



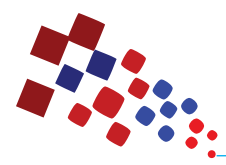
ULUSAL GIDA
REFERANS LABORATUVARI
NATIONAL FOOD
REFERENCE LABORATORY



UGRL DERGİSİ
JOURNAL of NFRL

ULUSAL GIDA REFERANS LABORATUVARI DERGİSİ

Cilt: 1 Sayı: 1
Haziran/2010



Vizyonumuz

“Gıda konusunda bilimsel, anlaşılır ve yenilikçi bakış açısı ile kamu ve özel sektörde liderlik vasfını koruyarak güncel ve kullanılabılır bilgiyi halk sağlığı ve toplum refahı için sunmaktır.”



Misyonumuz

“Kuruluş kanunumuzdan aldığımız güç ile ulusal ve uluslararası bilgi paylaşımına açık, yenilikçi, rehber, lider ve uzman bakış açımızla kaliteli ve saygın bilimsel yayınları bilim dünyasında ait olduğu haklı yere getirmektir. Sağlanan katma değer toplumsal refah, halk sağlığı ve milli ekonomi yönünden değerlendirildiğinde sürekli iyileştirmeye açık ve yenilikçi bir yaklaşımla seçkin dergiler arasında yer alacaktır.”



Bakan Sunuş

İletişim teknolojisindeki gelişmelerle birlikte günümüzde toplumsal ve bireysel bilinçlenme, hayatın her safhasında en üst düzeyine çıkmıştır. Toplum bilincinde meydana gelen bu değişimler ile devletin vermekte olduğu hizmetlerin kapsam ve kalitesi de artmakta, buna paralel olarak gıda sektöründe; organik üretim, iyi tarım ve iyi hijyen uygulamaları yaygınlaşmakta ve bu şekilde üretilmiş ürünlere talep artmaktadır.

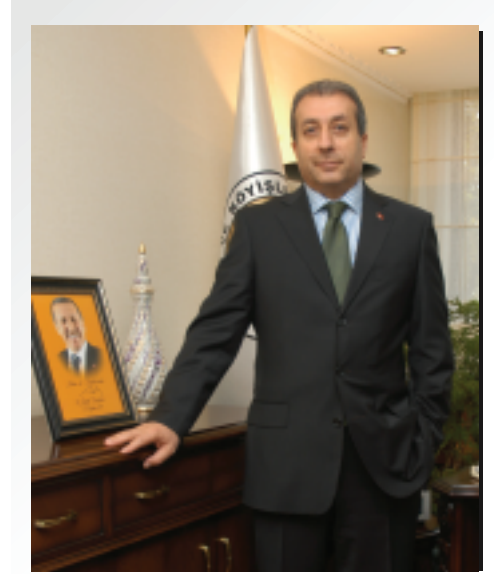
“Çiftlikten Sofraya Gıda Güvenilirliği” kapsamında en önemli işlev Tarım ve Köyişleri Bakanlığımıza aittir. Bunu sağlamanın yolu ülke dinamiklerimize uygun ve Avrupa Birliği mevzuatı ile uyumlaştırılabilir denetleme hizmetlerini etkin biçimde sağlamaktan geçmektedir. Bu kapsamda 13 Haziran 2010 tarihinde yürürlüğe giren 5996 sayılı “Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu” gıda denetimine ve halk sağlığı alanındaki çalışmalara verilen önemi açıkça ortaya koymaktadır. Bakanlığımız, bu kanunun icrasında, otuz dokuz il kontrol laboratuvarı, bir gıda araştırma enstitüsü, ülke laboratuvarlarının koordinasyonunu ve uluslararası seviyede temsilciliğini sağlamakta olan Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı ile gıda kontrol hizmetlerinde bilimsel ve etkin çalışmalarını sürdürmektedir. Hedefimiz halk sağlığını korumak, üretim kalitesini yükselterek ihracat kapasitesini arttırmak ve ekonomik katma değer sağlamaktır.

Türkiye, Asya ve Avrupa arasında köprü oluşturmalarının ötesinde, Akdeniz ve Karadeniz kıyılarının en bereketli topraklarına sahip olup, küresel pazarda seçkin bir yere sahiptir. Bu pazarın küresel, ulusal ve kanuni dengelerine bakıldığında, organik ürünler ve iyi üretim uygulamaları ile yetiştirilmiş veya imal edilmiş ürünler piyasada belirgin bir önem arz etmektedir. Bu kapsamda Türkiye, güncel üretim bilgileri ve ileri teknolojik yaklaşımı ile gıda piyasasında seçkin bir noktaya doğru emin adımlarla ilerlemektedir.

Günümüz dünya gıda piyasasında en etkin pazar payına sahip ülkelerin ürünlerinde bile belirgin fiziksel, kimyasal ve biyolojik tehlikeler bulunmaktadır. İlgili üretici ülkeler bu tehlikeleri bertaraf etmekten, izleyerek ortaya koymayı ve buna ait kaynağın ortadan kaldırılması eğilimi ile güvenilir gıda sağlamayı hedeflemektedir. Ülkemiz, benzer şekilde, bakanlığımıza ait laboratuvarları, kontrol mekanizması ve kanuni düzenlemeleri ile riskleri azaltmayı hedeflemiş ve bu kapsamda yapılacak tüm çalışmaları desteklemeyi ödev edinmiştir. Bu durum, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı’nın dinamik ve güncel yapısı ile etkin olarak sağlanmaktadır.

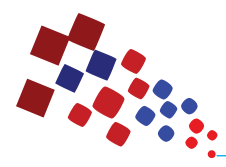
Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı, Avrupa Birliği EC 882/2004 direktifi kapsamında görev yapan Avrupa Birliği ülkelerinin ulusal gıda referans laboratuvarları ile donanım, personel ve bilgi olarak eşdeğer bir laboratuvardır. Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı 14 Ocak 2009 tarihinde yayınlanan yönetmelikle üzerine düşen görevleri Bakanlığımızın kurumsal kimliğine yakışır şekilde yerine getirecektir.

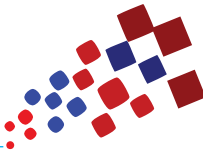
Laboratuvarımızın hem bu görevlerden ortaya çıkacak bilgileri hem de diğer araştırmacıların değerli bilgilerini Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Dergisi’nde önce ülkesel çapta daha sonra uluslararası platformda paylaşımına sunacağından şüphemiz yoktur. Bilgi paylaşımı kapsamında yayın hayatına yeni başlayan Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Dergisi’nin hayırlı olmasını dilerim.



Dr. M. Mehdi EKER

Tarım ve Köyişleri Bakanı





Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü'ne bağlı olarak Ulusal Gıda Referans Laboratuvarının kurulmuş olması Türkiye'nin halk sağlığı ve gıda güvenliği konusuna verdiği önemi göstermektedir. Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı'nın kurulmasına kadar ülkemizde mevcut İl Kontrol Laboratuvarları ve özel laboratuvarlar gıda kontrol görevini yerine getirmekteydiler ve halen bu göreve devam etmektedirler.

Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı'na kamu ve özel gıda laboratuvarlarının bilimsel olarak uyumlaştırılması aşamasında bir orkestra şefinin üstlendiği orkestra üyelerinin ahenkli çalışmasını sağlama görevini yerine getirmesi ön görülmüştür.

Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı tüm gıda laboratuvarlarına öncülük etmenin ötesinde Avrupa Birliği tarafından Birlik Referans Laboratuvarlarında uygulanan analiz yöntemlerini ülkemizde geçerli kılmak ve yaygınlaştırmak ile yükümlüdür. Bu kapsamda yapılan çalışmalar Türkiye'nin gıda alanında Avrupa Birliği'nde ciddiyetle var olduğunu göstermeye yöneliktir.

Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı, özgün mimarisi, bir yeni doğan ünitesinin temizliğine haiz laboratuvar koşulları, seçkin alt yapısı, güncel cihazları ve yetkin personeli ile adını kısa zamanda ülkemizde duyurmuştur. Hiç şüphesiz ki bu adı önce Avrupa daha sonra tüm Dünya'da daha sık duyacağız. Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü olarak Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı'nın tüm Gıda Kontrol Laboratuvarlarımıza lokomotif görevini kendisine yakışır şekilde yerine getireceğine dair güvenimiz tamdır.

Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı kurulmasının üstünden kısa bir zaman geçmesine rağmen her gıda krizinde çözüm bularak adından söz ettirmeyi başarmıştır. Öncelikle GDO analizlerinde yetkilendirilen dört laboratuvardan biri olarak çalışmaya başlamışken, hâlihazırda ihracat konusu olan yarı kuru ve kuru domateslerde mikrobiyoloji laboratuvarında geliştirilen yöntem ile Hepatitis A Virüsü tespiti analizi yaparak, ülkemizde bu hizmeti vermeye yetkin tek laboratuvardır.

Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Müdürlüğü bünyesinde yayın hayatına başlayan Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Dergisi'nin yukarıda anlatılan kalite ve güvenilirlik konusundaki temel hedeflerinin bilimsel alanda da seçkin bir yer alacağından eminiz. Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Dergisi'ne yayın hayatında başarılar dilerim.



Doç. Dr. Muzaffer AYDEMİR

*T.C. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı
Koruma ve Kontrol Genel Müdürü*



İnsanoğlunun da diğer tüm canlılar gibi hayatını devam ettirebilmek için beslenmeye, dolayısı ile gıda tüketimine ihtiyacı vardır. Bu ihtiyacın karşılanması için ilk şartı da güvenilir ve sağlıklı gıdaya erişimdir. Güvenilir ve sağlıklı gıda ise tarladan sofraya veya çiftlikten çatala diye açıklanan süreç içerisinde yeterli ve doğru bilgilendirme, üretim, denetim, kontrol ve izleme çalışmalarının gerçekleştirilmesi ve devamlılığının sağlanmasıdır.

Sağlıklı ve güvenilir gıdaya ulaşmada en önemli unsurlardan biri gıda analiz faaliyetleri ve laboratuvar hizmetleridir. Ü-

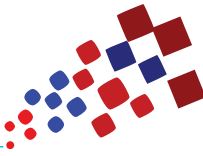
kemizde gıda, yem ve gıda ile temas eden madde ve malzeme analizlerinin hijyen, kalite ve güvenilirlik yönünden incelenmesi amacıyla ülke geneline yayılmış 40 gıda laboratuvarı mevcut olup bu laboratuvarlarımızda 2009 yılında 164.667 numunede fiziksel, kimyasal, mikrobiyolojik, katkı, pestisit, toksin vb. 1.646.672 analiz yapılmıştır. Ayrıca ülke genelinde kanatlı eti, su ürünleri, süt ve balda kalıntı izleme planı kapsamında 4326 numunede 5541 analiz yapılmıştır. Bu laboratuvarlarımızdan 22 tanesi değişik konu ve parametrelerde akredite olmuş olup son zamanlarda gündeme gelen GDO analizi kapsamında da 6 laboratuvarımız faaliyetlerine devam etmektedir.

Bu laboratuvarlarımızdan ayrı olarak gıda alanında referans laboratuvar ihtiyacını karşılamak, yapılamayan analizleri yapmak, yeterlilik testleri düzenlemek, eğitim ve danışmanlık hizmetleri vermek, analiz metodları geliştirmek, metod birlikteliği sağlamak, uluslararası düzeyde ülkemizi temsil etmek üzere çalışmalar yapacak olan Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı (UGRL) da 24 Kasım 2009 tarihinde proje bitimini takiben faaliyetlerine başlayarak ülke ihtiyaçları doğrultusunda hizmet verme heyecanına kavuşmuştur.

UGRL bünyesinde gıda alanında yapılan ve yapılacak olan araştırma ve çalışmaların paylaşılması amacıyla yayın hayatına başlayan ve UGRL' nın dışı açılan penceresi olacak " Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Dergisi" ne hem ulusal hem de uluslararası düzeyde kalite, doğruluk ve güvenilirlik ilkeleri doğrultusunda hizmet vermesi ve bilimsel araştırmalara öncülük edebilecek, ışık tutacak seçkin bir yer alması temennisiyle başarılar dilerim.

Dr. Ali TORUN

*T.C. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı
Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü
Halk Sağlığı Hizmetleri Daire Başkanı*



Ülkemiz gıda laboratuvarlarının yaşam için ihtiyaç duyulan tüm gıdaların temini ve üretimi noktasında hızla gelişen gıda sektörüne ayak uydurması ve bunun dahilinde de halkımıza güvenilir gıda arzında kontrol ve denetim hizmetlerinin aksatılmadan yürütülmesini sağlaması gerekmektedir.

Onlarca kamu ve özel gıda kontrol laboratuvarlarımız halen bu amaca yönelik hizmet vermeye tüm gayretleriyle devam etmektedir. Ancak bu hizmetlerin verilmesinde orkestranın her bir çalgısını oluşturan laboratuvarlarımızın aynı notayı basması ve ahengi sağlaması için bir şefe ihtiyaçları vardı. Bu sebeple şeflik görevini layıkıyla yapacak ve yapacağı çalışmalar ve hizmetlerle sadece ülkemiz de değil Dünya genelinde güneş gibi ışık olacak bir laboratuvar “Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı” mız kurulmuştur.

Ulusal Gıda Referans Laboratuvarımıza bu amaçla yapacağı kalite ve güvenilirlik adına bilimsel çalışmalarında ve başlattığı yayın hayatında başarılar dilerim.



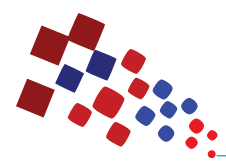
Hüseyin ARAP

T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı

Koruma ve Kontrol Genel Md.

Halk Sağlığı Hizmetleri Daire Başkanlığı

Laboratuvarlar Şb. Md.



14 Ocak 2009 tarih ve 27110 sayılı resmi gazetede yer alan Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı'nın (UGRL) kuruluş ve görev esaslarına dair yönetmeliğin yayınlanması ile kuruluş çalışmalarımız başlamıştır. Laboratuvarımızda çalışmak üzere seçilen ve laboratuvarımızın çekirdeğini oluşturan uzman ekip 2008 yılında ilk eğitim çalışmalarını tamamlamış,

2009 yılı nisan ayından itibaren de müdürlüğümüze atanmışlardır. Bu tarihten itibaren zorlu bir çalışma sürecine girilmiş ancak kısa sürede gerekli donanım sağlanarak çalışmalara başlanmıştır.

Laboratuvarımız; Biyolog, mühendis, veteriner hekim, kimyager gibi farklı meslek mensuplarından oluşan 40 kişilik seçkin bir kadroya sahiptir ve her gün yeni katılımlarla genişlemektedir. Multidisipliner çalışmanın gerekliliğine ve bilgiyi paylaşmanın önemine inan personelimiz, yayımladığımız bu dergi ile aynı platformda çalışan tüm bilim insanlarına ulaşmayı ve yaptığımız çalışmaları paylaşmayı hedeflemektedir.

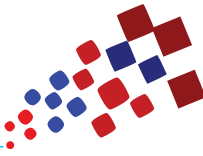
UGRL Avrupa Birliği'nin (AB) EC/882/2004 sayılı direktifinde yer alan görevlerinin yanı sıra bir araştırma laboratuvarı olarak gıda sanayi, üniversiteler, TÜBİTAK gibi kurum ve kuruluşlarla işbirliği halinde çalışmalarını yürütmektedir. Kuruluşumuzdan bu güne kadar geçen kısa süre zarfında ülkesel katılımlı 15 adet eğitim/çalıştay gerçekleştirmiştir. GDO krizinde analiz yapabilen ilk laboratuvarlar arasında yer almış, ülkemizin kuru domates ihracatında probleme yol açan Hepatit A konusunda aktif çalışarak yöntem geliştirmiş ve oluşan problemi çözmüştür.

UGRL, İtalya yönetiminde 16 ülke ile ortak AB 7. Çerçeve projesi başvurusunda bulunmuş, FAO'ya sunduğu Türkiye'nin ilk ulusal gıda projesi kabul edilmiştir. DPT, TÜBİTAK gibi birçok kuruma proje önerisinde bulunarak faaliyetlerini yürütmektedir. Bu kapsamda laboratuvarımız ülkemizde AB standartlarına uygun bir şekilde gıda kontrol hizmetlerinin yürütülmesinin sağlamak üzere köklü bir laboratuvar alt yapısı oluşturarak, deneyimli laboratuvarların tecrübelerinden faydalanarak, tüm laboratuvarlarımızın aynı bilimsellikte koordineli bir şekilde çalışmasını sağlayacaktır.

İlk sayısını okumakta olduğunuz "UGRL Dergisi" bu bakış açısı ve hevesle alanında saygın dergilerden biri olmaya adaydır. UGRL yönetimi adına dergide emeği geçen herkese teşekkür eder, başarılar dilerim.

Dr. Berrin ŞENÖZ

*T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı
Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Müdürü*



Hoşgeldiniz

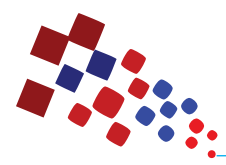


Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı adının bize yüklediği görev sorumluluğu bilinci ile çıktığımız bu yolda siz değerli bilim insanlarının katkıları ile gıda bilimi alanında bu günden yarına çoğalarak ve bilimsel birikimimiz artarak ilerleyeceğimiz düşünce ve inancı ile hoşgeldiniz.

Mustafa Kemal Atatürk' ün 'Hayatta en hakiki mürşit ilimdir, fendir' sözünü kendilerine ilke edinen UGRL çalışanlarının emekleri ile yayın hayatına ilk adımını atarken sizlerin üretici güçlerinizin ürünlerinin birbirimize aktarılmasında çok önemli rol oynayacağına inandığımız dergimizin uzun soluklu olması dileği ile yüreğinizden çocuk sevinci, düşüncelerinizden bilimin gerçekçiliği eksik olmasın.

Dr. E.Nazan AKÇELİK

UGRL Dergisi Yazı İşleri Müdürü



Editor Kurulundan

Küresel açlık indeksinde en büyük iyileştirmeyi yaptığı vurgulanan Türkiye aynı zamanda dünya gıda üretiminde ilk sıralarda yer alan ve bu alanda hem yeniliklere açık hem de uygulamalarda Ortadoğu ve Batı Asya'nın öncüsü olarak anılmaktadır. Türkiye Avrupa Birliği ile uyum sürecini hızlandırmıştır. Bu kapsamda Avrupa Birliği ile uyum süreci içerisinde en sıkıntılı başlıklardan

biri olan "Gıda Güvenliği" konusunda uyum çalışmaları devam etmektedir. Türkiye, bütün bu iyileştirme çalışmalarının bir çıktısı olarak, gıda üretiminde entegrasyona hızlı geçişi sağlamasının ötesinde gıda kontrolü ve güvenliği konusunda da gereken adımları atmaya başlamıştır. Bu çalışmaların ilk olgunlaşan meyvesi Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı'dır (UGRL).

UGRL gıda kontrolünün yaygın ve etkin olarak Avrupa Birliği tarafından bildirilen standarda ulaştırılmasında görevlendirilmiş ve kanunen yetkilendirilmiştir. UGRL, kuruluş kanunu ve yönetmeliğinden aldığı güçle sadece gıdaların güvenliğinin saptanmasında değil ayrıca tüm ülkede yaygın, etkin ve bir örnek analizlerin yapılmasının da güvencesidir. UGRL'nin kuruluşu Türkiye'de gıda güvenli yolunun önemli kilometre taşlarından biridir.

Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Dergisi elinize ulaşan bu ilk sayısında, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanı Dr. M. Mehdi EKER, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın idarecileri tarafından hazırlanmış değerli derlemeleri içermektedir. Aynı zamanda bu sayı içerisinde UGRL uzmanları tarafından kaleme alınmış gıda güvenliği ve kontrolü alanında öncelikli konulara ait derlemeler de yer almıştır.

Yayın hayatına yeni başlayan UGRL Dergisi'nin hakem kurulu ve danışmanları gıda alanında saygın ve seçkin akademisyenler, gıda analizi konusunda engin tecrübeleri olan araştırmacılar arasından seçilmiştir. Dergi ilk iki sayısında Türkçe yayınlanacak olup daha sonra ki sayılarda Türkçe ve İngilizce metinleri bir arada bulabileceğiniz referans bir kaynak olacaktır.

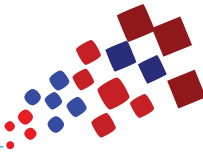
UGRL Dergisi'nin yayın hayatına başlamasında büyük desteğini esirgemeyen; UGRL Yönetimi ve değerli personeline destekleri ve emekleri için teşekkür ederiz. Dergimizin hazırlanması, basımı ve dağıtımında T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın köklü kimliğini her türlü yayın platformunda en başarılı şekilde temsil eden Yayın Dairesi Başkanlığı'na teşekkürü bir borç biliriz.

Dr. Aslı KORKMAZ

Dr. Ahmet KOLUMAN

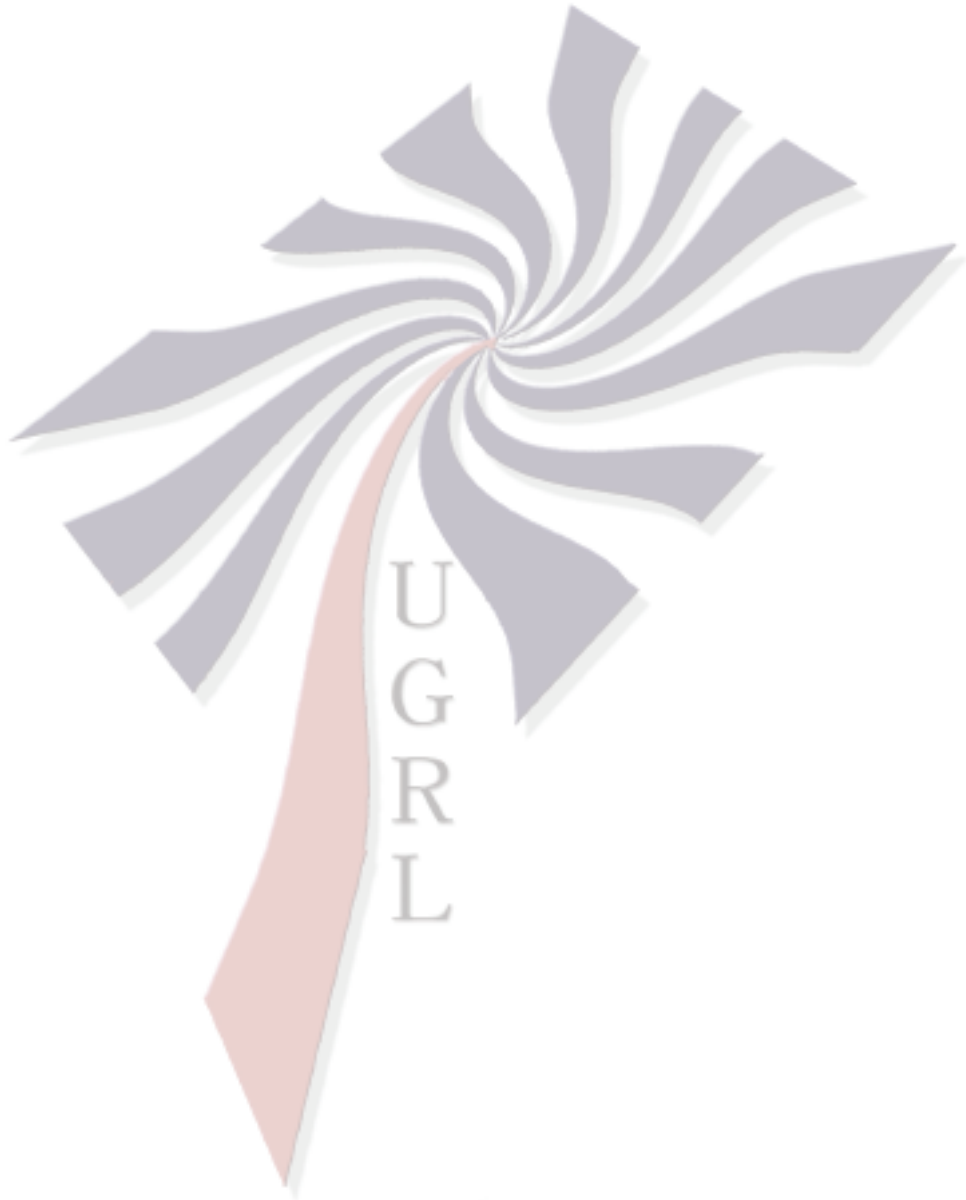
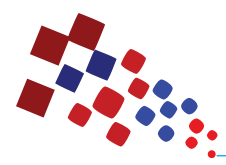
Gıda Yük. Müh. R. Kürşat AKTAŞ

UGRL Dergisi Editör Kurulu



İçindekiler

Tek Tüpte Mikrobiyolojik Tanı	
<i>Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)</i>	13
Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar ve Analiz Yöntemleri	
<i>Genetically Modified Organism And Analysis Methods</i>	21
Gıdalarda Katkı, Tağşiş ve Orijin Belirleme	
<i>Determination Of Additives, Adulteration And Origin In Foodstuffs</i>	31
Pestisit Analizlerine Genel Bakış	
<i>General Prospect To Pesticide Analysis</i>	37
Mikotoksinler ve Toksik Etki Mekanizmaları	
<i>Mycotoxins And Their Mechanism Of Toxicity</i>	43
Dioksinler ve Gıdalarda Yarattığı Risk	
<i>Dioxins And Risk In Foodstuffs</i>	51
Bitkisel Besin Desteklerinde Sildenafil ve Yeni Analoglarının Tespiti	
<i>Determination Of Sildenafil And Novel Analogues In Herbal Dietary Supplements</i>	55
Gıda İle Temas Eden Ambalaj Malzemelerinde Bisfenol A	
<i>Bisphenol A In Packaging Materials In Contact With Food</i>	61
Mineral Mikro Besin Öğelerinin Metabolizma Üzerine Etkileri	
<i>The Effects of Mineral Micro Nutritional Components On Metabolism</i>	67
Poliklorlu Bifenillerin Sucul Sistemler Üzerine Toksisitesi	
<i>Toxicity Of Polychlorinated Biphenyls On Aquatic Systems</i>	77
Yazarlar için Yazım Kılavuzu	83





Tek Tüpte Mikrobiyolojik Tanı

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Atanur TEZEL *

Zeynep T. BURKAN

Dr. Sibel ÖZKÖK

Dr. E. Nazan AKÇELİK

*Ulusal Gıda Referans Müdürlüğü
Mikrobiyoloji Laboratuvarı*

Dr. H. Duygu ÇALIM

Dr. Ahmet KOLUMAN

ÖZET

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) hedef bölgenin hızlı, yüksek sensitivite, spesifite ve etkinlikte çoğaltılmasına olanak veren moleküler bir yöntemdir. Yeni bir yöntem olmasına rağmen mevcut yayın sayısı, birçok uygulama alanı olduğuna ve mikrobiyolojik analizlerde kayda değer biçimde tercih edildiğine işaret etmektedir. Yöntem, uygulama kolaylığı, çoğaltma ve görüntüleme aşamalarında pahalı alet/ekipmana gereksinim duymaması ve ekonomik olması nedeniyle özellikle gelişmekte olan ülkelerde ve saha şartlarında kullanım alanı bulmuştur. Bu derlemede yöntemin prensibi, uygulanışı, bazı moleküler yöntemlere karşı avantaj ve dezavantajları tartışılmıştır. Ayrıca ilgili yöntemin mikrobiyolojide bazı patojenler için tespit limitleri ve reaksiyon süresi incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), Nükleik asit amplifikasyon, hızlı tespit

ABSTRACT

Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) is a molecular method that helps to amplify target region with high sensitivity, specificity and efficiency. Even it is a new method; high numbers of reports indicate a lot of application and significant preference in microbiological analysis. The method has had area of usage in developing countries and field applications with its easiness, economical aspects, with excluding expensive devices both in amplification and visualization steps. This review underlines principal of the method, application, advantages and disadvantages of the method comparison with some molecular methods. This review also includes detection limits and reaction time of LAMP for some pathogens.

Keywords: Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), nucleic acid amplification, rapid detection

GİRİŞ

Mikroorganizmaların tespitinde özellikle rutin gıda analizleri için, uluslararası standart yöntem olarak kabul edilen konvansiyonel kültür teknikleri kullanılmaktadır. Konvansiyonel kültür teknikleri gıda analizlerinde uluslararası standart yöntem olarak kabul edilmelerinin ötesinde canlılığın ve antibiyotik direncinin değerlendirilmesi gibi konularda sağladığı bilgiler ve elde edilen suşların saklanabilmesi gibi avantajları nedeniyle, geliştirilmiş birçok yeni yöntemle rağmen, önemini hala korumaktadır (Poxton 2005). Bununla birlikte resmi olarak mikrobiyolojik analizlerde zorunlu olmasına rağmen konvansiyonel kültür yöntemlerinde analiz süresinin uzunluğu, istenilen sensitivitenin bazı durumlarda sağlanamaması ve bazı mikroorganizmaların yavaş gelişmeleri veya izolasyonlarının yapılamaması gibi nedenlerle son yıllarda birçok moleküler yöntem geliştirilmiş ve rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır.

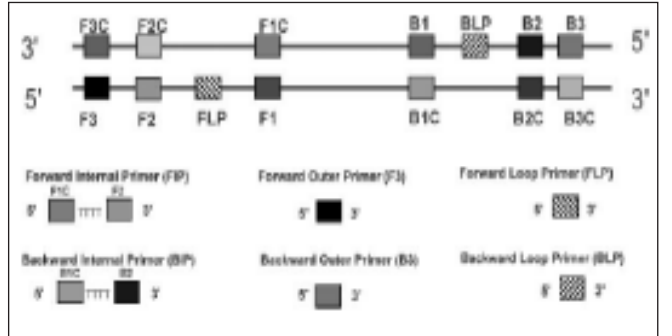
Moleküler yöntemler içinde, nükleik asitlerin patojenler için özgün bölgelerinin in vitro amplifikasyonu prensibine dayanan yöntemler daha avantajlı durumdadır. Bu yöntemlerde, varolan az miktardaki nükleik asitlerin çoğaltılması sağlanarak testin hassasiyeti artırılmıştır. Bu yöntemler arasında Polimerase Chain Reaction (PCR), Ligase Chain Reaction (LCR), Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA), Transcription-Mediated Amplification (TMA) ve Strand Displacement Amplification (SDA) için ticari kitler mevcut olup bazı ülkelerde yetkili otorite tarafından onaylanarak rutin kullanıma girmiştir (Versalovic ve Lupski 2002). Yukarıda adı geçen yöntemlerden en çok tercih edileni PCR dir.

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), Notomi ve ark. (2000) tarafından geliştirilen alternatif bir nükleik asit amplifikasyon yöntemidir. Reaksiyon, hedef bölgeye özgü 2 adet forward ve 2 adet backward primer kullanılarak izotermal şartlarda (60-65 oC) gerçekleştirilir. Kullanılan enzim *Bacillus stearothermophilus*'tan elde edilen ve strand displacement (zincir yer değiştirme) özelliği olan fakat ekzonükleaz aktivitesi olmayan Bst DNA polimerazdır. Nagamine ve ark. (2002) tarafından, bu primerlere ilave olarak 2 adet loop primeri kullanıldığında reaksiyon süresinin kısaldığı ve hassasiyetinin arttığı bildirilmiştir. Bu şekilde kullanıldığında toplam 6 adet primer kombine olarak hedef DNA'da 8 spesifik bölgeye bağlanmakta ve reaksiyonun spesifitesi artmaktadır. Ayrıca aynı reaksiyon tüpünde reverse transcriptase enzimi kullanılarak RNA'dan DNA sentezlenmek ve takiben amplifikasyonu yapılmak suretiyle yöntem RNA amplifikasyonu için-

de kullanılabilir (Reverse Transcription LAMP-RT LAMP) (Mori ve Notomi 2009). LAMP reaksiyonu sonucu bir saatten daha az bir sürede 500 µg/ml.den daha fazla miktarda DNA ürünü elde edilebilmektedir (Nagamine ve ark. 2002). Yöntem, hızlı, ucuz ve doğruluk oranı yüksek olduğundan ilk bildirildiği 2000 yılından itibaren araştırmacıların ilgisini çekmiş ve konuyla ilgili ikiye yakın uluslararası araştırma yayınlanmıştır. LAMP yöntemi esas alınarak *Salmonella*, Verotoksijenik *Escherichia coli* (VTEC), *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli*, Norovirus ve diğer bazı patojenler için ticari kitler üretilmiş olup bunların bazılarının Japonya'da rutin identifikasyon ve izleme programlarında kullanımı resmi olarak onaylanmıştır (Mori ve Notomi 2009).

Prensip

LAMP, nükleik asitlerin amplifikasyonunu izotermal şartlarda gerçekleştirmek üzere tasarlanmıştır. Bu nedenle PCR esnasında gerekli olan çift iplikçikli DNA'nın denaturasyonu aşamasına ihtiyaç duyulmamaktadır. Bu, reaksiyon sırasında primer bağlanması için sürekli tek iplikçikli bir bölgenin sağlanması ile mümkün olmaktadır. Hedef bölge ve primer seçimi şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. LAMP reaksiyonu için hedef bölgeden seçilen primerlerin yerleşimi (Parida ve ark. 2008)

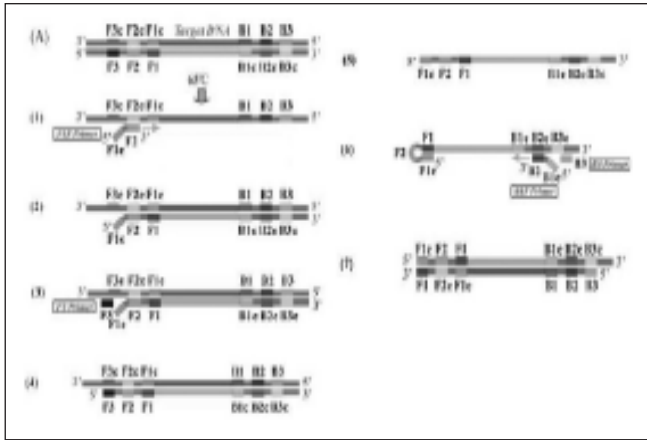
LAMP reaksiyonu üç aşamadan oluşan bir reaksiyondur. İlgili aşamalar aşağıda verilmiştir.

1- Döngüsel Amplifikasyon için başlangıç materyalinin oluşması

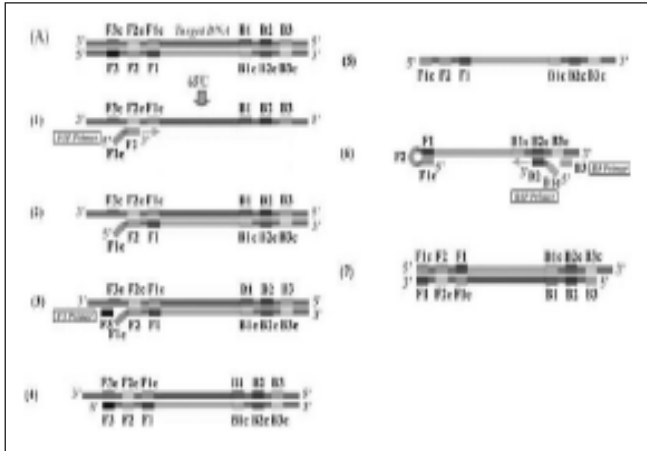
Bu aşamanın amacı döngüsel amplifikasyon için başlangıç ürünü olan 5' ve 3' uçlarında birer adet tek iplikçikli DNA ilmiği (loop) bulunan ürünün sentezlenmesidir. Nagamine ve ark.(2001) LAMP reaksiyonunun başlaması için denature DNA'ya gerek olmadığını bildirmişlerdir. Çift iplikçikli DNA yaklaşık 65oC'de dinamik dengede olduğundan primerlerden biri hedefine bağlanarak reaksiyonu başlatır. Forward Inner Primerin (FIP) F2 birimi, tamamlayıcı bölgesi olan F2c'ye bağla-



narak yeni zincirin 5' ucundan 3' ucuna doğru sentezlenmesini sağlar. Aynı anda inner (iç) primerden birkaç baz kısa ve düşük konsantrasyonda olan Forward Outer Primer (F3) hedef bölgesine daha yavaş bir şekilde bağlanır. Bu şekilde yeni bir zincir sentezlenmeye başlar. Bst DNA polimerazın zincir yer değiştirme özelliği olduğundan yeni zincir sentezlenirken mevcut çift iplikçikli zincir tek iplikçikli hale getirilmiş olur. Bu tek iplikçikli zincir kalıp olarak kullanılarak aynı işlem 3' ucunda Backward Inner Primer (BIP) ve Backward Outer Primer (B3) tarafından gerçekleştirilerek şekil 2 deki reaksiyonlar sonucunda şekil 3 deki döngüsel amplifikasyon için başlangıç materyali oluşur.



Şekil 2. Başlangıç materyalinin oluşması (Anon. 2010a)

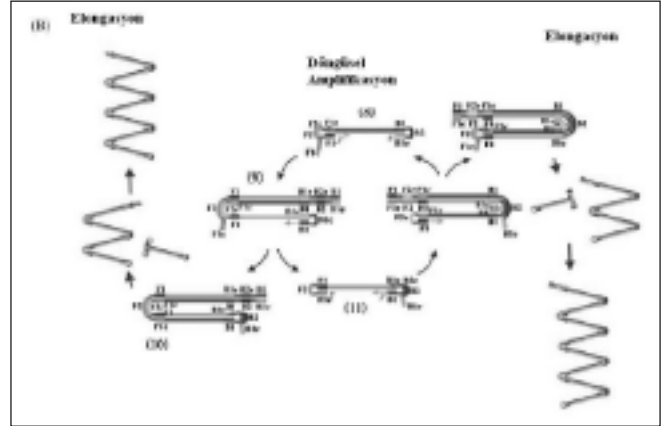


Şekil 3. Döngüsel amplifikasyon için başlangıç materyali (Anon. 2010a)

2- Döngüsel Amplifikasyon

Bu aşamadan sonra Loop primerleri (FLP ve BLP), FIP ve BIP hedeflerine bağlanarak yeni zincirlerin sentezini başlatırlar. Döngüsel amplifikasyon F2'nin F2c'ye bağlanması ile başlar. Döngüsel amplifikasyon, başlan-

gıç ürününün internal primerlerle logaritmik olarak çoğaltılmasına olanak verir. Döngüsel amplifikasyonun esas şekli 4 teki 8 ve 11 nolu ürünler arasındaki sürekli döngü ile başlangıç materyali ve bu materyalin ters tekrarının devamlı bir şekilde üretilmesidir. Bu döngü sırasında açığa çıkan ara ürünler takip eden elongasyon aşaması için gereklidir.



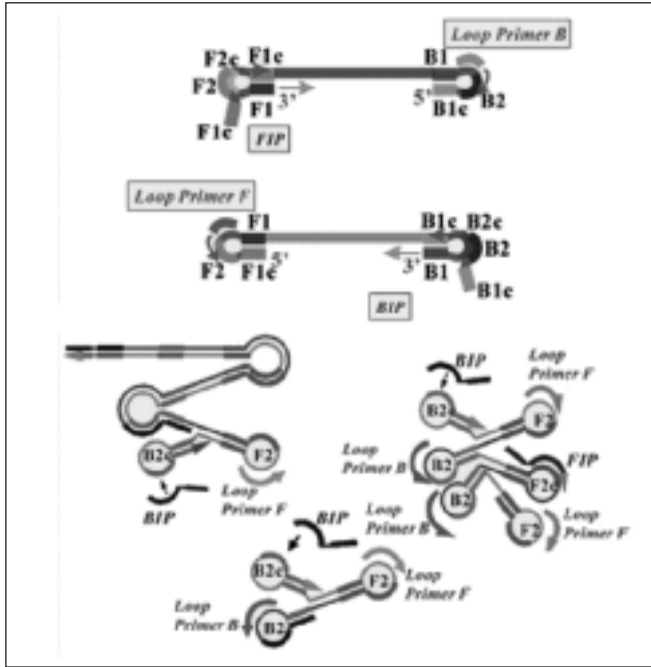
Şekil 4. Döngüsel amplifikasyon ve Elongasyon (Anon. 2010a)

3- Elongasyon

Elongasyon için başlangıç materyali döngüsel amplifikasyonun ara ürünlerine FIP ve BIP lerin bağlanmasıyla oluşur (Şekil 4). Bunu takiben ilgili primerlerin tek iplikçikli ilmi bölgesine bağlanmasıyla yeni zincirler sentezlenirken mevcut çift iplikçikli zincirler açılarak reaksiyonun devamını sağlar.

LAMP reaksiyonu sonunda oluşan ürünler, aynı zincirdeki hedef bölgenin dönüşümlü olarak üretilen ters tekrarlarına internal primerlerin bağlanmasıyla oluşan, değişik büyüklüklerdeki ilmi DNA bölgesi karışımı ile birlikte hedef bölge ve bunun çok sayıda ters tekrarını içeren karnabahar benzeri yapılardır (Şekil 4). İlgili döngünün animasyonunun araştırmacı tarafından izlenmesi reaksiyon prensibinin netleşmesinde yardımcı olacaktır (Anon. 2010b).

LAMP reaksiyonunun etkinliği Nagamine ve ark. (2002) bildirdiği gibi loop primerleri kullanılarak artırılabilir ve reaksiyon süresi kısaltılabilir. Buradaki temel prensip kullanılan primerlerin her birinin DNA sentezi için başlangıç noktası olarak görev yapması ve orijinal reaksiyonda oluşmayan bazı ilave yapıların oluşmasıdır. Loop primerleri kullanıldığında reaksiyon süresinin normal sürenin üçte birinden yarısına kadar değişkenlik gösterdiği ve reaksiyonun ortalama 30 dakikada tamamlanabileceği gösterilmiştir. Şekil 5'te FIP ve BIP'e ilave olarak 2 adet loop primeri kullanıldığında reaksiyonun nasıl devam edeceği gösterilmiştir.



Şekil 5. Loop primerleri kullanıldığında reaksiyonda oluşan ürünler (Anon. 2010c)

Uygulama Protokolü

LAMP reaksiyonu genellikle 2X reaksiyon karışımının içinde (20 mM TrisHCl pH 8.8, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 8 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 1.4 mM dNTP karışımı, 0.8 M betaine, %0.1 Tween 20, 8 ünite Bst DNA polimeraz) FIP ve BIP primerlerinin her birinden 50 pmol, F3 ve B3 dış primerlerinin her birinden 5 pmol, FLP ve BLP loop primerlerinin her birinden 25 pmol ve 2 µl template ile birlikte toplam 25 µl hacimde gerçekleştirilir. Her reaksiyonda uygun pozitif ve negatif kontroller kullanılmalıdır. LAMP reaksiyonu için optimum ısı derecesi Bst DNA polimeraz için en uygun ısı olan 60-65°C dir. RT-LAMP için karışıma reverse transkriptase eklenmesi gerekmektedir (Parida ve ark. 2008). Reaksiyon süresi 12-90 dk. arasında değişmektedir (Tablo 1, en sonda gösterilmiştir). Reaksiyon sonunda oluşan ürünün belirlenmesi ve doğrulanması çeşitli yöntemlerle yapılabilmektedir. Bu yöntemler aşağıda verilmiştir.

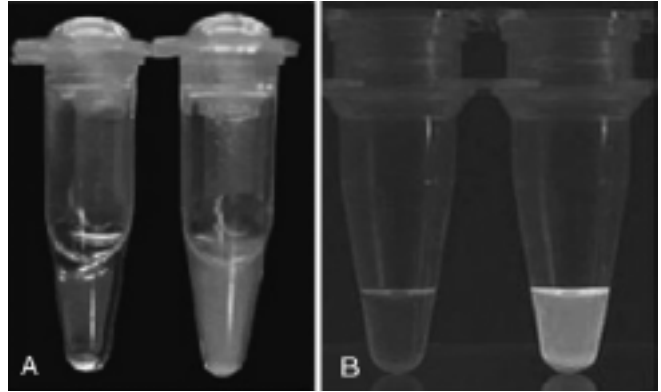
1- Görsel belirleme

a) Bulanıklığın gözlenmesi : LAMP reaksiyonu sonucunda kısa sürede fazla miktarda oluşan son ürün (> 500 µg/ml) bol miktarda pirofosfat iyonu (1. denklem) oluşmasına neden olur. Pirofosfat iyonlarının magnezyum (Mg²⁺) ile birleşmesiyle oluşan magnezyum pirofosfatın (2. denklem) reaksiyon tüpünde yaptığı bulanıklık, herhangi bir alet/ekipman kullanmadan makroskobik olarak pozitif ve negatif reaksiyonun belirlenme-

sine izin verir (şekil 6). Bulanıklığın oluşmasında etkili kimyasal reaksiyona ait denklem aşağıdadır (Mori ve ark. 2001).



b) Floresan ışımının gözlenmesi: Oluşan ürün, çift iplikçikli nükleik asitlere doğrudan bağlanan floresan boyalar yardımıyla (EtBr, SYBR Green I, Picogreen gibi) veya Tomita ve ark. (2008) tarafından bildirildiği gibi calcein kullanılarak belirlenebilmektedir. Calcein kullanıldığında reaksiyonun başlangıcında manganez (Mn²⁺) iyonları calceine bağlanarak floresan ışımını engeller. eaksiyonun sonunda üretilen bol miktardaki pirofosfat iyonu manganez iyonları ile birleşerek calceininin serbest kalmasına ve floresan ışımaya neden olur (şekil 7). Bu ışım basit bir UV el lambası (366 nm) ile belirlenebilmektedir.



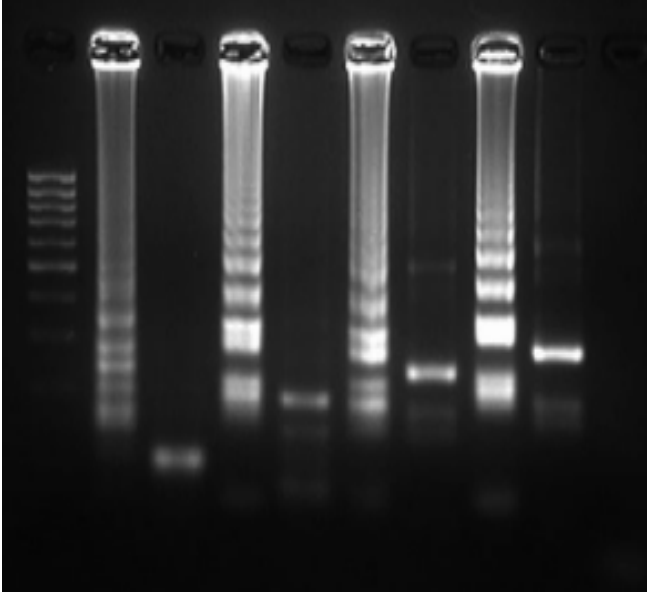
Şekil 6. Bulanıklığın gözle tespiti Şekil 7. Calcein kullanılarak tespit

2- Bulanıklığın gerçek zamanlı belirlenmesi :

Magnezyum pirofosfat iyonları nedeniyle oluşan bulanıklık spektrofotometrik yöntemle gerçek zamanlı olarak belirlenebilmektedir. Bunun için özel olarak tasarlanmış bir turbidimetre 400 nm'de her 6 saniyede bir optik dansiteyi ölçerek kayıt etmektedir. Bu sayede oluşan ürünün miktarını belirlemek gerçek zamanlı PCR'da olduğu gibi mümkün olmaktadır (Mori ve ark. 2004).

3- Agaroz Jel Analizi :

Son ürün yukarıda belirtilen yöntemlere ilave olarak agaroz jel elektroforezi ile ayrılabilen ve çift iplikçikli DNA ya bağlanan floresan boyalarla UV altında görüntülenebilmektedir. Ayrıca doğrulama için kesim enzimleri ile ürün kesilebilmekte ve özgün kesim ürünleri belirlenebilmektedir (Parida ve ark. 2004, Thai ve ark. 2004). Oluşan ürünün yapısından dolayı agaroz jelde merdiven benzeri yapı gözlenir (Şekil 8).



Şekil 8. Dengue virusunun DEN-1,2,3 ve 4 serotiplerinin LAMP reaksiyonu sonucu oluşan ürünleri ve bu ürünlerin BanII kesim enzimiyle kesildikten sonra oluşan parçalarının agaroz jeldeki fotoğrafı (Parida ve ark. 2005)

4- Ürünün sekans spesifik olarak belirlenmesi:

Mori ve ark. (2006) tarafından bildirildiği şekilde son ürün, düşük ağırlıklı polyethylenimine (PIE) ile kısa süreli santrifüj işlemi ile çöktürülerek ve ilimik bölgelerine özgün, floresan boyalarla işaretli probalar kullanılarak UV altında görüntülenebilmektedir.

LAMP yönteminin avantajları

1- Reaksiyon izotermal şartlarda gerçekleştiği için thermal cycler gibi özel ve pahalı aletler gerektirmemektedir. Bir su banyosu veya ısı bloğu ile izotermal amplifikasyon gerçekleştirilebileceğinden saha koşullarında kolaylıkla uygulanabilmektedir (Liu ve ark. 2009).

2- LAMP reaksiyonundan başka NASBA ve SDA gibi izotermal amplifikasyon yöntemleri olmasına rağmen her iki yöntem içinde birden fazla enzim ve oluşan ürünü görüntülemek için alet/ekipman gerekmektedir (Weusten ve ark. 2002, Barken ve ark. 2007). Ayrıca LAMP reaksiyonunun SDA'dan 50, NASBA'dan 10 kat daha hassas olduğu bildirilmiştir (Nagamine ve ark. 2002).

3- Hedef DNA'daki 8 bölgeyi tanıyan 6 primer kullanıldığı için LAMP reaksiyonunun spesifitesi yüksektir.

4- Ürünün tüpü açmadan gözle belirlenebilmesi nedeniyle PCR daki en önemli kontaminasyon kaynaklarından birisi olan PCR sonrası görüntüleme aşamasına gerek kalmamakta, böylece kontaminasyon riski azalmaktadır (Parida ve ark. 2008). Goto ve ark. (2009)

reaksiyon başında tüpe eklenen hydroxy naphthol blue ile oluşan ürünün 650 nm. dalga boyunda bir mikropolet okuyucuda belirlenebileceğini bildirmişlerdir. Bu şekilde hem kontaminasyon riskini minimuma indirmek hem de çok sayıda örneği aynı anda değerlendirmek mümkün olmaktadır.

5- Magnezyum pirofosfat iyonlarının çökmesi sonucu oluşan bulanıklık gerçek zamanlı olarak takip edilerek oluşan ürünün miktarı belirlenebilmektedir (Mori ve ark. 2004). Gerçek zamanlı PCR'da da oluşan ürün miktarı belirlenebilmesine rağmen pahalı alet ve ekipmana ihtiyaç duyulması nedeniyle, kaynakları sınırlı küçük laboratuvarlar ve saha koşulları için ekonomik olmamaktadır.

6- Reaksiyon, PCR ile karşılaştırıldığında ısı değişimlerine gerek duymaması nedeniyle çok daha hızlı olmaktadır (Tablo 1).

7- Tablo 1 de görüleceği gibi yapılan bazı çalışmalarda LAMP yönteminin tespit sınırı, Misawa ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışma istisna olarak, PCR'a eşit veya PCR'dan daha hassas olarak bildirilmiştir.

8- LAMP, PCR ile kıyaslandığında reaksiyonu inhibe edebilen biyolojik maddelerden (serum, plazma, idrar vs) daha az etkilenir. Bu yüzden ekstraksiyon aşaması yapılmadan reaksiyona başlanabileceğinden masraf ve zaman tasarrufu sağlanmış olur (Ohtsuka ve ark. 2005, Kaneko ve ark. 2007).

9- LAMP ucuz bir yöntemdir, reaksiyon başına maliyet bazı araştırmacılar tarafından 50 cent ile 5 USD arasında bildirilmiştir (Hill ve ark. 2008, Misawa ve ark. 2007). Test sonucunda elde edilen son ürünün görüntülenmesinde farklı yöntemler kullanılabilmesinin de ekonomik yönden etkisi belirgindir.

10- LAMP yöntemi kullanım kolaylığı ve hızlı olması nedeniyle çok sayıda örneğin kısa zamanda değerlendirilebilmesine olanak sağlamaktadır.

LAMP yönteminin dezavantajları :

1- LAMP için hedef bölgede 8 spesifik bölge gerektiğinden primer dizaynı PCR dan daha zordur. Ancak bu işlem için ücretsiz primer dizayn programları bulunmaktadır.

2- LAMP reaksiyonunun belirleme limiti düşük olduğundan örnek ve reaksiyon hazırlığı aşamalarında kontaminasyona duyarlıdır. Bunun için uygun deney kontrolleri tasarlanarak her reaksiyonda kullanılmalıdır.

Tablo 1. LAMP, PCR ve konvansiyonel kültür yöntemi karşılaştırması yapılmış bazı çalışmalardan örnekler

Çalışmalar	LAMP		PCR		Kaynaklar
	Tespit sınırı	Süre	Tespit sınırı	Süre	
Enterotoksijenik E.coli (LT1 geni için)	4 kob/test	12 dk	4x10 ¹ kob/test	3-4 s	Yano ve ark., (2007)
Enterotoksijenik E.coli (ST1 geni için)	4x10 ¹ kob/test	20 dk	4x10 ² kob/test	3-4 s	
E.coli O157	4.1x10 ² kob/ml	40 dk	4.1x10 ⁴ kob/ml	3 s	Wang ve ark., (2008)
VTEC O157, O26, O111	0.7-2.2 bakteri/test	60 dk	10-17 bakteri/test	3-4 s	Hara-Kudo ve ark., (2007)
Enterobacter sakazakii	1.2 kob/100g.	90 dk	1.3 kob/100g	4 s	Liu ve ark., (2009), Liu ve ark., (2006)
Campylobacter jejuni	7.9 kob/test	23.5-25.5 saat(1)	Sensitivite %98.5 ⁽²⁾	3-4 gün	Yamazaki ve ark., (2009)
Campylobacter coli	3.8 kob/test		Spesifite %97.4 ⁽²⁾		
Campylobacter jejuni	1.4 kob/test	60 dk	Sensitivite %81.3 ⁽²⁾	3-4 gün	Yamazaki ve ark., (2008a)
Campylobacter coli	1.2 kob/test	60 dk	Spesifite %96.6 ⁽²⁾		
Salmonella enteritidis	10 ³ kob/ml	30 dk	106 kob/ml	4 s	Okamura ve ark., (2008)
Salmonella subsp. enterica ve arizona	1.9-2.2 bakteri/test	60 dk	2.2-18.5 bakteri/test	4 s	Hara-Kudo ve ark., (2005)
Shigella ve Enteroinvaziv E.coli	8 kob/test	60 dk	8x10 ² kob/test	3 s	Song ve ark., (2005)
Metisiline dirençli Staphylococcus aureus	10 ² mecA kopyası	90 dk	10 mecA kopyası ⁽³⁾	2-3 s	Misawa ve ark., (2007)
Staphylococcus aureus (sed geni için)	38 bakteri/test	30 dk	3.8x10 ³ bakteri/test	4 s	Goto ve ark., (2007)
Vibrio parahaemolyticus	2 kob/test	13-22 dk	19.6 kob/test	4 s	Yamazaki ve ark., (2008b)
Yersinia enterocolitica	65 kob/ml	60 dk	65 kob/ml	3-4 s	Gao ve ark., (2009)
Norovirus Genogrup I	102 kopya/test ⁽⁴⁾	59 dk	103 kopya/test ⁽⁵⁾	3-4 s	Fukuda ve ark., (2006)
Norovirus Genogrup II	103 kopya/test ⁽⁴⁾	61 dk	104 kopya/test ⁽⁵⁾	3-4 s	
Canine parvovirus	10-1 TCID ₅₀ ⁽⁶⁾	60 dk	10 TCID ₅₀ ⁽⁶⁾	2-3 s	Cho ve ark., (2006)
Severe acute respiratory syndrome Coronavirus (SARS)	10-2 pfu ^(4,7)	60 dk	1 pfu ^(5,7)	3-4 s	Thai ve ark., (2004)
Dengue virus DEN-1 serotipi için	1 pfu ^(4,7)	30 dk	10 pfu ^(5,7)	3-4 s	Parida ve ark., (2005)
Dengue virus DEN-2,3 ve 4 serotipleri için	10-1 pfu ^(4,7)				
H5 avian influenza virus	10-2 pfu/test ^(4,7)	40 dk	1 pfu/test ^(5,7)	2-3 s	Imai ve ark., (2006)

(1) Preston broth'ta ön zenginleştirme süresi dahil edilmiştir.

(2) Konvansiyonel kültür yöntemi ile karşılaştırılmıştır

(3) Real-time dupleks PCR

(4) Reverse Transcription LAMP (RT LAMP)

(5) Reverse transcription PCR (RT PCR)

(6) Tissue culture infective dose 50 (TCID₅₀)

(7) Plaque forming unit (pfu)



3- PCR da inhibisyonun kontrolü ve yanlış negatif reaksiyonların belirlenmesi için internal amplifikasyon kontrolü kullanılması gerekliliği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Hoorfar ve ark. 2003). LAMP reaksiyonunda ise internal amplifikasyon kontrolü kullanılamadığından negatif sonuçların, reaksiyon inhibisyonundan kaynaklanıp kaynaklanmadığı belirlenmemektedir.

4- PCR da aynı tüpte birden fazla hedef bölgenin belirlenmesine olanak veren multipleks format kullanılarak amplifiye edilen bölge belirlenebilirken, LAMP reaksiyonu için bu format uygun değildir. Birden fazla hedef bölge için primerler aynı reaksiyonda kullanılabilmesine rağmen (Fukuda ve ark. 2006), hangi bölgenin amplifiye edildiği belirlenmemektedir. Bu şekilde bir belirleme yapılmak isteniyorsa her hedef bölge için ayrı tüplerde ayrı reaksiyonlar hazırlanmalı (Parida ve ark. 2005) veya Mori ve ark. (2006) tarafından bildirilen yöntem ile her ürün için farklı floresan işaretli problemler kullanılmalıdır.

SONUÇ

LAMP yöntemi, avantajlarında bildirildiği gibi sensitif, spesifik, hızlı ve ekonomik bir yöntem olduğundan kaynakları sınırlı laboratuvarlar için tercih edilebilir bir yöntemdir. Cihaz bağımlılığı olmadığından uygulanması ve sonucun okunması hem ucuz hem de kolaydır. Diğer yöntemlerle beraber kombine edilerek amaca uygun olarak geliştirilebilme potansiyeli bulunmaktadır. Erken teşhisin önemli olduğu hızla yayılan enfeksiyon hastalıklarında ve saha koşullarında kullanıma uygun bir yöntem olarak değerlendirilebilir. Ulusal izleme programlarında ve rutin laboratuvar analizlerinde yaygın bir şekilde kullanım alanı bulabileceğinden kısa zamanda Türkiye'deki bilim insanlarının da dikkatini çekeceği düşünülmektedir. Gıda analizlerinde raf ömrü göz önüne alındığında hızlı sonuç vermenin önemi ortaya çıkmaktadır. Türkiye'de mevcut koşullar altında tüm devlet laboratuvarlarının PCR sistemine yönelmesi yerine bu yöntem ile belirli patojenlerin hızlı tespitini yapabilecekleri düşünülmektedir. İlgili yöntemin resmi laboratuvarlar da yaygınlaşması güvenilirlikte artış sağlayacağı gibi ekonomik olarak devlet bütçesine katma değer sağlayacaktır. Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı, yönetmeliğinin tanımladığı sorumluluklar kapsamında bu yöntemin hem yaygınlaştırılmasında hem de ilgili sarf malzemelerinin hazırlanmasında ve ulusal kullanım amaçlı olarak sağlanmasında uygun kaynaklar sağlandığı takdirde aktif rol alabilecektir.

KAYNAKLAR

- Anonim 2010a. <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html> Erişim tarihi 15.02.2010.
- Anonim 2010b. <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/anim.html> Erişim tarihi 15.02.2010.
- Anonim 2010c. <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/loop.html> Erişim tarihi 26.02.2010.
- Barken K.B., Haagensen J.A.J., Tolker-Nielsen T. 2007. Advances in nucleic acid-based diagnostics of bacterial infections. *Clin. Chim. Acta.*, 384:1-11.
- Cho HS., Kang JI., Park NY. 2006. Detection of canine parvovirus in fecal samples using loop-mediated isothermal amplification. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 18:81-84.
- Fukuda S., Takao S., Kuwayama M., Shimazu Y., Miyazaki K. 2006. Rapid detection of Norovirus from fecal specimens by real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Clin. Microbiol.*, 44(4): 1376-1381.
- Gao H., Lei Z., Jia J., et al. 2009. Application of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Yersinia enterocolitica* in pork meat. *J. Microbiol. Methods.*, 77: 198-201.
- Goto M., Hayashidani H., Takatori K., Hara-Kudo Y. 2007. Rapid detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* harbouring genes for four classical enterotoxins, SEA, SEB, SEC and SED, by loop-mediated isothermal amplification assay. *Lett. Appl. Microbiol.*, 45:100-107.
- Goto M., Honda E., Ogura A., Nomoto A., Hanaki K.I. 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Bio. Techniques.*, 46:167-172.
- Hara-Kudo Y., Yoshino M., Kojima T., Ikeda M. 2005. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 253, 155-161.
- Hara-Kudo Y., Nemoto J., Ohtsuka K., et al. 2007. Sensitive and rapid detection of Verotoxin-producing *Escherichia coli* using loop-mediated isothermal amplification. *J. Med. Microbiol.*, 56: 398-406.
- Hill J., Beriwal S., Chandra I., et al. (2008). Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of Common Strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 46(8); 2800-2804.
- Hoorfar J., Cook N., Malorny B. et al. 2003. Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 5835.
- Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, et al. 2006. Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. *Vaccine*, 24:6679-6682.
- Kaneko H., Kawana T., Fukushima E., Suzutani T. 2007. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70:499-501
- Liu Y., Gao Q., Zhang X., Hou Y., Yang J., Huang X. 2006. PCR and oligonucleotide array for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Mol. Cell. Probes.*, 20, 11-17.
- Liu C., Zheng W., Zhang H., Hou Y., Liu Y. 2009. Sensitive and rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula by loop-mediated isothermal amplification method. *J. of Food Safety*, 29: 83-94.

- Misawa Y., Yoshida A., Saito R. et al. 2007. Application of loop-mediated isothermal amplification technique to rapid and direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in blood cultures. *J. Infect. Chemother.*, 13:134–140.
- Mori Y., Nagamine K., Tomita N., Notomi T. 2001 Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 289: 150–154.
- Mori, Y., Kitao, M., Tomita, N., Notomi, T. 2004. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J Biochem. Biophys. Methods*, 59: 145–157.
- Mori Y., Hirano T., Notomi T. 2006 Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC Microbiology* 6(3): 1-10.
- Mori Y., Notomi T. 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J. Infect. Chemother.*, 15: 62-69.
- Nagamine K., Watanabe K., Ohtsuka K., Hase T., Notomi T. 2001. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template. *Clinical Chemistry*, 9: 1742-1743.
- Nagamine K., Hase T., Notomi T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, 16: 223-229
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H. et al. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28 (e63): 1-7.
- Ohtsuka K., Yanagawa K., Takatori K., Hara-Kudo Y. 2005. Detection of *Salmonella enterica* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification and characterization of *Salmonella* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 6730–6735.
- Okamura M., Ohba Y., Kikuchi S., et al. 2008. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid, sensitive and specific detection of the O9 group of *Salmonella* in chickens. *Vet. Microbiol.*, 132: 197-204.
- Parida M., Posadas G., Inoue S., Hasebe F., Morita K. 2004. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J. Clin. Microbiol.*, 42: 257-63.
- Parida M., Horioke K., Ishida H. et al. 2005. Rapid detection and differentiation of Dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 2895–2903.
- Parida M., Sannarangaiah S., Dash P.K., Rao P.V.L., Morita K. 2008. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev.Med.Virol.*, 18: 407-421.
- Poxton I.R. 2005. Molecular Techniques in the diagnosis and management of infectious diseases: Do they have a role in bacteriology? *Med. Princ. Pract.*, 14(suppl 1): 20–26.
- Song T., Toma C., Nakasone N., Iwanaga M. 2005. Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by loop-mediated isothermal amplification. *FEMS Microbiol. Lett.*, 243: 259-263.
- Thai H.T.C, Le M.Q., Vuong C.D., et al. 2004. Development and evaluation of a novel loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of SARS Corona virus. *J. Clin. Microbiol.*, 42(5): 1956–1961.
- Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T. 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat. Protoc.*, 3: 877–82.
- Versalovic J., Lupski J.R. 2002. Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. *Trends Microbiol.*, 10: 15–21.
- Wang D., Liu F., Huo G., Ren D., Li Y. 2008. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for detecting *Escherichia coli* O157 in raw milk. *J. Rapid. Meth. Aut. Mic.*, 17: 55-66.
- Weusten J. J. A. M., Carpay W. M., Oosterlaken T. A. M., van Zuijlen M. C. A., van de Wiel P. A. 2002. Principles of quantitation of viral loads using nucleic acid sequence-based amplification in combination with homogeneous detection using molecular beacons. *Nucleic Acids Res.*, 30 (e26): 1-7.
- Yamazaki W., Taguchi M., Ishibashi M., et al. 2008a. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Med. Microbiol.*, 57: 444-451.
- Yamazaki W., Ishibashi M., Kawahara R., Inoue K. 2008b. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiology* 8: 163, 1-7.
- Yamazaki W., Taguchi M., Kawai T. et al. 2009 Comparison of loop-mediated isothermal amplification assay and conventional culture methods for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Naturally Contaminated Chicken Meat Samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 1597–1603.
- Yano A., Ishimura R., Hujikata R. 2007. Rapid and sensitive detection of heat-labile I and heat-stable I enterotoxin genes of enterotoxigenic *Escherichia coli* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J. Microbiol. Methods*, 68: 414-420.



Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar ve Analiz Yöntemleri

Genetically Modified Organism And Analysis Methods

Dr. Muhammet KAYA*

Dr. Şafak B. KARAKOÇ

Burcu OLANCA

Ayşegül ARIKAN

Dr. Ayşegül E. YAŞINOK

*Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı
Biyoteknoloji ve GDO Bölümü*

ÖZET

Günümüzde, modern biyoteknolojik yöntemler kullanılarak, bir ya da birkaç genin aktarılması ile yeni tarımsal özelliklere sahip bitkiler elde edilmektedir. Böylece, zararlılara, hastalıklara, herbisitlere ve çeşitli streslere dayanıklı, ürün ve verim kalitesi artırılmış transgenik bitkiler üretilmektedir. Transgenik bitkiler, çeşitli gen aktarım yöntemlerinin kullanılması ile üretilmektedir. Ayrıca, genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar (GDO), protein ve DNA esaslı tanımlama yöntemleri kullanılarak saptanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Gıda, GDO, Transgenik Bitki, PCR, ELİSA

ABSTRACT

Novadays, utilizing modern biotechnological methods, plants with new agricultural properties have been produced by transferring one or few genes. As a result, disease, pest, herbicide and various stress resistant, and product and yield increased transgenic plants were produced. Transgenic plants was constructed using various gene transfer methods. Moreover, genetically modified organisms (GMO), were identified utilizing genetic and protein based detection methods.

Keywords: Food, GMO, Transgenic Plants, PCR, ELISA

GİRİŞ

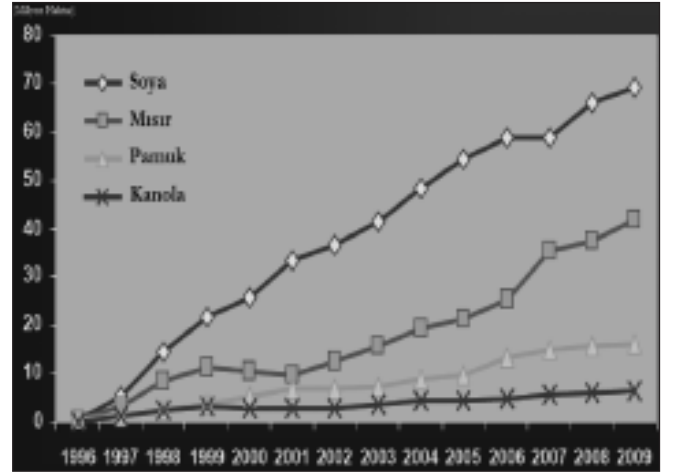
Bitki ıslahı insanlık tarihi kadar eski olmakla beraber ürünlerdeki kalite ve verim artışı, son elli yılda geliştirilen ıslah yöntemleri ile modern tarım teknolojisinin birlikte kullanılması neticesinde olmuştur. Ancak yabancı formlarıyla karşılaştırdığında ıslah edilen verimli çeşitlerin neredeyse tamamı hastalık ve zararlılara karşı dayanıksızdırlar. Bunun en önemli nedeni uygulanan ıslah programlarında verim ve kalitenin her zaman birinci planda tutulması, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılığın ise ikinci plana itilmesidir. Yabancı türlerden kültür çeşitlerine melezleme yoluyla dayanıklılık genlerinin aktarılması da kısırılık ve uyumsuzluk nedeniyle her zaman mümkün olmamaktadır. Bu bitkiler arasında melezleme yapılsa dahi, istenmeyen genlerin geçişi önlenememekte ve geri melezleme ile de bu genlerin uzaklaştırılması çok uzun zaman almaktadır. Günümüzde modern biyoteknolojik yöntemler kullanılarak bu olumsuzluklar kolayca aşılabilmekte, çok verimli bir çeşidin istenen özellikleri değiştirilmeksizin bir ya da birkaç gen, yeni tarımsal özellikler kazandırmak amacıyla bitkilere kolayca aktarılabilmektedir (Özcan ve Sancak, 2005).

Modern biyoteknolojik yöntemler kullanılarak elde edilmiş yeni bir genetik materyal kombinasyonuna sahip olan herhangi bir canlı organizmaya genetik yapısı değiştirilmiş organizma (GDO) adı verilir (Anonim, 2003). GDO'lar transgenik organizmalar olarak da adlandırılmaktadır (Bayraç ve ark., 2007). Transgenik organizmalar ve bunlardan elde edilmiş ürünlerin insan sağlığı ve biyolojik kaynaklar açısından bazı riskler taşıdığı ve güvenli kullanmaya yönelik sistemler geliştirmekle bu risklerin minimuma indirilmesinin gerekliliği tüm dünyada kabul edilmektedir.

Ticari amaçlı piyasaya sürülmek için üretilen ve yaygın olarak kullanılan transgenik bitkisel ürünler; mısır, soya, kanola, pamuk ve pirinç gibi ürünlerdir (Sökmen, 2005; Yang et al., 2008).

Genetiği değiştirilmiş (GD) soya tarımı yapılan alanlar (65,8 M.He), toplam soya tarımı yapılan alanların (90 M.He) yaklaşık % 77'sidir (Şekil1). Transgenik tarım yapılan alanların % 53'ünde soya, % 30'unda mısır ve % 12'sinde pamuk tarımı yapılmaktadır (Clive, 2010)

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki GD bitkilerin tarım alanlarındaki üretimi 1996 yılında başladıktan sonra her yıl artarak büyümektedir (Şekil 2). GD bitki tarımı 2009 yılı verilerine göre 25 ülkede 134 milyon hektar alandır (Tablo 1). ABD en fazla (dünyadaki toplam alanın yarısı kadar) GD bitki tarımı yapılan ülkedir. Bu ülkeyi Brezilya, Arjantin ve Hindistan takip etmekte-



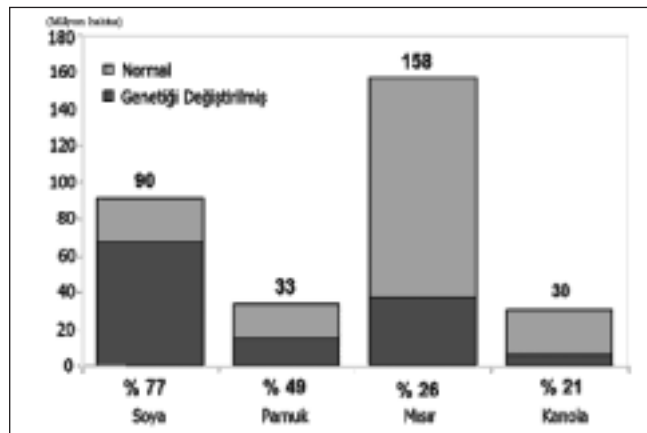
Şekil 2. GD bitkilerin yıllara göre üretim durumları (Clive, 2010)

dir (Clive, 2010).

GD bitki sayısı, GDO tipi ve yetiştirilen ülke sayısının önümüzdeki yıllarda önemli oranda artacağı tahmin edilmektedir. En çok tarımı yapılan soya dikkate alındığında 2008 yılında ticari olarak AB tarafından onaylanan sadece bir GD soya varken bu sayı 2009 yılında 3 olmuştur (Anonim, 2010). Ticari GD soya sayısının 2015 yılına kadar katlanarak artacağı, yedi veya daha fazla olacağı tahmin edilmektedir. Ticari GD bitki sayısının 2008 yılında 33 iken 2015 yılında tüm bitki türlerinde 124'e ulaşacağı tahmin edilmektedir (Stein and Rodriguez-Cerezo, 2009)

TRANSGENİK BİTKİ GELİŞTİRME AMAÇLARI

Zararlılara karşı dayanıklılık: Genetik modifikasyon teknikleriyle böceklerle karşı toksik etkili proteinleri kodlayan genler, değişik kaynaklardan izole edilerek bitkilere aktarılmaktadır. Bunlardan en önemlisi *Bacillus thuringiensis* (Bt) bakterisine ait delta-endotoksin proteinlerinin sentezinden sorumlu olan cry (kristal)



Şekil 1. Dünyada GD bitkilerin normal bitkilere oranı, (Clive, 2010)



Tablo 1. GD bitkilerin ülkelere göre ekim alanları (Clive, 2010)

Sıra	Ülke	Ekim Alanı (M.He)	Genetiği Değiştirilmiş Bitkiler ve
1	ABD	64.0	Soya, Mısır, Pamuk, Kanola, Papaya, Yonca, Ş. Pancarı, Kabak
2	Brezilya	21.4	Soya, Mısır, Pamuk
3	Arjantin	21.3	Soya, Mısır, Pamuk
4	Hindistan	8.4	Pamuk
5	Kanada	8.2	Kanola, Mısır, Soya, Ş. Pancarı
6	Çin	3.7	Pamuk, Domates, Kavak, Papaya, Biber
7	Paraguay	2.2	Soya
8	Güney Afrika	2.1	Mısır, Soya, Pamuk
9	Uruguay	0.8	Soya, Mısır
10	Bolivya	0.8	Soya
11	Filipinler	0.5	Mısır
12	Avustralya	0.2	Pamuk, Kanola
13	Burkina Faso	0.1	Pamuk
14	İspanya	0.1	Mısır
15	Meksika	0.1	Pamuk, Soya
16	Şili	<0.1	Mısır, Soya, Kanola
17	Kolombiya	<0.1	Pamuk
18	Honduras	<0.1	Mısır
19	Çek Cum.	<0.1	Mısır
20	Portekiz	<0.1	Mısır
21	Romanya	<0.1	Mısır
22	Polonya	<0.1	Mısır
23	Kosta Rika	<0.1	Pamuk, Soya
24	Mısır	<0.1	Mısır
25	Slovakya	<0.1	Mısır

genlerinin bitkilere aktarılmasıdır. Bu toksin Lepidoptera, Coleoptera ve Diptera takımındaki böcekler karşı toksikken, diğer hayvan ve insanlara karşı zararsızdır. Ayrıca; böceklerin biotin eksikliğinden ölümüne neden olan avidinin bitkilerde üretimini sağlayan gen aktarımında yapılmaktadır. Bunların dışında; böcekler dayanıklılığı artırmak amacıyla proteaz inhibitör genleri, anti-metabolik enzim geni, Streptomyces türlerinden kolesterol-oksidad geni ve bezelyedeki lektin geni kullanılmaktadır (Anonim, 2001; Özcan ve Sancak, 2005; Demir et al., 2006).

Hastalıklara karşı dayanıklılık: Bu amaçla yapılan uygulamalar; i)Normalde bitkide bulunmayan ve hastalık etmenlerine karşı toksik etki yapan proteinleri kodlayan genlerin bitkiye aktarılması, ii)Normalde bitkide bulunan ve patojen saldırısı sırasında uyarılan savunma genlerinin bitkiye aktarılacak daha fazla üretimlerinin sağlanması, iii)Özellikle fitoaleksinin sentezi aşamasında gerekli olan enzimlerin üretiminden sorumlu olan genlerin bitkiye kazandırılması, iv)Hastalık etminin salgıladığı ürünleri yok edici proteinleri kodlayan genlerin bitkiye aktarılmasıdır (Özcan ve Sancak, 2005; Demir et al., 2006).

Herbisitlere karşı dayanıklılık: Yabancı ot kontrolünde kullanılan herbisitlerden seçici olanları dayanıklı yabancı otların ortaya çıkmasına sebep olurken, total herbisitler ise hem yabancı otların hem de kültür bitkileri için toksiktir. GD bitkilerin filizlenme döneminde çiçeklenme dönemi sonuna kadar herbisitlerle muamelesi mümkün olabilmektedir. Bugüne kadar glifosat, glufosinat amonyum, imidazolinon, sülfonilüre, sethoksidim ve bromoksinil herbisitlerine dirençli altı ürün kategorisi geliştirilmiştir. En bilineni ticari olarak Roundup®, Rodeo® ve Accord® olarak adlandırılan glifosata karşı dirençli soya, mısır, pamuk, kanola, şeker pancarı ve buğdaydır. Glufosinat amonyum herbisitini tolere eden genetik modifiye mısır, soya, pirinç, şeker pancarı, tatlı mısır ve kanola gibi tohumlara ticari olarak Liberty Link® denilmektedir. Ticari olarak Poast®, Poast Plus®, and Headline® olarak adlandırılan herbisitlerdeki aktif bileşen olan sethoksidime karşı dirençli soya fasulyesi ve mısır üretilmektedir. Buctril® ismiyle ticari olarak satılan bromoksinile karşı dirençli pamuk da mevcuttur (Anonim, 2001; Özcan ve Sancak, 2005; Demir et al., 2006).

Strese karşı dayanıklılık: Genetik modifikasyonla bitkilere sıcaklık, soğuk, su eksikliği, yüksek tuzluluk veya ağır metallerle karşı yüksek tolerans kazandırılması bunların uygun olmayan koşullarda yetiştirilmesi sağlanır. Nicotiana tabacum'a mangan-SOD geninin aktarılması ile ozon zararı 3-4 kat azaltılmakta, mannitol-hidrogenaz oluşumundan sorumlu genin aktarılmasıyla kuraklığa karşı dayanıklılık artmakta, kloroplast membranının lipitler ile doyurulmasına katkıda bulunan genler soğuğa karşı toleransı artırmakta; glutamin-sintetaz enziminin fazla üretilmesini sağlayan genin çeltiğe aktarımı ile tuza karşı tolerans artmakta, kolinoksigenaz geninin aktarılmasıyla tuza karşı dayanıklılık artmakta, ağır metallerle karşı toleransı artıran genlerin aktarılmasıyla kirlenmiş topraklarda bitkilerin iyi yetişmesi sağlanmaktadır (Demir et al., 2006).

Bitkilere gen transferiyle sağlanan diğer faydalar: Genellikle kolza, domates ve mısır gibi bitkilerde erkek kısırlık geninin, özel bir gene bağlanması ve bu genin hibrit dölde aktarılması ile % 100 steril döl elde edilmektedir (Demir et al., 2006). Bitkilere azot üzerine etkili glutamat dehidrogenaz enzimini kodlayan gen aktarımı yapıldığında bitkinin azot alımı artmakta ve fazla gübre kullanımı engellenmektedir. Bu gen buğdaya aktarıldığında biyokütle üretimi, büyüme hızı ve dane ağırlığı artmaktadır (Anonim, 2001). Bitkilerin karbonhidrat metabolizması değiştirilerek, nişastanın gıda ve kimya sanayinde kullanımı artırılmakta; gıda ve eczacılık sanayinde uçucu maddelerin veya aromatik bileşiklerin stabilize edilmesinde veya istenilmeyen maddelerin uzaklaştırılmasında kullanılan siklodekstrin patatese üretilmekte ; β -karotin üreten ve demir bağlaması düşük olan çeltik (Golden Rice) üretilmekte ve bitkilerde lizin sentezinin artırılabilir. Domatesde etilen üretimi azaltılarak olgunlaşma süresi artırılmaktadır. Tahıllar ve sebzelerde mineral maddelerin alımını engelleyen fitat oranı, fitaz enzim geninin aktarılmasıyla azaltılabilmektedir. Patates ve domatese toksik etkili olan glikoalkaloidlerin sentezinde önemli olan UDP-Glukoz-Glucosiltransferazın etkisi gen aktarımı ile durdurulabilmiştir. Çeltikte alerjik etki yapan protein oranı, antisens RNA teknolojisi sayesinde azaltılabilir. Yapıştırıcı ya da folya yapımında kullanılan modifiye nişasta, kağıt üretiminde kullanılan selüloz, jel ve kabartıcı olarak kullanılan pektinlerin endüstriyel anlamda elde edilmesinde gen teknolojisinden yararlanılmaktadır. Ayrıca bitkilerde biyoplastik üretiminde bu yolla sağlanmaktadır (Özcan ve Sancak, 2005; Demir et al., 2006; Bayraç ve ark. 2007). Yüksek maliyetli ve eksik donanım nedeniyle donanımı kısıtlı olan Hepatit B aşısı, Hepatit B yüzey antijeni üreten transgenik tütün ve patates ile geliştirilmiştir (Mason et al., 2002). Benzer çalışmalar kızamık, çocuk felci, difteri, kuduz ve viral hastalıkların aşılarında devam etmektedir. Kistik fibrosis ve karaciğer hastalıklarında kullanılan bir protein çeltikte ve gaucher hastalığında kullanılan ve çok pahalı bir ilaç olan glukoserebrosidaz ise tütün bitkisinde üretilenmiştir. Süs bitkilerine yeni pigment genleri aktararak veya mevcut pigment genleri antisens RNA tekniği ile engellenerek çok değişik renklerde süs bitkileri elde edilebilmektedir Patlayıcı maddeler ile kirlenmiş topraklardan TNT'yi temizleyen transgenik tütün; iyonize cıvayı daha az tehlikeli olan metalik cıvaya dönüştürebilen manolya; renk değişimi sayesinde mayın temizliğinde kullanılan bitki örnek olarak verilebilir (Kusnadi et al., 1997; Özcan ve Sancak, 2005; Demir et al., 2006; Bayraç ve ark. 2007).

GEN AKTARIM TEKNİKLERİ

Gen teknolojisinde bitki hücrelerine gen aktarıldıktan sonra bu hücrelerden doku kültürü teknikleriyle yeni bitkiler elde edilir (Özcan ve Sancak, 2005).

Agrobacterium aracılığıyla gen aktarımı: Bitkilere gen aktarımında en yaygın kullanılanı, genetik mühendisi olarak adlandırılan gram negatif toprak bakterisi olan *Agrobacterium tumefaciens* bakterisi aracılığıyla gen transferidir. Bu bakteri aracılığıyla tarımsal öneme sahip birçok gen, çift çenekli bitkilere kolaylıkla aktarılabilmektedir. Bu bakteri kromozom DNA'sından başka kök boğazı tümörüne neden olan Ti plazmidine sahiptir. Hastalığın sorumlusu olarak plazmitteki T-DNA (aktarılan DNA) gösterilmiştir. Bu yöntemde T-DNA bölgesi kesici enzimlerle çıkartılıp, yerine bitkiye aktarılacak geni taşıyan DNA parçası yerleştirilmekte ve bu DNA parçası da bakteri doğası gereği bitki hücrelerine aktarabilmektedir. T-DNA'nın kesilerek bitki hücrelerine taşınmasını ve kromozomlarla birleşmesini Ti plazmidi üzerinde bulunan virülens (vir) genler sağlamaktadır (Birch, 1997; Babaoğlu, 1999; Zafar, 2004; Özcan ve Sancak, 2005). *Agrobacterium* sisteminin, tahılların da içinde bulunduğu tek çenekli bitkilerde ve sıkı doku yapısına sahip meristemlerde kullanımının sınırlı kalmasından dolayı, sonikasyon destekli *Agrobacterium* aracılığıyla gen transferi (SAAT) kullanılmaktadır (Trick and Finer, 1997, 1998). Ayrıca agroinfeksiyon ve agrolistik de gen aktarımında uygulanan diğer tekniklerdir (Hansen and Chilton, 1996).

Doğrudan DNA transferi teknikleri: Bu yöntemlerle hem tek çenekli, hem de çift çenekli bitkilerde başarılı sonuçlar alınmıştır.

Biyolistik gen transferi (Partikül tabancası ile gen aktarımı): Bitki hücrelerine aktarılmak istenen genleri taşıyan DNA parçası, önce 1-2 μ m çapındaki ağır metal partiküllerine (altın veya tungsten) spermidin veya CaCl_2 gibi bileşiklerle yapıştırılır. Daha sonra bunlar, bitki hücre ve dokularına (yaprak, embriyo, sürgün ucu meristemi gibi organ kısımları), elektrik akımı, helyum, hidrojen veya sıkıştırılmış havayla bombardıman edilir. Metal zerrelere bitki hücrelerine girdikten sonra DNA parçası ayrılarak bitki hücresinin kromozomlarıyla birleşir. Bu yöntemle doğrudan faj, bakteri veya maya hücreleri hedef dokuya transfer edilebilmektedir (Kikkert, 1993; Zafar, 2004; Özcan ve Sancak, 2005).

Protoplastlara direkt gen aktarımı (Elektroporasyon ve PEG aracılığıyla transformasyon): Enzimatik yollarla hücre duvarı eritilmiş olan bitki hücrelerine protoplast denir. Yüksek voltajlı elektrik akımı veya kimyasal maddelerle (%15-25 PEG: polietilen glikol)



protoplast zarında DNA moleküllerinin geçebileceği büyüklükte (30 nm) geçici gözenekler oluşturulur ve yabancı genleri taşıyan DNA parçası hücre içerisine girecek kromozomlarla birleşir. Ancak birçok bitki türünde protoplastlardan bitki rejenerasyonu mümkün olmamaktadır (Babaoğlu, 1999; Zafar, 2004; Özcan ve Sancak, 2005).

Mikro enjeksiyon ile gen aktarımı: İlk genetik modifiye hayvan bu yöntemle elde edilmiştir. Bitki hücreleri mikro iğnelerle delinmesi zor olan lignin ve selülozdan oluşan kalın tabakalar içerdiğinden bitkilerde kullanılması zor bir tekniktir. Bu yöntemde aktarılabilecek genleri taşıyan DNA parçası çok ince (0.5-10 İm çapında) kılcal pipetlerle veya enjektörlerle doğrudan immobilize edilmiş hedef hücrelere, kallus, meristem, mikrospor vb. içerisine steril şartlarda mikroskop altında enjekte edilir (Babaoğlu, 1999; Zafar, 2004).

Diğer gen transferi aktarımı: Diğer bazı teknikler çok özel durumlarda uygulanmış olup pratikte geniş uygulamaları yoktur. Bunlar sonikasyon, lazer mikro ışınlarıyla transformasyon, silikon karbit fiberleri ile transformasyon ve desikasyon (soldurma) teknikleridir (Babaoğlu, 1999).

GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALARIN ANALİZ YÖNTEMLERİ

GDO'lar biyoteknolojik yöntemler kullanılarak canlıların gen dizilimlerinde yapılan değişikliklerle elde edilirler (Ahmed, 2002). Canlılardaki bu tür genetik değişiklikler sadece istenilen özelliği veren genin aktarılmasıyla değil, belirli bir gen zincirinin aktarımıyla gerçekleştirilir. Herhangi bir organizmaya aktarılan bu gen yapısı; aktarılmış olan DNA'nın mRNA'ya transkripsiyonunu başlatan promotor gen (Karnıbahar mozaik virüsünün 35S promotor vb.), bitkiye istenilen özelliği kazandıran proteini kodlayan gen, transkripsiyonu sonlandıran terminatör gen (NOS terminatör vb), işaretleyici ve seçici olarak görev yapan markör genleri (antibiyotik direnç genleri vb.) içerir (Tripathi, 2005; Adugna and Mesfin, 2008). Promotor, terminatör ve markör genler bitkinin genetik bir değişime maruz kalıp kalmadığının tespitinde önemlidir (Asif, 2004; Turhan, 2008). Son yıllarda geliştirilen GDO'larda araştırmacılar Karnıbahar mozaik virüsünün (CaMV) 35S promotoru yerine bitkisel kaynaklı olanları (anter spesifik promotor ve pTa29 polen spesifik promotor vb.) kullanmışlardır. Ayrıca araştırmacılar, yatay gen geçişine sebep olabileceği gerekçesi ile antibiyotik direnç genlerinin kullanımını azaltmış, bunların yerine "yeşil protein floresanı ve mannoz" alternatif olarak göstermişlerdir (Bayraç ve ark., 2007).

GDO analiz teknikleri, transgenik bitkiyle genetiği değiştirilmemiş kültür çeşitleri arasındaki farklılıklardan yararlanır. Bir GDO'nun analizi genetik modifikasyon sonucu oluşan yeni molekülün (DNA, RNA veya protein) tespit edilmesi şeklindedir. Bu kapsamda GDO analizleri protein ve DNA esaslı olmak üzere iki temel yöntemle yapılır (Querci, et al., 2007; Adugna and Mesfin, 2008). Protein temelli teknikler GDO'ya özgü bir proteinin taranması şeklindedir. DNA'ya dayalı moleküler biyolojik teknikler daha geniş kapsamlı kalitatif ve kantitatif tespit çalışmaları şeklindedir (Ahmed, 2002). Ayrıca kütle spektrofotometresi, kromatografi, Near Infrared (NIR) Spektroskopisi ve DNA çipleri GDO analizleri için kullanılabilecek diğer metotlardır (Ahmed, 2002; Asif, 2004).

Protein Esaslı Analiz Yöntemleri: Genetik modifiye ürünlerin analizinde kullanılan bu yöntemin temeli, belirli genler tarafından kodlanan yeni proteinlerin (transgenik bazı ürünlerdeki Bt Cry1Ac, Cry1C, Cry3A, Cry2A, Cry9C, CP4 EPSPS, ve PAT vb.) spesifik olarak tespiti şeklindedir. (Bonfini, et al., 2001; Ahmed, 2002; Querci, et al., 2007). Proteine dayalı analiz metotlarının kısıtlayıcı yönleri mevcuttur. Genetik modifikasyonlar her zaman yeni bir proteinin sentezine neden olmadığı gibi tespit için yeterli miktarda protein sentezi gerçekleşmeyebilir. Ayrıca proteinler sadece bitkinin belli kısımlarında ya da fizyolojik gelişimin farklı aşamasında, farklı seviyede ifade ediliyor olabilir. Bu analiz metotları denature olmamış, konformasyonun tam olduğu proteinlere gereksinim duyduğu için matris olarak taze ve işlenmemiş gıdalarla sınırlıdır (Asif, 2004).

Immunoassay: Protein ve antikor arasındaki özgün bağlanma esasına dayanan immunoassay teknolojisi kompleks matrislerde birçok protein tipinin kalitatif ve kantitatif tespiti için uygulanmaktadır (Bonfini, et al., 2001; Ahmed, 2002; Querci, et al., 2007). Immunoassay teknikleri test maddesi olarak antikorları kullanan ölçme sistemidir. Antikor hayvan serumlarında üretilen, vücuda giren herhangi bir yabancı maddeye (antijen) spesifik olarak bağlanarak karşı cevap oluşturan protein molekülüdür. Bu yöntemler, antikorla birlikte hedef molekül bulunduğunda (GDO tespiti durumunda yeni sentezlenen protein /antijen) birçok matrisde protein tiplelerinin tespiti için uygulanabilir. Yöntemlerde kullanılan antikorlar katı sabit faza bağlıdır. İki şekilde uygulanır. Birinci rekabet tekniğinde; detektör ve hedef molekül antikora bağlanmak için yarışır. Diğerinde ise hedef molekülün detektör antikor ve esas bağlayıcı antikor arasına bağlanması (çift sandviç modeli) şeklindedir

(Ahmed, 2002; Topal, 2006). İşlenmiş gıda ürünleri gibi bazı kompleks matrikslerde bu metotların kesinlik ve doğruluğunun olumsuz etkilenmesi ve bu gıda matrikslerinde bulunan sürfektanlar, yağ asitleri, fenolik bileşikler, endojen fosfatazlar ve bazı enzimlerin antijen-antikor reaksiyonunu inhibe etmesi gibi dezavantajlar vardır. Bütün bunların yanında, transgenik protein düşük seviyede sentezlendiğinde, ısı uygulamaları nedeniyle denature ya da degrade olduğunda metodların tespit limitide düşmektedir (Asif, 2004).

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): ELISA enzim işaretli immunoreaktant (antikor ya da antijen) ve immunosorbent (katı sabit faza antikor ya da antijen bağlanması) kullanan immunoassay yöntemidir. ELISA yeni gen tarafından kodlanan proteinin ifade edilme seviyesini değerlendirmek için yaygın olarak uygulanır (Asif, 2004). ELISA mikrokuyucuklu plaka ve kaplanmış tüp olmak üzere iki tiptedir. Antikor kaplanmış mikrokuyucuklar; daha yüksek duyarlılıkta, verimlilikte, ekonomik ve proteinlerin denature olmadan çalışmasına olanak sağladığı için kantitatif analizlerde ideal bir yöntemdir. Bu yöntemde işlem süresi 90 dakikadır. Antikor kaplanmış tüp formatında ise; işlem süresi 15-30 dakika kadar olduğu için alan testlerinde kullanılır. Bu metotta; tüpler hem gözle hem de optik okuyucu ile değerlendirilebilir. Kantitatif internal standart olmadığı için sonuçlar kalitatiftir (Ahmed, 2002).

Transgenik tarım ürünleri için ELISA testinde, protein izole edilir. Bu proteinin yüzey spesifik yapılarına (epitop) karşı antikor üretilir. Eğer protein varsa bunlar test kitinin duvarlarına bağlanır ve işaretlenmiş antikorla reaksiyona girerek renk değişimine sebep olurlar. Çoğu ticari kitlerde hedef proteinin miktarının tespiti, hazırlanmış olan standart eğrilerden karşılaştırma ile mümkündür (Asif, 2004).

Lateral Flow Strip Yöntemi: Bu yöntem, mikrotiter kuyucukların yerine striplerin kullanıldığı, ELISA yönteminin değişik bir formudur. Yeni proteine spesifik immobilize antikor çifti, renkli reaktantlara bağlanır ve nitroselüloz stripin içine yerleştirilir. Bu test stripleri transgenik tohum proteinleri veya bitki doku ekstraktının bulunduğu tüplere yerleştirildiğinde, renkli reaktantlarla çift yapmış antikorlarla birleşerek sandviç modeli oluşturur. Bu yapı, birisi transgenik proteine spesifik, diğeri transgenik olmayan proteine spesifik, renkli reaktantlara bağlı antikor bulunduran iki zonlu strip boyunca ilerler. Membran üzerinde tek bir bant oluşumu negatif (kontrol), iki bantın oluşumu pozitif sonuç demektir. Metotta kantitatif internal standartlar olmadığı için

kalitatiftir. Bu yöntem hızlı ve ucuz olduğu için satış noktalarındaki tarama analizleri için uygundur (Adugna and Mesfin, 2008).

Diğer Immunoassay Yöntemler: ELISA ve Lateral flow strip metotlarının dışındaki diğer immunoassayler katı sabit yüzey olarak manyetik partikülleri kullanırlar. Bu manyetik partiküller yakalayıcı antikorlarca kaplanır ve reaksiyon tüp içinde gerçekleşir. Bağlı partiküller bir mıknatıs yardımı ile diğer bağlı olmayanlardan ayrılırlar. Reaksiyon içinde serbest hareket eden eş büyüklükte partiküller olduğu için bu yöntemin kinetiği çok yüksektir ve bu durum metodun kesinliğini artırır. Antikora dayalı metotlarla cihaza dayalı metotların birleştirilmesiyle (immunoassay-kütle spektrofotometresi vb.) bu yöntemlerde gelişmeler sağlanmıştır (Ahmed, 2002; Asif, 2004).

Western Blot Yöntemi: Western blot, hedef protein seviyesinin önceden belirlenen eşik değerinin altında veya üstünde olup olmadığının kalitatif belirlenmesini sağlayan bir metottur. Özellikle çözünür olmayan proteinlerin tespitinde kullanılır. Bu metot rutin yapılan GDO testlerinden daha çok araştırmaya yönelik çalışmalar için uygundur. Test edilecek olan örnek, deterjanlar ve indirgeyici ajanlarla çözünür hale getirilir ve sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılırlar. Bu bileşenler nitroselüloz membrana transfer edilir, 125I işaretli antikorların uçlarına bağlanırlar, bağlanmış olan antikorlar otoradyografik olarak tespit edilir (Ahmed, 2002; Adugna ve Mesfin, 2008; Asif, 2004).

DNA Esaslı Analiz Yöntemleri: Genetiği değiştirilmiş gıdalar için DNA saptama metotları, diziye özgü şekilde hibridize olan DNA çift sarmalının iki iplikçığının tamamlanmasına dayanır. Birçok teknik olmasına rağmen Southern blot ve özellikle PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) analizleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Gen ekspresyonunun saptanması için "mikroarray"a dayalı teknoloji halen geliştirilmektedir (Ahmed, 2002; Pan, 2002). Mevcut metotlar arasında rutin uygulamalarda GDO ve GDO türevli materyalin tespiti için, PCR metotları en duyarlı ve güvenilir metotlar olarak kabul edilir. Hedef dizi, genellikle değişmiş gen yapısının bir parçasıdır (örneğin; promotor, terminatör, gen ya da bu elementlerden ikisinin birleşimi) (Jensen ve ark., 2003).

Genel olarak GDO analizleri üç aşamada yapılmaktadır. Birinci aşama DNA'sı izole edilen ürünün GDO'lu olup olmadığına yönelik taramadır. Bu aşamada özellikle bu ürünlerde en çok kullanılan 35S promotor ve NOS terminatör bölgelerinin çoğaltılması yapılır. Sonucun pozitif olması durumunda hangi çeşit GDO ol-



duğunu belirlemeye yönelik tanımlama yöntemleri uygulanır. Son aşamada ise tipi belirlenmiş olan GDO'nun kantitatif tayini yapılır (Turhan, 2008). Tarama ve tanımlama yaygın olarak konvansiyonel PCR kullanılarak yapılır. Gen aktarımında yaygın olarak kullanılan dizileri hedefleyen primerlerin dizaynıyla geliştirilen tarama metotları, kesin tanımlama gerektirmeden geniş bir aralıktaki GD ürünlerinin tespitini sağlar. Bugüne kadar, GDO geliştirilmesi için başta *Agrobacterium tumefaciens* ve karnıbahar mozaik virüsü (CaMV) orijinli olmak üzere çeşitli düzenleyici elementler kullanılmıştır. GDO miktarının belirlenmesi gerektiğinde pozitif bulunan örneklerde miktar tayini yapılır. Geliştirilen değişik metotlar içerisinde nükleik asit miktar tayini için real time PCR en başarılı, doğru ve güçlü bir tekniktir. Real time PCR teknolojisinde içeriği bilinen standart materyaller kullanılarak hazırlanmış standart eğri oluşturulması gerekir. Hem standartlar hem de bilinmeyen örnekler aynı çalışmada analiz edilir. GD materyalin miktarının tayini için ve standart eğri oluşturmak için birçok yaklaşım bulunmaktadır (Querci et al., 2007)

Southern Blot metodu: Bu metot izole edilmiş DNA örneklerinin nitroselüloz ya da naylon membranlara sabitlenmesini, GDO'ya özgü çift iplikli-işaretlenmiş nükleik asit problemleriyle işaretlenmesini ve hibridizasyonun radyografiksel (radiografically), florometrik (fluorometrically) olarak ya da kemiluminesanla (chemiluminescently) saptanmasını içerir.

Önceden problemler 32P ile işaretlenmekteyken, son zamanlarda duyarlılığı 32P'ye eşit, radyoaktif olmayan floresan etiketli DNA digoksigenin- ya da biotin-etiketli DNA problemleri kullanılmaktadır. Böylece laboratuvarla radyoaktif malzeme kullanılmamaktadır. Ayrıca 32P 24 saat gerektirirken bu problemler saptama süresini 1 saatten daha az bir zamana düşürür. Ancak tek prob kullanıldığı için ve çoğaltma yapılmadığı için PCR'dan daha az duyarlı olduğu düşünülür (Ahmed, 2002).

PCR metodu: PCR ilk olarak 1985'te Kary Mullis et al. tarafından tanımlanmıştır ve moleküler biyolojik uygulamalarda kullanılmıştır (Anonim, 2002).

PCR işlemi DNA moleküllerinin hücresel organizmada meydana gelen doğal kopyalama işleminin in vitro olarak gerçekleşmesidir. Ancak doğal DNA kopyalamanın aksine, PCR esnasındaki DNA üretimi; orijinal DNA molekülünün tüm dizisini kapsamaz. Sınırlıdır ve DNA molekülünün özel, daha kısa olan bir bölgesini hedefler (Lipp et al., 2005). PCR çok duyarlıdır ve bu nedenle analiz için çok az miktarda örnek gerektirir. Herhangi bir PCR temelli saptama metodu stratejisi

GDO'ların geliştirilmesinde kullanılan transgenik DNA dizisi ile moleküler yapısının ayrıntılı bilinmesine ve primerlerin seçimine bağlıdır (Bonfini et al., 2001).

DNA ekstraksiyon ve saflaştırma aşamasından sonra PCR'la çoğaltma ve saptama/kantifikasyon yapılır (Anonim, 2002). PCR'ın bir döngüsü ve buna bağlı olarak sıcaklık profili denatürasyon, primer yapışması ve uzama olmak üzere tipik olarak üç fazdır; (Lipp et al., 2005).

İlk adımda DNA polimeraz için ana kopya olacak kalıp DNA, yaklaşık 94°C'de tek zincire ayrılır. İkinci adımda, primerlerin hedef diziyeye yapışması için reaksiyon karışımı 50-65°C (primer GC içeriğine bağlı olarak)'ye kadar soğutulur. Üçüncü adımda, yapışmış primerler optimum olarak 72°C'de DNA polimeraz kullanılarak uzatılır. Primerlerin uzamasıyla hedef dizinin bir kopyası oluşur (Bonfini et al., 2001). PCR protokolleri genel olarak bu üç adımlı PCR döngüsünün 30-40 tekrarını içerir. Konvansiyonel PCR'larda sonuç çoğaltma işleminin sonunda analiz edilir ve PCR ürünlerinin görüntülenmesi agaroz jel elektroforezle yapılır (Querci et al., 2007).

Teoride PCR ürünlerinin üretimi logaritmik olarak ilerlemelidir. Ancak, pratikte reaksiyon bileşenlerinin sınırlanması dolayısıyla 30-40 döngü arasında plato fazına ulaşır (Pan, 2002). Çoğaltılmış DNA'nın gerçekten seçilen hedef dizi olup olmadığını netleştirmek için tanımlanmasının ve primerlerin spesifik olmayan bağlanması olmadığının doğrulanması gereklidir. Bu amaç için birçok metot vardır (Bonfini et al., 2001). Bunlar; i) çoğaltılmış ürünün restriksiyon endonükleaz parçalamayla özel kesilmesi, ii) hedef diziyeye özel DNA problemleriyle hibridizasyon, iii) PCR ürünlerinin direkt sekanslanması, iv) iki primer çiftinin, özellikle çoğaltılmış hedef diziyeye bağlandığı nested PCR'dır (Pan, 2002).

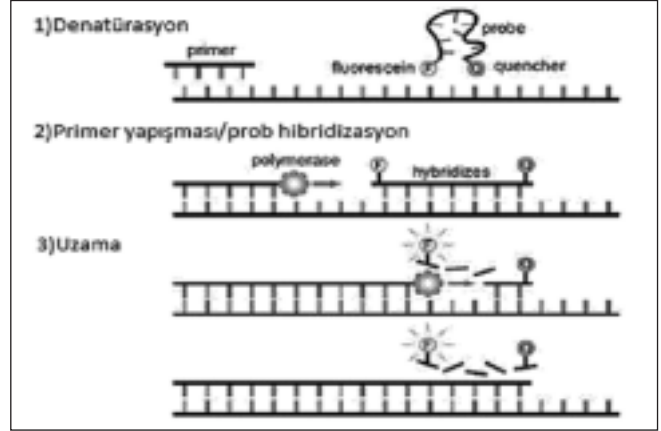
Geliştirilen PCR metodları arasında, real time PCR en başarılı olanıdır ve şu anki mevcut durumda nükleik asit kantifikasyonu için en doğru ve etkili tekniktir (Querci et al., 2007)

Real time PCR tekniği 1992'de Higuchi ve ark. tarafından geliştirilmiştir ve birçok real time PCR cihazının ve kullanımı kolay PCR çalışmalarının ortaya çıkmasıyla hızlı bir şekilde popüler olmuştur (Bonfini et al., 2001). Real time PCR düşük miktarda DNA kopyalarının tespitine izin verir (Pan, 2002). Konvansiyonel PCR'dan, reaksiyon sırasında her döngüde çoğaltılan PCR ürünlerinin ölçümü bakımından farklıdır. Bu metot; çalışmanın logaritmik fazında, çoğaltmanın takibine ve başlangıç materyalinin kesin tespitine izin verir. Bu-

rada tespit; yeni oluşan PCR ürünüyle birleşen ya da PCR ürününün çoğalmasıyla tamponda serbest kalan probun yaydığı floresanın ölçümüne dayanır (Gachon, 2004).

Real time PCR için geliştirilmiş başlıca tespit stratejileri ya da kimyasalları iki ana gruba ayrılır. Bunlar; Intercalating boyalar (örneğin; etidyum bromür ve SYBR® Green) ve hibridizasyon problemleri (örneğin; Taq Man® problemleri (Şekil 3) floresan rezonans enerji transfer (FRET) problemleri ve molecular beacon, Amplifluor® ve Scorpion™) dir (Querci et al., 2007).

GDO analizlerinde kullanılan DNA ve protein esaslı metotların bazı avantaj ve dezavantajları vardır, bunların karşılaştırılması Tablo 2’de verilmiştir.



Şekil 3. Taq Man® prob ile real time PCR (Querci et al., 2007)

Tablo 2. DNA ve protein esaslı analiz metotlarının avantaj ve dezavantajları (Adugna and Mesfin, 2008).

Avantajlar	Dezavantajlar
DNA Esaslı Metotlar	
-Çok düşük miktarlarda GDO'ları tespit edebilecek kadar hassas testlerdir. -PCR spesifik DNA'ların seçici amplifikasyonuna izin verir. -Hedef DNA içeren, gerekli örnek materyal miktarı en azdır. -Immunolojik yöntemlere göre çok az bileşiğe gerek duyar. İşlem süresi (primer sentezi, antikor üretimi vb.) daha kısadır. -DNA molekülü işlem süresince oldukça stabildir.	-Yanlış pozitif sonuç verebilen çok düşük seviyedeki bulaşmalara bile aşırı duyarlıdır. -Örnek analizi (yaklaşık 1 gün kadar) uzun zaman alır. -CaMV 35S promotor, NOS ve nptII sekansları gıdalarda doğal olarak bulunabilir ve bu tespit rDNA varlığını kanıtlamaz, yanlış pozitif sonuca sebep olur. -Bu testin sahada ve tahıl ambarlarında uygulanabilirlik potansiyeli sınırlıdır. -Protein bazlı metotlara kıyasla ekipman ve işlem anlamında çok daha pahalıdır. Ve iyi eğitilmiş personele gereksinim duymaktadır. -Metot validasyonunun prosedürü ve gereken şartları karmaşıktır.
Protein Esaslı Metotlar	
-Protein strip testleri basit, hızlı, ucuz ve güvenilirdir. Tüm bunlar PCR GDO tespit metodları için tamamlayıcı araçtır. -Reaktifler birkez geliştirildikten sonra örnek maliyeti düşüktür. -PCR 'dan daha az hassas olduğundan dolayı düşük seviyelerdeki kontaminasyonların neden olduğu yanlış pozitif sonuçlara da PCR'dan daha az duyarlıdır. -Strip testler sahada ve tahıl ambarlarında kullanılabilir.	-İşlem sonucu protein denaturasyonu olabilir. -Benzer protein özelliklerini ifade eden farklı transgenik eventler arasında farklı ifade modelleri ve biçimleri ayırt edilemez -Analiz geliştirme ve antikor oluşturma ve protein standartları için yüksek fiyatlar -GDO varlığının spesifik tanımlanmasına izin vermez, ve proteinlerin aşırı kimyasal veya fiziksel uygulamalara (özellikle çözücüler, ısıtma) karşı hassasiyetinden dolayı işlenmiş matrikslerde bulunan GDO varlığı tespit edilemeyebilir. -Amaca ulaşmak için önemli düzeyde zamana ve metod geliştirmeye gereksinim vardır.



KAYNAKLAR

- Adugna A. Mesfin T. 2008. Detection and quantification of genetically engineered crops, *Journal of SAT Agricultural Research*, 6: 1-10.
- Ahmed F.E. 2002. Detection of genetically modified organisms in foods, *TRENDS in Biotechnology*, 20 (5): 215-223.
- Anonim 2001. Harvest on the horizon: future uses of agricultural biotechnology. Report prepared by pew initiative on food and biotechnology.
- Anonim 2002. Consideration of methods for the detection and identification of foods derived from biotechnology, General approach and criteria for the methods. Codex alimentarius commission, CX/MAS 02/9.
- Anonim 2003. BM BÇS Cartagena Biyogüvenlik Protokolü, Tezmirlerin Kullanımı, Madde 3.
- Anonim 2010. http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm, 2010
- Asif M. GMO detection methods, NIBGE-FAO Workshop Manual on Capacity Building Biosafety of GM Crops: GMOs Detection, Pakistan, 2004:37-43.
- Babaoğlu M. 1999. Bitkilerde gen transferi teknikleri. *Ziraat Yüksek Mühendisleri Birliği Dergisi*, 322: 24-26.
- Bayraç T.A., Kalemtaş G., Baloğlu C., Kavas M. ve Önde, S. Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar, Ankara, ODTÜ Bilim ve Toplum Kitapları Dizisi, 2007, 64-66.
- Birch R.G. 1997. Plant transformation. Problems and strategies for practical application. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:297-326.
- Bonfini L., Heinze P., Kay S., Van den Eede G. 2001. Review of GMO Detection and Quantification Techniques, p:19-20, European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, Food Products and Consumer Goods Unit, I-21020 Ispra, Italy.
- Demir A., Seyis F., Kurt O. 2006. Genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar: I. Bitkiler. *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, 21 (2): 249-260.
- Gachon C., Mingam A., Charrier A. 2004. Real Time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany*, 55(402): 1445-1454.
- Hansen G., Chilton MD. 1996. 'Agrolistic' transformation of plant cells: Integration of T-strands generated in planta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 93(25): 14978-14983.
- Holst-Jensen A., Ronning S.B., Lovseth A., Berdal K. G. 2003. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Anal Bioanal Chem.* 375:985-993.
- James C., 2010. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009. ISAAA Brief No. 41. ISAAA: Ithaca, NY.
- Kikkert J.R. 1993. The Biolistic PDS-1000/He device. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*; 33:221-226.
- Kikkert J.R., Humiston G.A., Roy M.K., Sanford J.C. 1999. Biological projectiles (phage, yeast, bacteria) for genetic transformation of plants. *In vitro Cellular & Dev. Biology-Plant*; 35(1): 43-50.
- Lipp M., Shillito R., Giroux R., Spiegelhalter F., Charlton S., Pinnero D., Song P. 2005. Polymerase Chain Reaction Technology as Analytical Tool in Agricultural Biotechnology. *Journal of AOAC International*, 88 (1): 136-155.
- Mason H.S., Warzecha H., Mor T., Arntzen C.J., 2002. Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends Mol. Med.*, 8: 324-329.
- Özcan S. ve Sancak C. 2005. Modern biyoteknolojinin bitkisel üretimde kullanımı. *Modern Biyoteknoloji Uygulamaları. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü*, 2-21.
- Pan T.M. 2002. Current Status and Detection of Genetically Modified Organism. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10, (4): 229-241.
- Querci M., Paoletti C. and Eede G. V., 2007, From Sampling to Quantification Development and Harmonisation of Procedures for GMO Testing in the EU., *Collection of Biosafety Reviews*, 3: 8-41.
- Sökmen M.A.; 2005, Genetik Yapısı Değiştirilmiş Bitkiler ve Bitki Koruma Amaçlı Kullanımı, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 20: 3, 105-109.
- Stein A.,J. and Rodriguez-Cerezo E., 2009. The global pipeline of new GM crops. *JRC Scientific and Technical Reports*.).
- Topal Ş. 2006. Transgenik Uygulamalar: GDO ve Ürünleriyle ilgili Yönelimler, GMO ve GMG'lerin analizi için çeşitli yöntemler, İstanbul, Cemturun Ofset Matbaası, 4: 98-99.
- Trick H.N., Finer J.J. 1997. SAAT: sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation. *Transgenic Research*, 6(5): 329-336.
- Trick H.N., Finer J.J., 1998. Sonication assisted Agrobacterium-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Reports*; 17(6-7): 482-488.
- Tripathi L.; 2005. Techniques for detecting genetically modified crops and products, *African Journal of Biotechnology*, 4(13): 1472-1479.
- Turhan A., 2008. Soya ve Mısırdaki Genetiği Değiştirilmiş Ürünlerin Belirlenmesi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.
- Yang L., Guo J., Zhang H. et al., 2008. Qualitative and quantitative event specific PCR detection methods for Oxy-235 canola based on the 3' integration flanking sequence., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (6): 1804-1809.
- Zafar, Y. Capacity building in biosafety of genetically modified crops: GMOs (Genetically modified organisms) detection. NIBGE-FAO workshop on GMO Detection. Thailand, 27-31 Oct., 2003.





Gıdalarda Katkı, Tağşiş ve Orijin Belirleme

Determination Of Additives, Adulteration And Origin In Foodstuffs

Rind Kürşat AKTAŞ*
Dr. Aslı ÖZKÖK

Dr. Gülin KÖKSAL
Dr. Aslı Özdem TÜRKOĞLU

Onur BİLBER

*Ulusal Gıda Referans Müdürlüğü
Katkı Tağşiş Orijin Belirleme Laboratuvarı*

ÖZET

Birleşik Uzman Komitesi (Joint Expert Committee on Food Additives-JECFA) tarafından gıda katkı maddeleri üç gruba ayrılmıştır. Bu gruplar A1-2 B1-2 C1-2 olarak düzenlenmiştir. Türk Gıda Kodeksinde de gıda katkı maddeleri kullanımlarına göre 24 ana başlık altında incelenmiştir. Tüm bu gıda maddelerinin kullanım şartları ve taşınması gereken şartlar Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği tebliğlerinde açıklanmıştır.

Gıda güvenliği ve kalitesi açısından katkı maddelerinin ekleneceği gıda, ADI (Günlük Alınabilir Doz) değerleri ve katılabileceği maksimum miktarlar göz önüne alınarak gıda teknolojisinde kullanılması gerekmektedir. Bu bağlamda katkı maddelerinin laboratuvar ortamında denetimi ve takibi son derece önem taşımaktadır.

Gıda katkılarının bulunmaması gereken bir gıdaya ilavesi ile teknolojik özelliklerinin değiştirilmesi mümkün olduğu gibi gıdanın bileşenlerinden birinin veya birkaçının yine gıda özelliği gösteren başka bir madde ile değiştirilmesi de olasıdır. "Tağşiş" olarak ifade edilen ve istenmeyen bu durum, tüketicinin sağlığını tehdit edebilir ve ya üreticinin üretim maliyetlerini aşağı çekerek haksız kazanç sağlamasına, rekabet ortamının bozulmasına ve dolaylı olarak tüketicinin en uygun maliyetle kaliteli gıda maddesine ulaşma hakkının gaspına neden olabilir.

Gıda güvenliği ve kalitesine karşı giderek artan ilgi sonuç olarak tüketicinin kendisine sunulan gıdanın içeriği ve orijini konusunda talepkar olmasını sağlamış ve tüketici haklarını koruyan yasal düzenlemeler yolu ile üreticiyi de bu talepleri karşılayabilecek gıda üretimi metotlarına yönlendirmiştir.

Ülkemizde, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü otoritesi altında Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı bünyesinde kurulan Gıda Katkı Tağış Orijin Belirleme Laboratuvarı, ülke geneline yayılmış 40 gıda kontrol laboratuvarının değişik birimlerinde yapılan katkı, tağış, orijin belirleme analizlerinin tek bir birimde toplanması ve özellikle yeni metotların geliştirilerek etkin denetim faaliyetlerinin desteklenmesini amaç edinmiştir.

Anahtar kelimeler: Gıda katkı maddeleri, Tağış, Orijin, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı.

ABSTRACT

United Professionals Committee (Joint Expert Committee on Food Additives-JECFA) by food additives are divided into three groups. These groups A1-2 B1-2 C1-2 was as organized. Turkish Food Codex food additives in use were examined according to 24 broad headings. All of these terms of use and handling of food items required conditions are described in the Turkish Food Codex Regulation notification.

In terms of food safety and quality of food additives to be added, ADI (Accepted Daily Intake) values and can participate by taking into consideration the maximum amount must be used in food technology. In this context, supervision and monitoring of additives in the laboratory environment are extremely important.

The absence of food additives added to food should be replaced with the technological properties of food components as possible, one or more features of the food still be replaced with another substance is also possible to show. "Adulteration" as expressed and unwanted, this condition of the consumer threatens the health or the manufacturer's production costs down by pulling to gain unfair competitive environment of corruption and indirectly the consumer's optimal cost-quality food reaches the right cause of extortion.

Food safety and quality, against the ever-increasing interest as a result of consumers offered him food and the origin of the content on the subject demanding ensure that consumer rights and protect their legal arrangements via the manufacturer, this demand could meet food production methods ranked the direction.

In our country, Ministry of Agriculture and Rural Affairs General Directorate of Protection and Control under the authority of the National Food Reference Laboratory established at Food Additives, Adulteration, Origin Determining Laboratory, the country is spread across 40 different food control laboratory units the contribution, adulteration, to determine the origin of their analysis in a single unit to gather and especially of new methods by developing effective supervision has aimed to support the activities.

Key words: Food additives, Adulteration, Origin, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Food Reference Laboratory.

GIDALARDA KATKI, TAĞIŞ ve ORİJİN BELİRLEME

En temel insan ihtiyaçlarından birisi olan beslenme, kaliteli ve albenili gıda üretimini de beraberinde getirmiştir. İnsan, bu ihtiyacını karşılamak üzere gıda maddesi bulmak, yetiştirmek hatta avlamak zorunda kalmıştır. Bir şekilde elde ettiği bu gıda maddesini muhafaza etmesi, sadece bir ihtiyacı karşılamak dışında tüketimini bir zevk kaynağı haline getirmesi veya ticari mal olarak değerlendirmek üzere hedef kitlenin tercih etmesini sağlayacak bir takım ek özellikler ilave etmesi gerekmiştir. Tüm bu gereksinimleri karşılamanın en basit ve etkili yollarından birisi gıda katkı maddelerinin kullanılmasıdır.

Uluslararası düzeyde gıda katkı maddelerinin değerlendirilmesi 1955 yılında Cenova'da Birleşmiş Mil-

letlere bağlı Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından ortaklaşa gerçekleştirilen gıda katkıları konferansında başlatılmıştır. Konferans sonucunda kimyasal katkıların teknik kullanımları ve gıda güvenlik tedbirleri ile ilgili uzman komitelerin oluşturulması teklif edilmiş ve Birleşik Uzman Komitesi (Joint Expert Committee on Food Additives; JECFA) kurulmuştur. Günümüzde JECFA tarafından değerlendirilmiş 1500'den fazla gıda katkı maddesi mevcuttur (Anon., 2010b). Türk Gıda Kodeksinde gıda katkı maddeleri "Tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıda ham veya yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan; seçilen teknoloji gereği kullanılan işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamul maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında



Tablo 1. Kullanım Alanlarına Göre Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması.

Sıra No	Gıda Katkı Maddesi	Tanımı
1	Aroma arttırıcılar	Gıdanın mevcut tat ve/veya kokusunu arttıran maddeler
2	Aroma maddesi:	Gıda maddelerine tat ve koku vermek ve bunları geliştirmek için kullanılan maddeleri ve bunların üretiminde kullanılan kaynak materyaller
3	Asitler	Asitliği arttıran ve/veya gıdada ekşi bir tat oluşumunu sağlayan maddeler
4	Asitlik düzenleyiciler	Gıdaların asitlik veya alkaliliğini değiştiren veya kontrol eden maddeler
5	Ayırıcılar	Metalik iyonlarla kimyasal kompleks oluşturan maddeler
6	Emülgatörler	Bir gıda maddesinde, yağ ve su gibi iki veya daha fazla fazın homojen bir karışımını oluşturan veya sabit tutan maddeler
7	Emülgatör tuzları	Gıdalarda bulunan proteinleri dispers hale getirerek yağ ve diğer bileşenlerin homojen dağılımını sağlayan maddeler
8	Hacim arttırıcılar	Gıdaların faydalanılabilir enerji değerini arttırmadan, gıdaların hacmini arttıran maddeler
9	İtici gazlar	Gıdanın, bulunduğu kaptan dışarı çıkmasını sağlayan hava dışındaki gazlar
10	Jelleştiriciler	Jel oluşumu ile gıdada farklı bir tekstür oluşturan maddeler
11	Kabartıcılar	Gaz oluşturarak hamurun hacmini arttıran madde veya madde kombinasyonları
12	Köpük oluşturmalar	Sıvı veya katı gıdalarda gaz fazın homojen dağılımını sağlayan maddeler
13	Köpüklenmeyi önleyiciler	Köpüklenmeyi azaltan veya önleyen maddeler
14	Koruyucular	Gıdaların mikroorganizmalarla bozulmalarını önleyerek raf ömürlerinin uzatılmasını sağlayan maddeler
15	Kıvam arttırıcılar	Gıdanın kıvamını arttıran maddeler
16	Modifiye nişastalar	Fiziksel veya enzimatik uygulamaya, asit veya alkali inceltme veya ağartmaya tabi tutulmuş olsun veya olmasın yenilebilir nişastaların bir veya daha fazla kimyasal işleme tabi tutulması ile elde edilen maddeler
17	Nem tutucular	Gıda maddelerinin düşük rutubetli ortamdan etkilenip kurummasını önleyen veya toz gıdaların sıvı ortamlarda erimesini kolaylaştıran maddeler
18	Oksitlenmeyi önleyiciler	Oksidasyonun neden olduğu bozulmaları önleyerek gıdaların raf ömürlerinin uzatılmasını sağlayan maddeler
19	Parlatıcılar	Yağlayıcılar da dahil gıdaların dış yüzeyine uygulandığında parlak bir görünüm veren veya koruyucu bir tabaka sağlayan maddeler
20	Renklendiriciler	Tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıdalarda ana bileşen olarak kullanılmayan, gıdaya renk artırıcı veya renk düzenleyici olarak katılan maddeler
21	Sertleştiriciler	Meyve ve sebzelerin dokularını sert veya gevrek tutan veya mevcut jelleştiriciler ile reaksiyona girerek jel oluşumunu sağlayan veya güçlendiren maddeler
22	Stabilizatörler	Gıdaların fiziko-kimyasal durumlarını korumalarını sağlayan, iki veya daha fazla karıştırılmaz fazın homojen dağılımını ve gıdaların var olan renklerini koruyan veya kuvvetlendiren maddeler
23	Tatlandırıcılar:	Gıdalarda tatlı bir lezzet sağlayan, şeker dışındaki maddeler
24	Topaklanmayı önleyiciler	Gıda partiküllerinin birbirine yapışması eğilimini azaltan veya önleyen maddeler

gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek veya istenmeyen değişikliklere engel olmak ve düzeltmek amacıyla kullanılmasına izin verilen maddeler” olarak tanımlanmıştır.

JECFA tarafından gıda katkı maddeleri üç gruba ayrılmıştır. Bu gruplar A1-2 B1-2 C1-2 olarak düzenlenmiştir (Anon., 2010a).

A1 grubunda bulunan tüm maddelerin değerlendirilmeleri tamamlanmış ve günlük alınabilir dozlar (ADI-Accepted Daily Intake) belirlenmiştir. Bunlar kullanımına izin verilen maddelerdir. A2 grubunda bulunan maddelerin değerlendirmeleri henüz tamamlanmamış ancak günlük kullanım miktarları belirlenerek, geçici olarak kullanımına izin verilmiş olan maddelerdir (Anon., 2010a).

B grubunda bulunan katkı maddelerinin değerlendirilmesi tamamlanmamıştır. B1 grubundaki maddelerde ise değerlendirmeler başlanmış olup ancak günlük alınabilir miktarları tespit edilmemiştir. Üretimindeki öneminden dolayı teknolojik açıdan kullanımlarına izin verilen maddelerdir. B2 grubunda ise hiçbir değerlendirmeye tabi tutulmamış, ancak değerlendirmeye aday olan katkı maddeleri bulunur (Anon., 2010a).

C listesi olumsuz yapı listesidir. C1 ve C2 gruplarında toksikolojik verilere göre kullanımı tamamen sakıncalı olanlar ya da kullanımına kısmen izin verilenler yer alır. C1 listesi gıda katkısı olarak kullanımları insan sağlığı için zararlı olarak kabul edilen katkı maddeleridir. ADI değerleri yoktur. C2 listesi kullanımı ancak belirli amaçlar için sınırlandırılmış olan katkı maddelerini içerir (Anon., 2010a). Türk Gıda Kodeksinde de gıda katkı maddeleri kullanımlarına göre 24 ana başlık altında incelenmiştir (Tablo 1)

Tüm bu gıda maddelerinin kullanım şartları ve taşınması gereken şartlar Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği tebliğlerinde açıklanmıştır. Bazı katkı maddelerinin kullanım miktarı iyi teknolojinin gerektirdiği miktar (Good Manufacturing Processes=GMP) olarak tanımlanmaktadır. Bu durumda kullanım miktarı (maksimum doz) Quantum Satış (QS) (herhangi bir maksimum seviyenin belirtilmemesi) olarak ifade edilir. Bununla beraber; bir katkı, özgün bir gıda maddesinde QS maksimum miktarı ile izin verilirken aynı katkı maddesinin farklı bir gıdadaki miktarı sınırlandırılmış olabilir (Anon., 2010c).

Katkı maddelerinin her açıdan sağladığı faydanın maksimumda tutulması ancak insan sağlığının gözetilmesiyle mümkündür. Gıda güvenliği ve kalitesi açısından katkı maddelerinin ekleneceği gıda, ADI değerleri ve katılabileceği maksimum miktarlar göz önüne alınarak gıda teknolojisinde kullanılması gerekmektedir. Bu

başlamda katkı maddelerinin laboratuvar ortamında denetimi ve takibi son derece önem taşımaktadır.

Gıda katkılarının bulunmaması gereken bir gıdaya ilavesi ile teknolojik özelliklerinin değiştirilmesi mümkün olduğu gibi gıdanın bileşenlerinden birinin veya birkaçının yine gıda özelliği gösteren başka bir madde ile değiştirilmesi de olasıdır. “Tağşış” olarak ifade edilen ve istenmeyen bu durum, tüketicinin sağlığını tehdit edebilir veya üreticinin üretim maliyetlerini aşağı çekerek haksız kazanç sağlamasına, rekabet ortamının bozulmasına ve dolaylı olarak tüketicinin en uygun maliyetle kaliteli gıda maddesine ulaşma hakkının gaspına neden olabilir. Tağşış için kullanılan tağşış ajanının gıda özelliği taşıması durumu da “taklit” olarak adlandırılabilir. Bu konuda yakın zamanda yaşanan en çarpıcı örneklerden biri Çin’de bebek ölümlerine sebep olan bebek mamalarının melamin ile tağşış olayıdır. Düşük kalitedeki süt tozunun bebek mamaları üretim sürecinde hammadde olarak kullanılabilmesi için melamin ilavesi ile azot içeriğinin optimizasyonu prensibi ile gerçekleştirilen bu tağşış işlemi Tarım Bakanlığı bünyesindeki laboratuvarlarda LC-MS/MS metotları kullanılarak tespit edilebilmektedir. Bu olay tağşışın insan sağlığına zararlı olduğu durumlara örnektir. Ekonomik zarara neden olan tağşış türlerine bal üretiminde yüksek fruktozlu mısır şurubu (HFCS) kullanılması veya arının şekerle beslenmesi yolu ile balın tağşışi örnek gösterilebilir. Arıya şeker yedirerek veya uygun katkı maddeleri ile HFCS muamelesi ile elde edilen balın maliyeti, doğal bal üretim süreci ile kıyaslandığında çok düşük olmaktadır. Düşük maliyetlerle üretilen balın doğal balla aynı ticari şartlar altında tüketiciye sunulması tüketicinin tercih hakkının etkilenmesi yolu ile aldatılması, daha düşük kaliteli ürünü, kalite/fiyat skalasına göre daha yüksek bir bedel ödeyerek satın almasına neden olmaktadır. Bu alanda yapılması muhtemel tağşış bakanlığımız laboratuvarlarında izotop oranları kütle spektrometresi (IRMS) ve yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) metotları ile tespit edilebilmektedir.

Gıda güvenliği ve kalitesine karşı giderek artan ilgi sonuç olarak tüketicinin kendisine sunulan gıdanın içeriği ve orijini konusunda talepkar olmasını sağlamış ve tüketici haklarını koruyan yasal düzenlemeler yolu ile üreticiyi de bu talepleri karşılayabilecek gıda üretimi metotlarına yönlendirmiştir. Rekabet ortamının tesis edilmesi, kamu sağlığının korunması için üreticinin gıda üretim sürecinde kullandığı hammaddenin orijini de önem kazanmış, tağşış tanımı bu doğrultuda “gıda içerisine gıdada bulunmaması gereken katkı maddelerinin



katılması, bir veya daha fazla gıda bileşenin gıda özelliği gösteren veya göstermeyen düşük maliyetli benzer bir madde ile değiştirilmesi, hammadde veya gıdanın orijini hakkında yanlış beyan verilmesi” olarak genişletilmiştir (Da-Wen, 2008). Avrupa birliği yasalarında bu kavram protected designation of origin (PDO), protected geographical indication (PGI) ve Traditional Speciality Guaranteed (TSG) olarak ifade edilmiş ve gıdanın coğrafik orjinini ve ticari garantiyi de kapsamıştır. Yukarıda anlatılan balda tağşiş tanımı kapsamında HFCS ile balın tağşişinin yanında arıyı şekerle besleyerek doğal bal üretimi prosesine müdahale edilmesi gibi et ürünlerinde değişik türlerin karışımının kullanılması da gıda orijini ile yapılan tağşişe örnektir. Karışım etlerden üretilen salam, sucuk, sosis gibi et ürünlerinde kıyasla daha düşük maliyetli olan türün baskın kullanılması ve etiket üzerinde durumun açıklanmaması, kesim sonrasında dahi birbirinden ayrılması oldukça zor olan at, eşek gibi hayvan etlerinin bu ürünlere işlenerek ekonomik fayda sağlanırken halk sağlığına zarar verilmesi gibi durumlar çoğu zaman haberlere konu olmuştur. Et ve et ürünlerinde yapılabilecek bu tip tağşişler ancak laboratuvar şartlarında gerçekleştirilecek spektroskopik genetik, histolojik muayeneleri de kapsayan geniş spektrumlu orijin belirleme analizleri ile mümkündür.

Ülkemizde, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü otoritesi altında Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı bünyesinde kurulan Gıda Katkı Tağşiş Orijin Belirleme Laboratuvarı, ülke geneline yayılmış 40 gıda kontrol laboratuvarının değişik birimlerinde yapılan katkı, tağşiş, orijin belirleme analizlerinin tek bir birimde toplanması ve özellikle yeni metodların geliştirilerek etkin denetim faaliyetlerinin desteklenmesini amaç edinmiştir. Gıdalarda katkı, tağşiş, orijin belirleme çok geniş konuları kapsayan bir alandır. UGRL, köklü analizleri barındırdığı gibi her geçen gün araştırma yapılmasına ve yeni laboratuvar analizlerine ihtiyaç duyulan bu alanda söz sahibi olmayı hedeflemektedir.

KAYNAKLAR

- Anonim, 2010 a. Erişim adresi: www.kimyaevi.org Erişim tarihi: 12.03.2010
- Anonim, (2010b). Erişim adresi: http://www.fao.org/ag/agn/agns/jecfa_history_en.asp Erişim tarihi: 11.02.2010
- Anonim, 2010c. Erişim adresi: <http://www.gidakat.org.tr/?p=8&l=tr> Erişim tarihi: 02.01.2010
- Da-Wen Sun, National University of Ireland, Earlsfort Terrace, Dublin, 720 p., JUN-2008 modern techniques for food authentication.





Pestisit Analizlerine Genel Bakış

General Prospect To Pesticide Analysis

Dr. Özge Çetinkaya Açar*

Özge Metin

Ayşe Avcı

Fazıl Diler

Sevilay Kırış

Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı

Kalıntı Analizleri Bölümü, Pestisit Analizleri Birimi

ÖZET

Tüketici açısından neden oldukları potansiyel sağlık riskleri nedeniyle, gıda maddelerinde pestisit ve pestisit metabolitleri kalıntılarının analiz edilmesi ve miktarlarının tespit edilen maksimum kalıntı limitlerinin (MRL) altında olması oldukça önem taşımaktadır. Pestisit analizlerinde mümkün olan en çok sayıda maddeyi bir arada analiz etmek üzere çoklu kalıntı analiz metotları (MRM) geliştirilmiştir. Pestisit analizlerinde kullanılmak üzere geliştirilmiş çok farklı metotlar bulunmakla birlikte, genel olarak pestisit analiz yöntemlerinde dört temel aşama söz konusudur. Bunlardan ilk aşama örneğin hazırlanması olup, matriksin katı ya da sıvı olmasına göre örneğe çeşitli ön işlemler (parçalama, çalkalama, karıştırma vb.) uygulanır. İkinci aşama ekstraksiyon aşamasıdır ve bu aşamada pestisit kalıntılarının örnek yapısından ayrılarak toplanmasını sağlamak üzere çeşitli yöntemler uygulanır. Kullanılacak ekstraksiyon yönteminin belirlenmesinde analitlerin sudaki çözünürlükleri, polariteleri, örnekteki yağ miktarı önem taşımaktadır. Ekstraksiyon aşamasını takiben, ekstrakt içerisinde kalan ve analiz sonuçlarını ve analizin yapılacağı cihazı olumsuz etkileyen büyük moleküllü bileşiklerin uzaklaştırılması amacıyla çeşitli temizleme (clean-up) yöntemleri uygulanır. Pestisit kalıntı analizlerinde en sık kullanılan yöntemler gaz kromatografisi (GC) ve sıvı kromatografisi (LC) yöntemleridir. Bunlarla birlikte, kütle spektrometresi (MS) ile birleştirilmiş gaz ya da sıvı kromatografisi cihazlarının kullanıldığı metotlar (GC/MS, GC/MS/MS, LC/MS, LC/MS/MS) yüksek hassasiyet ve seçicilikleri nedeniyle pestisit kalıntı analizlerinde en yaygın kullanılan metotlar olarak öne çıkmaktadır. Pestisit kalıntı analizlerinde en sık karşılaşılan sorun matriks etkisidir. Matriks etkisini ortadan kaldırmak üzere öne sürülen birçok yöntem bulunmakla birlikte, en yaygın kullanım alanı bulan yaklaşım matriks ile birleştirilmiş kalibrasyon standartları kullanılmasıdır.

Anahtar kelimeler: Pestisit, MRL, pestisit analizleri, ekstraksiyon, matriks etkisi

ABSTRACT

Due to the possible health risks, analysis of residues of pesticides and their metabolites in foods and ensuring their amounts to be below maximum residue limits (MRL) is very important. Multiresidue methods (MRM) were developed in order to analyze maximum amount of pesticides together. Although there are many different methods developed for pesticide analysis, generally pesticide analysis methods were composed of four main steps. The first step is sample preparation and some pretreatments (blending, stirring, mixing etc.) are applied according to the physical state of sample. Second step is extraction and some methods are used in order to extract the pesticide residues from the matrix. The solubilities and polarities of the pesticide residues and the amount of fat in the sample is important to decide the suitable extraction method. After the extraction step, various clean-up procedures are applied for separation of the impurities from the extract, in order to ensure the certainty of the results of analysis and to protect the equipment. The most common methods used in pesticide analysis are gas chromatography (GC) and liquid chromatography (LC). Additionally, the methods in which gas or liquid chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS, GC/MS/MS, LC/MS, LC/MS/MS) became the most common methods in pesticide residue analysis with their high precision and selectivity. The most common problem encountered in pesticide residue analysis is matrix effect. Despite there are many suggested methods to overcome the matrix effect, the most commonly applied method is to use matrix-matched calibration standards.

Keywords: Pesticide, MRL, pesticide analysis, extraction, matrix effect

GİRİŞ

Pestisit, zirai mücadele uygulamalarında kullanılan her türlü kimyasal maddeyi ifade etmektedir. Günümüzde pestisit ya da pestisit metaboliti (parçalanma ya da dönüşüm ürünü) olarak tanımlanmış 500'ün üzerinde madde bulunmaktadır. Pestisitler çok farklı özelliklerine göre sınıflandırmaya tabi tutulmakla birlikte, en yaygın kullanılan sınıflandırmalar, moleküler yapılarında bulunan fonksiyonel gruplara (inorganik, organik klorlular, organik fosforlular, karbamatlar, organik azotlular, organik kükürtlüler gibi) ya da hedef zararlılara (insektisitler, fungusitler, herbisitler, akarisitler gibi) göre yapılan sınıflandırmalardır.

Pestisitler, çeşitli zararlıların gelişimini engelleyerek ve hastalıkların önüne geçerek tarımsal verimliliği artırmak amacıyla tarımsal ürünlere uygulanan maddelerdir. Ancak diğer taraftan, tüketici açısından ortaya koydukları potansiyel sağlık riskleri nedeniyle kullanım miktarlarının mümkün olan en düşük seviyede tutulması ve son ürünlerdeki kalıntı miktarlarının belirli seviyelerin altında olması gerekmektedir (Araoud ve ark.,2007).

İkinci Dünya Savaşı'nın ardından ortaya çıkan gıda ihtiyacını karşılamak üzere tarımda pestisit kullanımının yaygınlaşması ile birlikte, gıda ürünleri, toprak ve suda bu kimyasalların ve metabolitlerinin kalıntılarının ortaya çıkması sorunu baş göstermiş ve bu kalıntı miktarlarının kontrolüne yönelik yasal düzenlemeler hazırlanmaya başlanmıştır (Ahmed, 2001, Kruve ve ark., 2008, SANCO, 2004). İyi tarım uygulamaları ve kabul

edilebilir günlük alım miktarı değerleri temel alınarak belirlenen en yüksek pestisit kalıntı limiti 'Maksimum Kalıntı Limiti (MRL, Maximum Residue Level)' olarak adlandırılmaktadır. Ülkemizde pestisitlerin MRL değerlerine yönelik yasal düzenlemeler, 396/2005/EC sayılı Avrupa Birliği Parlamentosu ve Konsey Tüzüğü'nün ilgili hükümleri dikkate alınarak Avrupa Birliği'ne uyum çerçevesinde hazırlanan 'Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Bulunmasına İzin Verilen Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Tebliği'nde yer almaktadır.

PESTİSİT ANALİZLERİ

Pestisit analizlerinde analiz edilecek numunelerin alınma şekli, nakliyesi, işlenmesi ve depolanması analiz sonuçlarını etkilemektedir. Bu nedenle numuneler 2002/63/EC Direktifine ve 'Gıda Maddelerinde Pestisit Kalıntılarının Resmi Kontrolü İçin Numune Alma Metotları Tebliği'ne (2006/51) göre alınmalıdır. Ayrıca numunelerdeki pestisit kalıntılarının, 'Gıda ve Yemlerde Pestisit Kalıntı Analizine Yönelik Metot Validasyonu ve Kalite Kontrol Prosedürü'ne (SANCO/10684/2009) göre analiz edilmesi gerekmektedir.

Pestisit analizleri genel olarak dört temel aşamada gerçekleştirilir: (1) Örnek (matriks) hazırlama, (2) Ekstraksiyon, (3) Temizleme (clean-up) ve (4) Analiz

1.ÖRNEK HAZIRLAMA

Pestisit analizlerinde, matriksin yapısına bağlı olarak çeşitli ön işlemler uygulanmaktadır. Analiz yapılacak gıda maddesi katı madde ise (meyve sebze gibi), tüm örneği temsil edecek büyüklükte örnek tartılarak



homojenize edilir. Homojenizasyon işlemi oldukça önem taşımaktadır ve örnek yapısına bağlı olarak bir mikser, parçalayıcı, çalkalayıcı, karıştırıcı ya da sonikatör kullanılarak gerçekleştirilebilir. Isıya duyarlı pestisitlerin bozulmasını önlemek amacıyla bu aşamada kuru buz veya sıvı azot kullanılabilir. Sıvı örnekler için (süt gibi) parçalama işlemine gerek kalmamakla birlikte, mikser, çalkalayıcı, karıştırıcı kullanılarak örnek homojenliğinin sağlanması gerekmektedir.

2.EKSTRAKSİYON

Pestisit analizlerinde kullanılacak ekstraksiyon yöntemi belirleyen en önemli parametre, analitin polaritesi ve pestisitlerin sudaki çözünürlükleridir. Diğer taraftan, çalışılan matriksin yapısı, özellikle de yağ içeriği, izolasyon, temizleme ve analizde uygulanacak metotun belirlenmesi açısından son derece önem taşımaktadır. Yapısında % 2'den fazla yağ içeren örnekler yağlı örnek olarak kabul edilmektedir (Ahmed, 2001). Yağsız örnekler için ise içerdikleri su miktarı uygulanacak ekstraksiyon yönteminin belirlenmesinde önem taşımaktadır.

Çoklu kalıntı analizlerinde karşılaşılan en önemli problem, analiz edilecek maddelerin polarite aralığı genişledikçe matriksden kaynaklanan bulaşanların da artmasıdır. Tüm matriks çeşitlerinden bütün pestisitleri ekstrakte edebilecek tek bir metot bulunmamaktadır (Lehotay, 1997, Ahmed, 2001). Çoklu analizlerinde kullanılacak metotun geliştirilmesinde, mümkün olan en az matriks bulaşanına sebep olacak şekilde mümkün olan en fazla sayıda pestisit kalıntısını analiz etmeye

olanak sağlayan polarite aralığının ne olması gerektiği ve bu seçiciliğin sağlanabilmesi için geri kazanım oranlarından ne kadar fedakarlık yapılabileceği noktaları önem taşımaktadır.

Meyve ve sebzeler ile tahıl örnekleri genellikle tek bir organik bir çözücü, çözücü karışımları, su ya da pH değeri ayarlanmış su ile karıştırılarak ekstrakte edilir (Ahmed, 2001, Lehotay, 1997). En sık kullanılan organik çözücüler asetronitril, metanol, aseton ve etil asetatıdır. Sıvı örnekler, gerekirse su ile seyreltilerek doğrudan ekstrakte edilirler. Hayvansal kaynaklı örneklerde analiz edilecek pestisitler genellikle yağda birikirler. Bu tip örneklerin ekstraksiyonunda ilk aşama yağın matriksden uzaklaştırılmasıdır. Uzaklaştırılan yağ daha sonra uygun bir çözücüde tekrar çözündürülerek analizlerden uzaklaştırılır.

Pestisit kalıntılarının ekstraksiyonunda matriks yapısına ve analiz edilecek bileşiklere bağlı olmak üzere çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Soxhlet ekstraksiyonu (SOX), sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE, liquid-liquid extraction), katı faz ekstraksiyonu (SPE, solid phase extraction), katı faz mikro-ekstraksiyonu (SPME, solid phase micro-extraction), matriks-katı faz dağılımı (MSPD, matrix-solid phase dispersion), süperkritik sıvı ekstraksiyonu (SFE, supercritical fluid extraction), hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE, accelerated solvent extraction), mikrodalga ekstraksiyonu (MAE, microwave-assisted extraction) kullanılan başlıca yöntemlerdir (Tsipi ve ark., 1999, Lambropoulou ve Alba-

Tablo 1: Pestisit Kalıntı Analizlerinde kullanılan Ekstraksiyon ve Temizleme (Clean-up) Teknikleri ve Uygulandıkları Temel Matriksler, Kapsamları, Avantaj ve Sınırlamaları (Ahmed,2001)

Teknik	Ekstraksiyon	Temizleme	Temel matriks, kapsam, avantaj, sınırlamalar
LLE	+	+	İşlenmiş gıdalar, sıvılar, mahsuller, bitkisel ürünler
SPE -Kartuş -GCB	+	(+)	İşlenmiş gıdalar, sıvılar, mahsuller, Emülsiyon olmaz, az miktarda organik çözücü harcanır, otomatize edilebilir
SPME	+	(+)	İşlenmiş gıdalar, sıvılar, mahsuller. Organik solvent kullanılmaza, otomatize edilebilir
MSPD	+	+	Bitkisel ürünler, işlenmiş gıdalar, sıvılar, yemler. Emülsiyon olmaz
SFE	+	+	Tahıllar, bitkisel ürünler. Ekolojik olarak toksik olmayan akışkan (CO ₂) kullanılır. Ekstraksiyon miktarları küçüktür, kullanımı pahalıdır.
ASE	+	(+)	İşlenmiş gıdalar, mahsuller, bitkisel ürünler. Az miktarda çözücü kullanılır, otomatize edilebilir.
MAE	+	(+)	İşlenmiş gıdalar, mahsuller, bitkisel ürünler
GPC	(+)	+	Fazla miktarda yağ içeren matrikslerde uygundur. Otomatize edilebilir.

+ = Ana etki (+) = İkincil etki

nis, 2007, Barriada-Pereira ve ark., 2003, Adou ve ark., 2001, Beyer ve Biziuk, 2008, Ahmed, 2001).

Pestisit kalıntı analizlerinde kullanılan ekstraksiyon ve temizleme (clean-up) teknikleri ve uygulandıkları temel matriksler, kapsamları, avantaj ve sınırlamaları Tablo 1'de verilmektedir.

3. TEMİZLEME (CLEAN-UP)

Hangi ekstraksiyon yöntemi kullanılırsa kullanılsın örnek ekstraktı içerisinde lipidler, proteinler, karbohidratlar, pigmentler gibi yüksek molekül ağırlıklı bileşikler kalmaktadır ve hem doğru analiz yapılabilmesi ve düşük tespit limitlerine ulaşılabilmesi, hem de analiz yapılan cihazın korunmasının sağlanması için bu bileşiklerin ortamdan uzaklaştırılması gerekir (Ahmed, 2001, Beyer ve Biziuk, 2008). Bu amaçla ekstraksiyon sonrasında ekstraktın saflaştırılması amacıyla temizleme (clean-up) işlemleri uygulanır. En sık kullanılan temizleme yöntemleri sabunlaştırma, jel kromatografi (GPC, gel-permeation chromatography), adsorpsiyon kromatografisi (aluminyum, silikajel ya da fluorisil), sıvı-sıvı ayırması (LLE, liquid-liquid partitioning), asit uygulaması, buhar destilasyonu ya da düşük sıcaklıkta çöktürmedir ve bu yöntemler tek başına ya da bir arada kullanılabilmektedir (Ahmed, 2001, Araoud ve ark., 2007, Beyer ve Biziuk, 2008).

4. ANALİZ

Pestisit analizlerinde zaman, kimyasal ve sarf malmeye ve masrafların azaltılması açısından mümkün olan en çok sayıda maddeyi bir arada analiz etmek önem taşımaktadır. Bu amaca yönelik olarak çoklu kalıntı analiz metotları (MRM, Multiresidue Methods) geliştirilmektedir (Lehotay, 1997). Analiz edilen maddelerin polarite, çözünürlük, uçuculuk gibi özelliklerinin farklı olması nedeniyle bir arada ekstrakte ve analiz edilmeleri zor olduğundan çoklu kalıntı analiz metotlarının geliştirilmesi oldukça zordur (Araoud ve ark., 2007).

Pestisit kalıntı analizlerinde kullanılmak üzere çok sayıda analitik metot geliştirilmiştir. Pestisit kalıntı analizleri, elektron yakalama dedektörü ((ECD, electron-capture dedector), azot-fosfor dedektörü (NPD, nitrogen-phosphorus dedector), alev fotometrik dedektör (FPD, flame photometric detector) gibi farklı dedektörler içeren gaz kromatografisi (GC, gas chromatography) ve diyot dizini dedektör (DAD, diode array dedector), floresans dedektör (FD, fluorescence dedector) gibi dedektörler içeren sıvı kromatografisi (LC, liquid chromatography) cihazları ile gerçekleştirilebilmektedir (Lopez ve ark., 1998, Dömötörova ve Matisova, 2008, Adou ve ark., 2001). Bunların dışında, kütle spektrometresi (MS, mass spectrometry) ile birleştiril-

miş gaz ya da sıvı kromatografisi cihazlarının kullanıldığı metotlar (GC/MS, GC/MS/MS, LC/MS, LC/MS/MS), yüksek hassasiyet ve seçicilikleri nedeniyle pestisit kalıntı analizlerinde en yaygın kullanılan metotlar olarak öne çıkmaktadır (MartinezVidal, 2002, Huskova ve ark., 2009, Zrostlikova ve ark., 2003). Uçucu olmayan ve ısıya duyarlı pestisitlerin GC ile analizleri zor olduğundan, bu tip pestisit kalıntılarının analizinde LC kullanılmaktadır (Kruve ve ark., 2008, Araoud ve ark., 2009).

Gıda maddelerinde çoklu pestisit kalıntı analizlerinde en sık karşılaşılan problem matriks etkisidir (Schenck ve Lehotay., 2000, Kruve ve ark., 2008, Tiryaki, 2009). Matriks etkisi, gıda maddesinin yapısından kaynaklanan bileşikler nedeniyle analiz edilen pestisit kalıntılarında ait sinyallerde değişim meydana gelmesidir. Matriks etkisinin gerçek mekanizması bilinmemekle birlikte, uçucu olmayan bileşenlerden ya da yüksek yüzey aktivitesine sahip bileşiklerden ileri geldiği ortaya konmuştur. Matriks etkisi ayrıca analiz edilen bileşiğin kimyasal yapısı ile de yakından ilgilidir. Polar bileşiklerin iyonlaşma verimlerinin, daha az polar bileşiklere oranla matriksten kaynaklanan bileşiklerden daha fazla etkilendiği belirlenmiştir (Kruve ve ark., 2008). Bununla birlikte, kullanılan iyonlaşma kaynağı (APCI, Atmospheric Pressure Chemical Ionization ya da ESI, Electrospray Ionization), iyonlaştırma modu ya da akış hızı gibi analiz parametrelerinin de matriks etkisinin derecesini etkilediği bilinmektedir. Matriksten ileri gelen bileşiklerden kaynaklanan girişim genellikle analiz edilen bileşiklere ait piklerin şeklinin bozulmasına sebep olur. Matriks etkisinin söz konusu olup olmadığı, çözücü içerisindeki analitin piki ile aynı miktar analitin örnek ekstraktı içinde elde edilen piki karşılaştırılması ile tespit edilebilir (Tiryaki, 2009).

Matriks etkisinin dikkate alınmasını sağlamak üzere benimsenen bazı yaklaşımlar vardır. Bu amaçla önerilen yaklaşımlardan biri standart ekleme metodudur; ancak bu yöntem enjeksiyon sayısının artırılmasını gerekli kılmaktadır. Matriks etkisi genellikle bileşik yapısına bağlı olduğundan, çoklu pestisit analizlerinde iç standart kullanımı yaygın değildir. Bu amaçla kullanılabilecek ideal bir iç standart izotopik olarak işaretlenmiş standart olabilir ancak bu tip standartlar mevcut değildir ya da son derece pahalıdır (Kruve ve ark., 2008, Kirchner ve ark., 2008). Bununla birlikte, izotopik olarak işaretlenmiş standartların da matriks etkisine sebep olabileceği bildirilmiştir (Liang et al., 2003). Matriks etkisini ortadan kaldırmak üzere SANCO tarafından önerilen yöntem, matriks ile birleştirilmiş kalibrasyon stan-



dartları kullanılmasıdır. Muhtemel tüm matriksler için ayrı ayrı standart çözeltilerin hazırlanması gerçekçi bir yaklaşım olmadığından, bir grup matriksi temsil edecek matriksler kullanılmaktadır. Tüm bu yaklaşımlar, matriks etkisinin ortadan kaldırılmasını değil hesaba katılmasını sağlamaktadır. Matriks etkisini en aza indirmenin yolu örnek hazırlama tekniklerinin modifiye edilmesi ya da kromatografik analiz koşullarının değiştirilmesi ile mümkün olabilmektedir (Kruve ve ark., 2008).

Kruve ve ark. (2008), en düşük matriks etkisi ve en yüksek geri kazanım değerlerini veren metodu belirlemek üzere, çeşitli meyve ve sebze örneklerinde üç farklı metotla (Luke metodu (AOAC 985.22), QuEChERS metodu (AOAC 2007.01) ve matris-katı faz dağılım metodu (MSPD, Matrix Solid Phase Dispersion)) 14 adet pestisit kalıntısını LC/MS de analiz etmişlerdir. Genel olarak Luke ve QuEChERS metotları tüm sonuçlarda iyi ve yeterli bulunmuştur. En düşük matriks etkisine sebep olan metot Luke metodu olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, QuEChERS metodunda geri kazanım değerleri oldukça yüksek olduğundan tercih edilmektedir. MSPD metodunda ise matriks etkisi düşük fakat geri kazanım değerleri kabul edilemez düzeyde düşük olarak tespit edilmiştir. Çalışmada metot validasyonunda matriks etkisi ve geri kazanım değerlerinin birlikte değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır (Kruve ve ark., 2008)

SONUÇ

Zirai mücadele uygulamalarında kullanılan ve potansiyel sağlık riskleri taşıması nedeniyle gıda maddelerindeki kalıntı miktarlarının belirlenen Maksimum Kalıntı Limitlerinin (MRL) altında olması gereken pestisitlerin analizlerinde, matriksin yapısına ve analiz edilecek pestisitlerin polaritesi ve sudaki çözünürlüklerine bağlı olarak çok çeşitli metotlar kullanılabilir. Bu metotlarda uygulanan işlemler, genel olarak örnek (matriks) hazırlama, ekstraksiyon, temizleme (clean-up) ve analiz aşamalarından oluşmaktadır. Pestisit kalıntı analizlerinde en önemli nokta, analiz edilecek matrikse ve pestisit çeşidine göre uygulanabilecek en uygun metodun seçilmesidir.

KAYNAKLAR

Adou K., Bontoyan W.R., Sweeney P.J. 2001. Multiresidue method for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables by accelerated solvent extraction and capillary gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (9): 4153-4160.

Ahmed F.E. 2001. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. *Trends In Analytical Chemistry*, 20(11): 649-660.

Araoud M., Douki W., Rhim A., Najjar M. F., Gazzah N. 2007. Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 42(2): 179-187.

Barriada-Pereira M., Concha-Grana E., Gonzalez-Castro M.J., Muniategui-Lorenzo S., Lopez-Mahia P., Prada-Rodriguez D., Fernandez-Fernandez E. 2003. Microwave-assisted extraction versus Soxhlet extraction in the analysis of 21 organochlorine pesticides in plants. *Journal of Chromatography A*, 1008: 115-122.

Beyer A., Biziuk M. 2008. Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. *Food Chemistry*, 108: 669-680.

Dömötöröva M., Matisova, E. 2008. Fast gas chromatography for pesticide residues analysis. *Journal of Chromatography A*, 1207: 1-16.

Huskova R., Matisova E., Hrouzkova S., Svorec L. 2009. Analysis of pesticide residues by fast gas chromatography in combination with negative chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216: 6326-6334.

Kirchner M., et al., 2008. Fast gas chromatography for pesticide residues analysis using analyte protectants. *Journal of Chromatography A*, 1186: 271-280.

Kruve A., Künnapas A., Herodes K., Leito I. 2008. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1187, 58-66.

Lambropoulou D.A., Albanis T.A. 2007. Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70: 195-228.

Lehotay S.J. 1997. Supercritical fluid extraction of pesticides in foods. *Journal of Chromatography A*, 785: 289-312.

Liang H.R., Foltz R.L., Meng M., Benneth P. 2003. Ionization enhancement in atmospheric pressure chemical ionization and suppression in electrospray ionization between target drugs and stable-isotope-labeled internal standards in quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17(24): 2815-2821.

Lopez F.J., Beltran, J., Forcada, M., Hernandez, F. 1998. Comparison of simplified methods for pesticide residue analysis Use of large-volume injection in capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 823: 25-33.

MartinezVidal J.L., Arrebola, F.J., Mateu-Sanchez M. 2002. Application to routine analysis of a method to determine multiclass pesticide residues in fresh vegetables by gas chromatography/ tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16: 1106-1115.

SANCO. 2004. SANCO/825/00 rev.7, 17/03/2004. Guidance document on residue analytical methods.

Tiryaki O. 2009. Pestisit kalıntı analizlerinde örnek matrisi sorunu ve çözüm yolları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 25 (1-2): 456-478.

Tsipi D., Triantafyllou M., Hiskia A. 1999. Determination of organochlorine pesticide in honey, applying solid phase extraction with RP-C18 material. *Analyst*, 124: 473-475.

Zrostlikova J., Hajslova J., Kovalczuk T., Stepan R. Poustka J. 2003. Determination of seventeen polar/thermolabile pesticides in apples and apricots by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 86: 612-22.





Mikotoksinler ve Toksik Etki Mekanizmaları

Mycotoxins And Their Mechanism Of Toxicity

Dr. Mustafa Alp ÇETİNKAYA*

Mutluay ERGÜL

*Ulusal Gıda Referans Müdürlüğü
Kalıntı Analizleri Bölümü, Mikotoksin Birimi*

ÖZET

Başlıca *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinsine bağlı olan toksijenik küfler, ağırlıklı olarak tarımsal önemi olan bitkilerde hasat öncesinde veya depolama esnasında gelişmektedir. Bu toksijenik küflerin sekonder metabolitleri olarak, mikotoksinler, insan ve hayvanlarda toksik etkilerini göstermektedir. Birkaçı halk sağlığı ve tarım-ekonomisi yönünden önemlidir: aflatoksinler, okratoksinler, trikotesenler, fumonisinler, zearalenon ve patulin. Bu mikotoksinler insan sağlığı, hayvan sağlığı ve tarımsal ürünlerde dünya çapında kayıplara sebep olmaktadır. Mikotoksinlerin hayvan veya insanlar üzerindeki olumsuz etkileri ve karsinojenik potansiyelleri son yıllarda yoğun şekilde çalışılmıştır. Mikotoksinle bulaşık gıda veya yemleri tüketen insan ve hayvanlarda toksisite derecesini etkileyen faktörler içinde tür, etki şekli/mekanizması, metabolizma ve savunma mekanizması bulunmaktadır.

Anahtar sözcükler: Mikotoksin, Küf, Gıda, Toksisite

ABSTRACT

Toxigenic moulds that mainly belong to genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*, predominantly grow on plants of agricultural importance during pre-harvest or storage. As secondary metabolites of these toxigenic moulds, mycotoxins exert their toxic effects on animals and humans. Several of them are significant for public health and agro-economy: aflatoxins, ochratoxins, trichothecenes, fumonisins, zearalenone and patulin. These mycotoxins cause losses worldwide in human health, animal health and agricultural products. The adverse effects and carcinogenic potentials of mycotoxins to humans or animals have been studied extensively in recent years. Factors affecting the magnitude of toxicity of humans or animals consuming mycotoxins-contaminated foods or feeds, respectively, include species, mechanisms/modes of action, metabolism and defense mechanisms.

Key Words: Mycotoxins, Mold, Food, Toxicity

GİRİŞ

Mikotoksinler, birçok tarımsal üründe ve gıdada bulunan saprofit küfler tarafından oluşturulan toksinlerdir (Turner ve ark. 2009). Tarlada veya hasat sonrasında kolaylıkla mahsullere kolonize olan küflerin büyüme ve gelişiminde biyokimyasal öneme sahip olmayan (Hussein ve Brasel 2001, Anklam ve ark. 2002, Zheng ve ark. 2006), nispeten küçük (MA ~700) ve toksik sekonder metabolitlerdir (Peraica ve ark. 1999, Turner ve ark. 2009). Toksin oluşturan küfler, bu toksik sekonder metabolitlerin birini veya daha fazlasını oluşturabilmektedir. Küflerin tümünün toksin oluşturma özelliğinin olmadığı ve küflerin sekonder metabolitlerin tümünün toksik olmadığı bilinmektedir (Hussein ve Brasel 2001). Sekonder metabolitlerin fonksiyonları tam olarak ortaya konamamıştır ancak aynı çevrede rekabet eden diğer mikroorganizmaları elimine etmede rol oynadıkları ve ayrıca parazitik küflerin, konakçı dokularını istila etmelerine yardımcı oldukları düşünülmektedir (Bräse ve ark. 2009).

Gıda ve yemlerde bulunmaları, insanlar ve hayvanlar için bir sağlık riskidir (Anklam ve ark. 2002, Zheng ve ark. 2006, Turner ve ark. 2009). Hasat öncesinde, hasatta, kurutma sürecinde geçen zamanda ve depolama esnasında ürünlerde oluşabildiklerinden, birçok gıda ve yem mikotoksinlerle kontamine hale gelebilir (Zheng ve ark. 2006). Genellikle, birkaç günden fazla muhafaza edilen mahsuller küf gelişimi ve mikotoksin oluşumu için potansiyel bir hedef haline gelmektedir. Küfün türüne bağlı olarak mikotoksinler hem ılıman hem de tropik bölgelerde oluşabilir (Turner ve ark. 2009). Mikotoksinlerle sıklıkla kontamine olabilen ürünler; tahıllar (mısır, buğday, arpa, yulaf), sert kabuklu meyveler (ceviz, fındık, yer fıstığı, Antep fıstığı), kuru üzüm, incir, kahve, kakao, baharatlar, yağlı tohumlar, kuru baklagiller, pamuk tohumu ve elmadır (Zheng ve ark. 2006, Turner ve ark. 2009). Mikotoksinler ayrıca üretimlerinde kontamine arpa, diğer tahıllar ve üzüm kullanılması sonucu bira ve şarapta da bulunabilir. Bunun dışında insan gıda zincirine, kontamine yemle beslenen çiftlik hayvanlarından elde edilen yumurta, süt ve peynir gibi hayvansal ürünlerle veya etlerle girebilirler (Turner ve ark. 2009).

Mikotoksinler çoğunlukla genotip olarak spesifiklerdir, ancak bir veya daha fazla küf türü tarafından oluşturulabilirler. Oluşumlarına birçok faktör dahil olduğundan toksin üreten bir küfün varlığı, ilgili toksinin de mevcut olacağı anlamına gelmediği gibi görünen bir küfün olmaması da gıdanın toksinlerden arı olacağı garantisini vermez (Turner ve ark. 2009). Tek bir küf türü

bir veya birkaç mikotoksin üretebilmekte veya bir veya birkaç mikotoksin farklı küf türleri tarafından üretilmektedir (Hussein ve Brasel 2001).

Toplam yaklaşık 300 farklı mikotoksin tanımlanmaktadır ki bunlar yaklaşık 200 farklı küf tarafından üretilmektedir (Anklam ve ark. 2002, Gromadzka ve ark. 2008, Bräse ve ark. 2009). Mikotoksin oluşturan en önemli küf cinsleri *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium*'dur (Zheng ve ark. 2006, Gromadzka ve ark. 2008). Bununla birlikte, bu 300 mikotoksinin yaklaşık 20'si, insan ve hayvanlarda sağlık riski oluşturdukları düşünülen seviyelerde gıda ve yemlerde bulunabilmektedir (Anklam ve ark. 2002). Risk oluşturan ve yaygın olarak görülen mikotoksinler aflatoksinler, okratoksinler, fumonisinler, trikotesenler, zearalenon ve patulindir (Hussein ve Brasel 2001, Anklam ve ark. 2002, Zheng ve ark. 2006, Gromadzka ve ark. 2008). Bu toksinler her yıl insan ve hayvan sağlığı alanında ve tarımsal ürünlerde milyonlarca dolarlık kayba sebep olmaktadır. 1993 yılında WHO (Dünya Sağlık Örgütü) ve IARC (Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı) aflatoksinler, okratoksinler, trikotesenler, zearalenon ve fumonisinlerin karsinojenik potansiyellerini değerlendirmiştir. Doğal olarak oluşan aflatoksinler karsinojenik (Grup 1) olarak sınıflandırılırken, okratoksinler ve fumonisinler muhtemel karsinojenler (Grup 2B) olarak sınırlandırılmıştır. Bununla birlikte trikotesenler ve zearalenon insan karsinojeni olarak sınıflandırılmamıştır. Mikotoksinle bulaşık gıda veya yemleri tüketen insan ve hayvanlarda toksisitenin büyüklüğünü etkileyen faktörler içinde tür, etki mekanizması/şekli, metabolizma ve savunma mekanizmaları vardır (Hussein ve Brasel 2001). Birçok mikotoksinin bir hayvanda belirli bir sistem üzerinde spesifik etkileri bulunmaktadır ancak çoğu birkaç sistemi aynı anda etkilemektedir. Mikotoksinler tarafından oluşturulan farklı toksisite düzeylerini anlamak için, biyolojik etkileri bilgisine sahip olmak gereklidir (Bräse ve ark. 2009).

AFLATOKSİNLER

Mikotoksinlere olan genel ilgi, İngiltere'de çiftlik hayvanlarında daha sonra sebebinin aflatoksinler olduğu kanıtlanmış Hindi X hastalığı olarak adlandırılan yem kaynaklı bir mikotoksikozis'in ortaya çıktığı 1960'lı yıllarda artmıştır. Daha sonra, aflatoksinlerin hayvan ve insanlarda karaciğer karsinojeni olduğu ortaya konmuş ve bu, mikotoksinlerle ilgili araştırmaları teşvik etmiştir (Peraica ve ark. 1999). Aflatoksinler hayvanları ve insanları etkilediği bilinen en güçlü doğal kanser yapıcı bileşiklerdir. Genellikle dört bileşiği gıdalarda oluşur: B1, B2, G1 ve G2 ama M1 ve M2 gibi biyotransformas-



yonu uğramış diğer aflatoksinler de gıdalarda (süt) bulunabilmektedir (Frisvad ve ark. 2007).

Aflatoksinler en çok çalışılmış mikotoksin grubudur ve *Aspergillus* cinsinin farklı türleri tarafından oluşturulmaktadır. Farklı küf türleri tarafından oluşturulan 20'nin üzerinde aflatoksin türü vardır. (Hussein ve Brasel 2001). *Aspergillus flavus* tropik ülkelerde birçok gıda çeşidinde oluşur ve aflatoksinleri üreten en yaygın türdür. Bu türler mısır, yer fıstığı ve pamuk tohumunda çok yaygındır ve sadece AFB1 ve AFB2'yi oluşturur. *Aspergillus parasiticus* daha ziyade yer fıstığında yaygındır ancak diğer gıdalarda daha nadir görülür. *A.flavus* ile kıyaslandığında coğrafi olarak daha kısıtlıdır. *A.parasiticus* hem AFB1, AFB2 hem de AFG1 ve AFG2'yi oluşturur ve hemen hemen tüm bilinen izolatları toksijeniktir (Hussein ve Brasel 2001, Frisvad ve ark. 2007). Bunlar dışında *A.toxicarius*, *A.parvisclerotigenus*, *A.pseudotamarii*, *A.tamarii*, *A.ochraceoroseus*, *A.rambellii* türleri de aflatoksin üreten türlerdir ancak gıdalarda yaygın değildirler ya da hiç bulunmazlar (Frisvad ve ark. 2007).

Aflatoksinler kimyasal olarak bir kumarin halkasıyla birleşmiş dihidrofuran veya tetrahidrafuran kısmından oluşur. Aflatoksinler diğer birçok heterosiklik bileşik gibi flüoresans özelliktedir ve bu özellikleriyle ayrımları yapılmaktadır. Ultraviyole ışık altında AFB1 ve AFB2 mavi flüoresans verirken, AFG1 ve AFG2 yeşil flüoresans vermektedir (Hussein ve Brasel 2001).

AFB1, bilinen en güçlü doğal karsinojendir ve IARC sınıflandırmasında kategori 1A'da yer almaktadır (Caloni ve ark. 2006, Rosi ve ark. 2007). AFB1 sitokrom P450 enzimleri tarafından karsinojen bir madde olan AFB1-8,9-epoksit türevine metabolize edilir (Coulombe 1993, Smela ve ark. 2001, Rosi ve ark. 2007). Ayrıca aflatoksin M1'e, N7-guanin katımı oluşturan bir DNA reaktif metabolite biyoetkinleştirilir ve ayrıca proteinlere de bağlanabilir (Rosi ve ark. 2007). AFB1'in karsinojenik ve mutajenik etkisi, elektrofilik ve yüksek oranda reaktif AFB1-8,9-epoksit'in DNA gibi hücresel nükleofillere affinitesinin bir sonucudur. Aşırı reaktif olma özelliğinden dolayı, AFB1-8,9-epoksit sadece indirekt olarak glutatyon (GSH)'un veya DNA bazlarının katımı olarak biyolojik sistemlerden izole edilmektedir. AFB1-8,9-epoksit GSH tarafından etkisiz hale getirilebilir ve reaksiyon GSH-S-transferaz tarafından kataliz edilir. Birçok türde, GSH tarafından etkisiz hale getirme önemli bir AFB1 detoksifikasyon yolağıdır ve AFB1-GSH oluşumu, AFB1'in hepatokarsinojenik etkilerine karşı koruyucudur. AFB1'e dirençli türlerde GST tarafından aracılık edilen detoksifikasyon önemli bir belirle-

yici olabilir. AFB1, sülfatlar ve glukuronik asit ile konjugasyon yoluyla da detoksifiye olabilir. AFB1-8,9-epoksit, ayrıca katalitik olarak (epoksit hidrolaz tarafından) veya kendiliğinden AFB1-8,9-dihidrodiol'e hidrolize olabilir (Coulombe 1993).

Etkinleşen AFB1 ayrıcalıklı olarak guanil kalıntılarına bağlanır ve AFB1-N7-guanin (AFB1-N7-Gua) katımı en baskın olanıdır (Coulombe 1993, Smela ve ark. 2001). İzole edilen diğer katımlar arasında AFB1-N7-Gua'nın açık-halkalı türevi olan AFB1-formamidopirimi-din (AFB1-FAPyr) en yaygın olanıdır. Bu katımların oluşumu, tümörlerin ortaya çıkabildiği kalıtsal mutasyonların gelişimindeki varsayılan ilk basamaktır. Bu genetik lezyonların tamiri canlı hücrelerde enzimatik olarak veya kendiliğinden oluşur ve uzaklaştırılan katımlar idrarla atılır (Coulombe 1993).

AFM1'in ortaya konmuş olan toksik ve karsinojenik etkileri WHO-IARC 'ın sınıflandırmasını grup 2 den grup 1 'e değişmesine yöneltmiştir (Rosi ve ark. 2007). AFB1'in hidroksillenmiş metaboliti olan AFM1 ana moleküle göre %2-10 arasında bir karsinojeniteye sahiptir ve IARC Grup 2B'de muhtemel insan karsinojenleri olarak sınıflandırılmıştır. AFM1, AFB1 ile bulaşık yemlerin tüketiminden sonra hayvanların sütlerinde tespit edilmektedir (Caloni ve ark. 2006). Sütteki AFM1 içeriği pastörizasyon, sterilizasyon ve sütün dondurulmasıyla veya süt ürünleri yapılmasıyla indirgenmemektedir (Caloni ve ark. 2006, Rosi ve ark. 2007). Bunun yanında sütte okratoksin A veya T-2 toksin gibi diğer mikotoksinlerin de bulunma olasılığı AFM1 ile sinerjistik toksik etkiler oluşturabildiklerinden önemlidir (Caloni ve ark. 2006).

Avrupa Komisyonu Direktifinde, süt veren hayvanların yemlerindeki en yüksek AFB1 içeriği 5 µg/kg olarak belirlenmişken, yetişkinlerin tüketimine sunulan süt ve kurutulmuş veya işlenmiş süt ürünlerinde 50 ng/L'ye bebeklerin tüketimine sunulan sütlerde ve bebek mamasına katılan süt ürünlerinde 25 ng/L'ye ayarlanmış-tır (Caloni ve ark. 2006, Rosi ve ark. 2007).

OKRATOKSİNLER

Okratoksinler kimyasal olarak, L-,fenilalanin'in amino grubuna bağlı bir amid ile ekli 3,4-dihidrometilizokumarin türevleri olarak tanımlanmaktadır. Bu bileşiklerin nefrotoksik etkili olduğu bilinmektedir. Bu grubun en toksik bileşiği Okratoksin A (OTA)'dır (Hussein ve Brasel 2001). OTA, *Aspergillus* veya *Penicillium* türü küflerin ürettiği bir mikotoksindir. (Hussein ve Brasel 2001, O'Brien ve ark. 2001, Bakker ve Pieters 2002).

OTA hayvan ve insanlarda etkili bir nefrotoksindir. Muhtemel insan karsinojeni (Sınıf 2B) olarak sınıflandırılmaktadır. OTA ve Balkan Endemik Nefropatisi arasındaki ilişki uzun zaman araştırılmış ancak ortaya konamamıştır. *Aspergillus* kısmından *Flavi*, *Circumdati* ve *Nigri*, *Penicillium* kısmından *Verrucosa* en önemli OTA üreten küflerdir (Frisvad ve ark. 2007). *A.ochraceus*, özellikle tahıl ve kahve olmak üzere depolanan birçok üründe sporadik olarak bulunmaktadır (Bakker ve Pieters 2002, Frisvad ve ark. 2007). Güneşte kurutma esnasında kahve çekirdeklerini enfekte edebilir ve böylece yeşil kahve taneleri OTA kaynağı olurlar (Bakker ve Pieters 2002). Ilıman iklimlerde OTA; mısır, buğday, arpa gibi ürünlerde ve depolanan tahıllarda *Penicillium verrucosum* tarafından oluşturulmaktadır (Bakker ve Pieters 2002, Frisvad ve ark. 2007). Enfeksiyonun hasat öncesinde ve sonrasında olduğu ancak hasat sonrası dönemin gıdalarda OTA oluşumunda baskın bir faktör olduğu görülmektedir. Avrupa'da hayvan yemlerinde büyük ölçekte tahıl kullanıldığından ve OTA nispeten in vivo olarak stabil olduğundan, bu mikotoksin o bölgedeki özellikle böbrek ve karaciğer gibi bazı hayvansal ürünlerde de bulunmaktadır (Bakker ve Pieters 2002). *A.carbonarius* da okratoksin A üreten önemli bir küftür. Üzümde, üzüm suyu, şarap, kuru üzüm gibi ürünlerde ve kahve çekirdeğinde oluşur (Bakker ve Pieters 2002, Frisvad ve ark., 2007). Olgunlaşan meyvelerde (özellikle üzümde) yüksek ısılarda *A.carbonarius* gelişmektedir. Siyah sporları sebebiyle, güneş ışığına yüksek oranda dirençlidir ve kurutmada canlı kalabilmektedir (Bakker ve Pieters 2002). *Aspergillus* kısım *Flavi*'de bulunan *Petromyces alliaceus* saf kültürde büyük oranlarda okratoksin A üretir ve bu türün ürettiği toksin Kaliforniya kaynaklı incirlerde bulunmaktadır. *Aspergillus* kısım *Circumdati*'de bulunan *A.steynii* de etkili bir OTA üreten küftür ve yeşil kahve çekirdeği, küflü soya fasulyesi ve pirinçte bulunmaktadır. *A.niger*, çok yaygın bir tür olmasına rağmen sadece birkaç suşu OTA üretir. *P.nordicum* salam gibi et ürünlerinde bulunan başlıca OTA üreticisi küftür (Frisvad ve ark. 2007).

OTA bir amid bağ ile 7-karboksil grubu vasıtasıyla bir molekül L-,fenilalanine bağlı klorlanmış dihidroizokumarin kısmı içermektedir. OTA nispeten stabil ve normal pişirme veya işleme koşulları altında kısmen bozulmaktadır. Öğütmenin beyaz unda büyük ölçüde OTA konsantrasyonunu azalttığı ancak kepekli buğday unundaki düzeyler üzerine çok az etkisi olduğu bildirilmektedir. Isıtma ve öğütme işlemleri kahvaltılık tahıl ve bisküvi üretiminde okratoksin içeriğini azaltmaktadır ancak makarna imalatında azalma olmamaktadır. Kah-

vede dekafeinasyon işlemi OTA konsantrasyonunu yaklaşık %90 oranında azaltmaktadır. Kahvenin kavrulmasıyla oluşan azalma değişkendir ancak o da %90'lara ulaşabilmektedir. Pişirme, kavurma, fermente etme gibi birçok gıda işleme aşamalarından OTA etkilenmemektedir ve pazarlanan ürünlerde tespit edilmektedir (Bakker ve Pieters 2002).

OTA mide-bağırsak kanalından yavaş bir şekilde emilir. Birçok türde kan yoluyla başlıca böbrekler olmak üzere düşük konsantrasyonlarda karaciğer, kas ve yağ dokuya dağılır. Ratlarda, tavşanlarda ve insanlarda süte geçiş gösterilmiştir ancak rumen mikrobiyotası tarafından OTA'nın metabolize olması sebebiyle inek sütüne geçiş azdır. OTA kısmen metabolize olur ve büyük kısmı değişmeden atılır. İncelenen tüm türlerde OTA'nın ana metaboliti okratoksin alfadır. Bu ve daha küçük metabolitlerinin OTA'nın kendisinden daha az toksik olduğu bildirilmektedir. OTA idrar ve dışkı ile atılır ve farklı türlerde bu atılım yollarının her birinin katkısı OTA'nın enterohepatik resirkülasyonunun ölçüsünden ve serum makromoleküllerine bağlanmasından etkilenmektedir. Bu faktörler türler arasında geniş ölçüde değişen serum OTA yarı ömrünün saptanmasında önemlidir. OTA insan ve ruminant olmayan hayvanlarda uzun yarı ömre sahiptir (Bakker ve Pieters 2002).

OTA'nın test edilen tüm hayvan türlerinde nefrotoksik olduğu gösterilmiştir. Ana hedefi sitotoksik ve karsinojenik etkiler gösterdiği renal proksimal tubullerdir. Nefrotoksisiteye duyarlılıkta önemli cinsiyet ve tür farklılıkları olduğu açıktır. Kemirgenlerde karsinojenitenin gözlemlendiği dozlar nefrotoksisiteye sebep olduğu dozlardan yüksektir. OTA ile ilgili karsinojenite çalışmaları değerlendirildiğinde OTA'nın DNA ile doğrudan etkileşime girip girmediği veya reaktif oksijen türleri oluşturarak etki edip etmediği açık değildir. OTA'nın hem in vitro hem in vivo koşullarda genotoksik olduğu gösterilse de, genotoksisitenin mekanizması açık değildir ve bunun DNA ile doğrudan etkileşmesine aracılık ettiği yönünde bilgi bulunmamaktadır. OTA plasentayı geçebilir ve ratlarda ve farelerde embriyotoksik ve teratojeniktir. Birçok türde immunosupresif etkileri olduğu gösterilmektedir. İmmunolojik ve teratojenik etkiler nefrotoksisite oluşan dozlardan çok daha yüksek dozlarda gözlemlenmektedir. OTA, Kuzey Yarımküredeki ılıman iklime sahip ülkelerdeki insan kan örneklerinde tespit edilmiştir ancak insanlarda hiçbir akut zehirlenme olgusu bildirilmemiştir. İnsanlarda ölümcül böbrek hastalığının olduğu bölgelerde yaşayan insanlardan alınan kan örneklerinde OTA çok sık ve yüksek konsantrasyonlarda tespit edilmiştir ve bu üst idrar yolunun tümör-



lerinin artmasıyla ilişkilidir. Bununla birlikte hastalığın görülmediği diğer bazı Avrupa ülkelerinde benzer konsantrasyonlar bulunduğu bildirilmektedir (Bakker ve Pieters 2002).

TRİKOTESENLER

Mikotoksinler arasında önemli bir grup olan trikotesenleri ürettiği bilinen küf cinsleri *Fusarium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Stachybotrys*, *Verticimonosporium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium* ve *Cylindrocapon* küfleridir (Hussein ve Brasel 2001, Pronk ve ark. 2002, Larsen ve ark. 2004, Zhou ve ark. 2008). *Fusarium*lar bu cinsler arasında belirgin şekilde öneme sahiptir çünkü dünya çapında yaygındırlar ve çok büyük ölçekte trikotesen üretirler. Bununla birlikte, bilinen 150 den fazla trikotesenin sadece birkaç tanesi hayvan ve insan kullanımında olan ürünlerde bulunmalarından dolayı öneme sahiptir (Pronk ve ark. 2002, Frisvad ve ark. 2007). Bunlar; deoksinivalenol (DON; vomitoksin olarak da bilinir), nivalenol (NIV), diasetoksisirpenol (DAS) ve T-2 toksin (T-2) ve daha seyrek bulunan türevleri; 3-asetildeoksinivalenol (3-Ac-DON), 15-asetildeoksinivalenol (15-Ac-DON), fusarenon X (FusX), neosolaniol (NeoSol) ve HT-2 toksin (HT-2) (Pronk ve ark. 2002). DAS, NeoSol, T-2, HT-2 Tip A Trikotesenler olarak, NIV, FusX, DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON Tip B Trikotesenler olarak sınıflandırılmaktadır (Pronk ve ark. 2002, Larsen ve ark. 2004). Trikotesenler, bir 12,13-epoksi-trikotes-9-en çekirdeği ile karakterize seskuiterpen halkası içeren bileşiklerdir (Hussein ve Brasel 2001). Trikotesenler renksiz ve çoğunlukla kristal katılardır. Tip A trikotesenler kloroform, dietil eter, etil asetat ve aseton gibi kısmen polar olan çözücülerde çözünürken, Tip B trikotesenler sulu metanol, sulu asetonitril gibi daha yüksek polariteye sahip çözücülere gereksinim duyarlar. Trikotesenler UV ışığı altında flüoresans vermezler (Hussein ve Brasel 2001, Pronk ve ark. 2002).

Deoksinivalenol (DON) ve asetillenmiş türevleri (3-Ac-DON, 15-Ac-DON) belirgin şekilde en önemli trikotesenler arasındadır. Oluşumları hakkında çok sayıda rapor yayınlanmıştır. *Fusarium graminearum* ve *F.culmorum* özellikle tahıllarda DON üreten önemli küflerdir. Nivalenol (NIV) ve Fusarenon X (FX, 4-NIV), DON ile aynı ürünlerde oluşmaktadır. NIV, DON'a göre daha düşük konsantrasyonlarda tespit edilmekte ancak daha toksik olduğu düşünülmektedir. *F.graminearum* tahıllarda NIV ve FX ürettiği bilinen en önemli küftür. T-2 toksin de en toksik trikotesenlerden biriyken, HT-2 türevi daha az toksiktir. Yapısal benzerliklerinden dolayı bu toksinler çoğunlukla aynı analitik metot içine dahil edil-

mektedir. *F.sporotrichioides* ve *F.langsethiae* tahıllardan sıklıkla izole edilen, T-2 ve HT-2 üreten küflerdir (Frisvad ve ark. 2007).

Genel olarak, trikotesenler sindirim kanalından iyi bir şekilde emildikten sonra birçok doku ve organa yayılırlar. Vücutta metabolize olmasına konjugasyon ve de-epoksidasyon yardımcı olur, ayrıca bazı trikotesenlerde deasetilasyon ve hidroksilasyon da rol oynar. Trikotesenlerin detoksifiye olmasında de-epoksidasyon en önemli basamaktır. Bu işlem, sindirim kanalındaki mikroorganizmalar tarafından yapılır, sığırlarda ayrıca ruminal flora da etkilidir. Trikotesenlerin sindirim kanalı mikroflorasının kompozisyonunu değiştirdiği belirtilmektedir. Sindirim kanalı florasının de-epoksit metabolitleri oluşturmak için adapte olması birkaç gün alabilmektedir. Trikotesenlerin bu ilk birkaç gün de-epoksit edilememesi, trikotesenli ürünlerle beslenmenin başında görülen yüksek toksik etkilerin bir açıklaması olabilir. Bazı hayvan türleri (tavukların da bulunduğu) epoksit indirgenmesi için gerekli mikrofloradan yoksundurlar ve trikotesenlere muhtemelen en duyarlı türlerdir (Pronk ve ark. 2002).

Trikotesen bileşiklerinin akut toksisitesi insan ve hayvanlarda ishal, kusma, lökositosis, hemoraji, dolaşım şoku ve ölümle karakterizedir. Kronik toksisitesi ise iştahsızlık, kilo artışında düşme, yem veya gıda tüketmeme, nöroendokrin değişiklikler ve immunolojik etkilerle karakterizedir (Pronk ve ark. 2002, Larsen ve ark. 2004, Frisvad ve ark. 2007, Zhou ve ark. 2008). Trikotesenler, immun fonksiyonu hem baskılayabilir hem de uyarabilir, bu da ya enfeksiyona veya neoplaziye dirençte bozulma ya da aşırı duyarlılık veya otoimmun bozukluklarla sonuçlanabilmektedir (Pronk ve ark. 2002).

Biyokimyasal olarak, trikotesenler hücre ve organ düzeyinde aşırı toksiktirler. Ökaryotik hücrelere yüksek düzeyde sitotoksik etkilidirler; hücre lizisine ve mitozun inhibisyonuna yol açarlar. Trikotesenler ayrıca protein ve DNA-RNA sentezinin de çok güçlü baskılayıcısıdırlar ve hücre zarıyla etkileşime girebilirler. Hücre-altı düzeydeki toksisiteyi büyük oranda protein sentezini baskılama ve sülfidril gruplarına kovalent olarak bağlanma yeteneklerine bağlıdır (Pronk ve ark. 2002, Larsen ve ark. 2004, Zhou ve ark. 2008).

FUMONİSİNLER

Fumonisinlerin, başlıca *F.prolifertum* ve *F.verticillioides* tarafından oluşturulan ve yapılarında toksisiteye sebep olan uzun zincirli hidrokarbon (sfinjosin ve sfinjanin'in yapısına benzer) birimine sahip, yüksek düzeyde karsinojen metabolitler oldukları bildirilmekte-

dir (Hussein ve Brasel 2001, Bakker ve ark. 2003, Frisvad ve ark. 2007). Fumonisin B1 (FB1) en yaygın ve en toksik olanıdır (Hussein ve Brasel 2001, Bakker ve ark. 2003, Stockmann-Juvala ve Savolainen 2008) ve ratlarda tümörü teşvik ettiği, atlarda lökoensefalomalasi (ELEM) ve domuzlarda pulmoner ödem oluşturduğu belirtilmektedir (Hussein ve Brasel 2001). Doğal olarak oluşan fumonisin B bileşikler grubuna ait moleküller uzun bir hidroksillenmiş hidrokarbon zinciri içermektedir ki buna trikarballilik asit, metil ve amino grupları eklenmektedir (Stockmann-Juvala ve Savolainen 2008) ve bu yapının, sfingoid bazlara yapısal benzerliğinden dolayı toksik etki gösterdiği bildirilmektedir (Hussein ve Brasel 2001).

Önemli miktarlarda fumonisin oluşturan tek tür *Fusarium verticillioides* (F.moniliforme) türüdür. En az 10 farklı *Fusarium* türü daha fumonisin oluşturma yeteneğine sahiptir (Bakker ve ark. 2003). *Fusarium verticillioides* ve *F.proliferatum* mısırdaki yaygın bir kültür ve sıklıkla hem hasar görmüş hem de normal mısır danelelerinden izole edilmektedir (Bakker ve ark. 2003, Frisvad ve ark. 2007, Stockmann-Juvala ve Savolainen 2008). Bu türler, sıcak iklimlerde önemli bir bitki hastalığı olan mısırlardaki "fusarium dane çürüklüğü" hastalığının sebebidirler. *F.verticillioides* ve *F.proliferatum* çok geniş ısı aralığında ama sadece nispeten yüksek su aktivitesinde ($aw > 0,9$) geliştiklerinden, hasattan önce veya kurutmanın erken dönemi esnasında mısırdaki oluşmaktadır. Aşırı durumların haricinde, fumonisinlerin konsantrasyonu depolama esnasında artmamaktadır. Fumonisinler coğrafi olarak geniş bir dağılım göstermektedir ve doğal olarak mısırdaki oluşumları dünyada birçok bölgede bildirilmektedir. Fumonisinler buğday, sorgum, darı, pirinç, asparagus ve mung fasulyesi gibi diğer gıdalarda daha nadir oluşmaktadır (Bakker ve ark. 2003). *F.nygamai*, *F.napiforme*, *F.thapsinum*, *F.anthophilum* ve *F.dlaminii* darı, sorgum ve pirinçte fumonisin üreten diğer türlerdir (Frisvad ve ark. 2007).

Çalışılan tüm hayvan türlerinde, fumonisinler sindirim kanalından zayıf şekilde emildiği ve hızlı bir şekilde dağılım gösterip atıldığı tespit edilmektedir. Karaciğer ve böbrek emilen fumonisinlerin (başlıca FB1) çoğunu tutmaktadır ve FB1 rat karaciğeri ve böbreğinde plazmaya göre daha uzun süre kalmaktadır. Gebe rat ve tavşanlarda, çok düşük konsantrasyonlarda FB1 uterus ve plasentada tespit edilmiştir. Fötusta FB1'in bulunmaması plasental transferin olmadığını göstermektedir. Laktasyon esnasında geçiş ile ilgili çok az bilgi mevcuttur ve fumonisinlerin in vivo ve in vitro metabolize olmadığı görülmektedir. Her ne kadar fumonisinler,

sitokrom P450 enzimleriyle metabolize olmasalar da, FB1 bu enzimlerin aktivitesini, sfingolipid biyosentezini değiştirdiği mekanizma yoluyla değiştirebilmektedir (Bakker ve ark. 2003).

Sfingolipidler tüm ökaryotik hücrelerde bulunabilen bir lipid sınıfıdır. Bu hücrelerde önemli yapısal moleküller olarak hizmet eder ve birçok hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde görev yaparlar (Stockmann-Juvala ve Savolainen 2008). Fumonisinler, sfingolipidlerin uzun zincir baz yapısıyla açık bir yapısal benzerlik taşırlar (Bakker ve ark. 2003, Stockmann-Juvala ve Savolainen 2008). Bu benzerlik nedeniyle, bazı araştırmacılar, sfingolipid metabolizmasının bozulmasının fumonisinler için bir hedef olabileceğini öne sürmektedirler. FB1'in primer rat karaciğer hepatositlerinde de novo sfingolipid biyosentezini inhibe edebildiği ve bu olayda seramid sentetaz enziminin inhibisyonunun anahtar rol oynadığı gösterilmiştir. Bu sonuç, FB1'in ratlarda idrar sfinganin ve sfingosin düzeylerini, FB1-bulaşık yem tüketen ponilerde serum düzeylerini, deri altı yolla FB1 uygulanan farelerin böbrek, karaciğer ve ince bağırsaklarında sfinganin düzeylerini ve in vitro koşullarda böbrek epitelyum hücrelerinde hücresel sfinganin ve sfingosin düzeylerini artırabildiğinin gösterildiği birçok çalışmayla doğrulanmaktadır (Stockmann-Juvala ve Savolainen 2008).

ZEARALENON

Zearalenon, 6-(10-hidroksi-6-okso-trans-1-undesenil)-, rezorsilik asit μ -lakton olarak bilinen bir fitoöstrojenik bileşiktir. Zearalenon, dünyanın ılıman ve sıcak bölgelerinde tarımsal ürünlerde büyüme ve hasat sezonları esnasında oluşma eğilimi gösteren ve birçok tahıla kolonize olan farklı *Fusarium* türleri tarafından üretilmektedir. (Hussein ve Brasel 2001, Gromadzka ve ark. 2008). *F.graminearum*, *F.culmorum*, *F.crookwellense*, *F.equiseti*, *F.semitectum* ve *F.sporotrichioides* gibi *Fusarium* türleri tarafından enfekte olan mısır, buğday, yulaf ve arpada çok sıklıkla yüksek miktarlarda zearalenon bulunabilmektedir (Coulombe 1993, Gromadzka ve ark. 2008). *F.graminearum* çiftlik hayvanlarında görülen östrojenik etkilerden sorumlu en önemli türdür (Hussein ve Brasel 2001). Zearalenon uzun yıllar boyunca domuzda hiperöstrojenizm ile ilişkilendirilmiş ve insanlardaki muhtemel etkileri de bildirilmiştir. Zearalenon türevleri çiftlik hayvanlarında gelişimi teşvik amacıyla kullanılmış ancak Avrupa Birliği'nde artık yasaklanmıştır (Frisvad ve ark. 2007).

Zearalenon, alkali çözeltilerde, eter, benzen, asetonitril, kloroform, aseton ve alkollerde çözünür ancak



suda çözünmez. Isıya dayanıklı olduğu için bu onun gıdalardan uzaklaştırılmasını ve/veya bozunmasını zor hale getirmektedir. Zearalenon'un rezorsinol kısmı keton ve metil grupları olan trans izomerik formda çift bağ ile 14-atomlu makrosiklik lakton halkasına kaynaşmıştır. En sık karşılaşılan zearalenon türevleri zearalanon, -, -, -zearalenol ve -, -, -zearalanol'dur (Gromadzka ve ark. 2008). Alkol metabolitleri de (- ve -, -zearalenol) östrojenik etkilidir (Hussein ve Brasel 2001).

Zearalenon'un birçok hayvan türünde östrojenik ve anabolik özellikler ortaya koyduğu ve fare, rat ve kobayda oral uygulamayı takiben nispeten düşük akut toksisiteye sahip olduğu bildirilmektedir (Gromadzka ve ark. 2008). Östrojenik olarak tanımlanan zearalenon ve metabolitlerinin toksisiteleri kimyasal yapılarıyla ilişkilidir, bu yapı östradiol, östron ve östriol gibi doğal olarak oluşan östrojenlerin yapısına benzemektedir. Bu bileşikler, 17-östradiol ile yarışmalı olarak insan östrojen reseptörleriyle etkileşerek üreme sistemi üzerine etki etmektedirler (Coulombe 1993, Gromadzka ve ark. 2008). Birçok çalışmada zearalenon'un östrojenik potansiyelinin diğer çevresel östrojenlerinkinden birkaç kat fazla olduğu gösterilmektedir. Oral uygulamayı takiben zearalenon hızlı bir şekilde emilir ve -, -, -zearalenol ve -, -, -zearalanol bileşiklerine dönüştüğü ve sonra glukuronik asit ile konjuge olduğu bağırsak hücrelerinde metabolize olabilmektedir. Her ne kadar emilim oranının ölçülmesi zor olsa da, ratlarda, tavşanlarda ve insanlarda yaygın şekilde emildiği görülmektedir. Ayrıca, zearalenon, hepato-, hemato-, immuno- ve genotoksik özellikler de göstermektedir. Bu nedenle, tahıl ve tahıl ürünlerinde zearalenon tolerans düzeyleri (µg/kg) birçok ülkede düzenlenmektedir (Gromadzka ve ark. 2008).

PATULİN

Patulin (4-hidroksi-4H-furo[3,2-c]piran-2(6H)-on), çürüyen meyvelerde birçok küf tarafından sentezlenen bir mikotoksindir ve ticari olarak satılan elma sularında da sıklıkla oluşmaktadır (Rychlik ve ark. 2004, Kawamoto ve ark. 2008). Patulin kontaminasyonu, üzüm, kayısı, şeftali gibi meyvelerde de bildirilmektedir. Patulin, *Aspergillus clavatus*, *Penicillium expansum*, *P.griseofulvum* ve *Byssoschlamys nivea* gibi farklı küf türleri tarafından üretilen bir mikotoksindir (Kawamoto ve ark. 2008). *P.expansum* en önemli patulin kaynağıdır. *Byssoschlamys nivea* pastörize meyve sularında patulin üretebilmektedir. *P.griseofulvum* saf kültürde yüksek düzeyde patulin üreten etkili bir kültür ve potansiyel olarak tahıl, hamur işi ve benzer ürünlerde de patulin üretebilir. *P.carneum*, *P.paneum*, *P.sclerotigenum*,

P.dipodomycola diğer patulin üreten türlerdir ancak önemleri nispeten daha azdır (Frisvad ve ark. 2007).

Yapılan çalışmalarda patulin'in hayvanların akciğer, karaciğer, bağırsak kan damarları ve dokularında konjesyon ve ödem gibi önemli semptomlara yol açtığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, patulinin toksisite mekanizması hala tam olarak netleşmemiştir (Bräse ve ark. 2009). Patulin, hem gram-negatif hem de gram-pozitif bakteriler üzerine antibiyotik etkiye sahiptir (Kawamoto ve ark. 2008). Birçok çalışmada hayvanlarda akut toksik şekilde ve teratojenik olarak etkidiği ve ayrıca mutajenite, DNA hasarı yapma, nörotoksisite ve alerji gelişimi gibi farklı toksik etkilere de sahip olduğu bildirilmektedir (Rychlik ve ark. 2004, Kawamoto ve ark. 2008). Patulin'in karsinojenik gücü hala bilinmemektedir. 1960'larda araştırmacılar deri altı uygulamayı takiben sarkomalar tespit etmişken, daha sonraki yıllarda yapılan yedirme denemesi çalışmalarında patulin'in karsinojenik etkinliği kanıtlanamamıştır. Çok yakın geçmişte patulin toksisitesinin hücresel yönleri yaygın şekilde araştırılmıştır. Elektrofilik karakterine bağlı olarak, patulin'in glutatyon (GSH) ve proteinler gibi hücresel nükleofiller ile etkileştiği gösterilmektedir. İnsanlarda patulin'in emilimi, toksikokinetik davranışı ve metabolizması hakkında bilgi olmadığından patulin'in organizmada mutajenik düzeylerde oluşup oluşmadığı hala tartışmalıdır (Rychlik ve ark. 2004). İnsan tüketimine sunulan gıdalarda (elma ve ürünleri) patulin içeriği birçok ülkede 50 µg/kg olarak sınırlandırılmıştır, AB çocuk mamaları için 10 µg/kg'lık bir limit belirlemiştir. Bununla birlikte bu limitler hala tartışılmaktadır (Rychlik ve ark. 2004, Kawamoto ve ark. 2008).

KAYNAKLAR

- Anklam E., Stroka J., Boenke A. 2002. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. *Food Control*, 13: 173-183.
- Bakker M., Pieters M.N. 2002. Risk Assessment of Ochratoxin A in the Netherlands. RIVM report 388802025/2002. [<http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/388802025.pdf>], Erişim tarihi: 14.03.2010.
- Bakker M.I., Speijers G.J.A., Paulsch W.E., Van Egmond H.P. 2003. Risk assessment of fumonisin B1 in the Netherlands. RIVM report 310301001/2003. [<http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/310301001.pdf>], Erişim tarihi: 14.03.2010.
- Bräse S., Encinas A., Keck J., Nising C.F. 2009. Chemistry and Biology of Mycotoxins and Related Fungal Metabolites. *Chemical Reviews*, 109: 3903-3990.
- Caloni F., Stammati A., Friggè G., De Angelis I. 2006. Aflatoxin M1 absorption and cytotoxicity on human intestinal model. *Toxicol*, 47: 409-415.

- Coulombe R.A. 1993. Symposium: Biological action of mycotoxins. *Journal of Dairy Science*, 76(3): 880-891.
- Frisvad J.C., Thrane U., Samson R.A. Mycotoxin Producers. In: Dijksterhuis J., Samson R.A., eds. *Food Mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food*. Florida. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2007: 135-159.
- Gromadzka K., Waskiewicz A., Chelkowski J., Golinski P. 2008. Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines. *World Mycotoxin Journal*, 1(2): 209-220.
- Hussein H.S., Brasel J.M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167: 101-134.
- Kawamoto Y., Bandoh S., Higashihara K., Miyagawa H., Goto T. 2008. Development and single laboratory validation of a method for patulin determination in fruit juices. *World Mycotoxin Journal*, 1(1): 59-65.
- Larsen J.C., Hunt J., Perrin I., Ruckebauer P. 2004. Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report. *Toxicology Letters*, 153: 1-22.
- O'Brien E., Heussner A.H., Dietrich D.R. 2001. Species-, Sex-, and Cell Type-Specific Effects of Ochratoxin A and B. *Toxicological Sciences*, 63: 256-264.
- Peraica M., Radic B., Lucic A., Pavlovic M. 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of World Health Organization*, 77(9): 754-766.
- Pronk M.E.J., Schothorst R.C., Van Egmond H.P. 2002. Toxicology and occurrence of nivalenol, fusarenon X, diacetoxyscirpenol, neosolaniol and 3- and 15-acetyldeoxynivalenol: a review of six trichothecenes. RIVM report 388802024/2002.
- [<http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/388802024.pdf>], Erişim tarihi: 14.03.2010.
- Rosi P., Borsari A., Lasi G., Lodi S., Galanti A., Fava A., Girotti S., Ferri E. 2007. Aflatoxin M1 in milk: Reliability of the immunoenzymatic assay. *International Dairy Journal*, 17: 429-435.
- Rychlik M., Kircher F., Schusdzarra V., Lippl F. 2004. Absorption of the mycotoxin patulin from the rat stomach. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 729-735.
- Smela M.E., Currier S.S., Bailey E.A., Essigmann J.M. 2001. The chemistry and biology of aflatoxin B1: from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 22(4): 535-545.
- Stockmann-Juvala H., Savolainen K. 2008. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. *Human & Experimental Toxicology*, 27: 799-809.
- Turner N.W., Subrahmanyam S., Piletsky S.A. 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632: 168-180.
- Zheng M.Z., Richard J.L., Binder J. 2006. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia*, 161: 261-273.
- Zhou T., He J., Gong J. 2008. Microbial transformation of trichothecene mycotoxins. *World Mycotoxin Journal*, 1(1): 23-30.



Dioksinler ve Gıdalarda Yarattığı Risk

Dioxins And Risk In Foodstuffs

Devrim Kılıç *

Dr. Gül Ç.Çakıroğulları

Yunus Uçar

*Ulusal Gıda Referans Müdürlüğü
Kalıntı Analizleri Bölümü, Dioksin Birimi*

ÖZET

Dioksinler yüksek toksik etkiye sahip çok klorlu bileşiklerdir. Klor varlığında çeşitli doğal olaylar ve endüstriyel işlemler sırasında yüksek sıcaklıkta oluşmaktadırlar. En bilinen dioksin bileşiği olan 2,3,7,8-TCDD aflatoksin-den 600 kat daha fazla toksik etkiye sahiptir. Dioksinler doğada toprak, su ve diğer alıcı ortamlarda bulaşı olarak bulunur ve asıl önemli biyolojik birikimi lipofilik özelliğinden dolayı yağlı dokularda yaparlar. İnsanlarda dioksin maruziyetinin %90'nının gıdalardan ve özellikle hayvansal yağ içeren gıdalardan olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Dioksin, poliklorlu bifeniller, risk, gıda

ABSTRACT

Dioxins are polychlorinated compounds which have high toxic effects. In availability of chlorine, they occur in some natural events and industrial processes at high temperatures. 2,3,7,8-TCDD which is the most toxic dioxin congener is 600 times more toxic than aflatoxin. Dioxins exist in soil, water and the other receiving environment as a contaminant and as a result of their lipophilic character they biologically accumulate in fatty tissues. Ninety percentage of human exposure to dioxin occurs from foods and especially from animal originated foods.

Keywords: Dioxin, polychlorinated biphenyls, risk, food

GİRİŞ

İnsanların bilinç düzeyi arttıkça, yaşamlarını daha uzun ve kaliteli sürdürme isteğine paralel olarak güvenli gıda kavramı ortaya çıkmıştır. Son yıllarda artan gıda güvenliği hassasiyeti sebebiyle, artık gıdalar sadece besinsel öğeleri ile değil aynı zamanda, kısa veya uzun vadede insan sağlığına etkili olabilecek katkı, kalıntı ve bulaşanların varlığına ve miktarlarına bağlı olarak değerlendirilmektedir.

Gıdalardaki bulaşanların belki de en toksik olanı dioksinlerdir. Örneğin aflatoksine oranla 600 kat daha toksik olduğu belirtilmiştir (Foodinfo.net, 2008). Dioksinler denilince kastedilen poliklorludibenzo-para-dioksinler (PCDD), poliklorludibenzofuranlar (PCDF) ve çoğu zaman dioksin benzeri poliklorlu bifenillerdir (Toplam 209 PCB'nin 12 tanesi). Poliklorludibenzo-para-dioksin iki oksijen köprüsüyle, poliklorludibenzofuran tek oksijen köprüsüyle birbirlerine bağlanmış klorlu benzen halkası içeren bileşen grubunun genel ismidir. 75 PCDD isomeri ve 135 PCDF izomeri bulunmaktadır (Anon., 1989). Bu bileşiklerden 17'si toksik etkisi açısından değerlendirilmekte ve analiz edilmektedir (Dioxin fact sheet, 2001). PCB'ler ise bifenillerin doğrudan klorlanması ile sentezlenmiş klorlu aromatik hidrokarbonlardır (Dioxin fact sheet, 2001). Bu bileşiklerin içinde en bilinen ve en toksik olanı 2,3,7,8 TCDD'dir ve diğer bileşiklerin toksik değeri TCDD'ye göre ifade edilmektedir (Anon., 1989).

Dioksinler (PCDD ve PCDF) insan yapımı olarak ve kasten üretilmezler fakat kimyasal işlemlerin yan ürünü olarak oluşurlar. Volkanik patlamalar ve orman yangınları gibi doğal olaylar, kimyasallar, pestisitler, çelik ve boyaların üretilmesi, kağıt ve kağıt hamurlarının beyazlatılması, egsoz yayımları ve yanma gibi prosesler sonucu oluşmaktadırlar. Örneğin klorlu bir atık, yakma tesisinde kontrolsüz bir şekilde yandığında, yayılan hava dioksin içermektedir (10). PCB'ler ise yakın tarihlere kadar ticari olarak üretilmişlerdir ve transformatörler, inşaat malzemeleri, yağlayıcı maddeler, kaplama malzemeleri, plastik maddeler ve mürekkeplerde bulunmaktadır (Dioxin fact sheet, 2001).

Dioksinlerin çevrede kalıcılıkları çok fazladır, ısı ve zamanla parçalanma oranları çok düşüktür (Anon., 1989). Bu sebeple kalıcı organik kirleticiler olarak Stockholm Konvansiyonunda belirtilmiştir (chm, 2008).

Birçok araştırmada dioksinlerin özellikle TCDD'nin kanser yapıcı etkisi belirtilmiştir. Örneğin Van Miller et al 1977, Kociba et al 1978, NIH 1982a, NIH 1980b, NCI, 1977, NCI 1979 çalışmalarında dioksinlerin kanser yapıcı etkileri gösterilmiştir (Anon., 1989). Yapılan

çalışmalarda dioksinlerin teratojenik olduğu fakat mutajenik etkilerinin olmadığı belirtilmiştir (Anon., 1989). Bunların yanısıra insanlarda TCDD maruziyeti sonucu ortaya çıkan ve çeşitli çalışmalarda belirtilen septomlardan klorakne, hiperkeratozis, hiperpigmentasyon elastosis gibi deri başkalaşimleri, karaciğerde yumuşak fibroz doku oluşumu, kanda transaminaz değerlerinde artma, hiperkolesterolemi, hipertrigliseridemi, iştah ve kilo kaybı, sindirim bozuklukları (özellikle alkol ve yağlı gıda sindiriminde), kas eklem ağrıları ve genel halsizlik, şişmiş lenf bezleri, kardiovasküler, üriner ebz solunum ve pankreatik bozukluklar gibi sistemik etkileri, seksüel fonksiyon kaybı, başağrısı, nöropati, görme bulanıklığı, duyma tatma ve koku kaybı gibi sinir sisteminde etkileri ve uyku bozukluğu, depresyon, enerji ve motivasyon kaybı, ani sinir gibi psikiyatrik etkileri bulunmaktadır (Anon., 1989).

1971 yılında ABD Missouri'de 57 atın ölümüyle ortaya çıkan olay, 1976 İtalya Seveso'da yaşanan fabrika kazası, Vietnamda ABD ordusu tarafından kullanılan portakal gazı (Anon., 1989), Belçika'daki 1999 dioksin krizi (Lok ve Powell, 2000), 1968'deki Yusho ve Yucheng vakası (Anon., 1989), Ukrayna başkanı Yushchenko'nun dioksin ile zehirlenmesi tarihindeki önemli dioksin vakalarıdır.

Crummet ve Stehl'in 1973 yılındaki çalışmalarında belirttikleri üzere dioksinler lipofilik olup birçok çözücüde çok az, suda çok daha az çözünürler (Anon., 1989). Suda çözünmeyip yağda çözünmesi sebebiyle çevrede organik maddelere ve sedimente bağlanan dioksinler insanların ve hayvanların yağlı dokularında absorbe edilir ve biyolojik olarak parçalanmaması sebebiyle de sürekli biriktirilirler. (Dioxin fact sheet, 2001) Flesh-Janys et al. tarafından 1996'da yapılan çalışma çeşitli dioksin bileşiklerinin insan vücudunda 3 ile 19.6 yıl arasında değişen, ortalama 7-8 yıl gibi oldukça uzun yarılanma ömürleri olduğunu ortaya koymuştur (Hays ve Aylward, 2003). Isense ve Jones 1975'te biobirikim sebebiyle canlı organizmalarda yüzlerce kat fazla TCDD bulunduğunu göstermişlerdir (Anon., 1989). Böylelikle toprakta ve havada dioksin miktarı çok az iken hayvansal dokularda yüzlerce hatta binlerce katı olabilmektedir. Bu sebeple dioksin maruziyeti açısından hayvansal gıdalar büyük önem teşkil etmektedirler.

Amerikan Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından 2000 yılında bildirildiğine göre insanların dioksinlere maruziyetinin %90 oranla gıdalardan ve özellikle hayvansal yağ içeren gıdalardan olduğu tespit edilmiştir (Hays ve Aylward, 2003). Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu (EFSA)'nın 2000 yılı taslak değerlendirmesine göre



re dioksin alımında en büyük orana sırasıyla süt ve süt ürünleri, balık, et ve yumurta sahip olmaktadır (EFSA, 2004). Ancak bu dağılım ülkeden ülkeye ve beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak değişiklikler göstermektedir. Birçok ülke açısından balıkların daha öncelikli risk grubu olduğu belirtilmiştir.

Dioksinlerin toksik etkisi yaşam süresi boyunca vücutta biriken miktarla direkt olarak ilgilidir. (Dioxin fact sheet, 2001) Avrupa Birliği Gıda Bilim Kurulunun belirttiğine göre haftalık tolere edilebilir alım miktarı 14 pgTEQ/kg vücut ağırlığıdır (Gies ve ark., 2007).

Ülkemizde de dioksinlerin maksimum miktarları ile ilgili yasal düzenlemeler yapılmış olup 2005 yılında yemlere, 2008 yılında gıdalara yönelik maksimum seviyeler, AB sınırları esas alınarak tebliğ şeklinde yayımlanmış ve yürürlüğe girmiştir.

Dioksinlerin analizi gerekli ekstraksiyon ve saflaştırma aşamalarından sonra GC-HRMS'de izotop ayrıştırma yöntemine göre ölçüm yapılarak gerçekleştirilir (5,6). Son derece kapsamlı ve pahalı olması sebebiyle dünyada az sayıda analitik laboratuvarında yapılabilmektedir. Ülkemizde Ankara İl Kontrol Laboratuvarı'nda gıda ve yem örneklerinde PCDD, PCDF ve dioksin benzeri PCBler, Tübitak Marmara Araştırma Merkezinde hava ve sediment örneklerinde PCDD ve PCDF'ler analiz edilebilmektedir.

Türkiye'de gıdalarda dioksin üzerine Ankara İl Kontrol Laboratuvarı tarafından yapılan iki çalışmada tereyağlarında 0,29 ile 3,98 pg TEQ/g yağ arasında değişen değerlerde ve maksimum limitlerin altında kalmak suretiyle (Traag et al., 2007) , balıklarda da yine maksimum seviyelerin altında olarak 0,84 ile 2,80 arasında değerlerde (Uçar et al., 2008) dioksin bulunmuştur.

İzleme ve araştırma çalışmaları devam etmektedir.

KAYNAKLAR

Anonim, WHO, 1989. *IPCS International Program on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 88. Polychlorinated dibenzoparadioxins and dibenzofurans*. Geneva, 409.

Hays, S.M. and Aylward, L.L. 2003. *Dioxin risks in perspective: Past present and future. Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37: 202-217.

EFSA Scientific Colloquium Summary Report. *Dioxins. Methodologies and principles for setting tolerable intake levels for dioxins, furans and dioxin-like PCBs*. Brussels Belgium, 28-29 June 2004.

Gies, A. Nuemeier, G. Rappolder, M. Konietzka, R. 2007. *Risk assessment of dioxins and dioxin-like PCBs in food – comments by the German federal environmental agency. Chemosphere*, 67: 344-349.

EPA Method 1613 Tetra-through Octa chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS, October 1994, 86.

EPA Method 1668, revision A: chlorinated biphenyl congeners in water, soil, sediment, and tissue by HRMS/HRGC, EPA no: 821-R-00-002. December 1999.

Traag, WA., Immerzeel, J., Kraats, C., Lee, MK., Hoogenboom, LAP., Oymael, B., Ucar, Y., Kılıç, D., Cakiroglu, GC. 2008. *Levels of PCDD/Fs, dioxin-like PCBs in butter from Turkey. Organohalogen compounds*. Vol 70: 2404-2407.

Uçar, Y., Kılıç, D., Oymael, B., Çelik Çakıroğulları, G., Bozkurt, E. N. Karadeniz'de mezgit, İstavrit ve hamsi balıklarında PCDD/F, dl-PCB ve indikatör PCB'lerin GC-HRMS ile tespiti. *BIES 08 Blacksea International Environmental Symposium Bildirileri*. 25-29 August 2008.

Fact Sheet on dioxin in feed and food, Brussels 20 July 2001 <http://chm.pops.int/> erişim tarihi:2008 (http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/library/press/press170_en.pdf)

Lok, C., Powell, D. 2000. *The Belgian Dioxin Crisis of the Summer of 1999: a case study in crisis communications and management. February 1, 2000 Technical Report #13. http://www.foodsafetynetwork.ca/articles/316/belgian_dioxin_crisis_risk_comm.pdf*.





Bitkisel Besin Desteklerinde Sildenafil ve Yeni Analoglarının Tespiti

Determination Of Sildenafil And Novel Analogues In Herbal Dietary Supplements

Mustafa BAŞER*

İlknur (Karakurt) KAHVECİ

Serkan ÇARKÇIOĞLU

*Ulusal Gıda Referans Müdürlüğü
Veteriner İlaç Bölümü*

ÖZET

Sentetik fosfodiesteraz tip-5 enzim (PDE-5) inhibitörleri sıklıkla erkeklerde ereksiyon bozuklukları-nın tedavisinde kullanılmaktadır. Bunlardan biri geçmişte pulmoner arter hipertansiyon tedavisinde kullanılan, daha sonra Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından ereksiyon bozukluklarının tedavisinde kullanılması için onay verilen sildenafil sitrat (Viagra®) dır. Bu ilaç doktor kontrolünde kullanılmalıdır, çünkü yüksek dozda kullanımı ciddi yan etkilere sebep olabilmektedir. Son birkaç on yılda bitkisel besin desteklerinin ve bitkisel ilaçların kullanımı büyük ölçüde artmıştır. Genel olarak toplumda bitkisel desteklerin tamamen doğal olduğu yönünde bir inanç vardır. Fakat son zamanlarda bitkisel ilaç ve besin desteklerinde, bilhassa sildenafil ve analoglarıyla olmak üzere, sentetik PDE-5 inhibitörleriyle birçok tağşiş vakası rapor edilmiştir. “Doğal” olan bitkisel desteklerde yapılan tağşiş insan sağlığı tehdidinde sebep olduğu için, bu maddelerin analiz edilmesi için analitik metotlar oluşturulmuştur. Literatürde, bitkisel destek ve ilaçlarda yapılan yasal olmayan tağşişin izlenmesi genel olarak HPLC, LC/MS, LC/MS/MS ile yapılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: PDE-5 inhibitörleri; sildenafil; sildenafil analogları; tağşiş; bitkisel destekler; LC/MS.

ABSTRACT

Synthetic phosphodiesterase type-5 enzyme (PDE-5) inhibitors are frequently used to treat erectile dysfunction (ED) in men. One of them which was used in the past to treat pulmonary artery hypertension is sildenafil citrate (Viagra®), was approved for the treatment of ED in man by the US Food and Drug Administration (FDA). This drug should be taken under doctors's control because over-dose may cause serious side effects. Over the last few decades the use of herbal dietary supplements and herbal remedies has increased greatly. There is a general belief in the public that herbal supplements are "all natural." But recently, in particular, there have been several reports about herbal supplements and herbal drugs which had been adulterated with synthetic PDE-5 inhibitors, especially with sildenafil and sildenafil analogues. Because of the adulteration of "natural" herbal supplements poses a health treat to people, analytical methods were performed to analyse these substances. Reported methods in the literature concerning for illegal adulterations in herbal supplements and drugs are generally HPLC, LC/MS, LC/MS/MS.

Key Words: PDE-5 inhibitors; sildenafil; sildenafil analogues; adulteration; herbal supplements; LC/MS.

1. GİRİŞ

1990'lı yılların başında, fosfodiesteraz enzim-5 etkinliğini engellemek için bir ilaç geliştirildi. Geliştirilme amacı bir iskemik kalp rahatsızlığı olan angina pekrosis (göğüs ağrısı) ve hipertansiyon tedavisinde kullanılmayıydı. Fakat ilaç henüz faz 1-2 çalışması aşamasındayken araştırmacılar deneklerin kullanmadıkları tabletleri iade etmek istememesiyle hayrete düştüler. Ve çalışmada, deneklerden birçok erkeğin daha önce var olan ereksiyon bozukluğunun çözümlendiğini ifade etmesiyle sonuçlandı (Gratz ve ark., 2004, Anonim, 2010a). Daha sonra bu madde sildenafil sitrat, (Viagra®) olarak adlandırıldı. 2003 Ağustos ayına kadar ereksiyon bozukluklarında kullanılan tek PDE-5 inhibitörü sildenafil sitrat oldu. Daha sonra iki farklı PDE-5 inhibitörü daha daha hem Avrupa'da hem de Amerika'da onaylandı. Bunlar; vardenafil hidroklorid (Levitra®) ve tadalafil (Cialis®) olarak adlandırıldı (Gratz ve ark., 2004, Reepmayer ve Avignon, 2008).

Sildenafil sitratin etki mekanizması, korpus kavernosumda azot oksit salınımını sağlamakla başlar. Salınan azot oksit, guanilaz siklaz enziminin reseptörlerine bağlanır, bu durum da siklik guanozin monofosfat seviyelerinin artmasına sebep olur. Bu da penis yapısında bulunan sarmal arterlerdeki düz kasların gevşemesine böylece kan akışının hızlanmasına dolayısıyla ereksiyona sebep olur. Sildenafil karaciğer enzimleri tarafından metabolize edilir ve hem karaciğer hem de böbrek tarafından vücuttan atımı gerçekleşir. Vücuttaki yarı ömrü 3-4 saattir (Anonim, 2010a, Singh ve ark., 2009). Sildenafil, C₂₂H₂₀N₆O₄S kimyasal formülüne sahip olup, molekül ağırlığı 474,6 g/mol'dür.

Hastalarda ereksiyon bozuklukları genellikle (%60-70 kadarı) hipertansiyon ve iskemik kalp rahatsızlıkları ile birlikte seyrederek. Ne yazık ki PDE-5 inhibitörleri, bu hastalıkların tedavisinde kullanılan bazı ilaçlarda negatif etkileşim göstermektedir. Nitrogliserin, doxazosin, terazosin gibi. (Singh ve ark., 2009). PDE-5 inhibitörlerinin hem bu negatif etkileşimleri hem de görme bozukluğu ve noksanlığı, hipotansiyon, ani duyma bozukluğu gibi yan etkilere sebep olması gibi problemler PDE-5 inhibitörlerinin bitkisel alternatiflerinin ortaya çıkmasına zemin hazırlamıştır (Anonim, 2010a, Singh ve ark., 2009, Pomeranz ve Bhavsar, 2006, Anonim, 2010b).

Bitkisel besin destekleri, "tamamen doğal, güvenli ve hiç bir yan etkiye sebep olmaması" gibi sloganlarıyla kısa zamanda büyük bir pazara ulaşmışlardır. Fakat birçoğunun maalesef PDE-5 inhibitörleri eklenerek taşışe uğradığı tespit edilmiştir. Şu anda sadece onay almış PDE-5 inhibitörleriyle değil, onaylanmamış PDE-5 analoglarıyla da yapılan taşış vakaları rapor edilmiş ve literatüre geçmiştir. Bu problem, gizlenip üzeri örtüldükçe daha da içinden çıkılmaz bir hal almakta, PDE-5 analoglarında yapılan yapısal değişikliklerle elde edilen modifiye analogların da taşış amacı kullanıldığı ortaya çıkmaktadır.

Bu derleme, bitkisel besin desteklerinde taşış olarak tüketicinin karşısına çıkan ve sağlığını tehdit eden PDE-5 inhibitörlerinden sildenafil ve yeni olarak ortaya çıkan sildenafilin yapısında yapılan değişikliklerle elde edilen sildenafil analoglarının tespitiyle ilgili literatür derlemesi yapmayı amaçlamaktadır.



2. BİTKİSEL BESİN DESTEKLERİNDE SİLDENAFİL VE ANALOGLARIYLA YAPILAN TAĞŞIŞ

2.1. Bitkisel Besin Destekleri

Bitkisel besin destekleri artık hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tüketicideki genel kanı ise, bitkisel desteklerin sentetik içeriklerden, ilaçlardan daha güvenli olduğu yönündedir. Fakat yapılan son araştırmalar, bunun aksi yönündeki sonuçlarla bizi karşı karşıya bırakmaktadır. Özellikle Çin ve Tayvan gibi uzak doğu menşeli bitkisel ilaç ve besin desteklerinde fazla miktarda ağır metal ve üreticinin belirtmediği ilaçlara rastlanmaktadır (Gratz ve ark., 2004, Singh ve ark., 2009, Lin ve ark., 2006, Liang ve ark., 2006).

Bitkisel besin desteklerinin içeriğinin üzerinde belirtilmesi zorunlu olup, piyasaya sürülmeden önce sağlıklı ve güvenli olmasının tüm sorumluluğu ise üreticiye aittir. FDA piyasadaki güvenli olmayan bitkisel besin desteklerine karşı önlem almaktan sorumludur. Ülkemizde ise Tarım ve Köyişleri Bakanlığı bitkisel besin desteklerine ruhsat vermekte ve güvenli olmayan ürünlere karşı önlem almaktadır. (Singh ve ark., 2009).

Doğada afrodizyak etkili birçok bitki bulunmaktadır. Bunlardan en çok kullanılanları; ginseng kökü, liçi tohumu, kurt üzümü meyvesi, aveto, keçiyoynuzu, şakayık kökü, magnoliavine meyvesi vb. çoğu uzak doğu kökenli bitkilerdir. Bunlardan faydalanılarak da afrodizyak etkili bitkisel besin destekleri hazırlanmaktadır. Bu bitkisel besin destekleri yüksek dozda kullanılmadıkları sürece, hiçbir sağlık tehlikesi oluşturmadan cinsel gücü artırıcı etki göstermektedir. Fakat üreticiler, ürünlerinin etkisini arttırmak ve sadece biraz daha fazla kar elde etmek için ürünlerine sentetik PDE-5 inhibitörlerinden olan sildenafil ve thiosildenafil, thiomethiosildenafil, thiohomosildenafil, homosildenafil, acetildenafil, hidroksihomosildenafil gibi sildenafilin yapısal analoglarını sonradan eklemekte, bu durum halk sağlığı için tehlike oluşturmaktadır (Singh ve ark., 2009, Zhu ve ark., 2005). Literatürde sildenafil ve onun yeni analoglarıyla yapılmış birçok tağşış vakası ve bu maddelerin tespiti için geliştirilmiş analiz yöntemleri vardır.

2002 yılında Çin'de yapılan bir araştırma sonucunda bitkisel besin desteği kapsüllerinde ortalama 42,8 mg/kapsül sildenafil sitrat tespit edilmiştir (Tseng ve Lin, 2002). Pfizer firması ise, etken maddesi sildenafil sitrat olan Viagra'nın günde 50 mg kullanılması gerektiğini ve maksimum dozun 100 mg olduğunu tavsiye etmektedir. 65 yaşın üzeri ve ciddi böbrek rahatsızlığı olanların ise günde 25 mgdan fazla viagra tüketmesinin

tehlikeli olabileceğini belirtmektedir (Anonim, 2010c). Bu durum sağlıklı insanların bile günde 3 destek tableti almasının çok tehlikeli olabileceğini göstermektedir.

Tayvan'da 2006 yılında yapılan başka bir çalışmada, bitkisel besin desteklerinde bir sildenafil analoğu olan hidroksihomosildenafil rastlanmıştır. Bu yeni maddenin sildenafilin piperazin tarafındaki N-metil grubunun yerine N-hidroksi-etil grubunun gelmesiyle elde edildiği görülmektedir (Lin ve ark., 2006).

2009 yılında Fransa'da yapılan bir çalışmada ise afrodizyak etkili 17 ticari bitkisel besin desteği ve bitkisel ilaç analiz edilmiştir. Analiz edilen beş numunede sildenafil, bir numunede hidroksihomosildenafil, bir numunede ise düşük miktarda thiomethiosildenafil tespit edilmiştir (Balayssac ve ark., 2008).

Yukarıdaki literatür çalışmalarından da anlaşılacağı üzere önceleri sildenafil ile yapılan tağşış, yerini yeni analoglarına bırakmıştır. Ve bu analoglar, insanlarda kullanılması ruhsatlandırılmış ilaçlar değildir. Son zamanlarda ise, sildenafilin piperazin tarafındaki oksijenin yerine kükürt gelmesiyle elde edilen thio-sildenafil türevleriyle yapılan hileler literatürlere geçmeye başlamıştır (Zou ve ark., 2008).

2.2. Piyasadan Çekilen Bitkisel Besin Destekleri

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), PDE-5 inhibitörleriyle tağşış yapılmış birçok marka bitkisel besin destekleri tespit etmiş ve bunlarla ilgili gerekli önlemleri almaktadır. Çoğu zaman firmalara ürünlerinin kendilerinin piyasadan çekmesini tavsiye etmekte ya da ürünleri tamamen yasaklamaktadır.

Mayıs 2003'te, "Viga" isimli bitkisel besin desteğinde sildenafil tespit edildiğinden, FDA tüketicileri bu ürünü satın almamaları konusunda uyarmış, firmanın da gönüllü olarak bu ürünü geri çekmesini talimat olarak vermiştir (Anonim, 2010d).

Eylül 2007'de "Axcil ve Desirin" markalı, doğal afrodizyak etki amaçlı tüm dünyada satılan bitkisel besin desteklerinde, FDA laboratuvarlarında yapılan analizler sonucunda sildenafil, thiosildenafil, thiohomosildenafil tespit edilmiş, üreticinin firmanın ilaçlarını gönüllü olarak piyasadan çekmesi kararı verilmiştir (Anonim, 2010e).

FDA, yine 2007 yılında "True Man ve Energy Max" adlı bitkisel besin desteklerinin tamamen yasaklamıştır. Bu besin desteklerinde ise, önce sildenafilin thio analoğu tespit edilmiş, sonra ise hem sildenafilin thio analoğu hem de vardanafilin bir analoğu tespit edilmiştir (Anonim, 2010f).

2.3. Kullanılan Teknikler

Literatürde, karmaşık matrislerde PDE-5 inhibitörleri ve analogları ile yapılan taşıyıcı, dolayısıyla sildenafil ve analoglarının hem ayrımı hem de tespitinde, ince tabaka kromatografisi (TLC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), sıvı kromatografisi kütle spektrometrisi (LC/MS) kullanılmaktadır. Ayrıca yeni ve bilinmeyen sildenafilin analoglarının tanımlanmasında, ultraviyole spektroskopisi (UV), infrared spektroskopisi (IR), nükleer manyetik rezonans (NMR), LC/MS/MS gibi birçok tekniğin kullanımı faydalı bulunmuştur (Singh ve ark., 2009). Bununla beraber, LC/MS teknikleri, bitkisel besin desteklerinde sildenafil ve analoglarının hem tespitinde, hem de yeni analoglarının tanımlanmasında baskın olarak görülmektedir.

Tablo 1'de (en sonda verilmiştir) sildenafil ve analoglarının tespitinde sıklıkla kullanılan HPLC teknikleri ve cihaz şartları, Tablo 2'de (en sonda verilmiştir) ise sildenafil ve analoglarının yapısı ve MS parçalanma verileri yer almaktadır. Tablo 2'de görüldüğü gibi ilaçlar ve onların analogları benzer bir kimyasal yapı göstermektedir. Bu yüzden onların parçalanırken de aynı yolu izlediklerini düşünebiliriz. Sildenafil ve analoglarının karakteristik ortak iyonları m/z 311 ve m/z 377'tir. Bu yüzden şüpheli bir numune ile karşılaştığımızda ve içinde ki sildenafil ve analogları konusunda bilgi sahibi olmadığımızda bu karakteristik iyonlar bize iyi bir kanıt sağlayacaktır. Benzer şekilde thiosildenafil ve analoglarının ortak karakteristik parçalanma iyonu m/z 299'dur. Bu iyon bize thiosildenafil ve analogları hakkında ciddi bir ipucu sağlayacaktır. Literatürde, başka sildenafil grupları ve diğer PDE-5 inhibitörleri ile ilgili benzer çalışmalar vardır. Biz bu derlemede, en çok rastlanan, son zamanlarda en çok taşıyıcı olarak rapor edilen sildenafil ve analogları ile ilgili verilere yer vermeye çalıştık. Ayrıca MS verilerinin bilinmeyen bir ilacın tespitinde, özellikle taşıyıcı vakalarında, kullanılabileceğini göstermeye çalıştık.

Kullanılan cihaz tekniğinin yanında, diğer önemli konu numune hazırlamaktır. Çoğu numune hazırlama teknikleri, istenen analitin organik bir solvent içine alınmasıyla sağlanmaktadır. Tablo 3'de (en sonda verilmiştir) sıklıkla kullanılan numune hazırlama teknikleri listelenmiştir. İlaçlar genel olarak su ve metanolde iyi çözündüğünden, literatürde bitkisel besin desteklerinde sildenafil ve analoglarının tespitinde, ekstraksiyon aşamasında metanol ve su sıklıkla kullanılmakta, basit ekstraksiyon yöntemleri ile beraber HPLC ve uygun detektör seçimi (UV, MSn v.b.) genel stratejiyi oluşturmaktadır.

3. SONUÇ

Son zamanlarda, bitkisel besin desteklerinde sildenafil ve analoglarıyla yapılan taşıyıcı sıklıkla rastlanmaktadır. Bu durum halk sağlığını ciddi bir şekilde tehdit ettiğinden, literatürde sildenafil ve analoglarının tespiti ve yeni analoglarının tanımlanmasıyla ilgili birçok metot geliştirilmiştir. Bu derlemede, literatürde genel olarak yer alan numune hazırlama teknikleri, cihaz teknikleri, MS parçalanma verilerini de içine alan bir metotlar tablolar halinde sunulmuş, genel stratejilere yer verilmiştir. Burada verdiğimiz bu bilgiler, bitkisel besin desteklerinde sildenafil ve analoglarının tespitinde kolaylıkla kullanılabilecek verilerdir.

KAYNAKLAR

- Anonim. 2010a. www.wikipedia.org-sildenafil. Erişim Tarihi: 11.02.2010
- Anonim. 2010b. Erişim adresi: <http://www.fda.gov/Drugs/Drug-Safety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm12484.htm>. Erişim Tarihi: 19.02.2010
- Anonim. 2010c. <http://www.viagra.com/finding-right-viagra-dose.aspx>. Erişim Tarihi: 03.03.2010
- Anonim. 2010d. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Testimony/ucm114985.htm>. Erişim Tarihi: 04.03.2010
- Anonim. 2010e. <http://www.fda.gov/Safety/Recalls/ArchiveRecalls/2007/ucm112274.htm>.
- Anonim. 2010f. <http://www.fda.gov/Safety/Recalls/ArchiveRecalls/2007/ucm112304.htm>.
- Balayssac S., Trefi S., Gilard V., Martino M.M. 2008. 2D and 3D DOSY H NMR, A Useful Tool for Analysis of Complex Mixtures: Application to Herbal Drugs or Dietary Supplements for Erectile Dysfunction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50(2009): 602-612
- Choi D.M., Park S., Yoon T.H., Jeong H.K., Pyo J.S., Park J., Kim D., Kwon S.W. 2008. Determination of Analogs of Sildenafil and Vardenafil in Foods by Column Liquid Chromatography with A Photodiode Array Detector, Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. *J. AOAC Int.*, 91(3): 580-588
- Gratz S.R., Fluer C.L., Wolnik K.A. 2004. Analysis of Undeclared Synthetic Phosphodiesterase-5 Inhibitors in Dietary Supplements and Herbal Matrices by LC-ESI-MS and LC-UV. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36(3): 525-533
- Gratz S.R., Gamble B.M., Flurer R.A. 2006. Accurate Mass Measurement Using Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry for Structure Elucidation of Designer Drug Analogs of Tadalafil, Vardenafil and Sildenafil in Herbal and Pharmaceutical Matrices. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(15): 2317
- Liang Q., Qu J., Luo G., Wang Y. 2006. Rapid and Reliable Determination of Illegal Adulterant in Herbal Medicines and Dietary Supplements by LC/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40(2):305-311



Lin M.C., Liu Y.C., Lin J.H. 2006. Identification of Sildenafil Analogue Adulterated in Two Herbal Food Supplements. *Journal of Food and Drug Analysis*, 14(3): 260-264

Pomeranz H.D. ve Bhavsar A.R. 2006. Nonarteritic Ischemic Optic Neuropathy Developing Soon After Use of Sildenafil (Viagra): A Report of Seven New Cases. *J. Neuroophthalmol*, 25(1): 9-13

Reepmayer C.R. ve Avignon D.A. 2008. Structure Elucidation of Thioketone Analogues of Sildenafil Detected as Adulterants in Herbal Aphrodisiacs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49(1): 145-150

Reepmayer J.C. 2009. Direct Intramolecular Gas-phase Transfer Reactions During Fragmentation of Sildenafil and Thiosildenafil Analogs in Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(2009): 927-936

Reepmayer J.C. ve Avignon D.A. 2009. Use of A Hydrolytic Procedure and Spectrometric Methods in The Structure Elucidation of A Thiocarbonyl Analogue of Sildenafil Detected as An Adulterant in An over-the-counter Herbal Aphrodisiac. *J. AOAC Int.*, 92(5):1336-1342

Reepmayer J.C., Woodroof J.T., Avignon D.A. 2007. Structure Elucidation of A Novel Analogue of Sildenafil Detected as An Adulterant in An Herbal Dietary Supplement. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 43(2007): 1615-1621

Singh S., Prasad B., Savaliya A.A., Shah R.P., Gohil V.M., Kaur A. 2009. Strategies for Characterizing Sildenafil, Vardenafil, Tadalafil and Their Analogues in Herbal Dietary Supplements and Detecting Counterfeit Products Containing These Drugs. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(1): 13-28

Tseng M.C. ve Lin J.H. 2002. Determination of Sildenafil Citrate Adulterated in A Dietary Supplement Capsule by LC/MS/MS. *Journal of Food Drug Analysis*, 10(2): 112-119

Zhu X., Xiao S., Chen B., Zhang F., Yao S., Wan Z., Yang D., Han H. 2005. Simultaneous Determination of Sildenafil, Vardenafil and Tadalafil as Forbidden Components in Natural Dietary Supplements for Male Sexual Potency by High Performance Liquid Chromatography - Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1066(2005:) 89-95

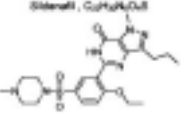
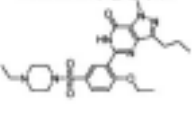
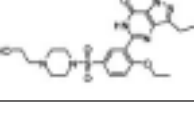
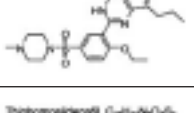
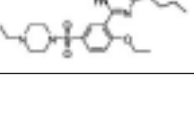
Zou P., Hou P., Oh S.S.-Y., Chong Y.M., Bloodworth B.C., Low M.Y., Koh H.L. 2008. Isolation and Identification of Thiohomosildenafil and Thiosildenafil in Health Supplements. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 47(2): 279-284

Zou P., Oh S.S., Hou P., Low M.Y., Koh H.L. (2006). Simultaneous Determination of Synthetic Phosphodiesterase-5 Inhibitors Found in A Dietary Supplement and Premixed Bulk Powders for Dietary Supplements Using High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Liquid Chromatography - Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1104 (1-2): 113-122

Tablo 1: Literatürde yer alan bitkisel besin desteklerinde sildenafil ve yeni analogları için HPLC metotları

Uygulanabilirlik	Kolon	Mobil Faz		Gradient Tdk/A:B	Akış Hızı (ml/dk)	Kaynak
		A	B			
Sildenafil	SB-C18 150 x 2,1 mm 5 µm	Su (% 0,1 Formik asit)	Asetonitril	T0-5/85:15; T5-15/10;90 T15-20/10;90	0,4	Gratz ve ark., 2004
Piperidine asetildenafil Hyroksiasetildenafil Sildenafil	SB-C18 150 x 2,1 mm 3.5 µm	Su (% 0,1 Formik asit)	Asetonitri (% 0,1 Formik asit)	T0-15/95:5; T15-20/5;95 T20-27/95;5	0,2	Gratz ve ark., 2006
Sildenafil Homosildenafil Hyroksihomosildenafil Asetildenafil	C18 250 x 4,6 mm 5 µm	Asetonitril	Amonyum format 0,01 M	T0-27/38;62	1,0	Zou ve ark., 2006
Asetildenafil Hyroksiasetildenafil Sildenafil Homosildenafil	C18 250 x 4,6 mm 5 µm	% 0,1 Sodyum-1-heksanesulfonik asit (%0,1 Fosforik asit içinde)	Asetonitril	T0-15/45:55 T15-28/0;100	1,2	Choi ve ark., 2008
Thiomethisosildenafil Methisosildenafil Thiosildenafil	SB-C18 150 x 4,6 mm 5 µm	Su (7mM Formik asit)	Metanol (7mM Formik asit)	T0-5/85:15 T5-15/10;90 T15-20/10;90	1,0	Reepmayer ve Avignon, 2008
Thiohidroksihomosildenafil	SB-C18 150 x 4,6 mm 5 µm	Su (7mM Formik asit)	Metanol (7mM Formik asit)	T0-5/85:15 T5-15/0;100 T15-20/0;100	1,0	Reepmayer ve Avignon, 2009

Tablo 2: Sildenafil ve Analoglarının Yapısı ve MS Parçalanma Verileri

Sildenafil ve Analogları	Tam Kütle	Ana Parçalanma Ürünleri (m/z)	Ortak parçalanma (m/z)	Kaynak
 Sildenafil, C ₂₂ H ₂₆ N ₄ O ₄ S	474,2049	475, 447, 418, 391, 377, 374, 329, 311, 283, 163	311, 377	Reepmayer, 2009
 Homocildenafil, C ₂₂ H ₂₆ N ₄ O ₄ S	488,2206	487, 461, 377, 311,299,283,255, 113, 99	311, 377	Reepmayer, 2009 Zou ve ark., 2008
 Hydroxy sildenafil, C ₂₂ H ₂₆ N ₄ O ₄ S	504,2155	505, 487, 461, 377, 311, 283, 129, 112, 99	311, 377	Reepmayer, 2009 Lin ve ark., 2006
 Thio sildenafil, C ₂₂ H ₂₆ N ₄ O ₄ S ₂	490.1821	491, 407, 393,343, 341, 327, 315, 312, 299, 283, 271, 163, 99	299	Zou ve ark., 2008 Reepmayer, 2009
 Thiohomocildenafil, C ₂₂ H ₂₆ N ₄ O ₄ S ₂	504,1977	505, 477, 421, 393, 355, 327, 299, 271, 113, 99	299	Zou ve ark., 2008

Tablo 3: Sildemafil ve Analoglarının Ekstraksiyonu İçin Numune Hazırlama Teknikleri

Numune Çeşidi	Ekstraksiyon Solventi	Prosedür	Kaynak
Kapsül	Metanol Kloroform	Metanol ile ultrasonik banyoda 30 dk numuneyi ekstrakte et. Vakum altında çözücüyü uçur. Kloroform ile kalan kalıntıyı çöz.	Zou ve ark., 2008
Kapsül	Asetonitril / Su	Ultrasonik banyoda 20 dk 25 ml (1:1) Asetonitril / Su ile ekstrakte et. 4500 rpm'de santrifüj yap. Üstte kalan çözeltiyi LC-MS'e enjekte et.	Reepmayer ve ark., 2007
Oral Çözelti	Metanol	Numuneyi 0,45 µm naylon filtreden geçir. Metanol ile belli bir orana seyrelt. Sıvı çözeltiyi LC-MS'e enjekte et.	Zhu ve ark., 2005
Kapsül, tablet	Metanol	Manyetik karıştırıcıyla 2 saat 100 ml metanol ile numuneyi çöz. 30 dk ultrasonik banyoda muamele et. Çözeltiyi seyrelt. Numuneyi 0,45 µm naylon filtreden geçir. Sıvı çözeltiyi LC-MS'e enjekte et.	Balayssac ve ark., 2008
Toz numune	Etanol	30 dk oda sıcaklığında 5 ml etanol ile ultrasonik çalkalayıcıda numuneyi ekstrakte et. Numuneyi 0,45 µm naylon filtreden geçir. Sıvı çözeltiyi LC-MS'e enjekte et.	Lin ve ark., 2006



Gıda İle Temas Eden Ambalaj Malzemelerinde Bisfenol A

Bisphenol A In Packaging Materials In Contact With Food

Semra Yüksel ŞENER

Dr. Ebru ŞANLI*

Dursun KIRIŞIK

T. Boğaçhan ALTUNKAYNAK

Ulusal Gıda Referans Müdürlüğü

Gıda ile Temas Eden Madde ve Malzemeler Bölümü

ÖZET

Gıdayla temas eden ambalaj malzemeleri, doğru seçilmediğinde içerdikleri kimyasallardan dolayı gıdaya çeşitli kimyasal maddeleri bulaştırma tehlikesini de beraberinde getirebilmektedir. Bu problemin çözümü için gıda ile temas eden malzemeler konusunda Avrupa Birliği ve üye ülkeler tarafından benimsenen ve ülkemizde de geçerli olan mevzuat çalışmaları yapılmaktadır. Gıda ile temas eden malzemelerde yaygın olarak analizleri yapılan bileşikler; formaldehit, ftalat ve aromatik amin bileşikler, BADGE ve BFDGE, Bisfenol A (BPA), kalıntı solvent analizleri, melamindir. Sözkonusu bileşiklerden çalışmamızın konusu olan BPA'nın en fazla kullanıldığı alan % 60'lık oranla polikarbonat plastik üretimidir. Bunu %26'lık oranla epoksi reçine üretimi takip etmektedir. Genel olarak polyester üretimi, termal kağıt üretimi, PVC plastiklerde katkı maddesi olarak kullanımı, lastik ve poliamid sanayinde kullanımı % 0.2-0.3 oranlarında değişmektedir. Günlük hayatımızda kullandığımız PVC plastik pencere-ler, kompakt disk, iş güvenlik kaskları, toz boya, su damacaneleri, bebek biberonu konserve kutularının iç yüzey kaplama folyolarında, elektrik ve elektronik parça yapımında da sıklıkla kullanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Bisfenol A; ambalaj; migrasyon.

ABSTRACT

Packaging materials which are contacting to food stuff are if not proper can cause different chemicals to contaminate into food. To attempt to solve this problem, there are draft legislations espoused in European Union and memberships also hold true in our country. Most common chemical compounds analysing in food stuff contacting packaging material are formaldehyde, ftalat ve aromatic amin compounds BADGE ve BFDGE, Bisfenol A (BPA), residü solvent analysis, melamine. Case of our study, BPA is mostly in use with 60 % rate polycarbonic plastic production. Epoxy resin production is following BPA with 26 % rate. Generally the rate in production of polyester and thermal paper, in use an additive in PVC plastics, use in gum and poliamid industry is between 0,2 – 0,3 % . Furthermore it's frequently used in PVC plastic windows, CD, security casques, powder paints, flagons, feeding bottles, covering inside the tin cans, production of electric and electronic materials.

Key words: Bisphenol A; packaging; migration,

GİRİŞ

Ambalaj malzemeleri; ışık, nem, oksijen, mikroorganizma, koku gibi maruziyetlere karşı gıdayı korumak ve gıdanın kalitesi ile güvenliğini sağlamak amacıyla kullanılmaktadır (Strathmann ve ark., 2005). Genel olarak gıdayla temas eden ambalaj malzemeleri, plastikler (Lau ve Wong, 1997) ağırlıkta olmak üzere selüloz, kağıt, karton, seramik (Miguel ve ark., 1997; Saria-Vidal ve ark., 1997), cam, kauçuk, silikon, metal, ahşap ve vaks gibi maddelerden oluşmaktadır (Muncke, 2009). Gıdalarla temas eden malzemelerin bileşimlerinde, kazandırdığı özelliğe göre monomer, başlatıcı maddeler, katalizörler, çözücüler ve katkıları olabildiği gibi bu maddelerin karışımları, reaksiyon ve parçalanma ürünleri de olabilir. Dolayısıyla bu malzemeler içerdikleri kimyasallardan dolayı gıdaya çeşitli kimyasal maddeleri bulaştırma tehlikesini de beraberinde getirebilmektedir (Bonini ve ark., 2008; Muncke, 2009). Söz konusu bu geçişler tek başlarına olabilecekleri gibi çeşitli kimyasal tepkimeler eşliğinde de ortaya çıkabilmektedir. Kimyasal göç kavramı (migrasyon), belirli koşullar altında ambalaj malzemesinin üretiminde kullanılan kimyasal maddelerin temasta bulunduğu gıda maddesi ile etkileşerek gıdaya göç etmesi ya da transferi olarak tanımlanmaktadır (Katan, 1997; Muncke, 2009). Migrasyonu etkileyen temelde dört farklı değişken vardır. Bunlar gıdanın yapısı, temas süresi, temas sıcaklığı ve ambalajın yapısında bulunan ve içeriğinde kullanılan maddelerin miktarıdır. Tüm bu değişkenlere bağlı olarak gıda maddesinin kalitesi bozulabilmekte ve ambalajın bazı özellikleri değişebilmektedir. Gıdayla temas eden ambalaj malzemeleri, değişen yaşam koşulları sonucunda gerek hijyenik gerekse de gündelik yaşamı kolaylaştırdıkları için yaygın olarak kullanılmaktadır. Günlük yaşamda hemen her yerde karşımıza çıkan bu ürünler, muhtemel tüm kullanım durumları göz önünde bulun-

durularak hazırlanmalıdır ve insan sağlığına zarar verecek, gıdanın niteliğinde değişikliğe neden olacak herhangi bir maddenin sıcaklık değişikçe ve zamanla gıdaya geçişine izin vermeyecek özelliklerde olmalıdır (Sanches-Silva ve ark., 2009). Gıda maddesinin bozulması ve tüketici sağlığını tehdit etmesi ciddi bir problemdir. Bu problemin üstesinden gelebilmek için gıdayla temas eden madde ve malzemeler konusunda ABD’nde, ülkemizde (TGK, 2008) ve Avrupa birliği ülkelerinde mevzuatlar ve düzenlemeler geliştirilmiştir. Bu mevzuatlara göre gıda ile temas eden madde ve malzemeler güvenli olmalı ve bileşenlerini gıda maddelerine kabul edilemez miktarlarda transfer etmemelidir (Katan, 1997). Plastik malzemelerle ilgili toplam ve spesifik olmak üzere iki tür migrasyon limiti oluşturulmuştur. Birincisi gıda ile temas eden madde ve malzemelerden gıda maddesine geçebilen tüm maddeler için oluşturulmuş bir limittir, bu maddeler toplamda 10mg/dm² (madde/ambalaj malzemesinin alanı) geçmemelidir (Atek ve Belhaneche-Bensemra, 2005; Grob ve ark., 2007). İkincisi spesifik göç limitidir ve gıdaya

Tablo 1. Bisphenol A’nın Genel Özellikleri

Genel Adı	Bisphenol A
IUPAC Adlandırması	2,2-bis (4-hidroksifenil) propan
CAS numarası	80-05-7
Kimyasal Formülü	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Yapısal Formülü	(CH ₃) ₂ -C-(C ₆ H ₄ -OH) ₂
Moleküler Ağırlığı	228.9
Erime Sıcaklığı	153-156°C
Kaynama Sıcaklığı	220°C (0.5kPa)
Alevlenme Sıcaklığı	270°C
Uçuculuğu	193°C (1 atm basınçta)
Sudaki Çözünürlüğü	120 mgL ⁻¹ (25°C’de)

(ECB 2003)



geçebilen her bir madde için toksikolojik değerlendirilmesine dayanarak oluşturulmuştur. Spesifik göç limiti, genelde Avrupa Bilimsel Gıda Komitesi tarafından belirlenen kabul edilebilir veya tolere edilebilen günlük alıma göre oluşturulur. Bu değerler 60kg ağırlığındaki bir kişi yaşamı boyunca her gün plastik materyal ile paketlenmiş ürünler yiyebileceği göz önünde bulundurularak hesaplanmıştır (Grob ve ark., 2007). Bu çalışmada ele aldığımız BPA spesifik migrasyon olarak değerlendirilmektedir. Genel özellikleri tablo 1'de verilmiştir.

1. Bisfenol A'nın Genel, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

2,2-bis (4-hidroksifenil) propan, genel olarak Bisfenol A (BPA) adı ile bilinmektedir. İki mol fenolün bir mol aseton ile düşük pH'da ve yüksek sıcaklıkta kondensasyonu ile elde edilmektedir. BPA katı, fenolik kokulu, krem-beyaz renkte, kristal yapıdadır. 25°C'deki yoğunluğu 1.1-1.2 g.L⁻¹'dir. Etanol, aseton ve dimetilsülfoksit (DMSO) gibi çözücülerde iyi çözünmektedir. Genelde üretilen BPA %99-99.8 saflıkta olmaktadır (Staples ve ark., 1998).

2. Bisfenol A'nın Üretimi ve Kullanım Alanları

BPA'nın dünyadaki yıllık üretimi ortalama 1.7 milyar kg civarındadır. Almanya, Hollanda, Japonya ve Amerika gibi ülkelerde çeşitli firmalar (Dow, Bayer, Shell, Mitsubishi gibi) tarafından üretilmektedir. BPA'nın kullanım alanının fazla olması ve artan talep nedeniyle yıllık üretimi de giderek artmaktadır (Feldman ve Krishnan, 1995). Sadece Avrupa'da 1997-98 yılları arasında 40.000 ton BPA kullanılmıştır. BPA'nın en fazla kullanıldığı alan %60'lık oranla polikarbonat plastik üretimidir (Feldman ve Krishnan 1995; Fent ve ark., 2003, Le ve ark., 2008; Maia ve ark., 2009). Polikarbonat plastikler ve epoksi reçineler genel olarak gıda saklama poşetleri, su damacaneleri, kola ve meyve suyu şişeleri, bebek biberonları (Biles ve ark., 1997; Staples ve ark., 1998; Sajiki ve Yonekubo, 2003; Brede ve ark., 2003; Maia ve ark., 2009), kola ve bira kutularının iç yüzeyinin kaplandığı plastik film yapımında kullanılmaktadır (Kang ve Kondo, 2005, Staples ve ark., 1998). Yüksek sıcaklığa dayanıklı polikarbonat plastikler yaygın olarak otomotiv sektöründe de kullanılmaktadır. BPA'nın çok geniş kullanım alanının olması günlük hayatta kişilerin BPA ile temas etme risklerini arttırmaktadır. BPA, günlük kullandığımız araç gereçlerde de açığa çıkmaktadır (Staples ve ark., 1998, Maia ve ark., 2009). Polikarbonat bebek biberonlarının normal kullanımı ile <0.03-5 ppb (Biles ve ark., 1997; Brede ve ark. 2003), polikarbonat şişelerin otoklav edilmesi ile 2.8 ppb (Krishnan ve ark., 1993; Feldman ve

Krihnan, 1995) ve epoksi film kaplı konserve kutusundan 80 ppb BPA'nın açığa çıkabildiği belirtilmektedir. Le ve arkadaşları (2008), kullanılmış polikarbonat su şişelerini ve aynı marka ile satın aldıkları yeni polikarbonat su şişelerini, normal hayatta bu polikarbonat su şişelerinin kullanım şartlarını simüle edecek şekilde 7 gün boyunca test emişler ve polikarbonat şişelerden salınan BPA'nın, kullanılmış ve yeni şişelerde aynı olduğunu bulmuşlar. Brede ve arkadaşları (2003) ise yaptıkları çalışmada kullanılmış şişelerde BPA'nın daha fazla olduğunu ancak Avrupa Birliği'nin belirttiği günlük tolere edilebilir alım miktarını (0,01 mg/kg vücut ağırlığı/gün) aşmadığını belirlemişlerdir. Bununla birlikte, kaynar suya tabi tutulmuş polikarbonat şişelerde çok daha fazla BPA salınımı gerçekleştirdiği birçok araştırmacı tarafından da gözlenmiştir. Aradaki farkın ise 15 ile 55 kat arasında değiştiğini rapor etmişlerdir (Biles ve ark., 1997; Le ve ark. 2008). Ayrıca, dış dolgu maddesi yapımında da polimerik BPA bis-glisididimetakrilat ve BPA-dimetilakrilat kullanılmaktadır (Olea ve ark., 1996; Snyder ve ark., 2000, Vandenberg ve ark., 2007). Olea ve ark., (1996) 50 mg dış dolgu maddesinin uygulanmasından 1 saat sonra 0.05-1 ppm BPA'nın açığa çıktığını belirtmektedir. Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu (EFSA) ve Fransa Gıda Güvenliği Ajansı (AFSSA)'nın ortaklaşa yaptığı araştırmalara göre insanda maksimum BPA alım miktarının günlük 0,05 mg/kg olduğu belirlenmiştir. Avrupa Direktifi 2002/72/EC'ye göre BPA için spesifik migrasyon limiti gıda veya gıda simulantlarında 3 mg/kg'dır.

3. Bisfenol A'nın Çevresel Durumu

BPA'nın çevrede bulunma oranı hakkında yapılan çalışmalarda yüzey sularında BPA konsantrasyonlarının farklılıklar gösterdiği belirtilmektedir. Almanya, Belçika ve Hollanda da yapılan çalışmalarda şehir şebekesi suyunda (<8-11 ngL⁻¹) BPA bulunduğu belirtilmektedir (Gülnaz, 2006). Üretim sırasında oluşan atıkların yeterince arıtılmadan atık sularla yüzey sularına verilmesi, BPA depolarında meydana gelen kaçaklar ve taşımacılık sırasında meydana gelen kazalarla BPA'nın büyük miktarlarda çevreye bulaştığı belirtilmektedir (Sajiki ve Yonekubo, 2003; Kang ve Kondo, 2005; Le ve ark., 2008). 1993 yılında üretilen 640.000 ton BPA'nın yaklaşık %0.017'si çeşitli yollarla çevreye dağılmıştır (Staples ve ark., 1998; Fent ve ark., 2003).

4. Bisfenol A'nın Vücuda Alınması ve Fetüse Etkisi

Oral yolla alınan BPA, gastrointestinal yolla vücuda girmektedir. Oral yolla alınan miktarın %83 kadarı öncelikle karaciğerde monoglukuronid formuna dönüş-

türülmekte daha sonra 72 saat içinde idrarla vücuttan atılmaktadır. BPA'nın monoglukuronid formunun anne sütüne geçebileceği belirtilmektedir (Snyder ve ark., 2000). Hamile sıçanlara besinlerle verilen BPA'nın, plasentada, 0.4 ve kanda 1.6 $\mu\text{g/kg}$ (yaş ağırlık) olarak bulunduğunu ve plasenta yolu ile fetüse geçtiği belirtilmektedir (Gülnaz, 2006). İçme suyu ile verilen BPA'nın üreme, testis patolojisi ve spermatogenezis üzerine etkisi dört döl boyunca incelenmiş (2-200 $\mu\text{g/kg}$ vücut ağırlığı gün), BPA'nın sıçanlarda üreme, testis patolojisi ve özellikle spermatogenezis üzerinde olumsuzluklar meydana getirdiği belirlenmiştir (Snyder ve ark., 2000).

5. Bisfenol A'nın Sağlık Üzerindeki Etkisi

Biberon, su damacaneleri gibi sert plastik malzemelerde bulunan BPA'nın insan sağlığına zararlı olduğu çeşitli bilimsel çalışmalarda ortaya konulmuştur. Çoğunlukla polikarbonatların üretiminde kullanılan BPA, insan vücudundaki endokrin sistemini bozan ve "endocrine disruptor" adı verilen insan yapımı kimyasallardan birisidir (Biles ve ark., 1997; Gaido ve ark., 1997; Snyder ve ark., 2000; Fukudo ve ark., 2001; Brede ve ark. 2003; Kang ve Kondo, 2005; Le ve ark., 2008; Maima ve ark., 2009; Muncke, 2009). BPA, bir çok plastik gıda kaplarının bir bileşeni olduğundan (Biles ve ark., 1997; Maragou ve ark., 2008), çoğunlukla her yaştaki insan sistemlerinde etkisini göstermektedir. Kadın üreme hormonları yanında beyin ve kardiyovasküler sistemi için hayati tehlike arz etmektedir. Aralık 2009 PNAS dergisinin haberine göre INRA (Fransa Ulusal Gıda Araştırmaları Enstitüsü)'lı bilim adamları tarafından sıçanların mide-bağırsak sistemlerinde BPA ya maruz kaldıktan sonra bağırsak geçirgenliğinde bir azalma olduğu, düşük dozlarda visseral ağrı (iç organlardan kaynaklanan ağrı) etkilerinin olduğu ve bağırsak iltihaplanması oluştuğunu tespit etmişlerdir. Aynı zamanda yetişkin dişi sıçanlarda doğum öncesinde ve sonrasında bağırsak duvarlarının fonksiyonunu zayıflattığı öne sürülmüştür. Araştırmalar, farelerde ve insana ait bağırsak hücrelerinde BPA'nın, vücut için gerekli mineral tuzları ve suyun dolaşımına olanak sağlayan bağırsak epitelyumunun geçirgenliğini azalttığını ortaya çıkarmışlardır. Ayrıca, BPA idrarda, kanda ve amniyotik sıvıda da tespit edilmiştir (Sajiki ve Yonekubo, 2003, Vandenberg ve ark., 2007).

6. Bisfenol A'nın Mutajenite ve Toksisitesi

Yapılan bakteriyel mutasyon çalışmalarında BPA'nın mutajenik olmadığı belirtilmektedir. BPA düşük akut inhalasyon toksisitesi göstermektedir. 10'ar adet dişi ve erkek Fisher F344 sıçanlar ile gerçekleştirilmiş bir çalışmada 170 mg m-3 BPA inhalasyon yolu

ile verilmiş ve çalışmada hiçbir sıçanın ölmediği, LC50 değerinin >170 mg m-3 olduğu belirtilmiştir (Nitschenke ve ark., 1985). BPA'nın akut oral toksisitesinin belirlenmesi için yapılan çalışmada 5'er adet dişi ve erkek (Sprague-Dawley) sıçana oral yolla (2000–5000 mg/kg) verilen BPA'nın 2000 mg/kg konsantrasyonunda ölüme neden olmadığı, 5000 mg/kg konsantrasyonunda erkeklerden 1'inin ve dişilerin hepsinin öldüğü belirtilmiştir. Dişilerin erkeklerden daha hassas olduğu, erkek ve dişilerin hepsi değerlendirildiğinde LD50 değerinin 5000 mg/kg olduğu belirtilmiştir (Snyder ve ark., 2000; ECB, 2003).

7. Bisfenol A'nın Hormonal Aktivitesi

Hormonlar vücudumuzdaki büyüme, gelişme, üreme, bazı metabolik olayların sağlanması ve vücudun sağlıklı olarak görev yapmasını sağlayan kimyasal habercilerdir. Hormonların biyolojik etkileri reseptörlere bağlandıktan sonra oluşur. İnsan, rat ve sıçanlarda östrojen reseptörlerinin (Hormonların hücrede bağlandıkları yapıya "reseptör" denir) ER α ve ER β , olmak üzere iki alt tipi bulunmaktadır. BPA'nın ER α ve ER β , reseptör bölgelere bağlanabilme özelliği 17-estradiol'e (bir tümör promotör olan 17-beta-estradiol) göre 10.000 kez daha zayıftır (Feldman ve Krishnan, 1995; Gaido ve ark. 1997; Snyder ve ark., 2000, Vandenberg ve ark., 2007). BPA'nın, MCF-7 hücre kültüründe insan serumu varlığında hücre proliferasyonunu inhibe ettiği (Villalobos ve ark., 1995), östrojen antagonisti hidroksitamoksifen varlığında östrojenik aktivitesinin 17-estradiol gibi inhibe olduğu, 17-estradiol gibi progesteron seviyesinin artışına neden olduğu belirtilmektedir (Feldman ve Krishnan, 1995; Olea ve ark., 1996). Ayrıca, BPA'nın progesteronik aktivite göstermediği ve anti-androjenik aktivite olduğu belirtilmiştir (Gaido ve ark., 1997). Bisfenol A 17-estradiol gibi prolaktin salgılanmasını arttırmakta, konsantrasyona bağlı olarak değişen prolaktin salınması 17-estradiole göre 1/1000-5000 kat daha zayıf olmaktadır (Steinmetz ve ark., 1997).

8. Bisfenol A'nın Biyodegradasyonu

BPA'nın biyodegradasyonu, kültür ortamındaki organizmaların oksijen tüketimi, karbondioksit oluşması ve analitik cihazlarla, kalitatif ve kantitatif analiz gibi farklı yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir. Örneğin, OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) 301B metodu ile BPA'nın şehir kanalizasyonu lağım çamurunda 28 günlük biyodegradasyon düzeyinin %83.6 olduğu, organizmaların ürettiği CO₂ miktarına göre belirlenmiştir. Dow kimya şirketi (1984), BPA'nın 20 günlük biyolojik oksijen ihtiyacı testinde



(BOD20) %71'nin biyolojik olarak parçalandığını belirtmiştir. West ve Goodwin (1997), OECD 301F Manometrik Respirometri testi ile BPA'nın 28 günlük biyodegradasyon düzeyinin %81–93.1 arasında değiştiğini, Stone ve Watkinson (1983) kapalı şişe ve Modifiye Sturm testiyle aktif çamurda BPA'nın biyolojik olarak parçalandığını, Turner ve Watkinson (1986), biyolojik atık su arıtma tesisi Modifiye SCAS (Semi Continuous Activated Sludge) testi ile BPA'nın 30 günlük aerobik biyodegradasyon düzeyinin %87–95 arasında değiştiğini belirtmektedir (Staples ve ark., 1998). BPA'nın nehir suyu örneklerinde parçalanmasında bakteri sayısının ve sıcaklığının etkili olduğu, bakteri sayısı >10.000 CFU/mL-1 olduğu durumlarda 30°C'de 2, 20°C'de 4, ve 4°C'de 20 günde %40'nın parçalandığı belirtilmiştir (Kang ve Kondo, 2002). Ayrıca beyaz çürükçül küf mantarı *Trametes villosa*'dan izole edilen lakkaz enzimi ile BPA'nın parçalanabildiği yapılan çalışmalarda elde edilmiştir (Fukuda ve ark., 2001). BPA'nın topraktaki parçalanabilirliğinin çok uzun zaman aldığı, 14C ile işaretli BPA kullanılarak yapılan çalışmada ancak 120 günlük inkübasyon sonrasında işaretli karbondioksit örneklerinin toplanabildiği de belirtilmiştir (Fent ve ark., 2003).

9. Bisfenol A'nın Metabolize Edilmesi

BPA'nın biyodegradasyonu sırasında minör ve majör olmak üzere iki metabolizma yolu olduğu, BPA'nın önce 4-hidroksibenzoik asit, 4-hidroksiasetofenon gibi ara bileşiklere ve daha sonra karbondioksit kadar parçalandığı belirtilmiştir (Lobos ve ark., 1992; Staples ve ark., 1998). Biyodegradasyon sonucunda BPA'nın yaklaşık %80 kadarı p-hidroksiasetofenon ve p-hidroksibenzaldehit'e dönüşmektedir. Bu iki ana parçalanma ürünü, daha sonra p-hidroksibenzoik asit ve CO₂'ye kadar indirgenmektedir. BPA'nın kalan %20'lik kısmı biyolojik siklus içinde önce 2,2-bis(4-hidroksifenil)-1-propanol'e daha sonra minör biyodegradasyon yolunda 2,3-bis-(4-hidroksifenil)-1,2-propandiol (Tetraol-IV)'e dönüştürülmektedir. Tetraol-IV oldukça yavaş bir şekilde p-hidroksifenaçil alkole dönüştürülmektedir (Spivack ve ark., 1994, Staples ve ark., 1998).

10. SONUÇ

Değişen yaşam koşulları sonucunda hayatımızın her noktasında karşımıza çıkan, gıda ile temas eden gıda dışı tüm malzemelerin migrasyon testleri ile kontrol edilmesi gıda güvenliğinin sağlanması için en önemli koşullardan biridir. İyi bir ambalaj güvenilir ve temasta bulunduğu gıda numunesine hiçbir bileşenini geçirmeyen yapıda olmalıdır. Bu amaçla gelişmiş ülkeler, gıda ile temas eden malzemelerin analizleri üzerin-

deki çalışmalarını yoğunlaştırmışlardır. Sözkonusu analizlerden birisi de ambalaj sanayinde yaygın olarak kullanılan BPA'dır. Çünkü BPA, günlük hayatımızda çok geniş bir ürün yelpazesi içinde kullanılmaktadır. Ancak, BPA gibi endüstriyel uygulamalar sonucu çevreye verilen atıklar, sucul ve karasal canlılarda üreme, gelişme ve diğer yaşamsal faaliyetlerin olumsuz etkileneşine neden olmaktadır. Bu nedenle BPA hakkında çok fazla çalışma yapılmış ve yapılmaktadır. Ancak şu da belirtilmelidir ki bazı ülkelerde devlet tarafından desteklenen bilimsel çalışmalar BPA'nın düşük dozlar da dahi zararlı etkilerinin olduğunu raporlarken, polikarbonat endüstrisi tarafından desteklenen makalelerde durum tam tersi; zarar ihmal edilebilir şeklindedir. İfade edilen durumlar gözönünde bulundurularak konu ile ilgili daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Atek D., Belhanence-Bensemra N. 2005. FTIR investigation of the specific migration of additives from rigid poly(vinyl chloride). *European Polymer Journal* 41:707-714.
- Biles J.E., Mcneal T.P., Begley T.H., Hollifield H.C. 1997. Determination of bisphenol-A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food simulating liquids. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 3541-3544.
- Brede C., Fjeldal P., Skjevrak I. and Herikstad H. 2003. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Additives and Contaminants*, 20(7): 684-689.
- Bonini M., Errani E., Zerbinati G., Ferri E., Girotti S. 2008. Extraction and gas chromatographic evaluation of plasticizers content in food packaging films. *Microchemical Journal* 90:31-36.
- Dow Chemical Company 1984. Bisphenol A biochemical oxygen demand. Study Report Submitted to the U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- ECB 2003, European Chemicals Bureau, European Union Risk Assessment Report 4,4'-Isopropylidenediphenol(Bisphenol-A). Eines No: 201-245-8 Office for Official Publications of the European Communities,
- Feldman D., Krishnan A. 1995. Estrogens in unexpected places: possible implications for researchers and consumers. *Environ. Health Perspect.* 103: 129-133.
- Fent G., Hein W.J., Moendel M.J., Kubiak R. 2003. Fate of 14C bisphenol A in soils. *Chemosphere*, 51: 735-746.
- Fukuda T., Uchida H., Takashima Y., Uwajima T., Kawabata T., Suzuki M. 2001. Degradation of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. *Biochem. and Biophys. Res. Com.* 284: 704-706.
- Gaido K.W., Leonard L.S., Lovell S., Gould J.C., Babai D., Portier C.J., McDonnell D.P. 1997. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 143: 205-212.

Grob K., Pfenninger S., Pohl W., Laso M., Imphof D., Rieger K. 2007. European legal limits for migration from food packaging materials: 1. Food should prevail over simulants; 2. More realistic conversion from concentrations to limits per surface area. PVC cling films in contact with cheese as an example. *Science Direct. Food Control.* 18:201-210.

Grob K. 2008. The future of simulants in compliance testing regarding the migration from food contact materials into food. *Science Direct. Food Control.* 19:263-268.

Gülhaz O. 2006. Bisfenol A'nın biyolojik parçalanması, biyokonsantrasyon faktörleri ve östrojenik aktivite düzeylerinin belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi. Doktora tezi.

Kang J.H., Kondo F. 2002. Bisphenol A degradation by bacteria isolated from river water. *Arch. of Environ. Contam. and Toxicol.* 43: 265-269.

Katan L.L. 1997. Migration from food contact materials. *Trends in Food Science & Technology.* 81:179.

Krishnan V., Stathis P., Permuth S.F., Tokes L. and Feldman D. 1993. Bisphenol A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrin.* 132: 2279-2286

Krishnan V., Safe S. 1993. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzop-dioxins (PCDDs), and dibenzofurans (PCDFs) as antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells: quantitative structure-activity relationships. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 120: 55-61.

Lau O-W., Wong S-K. 1997. Mathematical model for the migration of plasticisers from food contact materials into solid food. *Analytica Chimica Acta* 347:249-256.

Le H.H., Carlson E.M., Chua J.P., Belcher S.M. 2008. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Science Direct. Toxicology Letters* 176:149-156.

Maia J., Cruz J.M., Sendon R., Bustos J., Sanchez J.J., Paseiro P. 2009. Effect of detergents in the release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles. *Food Research International* 42:1410-1414.

Maragou N.C., Makri A., Lampi E.N., Thomaidis N.S., Koupparis M.A. 2008. Migration of bisphenol A from polycarbonate baby bottles under real use conditions. *Food Additives and Contaminants*, 25(3):373-383.

Muncke J. 2009. Exposure to endocrine disrupting compounds via the food chain: Is packaging a relevant source?. *Science of the Total Environment.* 407:4549-4559.

Nitschenke K.D., Quast J.F., Wolfe E.L. 1985. Bisphenol A: acute aerosol toxicity study with Fischer 344 Rats. Dow Chemical Company Report.

Olea N., Pulgar R., Perez P., Olea-Serrano F., Rivas A., Novillo-Fertrell A., Pedraza V., Soto A.M., Sonnenschein C. 1996. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ. Health Perspect.*, 104: 298-305.

Braniste V., Jouault A., Goultier E., Polizzi A., Buisson-Brenoc C., Leveque M., Martin P.G., Theodorou V., Fiamonti J., Houdeau E. 2010. Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. *PNAS.* P. 448-453.

Sajiki J., Yonekubo J. 2003. Leaching of bisphenol A (BPA) to seawater from polycarbonate plastic and its degradation by reactive oxygen species. *Chemosphere* 51: 55-62.

Sanches-Silva A., Andre C., Castanheira I., Cruz J.M., Pastorelli S., Simoneau C., Pasiro-Losada P. 2009. Study of migration of photoinitiators used in printed food-packaging materials into food simulants. *J. Agric. Food Chem.* 57: 9516-9523.

Sarria-Vidal M., Montana-Miguel J., Simal-Gandara J. 1997. Toward a test overall migration from the coated face of a recycled paperboard food contact material into fatty food simulants. *J.Agric. Food Chem.* 45: 2701-2707.

Snyder R.W., Maness S.C., Gaido K.W., Welsch F., Sumner S.C.J., Fennell T.R. 2000. Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 168: 225-234.

Spivack J., Leib T.K., Lobos J.H. 1994. Novel pathway for bacterial metabolism of bisphenol A, rearrangements and stilbene cleavage in bisphenol A metabolism. *J. Biol. Chem.*, 269: 7323-7329.

Staples C.A., Dorn P.B., Klecka G.M., O'block S.T., Harris L.R. 1998. A review of the environmental fate, effects and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, 36: 2149-2173.

Strathmann S., Pastorelli S., Simoneau C. 2005. Investigation of the interaction of active packaging material with food aroma compounds. *Science Direct. Sensors and Actuators B.* 106: 83-87.

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği 2008: Gıda Maddeleri ile temasta bulunan plastik madde ve malzemeler tebliği. Resmi gazete. 05.03.2008-26807. 2008/7.

Villalobos M., Olea N., Brotons J.A., Olea-Errano M.F., Ruiz De Almodovar J.M., Pedraza V. 1995. The e-screen assay: A comparison of different MCF7 cell stocks. *Environ. Health Perspec.*, 103 (9): 844-850.

Yamamoto T., Yasuhara A. 1999. Quantities of bisphenol A leached from plastic waste samples. *Chemosphere*, 38(11): 2569-2576.



Mineral Mikro Besin Öğelerinin Metabolizma Üzerine Etkileri

The Effects of Mineral Micro Nutritional Components On Metabolism

Dr. Atilla BEŞKAYA*

Dr. E. Banu SAĞLAM

Dr. G. Işıl BEKTAŞ

*Ulusal Gıda Referans Laboratuvar Müdürlüğü
Mineral Madde Bölümü*

ÖZET

Gıda olarak tanımlanan yiyecek ve içecek besin öğeleri ile vücuda alınan karbonhidratlar, proteinler ve yağlar “makro besin öğeleri” olarak mineral ve vitaminler ise “mikro besin öğeleri” olarak adlandırılmıştır. Yaşam için mutlak gerekli olan organik bileşiklerin metabolizmadaki oranlarına bakıldığında proteinler % 50-60, nükleik asitler % 10-20, yağlar % 10-20, karbonhidratlar % 10-15 ve inorganik yapı taşları da % 1-5 oranında bulunmaktadır. Gıda güvenliği ve besleyici değerinin belirlenmesinde gıdaların içerdiği element düzeyleri önemli yer tutmaktadır. Özellikle inorganik yapı taşı olan maddelerin insan sağlığı üzerine olan etkilerinin ortaya konulmasıyla birlikte, belirli bir dozun üzerine çıkıldığında halk sağlığı açısından tehlike oluşturduğu bildirilmiştir.

Mikro besin öğelerinden kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), kalay (Sn), arsenik (As), civa (Hg) ve titanium (Tn) gibi iz mineraller toksik metaller olarak tanımlanırlar. Demir (Fe), bakır (Cu), çinko (Zn), mangan (Mn), selenyum (Se), kobalt (Co), iyot (I), molibden (Mo), nikel (Ni), krom (Cr) ve alüminyum (Al) gibi elementlere ise essansiyel

iz mineraller denir. Kalsiyum (Ca), fosfor (P), magnezyum (Mg), potasyum (K), sodyum (Na), klor (Cl) gibi canlının temel yapı taşı olan makro elementler ise organizmada iyonik düzeyde bulunan minerallerdir.

Modern yaşamın vazgeçilmez unsurları olan kimyasal maddelerin kullanımı öncelikle sağlıklı bir toplumun oluşmasında, halk sağlığı, hayvan sağlığı ve bitki sağlığının korunması ile halkın yeterli, dengeli ve güvenli gıdayla beslenmesi büyük önem arz etmektedir. İnsan, hayvan ve bitki sağlığı ile çevre için riskler söz konusudur. Günümüz teknolojinin sağladığı imkanlar ile bu riskler kabul edilebilir düzeylere indirilmesi için analiz metotları geliştirmek, metot geçerliliğini kılmak, yeterlilik testi ve referans materyal üretimi çalışmalarına katılmak, konuyla ilgili ulusal ve uluslararası araştırma projelerinde görev almak, ülkede ve dünyada bu alandaki gelişmeleri takip etmek ve kimyasal kullanım nedeniyle insan sağlığını tehdit eden unsurları izlemek önem arz etmektedir.

Çevre hava, su ve toprak gibi fiziksel unsurların ortaya çıkardığı kirlilik nedeniyle canlı öğelerin hayati aktivitelerini olumsuz yönde etkileyen unsurlar olarak bilinir ve bu sorunlar "Çevre Kirliliği" adıyla değerlendirilmektedir. Düzensiz şehirleşme, orman ve doğal bitki örtüsünün tahribi, erozyon, hava kirliliği, gübre ve zirai mücadele ilaçları, endüstriyel atıklar ve çöp çevre sorunlarının başlıca kaynakları arasındadır. Böylece gıdaların hangi toprak, yem, su ve çevre koşullarında yetiştirildiği ürünlerde metal düzeylerinin belirlenmesi mevcut ulusal ve uluslararası kodeks yasal limitleri kullanırken, kuruluşumuz gelişen ve değişen endüstriyel koşullar karşısında durumu izleyerek, elde edilmiş verilere göre kamu ve özel kuruluşlara öncülük etmeyi hedeflemiştir. Ayrıca Bakanlıkça yetkilendirildiği konularda şahit numunelerde analiz yapan, eğitim veren, araştırma yapan, yeterli bilgi ve donanımına sahip personeli ile Türk Akreditasyon Kurumu veya Avrupa Akreditasyon Kuruluşları ile akredite edilmeyi hedefleyerek bu yönde çalışmalarını sürdürmeyi amaçlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Mikro Besin Öğesi, Gıda, Antioksidan, İz Mineral

ABSTRACT

Carbonhydrates, proteins and fats taken as nutritional components from food and beverages are named as 'macro nutrient components', minerals and vitamins are named as 'micro nutrient components'. When examining the percentage of essential organic molecules vital for life in metabolism, proteins 50-60%, nucleic acids 10-20%, fats 10-20, carbonhydrates 10-15% and 1-5% inorganic constituents form the basic composition.

Elemental value of food is important in examining the food safety and nourishment value. Showing the effect of inorganic constituents on human health, its stated that it may be dangerous for public health above a certain dose. Trace minerals from the micro nutrient components, lead (Pb), cadmium Cd), tin (Sn), arsenic (As), mercury (Hg) and titanium (Tn) are named as toxic metals. Essential trace elements such as iron (Fe), copper (Cu), zinc (Zn), manganese (Mn), selenium (Se), cobalt (Co), iodide (I), molibden (Mo), nickel (Ni), chromium (Cr) ve aluminum (Al) are named as micro elements. Calcium (Ca), phosphorous (P), magnesium (Mg), potassium (K), sodium (Na), chloride (Cl) that are basic constituents of living organisms are found as ionic level in organism.

Using the chemicals is indispensable fact of modern life. Primarily, generating a healthy public, protecting public health, animal health, and plant health, nourishing the public with enough and healthy food is important. Point of issue is that there are risks for human, animal and plant health. To decrease these risks to acceptable levels by using technological opportunity of today's, developing analysis methods, method validation, sustaining proficiency testing and reference material, performing national and international research projects, following the developments in our country and in the world, following the factors that are threatening the human health due to the use of chemicals.

Enviromental pollution is defined as problems that affect the living organisms' life in a negative way that appear in air, water and soil. Irregular urbanization, destroying forest and natural flora, erosion, air pollution, fertilizer and herbicides, industrial waste, garbage are the main reasons of enviromental pollution.

Thus, determining the metal content of food that are produced in different soil, water, feed, enviromental conditions by using existing national and international codex legal levels and following the changing and improving industrial situations, pioneering the state and public foundations according to obtained data. It also aimed making witness analysis that are authorized by Ministry, giving training, making research, being accredited by Turkish or European Accreditation Foundations with its staff who has enough information and equipment (MARA Legislation and Instruction).

Key Words: Micro-nutrient, Food, Antioxidant, İz Mineral



I. GİRİŞ

Gıda kontaminantları isteğimiz dışı gıdalara bulaşan kimyasal maddelerdir. Üretim sırasında kullanılan tarım ilaçlarının (pestisitler) gıdadaki kalıntıları, arsenik, kurşun, kadmiyum, cıva, kalay, vb. ağır metaller, dioksin, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, çevre kirliliği ajanları, hayvansal ürünlerdeki veteriner ilaçları kalıntıları, pişme sırasında oluşan piroliz ürünleri, gıda üzerinde kimyasal tepkimelerle oluşan N-nitroso bileşikler, gıdalarda üreyen mantarların metabolizma artıkları olan mikotoksinler, gıda ambalaj maddelerinden gıdalara bulaşan kimyasallar, gıda kontaminantı olarak adlandırılırlar (Beier RC, 1990).

Günümüzde 80 000 civarında kimyasal madde çeşitli amaçlar için kullanılmakta ve bu sayı her geçen yıl artmaktadır. XX inci yüzyılın başında çoğu doğal kaynaklı olmak üzere bir kaç bin kimyasal madde kullanılmış iken, bu durum 1940'lardan sonra daha da hız kazanmış ve 1950 yılında 7 milyon ton/yıl olan dünya kimyasal madde üretimi 1985 yılında 250 milyon ton/yıl'a yükselmiş iken bugün bu rakam 400 milyon ton/yıl'a ulaşmıştır. Dünya'da 19.yüz yılın başlarında ortalama yaşam süresi 30 yaş iken, 1997 yılında 63 yaşa yükselmiş ve bu rakamlar ABD'de sırasıyla bahsedilen yıllar itibarıyla 49 ve 77 yaş olduğu rapor edilmiştir (FAO/WHO, 2001).

Gıda standardını belirlemede etkin olan Kodeks Alimentarius Komisyonu'nun kuruluşuna giden süreç, 1945 yılında Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı (FAO) ile 1948 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün kurulması ile başlamıştır. 1950'lerden sonra gıda güvenliği konusundaki uluslararası işbirliği giderek artmış ve 1961 yılında FAO tarafından "Kodeks Alimentarius Komisyonu" kurulmuştur. Komisyon, WHO ile işbirliği içinde çalışmalar yürütmüş ve sonraki yıllarda FAO ve WHO gıda güvenliğini hedefleyen ortak komisyonlar kurmuşlardır (FAO/WHO, 2001).

İki yılda bir toplanmak üzere komiteler aracılığıyla görevini yürüten Kodeks Alimentarius Komisyonu bugün ülkemizin de içinde bulunduğu 165 ülkenin üyeliği bulunmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda oluşturulan standartların, dünyada gıda güvenliği sağlamasına ek olarak ülkeler arasındaki gıda ticaretinde bilim dışı suni engellerin önlenmesi gibi önemli bir yararı sağlamıştır. Dünya Ticaret Örgütü (WTO)'nün 1994 yılında kurulmasının ardından yürürlüğe giren "The WTO Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures (ASPM)" ve "The Agreement on Technical Barriers to Trade (TBT)" gibi uluslararası antlaşmalar da gıda ile ilgili düzenlemeler için Kodeks Alimentarius

Standartları referans olarak kabul edilmiştir. Avrupa Birliği'nin gıdalarla ilgili beslenme, gıda hijyeni ve toksikoloji konularında yetkili komitesi 1974 yılında kurulmuş olup bugün ise Avrupa Birliği Direktifleri "EC Directives" olarak uygulamaya konulmuştur. Gıda ile ilgili her ülkenin ulusal mevzuatı olduğu gibi bizde de "Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği"nin gıdalardaki istenmeyen maksimum kalıntı limitlerini (MRL) ve maksimum izin verilebilir miktarlarının başlangıç süresi olan 16 Kasım 1997 tarihli ve değişik sürelerde revize edilerek Resmi Gazete'de yayımlayarak yürürlüğe konulmuş bir mevzuatımız bulunmaktadır (ILSI-Eu. Rp.,1997)

Böylece Dünya Ticaret Örgütü'nün (WTO) yürürlüğe koyduğu "The Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures (ASPM)" ve "The Agreement on Technical Barriers to Trade (TBT)" gibi uluslararası antlaşmalar ile açıklanan düzenlemeler, Kodeks Alimentarius Standartları Referans olarak alınmış ve bu standartlara Türkiye'nin de uyuma katkı sağlaması zorunluluğu doğmuştur. Bu nedenle yukarıda sayılan ulusal ve uluslar arası kuruluşlar ile AR-GE çalışmaları sonucunda yaşanabilir bir çevre ile eko sistem içerisinde sağlıklı bir ulusal toplum ve dünya insanı ile entegrasyonu sağlayabilme ödev ve sorumluluğu bulunmaktadır (ILSI-Eu. Rp.,1997)

Sağlık Bakanlığı Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel Müdürlüğü tarafından, "Ulusal Mikro Besin Ögesi Yetersizliklerinin Önemi ve Kontrolü Sempozyumu" 19 Nisan 2007 tarihinde İstanbul Ceylan İntercontinental Otel'de yapılarak, Sempozyuma ulusal ve uluslararası kuruluşlardan kadın, çocuk ve halk sağlığı ile biyokimya, endokrinoloji, beslenme, gıda, tarım, eğitim, iletişim ve gelişim gibi bir çok farklı disiplinlerden uzmanın katılımı sağlanmıştır. Konuyla ilgili başta iyot, demir, çinko, folat gibi mineraller ile A ve D vitaminler olmak üzere tüm mikro-besin ögesi yetersizlikleri ile ilgili araştırmaların sözel bildiri ve poster sunumları bu bilimsel toplantıda tartışılmıştır. Türkiye'de konuyla ilgili yapılan sempozyumda proje, araştırma, derleme gibi tüm çalışmaların toplanması ve ülkemizde mikro-besin öğeleri ile ilgili bir durum değerlendirmesi yapılmıştır (MN-Rp., 2007)

Sonuç raporunda Türkiye'de 6-24 aylık bebeklerin "demir" yetersizliğine bağlı olarak beyin gelişiminde bozukluk riskinin var olduğu bildirilmiştir. Uzmanlar her yıl tahminen yeni doğan 330 bin bebeğin ise annenin hamileliği süresince yeterli "iyot" alamaması nedeniyle zihinsel gelişimlerinin yeterli olmadığı ve "Guatr" görülme sıklığının ise % 20 ve üzeri olduğu ülkemizde gözlenen orta düzeydeki iyot yetersizliğine bağlı olarak IQ değer-

lerinin normalden 10-15 puan daha az düzeyde seyrettiği tespit edilmiştir (MN-Rp., 2007).

Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı ülkemiz içinde bulunan 56 araştırma enstitüsü ile 40 il kontrol laboratuvarı, özel laboratuvarlar ile Üniversiteler, TÜBİTAK, Yüksek Teknoloji Enstitüleri, Türkiye Bilim Akademisi ile AB Çerçeve Programlarında Proje alabilen bir yapı ile kollaboratif çalışma düzenleyen, analiz yöntemlerinin geliştirilmesi ve standardizasyonunun sağlanması için çalışmaktadır. Yurtiçi ve yurtdışı bilimsel kuruluşlarla işbirliği ve ortak çalışma yürüten, eğitim ve araştırma yapan, ulusal düzeyde analiz sonuçlarına itiraz durumunda şahit numunelere bakan ve AB referans laboratuvarlarının faaliyetlerine ülke adına ulusal düzeyde katılım sağlayan ve Türk Akreditasyon Kurumu veya Avrupa Akreditasyon Kuruluşlarıncı akredite edilmeyi hedeflemektedir.

II. GÜNLÜK BESLENMEDE MİNERALLERİN YERİ VE ÖNEMİ

MİNERAL METABOLİZMASI

Vücut fonksiyonları ve biyokimyasal reaksiyonlar için gerekli olan mineraller enzimleri etkinleştirmekten, kimyasal reaksiyonları harekete geçirmeye ve iyi bir kemik yapısı oluşturmaktan, sağlıklı beyin fonksiyonları sağlamaya kadar fonksiyonları bulunmaktadır. Vitaminlerin aksine mineraller inorganik maddeler olup, organizma tarafından üretilmediği için besinler yoluyla alınması zorunlu maddelerdir. Vitaminler gibi hayatın devamlılığını sağlayan mineraller, besinin yakılması sonucunda geride kül olarak kalan inorganik elementlerdir. Kül analizi sonucunda 40'a yakın element ortaya çıkar. Bunlardan 17'si vücut için elzemdir. Bir mineralin elzem olup olmadığı, diyetten çıkartıldığında yetersizlik belirtisi göstermesiyle ayırt edilir. Diyetten çıkartıldığında yetersizlik belirtisi gösterenlere elzem mineraller adı verilir. Elzem mineraller, vücudun gereksinim duyduğu miktara göre makro veya mikro olarak ikiye ayrılırlar (Göksoy K, 1986; Ursel, 2001).

Vücudun kendi kendine oluşturamadığı inorganik maddeler olan mineraller, vitaminler ile birlikte çalışarak en fazla ihtiyaç duyulan bölgelere etkin bir şekilde ulaşmalarını sağlarlar. İnsan vücudunun en az vitaminler kadar minerallere de ihtiyacı vardır. Kan basıncında, kalp ritminde, kas fonksiyonlarında, vücuttaki sıvı dengesinin devamlılığında, üremede oldukça önemli rol oynayan mineraller kan oluşumunu ve sağlıklı sinir fonksiyonlarının gelişimini de kontrol ederler. Özellikle büyüme ve gelişme çağındaki çocuklarda mineral eksiklikleri oldukça büyük sorunlara neden olabilmektedir. Dünyada yaklaşık 2 milyar insan, vitamin ve mineral

eksikliği yaşadığı bildirilmektedir. Günlük beslenme temini, 24 saatte içinde alınacak besinlerin ne tür ve ne miktarda alınacağı ile tanımlanan bir terimdir (DNC, 2010).

Organizmanın iki çeşit besine gereksinimi vardır. Enerji verici besin maddeleri ve yapı taşı maddeleridir. Günlük beslenmede çok önemli bir yer tutan enerji verici besin maddeleri, karbonhidratlar, yağlar, proteinler harcanacak kalori miktarlarını karşılamaları gerekir. Bu maddeler yalnızca bazal metabolizmayı düzenlemekle kalmayıp, organizmanın ısı dengesini, büyümesini ve fiziksel etkinliğini de dengede tutabilmelidirler. Beslenmede amaç, alınan enerji ile verilen enerji arasında bir denge sağlamaktır. Alınan enerji harcanandan fazlaysa, artan enerji yağ biçiminde depo edilerek kişinin şişmanlamasına yol açar. Durum bunun tersiye, insan zayıflar. Beslenmede düzenli bir alışveriş dengesi uygulayan kişilerde, beden ağırlığı değişmez değerlerini korur. Enerji harcama kişiden kişiye değişir. Bu nedenle, günlük beslenme programları hazırlanırken, kişinin yaşam ve çalışma koşulları göz önünde bulundurulmuştur (Conrad et al, 2009).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından hazırlanan ve yaşamın çeşitli dönemlerinde gerekli kalori miktarlarını gösteren programları şöyledir: 24 saat için bazal metabolizma koşullarında 1600 kalori gereklidir, oturarak çalışan erişkinlerin 24 saat için enerji gereksinimleri 2400 kalordir. Bu değer kadın ve yaşlılarda artar ya da azalabilir; 15-18 yaşlar arasında yani gelişme çağında 24 saat için 3200 kalori gerekli iken, sürekli beden ile çalışanların kalori gereksinimi 3000-3500 kalori arasında değişmektedir. Ağır işlerde çalışanlar ile sporcuların kalori gereksinimleri 24 saat için 6000-8000 kalori arasında alınması önerilmektedir (ILSI-Eu. Rp.,1997)

Yapı maddeleri yalnızca enerji gereksinimi açısından bakıldığında, ister protein, ister yağ, ister karbonhidrat, hangi madde olursa olsun, yeterli derecelerde alındıklarında aralarında hiç bir fark olmadığı görülür. Ne var ki, beslenme yalnızca bir enerji kaynağı değil aynı zamanda organizmanın bazal dengesini de sağlar. Buna göre, bir yandan besinler alınırken, diğer yandan da yaşamın düzenli olarak sürmesi için gerekli maddeler, yani vitamin, su ve mineraller organizmaya girmelidir. Yoksa beslenme bozuklukları ortaya çıkar. Beslenme yetersizliği, enerji verici maddeler ile vitamin-mineral maddelerin topluca eksikliği; kötü beslenme ise yapı maddelerinden herhangi birinin eksikliğidir. Aslında kötü beslenme ve beslenme yetersizliği, özellikle yaşam kalitesi düşük ülkelerin birinci derecede sorunu olduğu rapor edilmiştir (FAO/WHO, 2001).



Günlük beslenmede mineral madde ve vitamin eksiklikleri, metabolizmayı etkileyerek çeşitli hastalıkların gelişmesine neden olurlar. Bunlara “beslenme yetersizliği hastalıkları” adı verilir. Örneğin Ca ve D vitamini eksikliği raşitizme ve osteomalaziye, vitamin A körlüğe, Zn kıl dökülmesine, Cu enzoatik ataksiye, vitamin E ve Se kas distrofisine, Fe anemiye, İyot guatra, vitamin C yetersizliği ise skorbute neden olduğu bilen olgular arasındadır. Mineral vitamin arasındaki bu ilişki dengeli beslenme ve sağlığın korunması açısından önem taşır. Günlük gereksinimi 50 mg'ın üzerinde olan minerallere makro, altında olanlara ise mikro veya iz elementler denir. Mineralleri metabolik faaliyetlerine göre üç grupta incelemek mümkündür (Aksoy, 2000; Ursel, 2001).

1. Temel Makro Mineraller: Kalsiyum, Fosfor, Magnezyum, Sodyum, Potasyum, Klor ve Sülfür

2. Esansiyel İz Mineraller: Demir, Bakır, Çinko, Manganez, Selenyum, Molibden, İyot, Kobalt, Flor, Krom, Lityum, Bor, Nikel ve Alüminyum

3. Toksik İz Mineraller: Arsenik, Civa, Kadmiyum, Kalay ve Kurşun

Mikro besin ögesi olarak değerlendirilen metallerin tasnifi yapıldığında makro, mikro ve toksik minerallerin metabolizmadaki etkilerini, önemini, düşük ya da yüksek oranlarda alımlarıyla ilgili bulguları ile yiyecek ve içecek kaynakları aşağıdaki bilgilerle açıklanmaya çalışılacaktır. Bu derlemede yer alacak konu başlığı esansiyel iz mineraller olacak, daha sonraki sayımızda ise toksik ve makro mineraller ele alınacaktır.

Esansiyel İz Mineraller

Demir (Fe)

a) Metabolik Önemi: Kırmızı kan hücrelerindeki hemoglobinin yapısında bulunur ve oksijenin taşınmasını sağlar. Hücrelerde enerji oluşumuna ve çıkan karbondioksitin dışarı atılmasını sağlar. Ömrü 4 ay olan kırmızı kan hücrelerinden, işlevi bitmiş olan demiri depolayıp tekrar kullanılabilir hale getirir. Yemekler ile aldığımız demir kana 60-120 dakika sonra geçer, oradan da kemik iliği ve karaciğere taşınır (Chan, 1989). Besinler ile alınıp emilen demirin yüzde 90'ı kemik iliğine taşınır, bunun da % 70'i, 8-10 gün içinde kan dolaşımında tekrar dönerek yerini alır. Bağışıklık sisteminde etkili olup, kollojen doku ve aminoasitlerin sentezlenmesinde görev alır. Demir birçok enzim için hayati önemi vardır. Hastalıklara karşı direnci artırır, yorgunluğu azaltır ve kırmızı kan hücrelerinin oksijenlenmesini sağlar (Washington, 1996; Karagül ve ark., 2000)

b) Yetersizlik Belirtileri: Demir ülkemizde en çok eksikliğine rastlanan mineraldir. Vücutta yeterli miktar-

da demir depolanmazsa, kırmızı kan hücreleri oksijeni taşıyamadığı için anemi, yorgunluk, halsizlik, nefes darlığı, sabırsızlık ve depresyon gibi belirtiler gösterir. Ayrıca iştahsızlık, zayıf hafıza, zeka düzeyinde gerilik, dikkatini toparlayamama, motivasyon güçlüğü, kilo kaybı, kırılğan saç ve kemik yapısı ile bağışıklık sisteminin zayıflaması gibi sorunlara sebep olur (Göksoy, 1986; Karagül ve ark., 2000).

c) Kaynakları ve Gereksinimi: Besinlerin içinde, hem ve hem olmayan demir şeklinde iki formu bulunur. Hayvansal kaynaklı olan hem demirler; et, tavuk ve balıkta yer alıp, yaklaşık yüzde 15-35 oranını kapsar. Hem olmayan demir kaynakları ise yumurta, pekmez, bulgur ve bitkisel besinlerdir. Bunlar, yüzde 2-20 oranında emilir. Bazı besinler demirin emilimini artırırken, bazıları da azaltır. Askorbik asit (Vit.C) demirin emilimini artırırken, çayda bulunan taninler, kuru baklagillerde bulunan fitik asit, kahvedeki polifenoller, hem olmayan demirin emilimini azaltır (Chan, 1989). Kırmızı et, sakatat türü ürünler, beyaz et, balık, yumurta, bal, süt ve ürünleri, bakliyat, kabuklu yemişler, kuru üzüm, pekmez gibi besinler bolca demir içerir. Maden suları, badem, avokado, fasulye, kırmızı pancar, mısır gevreği, hurma, yeşil yapraklı sebzeler, fındık, midye, şeftali, armut, kabak, kuru üzüm, pirinç, kahve, buğday, yulaf, kuru erik, ıspanak, hurma, üzüm, incir, portakal, domates, muz, havuç, lahana, karatürp, marul, mercimek, çavdar, şalgam ve kereviz de ikinci derecede demir (Fe) kaynağı besinlerdir (Karagül ve ark., 2000; Ursel, 2001).

Demir Yüksekliği: Uzmanlar yaşlı insanların vücutlarında demir depolanmasının, demir eksikliğinden daha zararlı olduğunu ve vücutta demir depolanmasıyla kanser, siroz, şeker hastalığı ve kalp rahatsızlıkları gibi kronik hastalıklara davetiyedir. Yapılan bir çalışmada yaşları 67-96 arasında olan 1016 insan üzerindeki bulgular, bu kişilerin % 13'ünde demir fazlalığı tespit edilmiş ve buna bağlı kronik ödemler, siroz ile enfeksiyon belirtileri gözlenmiştir (Conrad et al, 2009).

Bakır (Cu)

a) Metabolik Önemi: Bilinen bütün iz elementler, enzimler ve hormonlar gibi daha büyük moleküllerin yapı taşı olarak bünyelerinde bulunur ve onlarla etkileşerek ilişki içindeler. Böylece büyük miktarlardaki substratları regüle ederler. İz elementler özellikle ko-faktör rolleri ile metallo enzimlerin görevleri yönünden önemlidir (Jacob, 1987; Kurt ve ark., 2001). Bakır tirozinaz, katalaz, sitokrom oksidaz, süperoksit dismutaz ve dopamin beta-hidroksilaz, lizil oksidaz enzimlerin kofaktörüdür. İnce bağırsaktan emilir %10 albumin ve %90 se-

rüloplazmin ile taşınır. Serbest miktarı %1'in altında olup idrar ve safra yolu ile atılır. Bakırın sağlık açısından risk taşımasının nedeni, su tesisatında kullanılan çeşitli malzemelerde bakır kullanılması ve bakır veya bakır kaplı kapların bazı toplumalarda yemek pişirme amacıyla kullanılmasıdır (Oruç ve ark., 2009). Genel olarak doğada bulunan sulardaki bakır miktarı 4 µg/L'i geçmez. Ancak bazı sulara daha yüksek olduğu saptanmıştır. Konuta döşenmiş bakır alaşımlı tesisatlardaki su 6 saat veya daha uzun süre kalırsa sudaki bakır miktarı 1.0 mg/L üzerine çıkabileceği ve bu nedenle musluk ilk açıldığında akan su kullanılmamalı 15-30 saniye akması beklenmesi önerilir. Sudaki maksimum bakır seviyesi 1.3 ppm'dir (Sures ve ark., 2001).

b) Yetersizlik Belirtileri: Kan bakırında düşme, enzim aktivitelerinde azalma, melanin sentezinde bozulma, kıl-tüy-yünde depigmentasyon, demiyelinizasyon, enzootik ataksi (swayback), abortus, yaşama kabiliyetinde azalma, kansızlık, kemiklerde deformasyon, spastik paraliz, titreme, koordinasyon bozukluğu ve ishal ortaya çıkar (Göksoy, 1986). Bakır eksikliğinde büyüme geriliği, hipokrom mikrositer anemi, nötropeni, seberoik dermatit, ataksi, fotofobi, konjonktivit, hipotoni ve hepatomegali görülür. Daha sonra vezikülobüllöz ve ekzematoid bir karakter alan bu lezyonlar daha çok distal ekstremiteler ve perianal bölge gibi uç noktalarda daha belirgin olduğundan, acrodermatitis adı verilmiştir. Saçlar seyrek ince ve kırılıgandır (Karagül ve ark., 2000).

c) Kaynakları ve Gereksinimi: Daha çok ıstiridyel, karaciğer, balık ve yeşil sebzeler ile kuru üzüm, pancar, havuç, muz, ıspanak, lahana, erik, kayısı, badem, fındık ve çavdar gibi besinlerde bulunur. İçilen sulara yaklaşık 150 mcg Cu alınması önerilirken sağlıklı bir yaşam için yetişkin bir insanın 1000 mcg'a kadar tüketmesinde sakınca görülmediği rapor edilmiştir. Yüksekliğinde Wilson ve Menken hastalıkları görülür (Washington, 1996; Aksoy, 2000).

Çinko (Zn)

a) Metabolik Önemi: Çinkonun gıdasal olarak esansiyel oluşu ilk kez 1934 yılında farelerde ve ratlarda, 1955 yılında domuzlarda, 1958'de kanatlılarda, 1960 yıllarında sığırlarda ve 1961'de insanlarda belirlenmiştir (Doepel et al., 2002). Yetişkin insan vücudunun saç, deri, tırnak, kemik, karaciğer, böbrek, kas, pankreas, dalak ve testis dokularında 1.5 ile 2 gram civarında bulunur. Karbonhidrat, yağ ve protein sentezinde etkin rol oynar. Hücre büyümesi ve yenilenmesi ile farklılaşmasında son derece gerekli bir mineraldir. Zihinsel fonksiyonların gelişmesinde, bağışıklık sistemi-

nin pik yapmasında, hormonal dengenin korunmasında önemli yere sahiptir. Kalp, beyin ve üreme sisteminin çalışması için gereklidir. Antioksidan özelliği ile hem hücreleri serbest radikallerden korur, hem de hücre zarı ve fonksiyonlarına yardım eder. Çinko içeren enzimlerin karbonhidrat, lipid, nükleik asit metabolizması ve protein oluşumunda önemli işlevleri vardır. Organizmada 300'e yakın enzimin aktivitesinden sorumlu çinko (Zn) önemli metallo enzimlerin yapısına girerek karbonik anhidraz, karboksipeptidazlar, alkali fosfataz, DNA ve RNA polimeraz, timidin kinaz, aldolaz, süperoksit dismutaz, alkol retinal dehidrogenaz, laktat dehidrojenaz, glutamik dehidrojenaz, ürikaz ve karboksipeptidaz enzimlerinin aktif bölgesinde yer alarak enerji metabolizmasında, protein sentezinde ve ribonükleik asit biosentezinde görev alır (Aksoy, 2000; Karagül ve ark., 2000; Suttle, 2001).

b) Yetersizlik Belirtileri: Enfeksiyonlara duyarlı, iştahsızlık, kilo kaybı, öğrenme ve dikkat eksikliği, tat alma duyusunda bozukluk, ciltte görülen egzama, akne, dermatit, saçlarda inceltme ve dökülme gibi sorunlar yaşanır. Çinko eksikliği çok yaygın olarak yüksek tahıl içerikli vejetaryen diyetlerde bulunan ve organik asitlerden oluşan fitatlardan kaynaklanır. Vitamin A ve çinko yetersizliği kıl dökülmesi (alopecia), deride kalın kabuklanmalar (hiperkeratozis), deride kepeklenme (pitriozis), bakarkörlük (amourosis), gece körlüğü (night blindness), infertilite bozukluğu ile derinin epidermis tabakasında yangısal olmayan kabuklanma ve çatlaklarla karakterize bozuklukların oluşumuna neden olmaktadır (Karagül ve ark., 2000; Akkaya ve ark., 2005). Kan çinko seviyesinde düşme, enzim aktivitelerinde azalma, anoreksi, büyümede yavaşlama veya durması, parakeratozis, düşük süt verimi, yapağı-kıl dökülmesi, pika, bağışıklığın zayıflaması, yaraların iyileşmesinde gecikme, timusta küçülme, lökosit yüzdesinde artma, kemiklerde deformasyon, tırnakların çevresinde şişme ve yaralanmalar, gözlerin etrafında çapaklanma, salya akıntısı, kayıtsızlık ve ağırlık kaybı gibi bozukluklar gözlenmiştir (Kalaycıoğlu ve ark., 1998).

c) Kaynakları ve Gereksinimi: Çinko daha çok deniz ürünleri, et, karaciğer, tavuk yureği, peynir ve yumurta, fındık, ay çiçeği çekirdeği, baklagiller, pekmez, susam, soya fasulyesi, kabuklu kuruyemişler, tüm tahıllar, kabak çekirdeği, zencefil kökü maden suları ve ıstiridyede bulunur. Günlük çinko ihtiyacı yaklaşık 15 mg olup, 50 mg dan fazla alınması tavsiye edilmez. Eğer uzun süreli çinko kullanılacaksa günlük olarak 20 mg'lık doz önerilir. Çinkonun evcil hayvanlarda ortalama kan serum düzeyi 80-120 lg/dl iken bu oran insan



plazmasında 78-156 $\mu\text{g/dl}$ 'dir (Altıntaş ve Fidan-
cı, 1993). Değişik bitki türlerine göre saman ve slajlar-
da 60 ppm, tahıl danelerinde 20-30 ppm, soya, susam,
pamuk tohumu gibi bitkisel proteinlerde 50-70 ppm ara-
sında değişir. Yemlerde Zn içeriğinin 40 ppm den dü-
şük olması yetersizlik nedeni kabul edilir (Mc Dowell,
1992). Çinko değerleri kuru madde bazında (dry mat-
ter), kaba yem maddelerinde 17-160 ppm, tahıl danele-
rinde 20-30 ppm, yağlı tohum küsbelerinde 50-70 ppm
ve hayvansal protein kaynaklarında 90-100 ppm ara-
sında ve içme suyunda 5 ppm olarak değişmektedir.
Memeli dokuların çoğunda Zn konsantrasyonu türlere
göre 30-250 mg/g arasında değişir (Georgievski, 1982;
NRC, 2001).

MANGANEZ (Mn)

a) Metabolik Önemi: Hayvanlar ve insanlar için
zorunlu bir mikro element olup; biyolojik sistemlerde al-
fa-2 makro globulin Mn+2 olarak bulunan formu, trans-
ferine Mn+3, enzime Mn+4 ve doğada Mn+7 değerlik-
li olarak oksidasyon formları mevcuttur. Bir enzim akti-
vatörü olarak metallo enzimlerin sentezine iştirak eder
ve makro moleküllerin ko-faktör bileşeni olarak fonksi-
yon görür (Zaloğlu, 2001). Manganez minerali kemik
oluşumu ve bağ dokuları için çok gereklidir. Protein ve
genetik yapının sentezine katkıda bulunur ve besinlerin
enerjiye dönüşümünde yardımcı olur. Aynı zamanda
antioksidan görevi var, normal kan pıhtılaşmasına yar-
dımıcı olur. Glikoz metabolizmasının anahtar enziminde
önemli bir yardımcı faktördür. Böbreklerde ve karaci-
ğerde depolanır (Aksoy, 2000; Ceylan, 2001).

b) Yetersizlik Belirtileri: Mangan yetersizliğine
bağlı olarak büyümede gerileme, iskelet kaslarında de-
formasyon, üreme fonksiyonlarında bozukluk (kısırlık),
abortus, eklemlerin genişlemesi, hareketin azalması,
tarsus ekleminin ve tendodaki gastrokinemiya kondilu-
sa bağlı dışa ve içe dönmesi, perozis, yeni doğanlarda
ataksi, yumurta veriminde ve yumurta kabuğu kalitesin-
de düşüş gözlenir. Ayrıca enzimlerin aktivitesinde azal-
ma, vücut yağlarında artış, pankreas bozukluğuna bağ-
lı hipoplazi, aplazi ve diyabet görülür (Suttle, 2001; Za-
loğlu, 2001).

c) Kaynakları ve Gereksinimi: Diyetle alınan
Mn'in en önemli kaynağını yeşil yapraklı sebzeler, de-
niz ürünleri, kuşkonmaz, bütün tahıl ürünleri ve çay
oluşturmaktadır. Yağlı kuruyemişlerden ceviz, fındık,
fıstık, badem ile maden suları, avokado, kuru bezelye
ve yumurta gibi ürünlerde oldukça fazladır. Manganez
geniş bir güvenlik sınırına sahip olmasına rağmen tok-
sik düzeyi 1000 ppm'e kadar tolere edilebileceği rapor
edilmiştir (Ergün A, 2001; NRC, 2001).

Selenyum (Se)

a) Metabolik Önemi: Selenyum antioksidan bir
madde olup glutasyon peroksidaz enzimin kofaktör-
dür. Aynı zamanda her hücrenin doğru çalışmasında
gerekli olan tiroit hormonunun vücutta 5' iodinaz reak-
siyonunda da koenzim olarak görev yaparak en az ak-
tif olan T4'den, T3'e dönüştürülmesi için de yaşamsal
önemi vardır. Selenyum, E vitamini ile birlikte alındığın-
da savunma sisteminin güçlendirilmesinde katkıda bu-
lunan ve kanserden korumada etkili olan bir mineraldir
(Swain et al., 2000). Serbest radikallerin oluşumunda
etkili olan alkol, sigara dumanı ve yağların etkilerini nö-
tralize eder. Hava kirliliği, ultraviyole ışınları, radyasyon
ve toksik minerallere maruz kalma ile kardiyovasküler
hastalıklardan, karaciğer fonksiyonlarının ve üreme ye-
teneğinin korunmasını sağlar. Cornell Üniversitesi ve
Arizona Üniversitesinde gerçekleştirilen beş yıllık bir
çalışma sonucunda günde 200 mcg alan insanların
%63 daha az prostat tümörü, %58 daha az kolon kan-
seri, %46 daha az habis akciğer hastalığı olduğunu ve
genelde kanserden ölümlerde %39 azalma olduğunu
göstermiştir (Chan AC, 1989; Conrad et al, 2009). Ag-
riculture Research makalesine göre, fareler üzerindeki
araştırmalarda her ikisi de antioksidan olan selenyum
minerali ile E vitamini eksikliğinin virüs ve bakteriyel
hastalıkların neden olduğu enfeksiyonlarla mücadelede
başarı sağlandığını bildirmişlerdir. Selenyum, vücutta
kendisini zararlı bakterilerden ve aynı zamanda kanser
hücrelerinden korumada yardımcı olan sağlıklı bir bağ-
ışıklık sistemi için esastır. Selenyum ile Vitamin E kom-
binasyonu uçukların nedeni olan herpes virüsü ve zona
ile mücadelede rol aldığı, immün arttırıcı etkileri ile ro-
matoit artrit, sedef hastalığı, lupus ve egzama gibi kro-
nik hastalıklara karşı önemli işlev gördüğü bildirilmiştir
(Sies et al., 1992; Surai, 2001).

b) Yetersizlik Belirtileri: Selenyum eksikliği, top-
rağın selenyum açısından zenginliği veya fakirliği ile
ilişkilidir. Selenyum açısından fakir topraklarda yaşı-
yan ailelerin çocuklarının diğer çocuklara oranla daha
yavaş büyümekte oldukları gözlemlenmiştir. Selenyum
etkisi serviks, rektum, yumurtalık, mesane, yutak, pan-
kreas ve karaciğer gibi kanserleri önlemede yardımcı
olduğu bildirilmiştir. Çinin bir bölgesinde selenyum ek-
sikliğine bağlı miyokard nekrozu ve fibrozu endemik
olarak görüldüğü, kas yapısında şiddetli bir zayıflık,
kalp ve damarlardaki esneme, zafiyet ve çocuklarda fe-
tal kardiyomyopatiye neden olduğu rapor edilmiştir
(Beier, 1990; Benford, 2000).

c) Kaynakları ve Gereksinimi: Selenyum beyaz
et, deniz ürünleri, kırmızı et, soğan, sarımsak, kırmızı-

biber, brokoli, buğday tohumu vb. gıdalar en yaygın kaynaklardır. Hücre DNA'sına zarar veren serbest radikallere karşı Se antioksidan olarak görev yapar. Kanser, kalp rahatsızlıkları ve yaşlanma ile mücadelede yardımcı olarak vitamin C ve E ile birlikte alınması önerilmektedir. Günlük gereksinimi erkekler için 70 mcg ve kadınlar için ise 55 mcg olarak bildirilmiştir. Tedavi amacıyla kullanılacak ise bu oran 600 mcg'a kadar artırılabilir önerilmiştir. Se'un toksik düzeyi koyunlarda 20 ppm, sığırlarda 5-50 ppm, kanatlılarda ise 15 ppm olarak kritik sınır olduğu bildirilmiştir (Sies et al., 1992; Surai and Mellor, 2001).

İyot (I)

a) Metabolik Önemi: Organizmanın normal büyüme ve gelişmesi için gerekli olan önemli bir mikro besin öğesidir. İnsan vücudunda çok az miktarda bulunmakta olup, bedensel iyodun büyük bir kısmı tiroit bezinde bulunur ve tiroit hormonlarının yapımında görev alır. Tiroit bezi, boynun ön tarafında yer alır ve tiroit hormonlarını üretir. Bu hormonlar vücudun normal büyümesi ve zihinsel gelişmesi ile birlikte vücut ısısının ve enerjisinin oluşması gibi olayların devamını sağlar. İyotça fakir topraklarda yetiştirilen yiyeceklerde ve bölge sularında yetersiz miktarda iyot bulunduran besinlerle beslenen bireyler yeterli miktarda iyot alamazlar. İyot'un %100'e yakın bölümü ince bağırsaklardan emilimi gerçekleşir. Tiroksin ve triiodotironinin yapısına giren iyot, idrarda miktarının tespiti ile eksikliği taraması yapılır. İyot eksikliği yemek tuzlarına iyot eklenmesi ile önlenir. Türkiye'de 2000 yılından itibaren yemek tuzlarının iyotlanması zorunlu hale getirilmiş ve eksikliklerin giderilmesine bir nebze katkı sağlamıştır (Karagül ve ark., 2000; Aksoy, 2000).

b) Yetersizlik Belirtileri: İyotun yetersiz alınmasıyla gebe annelerde düşük yapma, ölü doğum, anormal bebek, yavaş büyüme ve gelişme geriliği, nörolojik bozukluklar, zeka geriliği ve guatr gibi çok çeşitli sağlık problemlerine neden olabilmektedir. Hafif ve orta derecede iyot eksikliğinde basit guatr ve hipotiroid oluşur. Günümüzde dünya nüfusunun %30'u iyot yetersizliği olan bölgelerde yaşadığı bildirilmiş olup, dünya nüfusunun %12'sinde iyot eksikliğine bağlı guatr, %1.6'sında zihinsel kusurlar ve %0.44'ünde ise kretinizm olduğu rapor edilmiştir. İyot yetersizliğine bağlı tiroit bezinin aşırı çalışması neticesinde bezde büyüme ve iyot'u depolamadan dolayı guatr oluşur. Guatr olarak adlandırılan bu hastalığı önlemede iyot en önemli mineraldir. Tiroit bezinin dengeli çalışması için iyot zorunludur. Yetersiz alımlarda boy uzaması ve kemik gelişimi durur, beyin gelişimi özellikle gebelik ve bebeklik

döneminde zarar görür, bunun sonunda zekâ geriliği ortaya çıkar. Aşırı iyot yetersizliği durumunda ise sağırılık, dilsizlik, cücelik ve doğuştan sakatlıkların görülmesinin arttığı bildirilmiştir (Aksoy, 2000; Yavuz, 2001).

c) Kaynakları ve Gereksinimi: İyot en çok deniz yosununda, özellikle de "kelp" denilen yosun türünde bulunur. Diğer kaynakları deniz ürünleri, kuşkonmaz, lahana, havuç, bögürtlen, turp, ıspanak, domates, patates, soğan ile muz gibi besinler iyot kaynağı ürünlerdir. Özellikle kara lahananın fazla tüketilmesi iyodun bağlanmasına neden olur. Bağlanan iyot aktif olmadığı için tiroit bezinde görev alamaz böylece T3 ve T4 hormonları inaktif konumda olacağından, iyot almanın en kolay ve etkili yolu iyotlu tuz kullanımı önerilmektedir (Aksoy, 2000; Yavuz, 2001).

Kobalt (Co)

a) Metabolik Önemi: Kobalt, B12 vitaminiyle beraber kobalamin bileşimini meydana getiren bir elementtir. Pankreasta önemli miktarda bulunur. İnsülinin ve bazı enzimlerin sentezlerinde kullanılır. Organizmada az miktarda bulunan bu mineral B12 vitaminin oluşumuna doğrudan etki eden ve metabolizmada kobalamin olarak adlandırılan bileşiğin aktif kofaktörü olarak işlev görür ve kandaki alyuvarların gelişmesi için önemli bir iz elementtir (Karagül ve ark., 2000).

b) Yetersizlik Belirtileri: Vitamin B12 eksikliği folik asit eksikliğine neden olarak nükleik asitlerin biyosentezini azaltır. Kobalt eksikliğinin belirtileri iştah kaybı sonucu ağırlık kaybı, büyüme gerileri, gebelik döneminde doğumsal anomalilere, halsizlik, enfeksiyonlara karşı direnç azalır ve pernisiyöz anemiye neden olur. Cinsiyet organları gelişemez, karaciğer ve dalak büyür, ishal ve sinir sisteminde bozukluklar görülür (Aksoy, 2000).

c) Kaynakları ve Gereksinimi: Hayvansal kaynaklardan kırmızı ve beyaz et, deniz ürünleri, karaciğer, yumurta sarısı ve bitkisel kaynaklardan tahıl tohumları ile mantarda bol miktarda bulunur (Aksoy, 2000; Yavuz, 2001).

Krom (Cr)

a) Metabolik Önemi: Krom temel bir iz mineral olup bazal metabolizma aktivitesini artırdığından vücut yağlarını yakıtını, bunun da kas tonüsünü geliştirmeye yardımcı olduğu ileri sürülmektedir. Diyet yapmaktan mucize bir buluş olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca karbonhidratların metabolizması için gerekli olduğundan ve aynı zamanda kan şekeri metabolizmasının düzenlenmesine katkı sağladığı böylece diyabeti geriletmeye yardımcı olduğu bilgiler mevcuttur. Kan yağ ve koleste-



rol düzeylerini kontrol ettiğini ve yüksek kan basıncını düşürmeye yardımcı olduğu bildirilmiştir.

b) Yetersizlik Belirtileri: İnsan ve hayvanlarda glikoz intoleransı, serum kolesterol, trigliserit ve açlık insülin düzeyinin yükselmesiyle hiper kolesterolemiye neden olduğu kaydedilmiştir (Ergün A, 2001; NRC, 2001)

c) Kaynakları ve Gereksinimi: Kromun en iyi kaynağı gerçek bira mayasında ve tahıl ürünlerinde olduğu saptanmıştır. Diyet yapanlar kromu karbonhidrat ve yağ metabolizması üzerine etkisi nedeniyle kullanır. Genel olarak krom pikolat şeklinde alınır. Kromun günlük gereksinimi 50–200 mcg arasında olduğu ve geniş bir endikasyona sahip olduğundan herhangi bir toksisiteye neden olmadığı saptanmıştır. Kaynakları arasında, mercimek ile burçakta var olduğu ileri sürülmektedir (Aksoy, 2000; Karagül ve ark., 2000).

Fluor (Fİ)

Hidroksiapatit kristallerinin yapısına girdiği için diş ve kemik oluşumu için gereklidir. Florür diş minelerini sertleştiren ve çürümelerini önler. Anne sütü içinde az miktarda florür bulunmasına karşın bebeklerde en az altıncı aya kadar florür eksikliği ortaya çıkmaz. Bu dönemde florür takviyesi yapılsa sürmekte olan diş yapısı bozulabilir. Eğer şehir sularında yeteri kadar florür yoksa (0.6 ppm'den az) fluorürlü diş macunları kullanılmıyorsa ve diğer yiyeceklerden alınan florür miktarı düşük ise florür takviyesi yapılmalıdır. Florür gelişigüzel kullanılmamalıdır. Çünkü tedavi edici dozlar ile toksik dozlar arasındaki sınır fazla değildir. Florür fazlalığında dişlerde siyah lekeler (fluorozis) oluşur. Daha çok sularda, çayda, ette ve deniz ürünlerinde bulunur. % 80-90 kadarı ince bağırsaklardan emilir (Ursel, 2001).

Lityum(Li): Lityum beyinin depresyon ve alkol bağımlılığı gibi ruhsal bozuklukların sebeplerini azaltma ve önlemeye yardımcı olan bir mineraldir. Bu mineral azlığı pek yaygın değildir. Kaynakları: Maden suları, deniz ürünleri ve domates, pırasa, patates, tahıllar, ciğer, patlıcan ve yapraklı sebzelerdir (Aksoy, 2000; Ursel, 2001).

Nikel: Bu mineral pankreası ve karaciğeri etkiler. Ancak bu konudaki bilgiler hayvanlar üzerinde yapılan deneylerle sınırlı kalmıştır. İnsan üzerindeki etkisi henüz yeterince açıklanmış değildir.

Kaynaklar: Mantar, lahana, tahıl ürünleri, meyveler, havuç ve kuru fasulyedir (Ursel, 2001).

Bor: Bor sağlıklı kemikler, dişler ve kalsiyum, magnezyum ve fosforun uygun metabolizması için ihtiyaç duyulan iz mineralidir. Bor beyin fonksiyonlarını ge-

liştirir, kemik erimesini azaltır ve kas yapar. Bor'un eksikliği D vitaminin yetmezliğini hızlandırır. D vitaminini böbreklerde en aktif form haline dönüştürmesi için gereklidir. Östrojen gibi belli hormonların aktive edilmesi için bor gerekmektedir. Vücudumuzdaki ve kemiklerdeki kalsiyum, magnezyum ve fosforun muhafazası için gerekli olan bir mineraldir. Bu üç mineralin vücutta maksimum şekilde kullanılması ve muhafazasını sağlayan yardımcı mineraldir. Kaynakları en fazla bulunan maden suları, elma, havuç, tahıl, üzüm, fındık, armut ve yapraklı sebzelerdir (Aksoy, 2000; Ursel, 2001).

Esansiyel Mikro/İz Minerallerin Antioksidatif Metabolizma İlişkisi

Günümüzde serbest oksijen radikalleri kendilerinin ve antioksidan kapasitesinin ölçülmesiyle; oksidatif stresin meydana getireceği biyolojik hasar ile çoğu hastalığın patolojisinde kritik rol oynadığı bildirilmektedir. Bu nedenle antioksidan intraselüler enzimlerin incelenmesi birçok konuyu aydınlatacağı gibi önemli hastalıkların prognozunda ve tanısında yol gösterici olabildiği açıklanmıştır (Beşkaya ve Fidancı, 2004). Organizmanın sağlıklı olabilmesi için vitaminlerin yanında minerallere de gereksinimi vardır. Minerallerin başlıca görevi hücre içi ve dışı sıvılar ile kanın asit-baz dengesinin korunmasına yardımcı olmaktır. Vitaminler ile mineraller organizmada işbirliği yaparak işlev görürler. Antioksidan savunma sistemi ile stres şartlarının oluşturduğu serbest radikal oluşumu arasında bir denge vardır (Zini ve ark. 1993). Oksidatif stres şartlarında birinci savunma hattını oluşturan Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px-Se), Sitokrom Oksidaz (COX-Cu-Fe), Süperoksit Dismutaz (SOD-Zn-Cu-Mn) ve Katalaz (CAT-Fe) gibi intraselüler antioksidan enzimlerin kofaktörü metaller uygun diyet alımı ile antioksidan sistem hattına katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (Dündar ve Aslan, 2000; Beşkaya, 2004).

Yapılan bir çalışmada, etlik piliçlerin rasyonlarına ilave edilen doğal ve sentetik antioksidanlar ile iz elementlerin metabolizması irdelenmiş; buna bağlı olarak yapılan çalışmada olası prooksidatif-antioksidatif etkileşimin istatistikî değerlendirilmesi yapılmıştır. Elde edilen bulgular ile kan serumunda vitamin C-Fe, vitamin A-Cu, vitamin A,E-Mn ve BHT-Se değerlerinde $p<0.001$ düzeyinde istatistik önemlilikte artışa; ancak vitamin E-Fe, vitamin C-Cu ile Mn ve vitamin A,C,E-Se değerlerinde $p<0.001$ düzeyinde istatistik önemlilikte düşüşe neden olmuştur. Ayrıca serum Zn düzeyleri ise birbirine yakın olup gruplar arasındaki farklılıkların istatistik önemi bulunmamıştır ($p>0.05$). Böylece broyler rasyonlarına ekstra olarak ilave edilen antioksidan vita-

min A, C, E ve sentetik bir antioksidan olan BHT'nin, önemli bazı mikro elementlerin; Fe, Cu, Zn, Mn, Se metabolizması üzerine beklenen sinerjist veya antagonist etkileri ile prooksidatif-antioksidatif etkileşimleri gerçekleştirdiği rapor edilmiştir (Beşkaya ve Fidancı, 2004).

KAYNAKLAR

- Akkaya R., Beşkaya A., Fidancı U.R., 2005. Research on Seasonal Changes of Serum Vitamin A and Zinc Levels in Sheep around Ankara Province. *Etilik CVCRI Journal of Microbiology* 16 (1-2), 13-22.
- Aksoy M., 2000. İz Elementleri. *Beslenme Biyokimyası. Hatipoğlu Yayınevi. Sayfa: 465-565. ISBN:975-8322-07-9*
- Altıntaş A., Fidancı U.R., 1993. Evcil hayvanlarda ve insanda kanın biyokimyasal normal değerleri. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 40(2):173-186.
- Benford D., 2000. The Acceptable Daily Intake. A Tool For Ensuring Food Safety. *ILSI Europe Concise Monographs Series. ILSI Press. Belgium.*
- Beşkaya A., 2004. İntrasellüler Enzimatic Antiooxidants; Superoksit Dismutas (SOD), Catalase (CAT), Glutation S-Transferaz (GST), Glutation Peroksidaz GSH-Px, Citokrom Oksidaz (COX). *February 01, 2001. Ankara University, Institute of Health Science. İnfo Vet Dergisi*, 5 (1-2), 13-15.
- Beşkaya A., Fidancı U.R. The Effects of Natural (Vit. A, C, E) and Synthetic Antioxidants (BHT) on Some Trace Elements in Broiler (Fe, Cu, Zn, Mn, Se Analysis by FAAS&GFAAS) Ph.D. Thesis. 2th National Veterinary Biochemistry and Clinical Biochemistry Congress; Fırat University, Faculty of Veterinary Medicine; Elazığ, 9-11 September 2004.
- Beşkaya A., Yıldız K., Başalan M., US M.F., 2008. Determination of some heavy metal (Cd, Cu, Pb, Zn) in breeding sheep tissues with parasitisms, soil, water and feedstuffs of around environment industry in Kırıkkale. *The Journal of Etilik Veterinary Microbiology*, 19(1), 39-46.
- Carapella S.C., 1992. Arsenic and arsenic alloys. In: Kroschwitz JI, Howe-Grant M, Eds. *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*. Vol. 3. New York, NY: John Wiley and Sons, 624-633.
- Ceylan N., 2001. Hayvan Beslemede Mineraller ve Stabilité, A.Ü.Ziraat Fakültesi Basımı, Zootečni Bölümü.
- Chan A.C., 1989. Partners in defense, vitamin E and vitamin C can J. *Physiol Pharmacol.*, 71: 725-731.
- Conrad et al, 2009. <http://www.nutrition.org/publications/guidelines-and-policies/reprints/>. AJCN ve URL <http://www.ajcn.org/> ve MUST; *Am. J. Clin. Nutr.* 91 (1): 1- 245, 251 – 292.
- Çakır A.F., 1975. Kalay ve Ekonomisi, *Madencilik Dergisi*, 14/3.
- Dutch Nutrition Centre: www.voedingscentrum.nl/ Vitamin and Mineral Supplement Fact Sheets Images adapted from here. *Linus Pauling Institute at Oregon State University Minerals ~ Zinc Facts about Zinc*. Erişim Tarihi: 21.02.2010.
- Dündar Y., Aslan R., (2000). Hekimlikte Osidatif Stres ve Antioksidanlar. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları*.
- Ergün A., Tuncer D.Ş., Çolpan İ., Yalçın S., Yıldız G., Küçükercan S., Şehu A., Küçükercan K., 2001. Hayvan Besleme Ve Beslenme Hastalıkları, *Medipres Mat. Yay. Med. Vet. Hiz. Hay. Ürn. Ltd. Baskı: Özkan Matbaacılık, Ankara*.
- Göksoy K., 1986. Çiftlik Hayvanlarında Mineral Madde Dengesizliklerinin Epidemiyolojisi. *TÜBİTAK VHAG-572. TAEK Lalahan Hayvan Sağlığı Nükleer Araştırma Enstitüsü, Ankara*.
- WHO Guidelines for drinking-water quality Dünya Sağlık Örgütü İçilecek Su Kalitesi Rehberi; . Erişim Tarihi: 07.03.2009. http://www.who.int/water_sanitation_health/dvq/guidelines/en.
- Ulusal Mikro Besin Ögesi Yetersizliklerinin Önemi ve Kontrolü Sempozyumu: T.C.Sağlık Bakanlığı, Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel Müdürlüğü 19 Nisan 2007 Ceylan Intercontinental Otel İstanbul. Erişim Tarihi: 23.02.2010. <http://www.geography.about.com>; JMPR (The Joint FAO/WHO Meeting on Pesticides Residues-Pestisit FAO/WHO Ortak Toplantısı);
- JECFA (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives- Gıda Katkıları FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi Notları) Erişim Tarihi: 15.02.2010.
- International Life Science Institute. Europe (1997). Applicability of the Acceptable Daily Intake (ADI) to Infants and Children ILSI Europe Report Series, January 1997, Genvai, Belgium. http://www.mn-turkey_moh_april_2007_sbacsapgm.gov.tr,
- Jones D.P., Eklow I., Thor H., Orrenius S., 1981. Metabolism Of Hydrogen Peroxide In Isolated Hepatocytes: Reactive Contributions Of Catalase And Glutathione Peroxidase In Decomposition Of Endogenously Generated H₂O₂. *Arch. Biochem. Biophys.* 210:505.
- Kalaycıoğlu L., Serpek B., Nizamlioğlu M., Başpınar N., Tiftik A.M., 1998. Biyokimya -Vitaminler, Selçuk Üniv. Vet. Fak. Yayınevi: 377- 379, Konya.
- Karagül H., Altıntaş A., Fidancı U.R., Sel T., 2000. Klinik Biyokimya, *Medisan Yayın Serisi*, 45: Ankara.
- Kırkcalı G., Yalçın S., 1998. Oksidatif Stresin Ölçülmesi Ve Standartizasyonu, İçinde: *Türk Biyokimya Derneği, Klinik Lab. Stnd ve Kalite Güvencesi Toplantı Kitabı*, 5: 305-312.
- Kurt D., Denli O., Kanay Z., Güzel C., Ceylan K., 2001. Diyarbakır bölgesi Akkaraman koyunlarında kan serumunda Cu, Zn, Se ve yünde Cu, Zn düzeylerinin araştırılması. *Türk J.Vet. Anim. Sci.*, 25: 431-436.
- Marklund S., 1984. Extracelluer Superoxide Dismutase In Human Tissue And Human Cell Lines *J. Clin. Invest*; 74: 1398-140
- Mc Dowell L.R., 1992. Minerals in animal and human nutrition in 'Animal Feeding and Nutrition' (Ed. By T.J. Cunha), *Acedemic Pres Inc. San Diego*.265-293.
- Mertz W., 1981. Trace Elements in Human and Animal Nutrition. *Academic Pres Inc., San Diego, CA*.
- Oruç H.H., Cengiz M., Beşkaya A., 2009. Chronic copper toxicosis in sheep following the use of copper sulfate as a fungicide on fruit trees *J Vet Diagn Invest* 21:540-543.
- Percy M., 1984. Catalase, An Old Enzyme With A New Role? *Can. J. Biochem. Cell. Biol*; 62:1006-1014.
- Roche 1993. Vitaminler, vitaminlerin özellikleri, insan ve hayvan beslenmesindeki önemi. *Roche Müstahzarları Sanayi Ltd. Şti., İstanbul*.
- Sies H., Stahl W., Sundquist A.R., 1992. Antioxidant Functions Of Vitamins. Vitamin E And C, Beta Carotene And Other Carotenoids. *Ann Ny Sci.*, 669: 7-21.
- Surai P., Mellor S., 2001. Nutrition Antioksidants Central to Long-term Liveability. *World Poultry Elsevier* 17: 12.
- TGKY 2005a. Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ No: 2002/63.
- TGKY 2005b. Ağır Metal (Cd, Pb) Seviyesinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği 2005/35.
- Ursel A., 2000. Natural care-Vitamins & Minerals Handbook. *London: Dorling Kindersley. ISBN 80-89179-01-0*
- Zaloğlu N., 2000. Manganezin Biyolojik Sistemdeki Etkileri. *Türk Biyokimya Dergisi*, 26 (2): 61.



Poliklorlu Bifenillerin Sucul Sistemler Üzerine Toksisitesi

Toxicity Of Polychlorinated Biphenyls On Aquatic Systems

Dr. Gül Çelik Çakıroğulları^{1*}

Dr. A. Çağlan Karasu Benli²

¹ Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı, Kalıntı Analizleri Bölümü, Dioksin Birimi,

² Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Bilimleri Anabilim Dalı

ÖZET

Poliklorlu bifenillerin çevresel taşınması, yayılması ve dönüşümü oldukça kompleks bir mekanizmadır. Yüzeysel suları poliklorlu bifenillerle atmosferik olaylar, nokta kaynaklardan direkt emisyonlarla veya atıkların boşaltılması yoluyla kontamine olurlar. Suda, poliklorlu bifeniller sedimente ve diğer organik maddelere adsorbe olurlar. Balıklar bütün yaşamları boyunca su yoluyla PCB'leri vücutlarına alırlar bu nedenden ötürü biokonsantrasyon faktörleri yüksektir. Sucul organizmalar üzerine poliklorlu bifenillerin etkilerine ilişkin hemen hemen bütün çalışmalar ticari PCB karışımları olan Aroclor karışımlarını içermektedir. Sonuçlar büyük anlamda değişkendir. Birbirlerine çok benzer organizmalarda bile klorlanma yüzdesi veya çevresel koşullar ve toksisite arasında kesin ve tutarlı bir ilişki yoktur. Balıklar için 96 saatlik LC50 değerleri 0.008 - > 100 mg/L olarak tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: PCB, sucul organizma, toksisite, akut, kronik

ABSTRACT

Environmental transport, distribution and transformation of polychlorinated biphenyls is a very complex mechanism. Surface waters are contaminated with the atmospheric events, direct emissions from point sources and discharging of wastes. Polychlorinated biphenyls adsorb on sediment and other organic matters in water. Fish accumulate polychlorinated biphenyls by exposure from water and because of that their bioconcentration factor is high. Almost all of the studies in effects of polychlorinated biphenyls on aquatic organisms concern the industrial mixtures of polychlorinated biphenyls named as Aroclors. The results are very variable. There is not a meaningful correlation between chlorination degree, environmental conditions and toxicity, also in similar organisms. LC50 values for 96 h is determined as 0.008 - > 100 mg/L for fish.

Keywords: PCB, aquatic organism, toxicity, acute, chronic

GİRİŞ

Poliklorlu bifenillerin çevresel taşınması, yayılması ve dönüşümü oldukça kompleks bir mekanizmadır. Dünya genelinde poliklorlu bifenillerin çevreye yayılımının çok geniş olmasının nedenleri arasında doğadaki kalıcılıklarının çok uzun zaman boyunca devam etmesi ve diğer fizikokimyasal özellikleri gösterilebilir.

Yüzey suları poliklorlu bifenillerle atmosferik olaylar, nokta kaynaklardan direkt emisyonlarla veya atıkların boşaltılması yoluyla kontamine olurlar. Suda, poliklorlu bifeniller sedimente ve diğer organik maddelere adsorbe olurlar. PCB'lerin suya bulaşması temel olarak endüstriyel ve şehir atıklarının nehirlere, göllere ve denizlere deşarj noktalarından olur. PCB'lerin sudaki düşük çözünürlüğü ve yüksek spesifik aktivitesine bağlı olarak deşarj edilen PCB'lerin büyük bir çoğunluğunun nehirlerin veya göllerin tabanında sediment tarafından adsorbe edildiği ve temel olarak sudaki partiküller yoluyla taşındığı belirtilmiştir (WHO, 1993).

İnsanlar üzerine olan etkileri:

Poliklorlu bifenillerin toksikolojik olarak değerlendirilmesinde birçok problem mevcuttur. Poliklorlu bifeniller çoğunlukla birçok bileşenin karışımı olarak mevcuttur ve poliklorlu bifenillerin toksisitesine ilişkin olan verilerin büyük bir kısmı da bu karışımların test edilmesine dayanmaktadır. Karışımları oluşturan bileşenlerden bazıları çevrede diğerlerine nazaran daha kolay parçalanabilmektedirler. Bu nedenden ötürü genel popülasyonun bu bileşiklere maruz kalma durumu işçilerin maruz kalma durumundan farklıdır.

Genel popülasyonun poliklorlu bifenillere maruz kalma durumu temel olarak kontamine olmuş gıdalar (sucul organizmalar, et ve çiftlik ürünleri) yoluyla olur. Endüstriyel ülkelerin birçoğunda, poliklorlu bifenillerin günlük alımı kişi başına birkaç mikrogram düzeyindedir. Bu tarz bir maruz kalma herhangi hastalıkla ilişkilendirilmemiştir. Anne sütü yoluyla poliklorlu bifenillere maruz kalan bebeklerin günlük poliklorlu bifenil alımı kg vücut ağırlığı başına birkaç mikrogramdır.

Poliklorlu bifenillerin, poliklorlu dibenzodioksinlerin ve poliklorlu dibenzofuranların insan sağlığı üzerine etkilerini ayrı ayrı değerlendirmek oldukça zordur çünkü poliklorlu bifeniller poliklorlu dibenzofuranlar içermektedirler ve bazen bazı kazalarda poliklorlu dibenzodioksinler tespit edilmektedir. Ticari poliklorlu bifeniller poliklorlu dibenzofuranlar ile kontamine olmuştur bu nedenden ötürü birçok durumda oluşan etkilerin poliklorlu bifenillerden mi yoksa daha toksik olan poliklorlu dibenzofuranlardan mı kaynaklandığını tespit etmek

mümkün değildir. İnsanlar için olumsuz etkileri gözlemlenen büyük intoksikasyon olaylarından olan Yusho, Yu-Cheng ve diğer intoksikasyon olaylarından elde edilen verilerin yeniden değerlendirilmesi gerekmektedir. Çünkü oluşan etkiler büyük ihtimalle poliklorlu bifeniller ve poliklorlu dibenzofuranlara maruz kalma sonucunda oluşan etkilerdir.

Yusho ve Yu-Cheng hastalarında intoksikasyon belirtileri gözlerin Meibomian bezlerinde hipersekresyon, gözkapaklarının şişmesi, tırnaklarda ve mukoz membranlarda pigmentasyon, bazen yorgunluk ve mide bulantısı ile ilgili olarak kusma görülür. Bu durumu genellikle hiperkeratozis ve derinin renginin koyulaşması ile birlikte foliküler genişleme ve akne şeklinde kızarıklıkların oluşumu gibi belirtiler takip eder. Bunlara ilaveten kollarda ve bacaklarda ödem, karaciğerde büyüme, karaciğer bozuklukları, merkezi sinir sistemindeki bozukluklar, solunum problemleri örneğin bronşit benzeri rahatsızlıklar ve hastaların bağışıklık sistemindeki değişimler gözlemlenmiştir. Yusho ve Yu-Cheng hastalarının çocuklarında büyümede azalma, deri ve mukoz membranlarda pigmentasyonda koyulaşma, diş etlerine ait hiperplazi, ksenoftalmik ödem yapmış gözler, doğumda diş çıkarma, ayak tabanında topukta ve kafatasında normal olmayan kalsifikasyon ve düşük doğum ağırlıkları gözlemlenmiştir. Bu hastalarda malignant yani habis neoplazmaların oluşumu ile poliklorlu bifeniller ve poliklorlu dibenzofuranlara maruz kalma arasında bir korelasyonun mevcut olup olmadığı açık bir şekilde ortaya çıkarılamamıştır çünkü ölüm sayısı çok düşüktür. Bununla beraber neoplazmalar, karaciğer ve akciğer kanserlerinden kaynaklanan ölümlerle birlikte erkek hastalarda istatistik olarak önemli bir artış gözlemlenmiştir.

Meslek dolayısıyla meydana gelen hastalık veya zarar durumlarında akut olarak maruz kalmadan birkaç saat sonra deride lekeler meydana gelir. Yüksek konsantrasyonlarda poliklorlu bifenillere maruz kalmadan sonra kaşınma ve yanma duygusu, konjunktivitinin irritasyonu, parmakların ve tırnakların pigmentasyonu ve klorakne gibi belirtiler gözlemlenir. Klorakne poliklorlu bifenillere maruz kalan işçiler arasında en yaygın olarak gözlemlenen bir bulgudur. İntoksikasyonun bu dermal belirtilerinin yanısıra farklı yazarlar karaciğer bozuklukları, bağışıklık sistemini baskılayıcı değişimler, solunum sisteminin mukoz membranlarında kısa süreli iritasyon ve baş ağrısı, baş dönmesi, sersemlik, depresyon, uyku ve hafızada bozukluklar, sinirlilik, yorgunluk ve erkeklerde iktidarsızlık gibi sinirsel, spesifik olmayan fizyolojik ve psikosomatik etkiler yarattığını bulmuşlar-



dır. Bütün bunlar göz önünde bulundurulduğunda; yüksek konsantrasyonlarda poliklorlu bifeniller ve poliklorlu dibenzofuranlara meslek nedeniyle maruz kalma durumunda deri ve karaciğer üzerinde etkiler gözlemlenir.

Aroclor 1254, 1242, 1016'a maruz kalan bir grup işçi ile iki büyük ölüm çalışması yürütülmüştür. Çalışmalardan birinde karaciğer ve safra kesesi kanserinden artan ölüm gözlemlenirken, diğer çalışmada ise neoplazmalar ve gastrointestinal sistemde kanserden ötürü artan ölümler gözlemlenmiştir. Mevcut epidemiyolojik çalışmaların hiçbiri poliklorlu bifenillere maruz kalma ve kanseden ölüm oranındaki artış konusunda önemli bir delil ortaya çıkaramamıştır. Bu toksik maddelere maruz kalan popülasyonda görülen ölüm sayısının çok düşük olması, doz bağlatılarının eksikliği ve poliklorlu bifenil karışımlarındaki kontaminantlardan kaynaklanan problemler önemli deliller elde edememenin nedenleri olarak düşünülebilir.

PCB'ler grup 2A içinde sınıflandırılırlar ve bu grup insanlar üzerine muhtemel karsinogenik etkileri olan ajanları içerir. İnsanların beslenmesinde PCB kontaminasyonunda en önemli rol oynayan besin maddesinin balık olduğu Berglund (1972) ve Hammond (1972) tarafından tespit edilmiştir (WHO, 1992). Bu durumun özellikle de balığın çok tüketildiği ve tüketilen balığın da yüksek oranda kontamine olmuş bölgelerden yakalandığı Japonya veya Kuzey Amerikan Büyük Gölleri gibi alanlar için geçerli olduğu ve Japonya'da insanların gıda yoluyla günlük olarak tükettikleri en yüksek PCB miktarının 48 İg/gün olduğu tespit edilmiş ve bu değer % 90'ının balıktan kaynaklandığı Kobayashi (1972) tarafından belirtilmiştir (WHO, 1992). Gıdaların poliklorlu bifenillerle kontamine olması için üç ana yol vardır:

a. çevreden balık, çiftlik hayvanları (besin zincirleri yoluyla) ve ürünleri ile alım

b. ambalaj materyallerinden gıdaya migrasyon yoluyla geçiş (temel olarak 1 mg/kg'dan daha az fakat bazı durumlarda 10 mg/kg'a kadar çıkabilir)

c. endüstriyel bir kaza sonucu gıdaların veya hayvan yemlerinin direkt kontaminasyonu (WHO, 1992). Geçmişe dayalı verilerin ışığında; bir erişkinin haftalık besin yoluyla poliklorlu bifenil alımının maksimum 100 µg'a kadar varabildiği veya bir kişinin bir günde yine besin yoluyla poliklorlu bifenil alımının yaklaşık olarak 14 µg olduğu tespit edilmiştir. 70 kg ağırlığında bir kişi için bu alım maksimum 0.2 µg/kg vücut ağırlığı/gün konsantrasyona tekabül ettiği Dünya Sağlık Örgütü (WHO/EURO) (1987) tarafından belirtilmiştir (WHO, 1992).

Mevcut çalışmaların ışığında, poliklorlu bifenillerin vücuttaki yayılımı, poliklorlu bifenillerin kandan hızlı bir şekilde temizlenmesi ve karaciğerde ve değişik organların adipöz dokularında birikim yapması şeklinde iki fazlı kinetik işlemde oluşur. Ayrıca plasental taşınma olduğu, fetal birikim yaptığı ve süte de geçtiği bilinmektedir. İnsanlarla yapılan bazı çalışmalarda, deri en yüksek PCB konsantrasyonuna sahip doku olurken lipid içeriğine dayalı olarak, beyindeki konsantrasyon tahmin edilenden daha düşük olarak bulunmuştur. Poliklorlu bifenillerin yağdan hareketi, bireysel poliklorlu bifenil bileşenlerinin metabolizma oranlarıyla büyük ölçüde ilişkilidir. Poliklorlu bifenillerin vücuttan atılması; bu bileşiklerin, fenoller, tiyol bileşikler ve diğer suda çözünen türevlerinin konjugatları gibi daha polar bileşiklere metabolize olmasına dayanmaktadır. Poliklorlu bifenillere ilişkin metabolik yollar hidroksilasyon, tiyoller ve diğer suda çözünen türevlerinin konjugasyonunu içermektedir. Bunlardan bazıları arene oksitleri gibi reaktif ara basamakları içerir. Metabolizma oranları, poliklorlu bifenillerin yapısına bağlı olup bileşikteki klor atomlarının pozisyonuna ve klorlanma derecesine göre değişmektedir. Yüksek oranda klorlanmış poliklorlu bifenillerin polar metabolitleri feçesde ilk olarak elimine olmaktadır fakat aynı zamanda üre ile boşaltımda oldukça belirgindir. Önemli bir eliminasyon yolunda anne sütüyle olmaktadır. Bazı poliklorlubifenil bileşenleri de saç yoluyla elimine olmaktadır. Poliklorlu bifeniller insanlarda adipöz dokuda ve anne sütünde akümüle olmaktadır. Poliklorlu bifenillerin beyin haricindeki, farklı organlarda ve dokulardaki konsantrasyonları organ ve dokuların yağ içeriğine bağlıdır. Endüstri yönünden gelişmiş ülkelerde genel popülasyonun adipöz dokusunda poliklorlu bifenil konsantrasyonlarının seviyeleri < 1-5 mg/kg (yağ üzerinden hesaplanmıştır) arasında değişmektedir. Memelilerde poliklorlu bifenil karışımları veya bileşenleri ile kısa dönem oral maruz kalmada hedef organ ve sistemler karaciğer, deri immun sistem ve üreme sistemidir. Poliklorlu bifenil karışımları veya bireysel poliklorlu bifenil bileşenlerine maruz kalındığında karaciğer, deri, bağışıklık sistemi ve üreme sisteminde lezyon oluşumları tetiklendiği gibi ödem oluşumu, gastrointestinal sistem ve tiroid bezinde ise istenmeyen oluşumlar gözlemlenir. Poliklorlu bifeniller karaciğerde çeşitli enzimleri tetikleme özelliğine sahiptirler. Endokrin sistemlerinde gözlemlenen etkiler ise hormonal-reseptör bağlarında ve steroid hormon dengesinde başkalaşımalar olarak tespit edilmiştir (WHO, 1992).

Balıklar bütün yaşamları boyunca su yoluyla PCB'leri vücutlarına alırlar bu nedenden ötürü biokonsantrasyon faktörleri yüksektir. Dengeye ulaşmak için

geçen süre değişken olup genellikle uzundur ve 100 günün üzerindedir. Yüksek oranda klorlanmış bifenillerin vücuda alımı ve vücutta tutulması daha fazladır. Yaşa bağlı olarak vücudun PCB yükü artar ve yüksek lipid içeriğine sahip olan balıklarda PCB seviyeleri daha fazladır. Birikim yapan PCB'ler lipid yönünden zengin dokularda toplanırlar. PCB'lere maruz kalma sona erdikten sonra vücuttan PCB atılımı tespit edilmiştir. Yarılanma ömrü birkaç haftadan birkaç yıla kadar değişmektedir. Birçok poliklorlu bifenilin biokonsantrasyon faktörleri sucul türlerde (balık, karides, midye) deneysel olarak tespit edilmiş ve 200'den 70000 veya daha yüksek değerlere kadar değiştiği tespit edilmiştir. Açık denizde yüksek trofik seviyelerde poliklorlu bifeniller bioakümüle olurlar ve bu birikim yüksek predatörlerde özellikle yüksek oranda klorlanmış bifenillerin artan oranı olarak görülür (WHO, 1992). İnsanlar ve hayvanlar üzerine yapılan birçok çalışma PCB'lerin ağız yoluyla alımından sonra vücuttaki birikim sırasının adipöz doku>deri>karaciğer>kas şeklinde olduğunu ortaya koymuştur (WHO, 1986). Organizmalarda PCB'lerin eliminasyonu, organikliklorlu insektisitler gibi metabolizmaya bağlıdır. PCB bileşenlerinin vücuttan atılma oranları çok yavaştır ancak bununla beraber düşük miktarlarda PCB dışı balıklarda yumurtaya lipoproteinler vasıtasıyla taşınarak vücuttan atılımları gerçekleşir. Ancak bu tarz vücuttan atılımların total vücut yükünde çok büyük bir oran teşkil etmediği belirtilmiştir (Walker, 2001).

Çeşitli sucul omurgasız türleri ve farklı Aroclor (ticari PCB karışımları) karışımları için 96 saatten daha uzun süre statik koşullar altında, LC50 değerleri 12 µg/L ve > 10 mg/L arasında değişmiştir. Sürekli akış poliklorlu bifenillerin toksisitesini artırmıştır. Genel olarak en toksik ticari karışımlar Aroclorlardır ki Aroclorlar orta düzeyde klorlanma derecesine sahiptirler. Düşük ve yüksek oranda klorlanma yüzdesine sahip karışımlar daha az toksiktirler (WHO, 1992).

Kabuklular, kabuk değiştirme döneminde poliklorlu bifenillere karşı daha hassastırlar. Uzun dönem testlerinde kısmen statik koşullar altında gerçekleşen maruz kalmada poliklorlu bifenillerin toksisitesinin beklenilenden daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Düzbaşı golyan balığı (*Phoxinus phoxinus*) yavru- ları için 96 saatlik LC50 değerleri 0.008 mg/L olarak tespit edilirken, kanal yayınları için bu değer > 100 mg/L olarak tespit edilmiştir. Bu önemli farklılık türlere ve PCB karışımlarına bağlanabildiği gibi azda olsa sıcaklık ve suyun sertliği gibi deneme koşullarına da bağlı olabilir. PCB'lerin toksisitesi, su akışının devamlı olarak sağlandığı ortamlarda PCB'lerin sudaki konsan-

trasyonunun sabit tutulabildiği durumlarda daha fazladır.

Sucul organizmalarda kısa ve uzun dönem toksisite:

Hansen ve ark. (1976b) fingerling kanal yayın balıklarını (*Ictalurus punctatus*) 20 hafta boyunca 20 mg/kg Aroclor 1242 içeren yemle beslemişlerdir. Balıklarda ağırlık kaybı ve karaciğerde hipertrofi gözlemlenmiştir. Aroclor'a maruz bırakılmış balıklar 8 hafta boyunca kontrol yemi ile beslendikten sonra yeniden 8 hafta boyunca Aroclor ihtiva eden yemle beslenmiş ve ağırlık kazancı ile karaciğer ağırlıklarının normal seviyelerine döndüğü tespit edilmiştir. PCB ile beslenen balıklarda histopatolojik lezyonlar gözlemlenmemiştir (WHO, 1993).

Nestel ve Budd (1975) Gökkuşaağı alabalıkları'nı (*Salmo gairdneri*) 330 günü aşkın bir süreyle 1, 10 ve 100 mg/kg Aroclor 1254 ile beslenmişlerdir. Büyüme oranları üzerinde hiçbir etki gözlenmezken, bütün dozlarda renal lezyonlar tespit edilmiştir. Renal nekrozis, hücresel veya granuler tipte oluşumla birlikte gözlemlenmiştir. Bütün dozlarda karaciğerde birim alana düşen hepatosit sayısında belirgin bir artış gözlemlenmiş olup bu durumun doza bağlı olarak geliştiği tespit edilmiştir. 10 ve 100 mg/kg Aroclor ihtiva eden yemle beslenen balıkların dalaklarında beyaz öz maddelerinin (lenfatik elementler) sayısında azalma olduğu tespit edilmiştir. Renal nekrozisi olan balıkta dalaktaki beyaz öz maddelerinde ve beyaz hücre sayısında azalma gözlemlendiği belirtilmiştir (WHO, 1993).

PCB'lerin sucul organizmalarda gelişme dönemlerinde ve üreme dönemlerindeki etkileri:

Westin ve ark. (1983) dişi Çizgili levrek'lerden (*Morone saxatilis*) yumurtalarına geçen PCB'lerin etkileri ile yem olarak kullanılan organizmalar yoluyla kuluçkadaki larvalara geçen PCB'lerin etkilerini araştırmışlardır. Dişi damızlık bireylerden ve *Artemia*'lardan kaynaklanan PCB'lerin etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Genç bireylerdeki PCB seviyeleri balıklar PCB içermeyen sulara nakledildiklerinde çalışma boyunca düşüş göstermiştir. Araştırmacılar aynı zamanda dişi bireyden ve yem olarak kullanılan organizmalardan kaynaklanan PCB'lerin doğada yeni bireylerin oluşumu üzerine olumsuz etki yapmayacağını tespit etmişlerdir (WHO, 1993).

Halter ve Johnson (1974) Coho salmonlarının (*Oncorhynchus kisutch*) yumurtalarını 4.4-56.4 µg/L Aroclor 1254 ihtiva eden solusyonlara maruz bırakmışlardır. Aroclor'a maruz kalma periyodu kuluçkadan önce 2 hafta ve kuluçkadan sonra 4 hafta kadar yani alevinler



genç dönemine gelinceye kadar devam etmiştir. En yüksek doz olan 56.4 µg/L konsantrasyonda kuluçka verimi % 30 oranında düşmüştür. Yumurtalar kuluçkadan önce temiz suya transfer edilirse alevlerin yaşama oranının belirgin bir şekilde arttığı belirtilirken, kuluçka döneminde en yüksek dozda Aroclor'a maruz bırakılan yumurtalardan çıkan bireylerin alevin döneminde ise % 58 mortalite gözlenmiştir. Alevinler kuluçkadan sonra 4 hafta boyunca PCB'lere maruz bırakıldıklarında, yaşama oranı ile maruz kalınan konsantrasyon arasında ters bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (örneğin 4.4 µg/L konsantrasyonda % 18'i, 26 µg/L'de % 90'ı ölmüştür) (WHO, 1993).

Freeman ve ark. (1982) Atlantik morinası balıklarını 5.5 ay boyunca 1-50 mg/kg yem Aroclor 1254 ile beslemişlerdir. Bu doza maruz kalan balıklarda testislerde ve baş böbrekte (adrenal ekivalenti) in vitro olarak başkalaşmış steroid biosentetik yapılar gözlemlenmiştir. Histolojik muayene sonunda testislerde, solungaçlarda ve karaciğerde anormallikler tespit edilmiştir. Testiküler anormallikler loplardaki düzensizlik, lop duvarlarında hiperplazi, spermatogenik elementlerin yağlı nekrozu ve/veya parçalara ayrılıp dağılması olarak tespit edilmiştir. 5-50 mg/kg yem PCB ile beslenen balıklarda solungaçların ikincil lamellalarının epiteliyal tabakasında hiperplazi tespit edilmiştir (WHO, 1993).

Sucul organizmalarda fizyolojik ve biyokimyasal etkiler:

Leatherland ve Sonstegard (1978) Coho salmonlarını (*Oncorhynchus kisutch*) 50 ve 500 mg/kg kuru yem konsantrasyonunda PCB karışımı (1:4, Aroclor 1242:1254) ile beslemişlerdir. En yüksek dozda beslenen balıklarda 3 ay sonra serum triiodothyronine (T3) seviyeleri istatistik olarak önemli derecede düşüş göstermiştir. Thyroxine (T4) seviyelerinin bu muameleden etkilenmediği belirtilmiştir. 3 ay sonra, en yüksek dozda Aroclor ile beslenen grubun T3:T4 seviyeleri, kontrol grubu ve düşük dozda beslenen gruba göre istatistik olarak önemli derecede yüksek bulunmuştur. 500 mg/kg konsantrasyonda Aroclor ile beslenen balıkların vücut ağırlıkları çalışmanın sonunda kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli derecede düşük bulunmuştur. 50 mg PCB/kg ve 5 mg mirex/kg karışımının 3 aylık bir periyodun sonunda serum triiodothyronine ve thyroxine seviyelerini istatistik olarak önemli derecede düşürdüğü ancak T3:T4 seviyelerini etkilemediği belirtilmiştir (WHO, 1993).

Leatherland ve Sonstegard (1979) Gökkuşaağı alabalıklarını (*Salmo gairdneri*) 2 ay boyunca 500 mg/kg kuru yem konsantrasyonunda Aroclor 1254 ile besle-

mişlerdir. PCB'lerin tiroid histolojisi ve serum tiroid hormon seviyeleri üzerine etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Aroclor'a maruz bırakılan balıkların karaciğer ağırlıkları, total karaciğer lipid içeriği ve karkas lipid içeriği diğer balıklara göre istatistik olarak önemli derecede yüksek bulunmuştur (WHO, 1993).

Johansson ve ark. (1972) Kahverengi alabalıkları (*Salmo trutta*) kapsül veya intramusküler enjeksiyon yoluyla 4 gün arayla 2 defa 5 mg/kg vücut ağırlığı dozunda Clophen A50 ile muameleye tabi tutmuşlardır. Balıklar 43 gün boyunca beslenmişler, 116 gün boyunca aç bırakılmışlar ve takip eden 87 gün boyunca yeniden beslenmişlerdir. Balıklara ilişkin metabolik analizler denemenin 43. gününde ve çalışmanın sonunda gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonunda balıkların vücut ağırlıklarında belirgin bir artış tespit edilmiştir. Ancak balıkların beslendiği ilk 43 günün sonunda benzer bir sonuç elde edilememiştir. Kan glukozu, kas glikojeni ve karaciğer somatik indeksi değerleri 43 gün sonra istatistik olarak önemli derecede artmış olup denemenin sonucunda ise kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistik olarak düştüğü tespit edilmiştir. Hemoglobin ve hematokrit seviyelerinin 43 gün sonra istatistik olarak önemli derecede düştüğü belirtilirken çalışmanın sonunda elde değerlerin kontrol grubundan elde edilen değerlerden istatistik olarak farklı olmadığı belirtilmiştir (WHO, 1993).

Camp ve ark. (1974) fingerling kedi balıklarını (*Ictalurus punctatus*) 8 mg/L konsantrasyonda Aroclor 1254 içeren suda tutmuşlardır. 4 saat sonra balıkla Camp et al. (1974) fingerling kedi balıklarını (*Ictalurus punctatus*) 8 mg/L konsantrasyonda Aroclor 1254 içeren suda tutmuşlardır. 4 saat sonra balıklarda serum transaminase aktivitesinde istatistik olarak önemli derecede artış elde edilmiştir. Serumun kortisol içeriği baskılanmıştır ancak bu durumun istatistik olarak önemli olmadığı belirtilmiştir. Sodyum:potasyum oranı sabit kalmıştır (WHO, 1993).

Sucul organizmalarda davranışlar üzerine etkileri:

Fingerman ve Russell (1980) erkek Körfez (*Fundulus grandis*) balıklarını 24 saat boyunca 4 mg/L konsantrasyonda Aroclor 1242'e maruz bırakmışlardır. Bu periyotta beyinde noradrenalin ve dopamin seviyelerinde istatistik olarak önemli derecede düşüş elde edildiği belirtilmiştir. Balıkların yüzme aktiviteleri de balıklar 24 saat boyunca Aroclor'a maruz kaldıktan sonra 10 dakika içerisinde tankın tabanında işaretlenmiş çizgileri kaç defa geçtiklerini sayarak izlenmiş olup aktivitenin

önemli derecede arttığı ve takip eden 2 gün içerisinde de bu şekilde kaldığı belirtilmiştir (WHO, 1993).

Sucul organizmalarda diğer kimyasallarla etkileşimler:

Halter ve Johnson (1974) 32.2 µg/L konsantrasyonunda Aroclor 1254'e maruz bırakılan Coho salmon'larının fry'ları (*Oncorhynchus kisutch*) için ortanca yaşam zamanının 336 saatten daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Frylar 2 hafta boyunca Aroclor ve DDT karışımlarına maruz bırakıldıklarında ise yaşama zamanları DDT için tek başına bulunan reaksiyon zamanına yakın olarak tespit edilmiştir (WHO, 1993).

Bilgi notu: Metnin içerisinde yer alan eski tarihli kaynaklara ulaşılamadığından, bu kaynakların alındığı WHO 1986; 1992; 1993 tarihli asıl kaynaklar referans olarak alınmış ve kaynaklar bölümünde bu şekilde listelenmiştir.

KAYNAKLAR

WHO. 1986. *PCBs, PCDDs and PCDFs Prevention and Control of Accidental and Environmental Exposures. Environmental Health. 227 p. World Health Organization. Regional Office for Europe Copenhagen.*

WHO. 1992. *Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Polychlorinated Terphenyls (PCTs) Health and Safety Guide No: 68. IPCS International Programme on Chemical Safety. 52 p. World Health Organization, GENEVA.*

WHO. 1993. *Polychlorinated Biphenyls and Terphenyls (Second Edition). Environmental Health Criteria 140. IPCS International Programme on Chemical Safety. 683 p. World Health Organization, GENEVA.*

Walker, C. H. 2001. *Organic Pollutants. An Ecotoxicological Perspective. Taylor and Francis Inc., 282 p, London, Great Britain.*



Yazarlar için Yazım Kılavuzu

1. UGRL Dergisi (Journal of NFRL) Türkçe ve İngilizce dillerinde yazılmış yayınları kabul eder.
2. Yayınlanmak üzere araştırma yazıları, derlemeler ve editöre mektuplar kabul edilir.
 - a. Araştırma yazıları kaynaklar dahil olmak üzere 15 sayfayı geçmemelidir.
 - b. Derlemeler kaynaklar dahil olmak üzere 10 sayfayı geçmemelidir.
 - c. Editöre mektuplar 1 sayfayı geçmemeli ve ilgili makalenin bildirilmesi gerekmektedir.
3. Dergiye gönderilen makale v.b. gibi yayınlar daha önce herhangi bir dergide yayınlanmamış olmalıdır.
4. Yayınlanmak amacıyla gönderilen makaleler v.b. gibi yayınlar aşağıda belirtilen yazım kurallarına göre düzenlenmelidir.
 - a. A4 kağıt boyutunda, tüm kenarlardan 2 cm boşluk bırakılmalıdır. Metin, tablolar ve şekil altları yazılırken 12 punto Times New Roman yazı karakteri kullanılmalı, 1.5 satır aralığı bulunmalıdır.
 - b. Metin içindeki terimler mümkün olduğunca Türkçe ve Latince olmalı, dilimize yerleşmiş kelimelere yer verilmeli ve çelişkili durumlarda Türk Dil Kurumu'nun güncel sözlüğü kullanılmalıdır. Öz Türkçe'ye özen gösterilmeli ve Türkçe kaynak kullanımına önem verilmelidir.
 - c. Metin içinde geçen Latince mikroorganizma isimleri ilk kullanıldığında tam ve açık yazılmalı, daha sonraki kullanımda kısaltılarak verilmelidir. Mikroorganizmaların orijinal Latince isimleri cins ismi büyük harfle başlayacak, tür ismi ise küçük harfle başlayacak şekilde italik olarak yazılmalıdır: *Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa* gibi. Ayrıca kullanılan tür isimlerinin Linnuess tür olması durumunda bu durum mutlaka tür isminden sonra "L." harfi ile belirtilerek kullanılmalıdır. Yazıda sadece cins adı geçen cümlelerde stafilokok, streptokok gibi dilimize yerleşmiş cins adları Türkçe olarak yazılabilir.
 - d. Derleme türü yazılarda yazar daha önce bu konuda çalışma ve yayın yapmış olmalıdır. Ancak istisnai koşullarda editörlük tarafından kendisine davet çıkartılabilir. Derlemelerde İngilizce özet, İngilizce ve Türkçe anahtar sözcükler bulunmalıdır.
 - e. Daha önce yayımlanmış yazılara eleştiri getirmek, katkıda bulunmak ya da bilim haberi niteliği taşıyacak bilgilerin iletilmesi amacıyla yazılan yazılar, Yayın Kurulu'nun inceleme ve değerlendirmesinin ardından "Editöre Mektup" bölümünde yayınlanır. Bu yazıların bir sayfayı aşmaması ve en fazla beş kaynakla desteklenmesi gerekmektedir.
 - f. Yazılar bir zorunluluk olmadıkça "miş'li geçmiş" zaman edilgen kip ile yazılmalıdır. Genel geçer bilgilerde geniş zaman kullanılabilir. Örn: *Daucus carota* (L.) bir yıllık bir olup beta karoten içeriği oldukça yüksektir.
 - g. Tüm satırlar numaralandırılmalıdır. Numaralandırma sürekli olmalıdır.
 - h. Yayımlanmış gereçleri yeniden basmak veya deney konusu olan insanların fotoğraflarını kullanmak için alınan izinler, insanlar üzerinde ilaç kullanarak yapılan klinik araştırmalarda ilgili "Kurum Etik Kurul Onayı" ve gönüllülerden yazılı bilgilendirme ile olur alındığına dair belgeler birlikte gönderilmelidir. İlgili etik kurul belgesine yazı içerisinde Materyal-Metot bölümünde açık bir gönderme yapılmalıdır.
 - i. Metin yazımında dikkat edilecek hususlar şunlardır: **Araştırma yazıları**; Başlık sayfası, Türkçe Özet, İngilizce Özet, Giriş, Gereç ve Yöntem, Bulgular, Tartışma, Kaynaklar, varsa Teşekkür bölümlerinden oluşmalıdır. **Derlemeler**; Başlık sayfası, Türkçe Özet, İngilizce Özet, Derleme Metni, Kaynaklar, varsa Teşekkür bölümlerinden oluşmalıdır.

den oluşmalıdır. Bu bölümlerin başlıkları, iki yana yaslanacak şekilde büyük harflerle kalın yazılmalıdır. İngilizce makalelerde Türkçe Başlık ve Özet bulunmalıdır. Yabancı yazarlarda Türkçe özet koşulu aranmaz.

Başlık sayfası: Makalenin Türkçe başlığı, İngilizce başlığı, kısa başlık, yazar adları, çalıştığı kurumlara ait bilgiler, dergi ile yapılacak yazışma işini üstlenen yazarın açık adresi, telefon numaraları (sabit ve cep), elektronik posta adresi belirtilmelidir:

- Yazının ana başlığı mümkün olduğu kadar kısa ve konuyu açıklayıcı olmalı, büyük harfle yazılmalıdır.
- Sayfa başlarına konacak olan kısa başlık 40 karakteri geçmemelidir.
- Makale birden fazla yazar tarafından yazılmış ise, aynı üniteye çalışan yazarların soyadları sonuna aynı miktarda yıldız konularak belirlenmelidir.

Türkçe Özet: Araştırma yazılarında; Amaç, Yöntem, Bulgular ve Tartışma alt başlıklarından oluşmalıdır (yapılandırılmış özet) ve en az 100, en fazla 250 sözcük içermelidir.

Derlemelerde bildirilen başlıklar aranmaz.

İngilizce Özet (Abstract): Türkçe Özet bölümünde belirtilenleri birebir karşılayacak şekilde yapılandırılmalıdır.

Anahtar Sözcükler: Türkçe ve İngilizce Özetlerin altında her biri virgül işareti ile birbirinden ayrılarak verilmelidir. Anahtar kelime sayısı 3-8 arasında olmalı ve makalenin özgünlüğünü vurgulayacak sözcükler kullanılmalıdır.

Giriş: Araştırmanın amacı, benzer çalışmalarla ilgili kaynak bilgisi kısaca sunulmalıdır.,

Gereç ve Yöntem: Araştırmanın gerçekleştirildiği kuruluş ve tarih belirtilmeli, araştırmada kullanılan araç, gereç ve yöntem açıkça sunulmalıdır. Standart metotlarda yapılan modifikasyonlar açık olarak ortaya konulmalıdır.

Bulgular: Sadece elde edilen bulgular açık bir şekilde belirtilmelidir. Bulguların anlatımında tablo ve grafik kullanımı ile veriler desteklenmelidir.

Tartışma: Bu bölümde, araştırmanın sonunda elde edilen bulgular, diğer araştırmacıların bulgularıyla karşılaştırılmalıdır. Araştırmacı, çalışma ile ilgili kendi yorumlarını bu bölümde aktarmalıdır.

Teşekkür Bölümü: Gerekli görülüyorsa Kaynaklar bölümünden hemen önce belirtilmelidir. Çalışma bilimsel bir kuruluş ve/veya fon ile desteklenmişse, desteğin alındığı kurumun açık adı ve proje numarası ile teşekkür kısmında bildirilmelidir. Makalenin bir kısmı, kongre/sempozyumda sunulmuşsa mutlaka sunum türü ile birlikte aynı bölümde belirtilmelidir. Makalenin tamamının sunulmuş olması halinde yayınlanmak üzere kabul edilmeyecektir.

Kaynaklar: Metnin içinde yazarların soyadını ve yayın tarihini içerecek şekilde parantez içinde cümle sonunda verilmelidir. İki veya daha az yazar varsa hepsi yazılmalıdır; yazar sayısı 3 veya daha çoksa yalnız ilk yazarın soyadı yazılıp ardından İngilizce metinlerde "et al." Türkçe metinlerde "ve ark." şeklinde kısaltılma yapılmalıdır. Metin içerisinde birden fazla yayına ait atıflarda tarih sırası gözetilmelidir. Aynı yazarın farklı yayınlarına ait atıflarda da tarih sırası gözetilmelidir. Aynı yazarın aynı yıl içerisinde yaptığı farklı çalışmalara yapılan atıflarda ise tarihin yanına küçük harflerle (a, b, ...) sıralama yapılarak atıf yapılmalıdır. Kaynakların yazılımı mutlaka aşağıdaki örneklerle uygun olmalıdır:

Metin içinde kaynak kullanımına örnek:

"Gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonlar içerisinde önemli bir yere sahip Salmonella türlerinin hızlı identifikasyonuna yönelik birçok teknik geliştirilmiştir. Bu teknikler arasında immuno magnetik seperasyon (IMS) tekniği birçok farklı materyalle çalışılan yayına konu olmuştur (Cudjoe ve ark.,1994, Griffiths ve Haseth, 2007, Anonim, 2010a)."



Aynı yazarın aynı tarihli faklı yayınlarına ait kullanıma ait örnek

"Cihaz; lazer ve infra red ışınlarını birbirine orantılı olarak karıştırıp, örnek yüzeyindeki değişik moleküler bağların hareketlerinden kaynaklanan yansımaya göre spektrum vermektedir (**Naumann ve ark. 2006a, Naumann ve ark. 2006b**)"

Kaynak yazımı örnekleri:

Standart Dergi makalesi için örnek:

Demirci M., Ünlü M., Şahin Ü. 2001. A Case of Hydatid Lung Cyst Diagnosed by Kinyoun Staining of Broncho-Alveolar Fluid. Türk. Parazit. Derg., 25 (3): 234-235.

Anonim kaynaklar için örnek:

Anonymous. 1981. Coffee drinking and cancer of the panceras (Editorial). Br. Med. J., 283:628.

Dergi eki için örnek:

Frumin A. M., Nussbaum J., Esposito M. 1979. Functinal asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan (Abstract). Blood, 54(Suppl 1): 26.

Kitap için örnek:

Eisen H. N. 1974. Immunology: an Introduction to Molecular and Cellular Principles of the Immun Response. 5th ed. New York: Harper and Row, 406.

Kitap bölümü için örnek:

Weinstein L., Swarts M.N. 1974. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. Pathologic Physiolog: Mechanism of Disease. Philadelphia: WB Saunders, 457-472.

İnternet sayfası adresi için örnek:

Eğer yazarı bilinmiyorsa Anonim olarak geçmektedir.

Anonim 2010. Erişim adresi: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>, Erişim tarihi 15.02.2010.

Tez için örnek:

Korkmaz A. 2009. Sıçan böbreğinde iskemi reperfüzyon hasarına karşı flavonoid uygulamasının etkilerinin incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.

Kongre tebligleri için örnek:

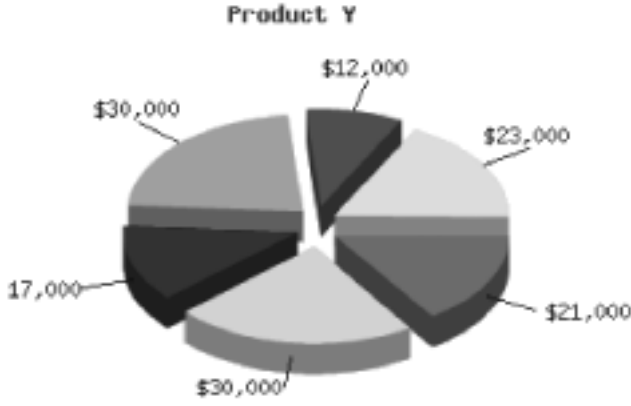
Susan Z., Kontur A. High media for accumulation in Campylobacters. International Campylobacter Symposium. Italy, Rome. 18-21 September 2008. Oral Presentation.

Tablolar ve Şekiller:

Her görsel (tablo, şekil, grafik, fotoğraf) metin içerisinde ilgili yere konulmuş olmalıdır. Tablolar alt ve üst çizgiler ve gerektiğinde ara sütun çizgileri içermelidir. Tablolar, "Tablo 1." şeklinde numaralandırılmalı ve tablo başlığı tablo üst çizgisinin üstüne yazılmalıdır. Şekil, grafik ve fotoğrafların başlıkları genellenerek Şekil adı altında toplanmalı ve Şekillerin altına yazılmalıdır. Fotoğraflar "jpeg. veya tiff." formatında olmalıdır. Baskı kalitesinin artırılması için gerekli olduğu durumlarda fotoğrafların taranmış halleri talep edilebilir. Yeniden gönderilecek fotoğraflar yüksek çözünürlükte olacak şekilde düzenlenerek dergi e-posta adresine en geç 2 gün içerisinde gönderilmelidir.

Şekil ve tabloların başlıkları ve sayıları koyu olarak yazılmalıdır.

Örnek:



Şekil 1. Dünyada endemik bitkilerin fiyatlandırması, (Coldu, 2010)

Tablo 8.4. Ekonomik durum göstergesi (Csedege, 2010)

Table 8.4(a) Profit and Loss financial projections for the longer term (2001-2003)

	1999 Actual	2000 (Plan)	2001 (Based on 2000 figures)	2002	2003
Key Product Sales					
Product 1	0	0	0	0	0
Product 2	0	0	0	0	0
Total Sales	0	0	0	0	0
Total OPEX	0	0	0	0	0
Contribution	0	0	0	0	0

5. Her yazar Çıkar Çatışması Beyanı'nı doldurmalıdır.

6. Sorumlu yazar tarafından Yayın Hakkı Devir Formu hazırlanarak tüm yazarlara imzalatılmalıdır.

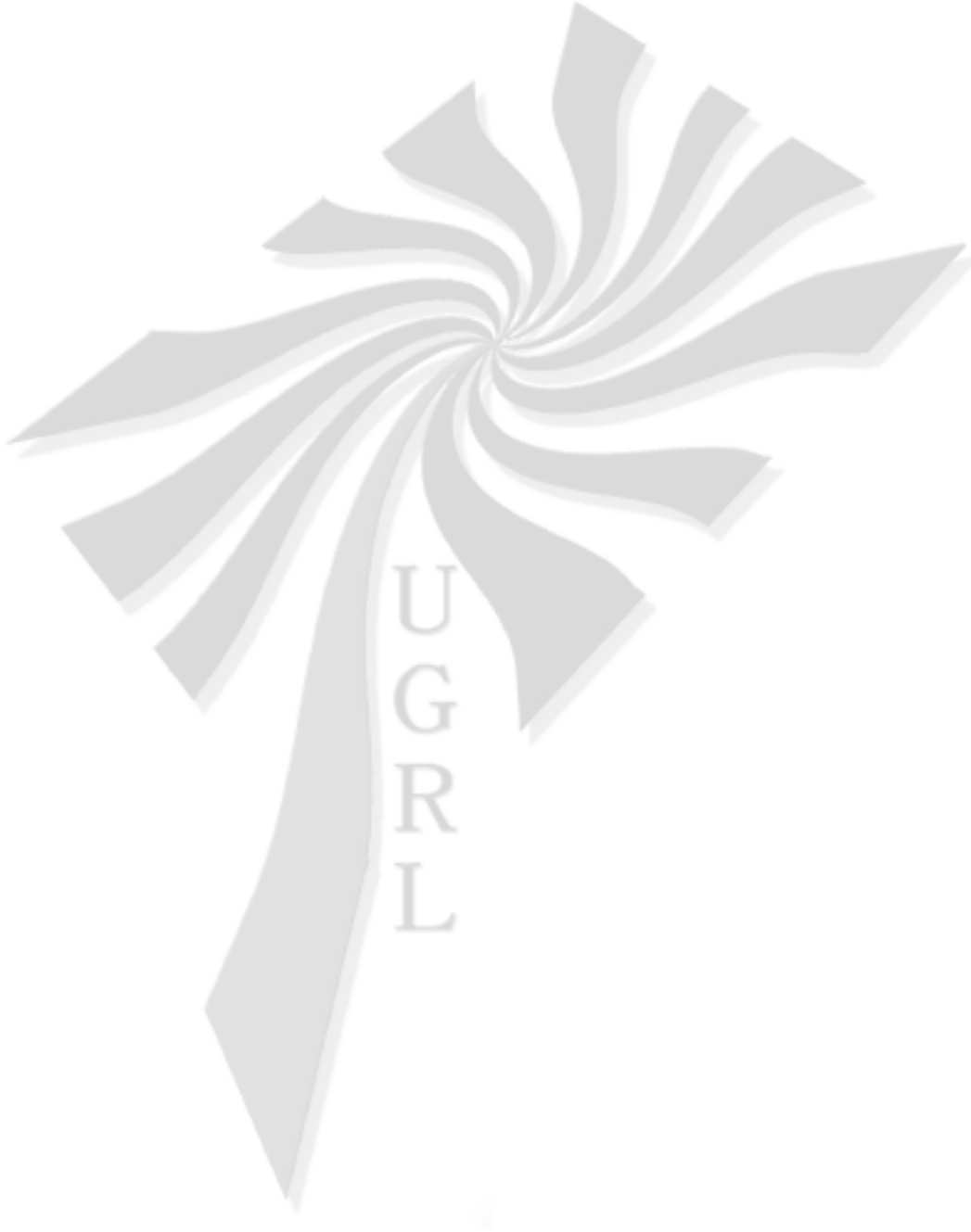
7. Yukarıda bildirilen yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan makaleler, çıkar çatışması beyanı ve yayın hakkı devir formu ile birlikte aşağıdaki adrese gönderilmelidir.

E-posta adresi: journal.nfrr@ugrl.gov.tr

8. Yukarıda bildirilen yazım kurallarına göre uygun olarak hazırlanmamış ve formları eksik makaleler hakem görüşü için gönderilmez.



Notlar:



Abonelik Bilgisi

Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Dergisi

Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı

Fatih Sultan Mehmet Bulvarı No: 70, 06170, Yenimahalle/ANKARA

e-posta: journal.nfrl@ugrl.gov.tr

Tel: 0312 327 41 81 / 1173-1311

Hesap No: Halkbank Yenimahalle Şubesi

TR73-0001200921400005000013

Yıllık Ücret: 20 TL