

İNCİR ve ÜZÜMDE OKRATOKSİN A'nın YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFI METODU ile SAPTANMASI

Emel KURUOĞLU¹Neslihan ÖZÇİLE¹Sibel GÖÇER¹

ÖZET

Üzüm ve incirde okratoksin A'nın saptanması için hızlı, ekonomik, güvenilir bir metod uygulanmıştır. Okratoksin A, üzüm ve incirden 0.1 M H₃PO₄ ve kloroform ile ekstre edilmiş ve ekstrakt tek kullanımlık Sep-Pak silika kartuş ile temizlenmiştir. Girişim yapan maddelerin fazla olduğu incirde ise temizleme basamağına ilaveler yapılmıştır. Okratoksin A, HPLC ile saptanmış ve TLC'de doğrulanmıştır. HPLC ile ölçümlerde minimum saptama limiti 0.03 ppb ve genî kazanım % 93.5-100'dür.

Anahtar Kelmeler: Okratoksin A, üzüm, incir, HPLC

THE DETERMINATION OF OCHRATOXIN A IN RAISIN AND FIG BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

SUMMARY

A rapid, economic and reliable method is applied to determine ochratoxin A in raisin and figs. Ochratoxin A is extracted by 0.1 M H₃PO₄ and chloroform from raisin and figs. The extract is cleaned up using a Sep-Pak silica cartridge. For the figs which has more interferences, extra steps are added to cleaning procedure. Ochratoxin A is detected by HPLC and confirmed by TLC. The detection limit is 0.03 ppb, the recovery is 93.5-100 % in HPLC.

Key Words: Ochratoxin A, raisin, fig, HPLC

GİRİŞ

Okratoksin'ler, *Aspergillus* ve *Penicillium* gibi her yerde bulunabilen küflerin çeşitli türleri tarafından oluştururlar. Bu küfler, gıda ve hayvan yemlerinin kontaminasyonu için bir potansiyeldir. *Aspergillus* türleri tarafından oluşturulan okratoksin A yüksek rutubet ve sıcaklık şartlarında sınırlı olarak ortaya çıkar, halbuki bazı *Penicillium* türleri ise en az 5°C kadar düşük sıcaklıklarda bile okratoksin üretebilir (1).

Okratoksin A'nın en yüksek kontaminasyonu hububatlarda bulunmuş ve bazı çekirdeklerde (kahve, soya, kakao) ise daha az ölçüde bulunmuştur. Okratoksin B ise nadirdir. Çeşitli Avrupa ülkelerinde, çiftlik hayvanlarında başlıca

belirtisi kronik nefropati olan okratoksin sorunu ile karşılaşmıştır (2).

Okratoksin A kalıntıları domuz, tavuk ve piliçlerin kan, böbrek, karaciğer ve kaslarında saptanmış fakat geviş getiren hayvanlarda bulunmamıştır. Deneysel çalışmalarda, domuzların böbreklerinde okratoksin A'nın oldukça yüksek seviyelerde olduğu ve maruz kalmanın bitişinden bir ay sonra bile böbreklerde teşhis edilebildiği görülmüştür (1).

Avrupa'nın çeşitli ülkelerinde, gıdada, kanda ve insan sütünde okratoksin A'nın meydana çıkması ile insanların maruz kaldığı kanıtlanmıştır. Epidemiyolojik bilgiler, bu toksinle kontamine olan gıdaların tüketimi ile Balkan

¹ Bölge Hıvzıssihha Enstitüsü, Mikotoksin ve Biyotoksin Laboratuvarı, Izmir - TÜRKİYE

Geliş tarihi : 23.02.1998 Kabul edilmiş tarihi : 14.10.1999

Yazışma Adresi : Kimyager Emel KURUOĞLU Bölge Hıvzıssihha Enstitüsü, Mikotoksin ve Biyotoksin Laboratuvarı, Izmir - TÜRKİYE

nefropati'nin çağrışım yaptığını göstermiştir(1). Bununla beraber, bazı tümörlerin etiolojisinde okratoksin A'nın direkt nedensel bir rolünün kanıtlandığı hiç bir veri yayınlanmamıştır. Bu nedenlerden dolayı, okratoksin A'nın insan sağlığına etkileri tekrar değerlendirilmelidir.

İnsan sağlığı açısından önem taşıyan okratoksin A'nın üzüm ve incirde tespiti için bugüne kadar yayınlanan resmi bir yöntem bulunmaması laboratuvar olarak bizi bu konu üzerinde çalışmaya yöneltmiştir. Kahve, hububat ve yemlerde okratoksin A'nın saptanması için kullanılan TLC metodlarını modifiye ederek üzüm ve incirde okratoksin A'yı saptamak için uygun bir HPLC metodu bulunmuştur.

GEREÇ ve YÖNTEM

A) Cihazlar

- a) Yüksek devirli çalkalayıcı - Ika Labortechnik
 b) Parçalayıcı - Waring Lab
 c) Rotatif evaporatör - Buchi rotavapor R 110
 d) Sep-Pak Silika kartuş - J T Baker(7086-07)
 e) UV aydınlatma donanımı - 365 and 254 nm
 f) İnce tabaka plakları - Merck 1.05721 (Silica gel 60) 20x20 cm
 g) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi üniteleri:
 1- Shimadzu LC-10 AD Sıvı kromatografi pompası
 2- Shimadzu RF-535 Floresans dedektör
 3- Shimadzu CTO-10A Kolon fırını
 4- Shimadzu Shim-pack CLC-ODS kolon (150x6mm),5mm, 100 A⁰
 5- Shimadzu CBM-10A Bağlantı kutusu
 6- Hewlett Packard Vectra 486/33 VL Bilgisayar
 7- Super VGA Ekran
 8- Hewlette Packard Desk Jet 550C Yazıcı
 9- CLASS-LC10 Yazılım versiyon 1.2

B) Solventler

- a) Kloroform - Baker. 9175-03

- b) Benzen- Baker. 9149-03
 c) Hekzan- Baker. 9304-03
 d) Dietileter- Merck. 926
 e) Asetik asit -Merck.56
 f) Asetonitril-Merck.1.00030
 g) Toluen- Baker. 9351-03
 h) Etilasetat - Merck. 864
 i) Formik asit- Merck. 563
 j) Metanol-Merck. 1.06007
 k) Ortofosforik asit - H₃PO₄- Merck. 563
 l) Mobil faz - % 0.1 Ortofosforik asit:

Asetonitril (45:55) (v:v)

m) Çalışma standardı-HPCL için 40 ng/ml ve TLC için 1µg/ml Okratoksin A. Benzen:asetonitril (98:2) (v:v) ile çözüldü.

C) Ekstraksiyon:

Analiz için getirilen incir veya üzüm örneği, kıyma makinesinden geçirilmiş ve yoğurularak homojen hale getirilmiştir. Homojen hale getirilmiş bu örnekten, 500 ml'lik bir balon içine 50 gram tartılmış ve üzerine 25 ml 0.1 M H₃PO₄ ve 250 ml kloroform ilave edilmiştir. Yüksek devirli çalkalayıcıda 1/2 saat çalkalanmış ve süzgeç kağıdından (Whatman 1) süzümüştür. Süzütüden 50 ml alınmış ve döner uçurucuda kuruluğa getirilmiştir (3-7). Geri kazanım çalışması için, homojen hale getirilmiş örnekten 50 gram alınarak içine 40 ppb okratoksin A standardından 25 µl ilave edilmiş ve işleme yukarıda anlatıldığı gibi devam edilmiştir.

D) Sep-Pak Temizleme:

Sep-Pak kartuş 6 ml benzen geçirilerek şartlanmış ve 3 ml benzen ile çözülen örnek kalıntısı silika kartuşa verilmiştir. Balon tekrar 3 ml benzen ile yıkanarak kartuşa ilave edilmiştir. Solvent silika jel üzerine gelince sıra ile 10 ml dietileter:hekzan (3:1) (v:v) ve 10 ml benzen:hekzan (1:9) (v:v) ile yıkanmıştır. Yıkama solventleri atılmış ve okratoksin A, 15 ml benzen:asetik asit (9:1) (v:v) ile elüe edilmiştir. Elüat su banyosunda, azot gazı altında kuruluğa getirilmiştir. Kalıntı 500 µl benzen:asetonitril (98:2) (v:v)'de çözülmüş ve 250 µl'si diğer bir vialle alınarak kuruluğa kadar uçurulmuştur. Kuruluğa getirilen bu kalıntı HPLC'de çalışmak

üzere 250 µl mobil fazda çözülmüştür. Kalan 250 µl örnek ekstraktı ile doğrulama için TLC çalışılmıştır.

E) İnce Tabaka Kromatografi (TLC):

Aktive edilmiş TLC plaklarına, benzen:asetonitril (98:2) (v:v) ile çözülmüş örnek ekstraktından 1, 3, 5 ve iki kez 10 µl spotlanmıştır. 10 µl örnek spotundan birinin üzerine 10 µl 1 ppm'lik okratoksin A çalışma standardı spotlanmıştır. Sonra sıra ile 1, 3, 5, 10 µl gibi farklı konsantrasyonlarda 1 ppm'lik okratoksin A standardı spotlanmıştır. Plak benzen:metanol:asetik asit (95:5:5) (v:v:v) içeren yürütme tankında geliştirilmiştir. Plak kurutulmuş ve 365 nm dalga boyu UV'de numune, internal standart ve standart spotları ile mukayese edilerek incelenmiştir. Okratoksin A olduğu düşünülen örnek spotunun standart spotu ile aynı R_f değerinde ve yeşilimsi mavi okratoksin A renginde olması gerekir. Spotun floresans yoğunluğunun hangi standart konsantrasyonuna uyduğu incelenmiştir. Bu bize bir ön bilgiyi verir. Daha ileri bir inceleme için iki yönlü TLC çalışması yapılmıştır. İkinci yürütmede, toluen: etil asetat: formik asit (5:4:1) (v:v:v) solventi kullanılmıştır. İki yönlü kromatografide numune tüm girişim yapan maddelerden temizlenmiştir. Hesaplama ise aşağıda verilen formül uygulanarak yapılmıştır.

$$\text{Okratoksin (ng/ml)} = \frac{S \times Y \times V}{W \times Z}$$

S = Plak üzerinde, örnekte bulunan okratoksin floresansı ile uyan standart miktarı (µl).

Y = Okratoksin derişimi (µg/ml)

W = Özütün içerdiği örnek ağırlığı (g)

Z = Floresansı S'ye uyan örnek miktarı (µl)

V = Özütün son seyreltme hacmi (ml)

F) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC):

Mobil faz ile HPLC kolonu şartlanmıştır. Floresans dedektör, Eksitasyon 333 nm, Emisyon 470 nm'e akış oranı 1 ml/dak. ve fırın

sıcaklığı 30 °C'de ayarlanmıştır. HPLC' de, 10, 20 ve 40 ppb gibi değişik konsantrasyonlarda hazırlanan okratoksin A standardından 20'şer µl enjekte edilmiş ve standart pik alanları (Y) ve standart konsantrasyonları (X) arasında 3 noktalı kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Mobil faz ile 250 µl'e (T_v) dilue edilen örnek ekstraktından 20 µl (I_v) enjekte edilmiştir. Enjekte edilen örnekteki okratoksin A konsantrasyonu (A) kalibrasyon grafiğinden tespit edilmiştir. Hesaplama, aşağıda verilen formül ile yapılmıştır.

$$W = 50 \times \frac{50}{25 + 250} = 9.09 \text{ g.}$$

$$\text{Okratoksin A (ng/g (ppb))} = \frac{A \times T_v \times I_v}{I_v \times W}$$

A: Enjekte edilen örnekteki okratoksin A miktarı (ng)

T_v: Örnek solüsyonunun son hacmi (µl)

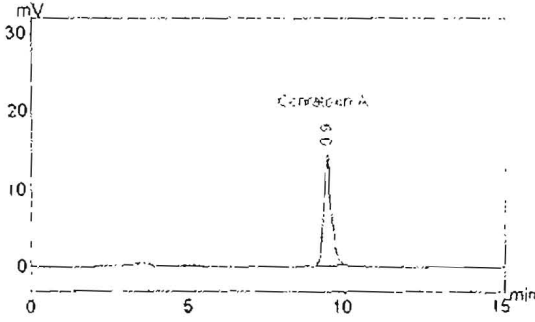
W: Eluatın temsil ettiği örnek miktarı (g)

I_v: Enjekte edilen eluat (µl)

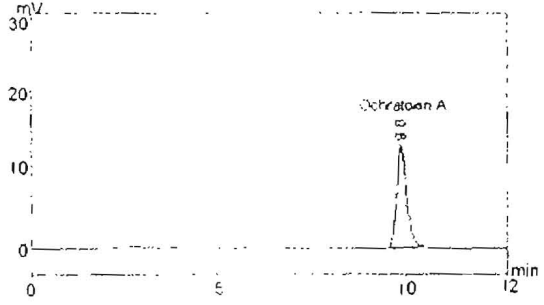
BULGULAR ve TARTIŞMA

Kontamine olmuş incir ve üzümde bulunan okratoksin A'nın sıvı kromatografideki kromatogramı şekil 2 ve 4'de gösterilmiştir. 40 ppb okratoksin A çalışma standart kromatogramları ise Şekil 1 ve 3'de görülmektedir. Çalışmada iki paralel örnek ve iki geri kazanım olmak üzere dört analiz yapılmıştır. Geri kazanım çalışması için homojen hale getirilmiş örnekten 50 gram tartılarak içine 25 µl 40 ppb okratoksin A standardı ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. Analiz yukarıda anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

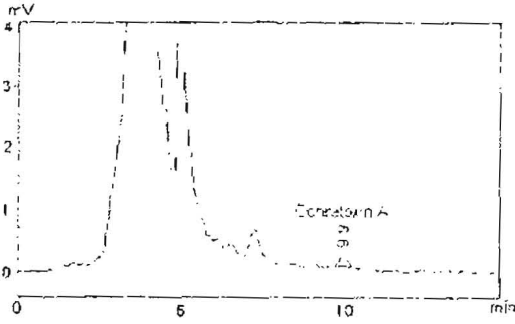
İncir ve üzümde ilk önce Romer metodu (3) uygulanmıştır. Bu metotta son ekstraktın HPLC çalışması için uygun temizlikte olmadığı görülmüştür. Birçok madde karışım yaptığı için Romer metoduna kolon temizleme basamağı



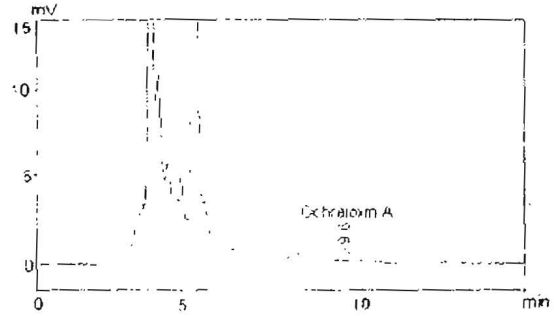
Şekil 1. 0.04 ppm Ochratoxin A'nın kromatogramı



Şekil 3. 0.04 ppm Ochratoxin A'nın kromatogramı



Şekil 2. Üzüm numune kromatogramı



Şekil 4. İncir numune kromatogramı

eklenmiştir. Bu şekilde örnek karışım yapan maddelerden kısmen temizlenmesine rağmen geri kazanımın düştüğü görülmüştür. Geri kazanımın düşük olması,örneğin iyi homojen olmadığını veya okratoksin A'nın ekstraksiyonun herhangi bir basamağında alınamayıp kaldığını akla getirmiştir.

Daha sonra gıda maddelerinde okratoksin A'nın TLC ile saptama metodu (4) incire uygulanmış fakat girişim yapan maddelerin çok fazla olduğu ve işlemin uzun sürdüğü görülmüştür.Temizleme basamağında benzen ile şartlanan SPE kartuş kullanılmış, ayrıca hekzan ve eter:hekzan (3:1) (v:v) ile yıkama işlemi ilave

edilerek okratoksin A benzen:asetik asit (9:1) (v:v) ile elüe edilmiştir. HPLC'e enjekte edildiğinde girişim yapan maddelerden arındığı ve özellikle okratoksin A pikinin etrafında herhangi bir girişim yapan maddenin olmadığı görülmüştür. Bu metot üzüm örneklerine uygulandığında incir örneklerinden daha iyi sonuç alınmıştır. Saptama limitinin minimum 0.03 ppb ve geri kazanımın % 93.5-100 arasında olduğu tespit edilmiştir.

Bu metod yüksek geri kazanım ve saptama limitinin düşük olması ile birlikte, 4-6 saat arasında sonuç vermesi ile hızlı, ekonomik ve güvenilirdir.

KAYNAKLAR

- 1-Natural Poisons. AOAC Official Methods of Analysis. 1207-1209, 1990.
- 2-Krogh P, Nesheim S. Ochratoxin A, Environmental Carcinogens Selected Methods of Analysis, Switzerland. 247-282, 1982.
- 3-Romer Minicolumn Method. AOAC Official of Analysis 1187, 1990.
- 4- Howell M V , Taylor P W. Determination of Aflatoxins, Ochratoxin A and Zearalenone in Mixed Feeds with Detection by Thin Layer Chromatography or High Performance LiquidChromatography. J Assoc Off Anal Chem 64, No.6, 1356-1363, 1981.
- 5- Roberts et al. Rapid, Economical Method for Determination of Aflatoxin and Ochratoxin in Animal Feedstuffs, J Assoc Off Anal Chem 64, No. 4, 961-963, 1981.
- 6- IPCS, Environmental Health Criteria 105, Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot. World Health Organization, Geneva. 29-69:1990.
- 7- Yoshio Ueno. Mycotoxins. Department of Toxicology and Microbial Chemistry. ScienceUniversity of Tokyo, Japan.