



**TAHİL BAZLI BEBEK MAMALARINDA DOĞAL MİKOTOKSİN
ZEARALENONE VE METABOLİTLERİNİN BİYOİZLEMESİ**

Tevfik Bülent AKSAKAL

**DOKTORA TEZİ
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

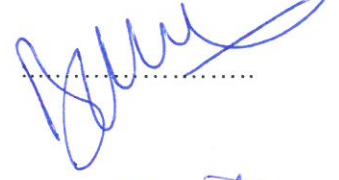
Şubat 2016

Tevfik Bülent AKSAKAL tarafından hazırlanan "Tahıl Bazlı Bebek Mamalarında Doğal Mikotoksin Zearalenone ve Metabolitlerinin Biyoizlemesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Bensu KARAHALİL

Farmasötik Toksikoloji, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Başkan : Prof. Dr. Sema BURGAZ

Farmasötik Toksikoloji, Gazi Üniversitesi

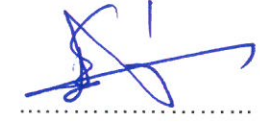
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Ender YARSAN

Farmakoloji ve Toksikoloji, Ankara Üniversitesi

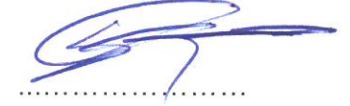
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Yalçın DUYDU

Farmasötik Toksikoloji, Ankara Üniversitesi

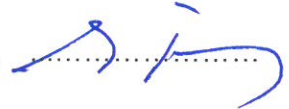
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye : Doç. Dr. Onur ERDEM

Eczacılık Bilimleri Merkezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Tez Savunma Tarihi: 09/02/2016

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Tevfik Bülent AKSAKAL

09.02.2016

TAHİL BAZLI BEBEK MAMALARINDA DOĞAL MİKOTOKSİN ZEARALENONE
VE METABOLİTLERİNİN BİYOİZLEMESİ

(Doktora Tezi)

Tevfik Bülent AKSAKAL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2016

ÖZET

Fusarium türü mantarların aktiviteleri esnasında oluşan Zearalenone ve metabolitleri tahıl ve dane içerikli gıdalarda östrojenik özellikleri ile insan ve hayvan sağlığı açısından birçok advers etkilere yol açarlar. Olası advers etkiler, özellikle bebek ve çocuklar kimyasallara ve toksik maddelere yetişkinlerden birçok farklı nedenden dolayı daha hassas olduklarından önem taşımaktadır. Bu çalışma ile piyasada ticari olarak satılan tahıl içerikli bebek mamaları Zearalenone ve metabolitlerinin (α -ZOL ve β -ZOL) varlığı yönünden analiz edilmiştir. Analiz için SPE yöntemi kullanılmış, mevcut çalışmalar farklı basamaklarda optimize edilerek metodun geçerli kılma çalışmaları yapılmış ve yöntem GC/MS'e uyarlanmıştır. Optimizasyon işlemleri sonucu geliştirilen yöntemin geçerli kılma parametrelerinin değerlendirilmesi sonucunda metodun seçici, doğru, duyarlı ve tekrarlanabilir olduğu görülmüştür. Analizi gerçekleştirilen tahıl bazlı 44 adet bebek mamasında ZON ve metabolitleri yönünden kontaminasyona delil olabilecek bir pozitif sonuçla karşılaşılmamıştır.

Bilim Kodu : 708.3.026
Anahtar : Bebek maması, mikotoksin, Zearalenone, östrojenik etki,
Kelimeler : SPE, GC/MS
Sayfa Adedi : 121
Danışman : Prof. Dr. Bensus KARAHALİL

BIOMONITORING OF THE NATURAL MYCOTOXINS ZEARALENONE AND ITS
METABOLITES IN CEREAL-BASED BABY FOODS

(Ph. D. Thesis)

Tevfik Bülent AKSAKAL

GAZİ UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

February 2016

ABSTRACT

Zearalenone and its metabolites which are produced during the activity of *Fusarium* genus of fungi pose several adverse effects on human and animal health for their estrogenic features on foods containing grain and cereals. Potential adverse effects are of high importance since infants and children are more susceptible to chemicals and toxic substances than adults due to a variety of reasons. In this study, grain containing infant formulas that are commercially available in the market were analyzed with regard to the presence of Zearalenone and its metabolites (α -ZOL ve β -ZOL). SPE method was employed for the analysis, validation of the method was performed by optimizing existing studies in different steps, and the method was adapted to GC/MS. Evaluating the validation parameters of the method developed after optimization processes, the method was determined to be selective, correct, precise and repeatable. In 44 grain containing infant formulas that were included in the analysis, none yielded positive result that could be considered as evidence of contamination with ZON and its metabolites.

Science Code : 708.3.026
Key Words : Infant food, mycotoxin, Zearalenone, estrogenic effect,
SPE, GC/MS
Page Number : 121
Supervisor : Prof. Dr. Bensu KARAHALİL

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım süresince akademik tecrübesini, bilgisini, desteğini ve hoşgörüsünü hiç esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Bensu KARAHALİL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Anabilim Dalı'nda ki hayranlık ve özenti duyguları içinde olduğum tüm değerli hocalarıma, öğretim üyelerine, özellikle bir süreliğine beraber çalışma fırsatı bulduğum, birçok yönüyle örnek almaya çalıştığım çok sevgili Prof. Dr. Ali Esat KARAKAYA hocama,

Tez çalışmalarına değerli katkıları ve yardımlarından dolayı Makine Mühendisi Ali Kasım ARKIN ve Yüksek Kimya Mühendisi Azime MERCAN'a,

Çalışmalarım sürecinde vefat eden babama ve tüm yaşadığım sıkıntılı süreçleri beraberce aşabildiğimiz aileme ve biricik kızım GÜLNİHAL'e,

Bana çok değerli bilim insanlarını tanıma fırsatı verdiği ve ufkumu açtığı için çok değerli büyük ülkeme sonsuz teşekkürler olsun...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xv
HARİTALARIN LİSTESİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mikotoksinler	3
2.1.1. Mikotoksinlere maruziyet ve advers etkileri	9
2.2. Zearalenone (ZON)	13
2.2.1. ZON'un tarihsel geçmişi	18
2.2.2. ZON kaynakları	20
2.2.3. ZON'un kimyasal yapısı	23
2.2.4. ZON'un (diyetle) vücuda alımı	23
2.2.5. Toksikokinetik	24
2.2.6. Etki mekanizması	30
2.2.7. ZON'un detoksifikasyon ve biyodegradasyonu	36
2.2.8. Toksisite verileri ve yasal düzenlemeler	40
2.2.9. Gıdalarda ZON tayini	44
2.3. Gaz kromatografi-kütle spektrometrisi (GC/MS)	45

Sayfa

2.3.1. Gaz kromatografisi	45
2.3.2. Kütle spektrometrisi	46
2.3.3. GC/MS'de verilerin elde edilmesi	49
2.3.4. GC/MS ile nitel ve nicel analiz.....	50
2.3.5. Türevlendirme	51
2.4. Katı faz ekstraksiyonu metodu	51
2.4.1. SPE metodunda maddelerin ayrılma prensipleri	54
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	55
3.1. Materyal	55
3.1.1. Numune Temini.....	55
3.1.2. Cihaz, sarf malzeme ve ekipmanlar	56
3.1.3. Kimyasal maddeler	56
3.1.4. Analitik standart maddeler.....	57
3.1.5. Stok çözeltilerin hazırlanması	57
3.2. Yöntem.....	58
3.2.1. Gaz kromatografi-kütle spektrometrisi (GC/MS) çalışmaları	58
3.2.2. Analiz yöntemi geliştirme.....	59
3.2.3. Ekstraksiyon çözücüsünün seçimi	60
3.2.4. Ekstraksiyon çözücüsünün uygun hacminin araştırılması	60
3.2.5. Numuneden analitlerin ekstraksiyonu	60
3.2.6. SPE aşaması	62
3.2.7. Türevlendirme basamağı	64
4. BULGULAR	69
4.1. Gaz kromatografi çalışmasının sonuçları	69
4.1.1. SCAN modda analitlerin değerlendirilmesi.....	69
4.1.2. SIM modda analitlerin değerlendirilmesi	73
4.1.3. Analitlerin türevlendirme basamağı	76

Sayfa

4.2. Yöntemin gerçek örneklere uygulanması ve geçerli kılınması.....	78
4.2.1. Özgünlük.....	78
4.2.2. Doğrusallık	80
4.2.3. Doğruluk, geri kazanım ve kesinlik.....	83
4.2.4. Teşhis sınırı	86
4.2.5. Tayin sınırı	87
4.3. Çalışma sonuçlarının değerlendirilmesi.....	87
5. TARTIŞMA	93
6. SONUÇ	101
KAYNAKLAR.....	103
EKLER.....	117
EK-1. % Geri Kazanımın hesaplanması, teşhis sınırı, tespit sınırı hesaplanmasına ait formüller	119
ÖZGEÇMİŞ.....	121

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Bebek ve çocuk sağlığı için önem arzeden mikotoksinler	6
Çizelge 2.2. Dünya çapında gıda ve yemlerin ZON ile kontaminasyon durumları	14
Çizelge 2.3. Gıdalarda birlikte bulunabilen mikotoksinler	17
Çizelge 2.4. ZON'un hayvan modellerinde akut toksisitesi	40
Çizelge 2.5. ZON için farklı ülkelerde gıda ve yemlerdeki maksimum limitler	42
Çizelge 2.6. ZON için belirlenen maksimum limitler	44
Çizelge 3.1. Analiz edilen numunelere ait bilgiler	55
Çizelge 3.2. Kullanılan cihaz, sarf malzeme ve ekipmanlar	56
Çizelge 3.3. Analizde kullanılan kimyasal maddeler	56
Çizelge 3.4. Referans standart maddeler	57
Çizelge 3.5. Perflorotribütilamin'e ait karakteristik iyonlarına ait standart değerler	58
Çizelge 3.6. GC/MS analiz parametreleri	59
Çizelge 3.7. GC fırın sıcaklık programı	59
Çizelge 4.1. ZON-2TMS, α -ZOL-3TMS ve β -ZOL-3TMS bileşiklerinin GC/MS verileri	76
Çizelge 4.2. ZON, α -ZOL ve β -ZOL'a ait 0, 5, 10, 20, 30 ng/mL'lik çalışma aralığı için regresyon eğrisinin özellikleri	82
Çizelge 4.3. ZON, α -ZOL ve β -ZOL'a ait 0, 1, 2, 3, 4 ng/mL'lik çalışma aralığı için regresyon eğrisinin özellikleri	83
Çizelge 4.4. ZON'un 5, 10, 20 ng/mL konsantrasyonları için ortalama geri kazanım, ortalama doğruluk (%) ve kesinlik	85
Çizelge 4.5. ZON'un 1, 2, 3 ng/mL konsantrasyonları için ortalama geri kazanım, ortalama doğruluk (%) ve kesinlik	85
Çizelge 4.6. α -ZOL'ün 5, 10, 20 ng/mL konsantrasyonları için ortalama geri alım, ortalama doğruluk (%) ve kesinlik	85

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.7. α -ZOL'ün 1, 2, 3 ng/mL konsantrasyonlar için ortalama geri kazanım, ortalama doğruluk (%) ve kesinlik	86
Çizelge 4.8. β -ZOL'ün 5, 10, 20 ng/mL konsantrasyonları için ortalama geri alım, ortalama doğruluk (%) ve kesinlik	86
Çizelge 4.9. β -ZOL'ün 1, 2, 3 ng/mL konsantrasyonları için ortalama geri alım, ortalama doğruluk (%) ve kesinlik	86
Çizelge 5.1. ZON ve metabolitleri ile tahıl, darı ve ürünlerinde yapılmış benzer çalışmalar	96

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Zearalenone ve metabolitlerinin kimyasal yapısı	23
Şekil 2.2. ZON'un metabolizması ve mikotoksikozis yolağı	26
Şekil 2.3. ZON'un çeşitli hayvan türleri ve insanda in vivo metabolizması	26
Şekil 2.4. Gaz kromatografi cihazının şematik gösterimi	46
Şekil 2.5. Kütle spektrometrisinin bileşenleri	47
Şekil 2.6. SPE kolonu ve yapısı	53
Şekil 3.1. Analizde kullanılacak TBME miktarı	61
Şekil 3.2. Türevlendirme sıcaklığı ve türevlendirme zamanı	65
Şekil 3.3. 90 °C'de 30 dakika türevlendirilmiş analitlere ait kromatogram	66
Şekil 3.4. 90 °C'de 60 dakika türevlendirilmiş analitlere ait kromatogram	66
Şekil 3.5. 60 °C'de 60 dakika türevlendirilmiş analitlere ait kromatogram	67
Şekil 4.1. 3 mg/L konsantrasyonda ZON, α -ZOL, ve β -ZOL içeren standart çözelti	69
Şekil 4.2. ZON-2TMS bileşiğinin iyon spektrumu	70
Şekil 4.3. ZON-2TMS bileşiğinin karakteristik iyonlarının kromatogramı	70
Şekil 4.4. ZON-2TMS bileşiğinin iyon spektrumu	70
Şekil 4.5. α -ZOL-3TMS bileşiğinin kromatogramı	71
Şekil 4.6. α -ZOL-3TMS bileşiğinin karakteristik iyonlarının kromatogramı	71
Şekil 4.7. α -ZOL-3TMS bileşiğinin iyon spektrumu	71
Şekil 4.8. β -ZOL-3TMS bileşiğinin kromatogramı	72
Şekil 4.9. β -ZOL-3TMS bileşiğinin karakteristik iyonlarının kromatogramı	72
Şekil 4.10. β -ZOL-3TMS bileşiğinin iyon spektrumu	72
Şekil 4.11. ZON-2TMS bileşiğinin iyon spektrumu	73

Şekil	Sayfa
Şekil 4.12. ZON-2TMS bileşiğinin karakteristik iyonlarının kromatogramı	73
Şekil 4.13. α -ZOL-3TMS bileşiğinin kromatogramı	74
Şekil 4.14. α -ZOL-3TMS bileşiğinin karakteristik iyonlarının kromatogramı	74
Şekil 4.15. β -ZOL-3TMS bileşiğinin kromatogramı	75
Şekil 4.16. β -ZOL-3TMS bileşiğinin karakteristik iyonlarının kromatogramı	75
Şekil 4.17. Türevlendirme sıcaklığının türevlendirme verimine etkisi	77
Şekil 4.18. Türevlendirme sıcaklığının türevlendirme verimine etkisi	77
Şekil 4.19. Türevlendirme sıcaklığının türevlendirme verimine etkisi	78
Şekil 4.20. Boş mama örneğinin analiziyle elde edilen kromatogram	79
Şekil 4.21. ZON, α -ZOL ve β -ZOL standartlarının eklendiği mama örneğinin analiziyle elde edilen kromatogram	79
Şekil 4.22. Boş ve ekleme yapılmış örneklerin kromatogramlarının birlikte gösterilişi	80
Şekil 4.23. Numuneye ZON eklenerek elde edilen kalibrasyon eğrisi (1. tekr.)	81
Şekil 4.24. Numuneye α -ZOL eklenerek elde edilen kalibrasyon eğrisi (1. tekr.)	81
Şekil 4.25. Numuneye β -ZOL eklenerek elde edilen kalibrasyon eğrisi (1. tekr.)	81
Şekil 4.26. Numuneye ZON eklenerek elde edilen kalibrasyon eğrisi (2. tekr.)	82
Şekil 4.27. Numuneye α -ZOL eklenerek elde edilen kalibrasyon eğrisi (2. tekr.)	82
Şekil 4.28. Numuneye β -ZOL eklenerek elde edilen kalibrasyon eğrisi (2. tekr.)	83
Şekil 4.29. Analiz edilen numuneye ait kromatogram	90
Şekil 4.30. Analiz edilen numunede ZON'a ait iyonların SIM taraması	90
Şekil 4.31. Analiz edilen numunede α -ZOL'a ait iyonların SIM taraması	91
Şekil 4.32. Analiz edilen numunede β -ZOL'a ait iyonların SIM taraması	91
Şekil 4.33. Çevre şartlarında bekletilmiş numuneye ait kromatogram	92

Şekil	Sayfa
Şekil 4.34. Çevre şartlarında bekletilmiş numunede ZON'a ait iyonların SIM taraması	92
Şekil 4.35. Çevre şartlarında bekletilmiş numunede α -ZOL'a ait iyonların SIM taraması	92
Şekil 4.36. Çevre şartlarında bekletilmiş numunede β -ZOL'a ait iyonların SIM taraması	92

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Fusarium hasarlı başak	22
Resim 2.2. Fusarium hasarlı başak	22
Resim 2.3. Fusarium enfekte buğday	22
Resim 2.4. Fusarium enfekte mısır	22

HARİTALARIN LİSTESİ

Harita	Sayfa
Harita 2.1. Dünya çapında tarım alanlarında sıkça karşılaşılan mikotoksinler	8

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
$\alpha\text{-ER}$	α -östrojen reseptörleri
$\beta\text{-ER}$	β -östrojen reseptörleri
$\alpha\text{-ZAL}$	α -zearalanol
$\beta\text{-ZAL}$	β -zearalanol
$\alpha\text{-ZOL}$	α -zearalenol
$\beta\text{-ZOL}$	β -zearalenol
$\mu\text{g/kg}$	Mikrogram/kilogram
$\mu\text{g/ml}$	Mikrogram/mililitre
$\mu\text{g/L}$	Mikrogram/litre
μm	Mikrometre
ACN	Asetonitril
a_w	Su aktivitesi değeri
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil)- trifloroasetamid
BSTFA:TMCS (99:1)	N,O-Bis(trimetilsilil)-trifloroasetamid: Trimetilklorosilan
C_8	Oktil
C_{18}	Oktadesil
$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_5$	6-[10-hidroksi-6-okso-trans-1-undekanil]- β
$\text{CD}3^+$	T lenfositler
$\text{CD}4^+$	T4 lenfositler; yardımcı, teşvik edici hücreler
$\text{CD}8^+$	T8 lenfositler, baskılayıcı veya sitotoksik hücreler
CH_2	Etilen
CH_3	Metil
CH_4	Metan
CO_2	Karbondioksit

Simgeler	Açıklama
CYP17	3 α - ve 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz enzimleri
Da	Dalton
eV	Elektron volt
g	Gram
H₂O	Su
H₂O₂	Hidrojen peroksit
LD₅₀	Letal Doz 50
M	Molekül
MeOH	Metanol
MeOH/ACN	Metanol/ asetonitril
MgSO₄	Magnezyum sülfat
mg	Miligram
mg/kg	Miligram/kilogram
mg/L	Miligram/litre
M+	Moleküler iyon
mL	Mililitre
m/z	Kütle/yük
ng/g	Nanogram/gram
ng/kg	Nanogram/kilogram
ng/mL	Nanogram/mililitre
NH₂	Amin
MSTFA	N-metil-N-trimetilsilil trifloroasetamid
pH	Asitlik veya bazlık derecesi
ppm	Milyonda bir kısım
PFTBA	Perflorotribütilamin
r²	Tanımlayıcılık katsayısı
ss	Santisaniye
TBME	Tersiyer bütıl metil eter
TMCS	Trimetilklorosilan
TMS	Trimetilsilil
TMSDEA	N-Trimetilsilildietilamin
V	Volt

Simgeler**Açıklama****V/cm**

Volt/santimetre

Kısaltmalar**Açıklama****AAS**

Atomik Absorbsiyon Spektrometre

AFLAs

Aflatoksinler

ATA

Alimenter toksik alöki

CI

Kimyasal iyonizasyon

EI

Elektron impakt

EM

Elektron çoğaltıcı

ESI

Elektron sprey iyonizasyon

ELISA

Enzim bağımlı immunosorbent yöntemi

FAB

Hızlı-atom bombardmanı

FAO

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü

FB

Fumonisinler

FD

Flame desorpsiyon

FI

Flame iyonizasyon

FSH

Folikül stimüle edici hormon

GC

Gaz kromatografi

GC/MS, GC-MS-MS

Gaz kromatografi-kütle spektrometre

HPLC

Yüksek performanslı sıvı kromatografi

HPLC-FLD

Yüksek performanslı sıvı kromatografi (floresans dedektör) veya kütle spektrometrik algılama

HPLC-MS ve HPLC-MS-MS

Likit kromatografi bağlı kütle algılama kombinasyonları

hPXR

Ksenobiyotik algılayan nükleer reseptör

HSCAS

Aluminosilikat

Hsp90

Isı-şok protein 90

IAC

Immun affinity kolon

IARC

Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı

IL-2

Interleukin 2

Kısaltmalar	Açıklama
IL-5	Interleukin 5
İTK	İnce tabaka kromatografisi
LC/MS veya LC/MS/MS	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi- kütle spektrometrisi
LH	Lüteinize edici hormon
LLE	Sıvı-sıvı ekstraksiyon
LOD	Teşhis sınırı
LOQ	Tayin sınırı
MALDI	Matris destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon
MCF-7	Meme kanserine model hücre hattı
ML	Maksimum limit
MS	Kütle spektrometre
NIST	National Institute of Standards and Technology
NK	Natural killer; doğal öldürücü hücre
NOEL	Gözlenebilir etki oluşturmayan düzey
OTA	Okratoksin A
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
PCB	Poliklorlu bifenil
PD	Plasma desorpsiyon
PMTDI	Geçici maksimum tolere edilebilir günlük alım
RAL	Rezorsilik asit laktonlar
RIA	Radioimmun assay
RNA	Ribonükleik asit
RPM	Dakikada devrim
SCAN	Tüm iyonların taranması
SIM	Seçili iyon taraması
SIMS	İkincil iyon kütle spektrometre
SPE	Katı faz ekstraksiyonu
T-2	T-2 toksin
TDI	Kabul edilebilir günlük alım
TLC	İnce tabaka kromatografisi
TS	Thermosprey iyonizasyon

Kısaltmalar**Açıklama****vb.**

ve bunun gibi

ZAN

Zearalanone

ZEA

Zearalenone

ZON

Zearalenone

1.GİRİŞ

Gıda güvenliği, insan sağığı için öncelikli konuların başında gelir. Günümüzde, sürekli artan dünya nüfusuna yetecek miktarda ve nitelikli gıda maddesi üretimi, arz-talep dengesinin bozulması gibi birçok olumsuzluklar, gıda sektöründe karşılaşılan en önemli problemlerin başında gelir. Özellikle ihtiyacı karşılayabilmek için tarımsal uygulamalardan başlayarak, üretim aşamasının sonuna, hatta paketlemeye kadar süren tüm aşamalarda kullanılan kimyasal maddeler, insan vücudunda akut ve kronik pek çok sağık sorununa yol açabilmektedir. Gıdalara farklı amaçlarla bilinçli olarak katılan ve gıda katkı maddeleri olarak adlandırılan kimyasal maddeler dışında, istem dışı bulaşan çeşitli kontaminantlar, tarımsal kontaminantlar gibi kimyasallar da ekonomik kayıplara ve tüketiciler açısından çeşitli sağık sorunlarına yol açmaktadır [1, 2].

Endokrin bozucu kimyasallar, özellikle son yıllarda bilim çevrelerinin dikkatini çekmiş ve bu alandaki çalışmalar artmıştır. Bunun nedeni bu maddelerin hem insan sağığı hem de diğer canlılara yönelik oluşturduğu olumsuz etkilerdir. Bu kimyasallar, omurgalıların endokrin sistemleri ile etkileşime girdikleri için endokrin sistemi bozan kimyasallar veya endokrin bozucular olarak sınıflandırılmışlardır. Bu kimyasal bileşikler ve maddeler kullandığımız günlük ürünler, plastik şişe, kaplar ve değişik malzemeler, metal gıda kutularının kaplaması, deterjanlar, alev geciktiriciler, gıda, oyuncak, kozmetik, böcek ilaçları gibi geniş bir alanda bulunmaktadır. Endokrin bozucular insan ve diğer canlılarda üreme, sinir sistemi ve hormonal sistem üzerinde olumsuz etkiler meydana getirmektedirler. Bu kimyasal bileşik ya da maddeler organizmada özellikle hormonların taşıdığı sinyalleri değiştirerek veya onları taklit ederek organ, doku ve hücrelerin normal fonksiyonlarını etkilerler [3, 4].

Endokrin bozucu kimyasallar benzer özellikteki kimyasal yapılarıyla değil, canlı organizmalarda oluşturdukları etkinin ortak olması nedeniyle aynı isim altında sınıflandırılırlar. Her geçen gün bilimsel çalışmalar neticesinde yeni bir endokrin bozucu keşfedilmektedir. Etki alanı içinde öncelikli olarak endokrin sistemin olması, canlılığın devamı olan üremenin olumsuz yönde etkilenmesi, gelecek

nesillerde doğuracağı birçok istenmeyen sonuç söz konusu olduğundan, endokrin bozucular üzerinde yapılan çalışmaların önemi artmaktadır. Ayrıca, gelişen, kendini yenileyen teknoloji ve analiz metodları yeni keşiflerle, bilgi birikimiyle bu tür çalışmalarda farkındalığın artmasına yardımcı olmaktadır [4].

Fusarium türü mantarlar tarafından üretilen Zearalenone endokrin bozucu olarak tanımlanmış bir mikotoksindir. Bitkisel kaynaklı olan bu gıda kontaminantına maruziyet hayvanlar ve insanlar için östrojenik etkisinden dolayı önem arz etmektedir. Bilhassa bebekler, yaşam sürecinin erken döneminde bulunan çocuklar bitkisel kaynaklı mama ve benzeri gıda ürünleriyle beslenmeleri, kimyasalların zararlı etkilerine erişkinlerden çok daha duyarlı olmaları nedeniyle yüksek risk grubunda yer alırlar [5, 6].

Sunulan bu çalışma piyasada ticari olarak satılan tahıl bazlı bebek mamalarının Zearalenone, metabolitleri α -Zearalenol ve β -Zearalenol ile kontaminasyon durumu, teşhis ve tayin sınırı birçok literatürdeki metodlara göre daha yüksek olan, relatif olarak düşük ölçekli saha taraması ve metod geliştirme çalışmasıdır. Bu çalışmada, piyasada ticari olarak satılan tahıl bazlı bebek mamalarında sıklıkla kullanılan örnek hazırlama tekniği *Katı Faz Ekstraksiyonu* (Solid Phase Extraction) yöntemi ile optimizasyon çalışması yapılarak, sonuçlar Gaz Kromatografi Kütle Spektrometre cihazı ile analiz edilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikotoksinler

Gıda maddelerine, üretim öncesi, üretim sürecinde ve tüketime kadar mevcut şartların oluşumlarına imkan sağladığı oranda birçok patojen ve saprofit karakterde küf mantarı (fungus) dahil olmaktadır. Bu funguslar, üründe kalite ve miktar yönünden kayıplara sebep oldukları gibi, oluşturdukları toksinlerle de insan ve hayvan sağlığı açısından önemli tehlikeleri beraberinde getirmektedirler. Tarım ürünleri, bitkisel yağ, çeşitli tüketim maddeleri ve hayvan yemleri gibi, küf mantarlarından zarar görmüş besinler; süt, peynir gibi süt mamülleri; et, sucuk, sosis, salam gibi fermente et ürünleri ve hayvansal kaynaklı diğer ürünlerdeki kalıntılar, insan ve hayvan gıdalarında mikotoksin kontaminasyonu için temel kaynaklar olarak görülmektedir [7, 8].

Belirli koşullar altında bitkinin doku veya hücreleri arasına yerleşmiş (endofitik) mantarlar tarafından üretilen mikotoksinler diğer canlı organizmalarda advers etkilere neden olurlar. Bitkilerle mantar etkileşimleri oldukça karmaşık bir durum gösterir. Mantarlar saprofit olabilir, ölü organik maddelerden beslenir veya konak bitkide endofit olarak yaşarlar. Her iki durumda çevresel stres, insektlerin oluşturduğu mekanik hasar, bitki hastalığı, kolonizasyona yatkınlık, büyüme ve toksin üretimini belirleyici faktörler arasında yer alır. Mantarlar hem bitkide gelişir hemde olgun tohum tanelerini işgal ederler. Bu endofit yaşam şekli; bir organizmanın içinde simbiyoz (ortak/birlikte yaşam) biçimde yaşayan diğer bir organizma şeklinde açıklanan “endosimbiont” olarak tanımlanır. Mantarlar bitkiyle kolonize yaşar ve genellikle bitkide herhangi belirgin bir hastalığa neden olmazlar. Mantarların yaşam döngüsünde oluşan mikotoksinler, çoğunlukla bitkilerin toksisitesinden sorumlu tutulduğu nedenler arasındadır. İnsan sağlığını tehdit eden mantarların birçok türü mısır, pirinç, buğday, darı, arpa, yulaf, yer fıstığı, pamuk tohumu, soya fasülyesi gibi tarım ürünlerine lokalize olur [9, 8]. Bu tarım ürünleri insan gıdaları ve hayvan yemlerinin üretiminde kullanılan temel unsurlardır. Besi ya da süt amaçlı yetiştirilen çiftlik hayvanları, eşdeğerleri ve laboratuvar hayvanlarının beslenmesinde kullanılan temel tüketim maddeleridir [9].

Mikotoksin terimi, mantar anlamına gelen “myco” ve zehir anlamına gelen, canlı organizmalar tarafından üretilen “toxin” kelimelerinin birleşmesinden türetilmiştir [3, 5]. Bilim çevrelerince daha önceleri herhangi bir vakayla ilişkilendirilmemiş mikotoksin kavramının, 1962 yılında Londra (İngiltere) yakınlarında bir bölgede yaklaşık 100 000 hindi telef olduktan sonra farkına varılmıştır. Bu vaka, hakkında çok fazla bilgi bulunmayan "hindi X hastalığı", kontamine fıstık içeren hayvan yeminde bulunan *Aspergillus flavus*'un (aflatoksinler) ikincil metabolitlerinden kaynaklanmıştır. *Aspergillus* türü mantarlar özellikle kuşlarda solunumla ilgili ciddi bir hastalık olan *Aspergillosis*'e yol açmaktadır. Mikotoksinler, doğada en yaygın bulunan *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* gibi bazı iplikli mantar türlerinin uygun nem ve ısı koşullarında oluşturdukları sekonder fungal metabolitlerdir. Oluşan bu metabolitler, mantarların normal gelişimi ve üremesi için gerekli değildir ve metabolizma artığı olarakta adlandırılırlar. Bu toksinler farklı yollardan maruziyet sonucu insanlar, hayvanlar, bitkiler ve diğer mikroorganizmalarda biyokimyasal, fizyolojik ve/veya patolojik değişimlere neden olurlar [6, 9, 10].

Mikotoksin oluşturan mantarlar dünyanın her tarafında yaygın şekilde bulunurlar. Gerek sahada gerekse harmanlama, depolama, taşıma ve gıda hazırlama sırasında şartlar (özellikle ısı ve rutubet) mantarların gelişmesine uygun olduğu takdirde kolaylıkla üreyebilirler. Neticede, ham madde olarak kullanılan tarım ürünleri, bunlardan hazırlanan yem ve besinler, mantarların istilasına uğrayarak mikotoksinlerle kolayca kirlenebilirler. Bu kirlenmenin doğurduğu maruziyetin hayvanlarda özellikle farkına varılmadan meydana gelmesi, gerek hayvan sağlığı ve ekonomik işletmecilik yönünden, gerekse kalıntıları vasıtasıyla doğuracakları toplum sağlığını olumsuz etkileyecek birçok risk içermesi bakımından günümüzde en çok ilgi doğuran konulardan birini oluştururlar [11, 12].

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO; The Food and Agriculture Organization of the United Nations) dünyada üretilen hububatın yaklaşık % 25'inin mikotoksinlerle kontamine olduğunu öngörmektedir. Ayrıca fındık, fıstık, çeşitli baharatlar, meyve ve bunlardan üretilen yan ürünler gibi diğer gıdalar, bu mantar metabolitleri ile kontamine olabilir [13]. Önemli ham maddelerin etkilenmesi halk

sağlığı açısından sonuçları daha dramatik bir hale sokabilir. Hububatlar içinde pirinç dünyada en çok tüketilen gıda maddesidir. Pirinçten sonra mısır ve buğday gelir. Dünya üzerinde yaklaşık 4 milyara yakın insanın bu gıdalarla beslendiği tahmin edilmektedir. Bunun yanında kontaminasyon kontrolü için yapılan analiz sonuçlarına göre genel olarak, pirinçte mikotoksin varlığının diğer tarım ürünlerinden daha az olduğu görülmüştür. Tarımsal ürünlerde yaşanan bu olumsuzluklar, ülkeler arası ticaret, çiftçilerin ürün tercihi ve yetiştiriciliği gibi birçok noktada tarım politikalarını belirleyici unsurlar arasında yer alır [14].

Mantarların kendilerine özgü bir beslenme tarzları mevcuttur. Enerji kaynağı için organik bileşiklere ve biyosentez için de yapısında karbon ihtiva eden kaynaklara gereksinim duyarlar. Mantarlar, kendi besinini kendi üretemeyen, canlılığın devamı için ototroflardan ya da diğer heterotroflardan besin alması gereken heterotrof (dışbeslenen) canlılar sınıfında kabul edilirler. Mantarlar aerobik organizmalardır. Büyük bir çoğunluğu, aerobik karakter taşır ve oksijenin bulunduğu ortamlarda gelişip çoğalabilirler. Türler arasında ki önemli farklılık oksijen gereksinimleridir. Ortamdaki CO₂ yoğunluğu % 10'un üstüne çıkması durumunda mantar mikroflorası hızla baskı altına alınır. Doğada binlerce tür mantar vardır. Mantarlar arasında en sık rastlanan ve hakkında en çok bilgi sahibi olunanlar Aspergillus, Penicillium ve Fusarium türleridir. Bunların ürettikleri mikotoksinlerle ilgili her geçen gün artan ciddi bir bilgi birikimi oluşmaktadır. Bu mantarlar tarafından üretilen tespit edilebilmiş 300'den fazla farklı toksik etkilere sahip mikotoksin çeşidi vardır [9, 15, 16].

Tarım ürünleri ve gıdalarda birçok toksik etkili mantar olmasına rağmen dünya çapında halk sağlığı açısından risk taşıyan ve sıkça karşılaşılan mantarlar tarafından üretilen önemli mikotoksinler; aflatoksinler, okratoksin, fumonisin, deoksinivalenol, zearalenone, trikotesenler ve ergot alkaloidleridir. Maruziyet sonucu yüksek risk grubunda olmaları nedeniyle bebek ve çocuk sağlığı açısından çok daha önemli olan bu mikotoksinler ve öne çıkan advers etikleri Çizelge 2.1'de gösterilmiştir [15, 16].

Çizelge 2.1. Bebek ve çocuk sağlığı için önem arzeden mikotoksinler [15]

MANTAR	Mikotoksinler	Advers Sağlık Etkileri
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. Parasiticus</i>	Aflatoksinler	Kusma, hepatit, karaciğer kanseri
<i>Fusarium verticillioides</i>	Fumonisinler	Kusma, nöral tüp defektleri, yemek borusu kanseri
<i>Fusarium culmorum</i>	Deoxynivalenol	Kusma
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	T-2 toksin	Gıda kaynaklı toksik lökopeni (ATA; Alimenter toksik alöki), hemoraji
<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. niger</i>	Okratoksinler	Balkan nefropatisi, böbrek kanseri
<i>Penicillium expansum</i>	Patulin	Kusma, kanser (şüpheli)
<i>Fusarium graminearum</i>	Zearalenone	Östrojenik etkiler, rahim ağzı kanseri (şüpheli)
<i>Claviceps purpurea</i>	Ergot alkaloidleri	Ergotizm

Mikotoksinler biyolojik bileşiklerin çok farklı bir grubunda yer alır. Kimyasal yapıları incelendiğinde çoğunun doymamış halkalı (aromatik) yapıda, daha az bir kısmının ise açık zincirli (alifatik) bileşiklerden oluştuğu görülür. Bakteri toksinlerinin aksine genel olarak, düşük molekül ağırlığı olan (çoğunlukla <700 Da), birbirinden farklı fiziksel özellik ve kimyasal yapı (piranlar, antraknonlar, kumarinler, makrolidler, steroidler, siklik polipeptidler) gösterirler. Bu özellikleri nedeniyle değişik matrislerden tespitlerinde farklı metod ve analiz yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır [15].

Gıda ve yemlerin mikotoksinlerle kontaminasyonu, yüksek oranda çevresel koşullara bağlı olan mantar gelişimi ve toksin üretimine göre değişir. Mantarlarla mikotoksin oluşumu için koşullar büyük ölçüde değişken olabilir. Fakat genellikle besin durumu, nem oranı, pH, sıcaklık, ortamda ki spesifik gazların varlığı ya da yokluğu, konak türü ve fiziksel yapısına bağlıdır. Bu nedenle potansiyel toksik etkili mantarın varlığı, bulunduğu ortamda mantar tarafından sentezlenmiş mikotoksinin de var olduğu anlamına gelmez. Ayrıca mikotoksinlerin bulunması, ortamda öncesinde veya mevcut zamanda belirli bir mantar türü olduğuna da kanıt olarak gösterilemez. Bireysel mantarlar çoğunlukla farklı mikotoksin kombinasyonlarını üretirler. Mantarlarda interaktif etki nedeniyle bu olasılık sıklıkla gözlemlenir. Ayrıca yıllar arasında gerçekleşen iklimsel değişkenlik, mikotoksin üretiminde ki tahmini oldukça karmaşık hale sokmakta ve zorlaştırmaktadır [9,17-19].

Rutubet, mantarların üremelerinde çok önemli faktörlerden birini oluşturmaktadır. Ortamda yüksek oranda bulunan rutubet, genellikle üreme üzerine olumlu etki

gösterir. Rutubet azaldıkça, mantarların çoğalmaları azalma veya sınırlanma yönünde bir eğilim gösterir [9, 11]. Mantarların rutubete olan gereksinimleri, türler arasında değişiklik gösterir. Mantarların gelişimleri için en uygun nem içeriği % 22-25 aralığındadır. Hasattan sonra depolama şartları da tahıl ve benzeri ürünlerin mantarlar tarafından işgaline neden olur. Büyüme döneminde optimal nem oranı ise % 12-18'dir. Mantar üremesinde bir diğer önemli faktör ise ısıdır. Mantarların üreyebildiği ısı aralığı oldukça geniştir ve rutubette olduğu gibi türler arasında farklılıklar gözlenir. Diğer faktörlerinde üremeyi teşvik yönünde uygun olması durumunda genellikle 20-30 °C aralığında gelişirler. Fakat genel olarak optimal ısı 0 °C ile 60 °C aralığında, hatta belirli türlerde daha yüksek sıcaklıklarda olabilir [9].

Bütün gıda maddeleri bünyesinde değişik oranlarda su içermektedir. Muhafaza esnasında ve tüketilene kadar gıdaların kalitelerinin korunmasında içerdiği su miktarı oldukça önemlidir. Su içeriğinin kontrolü ile gıdaların korunması prensibi kullanılan en eski yöntemlerden biridir. Mantarların üremesini etkileyen faktörlerden biride su aktivitesidir. Gıdada mevcut suyun buhar basıncının, aynı sıcaklıkta saf suyun buhar basıncına oranı olarak tanımlanan su aktivitesi (a_w), gıda maddesindeki suyun buhar basıncını değiştiren her faktörden aynı nispette etkilenir. Örneğin, gıdanın kuru madde oranında ki artış su aktivitesinin aksi yönde azalmasına neden olur. Genel olarak, gıdalarda bakteri ve maya kolonizasyonu, mevcut ortamda ki su aktivite değeri veya düşük pH değeriyle ilişkili olarak fungal değişikliklere neden olur. Bu kapsamda mantarla kontamine olmuş besin grupları baskın olarak tahıllar, dane yemler, fındık ve meyvelerdir [11, 17].

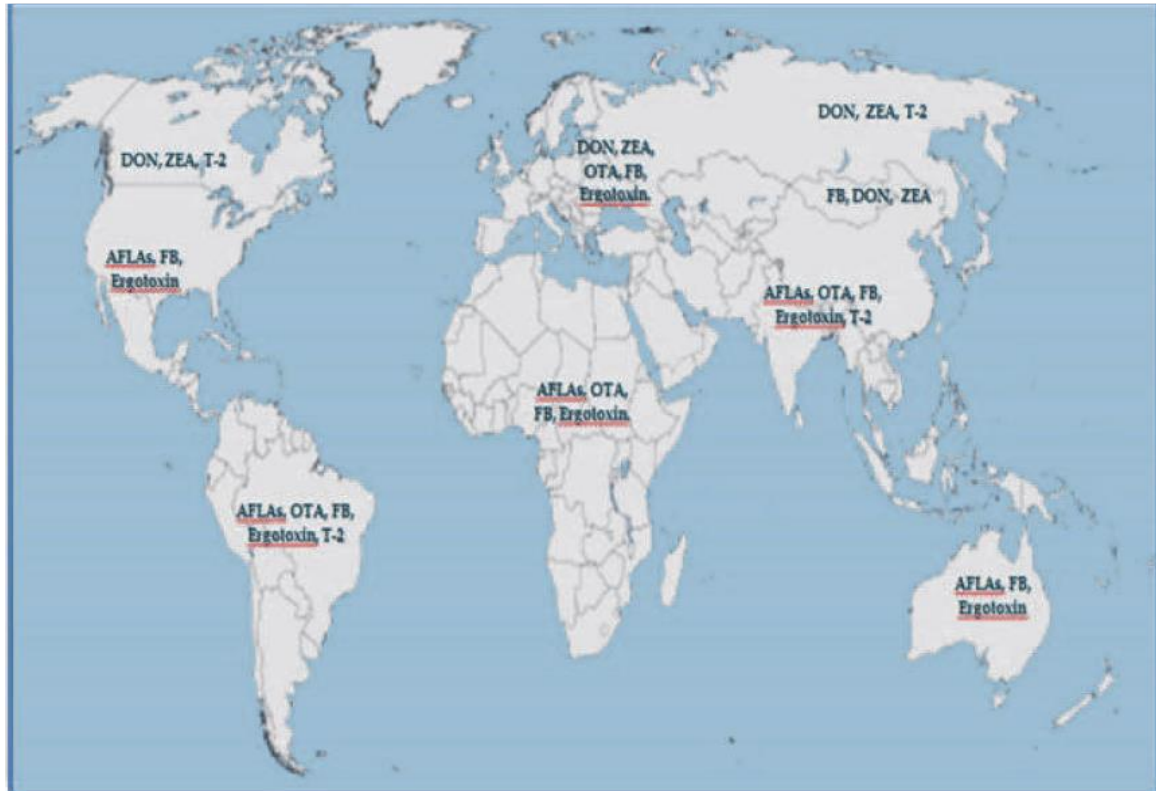
Gıda ve yemlerde küflenmeye neden olan, ürettikleri mikotoksinlerle halk sağlığı ve diğer canlılar açısından risk oluşturan mantarlar başlıca üç kaynaktan gelirler:

1: Bitkilere büyüme, gelişme sürecinde bitki paraziti (fitoparazit) olarak yerleşen, çoğunlukla ürünün üretiminin yapıldığı ekim alanlarından kaynaklanan ve bölgesel florada bulunan mantar türleridir. Bu grupta *Fusarium*, *Cladosporium*, *Claviceps*, *Pullaria*, *Rhizopus*, *Alternaria* gibi mantar türleri bulunur.

2: Hasat sonu ekim alanından bitkiyi kirletici olarak kontamine eden, tarlada doğal olarak bulunan mantar florasından, nispeten 20 °C civarında veya daha düşük sıcaklıkta ve % 60 oranında rutubet ortamına uyum sağlamış, ürünün depolandığı ambar şartlarında aktivitesini devam ettirebilen *Aspergillus* ve *Penicillium* türleridir.

3: Tarladan hasat edilmiş ürünün saklandığı depo koşullarının, mantarların ortam sıcaklığı, nem, ürün istifleme/saklama şekli ve benzeri koşullar açısından üremeye olanak sağladığı durumlarda ortaya çıkan *Fusarium*, *Sardarya*, *Popullaspora* ve *Aspergillus* türleridir [20].

Dünya çapında yaygın olarak bulunan tahıl, dane yemler gibi bitkisel bazlı gıda ve yem ürünleri kirleticisi mikotoksinler Harita 2.1’de harita üzerinde bölgesel dağılım olarak gösterilmiştir [21].



Harita 2.1. Dünya çapında tarım alanlarında sıkça karşılaşılan mikotoksinler (AFLAs: Aflatoksinler; FB: Fumonisinler; OTA: Okratoksin A; ZEA: Zearelenone; T-2: T-2 toksin) [21]

Zearalenone üreticisi *Fusarium* türlerinin ve toksinlerin gelişmesi için en önemli faktör iklim koşulları, özellikle düşük sıcaklık ve yüksek nemdir. Bu parametrelerin üremeyi teşvik yönünde gerçekleştiği uygun koşullarda *Fusarium* türü mantarlar bitkileri işgal ederler. Bu koşullar yıllar arasında iklimsel farklılığa bağlı olarak değişebilir. İklim koşulları uygun olduğu yıllarda yüksek sıklık ve yüksek düzeylerde oluşturmaktadırlar [21, 22].

2.1.1. Mikotoksinlere maruziyet ve advers etkileri

Mantarların bir bölümünün beşeri ve veteriner hekimlikte medikal tedavilerde (penisilinler, statinler) gıda sektöründe tüketilen gıdaların büyük çoğunluğunda, gıdanın, muhafaza ve konserve edilmesi, fermentasyon ve mayalanma, olgunlaşma olaylarında, hatta yeni kompleks bileşiklerin sentezlenmesinde destekleyici olarak birçok yararı vardır. Bunun yanında bazı türler ise uygun çevresel şartlarda sıklıkla gıda ve yem ham maddesi olarak kullanılan tahılları ve dane yemleri potent toksinleriyle (mikotoksin) kontamine etmektedirler. Mikotoksinlerin gıda hazırlama süreçlerinde, birçok pişirme tekniğinde kararlı olması, kolayca yıkımlanmaması gibi nedenlerle diyetten ürün çıkarılmadıkça maruziyetten kaçınmak imkansızdır [23].

Canlıları belirli özelliklerine göre gruplara ayırarak inceleyen, belirli bir biyosistematik sınıflandırmada tanımlayan taksonomide, filamentli mantarlar (hifli küfler) Mycobiota (funguslar âlemi) içinde Zygomycota, Ascomycota ve Deuteromycota bölümleri altında yer alır. Gıdalarda ve yemlerde bulunan *Fusarium* türü mantarlar Mycobiota'nın Deuteromycota alt sınıfında bulunmaktadır [24-26].

Mikotoksinlere maruziyeti ölçmek oldukça komplekstir [27]. Mantarlar tarafından üretilen bir toksinin tek başına ve/veya metabolitlerin doğru sayısal bir miktarının varlığı biyo-ölçüm için yetersiz bir biyolojik belirteç olarak sınıflandırılır. Biyolojik izleme çevre değişikliklerine canlıların tepkisinin ölçülmesi olarak tanımlanabilir [28, 29]. İzleme maksadıyla canlı organizmalar en sık kullanılan yöntem ve yoldur. Ancak izleme amacıyla transplant metodlar, canlılığını kaybetmiş veya canlılık

kabiliyetini kaybetmekte olan dokularda kullanılabilir. Bu toprak, hava ve su gibi ortamlar içinde geçerlidir. Örneğin likenler, yosunlar, vasküler bitkiler ve mantarlar havada partiküler halde bulunan veya uçuşan metalik kirliliğin pasif bir biyoizlemesi olarak başarıyla kullanılabilir [29]. Canlı organizma olan mantarların metabolizmaları esnasında oluşan toksinler yaşamsal faaliyetlerini sürdürdüklerine veya yaşamsal faaliyetlerini kaybetmiş olsalar bile önceki bir zamanda o ortamda bulunduklarına dair bir delildir. Gıda ve yem ham maddelerinde çevresel şartların imkan sağladığı oranda gelişebilen mantarların varlığının teyidinde, oluşturdukları mikotoksinler bir biyogösterge olarak kullanılabilir. Ayrıca mikotoksinlerin tayiniyle bitkinin veya daha sonraki aşamalarda fitoparazit olarak yerleştiği bitkilerden elde edilen tahıl ve dane yemlerde, bunlardan üretilen besinlerde varlıklarının biyoizlemesi gerçekleştirilebilir. Mantarların varlığı için biyogösterge olarak kullanılabilen mikotoksinler, elde edilen sonuçlara göre gıda ve yem ham maddesinin üretim aşamaları ve sonrasında, bunlardan üretilen gıda ve yemlerde mantarlarla mücadelede büyük rol oynayabilir [30-32].

Mikotoksinlere maruziyet kaynağı olması açısından tahıl, dane yem ve ürünleri, temel gıda maddesi olmaları, yem ham maddesi olarak yaygın kullanılmaları, toksik etkili küf gelişmesine, hasat öncesinde, hasat sırasında ve sonrasında mikotoksinlere hedef olmaları nedeniyle önemlidirler. Ayrıca tahıl, dane yemler gibi doğrudan veya dolaylı olarak kontamine yemlerle beslenen ve mikotoksin kalıntısı içeren hayvansal ürünler (süt, et, ve yumurta) sonucu ana bileşik ve türevleri canlı organizmalar için maruziyetin temel kaynağıdır [15, 33].

Genellikle bitkisel kaynaktan gelen mikotoksinler gıda alımı sonucu oral, inhalasyonla, deriyle temas yoluyla absorbe olarak veya toksik etkili mantarın yol açtığı mikotik bir enfeksiyon yoluyla, pasif maruziyet sonucu organizmaya alınırlar. Fakat belirgin şekilde mikotoksinlere en yaygın maruziyet yolu beslenme kaynaklı gelişen oral yoldur. İnhalasyon ve deri yoluyla maruziyet ise mesleki nedenle çoğunlukla tarım, daha düşük düzeyde gıda ve yem hazırlama sektöründe çalışan işçilerde söz konusudur [15, 34].

Mikotoksin çeşitleriyle kontamine bitki kaynaklı besinlerle beslenen insanlarda, evcil hayvanlarda görülenlere benzer şekilde, karmaşık nitelikli, karaciğer, böbrek, deri, kan, sinir sistemi ve hormonal denge bozukluklarıyla kendini gösteren bir tablo mevcuttur. Bu süreçte en belirgin olarak performans düşüklüğü, etkilenen organ ya da dokulara yönelik hastalık ya da ölümlerle sonuçlanan bir dizi advers etkiler meydana gelmektedir. Örneğin mikotoksinlere oral maruziyet sonucu gastrointestinal sistem veya kontakt deri irritasyonu, hematolojik parametrelerde değişiklikler, konjenital anomaliler ve doğum sonrası gelişimsel defektler söz konusudur. Bu etki alanında ki genişlik nedeniyle, insanlarda ve farklı hayvan türlerinde oldukça değişken yansımalar gözlenir. İnsanlar arasında genetik yapıdan dolayı farklı ırklar ve hatta aynı ırkın bireyleri arasında farklılıklar mevcut olması, etkide farklı yansımalar doğurmaktadır. Genel olarak mikotoksinler, çok çeşitli hücresel süreçleri etkiler ve toksik etkileri ile geniş bir yelpazede değerlendirilirler [15, 34].

Mikotoksinlere insanların maruz kalması sonucunda, etki açısından klinik semptomlar da dahil çok farklı belirtiler gözlenmektedir. Yüksek miktarda mikotoksin içeren gıdaların tüketimi insanlarda akut intoksikasyonla sonuçlanan ve mikotoksikozis olarak adlandırılan ağır vakalara neden olur. Mikotoksikozis terimi, bir mikotoksinin biyolojik bir sistemde ki toksisitesiyle ortaya çıkan bir sendromu tanımlamak için kullanılır. Yüksek maruziyet sonucu oluşan mikotoksikozis oldukça geniş bir yelpazede diğer hastalık semptomlarıyla karışan bir tablo gösterir. Bu nedenle birçok hastalık ve etiyolojisi şüpheli toksik tabloda, mikotoksikozis göz önünde bulundurulmalıdır. Sağlık açısından mikotoksinlerin bilinen en önemli toksik etkileri, yapılan deneysel çalışmalar sonucu ve doğal yaşanmış vakalardan edinilen verilerle çoğunlukla tanımlanmıştır. Fakat muhtemel sinerjik veya antagonize etkileri hakkında çok az bilgi mevcuttur. Bu durumun en büyük nedenlerinden birisi, belirli bir tür mantarın birden fazla farklı mikotoksin üretebilmesinden kaynaklanan zorluklardır. Düşük dozlarda maruziyet sıklığının ilerleyen süreçte ne tür kronik sağlık sorunlarına yol açtığı hakkında mevcut bilgiler ise oldukça sınırlıdır [9,18].

Mikotoksinlere düşük düzeyde kronik maruziyetin advers sağlık etkileri kanser dahil olmak üzere farklı değişiklikleri kapsar. Uzun dönemli düşük maruziyet, akut toksik etkiye yönelik semptomların olmaması, advers etkinin kronik düzeyde seyretmesi, mikotoksinleri ciddi bir halk sağlığı sorunu haline getirmiştir. Mikotoksinler değerlendirilirken sosyo ekonomik faktörler, yaşılan coğrafya, yıllar arası iklimsel değişikliklerin oluşturduğu farklılıklar ve diğer birçok toksik etkiyi olgunlaştırıcı risk göz ardı edilmemelidir [15].

Canlı organizmalara zarar veren mineraller, bitkisel, hayvansal ya da sentetik maddeler “toksik madde”, bu maddelere maruziyetle organizmanın reversibl ya da irrevesibl olarak hasar görmesi ise “toksisite” olarak tanımlanmaktadır. Doğada bulunan tüm ksenobiyotikler uygun yol ve uygun dozda canlı organizmaya verildiğinde toksik etki oluşturma potansiyeline sahiptir. Organizmayı alınan toksik maddenin nasıl ve ne ölçüde etkilediğı sorusunun cevabı, büyük oranda maddenin toksikokinetik profilinde yer alır. Kontamine kaynaktan maruziyetten sonra (oral, inhalasyon, deriyle temas yoluyla) bir mikotoksinin toksisitesini; alım, absorbsiyon, transformasyon, farmakokinetik, moleküller arası etkileşim, dağılım ve atılım gibi metabolik yollar belirler. Ayrıca tüm bu süreçlerde, mikotoksinin stabilitesi de göz ardı edilmemesi gereken önemli bir kriterdir [15, 35].

Laboratuvar hayvanlarında farklı kimyasalların toksisite dercesi tür farklılıklarına, yaş (fötus, genç ya da yaşlı), ve cinsiyet durumuna bağılı olarak değişim gösterir. Benzer nedenlerle bebekler ve çocuklar farklı toksinlere yetişkinlere göre daha duyarlı olarak kabul edilir. Çünkü düşük vücut ağırlığı, yüksek metabolizma hızı, farklı organ ve dokularda ki bir kısım metabolize edici enzimlerin henüz gelişmemiş ya da yetersiz olmasından kaynaklı düşük detoksifikasyon yeteneğı ve bazı organların fizyolojik gelişimini tam olarak tamamlamamış olması (örn: sinir sistemi) nedeniyle yüksek risk grubundadırlar [15].

Mikotoksinlerin bazıları alerjenik özellikleri nedeniyle otoimmün hastalıklara neden olabilirler. Birçok fungal enzim, yapısında karbonhidrat ihtiva eden, hücre duvarı sentezini bozarak etki gösteren glikopeptid antimikrobiyaller ile birlikte alerjenik özellik gösterirler. Bu enzimler sporlar içinde bulunur, mantarın büyüme ve gelişme

sürecinde ortama salınırlar. Örneğin *Aspergillus*, *Alternaria* ve *Cladosporium* türlerinin bir kısmı kapalı ortamda kolayca üreyebilmeleri nedeniyle, özellikle aerosol yolla maruziyet sonucu, yapılarında ki enzim ve protein içeriğinden kaynaklanan etkiyle potansiyel alerjeniktirler. Bazı mikotoksinler ise immunotoksik, genotoksik, teratojenik, karsinojenik veya mutajenik etki gösterirler [17, 36, 37].

Gıda ve yemlerin mikotoksinlerle, hasat veya hasat sonrası saklanması sürecinde uygun şartların oluşması ve bu nedenle daha fazla ortaya çıkmaları nedeniyle, ürünlerin mantar enfestasyonlarından korunması için en fazla önleyici çaba bu dönemlerde harcanmaktadır [34]. Mikotoksinlerin birçoğu pişirme, gıda hazırlama ve benzeri süreçlerde oldukça stabildir. Bu nedenle özellikle ısı ile işleme yıkımlanmaları için ısıya maruz kaldıkları sürenin ve benzeri işlemlerin çok fazla önemi yoktur [38].

2.2. Zearalenone (ZON)

Fusarium türü mantarlar aktif patojen mikroorganizmalar olup bitkiyi tarlada enfekte ederek hasattan önce bitkide birçok hastalığa yol açmakta ve doğada oldukça yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Dünya çapında ılıman ve sıcak iklim kuşağının hüküm sürdüğü ülkelerde yaygın toprak mantarı olarak bulunur ve bu nedenle tahılların düzenli kirleticisi olarak kabul edilirler. *Fusarium*lar, ürünü öncelikle tarlada etkileyen mantarlar olarak kabul edilmişse de, sonraki aşamalarda depolanmış tahıl, yem ve gıdalarda da yaygın olarak bulunurlar [39, 40].

Tarladaki *Fusarium* türüyle enfekte tahıllarda hasat öncesi ZON artışı beklenen bir durumdur. Fakat mısır, buğday, diğer tahıl ve dane bazlı hayvan yemi örneklerinde yapılan çalışmalar, doğal olarak oluşan yüksek düzeydeki ZON'un tarladan ziyade, uygun olmayan depolama şartlarından kaynaklandığını göstermiştir. Gıda kalitesinde nemden farklı olarak fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik kararlılığın belirlenmesinde, ölçümü kolay fizikokimyasal önemli bir parametre olarak su aktivitesi değeri yaygın olarak kullanılmaktadır. *Fusarium*lar genellikle ortalama 0,88-0,91 su aktivitesi aralığında veya % 23'ten daha fazla nem içeren koşullarda gelişebilmektedirler. ZON'un oluşması için belirlenen parametrelerden su aktivitesi

değeri 0,98, sıcaklık ise 25-30 °C aralığındadır. Hasat sonrası düşük miktarda mantarla kontamine tahılların, % 30 veya % 40'tan daha yüksek nem içeren ürün saklama koşullarında düzeyi artmaktadır [39, 40].

Günümüzde tüm dünya çapında tahıl ve benzeri ürünler veya bunlarla beslenen hayvanların, özellikle ZON başta olmak üzere diğer Fusarium türlerinden kaynaklı mikotoksinlerle kontamine olduğu yönünde güçlü kanıtlar vardır. Mantarla kontamine ürün veya maddelerin ticareti, mikotoksinlerin tüm dünyada farklı odaklara dağılmasına katkıda bulunmaktadır. İthal ürünlerin ithal edildiği ülkelerde ki odaktan gelen mevcut mantar varlığının uygun olmayan şekilde depolama, ürün bekletme, bölgesel iklim koşullarının üremeye olumlu katkıda bulunması gibi nedenlerden dolayı, odaktakinden daha ileri boyutlarda, tahmin ve takibi olanaksız sonuçlarla karşılaşmak söz konusu olmaktadır. Dünyanın farklı bölgelerinde gıda ve hayvan yemleri ham maddesi olarak kullanılan tahıl, dane yem ve yan ürünlerinde, yapılan analiz sonuçlarına göre ortalama ölçülmüş ZON ile kontaminasyon düzeyleri Çizelge 2.2'de gösterilmiştir [39].

Çizelge 2.2. Dünya çapında gıda ve yemlerin ZON ile kontaminasyon durumları [39]

Ülke	Ürün (ticari mal)	Dağılım aralığı (mg/kg, ppm)
Avrupa		
Bulgaristan	Buğday	≤ 0,12
<u>Hırvatistan</u>	Mısır tohumu	Ortalama 1,70
Finlandinavya	Yem ve tohum	0,022–0,095
Almanya	Buğday	0,001–8,04; 0,017–0,104
Almanya	Arpa	0,002–0,311
Almanya	Buğday, mısır, yulaf ürünleri	0,002–0,018
Almanya	Buğday	Ortalama 0,015
Almanya	Mısır	≤ 0,860
Almanya	Yulaf	≤ 0,021
Almanya	Mısır yan ürünleri	≤ 1,362
Almanya	Mısır bitkisi	≤ 0,553
Almanya	Mısır silajı	≤ 1,790
Almanya	Soya küspesi	≤ 0,211
Macaristan	Küflenmiş mısır (depolanmış)	0,01–11,8
İtalya	Mısır	0,004–0,15; 0,453
Hollanda	Buğday	0,020–0,231

Çizelge 2.2. Devam. Dünya çapında gıda ve yemlerin ZON ile kontaminasyonu
[39]

Ülke	Ürün (ticari mal)	Dağılım aralığı (mg/kg, ppm)
Avrupa		
Hollanda	Mısır yemi	3,1
Polonya	Buğday	0,01–2
İskoçya	Arpa (3 ay–1 yıl depolanmış)	2,1–26,5
Slovakya	Kanatlı yemi	0,003–0,086
İsviçre	Buğday	0,01–0,018; 0,01–0,121
İngiltere	Mısır yemi	0,02–1,8
İngiltere	Mısır	0,04–1,8
Yugoslavya	Yulaf	0,03–0,086
Yugoslavya	Arpa	0,021–0,03
Yugoslavya	Mısır	0,043–10
Yugoslavya	Süt sığırı yemi	0,14–0,96
Afrika		
Mısır	Tahıl	0,005–0,045
Mısır	Mısır daneleri	9,8–38,4
Fas	Mısır	0,0135–0,0165
Nijerya	Küflü acha (<i>Digitaria exilis</i>)	0,2–0,6
Nijerya	Mısır	≤ 17,5
Nijerya	Bira	0,245–1,32 mg/L
Zambiya	Mısır (Bira yapımında kullanılan)	0,1–0,8
Zambiya	Mısır maltı	≤ 4
Zambiya	Bira	0,09–4,6 mg/L
Güney Afrika	Tahıl/hayvan yemi	0,05–8
Güney Amerika		
Arjantin	Hububat ve gıda	0,2–0,75
Arjantin	Siğır yemi	1,2–3,06
Arjantin	Kanatlı yemi	0,03–0,28
Arjantin	Kanatlı yemi	0,327–5,85
Arjantin	Mısır	0,005–2
Brezilya	Buğday	0,04–0,21
Brezilya	Mısır	0,0368–0,719; 0,0467–0,719; 0,653–9,83
Uruguay	Kurutulmuş meyve ve sebze; arpa ve malt	0,1–0,2; 0,1–0,2
Kuzey Amerika		
Kanada	Mısır	0,005–0,647
Kanada	Arpa	0,004–0,021
Kanada	Buğday ve arpa	≤ 0,3

Çizelge 2.2. Devam. Dünya çapında gıda ve yemlerin ZON ile kontaminasyonu
[39]

Kanada	Yemelik mısır	<0,01–141
Amerika Birleşik Devletleri, (ABD)	Küflenmiş mısır	0,1–21,4
ABD	Buğday	0,36–11,05
ABD	Mısır	0,114–3
ABD	Kabuklu tahıl, kabuksuz tahıl	0,021–0,48; 0,019–3,656
ABD	Sorgum	0,047–1,48
ABD	Küflenmiş mısır	≤ 13,2
ABD	Pancar ve pancar lifleri	0,012–0,391
Asya		
Çin	Buğday	0,005–1,4
Çin	Mısır	0,014–0,169; 0,01–0,04
Hindistan	Saman	Ortalama 0,422
Hindistan	Karışık konsantre örnek	0,843
Hindistan	Mısır	0,01–0,04
Hindistan	Buğday ve pirinç	≤ 600
Endonezya	Mısır ve kanatlı yemi	0,0055–0,526
İran	Mısır unu	≤ 0,889
İran	Mısır	0,1–0,212
İran	Peynirli atıştırmalık (aperatif)	≤ 1,471
Japonya	Buğday	0,002–0,025
Japonya	Arpa	0,010–0,658
Japonya	Buğday	0,053–0,51
Japonya	Arpa	11–15; 0,105–15,3
Kore	Arpa	0,014–0,171; 0,04–1,416
Kore	Mısır	0,04–0,386
Kore	Arpa içeren gıdalar	0,034–0,0058; 0,0034–0,120
Kore	Pirinç	0,0217–0,047
Kore	Mısır içeren gıdalar	0,0036–0,084
Filipinler	Mısır	0,059–0,0505
Katar	Pirinç	0,00018–0,0014
Katar	Buğday	0,00021–0,0021
Katar	Mısır gevreği	0,0038–0,00681
Tayland	Mısır	0,923
Okyanusya		
Avustralya	Buğday	0,04–0,43
Avustralya	Mısır	>1
Yeni Zelanda	Mısır	2,7–10,5; 0,1–16
Yeni Zelanda	Mısır (bitki)	8–75
Yeni Zelanda	Mısır özü, lif ve gluten	2,2–4,8

Kontaminasyon düzeyinin tespiti için yapılan çalışmalarla ZON'un insan tüketimine yönelik tahıllarda, ortalama 0,001 ve 175 mg/kg aralığında bulunabildiği belirlenmiştir. Ancak kontaminasyonun düzeyi ile ilgili kesin veriler ortaya koymak oldukça zordur [5]. Çünkü geniş bir aralıkta ifade edilen bu miktarlar bitki türüne, coğrafik bölge şartlarına, ürünün üretiminden tüketilene kadar ki süreçte kullanılan tekniklere, bitkinin üretim yılında maruz kaldığı iklim koşullarına ve ülkeler arası regülasyon farklılıklarından kaynaklanabilecek nedenlere bağlı olarak değişir [5, 15].

ZON'un başlıca özelliği tahıllar, daneler ve hayvan yemlerinde Triketesenler ve Fumonisinleri de kapsayan diğer Fusarium toksinleri ile birlikte bulunmasıdır. Fusarium türü mantarlar benzer şartlarda üreyebilme, bir türün aktiviteleri esnasında farklı mikotoksinleri de oluşturabilmelerinden dolayı aynı gıda maddesini birkaç mikotoksin enfekte edebilir. Bununla birlikte tahıl, tahıl ürünleri, daneler, bu ham maddelerden üretilen veya sonradan üreyerek gıdalarda birlikte bulunabilen mikotoksinler Çizelge 2.3'te belirtilmiştir [21].

Çizelge 2.3. Gıdalarda birlikte bulunabilen mikotoksinler [21]

Okratoksin ve Sitrinin
Okratoksin ve ZON
Aflatoksin B1 ve Fumonisin B1
Fumonisin B1 ve Moniliformin
Vomitoksin (DON), Nivalenol, T-2 Toksin, HT-2 toksin
Vomitoxin (DON), Nivalenol, T-2 Toksin, HT-2 toxin, ZON

ZON, steroid yapıda olmayan, poliketid sentaz enzimlerinin görev aldığı yolakla, Fusarium türü çeşitli mantarlar tarafından biyosentezlenen östrojenik etkili veya östrojeni taklit edebilen bir mikotoksindir. ZON'un birincil üreticisi "*Fusarium graminearum*" 'dir. Bir diğer adıyla "*Gibberella zeae*", geçmişte ise *F. roseum* olarak adlandırılmıştır. *Fusarium graminearum* ağırlıklı olarak ZON dışında Triketenleri (deoksinivalenol, 15-asetil deoksinivalenol, 3-asetil deoksinivalenol, nivalenol, 4-asetil nivalenol ve fusarenon-X) üretir. Benzer şekilde *F. culmorum*, *verticillioide*s (moniliforme), *sporotrichioide*s, *semitectum*, *equiseti* ve *oxysporum*

türleri ZON üretme kapasitesine sahiptirler. Yaşam döngülerinde, metabolik aktiviteleri esnasında karmaşık ve kompleks üretim şekli mantarlarda oldukça yaygın görülmektedir. Bu nedenle mantarlarla mücadele, gıda ve yem maddelerinin kontaminasyon durumlarını önleme gibi işlemlerde birçok zorluğu beraberinde getirmektedir [22, 39, 41].

2.2.1. ZON'un tarihsel geçmişi

Yüz yılı aşkın bir süredir küfle enfekte tahıllar, tahıl ürünleri, dane yemler, tahıl/dane bazlı gıdalar çiftlik hayvanları ve insanlarda sağlık problemleriyle ilişkili bulunmuştur. Bu durum, etkeni bulma yönünde bir dizi çalışmalarında beraberinde getirmiştir. ZON'un tam olarak tanımlanması, aflatoksinlerin bulunmasıyla birlikte mikotoksinler üzerine çok yönlü çalışmaların yoğunlaştığı 1960'lı yıllara rastlamaktadır. Canlı organizmalar üzerinde ki etkilerinin anlaşıldığı ilk zamanlarda F-2 olarak tanımlanan bu psödo-östrojenin (ksenoöstrojen) kimyasal yapısı belirlendikten sonra "Zearalenone" olarakta isimlendirilmiş ve doğal olarak oluşan veya sentezlenerek elde edilen birçok türevi ortaya çıkarılmıştır [38, 40].

Bitkilerdeki *Fusarium* enfestasyonları Avrupa, Rusya ve Doğu Sibiry'a'da "uyuz tahıl" (scabby grain) ve "küflü ot" (moldy hay) gibi tabirlerle uzun süre toksik olarak kabul edilmiştir. Özellikle buğdayda gerçekleşen tablo, kırmızı küf hastalığı veya Japonca "Akakabi-byo" olarak adlandırılmıştır. Bu ürünlerin tüketimi neticesinde insanlarda gastroenterit vakaları sıklıkla görülmüştür. Mantar genellikle küf içeren, kabuk yapısı bozulmuş, uyuz olarak tabir edilen tahıllarda, tahılın aseksüel olduğu yazın hasat dönemi veya ilkbaharda ki körpe sürgün aşamalarında "*Gibberella zeae*" (Schwabe) ya da "*Fusarium graminearum*" olarak tespit edilmiştir [38, 39].

ABD'nin orta ve batı bölgelerinde domuz yetiştiriciliği yapılan çiftliklerde, 1920'lerin ortalarında birçok hayvanda östrojenizm vakası tespit edilmiştir [16]. Genç dişi domuzlarda vajinada şişkinliğin gözlenmesi, vajinanın ters dönmesi, uterusun sarkması (prolapsus) ve erkek domuzlarda penis derisinde gözlenen belirgin bir şişkinliğin özellikle küflü mısır tüketimiyle bağlantılı olduğu sonucuna varılmıştır.

Ayrıca bu vakalarda gözlenen vajinanın ve bazende rektumun sarkması, sekonder etkiler olarak belirlenmiştir [38, 39].

Araştırmacılar *Gibberella zeae* (*F. graminearum*) kültüründen dişilerde rahimi besleyici (uterotrofik) ve besi hayvanlarında gelişmeyi uyarıcı, anabolik etkiye sahip aktif bir metabolit izole etmişlerdir. Mısırdaki bulunan, özellikle domuzlarda maruziyet sonucu endometrial hiperplazi gelişimiyle karakterize, rahimde normalden farklılaşmış hücresel artış yönünde etkiler gösteren *Fusarium* bileşimi, F-2 veya ZON olarak adlandırılmıştır [11, 38].

ZON her ne kadar mantarların metabolik aktiviteleri esnasında üretilen toksik bir bileşik olsada, düşük akut toksisite ve karsinojenite göstergelerine sahiptir. Bununla birlikte ZON'a maruziyet sonucu hayvanlarda gözlemlenen klinik belirtilerin çoğu, organizmada neden olduğu östrojenik ve gelişmeyi uyarıcı özellikleriyle ilişkili olarak kabul edilmiştir [11, 38].

Dünyanın farklı yerlerinde, ZON'un bu östrojenik etkinliğini destekleyici birçok vaka tespit edilmiştir. Örneğin, Atlas Okyanusu alt havzasında, Antil olarak bilinen Karayipler denizinin kuzey doğusunda bir ada olan Porto Riko'da yaşayan genç kızlarda, 1978'den 1984'e kadar gözlenen erken meme gelişimi, erken buluşma; İtalya'nın kuzey bölgesinde bir okulda ve Macaristan'ın güneydoğu bölgesinde, erken meme gelişimi vakalarında belirgin bir artış olduğu belirlenmiştir. Tüm bu gözlenen vakaların ortaya çıkmasında ZON sorumlu etken olarak kabul edilmiştir. Macaristan'da ortaya çıkan erken meme gelişimi görülen hastalardan alınan kanlara ait serumlarda 18,9-103,5 µg/mL aralığında ki düzeylerde ZON tespit edilmiştir. Ayrıca bu verileri destekleyici olarak hastaların tükettikleri gıda örneklerinden yapılan analizlerinde de ZON varlığına rastlanmıştır. Uzakdoğu ülkelerinden Çin'de, *Fusarium* türüyle kontamine karabuğdayda ZON'a rastlanmış ve bu durumun insanlarda endemik meme büyümesiyle bağlantılı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu vakaların gelişmesini destekleyici ek bilgi olarak, bayanlara yönelik satılan ticari birçok meme büyütücü gıda takviyelerinde, ZON aktif etken madde olarak bulunmaktadır [9, 38, 39].

Anabolik steroidler, büyüme hızlandırıcılar veya büyümeyi uyarıcılar ile muamele edilen hayvanlardan orjin alan mandıra, et gibi gıda ürünleri, ZON veya analogları ile kontamine olmuş tahıllar, bu kaynaklardan beslenen insanlarda hormonal sisteme müdahaleyle östrojenik değişimleri başlatır. Özellikle yukarıda bahsedilen İtalya'da meydana gelen erken meme gelişimi vakasının, hayvanlarda ki klinik gözlemler ve diğer vakalardan elde edilen kanıtların ardından, genç kızlarda ZON'un erken meme gelişimi ve erken ergenliğe girişe neden olan bir faktör olabileceği kanaatine varılmıştır. Bu ve benzeri olumsuzlukların ardından tarım ve hayvancılık alanında düzenlemeler kapsamında, Avrupa Birliği üye ülkelerinde büyümeyi uyarıcıların kullanımı 1985 yılında yasaklanmıştır [39, 42].

2.2.2. ZON kaynakları

ZON ve aktif türevleri, mantar üremesine elverişli koşullar altında tahılların *Fusarium* enfestasyonları ile oluşurlar. Deney hayvanlarında ki maruziyet çalışmaları sonucu, yetişkin bir farenin vajina mukozasının dış tabakasında bulunan epitel hücrelerinde (epitelyum) boynuzlaşma ile belirgin vajinal kornifikasyona neden olmuştur. Benzer çalışmalar neticesinde, birtakım fizyolojik ve ruhsal değişikliklerle karakterize belirtilerin gözlemlendiği, dişide erkekle cinsel ilişkiye girme isteğinin gerçekleştiği siklik peryotta ki östrusu başlattığı belirlenmiş ve bu özelliğine istinaden ksenoöstrojenler olarak isimlendirilmiştir [43, 44].

Değişen ılıman iklim, düşük sıcaklıklar, nemli hava ve bu değişken koşulların bitkide oluşturduğu stresinde katkısıyla *Fusarium* küflerinin gelişimi sonucu ZON üretimi teşvik edilir. ZON özellikle tarlada yetişen mısır bitkisinde, yaz sonu veya sonbahar başlangıcındaki yağışlı havalarda yağın dolunun etkisiyle, özellikle mekanik hasarla çok daha hızlı oluşabilir. Çünkü doluyla oluşan mekanik hasar, bitki yüzeyinde mantarların kolayca yerleşip tutunabileceği alanlar oluşturmakta ve bu çukur/defekli bölgelerde nispeten nem oranı daha fazla olmaktadır. Yüksek nem içeren ortamlarda yanlış depolama sonucu oluşan ZON düzeyi, bazı tarlalardan alınmış örneklerle kıyasla doğal olarak oluşan düzeylerden oldukça fazladır. ZON, üretim ve sonraki aşamalarda, tahıldan yapılan ekmek ve benzeri

ürünler, biranın mayalanması ve buna benzer gıda hazırlama süreçlerinde varlığını, etkinliğini koruma açısından oldukça stabildir [5, 38].

ZON üreten mantarlar çoğunlukla mısır bitkisine kolonize olur, daha az oranda ise arpa, yulaf, buğday, süpürge darısı, darı ve pirinç gibi ürünlerde de üremektedirler. Toksin ayrıca un, malt, soya unu ve bira gibi tahıl ürünlerinde de bulunmaktadır. Son zamanlarda ZON'un varlığına yönelik yapılan analizlerde, in vitro ortamda metabolitleri α -zearalenol (α -ZOL) ve β -zearalenol'ün (β -ZOL) mısır ürünleri, mısır silajı ve soya gübresinde de düşük düzeylerde bulunduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle in vitro ortamda, değişik matrislerde ZON'un varlığına yönelik yapılan araştırmalarda metabolitlerinde dikkate alınması gerekmektedir [39, 45, 46].

ZON geniş bir iklim kuşağında meydana gelir. Yukarıda açıklandığı gibi Fusarium mantarlarının üremesine ve dolayısıyla ZON oluşumuna en elverişli ürün mısırdır. ZON'un oluşumundan sorumlu mantar olarak Fusarium türü olan *Gibberella zea* (*F. graminearum*) mısır bitkisinin sapında gelişerek, sapın zayıflamasına neden olmakta veya koçana kadar ilerleyerek koçan çürümesine (kulak çürüğü) yol açmaktadır. Fusarium funguslarının canlı organizmalar için toksik kabul edilen türlerinin birçoğu tahılların majör patojenleridir. Buğday ve arpada başak yanığına, diğer tahıllar ve danelerde ise ürün kalitesinin bozulmasına neden olur. Fusarium enfestasyonu sonucu başak, buğday ve mısırdaki gelişen tipik görünüm Resim 2.1-4'te gösterilmiştir [22, 46].



Resim 2.1. Fusarium hasarlı başak [46]



Resim 2.2. Fusarium hasarlı başak [46]



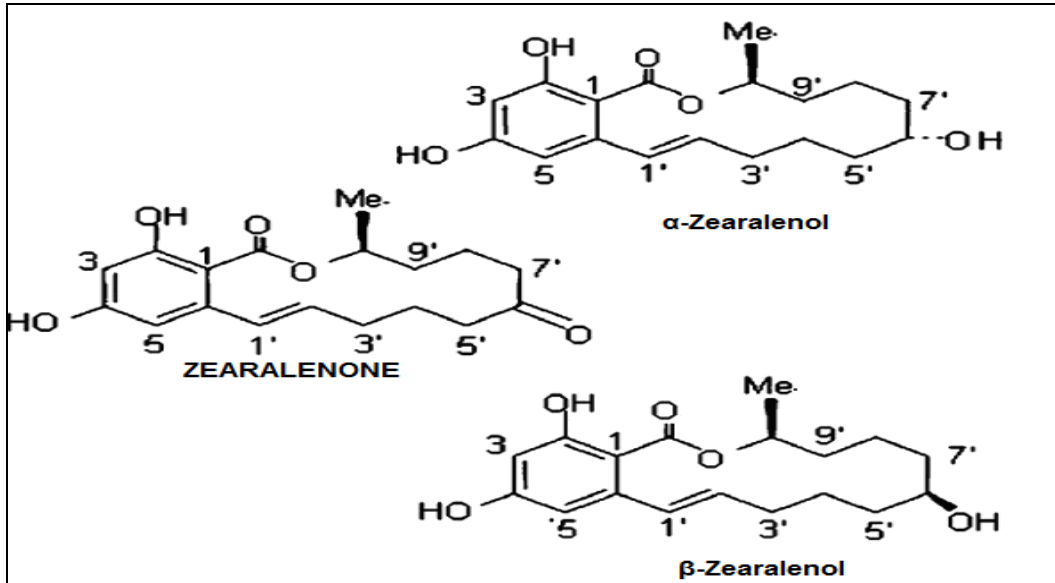
Resim 2.3. Fusarium enfekte buğday; (Soldaki normal, sağdaki hasarlı taneler) [46]



Resim 2.4. Fusarium enfekte mısır (*Gibberella zeae* enfestasyonu; mısır) [22]

2.2.3. ZON'un kimyasal yapısı

Kimyasal yapısı 6-[10-hidroksi-6-okso-trans-1-undekanil]- β ($C_{18}H_{22}O_5$) şeklindedir ve rezorsilik asit laktonları (RAL) sınıfında tanımlanmıştır. RAL'lar çeşitli biyolojik aktivitelere sahip poliketid mikotoksinlerin bir familyasına dahildir. Bu familyanın temsili örnekleri, ısı şok proteini 90 (Hsp90; heat-shock protein; hücreyi sıcaklık artışı, toksinler, hızlı asit baz değişimi ve virüs gibi yabancı unsurlara karşı koruyan molekül topluluğu) inhibitörü *radicicol* (antifungal ajan) ve östrojen agonisti ZON vardır. ZON'un memelilerde, C-8'de ki keto grubu, farklı 3-boyutlu iki stereoizomerik (veya optik izomer) metabolitlerine indirgenir (α - ve β - izomerler; α -ZOL ve β -ZOL). ZON ve metabolitlerinin kimyasal yapısı Şekil 2.1'de gösterilmiştir. ZON'un bu metabolitleri de mantar tarafından üretilmektedir, ancak ZON'dan çok daha düşük düzeylerde oluşurlar [9, 39, 47, 48].



Şekil 2.1. Zearalenone ve metabolitlerinin kimyasal yapısı [39]

2.2.4. ZON'un (diyetle) vücuda alımı

Alımını takiben hayvanlarda hızlı biyotransformasyonu ve atılımı söz konusudur. Bu nedenle uzun dönemde kalıntı düzeyleri hızlı atılımdan dolayı düşeceğinden, ZON'a et ve et ürünleri ile maruziyetin advers etkileri çok az önemlidir. ZON'un muhtemel risk oluşturması açısından asıl ana kaynak Avrupa ülkelerinde buğday,

çavdar, yulaf, Kanada ve ABD'de ise mısır, buğday ve buğday ürünleri olarak görülmektedir [49]. ZON'un laktasyondaki ineklerde yüksek dozda yemle alımını takiben sütte kalıntısına rastlanabilir. Oral yolla verilen 6000 mg ZON'un (12 mg/kg vücut ağırlığına denk) ardından bir ineğin sütünde (6,1 µg/L ZON, 4 µg/L α-ZOL ve 6,6 µg/L β-ZOL) maksimum yoğunluklarda bulunmuştur. Benzer bir çalışmada, 21 gün süreyle yemle alınan 50 veya 165 mg ZON maruziyetinden (0,1 ve 0,33 mg/kg vücut ağırlığına denk) sonra laktasyondaki her 3 ineğin sütünde (<0,5 µg/L) ZON ve metabolitleri tespit edilememiştir. Uzun süreli düşük ve yüksek iki farklı düzeyde gerçekleşen maruziyet sonucu sütte kalıntı gözlenmemesi, sütün, dolayısıyla süt ürünlerinin ZON ve metabolitleri yönünden önemsenecek bir risk taşımadığına güçlü bir kanıt olmuştur. Yumurtacı tavuklarda yapılan ZON'a yönelik birçok çalışmada ise, yumurtalarda ZON kalıntısına rastlanmamıştır. Bu sonuçlar ve destekleyici birçok çalışmayla ZON maruziyetinin ağırlıklı kaynağı olarak tahıl, tahıl ürünleri ve dane yemler ihtiva eden bitkisel bazlı gıdalar olarak kabul görmüştür [39].

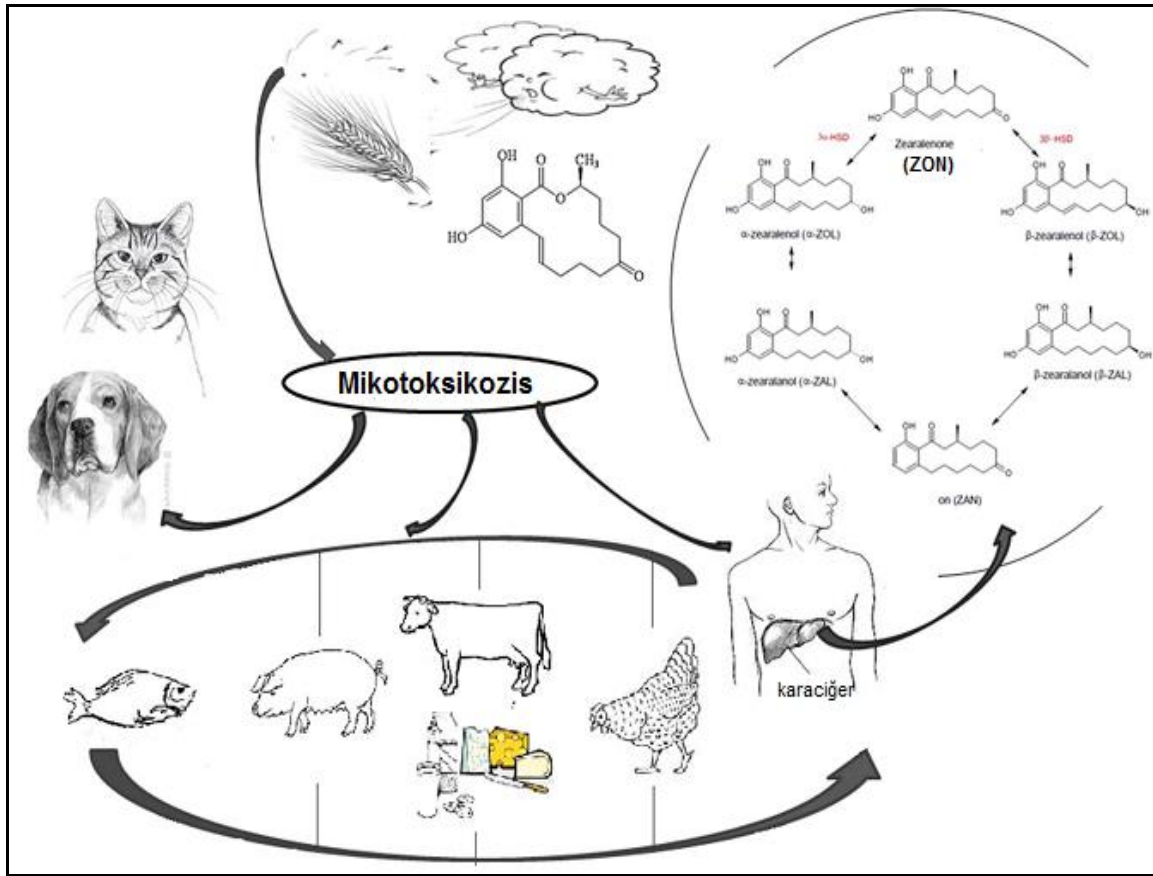
Temel gıdalarda ZON'un ortalama seviyesi ve temel gıdaların tüketimi göz önüne alındığında yetişkinlerde ortalama günlük ZON alımı 0,8-29 ng/kg vücut ağırlığı arasında değişirken, küçük çocuklar 6-55 ng/kg vücut ağırlığı ile en yüksek günlük alıma sahiptir. ZON'un diyetle günlük ortalama alımı Kanada, Danimarka ve Norveç gibi ülkelerde 20 ng/kg vücut ağırlığı, ABD'de 30 ng/kg vücut ağırlığı miktarlarında olduğu tahmin edilmektedir. İnsanlarda diyetle ZON alımı ile ilgili sınırlı sayıda bilimsel çalışma bulunmaktadır. Bunun nedeni muhtemelen tüketilen gıdalarda ZON düzeyi hakkında bilgi eksikliğinin olması, ZON oluşumunun sürkeli değişken olması ve dünyanın farklı bölgelerinde ki ülkelerde yeter düzeyde kalıntı tespitine yönelik analizlerinin yapılmamasından kaynaklanmaktadır. Özellikle Kanada ve İskandinavya kaynaklı bilgiler neticesinde, insan popülasyonu için riskin çok az olduğu sonucuna varılmıştır [39, 49, 50].

2.2.5. Toksikokinetik

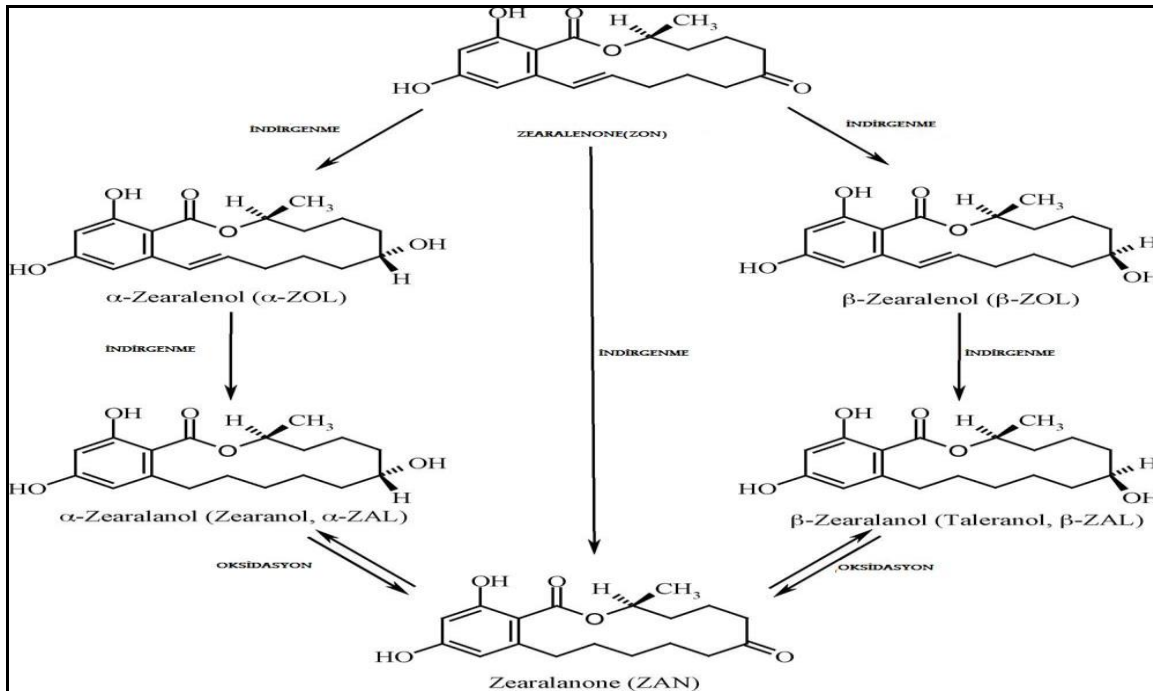
ZON oral yolla alımı takiben gastrointestinal kanaldan oldukça hızlı emilir. Emilim derecesini belirlemek, karaciğerde üretilip onikiparmak bağırsağına salgılanan

fazla miktarda safra nedeniyle tam olarak mümkün değildir. Fakat mevcut verilere dayanarak rat, tavşan ve insanlarda yüksek düzeyde gastrointestinal bölgeden emilim gözlenir. Domuzlarda (15-25 kg ağırlığa sahip) 10 mg/kg vücut ağırlığı olarak uyarlanan tek bir oral doz uygulamasından sonra % 80-85 oranında emilimin gerçekleştiği belirlenmiştir. ZON ile kontamine besin alımını takiben, hızlı bir şekilde kana geçer, 30 dakika içerisinde plazmada ana bileşik ve metabolitleri gözlenir. Deneysel çalışmalarla, domuzlarda farmakokinetik amaçlı oral doz uygulamasını takiben dağılım fazı sonrasında, toplam plazma ZON radyoaktivitesinin biyolojik yarı ömrü 86 saat olarak ölçülmüştür [38, 39].

ZON, ilk biyotransformasyon adımı katalize eden steroidojenik 3 α - ve 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz enzimlerinin (CYP17) katılımıyla oksidatif, redüktif, hidrolitik reaksiyonları kapsayan Faz I ve konjugasyonun gerçekleştiği Faz II metabolizmanın her ikisinde uğrar [5, 39]. Faz I metabolik süreçte ki C-6'da keto grubunun indirgenmesi aşamasında, temel metabolitleri olan α - ya da β -ZOL meydana gelir. Ayrıca C11-C12'de ki çift bağların redüksiyonu sonucunda α - ya da β -zearalanol oluşur [9, 40]. ZON ayrıca in vivo gerçekleşen metabolizmada veya yapay sentezlenerek α -ZOL, β -ZOL, Zearalanone (ZAN), α -zearalanol (α -ZAL) ve β -zearalanol (β -ZAL) gibi metabolitlere dönüşür. ZON'un oluşumu, alımını takiben oluşturduğu mikotoksikozise neden olan döngü ve metabolik süreci Şekil 2.2 ve Şekil 2.3'te gösterilmiştir [45, 47].



Şekil 2.2. ZON'un metabolizması ve mikotoksikozis yolağı [45]



Şekil 2.3. ZON'un çeşitli hayvan türleri ve insanda in vivo metabolizması (glukuronidler ve gliko konjugatları belirtilmemiştir) [47]

ZON'un karaciğerde biyotransformasyonu ile ana bileşik ve metabolitler yönünden türler arasında farklılık gözlenir. ZON ile kontamine yulafla beslenen domuzların karaciğer örneklerinde ağırlıklı olarak α ve daha az düzeyde β metabolitler ve ana bileşik ZON görülmüştür. Aynı hayvanların kas dokularında yapılan analizlerde de benzer şekilde α -ZOL'un yüksek, β -ZOL'un daha düşük düzeyde, ZON'un ise eser miktarda bulunduğu belirlenmiştir. ZON reproduktif dokulara (ovaryum, uterus), adipoz dokulara, testislerde intersitisyel alanda bulunan ve lüteinleştirici hormon (LH; lutenizing hormone) uyarısı sonucu testosteron üreten hücrelere (leydig hücreleri) lokalize olabilir ve bu dokularda kalıntısına rastlanabilir [5, 9, 51].

Domuzlarda alınan bu sonuçların tam aksine, aynı ZON kontamine yemle beslenen düvelerin karaciğerinde yapılan analizlerde, metabolitleri α ve β -ZOL'ler ve ana bileşik ZON'un çok düşük düzeyde bulunduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlarla geniş getiren hayvanlarda (ruminant) oral biyoyararlanımın oldukça düşük olduğu sonucuna varılmıştır. Ruminantlarda ilk mide kompartmanı rumende bulunan, özellikle selülozun sindiriminde görevli protozoalar, ZON'u biyodegrede etmiş olabilirler. Ayrıca midenin 4 farklı kompartmandan oluşması, emilime kadar geçen süre ve farklı ortamlarda ki yapıda degradasyonu artırmış olabilir [5, 9, 51].

Benzer şekilde kontamine yem ile tavuklarda yapılan maruziyet çalışmasında dokularda kalıntı bulunmuş, fakat aynı tavuğun yumurtasında ZON ve metabolitlerine rastlanmamıştır. Bu birbirini destekleyici sonuçlarla, ZON ve metabolitlerine hayvansal doku ve hayvansal kökenli gıda ürünleriyle beslenme sonucu maruziyetin düşük olduğu, asıl yüksek maruziyetin tahıl, dane yemler gibi bitkisel kaynaklı olduğu kabul edilmiştir [5].

Domuzlarda karaciğer parenkim hücrelerinin, endoplazmik retikulumunda bulunan mikrozomlara yerleşmiş enzimler tarafından ZON, büyük oranda α -ZOL'a dönüştürülmesine rağmen, sığırlarda biyotransformasyonda baskın metabolit β -ZOL'dür. Sığırlarda gerçekleşen biyotransformasyona benzer şekilde tavuklarda da baskın metabolit β -ZOL olarak tespit edilmiştir. Koyunlarda karaciğerden elde edilen mitokondriyal fraksiyon sonrası yapılan incelemede ise ana bileşiğin baskın şekilde α -ZOL'a dönüştüğü belirlenmiştir. İnsanlarda ZON, alımını takiben büyük

oranda α -ZOL'a metabolize olur. Bu ana maddeden daha potent östrojenik bir bileşiktir [38, 51].

Domuz ve benzer fizyolojik yapı nedeniyle muhtemelen insanlarda ZON oral yolla alımdan sonra hızla ve tamama yakın bir oranda gastrointestinal kanaldan absorbe olur. Karaciğer glukuronidasyonda majör rol oynarken, intestinal mukozada aktif şekilde biyotransformasyona katılır. Domuz intestinal mukoza homojenatlarında (dudenum ve jejunum) yapılan in vitro bir çalışmada, ZON'un α -ve β -ZOL'a indirgendiği belirlenmiştir. Bu hücrelerde ZON α -ZOL, β -ZOL, α -ZAL ve β -ZAL'a yıkımlanır. ZON'un bu indirgenme ürünleri daha sonra, organik bileşiklerin detoksifikasyonunda ve idrarla atılımında görevli bir üronik asit olan glukuronik asitle birleşir. Koyunlarda bu formların bazısı yüksek düzeyde idrarla glukuronid olarak atılabilir. ZON, genel olarak önemli oranda safra ve idrarla atılır. İnsanlarda yapılan farmakokinetik bir çalışmada erkek gönüllü bireylere oral yolla tek doz 100 mg ZON verilmesinden 6 saat sonra ZON, α -ZOL ve β -ZOL'un idrardaki yoğunlukları sırasıyla 3, 7,3 $\mu\text{g/mL}$ ve tespit sınırı altında, 12 saat sonra sırasıyla 6, 9,6 ve 2,7 $\mu\text{g/mL}$ ve 24 saat sonrasında ise sırasıyla 2, 7,4 ve 2 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. ZON ve metabolitleri rumuninantların safra analizlerinde, sırasıyla % 68 β -ZOL, % 24 α -ZOL ve % 8 ZON gibi değişik oranlarda tespit edilmiştir. Uygulanan doza bağlı olarak karaciğer ve safrada ZON ve metabolitlerinin yoğunluğu artar [52]. Yem ile 0,1 mg/kg/gün ZON verilen erkek sığırın kas dokusunda, böbreklerinde, karaciğerinde, mesanesinde ve sırt bölgesinde ki yağlarında ZON ve metabolitleri yapılan kalıntı analizlerinde tespit edilememiştir [54]. Hayvan türleri arasında ZON'un metabolizmasında önemli derecede farklılıklar bulunmasına rağmen, insanlarda deneysel çalışmaların yetersizliğinden dolayı bilgiler kısıtlıdır [5, 9, 38, 39].

Sığırlarda öncelikle selülozun sindiriminde rol alan bakteri ve protozoalardan oluşan gastrointestinal flora, ZON'un metabolizmasına yardımcı olabilir. ZON indirgenmeyle rumende çoğunlukla α -ZOL ve daha düşük oranda β -ZOL'a metabolize olabilir. Sığırlarda bulunan 4 farklı mide kompartmanını kapsayan gastrointestinal kanaldan absorpsiyon durumu, hidroksteroid dehidrogenaz ile karaciğerde metabolizma ve hayvan türlerinde ki farklılıklar dahil olmak üzere,

sitozolik östrojen reseptör bölgesindeki rekabete bağlı olarak ZON'un toksisitesi, diğer bir ifadeyle hedef dokularda ki hormonal etkisi artış veya azalış göstermektedir [38].

ZON, türlerin çoğunda karaciğer ve barsaklar arasında atılım, emilim ve tekrar atılımın yaşandığı geniş bir enterohepatik sirkülasyon ve safra sekresyonuna uğrar. ZON'un metabolizma sonu atılımı için türlerin çoğunda majör yol dışkı olmasına rağmen, tavşanlarda biyotransformasyon yolağının farklılığından dolayı birçok maddede olduğu gibi atılım için primer yol idrardır [38].

Farmakokinetik çalışmalarda, tek bir dozda verilen ZON'un tamamı yakını 72 saat içinde atılmıştır. Yaklaşık % 94 radyoaktif ZON'un, beyaz Livorno ırkı yumurtacı tavuklara oral 10 mg/kg vücut ağırlığı dozda tatbikinden sonra 72 saat içinde dışkıyla elimine edildiği gözlenmiştir. Kalıntı tespitine yönelik yapılan analizlerde yenilebilir kas dokularında ZON'un dikkate değer bir kalıntısı tespit edilememiştir. Fakat lipofilik özellikte olan α - ve β - metabolitlerinin, yaklaşık 2 mg/kg dozlarda maruziyetinden 72 saat sonra, aynı hayvanların yumurta sarısında bulunduğu rapor edilmiştir. Yüksek dozda uygulama sonrası ZON, α - ve β -ZOL'ler domuz, koyun ve inek sütüne geçebilirler. Fakat sütte kalıntı tespitine yönelik çok sınırlı sayıda veri mevcuttur. ZON ve metabolitlerinin süt, yumurta ve gıdalarda potansiyel kalıntısı ve buna bağlı maruziyet sonucu genç kızlarda olası erken seksüel gelişim ve diğer advers etkileri bilim çevrelerini endişelendiren öncelikli sorunların başında gelir [38, 54].

Mikotoksinlere maruziyetin ardından hayvanlarda gerçekleşen metabolik süreç sonucu oluşan, ana bileşikten daha potent östrojenik metabolitlerin oluşması advers etkilerin ortaya çıkmasını doğurabilir. Hayvanların sindirim sisteminde veya dokularında büyük ölçüde transformasyon olursa bu karkas ve süt kalitesine olumsuz yönde ilave etkilere neden olabilir. ZON'un koyunlardaki metabolizması ZON, α -ZOL, β -ZOL, α -ZAL ve β -ZAL'ı da içeren en az beş metabolitin sentezini de içerecek şekilde gerçekleşmektedir [39]. ZON'un advers etkileri eliminasyon yoluyla kısmen belirlenebilir. ZON'un glukuronidi önemli derecede safrayla atılır. Safra karaciğerden koledok kanalı ve water kanalcığıyla oniki parmak bağırsağına

dökülür, buradan yeniden emilir ve bu esnada da ana bileşik barsak mukoza hücrelerinde metabolize olur. Sonuçta portal kan akımı yoluyla karaciğer ve sistemik kan dolaşımına katılır [38]. Metabolizma sonucu ZON'un indirgenmiş formu olarak oluşan ve ana bileşiğe göre daha potent etkiye sahip olan α -ZOL, bu şekilde östrojenik aktiviteyi artırır [55].

ZON'un in vivo türevlerinin (α -ZOL, β -ZOL, ZAN, α -ZAL, β -ZAL) veteriner hekimliği alanında uygulamaya yönelik preparatlarından bazıları uygun doz ve zamanda besi sığırlarında ve sahada çok tercih edilmesede kısmen koyunlarda gelişmeyi uyarıcı (anabolik) etkiye sahiptir. Bu nedenle sentetik ticari formülasyon türevlerinden biri olan Zeranol (α -ZAL veya ticari adıyla Ralgro, kas kütlesini artırır) anabolik ajan olarakta kullanılmakta ve kullanımı serbest olan ülkelerde pazarlanmaktadır. Zeranol, ZON'un in vivo olarak, memelilerde gerçekleşen biyotransformasyon sürecinde oluşan metabolitidir. Zeranol'ün veteriner preparatı *Ralgro*, ABD ve Kanada dahil olmak üzere birçok ülkede et sığırları ve koyunlarda, hayvanların *yasal arınma süresi* beklenerek kesimine izin verilmesi şartıyla kullanılmaktadır. Bununla birlikte 1989 yılında α -ZAL ve etken maddeyi içeren veteriner preparatlar Avrupa Birliği tarafından topluluk bünyesinde ki tüm üye ülkelerinde yasaklanmıştır. Türkiye'de ise, 1992 yılında besi sığırlarında anabolik etkili Ralgro'nun ithalatı, imalatı ve kullanılması yasaklanmıştır [6, 40, 55].

2.2.6. Etki mekanizması

ZON tarafından östrojen reseptörlerine bağlanma

ZON östrojenik (östrojene ilgili) dokulardaki östrojen reseptörlerine bağlanabilir. ZON ve türevleri bir östrojen reseptör agonisti gibi hareket ederek östrojeni taklit etmekte olağan üstü bir yeteneğe sahiptir. Reprodüktif (üreme) organlarda hormonal etkilerinden dolayı morfolojik ve fonksiyonel değişimlere yol açar. ZON ve metabolitleri hücre çekirdeğine translokasyonun ardından, sitoplazmik östrojen reseptörleri (endojen 17β -estradiol) ile etkileşebilir ve direk olarak reseptörlere doğrudan bağlanabilirler. Bu yetilerinden dolayı ZON'un, östrojen duyarlı elementleri ve gen transkripsiyonunu etkinleştirici bir östrojen reseptörü olduğu

kabul edilir. Ayrıca ribonükleik asitin (RNA) stimülasyonu, protein sentezi ve östrojenizmin klinik belirtilerinin ortaya çıkmasına yol açabilir [38, 56].

İn vitro olarak yapılan çalışmalarda, insan α ve β östrojen reseptörleri transfekte edilmiş hücreler kullanıldığında, ZON'un her iki reseptörde bağlandığı, östrojen gibi davrandığı rapor edilmiştir. Ayrıca ZON α -östrojen reseptörleri (α -ER) için tam, β -östrojen reseptörleri (β -ER) içinse kısmi agonist olarak belirlenmiştir. Ancak, bu kesin olmamakla birlikte, yüksek konsantrasyonlarda yapılan birkaç çalışmada ZON'un, hem α -ER hem de β -ER üzerinde, ER antagonistisi olarak hareket edebileceği de belirlenmiştir [38, 57].

Rezorsilik asit laktonları içinde yer alan α -ZOL, ZON ve β -ZOL'a göre sitozolik östrojen reseptörlerine çok daha yüksek oranda bir bağlanma affinitesi gösterir. ZON ve analoglarının bağıl östrojenitesi, MCF-7 (meme kanserine model hücre hattı) insan göğüs adenokarsinoma hücre hatları kullanılarak, sırasıyla α -ZOL > α -ZAL > β -ZAL > ZAN > ZON > β -ZOL şeklinde değerlendirilmiştir [58]. Besinlerdeki ZON'a hassasiyette, türler arasındaki varyasyonların varlığı, farklı metabolitlerin oluşumu ve ZON'un relatif (görelî, bağıl) bağlanma özelliği ile ilgili olduğu kabul edilir [38].

Domuzda östrojenik potansi yüksek olan α -ZOL'un relatif bağlanma kapasitesi rat ve tavuklardan daha iyidir. Domuz ve koyun, sıçan, fare, hamster, kobay gibi kemirgen sınıfındaki rodentlerden ZON'a daha duyarlı olarak kabul edilir. ZON'a yönelik toksisite veya hormonal etki çalışmalarında, insana fizyolojik açıdan en yakın türlerden biri olarak kabul edilen model hayvan domuz bu yönden büyük önem taşımaktadır [38, 59].

Organizmada hormonların salınımında, hormonal döngünün idamesi için önce hipotalamustan LH, folikül stimüle edici hormon (FSH; Follicle stimulating hormone), prolaktin (süt salgılatıcı hormon), büyüme hormonu gibi bazı hormonlar salgılanmaktadır. Bunlar hipofize gelerek bu defa hipofizden diğer hormonların salgılanmasını uyarmaktadır. İkinci aşamada ise hipofizden salgılanan hormonlar vücuttaki salgı bezlerine giderek o bezlerden bazı hormonların salgılanmasını

sağlamaktadır. Hipotalamik-hipofiziyal aksis (veya eksen) olarak isimlendirilen bu sistem sayesinde gün boyu farklı işlevselliğe sahip hormonlar salınmaktadır. ZON, hipotalamik-hipofiziyal aksis üzerinde hareket edebilme yeteneğine sahiptir. Seksüel olgunluğa ulaşmamış 70 günlük Yorkshire ırkı domuzlarda yapılan bir araştırmada, ZON maruziyeti sonucu hipotalamik-hipofiziyal aksis etkilenmiş, LH düzeylerinde en az 44 gün boyunca dalgalanma gözlemlenmiştir. Ancak, ZON maruziyetiyle pubertal östrus (normal östrus) başlangıcında, gebe kalma oranında düşüş olmasına rağmen, ovulasyon (yumurtlama) oranları veya fötüs sayısı üzerinde olumsuz bir etki gözlenmemiştir. Bu etkiyle ilk östrusun daha ileri bir tarihe ötelenmesi, gebe kalma oranının düşmesi, entansif hayvan yetiştiriciliğinde gebelik senkronizasyonunun kontrolünde aksaklıklara, ilave ve tekrar hormonal uygulamalar gibi ekstra maliyetlere neden olması yetiştiriciler açısından istenmeyen sonuçlar doğuracaktır [38, 60].

Seksüel olgunluğa yaklaşmış domuzlara (178 günlük, 94 kg ağırlığında) günlük 10 mg ZON 2 hafta süresince uygulanmış, alınan örneklerde ortalama LH serum düzeylerinin baskılandığı, fakat seksüel olgunluğun (ergenlik) başlangıcının ve devamında kızgınlık aşamalarının (metöstrus, diöstrus, proöstrus ve östrus) olumsuz etkilenmediği gözlemlenmiştir [38]. Domuz, bir doğumda birden fazla yavru doğuran (politokoz) bir hayvandır. Kızgınlık periyodunda 10 ile 25 arasında oosit üretebilir. Tüm süreçlerde ve domuzun ZON'a maruziyetinde gözlenen sonuçlarda bu durum da dikkate alınmalıdır [61].

Erkek ratlar (70 günlük), 35 gün boyunca oral 20 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde ZON'a maruz bırakıldığında serum prolaktin düzeyinin arttığı, fakat serum LH ve FSH düzeyleri, gövde, testis ağırlıkları, spermatogonyum, spermatosit ve spermatidlerde anormal bir farklılaşma gerçekleşmemiştir. Benzer çalışmalarda genel olarak erkek üreme organlarında ve özellikle testislerde spermatogenezisin çeşitli aşamalarında patolojik yönde bir değişim gözlenmemiştir [38, 62].

ZON maruziyeti sonrası öncelikle üreme sisteminde advers sonuçlar gözlenmekte olup, bunlar yanında farklı etkilerde barındırabilir. İn vitro hücre hatları kullanılarak, ZON'un sitokrom P450 enzimlerinin ekspresyonu dahil, çok sayıda hepatik ilaç

metabolize edici enzimlerin ekspresyonunu, bir transkripsiyon faktör düzenleyicisi olarak aktive ettiği, insan steroid ve ksenobiyotik algılayan nükleer reseptör (hPXR; human pregnane X receptor) içinse bir ligand (bağlayıcı) olarak görev yaptığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar ZON'un ilaçların metabolizmasını indükleme yönünde bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir [38]. Farklı yaşlarda domuzlarla yapılan değişik dozlarda ki maruziyet çalışmalarında, ZON her zaman belirgin semptomlarla karakterize klinik bulgular göstermemiştir. Bu maruziyet çalışmalarıyla öngörülen, ZON'un gıdalardaki konsantrasyonuna bağlı olarak birçoğu henüz keşfedilmemiş, organizmada ki diğer parametrelerinde yön verdiği farklı biyolojik ve advers etkilere sahip olduğu yönündedir [38, 62].

İn vitro test ile (MCF-7) yapılan farklı bir çalışmada ZON'un en potent östrojenik etkiye sahip metaboliti olan α -ZOL'un, östrojenik aktivitesi 17- β östradiolle aynı görülmüştür. Estradiol olarakta adlandırılan 17- β östradiol steroid yapıda birincil kadın cinsiyet hormonudur. ZON, α -ZOL'e kıyasla yaklaşık 2 kat daha az östrojenik potansiyele sahiptir. ZON'un östrojenik potansiyeli metaboliti olan β -ZOL'un ise yaklaşık 2 katıdır. Bu nedenle ZON'un metabolize olması ve özellikle metaboliti olan α -ZOL'un maruz kalınan kaynakta daha yüksek düzeyde bulunması canlı organizma üzerinde olası riskleri artırmaktadır. Bu kapsamda ZON'a yönelik yapılan kalıntı analizlerinde şayet risk değerlendirmesi yapılacaksa, sadece ana bileşik değil, her iki metaboliti, özellikle potensi yüksek α -ZOL'un birlikte değerlendirilmesi gerekir [62].

Üreme (Reprodüktif) toksisitesi ve hormonal etkiler

Bir ksenoöstrojen olan ZON'un keşfinde, oluşturduğu etkilerin domuzlarda ki klinik sonuçları büyük fayda sağlamıştır. Daha önce bahsedildiği gibi domuzlar biyolojik açıdan insanlarla benzerlikler taşır. Çok sayıda bilimsel çalışmada domuz referans model olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle domuzlarda ZON maruziyetinin potansiyel advers etkileri, organ ve dokuların benzer yapı ve işlevselliği nedeniyle, patolojik ve fizyolojik açıdan insanlarla karşılaştırmada yardımcı olmaktadır [38, 63].

ZON, özellikle domuzlarda üreme sistemi üzerinde majör etki olarak aşırı östrojen salgılanması veya alınması olarak tanımlanan “hiperöstrojenizme” neden olur. Domuzlarda östrojenizm ABD’nin orta-batı bölgesinde 1920’lerin ortalarında tespit edilmiştir. Östrojenizm, östrojenlerin toksik olmakla birlikte, düşük düzeylerde alınmaları sonucu oluşan hastalık tablosudur. Çiftlik hayvanlarında başta yonca türleri olmak üzere östrojenik potansiyele sahip fitoöstrojenik bitkilerin tüketiminden kaynaklanır. Ergenlik öncesi (prepubertal) domuzlar en hassas türlerdir. Sığırlar nispeten, tavuklarda ise östrojen veya benzer etkiyi gösteren bileşiklere maruziyette gastrointestinal yapı farklılığı ve sistemde ki floradan kaynaklı daha az advers etki gözlenir [38, 41].

Hiperöstrojenizmin kliniksel semptomlar ve fizyolojik açıdan tipik bulguları; vulvada şişlik, uterus boyutu ve salgılarında artış, meme bezi hiperplazisi ve sekresyon, uzun süreli kızgınlık, dişi memelilerde yumurtalık etkinliğinin anormal bir biçimde yokluğu ile karakterize anöstrüs, yalancı gebelik sıklığında artış, infertilite, cinsel istek/içgüdü olarak tanımlanan libidoda azalma, rektum ya da vajinanın normal anatomik yerleşimini terk edip sarkma gösterdiği rektal ve vajinal prolapsusun sekonder komplikasyonları, ölü doğumlar ve hacimsel yönden küçük yavrular olarak yansır. Ayrıca doğumsal canlı vücut ağırlığında ve anne karnında maternal besin tüketiminde maruz kalınan doza bağımlı düşüşler gözlenmiştir. Gebelik sürecinde annenin maruziyeti neticesinde fötusunda etkilendiği ve fetal vücut ağırlıklarının yapılan çalışmalarda ki tüm deneme gruplarında azaldığı gözlenmiştir [38, 41].

ZON’un yüksek düzeyde bulunduğu rasyonla uzun dönemli kronik beslenme durumunda, dişi domuzlarda gebe kalabilme yeteneği, gebelik sürecini tamamlayıp yavru doğurabilme gibi olguları kapsayan fertilite üzerinde negatif bir etki gözlenmemiştir [38]. Büyüme evresini tamamlamış domuz oositleriyle, in vitro ortamda purifiye (saflaştırılmış) ZON’la yapılan maruziyette, mayotik iğın (kromozomların bağlandığı lifler) olağandışı formasyonu gelişmiş, daha az fertil oositler ve embriyoda normal sayıdan farklı ploidi (hücredeki kromozom sayısı) gözlemlenmiştir [64]. Fertilite ve reproduksiyon üzerinde meydana gelen bu tür advers etkiler, ZON’un östrojenik aktivitesinden kaynaklanmaktadır [38].

ZON ile yapılan bir çalışma sürecinde yumurtalıkların, testislerin gelişimini veya eşey organlarında üretilen yumurta ve sperm gelişim aşamalarında uyarılarla etkinlik gösteren gonadotropinler (FSH, LH) ve seks steroidleri analiz edilmiş; 8 mg/kg vücut ağırlığı ZON maruziyetinde kanda ki LH ve FSH seviyelerinin hafif düzeyde arttığı belirlenmiştir. Seks steroidlerinden laktasyonda süt salgılatıcı hormon olarak görev yapan prolaktinin anlamlı sayılabilecek düzeyde arttığı, buna karşın progesteron ve östradiol'ün ise azaldığı gözlemlenmiştir [65].

ZON, fetal yaşamdaki erkek ratların uterustaki gelişimini etkiler. Fetal anogenital indeks (anogenital mesafe/vücut ağırlığı) ile vücut ağırlığı arasında, doza bağımlı olarak tüm deneysel maruziyet gruplarında azalmanın olduğu yönünde bağlantı gözlenmiştir. Bununla birlikte doz bağımlı olarak fetal ağırlık artışıyla, anogenital mesafe normalize edilmiştir. Fetal gelişim sürecinde mevcut verilerle hormonal değişimlere ve androjenik etkilere neden olduğu düşünülmese rağmen, advers sonuçların döllere aktarıldığı teratojenik bir etki gözlemlenmemiştir [65]. Ratlarda yapılan doz bağımlı bu denemeler neticesinde ZON'un uteral yaşamda fetal ağırlıktan ziyade, erkek ratların anogenital mesafesi üzerinde değişimlerle karakterize advers etkiler gösterdiği sonucuna varılmıştır [38, 66].

ZON maruziyetine normal siklustaki domuzlar gebe domuzlardan daha duyarlıdır. Gebe domuzlar maruziyet sonrası abort (yavru düşüklüğü) yapabilirler. Abortlar rasyon ve benzeri kaynaklardan gelen doğal Fusarium mantarlarıyla maruziyette gözlemlenmiş, ancak purifiye ZON'la bağlantı kurulamamış, gözlenen advers etkiler doğalla özdeşleştirilmiştir. Bu durumun, doğal kaynaktan gelen ZON'un özellikle östrojenik potansiyeli yüksek olan metaboliti α -ZOL'a dönüşmüş olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir [38, 66].

Genç erkek domuzlar yaşlılardan daha duyarlıdır. İleri yaştaki domuzların fizyolojik olarak ve dokuların işlevselliğinin büyük oranda zayıflamış olması, muhtemelen ZON maruziyetine daha duyarsız olmalarında bir neden teşkil etmektedir. Genç erkeklerde maruziyet sonucu testislerde atrofi ve meme bezlerinde büyüme gözlemlenmiştir. ZON maruziyetinin dişilerde ovulasyon süresini 10 gün kadar kısalttığı belirlenmiştir. Ovulasyon süresindeki farklılık uterus

ve endometriyumun gerek siklik fazda ki değişimleri ve gerekse gebeliğe hazırlanmasını olumsuz yönde etkileyebilir. Bu durum döllenmeyi, döllenlen yumurtanın endometriyuma tutunmasını ve dolayısıyla gebelik ihtimalinin zayıflaması gibi birçok istenmeyen olumsuz etkiyi beraberinde getirecektir [38].

ZON laboratuvar hayvanlarında (fare, rat, domuz, kobay, hamster, tavşan) yapılan çalışmalarda baskın şekilde genital sistemde değişikliklere neden olmuştur. ZON'a maruziyette fertilitede azalma, embriyo ölümü ve oluşan embriyoların dokudan fagosit edilerek yok edilmesinde artış, bir batında gerçekleşen çoklu doğumlarda azalma, adrenal bez, tiroid ve hipofiz bezi ağırlığında değişiklikler gözlenmiştir [39]. Tüm bu gözlenen advers etkiler ve şiddeti rasyon çeşidi, doz, maruziyet süresi ve sıklığına göre değişiklikler göstermektedir [38].

ZON'un immun sistem üzerine toksisitesi üzerine yapılan çalışmalarda dikkate değer bir bulguya rastlanmamıştır. Fakat yakın zamanda insanlar ve farelerle ilişkilendirilerek yapılan in vitro bir çalışmada, ZON yoğunluğuna bağlı bazı immünolojik parametrelerde değişiklikler bildirilmiştir. Yüksek ZON yoğunluğunda in vitro şartlarda lenfosit proliferasyonunu stimüle edici mitojenin inhibisyonu, lenfosit kökenli bir mediyatör olan "interleukin 2" (IL-2) ve "interleukin 5" (IL-5) üretiminde artış gibi immünolojik parametrelerde değişiklik bildirilmiştir. ZON'un histolojik yönden farklılaşma ve timositlerde (olgunlaşmamış lenfosit) fenotipik değişikliklerle karakterize timik (timüs bezi) atrofiye neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca dalakta humoral bağışıklık yanıtında büyük rol oynayan B lenfosit yüzdesinde azalma gözlenmiştir [39, 67]. Fareler üzerinde 40 mg/kg dozda yapılan bir çalışmada lenfositlerin alt kümesi yardımcı T-hücre alt tiplerinde ($CD3^+$, $CD4^+$ ve $CD8^+$ taşıyan), doğal öldürücü hücre (NK) ve pro-inflamatuar sitokinlerde anlamlı bir azalma gözlenmiştir [68].

2.2.7. ZON'un detoksifikasyon ve biyodegradasyonu

ZON'un toksik etkilerini azaltmak veya elimine etmek için kimyasal, fiziksel ve biyolojik metodlarla uygulanan yöntemler gıdalarda kontaminasyon gibi istenmeyen durumlardan korunma açısından oldukça önemlidir. Gıdalar ve yemler

için detoksifikasyon stratejileri gıda güvenliğini artırmak, ekonomik kayıpları, kontamine gıdaların takibi ve geniş saha taramalarını kapsayan survey çalışmalarının etkinliği açısından önem taşır [69].

Gıda, yem ve farklı kaynaklarda doğada yaygın şekilde bulunan mikotoksinlerin yüksek yoğunlukta ozon (O_3) varlığında degradasyon (yıkımlanma) ve detoksifikasyonu üzerine çalışmalar yapılmıştır. ZON'un 15 saniye süreyle O_3 ile muamelesi sonucu degrade olduğu, ana bileşik ve yan ürünlerin HPLC (High-performance liquid chromatography; Yüksek performanslı sıvı kromatografisi) ile tespit edilemediği görülmüştür. Buna ek olarak, bu bileşiklerin toksisitesi mikotoksin duyarlı biyoanaliz ölçümü sonucu, 15 saniye O_3 ile muameleden sonra önemli derecede azalmıştır. Farklı bir araştırmada değişik yoğunluklarda (%3, 5 ve 10), ortama bağlı olarak indirgen ve yükseltgen özelliğe sahip bir bileşik olan hidrojen peroksitin (H_2O_2) bulaşık mısırlarda ZON'u parçalama etkinliği çalışılmıştır. Çıkan sonuçlar, ZON'un parçalanma yüzdesinin H_2O_2 yoğunluğu, sıcaklık ve maruziyet süresine bağlı olduğunu göstermiştir. Bu degradasyona yönelik çalışma sonucu en yüksek düzeyde degradasyonun % 10 H_2O_2 , 80 °C ve 16 saat ile % 83,9 oranında ve aynı şartlarda süre kısıtlamasıyla 8 saatlik süreçte % 75 oranında olduğu belirlenmiştir [70, 71].

Yüksek sıcaklık ve basınçta, kısa sürede termomekanik işleme (ekstrüzyon pişirme) pişirilerek hububatların kahvaltılık, çerez ve rasyona ilave etme amacıyla hayvan yemine dönüştürülmesi gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Ekstrüzyon pişirme geleneksel metodlardan bazı avantajları nedeniyle son yıllarda tercih oranı artan gıda işleme yöntemleri arasında yer alır. Bu yöntem ara ve nihai işlenmiş ürün kalitesini artırmasının yanı sıra, tahıllar ve dane yemlerde muhtemel mikotoksinlerin seviyesini azaltarak gıda güvenliğini artırabilir [72]. Tahıl bazlı gıdalardaki ZON seviyesi, önemli derecede ekstrüzyon pişirme yöntemiyle azaltılabilir ve bu yöntemle tahıl bazlı gıdalarda ZON'un % 83 oranında azalması sağlanabilir [73]. Bununla birlikte, degradasyon için ekstrüzyon pişirme yöntemi kullanılacaksa, tekniğin ZON'un toksik veya biyolojik aktivitesinin tahıl bazlı gıdalarda azaldığı veya tamamıyla elimine edildiği referans tespit metodları ve cihazlarla onaylanması gerekmektedir [9, 72]. Sonuç olarak farklı tekniklerle

yapılan gıda hazırlama süreçlerinde, alkali koşullar altında pişirme ve ekstrüzyon pişirmenin önemli ölçüde ZON'un konsantrasyonunun azalmasına neden olduğu görülmüştür [9].

ZON toksisitesini azaltmak için gıdanın tüketiminde olumsuz bir sonuç doğurmayacak şekilde, ortamdaki kimyasal bileşiklerle herhangi bir reaksiyona girmeyen inert sorbentlerin ilave edilmesi en son yaklaşımlardan biridir. Adsorban kullanılarak mikotoksikozisin etkilerinin azaltılması ile ilişkili çoğu çalışma, aluminosilikatlar (HSCAS; hydrated sodium calcium aluminosilicate) ve aluminosilikat içeren kil (clay) üzerine yoğunlaşmaktadır. ZON'un ortamdan adsorbsiyonu için HSCAS'ın kullanılabilirliği test edilmiştir. Test sonucunda kimyasal olarak modifiye edilmiş, 108 mg/g bağlama kapasitesine sahip, mikroskobik kristal formüllü mineraller içeren, çok yumuşak bir fillosilikat grubu montmorillonite ve haricinde başarı düşük olmuştur [74]. Bir tür katyonik kuaterner amonyum bileşiği olan setilpiridinyum veya hegzadesiltrimetilamonyum ile türevlendirilmiş bu kilin yüzey hidrofobikliği sağlandığında, hidrofobik özellikteki ZON'a afinitenin arttığı tespit edilmiştir [75]. Farklı bir çalışmada safra asidi bağlayıcı bir reçine olan kolestramin test edilmiş ve ortaya çıkan sonuçlar neticesinde mikotoksinlere karşı koruyucu ajan olduğu kabul edilmiştir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda aktif kömür ve kolestraminin ZON detoksifikasyonunda beklentileri olumlu yönde karşılayan adaylar oldukları sonucuna varmışlardır. Bu iki maddenin yem katkı maddesi olarak rasyona ilavesinin, domuzlarda hiperöstrojenizmin önlenmesi için kullanılabileceği bildirilmiştir [76]. Ancak faydalarının yanında, bu iki maddenin dezavantaj olarak özellikle entegre işletmelerde yüksek maliyet getirmesi, işletme için en önemli çıktı olan yem maliyetini, dolayısıyla ekonomik anlamda ticari kaygıyı artırmakta ve bu nedenle kullanım tercihini kısıtlamaktadır [77].

Çiftlik hayvanlarında mikotoksin maruziyetini azaltmak için maya gibi mikroorganizmaların kullanılmasına yönelik geçmişten günümüze sürekli artan bir tercih olmuştur. Mikotoksinlerle mayaların etkileşimi 30 yılı aşkın bir süredir bilinmektedir. Örneğin, bir maya türü olan "Saccharomyces cerevisiae 1026" ile hücre duvarı materyalinde yapılan in vitro bir çalışmada, hücreden türeyen

modifiye mannan oligosakkarit (MOS), yaklaşık % 80 gibi önemsenecek bir oranda ZON'u bağlamıştır. *Saccharomyces cerevisiae* 1026, eski çağlardan itibaren bira, şarap ve ekmek tahıl ürünlerinin yapımında kullanılan en önemli maya suşlarından [39, 78, 79].

Bakteri, maya ve mantarları da içeren çeşitli mikroorganizmaların ZON'u, metabolize ederek α - ve β -ZON'a dönüştürebileceği belirlenmiştir. Yapılan çalışmaların ışığında, ZON'un çok daha östrojenik potansiyele sahip metaboliti α -ZON'a indirgenmesinin, barsak mukozasında daha aktif şekilde olduğu düşünülmektedir. ZON'un ruminantlarda gastrointestinal sistemde ki mikrobiyal yıkımlanmasına, rumen içeriğinden izole edilen kültürlerle yapılan çalışmalar kanıt olarak gösterilmiştir [80, 81]. Bununla birlikte, ZON'un yıkımlanmasında rumen protozoalarının rumen bakterilerden daha aktif olduğu ve % 90-100 oranında ZON yoğunluğunun α -ZON'a, daha düşük düzeyde ise β -ZON'a dönüştüğü tespit edilmiştir. Araştırmacılar, ZON'un biodegradasyonunda (biyoyıkımlanma) özellikle geviş getiren hayvanların ilk mide kompartımanı olan rumende ki protozoaların, en önemli ruminal mikrobiyal populasyon olduğu sonucuna varmışlardır. Buna karşın bu transformasyon, metabolitlerin östrojenik aktivitelerinin ZON ile benzer olması nedeniyle detoksifikasyon olarak değerlendirilemez [82, 83]. Çünkü bu yıkımlanmada ZON'dan daha potent östrojenik aktivitesi olan α -ZON, ana metabolit olarak ortaya çıkmaktadır. Bu durum bir bakıma etkinin güçlenmesine, östrojenik potansiyelin ve dolayısıyla advers sonuçların artmasına neden olmaktadır [39, 78].

Bakterilerle yapılan çalışmalarda, karışık bakteri kültürlerinin kültür ortamında ZON'u yıkımlayabildikleri görülmüştür. Kültürden elde edilen ekstraktların HPLC ve ELISA (ELISA; Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay; Enzim bağımlı immunosorbent yöntemi) yöntemleri ile analizlerinde ZON veya ZON benzeri ürün tespit edilmemiştir [84]. Son yıllarda çeşitli mikotoksinlerin detoksifikasyonunda "*Trichosporon mycotoxinivorans*" isimli bir maya türü tanımlanmıştır. *Trichosporon mycotoxinivorans*, ZON'u karbon okside ve diğer toksik olmayan metabolitlere yıkımlayabilmektedir. *Trichosporon mycotoxinivorans* ile detoksifikasyonda, ZON'un metabolitlerinden her ikisinde (α - ve β -ZON) tespit edilememiştir. Bu

bulguya dayalı olarak araştırmacılar, bu maya suşunun hayvan yemlerindeki mikotoksinlerin detoksifikasyonunda kullanılabileceğini belirtmişlerdir [84]. Ayrıca bu maya türünün, nefrotoksik etki barındıran bir mikotoksin olan ochratoxin A'nın detoksifikasyonunda da başarısı ispatlanmıştır. Mısır tanelerinde yapılan bir çalışmada, 4 günlük bakteriyel fermentasyon esnasında oluşan laktik asitin, % 68-75 aralığında bir oranda anlamlı derecede ZON yoğunluğunu azalttığı, ancak bu yolla indirgenmenin toksinin muhtemel toksik etkilerini önemli derecede değiştirmesinin beklenmediği ifade edilmiştir [39, 85].

2.2.8. Toksisite verileri ve yasal düzenlemeler

Akut toksisite

ZON'un oral uygulamadan sonra fare, sıçan ve kobayda nispeten düşük akut toksiteye ($LD_{50} >2000-20000$ mg/kg vücut ağırlığı, oral) sahip olduğu görülmüştür. İntraperitoneal (periton içi, karınzarı içi) uygulamada diğer maruziyet yollarına kıyasla daha fazla toksik etki gözlenir. İlaç ve benzeri uygulamalarda olduğu gibi intraperitoneal maruziyette emilim, yüzey alanının genişliğinden dolayı oral uygulamaya göre çok daha yüksektir. Ayrıca toksik etkili maddenin bir kısmı detoksifikasyon yollarına uğramadan hedef dokulara ulaşabilir. Bu durum kaçınılmaz olarak tüm hedef dokularda toksik etkinin artmasına neden olur. ZON'un Çizelge 2.4'te hayvanlardaki bazı akut toksisite (LD_{50}) çalışma sonuçları verilmiştir [39, 86].

Çizelge 2.4. ZON'un hayvan modellerinde akut toksisitesi, E (erkek), D (dişi)
(LD_{50} : Letal Doz 50) [39]

Türler	Cinsiyet	Uygulama yolu	LD_{50} (mg/kg vücut ağırlığı)
Fare	E/D	Ağız yoluyla	>2000
Fare	D	Ağız yoluyla	>20000
Fare	D	Periton içi	>500
Rat	E/D	Ağız yoluyla	>4000
Rat	E/D	Ağız yoluyla	>10000
Rat	E	Periton içi	5500
Kobay	D	Ağız yoluyla	>5000
Kobay	D	Periton içi	2500

Subakut ve subkronik toksisite

Deney hayvanları ve evcil hayvanlarda 90 günlük bir periyotta oral alımla yapılan toksisite çalışmalarında görülen etkilerin, ZON veya metabolitlerinin östrojen reseptörleriyle etkileşimine bağlı olduğu kabul görmüştür. Domuz ve koyunların kemirgenlerden daha hassas olduğu belirlenmiştir. Çoklu doz uygulamalarıyla yapılan kontrollü çalışmalarda ratlarda gözlenebilir etki oluşturmeyen düzey (NOEL; Non Observed Effect Level) 100 µg/kg vücut ağırlığı/gün olarak belirlenmiş ve bu değer uyarlanarak, domuzlarda NOEL 40 µg/kg vücut ağırlığı/gün (östrojenik etkinin gözlenmediği düzey) olarak kabul edilmiştir [39].

Domuzlarda yapılan tekrarlı doz çalışma sonuçlarının insanlara uyumlandırılmasıyla, ZON için östrojenik etkilerin gözlenmediği NOEL değeri 10 µg/kg vücut ağırlığı gün olarak belirlenmiştir. Dolaşımda ki yüksek östrojenlerin kısa veya uzun vadede olumsuz etkilere yol açabileceği, özellikle bebek ve yaşamın erken döneminde ki çocukların risk altında olabileceği düşünülerek kritik dozlar tespit edilmiştir. Bu amaçla, *tolere edilebilir günlük alım* (TDI, Tolerable daily intake) 0,25 µg/kg vücut ağırlığı gün, *geçici maksimum tolere edilebilir günlük alım* (PMTDI, Provisional maximum tolerable daily intake) ise 0,5 µg/kg vücut ağırlığı gün olarak belirlenmiştir [87].

ZON ve türevleri “Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı” (IARC, International Agency For Research on Cancer) tarafından değerlendirilmiş ve 1999 yılında Grup 3’te sınıflandırılmıştır. IARC, *Grup 3’e* karsinogenik etkileri insanda kanser yapıcı olarak sınıflandırılmayan kimyasal maddeleri dahil etmiştir [39].

Maksimum limitler

Bazı mikotoksinlerin tolerans düzeylerinin belirlenmesinde; diyet/rasyon veya diğer yollardan maruziyete dayalı yapılan toksikolojik çalışmaların verileri, mikotoksinlerin farklı alan ya da odaklara ham madde ile yayılması, diğer ülkelerdeki yasal düzenlemeler ile birlikte ticari anlaşmalar, analiz metotlarının tespiti yönelik uygunluğu gibi çeşitli faktörler ve parametreler yol gösterici

unsurlardır. ZON toksini hakkında 2003 yılında, gıda ve yemlerde 16 ülkede resmi düzenleme yapılmıştır. Mısır ve diğer tahıllarda ZON'un maksimum kalıntı limiti 50-1000 µg/kg arasında değişmektedir. Halen uygulamada olan Avrupa, Asya ve Afrika'da bulunan ülkelerde insan gıdaları ve hayvan yemlerinde ZON ile ilgili kabul edilen maksimum limitlere (ML; Maximum Level) ait düzenlemeler Çizelge 2.5'te verilmiştir [39, 88].

Çizelge 2.5. ZON için farklı ülkelerde gıda ve yemlerdeki maksimum limitler [39]

Ülke	Maksimum limit (µg/kg)	Hammadde
Ermenistan	1000	Bütün gıdalar
Avusturya	60	Çavdar, makarnalık buğday
	50	Damızlık domuz yemi
Beyaz Rusya	1000	Arpa, buğday, mısır
Bulgaristan	200	Doğrudan insan tüketimi için veya gıda maddelerine bileşen olarak tasarlanan hububat ve işlenmiş ürünler
Kanada	3000	Gebe olmayan dişi domuz yemi
Şili	200	Tüm gıdalar
Kolombiya	1000	Sorgum
Kıbrıs	2000	Yem maddeleri
	1500	Domuz yavruları için (bir günlük rasyon için yeterli)
	3000	Domuz yavruları hariç, diğer domuzlar
Fransa	50	Tahıl ve tahıl ürünleri
	200	Bitkisel yağlar
Estonya	1000	Buğday, arpa, mısır, tahıl unları (buğday, arpa, mısır), dövülmüş kabuksuz tahıl ve parçaları (buğday, arpa, mısır), makarna ürünleri, sıradan fırın mamülleri, şekerleme ürünleri, baklagiller, yağlar, zeytinyağı
	200	Sığır, domuz ve diğer çiftlik hayvanları için tamamlayıcı hayvan yemleri
	100	Bitkisel kökenli yem maddeleri, sığır, domuz ve diğer çiftlik hayvanları tamamlayıcı yem
	50	Genç sığır, genç domuz ve diğer genç çiftlik hayvanları için ek beslenme yemi
Macaristan	100	Öğütülmüş ürünler, tahıl bileşenli müsli
İran	400	Arpa
İtalya	20	Bebek mamaları
	100	Hububat ve türevi ürünler

Çizelge 2.5. Devam. ZON için farklı ülkelerde gıda ve yemlerdeki maksimum limitler [39]

Ülke	Maksimum limit (µg/kg)	Hammadde
Japonya	1000	Karma yemler
Letonya	1000	Tahıllar
	1000	Ekmek
Litvanya	300	Domuz yavrusu yemi
	100	Domuz yemi
Moldova	1000	Buğday ve buğday unu, arpa ve arpa unu, mısır ve mısır unu
Fas	200	Tahıllar, bitkisel yağlar
Romanya	20	Yemler
Rusya	1000	Buğday, arpa, mısır
	1000	Mısır
Sırbistan, Karadağ	500	Domuz yemi (50 kg'a kadar olanlar için)
	1000	Diğer domuzlar için yem
	3000	Sığır, koyun ve keçi yemi
	5000	Öküz yemi
Slovenya	1000	Domuz yemi
	40	Tahıl bazlı bebek maması ürünleri
Ukrayna	1000	Tahıllar, baklagiller; ayçiçeği püresi; un, ekmek; tüm kuruyemişler; hemen insan tüketimine sunulacak ve insan tüketimi için işlenen tüm tohumlar; bitkisel yağlar; kepekli buğday unu.
	40	Domuz karma yem (gebe, besi), damızlık domuz, iki aylıktan küçük domuz yemi
	1000	Yemlik/yem için soya püresi
Uruguay	200	Mısır, arpa

Avrupa Birliği üye ülkelerinde, birliğe aday olup uyum sürecinde olan, aynı kriterleri uygulayan Türkiye dahil bir çok ülkede tahıl, daneler ve bunlardan üretilen çeşitli gıdalarda Çizelge 2.6'da belirtilen limitler kabul edilmektedir. ABD ve Endonezya'nın da içinde bulunduğu birçok ülkede ise ZON için henüz düzenleyici yönergeler yapılmamıştır [89, 90].

Çizelge 2.6. ZON için belirlenen maksimum limitler (Avrupa komisyonu düzenlemeleri, No:1881/2006) [89]

Gıda Maddeleri		Maksimum limit (µg/kg)
1	İşlenmemiş tahıllar (mısır hariç)	100
2	İşlenmemiş mısır (ıslak öğütülecekler hariç)	350
3	Rafine mısır yağı	400
4	Doğrudan tüketime sunulan tahıllar, doğrudan insan tüketimine sunulan tahıl unları, kepek (son ürün olarak) ve embriyo	75
5	Ekmek (hafif fırıncılık ürünleri dahil), pastacılık ürünleri, bisküvi, tahıl çerezleri, kahvaltılık tahıllar (mısır çerezleri ve mısır bazlı kahvaltılık tahıllar hariç)	50
6	Doğrudan insan tüketimine sunulan mısır, mısır çerezleri ve mısır bazlı kahvaltılık tahıllar, aşağıda listelenen 7, 8, 9 ve 10 nolu gıda maddelerinin dışında,	100
7	İşlenmiş tahıl bazlı gıdalar(İşlenmiş mısır bazlı gıdalar hariç) ve bebek ve çocuklar için bebek mamaları	20
8	Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	20
9	500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısırın kabaca öğütülmesinden elde edilen küçük parçalar ve mısır irmiği (GTİP 1103 13) veya mısırdan elde edilen pelleter (GTİP 1103 20 40) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	200
10	500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır unu (GTİP 1102 20) 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 (GTİP 1904 10 10)	300

2.2.9. Gıdalarda ZON tayini

ZON ve metabolitlerinin biyolojik matriks, doku ve özellikle gıdalarda kontaminant olarak bulunabilmesinden kaynaklanan, insanlar ve diğer canlılarda ki advers etkilerini kontrol altına almak, önlemek için geçerliliği kabul edilmiş analiz yöntemleriyle şüpheli numuneler kontrol edilmeli ve gerekli önlemler alınmalıdır.

ZON ve metabolitlerinin farklı matrislerden tespitine yönelik en yaygın kullanılan analiz yöntemleri aşağıda belirtilmiştir:

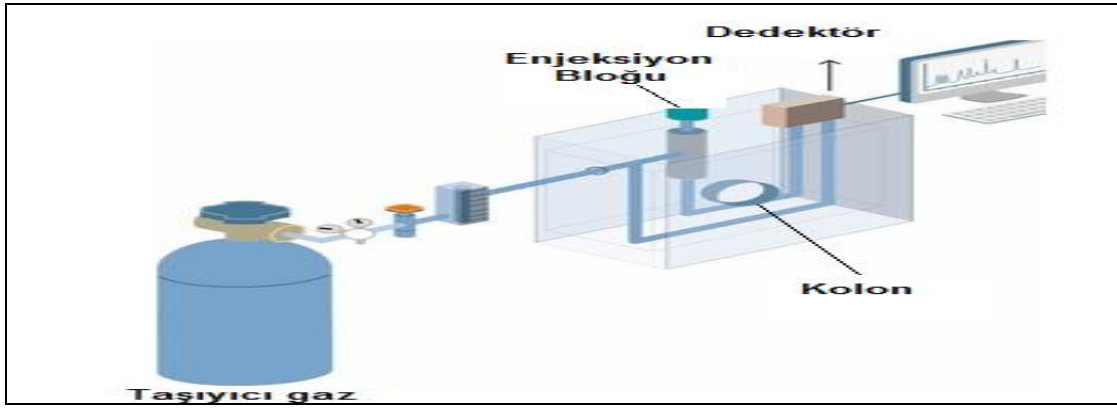
- İnce tabaka kromatografisi (İTK, TLC; Thin Layer Chromatography),
- ELISA,
- Gaz kromatografisi (GC; Gas Chromatography),
- Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometre (GC/MS; Gas Chromatography-Mass spectrometry, GC-MS-MS),
- HPLC-FLD (floresans dedektör) veya kütle spektrometrik algılama HPLC-MS ve HPLC-MS-MS; Likit kromatografi bağlı kütle algılama kombinasyonları
- Yüksek performanslı sıvı kromatografisi- kütle spektrometresi (LC-MS veya LC-MS-MS) [22].

2.3. Gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC/MS)

2.3.1. Gaz kromatografisi

Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. Daha basit bir tanımla maddelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinde ki farklardan yararlanarak bir karışımı oluşturan bileşikleri uygun bir teknikle birbirinden ayırma işlemidir [90, 91].

Gaz kromatografi James ve Martin tarafından 1952 yılında geliştirilmiş bir analiz yöntemidir. Bu teknik uçucu olan veya uçucu hale getirilebilen maddelerin belirli bir sıcaklıkta helyum, azot ve hidrojen gibi taşıyıcı inert gazların akışı yardımıyla sabit bir faz ile etkileşimleri sonucu ayrılmaları esasına dayanır [90, 91]. Gaz kromatografi cihazının bileşenleri Şekil 2.4'te şematize edilerek gösterilmiştir [81].



Şekil 2.4. Gaz kromatografi cihazının şematik gösterimi [92]

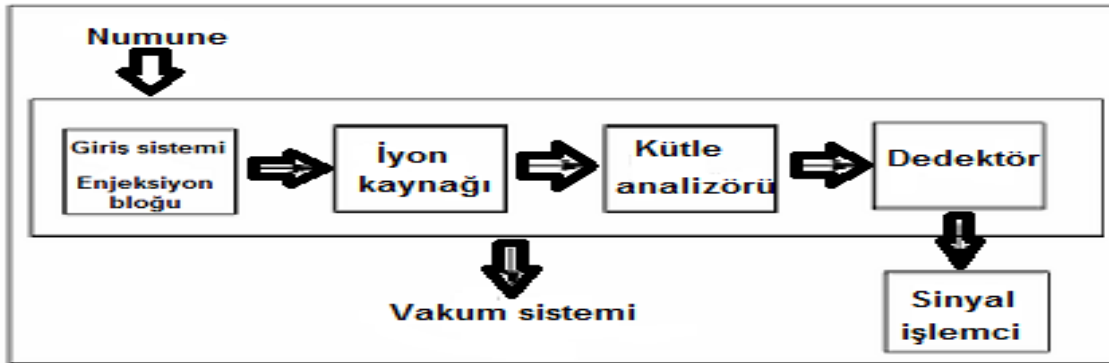
Gaz kromatografi sisteminde ana işlevsel merkez, kromatografik ayrımının meydana geldiği, değişik uygulamalara ve analiz edilecek maddeye uygun farklı tipte ve uzunlukta ki kolondur. Kolon içindeki sabit faz, kolon iç yüz cidarına tutturulmuş, dolgu materyali olarak isimlendirilen silika, alumina veya karbon gibi katı bir madde ise yöntem gaz-katı kromatografisi denir. Kolonda gerçekleşen ayırma, analitlerin katı faz üzerindeki farklı adsorpsiyon ilgilerine dayanarak gerçekleşir [93].

2.3.2. Kütle spektrometresi

Kütle spektroskopisi günümüzde mevcut tüm analitik yöntemler arasında en geniş uygulama alanı olanıdır. Maddelerin element bazında bileşimlerinin tespitinde; inorganik, organik ve biyolojik moleküllerin yapılarının aydınlatılmasında; karmaşık, kompleks karışımların kalitatif ve kantitatif analizlerinde; katı yüzeylerin yapılarının ve bileşimlerinin ortaya çıkarılması, bir numunedeki atomların izotopik oranlarının bulunmasında oldukça hassas, seçici ve başarılı bir yöntemdir. Bu tekniklerden biri olan gaz kromatografi-kütle spektrometresi iki güçlü analitik tekniğin ortak kombinasyonudur. Gaz kromatografisi bir ayırma tekniği, kütle spektrometresi ise bir teşhis tekniğidir [94, 95].

Kütle spektrometresinin temel prensibi, inorganik ya da organik bileşiklerin uygun bir yöntemle iyonlaşmayı sağlayan kaynak sayesinde iyonlarını oluşturmak, bu iyonları kütle/yük (m/z , mass number/charge number) oranlarına göre ayırmak, bunların m/z oranlarını ve iyon şiddetlerini (bağıl bolluklarını) ayrı ayrı nitel ve nicel

olarak tespit etmektir. Kütle spektrometresinde oluşan iyonların çoğu tek yüklü olduğundan m/z oranı basitçe iyonun kütlesine eşittir [94, 95]. Kütle spektrometresinin bileşenleri Şekil 2.5'te gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Kütle spektrometrisinin bileşenleri [90]

İyon kaynağı

İyon kaynağı, GC/MS'in, GC kısmında bulunan kolonu terk eden molekülleri, MS kısmında yüklü ya da iyonlaşmış hale dönüştürmektedir. Analizi yapılan örnekteki moleküller, yüksek voltajla ısıtılan bir flamandan anoda doğru akan bir elektron akımı tarafından, enerji yüklü elektronlarla bombardıman edilir. Elektrostatik kuvvetler molekülün elektron kaybederek doğrudan veya dolaylı olarak iyonlaşmasını sağlar. İyonizasyon ile hem pozitif ve hem de negatif iyonlar oluşur. Genel olarak pozitif olanlar fazladır ve analitik yöntemler de, çoğunlukla pozitif taneciklere dayanır. İyonların oluşmasından sonra bir kütle analizörü ile elektrik akımı ve manyetik alanın uygulanmasıyla iyonlar m/z oranlarına göre ayrılırlar [95, 96].

Kütle spektrometrelerinde kullanılan iyon kaynakları, gaz fazı kaynakları ve desorpsiyon kaynakları olmak üzere iki ana kategoriye ayrılır. Gaz fazı iyon kaynakları numunelerin yüksek ısıyla öncelikle buharlaştırılması, ardından kalan katı haldeki maddelerin iyonlaştırılması esasına dayanmaktadır. Diğer yöntemler ise katı veya sıvı haldeki bir numuneyi doğrudan gaz iyon haline dönüştürmektedir. İyonlaştırma için elektron iyonizasyon yöntemi en sık kullanılan yöntemdir [90].

Elektron iyonizasyon yöntemine, elektron impakt iyonizasyon da denir. Bu “sert”, seçici, hassas bir iyonizasyon tekniğidir. Elektron darbe olarak ifade edilen bu iyonizasyon ile kimyasal bağları kırabilir. Bu teknikte sistem yüksek vakum altında çalışılır. Gaz halinde olan örnek, hızlandırılmış ve 70 eV'luk yüksek enerjiye sahip elektronlar ile farklı açılarda veya çoğunlukla dik konumda vakum altında bombardıman edilerek iyon oluşumu sağlanır. Bu teknikte, yüksek kinetik enerjili elektronlar çarptıkları moleküllerin öteleme enerjilerinde küçük bir artışa neden olur. Buna karşılık etkileşen moleküller yüksek titreşim ve dönme seviyelerine uyarılırlar. Bu olayın akabinde uyarılan moleküllerde veya maddelerde sık sık yoğun parçalanma görülür ve kütlesi ana molekülden daha düşük olan çok sayıda değişik kütleli molekül (fragman) oluşur. Elektron iyonlaştırma yöntemi ile çok sayıda parçalanma ürününün oluşmasıyla, moleküle ait detay bilgilerde sağlandığından molekülün tayini kolaylaşır [90, 91].

Kütle analizörü

Farklı m/z oranlarındaki iyonları ayırabilmek için birçok analizör kullanılabilir. Kütle spektrometresinde ki iyonlaştırma bölgesinde oluşturulan iyonlar kütle analizörüne gelirler. Kütle analizörü olarak kuadropol, manyetik sektör analizörleri, çift odaklı spektrometreler, iyon tuzaklı analizörler, uçuş zamanlı analizörler kullanılır. Vakum pompası ile yaklaşık 10^{-7} torr basınç altında tutulan analizör tüpünde hızlı, hareketli iyonlar kuvvetli bir manyetik alan içine girerler ve alanın etkisiyle eğri bir yol çizerler. Bu yolun eğrimi (eğrinin çapı) manyetik alanın kuvvetine, iyonların hızına ve kütlesine göre değişir. İyonlaşma kaynağından sonra kütle analizörüne giren iyonlar burada m/z değerlerine göre sıralanırlar ve böylece maddelerin ayrımı kromatografik olarak gerçekleşmiş olur [90, 96].

Kuadropol tipi analizörlerde, manyetik alan yerine iyon demeti yoluna paralel yerleştirilen ve 10-30 cm uzunluğunda birbirine paralel konumda dört silindirik çubuktan oluşan bir sistem kullanılır. Kuadropol kütle analizörleri belirli m/z değerine sahip iyonlar için filtre görevi görür. Bu, elektrot olarak iş gören dört paralel silindirik çubukla sağlanır. Karşılıklı çubuklar birbirine bağlıdır; bir çift değişebilir doğru akım kaynağının pozitif tarafına, diğer çift ise negatif ucuna

bağlanır. Ayrıca, her çubuk çiftine değişebilir salınımlı radyo-frekanslı alternatif akım potansiyeli uygulanır [79-84]. Uygulanan radyo frekans salınımı iyonların çubuklar tarafından itilmesine veya çekilmesine neden olur. Bu esnada sadece belirli m/z oranına sahip iyonlar belirli bir eksen boyunca bir yörüngeye sahip olurlar ve diğerleri çubuklar tarafından tutulurken, onlar dedektöre geçerler. Kuadrupol ayırıcıların ayırım gücü yüksektir, oldukça kısa zamanda tarama gerçekleştirilir, ucuz ve kullanımı kolaydır [93-95, 97, 98].

Dedektör

Kütle spektrometresinin son bileşeni iyon dedektörüdür. Kütle spektrometre dedektörleri, tüm gaz kromatografisi dedektörleri arasında en güçlü olanlarıdır. Bir GC/MS sisteminde ayırma boyunca, kütle spektrometresi sürekli olarak kütleleri taramaktadır. Manyetik alanda m/z oranlarına göre ayrılan iyonlar, aralığı ayarlanabilen bir yarıktan geçtikten sonra dedektörle sayılırlar. Kütle spektrometrelerinde yaygın olarak kullanılan dedektör elektron çoğaltıcılardır (EM; Electron multiplier). İyonlar kütle analizöründen geçtikten sonra dedektörde bir sinyal oluşturulur. Dedektör girişinde yüzeye çarpan iyonlar elektronların salınmasına neden olur. Elektron çoğaltıcı iyonların enerjisini ikincil iyonlara dönüştürür. Bu dönüşüm oluşan sinyalde yaklaşık bir milyon kat artışa neden olmaktadır. Dedektör yüzeyinden yayılan ikincil elektronların çoğaltılmasıyla daha fazla tayin etkinliğine sahiptir. Bu tür dedektörler çok duyarlıdır ve daha hızlı cevap verirler [96, 98].

2.3.3. GC/MS’de verilerin elde edilmesi

Kütle spektrometresinde iki tip iyon tarama modu vardır. Bunlar toplam iyon taraması (SCAN; tüm iyonların taranması) ve seçilmiş iyon taraması (SIM; Selected Ion Monitoring) modlarıdır. Toplam iyon tarama modunda geniş bir aralıkta m/z taraması yapılır. Cihaza enjekte edilen örnekteki bütün maddelere ait piklerin tamamı gözlenir. SIM modu belirli bir aralıktaki bütün m/z değerlerinin taranmasından ziyade, sadece birkaç analite ait seçilmiş m/z değerinin tarandığı moddur [95]. Tarama, iyonlaşmış maddelerin m/z değerleri seçilen bileşiği en iyi

temsil edecek şekilde yapılır. SIM modunda kütle analizörü, seçilen analite ait m/z değerlerini dönüşümlü olarak ölçmektedir. Analizörde ki süreç bir m/z değerinden diğerine atlamaktadır. Bu nedenle analiz için gereksiz olan m/z değerlerinde harcanan tarama süresi sıfıra inerken hedef iyonlar için sinyal integrasyon süresi 10 ile 100 kat arasında artmaktadır. Bu da duyarlılığın ve seçiciliğin artmasını sağlamaktadır. SIM modu genellikle hedef-bileşik analizlerinde ve miktar ölçümlerinde kullanılmaktadır. SCAN modu ise analitin özellikle alınma zamanını belirleyerek varlığının teyidinde ve var olabilecek diğer analitleri tespit etmek için kullanılabilmektedir [95, 96, 99].

2.3.4. GC/MS ile nitel ve nicel analiz

GC/MS hem nitel hem de nicel analizin birlikte yapılmasına imkan sağlayan enstrümental bir cihazdır. Örneğe ait kromatogramdaki herhangi bir pikin veya bütün piklerin kütle spektrumları, sistem bilgisayarına yüklenmiş olan kütüphanedeki spektrumlarla karşılaştırılabilir [100]. Bu amaçla NIST (National Institute of Standards and Technology's) ve WILEY Kütüphaneleri gibi GC/MS üreticileri tarafından ortak kabul edilmiş çok sayıda maddeye ait bilgilerin yer aldığı ticari spektral kütüphaneler sıklıkla kullanılmaktadır. Bilinmeyen örnek için yapılan kütüphane araştırması eğer o madde kütüphanede tanımlı ise ve temiz, gürültüden uzak bir kütle spektrumu almaya imkan sağlayacak ölçüde etkili bir gaz kromatografi ayrımı yapıldıysa doğru sonuca götürebilmektedir. Ayrıca bilinmeyen analite yönelik yapılan analizde başlangıçta güvenilir ve yol gösterici bir kaynak teşkil eder. Fakat spesifik maddelerin analizinde araştırmacının tercihi güvenilirlik açısından çok daha önemlidir. Bazı madde analizlerinde, özellikle matriks yoğunluğundan veya metoda bağlı farklı nedenlerden kaynaklı kütüphane verileri yeterli olmayabilir. Bu durumda referans standart maddeden elde edilecek verilere göre hareket edilmelidir [101, 102].

Nicel analiz GC/MS'in önemli bir uygulama alanıdır. GC/MS'in nicel analizdeki gücü, yüksek seçiciliğe ve düşük tayin limitlerine ulaşılabilmesi ile açıklanabilir [90]. Nicel analiz, tespiti yapılmak istenen bileşiğin bilinen konsantrasyonunun ölçülmesi ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmesine dayanır. Kalibrasyon eğrileri

genellikle geniş bir konsantrasyon aralığında doğrusaldır. Konsantrasyon, teşhis sınırına yaklaştıkça ve konsantrasyonlar arasında fark büyüdükçe doğrusallıktan sapmalar olmakta, belirlenen düzeylerle çizilen kalibrasyonda değerlendirilen sonuçlar gerçek değerlerden farklı çıkmaktadır [95, 103, 104].

2.3.5. Türevlendirme

Türevlendirme, enstrümental analizlerde kromatografik seçiciliği ve duyarlılığı artırmaya yönelik çoğunlukla ısı altında yapılan bir kimyasal işlemdir. Gaz kromatografisi ile yapılan çalışmalarda bileşiklerin termal kararlılığının artırılması, kaynama noktasını düşürmek, molekül ağırlığını arttırmak, daha spesifik iyonlar oluşturmak ve polar gruplar içeren bileşiklerin uçuculuğunun sağlanması, analite spesifik özellikler kazandırarak daha fazla tanınır hale getirilmesi gibi nedenlere bağlı olarak türevlendirme gerekebilmektedir. Türevlendirme bileşikteki polar grup üzerinden yapılır. Sonuçta oluşan türevin polaritesi azaltılmış, uçuculuğu artmış ve ısı kararlılığı iyileştirilmiş olmaktadır. Bu amaçla en yaygın olarak uygulanan türevlendirme çeşitleri; genellikle iyonik organometalik türlere uygulanan alkilleme, yer değiştirme yöntemi ile bir açıl grubunun bir moleküle eklenmesini amaçlayan açilleme ve organik moleküldeki aktif bir hidrojenin bir silil grubuyla yer değiştirilmesini sağlayan silillemedir. Analite yönelik doğru türevlendirme ajanının seçimi, türevlendirme süresi ve sıcaklığı veya türevlendirme ajanına farklı kimyasallar katmak gibi birçok faktör önem taşımaktadır [105-110].

2.4. Katı faz ekstraksiyonu metodu

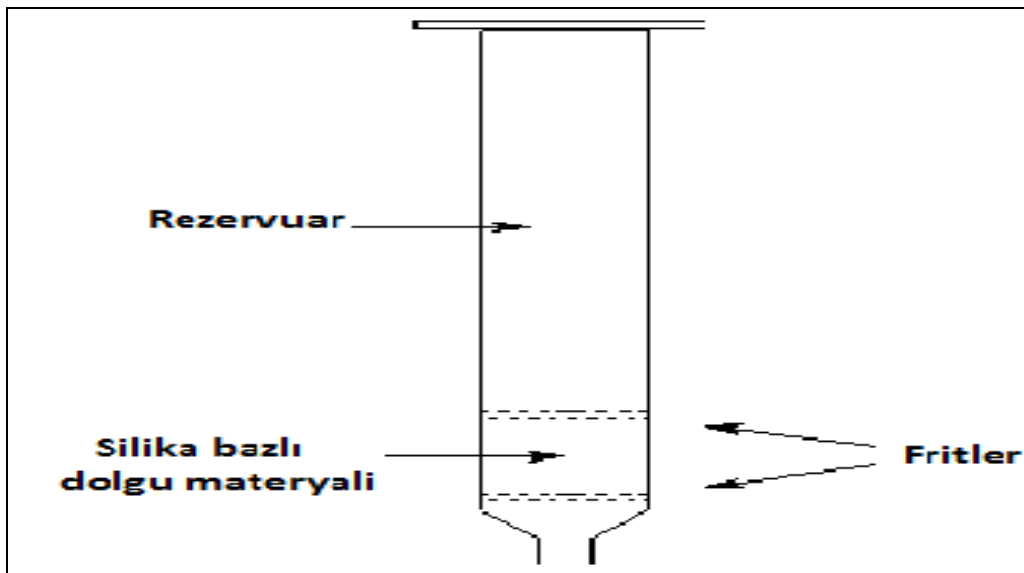
Katı faz ekstraksiyonu metodu (SPE, Solid phase extraction) sıvı bir karışımdaki çözünmüş veya süspansiyon halindeki bileşikleri, fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak diğer bileşiklerden ayırma esasına dayanan bir süreçtir. SPE yönteminin kan, plazma, serum, doku, idrar gibi biyolojik; su, toprak, çeşitli atık benzeri çevresel ve gıda, farmasötik ürünler gibi çok çeşitli matrikslerden analit veya analitleri izole etmeyi amaçlayan oldukça geniş bir uygulama alanı vardır. Analitik laboratuvarlar numuneyi konsantre etmek ve matriks ortamından analiti saflaştırmak için SPE'yi kullanmaktadır. Bu nedenle örnek hazırlama; özellikle

HPLC, GC, GC/MS, LC/MS/MS, radioimmün assay (RIA), atomik absorpsiyon spektrometre (AAS) gibi cihazlar yardımıyla yapılan analizler öncesinde özellikle tespit edilmek istenen analitin seçiciliğinin artması için uygulanması gereken çok önemli ve tercih oranı yüksek bir basamaktır [111, 112].

Örnek hazırlama işlemi başlıca iki amaç için yapılmaktadır. Bunlar sırasıyla; örneklerin istenmeyen bileşenlerden temizlenmesi (clean-up), bir diğeri ise tespit edilebilir düzeyin üstüne çıkabilmek için yoğunlaştırılmasıdır. Temizleme işlemi ile matriksten analizin yanlış sonuçlanmasına neden olabilecek, aranan maddenin tespit edilmesini engelleyebilecek veya analiz yapılan cihazın kirlenerek, sonraki çalışmalarda tekrarlanabilirliğinin azalmasına neden olacak kirliliklerin (impurity) uzaklaştırılması sağlanır. Özellikle doku, kan ve plazma, çeşitli atık gibi yoğun ve karmaşık matriks içeren örneklerden yapılan analizlerde temizleme işlemi analiz cihazının istenmeyen matrikslerden, etkileşimlerden kurtularak doğru ve tekrarlanabilir sonuç vermesini etkileyen en önemli parametredir. Ayrıca temizleme işlemi analiz cihazının uzun dönemde performansını, amortisman (kolon, aşınma, yıpranma payı) giderlerinin azalmasını ve doğru sonuçlarla verimliliğini artıracaktır [111, 113].

Analiz öncesi yapılması gereken örnek hazırlama süreci, çoğunlukla zor, pahalı, zaman alan ve ciddi iş gücü gerektiren bir işlemdir. Analitin, analiz süreci boyunca etkinliğini kaybedip bozulması ve tespitinin zorlaşması gibi birçok önemli parametre, örnek hazırlama sürecinin seçiminde rol almaktadır. Uzun yıllardır en sık kullanılan örnek hazırlama yöntemi olan sıvı-sıvı ekstraksiyon (Liquid-liquid extraction, LLE) yöntemi, fazla miktarda çözücüye ihtiyaç duyulması, ekstraksiyon sırasında emülsiyon faz oluşması, karmaşık ve yoğun matriks içeren numunelerde gerekli saflığa sahip olmayan ekstraktlar elde edilmesi, çözücülerin yeterince uzaklaştırılamaması ve duyarlı kantitatif sonuçlar elde edilememesi gibi istenmeyen durumlara neden olabilmektedir. Kromatografik analizler öncesinde genellikle tek bir örnek hazırlama tekniği yeterli olmamakta, bu yöntemlerden birden fazlasının kombinasyonu gerekmektedir. Klasik olarak analizden önce, sıvı-sıvı ekstraksiyonu, bunu takiben evaporasyon/uçurma ve uygun çözücünün eklenerek tekrar seyreltilmesi işlemleri bir arada uygulanmaktadır [111, 113, 116].

SPE yöntemi, temel olarak küçük, tek kullanımlık (disposable) ekstraksiyon kolon veya disklerine, farklı miktarlarda çeşitli adsorban maddelerin doldurulması ve sıvı örneklerde analit dışında ki istenmeyen bileşenleri ayırma, yoğunlaştırma ve analizin devamında örneğin içerdiği matriks yapısının değiştirilmesi amaçlarıyla hazırlanmış olan kolon ve disklerden geçirilmesi prensibine dayanmaktadır. Sıvı örneğin kolondan geçirilmesi, yerçekimi aracılığıyla gerçekleştirilebildiği gibi, zaman kaybının önüne geçmek amacıyla kolon bileşimine negatif basınç sağlayan, vakum manifold (arttırma, çoğaltma) olarak isimlendirilen bir düzenele, vakum yardımıyla da yapılabilir. [112, 114]. Klasik bir SPE kolonunun yapısı, disk ve plakaları Şekil 2.6 'da görülmektedir.



Şekil 2.6. SPE kolonu ve yapısı [115]

SPE metod prosedüründe kolondan geçirme sırasında, örnek molekülleri ile kolon dolgusunda ki adsorban madde arasında ikincil bir etkileşim meydana gelmektedir. Hedef analite yönelik bu etkileşimden faydalanarak maddelerin ayrılma işlemi gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemde analiz edilecek bileşik adsorban maddeye bağlanarak kolon içinde tutulurken, ekstraksiyon çözeltisi ve istenmeyen bileşenler bu madde ile herhangi bir etkileşime girmeden örneğin geçiş sürecinde kolon dolgu materyalinden akıp uzaklaşırlar. Daha sonra kolon dolgusuna tutunmuş sıvı matriksteki analit harici istenmeyen bileşenler uygun yıkama çözeltisi ile uzaklaştırılır. Analiz edilecek hedef bileşen kolonda ki adsorban maddeden uygun bir çözelti yardımıyla çözündürülerek alınmaktadır [111, 112, 114, 118, 119].

2.4.1. SPE metodunda maddelerin ayrılma prensipleri

SPE metodunda maddelerin birbirinden ayrılması, analizi yapılacak maddenin molekülleri ile adsorban maddenin yapısında bulunan etkin gruplar arasında ki moleküller arası etkileşimler sayesinde gerçekleşir. Analiz edilecek madde adsorban maddelerdeki etkin gruplara farklı kimyasal bağ ve etkileşim yapar. Analiz için uygulanacak SPE prosedüründe maddelerin birbirinden ayrılması, kromatografik yöntemlerle benzerlik gösterir. SPE metodunda analiz edilecek madde, çözücü ve adsorban maddelerin özelliklerine göre çeşitli ayırma mekanizmaları rol oynar. Bu ayırma mekanizmaları başlıca; normal faz, ters faz, iyon değişim (katyonik ve anyonik değişim) ve moleküler eleme (size exclusion) olarak sayılabilir. Günümüzde analistlerin en çok tercih ettiği yöntem *ters faz* mekanizmasıdır. Bu ayırma mekanizması, adsorban maddenin örnek çözeltisinden daha düşük polariteye sahip olduğu sistemdir. Ters faz kromatografide sabit faz polar olmayan bir çözücü, hareketli faz ise polar bir çözücüdür. Hareketli fazda ki küçük değişimlere daha az duyarlıdır, elemine eder. Normal faza göre elüsyon daha hızlıdır. Oktadesil (C₁₈) bu teknikte en fazla kullanılan adsorban madde olmakla birlikte, oktil (C₈), sikloheksil, bütül, fenil ve siyano da çeşitli örnekler için seçici olmaları nedeniyle tercih edilirler. Ters faz, klinik ve çevresel amaçlı örneklerdeki organik kalıntıların analizinde çok yaygın şekilde kullanılan bir ayırım tekniğidir [111-114, 118-121].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Numune temini

Analizi yapılacak olan tahıl bazlı bebek mamalarından 2014 Mayıs ve Eylül ayları arasında Ankara iline bağlı Keçiören, Çankaya, Altındağ ve Yenimahalle ilçelerinde bulunan süpermarket ve hipermarketlerden rastgele 4 farklı firmaya ait, farklı parti üretimi, üretim ve tavsiye edilen son tüketim tarihleri farklı olacak şekilde 44 adet numune toplanmıştır. Numuneler temin edildikten analiz edileceği zamana kadar olası kontaminasyon durumlarını stabilize etmek için -18 °C'de muhafaza edilmiştir. Numuneler temin durumuna göre yaklaşık bir aylık periyotta analize alınmıştır. Numunelere ait bilgiler Çizelge 3.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Analiz edilen numunelere ait bilgiler

Marka	Analiz edilen numune adedi	Ürünün tahıl içeriği / Miktar (g)	Enerji değeri kcal (100 g)*	Üretim tarihi / Son tüketim tarihi
A	11	Tahıl unları(%99,5) (Buğday, yulaf, pirinç, darı, arpa, mısır, çavdar); kalsiyum karbonat, demir pirofosfat, potasyum iyodür, vitaminler / 200 g	362	- / 24.04.2015 - / 29.05.2015 - / 28.06.2015 - / 30.08.2015
B	11	% 73 tam tahıllar (% 52 tam tahıllı buğday unu, % 17 tam tahıllı arpa unu, % 16 tam tahıllı yulaf gevreği, % 9 tam tahıllı kabuklu buğday, % 6 tam tahıllı çavdar unu), % 16 mısır unu, % 10 pirinç irmiği, B ₁ vitamini / 200 g	383	- / 23.07.14 - / 31.02.15 11.07.14 / 11.07.15 13.02.13 / 31.08.14 07.11.12 / 31.05.14 25.04.13 / 19.10.14 31.08.14 / 31.04.15
C	11	Tahıllar (%76.5); buğday unu, hidrolize edilmiş buğday unu, pirinç unu, öğütülmüş arpa, öğütülmüş çavdar, mısır unu, süktroz, dekstroz, kalsiyum karbonat, demir pirofosfat, potasyum iyodür vitaminler / 125 g	389	- / 12.05.14 - / 29.07.14 - / 17.06.14 - / 29.07.14 27.02.14 / 27.08.15 29.04.14 / 29.10.15 12.06.14 / 12.12.15
D	11	Tahıl unları (%45); pirinç, tam buğday, yulaf, darı, arpa, mısır, çavdar, buğday lifi, öğütülmüş şeker, laktoz, süt proteini, bitkisel yağ, mineraller, vitaminler / 250 g	357	11.03.14 / 11.03.15 21.05.14 / 21.05.15 15.07.14 / 15.07.15 25.09.14 / 25.09.15

3.1.2. Cihaz, sarf malzeme ve ekipmanlar

Metod optimizasyonu, metodun geçerli kılınması aşamalarında kullanılan tüm enstrümental cihaz, ekipman, sarf malzemeler, standart maddeler, susuz toz/granül kimyasal madde ve solventlere ait bilgiler Çizelge 3.2-4'te belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan cihaz, sarf malzeme ve ekipmanlar

Cihaz/Ekipman Adı	Marka
Gaz Kromatografi	HP 6890 (Agilent Tec., CA, USA)
Kütle Spektrometresi	HP 5973 (Agilent Tec., CA, USA)
GC kolon	HP5MS (J&W Scien., Milan, Italy)
Santrifüj	Kubota, 5500 (Japan)
Vorteks	(Firlabo, Lyon, France)
Ultrasonik su banyosu	Sonorex (Walldorf, Germany)
Etüv	Elektro-mag (Turkey)
Hassas terazi	Extend (Sartorius, Goettingen, Germany)
Derin dondurucu	Vestfrost (Denmark)
Numune yoğunlaştırıcı	VLM Eva 1 VIS (Germany)
Deiyonize su cihazı	Milli-Q (Millipore, Milford, MA, USA)
C ₁₈ SPE kartuş, 500 mg, 6 mL	Althech
0,45 µm naylon filtre	Macherey-Nagel (Germany)
15 mL'lik vida kapaklı cam tüp	Yerli üretim

3.1.3. Kimyasal maddeler

Metod optimizasyonu ve örnekler için yapılan analiz sürecinde ki farklı aşamalarda kullanılan GC saflıkta solvent, türevlendirme ajanı, susuz kuru toz/granül kimyasal maddeler ve üretici firma markaları Çizelge 3.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.3. Analizde kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal madde	Marka
Tersiyer Bütil Metil Eter	Merck (Darmstadt, Germany)
Metanol	Merck (Darmstadt, Germany)
Aseton	Merck (Darmstadt, Germany)
Asetonitril	Merck (Darmstadt, Germany)
İsooktan	Merck (Darmstadt, Germany)
BSTFA:TMCS (99:1)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
Sodyum klorür	Merck (Darmstadt, Germany)
Magnezyum sülfat	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)

3.1.4. Analitik standart maddeler

Analiz sürecinde geri kazanım ve kalibrasyon grafiği için kullanılan sertifikalı referans toz standart maddeler Çizelge 3.3’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.4. Referans standart maddeler

Standart madde	CAS Number	Marka
Zearalenone (F-2 toxin), C ₁₈ H ₂₂ O ₅	17924-92-4	Sigma-Aldrich
α-Zearalenol (2,4-Dihydroxy-6- (6α,10-dihydroxy-trans-1-undecenyl) benzoic acid μ-lactone), C ₁₈ H ₂₄ O ₅	36455-72-8	Sigma-Aldrich
β-Zearalenol (2,4-Dihydroxy-6- (6β,10-dihydroxy-trans-1-undecenyl) benzoic acid μ-lactone), C ₁₈ H ₂₄ O ₅	71030-11-0	Sigma-Aldrich

3.1.5. Stok çözeltilerin hazırlanması

Standart ana stok çözeltinin hazırlanması

Toz standart madde 1 mg miktarında hassas terazide tartılıp 10 mL asetonitrilde çözülerek 100 µg/mL konsantrasyonda ana stok çözeltisi hazırlandı.

Standart ara stok çözeltisinin hazırlanması

Hazırlanan 100 µg/mL’lik ana stok çözeltisinden 1mL alınıp üzerine 9 mL asetonitril eklenerek 10 mL, 10 µg/mL konsantrasyonda ara stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan 10 µg/mL 10 mL konsantrasyonda ki ara stok çözeltisinden 1mL alınıp üzerine 9 mL asetonitril eklenerek 10 mL, 1 µg/mL stok çözelti hazırlandı. Bu toz standarttan ana ve ara stok çözelti hazırlama prosedürü her üç analit içinde yapıldı. En düşük konsantrasyonda hazırlanan 1 µg/mL stok çözeltiden iki farklı çalışma düzeyinde kalibrasyon grafikleri için boş numunelere eklemeler yapıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC/MS) çalışmaları

GC/MS ile analizlere başlamadan önce cihazın MS kısmında bulunan iyonlaştırıcı, kütle analizörü ve dedektör kısımlarının ayarlanması amacıyla uçuculuğu yüksek ve kararlı organik bileşikler kullanılarak sistemin ayarlanması gerekmektedir. Bu amaçla cihaz üreticisi tarafından üretim aşamasında cihaza entegre olan, kuadropol sistemlerinde yüksek uçuculuğu ve kararlılığı sebebiyle en çok tercih edilen perflorotribütilamin (PFTBA) kullanılmıştır. Sistemde bu işlem software'den komutla "AUTOTUNE" denilen donanım kullanılarak yapılmıştır. Bu maddeye özgü olan 69, 219, 502 m/z değerindeki iyonlara ait değerler ile Çizelge 3.5'te belirtilen standart değerler karşılaştırılarak sistem ile ilgili değerlendirme yapılmıştır. Elde edilen değerler standart değerler ile karşılaştırılmış ve uyumlu olduğuna, cihazın optimal şartlarda çalıştığına karar verilerek analize başlanmıştır. Bu işlem cihaza numune enjeksiyonu yapmadan önce her gün rutin olarak tekrar edilmiştir.

Çizelge 3.5. PFTBA'ya ait karakteristik iyonlarına ait standart değerler

Kütle		Bağıl Bolluk (%)	İzotop Kütle	İzotop Oranı (%)
69,0		100,0	70,05	0,5 – 1,13
219,0		>35,0	219,95	3,2 – 4,43
502,0		>1,0	503,05	7,9 – 10,51

GC/MS çalışmalarında duyarlılığı ve analitlerin seçiciliğini artırmak amacıyla SIM modu kullanılmıştır. GC/MS cihazına ait diğer parametreler Çizelge 3.6'da, GC'de kullanılan sıcaklık programı ise Çizelge 3.7'de belirtilmiştir [122].

Çizelge 3.6. GC/MS analiz parametreleri [122]

Kolon Başlangıç Sıcaklığı	: 140 °C
Enjektör Bloğu Sıcaklığı	: 230 °C
Transfer Bloğu Sıcaklığı	: 250 °C
Kolon Tipi	: Difenildimetilpolisiloksan(%5:%95) içerikli 30 m, 0.25 µm film kalınlığında, 0.25 mm çaplı
İyonizasyon Tipi	: EI (70 eV)
Kütle analizör Tipi	: Kuadropol
Enjeksiyon Tipi	: Splitless
Enjeksiyon Miktarı	: 2 µL
Taşıyıcı Gaz	: Helyum (1 mL/dakika)
Analiz Süresi	: 16 dakika
İyon Tarama Şekli	: SIM

Çizelge 3.7. GC fırın sıcaklık programı [123]

Artış Hızı (°C /dakika)	Sıcaklık Değeri (°C)	Bekleme Süresi (dakika)	Toplam Analiz Süresi (dakika)
20	300	7,5	16

3.2.2. Analiz yöntemi geliştirme

ZON ve metabolitlerinin GC/MS'te tayinlerinin yapılabilmesi amacıyla daha önce yapılmış analitik çalışmalar kaynak alınarak, SPE yöntemi değişik aşamalarında optimize edilerek geliştirilmiştir. Bu yöntemde organik çözücüler kullanılarak matrikste bulunması olası hedef analitlere yönelik referans standart maddeler kullanılarak en uygun prosedür belirlenip GC/MS'e uygulanmıştır. Analiz yöntemi çeşitli basamakları içermekte olup her bir basamak için uygun optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

3.2.3. Ekstraksiyon çözücüsünün seçimi

ZON ve metabolitlerinin katı/toz haldeki numuneden tespiti amacıyla, analitlerin ekstraksiyonlarında en çok tercih edilen organik çözücülerden su, asetonitril, metanol, aseton ve tersiyer bütıl metil eter (TBME) denenmiştir [124-126].

Numuneden analitleri çözmek için yukarıda ifade edilen organik çözücüler tek başlarına ya da asetonitril:metanol, asetonitril:su, metanol:su karışımları farklı oranlarda denenmiştir [124-126]. İki farklı çözücünün farklı karışım oranlarıyla analize devam edildiğinde veya asetonitril ve metanol tek başlarına kullanıldığında GC/MS'e enjekte etmeye uygun olmayan yoğun kirlilikle karşılaşmıştır. Fakat ekstraksiyon çözücüsü olarak TBME'in tercih edilmesi ile analizin devamında diğer çözücü karışımlarına oranla gözle anlaşılabilir şekilde daha temiz çözelti elde edilmiştir. Buna ek olarak TBME'in diğer çözücülere oranla kaynama noktasının düşük olması, örnek yoğunlaştırıcıda daha kısa sürede uçmasını sağlamış ve analiz süresinin kısılması açısından önemsenecek derecede kazanç sağlamıştır.

3.2.4. Ekstraksiyon çözücüsünün uygun hacminin araştırılması

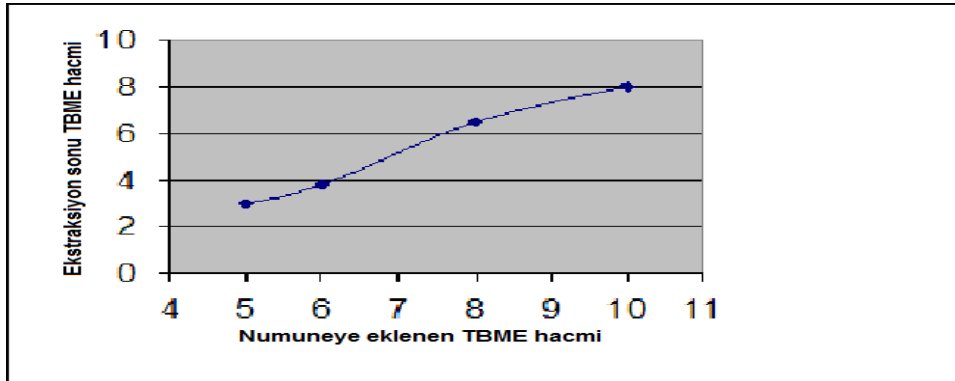
Ekstraksiyon çözücüsünün hacmini belirlemek için, farklı hacimlerdeki TBME farklı firmalara ait, farklı oranlarda içerik ve partikül büyüklüğüne sahip numunelere ilave edilmiş, santrifüj sonrası üst fazdan alınabilen hacmin miktarına göre çözücü hacmine karar verilmiştir. Ekstraksiyon çözücü hacminin belirlenmesi 3.2.5'de anlatılmıştır.

3.2.5. Numuneden analitlerin ekstraksiyonu

Katı fazdan organik çözücüyle ekstraksiyonun amaçlandığı bu basamakta, 5 g numune alınır, 50 mL'lik plastik vida kapaklı plastik propilen santrifüj tüplerine aktarılır. Üzerine 1 µg/mL'lik ZON, α-ZOL ve β-ZOL stok çözeltilerinden metod denemelerinde yüksek konsantrasyonda doğru tespit için yol gösterici olması açısından 100 µL eklendi.

Propilen tüpteki numune üzerine 4 g magnezyum sülfat ($MgSO_4$), 1 g sodyum klorür ($NaCl$) ve 10 mL TBME konur. Tüpün kapağı sıkıca kapatılıp ekstraksiyon ve numune sistemi bir dakika ultrasonik banyoda bekletildikten sonra bir dakika vorteksle karıştırıldı [124-127].

Analizde kullanılabilecek en uygun TBME hacmi, yapılan optimizasyon çalışmaları doğrultusunda belirlenmiştir. TBME hacminin belirlenmesi için sırasıyla 5 mL, 6 mL, 8 mL ve 10 mL denenmiş, en stabil sıvı üst fazdaki hacimsel geri kazanımın 10 mL’de olduğu görülmüştür. Denemeler sonucu farklı yapıda ki numunelere 10 mL TBME eklendiğinde yaklaşık 8 mL’lik geri kazanım olmuştur. Numuneye TBME’nin 10 mL’den fazla eklenmesi durumunda ortama numuneden ilave yoğun matriks geçişi olduğu, çözeltide kirliliğin arttığı tespit edildiğinden denemeler sonlandırılmıştır (Bkz. Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Analizde kullanılacak TBME miktarı

Vorteksle karıştırma işleminden sonra sistem 10 dakika 3500 Rpm hızla santrifüj edilir. Santrifüj süresini belirlemek için yapılan çalışmada 5, 10 ve 15 dakikalar denenmiş, 10 dakikalık sürede TBME’in katı fazdan en belirgin şekilde ve stabil hacimde ayrıldığı görülmüş, 15 dakikalık sürede ise değişen bir sonuç gözlemlenmemiştir.

Santrifüj edilen ve faz ayrımı sağlanan numunede üst fazda toplanan 8 mL’lik TBME plastik pastör pipeti yardımıyla 10 mL’lik vida kapaklı cam santrifüj tüpüne alınır. Propilen tüpte kalan katı ekstraksiyon sistemine muhtemel analit kalıntıları tekrar toplamak ve geri kazanımı artırmak amacıyla 10 mL TBME eklenerek

yukarıdaki prosedür tekrar edilip, önceki toplanan üst fazla birlikte uçurma işlemine tabi tutulur. Açık sistem örnek yoğunlaştırıcıda 55 °C'de azot gazı yardımıyla TBME'de çözünmüş matriks tamamıyla uçurulur. Uçurma sonucu cam santrifüj tüpünde numuneye ait farklı bileşinleri barındıran matriks kuru kalıntı halinde kalır.

3.2.6. SPE aşaması

SPE C₁₈ basamağı

SPE C₁₈ basamağı, cam santrifüj tüpünde kuru kalıntı halinde bulunan, TBME aracılığıyla numuden çözünmüş maddelerin istenmeyen polar gruplar ve matrikslerden ayrılıp saflaştırılarak hedef analitlerin elde edilmesi aşamasını kapsar. Bu basamak optimize edilen metodun en kritik noktalarını kapsamaktadır.

Numuneden çözünmüş ve kuru kalıntı halindeki maddelerin C₁₈ kolonundan geçirilmesi için cam santrifüj tüpüne 5 mL 40:60 oranında metanol:su konulup 1 dakika ultrasonik banyoda bekletilir. Ultrasonik banyo vasıtasıyla cam tüpün cidarına yapışmış ve vorteksle çözdürmekte zorlanılacak kalıntıların kolayca çözünmesi amaçlanmıştır. Bu işlemin ardından 1 dakika vorteks yapıp tüp içerisindeki serbest hale geçmiş bütün maddelerin çözünmesi sağlanır [128].

Tüp içerisindeki kuru kalıntı halindeki maddelerin çözünmesi ve C₁₈ kolonundan geçirilmesi için belirlenen 40:60 metanol:su oranına bir sonraki aşama olan yağ ve yağ benzeri matrikslerin yağ çözücü bir solvent olan n-hekzan ile ortamdan uzaklaştırılması işlemi esnasında karar verilmiştir. Çözücü için 30:70, 40:60, 50:50 metanol:su içeren ekstraktlara eklenen n-hekzan ile yağların uzaklaştırılması işleminde; 30:70 ve 50:50 metanol:su oranlarında üst kısımdaki n-hekzan fazının çözeltinin bulunduğu alt fazdan tam olarak ayrılmadığı, fazlar arasında bulutsu, süspanse bir görüntünün olduğu gözlemlenmiştir [129].

Homojen halde çözünmüş matriks ve bileşenleri içeren 5 mL 40:60 metanol:su C₁₈ kolon aşamasına yönelik hazırlık için 0,45 µm naylon filtreden vakum altında süzölmüştür. Bu işlemle, ortamda matriksten gelen partiküllerin C₁₈ kartuşunun

porlarını tıkayarak, atmosferik basınç altında akışkanlığa engel olmamaları sağlanmıştır. Ayrıca porlardan geçerek sonraki aşamalara taşınıp GC/MS'te, dolayısıyla kromatogramlarda oluşturacakları kirlilikten kaynaklı hassasiyet kaybının önüne geçilmesi sağlanmıştır.

Çözünmüş maddeleri içeren 5 mL 40:60 metanol:su çözeltisi üzerine yağ ve benzeri matrikslerin uzaklaştırılması için 2 mL n-hekzan eklenip, yaklaşık 30 saniye vortekslenerek 5 dakika 3500 Rpm hızında santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası yağ ve benzeri matriksleri içeren üsteki n-hekzan fazı plastik pastör pipeti yardımıyla uzaklaştırılmıştır.

Kullanılan n-hekzan miktarı için öncelikle 1 mL hacim denenmiş, 3500 Rpm hızla 5 dakika santrifüj sonrası her iki faz arasında bir ara geçiş fazı olduğu ve alt fazın berrak olmayıp yağ damlacıklarından kaynaklandığı düşünülen bulanık bir görüntüde olduğu görülmüştür. Çözücü sistemine tekrar 1 mL n-hekzan eklenip işlem tekrarlandığında iki faz arasında ayrılmanın tam ve alt fazın oldukça berrak olduğu görülmüştür. Santrifüj süresine 5 dakika ile başlanmış ve faz ayrımının keskin sınırlarda gerçekleştiği görüldüğünden farklı bir süre denemesi yapılmamıştır.

Yağ ve benzeri matrikslerin uzaklaştırılmasından sonra hedef analitler ve numuneye ait diğer tüm matrikslerin bulunduğu 5 mL 40:60 metanol:su çözeltisinin SPE C₁₈ kolonundan geçirilmesi işlemi yapılır. Bu aşamayla hedef analitler dışında istenmeyen diğer tüm bileşenlerin olabildiğince uzaklaştırılması amaçlanmıştır.

Numuneye ait 5 mL 40:60 metanol:su çözeltisinin C₁₈ kolonundan geçirilmesinden önce kolonun şartlandırılması işlemi yapılır. Şartlandırma için öncelikle 5mL metanol ve arkasından 5 mL su, atmosferik basınç altında kolona uygulanır. Kolon şartlanmasından sonra çözünmüş maddeleri içeren 5 mL 40:60 metanol:su atmosferik basınç altında, kendi halinde kolondan geçirilir. Kolon şartlamasında kullanılan metanol ve su miktarları, önceki çalışmalarda en çok kullanılan hacimlere göre karar verilmiştir [130].

Numune çözeltisinin kolondan geçmesinin ardından hedef analitler dışında kirlilik oluşturacak ve analiz sonucunu olumsuz yönde etkileyecek matrikslerin ve polar maddelerin kolon dolgusundan uzaklaştırılması için atmosferik basınç altında 5 mL 40:60 metanol:su geçirilerek kolon yıkanır. Bu işlemler esnasında atmosferik basınç, çözeltinin adsorban maddeyle etkileşiminin yeterince olması ve analit kaybını engellemek için tercih edilmiştir.

Kolon yıkama işleminden sonra 5 mL 80:20 aseton:metanol kolondan geçirilerek cam tüpe toplanır. Bu işlemle kolon yapısına tutunmuş hedef analitlerin elüsyonu gerçekleştirilmiştir.

SPE amino kolon (NH₂) basamağı

Numunenin karbonhidrat bakımından zengin bir içeriğe sahip olmasından dolayı Bölüm 2.3.1'de bahsedilen amino içerikli kolon kullanımına karar verilmiştir. Bu işlemle C₁₈ kolonunda kalan analiz sonucunu etkileyecek polar maddeler ve analiz sonu kirliliğe neden olacak matriksler daha fazla uzaklaştırılır. Bu amaçla tek kullanımlık NH₂ kolon kullanılmıştır [111, 112].

SPE NH₂ kolonu öncelikle 5 mL 80:20 aseton:metanol ile şartlandırılmıştır. Bir önceki aşamada C₁₈ kolonundan elde edilen 5 mL 80:20 aseton:metanol elüatı NH₂ kolonundan atmosferik basınç altında geçirilerek toplanır ve 55 °C'de azot gazı ile örnek yoğunlaştırıcıda tamamıyla uçurulur. Tüpün dip kısmında kalan kuru kalıntı üzerine 400 mL metanol ilave edip vortekslenerek çözündürülür ve türevlendirme vialine alınır. Türevlendirme vialinde ki çözelti örnek yoğunlaştırıcıda 55 °C'de azot gazı ile kuru kalıntı haline gelinceye kadar uçurulur.

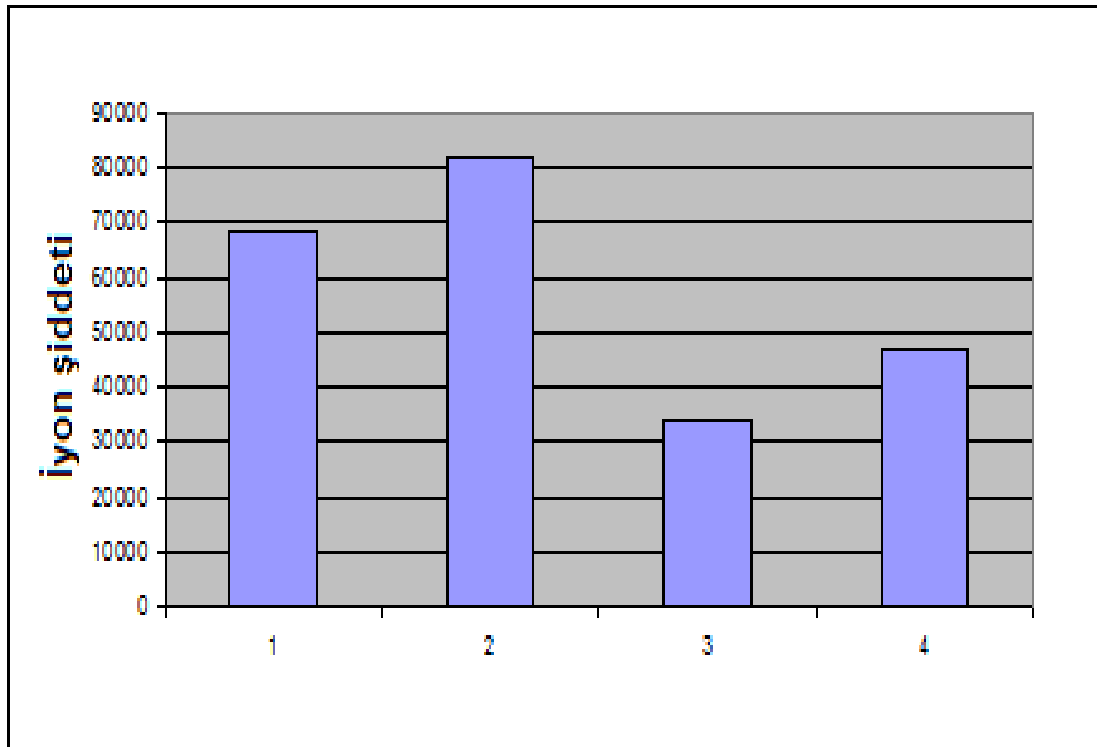
3.2.7. Türevlendirme basamağı

Türevlendirme vialindeki elüsyondan kalan kuru kalıntıya, ZON ve metabolitlerinin GC için gerekli termal kararlılığa ve uçuculuğa sahip olmaları amacıyla N,O-Bis(trimetilsilil)-trifloroasetamid: Trimetilklorosilan (BSTFA:TMCS (99:1)) 100 µL

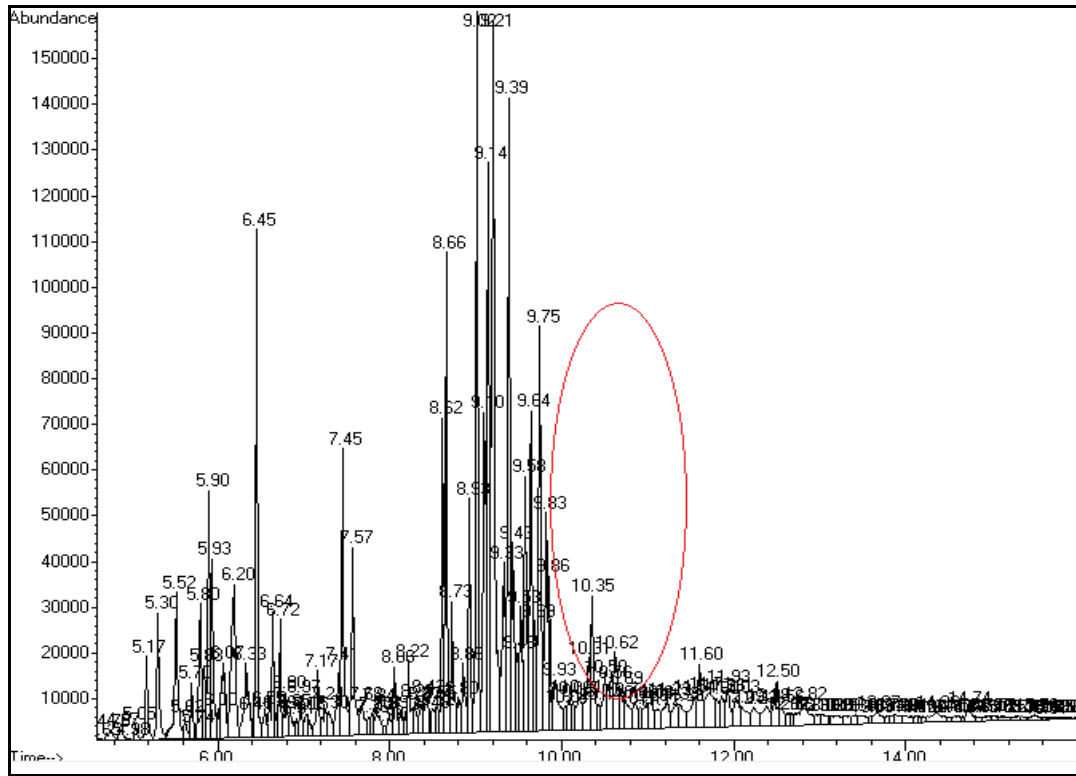
eklenip 1 dakika vorteksle karıştırılır. Türevlendirici ile tamamıyla karışan çökelti 60 dakika 60 °C'de etüvde bekletilir.

Türevlendirme işleminin ardından çözelti tekrar örnek yoğunlaştırıcıda azot altında 55 °C sıcaklıkta uçurulup vialde ki kuru kalıntıya 25 µL isooktan eklenir. Vial kalıntının tamamen çözünmesi için iyice vortekslenip ardından yaklaşık bir dakika ultrasonik banyoda bekletilir ve insert vialine alınarak GC/MS'e enjekte edilir.

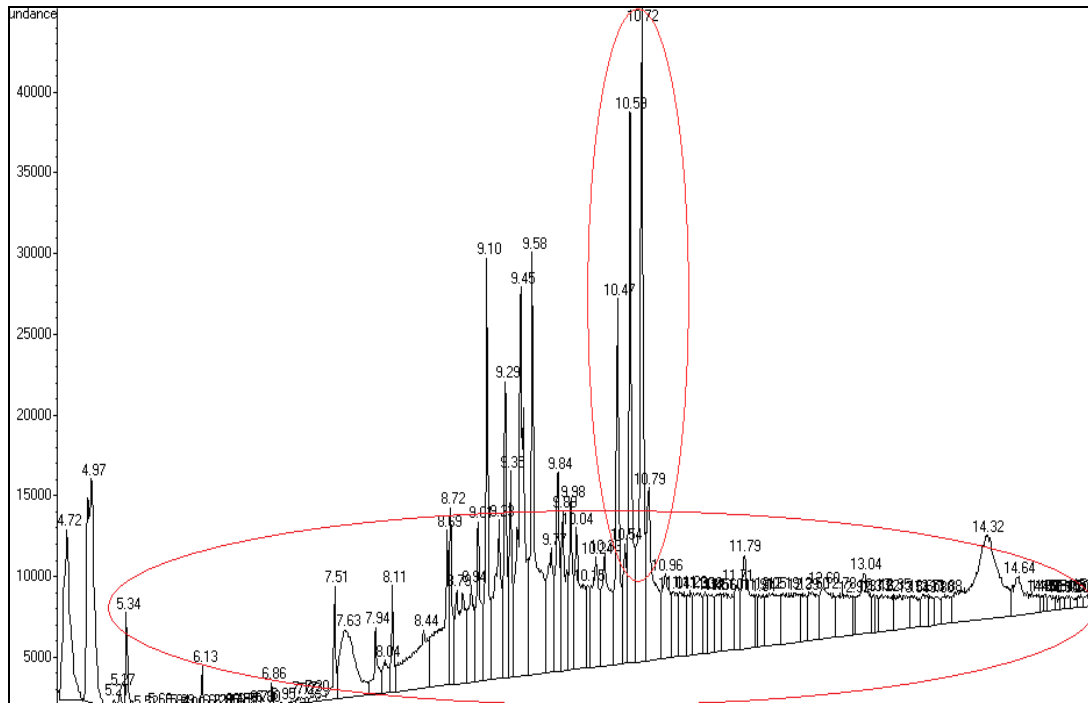
Türevlendirme sıcaklığı ve süresinin türevlendirme verimine etkisi, her bir deneme 2 tekrarlı olarak, 60 °C'de 30 dakika, 60 °C'de 60 dakika 90 °C'de 30 ve 90 °C'de 60 dakika bekletilmek suretiyle optimize edilmiştir. Türevlendirmenin 90 °C 30 dakika ve 90 °C 60 dakika olması durumunda GC/MS'e enjeksiyon sonucu oluşan kromatogramda analitlerin baskılandığı, yüksek oranda gürültü, tanımlanamayan pikler ve total iyon alanının düştüğü gözlenmiştir. Türevlendirme sıcaklığı ve süresinin türevlendirme verimine etkisi için yapılan çalışma sonuçları ve kromatogramlar Şekil 3.2-5'te gösterilmiştir.



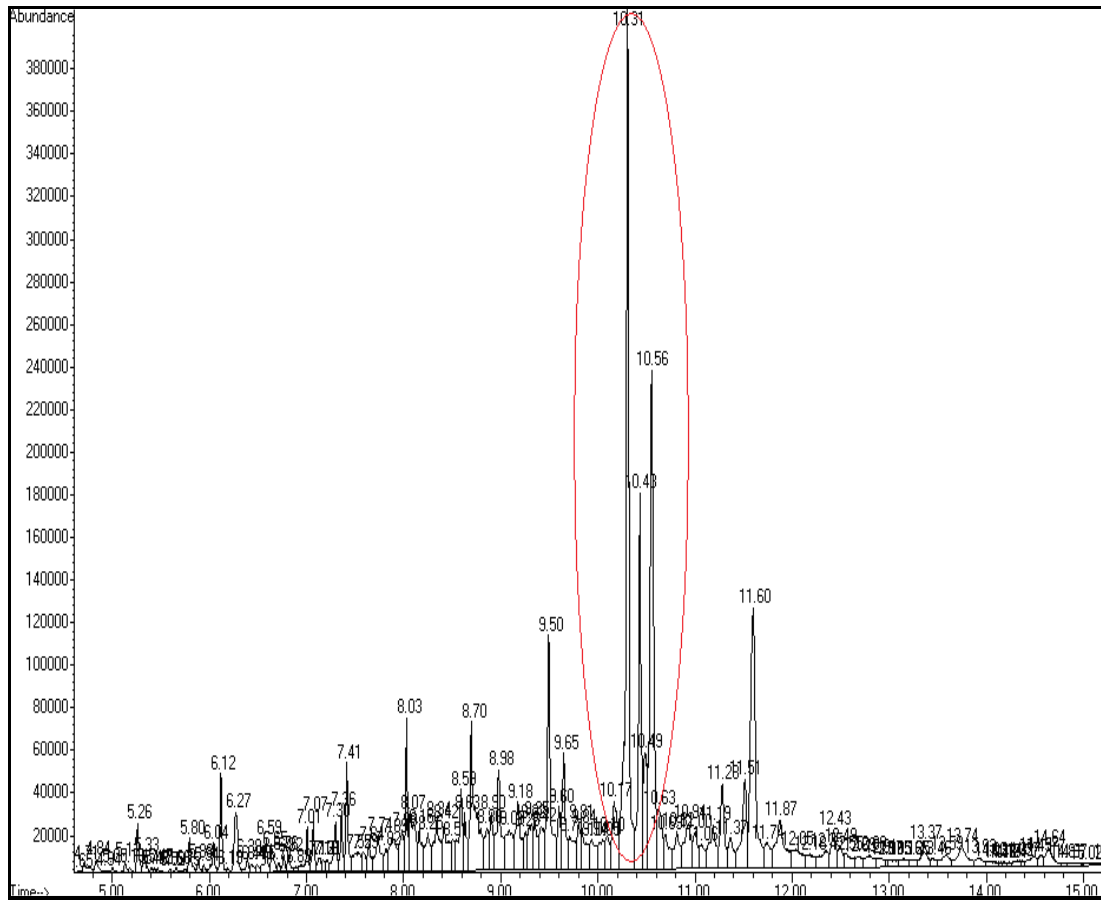
Şekil 3.2. Türevlendirme sıcaklığı ve türevlendirme zamanı; 1. Türevlendirme 60 °C'de 30 dakika, 2. 60 °C'de 60 dakika, 3. 90 °C'de 30 dakika, 4. 90 °C'de 60 dakika; y eksenini iyon alanları



Şekil 3.3. 90 °C'de 30 dakika türevlendirilmiş analitlere ait kromatogram



Şekil 3.4. 90 °C'de 60 dakika türevlendirilmiş analitlere ait kromatogram



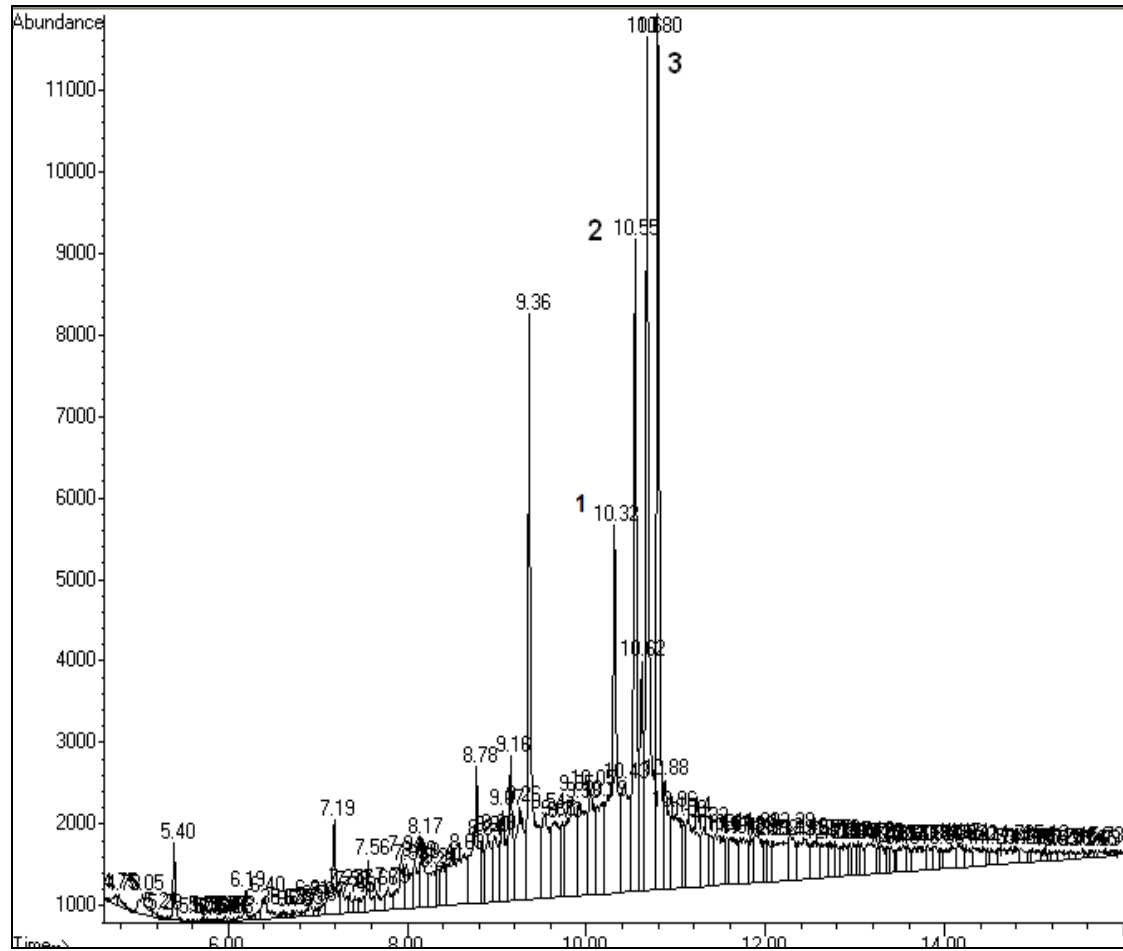
Şekil 3.5. 60 °C’de 60 dakika türevlendirilmiş analitlere ait kromotogram

4. BULGULAR

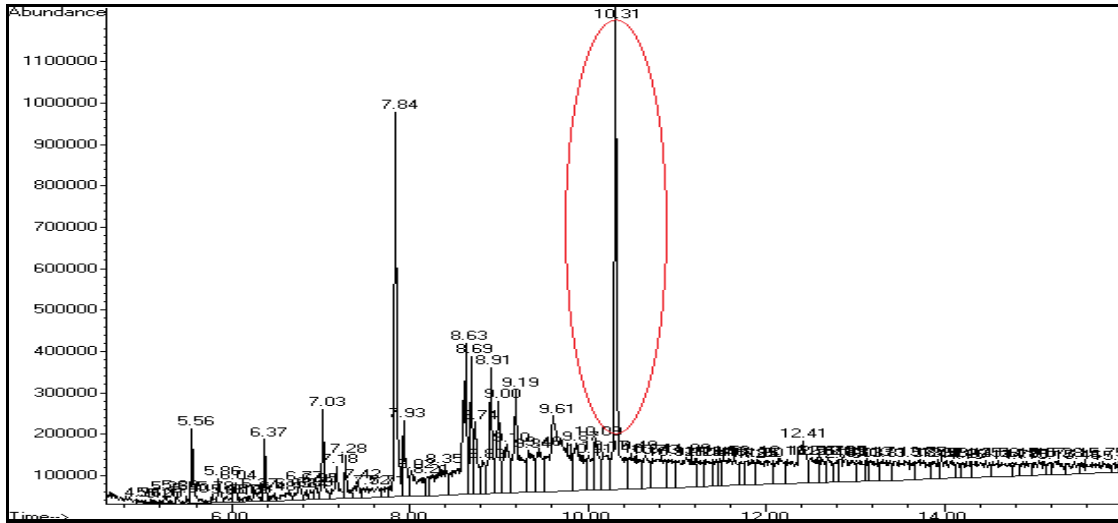
4.1. Gaz kromatografi çalışmasının sonuçları

4.1.1. SCAN modda analitlerin değerlendirilmesi

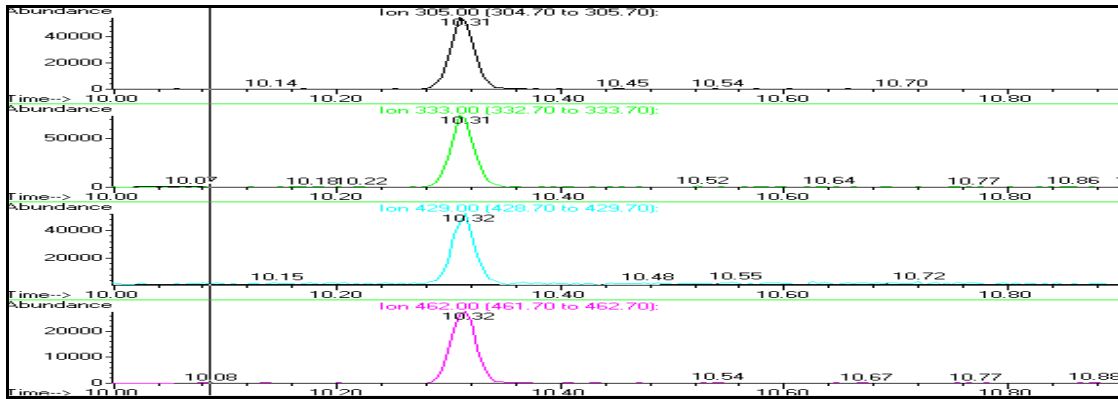
ZON, α -ZOL ve β -ZOL'a ait referans standart maddeler öncelikle SCAN modda GC/MS'e enjekte edilip, alıkonma zamanları ve karakteristik iyonların varlığı tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.1-10).



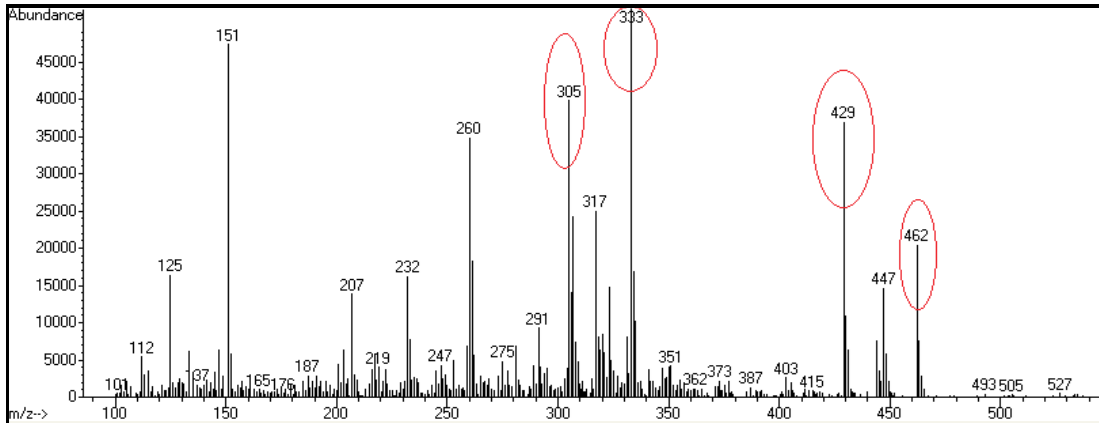
Şekil 4.1. 3 mg L⁻¹ konsantrasyonda ZON, α -ZOL, β -ZOL içeren standart çözelti. Koşullar: İyonizasyon tipi: EI (70 eV), enjeksiyon hacmi: 2 μ L, taşıyıcı gaz : helyum (1 mL/dakika), iyon tarama şekli: SCAN. Alıkonma zamanlarına göre analitler sırasıyla numaralandırılmıştır.1- ZON, 2- α -ZOL, 3- β -ZOL



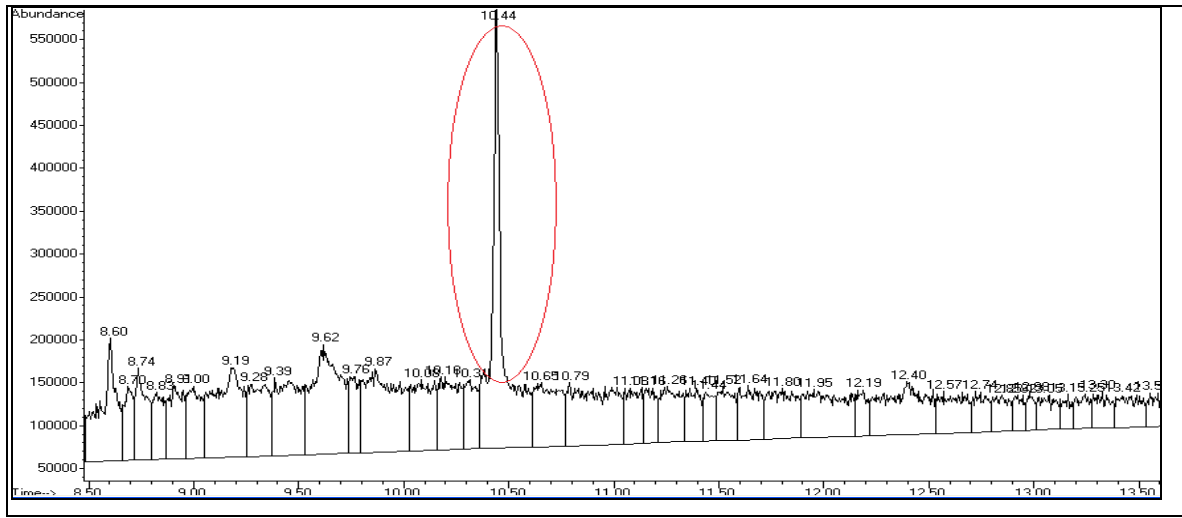
Şekil 4.2. ZON-2TMS bileşiğinin iyon spektrumu. Koşullar: İyonizasyon tipi: EI (70 eV), enjeksiyon hacmi: 2 μ L, taşıyıcı gaz: helyum (1 mL/dakika), iyon tarama şekli: SCAN



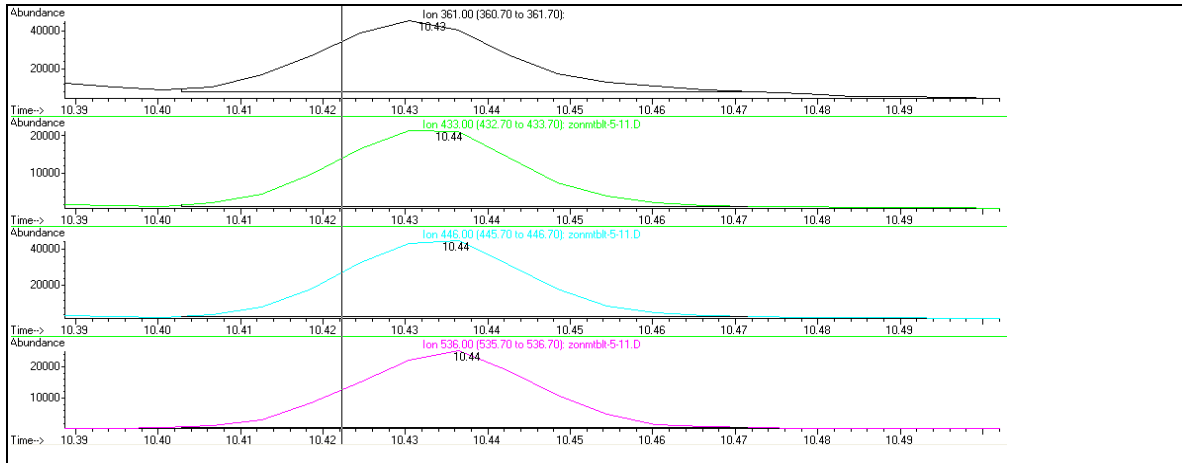
Şekil 4.3. ZON-2TMS bileşiğinin karakteristik iyonlarının kromatogramı. Koşullar: İyonizasyon tipi: EI(70 eV), enjeksiyon hacmi: 2 μ L, taşıyıcı gaz : Helyum (1 mL/dakika), iyon tarama şekli: SCAN



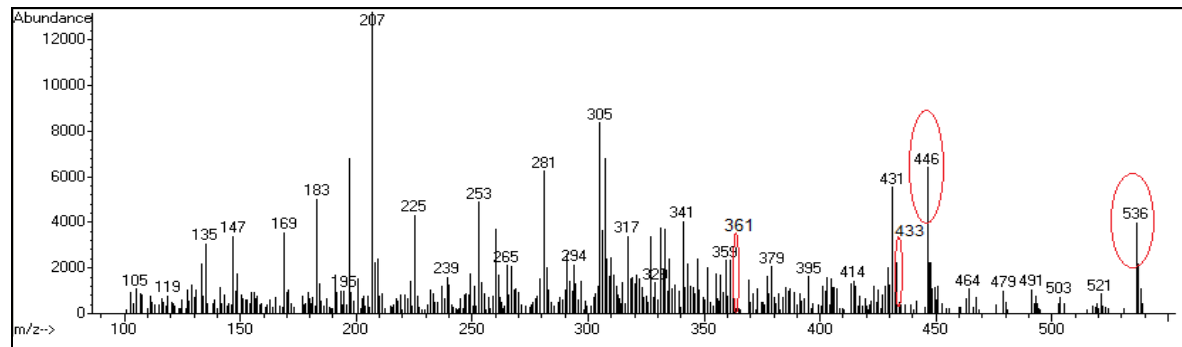
Şekil 4.4. ZON-2TMS bileşiğinin iyon spektrumu. Koşullar: İyonizasyon tipi: EI (70 eV), enjeksiyon hacmi: 2 μ L, taşıyıcı gaz : helyum (1 mL/dakika), iyon tarama şekli: SCAN



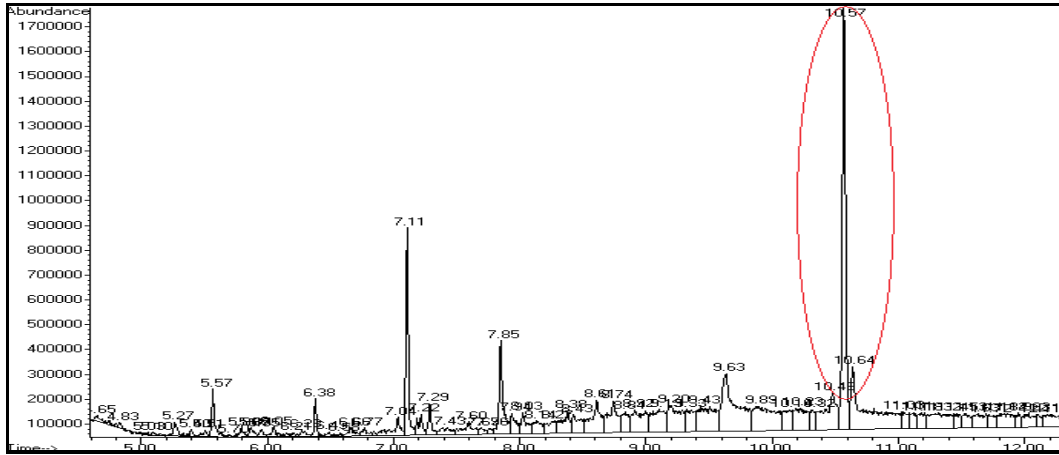
Şekil.4.5. α -ZOL-3TMS bileşiğinin kromatogramı. Koşullar: İyonizasyon tipi:EI (70 eV), enjeksiyon hacmi: 2 μ L, taşıyıcı gaz : helyum (1 mL/dakika), iyon tarama şekli: SCAN



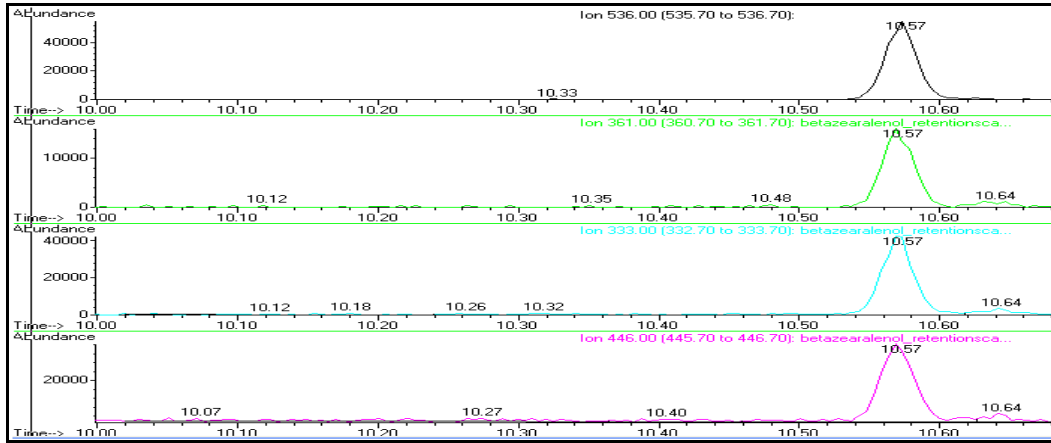
Şekil.4.6. α -ZOL-3TMS bileşiğinin karakteristik iyonlarının kromatogramı. Koşullar: İyonizasyon tipi:EI (70 eV), enjeksiyon hacmi: 2 μ L, taşıyıcı gaz : helyum (1 mL/dakika), iyon tarama şekli: SCAN



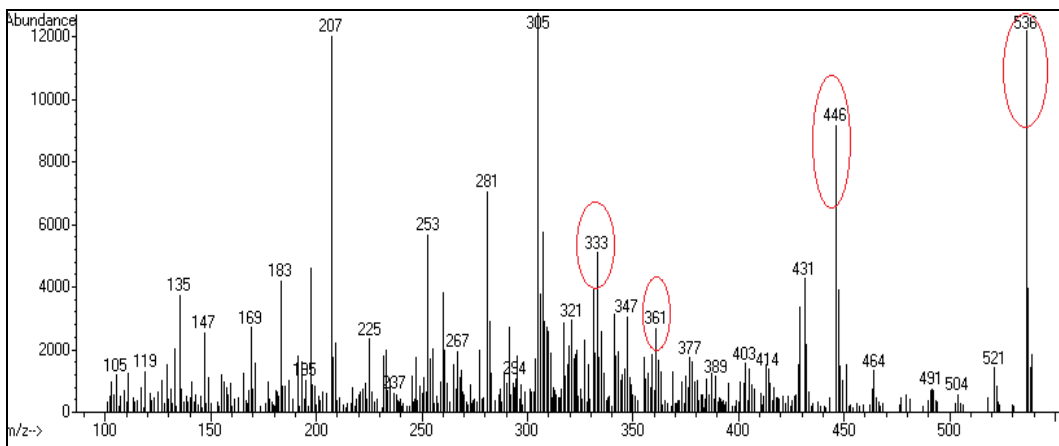
Şekil 4.7. α -ZOL-3TMS bileşiğinin iyon spektrumu. Koşullar: İyonizasyon tipi:EI (70 eV), enjeksiyon hacmi: 2 μ L, taşıyıcı gaz : helyum (1 mL/dakika), iyon tarama şekli: SCAN



Şekil 4.8. β -ZOL-3TMS bileşiğinin kromatogramı. Koşullar: İyonizasyon tipi:EI (70 eV), enjeksiyon hacmi: 2 μ L, taşıyıcı gaz : helyum (1 mL/dakika), iyon tarama şekli: SCAN



Şekil 4.9. β -ZOL-3TMS bileşiğinin karakteristik iyonlarının kromatogramı. Koşullar: İyonizasyon tipi:EI (70 eV), enjeksiyon hacmi: 2 μ L, taşıyıcı gaz : helyum(1 mL/dakika), iyon tarama şekli: SCAN

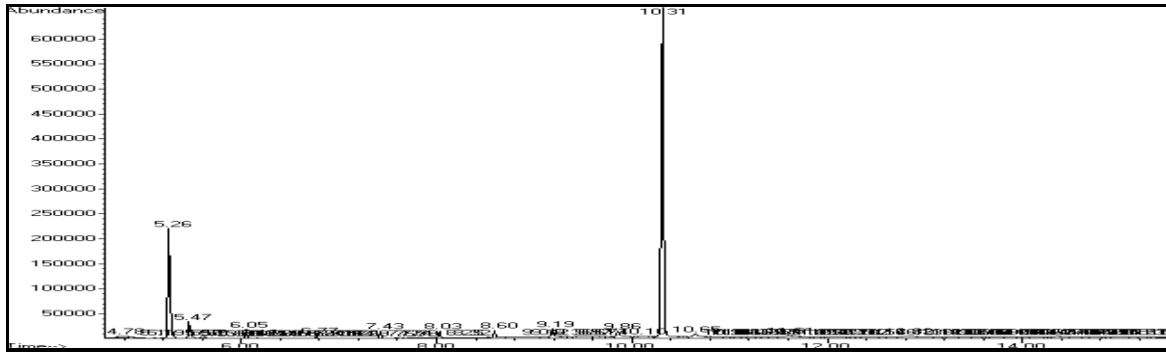


Şekil 4.10. β -ZOL-3TMS bileşiğinin iyon spektrumu. Koşullar: İyonizasyon tipi:EI (70 eV), enjeksiyon hacmi: 2 μ L, taşıyıcı gaz : helyum (1 mL/dakika), iyon tarama şekli: SCAN

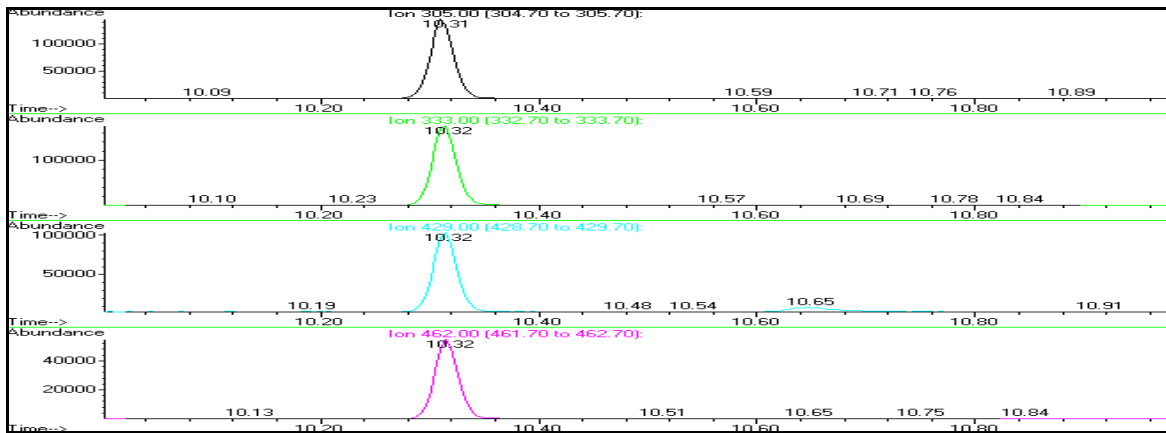
Yukarıda görüldüğü gibi SCAN modla her üç analitin birlikte ve tek başlarına GC/MS kromatogramları elde edildi. Numuneye ait tüm bileşenler, toplam matrikse ait pikler ve analitlerin kromatogramda ki alıkonma zamanları tespit edildi. Alıkonma zamanlarının tespiti için kromatogramda her üç analite ait iyonlar referans alındı [123-126].

4.1.2. SIM modda analitlerin değerlendirilmesi

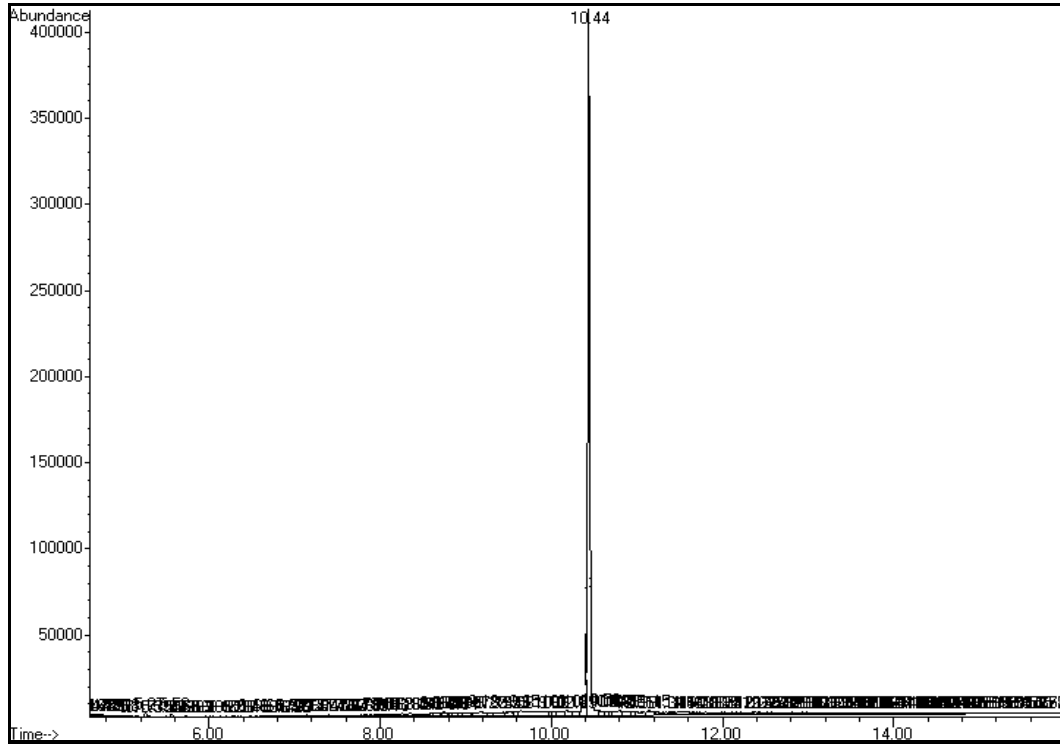
Cihaz metodu, alıkonma zamanı, analitlere ait iyonların doğruluk ve metod hassasiyetini teyid etmek için, analitlere ait iyonlar GC/MS'te oluşturulan metod yazılımına tanıtılarak SIM modda referans standart maddelere ait kromatogramlar elde edildi (Şekil 4.11-16) .



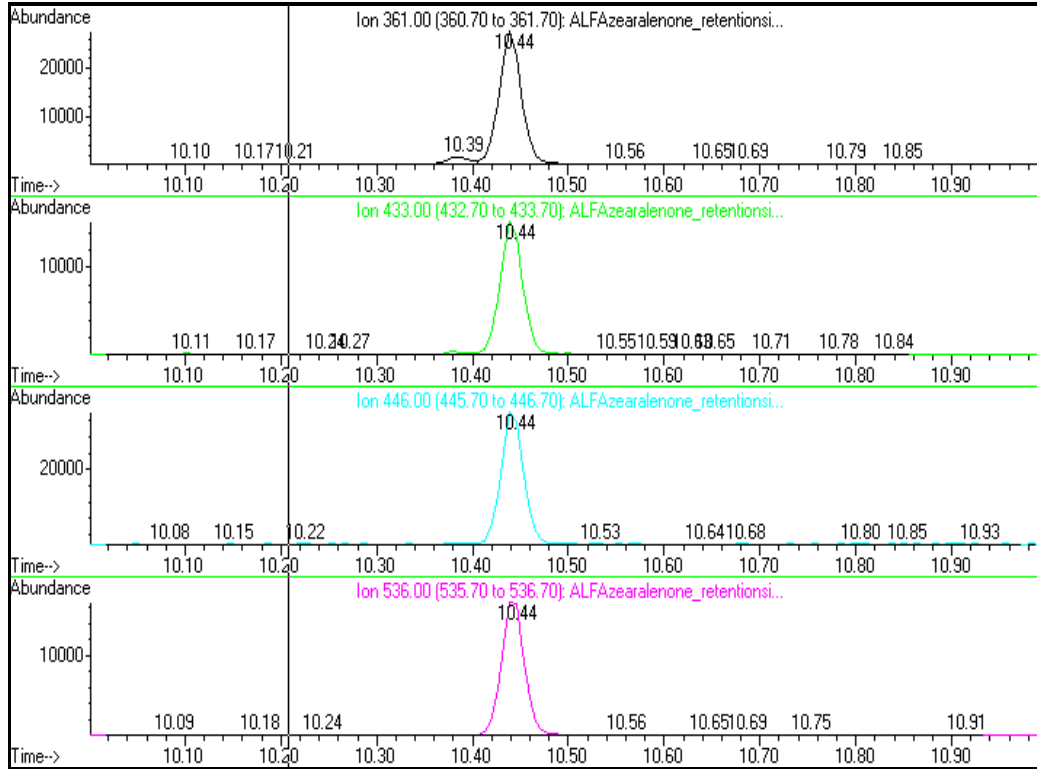
Şekil 4.11. ZON-2TMS bileşiğinin iyon spektrumu. Koşullar: İyonizasyon tipi: EI (70 eV), enjeksiyon hacmi: 2 μ L, taşıyıcı gaz: helyum (1 mL/dakika), iyon tarama şekli: SIM



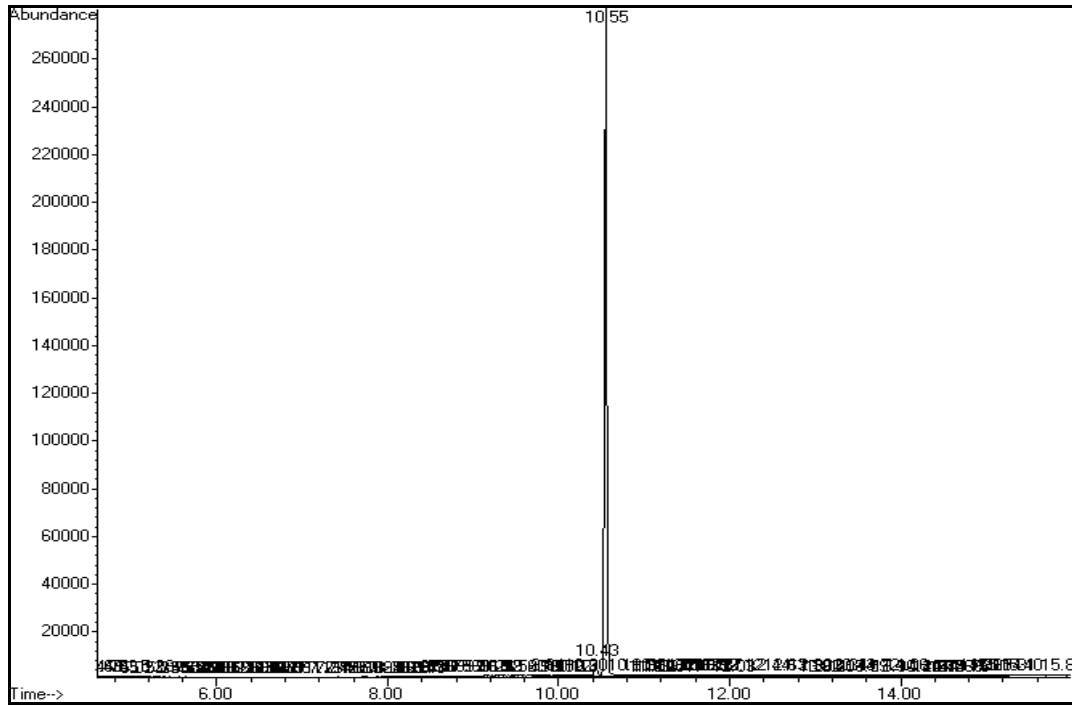
Şekil 4.12. ZON-2TMS bileşiğinin karakteristik iyonlarının kromatogramı. Koşullar: İyonizasyon tipi: EI (70 eV), enjeksiyon hacmi: 2 μ L, taşıyıcı gaz : helyum(1 mL/dakika), iyon tarama şekli:SIM



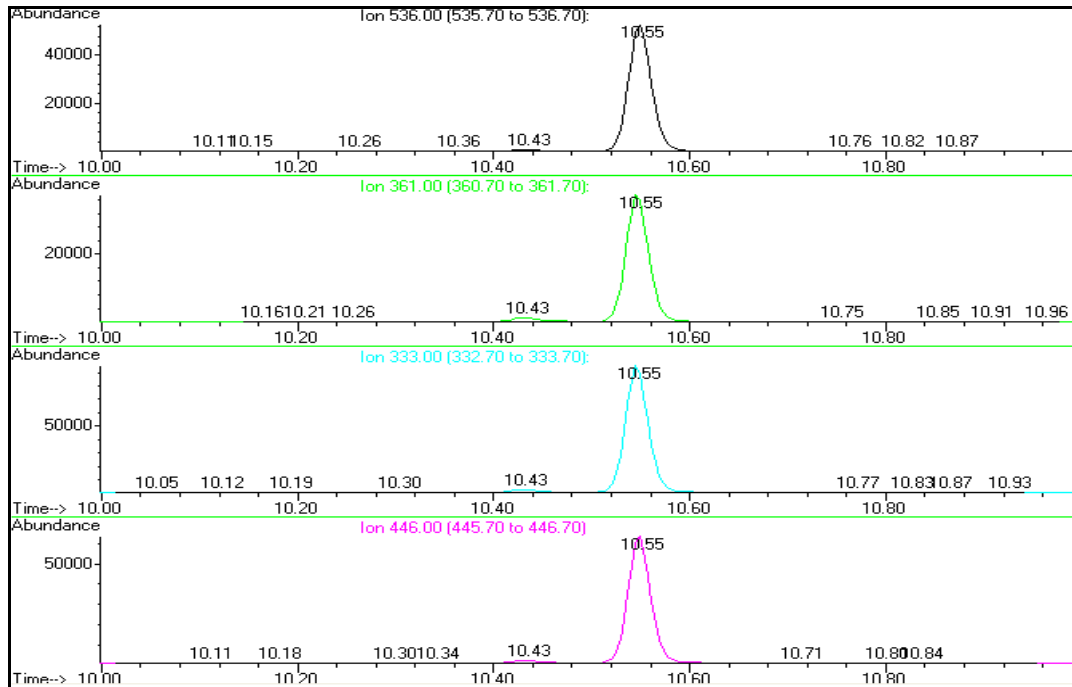
Şekil 4.13. α-ZOL-3TMS bileşiğinin kromatogramı. Koşullar: İyonizasyon tipi:EI (70 eV), enjeksiyon hacmi: 2µL, taşıyıcı gaz : helyum (1 mL/dakika), iyon tarama şekli: SIM



Şekil 4.14. α-ZOL-3TMS bileşiğinin karakteristik iyonlarının kromatogramı. Koşullar: İyonizasyon tipi : EI (70 eV), enjeksiyon hacmi: 2µL, taşıyıcı gaz : helyum (1 mL/dakika), iyon tarama şekli: SIM



Şekil 4.15. β -ZOL-3TMS bileşiğinin kromatogramı. Koşullar: İyonizasyon tipi: EI (70 eV), enjeksiyon hacmi: 2 μ L, taşıyıcı gaz : helyum (1 mL/dakika), iyon tarama şekli: SIM



Şekil 4.16. β -ZOL-3TMS bileşiğinin karakteristik iyonlarının kromatogramı. Koşullar: İyonizasyon tipi: EI (70 eV), enjeksiyon hacmi: 2 μ L, taşıyıcı gaz : helyum (1 mL/dakika), iyon tarama şekli: SIM

SCAN ve SIM modda analitlere ait elde edilen kromatogramlar karşılıklı değerlendirilmiş ve verilerin örtüştüğü görülmüştür. Yapılan değerlendirmeler

sonucu yöntemin gerçek örneklerle uygulanması ve geçerli kılınması sürecinde analitlerin Çizelge 4.1'de belirtilen alıkonma zamaları ve karakteristik iyonları kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. ZON-2TMS, α -ZOL-3TMS ve β -ZOL-3TMS bileşiklerinin GC/MS verileri [124-126]

Analit	Alıkonma Zamanı (Ort. dak.) $\pm$ ss	Analit Molekül Kütlesi	Karakteristik İyonlar (m/z)
ZON	10,31 $\pm$ 0,01	318	305, 333, 429, 462
α -ZOL	10,44 $\pm$ 0,01	320	361, 433, 446, 536
β -ZOL	10,57 $\pm$ 0,01	320	333, 361, 446, 536

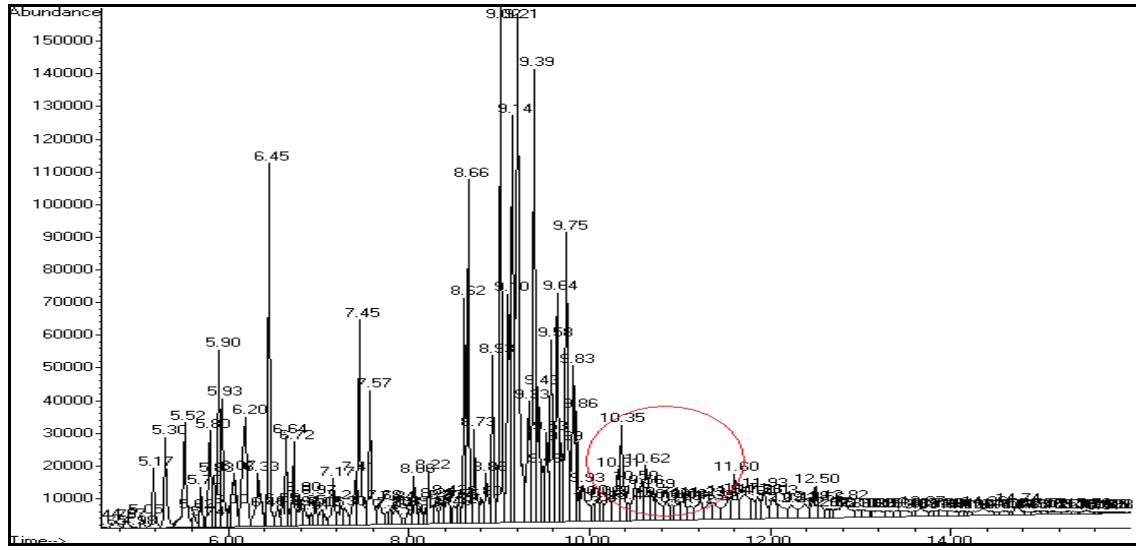
4.1.3. Analitlerin türevlendirme basamağı

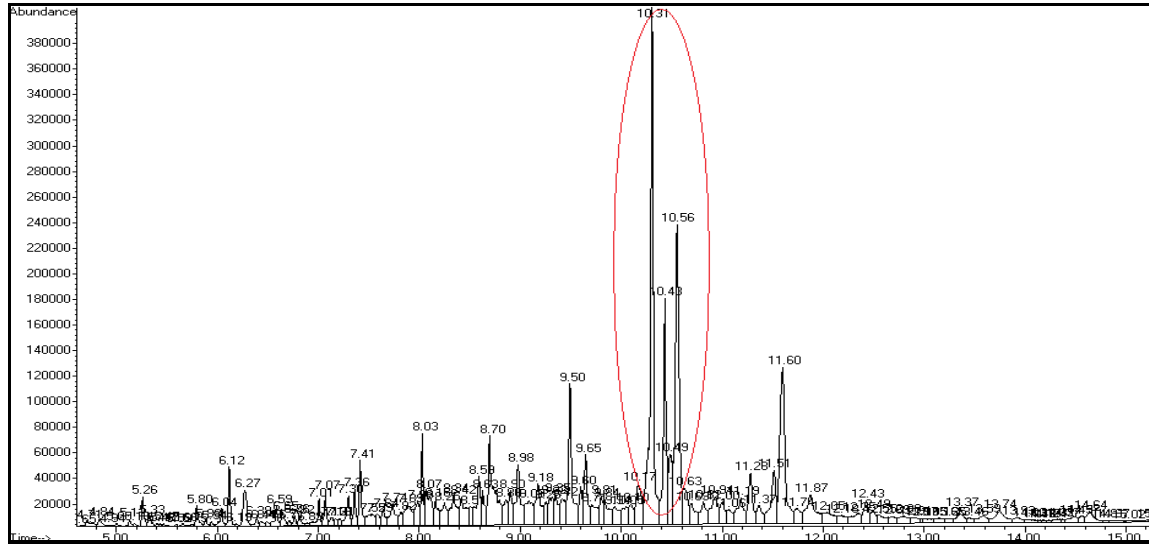
Türevlendirme ajanı olarak kullanılan BSTFA:TMCS (99:1) alkollerin, alkaloidlerin, aminlerin, karboksilli asitlerin, fenollerin ve steroidlerin moleküllerinde ki aktif bir hidrojenin bir silil grubuyla yer değiştirilmesi sonucu silillenmesinde öncelikle tercih edilen yaygın sililleme ajanıdır. Sililleme ajanı N,O-bis(trimetilsilil) trifloroasetamid: trimetilklorosilan (BSTFA:TMCS) (99:1), organik bileşiklerin sterik engeli olmayan polar gruplarıyla reaksiyona girmeye oldukça isteklidir [109, 131, 132].

ZON ve metabolitlerinin türevlendirilmesinde en yaygın ve tercih edilen türevlendirme reaksiyonu silillemedir. Yapılarında bulunan –OH ile trimetilsilil grupları yer değiştirerek sililleme yapılır. Türevlenme reaksiyonunda α -ZOL ve β -ZOL için 3 hidroksil grubu içeren potansiyel silillenme alanı mevcutken, ZON'da alfa pozisyonunda hidrojen atomu olan karbonil gurubu ile 2 hidroksil grubu vardır. EI'da ki moleküler iyonların varlığı ($M^{+•}$) sırasıyla ZON-2TMS, α -ZOL-3TMS ve β -ZOL-3TMS türevlendirme ürünlerinin oluşmasına neden olur. ZON ve metabolitleri, tüm aktif hidrojen atomlarının TMS (trimetilsilil) grubuyla yer değiştirmesi sonucu trimetilsilil eterlerine dönüşür [109, 131, 132].

Türevlendirme süresi ve sıcaklığının türevlendirme verimine ilişkin yapılan tekrarlı denemeler (4 defa) sonunda, ZON ve metabolitlerinin matriks ortamında 60 °C ve

60 dakika bekleme süresi sonucu GC/MS verilerinin stabil ve kromatogram sonuçlarının benzer olduğu görülmüştür. Fakat sıcaklık 90 °C ve 60 dakika bekleme süresi sonunda tanımlanamayan matrikslerin ve gürültünün arttığı, iyon alanlarının düştüğü, kromatografik değerlendirmelerin doğru yapılamayacağı anlaşılmıştır (Bkz. Şekil 4.17-19).





Şekil 4.19. Türevlendirme sıcaklığının türevlendirme verimine etkisi. Türevlendirme koşulları: Sililleme ajanı BSTFA:TMCS (99:1), Sıcaklık 60 °C, bekleme süresi 60 dakika

4.2. Yöntemin gerçek örneklerle uygulanması ve geçerli kılınması

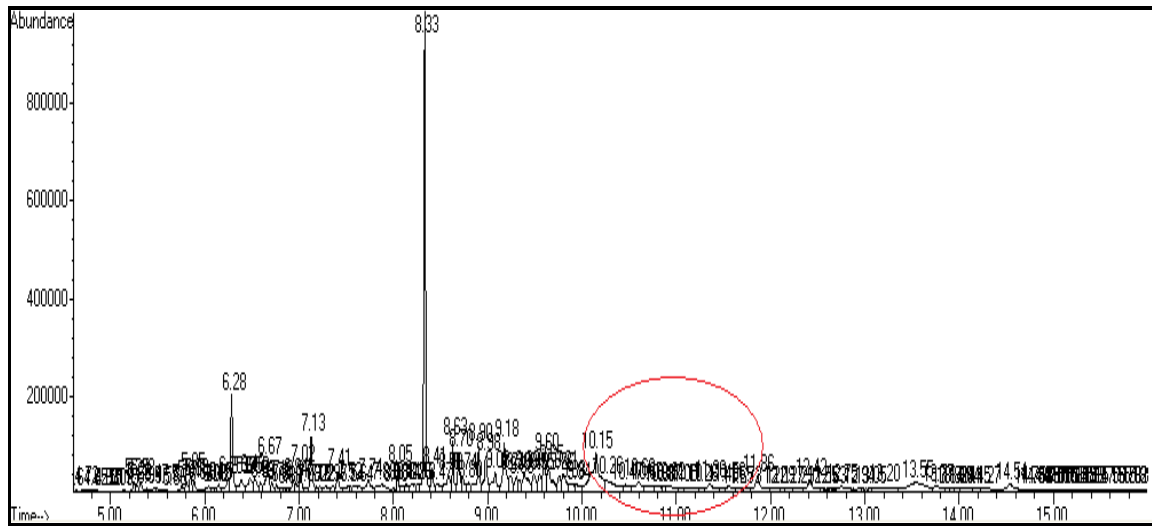
Yöntemi geçerli kılma çalışmalarının amacı, analitik bir işlemin istenilen amaca uygunluğunu göstermektir. Analitik işlemin amacı, yöntemi geçerli kılma çalışmaları sırasında değerlendirilecek özellikleri belirleyeceğinden, açık olmalıdır. Tipik bir yöntem geçerli kılma çalışmasında değerlendirilmesi gereken özellikler: doğruluk, kesinlik, özgünlük, teşhis sınırı, tayin sınırı, doğrusallık ve aralıktır [131]. Yöntemi geçerli kılma için yapılan bu çalışmada özgünlük, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, geri kazanım, teşhis sınırı ve tayin sınırı incelenmiştir.

Yöntem için iki farklı periyotta tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla sırasıyla ZON, α -ZOL ve β -ZOL için 0, 5, 10, 20, 30 ng/g çalışma aralığı ile 0, 1, 2, 3, 4 ng/g çalışma aralığı geçerli kılınmıştır.

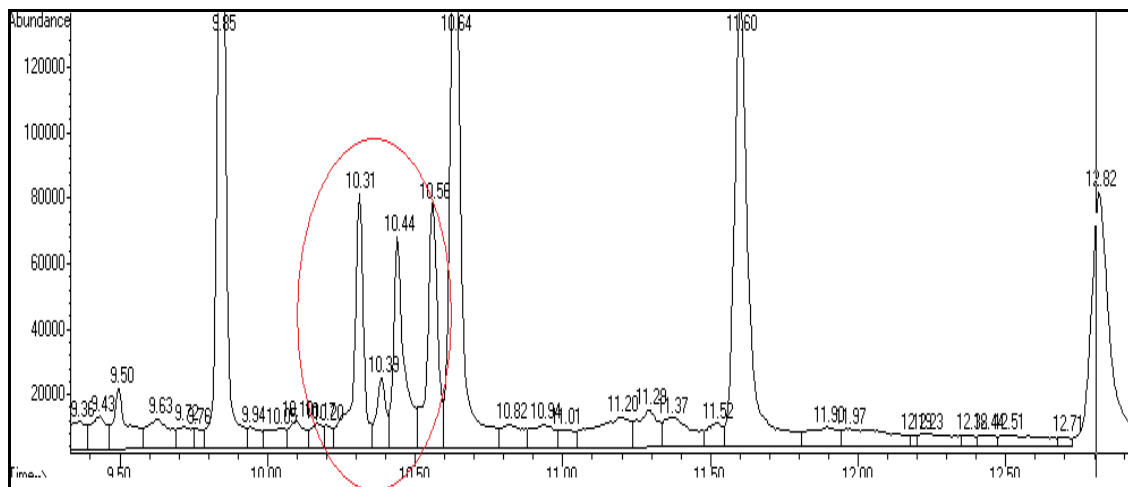
4.2.1. Özgünlük

Özgünlük, ortamda olması beklenebilecek diğer maddelerin varlığında ölçülen analitin kesin olarak tayin edilebilme yeteneğidir. Analitik yöntemin sadece amaçlanan madde veya maddeleri tayin edebilme yeteneğidir, bileşenin veya matriksin sınıfına göre değişebilir, sayısal bir değeri yoktur. Örnek matriksinde

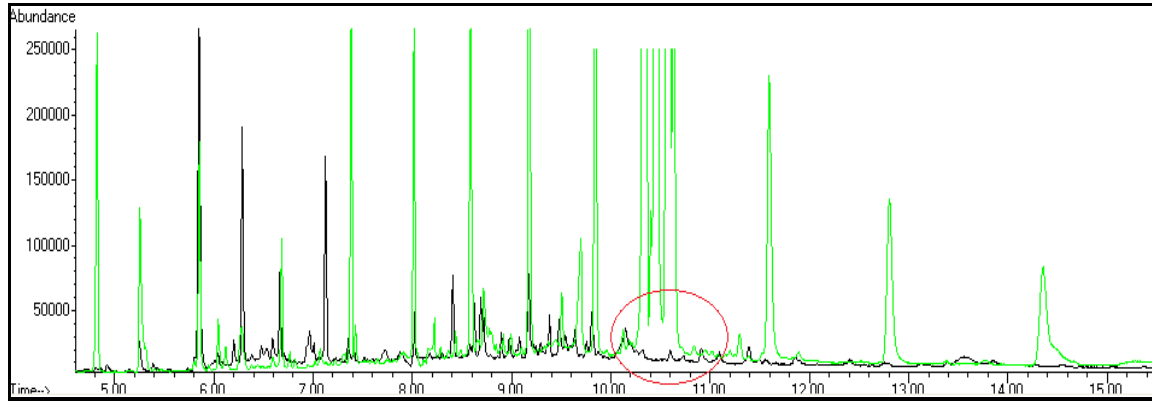
bulunan tüm gereken bileşenlerin yanında analiz edilecek maddelerin doğru ve özgün bir şekilde belirlenebilmesi, analitik yöntemlerin seçimliliğini belirler [132]. Bu çalışmada yöntemin özgünlüğünü incelemek için geliştirilen yöntemle, GC/MS ve SPE çalışmaları için belirlenen en uygun koşullarda boş (kör) numune, ZON ve metabolitlerinin eklendiği numuneye ait kromatogramlar Şekil 4.20 ve Şekil 4.21’de gösterilmiştir. Kromatogramların karşılaştırılmasıyla analitlerin alıkonma zamanlarında boş mama örneklerinden kontaminasyona delil olabilecek herhangi bir pikin gelmediği görülmüştür (Bkz. Şekil 4.22). Böylece yöntemin özgünlüğü gösterilmiştir.



Şekil 4.20. Boş mama örneğinin analiziyle elde edilen kromatogram



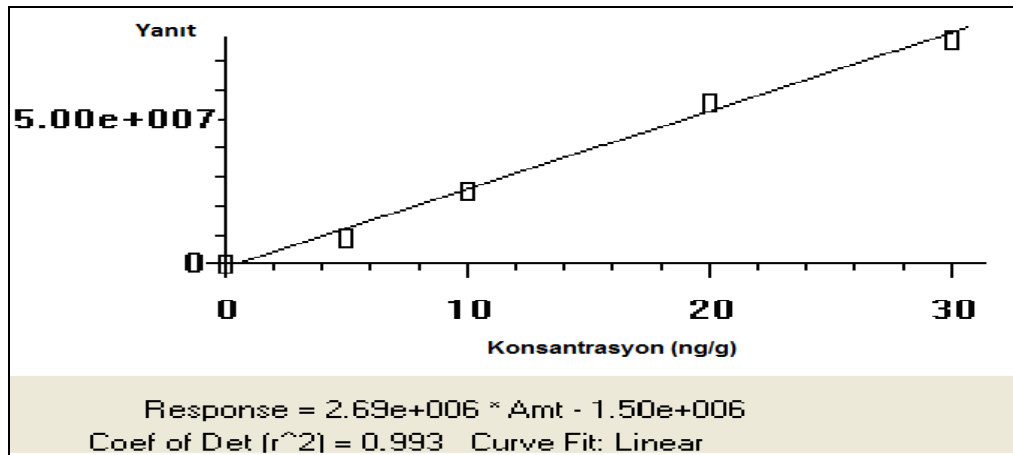
Şekil 4.21. ZON, α -ZOL ve β -ZOL standartlarının eklendiği mama örneğinin analiziyle elde edilen kromatogram



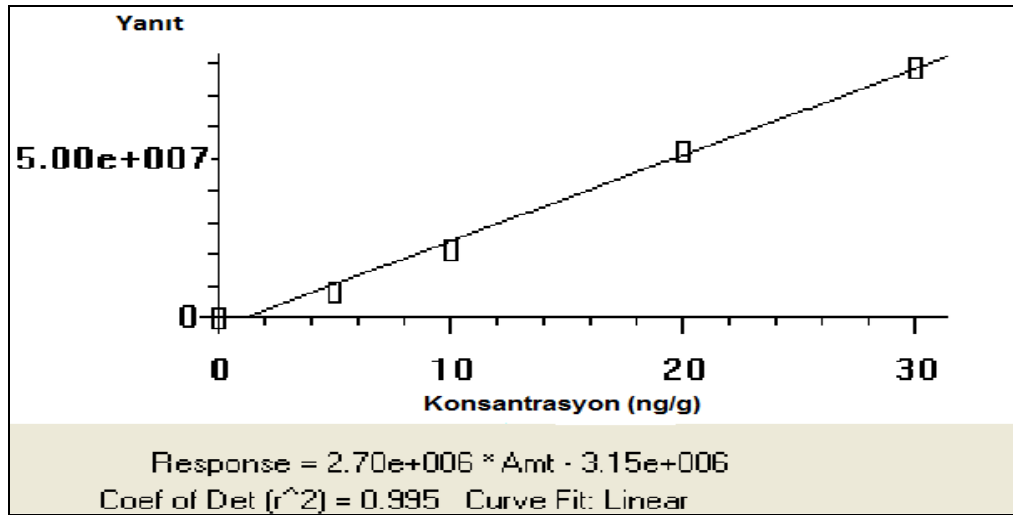
Şekil 4.22. Boş ve ekleme yapılmış örneklerin kromatogramlarının birlikte gösterilişi

4.2.2. Doğrusallık

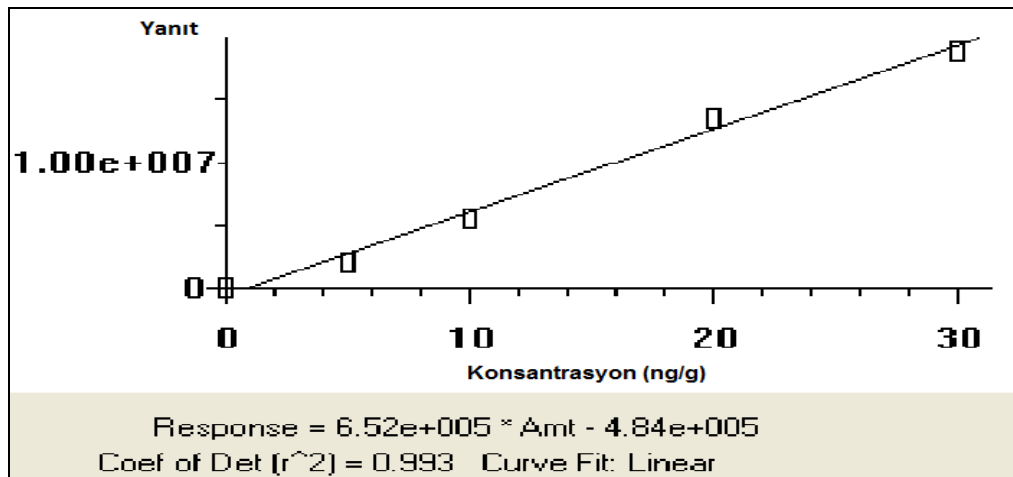
Bir analitik işlemin doğrusallığı, belirli bir aralıkta analitin örnekteki konsantrasyonuyla doğru orantılı sonuçlar elde edebilme yeteneğidir. Bir analitik yöntemin doğrusallığı test sonuçlarından doğrudan elde edilerek veya doğru tanımlanmış matematiksel konsantrasyonları bilinen, belirli bir sırada hazırlanmış örnekler içinde analitin farklı konsantrasyondaki örneklerinden elde edilir [131]. Yöntemin doğrusal çalışma aralığını bulmak için analitler açısından kalıntı içermeyen mama örneklerine ZON, α -ZOL ve β -ZOL standartları 4 farklı konsantrasyonda eklenmiştir. Hazırlanan örneklerin ve boş örneğin yapılan doğrusallık çalışması sonucunda elde edilen 5 noktalı regresyon eğrileri, eğrinin özellikleri, 0, 5, 10, 20, 30 ng/g çalışma aralığı ile 0, 1, 2, 3, 4 ng/g çalışma aralığı için Şekil 4.23-28'de, Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. Çalışmalar matriks eşlemeli (matrix-matched, matriks uyumlu) kalibrasyon kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 4.23. Numuneye ZON eklenerek elde edilen kalibrasyon eğrisi (1. tekrarlanabilirlik)



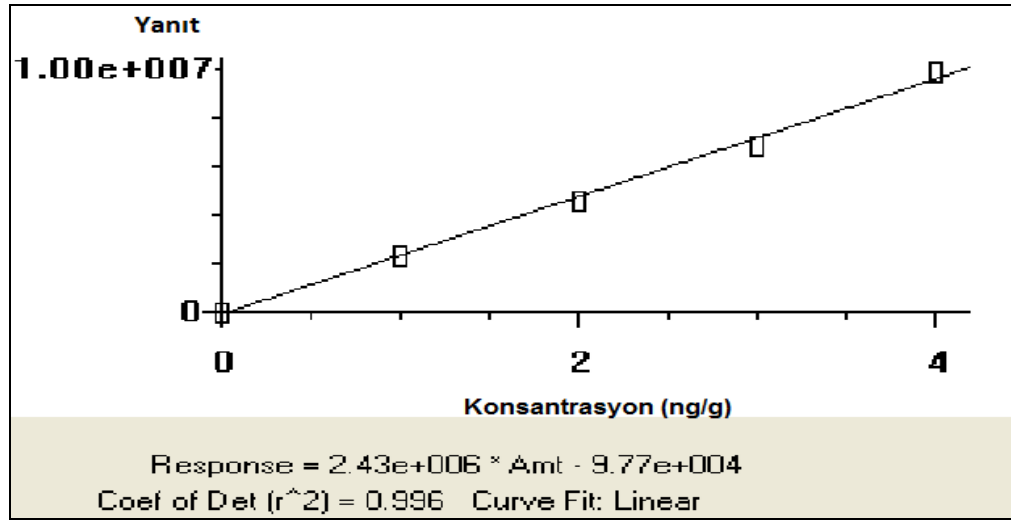
Şekil 4.24. Numuneye α -ZOL eklenerek elde edilen kalibrasyon eğrisi (1. tekrarlanabilirlik)



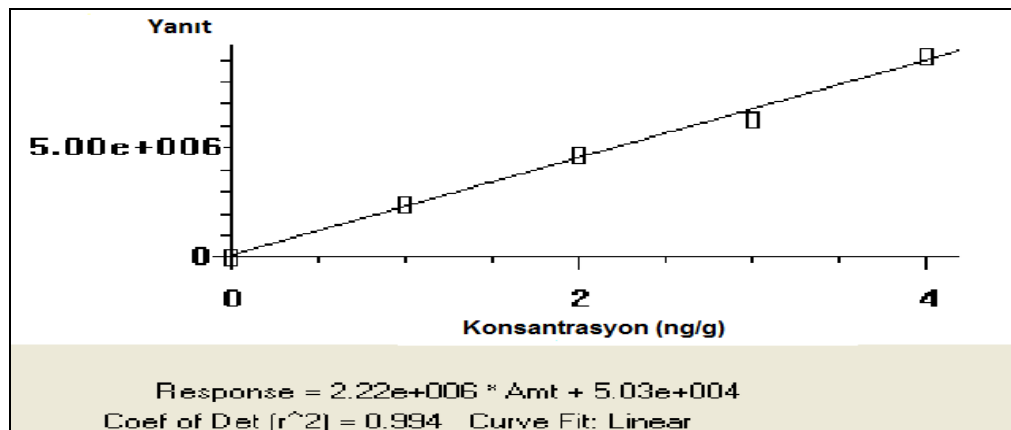
Şekil 4.25. Numuneye β -ZOL eklenerek elde edilen kalibrasyon eğrisi (1. tekrarlanabilirlik)

Çizelge 4.2. ZON, α -ZOL ve β -ZOL'a ait 0, 5, 10, 20, 30 ng/g'lık çalışma aralığı için regresyon eğrisinin özellikleri (y: iyon alanı, x: konsantrasyon (ng/g))

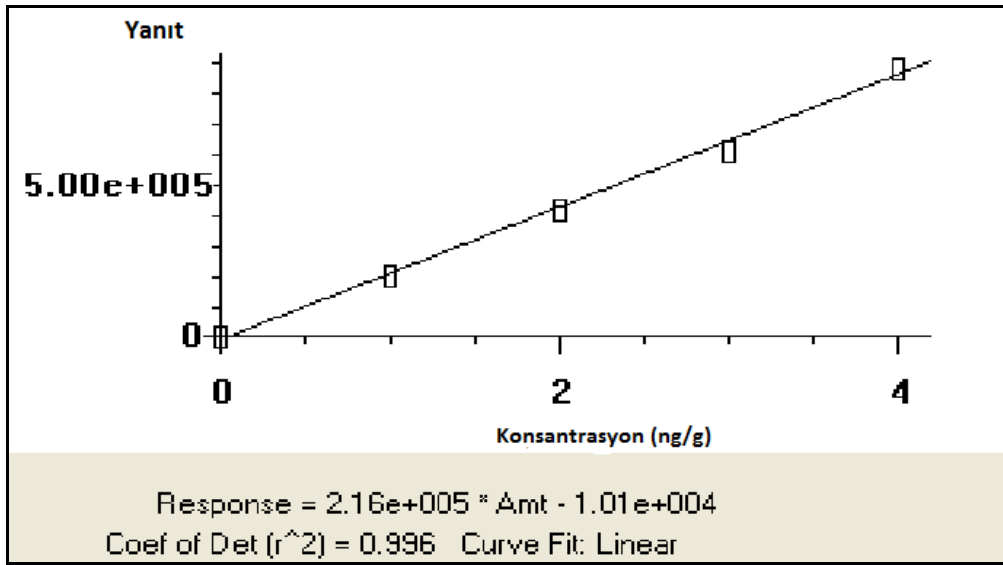
1. Tekrarlanabilirlik çalışması	Eğrinin Denklemleri	Tanımlayıcılık Katsayısı
ZON	$y=(2,69e+006)x- (1,50e+006)$	$r^2=0,993$
α -ZOL	$y=(2,70e+006)x - (3,15+006)$	$r^2=0,995$
B-ZOL	$y=(6,52e+005)x - (4,84e+005)$	$r^2=0,993$



Şekil 4.26. Numuneye ZON eklenerek elde edilen kalibrasyon eğrisi (0, 1, 2, 3, 4 ng/mL; 2. tekrarlanabilirlik)



Şekil 4.27. Numuneye α -ZOL eklenerek elde edilen kalibrasyon eğrisi (2. tekrarlanabilirlik)



Şekil 4.28. Numuneye β -ZOL eklenerek elde edilen kalibrasyon eğrisi (2. tekrarlanabilirlik)

Çizelge 4.3. ZON, α -ZOL ve β -ZOL'a ait 0, 1, 2, 3, 4 ng/g'lik çalışma aralığı için regresyon eğrisinin özellikleri (y: iyon alanı, x: konsantrasyon (ng/g))

2. Tekrarlanabilirlik çalışması	Eğrinin Denklemini	Tanımlayıcılık Katsayısı
α -ZOL	$y=(2,43e + 006)x - (9,77e + 004)$	$r^2=0,996$
α -ZOL	$y=(2,22e + 006)x - (5,03e + 004)$	$r^2=0,994$
β -ZOL	$y=(2,16e + 005)x - (1,01e + 004)$	$r^2=0,996$

4.2.3. Doğruluk, geri kazanım ve kesinlik

Doğruluk, yöntem ile elde edilen ölçümlerin gerçek veya kabul edilen değere yakınlığını belirtmektedir. Bir test sonucu ve kabul edilmiş referans değeri arasındaki anlaşmanın yakınlığı demektir. Gerçeklik ve kesinlik parametreleri ile belirlenir. Bir analitik yöntemin doğruluğu, yöntem ve birçok farklı yoldan elde edilebilen gerçek değer tarafından toplanan test sonuçlarına dayanmaktadır. Doğruluk, bazı çalışmalarda analitin matriksten ayrılmasından ve analitik cihaza verilmesinden sonra elde edilecek cevap ile bir çözücü içinde çözünen referans standart materyalin cevabının karşılaştırılmasına bağlıdır. Bu tür çalışmalarda elde edilen değer mümkün olduğunca doğruya yakın olmalıdır [131, 132].

Kimyasal ölçümde gerçek değerin ölçülmesi uygulanan metoda bağımlı olarak değişim göstermektedir. Deneysel işlemler sürecinde farklı aşamalarda meydana gelen bir kayıp gerçekleşir. Bu kayıp miktarının oranını ve belirsizliğini hesaplamak gerekir. Analiz sürecinde oluşan bu kayıp miktarı metodun geri kazanım oranı olarak ifade edilir. Doğruluk, numuneye eklenmiş analitin tayini ile gerçek değerin karşılaştırılması esasına dayanır ve % bağıl (relative) geri kazanım olarak ifade edilir. Başka bir ifadeyle geri kazanım, analitik prosedür sırasında geri kazanılan bir maddenin doğru konsantrasyonunun yüzdesi demektir. Eğer onaylanmış referans materyal yoksa validasyon sırasında belirlenir [131, 132].

Kesinlik, herhangi bir ölçümün tekrarlanabilme kabiliyeti, yani tamamen aynı yolla elde edilen araştırmacıya ait bireysel test sonuçlarının birbirine yakınlığının, aralarında ki tutarlılığın göstergesi veya şart koşulmuş (önceden belirtilmiş) koşullar altında elde edilmiş bağımsız test sonuçları arasındaki anlaşmanın yakınlığıdır. Kesinliğin ölçümü, genellikle kesin olmama terimleriyle ifade edilir ve test sonuçlarının standart sapması olarak hesaplanır. Daha az kesinlik, daha büyük bir standart sapmayla belirlenir. Kesinlik daha açık bir ifadeyle, bağımsız analiz sonuçları arasındaki tutarlılığı göstermektedir [132]. Boş bir matrikse bilinen analit(ler) miktarlarının eklenmesinin geri kazanılması yoluyla yapılan bu çalışmada kesinlik parametresi tekrarlanabilirlik (tekraredilebilirlik) parametresinin kontrolü ile belirlenmiştir [131-133].

Tekrarlanabilirlik koşulları, aynı ekipmanı kullanarak aynı operatör tarafından aynı laboratuvar da eş test maddeleri üzerinde aynı yöntemle elde edilen bağımsız test sonuçlarının bulunduğu koşullar demektir. ZON, α -ZOL ve β -ZOL'un boş mama örneklerine eklenmesi ile üç farklı konsantrasyonda 5, 10, 20 ng/g altı paralel çalışma yapılarak, iki farklı zaman periyodunda yapılan tekrarlanabilirlik çalışmaları sonucunda ortalama geri kazanım, % bağıl geri kazanım ve kesinlik (tekrarlanabilirlik limiti) değerleri hesaplanmıştır (Bkz. Çizelge 4.4, Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.8). Aynı çalışmalar ve hesaplamalar 1, 2, 3 ng/g konsantrasyonlar için de yapılmıştır (Bkz. Çizelge 4.5, Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.9).

Çizelge 4.4. ZON'un 5, 10, 20 ng/g konsantrasyonları için ortalama geri kazanım, % bağıl (relative) geri kazanım ve kesinlik

Eklenen Konsantrasyon (ng/g)	Bulunan Ortalama Geri Kazanım (ng/g)		%R' (% Bağıl (relative) geri kazanım oranı)		Kesinlik (r, n=6)
	Birinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	İkinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	Birinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	İkinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	
5 (n=6) ¹	4,32	3,92	86,62	78,37487	0,71
10 (n=6)	9,36	9,62	93,61	96,21192	0,47
20 (n=6)	20,71	21,09	100,48	104,25797	0,26

Çizelge 4.5. ZON'un 1, 2, 3 ng/g konsantrasyonları için ortalama geri kazanım, % bağıl (relative) geri kazanım ve kesinlik

Eklenen Konsantrasyon (ng/mL)	Bulunan Ortalama Geri Kazanım (ng/g)		%R' (% Bağıl (relative) geri kazanım oranı)		Kesinlik (r, n=6)
	Birinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	İkinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	Birinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	İkinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	
1 (n=6)	0,97	1,01	97,0	101,0	0,02
2 (n=6)	1,86	1,94	93,0	97,0	0,03
3 (n=6)	2,89	2,85	96,3	95,0	0,02

Çizelge 4.6. α -ZOL'un 5, 10, 20 ng/g konsantrasyonları için ortalama geri kazanım, % bağıl (relative) geri kazanım ve kesinlik

Eklenen Konsantrasyon (ng/mL)	Bulunan Ortalama Geri Kazanım (ng/g)		%R' (% Bağıl (relative) geri kazanım oranı)		Kesinlik (r, n=6)
	Birinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	İkinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	Birinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	İkinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	
5 (n=6)	4,68	4,82	77,83067	82,13890	0,37
10 (n=6)	9,62	9,65	97,53577	95,18703	0,40
20 (n=6)	20,02	19,8	99,54794	99,88520	0,12

¹ n: paralel çalışma sayısı; ortalama geri kazanım, matrix-matched kalibrasyon kullanılarak hesaplanmış değerlerdir; hesaplamalar ve istatistiki terimler Ek1'de açıklanmıştır.

Çizelge 4.7. α -ZOL'ün 1, 2, 3 ng/g konsantrasyonlar için ortalama geri kazanım, % bağıl (relative) geri kazanım ve kesinlik

Eklenen Konsantrasyon (ng/mL)	Bulunan Ortalama Geri Kazanım (ng/g)		%R' (% Bağıl (relative) geri kazanım oranı)		Kesinlik (r, n=6)
	Birinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	İkinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	Birinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	İkinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	
1 (n=6)	0,97	1,01	97,0	101,0	0,03
2 (n=6)	1,86	1,94	93,0	97,0	0,06
3 (n=6)	2,89	2,85	96,3	95,0	0,02

Çizelge 4.8. β -ZOL'ün 5, 10, 20 ng/g konsantrasyonları için ortalama geri kazanım, % bağıl (relative) geri kazanım ve kesinlik

Eklenen Konsantrasyon (ng/mL)	Bulunan Ortalama Geri Kazanım (ng/g)		%R' (% Bağıl (relative) geri kazanım oranı)		Kesinlik (r, n=6)
	Birinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	İkinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	Birinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	İkinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	
5 (n=6)	4,42	4,56	88,4	91,2	0,35
10 (n=6)	9,54	9,48	95,4	94,8	0,38
20 (n=6)	19,52	19,7	97,6	98,5	0,18

Çizelge 4.9. β -ZOL'ün 1, 2, 3 ng/g konsantrasyonları için ortalama geri kazanım, % bağıl (relative) geri kazanım ve kesinlik

Eklenen Konsantrasyon (ng/mL)	Bulunan Ortalama Geri Alım (ng/g)		%R' (% Bağıl (relative) geri kazanım oranı)		Kesinlik (r, n=6)
	Birinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	İkinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	Birinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	İkinci Tekrarlanabilirlik Çalışması	
1 (n=6)	0,97	1,01	97,0	101,0	0,01
2 (n=6)	1,86	1,94	93,0	97,0	0,03
3 (n=6)	2,89	2,85	96,3	95,0	0,02

4.2.4. Teşhis sınırı

Bir analitin teşhis sınırı (LOD, Limit of dedection; gözlenebilme sınırı) , boş örnek veya zemin gürültüsünden önemli ölçüde farklı bir aletsel sinyalin alındığı, fakat miktarı belirlenemeyen en küçük analit konsantrasyonudur. Bu konsantrasyon

diğer bir ifadeyle cihazda ki analite ait karar limitidir [134]. Teşhis sınırını belirlemek için çeşitli yöntemler vardır. Bu çalışmada analitik eğrinin parametrelerinin kullanıldığı hesaplama yöntemi uygulanmıştır. Teşhis sınırı, EK-1'de ki eşitliğe göre hesaplanmıştır [134].

Analitik eğrinin parametrelerinin kullanıldığı hesaplamalar sonucu, 0, 5, 10, 20, 30 ng/g çalışma aralığı için; ZON'un teşhis sınırı 1,08 ng/g, α -ZOL'un 1,01 ng/g, β -ZOL'un 1,2 ng/g olarak bulunmuştur. Çalışma aralığı 0, 1, 2, 3, 4 ng/g için; ZON'un teşhis sınırı 0,20 ng/g, α -ZOL'un 0,20 ng/g, β -ZOL'un 0,06 ng/g olarak bulunmuştur.

4.2.5. Tayin sınırı

Tayin sınırı (LOQ, Limit of quantification; alt tayin sınırı), bir yöntemin belirli işlemsel koşullar altında, analitin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik ile tayin edilebildiği en düşük konsantrasyondur. Bu konsantrasyon diğer bir ifadeyle analitin cihazda ki tayin limitidir. Tayin sınırı, EK-1'de ki eşitliğe göre hesaplanmıştır [134].

Analitik eğrinin parametrelerinin kullanıldığı hesaplamalar sonucu, 0, 5, 10, 20, 30 ng/g çalışma aralığı için; ZON'un tayin sınırı 3,25 ng/g, α -ZOL'un 3,03 ng/g, β -ZOL'un 3,06 ng/g olarak bulunmuştur. Çalışma aralığı 0, 1, 2, 3, 4 ng/g için; ZON'un tayin sınırı 0,6 ng/g, α -ZOL'un 0,6 ng/g, β -ZOL'un 0,12 ng/g olarak bulunmuştur.

4.3. Çalışma sonuçlarının değerlendirilmesi

Geliştirilen yöntemin geçerli kılma çalışmaları 0, 5, 10, 20, 30 ng/g ile 0, 1, 2, 3, 4 ng/g çalışma aralığı için yapılmış ve bu kapsamda özgünlük, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, geri kazanım, teşhis sınırı, tayin sınırı parametreleri incelenmiştir. Gerçekleştirilen yöntemde, kontaminasyon düzeyleri araştırılan analitlerin, tahıl bazlı bebek mamalarında ki analizlerini geçerli kılma çalışmaları

bir rehber olmadığından, uluslararası kabul edilmiş rehber olan ICH Q2 (R1)²de belirtilen yöntem izlenmiştir [132]. Ayrıca örneklerinin zenginleştirilmesi ile yapılan geri kazanım çalışmasında, tekrarlanabilirlik hesaplamalarında “ISO 5725” ölçüm yöntemlerinin ve sonuçlarının doğruluğu (gerçeklik ve kesinlik) stadardına göre EK-1’de belirtilen formüller kullanılmıştır [135].

Özgünlük için boş mama örneği ile, bilinen konsantrasyonlarda ZON, α -ZOL ve β -ZOL standardı eklenmiş mama örneklerine ait kromatogramların karşılaştırılması sonucunda, mama örneklerinin incelenen analitlerle girişim yapabildikleri tespit edilmiştir.

Doğrusallık çalışmasında ise, 5 farklı konsantrasyonda hazırlanan örneklerle yöntemin uygulanmasıyla elde edilen pik alanlarının konsantrasyonla değişimi grafiği çizilmiştir. Bu çalışmayla, her iki farklı düzeylerde ki çalışma aralığında da ZON, α -ZOL ve β -ZOL’un doğrusal olduğu görülmüştür.

Bir yöntemin doğruluğu bulunan sonuçla gerçek sonucun birbirine yakınlığıdır. İki farklı düzeyler seçilerek yapılan peryotta ki tekrarlanabilirlik çalışmalarında üç farklı konsantrasyonda hazırlanan örneklerin 6’şar paralel halinde çalışılması sonucunda her iki çalışma aralığında da doğruluk yüzdelerinin ve ortalama geri kazanım değerlerinin yüksek olduğu görülmüştür.

Kesinlik aynı koşullarda elde edilen sonuçların birbirine yakınlığının göstergesidir. Çalışma aralığı 0, 5, 10, 20, 30 ng/g ile 0, 1, 2, 3, 4 ng/g için ayrı ayrı farklı zamanlarda tekrarlanabilirlik çalışmaları sonuçlarında her üç madde ve her çalışma seviyesi içinde tekrarlanılabilirlik katsayıları hesaplanarak yöntemin kesinliği gösterilmiştir. Tekrarlanabilirlik, “r” harfi ile ifade edilmekte olup, tekrarlanabilirlik koşulları altında elde edilen kesinliktir. Tekrarlanabilirlik koşulları ISO 5725-1’de aynı metot ile eşdeğer örneklerde aynı laboratuvarında, aynı ekipman ve aynı analist tarafından kısa zaman aralığında elde edilen bağımsız

² International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1)

test sonuçlarının elde edilmesi olarak tanımlanmıştır. Koşulların yakınlığı nedeniyle beklenen kesinlikte küçük olmaktadır [135, 136].

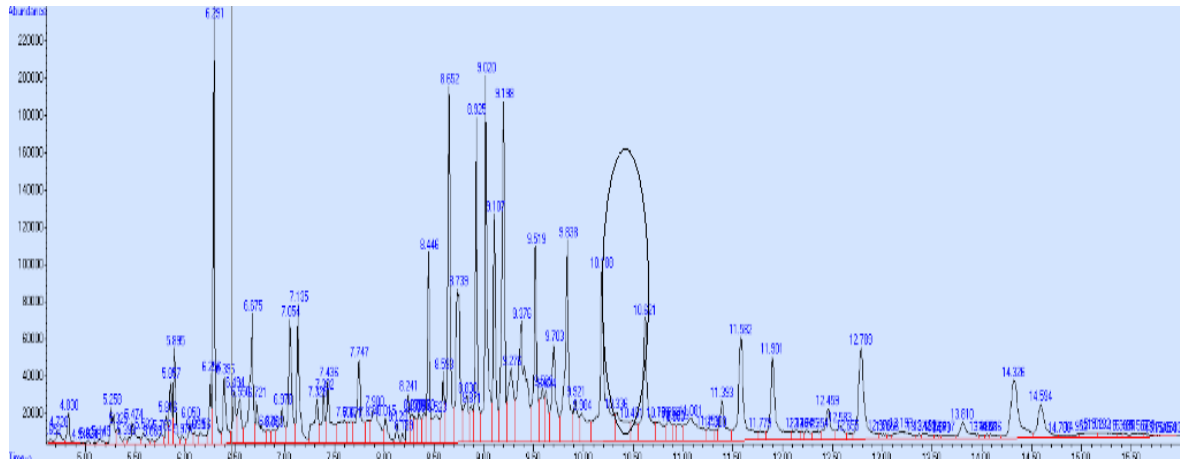
Teşhis sınırı, 0, 5, 10, 20, 30 ng/g çalışma aralığı için; ZON 1,08 ng/g, α -ZOL 1,01 ng/g, β -ZOL'un 1,2 ng/g olarak bulunmuştur. Çalışma aralığı 0, 1, 2, 3, 4 ng/g için; ZON 0,20 ng/g, α -ZOL 0,20 ng/g, β -ZOL'un 0,06 ng/g olarak bulunmuştur. Tayin sınırı ise; 0, 5, 10, 20, 30 ng/g çalışma aralığı için; ZON 3,25 ng/g, α -ZOL 3,03 ng/g, β -ZOL'un 3,06 ng/g olarak bulunmuştur. Çalışma aralığı 0, 1, 2, 3, 4 ng/g için; ZON 0,6 ng/g, α -ZOL 0,6 ng/g, β -ZOL'un 0,12 ng/g olarak bulunmuştur.

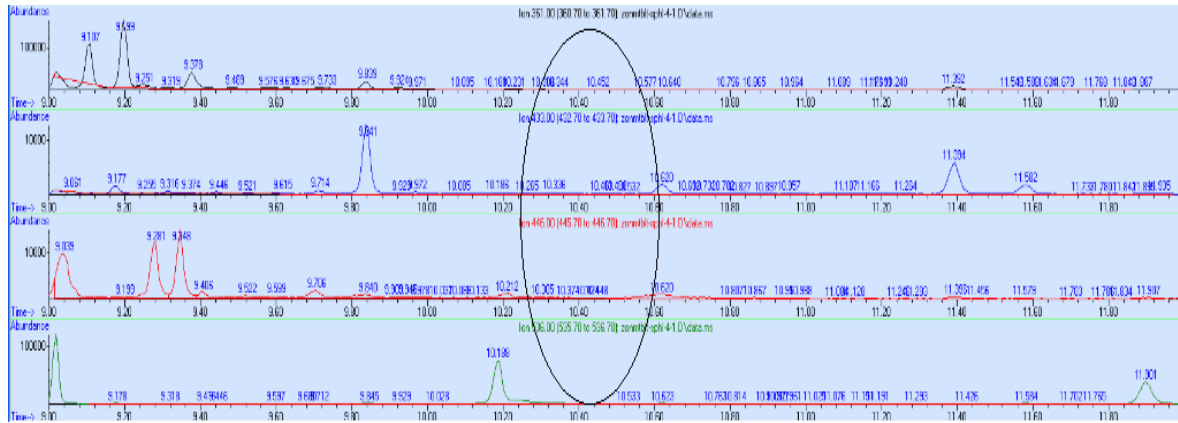
Analitik yöntemlerin performansı ve sonuçların yorumu ile ilgili 96/23/EC konsey direktifini uygulama 2002/657/EC direktifinde yer alan nicel yöntemlerin gerçekliği parametresine göre; ölçümlerin gerçekliğinin, boş bir matrikse bilinen analit(ler) miktarlarının eklenerek geri kazanılması yoluyla değerlendirilmesi durumlarda yapılan validasyon çalışmalarında; çalışma seviyesinin >1 ng/g ile 10 ng/g olması durumunda ortalama geri kazanım % R' (% bağıl geri kazanım oranı) değerlerinin “- % 30” ile “+ % 10” arasında olması beklenir [136].

İki farklı 0, 5, 10, 20, 30 ng/g ile 0, 1, 2, 3, 4 ng/g çalışma aralığı için yapılan validasyon çalışmasında, tekrarlanabilirlik çalışmalarında üç farklı konsantrasyonda hazırlanan örneklerin 6'şar paralel halinde iki ayrı çalışma periyodunda (iki ayrı günde) çalışılması sonucunda her iki çalışma aralığında ve her bir konsantrasyon düzeyinde % R' değerlerinin yüksek olduğu ve yukarıdaki ilgili aralığı karşıladığı görülmüştür. Yapılan bu değerlendirmeye göre; boş bir matrikse bilinen analit(ler) miktarlarının eklenmesinin geri kazanılması yoluyla değerlendirilmesi yöntemi ile yapılan her iki validasyon çalışmasında LOQ düzeylerinin (raporlama düzeyi) numunede kabul edilebilir doğrulukta hesaplandığı görülmüştür.

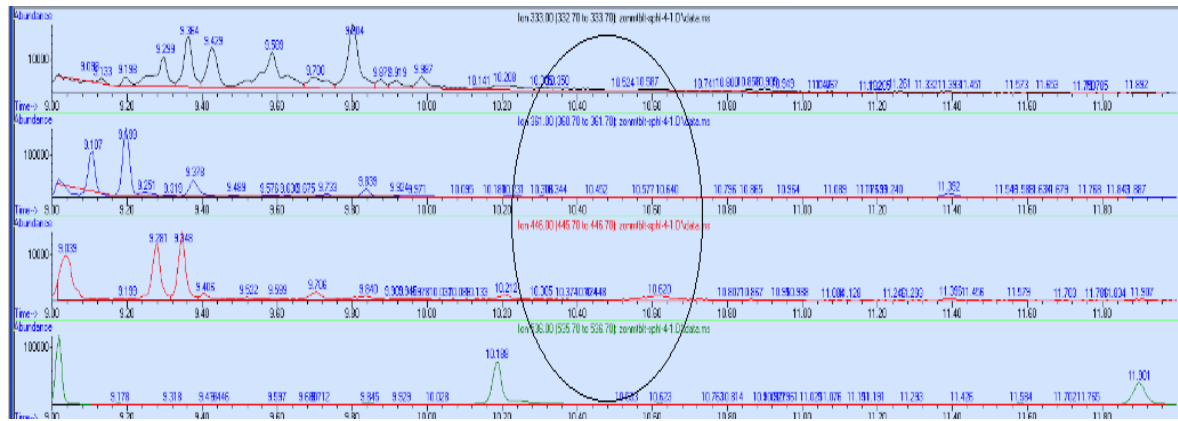
Metod optimizasyonu ve geçerli kılma çalışmaları sonucunda numuneler analize alınmıştır. Ekstraksiyon ve türevlendirme işlemleri sonucu GC/MS'e enjeksiyon yapılmadan önce Bölüm 3.2.1'de bahsedilen autotune işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonucu cihazın optimal şartlarda olduğu belirlendikten sonra cihaza sıralı

enjeksiyon yapılmıştır. Analiz edilen her bir numuneye ait kromatogram her iki çalışma aralığında (1. ve 2. çalışma aralığı) çizilen 2 farklı kalibrasyon düzeylerine okutulmuştur. Bu işlem sonucunda numunelerin herhangi birinde, her iki kalibrasyon aralığında miktarsal bir değer belirlenmemiş, tüm numunelerin tayin sınırlarında negatif olduğuna karar verilmiştir. Teşhis sınırında miktarsal olmayan, fakat cihazın bir sinyal alıp almadığını kontrol etmek için her bir numune ZON, α -ZOL ve β -ZOL'un tüm fragman iyonları cihaz software'ine girilerek olası kontaminasyon durumu SIM taramasıyla kontrol edilmiştir. Yapılan kontrollerde herhangi bir numunede ZON ve metabolitlerine ait fragman iyon, dolayısıyla sinyal alınmamıştır. Analiz edilen numuneye ait örnek kromatogram, ZON ve metabolitlerinin fragman iyonlarının seçili SIM taraması Şekil 4.29-32'de gösterilmiştir.



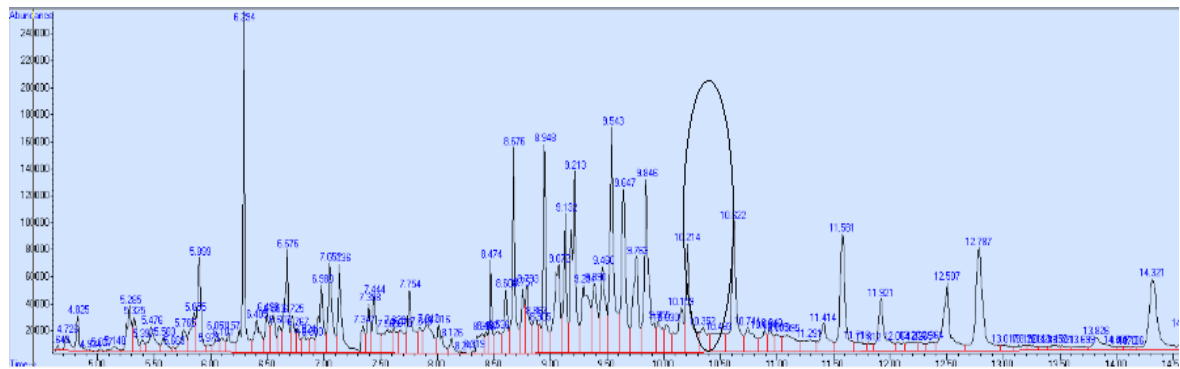


Şekil 4.31. Analiz edilen numune de α -ZOL'a ait iyonların SIM taraması

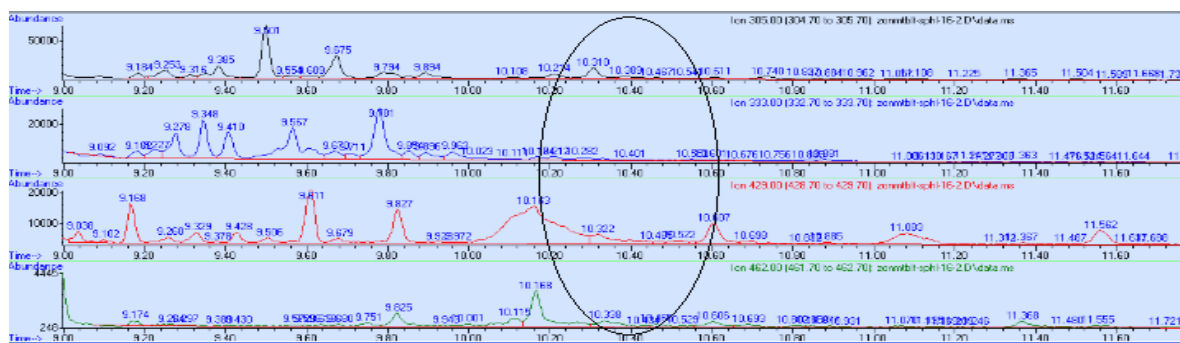


Şekil.4.32. Analiz edilen numune de β -ZOL'a ait iyonların SIM taraması

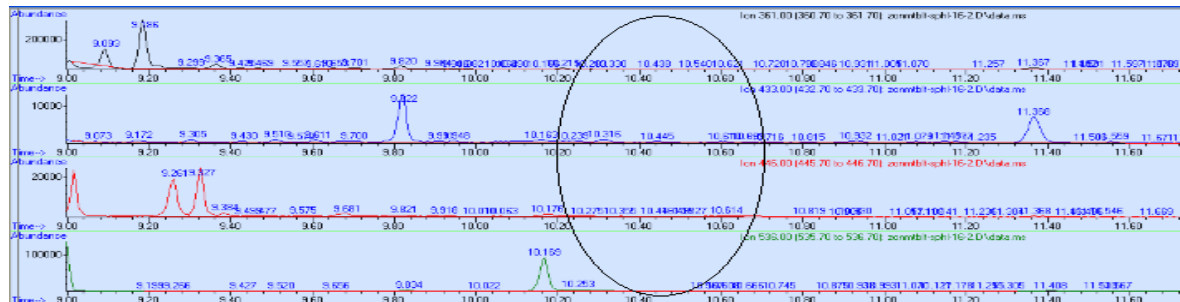
Analiz aşamalarının optimizasyonu ve metodu geçerli kılmaya yönelik çalışmalar esnasında 4 farklı firmaya ait yaklaşık 16 adet örnek stabil olmayan şartlarda, oda koşullarında bekletilmiştir. Bir kısmı son tüketim tarihleri geçtikten sonrada kontrol amaçlı analiz edilmiştir. Stabil olmayan şartlarda (ısı, nem vb.), çevresel stresin etkisi altında, ilkbahar, yaz ve sonbahar iklim koşullarında bekleyen numunelerin yapılan analizlerinde ZON ve metabolitlerinin kalıntısına rastlanmamıştır. Bu sonucun numune paketleri açıldığında ZON ve metabolitleri açısından kontamine olmadıkları, olsalar dahi çevresel şartlarda analitlerin zamanla degrade oldukları veya ortam şartlarının mantar üremesini teşvik edici parametreler barındırmadığı öngörülmüştür. Çevresel koşullarda beklemiş numuneye ait kromatogram, ZON ve metabolitlerinin fragman iyonlarının seçili SIM taraması Şekil 4.33-36'da gösterilmiştir.



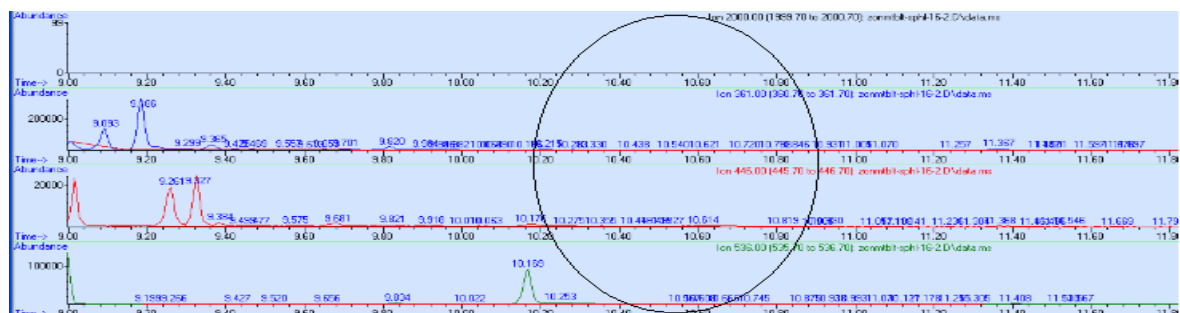
Şekil 4.33. Çevre şartlarında bekletilmiş numuneye ait kromatogram



Şekil 4.34. Çevre şartlarında bekletilmiş numunede ZON'a ait iyonların SIM taraması



Şekil 4.35. Çevre şartlarında bekletilmiş numunede α -ZOL'a ait iyonların SIM taraması



Şekil 4.36. Çevre şartlarında bekletilmiş numunede β -ZOL'a ait iyonların SIM taraması

5. TARTIŞMA

İnsanlar yaşamlarını sürdürebilmek için temel besin maddelerine ihtiyaç duyarlar. Bu temel besin maddeleri başlıca hayvansal ve bitkisel kaynaklardan gelir. Yaşamın devamlılığını sağlayan bu temel besin maddeleri fayda yanında sağlığı olumsuz etkileyen birçok kimyasal madde veya toksik maddeleri de bünyelerinde barındırabilirler. Bu maddelerin bir kısmı gıda hazırlama süreçlerinde kendiliğinden oluşan veya farklı kaynaklardan gelen istenmeyen kalıntılar olarak nitelendirilebilir. Sağlığı olumsuz etkileyebilen bu riskler her bireyde değişen derecede sonuçlar meydana getirmektedir. Yaş, cinsiyet, yaşam şekli, genetik nedenler, gıda alışkanlığı, maruziyet düzeyi gibi birçok parametre sonucu belirleyici faktörlerin başlıcalarıdır. Özellikle bebek ve yaşamın erken döneminde ki çocuklar, organ ve dokuların veya çoklu detoksifikasyon mekanizmalarının yeterince gelişmemiş olması nedeniyle tüm bu olumsuzluklara yetişkin bireylerden çok daha fazla duyarlıdır.

Bitkisel kaynaklı gıda üretimi, farklı aşamaları ve beraberinde olumsuzlukların dahil olabileceği uzun bir prosesi kapsar. Tahıl, dane yem gibi temel gıda kaynakları tarlaya ekimlerinden, hasat yapılana ve hasat sonrası depolanma sürecinden tüketim için raflarda bekletilmesine kadar geçen aşamaların herbirinde çeşitli olumsuzlukların oluşmasına aday gıda veya gıda ham maddeleridir. Tarlada bulunan doğal flora veya sonrasında ki şartların üremelerine olanak sağlamasından dolayı oluşan mantarlar, bu tür bitkilerde istenmeyen kontaminantların oluşmasında temel unsurlardır. Mantarlar bitkiye fitoparazit olarak yerleştikten sonra metabolik aktiviteleri esnasında ortama çok farklı mikotoksinleri salgırlar. Fusarium türü mantarlar tarafından oluşturulan bu mikotoksinlerden biri de ZON'dur. ZON, bitkisel kaynaktan maruziyetten sonra organizmada östrojeni taklit ederek veya yerine geçerek hormonal sistem, dolayısıyla hedef organ ve dokularda birçok advers etkiye neden olur.

ZON ve türevleri hayvansal gıda ürünlerinde de bulunur. Hayvanlar için temel kaynağı kontamine yem veya anabolik etkisinden dolayı bilinçli kullanılan veteriner preparatlarıdır. Ancak hayvanlarda alımından sonra metabolik sürece dahil olması,

detoksifikasyon mekanizmasına uğraması ve kısa sürede büyük çoğunluğunun vücuttan atılması veya anabolik amaçlı izne tabi kullanılan ülkelerde yasal arınma süresinin beklenmesi nedeniyle hayvansal ürünler insanlar açısından bitki bazlı besinler kadar tehlike arz etmemektedir.

Tahıl bazlı bebek mamalarının ZON ve türevleriyle kontamine olma durumunun bebek ve çocuk sağlığı açısından birçok hormonal/toksik etkiye neden olabileceği bilinmektedir. Gıdalarda istenmeyen kontaminant olarak bulunabilen bu maddelerin yüksek duyarlılıkla tespiti olumsuzlukların önceden öngörülmesi ve riskin mümkün olduğunca minimize edilmesi açısından önemlidir. Takip ve önlem açısından bu bileşiklerin biyolojik matrikslerde tespiti amacıyla TLC, ELISA, HPLC, GC/MS(MS), LC/MS (MS) gibi farklı çeşitli enstrümental teknikler kullanılmaktadır.

Biyolojik bileşik ve diğer bileşenler yönünden farklı matrikslerde SPE yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda SPE gibi bilinen ekstraksiyon metotlarına ek olarak sıvı-sıvı ekstraksiyon vb. tekniklerde oldukça fazla tercih edilmektedir. Ancak SPE tekniği, karmaşık içerikli biyolojik matrikslerde daha seçici olması, çok daha düşük düzeyde analitlerin tespitine olanak sağlaması, aynı matriks ortamında farklı bileşik ya da kimyasalların ayrımının sağlanabilmesi, çok daha temiz ekstraktlar elde edilebilmesi gibi birçok açıdan avantajları vardır. Ayrıca, GC/MS tekniğinde, analiz edilen karmaşık matriks içeren mama örneğinde olduğu gibi SPE yöntemi yerine sıvı-sıvı ekstraksiyonun kullanılması ve elde edilen yoğun matriks içerikli ekstraktın doğrudan cihaza enjekte edilmesi, cihaz işletim maliyetleri (dolgu kolonlar, auto sampler enjektörü, ion source vb. bölümler) yönünden sıkça sorunlar çıkaracaktır. Ayrıca eş zamanlı yapılan analizlerde cihaza enjeksiyon yapılan benzer metodla çalışılmış numunelerin değerlendirilmesinde, karşılaştırılmasında ve kalibrasyon eğrilerinin çiziminde sapmalar doğuracaktır. Analitik cihazlarda, özellikle GC, GC/MS (GC/MS/MS) gibi duyarlılığın çeşitli kirlilik ve safsızlıklardan olumsuz etkilendiği cihazlarda sürdürülebilir doğruluk ve tekrarlanabilirlik için SPE tekniği analistler için her zaman tercih nedeni olmuştur.

Bu çalışma ile mevcut SPE tekniklerinin belirli kritik noktalarında yapılan değişikliklerle farklı aşamaları optimize edilmiş, geliştirilen en uygun yöntem GC/MS'e uyarlanmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonucu geliştirilen GC/MS yönteminde tayin sınırı, iki farklı kalibrasyon eğrisine göre yapılmıştır. Geniş aralıklı kalibrasyon düzeylerinin seçiminde, kalibrasyon eğrisinin orjinden uzaklaştığı, alt ve üst kalibrasyon noktaları arasında uyumsuzluklar gözlenmiş, sonuçların gerçek değerlere yakın olması ve kalibrasyon eğrisinin orjine yaklaşması için iki farklı kalibrasyon aralığına (5 ng/g'dan küçük miktarlar için bir, 5>ng/g için ikinci) karar verilmiştir. Teşhis sınırı 1. çalışma aralığına göre ZON 0,20 ng/g, α -ZOL 0,20 ng/g, β -ZOL'un 0,06 ng/g; 2. çalışma aralığına göre, ZON 1,08 ng/g, α -ZOL 1,01 ng/g, β -ZOL 1,2 ng/g olarak tespit edilmiştir. Optimize edilen metodun avantajı teşhis ve tayin sınırlarının diğer birçok çalışmalara göre çok daha düşük olmasıdır. Optimize edilen ekstraksiyon metodları, bunlara ait sayısal değerler literatürde mevcut olan çeşitli tekniklerin kullanıldığı benzer çalışmalar ile bu çalışmalara ait sonuçlar Çizelge 5.1'de verilmiştir.

Çizelge 5.1. ZON ve metabolitleri ile tahıl, darı ve ürünlerinde yapılmış benzer çalışmalar³

Analit	Matriks	Ekstraksiyon	Clean up (Ekstrakt temizleme)	Tespit	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Ref.
ZON	Mısır, darı	ACN:H ₂ O	MycoSep	LC-APCI-MS ²	0,3–3,8 ng/g	-	[137]
ZON	Buğday unu	ACN:H ₂ O	MycoSep	LC-ESI-MS ²	10 ng/g	-	[137]
	Hububat	ACN:H ₂ O	AlfaOcraZea™	HPLC	-	-	[137]
	Hububat	ACN:H ₂ O MeOH:H ₂ O	Oasis HLB, IAC, MycoSep	HPLC	2 ng/g		[138, 139]
ZON	Tahıl bazlı bebek mamaları	MeOH:ACN: H ₂ O	SPE, C ₁₈ , IAC	LC-floresans dedektör, UV spektrometre	2,5 ng/g	3 ng/g, 2 ng/g	[140]
ZON	Mısır,un	ACN:H ₂ O	SPE (Mycosep)	LC/MSMS			[141]
ZON	Bebek maması, kahvaltılık tahıllar, atıştırmalık mısır, ekmek	ACN:H ₂ O	IAC	HPLC	0,65 ng/g	2,95 ng/g	[142]
ZON	Bebek maması, çorbalık makarna, mısır bazlı atıştırmalık	ACN:H ₂ O	IAC	HPLC. UPLC	4 ng/g; 8,1-10 ng/g	2,5 µg/kg; 8, 0-9, 2 ng/g	[143]
ZON	Beyaz un, karışık un, mısır unu, bebek maması	ACN:H ₂ O MeOH:H ₂ O	IAC	LC-FD	3,75 ng/g	12,5 ng/g	[144]
ZON	Patlamış mısır	ACN	SPE,C ₁₈	GC/MS	16 ng/g	48 ng/g	[122]
ZON	Buğday, pirinç, mısır	ACN	SPE,C ₁₈	GC/MS	0,6-5 ng/g	1,25-10 ng/g	[134]
ZON, α-ZOL	Tahıllar, domuz yemi	MeOH:ACN	IAC	LC-FLD	ZON, 2-6 ng/g; α-ZOL, 3-6 ng/g	-	[146]
ZON	İrmik	ACN	SPE,C ₁₈	GC/MSMS	-	10 ng/g	[147]
ZON	Mısır silajı	TBME:MeOH	SPE, Oasis HLB	HPLC-MS	-	-	[150]
ZON	Buğday, pirinç, mısır bazlı bebek maması	ACN:H ₂ O	SPE, C ₁₈	GC/MSMS	-	10, 5, 10 ng/g	[149]
ZON, α-ZOL, β-ZOL	Tahıl bazlı bebek maması	ACN:MeOH	LLE	LC/MSMS	1, 5 ng/g; 2 ng/g	5 ng/g; 2,5 ng/g	[150]
ZON, α-ZOL, β-ZOL	Tahıl bazlı bebek maması	TBME; MeOH:H ₂ O	SPE, C ₁₈	GC/MS	0,06-0,20 ng/g ; 1,01-1,2 ng/g	0,12-0,6 ng/g; 3,03-3,25 ng/g	[Sunulan çalışma]

³ ACN, asetonitril; H₂O, su; MeOH, metanol; MycoSep, AlfaOcraZea™, Oasis HLB, ekstrakt temizleme kolonu; IAC, immun affinity kolon.

GC/MS kullanılarak optimize edilen metod ile başta Avrupa Birliği olmak üzere birçok ülkenin talep ettiği ve özellikle Türk Gıda Kodeksi'nin (Gıda Maddelerinde Bulaşanların Maksimum Kalıntı Limitleri Hakkında Tebliğ (Tebliğ No: 2008 / 26)) mücadele ettiği maksimum kalıntı limitlerine uygun, hatta daha düşük düzeyde tespit limitleri elde edilmiştir. Analiz edilen farklı mama örnekleri neticesinde teşhis sınırında dahi kalıntıya delil olabilecek düzey tespit edilememiştir.

Analiz edilen numunelerde ZON ve metabolitleri yönünden kontamine bir durum tespit edilememesi, bütün benzer örneklerin de aynı olduğu anlamını taşımaz. Tahıl içerikli bebek mamalarında tek başına ZON veya kısıtlı sayıda metabolitleriyle birlikte metod geliştirme, optimizasyon ve kontaminasyon tespitine yönelik Çizelge 5.1'de belirtildiği üzere benzer metod optimizasyonu çalışmaları, survey çalışmaları ile piyasa araştırmaları yapılmıştır. Çizelge 5.1'de belirtildiği gibi bu çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu olarak, benzer çalışmalarda çoğunlukla ilgili metodun teşhis sınırında dahi herhangi bir kalıntıya rastlanmamış veya ≤ 0 , $\leq 0,1$, $\leq 17,6$ µg/kg gibi aralıklarda ki düzeyler olmak üzere ML'in altında değerler olarak tespit edilmiştir [140, 142, 143, 149, 150].

Gerçekleştirilen çalışma ve diğer çalışmalarda kontaminasyon açısından pozitif bir sonuçla karşılaşılmaması, ticari firmaların bu tür ürünleri üretirken ham maddeyi tüketime uygun belirli parametrelere göre seçmelerinden kaynaklanabilir. Ham maddeler üretim prosesinden önce kaliteli, mantarların üremesine olanak sağlayacak yüzeysel deformasyonların en az oranda olduğu, üründe tad açısından tek örneklilik ve diğer sağlık sorunlarına neden olabilecek kalıntıların uzaklaşmasını sağlamak amacıyla yapılan yıkama, kabuk kısmının ayrılması ve benzeri işlemler, paketlerin tek örnekliliğinin sağlanması amacıyla yapılan birçok farklı işlem, olası kontaminantların uzaklaştırılması için yapılan diğer fiziksel ve kimyasal (inert sorbentler) işlemlere tabi tutulmuş olma olasılığı ile kontaminasyona rastlanmadığı söylenebilir. Ayrıca mantarlar aerobik canlılardır ve canlılığın devamı için oksijene ihtiyaç duyarlar. Ticari ürünler hava sızdırmaz şekilde paketlenildiğinden, şayet mikotoksin üremesine neden olacak mantarla kontamine olsa bile canlılığın idamesi sağlanamayacaktır. ZON ve metabolitlerinin varlığına rastlanma ihtimali en yüksek ürün mısır ve ürünleridir. Analiz edilen

örneklerin ürün içeriği bilgilerinde içerik açısından tek başına mısır içermediği, diğer tahıl ve dane yemlerle birlikte homojen karışıma dahil edildiği belirlenmiştir. Bu nedenle analiz edilen birim miktar numunenin kontamine olma olasılığını azalmakta veya olası kontamine düzeyin teşhis ve tayin sınırının altında kalarak tespitini zorlaştırmaktadır. Benzer çalışmalarda gözlenen pozitif sonuçlar (≤ 0 , $\leq 0,1$, $\leq 17,6$ $\mu\text{g/kg}$) değerlendirilirken mikotoksin üremesine imkan sağlayan en önemli parametrenin ürünlerin yetiştirildiği ülkelerin bulunduğu veya temin edildiği ülkeye ait iklim kuşağı olduğu dikkate alınmalıdır. Analiz edilen numunelerde pozitif bir sonuç görülmemesinde, ham maddelerin özellikle karasal iklimin hüküm sürdüğü yerlerde yetişmiş olması, beraberinde ürünün hasat sonrası rutubetin mantar üremesini teşvik edici bir ortamda bulunmaması veya ham maddenin temin edildiği bölgesel florada ZON üreten *Fusarium* türü mantarların yokluğundan kaynaklı nedenler büyük rol oynamış olabilir.

Bu çalışmada teşhis sınırı ZON için 0,20 ng/g, tespit sınırı ise 0,6 ng/g olarak tespit edilmiştir. ZON için tespit sınırı TDI (0,25 $\mu\text{g/kg}$ vücut ağırlığı gün) ve PMTDI (0,5 $\mu\text{g/kg}$ vücut ağırlığı gün) değerlerinin düşük bir miktar üstündedir. Fakat teşhis sınırı ise 0,20 ng/g olarak TDI ve PMTDI'nın altında bir değer olarak ölçülmüştür. Analitik değerlendirmede teşhis sınırında ZON'a ait fragman iyonların her 4'ünün de tespit edilmesi gerekmektedir. Teşhis sınırı cihazda analitin tekrarlanabilir şekilde gözlemlendiği fakat ölçülemeyen miktar, başka bir ifadeyle cihaz için raporlama limiti olarak değerlendirilmektedir. Analizi gerçekleştirilen numunelerde software'den yapılan fragman iyon kontrollerinde özellikle ZON'a ait hiçbir iyon tespit edilmemiştir (Bkz. Şekil 4.29-32). Ayrıca β -ZOL için tespit sınırı 0,06 ng/g olarak TDI ve PMTDI'nın altında belirlenmiştir. β -ZOL'un bulunduğu ortamda ZON ve diğer metaboliti α -ZOL'un da bulunması beklenebileceğinden destekleyici bir dayanak oluşturmuştur. Bu bilgiler ışığında incelenen örneklerin öncelikle TDI değerinde kalıntı içermediği öngörülmüş, tüketilmeleri durumunda ZON'a bağlı östrojenik etki gözlenmeyeceği sonucuna varılmıştır.

Şayet analiz edilen numunelerde TDI'nın üstünde bir değer bulunsaydı, bu değer her ne kadar ML'in (ZON için ML; 20 $\mu\text{g/kg}$) altında olsa dahi ilgili örneği tüketen bebek veya yaşamın erken döneminde ki çocuklarda ZON'a maruziyet ihtimaline

bağlı risk değerlendirmesi yapılacaktır. Yaş grubu olarak 0-10 ay arası ve özellikle 5-9 ay arasında ek gıdaya geçilmesi ve bu dönemde ek gıda ve devam mamalarının tercihen bebeklerde kullanılması nedeniyle yüksek risk grubu olarak belirlenecekti. Buna yönelik ortalama vücut ağırlığı ve bu ağırlığa ihtiyacen günlük enerji gereksinimi (kcal kg^{-1} vücut ağırlığı gün^{-1}), ortalama günlük enerji gereksinimi (kcal gün^{-1}), söz konusu mamanın enerji içeriği, mamanın *tahmini günlük alım miktarı* (EDI, Estimation of the daily intake, ng/kg vücut ağırlığı/ gün), tüketim alışkanlığı, tüketim sıklığı ve süresi gibi parametreler değerlendirilecek, elde edilen verilere göre risk değerlendirmesi yapılacaktır [151-153].

6. SONUÇ

Tahıl bazlı bebek mamasında ZON, metabolitleri α -ZOL ve β -ZOL'un analizi için metod optimizasyonu yapılarak geliştirilen yöntemin kesin, doğru, seçici, tekrarlanabilir ve maksimum kalıntı düzeyinden düşük konsantrasyonlarda da duyarlılığının yüksek olduğu gösterilmiştir. Analizi gerçekleştirilen numunelerden elde edilen sonuçlara göre piyasada perakende satılan tahıl bazlı bebek mamalarının Zearalenone ve metabolitleri açısından kontamine olmadığı tespit edilmiştir. Bu ürünleri tüketen bebek ve çocukların tahıl bazlı mama kaynaklı bir risk altında olmadıkları gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Bilici, S., Uyar, M. F., Beyhan, Y. ve Sağlam, F. (2008). *Besin Güvenliği*. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Beslenme ve Fiziksel Aktiviteler Daire Başkanlığı.
2. İlbeği, İ. (2004). Gıda güvenliği ve tüketicinin korunması *Gıda Mühendisliği Dergisi*,13-16.
3. National Institutes of Health U.S. Department of Health and Human Services (2010). *Endocrine Disruptures*.
4. Çek, Ş. ve Sarıhan, F. (2010). Endokrin sistemi bozan kimyasallardan cinsiyet steroidlerinin balıklardaki etkileri. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 27 (1), 41-46.
5. Erkekoğlu, P., Şahin,G. ve Baydar, T. (2008). A special focus on mycotoxin contamination in baby foods: their presence and regulations. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33, 51–66.
6. Li Y., Burns K.A., Arao Y., Luh C.J. ve Korach K.S. (2012). Differential estrogenic actions of endocrine-disrupting chemicals bisphenol A, bisphenol AF, and zearalenone through estrogen receptor a and b in vitro. *Environmental Health Perspectives*, 120 (7), 1029–1035.
7. Herzallah, S. M. (2009). Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chemistry*, 114, 1141–1146.
8. Bryden, W. L. (2012). Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, 173, 134– 158.
9. Haschek, W.M. ve Voss, K.A. (2013). Mycotoxins. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*, chapter 39, Third Edition.
10. Logrieco, A., Bottalico, A., Mule, G., Moretti, A. ve Perrone, G. (2003). Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 645–667.
11. Mwanza, M. (2011). *A comparative study of fungi and mycotoxin contamination in animal products from selected rural and urban areas of South Africa with particular reference to the impact of this on the health of rural black people*, Yayınlanmamış Doktora Tezi, University of Johannesburg, Johannesburg.

12. Piesik, D., Panka, D., Delaney, K. J., Skoczek, A., Lamparski, R. ve Weaver, D. K. (2011). Cereal crop volatile organic compound induction after mechanical injury, beetle herbivory (*Oulema* spp.), or fungal infection (*Fusarium* spp.). *Journal of Plant Physiology*, 168, 878–886.
13. Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G. ve Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218-237.
14. Marroquín-Cardona, A. G., Johnson, N. M., Phillips, T. D. ve Hayes, A. W. (2014). Mycotoxins in a changing global environment – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 69, 220-230.
15. Sherif, S. O., Salama, E. E. ve Abdel-Wahhab, M. A. (2009). Mycotoxins and child health: The need for health risk assessment. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 212, 347-368.
16. Driehuis, F., Spanjer, M.C., Scholten, J.M. ve Giffel, M.C. (2008). Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. *Journal of Dairy Science*, 91, 4261-4271.
17. García-Cela, E., Ramos, A.J., Sanchis, V. ve Marin, S. (2012). Emerging risk management metrics in food safety: FSO, PO. How do they apply to the mycotoxin hazard?. *Food Control*, 25, 797-808.
18. D'Mello, P.F. ve Macdonald, A.M.C. (1997). Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology*, 69, 155-166.
19. Food and Agriculture Organization of the United Nations-World Health Organization. (2001). *Safety evaluation of certain mycotoxins in food*. FAO Food and Nutrition Paper N:74.
20. Kaya, S. ve Yarsan, E. (1995). Yem ve yem hammaddelerinde küflenmenin önlenmesi ve mikotoksinlerle kirlenmiş bu tür yemlerin değerlendirilmesine yönelik uygulamalar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 42 (2), 111-122.
21. İnternet: Ferrante, M., Salvatore, S. ve Oliveri, G.S. (2012). Carcinogen Role of Food by Mycotoxins and Knowledge Gap. *Carcinogen*, June 2012, 133-162. URL: <http://www.intechopen.com/books/carcinogen/carcinogen-role-of-food-by-mycotoxins-and-knowledge-gap>, Son Erişim Tarihi: 18.02.2015.
22. European Food Safety Authority (EFSA) (2011). Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA Journal*, 9(6): 2197.
23. Turner, P. C., Flannery, B., Isitt, C., Ali, M. ve Pestka, J. (2012). The role of biomarkers in evaluating human health concerns from fungal contaminants in food. *Nutrition Research Reviews*, 25, 162–179.

24. Guarro, J., Gene, J. ve Stchigel, A. M. (July 1999). Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, 454–500.
25. Underhill, D. M. ve Iliev, I. D. (2014). The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nature Reviews / Immunology*, 14, 405-416.
26. Thorn, R. G. ve Lynch, M. D. J.(2007). Fungi and eukaryotic algae. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*.(Ed.: Eldor A. Paul), 145-162.
27. Hans, P. van E., Schothorst, R. C. ve Jonker, M. A. (2007). Regulations relating to mycotoxins in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389:147–157.
28. G., Cano-Sancho, S., Marin, A. J., Ramos ve V., Sanchis (2010). Biomonitoring of *Fusarium* spp. mycotoxins: Perspean individual exposure assessment tool. *Food Science and Technology International*, 0(00):0001–0011.
29. Lodenius, M. (2013). Use of plants for biomonitoring of airborne mercury in contaminated areas. *Environmental Research*, 125, 113–123.
30. Pereyra, M.L.G., Chiacchiera, S.M., Rosa, C.A.R., Sager, R., Dalcero, A. M. ve Cavaglieri, L. (2011). Comparative analysis of themycobiota and mycotoxins contaminating corn trench silos and silo bags. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1474–1481.
31. Bensassi, F., Mahdi, C., Bacha, H. ve Hajlaoui, M. R. (2011). Survey of the mycobiota of freshly harvested wheat grains in the main production areas of Tunisia. *African Journal of Food Science*, 5(5), 292 – 298.
32. Hashemi, M. ve Alamri, S. (2010). Contamination of common spices in Saudi Arabia markets with potential mycotoxin-producing fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17, 167–175.
33. Sirot, V., Fremy, J. ve Leblanc, J. (2013). Dietary exposure to mycotoxins and health risk assessment in the second French total diet study. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 1-11.
34. Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15, 129-144.
35. Rietjens, I. M. C. M., Tyrakowska, B., Berg, J. P. L. S., Soffers, A. E. M. F. ve Punt, A. (2015). Matrix-derived combination effects influencing absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) of food-borne toxic compounds: implications for risk assessment. *Toxicology Research*, 4-23.
36. Dillon, H. K., Miller, J. D., Sorenson, W.G., Douwes, J. ve Jacobs, R. R. (1999). Review of methods applicable to the assessment of mold exposure to children. *Environmental Health Perspectives*, 107 (3), 473-480.

37. Eduard, W. (2009). Fungal spores: A critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting. *Critical Reviews in Toxicology*, 39 (10), 799-864.
38. Mostrom, M. (2011). Trichothecenes and zearalenone (Ed.: Ramesh GC). *Reproductive and Developmental Toxicology*, Toxicology Department Breathitt Veterinary Center Murray State University Hopkinsville, Kentucky USA, Chapter 54, 739-751.
39. Zinedine, A., Soriano, J. M., Molto, J. C. ve Manes, J. (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1-18.
40. Şennur, Ö., ve Oya, A. (1994). Mısırdaki zearalenone oluşumu üzerine araştırmalar. *Gıda*, 19 (5), 339-344.
41. Michelle, S.M. (2012). Zearalenone (Ed.: Ramesh GC). *Veterinary Toxicology*, Breathitt Veterinary Center, Hopkinsville, KY, USA, Chapter 95, 1266-1271.
42. Massart, F. ve Saggese, G. (2010). Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development. *International Journal of Andrology*, 33, 369-376.
43. Nikaido, Y., Yoshizawa, K., Danbara, N., Tsujita-Kyutoku, M, Yuri, T., Uehara, N. ve Tsubura, A. (2004). Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reproductive Toxicology*, 18, 803–811.
44. Fink-Gremmels, J. ve Malekinejad, H. (2007). Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 326-341.
45. Kwasniewska K., Gadza R., Kopciuch R-G. ve Cendrowski K. (2015). Analytical procedure for the determination of zearalenone in environmental and biological samples. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*; 45, 119-130.
46. İnternet: Food Standards Agency (2007). *The UK Code of Good Agricultural Practice to Reduce Fusarium Mycotoxins in Cereals*. URL :<http://food.gov.uk/multimedia/pdfs/fusariumcop.pdf> Son Erişim Tarihi: 15.03.2015.
47. Peter, Z., Bernhard, M. ve Bernhard, H. (2006). Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1136, 123–169.
48. Napolitano, C., Natoni, A., Santocanale, C., Evensen, L., Lorens, J. B. ve Murphy, P. V. (2011). Isosteric replacement of the Z-enone with haloethyl ketone and E-enone in a resorcylic acid lactone series and biological evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21, 1167–1170.

49. Minervini, F., Giannoccaro, A., Cavallini, A. ve Visconti, A. (2005). Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters. *Toxicol Letters*, 2005; 159, 272–283.
50. Eriksen, G.S. ve Alexander, J. (1998). Fusarium Toxins in Cereals – A Risk Assessment (Ed.: In: Nordic Council of Ministers). Tema Nord, Copenhagen, 502, 7–58.
51. Danicke, S., Swiech, E., Buraczewska, L. ve Ueberschar, K.H. (2005). Kinetics and metabolism of zearalenone in young female pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (Berl.), 89, 268–276.
52. Döll, S., Danicke, S. ve Schnurrbusch, U. (2003). The effect of increasing concentrations of Fusarium toxins in the diets of piglets on histological parameters of uterus. *Mycotox*, 19, 73–76.
53. Danicke, S., Ueberschar, K.H., Halle, I., Matthes, S., Valenta, H. ve Flachowsky, G. (2002). Effect of a detoxifying agent to laying hen diets containing uncontaminated or Fusarium toxin-contaminated maize on performance of hens and carryover of zearalenone. *Poultry Science*, 81, 1671–1680.
54. Sypecka, Z., Kelly, M. ve Brereton, P. (2004). Deoxynivalenol and zearalenone residues in eggs of laying hens fed with a naturally contaminated diet: Effects on egg production and estimation of transmission rates from feed to eggs. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5463–5471.
55. Hagler, W.M., Towers, N.R., Mirocha, C.J., Eppley, R.M. ve Bryden, W.L. (2001). Zearalenone: mycotoxin or mycoestrogen? *Memorial Symposium* 2001.
56. Valentina, M., Giulio, S., Elisabetta, R., Giuseppe, S. ve Francesco, M. (2011). Mycoestrogen pollution of italian infant food. *The Journal Of Pediatrics*, Pisa, Italy, Jan 18, 2011.
57. Kuiper, G. J. M., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., Saag, P. T., Burg, B. ve Gustafsson, J. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *The Endocrine Society*, 139 (10), 4252-4263.
58. Shier, W. T., Shier, A. C. , Xie, W. ve Mirocha, C. J. (2001). Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicon*, 39, 1435-1438.
59. Zinedine, A., Soriano, J. M., Molto, J. C. ve Manes, J. (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1-18.

60. Green, M. L., Diekman, M. A., Malayer, J. R., Scheidt, A. B. ve Long, G. G. (1990). Effect of prepubertal consumption of zearalenone on puberty and subsequent reproduction of gilts. *Journal of Animal Science*, 68, 171-178.
61. Geisert, R. D. ve Schmitt, R. A. M. (2002). Early embryonic survival in the pig: Can it be improved?. *Journal of Animal Science*, 80, E54-E65.
62. Ayed-Boussema, I., Pascussi, J. M., Maurel, P., Bacha, H. ve Hassen, W. (2011). Zearalenone activates pregnane X receptor, constitutive androstane receptor and aryl hydrocarbon receptor and corresponding phase I target genes mRNA in primary cultures of human hepatocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 31, 79-87.
63. Hussein, H. S. ve Brasel, J. M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167, 101-134.
64. Malekinejad, H., Eric J. Schoevers, E. J., Daemen, I. J. J. M., Zijlstra, C., Colenbrander, B., Fink-Gremmels, J. ve Roelen, B. A. J. (2007). Exposure of oocytes to the fusarium toxins zearalenone and deoxynivalenol causes aneuploidy and abnormal embryo development in pigs. *Biology of Reproduction*, 77, 840-847.
65. Collins, T. F. X., Sprando, R. L., Black, T. N., Olejnik, N., Eppley, R. M., Alam, H. Z., Rorie, J. ve Ruggles, D. I. (2006). Effects of zearalenone on in utero development in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1455-1465.
66. Tyler, C. R., Jobling S. Ve Sumpter P. (1998). Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence. *Critical Reviews in Toxicology*, 28(4):319–361.
67. Hueza, I. M., Raspantini, P. C. F., Raspantini, L. E. R., Latorre, A. O. ve Górniak, S. L. (2014). Zearalenone, an estrogenic mycotoxin, Is an immunotoxic compound. *Toxins*, 6, 1080-1095.
68. Salah-Abbès J. B., Abbès S., Houas Z., Abdel-Wahhab M. A. ve Oueslati R. (2008). Zearalenone induces immunotoxicity in mice: possible protective effects of radish extract (*Raphanus sativus*). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60: 761–770.
69. Binder, E. M. (2007). Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*, 133, 149-166.
70. McKenzie, K.S., Sarr, A.B., Mayura, K., Bailey, R.H., Millar, D.R., Rogers, T.D., Corred, W.P., Voss, K.A., Plattner, R. D., Kubena, L.F. ve Phillips, T.D. (1997). Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food and Chemical Toxicology*, 35, 807–820.
71. Abd Alla, E.S. (1997). Zearalenone: toxigenic fungi and chemical decontamination in Egyptian cereals. *Nahrung*, 41, 362–365.

72. Cetin, Y. ve Bullerman, L.B. (2005a). Cytotoxicity of Fusarium mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. *Food Chemical Toxicol*, 2005a; 43, 755–764.
73. Ryu, D., Hanna, M.A. ve Bullerman, L.B. (1999). Stability of zearalenone during extrusion of corn grits. *Journal of Food Protection*, 62, 1482–1484.
74. Lemke, S.L., Grant, P.G. ve Phillips, T.D. (1998). Adsorption of zearalenone by organophilic montmorillonite clay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3789– 3796.
75. Huwig, A., Freimund, S., Kappeli, O. ve Dutler, H. (2001). Mycotoxin detoxification of animal feed by different sorbents. *Toxicology Letters*, 122, 179–188.
76. Avantaggiato, G., Havenaar, R. ve Visconti, A. (2004). Assessing the zearalenone binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic in vitro gastrointestinal model. *Food and Chemical Toxicology*, 41, 1283–1290.
77. Galvano, F., Piva, A., Ritlen, A. ve Galvano, G. (2001). Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *Journal of Food Protection*, 64, 120–131.
78. Devegowda, G., Arvind, B.I.R. ve Morton, M.G. (1996). Saccharomyces cerevisiae and mannanoligosaccharides to counteract aflatoxisis in broilers. *Australian Poultry Science Symposium*, 8,103–106.
79. Shetty, P. H. ve Jespersen, L. (2006). Saccharomyces cerevisiae and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 48-55.
80. Biehl, M.L., Prelusky, D.B., Koritz, G.D., Hartin, K.E., Buck, W.B. ve Trenholm, H.L. (1993). Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 121, 152–159.
81. Kiessling, K. H., Pettersson, H., Sandholm, K. ve Monica Olsen, M. (1984). Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1070-1073.
82. Karlovsky, P. (1999). Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production, *Natural Toxins*, 7, 1–23.
83. Megharaj, M., Garthwaite, I. ve Thiele, J.H. (1997). Total biodegradation of the oestrogenic mycotoxin zearalenone by a bacterial culture. *Letters in Applied Microbiology*, 24, 329–333.

84. Molnar, O., Schatzmayr, G., Fuchs, E. ve Prillinger, H. (2004). *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 661–671.
85. Mokoena, M.P., Chelule, P.K. ve Gqaleni, N. (2005). Reduction of fumonisin B1 and zearalenone by lactic acid bacteria in fermented maize meal. *Journal of Food Protection*, 68, 2095–2099.
86. Hussein, H. S. ve Brasel, J. M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167, 101-134.
87. European Food Safety Authority (2014). Evaluation of the increase of risk for public health related to a possible temporary derogation from the maximum level of deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins for maize and maize products. *EFSA Journal*, 12(5): 3699.
88. Schollenberger, M., Muller, H. M., Ruffe, M., Suchy, S. ve Planck, S. (2005). W. Drochner Survey of Fusarium toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 317–326.
89. Commission Regulation (2006). (Ec) No 1881/2006 Of 19 December 2006. OJ L 364.
90. Skoong, D.A., Holler, F.J. ve Nielman, T.A. (2007). *Enstrümantal Analiz İlkeleri* (Ed.: E. Kılıç, F. Köseoğlu ve H. Yılmaz).1.Baskı, Ankara: Bilim Yayınları, 513-680.
91. Kitson, F.G., Larsen, B.S. ve McEwen, C.N. (1996). Gas Chromatography and Mass Spectrometry. 4th Ed. California: Academic Pres, 3-20.
92. İnternet: Gas Chromatography [online]. 2011 [cited 2013 Sept 21]. URL : http://www.lindegas.by/en/processes2/analysis_and_instrumentation/gas_chromatography/index.html Son Erişim Tarihi: 15.03.2015.
93. İnternet: <http://www.microbialcellfactories.com/content/6/1/6/figure/f4?highres=y> Son Erişim Tarihi: 19.03.2015.
94. Watson, J.T. ve Sparkman, O.D. (2008). *Introduction to Mass Spectrometry*. 4th Ed. England: John Wiley and Sons, 819.
95. Gross, J.H. (2004). *Mass Spectrometry A textbook*. 2nd ed. Germany: Springer, 518.
96. İnternet: Mass Spectrometry Tutorial, <http://www.cif.iastate.edu/mass-spec/ms-tutorial> Son Erişim Tarihi: 19.03.2015.
97. Marvin, C.M. (2007). *GC MS: A Practical User's Guide*. 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 8-10.

98. Lee, M. (2009). *Basic Skills in Interpreting Laboratory Data*. 4th Ed. USA: *American Society of Health- System Pharmacists*, 621.
99. Hajšlova, J. ve Tomáš Cajka, T. (2007). Gas chromatography–mass spectrometry (GC– MS) (Ed.: Y. Picó). *Food Toxicants Analysis*, Elsevier B.V., 419-473.
100. Setle, F. (1997). *Handbook of Instrumental Techniques for analytical chemistry*, Prentice Hall PTR, USA, 994.
101. Niessen, W.M.A. (2001). *Current Practice of Gas Chromatography - Mass Spectrometry*. New York: Marcel Dekker Inc., 110-113.
102. Ragunathan, N., Krock, K. A., Klawun, C., Sasaki, T. A. ve Wilkinsb, C. L. (1999). Gas chromatography with spectroscopic detectors. *Journal of Chromatography A*, 856, 349–397.
103. Kopka, J. (2006). Current challenges and developments in GC–MS based metabolite profiling technology. *Journal of Biotechnology*, 124, 312–322
104. Shah, V. P., Midha, K. K., Findlay, J. W. A., Hill, H. M., Hulse, J. D., McGilveray, I. J., McKay, G., Miller, K. J., Patnaik, R. N., Powell, M. L., Tonelli, A., Viswanathan, C. T. ve Yacobi, A. (2000). Bioanalytical Method Validation—A Revisit with a Decade of Progress. *Workshop/Conference Report. Pharmaceutical Research*, 17 (12).
105. Schummer, C., Delhomme, O., Appenzeller, B.M., Wennig, R. ve Millet, M. (2009). *Comparison of MTBSTFA and BSTFA in Derivatization Reactions of Polar Compounds Prior to GC/MS Analysis*. *Talanta*, 77 (4), 1473–1482.
106. Halket, J. M., Waterman, D., Przyborowska, A. M., Patel, R. K. P., Fraser, P. D. ve Bramley, P.M. (2005). Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *Journal of Experimental Botany- Making Sense of the Metabolome Special Issue*, 56 (410). 219–243.
107. İnternet: Orata, F. (2012). *Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis* (Ed.: Dr. Mustafa Ali Mohd). *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, 83-108. URL: [http://www.intechopen.com /books/advanced-gaschromatography-progress-in-agricultural-biomedical-and-industrial-applications/derivatization-reactions-andreagents-for-gas-chromatography-analysis](http://www.intechopen.com/books/advanced-gaschromatography-progress-in-agricultural-biomedical-and-industrial-applications/derivatization-reactions-andreagents-for-gas-chromatography-analysis), Son Erişim Tarihi: 22.03.2015.
108. Kırmızıbayrak, Ö. (2010). *Suda Bazı Östrojenik Steroidlerin Gaz Kromatografisi - Kütle Spektrometrisi İle Tayini*, Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi: Ankara.

109. Kinani, S., Bouchonnet, S., Bourcier, S., Porcher, J. M. ve Ait-Aïssab, S. (2008). Study of the chemical derivatization of zearalenone and its metabolites for gas chromatography–mass spectrometry analysis of environmental samples. *Journal of Chromatography A*, 1190 (1-2), 307-315.
110. Rosenfeld, J.M. (1999). Solid-phase analytical derivatization: enhancement of sensitivity and selectivity of analysis. *Journal of Chromatography A*, 843, 19–27.
111. İnternet: Solid Phase Extraction Application Guide [online]. 2012 [cited 2013 Sept 23]. URL : ftp://ftp.mnnet.com/english/Flyer_Catalogs/Chromatograph/SPE/SPE_Applis.pdf, Son Erişim Tarihi: 19.03.2015.
112. İnternet: Guide to Solid Phase Extraction.[online]. Supelco, 1998. [cited 2013 Sept. 21]. Available from : URL : <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>, Son Erişim Tarihi: 29.03.2015.
113. Wells, D.A. (2008). *Solid-phase extraction with cartridges*. Sample Prep. Solutions Company, Maplewood, MN, USA.
114. Bogialli S., Corcia A. D. ve Nazzari M. (2007). Extraction procedures (Ed.: Y. Picó). *Food Toxicants Analysis*, 9, 269-297
115. İnternet: Christie, W. W. (). Solid-phase extraction columns in the analysis of lipids. http://lipidlibrary.aocs.org/topics/spe_alm/index.htm Son Erişim Tarihi: 24.03.2015.
116. Hennion, M. C. (1999). Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 856 (1-2), 3–54.
117. Zief, M. (2005). *Solid Phase Extraction for Sample Preparation*. Phillipsburg: JT Baker.
118. Żwir-Ferenc, A. ve Biziuk, M. (2006). Solid Phase Extraction Technique-Trends, Opportunities and Applications. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15 (5), 677-690.
119. Dimitrios, F. (2007). *Clean-up and fractionation methods*. Chapter 10 (ED.:Y. Picó). *Food Toxicants Analysis*, 299-347.
120. Atkins, P. (2001). *The elements of physical chemistry with applications in biology*, New York: W.H.Freeman and Company, 381-413.
121. Kinsella, B., O'Mahony, J., Malone, E., Moloney, M., Cantwell, H., Furey, A. ve Danaher, M. (2009). Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7977–8015.

122. Ferreira, I., Fernandes, J. O. ve Cunha, S.C. (2012). Optimization and validation of a method based in a QuEChERS procedure and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of multi-mycotoxins in popcorn. *Food Control*, 27, 188-193.
123. Lee, H. S., Jung, B. H., Kim, S. Y. ve Chung, B. C. (2004). Determination of phytoestrogens in traditional medicinal herbs using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15, 452-460.
124. Byrd, N., Sweeney, D. ve Glauner, T. (2012). LC/MS/MS of Trichothecenes and Zearalenone in Wheat Using Different Sample Prep Methods. Application Note, *Agilent Technologies*, Germany.
125. Cunha, S. C. ve Fernandes, J. O. (2010). Development and validation of a method based on a QuEChERS procedure and heartcutting GC-MS for determination of five mycotoxins in cereal products. *Journal of Separation Science*, 33, 600-609.
126. Fuh, M. R., Huang, S. Y. ve Lin, T. Y. (2004). *Determination of residual anabolic steroid in meat by gas chromatography-ion trap-mass spectrometer*. *Talanta*, 64, 408-414.
127. Sospedra, I., Blesa, J., Soriano, J. M. ve Manes, J. (2010). Use of the modified quick easy cheap effective rugged and safe sample preparation approach for the simultaneous analysis of type A- and B-trichothecenes in wheat flour. *Journal of Chromatography A*, 1217, 1437-1444.
128. Blokland, M. H., Sterk, S. S., Stephany, R. W., Launay, F. M., Kennedy, D. G. ve Ginkel L. A. V. (2006). Determination of resorcylic acid lactones in biological samples by GC-MS. Discrimination between illegal use and contamination with fusarium toxins. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 384, 1221-1227.
129. Pallaroni, L. ve Holst, C. V. (2004). Development of an extraction method for the determination of zearalenone in corn using less organic solvents. *Journal of Chromatography A*, 1055, 247-249.
130. Royer, D., Humpf, H. U. ve Guy, P. A. (2004). Quantitative analysis of Fusarium mycotoxins in maize using accelerated solvent extraction before liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*, 21 (7), 678-692.
131. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (2005). ICH harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), Current Step 4 version, 17.
132. Skoong, D.A., Holler, F.J. ve Nielman, T.A. (1998). *Enstrümantal Analiz İlkeleri* (Ed.: E. Kılıç, F. Köseoğlu ve H. Yılmaz). Ankara: Bilim Yayıncılık, 849.
133. Miller, J.N. ve Miller, J. C. (2005). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Pearson Education Limited, England, 253.

134. Ribani, M., Collins, C. H. ve Bottoli, C. B .G. (2007). Validation of the determination of impurities in omeprazole, *Journal of Chromatography A*, 1156, 201-205.
135. The Fitness for purpose of analytical methods a laboratory guide to method validation and related topics. *Eurachem Guide*. Second edition, 2014.
136. COMMISSION DECISION of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities, 2002.
137. Lattanzio, V. M. T., Pascale, M. ve Visconti, A. (2009). Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. *Trends in Analytical Chemistry*, 28 (6), 758-768.
138. Rahmani, A., Jinap, S., Soleimany, F., Khatib, A. ve Tan, c. P. (2011). Sample preparation optimization for the simultaneous determination of mycotoxins in cereals. *European Food Research and Technology*, 232, 723-735.
139. Şenyuva, H. Z. ve John Gilbert, J. (2010). Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review. *Journal of Chromatography B*, 878, 115–
140. Lombaert, G. A., Pellaers, P., Roscoe, V., Mankotia, M., Neil, R. ve Scott, P. M. (2003). Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. *Food Additives & Contaminants*, 20 (5), 494-504.
141. Extraction of Zearalenone from Wheat and Corn by Accelerated Solvent Extraction (ASE®) (2004). Application Note 350, thermo scientific, Dionex.
142. Cano-Sancho, G., Marin, S., Ramos, A. J. ve Sanchis, V. (2012). Occurrence of zearalenone, an oestrogenic mycotoxin, in Catalonia (Spain) and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 835-839.
143. Ok, H. E., Choi, S., Kim, M. ve Chun, H. S. (2014). HPLC and UPLC methods for the determination of zearalenone in noodles, cereal snacks and infant formula. *Food Chemistry*, 163, 252-257.
144. Aldana, J. R., Silva, L.J.G., Pena, A., Mañes, J. ve Lino, C. M. (2014). Occurrence and risk assessment of zearalenone in flours from Portuguese and Dutch markets. *Food Control*, 45, 51-55.
145. Pereira, V. L., Fernandes, J. O. ve Cunha, S. C. (2014). Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 36, 96-136.
146. Sun, H., Ge, X., Lv, Y. ve Wang, A. (2012). Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. *Journal of Chromatography A*, 1237, 1-23.

147. Rodríguez-Carrasco, Y., Berrada, H., Font, G. ve Manes, J. (2012). Multi-mycotoxin analysis in wheat semolina using an acetonitrile-based extraction procedure and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1270, 28-40.
148. Richard, E., Heutte, N., Sage, L., Pottier, D., Bouchart, V., Lebailly, p. ve Garon, D. (2007). Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 2420-2425.
149. Rodríguez-Carrasco, Y., Moltó, J. C., Berrada, H. ve Manes, J. (2014). A survey of trichothecenes, zearalenone and patulin in milled grain-based products using GC–MS/MS. *Food Chemistry*, 146, 212-219.
150. Juan, C., Raiola, A., Mañes, J. ve Ritieni, A. (2014). Presence of mycotoxin in commercial infant formulas and baby foods from Italian market. *Food Control*, 39, 227-236.
151. Juan, C., Mañes, J., Raiola, A. ve Ritieni, A. (2013). Evaluation of beauvericin and enniatins in Italian cereal products and multicereal food by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Food Chemistry*, 140, 755–762.
152. Piccinelli, R., Pandelova, M., Le Donne, C., Ferrari, M., Schramm, K.W. ve Leclercq, C. (2010). Design and preparation of market baskets of European Union commercial baby foods for the assessment of infant exposure to food chemicals and to their effects, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 27 (10), 1337–1351.
153. European Food Safety Authority (2014). Scientific Opinion on the essential composition of infant and follow-on formulae. *EFSA Journal*, 12(7):3760.

EKLER

EK 1: % Geri kazanımın hesaplanması, % R' (% bağıl (relative) geri kazanım oranı), kesinlik, teşhis sınırı, tespit sınırı hesaplanmasına ait formüller

% Geri kazanım hesaplama formülü

$$\% R = (x' - x) / x_{\text{spike}} \times 100$$

R = Geri kazanım

x' = Spike edilen örneğin konsantrasyonu

x = Örnek konsantrasyonu

x_{spike} = Standart konsantrasyonu

% R' (% bağıl (relative) geri kazanım oranı)

$$R'(\%) = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{\text{spike}}} \times 100$$

$\bar{x}'$ = Zenginleştirilmiş (spike edilmiş) örnek sonucu (konsantrasyonu) ortalaması

$\bar{x}$ = Orjinal örnek sonucu (konsantrasyonu) ortalaması

x_{spike} = Zenginleştirme sonucu (konsantrasyonu) ortalaması=Standart konsantrasyonu ortalaması

Teşhis sınırı (Gözlenebilme sınırı)

$$\text{LOD} = 3,3 \text{ sb} / b \quad (3.1)$$

sb : Cevabın standart sapması (kör örneklerden alınan cevaplar)

b : Eğrinin eğimi

Tayin sınırı (Alt tayin sınırı)

$$\text{LOQ} = 10 \text{ sb} / b \quad (3.2)$$

sb : Cevabın standart sapması (kör örneklerden alınan cevaplar)

b : Eğrinin eğimi

Keskinlik parametresi için tekrareilebilirlik katsayısı formülleri:

$S_r = \sqrt{[(\sum(a_1 - b_1)^2) / 2d]}$ → İki farklı sonuç arasındaki standart sapma

$a - b$ = İki sonuç arasındaki fark

d = Çalışma sayısı

$r = 2,83 * S_r$

r : Tekrarlanılabilirlik limiti

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : AKSAKAL, Tefik Bülent
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 01.05.1974, Ankara
 Medeni hali : Bekâr
 Telefon : 0535 253 81 17
 Faks : -
 e-mail : aksakalbulent@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi /Sağlık Bilm. Enst.	Devam ediyor
Yüksek lisans	Ankara Üniversitesi /Veteriner Fakültesi	2001
Lise	Ankara Lisesi	1991

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
1991-2001	TRT, Naklen Yayın Birimi	Yardımcı personel
2002-Halen	Veteriner Kont. Merkez Araşt. Enstitüsü, Toksikoloji Lab., GTHB	Veteriner Hekim

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar -

Hobiler

Uzun yürüyüşler yapmak.