



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**TÜRKİYE'DEKİ ARI ÜRÜNLERİNDE HPLC YÖNTEMİ
KULLANILARAK SİTRİNİN, DEOKSİNİVALENOL VE
ZEARALENON DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

EDA KESKİN

BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi OZAN EMRE EYUPOĞLU

İSTANBUL - 2023

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)
Anabilim Dalı : Beslenme ve Diyetetik
Tez Sahibi : EDA KESKİN
Tez Başlığı : Türkiye'deki arı ürünlerinde HPLC yöntemi kullanılarak
sitrinin, deoksinivalenol ve zearalenon düzeylerinin belirlenmesi
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Güney Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 13.03.2023

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Kurumu

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Ozan Emre EYUPOĞLU İstanbul Medipol Üniversitesi

Sınav Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Gülgün ERSOY İstanbul Medipol Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Hande BAKIRHAN İstanbul Medipol Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Gözde DURLU BİLGİN Yeditepe Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Fatma M. BİBEROĞLU İstanbul Rumeli Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun
...../...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil
yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Eda KESKİN

İTHAF

Bu çalışmayı canım babam'a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yoğun çalışma temposuna rağmen tezimin her aşamasında bilgisini ve deneyimini benden esirgemeyen, sorduğum sorulara bıkmadan cevap vererek bana yeni ufuklar açan, beni her konuda teşvik eden ve yol gösteren çok değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ozan Emre EYUPOĞLU'na,

Çalışmamı yapabilmem için laboratuvar imkanlarını sunan başta İstanbul Medipol Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Gülden Zehra OMURTAG'a ve HPLC analiz aşamasındaki yardımlarından dolayı İstanbul Medipol Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı değerli öğretim üyelerine,

Çalışmamın bir bölümünü oluşturan LC-MS/MS analiz sürecinde değerli katkıları ve bilgi birikimleri ile çalışmama destek olan İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Doping Laboratuvar Şefi Sayın Veteriner Erol KABİL'e ve İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Toksikoloji Laboratuvar Şefi Sayın Veteriner Dr. Alper SEZGİN'e,

Lisans eğitimimden doktora sürecine kadar tüm akademik hayatım boyunca her koşulda bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, emeği geçen tüm İstanbul Medipol Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı değerli öğretim üyelerine,

Üniversite hayatımın ilk gününden bu güne kadar tüm iyi ve kötü günlerimde olduğu gibi doktora sürecimde de hep yanımda olan, manevi desteklerini hissettiğim tüm dostlarıma,

Hayatım boyunca bana inanan, her daim yanımda olan, desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen başta canım babam olmak üzere çekirdek aileme ve tüm geniş aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını destekleyen İstanbul Medipol Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ ONAY FORMU	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Mikotoksinler	6
4.1.1. Sitrinin.....	9
4.1.1.1. Sitrinin'in sağlık üzerindeki etkisi ve toksisite mekanizması.....	11
4.1.2. Deoksinivalenol.....	12
4.1.2.1. Deoksinivalenol'un sağlık üzerindeki etkisi ve toksisite mekanizması.	16
4.1.3. Zearalenon.....	17
4.1.3.1. Zearalenon'un sağlık üzerindeki etkisi ve toksisite mekanizması ...	19
4.2. Gıdalarda Mikotoksinlerin Tespiti	21
4.2.1. Analiz öncesi numune hazırlama yöntemleri.....	21
4.2.1.1. Katı-sıvı ekstraksiyonu	22
4.2.1.2. Katı faz ekstraksiyonu.....	22
4.2.2. Mikotoksin tespit yöntemleri	23

4.2.2.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi.....	23
4.2.2.2. Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi.....	25
4.3. Arı Ürünleri.....	26
4.3.1. Bal.....	27
4.3.1.1. Tanımı, besinsel değeri ve sağlık üzerindeki etkisi	27
4.3.2. Polen.....	29
4.3.2.1. Tanımı, besinsel değeri ve sağlık üzerindeki etkisi	29
4.3.3. Propolis	32
4.3.3.1. Tanımı, besinsel değeri ve sağlık üzerindeki etkisi	32
4.3.4. Arı sütü.....	33
4.3.4.1. Tanımı, besinsel değeri ve sağlık üzerindeki etkisi	33
5. MATERYAL VE METOT.....	36
5.1. Materyal	36
5.1.1. Analiz için kullanılan kimyasallar	36
5.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar	37
5.1.3. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler	38
5.2. Metot	38
5.2.1. Stok ve çalışma standart mikotoksin çözeltilerinin hazırlanması	38
5.2.1.1. Stok ve çalışma standart SİT çözeltilerinin hazırlanması	38
5.2.1.2. Stok ve çalışma standart DON çözeltilerinin hazırlanması	38
5.2.1.3. Stok ve çalışma standart ZEA çözeltilerinin hazırlanması	39
5.2.2. Arı ürünlerinde SİT analizi	39
5.2.2.1. SİT analizi öncesi arı ürünleri numunelerinin hazırlanması ve ekstraksiyonu	39
5.2.2.2. Arı ürünlerinde SİT analizi için HPLC prosedürü ve çalışma koşulları.....	40
5.2.3. Arı ürünlerinde DON analizi.....	41

5.2.3.1. DON analizi öncesi arı ürünleri numunelerinin hazırlanması ve ekstraksiyonu	41
5.2.3.2. Arı ürünlerinde DON analizi için HPLC prosedürü ve çalışma koşulları.....	42
5.2.4. Arı ürünlerinde ZEA analizi.....	43
5.2.4.1. ZEA analizi öncesi arı ürünleri numunelerinin hazırlanması ve ekstraksiyonu	43
5.2.4.2. Arı ürünlerinde ZEA analizi için HPLC prosedürü ve çalışma koşulları.....	44
5.2.5. HPLC-UV analizi sonrası mikotoksin içeren arı ürünleri numunelerinin LC-MS/MS analizi ile konfirmasyonu	44
5.2.6. Metot validasyonu.....	45
5.2.6.1. Lineerlik.....	46
5.2.6.2. LOD ve LOQ	46
5.2.6.3. Geri kazanım.....	46
5.2.7. Arı ürünlerinde SİT, DON ve ZEA için diyetel maruziyet ve risk değerlendirmesi.....	47
6. BULGULAR.....	49
6.1. Metod Validasyon Parametrelerinin Değerlendirilmesi.....	49
6.2. Arı Ürünleri Numunelerinde SİT Varlığı ve Düzeyi	54
6.3. Arı Ürünleri Numunelerinde DON Varlığı ve Düzeyi.....	59
6.4. Arı Ürünleri Numunelerinde ZEA Varlığı ve Düzeyi.....	64
6.5. Arı Ürünleri Numunelerinde SİT, DON ve ZEA Kontaminasyon Sıklığı ve Ortalama Değerleri	69
6.6. Arı Ürünlerinde LC/MS-MS Konfirmasyonu	72
6.7. Arı Ürünlerinde SİT, DON ve ZEA Açısından Diyetel Maruziyet Analizi ve Risk Değerlendirmesi	73

7. TARTIŞMA.....	77
7.1. Arı Ürünlerinde SİT, DON, ZEA Mikotoksinlerinin Varlığı ve Düzeyleri ...	77
7.2. Arı ürünlerinde Diyetset Maruziyet ve Risk Değerlendirmesi	82
8. SONUÇ	85
9. KAYNAKLAR	90
10. ÖZGEÇMİŞ	114



KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

BMDL: Kıyaslama Dozu Alt Limiti (Benchmark Dose Lower Limit)

DON: Deoksinivalenol

EDI: Tahmini Günlük Alım (Estimated Daily Intake)

EFSA: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority)

FAO: Gıda Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)

FDA: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration)

HACCP: Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları (Hazard Analysis and Critical Control Points)

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)

HPLC-UV: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Ultraviyole Dedektör (High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet detector)

IARC: Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı (International Agency for Research on Cancer)

LB: Tahmini Alt Sınır (Lower Bound Estimate)

LC-MS/MS: Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometrisi (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry)

LOD: Tespit Limiti (Limit of Detection)

LOQ: Tayin Limiti (Limit of Quantification)

kg: kilogram

MB: Tahmini Orta Sınır (Medium Bound Estimate)

mg: miligram

MoE: Maruz Kalma Marjı (Margin of Exposure)

MRL: Maksimum Kalıntı Limiti (Maximum Residue Limit)

ng: nanogram

rpm: dakikadaki devir sayısı (revolutions per minute)

R²: Korelasyon Katsayısı

ROS: Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)

SİT: Sitrinin

SLE: Katı-Sıvı Ekstraksiyon (Solid-Liquid Extraction)

SPE: Katı Faz Ekstraksiyonu (Solid Phase Extraction)

TBSA: Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması

TDI: Tolere Edilebilir Günlük Alım Miktarı (Tolerable Daily Intake)

TE: Tespit Edilemedi

TGK: Türk Gıda Kodeksi

TLC: İnce Tabaka Kromatografisi (Thin Layer Chromatography)

TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu

UB: Tahmini Üst Sınır (Upper Bound Estimate)

UV: Ultraviyole (Ultraviolet)

ZEA: Zearalenon

µg: mikrogram

µL: mikrolitre

WHO: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 4.1. Başlıca mikotoksinler.....	7
Tablo 6.1.1. İncelenen üç mikotoksinin LOD, LOQ ve geri kazanım değerleri	53
Tablo 6.2.1. HPLC-UV analizi ile arı ürünlerinde tespit edilen SİT miktarları.....	57
Tablo 6.3.1. HPLC-UV analizi ile arı ürünlerinde tespit edilen DON miktarları	62
Tablo 6.4.1. HPLC-UV analizi ile arı ürünlerinde tespit edilen ZEA miktarları	67
Tablo 6.5.1. Arı ürünlerinde tespit edilen mikotoksinlerin kontaminasyon sıklığı ve konsantrasyon değerleri	70
Tablo 6.7.1. Arı ürünleri tüketimi ile SİT'e diyetel maruziyet analizi ve risk değerlendirmesi.....	74
Tablo 6.7.2. Arı ürünleri tüketimi ile DON'a diyetel maruziyet analizi ve risk değerlendirmesi.....	75
Tablo 6.7.3. Arı ürünleri tüketimi ile ZEA'ya diyetel maruziyet analizi ve risk değerlendirmesi.....	76

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1. Sitrinin'in moleküler yapısı	9
Şekil 4.2. Deoksinivalenol'ün moleküler yapısı	13
Şekil 4.3. Zearalenon'un moleküler yapısı	17
Şekil 6.1.1. Toksin standartlarının HPLC-UV kromatogramı	49
Şekil 6.1.2. SİT için kalibrasyon grafiği	50
Şekil 6.1.3. Farklı konsantrasyonlardaki SİT standartlarının kromatogram çakıştırması	50
Şekil 6.1.4. DON için kalibrasyon grafiği	51
Şekil 6.1.5. Farklı konsantrasyonlardaki DON standartlarının kromatogram çakıştırması	51
Şekil 6.1.6. ZEA için kalibrasyon grafiği	52
Şekil 6.2.1. Türkiye'nin farklı illerinden temin edilen arı ürünlerinde tespit edilen SİT kontaminasyonu	55
Şekil 6.2.2. Bölgelere göre SİT tespit edilen arı ürünlerinin dağılımı	56
Şekil 6.2.3. SİT kontaminasyonuna maruz kalmış bir propolis numunesine ait HPLC- UV kromatogramı	58
Şekil 6.2.4. SİT içermeyen bir polen numunesine ait HPLC-UV kromatogramı	58
Şekil 6.3.1. Türkiye'nin farklı illerinden temin edilen arı ürünlerinde tespit edilen DON kontaminasyonu	60
Şekil 6.3.2. Bölgelere göre DON tespit edilen arı ürünlerinin dağılımı	61
Şekil 6.3.3. DON kontaminasyonuna maruz kalmış bir polen numunesine ait HPLC- UV kromatogramı	63
Şekil 6.3.4. DON içermeyen bir bal numunesine ait HPLC-UV kromatogramı	63
Şekil 6.4.1. Türkiye'nin farklı illerinden temin edilen arı ürünlerinde tespit edilen ZEA kontaminasyonu	65
Şekil 6.4.2. Bölgelere göre ZEA tespit edilen arı ürünlerinin dağılımı	66
Şekil 6.4.3. ZEA kontaminasyonuna maruz kalmış bir arı sütü numunesine ait HPLC-UV kromatogramı	68
Şekil 6.4.4. ZEA içermeyen bir polen numunesine ait HPLC-UV kromatogramı	68
Şekil 6.5.1. Bölgelere göre tüm arı ürünlerinde saptanan mikotoksinlerin dağılımları	71

Şekil 6.6.1. Bir propolis numunesinde tespit edilmiş üç mikotoksini temsil eden MS kromatogramı..... 72



1. ÖZET

TÜRKİYE'DEKİ ARI ÜRÜNLERİNDE HPLC YÖNTEMİ KULLANILARAK SİTRİNİN, DEOKSİNİVALENOL VE ZEARALENON DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Besin kalitesini olumsuz etkileyen ve dünya çapında aşırı israfa yol açan mikotoksin kontaminasyonu, insan sağlığı için risk oluşturmakta ve mikotoksinlere diyetle maruz kalmak, halen sağlık tehdidi olmaya devam etmektedir. Arı ürünleri içerdiği yüksek biyoaktif bileşikleri ve sağlığı geliştirici etkileri nedeniyle geleneksel ve modern tıpta en çok kullanılan doğal besinler arasında yer alır. Günümüzde arı ürünlerinin tüketimi ile herhangi bir veya birden fazla mikotoksinin vücuda alınıp alınmadığı belirsizliğini korumaktadır. Bu nedenle, çalışmamızda yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılarak arı ürünlerinde (bal, polen, propolis ve arı sütü) sitrinin (SİT), deoksinivalenol (DON), zearalenon (ZEA) düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmış ve ek olarak diyetel maruziyet değerlendirmesi yapılmıştır. Mikotoksin analizi HPLC-UV ile gerçekleştirilmiş ve mikotoksin saptanan numuneler, sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) ile doğrulanmıştır. Risk değerlendirmesi için maruziyet marjı (MoE) yaklaşımı kullanılmıştır. Tüm numunelerin %79,5'inde en az bir mikotoksin tespit edilirken, en sık saptanan mikotoksinler ZEA (%37,5) ve DON (%35,7) olarak belirlenmiştir. Bal ve propolis numunelerinde üç mikotoksinin varlığı gözlemlenmiş, ancak bu numunelerde sadece DON için tespit limitinin üzerinde konsantrasyonlar saptanmıştır. Polen numunelerinde SİT tespit edilmezken, sadece bir arı sütü numunesinde SİT (<LOD µg/kg) görülmüştür. ZEA saptanan bal, polen ve propolis numunelerinde belirlenen konsantrasyonlar tespit limitinin altında iken, sadece bir arı sütü numunesinde ZEA miktarının tespit limitinin üzerinde (0,0094 µg/kg) olduğu belirlenmiştir. Yapılan maruziyet değerlendirmesi sonucu, dört arı ürünü grubu için hesaplanan değerler çalışılan üç mikotoksinin de sağlık açısından risk oluşturmadığını ortaya koymuştur. Ancak arı ürünü gruplarında mikotoksinlerin tespit edilmesi nedeniyle, bu besinlerin tüketiminden kaynaklanabilecek sağlık risklerinin kontrol altında tutulması için rutin toksikolojik analizler gerçekleştirilmelidir.

Anahtar Kelimeler: Arı ürünleri, HPLC-UV, LC-MS/MS, maruziyet değerlendirmesi, mikotoksin

Bu tez çalışması İstanbul Medipol Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2021/19).

2. ABSTRACT

DETERMINATION OF CITRININ, DEOXYNIVALENOL, AND ZEARALENONE LEVELS USING THE HPLC METHOD IN BEE PRODUCTS IN TÜRKİYE

Mycotoxin contamination, which negatively affects food quality and causes excessive waste around the world, poses a risk to human health and dietary exposure to mycotoxins still remains a health threat. Bee products are among the most used natural foods in traditional and modern medicine due to their high bioactive compounds and health-promoting effects. Today, it remains unclear whether any or more mycotoxins are taken into the body by the consumption of bee products. Therefore, in our study, it was aimed to determine the levels of citrinin (CIT), deoxynivalenol (DON), and zearalenone (ZEA) in bee products (honey, bee pollen, propolis, and royal jelly) using high-performance liquid chromatography (HPLC) method and additionally, dietary exposure assessment was performed. Mycotoxin analysis was performed by HPLC-UV and mycotoxin detected samples were confirmed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The margin of exposure (MoE) approach was used for risk assessment. While at least one mycotoxin was detected in 79.5% of all samples, the most frequently detected mycotoxins were ZEA (37.5%) and DON (35.7%). The presence of three mycotoxins was observed in honey and propolis samples, but only concentrations above the detection limit for DON were detected in these samples. While CIT was not detected in bee pollen samples, CIT ($<LOD$ $\mu\text{g/kg}$) was observed only in one royal jelly sample. While the concentration values determined in honey, bee pollen and propolis samples in which ZEA were detected were below the detection limit, it was determined that the ZEA average concentration value was above the detection limit (0.0094 $\mu\text{g/kg}$) in only one royal jelly sample. As a result of the exposure assessment, the values calculated for the four bee product groups revealed that the three mycotoxins studied do not pose a health risk. However, due to the detection of mycotoxins in bee product groups, routine toxicological analyzes should be carried out in order to keep the health risks that may arise from the consumption of these foods under control.

Key Words: Bee products, exposure assessment, HPLC-UV, LC-MS/MS, mycotoxin

This work was financially supported by the Istanbul Medipol University Scientific Research Projects Fund (Project No: 2021/19).

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Besinlerin yapısında birçok sağlıklı doğal bileşiğin yanı sıra pestisitler, mikotoksinler, ağır metaller ve metaloidler gibi toksik bileşikler de bulunmaktadır (1,2). Günlük yaşantımızda sıklıkla tükettiğimiz yiyecekler çoğunlukla mikotoksin adı verilen zehirli bileşikler ile kontamine olmaktadır (3). Mikotoksinler esas olarak *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinsi mantarlar tarafından ikincil metabolizma sırasında üretilen düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. Mikotoksin üreten bu küf (mantar) türleri doğada oldukça yaygındır (4).

Mikotoksin kontaminasyonu gıda, tarım ve hayvancılık sektöründe geçmişten günümüze süregelen küresel bir gıda güvenliği sorunudur. Besinlerdeki bu kontaminasyon küflerin varlığına, tarımsal uygulamalara, hasat ve/veya depolama koşullarına (sıcaklık, nem oranı vb.) bağlıdır. Mikotoksinlerin çoğu ısıya, fiziksel ve kimyasal işlemlere karşı dayanıklıdır. Bu nedenle kaynatma, kavurma, pastörizasyon gibi işleme ve pişirme süreçleri sonrasında bile yiyeceklerdeki toksik bileşik varlığı devam edebilir (4,5).

Günümüzde tanımlanmış ve bildirilmiş üç yüzden fazla mikotoksin türü vardır (6). Besinlerdeki yüksek prevalansları ve hem insan hem de hayvan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle bilinen önemli mikotoksinler arasında; aflatoksinler (B1, B2, G1, G2, M1), fumonisinler (A, B1, B2), okratoksin A, trikotesenler (deoksinivalenol, T-2 toksini vb.), zearalenon, patulin ve sitrinin yer alır (7,8).

Deoksinivalenol (DON) ve zearalenon (ZEA) mikotoksinleri temel olarak *Fusarium graminearum* ve *Fusarium culmorum* türleri tarafından üretilirken (9,10), SİT *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Monascus* türleri tarafından üretilen poliketid türevi bir mikotoksindir (11). Aynı küf türleri tarafından sentezlendiği için DON ve ZEA mikotoksinleri genellikle buğday, arpa, yulaf, çavdar ve mısır gibi tahıllarda ve tahıl bazlı besinlerde birlikte bulunur (9,10). Sitrinin (SİT) ise tahıllar, tahıl bazlı ürünler, yağlı tohumlar ve baharatlar gibi çeşitli besinlerde tespit edilmesi ile sağlık için potansiyel bir tehdit oluşturmaktadır (11,12).

Mikotoksinler, toksisite ve evrensellik nedeniyle gıda güvenliği konularının odak noktası haline gelmiştir. Hem gıdalardaki hem de yemlerdeki mikotoksin oluşumu, insanlarda ve hayvanlarda akut zehirlenmenin yanı sıra kronik maruziyet sonucunda kanserojenik, mutajenik, nefrotoksik ve teratojenik gibi patolojik etkilere neden olabilir (13). Nefrotoksisite SİT'in iyi bilinen toksik bir etkisidir. Çalışmalar, memeli türlerinde tekrarlı doz SİT maruziyeti sonrası böbreğin birincil hedef organ olduğunu kanıtlamıştır (14-16). Kimyasal yapı olarak endojen östrojene benzeyen ZEA, bir östrojen antagonisti gibi davranarak 17- β östradiol ile östrojen reseptörlerine bağlanmak için yarışır. Bu nedenle doğal östrojenlerin aktivitelerini engelleyebilir, sentezlerini ve metabolizmalarını değiştirebilir veya östrojenik reseptörlerin sentezine müdahale edebilir (17). Aynı zamanda insan ve hayvan çalışmalarında ZEA, östrojenik aktivitesi ve östrojen reseptörlerine bağlanma afinitesi nedeniyle üreme bozuklukları ve hiperöstrojenizm ile ilişkilendirilmiştir (18). En yaygın araştırılan mikotoksinlerden biri olan DON ise genellikle enteropatojenik bir toksin olarak kabul edilir. İnsanların DON ile kontamine yiyecekleri tüketmesi sonucu akut toksisite; kusma, ishal, ateş ve karın ağrısı gibi besin zehirlenmesi belirtileri ile kendini gösterir (19). DON kontaminasyonuna kronik maruziyet ise büyümede gerilik, besin alımında azalma, vücut ağırlığı kaybı, kanserojenik ve mutajenik etkiler ile ilişkilendirilmiştir (20).

Mikotoksinlerin sağlık üzerindeki olumsuz etkileri bilinmesine rağmen, bu toksinlere diyetle maruz kalmak insanlar için günlük bir tehlike olmaya devam etmektedir. Bu nedenle, tükettiğimiz besinlerin hangi mikotoksinleri içerdiğini saptamak ve mikotoksinlerin besinlerde bulunabilecek kalıntı limitlerini belirlemek büyük önem taşımaktadır. Bal, polen, propolis ve arı sütü gibi arı ürünleri geçmişten bugüne hem yetişkin hem de çocuk beslenmesinde önemli ölçüde yer almaktadır. Özellikle günümüzde başta bulaşıcı viral hastalıklar olmak üzere çok sayıda hastalığa karşı bağışıklık sistemini güçlendirmek isteyen yetişkinler arı ürünlerini sıklıkla tercih etmektedir. Aynı zamanda ebeveynler çocuklarının gelişimini ve bağışıklığını desteklemek amacı ile çocukların günlük beslenmelerinde arı ürünlerine yer vermektedir. Dolayısıyla yaş fark etmeksizin arı ürünlerini tüketen bireylerin herhangi bir veya birden fazla mikotoksini vücuda alıp almadığı halen belirsizdir.

Literatür incelendiğinde; SİT, DON ve ZEA mikotoksinleri çoğunlukla tahıllar, tahıl bazlı yiyecekler, tahıl bazlı bebek mamaları, yağlı tohumlar, baharatlar ve hayvan yemlerinde analiz edilmiştir (5-7). Arı ürünlerinde mikotoksin varlığını araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar sadece polen örnekleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Toskana (İtalya)'da yürütülen bir çalışmada, polen numunelerinde yüksek DON konsantrasyonları (max: 179,7 µg/kg) tespit edilirken (21), Slovakya'nın çeşitli bölgelerinden toplanan polenlerde yaygın olarak T-2 toksin, ZEA ve DON mikotoksinleri saptanmıştır (22). Hem ulusal hem de uluslararası yayınlarda polen dışındaki diğer arı ürünlerinde mikotoksin analizine ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Mevcut çalışmalardan farklı olarak çalışmamızda polenin yanı sıra bal, propolis ve arı sütündeki mikotoksin varlığının değerlendirilmesi yeni bir yaklaşım olarak düşünülmektedir. Aynı zamanda Türkiye'deki arı ürünlerinde DON, ZEA ve SİT mikotoksinlerinden birinin veya birden fazlasının var olma olasılığı, literatürdeki veri sınırlılığı göz önünde bulundurulduğunda bu konunun araştırılmaya değer olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çalışmada yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılarak, Türkiye'nin farklı bölgelerinden ve illerinden temin edilen arı ürünlerinde (bal, propolis, polen ve arı sütü) SİT, DON ve ZEA düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Temel amacımıza ek olarak, temin edilen tüm arı ürünlerinde tespit edilen mikotoksinlere dair diyetel maruziyet değerlendirmesi yapılmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Mikotoksinler

Besinler yapısında birçok doğal bileşiği bulundurur. Bunların arasında, insan diyetinde sayısının yaklaşık 5000-10,000 olduğu tahmin edilen zehirli bileşikler (mikotoksinler, pestisitler, ağır metaller, metaloidler, antibiyotikler vb.) mevcuttur. Günlük yaşantımızda sıklıkla tükettiğimiz yiyecekler çoğunlukla mikotoksin adı verilen toksik bileşikler ile kontamine olmaktadır (1-3). Mikotoksin ismi mantar anlamına gelen Yunanca “mykes” ve zehir anlamına gelen Latince “toxicum” kelimesinden türetilmiştir (5). Mikotoksinler başta *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinsi mantarlar olmak üzere birçok filamentli mantarlar (küfler) tarafından üretilen düşük moleküler ağırlıklı (<1,000 Dalton) bileşiklerdir. Mikotoksin üreten bu küf türleri çeşitli çevresel koşullar altında besinlerde oluşabilme durumları nedeniyle, tüm dünyada küresel bir gıda güvenliği sorunu olarak kabul edilmektedir (4,23).

Günümüzde tanımlanmış ve bildirilmiş üç yüzden fazla mikotoksin türü vardır. Besinlerdeki yüksek prevalansları ve hem insan hem de hayvan sağlığı üzerindeki etkileri nedeniyle bilinen önemli mikotoksinler arasında aflatoksinler (B1, B2, G1, G2, M1), fumonisinler (A, B1, B2), okratoksin A, deoksinivalenol (DON), T-2 toksin, HT-2 toksin, zearalenon (ZEA) ve sitrinin (SİT) yer almaktadır (7,8) (Tablo 4.1).

Mikotoksin üreten küf türleri (*Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium*) doğada oldukça yaygın olup, tahıllar (sıklıkla buğday, arpa, mısır vb.), yağlı tohumlar (findık, ceviz, fıstık vb.), baharatlar ve kahve gibi çeşitli besinler üzerinde gelişmektedir. Mikotoksinler, kontamine olmuş bu besinlerin tüketimi ile doğrudan insan vücuduna alınmaktadır. Ayrıca yem kontaminasyonu gıda güvenliği için ekstra bir tehlike oluşturur. Çünkü hayvanların kontamine olmuş yemleri tüketmesi ile bu mikotoksinler süt, et, yumurta gibi hayvansal kaynaklı besinlere taşınır ve bu durum insanların mikotoksin içeren besinleri tüketmesine neden olur (24,25). Örneğin, İspanya’da gerçekleştirilen bir çalışmada, marketlerden satın alınan on üç inek

sütünün yaklaşık %10'unda izin verilen maksimum limitten daha yüksek seviyelerde aflatoksin M1 saptanmış, diğer aflatoksinler (B1, B2, G1, G2, M2), okratoksin A, fumonisinler (B1, B2) ve ZEA düşük seviyelerde tespit edilmiştir (26).

Tablo 4.1. Başlıca mikotoksinler (4,7)

Mantar türleri	Mikotoksinler	En sık saptanan besinler
<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoksinler (Aflatoksin B1, B2, G1, G2)	Mısır, buğday, pirinç, fıstık, antep fıstığı, badem, incir, pamuk tohumu, baharatlar
<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	Fumonisinler (Fumonisin B1, B2, B3)	Mısır, mısır içeren ürünler, kuşkonmaz
<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus carbonarius</i>	Okratoksin A	Tahıllar, şarap, üzüm, kahve, kakao, peynir
<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium cerealis</i> <i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium incarnatum</i>	Zearalenon	Tahıllar (mısır, buğday, arpa) ve tahıl bazlı ürünler, hayvan yemleri
<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium cerealis</i>	Deoksinivalenol	Tahıllar ve tahıl ürünleri, hayvan yemleri
<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> ve <i>Monascus</i> türleri	Sitrinin	Tahıllar, meyveler ve hayvan yemleri
<i>Penicillium expansum</i> <i>Bysochlamis nivea</i> <i>Aspergillus clavatus</i>	Patulin	Elma, elma suyu

Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre, dünyadaki tarım ürünlerinin %25'i mikotoksinleri içermekte ve dünyadaki gıdaların yaklaşık %5-10'u mikotoksin oluşumu nedeniyle israf edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi

(EFSA), FAO ve Avrupa Komisyonu gibi birçok ulusal ve uluslararası devlet kurumu bu küresel halk sağlığı sorununu ele almış, gıda ve yemlerdeki mikotoksin kontaminasyonunu sınırlamaya yönelik düzenlemeler ve yönergeler yayınlamıştır (4,24,27). Ülkemizde ise gıda ve yemlerdeki mikotoksin varlığına ilişkin veriler ve limitler T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından “Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği”nde belirtilmiş ve 2011 yılında Resmi Gazete’de yayınlanmıştır (28).

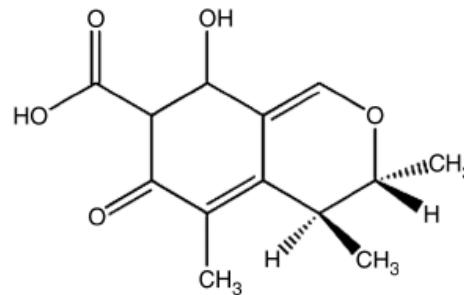
Besinlerdeki mikotoksin kontaminasyonu küflerin varlığına, tarımsal uygulamalara (hasat öncesinde veya hasat sonrası besinlerin işlenmesi, paketlenmesi, dağıtımı ve depolanması vb.) ve çevresel koşullara bağlıdır (29). Nem ve sıcaklık gibi çevresel faktörler mantar gelişimini teşvik ederek bu toksik bileşiklerin besinlerde üretim riskinin artmasına ve toksinlerin birikmesine katkıda bulunmaktadır. Araştırmalar tropikal ve subtropikal bölgelerdeki mahsullerin, ılıman bölgelerin mahsullerine kıyasla mikotoksin kontaminasyonuna daha duyarlı olduğunu ortaya koymuştur. Çünkü tropik bölgelerdeki yüksek sıcaklık ve nem varlığı mikotoksin oluşumu için en uygun koşulları sağlamaktadır (30). Genel olarak, yüksek sıcaklık ve nemli ortamlarda uygun olmayan bir şekilde depolanan başta tahıllar olmak üzere tüm besinler küf oluşumuna ve mikotoksin kontaminasyonuna maruz kalmaktadır (31). Besinler işlendikten sonra uygun koşullar altında depolandığı sürece mikotoksin üretimi zorlaşır. Bu, özellikle besinin su aktivitesi, depolama sıcaklığı ve nem oranının küf oluşumunu önleyecek kadar düşük olması ile sağlanabilir. Ancak bu koşullar mikotoksin üretimine izin verecek seviyelere yükseldiğinde işlenmiş olsa bile besinlerde mikotoksinler birikebilir (32).

Gıda işleme süreçleri gıda güvenliği için öngörülemeyen bir sorun olarak kabul edilmektedir. Mikotoksinlerin çoğu geleneksel gıda işleme sıcaklık aralığına (80-121 °C), fiziksel ve kimyasal işlemlere karşı nispeten dayanıklıdır. Bu nedenle, kaynatma, kavurma gibi normal pişirme koşullarında, hatta bazı durumlarda pastörizasyon sonrası bile yiyeceklerdeki toksik bileşik varlığı devam edebilmektedir (5,33). Fiziksel işlemler (ayıklama, temizleme ve öğütme) ve ısı işlemlerin mikotoksinler üzerindeki etkisi incelendiğinde, yüksek sıcaklık kullanımının mikotoksin düzeylerini azaltmada en büyük etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Yüz elli °C’nin üzerindeki yüksek sıcaklıklarda pişirme işleminin mikotoksin

konsantrasyonlarını önemli ölçüde azaltabildiği bildirilmektedir (5). Genel olarak, bir besine ısıtıl işlem uygulanması mikotoksin konsantrasyonlarını belirli ölçüde azaltır, ancak tamamen ortadan kaldırmaz. Besinlerde mikotoksin oluşumunu kontrol altına almak için birçok strateji önerilse de halen kesin bir çözüm bulunmamaktadır.

4.1.1. Sitrinin

Aspergillus (*A. carneus*, *A. niveus*, *A. terreus*) *Penicillium* (*P. citrinum*, *P. verrucosum* ve *P. expansum*) ve *Monascus* (*M. ruber*) türleri tarafından üretilen SİT, en yaygın olarak depolama sırasında oluşan poliketid türevi bir mikotoksindir (Şekil 4.1) (11,34). İlk kez 1930'lu yıllarda bir *P. citrinum* kültüründen izole edilmiştir (35). Tahıllar (mısır, buğday, çavdar, pirinç, arpa, yulaf) ve tahıl bazlı ürünler, meyveler (elma vb.) ve meyve suları, yağlı tohumlar (badem, yer fıstığı, fındık, fıstık, ayçiçeği, vb.) ve baharatlar (zerdeçal, kişniş, rezene, karabiber, kakule ve kimyon vb.) gibi çok çeşitli besinlerde SİT kontaminasyonu tespit edilmiştir (12,36). Farklı olarak, peynir numunelerinin incelendiği bir çalışmada SİT'in toksijenik suşlarının varlığı saptanmıştır (37). Aynı zamanda son yıllarda *Monascus purpureus*'un ikincil bir metaboliti olarak kırmızı fermente pirincin fermentasyonu sırasında SİT'in oluştuğu bilinmektedir. Kırmızı fermente pirinç geleneksel olarak Doğu Asya'da gıda boyası olarak kullanılmaktadır (38).



Şekil 4.1. Sitrinin'in moleküler yapısı (36)

Özellikle depolama koşullarındaki nem oranı, sıcaklık gibi çevresel faktörlere bağlı olarak SİT oluşmaktadır. Büyük oranda, tahıllar uygun şekilde kurutulmadığında ve daha yüksek nem içeriği (>%16) olan yerlerde muhafaza edildiğinde ortaya çıkmaktadır. Bu mikotoksinin oluşumu için uygun sıcaklık aralığı 12-37 °C (optimum sıcaklık 30 °C)'dir (34,39). Sıcaklığın farklı tahıl numunelerinde *P. verrucosum* büyümesi ve SİT oluşumu üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, deney esnasında nem içeriği korunmuş ve tahıl numuneleri 40 gün boyunca farklı depolama sıcaklıklarında (10, 20 ve 30 °C) tutulmuştur. Deney sonunda, 30 °C'de *P. verrucosum*'un maksimum büyüme sergilediği ve SİT birikiminin pirinçte 20 °C'de daha fazla olduğu belirlenmiştir (40).

Diğer mikotoksinlere kıyasla, SİT ısıya karşı daha fazla hassasiyet göstermektedir. Besinlerdeki SİT düzeylerinin sulu ortamlarda >100 °C'de, kuru koşullar altında ise >175 °C'de işlenme sonucu azaldığı tespit edilmiştir. Besinler ısıtıldıktan sonra SİT parçalanır ve SİT'den daha düşük sitotoksikite etkili olan sitrinin H₁ ve sitrinin H₂ oluşur. *Monascus* küfündeki SİT konsantrasyonunun suda kaynatma işlemi sonrası önemli ölçüde düştüğü ve 20 dakikalık ısıtma sonucu besinlerdeki SİT düzeylerinin yarı oranda azaldığı ortaya konmuştur (39). Isı uygulamaları dışında, flavonoidler gibi fitokimyasalların besinlere eklenmesi SİT konsantrasyonlarını etkileyebilecek bir faktör olarak dikkat çekmiştir. Yakın tarihli bir çalışmada, sıvı ortam fermentasyonu sırasında *Monascus aurantiacus* Li AS3.4384 (MAL) tarafından üretilen SİT üzerinde çeşitli flavonoidlerin (izoflavon, kuersetin, daidzein, luteolin, apigenin, kaempferol, mirisetin ve genistein) etkileri araştırılmıştır. SİT üretiminde en yüksek azalma fermentasyon sırasında 2 g/L genistein eklenmesi ile gözlemlenmiş ve SİT seviyelerinde yaklaşık %80 oranında bir azalma saptanmıştır. Çalışma sonuçları SİT'i azaltmak için *Monascus*'un fermentasyon sürecine genistein eklenebileceğini ortaya koymuştur (41). Aynı çalışma grubu tarafından gerçekleştirilen başka bir araştırmada, genistein ilavesinin SİT konsantrasyonunu azaltma mekanizması incelenmiş ve genistein eklenmesi ile birkaç genin (orf5, pksCT, orf3, orf1, orf6 ve ctnE genleri) önemli ölçüde aşağı regüle edildiği ve bunun sonucunda genisteinin SİT sentezini etkilediği belirlenmiştir (42). Farklı olarak, SİT kontaminasyonu üzerinde yüksek hidrostatik basınç, ultrasonikasyon ve soğuk atmosferik plazma gibi gıda endüstrisinde kullanılan yeni

teknolojilerin etkileri araştırılmış ve bu teknolojilerin besin kalitesini etkilemeden SİT düzeylerinde yaklaşık %50-100 oranlarında azalma sağladığı tespit edilmiştir (43-45).

Besinlerdeki SİT kontaminasyonunu ve tüketicilerin SİT maruziyet riskini araştıran çalışmalar son yıllarda artış göstermiştir. İnsanların SİT'e maruz kalma riski yüksek olmasına rağmen, besinlerdeki maksimum SİT limitleri açısından günümüzde kesin bir yasal sınır bulunmamaktadır (46). Besinlerde izin verilen en yüksek SİT miktarı Avrupa Birliği mevzuatında yer almış, 2014 yılında kırmızı maya *M. purpureus* ile fermente edilmiş pirinç bazlı besin desteklerinde maksimum sınır 2000 µg/kg olarak belirlenmiştir (47). En son 2019 yılı Avrupa Birliği mevzuatında ise besin desteklerinde SİT için maksimum 100 µg/kg'a kadar kalıntı limiti önerilmiştir (48). Ülke bazlı incelendiğinde, sadece Çin (50 µg/kg) ve Japonya'da (200 µg/kg) SİT için fermente kırmızı pirinçte maksimum sınır tanımlanmıştır (49). Diğer dünya ülkelerinde SİT'in besinlerdeki maksimum kalıntı limitleri için henüz düzenleme yapılmamıştır. Ülkemizde ise T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı "Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği"nde SİT kontaminasyonu açısından maksimum kalıntı limiti (MRL) sadece bir besin desteği (*Monascus purpureus* kullanılarak fermente edilmiş pirinç bazlı ürünler) için 2000 µg/kg olarak ilan edilmiştir (28). Özetle SİT için dünya çapında mutlak bir mevzuat yoktur. Bu nedenle, insanların beslenmesinde SİT'e maruz kalma konusundaki mevcut bilgiler sınırlıdır ve bu durum risk değerlendirmesini de engellemektedir. Uluslararası otoriteler tarafından tahıllarda ve tahıl bazlı ürünlerde SİT seviyelerinin izlenmesi önerilmiştir. Besinlerdeki SİT kontaminasyonu hakkında yeni çalışmalar gereklidir (36).

4.1.1.1. Sitrinin'in sağlık üzerindeki etkisi ve toksisite mekanizması

Literatürde SİT özellikle yüksek nefrotoksisite ve genotoksisite etkileri nedeniyle ön plana çıkmıştır. Nefrotoksisite SİT'in en iyi bilinen toksik etkisidir. Çalışmalar, memeli türlerinde tekrarlı doz SİT maruziyeti sonrası böbreğin birincil hedef organ olduğunu kanıtlamıştır (14,15). İnsanlarda gerçekleştirilen toksikokinetik çalışmalarda, SİT'in %40 oranında geri emildiği ortaya konmuştur (39). Böbrek dışında karaciğer, kalp, üreme sistemi, mitokondriyal solunum zinciri ve kemik iliği üzerinde de toksik etkileri olabileceği bildirilmiş, bu nedenle SİT

kontaminasyonu sağlık konusunda endişeleri daha fazla artırmıştır (50,51). Deney hayvanları (fare, tavşan, domuz ve sıçan) üzerinde farklı SİT dozları uygulanarak toksisite etkilerinin incelendiği çalışmalarında, SİT'in akut olarak maruziyet sonrası 4-12 saat içinde metabolik asidoz, azotemi ve hipokalemiye neden olduğu, uzun vadede vücut ağırlığını azalttığı, fertilizasyon ve embriyo gelişimini bozduğu, gebelik oranını düşürdüğü, böbrek ve karaciğer hasarı (dejenerasyon ve nekroz) oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (52-55). Genotoksik etkisi ise bakterilerde, farklı memeli hücrelerinde ve kemirgenlerde test edilmiştir. Bu mikotoksinin mutajenik olmadığı, klastojenik etkilerin göstergesi olan diğer DNA hasarı türlerini indükleyebileceği gösterilmiş ve genotoksik potansiyeli doğrulanmıştır (11). Ancak deney hayvanlarında ve insanlarda karsinojeniteye ilişkin sınırlı kanıt varlığı nedeniyle SİT Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC) tarafından üçüncü grup kanserojen ("insanlarda kanserojenliği açısından sınıflandırılmayanlar") olarak bildirilmiştir (56). Sağlık üzerindeki tüm bu olumsuz etkilerden korunmak amacıyla, SİT için EFSA tarafından belirlenen tolere edilebilir günlük alım miktarı (TDI) 0,2 µg/kg vücut ağırlığı'dır (12,57).

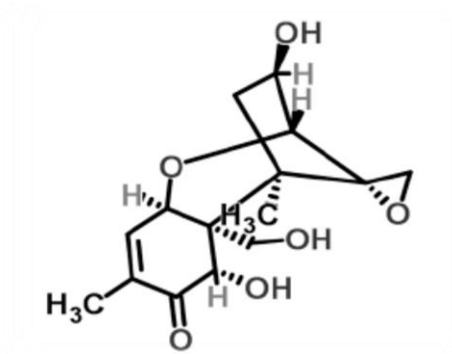
Genel olarak, SİT kaynaklı toksisite mekanizmasının artmış reaktif oksijen türleri (ROS) varlığı ve bozulmuş anti-oksidatif enzimatik sistemlerle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu durum SİT'in oksidatif stresi artırdığını ortaya koymaktadır. Kesin mekanizma henüz belirlenmemiş olsa da SİT'in oksidatif stres yoluyla apoptoz indüksiyonunda yer aldığına dair kanıtlar da vardır (14,15,50,51). Solunum zincirinde, SİT'in ROS oluşumunu teşvik ettiği, süperoksit anyonlarının sentezini artırdığı ve mitokondriyal kompleks I inhibisyonuna neden olduğu keşfedilmiştir. Bu biyoaktiviteler, lipid peroksidasyonunu ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile ilişkili hücre ölümünü açıklamaktadır (58).

4.1.2. Deoksinivalenol

Trikotesenler en büyük mikotoksin grubu olup, özellikle *Fusarium* türleri tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir. Aynı zamanda *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Trichotecium* ve *Cephalosporium*, trikotesenleri üreten diğer bazı

mantar türlerindendir (33,59). Yaklaşık 170 mikotoksin trikotesenler grubunda yer almaktadır. Bu toksinlerin düşük moleküler ağırlıkları ve temel kimyasal yapıları benzer olmasına rağmen, C12–C13 pozisyonunda yer alan epoksi halkasındaki farklılıklara göre trikotesenler dört gruba [Tip A (T-2 toksin, HT-2 toksin, neosolaniol, diasetoksisirpenol, harzianum A), Tip B (DON, nivalenol), Tip C (krotosin) ve Tip D (saratoksin G ve H, roridin A, verrukarin A)] ayrılmaktadır (4). Tip A ve Tip B trikotesenler yaygın olarak bulunmaları ve yüksek toksik yapıları nedeniyle ön plana çıkmaktadır (34,60).

Tip B trikotesenler grubunda yer alan DON (veya vomitoksin) literatürde en yaygın araştırılan mikotoksinlerden biridir ve yüksek toksisitesi nedeniyle dikkat çekmektedir. Başlıca *F. graminearum* ve *F. culmorum* tarafından üretilmekte ve sıklıkla asetil türevleri olan 3-asetildeoksinivalenol (3-AcDON) ve 15-asetildeoksinivalenol (15-AcDON) ile birlikte oluşmaktadır (Şekil 4.2) (9,61). Şimdiye kadar sıklıkla buğday, yulaf, çavdar, arpa ve mısır gibi tahıl mahsullerinde ve işlenmiş tahıllarda (tahıl bazlı besinler, malt, bira) tespit edilmiştir (5,9,62). Bu nedenle DON tahılların başlıca ve en yaygın doğal kontaminantı olarak kabul edilmektedir (5,63).



Şekil 4.2. Deoksinivalenol'ün moleküler yapısı (7)

Genel olarak, besinlerin ve hayvan yemlerinin DON ile kontaminasyonu, mekânsal (farklı kıtalar ve bölgeler) ve zamansal (hava ve iklim koşulları) olarak oldukça değişkendir. Avrupa'da iklim koşullarındaki değişiklikler, DON

kontaminasyonundaki artışı desteklemektedir (64,65). Sıcaklık (mantar türüne bağlı olarak 0-50 °C), nem oranı ($\geq 70\%$), hasat sırasında yağın yağmurlar ve ani seller gibi çevresel etmenler DON oluşumundaki artışların nedenleri arasında yer almaktadır (66). Ek olarak su aktivitesi, *Fusarium* türlerinden DON oluşumunu kolaylaştıran bir diğer çevresel faktördür. Yüksek su aktivitesinin (0,95 ve 0,99 a_w) daha fazla DON üretimini desteklediği bildirilmiştir. Buğdayda maksimum DON oluşumu 15 ila 25 °C arasında ve 0,97-0,99 a_w değerlerinde tespit edilmiştir (67). Başka bir çalışmada, sıcaklık (15'ten 30 °C'ye) ve su aktivitesinin (0,95'den 0,99'e) artışı, DON üretimini yaklaşık %31 oranında (1,5 $\mu\text{g/g}$ 'dan 47,5 $\mu\text{g/g}$ 'a) artırmıştır (68). Özetle, 20-25 °C aralığındaki sıcaklık ve yüksek su aktivitesi (0,95-0,99 a_w) ile *Fusarium* türlerinden DON'un meydana geldiği sonucuna varılabilir.

Güncel çalışmalar, bozulmaya karşı oldukça dirençli olan DON'un oluşumunu minimize etmek için degradasyon araştırmaları üzerine yoğunlaşmıştır. Günümüzde mikotoksin oluşumunu engellemek için yaygın olarak doğal ve/veya sentetik fungusitler (mantar ve sporlarının yok edilmesi veya kontrol altında tutulması amacıyla kullanılan kimyasal ürünler) kullanılmaktadır. Ancak sentetik fungusitlerin pahalı olması, çevre kirliliğine neden olması ve karsinojenite, teratojenite gibi olumsuz sağlık etkileri nedeniyle kullanımı istenmemektedir. Ayrıca zamanla fungusit kullanımına karşı direnç gelişmekte ve direnç nedeniyle etkili olabilmesi için fungusitlerin daha fazla kullanılması gerekmektedir. Daha fazla sentetik fungusit kullanımı da insan sağlığı için ciddi bir risk oluşturmaktadır (69). Yakın tarihte yapılan çalışmada, ticari bir ilaç olan azol fungusit prokloraz ile nar kabuğu özütü kombinasyonunun, DON seviyelerinde %50 azalma sağladığı ve sadece azol fungusit prokloraz kullanımına kıyasla bu kombinasyonun daha fazla yeterlilik gösterdiği bildirilmiştir (70). Başka bir çalışmada, sentetik fungusitlerin yerine doğal antifungal ajan olarak kullanılan kitosanın (2 mg/g), mısırdaki *F. graminearum* RCFG6001'den oluşan DON'u %93-100 oranında azalttığı belirlenmiştir. Aynı zamanda düşük konsantrasyondaki (0,5 mg/g) kitosanın mısırdaki 0,98 a_w değerinde uygulanması durumunda DON oluşumunu azaltmada daha etkili olduğu saptanmıştır (71). Son çalışmalar yüksek buhar sıcaklığının (185-265 °C) DON'u azaltmak için alternatif bir yöntem olduğunu ortaya koymuştur. Örneğin, 265 °C'de 3 m/s buhar hızıyla 6 dakika boyunca buharda pişirme işleminin DON konsantrasyonlarını buğdayda ve unda

sırasıyla %77,4 ve %60,5 oranında azalttığı bildirilmiştir (72). Ancak güncel çalışmalar besinsel ve dokusal gıda kalitesinde daha düşük bir azalma sağlayacak, yüksek bozunma verimliliğine sahip biyolojik stratejiler geliştirme üzerinde durmaktadır. Bu noktada mikroorganizmaların kullanımı öne çıkmıştır (73). *Lactobacillus plantarum* gibi laktik asit bakterilerinin, *F. graminearum* büyümesine karşı güçlü inhibitör aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Cao ve arkadaşları (74), *L. plantarum* AR524'un ekmek yapımı sırasında *F. graminearum* büyümesini %60,1 oranında inhibe ettiğini, DON'un %50,5'ini ortadan kaldırdığını gözlemlemiştir. Altta yatan mekanizma olarak, mikroorganizmaların mikotoksinlerin detoksifikasyonunu sağlayan özel yapılara sahip olmaları ve/veya mikotoksinleri metabolize ederek daha az toksik bileşiklere biyotransformasyonu yoluyla gerçekleştirebileceği üzerinde durulmaktadır. Tüm bu degradasyon çalışmalarına ek olarak, en yüksek DON konsantrasyonlarının tahılların dış kabuğunda bulunduğu ve bu nedenle tahılların temizlenmesi, elenmesi ve kabuklarının ayıklanmasının belirgin bir düşüşe yol açabileceği bildirilmiştir (75).

İnsanların DON'a maruz kalma riskinin yüksek olması nedeniyle, DON için besinlerde izin verilen maksimum limitler uluslararası otoriler tarafından belirlenmiştir. FDA, insanlar tarafından tüketilebilecek un ve kepek gibi buğday ürünleri için 1 ppm, hayvan tüketimine yönelik tüm tahıllar ve tahıl yan ürünleri için 5-10 ppm DON seviyeleri belirlemiştir (7). Codex Alimentarius Komisyonu'na göre bebekler ve küçük çocuklar için tahıl bazlı besinlerde maksimum DON seviyesi 200 µg/kg iken, yetişkinler için tahıl ürünlerinde (buğday, mısır ve arpa) <2000 µg/kg'dır (76). Benzer şekilde Avrupa Komisyonu, bebek mamalarında DON için maksimum sınırın ≤200 µg/kg ve yetişkinler için tahıl bazlı besinlerde bu limitin 500-1750 µg/kg olması gerektiğini bildirmiştir (77). Avrupa haricinde diğer ülkelerde besinlerde izin verilen DON limitleri değişebilmektedir. Japonya'da buğdayda DON limiti 1100 µg/kg iken, Güney Kore'de tahıl ve tahıl bazlı besinler ile mısır ve mısır bazlı besinler için limit sırasıyla 1100 µg/kg ve 2000 µg/kg'dır. Endonezya'da mısır ve buğday için maksimum DON limiti 1000 µg/kg, makarna ve erişte için 750 µg/kg, pasta, ekmek ve bisküvi gibi hazır ürünler için 500 µg/kg'dır (78). Ülkemizde ise DON'un besinlerde olması gereken MRL düzeyleri işlenmemiş buğday ve mısır için 1750 µg/kg, doğrudan tüketime sunulan tahıllar ve makarna için 750 µg/kg ve bebek-

küçük çocuklar için ek gıdalarda 200 µg/kg'dır (28). Yakın tarihli bir çalışmada, DON konsantrasyonunun 2040 yılına kadar buğdayda 500 µg/kg'dan 6000 µg/kg'a yükseleceği bildirilmiştir. Bu seviye, işlenmemiş buğdayda Avrupa Komisyonu'nun tolere edilebilir 1250 µg/kg sınırını aşmaktadır (79).

4.1.2.1. Deoksinivalenol'ün sağlık üzerindeki etkisi ve toksisite mekanizması

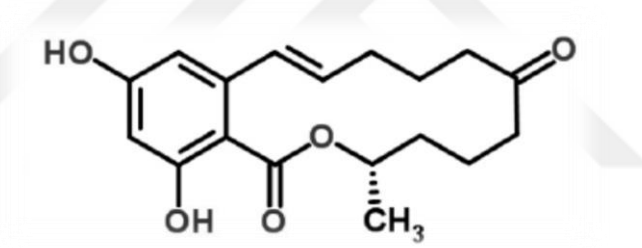
Besinlerdeki DON kontaminasyonu hem insan hem de hayvan sağlığı için geniş bir yelpazede olumsuz etkilere yol açmaktadır. Akut olarak DON'un enteropatojenik toksisiteye neden olduğu iyi bilinmektedir (60). Kontamine besinlerin (özellikle tahıllar) tüketilmesinden kısa bir süre sonra insanlarda gastroenterit belirtileri (kusma, ishal, karın ağrısı, ateş vb.) ve ciddi cilt problemleri kendini göstermektedir (5,19,59). Son veriler, DON'a akut ve subakut maruziyetin astım gelişimi ile doğrudan ilişkili olduğunu ve akciğer dokularında artmış sitokin seviyeleri (interlökin (IL)-6, IL-8 ve IL-1β) ile enflamatuvar yanıtları artırdığını ortaya koymuştur (80). Akut zehirlenmenin yanı sıra DON kontaminasyonuna kronik maruziyet büyüme geriliği, azalan besin alımı, vücut ağırlığı kaybı, kanserojenik ve mutajenik etkiler ile ilişkilendirilmiştir (13,20). Olası kanserojen etkisi bazı çalışmalar ile ortaya kinsa da deney hayvanlarında ve insanlarda karsinojeniteye ilişkin sınırlı kanıt varlığı nedeniyle DON üçüncü grup kanserojen ("insanlarda kanserojenliği açısından sınıflandırılmayanlar") sınıfında yer almaktadır (56). Aynı zamanda DON'un bağışıklık sistemi fonksiyonunda (bağışıklık hücrelerinin aktivasyonu ve proliferasyonu) azalmaya neden olarak immünotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (79). Tüm bu olumsuz sağlık etkilerinden korunmak için, WHO, EFSA ve FAO/WHO Gıda Katkı Maddeleri Ortak Uzman Komitesi (JECFA) dahil olmak üzere uluslararası kuruluşlar tarafından DON ve asetillenmiş türevlerinin toplamı için TDI 1 µg/kg (vücut ağırlığı) olarak belirlenmiştir (9,61,81).

Bu mikotoksin genellikle protein, DNA ve RNA sentezini engelleyerek insan sağlığını olumsuz etkiler. Toksisite mekanizması, 60S ribozomal alt birimine bağlanarak ve peptidiltransferaz enzimi ile etkileşimi sonucu protein sentezinin inhibisyonu yoluyla gerçekleşir. Peptidiltransferaz enzim inhibisyonu DNA ve RNA'da bozulmaya neden olmaktadır (4,82,83). Aynı zamanda büyüme geriliğinin, DON'un sitokin sinyalleşmesini baskılayarak büyüme hormonunun üretimini

azaltması sonucu meydana geldiği ortaya konmuştur (84). Son veriler ile DON'un neden olduğu bağırsak toksisitesi, temel olarak akut maruziyet sonucu aşırı ROS üretimi nedeniyle oluşabilecek mitokondriyal işlev bozukluğu ile ilişkilendirilmiştir (85).

4.1.3. Zearalenon

Esas olarak *F. graminearum* ve *F. culmorum* türleri tarafından üretilmektedir (Şekil 4.3). Aynı küf türleri tarafından sentezlendiği için DON ile birlikte buğday, arpa, yulaf, çavdar ve mısır gibi tahıllarda ve tahıl bazlı besinlerde bulunmaktadır. Tahıllar arasında mısır ve buğdayda ZEA kontaminasyonu insidansı yüksektir (4,10,86).



Şekil 4.3. Zearalenon'un moleküler yapısı (7)

ZEA'nın oluşumunu etkileyen çevresel faktörler diğer mikotoksinlerde olduğu gibi nem, sıcaklık, pH ve a_w 'dir. Besinlerde özellikle optimum sıcaklık 25-30 °C, optimum nem oranı %16 ve optimum a_w değeri 0,980-0,995 arasında değişen çevresel koşulların en yüksek ZEA konsantrasyonlarına neden olduğu belirlenmiştir (87). Bir diğer etmen olan pH'nin toksin birikimini desteklediği ve maksimum ZEA üretiminin pH 7'de gerçekleştiği gözlemlenmiştir (88). Aynı zamanda ZEA üretimi hasat öncesi, sonrası ve hasat koşulları sırasındaki uzun süreli soğuk ve yağışlı hava koşullarında artmaktadır (89). Mısırdan izole edilmiş *F. verticillioides* ve *F. graminearum* türlerinin oluşumu üzerinde a_w (0,92-0,95-0,98 a_w), sıcaklık (30-35 °C) ve CO₂ (400, 800, 1200 ppm) etkilerinin incelendiği yakın tarihli bir çalışmada, *F.*

graminearum'un büyümesi ve ZEA üretimi için optimum koşullar 30 °C, 0,98 a_w ve 400 ppm CO₂ olarak belirlenmiştir (90).

Besinlerde ZEA'nın olumsuz sağlık risklerini önlemek ve/veya azaltmak amacıyla farklı bozunma yöntemleri üzerinde durulmuştur. Bir lakton halkasına sahip olmasına rağmen, ZEA'nın genel olarak normal pişirme işleminden etkilenmediği, 150 °C'ye kadar ısıya dayanıklı olduğu bildirilmiştir (4). Bozunmanın sadece yüksek sıcaklıklarda (≥ 150 °C) ve/veya alkali koşullar altında gerçekleştiği gözlemlenmiştir (91). Güncel bir çalışmada, ısıtma işlemlerin doğal kontaminasyona uğramış tahıllardaki (mısır, buğday ve yulaf) ZEA konsantrasyonlarına etkisi incelenmiştir. Isıtma işlemi olarak farklı sıcaklıklarda (100-220 °C) ve farklı sürelerde (10-30 dakika) pişirme, kavurma ve ekstrüzyonla pişirme (yüksek basınç ve sıcaklık altında pişirme) yöntemleri kullanılmıştır. Uygulanan tüm yöntemlerin kontamine tahıllardaki ZEA miktarını azalttığı, ancak azalma miktarının sıcaklığa ve işlem süresine bağlı olduğu ortaya konmuştur. Tüm tahıllarda kontaminasyonu en çok azaltan yöntem ekstrüzyonla pişirme (%80'e kadar) olarak belirlenmiş ve kavurma işleminin ZEA konsantrasyonlarını %40'a kadar azalttığı bildirilmiştir (92). Isıtma işlemlerden farklı olarak, güvenli, verimli ve çevre dostu olan ozon uygulamasının ZEA üzerindeki etkileri incelenmiş ve doğal kontaminasyona maruz kalmış mısır örneklerinde beş saniyelik ozon uygulamasının (10 mg/L) ZEA'yı etkili şekilde bozabildiği ve bozunma oranlarının uygulanan ozon konsantrasyonu ve uygulama süresi ile artış gösterdiği saptanmıştır (93). Son yıllarda sıklıkla ZEA detoksifikasyonu için biyolojik yaklaşımlar araştırılmakta ve DON'da olduğu gibi ZEA'da da mikroorganizmaların kullanımını ile yüksek bozunma verimliliği sağlanabileceği bildirilmektedir. Probiyotik bakteri olan *Lactobacillus* spp. ve *Saccharomyces cerevisiae* mayasının mikotoksinlere karşı detoksifikasyon özellikleri incelenmiş ve ZEA konsantrasyonlarının *S. cerevisiae* ve *Lactobacillus* suşları tarafından sırasıyla ortalama %52 ve %57 oranında azaldığı tespit edilmiştir (94). *Saccharomyces cerevisiae* kullanarak ZEA'nın biyolojik bozunmasının ve olası bozunma mekanizmalarının araştırıldığı başka bir çalışmada, ZEA ile *S. cerevisiae* kombinasyonunun 48 saatlik inkübasyonundan sonra, ZEA'nın tamamen bozunduğu ve *S. cerevisiae*'nin oksidatif strese ve hücre ölümüne karşı etkili olan, ayrıca

toksinin hücre duvarı adsorpsiyonuna yardımcı hücre içi ve hücre dışı enzim üretimi yoluyla ZEA düzeylerini azalttığı belirlenmiştir (95).

Dünyanın birçok bölgesinden tahıl ürünlerinde ve diğer besinlerde ZEA oluşumu rapor edilmiştir. Sağlık riski göz önünde bulundurularak, ZEA'nın insan tüketimine dair yönetmelikleri ve mevzuatları yalnızca Avrupa Birliği tarafından belirlenmiştir. Besinlerde izin verilen maksimum ZEA limitleri işlenmemiş tahıllarda 100-200 µg/kg, işlenmiş tahıllarda 75 µg/kg, işlenmiş tahıl bazlı besinlerde 20 µg/kg ve tahıllı atıştırmalıklarda 50 µg/kg olarak bildirilmiştir (91). Özellikle yüksek düzeyde kontaminasyon nedeniyle, birkaç Asya ülkesinde ZEA için ülke bazlı düzenleyici limitler belirlenmiştir. Yakın zamanda Çin'de buğday, mısır ve unlarında ZEA için düzenleyici limit 60 µg/kg olarak revize edilmiştir (96). Ülkemizde ise ZEA için MRL düzeyleri işlenmemiş tahıllar, doğrudan insan tüketimine sunulan mısır, mısır çerezleri ve mısır bazlı kahvaltılık tahıllar için 100 µg/kg, işlenmiş tahıllar için 75 µg/kg, bebek ve küçük çocuklar için ek gıdalarda ise 20 µg/kg'dır (28).

4.1.3.1. Zearalenon'un sağlık üzerindeki etkisi ve toksisite mekanizması

Mikotoksin içeren besinlerin tüketilmesi sonucu insan ve hayvan vücudunda patolojik veya olumsuz fizyolojik tepkiler meydana gelmekte ve mikotoksikoz adı verilen mikotoksin tüketiminden kaynaklanan hastalıklar oluşmaktadır. ZEA'nın akut toksisite riski düşük olsa da kronik maruziyet büyük sağlık risklerine neden olmaktadır (97). Kimyasal yapı olarak, ZEA ve metabolitleri endojen östrojene (özellikle 17-β östradiol) benzemektedir. Ancak α-zearalenolün östrojenik potansiyeli, östrojen reseptörlerine daha fazla bağlanma afinitesi nedeniyle ZEA ve β-zearalenol'ünkinden daha yüksektir (4). Bu mikotoksin bir östrojen antagonisti gibi davranarak 17-β östradiol ile östrojen reseptörlerine bağlanmak için yarışır. Bu nedenle doğal östrojenlerin aktivitelerini engelleyebilir, sentezlerini ve metabolizmalarını değiştirebilir veya östrojenik reseptörlerin sentezine müdahale edebilir (98,99). İnsan ve hayvan çalışmalarında, östrojenik aktivitesi ve östrojen reseptörlerine bağlanma afinitesi nedeniyle ZEA üreme bozuklukları ve hiperöstrojenizm ile ilişkilendirilmiştir (18). Ayrıca östrojenik etkilerle ilişkili üreme bozuklukları olan kadınların endometriumlarında ZEA tespit edilmiştir. Düşük

döllenme oranı, implantasyon öncesi embriyonun gelişimi ve taşınması, embriyonun implantasyonu ve plasenta gelişimi dahil olmak üzere çeşitli gebelik olaylarını bozarak gebeliği de olumsuz etkileyebileceği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, ZEA fetal sağlığın programlanmasında hayati bir rol oynayabilmektedir (100,101). ZEA kontaminasyonu kadınların yanı sıra erkeklerin de üreme sağlığını olumsuz etkilemektedir. Erkeklerde testosteron düzeylerini, testis ağırlığını ve spermatogenezi düşürerek feminizasyonu indükleyebildiği ve libidoyu azaltabildiği gözlemlenmiştir (102). Çocuklar üzerinde yapılan çalışmalar incelendiğinde, yüksek miktarda mısır ve/veya mısır içeren yiyecekleri tüketen çocukların (özellikle kız çocukları) erken ergenliğe yatkın olduğu (103) ve idiyopatik ergenliğe sahip olan çocukların kanlarında yüksek düzeyde ZEA olduğu tespit edilmiştir (104). Üreme sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinden farklı olarak, uzun süreli diyetel ZEA maruziyetinin immünotoksisite, hepatotoksik, hematotoksik, immünotoksik ve genotoksik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (4). Yakın tarihte Tunuslu kadınlar üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, ZEA ve metabolitlerinin meme kanseri riskini artırdığı ve özellikle α -zearalanol'ün bu riskte potansiyel rolü olduğu saptanmıştır (105). Bununla birlikte, ZEA'nın insan meme bezlerinde östrojenik reseptörlere sahip hücrelerin büyümesini potansiyel olarak uyarabildiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, diğer epidemiyolojik çalışmalarla birlikte, ZEA'nın meme kanseri etiolojisinde bir rolü olabileceği hipotezini desteklemektedir (106). Ayrıca, adenokarsinom tanısı konmuş kadınların endometriyal dokusunda ve bazı endometriyal hiperplazi vakalarında ZEA tespit edilmiştir (4). Mevcut verilere rağmen, ZEA IARC tarafından üçüncü grup kanserojen olarak sınıflandırılmaktadır. Bu nedenle ZEA'nın kanserojen etkisi net olarak ifade edilememektedir (56).

Tüm bu olumsuz sağlık sonuçlarının patogeneğinde oksidatif stres temel faktör olarak gösterilmiştir. Diyetel ZEA maruziyetinin kanserojen aktivite sergileyen hücrelerin çoğalması, oksidatif stres, DNA hasarı, mitokondriyal dejenerasyon, hücre döngüsü durması ve son olarak apoptoz veya nekroz yoluyla hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (99,107,108). Bu mikotoksin için EFSA tarafından belirlenen TDI değeri 0,25 $\mu\text{g/kg}$ (vücut ağırlığı)'dır (61,91).

4.2. Gıdalarda Mikotoksinlerin Tespiti

Gıda güvenliğini sağlamak için besinlerdeki olası kontaminantların varlığını değerlendirmek oldukça yüksek bir öneme sahiptir. Gıda güvenliğinin kontrolü temel olarak besinlerin analiz edilmesi ile mümkündür (109). Günümüzde besinlerdeki belirli tehlikeleri ve bunların kontrolüne yönelik önlemleri belirleyen “Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları (HACCP)” sistemi gıda güvenliğini ve bunun devamlılığını sağlamak için en etkili sistem olarak kabul edilmektedir. Bu sistemin uygulanmasıyla, olası kontaminantların varlığını tespit etmek için hızlı, hassas ve doğru analiz yöntemleri üzerine ilgi yoğunlaşmıştır (97). Mikotoksin varlığının ve düzeylerinin belirlenmesi genellikle gıda numunesinin alımı, mikotoksin ekstraksiyonu, temizleme süreci ve son olarak saptama ve miktar belirlenmesi gibi ana basamakları içeren yöntemlerle gerçekleştirilmektedir (110).

4.2.1. Analiz öncesi numune hazırlama yöntemleri

Mikotoksin kontaminasyonu başta insan ve hayvan sağlığı olmak üzere dünya çapında dikkat çekmiş, aynı zamanda ulusal ve uluslararası ticarete bağlı yüksek ekonomik kayıplar sebebiyle büyük bir finansal sorun olarak kabul edilmiştir (7). Mikotoksin tespiti için seçilen analiz yöntemlerinin önemi ne kadar fazla ise analiz öncesinde doğru numune hazırlama teknikleri (ekstraksiyon ve temizleme adımları) de önemli bir basamak ve analitik sürecin temel taşıdır. Çünkü uygun olmayan numune hazırlama yöntemleri hatalı sonuçlara yol açarak sağlık ve ekonomik risklere neden olabilmektedir (111,112). Numune hazırlamanın ilk adımı mikotoksinlerin ekstraksiyonu olup ardından belirli bir tespit yönteminin duyarlılığını ve özgüllüğünü artırmak için temizleme prosedürü gerçekleştirilmektedir. Ekstraksiyon ve temizleme yönteminin seçimi, mikotoksinlerin kimyasal ve fiziksel özelliklerine, analiz edilecek besinlerin matriks tipine ve saptama (dedeksiyon) yöntemine bağlıdır (113). Sık kullanılan numune hazırlama yöntemlerinden bazıları şunlardır: ekstraksiyon için katı-sıvı ekstraksiyonu, sıvı-sıvı ekstraksiyonu, basınçlı sıvı ekstraksiyonu, süper kritik sıvı ekstraksiyonu, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve ultrasonik ekstraksiyon; temizleme prosedürü için katı faz ekstraksiyonu ve immünoafinite kolonları (29,114).

4.2.1.1. Katı-sıvı ekstraksiyonu

Katı-sıvı ekstraksiyonu (SLE) iyi bilinen bir ekstraksiyon tekniğidir. Eski bir numune hazırlama tekniği olmasına rağmen çok sayıda numune hazırlamak için halen kullanılmaktadır. Mikotoksinlerin değişken çözünürlüğe sahip olmaları ve fizikokimyasal özellikleri nedeniyle, ekstraksiyon amacıyla farklı organik çözücüler (metanol, asetonitril, aseton, etil asetat, kloroform, diklorometan vb.) ve/veya bunların su ile hazırlanan karışımları tercih edilmektedir. Katı-sıvı ekstraksiyonunda en yaygın olarak kullanılan çözücü karışım sistemi çeşitli oranlarda asetonitril veya metanolün su ile karışımıdır. Mikotoksinler çoğunlukla polar/hafif polar çözücülerde çözünürken, polar olmayan (apolar) çözücülerde çözünmezler. Örneğin, polar özellikli olan fumonisinlerin ekstraksiyonları için su ve polar çözücü (metanol ve asetonitril) gereklidir. Ancak aflatoksinler, patulin gibi bazı hidrofobik mikotoksinler ekstraksiyon sırasında yalnızca organik çözücüye ihtiyaç duyar (115).

4.2.1.2. Katı faz ekstraksiyonu

Katı faz ekstraksiyonu (SPE), yiyecek ve içecek numunelerinden mikotoksinlerin temizlenmesi, ekstraksiyonu ve ön-konsantre edilmesi için en yaygın kullanılan prosedürdür (117). Tahıllar, tahıl bazlı besinler, yağlı tohumlar gibi birçok besinde mikotoksin (aflatoksinler, fumonisin, okratoksin A, trikotesenler vb.) analizinden önceki süreç için uygundur (116). Bu yöntemde temel olarak ekstrakte edilmiş numuneler, istenmeyen bileşenlerinden temizlenmesi amacıyla numunenin matriks yapısının değiştirilmesi için hazırlanmış tek kullanımlık kolon veya kartuşlardan geçirilmektedir. Ekstraksiyon aşaması basitçe şu şekilde gerçekleşir: Mikotoksin içeren sıvı numune, sabit faz olarak işlev gören bir kolondan veya kartuştan geçirilir. Bu kolonda/kartuşta silika jel, alumina, modifiye silika, karbon gibi katı adsorbanlar mevcuttur (29). Bu yöntemde iki farklı mekanizma yoluyla ekstraksiyon-temizleme işlemi gerçekleşmektedir. Kısaca, ilk mekanizmada analiz edilecek mikotoksinler adsorban maddeye bağlanır ve kolonda tutulur. Tutulan toksin uygun bir organik çözücü ile kolondan ayrıştırılır. Diğer mekanizmada ise tam tersi bir durum söz konusudur. Mikotoksinler katı adsorbanlar tarafından tutulmazken, geri kalan bileşenler kolonda kalır. Böylece kolondaki tutucu maddeler mikotoksinler için filtre görevi görür (118,119).

Bu ekstraksiyon yönteminin avantajları arasında hızlı, verimli, tekrarlanabilir ve güvenli olması, yüksek saflıkta numunelerin oluşumu, geniş bir seçicilik aralığı, emülsiyon oluşma riskinin olmaması, çözücü ve numunelerin az miktarlarda kullanılması ve daha az çözücü kullanımından dolayı zehirli maddelerle daha az temas riski yer almaktadır. Bununla birlikte, bu teknikte tüm mikotoksinler için evrensel bir kolonun/kartuşun bulunmaması, fiziksel ve kimyasal faktörlerin (pH, çözücü türü, numunenin iyonik gücü vb.) yöntem performansına etkisi gibi bazı sınırlamaları da mevcuttur (7,118).

4.2.2. Mikotoksin tespit yöntemleri

Küresel çapta gıda güvenliği açısından mikotoksin kontaminasyonunun daha iyi anlaşılması için besinlerde ve hayvan yemlerinde mikotoksinlerin rutin olarak taranması ve saptanmasında doğru, hızlı ve oldukça hassas yöntemler gereklidir (120).

Gıda kontaminantlarının çoğu, analiz hassasiyetini ve kesinliğini artırmak amacıyla çeşitli dedektörlerle birleştirilmiş ayırıcı teknikler kullanılarak analiz edilmektedir. Günümüzde mikotoksin tespiti ve tayini için kullanılan başlıca analiz yöntemleri arasında HPLC, LC-MS/MS, enzim bağlantılı immünosorbent tahlili (ELISA), gaz kromatogramı (GC) ve ince tabaka kromatografisi (TLC) yer almaktadır (5,7,26). Bu yöntemler, uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikotoksin alanında yayınlanan çalışmaların en az yarısı bir tür kromatografik yöntem(ler) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.2.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

Konvansiyonel bir analitik yöntem olan HPLC, mikotoksinlerin analizinde en çok kullanılan kromatografik tekniklerden biri olup, çoğu mikotoksinin (aflatoksinler, fumonisinler, DON, T-2 toksin, HT-2 toksin, okratoksin A, ZEA, patulin vb.) kantitatif tespiti için tercih edilen bir metodolojidir. Bu analitik yöntem Avrupa Standardizasyon Komitesi (CEN) tarafından onaylanmış ve besinlerdeki mikotoksinlerin analizi için en güvenilir yöntemlerden biri olarak kabul edilmiştir. Birçok standardizasyon ve resmi kuruluş tarafından büyük ölçüde kullanılmaktadır (121).

Bu analiz sistemi temel olarak degazer (gaz giderici), pompa, numune alma ünitesi, analitik kolon ve dedektör ünitelerinden oluşmaktadır.

Degazer ünitesi, mikotoksinlerin ayrılması için kullanılan mobil faz çözeltisindeki var olan hava kabarcıklarının giderilmesini sağlar. Mobil faz çözeltisi temel olarak sulu tampon çözeltilerden veya su ile organik bir çözücünün (metanol, asetonitril vb.) karışımlarından oluşmaktadır. Aynı zamanda iyon bolluğunu arttırmak ve kromatografik pik şeklini iyileştirmek için mobil faz çözeltisine %0,01-0,3 aralığındaki konsantrasyonlarda formik asit/asetik asit veya 0,5-10,0 mM konsantrasyonlarında amonyum format/amonyum asetat eklenebilmektedir (3,122).

Pompa ünitesi, mobil faz çözeltisinin araştırmacılar tarafından ayarlanan basınç ve akış hızına göre HPLC sisteminde hareket etmesini sağlayan bölümdür. Mobil faz çözeltisi pompa aracılığı ile sistem üzerinden genellikle belirli bir akış hızında (0,4-1 mL/dk) kontrollü ve doğru bir şekilde iletilir. Kullanılan pompaların çoğu (>%90) pistonlu pompalardır (123).

Degazerden alınan mobil faz çözeltisi pompa aracılığı ile otomatik numune alma ünitesine ve daha sonra analitik kolon(lar)a gönderilmektedir. Sabit faz olarak adlandırılan bu kolon(lar) analiz edilen mikotoksinin kimyasal ve/veya fiziksel özelliklerine göre ayrışmasını sağlar. Kolonlar genellikle paslanmaz çelikten imal edilen ve içi silika bazlı veya polimer dolgulu olan yapılardır. Günümüzde uzun ömürleri ve hızlı analiz yapma özellikleri nedeniyle polimer dolgulu kolonlar tercih edilmektedir. En yaygın olarak kullanılan analitik HPLC kolonları 10, 15 veya 25 cm uzunluğunda olup, iç çapı 4, 5 veya 6 mm'dir. Analitik kolondan önce çeşitli yardımcı kolonlar (özellikle koruyucu kolonları) da kullanılabilir (123,124).

Mikotoksinlerin HPLC ile analizinde sıklıkla dedektör olarak ultraviyole (UV), floresans (FLD), diyot dizisi dedektörü (DAD), MS veya tandem kütle spektrometrik (MS/MS) dedektörler tercih edilmektedir (29). Örneğin, aflatoksinler ve okratoksin A doğal floresan sergiler, bu nedenle FLD detektörü tarafından tespit edilir. Patulin ve DON tespiti için ise UV dedektörü kullanılmaktadır (121). Hassasiyeti artırmak için HPLC, farklı algılama sistemleri (MS/MS gibi) ile birlikte kullanılabilir (7,125).

Bu analiz yöntemi temel olarak uygun bir dedeksiyon sistemine bağlı kromatografik ayırma tekniklerine dayanmaktadır. Sıvı kromatografide farklılık, kullanılan sabit faz (kolon) ile mobil faz arasındaki polarite farkı nedeniyle ve moleküler etkileşim türlerine göre gerçekleşmektedir. Sıvı kromatografinin en sık kullanılan teknikleri normal faz kromatografisi ve ters faz kromatografisidir. Normal faz kromatografide, kolon silika gibi polar bir adsorbandır. Mobil faz ise apolar bir çözücüdür. Normal faz kromatografisi A, D, E ve K vitaminleri gibi nispeten polar vitaminlerin, besinlerdeki doğal karotenoid pigmentlerin ve aktif polifenollerin analizi için kullanılmaktadır (126,127). Ters faz kromatografi ise mikotoksin analizi için yaygın olarak kullanılan HPLC ayırım modudur. Bu teknikte normal faz kromatografisinin tam tersi olarak sabit faz (kolon) apolar iken mobil faz çözeltisi polar yapıdadır. Genel olarak, bu ayırım tekniğinde C₁₈ HPLC kolonları kullanılır. C₁₈ kolonları diğer benzer kolonlardan daha iyi ayırma verimliliği ve hassasiyeti gösterir. Mobil faz olarak sıklıkla metanol-su, asetronitril-su gibi polar çözücüler tercih edilir. Analizlerin çoğu (>%70) ters faz modunda gerçekleştirilir. (121,128,129). Ters fazlı HPLC, mikotoksin analizinin yanı sıra hem suda hem de yağda çözünen vitaminlerin, fenolik aromatik bileşiklerin (vanilin gibi) ve pigmentlerin (klorofiller, karotenoidler, antosiyaninler vb.) analizinde kullanılmaktadır (123).

Geniş bir konsantrasyon aralığındaki yüksek duyarlılığı ve seçiciliği, gelişmiş doğruluk/kesinlik, hızlı analiz süresi (çoğu mikotoksin için yirmi dakikadan daha kısa sürede) ve küçük konsantrasyonlarda mikotoksin tespit edilebilme yeteneği bu analitik yöntemi mikotoksin analizinde daha avantajlı hale getirmektedir. Bu avantajlara rağmen mikotoksinlerin doğru bir şekilde saptanması için analiz öncesi kapsamlı temizleme ve kolon öncesi/sonrası türevlendirme gereksinimi HPLC'nin dezavantajları arasında yer almaktadır (7,114)

4.2.2.2. Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi

Gıda güvenliğine ilişkin var olan endişe nedeniyle, besinlerdeki mikotoksinlerin belirlenmesi için daha hassas analitik yöntemlerin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir (130). Düşük mikotoksin düzeylerini tespit etmede etkili bir yöntem olmasına rağmen, özellikle aynı anda çoklu mikotoksinler analiz edilmek

istendiğinde besinin karmaşık bir ekstraksiyon ve uzun temizleme süreç gerekliliği HPLC yöntemini zaman alıcı hale getirmektedir (97). Hızlı bir analiz gerektiğinde ise ELISA gibi immünolojik analize dayalı yöntemler hız ve uygun maliyet açısından iyi bir alternatiftir. Ancak ELISA gibi yöntemlerin tespit duyarlılığı kromatografik analiz yöntemleri kadar yeterli görülmemektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı LC-MS/MS günümüzde önemli bir konum kazanmış ve şu anda sıklıkla tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir (112). HPLC'nin ayırma gücü ile kütle spektrometre (MS) dedektörünün duyarlılığı ve özgüllüğünü birleştiren bu analiz yöntemi, analiz süresini azaltarak, numune verimini artırarak ve bazen temizleme adımı olmadan da mikotoksinlerin daha hassas ve seçici tespitini mümkün kılmaktadır. En önemlisi aynı anda çoklu mikotoksin analizinin doğru bir şekilde tanımlanması ve miktarının belirlenmesi bu yöntemin tercih edilmesinin en büyük sebebidir (97,122,131). Ek olarak, LC-MS/MS kullanımı, “maskeli” veya “değiştirilmiş” mikotoksinler olarak adlandırılan rutin tespitten kaçan konjuge mikotoksinlerin (glukoz gibi polar bir bileşiğe bağlı toksin) saptanmasına olanak sağlar (121). Çok sınıflı mikotoksinlerin eş zamanlı analizine imkan sağlamasının yanı sıra hedef moleküller hakkında daha fazla bilgi verir ve metabolomik, proteomik dahil olmak üzere gıda analizinde çok sayıda uygulamaya yönelik önemli bir kapı açar (131). Tüm bu güçlü yönlerine rağmen pahalı enstrümantasyon ve yüksek nitelikli araştırmacı gerekliliği bu yöntemin sınırlılıkları arasındadır (111).

4.3. Arı Ürünleri

Apidae familyasına ait büyük bir böcek grubu olan arılar (özellikle bal arıları) insan sağlığı için potansiyel olarak faydalı olan birçok arı ürününü arı kovanlarında üretir ve depolar. Bu ürünler genel olarak bitkilerin nektarlarından, polen tanelerinden ve diğer bitki bölümlerinden tek başına veya arı tükürük bezi salgıları ve/veya bitki salgılarıyla karıştırılarak elde edilmektedir (132).

Arı ürünleri başlığının altında; bal, polen, propolis, arı sütü, balmumu, arı zehiri ve arı ekmeği yer alır. Bu arı ürünleri antik çağlardan beri sağlığı iyileştirici ve destekleyici etkileriyle bilinmektedir. Ancak uzun yıllardır bu arı ürünleri arasında

besin değeri yüksek, biyoaktif bileşikler açısından zengin, doğal ve fonksiyonel ürünler olarak tanımlanan bal, polen, propolis ve arı sütü daha fazla ön plana çıkmış ve çalışmalarda daha çok ele alınmıştır (133).

4.3.1. Bal

4.3.1.1. Tanımı, besinsel değeri ve sağlık üzerindeki etkisi

Bal, arıların çiçeklerin nektarından toplayıp dönüştürdükleri, kendilerine özgü maddelerle birleştirdikleri, peteklerde depoladıkları ve olgunlaştırdıkları doğal bir besindir. Arı türü, çevre koşulları ve botanik köken farklılıkları nedeniyle en karmaşık kimyasal bileşime sahip doğal besinlerden biri olarak kabul edilen bu arı ürünü, tek başına besin olarak tüketilmesinin yanı sıra günümüzde gıda tatlandırıcısı, besleyici ajan ve tıbbi destek olarak da kullanılmaktadır (134,135).

Avrupa Komisyonu tarafından sunulan Ekim-2022 raporuna göre, küresel bal üretiminin 2021 yılında yaklaşık 1,2 milyon ton olduğu tahmin edilmektedir. Aynı raporda, 2022 yılının ilk altı ayında bal ithal edilen başlıca ülkelerin Çin (41,491 ton) ve Ukrayna (27,646 ton) olduğu, Türkiye'nin 4,881 ton ile beşinci sırada yer aldığı bildirilmiştir. Aynı zamanda AB'de iç tüketimi karşılamak için ithalat yapılması gerektiği ve bal ticaret dengesinin büyük ölçüde negatif olduğu (İthalat>İhracat) üzerinde durulmuştur (136). Ülkemizde ise Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre 2021 yılında 96,344 ton bal üretildiği, iller bazında incelendiğinde en çok üretimin sırasıyla Adana, Ordu, Sivas, Muğla ve Aydın'da olduğu bildirilmiştir (137).

Balın besinsel değeri incelendiğinde, en az 181 bileşen içerdiği ve yaklaşık bileşimini %80-85 karbonhidratlar, %15-17 su, %0,3-0,4 protein, %0,2 kül ve az miktarda mineraller, vitaminler, organik asitler, fenolik bileşikler ve enzimlerin oluşturduğu saptanmıştır (138-140). Balın karbonhidrat içeriği mono-, di- ve trisakkaritlerden oluşur. Esas olarak glukoz (%31) ile fruktoz (%38) içeren bir karbonhidrat çözeltisi olarak tanımlanabilir (141,142). Bu iki monosakkarit dışında bileşiminde sukroz, ramnoz, trehaloz, izomaltoz, maltoz, maltotetraoz, maltotrioz, rafinoz bulunmaktadır (143). Karbonhidratlardan sonra bal en çok su ve protein içermektedir. Protein içeriği serbest amino asitler ve enzimlerden (glukoz oksidaz,

amilaz, katalaz, peroksidaz, invertaz, diastaz, α -glukosidaz, asit fosfataz) oluşur. Balda saptanan amino asitler arasında prolin (%50-80) baskın olup, yüksek prolin varlığı balın olgunluğunu gösterir (144). Vitaminler ve mineraller (B₂, B₃, B₅ ve B₆ vitaminleri, folik asit, C vitamini, E vitamini, kalsiyum, demir, çinko, potasyum, fosfor, magnezyum, selenyum, krom, manganez) balda bulunan bileşiklerin küçük bir grubunu oluşturur. Ancak biyoyararlanımlarının yüksek olduğu (yaklaşık %80-90) bildirilmiştir (145). Organik asitler (asetik, bütirik, sitrik, süksinik, laktik, malik ve glukonik asit), fenolik asitler [hidroksisinamik asitler (klorojenik, vanilik, kafeik, p-kumarik, ferulik asitler) ve hidroksibenzoik asitler (gallik asit, ellajik asit, benzoik asit, 4-hidroksibenzoik asit)], flavonoller (kuersetin, kaempferol, mirisetin) flavonlar (luteolin, apigenin, trisetin ve krisin) ve flavanonlar (naringenin, hesperidin, pinosembrin ve pinostrobin) balın diğer önemli bileşenleri arasında yer almaktadır (146,147). Sağlıklı bir diyetle birlikte 250 mL suda çözünmüş 1,2 g/kg vücut ağırlığı dozunda bal tüketiminin sağlıklı insanlarda β -karoten, C vitamini, glutatyon redüktaz ve ürik asit gibi antioksidanların aktivitesinde artış sağladığı gösterilmiştir (148).

Biyoaktif bileşikler, insan sağlığı üzerindeki potansiyel yararlı etkileri nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Bu nedenle bal, içerdiği aktif bileşikler nedeniyle eski çağlardan beri hem dahili hem de harici kullanımlar için geleneksel tıpta doğal bir ilaç olarak kullanılmaktadır (149,150). Özellikle balın sağlık üzerindeki yararlı etkileri, balda en bol bulunan fitokimyasallar olan flavonoidler ve fenolik asitler ile ilişkilendirilmiştir (151). Çalışmalarda balın toplam fenolik bileşik içeriği ile antioksidan ve antienflamatuar aktivitesi arasında pozitif bir ilişki bildirilmekte, bu da balın faydalı özelliklerini belirlemede fenolik bileşiklerin rolünü vurgulamaktadır (152,153). Antienflamatuar aktivitesinin mekanizması, baldaki fenolik asitlerin ve flavonoidlerin tümör nekroz faktörü- α aktivitesi ve nitrik oksit inhibisyonu üzerindeki etkileri ile bağdaştırılmıştır (154). Aynı zamanda flavonoid içeriğinin antienflamatuar aktivitesi nedeniyle, enflamasyon nedenli nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer ve Parkinson hastalığı), kardiyovasküler hastalıklar, karaciğer hastalıkları, diyabet ve obezite gibi bulaşıcı olmayan hastalıkların tedavisi için bal potansiyel bir önleyici ve terapötik ajan olarak önerilmiştir (140,151,155). Bal aynı zamanda antimikrobiyal özellikleri ile de öne çıkmaktadır. Antienflamatuar etki mekanizmasında olduğu gibi, balın içerdiği flavonoidler patojenik

mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteden de sorumlu olarak gösterilmiştir (156). Balın yüksek ozmolaritesi, düşük su aktivitesi, düşük pH, glukoz oksidaz ve glikoproteinlerin varlığı da bu aktiviteye katkıda bulunan diğer özellikler olarak bildirilmiştir (140). Velásquez ve arkadaşlarının (157) yaptığı çalışmada, bal örneklerinden elde edilen fenolik ekstraktların *Streptococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* bakterilerini inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Balın ilaca dirençli bakterilere karşı bile etkili olduğu belirlenmiştir. Mekanizması, baldaki yüksek prebiyotik içeriği ve *Bifidobacterium*, *Fructobacillus* ve *Lactobacillaceae* (örn., antibiyotiklere oldukça dirençli patojenleri önlemede en güçlü tür olan *L. kunkei*) gibi başlıca yararlı laktik asit bakteri türleri ile yakından ilişkisine bağlanmıştır (158,159).

Yüksek karbonhidrat içeriği olmasına rağmen balın antidiyabetik aktivitesi bildirilmiş, bu aktivite prebiyotik etkilere sahip fenolik bileşikler ve oligosakkaritlerin varlığı ile açıklanmıştır (160). Ek olarak, antimetastatik, antiproliferatif ve antikanser etkileri ile kanserin önlenmesinde de anahtar rol oynadığı gösterilmiştir. Meme, karaciğer ve kolorektal kanserler gibi belirli kanser hücre hatlarındaki rolü de kapsamlı olarak araştırılmıştır (161,162). Meme kanseri oluşturulan bir sıçan modelinde hematolojik, östrojenik ve apoptotik aktivitelerin modülasyonu ile balın meme karsinogenezini hafiflettiği gösterilmiştir. Böylece kanser tedavisinde doğal bir ajan olabileceği bildirilmiş ve kemoterapötik ajanlara ek olarak bal tüketimi önerilmiştir (163).

4.3.2. Polen

4.3.2.1. Tanımı, besinsel değeri ve sağlık üzerindeki etkisi

Bitkinin nektarı ile arının tükürük salgılarının karışımından oluşan polen, arılar için en önemli besin ve protein kaynağıdır. Polen arılar tarafından arı sütü üretimi için veya doğrudan larvaların besini olarak kullanılırken, besleyici açıdan önemli bileşen çeşitliliği nedeniyle eski çağlardan beri insanlar tarafından değerli bir besin kaynağı olarak tüketilmektedir. Bu nedenle son yıllarda toz, granül, tablet ve sıvı formülasyonlarında besin desteği olarak tüketimi artmıştır (164,165).

Polen besin değerleri açısından oldukça zengin olup, insanlar için gerekli olan esansiyel amino asitler, lipitler, vitaminler, antioksidanlar ve diğer biyoaktif bileşikler dahil olmak üzere en az 200 aktif madde içerdiği bildirilmiştir (166). Kuru polen ağırlılığının yaklaşık %40-85'ini oluşturan karbonhidratlar arasında bol miktarda fruktoz, ardından glukoz ve sukroz yer almaktadır. Oligosakkaritler ve polisakkaritler de çeşitli biyolojik fonksiyonları düzenlemeye yardımcı olan çok önemli polen bileşenlerdir. En bol bulunan ikinci bileşen proteinlerdir. Proteinler, başta esansiyel amino asitler olmak üzere polen içeriğinin yaklaşık %14-30'unu oluşturmaktadır. Prolin, glutamik asit ve aspartik asit bu arı ürünün yapısındaki başlıca amino asitlerdir. Polende toplam 20 yağ asidi (kuru ağırlılığının yaklaşık %1-10'u) bulunmakta ve başlıca yağ asitleri arasında ise -linolenik asit, araşidonik asit ve linoleik asit (%0,4) yer almaktadır. Mikro besin ögeleri olarak vitaminler (A, E, C ve B grubu vitaminleri) ve mineralleri (potasyum, sodyum, kalsiyum, magnezyum, fosfor, çinko, demir, bakır ve manganez) de içerir (167-169). Ek olarak, nükleik asitler, pigmentler (klorofiller ve lutein, -karoten, -kriptoksantin gibi karetonoidler), flavonoidler (kuersetin, kaempferol, kateşin, epikateşin, luteolin) ve fenolik asitler (gallik asit, ferulik asit, kumarik asit) polenin değerli bileşenleridir. Ancak genellikle birden fazla bitki kaynağından oluştuğu için polenin bileşimi ve içeriği, arıların ziyaret ettiği botanik kaynaklar, toprak tipi, coğrafi köken, hasat mevsimi gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (169,170).

Polendeki farklı besin bileşenleri besleyici, sağlığı geliştirici ve tedavi edici özelliklere sahiptir. Son yirmi yılda birçok çalışma bu arı ürünün biyolojik aktiviteilerini analiz etmiş ve polenin vücut fonksiyonlarını düzenleyebilen antioksidan, antibakteriyel, antienflamatuar ve antikanserojenik aktiviteler gibi potansiyel terapötik özelliklere sahip olduğunu ortaya koymuştur (140). *İn vitro* ve *in vivo* alışmalar, içerdiği flavonoidler sayesinde polenin serbest radikalleri temizleyerek oksidasyonu bloke eden, lipid peroksidasyonunu inhibe eden ve serbest radikalleri temizleyen aktiviteler gösterdiğini ortaya koymuştur. Böylece genotoksik ve kanserojen ajanlara karşı etkili olduğu kanıtlanmıştır (171). Sıçanlarda gerçekleştirilen bir toksisite çalışmasında, polen takviyesinin kan ve beyindeki süperoksit dismutaz ve glutatyon seviyelerinde kayda değer bir artış sağlayarak ve malondialdehit düzeylerini önemli ölçüde azaltarak antioksidan sistemi güçlendirdiği

belirlenmiştir (172). Antioksidan aktiviteye ek olarak polenin antimikrobiyal ve antienflamatuar aktivitelerin kombinasyonu ile bağışıklık sistemini desteklediği bildirilmiştir (173) Çalışmalarda *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi çeşitli bakteri türleri üzerinde güçlü antimikrobiyal aktiviteler sergilediği gösterilmiştir (174). Özellikle içerdiği flavonoidler, fenolik bileşikler ve yağ asitleri nedeniyle antienflamatuar ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu da bilinmektedir.

Güncel çalışmalar düzenli şekilde polen tüketiminin kanser, hepatolojik, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıkların riskini azaltabileceğini ve mevcut hastalıklarda tedaviyi destekleyici etkilerinin olduğunu göstermektedir (140). Polenden izole edilen polisakkaritlerin kolon kanseri hücreleri üzerinde önemli antiproliferatif etkiler sergilediği (175) ve polenin kloroform ekstraktları sayesinde prostat hiperplazisini azaltarak prostat kanserine karşı antikanserojenik özellikler sergilediğini bildirmiştir (173,176). Kardiyoprotektif etkileri incelendiğinde, polenin vücuttaki kolesterol, trigliserit ve toplam lipit içeriğini azaltarak hipolipidemik aktiviteye sahip olduğu ve bu sayede kardiyovasküler hastalıkların tedavisi için faydalı olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda kardiyak sağlık üzerindeki bu aktivitelerin, bir prostaglandin-3 öncüsü ve trombosit agregasyonuna karşı bir inhibitör görevi gören α -linolenik asit gibi ω -3 yağ asitleri varlığına ve seviyelerine göre değiştiği gösterilmiştir (167). Birçok çalışmada, düzenli polen tüketiminin, trombosit agregasyonunu ve aterosklerotik plak oluşumunu önemli ölçüde engellediği belirlenmiştir (177,178). Tüm bu hastalıklara ek olarak, polen tüketiminin karaciğer fonksiyonlarını geliştirdiği, kandaki karaciğer enzimleri (alanin transaminaz, aspartat transaminaz, asit fosfataz) ve bilirubin düzeylerini azaltarak karaciğeri detoksifiye ettiği ve bu hepatoprotektif aktivitenin polenin bileşiminde bulunan polifenollerin (fenolik asitler ve flavonoidler) varlığından kaynaklanabileceği ortaya konmuştur (179-181).

4.3.3. Propolis

4.3.3.1. Tanımı, besinsel değeri ve sağlık üzerindeki etkisi

Arı tutkalı olarak da adlandırılan propolis, bitkilerin tomurcuklarından toplanan reçine ile balmumu, uçucu yağlar ve polen karışımından oluşan bir arı ürünüdür. Arılar tarafından toplanan bitki reçinelerinin güçlü antimikrobiyal etkileri sayesinde propolis, kovanları izole etmek, kovana giren ölü böcekleri mumyalamak ve dezenfekte etmek gibi özellikleri ile hem kovan yapısı için hem de savunma amaçlı kullanılmaktadır (182,183).

Propolis diğer bir arı ürünü olan polen gibi kimyasal bileşim açısından çok çeşitlidir. Temel olarak reçine (~%50), balmumu (~%30), uçucu yağlar (~%10) ve polen (~%5) karışımından oluşan propolisin günümüzde en az 300 biyoaktif bileşik içerdiği bildirilmiştir. Bu bileşikler; fenolik asitler (kafeik asit, kafeik asit fenetil ester, ferulik asit, klorojenik asit, p-kumarik, sinnamik asit), flavonoidler (krisin, luteolin, apigenin, galanjin, kaempferol, kuersetin, pinostrobin, pinosebrin), mineraller (kalsiyum, magnezyum, manganez, çinko, bakır, demir, kobalt ve selenyum), vitaminler (B₁, B₂, B₆, C ve E vitaminleri), terpenler (bisabolol), enzimler (süksinat dehidrogenaz, glukoz-6-fosfataz, adenosin trifosfat), alkoller (setil, mirisil, mannitol ve inositol), β -steroidler, stilbenler ve tanenlerdir (183-185). Bu aktif bileşiklerin içeriği ve bileşimi polende olduğu gibi büyük ölçüde kovanların çevresindeki bitki örtüsüne, coğrafi konuma ve iklim koşullarına göre değişmektedir (186).

Propolis sağlık yararları ile iyi bilinen bir başka arı ürünüdür ve uzun süredir geleneksel tıp yaklaşımlarında doğal bir destek olarak kullanılmaktadır. Sağlık üzerindeki etkisinin antioksidan, antiviral, antibakteriyel, antikanser, nöroprotektif ve immünomodülatör aktiviteleri ile sağlandığı bildirilmiştir (187-189).

Mevcut birçok çalışma, propolisin antioksidan aktivitesi üzerinde yoğunlaşmıştır (186,188,189). Ayrıca Gram (+) (*S. mutans*, *L. plantarum* vb.) ve Gram (-) bakterilere (*E. coli* vb.) karşı güçlü bir antibakteriyel etki ve influenza A virüsüne karşı antiviral bir aktivite sergilediği görülmüştür (190,191). Bu arı ürününün sağlık üzerindeki tüm bu yararlı etkileri yapısındaki kafeik asit fenetil ester

(CAPE), pinosembrin, galanjin, kuersetin gibi fenolik bileşiklerin varlığı ile ilişkilendirilmiştir (140). Uzun yıllardır propolis bu yararlı etkileri sayesinde geleneksel olarak gastrointestinal, jinekolojik, dermatolojik ve ağız hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır (185,192). Güncel çalışmalar, propolisin aynı zamanda içerdiği fenolik bileşikler (özellikle CAPE) sayesinde nöroprotektif etki sağlayarak beyindeki oksidatif stresi önlediğini göstermiştir (193-194). Ayrıca bileşimindeki CAPE varlığı ile sitokin üretimini ve T hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederek immünomodülatör bir aktivite sergilediği, bağışıklık yanıtlarını modüle ettiği ortaya konmuştur (140). Dört hafta boyunca farklı dozlarda propolis takviyesi alan yaşlı farelerde propolisin doğal ve kazanılmış bağışıklık üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır (195). Ayrıca, deney hayvanları üzerinde propolis polifenollerinin (özellikle pinosembrin) enflamatuvar ve anjiyojenik faktörleri modüle ederek ateroskleroz ilerlemesini önlediği, diyabetik farelerde ise nöronları enflamasyon hasarından koruyarak bilişsel fonksiyonlardaki eksiklikleri azalttığı gösterilmiştir (196,197). Birkaç çalışmada propolisin antikanser aktivitesi değerlendirildiğinde ise lösemi, lenfoma, gastrointestinal, akciğer ve meme kanseri gibi birçok kanser hücre dizisinde antiproliferatif ve proapoptotik aktivitelere sahip olduğu ve bu aktivitelerin propolisin bileşimindeki flavonoidler ve fenolik asitlerin (özellikle CAPE, pinosembrin, galanjin) miktarına bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir (140,198-201). Bu kanser türlerine ek olarak, propolisin CAPE içeriği sayesinde güçlü bir antienflamatuvar etki sağlayarak ultraviyole B ışınları kaynaklı cilt kanserleri için potansiyel bir kemopreventif ajan olabileceği bildirilmiştir (202).

4.3.4. Arı sütü

4.3.4.1. Tanımı, besinsel değeri ve sağlık üzerindeki etkisi

Arı sütü, genç işçi arıların temel olarak hipofaringeal ve mandibular tükürük bezleri tarafından salgılanan, sarımsı veya süt beyazı renkli, oldukça viskoz yapılı bir arı ürünüdür. Kraliçe arıların yaşamları boyunca, işçi arı larvalarının ise yaşamlarının ilk üç günü için temel yiyeceğidir (203).

Arı sütü esas olarak su (%60-70), proteinler (%12-15), karbonhidratlar (%10-16) ve lipitlerden (%3-6) oluşmaktadır (204). Başlıca karbonhidratlar %90 oranında

monosakkaritler (fruktoz, glukoz) olup, %0,8-3,6 oranında sukroz ve az miktarda maltoz, trehaloz, erloz içerir. Laktoz olup olmadığı ise belirsizdir (204,205). Arı sütünün kuru ağırlığının yaklaşık %82-90'ını proteinler oluşturmakta ve bu proteinler “Majör Arı Sütü Proteinleri (MRJP’ler)” olarak adlandırılmaktadır. Günümüzde dokuz adet çözünür MRJP tanımlanmış olup bu proteinlerin yaklaşık yarısı (>%45) MRJP1’dir. Bu proteinler dışında protein bileşeni olarak serbest amino asitler (glisin, lizin, glutamik asit, prolin vb.) peptidler [jelleinler (I-IV), royalisin], enzimler (amilaz, invertaz, katalaz, asit fosfataz ve lizozim) ve nükleotidler (adenozin monofosfat, adenozin monofosfat N1-oksit ve adenozin N1-oksit) de yer almaktadır (206,207). Lipitler arı sütü bileşiminde önemli bir rol oynamaktadır. Arı sütü lipitlerinin yaklaşık %80-90’ı nadir bulunan serbest yağ asitleridir: trans-10-hidroksi-2-dekanoik asit (10-HDA), glukonik asit, 3-hidroksidodekanoik asit, 8-hidroksioktanoik asit, 11-oksododekanoik asit gibi. Arı sütünün ana ve spesifik lipit bileşeni 10-HDA olup, arı sütünün kalitesi ve orijinalliğini doğrulamak için bir belirteç olarak kullanılır (208). Bu besin öğelerinin yanı sıra arı sütü bileşiminde az miktarda mineraller (en yüksek potasyum olmak üzere, sodyum, magnezyum, fosfor, kükürt, kalsiyum, çinko, demir ve bakır), vitaminler (temel olarak B grubu vitaminleri; B₁, B₂, B₃, B₅ ve B₆ vitaminleri, biotin, folik asit, E vitamini), fenolik asitler (ferulik asit, oktanoik asit, dodekanoik asit, vb.) ve flavonoidler (kuersetin, kaemferol, galanjin, fisetin, pinosembrin, narinjin, hesperidin, genistein, apigenin, luteolin) mevcuttur (209,210). Diğer arı ürünlerinde olduğu gibi, arı sütü bileşiminin de nektar ve çiçek farklılıkları, bal arısı türleri, mevsimsel ve coğrafi koşullar gibi çeşitli faktörlerden etkilendiği belirlenmiştir (211).

Arı sütü uzun yıllardan beri geleneksel tıpta kullanılmakta, günümüzde sağlık üzerindeki yararlı özellikleri nedeniyle hastalıkların önlenmesi ve sağlığın geliştirilmesi için fonksiyonel bir besin olarak tüketimi giderek artmaktadır. Arı sütünün sağlık üzerindeki faydaları, proteinler (özellikle MRJP’ler ve peptidler) başta olmak üzere lipitler (özellikle 10-HDA), flavonidler ve diğer biyoaktif bileşiklere atfedilmiştir (212,213). Bu arı ürününün immünomodülatör (214), antioksidan (189,209,215), antiaging (216), hipokolesterolemik (217) ve antihipertansif (218) aktiviteler sergilediği ve bu etkilerin özellikle MRJP1 ve MRJP2’nin, ayrıca kısmen de olsa flavonoidler ve fenolik bileşikler sayesinde

gerçekleştirdiği bildirilmiştir (206). Ek olarak, MRJP2'nin antihepatik, antikanserojen ve potansiyel bir yara iyileştirme biyoaktivitesine sahip olduğu da rapor edilmiştir (212,219). MRJP3'ün ise *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda güçlü immün düzenleyici etkiler göstererek arı sütünün antialerjik ve antienflamatuar aktivitesine etkisi olduğu ortaya konmuştur (220). Arı sütünün Gram (+) ve Gram (-) bakterilere, mantarlara ve mayaya karşı mikrobiyal hücre duvarına zarar vererek antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve bu aktiviteden MRJP2, MRJP4, arı sütü peptidleri (jelleinler ve royalisin) ve 10-HDA'nın sorumlu olduğu ortaya konmuştur (215,221,222). Ayrıca, jelleinler, royalisin ve 10-HDA nöroprotektif etki göstererek Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde arı sütünün etkili bir rol oynayabileceği belirlenmiştir (223,224). Son olarak, arı sütünün dişi farelerde üreme performansını artırarak doğurganlığı teşvik ettiği, anti-menopoz ajanı olduğu bildirilmiş ve etki mekanizmasının diğer hastalık mekanizmalarında olduğu gibi MRJP'ler ve 10-HDA'dan kaynaklandığı düşünülmektedir (225). Son yıllarda yapılan bir çalışma, arı sütünü SARS-CoV-2 (COVID-19) enfeksiyonu için umut verici bir tedavi ajanı olarak önermiş ve bu etkisini MRJP2 bileşeni ile ilişkilendirmiştir (226).

5. MATERİYAL VE METOT

5.1. Materyal

Çalışmanın materyalini oluşturan arı ürünleri bal (n=28), taze arı poleni (n=28), ham propolis (n=28) ve arı sütü (n=28) olmak üzere dört ana ürün grubuna ayrıldı. Çalışmanın materyalini toplam 112 arı ürünü oluşturdu. Numuneler Eylül-Kasım 2021 tarihleri arasında Türkiye'nin yedi bölgesi ve her bölgeden dört il olmak üzere 28 farklı şehirdeki yerel arıcılardan doğrudan satın alındı. Bal numuneleri cam kavanozlarda en az 500 g, polen numuneleri şeffaf poşetlerde en az 100 g, ham propolis numuneleri şeffaf poşetlerde en az 20 g ve arı sütü numuneleri ise cam kavanozlarda en az 10 gr olarak satın alındı. Arı ürünlerinin tedarik edileceği iller seçilirken TÜİK tarafından yayınlanan "Türkiye İller Bazında Arıcılık İstatistikleri (1991-2020)" verileri kullanıldı. Seçilen bölge ve iller; Marmara Bölgesi – Edirne, Çanakkale, Balıkesir, Bursa; Ege Bölgesi: Muğla, Aydın, İzmir, Afyon; Akdeniz Bölgesi: Antalya, Hatay, Mersin, Kahramanmaraş; İç Anadolu Bölgesi: Ankara, Kayseri, Konya, Sivas; Karadeniz Bölgesi: Artvin, Kastamonu, Ordu, Tokat; Doğu Anadolu Bölgesi: Ağrı, Erzurum, Muş, Van; Güneydoğu Anadolu Bölgesi: Adıyaman, Gaziantep, Siirt, Şanlıurfa illerinden oluştu. Tüm arı ürünleri etiketlendikten sonra, taze polen, ham propolis ve arı sütü numuneleri soğuk (taze polen: $+4\pm1$ °C, ham propolis ve arı sütü: -18 ± 1 °C) ve karanlık bir ortamda muhafaza edildi. Sadece bal numuneleri oda sıcaklığında ($23-25\pm1$ °C) ve karanlık bir ortamda saklandı. Satın alınan tüm numuneler kendi ambalajlarında belirtilen saklama koşullarında analiz gününe kadar bekletildi.

5.1.1. Analiz için kullanılan kimyasallar

Çalışmada kullanılan DON, SİT ve ZEA standartları (tümü ≥ 98 saflıkta) Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) satın alındı. Analizde kullanılan asetonitril Carlo Erba'dan (CARLO ERBA Reagents, Val-de-Reuil, Fransa), metanol ve asetik asit Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD), formik asit Honeywell'den (Riedel-de Haën™, ABD) satın alındı. Kullanılan kimyasalların ve çözücülerin tümü yüksek

saflıkta idi (HPLC-grade). Tüm çözelti hazırlama adımlarında ve HPLC analizinde yer alan mobil fazlarda kullanılan ultra saf su, PURELAB flex-3-Ultra-Purified Water Machine su arıtma sistemi (ELGA LabWater NA, Woodridge, IL, ABD) ile saflaştırıldı.

5.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

- i. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)
 - HPLC sistemi (Agilent 1100 Series, ABD)
 - Degazer ünitesi (G1322A)
 - Pompa ünitesi (G1312A)
 - Otomatik numune alma birimi (G1313A)
 - Kolon fırını (G1316A)
 - HPLC kolonu [Ters faz- C_{18} kolonu (4,6 x 250 mm, 5 μ m)] (Purospher Star, Merck, Almanya).
 - UV dedektör (G1314A)
- ii. Sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS)
 - LC-MS/MS sistemi (DIONEX UltiMate 3000 UHPLC, Thermo Scientific, ABD)
- iii. Hacim ayarlı mikropipet (100 ve 1000 μ L' lik)
- iv. Buzdolabı
- v. Çeker ocak (TOLKİM, İstanbul, Türkiye)
- vi. Derin dondurucu
- vii. Elektronik hassas terazi (AND A&D Company, Tokyo, Japonya)
- viii. Etüv (Microtest, Ankara, Türkiye)
- ix. Isıtıcıli manyetik karıştırıcı (DLAB Scientific Inc., CA, ABD)
- x. Ultra saf su cihazı (ELGA LabWater NA, Woodridge, IL, ABD)
- xi. Vorteks (Velp Scientifica, MB, İtalya)
- xii. UV-Vis spektrofotometre (Schimadzu UV-1800, Japonya)

5.1.3. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

- i. Balon joje
- ii. Beher
- iii. Erlenmeyer
- iv. Cam huni
- v. Cam vialler (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Almanya)
- vi. Enjektör
- vii. Eppendorf tüpler
- viii. Mezur
- ix. Numune süzme filtresi (Whatmann No. 4) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD)
- x. Parafilm (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Almanya)
- xi. Pipet uçları
- xii. Plastik huni
- xiii. Steril şırınga ucu filtre (0,22 µm/25 mm/PVDF) (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Almanya)

5.2. Metot

5.2.1. Stok ve çalışma standart mikotoksin çözeltilerinin hazırlanması

5.2.1.1. Stok ve çalışma standart SİT çözeltilerinin hazırlanması

Stok SİT standart çözeltisi, metanol içinde 5 mg/mL konsantrasyon olacak şekilde hazırlandı. Çalışma çözeltileri, stok standart çözeltinin metanol ile beş farklı konsantrasyona (0,625 - 1,25 - 2,5 - 5 - 10 µg/mL) seyreltilmesi ile oluşturuldu. Hazırlanan tüm stok ve çalışma standart çözeltileri karanlık ortamda -20 °C'de parafilm kaplı amber cam şişelerde saklandı.

5.2.1.2. Stok ve çalışma standart DON çözeltilerinin hazırlanması

Stok DON standart çözeltisi asetonitril içinde 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlandı. Bu stok çözelti, bir metanol:ultra saf su (20:80 v/v) karışımı ile beş farklı

konsantrasyona (0,0025 - 0,005 - 0,01 - 0,02 - 0,04 µg/mL) seyreltildi ve DON çalışma çözeltileri oluşturuldu. Hazırlanan tüm stok ve çalışma standart çözeltileri karanlık ortamda -20 °C’de parafilm kaplı amber cam şişelerde saklandı.

5.2.1.3. Stok ve çalışma standart ZEA çözeltilerinin hazırlanması

Stok ZEA standart çözeltisi asetonitril içerisinde 2 mg/mL konsantrasyonda hazırlandı. Çalışma çözeltileri, stok çözeltinin asetonitril ile 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 µg/mL konsantrasyonlarına seyreltilmesi ile oluşturuldu. Hazırlanan tüm stok ve çalışma standart çözeltileri karanlık ortamda -20 °C’de parafilm kaplı amber cam şişelerde saklandı.

5.2.2. Arı ürünlerinde SİT analizi

5.2.2.1. SİT analizi öncesi arı ürünleri numunelerinin hazırlanması ve ekstraksiyonu

Arı ürünleri numunelerinin SİT analizi öncesi hazırlama ve ekstraksiyon işlemleri İstanbul Medipol Üniversitesi Toksikoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Numunelerin hazırlanma ve ekstraksiyon işlemi öncesi ve işlem süresince kullanılan cam malzemeler yıkandıktan sonra ultra saf sudan geçirildi ve 60°C’de 3 saat boyunca etüvde (Microtest, Ankara, Türkiye) bırakıldı. Katı taze polen ve ham propolis numuneleri elektronik hassas terazide (AND A&D Company, Tokyo, Japonya) 250±0,1 mg olacak şekilde tartılıp cam beherlere konuldu ve numunelerde var olabilecek nemin uçurulması amacıyla etüvde (Microtest, Ankara, Türkiye) 60 °C’de iki saat boyunca kurutuldu. Kurutma işlemi sonrası numunelere 50 mL metanol eklendi ve numuneler manyetik karıştırıcı (DLAB Scientific Inc., CA, ABD) ile 2 saat boyunca (1500 rpm/dk) ekstrakte edildi. Bal ve arı sütü numuneleri ise elektronik hassas terazide (AND A&D Company, Tokyo, Japonya) 250±0,1 mg olacak şekilde tartılıp cam beherlere konuldu. Üzerlerine 50 mL metanol eklendi. Numuneler 2 saat boyunca (1500 rpm/dk) manyetik karıştırıcıda (DLAB Scientific Inc., CA, ABD) karıştırılarak ekstrakte edildi. Ekstraksiyon sonrası elde edilen çözeltilerde var olabilecek çözünmemiş tortuyu ortadan kaldırmak için tüm

numuneler Whatman No: 4 filtre kağıdından (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) geçirilerek süzüldü. Süzülen tüm arı ürünleri numuneleri çeker ocak (TOLKİM, İstanbul, Türkiye) içerisinde uçuruldu (60 °C, 3 saat, 500 rpm). Uçurma işlemi sonrası hassas terazide tartım işlemi yapıldı ve elde edilen ekstrakt miktarları belirlendi. Her bir arı ürünü ekstraktlarından 2'şer mg tartılıp eppendorf tüplerine aktarıldı. Tüm numune ekstraktlarına 2 mL metanol:ultra saf su (20:80 v/v) solüsyon karışımı eklenerek vorteks ile karıştırıldı. Karıştırma sonrası her bir numune steril şırınga ucu filtreden (0,22 µm/25 mm/PVDF) (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Almanya) geçirilerek viallere aktarıldı. Viallere konulan tüm numuneler analiz için HPLC cihazının otomatik numune alma ünitesine yerleştirildi. Bal, polen, propolis ve arı sütü numunelerinde SİT varlığının ve miktarlarının belirlenmesi için HPLC analizi üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Analiz sonucunda SİT tespit edilen her numune için saptanan toksin değerleri Microsoft Excel® programı kullanılarak hesaplandı.

5.2.2.2. Arı ürünlerinde SİT analizi için HPLC prosedürü ve çalışma koşulları

Arı ürünleri numunelerinde SİT'in HPLC-UV analizi İstanbul Medipol Üniversitesi Farmasötik Kimya Laboratuvarında gerçekleştirildi.

SİT analizinde kullanılan ekipmanlar ve çalışma koşulları:

- i. HPLC sistemi: Agilent 1100 serisi
- ii. Kromatografik kolon: Encapped Purospher Star ters faz-C₁₈ kolon (4,6 x 250 mm, 5 µm)
- iii. Mobil faz: Asetonitril:ultra saf su:formik asit (10:90:0.1, v/v/v)
- iv. Enjeksiyon hacmi: 100 µL
- v. Akış hızı: 1 mL/dk
- vi. Kolon sıcaklığı: 25±1 °C
- vii. Dedektör: UV (UV dalga boyu: 325 nm)
- viii. Analiz süresi: 15 dk

Arı ürünleri numunelerindeki SİT varlığını değerlendirmek için kalibrasyon grafiği kullanıldı. Kalibrasyon grafiğini oluşturmak için, farklı konsantrasyonlardaki seyreltik SİT standartları (0,625 - 1,25 - 2,5 - 5 - 10 µg/mL) HPLC-UV ile 15 dakika

boyunca analiz edildi. Pik alanı, alıkonma zamanı gibi veriler Agilent Chemstation yazılım programı kullanılarak elde edildi.

5.2.3. Arı ürünlerinde DON analizi

5.2.3.1. *DON analizi öncesi arı ürünleri numunelerinin hazırlanması ve ekstraksiyonu*

Arı ürünleri numunelerinin DON analiz öncesi hazırlama ve ekstraksiyon işlemleri İstanbul Medipol Üniversitesi Toksikoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Numunelerin hazırlanma ve ekstraksiyon işlemi öncesi ve işlem süresince kullanılan cam malzemeler yıkandıktan sonra ultra saf sudan geçirildi ve 60°C’de 3 saat boyunca etüvde (Microtest, Ankara, Türkiye) bırakıldı. Katı taze polen ve propolis numuneleri elektronik hassas terazide (AND A&D Company, Tokyo, Japonya) 250±0,1 mg olacak şekilde tartılıp cam beherlere konuldu ve numunelerde var olabilecek nemin uçurulması amacıyla etüvde (Microtest, Ankara, Türkiye) 60 °C’de iki saat boyunca kurutuldu. Kurutma işlemi sonrası numunelere 50 mL metanol eklendi ve numuneler manyetik karıştırıcı (DLAB Scientific Inc., CA, ABD) ile 2 saat boyunca (1500 rpm/dk) ekstrakte edildi. Bal ve arı sütü numuneleri ise elektronik hassas terazide (AND A&D Company, Tokyo, Japonya) 250±0,1 mg olacak şekilde tartılıp cam beherlere konuldu. Üzerlerine 50 mL metanol eklendi. Bal ve arı sütü numuneleri 2 saat boyunca (1500 rpm/dk) manyetik karıştırıcıda (DLAB Scientific Inc., CA, ABD) karıştırılarak ekstrakte edildi. Ekstraksiyon sonrası elde edilen çözeltilerde var olabilecek çözünmemiş tortuyu ortadan kaldırmak için tüm numuneler Whatman No: 4 filtre kağıdından (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) geçirilerek süzüldü. Numuneleri DON bileşimine stabilize etmek için ekstrakte edilen tüm arı ürünleri aktif kömür, celite ve alüminyum oksit (Al₂O₃) içeren tek kullanımlık temizleme kolonlarından geçirildi (227,228). Daha sonra tüm numuneler çeker ocakta (TOLKİM, İstanbul, Türkiye) 60°C’de 3 saat boyunca uçuruldu. Uçurma işlemi sonrası elde edilen ekstrakt kalıntıları asetonitril:ultra saf su (21:4 v/v) karışımı ile manyetik karıştırıcıda 1 saat boyunca karıştırıldı ve tüm numuneler çeker ocak içerisinde tekrar uçurma işlemine alındı (60 °C, 2 saat, 500 rpm). Uçurma

işlemi sonrası tartım yapılarak elde edilen ekstrakt miktarları belirlendi. Her bir arı ürünleri ekstraktlarından 2'şer mg tartılıp eppendorf tüplerine aktarıldı. Tüm numune ekstraktlarına 2 mL metanol:ultra saf su (20:80 v/v) solüsyon karışımı eklenerek vorteks ile karıştırıldı. Karıştırma sonrası tüm numuneler steril şırınga ucu filtreden (0,22 µm/25 mm/PVDF) (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Almanya) geçirilerek viallere aktarıldı. Viallere konulan tüm numuneler analiz için HPLC cihazının otomatik numune alma ünitesine yerleştirildi. Bal, polen, propolis ve arı sütü numunelerinde DON varlığının ve miktarlarının belirlenmesi için HPLC analizi üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Analiz sonucunda DON tespit edilen her numune için saptanan toksin değerleri Microsoft Excel® programı kullanılarak hesaplandı.

5.2.3.2. Arı ürünlerinde DON analizi için HPLC prosedürü ve çalışma koşulları

Arı ürünleri numunelerinde DON'un HPLC-UV analizi İstanbul Medipol Üniversitesi Farmasötik Kimya Laboratuvarında gerçekleştirildi.

DON analizinde kullanılan ekipmanlar ve çalışma koşulları:

- i. HPLC sistemi: Agilent 1100 serisi
- ii. Kromatografik kolon: Encapped Purospher Star ters faz-C₁₈ kolon (4,6 x 250 mm, 5 µm)
- iii. Mobil faz: Metanol:ultra saf su:asetik asit (97:2:1 v/v/v)
- iv. Enjeksiyon hacmi: 100 µL
- v. Akış hızı: 1 mL/dk
- vi. Kolon sıcaklığı: 25±1°C
- vii. Dedektör: UV (UV dalga boyu: 220 nm)
- viii. Analiz süresi: 15 dk

Arı ürünleri numunelerindeki DON varlığını değerlendirmek için kalibrasyon grafiği kullanıldı. Kalibrasyon grafiğini oluşturmak için, farklı konsantrasyonlardaki seyreltik DON standartları (0,0025 - 0,005 - 0,01 - 0,02 - 0,04 µg/mL) HPLC-UV ile 15 dakika boyunca analiz edildi. Pik alanı, alıkonma zamanı gibi veriler Agilent Chemstation yazılım programı kullanılarak elde edildi.

5.2.4. Arı ürünlerinde ZEA analizi

5.2.4.1. ZEA analizi öncesi arı ürünleri numunelerinin hazırlanması ve ekstraksiyonu

Arı ürünleri numunelerinin ZEA analizi öncesi hazırlama ve ekstraksiyon işlemleri İstanbul Medipol Üniversitesi Toksikoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Numunelerin hazırlanma ve ekstraksiyon işlemi öncesi ve işlem süresince kullanılan cam malzemeler yıkandıktan sonra ultra saf sudan geçirildi ve 60°C’de 3 saat boyunca etüvde (Microtest, Ankara, Türkiye) bırakıldı. Katı taze polen ve ham propolis numuneleri elektronik hassas terazide (AND A&D Company, Tokyo, Japonya) 250±0,1 mg olacak şekilde tartılıp cam beherlere konuldu ve numunelerde var olabilecek nemin uçurulması amacıyla etüvde (Microtest, Ankara, Türkiye) 60 °C’de iki saat boyunca kurutuldu. Kurutma işlemi sonrası numunelere 50 mL metanol eklendi ve numuneler manyetik karıştırıcı (DLAB Scientific Inc., CA, ABD) ile 2 saat boyunca (1500 rpm/dk) ekstrakte edildi. Bal ve arı sütü numuneleri ise elektronik hassas terazide (AND A&D Company, Tokyo, Japonya) 250±0,1 mg olacak şekilde tartılıp cam beherlere konuldu. Üzerlerine 50 mL metanol eklendi. Numuneler 2 saat boyunca (1500 rpm/dk) manyetik karıştırıcıda (DLAB Scientific Inc., CA, ABD) karıştırılarak ekstrakte edildi. Ekstraksiyon sonrası elde edilen çözeltilerde var olabilecek çözünmemiş tortuyu ortadan kaldırmak için tüm numuneler Whatman No: 4 filtre kağıdından (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) geçirilerek süzüldü. Süzülen tüm arı ürünleri numuneleri çeker ocak (TOLKİM, İstanbul, Türkiye) içerisinde uçuruldu (60 °C, 3 saat, 500 rpm). Uçurma işlemi sonrası hassas terazide tartım işlemi yapıldı ve elde edilen ekstrakt miktarları belirlendi. Her bir arı ürünü ekstraktlarından 2’şer mg tartılıp eppendorf tüplerine aktarıldı. Tüm numune ekstraktlarına 2 mL metanol:ultra saf su (20:80 v/v) solüsyon karışımı eklenerek vorteks ile karıştırıldı. Karıştırma sonrası her bir numune steril şırınga ucu filtreden (0,22 µm/25 mm/PVDF) (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Almanya) geçirilerek viallere aktarıldı. Viallere konulan tüm numuneler analiz için HPLC cihazının otomatik numune alma ünitesine yerleştirildi. Bal, polen, propolis ve arı sütü numunelerinde ZEA varlığının ve miktarlarının belirlenmesi için HPLC analizi üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Analiz sonucunda ZEA

tespit edilen her numune için saptanan toksin değerleri Microsoft Excel® programı kullanılarak hesaplandı.

5.2.4.2. Arı ürünlerinde ZEA analizi için HPLC prosedürü ve çalışma koşulları

Arı ürünleri numunelerinde ZEA'nın HPLC-UV analizi İstanbul Medipol Üniversitesi Farmasötik Kimya Laboratuvarında gerçekleştirildi.

ZEA analizinde kullanılan ekipmanlar ve çalışma koşulları:

- i. HPLC sistemi: Agilent 1100 serisi
- ii. Kromatografik kolon: Encapped Purospher Star ters faz-C₁₈ kolon (4,6 x 250 mm, 5 µm)
- iii. Mobil faz: Metanol:ultra saf su:asetik asit (10:89:1, v/v/v)
- iv. Enjeksiyon hacmi: 100 µL
- v. Akış hızı 0,7 mL/dk
- vi. Kolon sıcaklığı: 25±1 °C
- vii. Dedektör: UV (UV dalga boyu: 236 nm)
- viii. Analiz süresi: 15 dk

Arı ürünleri numunelerindeki ZEA varlığını değerlendirmek için kalibrasyon grafiği kullanıldı. Kalibrasyon grafiğini oluşturmak için, farklı konsantrasyonlardaki seyreltik ZEA standartları (0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 µg/mL) HPLC-UV ile 15 dakika boyunca analiz edildi. Pik alanı, alıkonma zamanı gibi veriler Agilent Chemstation yazılım programı kullanılarak elde edildi.

5.2.5. HPLC-UV analizi sonrası mikotoksin içeren arı ürünleri numunelerinin LC-MS/MS analizi ile konfirmasyonu

Arı ürünlerinin HPLC-UV analizi sonucunda belirlenen pozitif numuneler, LC-MS/MS sisteminde mikotoksinlerin kütle fragmentleri analizleri ile doğrulandı ve LC-MS/MS analizleri İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Toksikoloji Laboratuvarında yapıldı.

Kütle spektrometrik analizi, pozitif elektrosprey iyonizasyon modunda gerçekleştirildi. LC-MS/MS [DIONEX UltiMate 3000 UHPLC sistemi (Thermo Scientific™, ABD)] analizinde her bir kütle fragmentini dörtlü kütle parçacıklı quardrapolden (TSQ Quantum; Thermo Scientific™, San Jose, CA, ABD) geçirerek daha seçici bir mikotoksin analizi uygulandı. Verilerin değerlendirilmesi için Thermo Scientific™ SII for Xcalibur™ yazılımı kullanıldı.

LC/M-MS analizinde kullanılan çalışma metodu:

- i. Analitik kolon: Thermo Scientific™ Accucore™ C₁₈ kolonu (100 x 2,1 mm, 2,6 µm)
- ii. Elektron püskürtme iyonizasyonu voltajı: 3,5 kV
- iii. Taşıyıcı gaz basıncı: 45 psi
- iv. Çarpıştırıcı gaz (argon) basıncı: 1,5 mTorr
- v. Buharlaştırma sıcaklığı: 270 °C
- vi. Enjeksiyon hacmi: 5 µL
- vii. Gradyan pompa akış hızı: 0,30 mL/dk
- viii. Kolon sıcaklığı: 30 °C
- ix. Mobil faz: İkili mobil faz akışı kullanıldı [mobil faz A (5 mM amonyum format) ve mobil faz B (metanol)]. İzogradient çözücü akış programında ilk 15 dakika boyunca ikili lineer gradient akış kullanıldı. Mobil faz B %2'den %95'e çıkarılıp 2 dakika boyunca bu oranda sabit tutuldu. Ardından 2 dakika boyunca %98 mobil faz A'da tutuldu. Toplam analiz süresi 20 dakikaya ayarlanarak tüm akış mobil faz B ile tamamlandı.
- x. SİT, DON ve ZEA için 200-800 m/z'lik bir kütle tarama aralığı kullanıldı.

5.2.6. Metot validasyonu

Bal, polen, propolis ve arı sütü numunelerinde SİT, DON ve ZEA mevcudiyetini ve miktarını saptamak için yapılan HPLC-UV analizinin metod validasyonu gerçekleştirildi. Validasyon için lineer aralık, linearite denklemi, korelasyon katsayısı (R^2), tayin limitleri (LOQ), tespit limitleri (LOD) ve geri kazanım parametreleri kullanıldı ve değerlendirildi (229).

5.2.6.1. *Lineerlik*

Lineerlik (lineer aralık, linearite denklemi ve R^2) ayrı ayrı SİT, DON ve ZEA standart çözelti serileri ile oluşturulan kalibrasyon eğrileri kullanılarak değerlendirildi.

Kalibrasyon eğrisi oluşturulurken beş farklı SİT konsantrasyonu (0,625 - 1,25 - 2,5 - 5 - 10 $\mu\text{g/mL}$) kullanıldı. Farklı konsantrasyonlardaki bu beş çalışma çözeltileri HPLC-UV ile üç tekrarlı olarak analiz edildi. Analiz sonucu oluşan pik alanları hesaplandı ve lineerlik değerleri elde edildi. SİT için kalibrasyon grafiği Microsoft Excel® programı kullanılarak çizildi.

Kalibrasyon eğrisi oluşturulurken beş farklı DON konsantrasyonu (0,0025 - 0,005 - 0,01 - 0,02 - 0,04 $\mu\text{g/mL}$) kullanıldı. Farklı konsantrasyonlardaki bu beş çalışma çözeltileri HPLC-UV ile üç tekrarlı olarak analiz edildi. Analiz sonucu oluşan pik alanları hesaplandı ve lineerlik değerleri elde edildi. DON için kalibrasyon grafiği Microsoft Excel® programı kullanılarak çizildi.

Kalibrasyon eğrisi oluşturulurken beş farklı ZEA konsantrasyonu (0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 $\mu\text{g/mL}$) kullanıldı. Farklı konsantrasyonlardaki bu beş çalışma çözeltileri HPLC-UV ile üç tekrarlı olarak analiz edildi. Analiz sonucu oluşan pik alanları hesaplandı ve lineerlik değerleri elde edildi. ZEA için kalibrasyon grafiği Microsoft Excel® programı kullanılarak çizildi.

5.2.6.2. *LOD ve LOQ*

Bal, polen, propolis ve arı sütü numunelerinde DON, SİT ve ZEA mikotoksinlerinin LOD ve LOQ değerleri sinyal/gürültü (S/N) oranının sırasıyla 3,3 ve 10 katı olarak hesaplandı (230). Hesaplamalar için Microsoft Excel® programı kullanıldı.

5.2.6.3. *Geri kazanım*

Her bir mikotoksin için geri kazanım değerlerini belirlemek amacıyla, SİT toksini içermeyen herhangi bir numuneye SİT (1,25 $\mu\text{g/mL}$); DON toksini içermeyen herhangi bir numuneye DON (0,005 $\mu\text{g/mL}$) ve ZEA toksini içermeyen herhangi bir

numuneye ZEA (0,5 µg/mL) çalışma çözeltisi iç standart olarak 100'er µL eklendi. Farklı konsantrasyonlardaki farklı mikotoksinlerin eklendiği numuneler HPLC-UV ile on tekrarlı olarak analiz edildi. Böylece her bir mikotoksin için geri kazanım değerleri aşağıda belirtilen formül ile hesaplanarak elde edildi.

$$\% \text{Geri Kazanım} = \frac{\text{Standart eklenmiş numune analiz sonucu } (\mu\text{g/kg}) \times 100}{\text{Eklenen standart miktarı } (\mu\text{g/kg})}$$

5.2.7. Arı ürünlerinde SİT, DON ve ZEA için diyetel maruziyet ve risk değerlendirmesi

Besinlerde sadece mikotoksin kontaminasyon düzeylerinin belirlenmesi, tüketim sonucunda oluşabilecek olası olumsuz sağlık risklerini değerlendirmede eksik bir yöntemdir. Bu nedenle, potansiyel tehlikeyi belirlemek için bir maruziyet değerlendirmesi ve risk karakterizasyonu yapmak doğru olacaktır. Eksiksiz ve geniş çaplı bir besin tüketim çalışmasının mevcudiyeti, maruziyetin doğru bir şekilde belirlenmesi için esastır. Türkiye’de arı ürünleri tüketimine ilişkin kapsamlı veri bulunmamaktadır. Ancak çalışmamızda arı ürünleri tüketimine bağlı olası mikotoksin maruziyetini belirlemek için Türkiye’de yapılan kesitsel bir çalışmadan yıllık kişi başına düşen arı ürünleri tüketim verileri kullanıldı (bal: 923,18 g kişi/yıl, arı poleni: 8,45 g kişi/yıl; propolis: 3,15 g kişi/yıl ve arı sütü: 3,01 g kişi/yıl) (231). Yetişkinler için ortalama vücut ağırlığı (76,4 kg) Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması (TBSA)-2019 verilerinden [19-65 yaşı arası 7569 yetişkin (2938 erkek, 4631 kadın)] elde edildi (232).

Maruziyet risk değerlendirmesi için öncelikle yetişkin bireylerin arı ürünlerinden SİT, DON ve ZEA’nın tahmini günlük alım (EDI) miktarları aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve ng/kg vücut ağırlığı/gün olarak ifade edildi (233):

$$\text{EDI} = \frac{\text{Ortalama mikotoksin konsantrasyonu } \left(\frac{\text{ng}}{\text{g}}\right) \times \text{besin tüketimi } \left(\frac{\text{g}}{\text{gün}}\right)}{\text{ortalama vücut ağırlığı (kg)}}$$

Formülde yer alan ortalama mikotoksin konsantrasyonu hesaplanırken, WHO tarafından Kasım 2020’de yayınlanan “Gıdalardaki kimyasalların diyetle maruziyet değerlendirmesi (Dietary exposure assessment for chemicals in food)” raporu dikkate

alındı (234). Çalışmamızda arı ürünleri tüketimi sonucu mikotoksinlere (SİT, DON, ZEA) olan maruziyet değerlendirilirken, LOD ve LOQ'un altında tespit edilen analiz sonuçlarının işleme prensipleri yukarıda belirtilen rapora göre uygulandı. DON, SİT ve/veya ZEA konsantrasyonu tespit edilemeyen ve <LOD olan numuneler için tahmini orta sınır hesaplanırken “½ LOD” değeri, konsantrasyonu <LOQ olan numuneler için “½ LOQ” değeri ele alındı. DON, SİT ve/veya ZEA konsantrasyonu tespit edilemeyen ve <LOD olan numuneler için “LOD” değerleri, konsantrasyonu <LOQ olan numuneler için “LOQ” değerleri tahmini üst sınır hesaplamasında kullanıldı. Tahmini alt sınır hesaplanırken ise DON, SİT ve/veya ZEA konsantrasyonu tespit edilemeyen ve <LOD olan ürünler için “sıfır”, konsantrasyonu <LOQ olan ürünler için “LOD” değeri kullanıldı.

Yapılan çalışmalarda SİT, DON ve ZEA'nın genotoksik etkileri olduğu ortaya konmuştur. Ancak bu etkileri nasıl gösterdikleri konusunda net bir veri bulunmamaktadır. Bu nedenle EFSA tarafından 2020 yılında yapılan risk değerlendirmesinde, mikotoksinlerin gıda ve yemlerdeki kanserojen ve genotoksik etkilerine ilişkin soru işaretlerini ortadan kaldırmak amacıyla mikotoksinler için maruziyet marjı (MoE) değeri yaklaşımının benimsenmesi gerektiği belirtilmiştir. Çalışmamızda da bu yaklaşımdan yola çıkarak risk karakterizasyonu belirlendi. Maruziyet marjı hesaplamasında kullanılan formül aşağıda verildi (235). Formülde yer alan kıyaslama dozu alt limiti (BMDL) değeri olarak EFSA tarafından önerilen, kemirgenler için %10 ekstra kanser riski ile ilgili kıyaslama dozu alt limiti (BMDL₁₀) dozları kullanıldı ve SİT, DON, ZEA için BMDL₁₀ değerleri sırasıyla 48 µg/kg vücut ağırlığı/gün, 210 µg/kg vücut ağırlığı/gün ve 6,39 mg/kg vücut ağırlığı/gün idi (46,91,236).

$$\text{MoE} = \frac{\text{BMDL}_{10} \text{ (ng/kg vücut ağırlığı/gün)}}{\text{EDI (ng/kg vücut ağırlığı/gün)}}$$

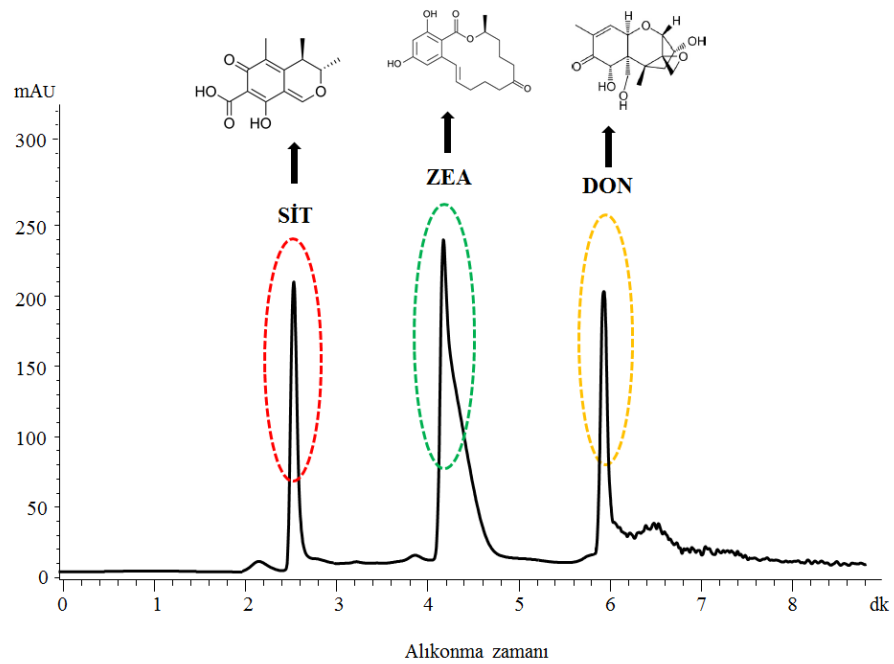
Hesaplama sonucunda MoE değerinin 10,000'in altında olması genotoksik kanserojene maruz kalmayla ilişkili olası bir sağlık riski olarak tanımlanmakta ve tüketiciler için sağlık endişelerine yol açmaktadır (235).

6. BULGULAR

Bu çalışmada, Türkiye'nin yedi bölgesinden ve her bölgeden dört il olmak üzere yirmi sekiz farklı şehirden satın alınan toplam 112 arı ürünü numunesi (dört farklı grup; bal, polen, propolis ve arı sütü) HPLC-UV ile DON, SİT, ZEA varlığının ve miktarının tespiti için analiz edildi.

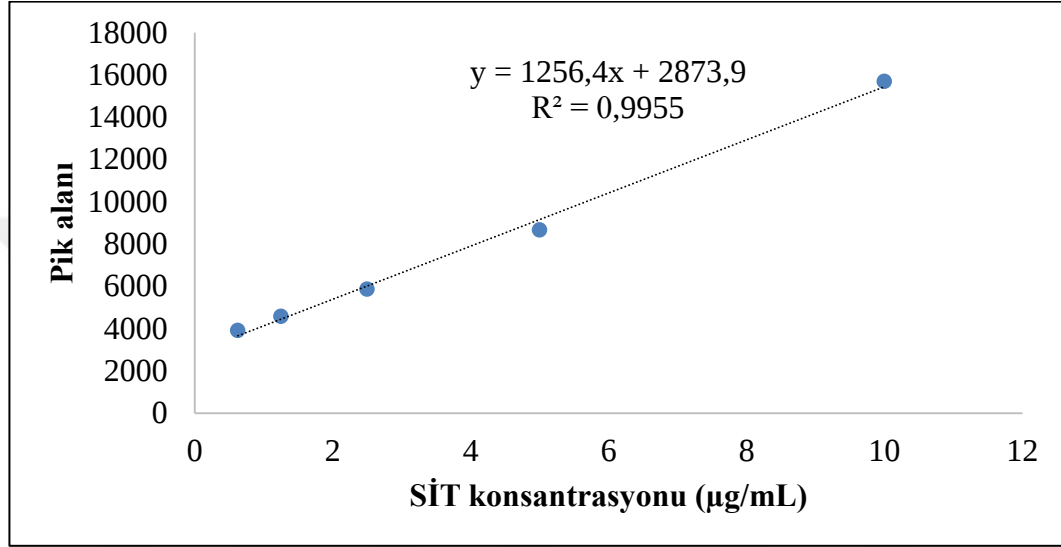
6.1. Metod Validasyon Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Bu çalışmada; bal, polen, propolis ve arı sütü numunelerinde analiz edilen SİT, DON ve ZEA mikotoksinleri için metod validasyon parametreleri (lineer aralık, linearite denklemi, korelasyon katsayısı (R^2), LOD, LOQ, geri kazanım) değerlendirildi. Hazırlanan SİT, DON ve ZEA çalışma standart çözeltilerinin HPLC-UV'de yürütülmesi ile oluşturulan kromatogramlara göre, alıkonma zamanları SİT, DON ve ZEA için sırasıyla 2,6 dakika, 6,2 dakika ve 4,4 dakika olarak tespit edildi (Şekil 6.1.1).

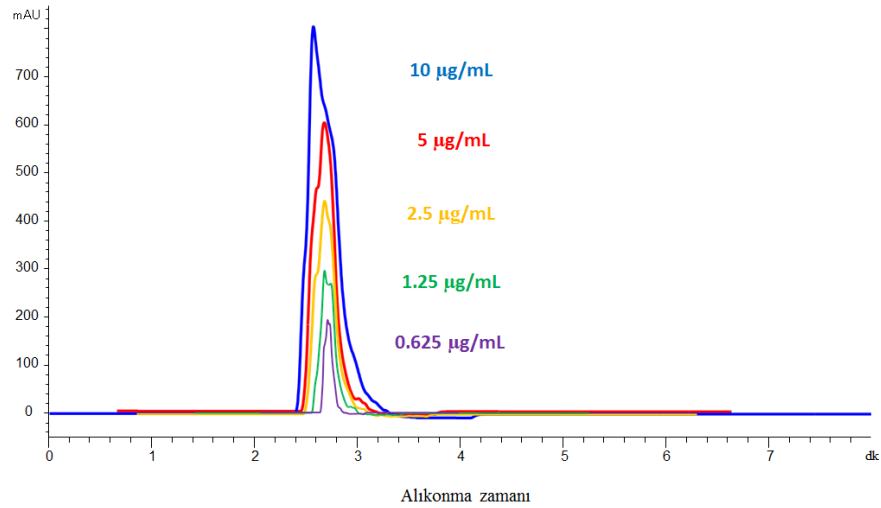


Şekil 6.1.1. Toksin standartlarının HPLC-UV kromatogramı

Şekil 6.1.2’de beş farklı SİT konsantrasyonları kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi, lineerite denklemi ve R^2 değeri gösterildi. Kalibrasyon eğrisi doğrusal bulundu. Hesaplanan R^2 değeri $>0,99$ idi. Bu bulgu, lineerliği analitik olarak doğruladı. Lineerlik SİT için 2,5-10,0 $\mu\text{g/mL}$ olarak ölçüldü. Farklı konsantrasyonlardaki SİT çalışma standartlarının kromatogram çakıştırması Şekil 6.1.3’te verildi.

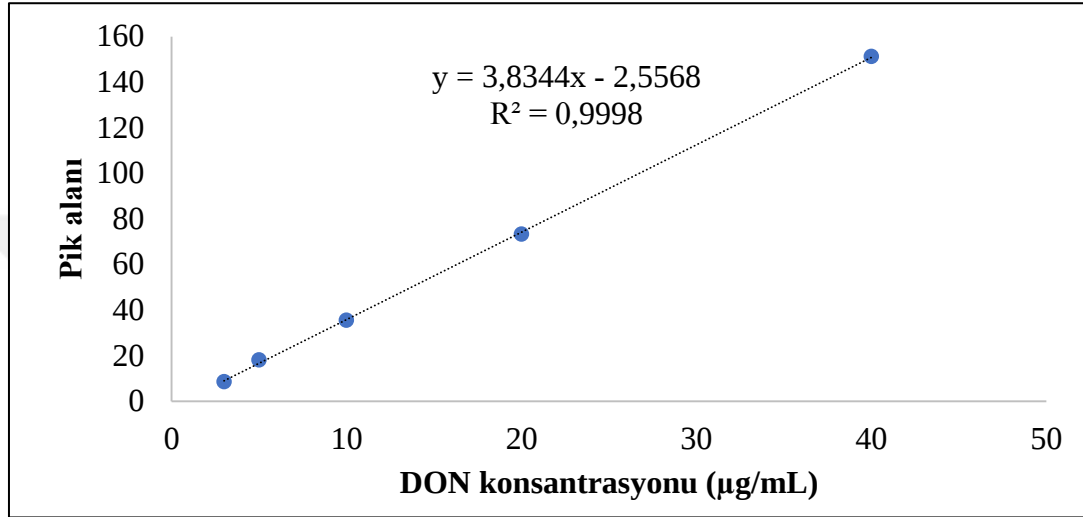


Şekil 6.1.2. SİT için kalibrasyon grafiği

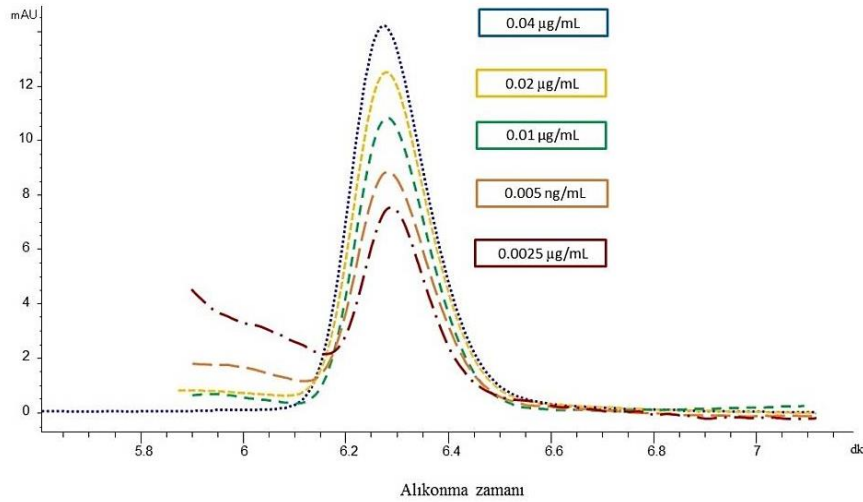


Şekil 6.1.3. Farklı konsantrasyonlardaki SİT standartlarının kromatogram çakıştırması

Şekil 6.1.4'te beş farklı DON konsantrasyonları kullanılarak oluşan kalibrasyon eğrisi, linearite denklemi ve R^2 değeri gösterildi. Oluşturulan kalibrasyon eğrileri doğrusal bulundu. Hesaplanan R^2 değeri $>0,99$ idi. Bu bulgu, lineerliği analitik olarak doğruladı. Lineerlik DON için 0,0025-0,02 $\mu\text{g/mL}$ olarak ölçüldü. Farklı konsantrasyonlardaki DON standartlarının kromatogram çakıştırması Şekil 6.1.5'te verildi.

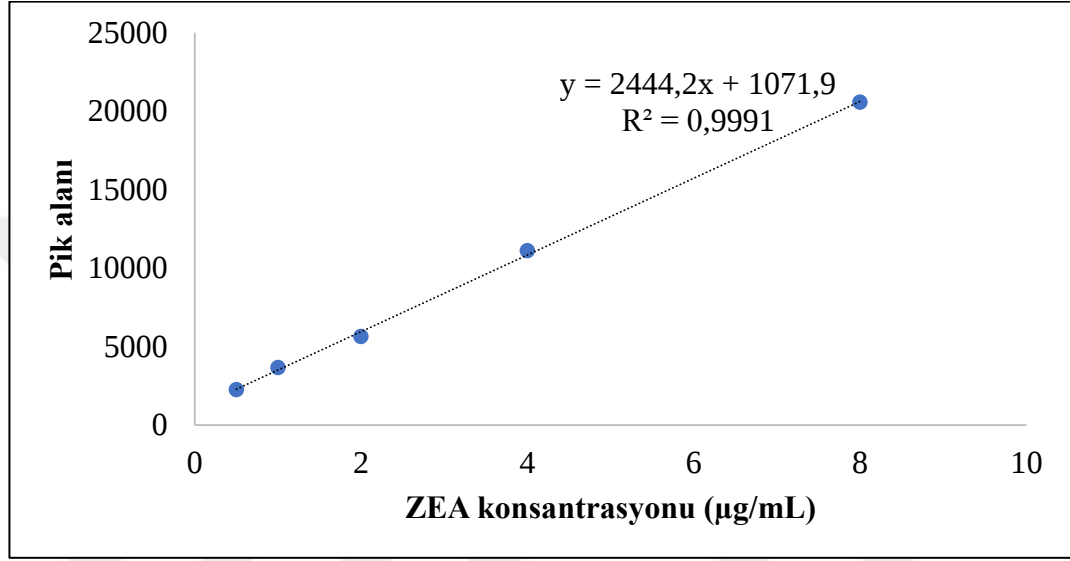


Şekil 6.1.4. DON için kalibrasyon grafiği

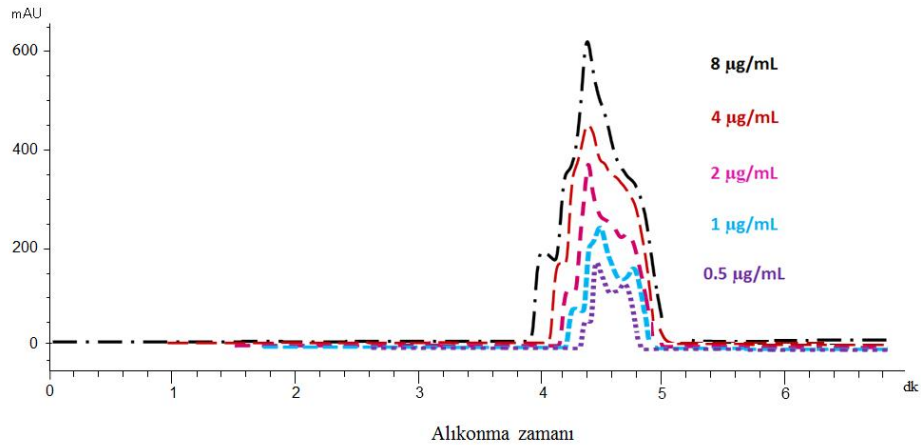


Şekil 6.1.5. Farklı konsantrasyonlardaki DON standartlarının kromatogram çakıştırması

Şekil 6.1.6’da beş farklı ZEA konsantrasyonları kullanılarak oluşan kalibrasyon eğrisi, lineerite denklemi ve R^2 değeri gösterildi. Kalibrasyon eğrileri doğrusal bulundu. Hesaplanan R^2 değeri $>0,99$ idi. Bu bulgu, lineerliği analitik olarak doğruladı. Lineerlik ZEA için 0,5-8,0 $\mu\text{g/mL}$ olarak ölçüldü. Farklı konsantrasyonlardaki ZEA standartlarının kromatogram çakıştırması Şekil 6.1.7’de verildi.



Şekil 6.1.6. ZEA için kalibrasyon grafiği



Şekil 6.1.7. Farklı konsantrasyonlardaki ZEA standartlarının kromatogram çakıştırması

Mikotoksinlerin analizlerine ilişkin LOD, LOQ ve geri kazanım değerleri Tablo 6.1.1’de verildi. Toksin içermeyen numunelerden elde edilen SİT, DON ve ZEA’nın geri kazanım değerleri sırasıyla %97,2, %96,6 ve %99,9 olarak belirlendi. Türk Gıda Kodeksi (TGK)’nin “Gıdalardaki Mikotoksin Seviyelerinin Resmi Kontrolü için Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği (Tebliğ No:2018/10)”ne (237) göre performans kriterleri açısından değerlendirildiğinde, geri kazanım değerlerimizin SİT, DON ve ZEA için sırasıyla %70-120, %60-100 ve %60-120 aralığını karşıladığı saptandı. Bu sonuçlar SİT, DON ve ZEA için geri kazanım düzeylerinin TGK’nın analiz metodu kriterlerine uygun olduğunu ortaya koydu.

Tablo 6.1.1. İncelenen üç mikotoksinin LOD, LOQ ve geri kazanım değerleri

Toksin	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Geri kazanım (%)
SİT	0,003	0,008	96,6
DON	0,002	0,005	97,2
ZEA	0,007	0,022	99,9

DON: deoksinivalenol, SİT: sitrinin, ZEA: zearalenon.

6.2. Arı Ürünleri Numunelerinde SİT Varlığı ve Düzeyi

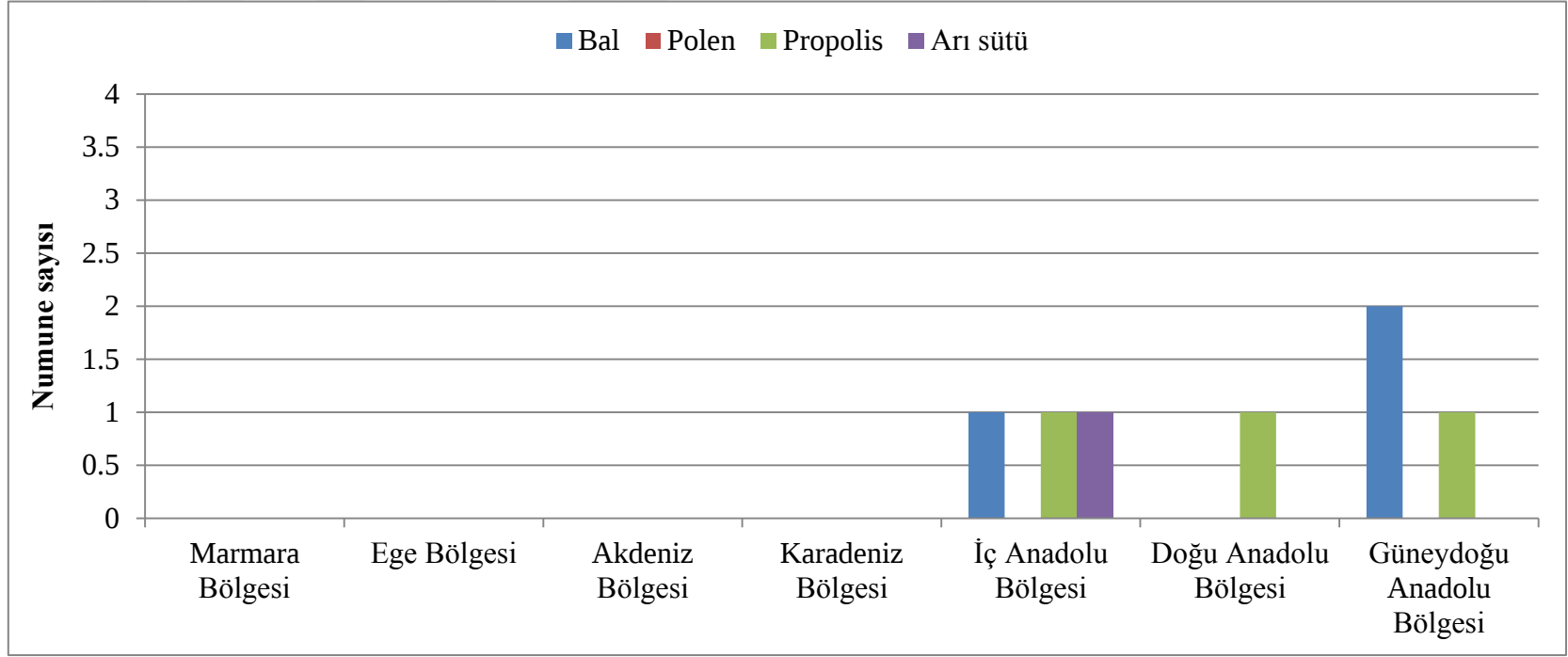
Türkiye'nin yirmi sekiz farklı ilinden satın alınan arı ürünlerinde tespit edilen SİT kontaminasyonu harita üzerinde gösterildi (Şekil 6.2.1). Bal, polen, propolis ve arı sütü numunelerindeki SİT varlığı bölge bazlı incelendiğinde, Marmara, Ege, Akdeniz ve Karadeniz Bölgeleri'nde SİT tespit edilmezken, İç Anadolu Bölgesi'nde sadece Ankara ilinde SİT saptanmadı. İç Anadolu Bölgesi'ndeki diğer iller değerlendirildiğinde, Kayseri'de bal, Konya'da propolis, Sivas'ta ise arı sütü numunesinde SİT kontaminasyonu belirlendi. Doğu Anadolu Bölgesi'nde sadece Ağrı ilinin propolis numunesinde SİT'e rastlanıldı. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde ise Adıyaman ve Şanlıurfa'da SİT varlığı görülmezken, Siirt'te bal ve propolis, Gaziantep'te ise yalnızca bal numunesinde SİT belirlendi (Şekil 6.2.1 ve Şekil 6.2.2).

Tablo 6.2.1'de arı ürünleri numunelerinin HPLC-UV ile SİT analiz sonuçlarına ait değerler her bir arı ürünü grubu için ayrı ayrı gösterildi. Ortalama SİT konsantrasyonu LOD düzeyinin altında olduğu saptanan arı ürünlerinin konsantrasyon değerleri tabloda “<LOD” olarak ifade edildi. Arı ürünleri arasında kıyaslama yapıldığında, bal ve propolis numunelerinin polen ve arı sütü numunelerine göre daha fazla SİT kontaminasyona maruz kaldığı belirlendi. Tüm polen numunelerinde SİT kontaminasyonu saptanmazken, sadece bir arı sütü numunesinde (Sivas) SİT (<LOD µg/kg) görüldü. Kontamine bal (Kayseri, Siirt, Gaziantep) ve propolis (Konya, Ağrı, Siirt) numunelerinde SİT miktarlarının tespit limitinin altında (<LOD µg/kg) olduğu belirlendi.



SİT

Şekil 6.2.1. Türkiye'nin farklı illerinden temin edilen arı ürünlerinde tespit edilen SİT kontaminasyonu. Renkli şekiller (sarı yıldız, kırmızı daire, yeşil kare ve mor üçgen) SİT tespit edilen arı ürünlerini temsil eder.



Şekil 6.2.2. Bölgelere göre SİT tespit edilen arı ürünlerinin dağılımı

Tablo 6.2.1. HPLC-UV analizi ile arı ürünlerinde tespit edilen SİT miktarları

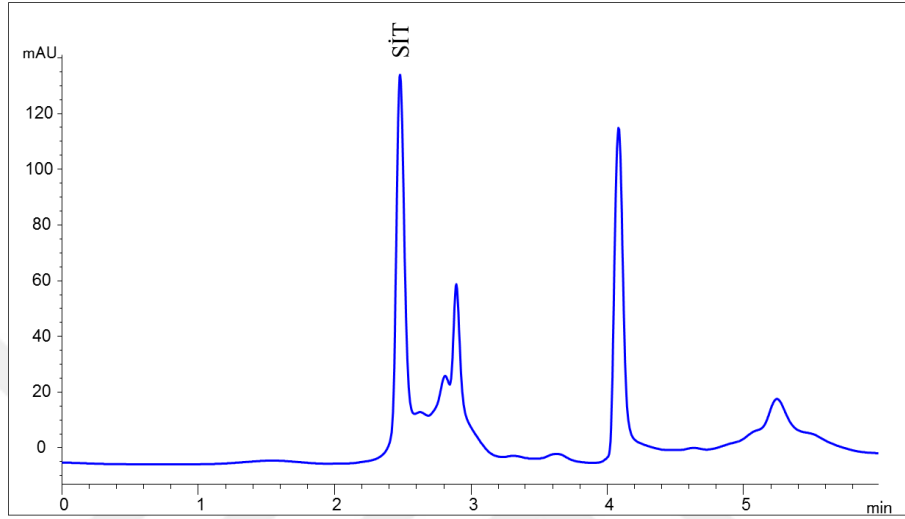
Bölgeler ve iller	SİT (µg/kg)			
	Bal	Polen	Propolis	Arı sütü
	(n = 28)	(n = 28)	(n = 28)	(n = 28)
	$\bar{X} \pm SH^*$	$\bar{X} \pm SH^*$	$\bar{X} \pm SH^*$	$\bar{X} \pm SH^*$
Marmara Bölgesi				
Balıkesir	TE	TE	TE	TE
Çanakkale	TE	TE	TE	TE
Edirne	TE	TE	TE	TE
Bursa	TE	TE	TE	TE
Ege Bölgesi				
Muğla	TE	TE	TE	TE
İzmir	TE	TE	TE	TE
Aydın	TE	TE	TE	TE
Afyonkarahisar	TE	TE	TE	TE
Akdeniz Bölgesi				
Kahramanmaraş	TE	TE	TE	TE
Antalya	TE	TE	TE	TE
Mersin	TE	TE	TE	TE
Hatay	TE	TE	TE	TE
İç Anadolu Bölgesi				
Ankara	TE	TE	TE	TE
Kayseri	<LOD	TE	TE	TE
Konya	TE	TE	<LOD	TE
Sivas	TE	TE	TE	<LOD
Doğu Anadolu Bölgesi				
Van	TE	TE	TE	TE
Muş	TE	TE	TE	TE
Erzurum	TE	TE	TE	TE
Ağrı	TE	TE	<LOD	TE
Karadeniz Bölgesi				
Artvin	TE	TE	TE	TE
Tokat	TE	TE	TE	TE
Kastamonu	TE	TE	TE	TE
Ordu	TE	TE	TE	TE
Güneydoğu Anadolu Bölgesi				
Siirt	<LOD	TE	<LOD	TE
Adıyaman	TE	TE	TE	TE
Şanlıurfa	TE	TE	TE	TE
Gaziantep	<LOD	TE	TE	TE

TE: Tespit edilemedi, SİT: sitrinin

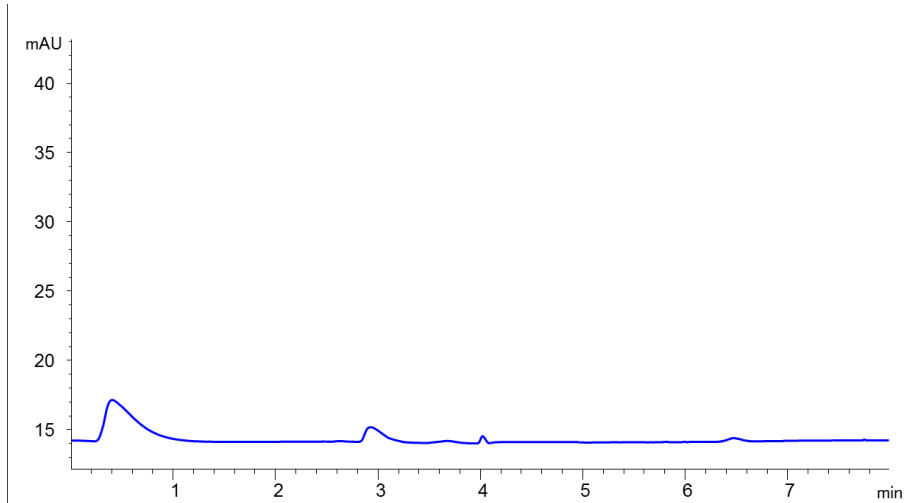
Değerler ortalama ($\bar{X}$) ± standart hata (SH) olarak verildi.

* SH değerleri ≤ 0,0001 olduğu için tabloda gösterilmedi.

Arı ürünlerinde SİT kontaminasyonunun görselleştirilmesi ve anlaşılması amacıyla, kontaminasyona maruz kalmış bir propolis numunesine ait HPLC-UV kromatogramı Şekil 6.2.3’da, SİT içermeyen bir polen numunesine ait HPLC-UV blank kromatogramı ise Şekil 6.2.4’de verildi.



Şekil 6.2.3. SİT kontaminasyonuna maruz kalmış bir propolis numunesine ait HPLC-UV kromatogramı

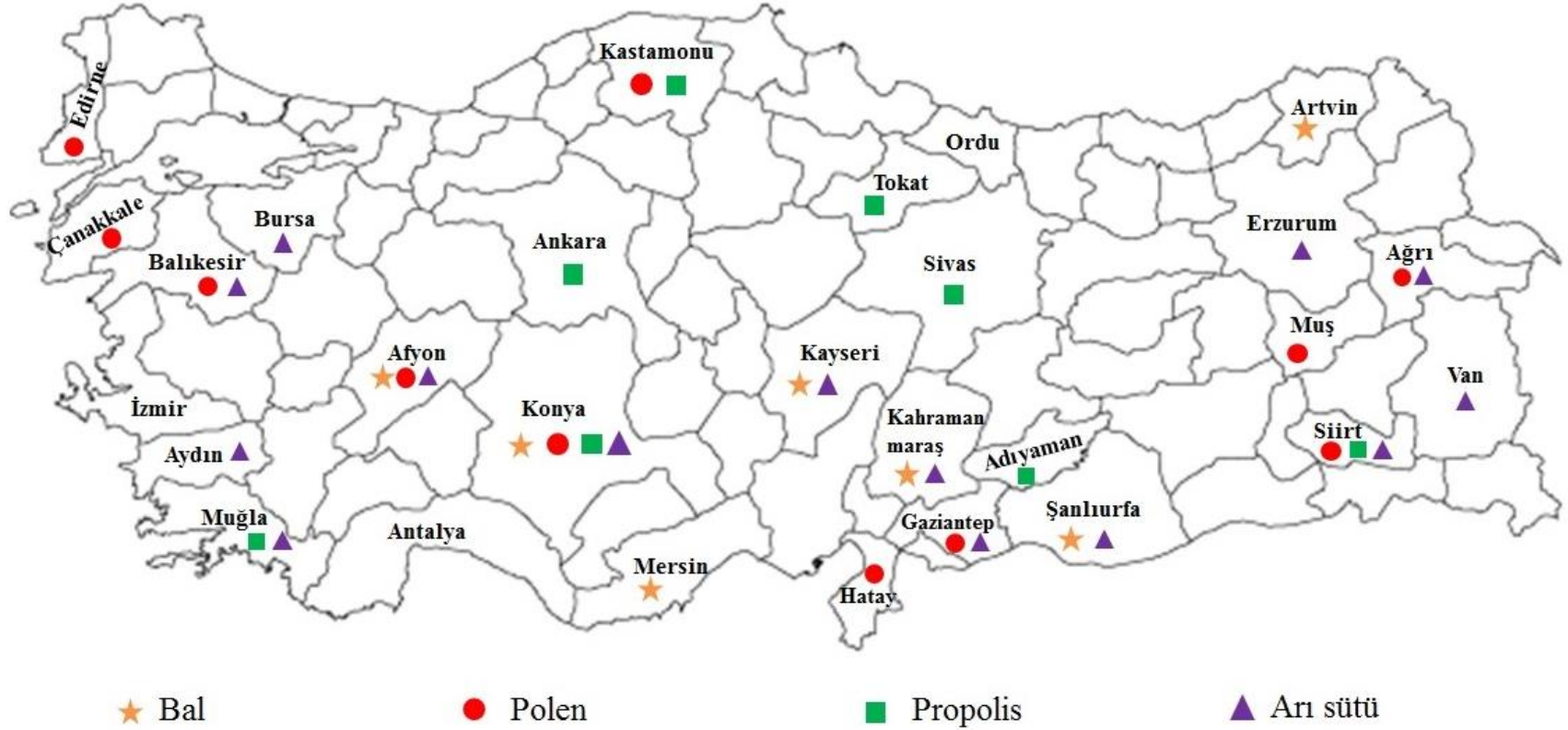


Şekil 6.2.4. SİT içermeyen bir polen numunesine ait HPLC-UV kromatogramı

6.3. Arı Ürünleri Numunelerinde DON Varlığı ve Düzeyi

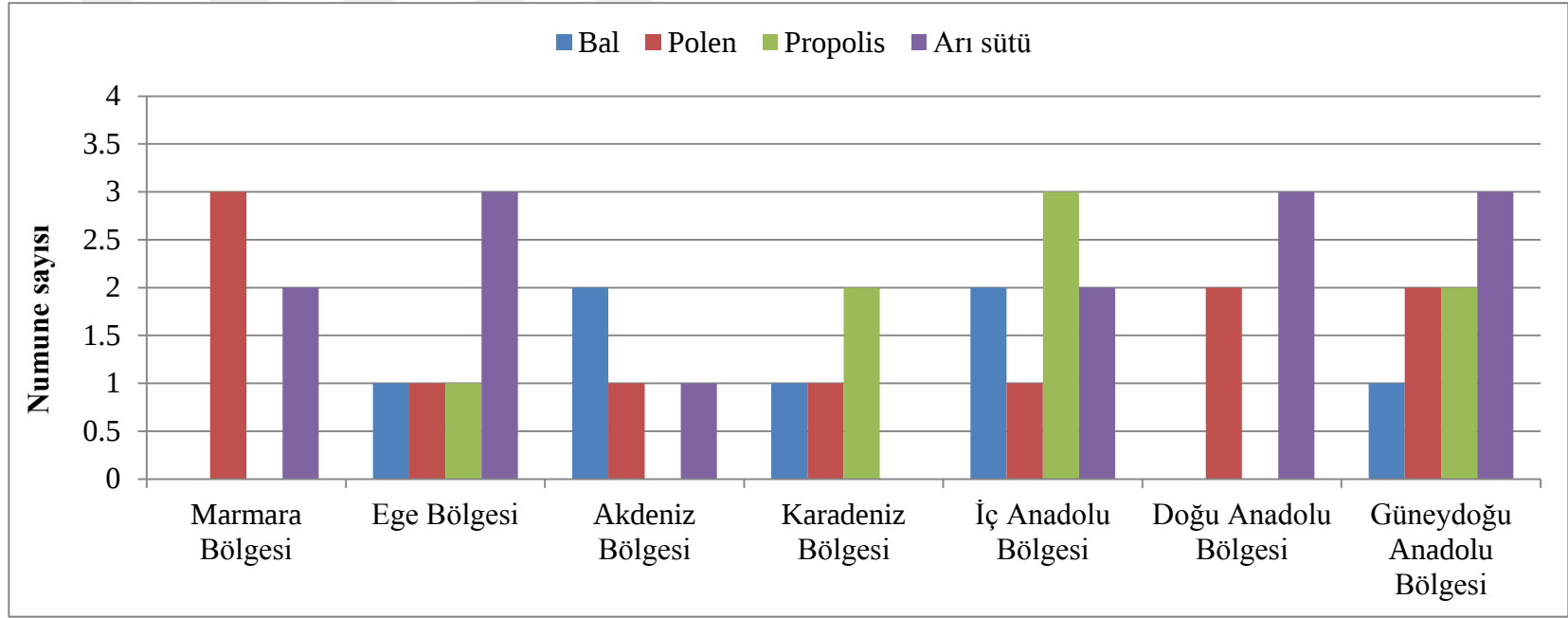
Türkiye'nin yirmi sekiz farklı ilinden satın alınan arı ürünlerinde tespit edilen DON kontaminasyonu harita üzerinde gösterildi (Şekil 6.3.1). Bal, polen, propolis ve arı sütü numunelerindeki DON varlığı bölge bazlı incelendiğinde, her bölgedeki en az bir ilde DON konsantaminasyonu belirlendi. Marmara Bölgesi'nde en sık polen, Ege, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde arı sütü, Akdeniz Bölgesi'nde bal, İç Anadolu ve Karadeniz Bölgesi'nde ise en sık propolis numunelerinde DON saptandı. Marmara ve Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki sadece bal ve propolis numunelerinde DON tespit edilmedi. İzmir, Antalya ve Ordu'nun tüm arı ürünlerinde DON görülmezken, sadece Konya ilinden satın alınan arı ürünlerinin tamamında DON kontaminasyonu saptandı (Şekil 6.3.1 ve Şekil 6.3.2)

Tablo 6.3.1'de arı ürünleri numunelerinin HPLC-UV ile DON analiz sonuçlarına ait değerler her bir arı ürünü için ayrı olarak gösterildi. Ortalama DON konsantrasyonu LOD düzeyinin altında olduğu saptanan arı ürünlerinin konsantrasyon değerleri tabloda “<LOD” olarak ifade edildi. Arı ürünleri arasında kıyaslama yapıldığında, propolis numunelerinin diğer arı ürünleri numunelerine göre daha fazla DON kontaminasyona maruz kaldığı belirlendi. Ortalamalar açısından en yüksek ortalama DON konsantrasyonu 0,013 µg/kg ile propolis numunesinde (Siirt) saptandı.



DON

Şekil 6.3.1. Türkiye'nin farklı illerinden temin edilen arı ürünlerinde tespit edilen DON kontaminasyonu. Renkli şekiller (sarı yıldız, kırmızı daire, yeşil kare ve mor üçgen) DON tespit edilen arı ürünlerini temsil eder.



Şekil 6.3.2. Bölgelere göre DON tespit edilen arı ürünlerinin dağılımı

Tablo 6.3.1. HPLC-UV analizi ile arı ürünlerinde tespit edilen DON miktarları

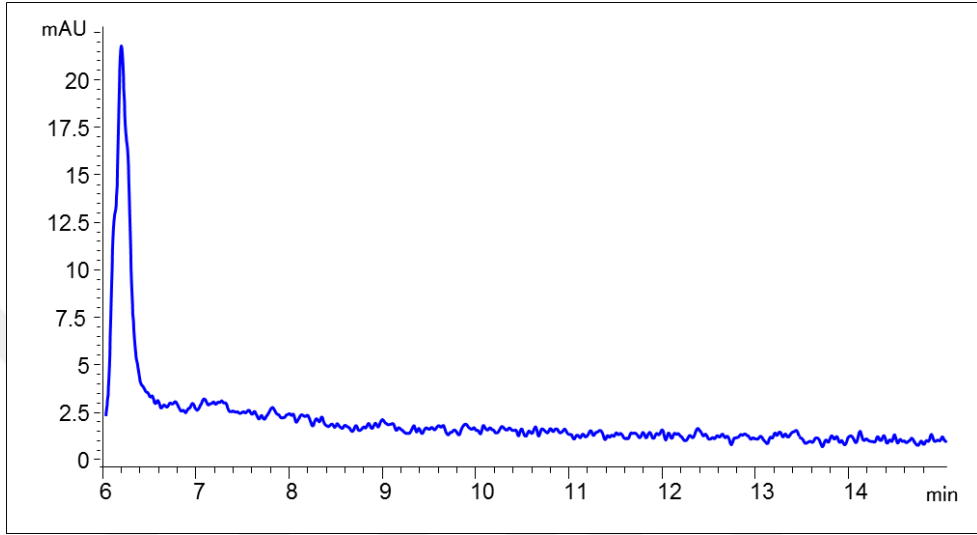
Bölgeler ve iller	DON (µg/kg)			
	Bal	Polen	Propolis	Arı sütü
	(n = 28)	(n = 28)	(n = 28)	(n = 28)
	$\bar{X} \pm SH^*$	$\bar{X} \pm SH^*$	$\bar{X} \pm SH^*$	$\bar{X} \pm SH^*$
Marmara Bölgesi				
Balıkesir	TE	<LOD	TE	<LOD
Çanakkale	TE	0,0021	TE	TE
Edirne	TE	0,0020	TE	TE
Bursa	TE	TE	TE	<LOD
Ege Bölgesi				
Muğla	TE	TE	0,0041	0,0021
İzmir	TE	TE	TE	TE
Aydın	TE	TE	TE	0,0020
Afyonkarahisar	<LOD	<LOD	TE	0,0022
Akdeniz Bölgesi				
Kahramanmaraş	0,0038	TE	TE	<LOD
Antalya	TE	TE	TE	TE
Mersin	<LOD	TE	TE	TE
Hatay	TE	<LOD	TE	TE
İç Anadolu Bölgesi				
Ankara	TE	TE	0,0069	TE
Kayseri	<LOD	TE	TE	<LOD
Konya	<LOD	<LOD	0,0067	0,0024
Sivas	TE	TE	0,0066	TE
Doğu Anadolu Bölgesi				
Van	TE	TE	TE	<LOD
Muş	TE	0,0036	TE	TE
Erzurum	TE	TE	TE	<LOD
Ağrı	TE	<LOD	TE	0,0021
Karadeniz Bölgesi				
Artvin	<LOD	TE	TE	TE
Tokat	TE	TE	0,0085	TE
Kastamonu	TE	<LOD	0,0054	TE
Ordu	TE	TE	TE	TE
Güneydoğu Anadolu Bölgesi				
Siirt	TE	<LOD	0,0130	0,0021
Adıyaman	TE	TE	0,0036	TE
Şanlıurfa	0,0022	TE	TE	0,0040
Gaziantep	TE	<LOD	TE	0,0030

DON: Deoksivalenol, TE: Tespit edilemedi.

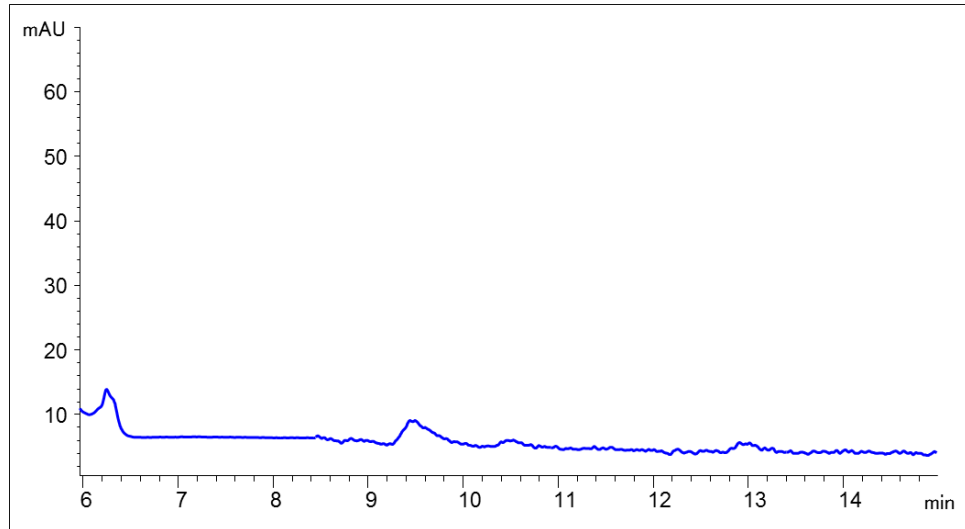
Değerler ortalama ($\bar{X}$) ± standart hata (SH) olarak verildi.

* SH değerleri ≤ 0,0001 olduğu için tabloda gösterilmedi.

Arı ürünlerinde DON kontaminasyonunun görselleştirilmesi ve anlaşılması amacıyla, kontaminasyona maruz kalmış bir polen numunesine ait HPLC-UV kromatogramı Şekil 6.3.3’da, DON içermeyen bir bal numunesine ait HPLC-UV blank kromatogramı ise Şekil 6.3.4’de verildi.



Şekil 6.3.3. DON kontaminasyonuna maruz kalmış bir polen numunesine ait HPLC-UV kromatogramı

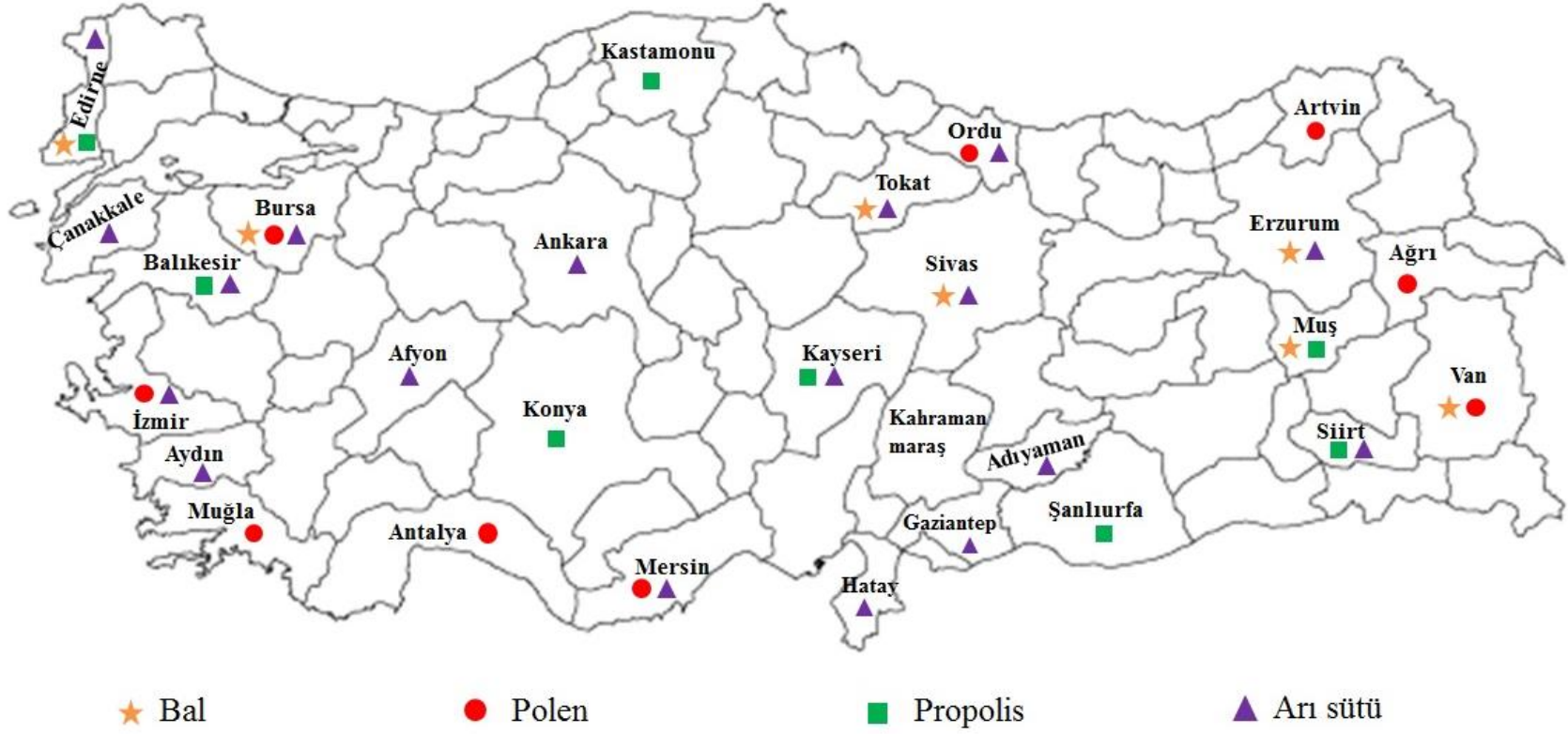


Şekil 6.3.4. DON içermeyen bir bal numunesine ait HPLC-UV kromatogramı

6.4. Arı Ürünleri Numunelerinde ZEA Varlığı ve Düzeyi

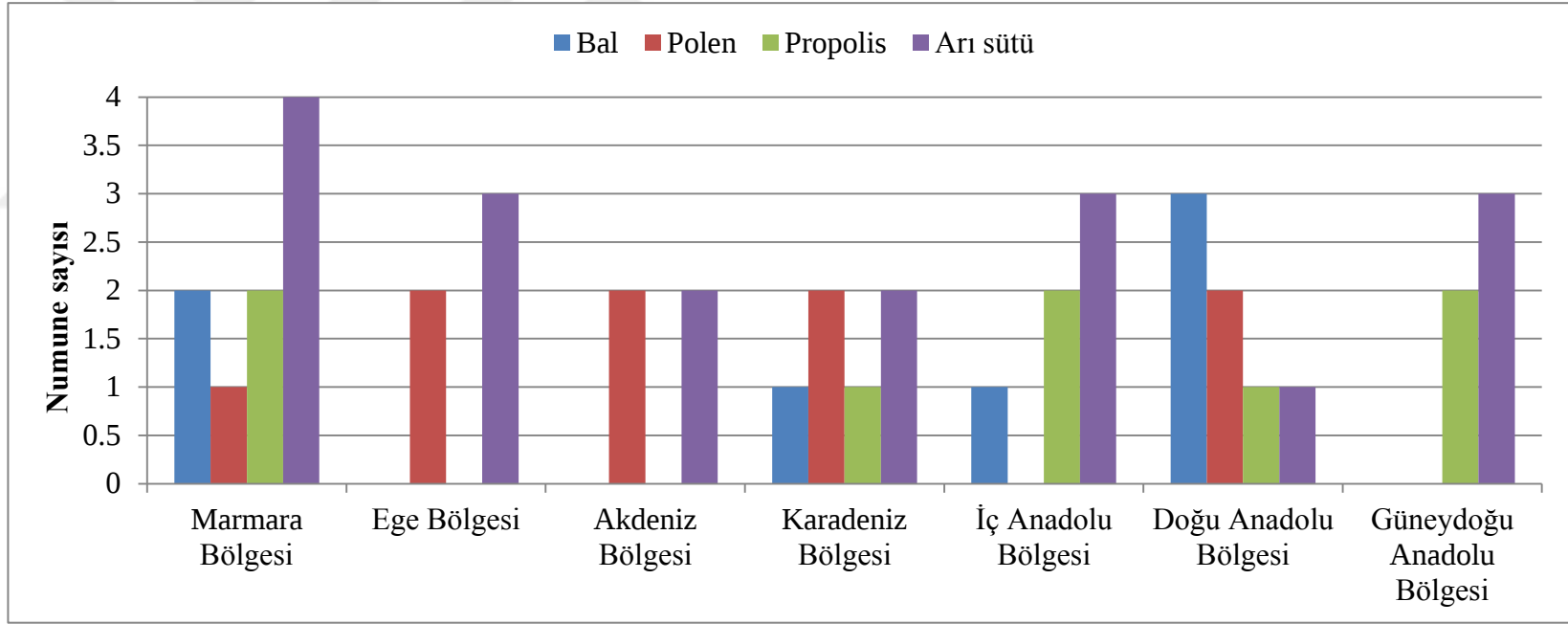
Türkiye'nin yirmi sekiz farklı ilinden satın alınan arı ürünlerinde saptanan ZEA kontaminasyonu harita üzerinde gösterildi (Şekil 6.4.1). Bal, polen, propolis ve arı sütü numunelerindeki ZEA varlığı bölge bazında incelendiğinde, yedi bölgeden temin edilen yirmi yedi ilin en az bir arı ürünü grubunda ZEA tespit edilirken, sadece Akdeniz Bölgesi'nde Kahramanmaraş ilinden satın alınan tüm arı ürünlerinde ZEA'ya rastlanmadı. Arı ürünü bazlı incelendiğinde, yedi bölgenin en az bir arı sütü numunesinde ZEA görüldü. Ege ve Akdeniz Bölgesi'nin bal ve propolis numunelerinde, İç Anadolu Bölgesi'nin polen numunelerinde, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nin ise bal ve polen numunelerinde ZEA saptanmadı (Şekil 6.4.1 ve Şekil 6.4.2)

Tablo 6.4.1'de arı ürünleri numunelerinin HPLC-UV ile ZEA analiz sonuçlarına ait değerler her bir arı ürünü grubu için ayrı ayrı gösterildi. Ortalama ZEA konsantrasyonu LOD düzeyinin altında olduğu saptanan arı ürünlerinin konsantrasyon değerleri tabloda “<LOD” olarak ifade edildi. Arı ürünleri arasında kıyaslama yapıldığında, polen ve arı sütü numunelerinin bal ve propolis numunelerine göre daha fazla ZEA kontaminasyona maruz kaldığı belirlendi. ZEA saptanan arı ürünleri numunelerinde belirlenen konsantrasyonlar tespit limitinin altında iken, sadece Aydın ilinden satın alınan arı sütü numunesinde ZEA miktarının tespit limitinin üzerinde (0,0094 µg/kg) olduğu görüldü.



ZEA

Şekil 6.4.1. Türkiye'nin farklı illerinden temin edilen arı ürünlerinde tespit edilen ZEA kontaminasyonu. Renkli şekiller (sarı yıldız, kırmızı daire, yeşil kare ve mor üçgen) ZEA tespit edilen arı ürünlerini temsil eder.



Şekil 6.4.2. Bölgelere göre ZEA tespit edilen arı ürünlerinin dağılımı

Tablo 6.4.1. HPLC-UV analizi ile arı ürünlerinde tespit edilen ZEA miktarları

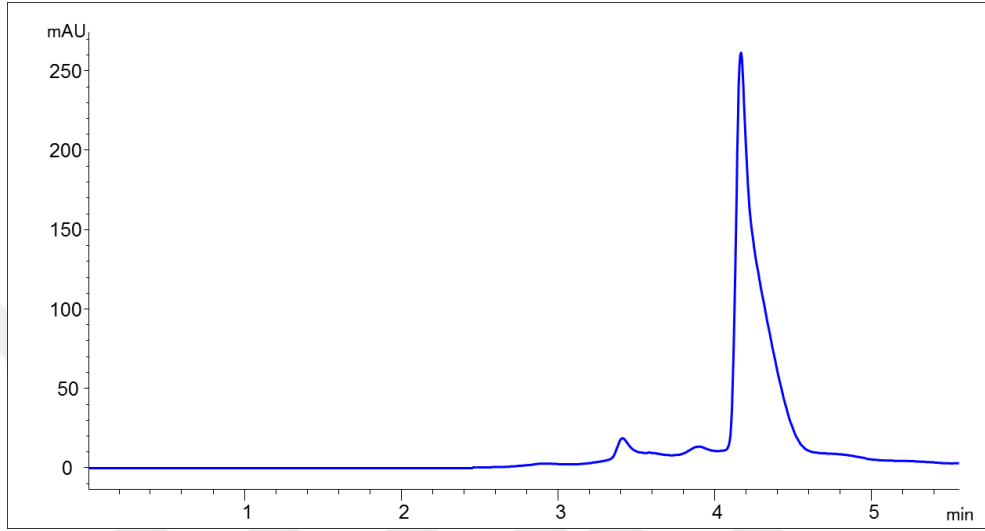
Bölgeler ve iller	ZEA (µg/kg)			
	Bal	Polen	Propolis	Arı sütü
	(n = 28)	(n = 28)	(n = 28)	(n = 28)
	$\bar{X} \pm SH^*$	$\bar{X} \pm SH^*$	$\bar{X} \pm SH^*$	$\bar{X} \pm SH^*$
Marmara Bölgesi				
Balıkesir	TE	TE	<LOD	<LOD
Çanakkale	TE	TE	TE	<LOD
Edirne	<LOD	TE	<LOD	<LOD
Bursa	<LOD	<LOD	TE	<LOD
Ege Bölgesi				
Muğla	TE	<LOD	TE	TE
İzmir	TE	<LOD	TE	<LOD
Aydın	TE	TE	TE	0,0094
Afyonkarahisar	TE	TE	TE	<LOD
Akdeniz Bölgesi				
Kahramanmaraş	TE	TE	TE	TE
Antalya	TE	<LOD	TE	TE
Mersin	TE	<LOD	TE	<LOD
Hatay	TE	TE	TE	<LOD
İç Anadolu Bölgesi				
Ankara	TE	TE	TE	<LOD
Kayseri	TE	TE	<LOD	<LOD
Konya	TE	TE	<LOD	TE
Sivas	<LOD	TE	TE	<LOD
Doğu Anadolu Bölgesi				
Van	<LOD	<LOD	TE	TE
Muş	<LOD	TE	<LOD	TE
Erzurum	<LOD	TE	TE	<LOD
Ağrı	TE	<LOD	TE	TE
Karadeniz Bölgesi				
Artvin	TE	<LOD	TE	TE
Tokat	<LOD	TE	TE	<LOD
Kastamonu	TE	TE	<LOD	TE
Ordu	TE	<LOD	TE	<LOD
Güneydoğu Anadolu Bölgesi				
Siirt	TE	TE	<LOD	<LOD
Adıyaman	TE	TE	TE	<LOD
Şanlıurfa	TE	TE	<LOD	TE
Gaziantep	TE	TE	TE	<LOD

TE: Tespit edilemedi, ZEA: Zearalenon.

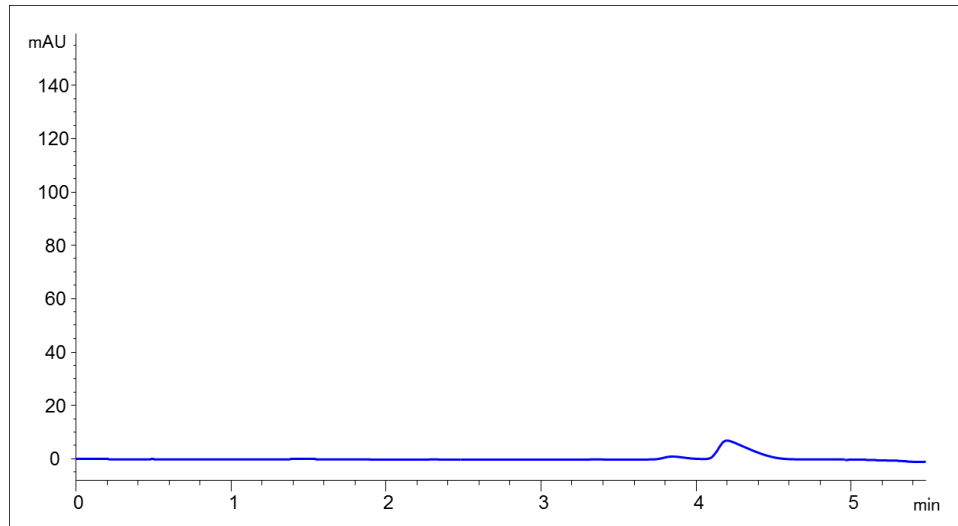
Değerler ortalama ($\bar{X}$) ± standart hata (SH) olarak verildi.

* SH değerleri ≤ 0,0001 olduğu için tabloda gösterilmedi.

Arı ürünlerinde ZEA kontaminasyonunun görselleştirilmesi ve anlaşılması amacıyla, kontaminasyona maruz kalmış bir arı sütü numunesine ait HPLC-UV kromatogramı Şekil 6.4.3’de, ZEA içermeyen bir polen numunesine ait HPLC-UV blank kromatogramı ise Şekil 6.4.4’de verildi.



Şekil 6.4.3. ZEA kontaminasyonuna maruz kalmış bir arı sütü numunesine ait HPLC-UV kromatogramı



Şekil 6.4.4. ZEA içermeyen bir polen numunesine ait HPLC-UV kromatogramı

6.5. Arı Ürünleri Numunelerinde SİT, DON ve ZEA Kontaminasyon Sıklığı ve Ortalama Değerleri

Bal, polen, propolis, arı sütü ve toplam arı ürünlerindeki ortalama mikotoksin konsantrasyon değerleri Tablo 6.5.1’de gösterilmiştir. Ortalama SİT, DON ve ZEA konsantrasyonu LOD düzeyinin altında olduğu saptanan arı ürünlerinin ortalama konsantrasyon değerleri tabloda “<LOD” olarak ifade edildi ve genel ortalama hesaplamasına dahil edilmedi.

Tüm arı ürünlerinin ortalama DON ve ZEA değerleri sırasıyla 0,0041 µg/kg ve 0,0094 µg/kg olarak belirlendi. Bu değerlerin DON ve ZEA için belirlenen tespit limiti düzeylerinin üzerinde olduğu saptanmıştır. Tüm arı ürünlerindeki ortalama SİT konsantrasyonu LOD değerinin altında idi. Tüm numunelerin %79,5’inde en az bir mikotoksin tespit edilirken, en sık saptanan mikotoksinler ZEA (%37,5) ve DON (%35,7) olarak belirlendi.

Bal ve propolis numunelerinin sadece tespit limiti üzerinde bir konsantrasyon ile DON kontaminasyonuna maruz kaldığı belirlendi ve kontaminasyon sıklığı bal için %25 iken, propolis numunelerinde bu sıklık %28,6 idi. Bal numunelerinde ortalama DON, SİT ve ZEA konsantrasyonlarının sırasıyla 0,0030 µg/kg, <LOD ve <LOD olduğu görüldü. Benzer durum propolis numunelerinde de saptanmış olup DON, SİT ve ZEA konsantrasyonları sırasıyla 0,0069 µg/kg, <LOD ve <LOD idi. Polen numunelerinde SİT tespit edilmezken, bu numunelerin en fazla DON (%39,3) mikotoksini ile kontamine olduğu belirlendi. Polenlerde ZEA miktarı ise LOD değerinin altında idi. Arı sütü numunelerinde, analiz edilen tüm mikotoksinlerin varlığı görülse de, sadece SİT konsantrasyonu LOD değerinin altında tespit edildi. En sık saptanan mikotoksin ise ZEA (%64,3) olup, sadece bir arı sütü numunesinde ZEA kontaminasyonu tespit limitinin üzerinde (0,0094 µg/kg) idi. ZEA’dan sonra bu numunelerde 0,0025 µg/kg’lık bir konsantrasyon ile tespit limitinin üzerinde belirlenen mikotoksin ise DON idi.

Tablo 6.5.1. Arı ürünlerinde tespit edilen mikotoksinlerin kontaminasyon sıklığı ve konsantrasyon değerleri

		Arı ürünleri				
		Bal	Polen	Propolis	Arı sütü	Toplam
		(n = 28)	(n = 28)	(n = 28)	(n = 28)	(n = 112)
DON	Pozitif numune %, (n) [*]	25,0 (7)	39,3 (11)	28,6 (8)	50,0 (14)	35,7 (40)
	Ortalama (µg/kg) [†]	0,0030	0,0026	0,0069	0,0025	0,0041
	Min. - max. (µg/kg) [‡]	0,0022 – 0,0038	0,0020 – 0,0036	0,0036 – 0,0130	0,0020 – 0,0040	0,0020 – 0,0130
SİT	Pozitif numune %, (n) [*]	10,7 (3)	TE	10,7 (3)	3,6 (1)	25,0 (7)
	Ortalama (µg/kg) [†]	<LOD	TE	<LOD	<LOD	<LOD
	Min. - max. (µg/kg) [‡]	<LOD	TE	<LOD	<LOD	<LOD
ZEA	Pozitif numune %, (n) [*]	25,0 (7)	32,1 (9)	28,6 (8)	64,3 (18)	37,5 (42)
	Ortalama (µg/kg) [†]	<LOD	<LOD	<LOD	0,0094	0,0094
	Min. - max. (µg/kg) [‡]	<LOD	<LOD	<LOD	0,0094	0,0094

Tabloda “<LOD” gösterimi SİT ve ZEA için LOD değerlerinin sırasıyla 0,003 ve 0,007’den daha küçük olması durumunu ifade eder.

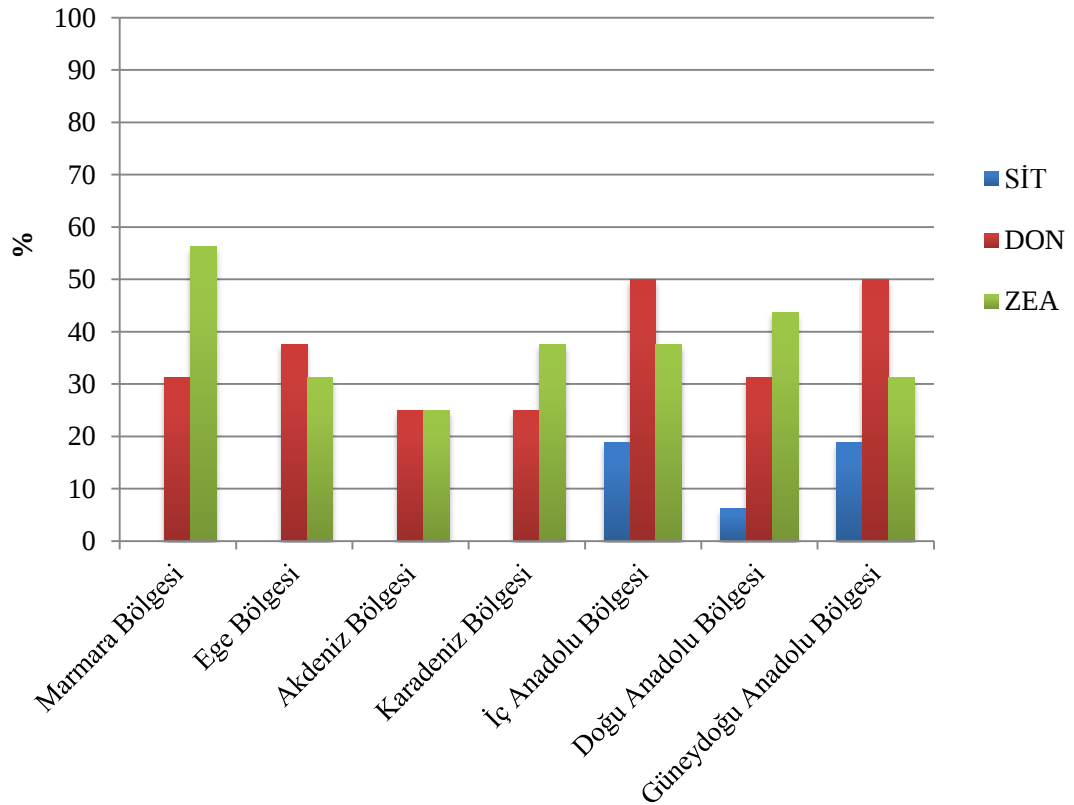
*DON, SİT ve ZEA için >LOD olarak belirlenen numune sayısı

†DON, SİT ve ZEA için >LOD olarak belirlenen numunelerin ortalama konsantrasyon değeri

‡DON, SİT ve ZEA için >LOD olarak belirlenen numunelerin minimum ve maksimum değeri

Tüm arı ürünlerinde saptanan mikotoksinlerin bölgelere göre dağılımları Şekil 6.5.1’de gösterilirken, bal, polen, propolis ve arı sütü numunelerinde analiz sonucu tespit edilen üç mikotoksinin arı ürünü gruplarında bölge bazlı dağılımı Şekil 6.2.2, 6.3.2 ve Şekil 6.4.2’de verildi.

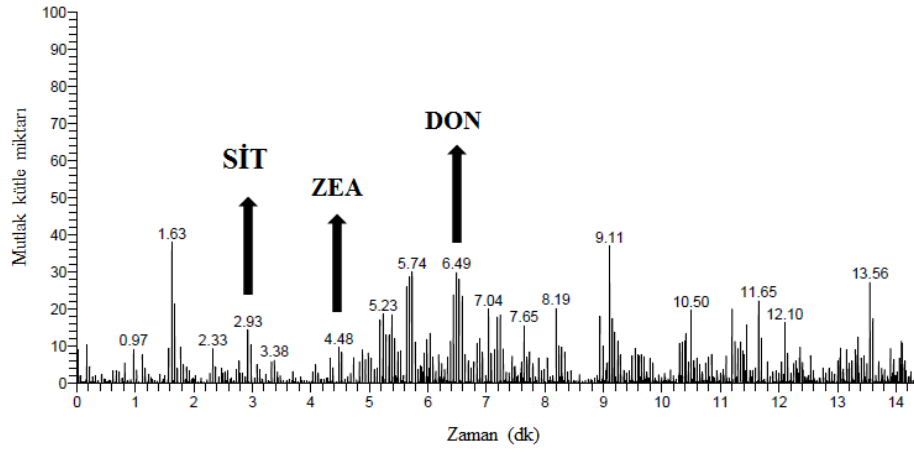
Şekil 6.5.1’de dağılımlar belirlenirken, her bir bölgedeki dört ilden satın alınan toplam arı ürünleri ele alındı ve LOD değerinin altında tespit edilen tüm numuneler dağılıma dahil edildi. Bunun sonucunda bölgelere göre arı ürünlerinde mikotoksin bulunma sıklığı şu şekilde sıralanabilir: Marmara Bölgesi: ZEA > DON (SİT tespit edilmedi); Ege Bölgesi: DON > ZEA (SİT tespit edilmedi); Akdeniz Bölgesi: DON=ZEA (SİT tespit edilmedi); Karadeniz Bölgesi: ZEA > DON (SİT tespit edilmedi); İç Anadolu Bölgesi: DON > ZEA > SİT; Doğu Anadolu Bölgesi: ZEA > DON > SİT; Güneydoğu Anadolu Bölgesi: DON > ZEA > SİT.



Şekil 6.5.1. Bölgelere göre tüm arı ürünlerinde saptanan mikotoksinlerin dağılımları

6.6. Arı Ürünlerinde LC/MS-MS Konfirmasyonu

HPLC-UV ile analiz sonrası SİT, DON ve ZEA tespit edilen pozitif numuneler dış laboratuvara gönderilerek LC-MS/MS analizi ile konfirme edildi. Arı ürünlerinde tespit edilen üç mikotoksini temsil eden MS kromatogram örneği Şekil 6.6.1’de verildi.



Şekil 6.6.1. Bir propolis numunesinde tespit edilmiş üç mikotoksini temsil eden MS kromatogramı

6.7. Arı Ürünlerinde SİT, DON ve ZEA Açısından Diyetset Maruziyet Analizi ve Risk Değerlendirmesi

Bal, polen, propolis ve arı sütü numunelerinde SİT, DON ve ZEA'nın tahmini LB, MB ve UB düzeylerindeki konsantrasyonları ile bu arı ürünlerini tüketen yetişkin bireylerin bu üç mikotoksin için tahmini günlük alımları LB, MB ve UB düzeyinde hesaplandı ve sırasıyla Tablo 6.7.1, Tablo 6.7.2 ve Tablo 6.7.3'de verildi. Bal, propolis ve arı sütü tüketen yetişkinlerin SİT için tahmini günlük MB alımları sırasıyla 0,033 ng/kg vücut ağırlığı/gün, 0,000118 ng/kg vücut ağırlığı/gün ve 0,000105 ng/kg vücut ağırlığı/gün idi. DON için tahmini günlük MB alımları 0,000199 - 0,046 ng/kg vücut ağırlığı/gün aralığında belirlendi. Tahmini günlük ZEA MB alımları ise 0,000398 - 0,1145 ng/kg vücut ağırlığı/gün aralığında olduğu saptandı.

Tablo 6.7.1, Tablo 6.7.2 ve Tablo 6.7.3'de gösterilen, arı ürünlerinin tüketimine bağlı mikotoksin maruziyeti ve bu maruziyetten kaynaklanan sağlık riski değerlendirmesine göre her bir arı ürünü grubunda SİT, DON ve ZEA için hesaplanan MoE değeri 10,000'in üzerinde idi.

Tablo 6.7.1. Arı ürünleri tüketimi ile SİT’e diyetel maruziyet analizi ve risk değerlendirmesi

	Arı ürünleri			
	Bal (n = 28)	Polen (n = 28)	Propolis (n = 28)	Arı sütü (n = 28)
Toksin konsantrasyonu (ng/g)				
MB [†]	0,001	-	0,001	0,001
LB-UB [‡]	0 – 0,002		0 – 0,002	0 – 0,002
Tüketim (g/gün)	2,5	0,023	0,009	0,008
SİT	EDI (ng/kg v.a./gün)			
	MB	-	1,18 x 10 ⁻⁴	1,05 x 10 ⁻⁴
	LB-UB	0 – 0,065	0 – 2,36 x 10 ⁻⁴	0 – 2,09 x 10 ⁻⁴
	BMDL ₁₀ (ng/kg v.a./ gün) ^a	48,000	48,000	48,000
	MoE ^b	>10,000	>10,000	>10,000

BMDL₁₀: %10 ekstra riskle ilgili kıyaslama dozu alt limiti, EDI: tahmini günlük alım, LB:tahmini alt sınır, MB:tahmini orta sınır, MoE: maruziyet marjı, SİT: sitrinin, UB: tahmini üst sınır, v.a.: vücut ağırlığı.

[†]MB: Konsantrasyon <LOD olanlar için ½ LOD değeri kullanıldı; Konsantrasyon <LOQ olanlar için ½ LOQ değeri kullanıldı.

[‡]LB: Konsantrasyon <LOD olanlar için “sıfır” değeri kullanıldı; Konsantrasyon <LOQ olanlar için LOD değeri kullanıldı.

UB: Konsantrasyon <LOD olanlar için LOD değeri kullanıldı; Konsantrasyon <LOQ olanlar için LOQ değeri kullanıldı.

^a SİT için BMDL₁₀ değeri = 48 µg/kg v.a./gün.

^b MoE değeri ≥ 10,000 olduğunda “sağlık açısından riskli değildir” anlamına gelir.

Tablo 6.7.2. Arı ürünleri tüketimi ile DON’a diyetssel maruziyet analizi ve risk değerlendirmesi

	Arı ürünleri			
	Bal (n = 28)	Polen (n = 28)	Propolis (n = 28)	Arı sütü (n = 28)
Toksin konsantrasyonu (ng/g)				
MB [†]	0,0014	0,0014	0,0093	0,0019
LB-UB [‡]	5,71 x 10 ⁻⁴ – 0,003	5,45 x 10 ⁻⁴ – 0,0028	0,0036 – 0,013	0,0011 – 0,0037
Tüketim (g/gün)	2,5	0,023	0,009	0,008
EDI (ng/kg v.a./gün)				
MB	0,046	4,21 x 10 ⁻⁴	0,0011	1,99 x 10 ⁻⁴
LB-UB	0,019 – 0,982	1,64 x 10 ⁻⁴ – 8,43 x 10 ⁻⁴	4,24 x 10 ⁻⁴ – 0,0015	1,15 x 10 ⁻⁴ – 3,87 x 10 ⁻⁴
BMDL ₁₀ (ng/kg v.a./ gün) ^a	210,000	210,000	210,000	210,000
MoE ^b	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000

BMDL₁₀: %10 ekstra riskle ilgili kıyaslama dozu alt limiti, DON: deoksinivalenol, EDI: tahmini günlük alım, LB:tahmini alt sınır, MB:tahmini orta sınır, MoE: maruziyet marjı, UB: tahmini üst sınır, v.a.: vücut ağırlığı.

[†] MB: Konsantrasyon <LOD olanlar için ½ LOD değeri kullanıldı; Konsantrasyon <LOQ olanlar için ½ LOQ değeri kullanıldı.

[‡] LB: Konsantrasyon <LOD olanlar için “sıfır” değeri kullanıldı; Konsantrasyon <LOQ olanlar için LOD değeri kullanıldı.

UB: Konsantrasyon <LOD olanlar için LOD değeri kullanıldı; Konsantrasyon <LOQ olanlar için LOQ değeri kullanıldı.

^a DON için BMDL₁₀ değeri = 210 µg/kg v.a./gün.

^b MoE değeri ≥ 10,000 olduğunda “sağlık açısından riskli değildir” anlamına gelir.

Tablo 6.7.3. Arı ürünleri tüketimi ile ZEA'ya diyetssel maruziyet analizi ve risk değerlendirmesi

	Arı ürünleri			
	Bal (n = 28)	Polen (n = 28)	Propolis (n = 28)	Arı sütü (n = 28)
Toksin konsantrasyonu (ng/g)				
MB [†]	0,0035	0,0035	0,0035	0,0038
LB-UB [‡]	0 – 0,007	0 – 0,007	0 – 0,007	3,88 x 10 ⁻⁴ – 0,0071
Tüketim (g/gün)	2,5	0,023	0,009	0,008
ZEA EDI (ng/kg v.a./gün)				
MB	0,1145	0,0011	4,12 x 10 ⁻⁴	3,98 x 10 ⁻⁴
LB-UB	0 – 0,2291	0 – 0,0021	0 – 8,25 x 10 ⁻⁴	4,06 x 10 ⁻⁵ - 7,43 x 10 ⁻⁴
BMDL ₁₀ (ng/kg v.a./ gün) ^a	6,390,000	6,390,000	6,390,000	6,390,000
MoE ^b	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000

BMDL₁₀: %10 ekstra riskle ilgili kıyaslama dozu alt limiti, EDI: tahmini günlük alım, LB:tahmini alt sınır, MB:tahmini orta sınır, MoE: maruziyet marjı, UB: tahmini üst sınır, v.a.: vücut ağırlığı, ZEA: zearalenon.

[†] MB: Konsantrasyon <LOD olanlar için ½ LOD değeri kullanıldı; Konsantrasyon <LOQ olanlar için ½ LOQ değeri kullanıldı.

[‡] LB: Konsantrasyon <LOD olanlar için “sıfır” değeri kullanıldı; Konsantrasyon <LOQ olanlar için LOD değeri kullanıldı.

UB: Konsantrasyon <LOD olanlar için LOD değeri kullanıldı; Konsantrasyon <LOQ olanlar için LOQ değeri kullanıldı.

^a ZEA için BMDL₁₀ değeri = 6,39 mg/ kg v.a./gün.

^b MoE değeri ≥ 10,000 olduğunda “sağlık açısından riskli değildir” anlamına gelir.

7. TARTIŞMA

Ekosistemin mikotoksinlerle kontamine olması, besinlerde birikime ve bunun sonucunda besin zincirinin kontaminasyonuna neden olmaktadır. Günümüzde gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde besinlerin ve yemlerin mikotoksin oluşumuna maruz kalması hem sağlık hem de ticari boyutta büyük bir endişe kaynağı olmuştur (7,111,112). Bu nedenle mikotoksin varlığını ve düzeylerini belirleyen çalışmalar hem gıda güvenliği hem de halk sağlığı açısından oldukça önemli bir yere sahiptir. Literatürde çoğunlukla tahıllar, tahıl bazlı besinler, yağlı tohumlar, baharatlar, kuru meyveler, süt ürünleri ve kahve gibi besinlerde sıklıkla aflatoksinler, fumonisinler, DON, okratoksin A, ZEA gibi başlıca mikotoksinlerin analizine ilişkin veriler yer almaktadır (5-7,11,12,36). Ancak bu çalışmalar incelendiğinde, günümüzde biyoindikatör olarak kabul edilen arı ürünlerinin geniş kapsamda ele alınmadığı görülmüştür. Bu nedenle çalışmamızda; bal, polen, propolis ve arı sütü olmak üzere dört arı ürünü grubunda mikotoksin bulunma olasılığı üzerinde durulmuş ve bu varsayım çalışmamızın amacını oluşturmuştur. HPLC yöntemi kullanılarak, Türkiye'nin yedi bölgesindeki yirmi sekiz farklı ilden temin edilen toplam 112 arı ürünü (bal, propolis, polen ve arı sütü; her bir grup için n=28) SİT, DON ve ZEA düzeylerinin belirlenmesi amacıyla yürütülen bu çalışmanın bulguları mevcut literatür ile karşılaştırılarak tartışılmıştır.

7.1. Arı Ürünlerinde SİT, DON, ZEA Mikotoksinlerinin Varlığı ve Düzeyleri

Mikotoksinler ağız, solunum sistemi veya deri gibi doğal bir yol aracılığıyla vücuda alındığında omurgalı canlılarda toksik etkiye neden olabilen bileşiklerdir. Mikotoksin kontaminasyonu gıda, tarım ve hayvancılık sektöründe küresel bir sorun olup, gıda güvenliği ve besin kalitesi konularının odak noktası haline gelmiştir (4,23). Toksik özellikleri ve toksisite dereceleri kimyasal yapılarına ve besinlerdeki konsantrasyonlarına göre değişen mikotoksinlerin sağlık üzerindeki toksik etkileri birbirlerinden oldukça farklıdır. Bu etkiler; karaciğer, böbrekler, gastrointestinal sistem, merkezi sinir sistemi ve bağışıklık sisteminde akut veya kronik hasarlardır (5,14-16,19,59,79). Bu olumsuz sağlık etkileri bilinmesine rağmen, mikotoksinlere maruz kalmak tüketiciler için halen bir tehlike olmaya devam etmektedir. Bu

nedenle, tükettiğimiz besinlerin hangi mikotoksinleri içerdiğini saptamak ve mikotoksinlerin besinlerde bulunabilecek kalıntı limitlerini belirlemek büyük önem taşır.

Ulusal ve uluslararası çalışmalar incelendiğinde, arı ürünlerinde mikotoksin kontaminasyonu ile ilgili az sayıda araştırma bulunduğu ve bunların yurtdışı orijinli olduğu belirlenmiştir. Arı ürünlerinde mikotoksin düzeylerinin belirlenmesine yönelik Türkiye’de gerçekleştirilen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sadece Sandıkçı Altunatmaz ve arkadaşları (238) tarafından İstanbul’daki farklı satıcılardan toplanan 12 polen örneğinin mikrobiyolojik kalitesi araştırılmış ve mikotoksin oluşumuna neden olan *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. ocraceus*), *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. melanochlorum*), *Alternaria* (*A. alternata*), *Trichothecium* (*T. roseum*) ve *Monascus* (*M. ruber*) küf türleri polen numunelerinde tespit edilmiştir. Çalışmamızda Türkiye’deki arı ürünlerinde mikotoksin varlığı ve düzeyleri ilk kez değerlendirilmiştir. Bulgularımız tüm arı ürünlerinin %79,5’inde en az bir mikotoksin varlığını gösterirken, en sık saptanan mikotoksinler ZEA (%37,5) ve DON (%35,7) olmuştur. Tüm arı ürünlerinde ortalama DON ve ZEA konsantrasyonlarının bu iki mikotoksin için belirlenen tespit limit düzeylerinin üzerinde olduğu saptanmış, ancak tüm arı ürünlerinde ortalama SİT konsantrasyonunun belirlenen LOD değerinin altında olduğu bulunmuştur. Arı ürünü grubu bazlı incelendiğinde, bal ve propolis numunelerinin sadece tespit limiti üzerinde bir konsantrasyon ile DON kontaminasyonuna maruz kaldığı, DON kontaminasyon sıklığının bal için %25, propolis için ise %28,6 olduğu belirlenmiştir. Arı sütü numunelerinde analiz edilen üç mikotoksinin varlığı görülse de sadece SİT kontaminasyonu tespit limitinin altındadır. Arı sütünde en sık saptanan mikotoksin ZEA (%64,3) olup sadece bir arı sütü numunesinde tespit limitinin üzerinde ZEA kontaminasyonu (0,0094 µg/kg) görülmüştür. Literatür taramasına göre, ulusal ve uluslararası kapsamda bal, propolis ve arı sütü numunelerinde gerçekleştirilen mikotoksin çalışmalarına rastlanmamıştır. Bu nedenle, diğer araştırmalar ile çalışmamızın bulguları arasında bir karşılaştırma yapılamamıştır. Böylece bal, propolis ve arı sütünde elde ettiğimiz bulgularımızın hem ulusal literatüre hem de “Birleşmiş Milletler Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri”nden biri olan “Gıda güvenliği” verilerine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Bal, propolis ve arı sütü numunelerinde elde ettiğimiz bulgularımızı karşılaştırabileceğimiz ulusal ve uluslararası çalışmalara rastlanılmamış olsa da mevcut literatürdeki sınırlı sayıda olan araştırmaların materyallerini sadece polen numuneleri oluşturmuştur. Bu çalışmaların hepsi uluslararası merkezlidir. İspanya’da yürütülen bir çalışmada, on beş polen numunesinde sekiz *Fusarium* toksini (DON, 3-asetildeoksinivalenol, fusarenon-X, diasetoksiscirpenol, nivalenol, neosolaniol, HT-2 toksin ve T-2 toksin) araştırılmış ve GC-MS/MS yöntemi ile analiz edilen on beş numuneden ikisinde yüksek konsantrasyonlarda neosolaniol (30 ve 22 µg/kg) ve nivalenol (~1 µg/kg) kontaminasyonu görülmüştür. Analiz edilen diğer mikotoksin konsantrasyonlarının ise her toksin için belirlenen tespit limitlerinin (LOD: 0,3-1,2 µg/kg) altında ölçüldüğü bildirilmiştir (239). Ancak İspanya’da gerçekleştirilen bir başka çalışmada, arıcılardan ve aktar dükkanından satın alınan toplam yirmi polen örneği, önceki çalışmadan farklı olarak HPLC-FLD ile aflatoksin (B1, B2, G1, G2) ve okratoksin A tespiti amacıyla analiz edilmiş ve polen örneklerinde mikotoksin kontaminasyonu görülmemiştir (240). Benzer sonuçlar Xue ve arkadaşları (241) tarafından Çin’de yürütülen çalışmada da ortaya konmuştur. Çin’nin kuzeyindeki yerel arıcılardan toplanan yirmi adet polen örneğinde aflatoksinler (B1, B2, G1, ve G2) ve okratoksin A farklı bir analiz yöntemi kullanılarak (LC-MS/MS) incelenmiş ve bu beş mikotoksinin tümü için LOD ve LOQ değerlerinin sırasıyla 0,01-0,05 µg/kg ve 0,25-0,5 µg/kg aralığında olduğu bildirilmiştir. Ancak tüm polen numunelerinde aflatoksinler (B1, B2, G1, ve G2) ve okratoksin A için ölçülebilir konsantrasyonlar belirlenmemiştir. Batı Slovakya’nın farklı bölgelerindeki üç arıcıdan toplanan kırk beş polen numunesinde (haşhaş, kolza ve ayçiçeği poleni olmak üzere üç grup; her grup için n=15) ise toplam aflatoksin, fumonisin, DON, T-2 toksin, okratoksin A ve ZEA mikotoksinleri ELISA ile analiz edilmiştir. Tüm numunelerde fumonisin hariç diğer mikotoksinler saptanmıştır. En yaygın görülen mikotoksinler haşhaş polenlerinde sırasıyla ZEA (356,6 µg/kg), DON (228,5 µg/kg) ve T-2 toksin (214,3 µg/kg) iken, kolza ve ayçiçeği polenlerinde bu sıralama T-2 toksin (231,3 µg/kg; 276 µg/kg), DON (229,9 µg/kg; 187,9 µg/kg) ve ZEA (159,4 µg/kg; 132,4 µg/kg) olarak değişmiştir. Ayrıca çalışmadaki tüm polen numunelerinde mikotoksin oluşumuna neden olan en yaygın mantar türleri araştırılmış ve numunelerin tümünde *Aspergillus* (baskın olarak *A. flavus*), *Fusarium* (*F.*

verticillioides ve *F. sporotrichoides*), *Alternaria* (*A. alternata*) ve *Penicillium* (*P. verrucosum*) türlerine ait mantarlar tespit edilmiştir (22). Benzer bulgular Gonzalez ve arkadaşları (242) tarafından yürütülen çalışmada görülmüştür. Polende mantar oluşumuna dikkat çekilen çalışmada, 87'sinin İspanya'dan, 3'ünün Arjantin'den temin edildiği toplam 90 adet tüketime hazır polen numunesi analiz edilmiştir. Numunelerde *P. verrucosum*, *A. niger* *agrega* (*A. niger* + *A. tubingensis*), *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. flavus*, *A. parasiticus* ve *Alternaria* suşları saptanmıştır. İzole edilen mantar türleri olarak *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *P. verrucosum* ve *A. niger* *agrega* izolatlarının sırasıyla %100, %53,3, %33,3 ve %25'inin okratoksin A; *A. niger* *agrega* izolatlarının %28,6'sının aflatoksin B1 ve %10'unun aflatoksin B2 üretimine neden olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmayı önceki çalışmadan farklı kılan etken kullanılan analiz yöntemi olup, analizler HPLC-FLD ile gerçekleştirilmiştir. Sırbistan'da ise ülkenin orta ve kuzeybatı bölgelerinden toplanan 26 polen numunesinin tamamında yüksek konsantrasyonlarda (ELISA; 3,15-17,32 µg/kg) aflatoksin B1 tespit edilmiş ve mikrobiyolojik olarak on numunede önceki çalışmalarla benzer olarak *Penicillium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus flavus* ve *Fusarium* türleri, farklı olarak ise *Mucor* sp., *Rhizopus* sp. ve *Trichoderma* sp. belirlenmiştir. Bu türlerin tümü potansiyel mikotoksin üreten mantarlardır (243). Son olarak, yakın tarihte İtalya'nın Toskana kentindeki yerel arıcılar, süpermarketler ve çiftçi pazarlarından toplanan 29 polen örneği üzerinde gerçekleştirilen çalışmada, ELISA ile DON ve toplam aflatoksin varlığı araştırılmış, tüm polenlerde aflatoksin tespit edilirken, 25 örnekte (%86,2) DON saptanmıştır (21). Tüm bu çalışmalar dikkate alındığında, polen numunelerinde elde ettiğimiz bulgularımızın literatürdeki çalışmalarla benzer ve farklı yönleri mevcuttur. Diğer ülkelerde gerçekleştirilen çalışmalarla kıyaslandığında, sadece Slovakya ve İtalya'daki sonuçlarla benzer şekilde polen numunelerimizin DON (%10,7) ve ZEA (<LOD) kontaminasyonuna maruz kaldığı belirlenmiştir. Ancak yaptığımız karşılaştırmalarda, diğer çalışmalardan farklı olarak polen numunelerimizde SİT varlığı araştırılmış ve analiz sonucunda SİT kontaminasyonu saptanmamıştır. Ülkemizde ise polen örneklerinde mikotoksin analizi ile ilgili bulgularımızı karşılaştırılabileceğimiz çalışmalar bulunmamaktadır. Literatürde ve çalışmamızdaki polen numunelerinde tespit edilen mikotoksinlerin varlığı, çalışmalarda gösterildiği gibi polen örneklerinden izole

edilen mantarların varlığı ile açıklanabilir. Ancak polenlerde ve aynı zamanda diğer arı ürünlerinde mikotoksin oluşumuna neden olan mantarlar ve bunların bazı koşullar altında mikotoksin üretme yetenekleri hakkında sınırlı sayıda veri olması ve arı ürünlerinde mikolojik analiz için özgün bir prosedür olmaması göz önüne alındığında, hem kendi bulgularımız ve hem de mevcut literatürdeki veriler ülkelere özgü ve/veya uluslararası otoriteler tarafından resmi bir prosedür gerekliliğini düşündürmektedir.

Çalışmamız ile yukarıda sonuçları verilen araştırmalar arasındaki farklılıkların analizleri gerçekleştirilen arı ürünlerinin temin edildiği ülkelerin farklı olması, her ülkenin kendine özgü coğrafi ve iklim koşulları, çalışılan polen numunelerinin fiziksel yapısı (taze, kurutulmuş, dondurulmuş vb.), ülkelerin tarımsal politikalarındaki farklılıklar (hasat ve depolama koşulları, hasat yöntemleri vb.) ve böcekler, arılar ve/veya rüzgar gibi çevresel faktörler aracılığıyla arı ürünlerinin çarpaz kontaminasyona maruz kalması gibi nedenlerden kaynaklabileceği düşünülmektedir. Örneğin, bilindiği üzere yüksek sıcaklık ve nem varlığı mikrobiyolojik aktiviteyi artırır. Besinlerin nem içeriği her ülke için farklı olmakla birlikte, ulusal düzenlemeler polendeki nem oranının kalitesini korumak ve raf ömrünü artırmak için %4-10 arasında olması gerektiğini ve kurutulmuş polenin nem içeriğinin %6'yı geçmesi durumunda polende kontaminasyona neden olabileceğini vurgulamaktadır (244). Ayrıca analiz edilen her bir mikotoksin türünün ve konsantrasyonlarının çalışmalar arasında farklılık göstermesi, mikotoksinlerin farklı küf türleri tarafından sentezlenmesi ve bu küf türlerinin her ülkede değişik oranlardaki varlığı ile açıklanabilir. Aynı zamanda kullandığımız analiz yöntemleri çalışma bulgularımızı diğer çalışmalardan farklı kılan bir faktör olarak gösterilebilir. Genel olarak literatürdeki araştırmalarda ELISA, GC-MS/MS ve HPLC-FLD gibi analiz yöntemleri kullanılırken, çalışmamızda arı ürünleri öncelikle HPLC-UV ile analiz edilmiş, ardından mikotoksin tespit edilen numuneler LC-MS/MS analitik yöntem ile doğrulanmıştır. Diğer araştırmalara kıyasla, çalışmamızda genel olarak arı ürünlerindeki SİT, DON ve ZEA kontaminasyonlarının oransal ve miktarsal olarak daha düşük konsantrasyonlarda dahi belirlenebilmesi, son yıllarda en hassas, seçici ve duyarlı olarak nitelendirilen iki analiz yönteminin (HPLC ve LC-MS/MS) birlikte kullanımına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda analizleri gerçekleştirilen arı ürünleri Türkiye'nin yedi farklı bölgesinde üretim yapan yerel arıcılardan temin edilmiştir. Bu nedenle, çalışmamızın sonuçları Türkiye'deki arı ürünlerinde mikotoksin kontaminasyonu hakkında bilgi vermesi açısından önemlidir. Bulgularımız arı ürünlerindeki mikotoksin çeşitliliğinin Türkiye'nin bölgelerine göre farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Diğer bölgelere kıyasla Marmara, Karadeniz ve Doğu Anadolu Bölgelerinde ZEA kontaminasyonu daha yüksek iken, Ege, İç Anadolu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerindeki arı ürünlerinde DON kontaminasyonunun baskın olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Marmara, Ege ve Akdeniz Bölgelerinden temin edilen arı ürünlerinde SİT tespit edilmemiştir. Bölgeler arasında ortaya çıkan bu farklılıklar, numunelerin temin edildiği her bölgenin ve hatta her ilin kendine has bitki örtüsü, iklim koşulları (yağış durumu, sıcaklık, nem oranı vb.), numunelerin toplanma ve depolanma koşulları ile süreleri arasındaki farklılıklar gibi faktörlerden kaynaklanabilir. Aynı zamanda her bir arı ürünü grubunun (bal, polen, propolis ve arı sütü) farklı üreticiler tarafından farklı hasat ve işleme yöntemlerine maruz kalması, üreticilerin ve hasat-işleme-depolama ortamlarının hijyeninden büyük olasılıkla etkilendiği, tüm bu aşamalarda çapraz kontaminasyona maruz kalabileceği düşünülmektedir.

7.2. Arı ürünlerinde Diyetel Maruziyet ve Risk Değerlendirmesi

Bilindiği üzere mikotoksinler sağlık için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. İnsanlar için mikotoksinlere maruz kalmanın ana kaynağı, mikotoksinlerle kontamine olmuş besinlerin diyet yoluyla alınmasıdır. Dünya genelinde insanlar, özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki kırsal alanlarda yaşayan nüfus yerel olarak üretilen yiyeceklerle beslenmektedir. Bu yerel besinlerin başında gelen arı ürünleri geçmişten bugüne günlük beslenmemizde yer almakta ve bu besinler sağlık açısından çok önemli besin değerleri içermektedir. Birçok hastalığa karşı bağışıklık sistemini güçlendirmek isteyen yetişkinler arı ürünlerini sıklıkla tercih etmektedir. Ek olarak ebeveynler çocuklarının gelişimini ve bağışıklığını desteklemek amacı ile çocuklarının günlük beslenmelerinde arı ürünlerine yer vermektedir. Özellikle son yıllarda COVID-19 gibi bulaşıcı viral hastalıkların ön plana çıkması nedeniyle arı ürünlerinin hem yetişkinler hem de çocuklar tarafından yaygın bir şekilde tüketildiği

görülmüştür. Dolayısıyla arı ürünlerini tüketen çocuk ve yetişkinlerin herhangi bir veya birden fazla mikotoksini vücuda alıp almadığı halen belirsizliğini korumaktadır.

Günümüzde mikotoksin maruziyeti ve risk değerlendirmesi için kullanılan en yaygın yöntem MoE yaklaşımıdır. Bu yöntem halk sağlığının korunmasına yönelik önlemlerin uygulanmasında önceliklerin belirlenmesine hizmet eder. Gözlemlenebilir yan etkisi olmayan mikotoksin düzeyi ile besinde saptanan mikotoksin konsantrasyon değerleri arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Bu yaklaşım bir ilişkiyi ortaya koyduğu için MoE boyutsuz bir sayı olup, MoE değerinin $\geq 10,000$ olması sağlık açısından bir risk oluşmadığının göstergesi iken, bu değer $< 10,000$ olması hem bireysel hem de toplumsal sağlık açısından potansiyel bir risk oluşabileceğini ifade etmektedir (36,91,235).

Çeşitli besinlerin tüketimine bağlı olarak mikotoksin maruziyeti ile ilgili literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Ancak arı ürünleri ile ilgili maruziyet çalışmaları oldukça yetersizdir. Bu nedenle çalışmamızda kontamine olmuş arı ürünleri tüketiminin insan sağlığı açısından potansiyel bir risk oluşturup oluşturmadığını belirlemek için maruziyet analizi ve sağlık açısından risk değerlendirmesi yapılmıştır.

Türkiye’deki mevcut çalışmalar incelendiğinde, arı ürünlerinde mikotoksin kontaminasyonuna dair herhangi bir maruziyet ve risk değerlendirme çalışması ile karşılaşılmamıştır. Uluslararası literatürde ise mikotoksin çalışmalarında olduğu gibi çok sınırlı sayıda polen tüketimine yönelik maruziyet çalışmaları söz konusudur. Bu nedenle arı ürünleri tüketimi sonucunda karşılaşılacak maruziyet riski ile ilgili elde ettiğimiz bulguların literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Végh ve arkadaşlarının (244) yakın tarihli bir çalışmada, literatürdeki polen çalışmalarından elde edilen verilere dayanılarak, en yaygın mikotoksinler (aflatoksin B1, okratoksin A, fumonisinler, ZEA, DON ve T-2 toksin), pestisitler, ağır metaller ve pirolizidin alkaloidleri için bir risk değerlendirmesi yapılmıştır. Günlük polen tüketiminin 25 g olduğu varsayılarak hesaplanan risk değerlendirmesinde, T-2 toksin, okratoksin A, ZEA ve DON maruziyetinin otoriteler tarafından önerilen TDI düzeylerine sırasıyla %119,65, %20,43, %16,43 ve %7,39 oranlarında katkıda bulunduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar tarafından günlük 25 g polen tüketimi ile

DON, ZEA, okratoksin A ve T-2 toksinine maruz kalmanın sağlık açısından risk oluşturduğu bildirilmiştir. Ancak çalışmamızın bulguları mevcut literatür verilerinden farklı sonuçlar ortaya koymuştur. Sadece polen numunelerinde değil, tüm bal, propolis ve arı sütü numunelerinde tespit ettiğimiz mikotoksinler için hesapladığımız MoE değerlerinin 10,000'in üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu ile Türkiye'deki arı ürünlerinin tüketiciler için sağlık riski oluşturmadığı sonucuna varılabilir. Ancak çalışmamız ile literatürdeki veriler arasındaki farklılıklar, çalışmamızda arı ürünlerinin tüketiminden kaynaklanabilecek olası maruziyeti belirlemek için küçük örneklemliler kesitsel bir çalışmadan elde edilen günlük tüketim verilerinin kullanılmasına, analiz edilen arı ürünlerindeki mikotoksin konsantrasyonlarındaki farklılıklara ve maruziyet analizinde kullanılan farklı yöntemlere bağlanabilir. Daha doğru bir maruziyet analizi için tüm yaş gruplarını içeren geniş bir popölasyon üzerinde arı ürünlerine dair detaylı bir besin tüketim çalışmasına ihtiyaç vardır.

8. SONUÇ

Günümüzde seçiciliği ve hassasiyeti ön planda olan HPLC ve LC-MS/MS analiz yöntemleri kullanılarak, Türkiye'nin yedi bölgesinden ve her bölgeden dört şehir olmak üzere 28 farklı şehirden temin edilen arı ürünlerinde (bal, polen, propolis ve arı sütü) SİT, DON ve ZEA düzeylerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirdiğimiz çalışmamızın sonuçları bu bölümde özetlenmiş ve ek olarak, çalışmamızın temel amacını oluşturmasa da arı ürünlerinde tespit edilen mikotoksinlerin maruziyet analizine dair elde ettiğimiz sonuçlar aşağıda sunulmuştur;

- Tüm arı ürünleri numunelerinin %79,5'inde en az bir mikotoksin tespit edilirken, en sık saptanan mikotoksinler ZEA (%37,5) ve DON (%35,7) olmuştur.
- Tüm arı ürünlerinin ortalama DON ve ZEA değerleri sırasıyla 0,0041 µg/kg ve 0,0094 µg/kg olarak belirlenmiştir. Bu değerlerin DON ve ZEA için belirlenen tespit limiti düzeylerinin üzerinde olduğu saptanmıştır. Tüm arı ürünlerindeki ortalama SİT konsantrasyonunun ise belirlenen tespit limitinin altında olduğu görülmüştür.
- Mikotoksin bazlı incelendiğinde, bal ve propolis numunelerinin polen ve arı sütü numunelerine göre daha fazla SİT kontaminasyona maruz kaldığı belirlenmiştir. Tüm polen numunelerinde SİT kontaminasyonu saptanmazken, sadece bir arı sütü numunesinde SİT görülmüştür.
- Mikotoksin bazlı incelendiğinde, tüm arı ürünü gruplarının tespit limiti üzerinde bir konsantrasyon ile sadece DON kontaminasyonuna maruz kaldığı tespit edilmiş ve kontaminasyon sıklığı bal, propolis, polen ve arı sütü için sırasıyla %25,0, %39,3, %28,6 ve %50,0 olarak belirlenmiştir. Arı sütü numunelerinin diğer arı ürünleri numunelerine göre daha fazla DON kontaminasyona maruz kaldığı görülmüştür. Ancak ortalamalar açısından en yüksek DON konsantrasyonu 0,013 µg/kg ile bir propolis numunesinde saptanmıştır.
- Mikotoksin bazlı incelendiğinde, ZEA kontaminasyon sıklığı bal, propolis, polen ve arı sütü için sırasıyla %25,0, %32,1, %28,6 ve %64,3 olarak

belirlenmiştir. Polen ve arı sütü numunelerinin bal ve propolis numunelerine göre daha fazla ZEA kontaminasyona maruz kaldığı görülmüştür. Arı ürünleri numunelerinde belirlenen konsantrasyonlar tespit limitinin altında iken, sadece bir arı sütü numunesinde ZEA miktarı tespit limitinin üzerinde (0,0094 µg/kg) saptanmıştır.

- Ürün grubu bazlı incelendiğinde ise bal numuneleri eşit oranlarda DON (%25) ve ZEA (%25) ile kontamine olmuş, ancak sadece DON için LOD değerinin üzerinde bir konsantrasyon (0,003 µg/kg) tespit edilmiştir. Polen numunelerinin en fazla DON (%39,3) mikotoksini ile kontamine olduğu saptanmıştır. Arı sütü numunelerinde, analiz edilen tüm mikotoksinlerin varlığı görülse de sadece SİT konsantrasyonu LOD değerinin altında tespit edilmiş ve en sık saptanan mikotoksin ZEA (%64,3) olmuştur. Propolis numuneleri ise eşit oranlarda DON (%28,6) ve ZEA (%28,6) ile kontamine olmuş, ancak sadece DON için LOD değerinin üzerinde bir konsantrasyon (0,0069 µg/kg) belirlenmiştir.
- Bölgelere göre arı ürünlerinde mikotoksin bulunma sıklığı şu şekilde sıralanmıştır: Marmara Bölgesi: ZEA > DON (SİT tespit edilmedi); Ege Bölgesi: DON > ZEA (SİT tespit edilmedi); Akdeniz Bölgesi: DON=ZEA (SİT tespit edilmedi); Karadeniz Bölgesi: ZEA > DON (SİT tespit edilmedi); İç Anadolu Bölgesi: DON > ZEA > SİT; Doğu Anadolu Bölgesi: ZEA > DON > SİT; Güneydoğu Anadolu Bölgesi: DON > ZEA > SİT.
- Bal, polen, propolis ve arı sütü numunelerindeki SİT varlığı bölge bazlı incelendiğinde, Marmara, Ege, Akdeniz ve Karadeniz Bölgeleri'nde SİT tespit edilmezken, İç Anadolu Bölgesi'nde sadece bir ilde SİT saptanmamıştır. İç Anadolu Bölgesi'nden numunelerin alındığı diğer iller değerlendirildiğinde, Kayseri'de sadece bal, Konya'da sadece propolis ve Sivas'ta ise sadece arı sütü numunelerinde SİT kontaminasyonu belirlenmiştir. Doğu Anadolu Bölgesi'nde sadece Ağrı ilinin propolis numunesinde SİT'e rastlanılmıştır. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde ise Adıyaman ve Şanlıurfa'da SİT varlığı görülmezken, Siirt'te bal ve propolis, Gaziantep'te ise sadece bal numunesinde SİT belirlenmiştir.

- Bal, polen, propolis ve arı sütü numunelerindeki DON varlığı bölge bazlı incelendiğinde, her bölgedeki en az bir ilde DON konsantaminasyonu belirlenmiştir. Marmara Bölgesi'nde en sık polen, Ege, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde arı sütü, Akdeniz Bölgesi'nde bal, İç Anadolu ve Karadeniz Bölgesi'nde ise propolis numunelerinde DON saptanmıştır. Marmara ve Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki sadece bal ve propolis numunelerinde DON tespit edilmemiştir. İzmir, Antalya ve Ordu'nun tüm arı ürünlerinde DON görülmezken, sadece Konya ilinden satın alınan arı ürünlerinin tamamında DON kontaminasyonu saptanmıştır.
- Bal, polen, propolis ve arı sütü numunelerindeki ZEA varlığı bölge bazında incelendiğinde, yedi bölgeden temin edilen yirmi yedi ilin en az bir arı ürünü grubunda ZEA tespit edilirken, sadece Akdeniz Bölgesi'nde Kahramanmaraş ilinden satın alınan tüm arı ürünlerinde ZEA'ya rastlanmamıştır. Arı ürünü bazlı incelendiğinde ise, yedi bölgenin en az bir arı sütü numunesinde ZEA görülmüştür. Ege ve Akdeniz Bölgesi'nin bal ve propolis numunelerinde, İç Anadolu Bölgesi'nin polen numunelerinde, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nin ise bal ve polen numunelerinde ZEA saptanmamıştır.
- Arı ürünlerinin tüketimine bağlı mikotoksin maruziyeti ve bu maruziyetten kaynaklanan sağlık riski değerlendirmesine göre, her bir arı ürünü grubunda SİT, DON ve ZEA için hesaplanan MoE değeri 10,000'in üzerinde bulunmuş ve böylece Türkiye'de arı ürünleri tüketicilerinin SİT, DON ve ZEA mikotoksinlerine maruziyetine ilişkin herhangi bir sağlık riski olmadığı görülmüştür.

Besin zincirinin kontaminasyonu dünya çapında önemli bir gıda güvenliği sorununu oluşturmaktadır. Bu nedenle mikotoksin düzeylerini belirleyen çalışmalar hem toplum sağlığı hem de çevre kirliliği açısından oldukça önemlidir. Günümüzde biyoindeksör olarak kabul edilen arı ürünleri süper besinler arasında yer almaktadır. Dünya genelinde gerek direkt tüketimi gerekse formüle edilen besin desteklerindeki kullanımı nedeniyle, arı ürünlerinin kalitesi ve güvenliği ön plana çıkmaktadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, ilk kez Türkiye'deki arı ürünlerinin DON, SİT

ve ZEA ile doğal kontaminasyona maruz kaldığını göstermektedir. Bu nedenle gıda güvenliğinin sağlanabilmesi için arı ürünleri rutin olarak toksikolojik testlerden geçmeli ve bu ürünlerde farklı kontaminantlar da değerlendirilmelidir. Öte yandan, tahıllar ve yağlı tohumlarda olduğu gibi arı ürünlerinde de mikotoksinlerin izin verilen maksimum kalıntı limitleri belirlenmeli ve ulusal otoriteler tarafından kabul edilebilir mikotoksin konsantrasyonlarının düzenlenmesi için gerekli çalışmalar yapılmalı ve standartlar oluşturulmalıdır. Arı ürünlerindeki mikotoksin içeriğine ilişkin gıda kılavuzları hazırlanmalıdır.

Çalışmamızda arı ürünleri tüketimi ile mikotoksin maruziyet riskinin değerlendirilmesi, mevcut literatüre bir diğer katkı olarak sayılabilir. Ancak gerçekleştirdiğimiz risk değerlendirmesinin daha net ve doğru bir şekilde belirlenebilmesi için Türkiye genelinde daha fazla sayıda arı ürününün analiz edilmesi ve her yaş grubunu içeren daha geniş bir popülasyon ile çalışılması gerekliliği önerilerimiz arasındadır. Olası toksikolojik sağlık risklerini önlemek için düzenli aralıklarla tüm yaş gruplarını kapsayan risk değerlendirmeleri yapılmalıdır. Ayrıca hem arı ürünlerindeki mikotoksin varlığı hem de olası sağlık riskleri konusunda ilgili kurumlarca eğitim programları düzenlenerek üreticiler, satıcılar, ihracat yapan yetkililer ve tüketiciler bilinçlendirilmeli ve farkındalık oluşturulmalıdır.

Mikotoksinlerin besinlerde her zaman tespit edilemeyeceği ve mantarların mikotoksin içeren besinlerden tam anlamıyla izole edilemeyeceği bilinmektedir. Bu nedenle, mikotoksin içermeyen arı ürünlerinin ve arı ürünlerini içeren besin desteklerinin güvenli üretim, işleme ve depolama süreçleri için önemli kriterler söz konusudur. Hem hasat öncesi/sonrası koşullarda hem de işleme/depolama süreçlerinin herhangi bir aşamasında sıcaklık, nem, su aktivitesi, coğrafi veya iklimsel şartlar gibi mikotoksinlerin oluşumuna ve düzeyine doğrudan katkıda bulunan çevresel faktörler dikkate alınmalıdır. Çalışmamızda, tespit edilen kontaminasyonların arı ürünlerinin üretiminde mi yoksa depolama koşullarında mı meydana geldiği belirsiz olduğu için, başta sıcaklık, nem ve hijyen olmak üzere yerel otoriteler tarafından bildirilen tüm tedbirlerin gıda süreçlerinin her aşamasında titizlikle uygulanması ve takip edilmesi gerekmektedir. Mikotoksinlerin bu

besinlerde kontrol altında tutulabilmesi için HACCP planları, İyi Tarım Uygulamaları (Good Agricultural Practices, GAPs) ve İyi Üretim Uygulamaları (Good Manufacturing Practices, GMPs) etkili şekilde yürütülmelidir. Öte yandan, arı ürünlerindeki ve bu ürünleri içeren besin desteklerindeki mevcut mikotoksinlerin uzaklaştırılması için uygulanacak her türlü işlem, herhangi bir kalıntı bırakmadan mikotoksinleri gıda matrislerinden etkili bir şekilde etkisiz hale getirmeli ve bu besinlerin fiziksel, kimyasal ve organoleptik özellikleri üzerinde zararlı bir etkiye sahip olmamalıdır. Ancak gıda işleme süreçlerinin arı ürünleri üzerindeki olası etkileri ve işleme yöntemleri hakkındaki bilgiler sınırlı olup bu konu ileride yapılacak araştırmalarla kapsamlı bir şekilde açıklanmayı beklemektedir. Bu hususlara dayalı olarak, arı ürünleri ve mikotoksin ilişkisine dair çok yönlü araştırmalara ihtiyaç vardır.

9. KAYNAKLAR

1. Thakali A, MacRae JD. A review of chemical and microbial contamination in food: What are the threats to a circular food system?. *Environ Res.* 194:110635, 2021.
2. Zhao FJ, Tang Z, Song JJ, Huang XY, Wang P. Toxic metals and metalloids: Uptake, transport, detoxification, phytoremediation, and crop improvement for safer food. *Molecular plant.* 15(1): 27-44, 2022.
3. Bajkacz S, Kycia-Slocka E. Liquid chromatography in food analysis. pp. 391-455. In: Picó Y, editor. *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*. London, Academic Press, 2020.
4. Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem Toxicol.* 60:218-237, 2013.
5. Kharayat BS, Singh Y. Mycotoxins in foods: Mycotoxicoses, detection, and management. pp. 395-421. In: Holban AM, Grumezescu AM, editors. *Microbial Contamination and Food Degradation*. London, Academic Press, 2018.
6. El-Sayed RA, Jebur AB, Kang W, El-Demerdash FM. An overview on the major mycotoxins in food products: characteristics, toxicity, and analysis. *Journal of Future Foods.* 2(2):91-102, 2022.
7. Alshannaq A, Yu JH. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *Int J Environ Res Public Health.* 14(6):632, 2017.
8. Silva L, Pereira A, Duarte S, Pena A, Lino C. Reviewing the analytical methodologies to determine the occurrence of citrinin and its major metabolite, dihydrocitrinone, in human biological fluids. *Molecules.* 25(12):2906, 2020.
9. Knutsen H, Alexander J, Barregard L, Bignami M, Brüschweiler B, Ceccatelli S, et al.; EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *EFSA J.* 15(9):4718, 2017.
10. Knutsen H, Alexander J, Barregard L, Bignami M, Brüschweiler B, Ceccatelli S, et al.; EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food

- Chain). Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. *EFSA J.* 15(7):4851, 2017.
11. Ali N, Degen GH. Citrinin biomarkers: a review of recent data and application to human exposure assessment. *Arch Toxicol.* 93(11):3057-66, 2019.
 12. López Sánchez P, de Nijsa M, Spanjer M, Pietric A, Bertuzzic T, Starski A, et al. Generation of occurrence data on citrinin in food. *EFSA Supporting Publication.* 14(2):EN-1177, 2017.
 13. Do TH, Tran SC, Le CD, Nguyen HBT, Le PTT, Le HHT, et al. Dietary exposure and health risk characterization of aflatoxin B1, ochratoxin A, fumonisin B1, and zearalenone in food from different provinces in Northern Vietnam. *Food Control.* 112:107108, 2020.
 14. Meerpoel C, Vidal A, Tangni EK, Huybrechts B, Couck L, De Rycke R, et al. A study of carry-over and histopathological effects after chronic dietary intake of citrinin in pigs, broiler chickens and laying hens. *Toxins.* 12(11):1-19, 2020.
 15. Karaica D, Micek V, Rašić D, Peraica M, Šegvić Klarić M, Breljak D. Subchronic exposure to individual and combined ochratoxin A and citrinin affects the expression of rat renal organic anion transporters. *Mycotoxin Res.* 36(4):339-52, 2020.
 16. Rašić D, Micek V, Klarić MS, Peraica M. Oxidative stress as a mechanism of combined OTA and CTN toxicity in rat plasma, liver and kidney. *Hum Exp Toxicol.* 38(4):434-45, 2019.
 17. Wu N, Ou W, Zhang Z, Wang Y, Xu Q, Huang H. Recent advances in detoxification strategies for zearalenone contamination in food and feed. *Chin J Chem Eng.* 30:168-77, 2021.
 18. Wang J, Xie Y. Review on microbial degradation of zearalenone and aflatoxins. *Grain & Oil Science and Technology.* 3(3):117-25, 2020.
 19. Sobrova P, Adam V, Vasatkova A, Beklova M, Zeman L, Kizek R. Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdiscip Toxicol.* 3(3):94-9, 2010.
 20. Peng Z, Chen L, Xiao J, Zhou X, Nüssler AK, Liu L, et al. Review of mechanisms of deoxynivalenol-induced anorexia: The role of gut microbiota. *J Appl Toxicol.* 37(9):1021-9, 2017.

21. Nuvoloni R, Meucci V, Turchi B, Sagona S, Fratini F, Felicioli A, et al. Bee-pollen retailed in Tuscany (Italy): Labelling, palynological, microbiological, and mycotoxicological profile. *LWT*. 140:110712, 2021.
22. Kačániová M, Miroslav J, Chlebo R, Kňazovická V, Kadasi-Horáková M, Kunová S, et al. Mycobiota and mycotoxins in bee pollen collected from different areas of Slovakia. *J Environ Sci Health*. 46(7):623-9, 2011.
23. Janik E, Niemcewicz M, Ceremuga M, Stela M, Saluk-Bijak J, Siadkowski A, et al. Molecular aspects of mycotoxins-A serious problem for human health. *Int J Mol Sci*. 21(21):8187, 2020.
24. Lee HJ, Ryu D. Worldwide occurrence of mycotoxins in cereals and cereal-derived food products: Public health perspectives of their co-occurrence. *J Agric Food Chem*. 65(33):7034-51, 2017.
25. Kaushik G. Effect of on mycotoxin content in grains. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 55(12):1672-83, 2015.
26. Flores-Flores ME, González-Peñas E. Development and validation of a high performance liquid chromatographic–mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 10 trichothecenes in ultra-high temperature processed cow milk. *J Chromatogr A*. 1419:37-44, 2015.
27. European Commission. Commission regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off J Eur Union*. 364:5-24, 2006.
28. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği. 29 Aralık 2011. Sayı: 28157, Başbakanlık Basımevi, Ankara.
29. Pereira VL, Fernandes JO, Cunha SC. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends Food Sci Technol*. 36(2):96-136, 2014.
30. Adegoke GO, Letuma P. Strategies for the prevention and reduction of mycotoxins in developing countries, mycotoxin and food safety in developing countries. pp. 123-136. In: Makun HA, editor. *Mycotoxin and Food Safety in Developing Countries*. London: InTechOpen, 2013.
31. Gab-Allah MA, Choi K, Kim B. Accurate determination of type B trichothecenes and conjugated deoxynivalenol in grains by isotope dilution–

- liquid chromatography tandem mass spectrometry. Food Control. 121:107557, 2021.
32. Chulze SN. Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 27(5):651-7, 2010.
 33. Milićević DR, Skrinjar M, Baltić T. Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. Toxins (Basel). 2(4):572-92, 2010.
 34. Ostry V, Malir F, Ruprich J. Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. Toxins (Basel). 17;5(9):1574-86, 2013.
 35. He Y, Cox RJ. The molecular steps of citrinin biosynthesis in fungi. Chem Sci. 7:2119-27, 2016.
 36. Alexander J, Befond D, Boobis A, Ceccatelli S, Cottrill B, Cravedi JP, et al.; EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). Scientific opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. EFSA J. 10:2605, 2012.
 37. Wang ML, Lu CH, Xu QY, Song SY, Hu ZY, Zheng ZH. Four new citrinin derivatives from a marine-derived *Penicillium* sp. fungal strain. Molecules 18:5723-35, 2013.
 38. Marič A, Skočaj M, Likar M, Sepčić K, Cigić IK, et al. Comparison of lovastatin, citrinin and pigment production of different *Monascus purpureus* strains grown on rice and millet. J Food Sci Technol. 56(7):3364-73, 2019.
 39. Silva LJG, Pereira AMPT, Pena A, Lino CM. Citrinin in foods and supplements: A review of occurrence and analytical methodologies. Foods. 10(1):14, 2021.
 40. Wawrzyniak J, Waśkiewicz A. Ochratoxin A and citrinin production by *Penicillium verrucosum* on cereal solid substrates. Food Addit Contam Part A. 31:139-48, 2014.
 41. Wang Y, Gao H, Xie J, Li X, Huang Z. Effects of some flavonoids on the mycotoxin citrinin reduction by *Monascus aurantiacus* Li AS3. 4384 during liquid-state fermentation. AMB Express. 10:26, 2020.

42. Ouyang W, Liu X, Wang Y, Huang Z, Li X. Addition of genistein to the fermentation process reduces citrinin production by *Monascus* via changes at the transcription level. *Food Chem.* 343:128410, 2021.
43. Tokuşoğlu Ö, Alpas H, Bozoğlu F. High hydrostatic pressure effects on mold flora, citrinin mycotoxin, hydroxytyrosol, oleuropein phenolics and antioxidant activity of black table olives. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 11:250-8, 2010.
44. Zhou G, Fu L, Li X. Optimisation of ultrasound-assisted extraction conditions for maximal recovery of active monacolins an removal of toxic citrinin from red yeast rice by a full factorial design coupled with response surface methodology. *Food Chem.* 170:186-92, 2015.
45. Vaseghi N, Bayat M, Nosrati AC, Ghorannevis M, Hashemi S. Evaluation of the plasma jet effects on the citrinin and ochratoxin A producing species of the genus *Penicillium*. *Bulg Chem Commun.* 50:383-92, 2018.
46. Meerpoel C, Vidal A, Andjelkovic M, De Boevre M, Tangni EK, Huybrechts B, et al. Dietary exposure assessment and risk characterization of citrinin and ochratoxin A in Belgium. *Food Chem Toxicol.* 147: 111914, 2021.
47. European Commission. Commission Regulation (EU) No 212/2014 of 6 March 2014 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of the contaminant citrinin in food supplements based on rice fermented with red yeast *Monascus purpureus*. *EFSA J.* 16:3-4, 2014.
48. European Commission. Commission Regulation (EU) 2019/1901 of 7 November 2019 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of citrinin in food supplements based on rice fermented with red yeast *Monascus purpureus*. *Off J Eur Union.* 62:2-4, 2019.
49. Urraca JL, Huertas-Pérez JF, Cazorla GA, Gracia-Mora J, García-Campaña AM, Moreno-Bondi MC. Development of magnetic molecularly imprinted polymers for selective extraction: Determination of citrinin in rice samples by liquid chromatography with UV diode array detection. *Anal Bioanal Chem.* 408:3033-42, 2016.

50. de Oliveira Filho JWG, Islam MT, Ali ES, Uddin SJ, Santos JVO, de Alencar MVOB, et al. A comprehensive review on biological properties of citrinin. *Food Chem Toxicol.* 110:130-41, 2017.
51. Rašić D, Micek V, Klarić MS, Peraica M. Oxidative stress as a mechanism of combined OTA and CTN toxicity in rat plasma, liver and kidney. *Hum Exp Toxicol.* 38(4):434-45, 2019.
52. Hanika C, Carlton WW, Boon GD, Tuite J. Citrinin mycotoxicosis in the rabbit: Clinicopathological alterations. *Food Chem Toxicol.* 22:999-1008, 1984.
53. Lurá MC, Fuentes MB, Cabagna M, González AM, Nepote AF, Giugni MC, et al. Actividad de metabolitos de *Penicillium citrinum* sobre ratones *Mus musculus*. *Rev Iberoam Micol.* 18:183-6, 2001.
54. Chan WH. Effects of citrinin on maturation of mouse oocytes, fertilization, and fetal development in vitro and in vivo. *Toxicol Lett.* 180:28–32, 2008.
55. Thacker HL, Carlton WW, Sansing GA. Citrinin mycotoxicosis in the guinea-pig. *Food Cosmet Toxicol.* 15:553-61, 1977.
56. Ostry V, Malir F, Toman J, Grosse Y. Mycotoxins as human carcinogens-the IARC monographs classification. *Mycotoxin Res.* 33(1):65-73, 2017.
57. Atapattu SN, Poole CF. Recent advances in analytical methods for the determination of citrinin in food matrices. *J Chromatogr A.* 1627:461399, 2020.
58. Kamle M, Mahato DK, Gupta A, Pandhi S, Sharma N, Sharma B, et al. Citrinin mycotoxin contamination in food and feed: Impact on agriculture, human health, and detection and management strategies. *Toxins (Basel).* 14(2):85, 2022.
59. Polak-Śliwińska M, Paszczyk B. Trichothecenes in food and feed, relevance to human and animal health and methods of detection: A systematic review. *Molecules.* 26(2):454, 2021.
60. Mahato DK, Pandhi S, Kamle M, Gupta A, Sharma B, Panda BK, et al. Trichothecenes in food and feed: Occurrence, impact on human health and their detection and management strategies. *Toxicon.* 208:62-77, 2022.

61. Ostry V, Dofkova M, Blahova J, Malir F, Kavrik R, Rehurkova I, et al. Dietary exposure assessment of sum deoxynivalenol forms, sum T-2/HT-2 toxins and zearalenone from cereal-based foods and beer. *Food Chem Toxicol.*139:111280, 2020.
62. Del Ponte EM, Moreira GM, Ward TJ, O'Donnell K, Nicolli CP, Machado FJ, et al. *Fusarium graminearum* species complex: A bibliographic analysis and web-accessible database for global mapping of species and trichothecene toxin chemotypes. *Phytopathology.* 112(4):741-51, 2022.
63. Gab-Allah MA, Tahoun IF, Yamani RN, Rend EA, Shehata AB. Natural occurrence of deoxynivalenol, nivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in cereal-derived products from Egypt. *Food Control.* 137:108974, 2022.
64. Fink-Gremmels J, Van der Merwe D. Mycotoxins in the food chain: contamination of foods of animal origin. pp. 241-261. In: Smulders FJM, Rietjens IMCM, Rose MD, editors. *Chemical Hazards in Foods of Animal Origin.* The Netherlands, Wageningen Academic Publishers, 2019.
65. Ferrigo D, Raiola A, Causin R. *Fusarium* toxins in cereals: Occurrence, legislation, factors promoting the appearance and their management. *Molecules.* 21:627, 2016.
66. Sudakin DL. Trichothecenes in the environment: Relevance to human health. *Toxicol. Lett.* 143, 97-107, 2020.
67. Olopade BK, Oranusi SU, Nwinyi OC, Gbashi S, Njobeh PB. Occurrences of deoxynivalenol, zearalenone and some of their masked forms in selected cereals from Southwest Nigeria. *NFS Journal.* 23:24-9, 2021.
68. Belizán MME, Gomez ADLA, Terán Baptista ZP, Jimenez CM, Sánchez Matías MDH, Catalán CAN, et al. Influence of water activity and temperature on growth and production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* sensu stricto and related species in maize grains. *Int J Food Contam.* 305:108242, 2019.
69. İmamoğlu Ö. Biyokontrolde doğal ürünlerin kullanılması; Kitosan. *Türk Hij Den Biyol Derg.*68(4):215-22, 2011.
70. Sadhasivam S, Shapiro OH, Ziv C, Barda O, Zakin V, Sionov E. Synergistic inhibition of mycotoxigenic fungi and mycotoxin production by combination

- of pomegranate peel extract and azole fungicide. *Front Microbiol.* 10:1919, 2019.
71. Zachetti VGL, Cendoya E, Nichea MJ, Chulze SN, Ramirez ML. Preliminary study on the use of chitosan as an eco-friendly alternative to control *Fusarium* growth and mycotoxin production on maize and wheat. *Pathogens.* 8(1):29, 2019.
 72. Liu Y, Li M, Bian K, Guan E, Liu Y, Lu Y. Reduction of deoxynivalenol in wheat with superheated steam and its effects on wheat quality. *Toxins (Basel).* 11(7):414, 2019.
 73. Wang J, Xie Y. Review on microbial degradation of zearalenone and aflatoxins. *Grain Oil Sci Technol.* 3:117-25, 2020.
 74. Cao H, Meng D, Zhang W, Ye T, Yuan M, Yu J, et al. Growth inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification by lactic acid bacteria and their application in sourdough bread. *Int J Food Sci Technol.* 56:2304-14, 2021.
 75. Ji F, He D, Olaniran AO, Mokoena MP, Xu J, Shi J. Occurrence, toxicity, production and detection of *Fusarium* mycotoxin: A review. *Food Prod Process Nutr.* 1:1-14, 2019.
 76. FAO, WHO. Codex Alimentarius International Food Standards: General standard for contaminants and toxins in food and feed. Codex Stan CXS 193-2015, http://www.fao.org/input/download/standards/17/CXS_193e_2015.pdf (Accessed 10.09.2022).
 77. Europe Commission. E. C. Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding, 2006/576/EC. *Off J Eur Union.* 229:7-9, 2006.
 78. Anukul N, Vangnai K, Mahakarnchanakul W. Significance of regulation limits in mycotoxin contamination in Asia and risk management programs at the national level. *J Food Drug Anal.* 21:227-41, 2013.
 79. Ganesan AR, Mohan K, Karthick Rajan D, Pillay AA, Palanisami T, Sathishkumar P, et al. Distribution, toxicity, interactive effects, and detection

- of ochratoxin and deoxynivalenol in food: A review. *Food Chem.* 378:131978, 2022.
80. Ookawara T, Aihara R, Morimoto A, Iwashita N, Kurata K, Takagi, Y, et al. Acute and subacute oral toxicity of deoxynivalenol exposure in a dermatophagoides farinae-induced murine asthma model. *Toxicol Sci*, 179(2):229-40, 2021.
 81. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations & Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives and contaminants: eightieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization Meeting. Rome, Italy. WHO technical report series: 995, 2016.
 82. Payros D, Alassane-Kpembi I, Pierron A, Loiseau N, Pinton P, Oswald IP. Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms. *Archives of Toxicology*. 90(12):2931-57, 2016.
 83. Liao Y, Peng Z, Chen L, Nüssler AK, Liu L, Yang W. Deoxynivalenol, gut microbiota and immunotoxicity: A potential approach?. *Food and Chemical Toxicology*. 112:342-54, 2018.
 84. Li J, Wang Y, Deng Y, Wang X, Wu W, Nepovimova E, et al. Toxic mechanisms of the trichothecenes T-2 toxin and deoxynivalenol on protein synthesis. *Food Chem Toxicol*. 164:113044, 2022.
 85. Wang S, Wu K, Xue D, Zhang C, Rajput SA, Qi D. Mechanism of deoxynivalenol mediated gastrointestinal toxicity: Insights from mitochondrial dysfunction. *Food Chem Toxicol*. 153:112214, 2021.
 86. Yazar S, Omurtag GZ. Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. *Int J Mol Sci*. 9:2062-90, 2008.
 87. Manna M, Kim KD. Influence of temperature and water activity on deleterious fungi and mycotoxin production during grain storage. *Mycobiology*. 45:240-54, 2017.
 88. Hamed MA, Abdel Ghany TM, Elhussieny NI, Nabih MA. Exploration of fungal infection in agricultural grains, aflatoxin and zearalenone synthesis under pH stress. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 5(4):1007-17, 2016.

89. Stanciu O, Juan C, Berrada H, Miere D, Loghin, F, Mañes J. Study on trichothecene and zearalenone presence in romanian wheat relative to weather conditions. *Toxins (Basel)*.11(3):163, 2019.
90. Peter Mshelia L, Selamat J, Iskandar Putra Samsudin N, Rafii MY, Abdul Mutalib NA, Nordin N, et al. Effect of temperature, water activity and carbon dioxide on fungal growth and mycotoxin production of acclimatised isolates of *Fusarium verticillioides* and *F. graminearum*. *Toxins (Basel)*. 12(8):478, 2020.
91. Alexander J, Benford D, Boobis A, Ceccatelli S, Cottrill B, Cravedi JP, et al.; EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA J*. 9(6):2197, 2011.
92. Pleadin J, Babić J, Vulić A, Kudumija N, Aladić K, Kiš M, et al. The effect of thermal processing on the reduction of deoxynivalenol and zearalenone cereal content. *Croat J Food Sci Technol*. 11:44-51, 2019.
93. Qi L, Li Y, Luo X, Wang R, Zheng R, Wang L, et al. Detoxification of zearalenone and ochratoxin A by ozone and quality evaluation of ozonised corn. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 33(11):1700-10, 2016.
94. Chlebicz A, Ślizewska K. In vitro detoxification of aflatoxin b₁, deoxynivalenol, fumonisins, T-2 toxin and zearalenone by probiotic bacteria from genus *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae* Yeast. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 12(1):289-301, 2020.
95. Zhang H, Dong M, Yang Q, Apaliya MT, Li J, Zhang X. Biodegradation of zearalenone by *Saccharomyces cerevisiae*: Possible involvement of ZEN responsive proteins of the yeast. *J Proteomics*. 143:416-23, 2016.
96. Global Agricultural Information Network (GAIN). China releases standard for maximum levels of mycotoxins in food (GAIN report no. CH18026). China, China Food and Drug Administration (CFDA), 2018.
97. Brera C, De Santis B, Debegnach F, Gregori E, Pannunzi E. Mycotoxins. pp.467-492. In: Nollet LML, Toldrá F, editors. *Food Analysis by HPLC*. Boca Raton, CRC Press, 2013.

98. Wu N, Ou W, Zhang Z, Wang Y, Xu Q, Huang H. Recent advances in detoxification strategies for zearalenone contamination in food and feed. *Chin J Chem Eng.* 30:168-77, 2021.
99. Rai A, Das M, Tripathi A. Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 60(16):2710-29, 2020.
100. Mostrom MS, Jacobsen BJ. Ruminant mycotoxicosis: An update. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 36(3):745-74, 2020.
101. Pan P, Ying Y, Ma F, Zou C, Yu Y, Li Y, et al. Zearalenone disrupts the placental function of rats: A possible mechanism causing intrauterine growth restriction. *Food Chem Toxicol.* 145:111698, 2020.
102. Zinedine A, Soriano JM, Moltó JC, Mañes J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone, an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem Toxicol.* 45:1-18, 2007.
103. Massart F, Meucci V, Saggese G, Soldani G. High growth rate of girls with precocious puberty exposed to estrogenic mycotoxins. *J Pediatr.* 152(5):690-5, 2008.
104. Massart F, Saggese G. Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development. *Int J Androl.* 33(2):369-76, 2010.
105. Belhassen H, Jiménez-Díaz I, Arrebola JP, Ghali R, Ghorbel H, Olea N, et al. Zearalenone and its metabolites in urine and breast cancer risk: a case-control study in Tunisia. *Chemosphere.* 128:1-6, 2015.
106. Claeys L, Romano C, De Ruyck K, Wilson H, Fervers B, Korenjak M, et al. Mycotoxin exposure and human cancer risk: A systematic review of epidemiological studies. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 19(4):1449-64, 2020.
107. Virk P, Al-mukhaizeem NAR, Bin Morebah SH, Fouad D, Elobeid M. Protective effect of resveratrol against toxicity induced by the mycotoxin, zearalenone in a rat model. *Food Chem Toxicol.* 146:111840, 2020.
108. Mahato DK, Devi S, Pandhi S, Sharma B, Maurya KK, Mishra S, et al. Occurrence, impact on agriculture, human health, and management strategies of zearalenone in food and feed: A review. *Toxins (Basel).* 13(2):92, 2021.
109. Moretti A, Logrieco AF, Susca A. Mycotoxins: An underhand food problem. *Methods Mol Biol.* 1542:3-12, 2017.

110. Shephard GS. Determination of mycotoxins in human foods. *Chem Soc Rev.* 37:2468-77, 2008.
111. Ok HE, Lee SY, Chun HS. Occurrence and simultaneous determination of nivalenol and deoxynivalenol in rice and bran by HPLC-UV detection and immunoaffinity cleanup. *Food Control.* 87:53-9, 2018.
112. Nawaz MAH, Rauf S, Hayat A, Catanante G, Raza R, Marty JL. Determination of mycotoxins in food. pp. 139-168. In: Wong YC, Lewis RJ, editors. *In Analysis of Food Toxins and Toxicants.* UK, John Wiley & Sons, 2017.
113. Ridgway K, Scientific R. Sample preparation for food contaminant analysis. *LC GC Eur.* 25:1-8, 2012.
114. Twarużek M, Błajet-Kosicka A, Kosicki R, Grajewski J. Mycotoxin analytical methods. pp.363-386. In: Viegas C, Pinheiro C, Sabino R, Viegas S, Brandão J, Verissimo C, editors. *Environmental Mycology in Public Health.* London, Elsevier, 2015.
115. Varga E, Glauner T, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher R, Sulyok M. Development and validation of a (semi-)quantitative UHPLC-MS/MS method for the determination of 191 mycotoxins and other fungal metabolites in almonds, hazelnuts, peanuts and pistachios. *Anal Bioanal Chem.* 405(15):5087-104, 2013.
116. Lim CW, Li A, Chan JSH. Mycotoxins detection in Asia. pp.169-194. In: Wong YC, Lewis RJ, editors. *In Analysis of Food Toxins and Toxicants.* UK, John Wiley & Sons, 2017.
117. Shephard GS. Current status of mycotoxin analysis: A critical review. *J AOAC Int.* 99(4):842-8, 2016.
118. Rahmani A, Jinap S, Soleimany F. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 8:202-51, 2009.
119. Andrade-Eiroa A, Canle M, Leroy-Cancellieri V, Cerdà V. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *Trends Analyt Chem.* 80:641-54, 2016.
120. Luo Y, Liu X, Li J. Updating techniques on controlling mycotoxins-A review. *Food Control.* 89:123-32, 2018.

121. Ismail BP, Nielsen SS. Analysis of food contaminants, residues, and chemical constituents of concern. pp.582-4. In: Nielsen SS, editor. Food Analysis. Food Science Text Series. Switzerland, Springer International Publishing, 2017.
122. Frenich AG, Romero-González R, Aguilera-Luiz MM. Comprehensive analysis of toxics (pesticides, veterinary drugs and mycotoxins) in food by UHPLC-MS. Trends Analyt Chem. 63:158-69, 2014.
123. Reuhs BL. High-performance liquid chromatography. pp.213-226. In: Nielsen SS, editor. Food Analysis. Food Science Text Series. Switzerland, Springer International Publishing, 2017.
124. Eser B, Sepici Dinçel A. Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları. Journal of Health Services and Education. 2(2):51-7, 2018.
125. Lv S, Wang H, Yan Y, Ge M, Guan J. Quantification and confirmation of four aflatoxins using a LC-MS/MS QTRAP system in multiple reaction monitoring, enhanced product ion scan, and MS³ modes. Eur J Mass Spectrom (Chichester). 26(1):63-77, 2020.
126. Motilva MJ, Serra A, Macia A. Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. J Chromatogr A. 1292:66-82, 2013.
127. Huang L, Li J, Bi Y, Xu Y, Wang Y, Wang J, et al. Simultaneous determination of α -tocopherol, β -tocopherol, γ -tocopherol, δ -tocopherol, sesamin, sesamol, and asarinin in sesame oil by normal-phase high performance liquid chromatography. J Food Compos Anal. 104:104132, 2021.
128. Žuvela P, Skoczylas M, Jay Liu J, Ba Czek T, Kaliszan R, Wong MW, et al. Column characterization and selection systems in reversed-phase high-performance liquid chromatography. Chem Rev. 27;119(6):3674-729, 2019.
129. Josic D, Kovac S. Reversed-phase high performance liquid chromatography of proteins. Curr Protoc Protein Sci. Chapter 8:Unit 8.7, 2010.
130. Arroyo-Manzanares N, Huertas-Pérez JF, García-Campaña AM, Gámiz-Gracia L. Review of sample treatments and the state-of-the-art of analytical techniques for mycotoxins in food. pp. 51-102. In: Wong YC, Lewis RJ,

- editors. In *Analysis of Food Toxins and Toxicants*. UK, John Wiley & Sons, 2017.
131. Cortés-Herrera C, Artavia G, Leiva A, Granados-Chinchilla F. Liquid chromatography analysis of common nutritional components, in feed and food. *Foods*. 8(1):1, 2018.
 132. Coppock RW. Bee products as nutraceuticals to nutraceuticals for bees. pp.813-33. In: Gupta RC, Lall R, Srivastava A, editors. *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*. Academic Press, 2021.
 133. Wang Z, Ren P, Wu Y, He Q. Recent advances in analytical techniques for the detection of adulteration and authenticity of bee products - A review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 38(4):533-49, 2021.
 134. Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. Honey for nutrition and health: A review. *J Am Coll Nutr*. 27:677-89, 2008.
 135. El-Soud A, Helmy N. Honey between traditional uses and recent medicine. *Macedon J Med Sci*. 5:205-14, 2012.
 136. European Commission (EC). Honey Market Presentation-Autumn 2022, https://agriculture.ec.europa.eu/system/files/2022-10/market-presentation-honey_autumn2022_en.pdf (accessed 10.11.2022).
 137. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). Türkiye İller Bazında Arıcılık İstatistikleri (1991-2021), <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/aricilik/Link/2/Aricilik-Istatistikleri> (Erişim 26.03.2022).
 138. Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Romandini S, Bertoli E, Battino M. Contribution of honey in nutrition and human health: A review. *Mediterr J Nutr Metab*. 3:15-23, 2010.
 139. Miguel MG, Antunes MD, Faleiro ML. Honey as a complementary medicine. *Integr Med Insights*. 12:12, 2017.
 140. Cornara L, Biagi M, Xiao J, Burlando B. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. *Front Pharmacol*. 8:412, 2017.
 141. Ball DW. The chemical composition of honey. *J Chem Educ*. 84:1643, 2007.

142. Gośliński M, Nowak D, Szwengiel A. Multidimensional comparative analysis of bioactive phenolic compounds of honeys of various origin. *Antioxidants* (Basel). 10(4):530, 2021.
143. Da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett, R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem.* 196,309-23, 2016.
144. Iglesias MT, Martín-Álvarez PJ, Polo MC, De Lorenzo C, González M, Pueyo E. Changes in the free amino acid contents of honeys during storage at ambient temperature. *J Agric Food Chem.* 54:9099-104, 2006.
145. Solayman M, Islam MA, Paul S, Ali Y, Khalil MI, Alam N, et al. Physicochemical properties, minerals, trace elements, and heavy metals in honey of different origins: A comprehensive review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 15:219-33, 2016.
146. Ciucure CT, Geană EI. Phenolic compounds profile and biochemical properties of honeys in relationship to the honey floral sources. *Phytochem Anal.* 30:481-92, 2019.
147. Ahmed S, Sulaiman SA, Baig AA, Ibrahim M, Liaqat S, Fatima S, et al. Honey as a potential natural antioxidant medicine: An insight into its molecular mechanisms of action. *Oxid Med Cell Longev.* 2018:8367846, 2018.
148. Al-Waili NS. Effects of daily consumption of honey solution on hematological indices and blood levels of minerals and enzymes in normal individuals. *J Med Food.* 6:135-40, 2003.
149. Durazzo A, Lucarini M, Santini A. Nutraceuticals in human health. *Foods.*9:370, 2020.
150. Eteraf-Oskouei T, Najafi M. Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: A review. *Iran J. Basic Med. Sci.* 16:731-42, 2013.
151. Pashte VV, Pashte SV, Said PP. Nutraceutical properties of natural honey to fight health issues: A comprehensive review. *J Pharmacogn Phytochemi.* 9:234-42, 2020.
152. Combarros-Fuertes P, Estevinho LM, Dias LG, Castro JM, Tomás-Barberán FA, Tornadijo ME, et al. Bioactive components and antioxidant and

- antibacterial activities of different varieties of honey: A screening prior to clinical application. *J Agric Food Chem* 67:688-98, 2019.
153. Biluca FC, da Silva B, Caon T, Mohr ETB, Vieira GN, Gonzaga LV, et al. Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (*Meliponinae*). *Food Res Int.* 129:108756, 2020.
 154. Kassim M, Achoui M, Mustafa MR, Mohd MA, Yusoff KM. Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity. *Nutr Res.* 30:650-9, 2020.
 155. Hossen MS, Ali MY, Jahurul MHA, Abdel-Daim MM, Gan SH, Khalil MI. Beneficial roles of honey polyphenols against some human degenerative diseases: A review. *Pharmacol Rep.* 69:1194-205, 2017.
 156. Gyawali R, Ibrahim SA. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control.* 46: 412-29, 2014.
 157. Velásquez P, Montenegro G, Leyton F, Ascar L, Ramirez O, Giordano A. Bioactive compounds and antibacterial properties of monofloral Ulmo honey. *CyTA-J Food.* 18:11-9, 2020.
 158. Ahmad RS, Hussain MB, Saeed F, Waheed M, Tufail T. Phytochemistry, metabolism, and ethnomedical scenario of honey: A concurrent review. *Int J Food Prop.* 20:254-69, 2017.
 159. Vasquez A, Forsgren E, Fries I, Paxton RJ, Flaberg E, Szekely L, et al. Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS ONE.* 7:e33188, 2012.
 160. Ali H, Abu Bakar M, Majid M, Muhammad N, Lim, S. In vitro anti-diabetic activity of stingless bee honey from different botanical origins. *Food Res.* 4:1421-6, 2020.
 161. Waheed M, Hussain MB, Javed A, Mushtaq Z, Hassan S, Shariati MA, et al. Honey and cancer: A mechanistic review. *Clin Nutr.* 38:2499-503, 2019.
 162. Erejuwa OO, Sulaiman SA, Wahab MSA. Effects of honey and its mechanisms of action on the development and progression of cancer. *Molecules.* 19, 2497-522, 2014.

163. Ahmed S, Othman NH. The anti-cancer effects of Tualang honey in modulating breast carcinogenesis: An experimental animal study. *BMC Complement Altern Med.* 17:208, 2017.
164. Denisow B, Denisow-Pietrzyk M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *J Sci Food Agric.* 96(13):4303-9, 2016.
165. Kostić AŽ, Kaluđerović LM, Dojčinović BP, Barać MB, Babić VB, Mačukanović-Jocić MP. Preliminary investigation of mineral content of pollen collected from different Serbian maize hybrids - is there any potential nutritional value? *J Sci Food Agric.* 97(9):2803-9, 2017.
166. Lu P, Takiguchi S, Honda Y, Lu Y, Mitsui T, Kato S, et al. NMR and HPLC profiling of bee pollen products from different countries. *Food Chem (Oxf).* 5:100119, 2022.
167. Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Kaźmierczak J, Mencner L, Olczyk K. Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015:297425, 2015.
168. Da Silva GR, da Natividade TB, Camara CA, da Silva EMS, Silva TMS. Identification of sugar, amino acids and minerals from the pollen of Jandaíra Stingless bees (*Melipona subnitida*). *Food Nutr Sci.* 5(11):1015-21, 2014.
169. Li QQ, Wang K, Marcucci MC, Sawaya ACHF, Hu L, Xue XF, et al. Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites. *J Func Foods.* 49:472-84, 2018.
170. Salazar-Gonzalez CY, Rodríguez-Pulido FJ, Terrab A, Díaz-Moreno C, Fuenmayor CA, Heredia FJ. Analysis of multifloral bee pollen pellets by advanced digital imaging applied to functional food ingredients. *Plant Foods Hum Nutr.* 73(4):328-35, 2018.
171. Rzepecka-Stojko A, Stojko J, Kurek-Górecka A, Górecki M, Kabała-Dzik A, Kubina R, et al. Polyphenols from bee pollen: Structure, absorption, metabolism and biological activity. *Molecules.* 20(12):21732-49, 2015.
172. Khalil FA, Elsheikh NM. The effects of dietary Egyptian propolis and bee pollen supplementation against toxicity of sodium fluoride in rats. *J Am Sci.* 6(11):310-6, 2010.

173. Mărgăoan R, Stranț M, Varadi A, Topal E, Yücel B, Cornea-Cipcigan M, et al. Bee collected pollen and bee bread: bioactive constituents and health benefits. *Antioxidants* (Basel). 8(12):568, 2019.
174. Fatrcová-Šramková K, Nôžková J, Máriássyová M, Kačániová M. Biologically active antimicrobial and antioxidant substances in the *Helianthus annuus* L. bee pollen. *J Environ Sci Health B*. 51(3):176-81, 2016.
175. Wang B, Diao Q, Zhang Z, Liu Y, Gao Q, Zhou Y, Li S. Antitumor activity of bee pollen polysaccharides from *Rosa rugosa*. *Mol Med Rep*. 7(5):1555-8, 2013.
176. Wu YD, Lou YJ. A steroid fraction of chloroform extract from bee pollen of *Brassica campestris* induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells. *Phytother Res*. 21(11):1087-91, 2007.
177. Pascoal A, Rodrigues S, Teixeira A, Feás X, Estevinho LM. Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food Chem Toxicol*. 63:233-9, 2014.
178. Rzepecka-Stojko A, Stojko J, Jasik K, Buszman E. Anti-atherogenic activity of polyphenol-rich extract from bee pollen. *Nutrients*. 9(12):1369, 2017.
179. Yıldız O, Can Z, Saral O, Yuluğ E, Oztürk F, Aliyazıcıoğlu R, Canpolat S, Kolaylı S. Hepatoprotective potential of chestnut bee pollen on carbon tetrachloride-induced hepatic damages in rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013:461478, 2013.
180. Cheng N, Ren N, Gao H, Lei X, Zheng J, Cao W. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Schisandra chinensis* pollen extract on CCl₄-induced acute liver damage in mice. *Food Chem Toxicol*. 55:234-40, 2013.
181. Huang H, Shen Z, Geng Q, Wu Z, Shi P, Miao X. Protective effect of *Schisandra chinensis* bee pollen extract on liver and kidney injury induced by cisplatin in rats. *Biomed Pharmacother*. 95:1765-76, 2017.
182. Bankova V, Popova M, Trusheva B. The phytochemistry of the honeybee. *Phytochemistry*. 155:1-11, 2018.
183. Anjum SI, Ullah A, Khan KA, Attaullah M, Khan H, Ali H, et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi J Biol Sci*. 26:1695-703, 2019.

184. Huang S, Zhang CP, Wang K, Li GQ, Hu FL. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*. 19:19610-32, 2014.
185. Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH. Honey, propolis, and royal jelly: A comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative Med Cell Longev*. 2017:1259510, 2017.
186. Andrade JKS, Denadai M, de Oliveira CS, Nunes ML, Narain N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Res Int*. 101:129-38, 2017.
187. Kocot J, Kielczykowska M, Luchowska-Kocot D, Kurzepa J, Musik I. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application. *Oxid Med Cell Longev*. 2018:7074209, 2018.
188. Gargouri W, Osés SM, Fernández-Muiño MA, Sancho MT, Kechaou N. Evaluation of bioactive compounds and biological activities of Tunisian propolis. *LWT*. 111: 328-36, 2019.
189. Martinello M, Mutinelli F. Antioxidant activity in bee products: A review. *Antioxidants (Basel)*. 10(1):71, 2021.
190. Przybyłek I, Karpiński TM. Antibacterial properties of propolis. *Molecules*. 24(11):2047, 2019.
191. Takemura T, Urushisaki T, Fukuoka M, Hosokawa-Muto J, Hata T, Okuda Y, et al. 3,4-Dicaffeoylquinic acid, a major constituent of Brazilian propolis, increases trail expression and extends the lifetimes of mice infected with the influenza A virus. *Evid Based Complement Altern Med*. 2012:1-7, 2012.
192. Braakhuis A. Evidence on the health benefits of supplemental propolis. *Nutrients*. 11: 2705, 2019.
193. Alkis HE, Kuzhan A, Dirier A, Tarakcioglu M, Demir E, Saricicek E, et al. Neuroprotective effects of propolis and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the radiation-injured brain tissue (Neuroprotective effects of propolis and CAPE). *Int J Radiat Res*. 13:297-303, 2015.
194. Bazmandegan G, Boroushaki MT, Shamsizadeh A, Ayoobi F, Hakimizadeh E, Allahtavakoli M. Brown propolis at-tenuates cerebral ischemia-induced oxidative damage via affecting antioxidant enzyme system in mice. *Biomed Pharmacother*. 85: 503-10, 2017.

195. Gao W, Wu J, Wei J, Pu L, Guo C, Yang J, et al. Brazilian green propolis improves immune function in aged mice. *J Clin Biochem Nutr.* 55:7-10, 2014.
196. Daleprane JB, da Silva Freitas V, Pacheco A, Rudnicki M, Faine LA, Dörr FA, et al. Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. *J Nutr Biochem.* 23:557-66, 2012.
197. Pei B, Sun J. Pinocembrin alleviates cognition deficits by inhibiting inflammation in diabetic mice. *J Neuroimmunol.* 314:42-9, 2018.
198. Catchpole O, Mitchell K, Bloor S, Davis P, Suddes A. Antiproliferative activity of New Zealand propolis and phenolic compounds vs human colorectal adenocarcinoma cells. *Fitoterapia.* 106:167-74, 2015.
199. Demir S, Aliyazicioglu Y, Turan I, Misir S, Mentese A, Yaman SO, et al. Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line. *Nutr Cancer.* 68:165-72, 2016.
200. Xuan H, Li Z, Yan H, Sang Q, Wang K, He Q, et al. Antitumor activity of chinese propolis in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells. *Evid-Based Complement Altern Med.* 2014:1-11, 2014.
201. Alday E, Valencia D, Carreño AL, Picerno P, Piccinelli AL, Rastrelli L, et al. Apoptotic induction by pinobanksin and some of its ester derivatives from Sonoran propolis in a B-cell lymphoma cell line. *Chem Interact.* 242:35-44, 2015.
202. Bolfa P, Vidrighinescu R, Petruta A, Dezmirean D, Stan L, Vlase, L, et al. Photoprotective effects of Romanian propolis on skin of mice exposed to UVB irradiation. *Food Chem Toxicol.* 62:329-42, 2013.
203. Wright GA, Nicolson SW, Shafir S. Nutritional physiology and ecology of honey bees. *Annu Rev Entomol.* 63:327-44, 2018.
204. Guo J, Wang Z, Chen Y, Cao J, Tian W, Ma B, et al. Active components and biological functions of royal jelly. *J Func Foods.* 82:104514, 2021.
205. Zhu ZY, Zhang Y, Wang JH, Li X, Wang W, Huang ZP. Characterization of sugar composition in Chinese royal jelly by ion chromatography with pulsed amperometric detection. *J Food Compos Anal.* 78, 101-7, 2019.

206. Mureşan CI, Dezmirean DS, Marc BD, Suharoschi R, Pop OL, Buttstedt A. Biological properties and activities of major royal jelly proteins and their derived peptides. *J Func Foods*. 98:105286, 2022.
207. Ramanathan ANKG, Nair AJ, Sugunan VS. A review on royal jelly proteins and peptides. *J Funct Foods*. 44:255-64, 2018.
208. Ramadan MF, Al-Ghamdi A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *J Funct Foods*. 4:39-52, 2012.
209. Balkanska R, Marghitas LA, Pavel CI. Antioxidant activity and total polyphenol content of royal jelly from Bulgaria. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 6:578-85, 2017.
210. Zhao YZ, Li ZG, Tian WL, Fang XM, Su SK, Peng WJ. Differential volatile organic compounds in royal jelly associated with different nectar plants. *J Integr Agric*. 15: 1157-65, 2016.
211. Ma Ç, Ma B, Li J, Fang Y. Changes in chemical composition and antioxidant activity of royal jelly produced at different floral periods during migratory beekeeping. *Food Res Int*. 155:111091, 2022.
212. Collazo N, Carpena M, Nuñez-Estevez B, Otero P, Simal-Gandara J, Prieto MA. Health promoting properties of bee royal jelly: Food of the queens. *Nutrients*. 13:543, 2021.
213. Ahmad S, Campos MG, Fratini F, Altaye SZ, Li J. New insights into the biological and pharmaceutical properties of royal jelly. *Int J Mol Sci*. 21:382, 2020.
214. Simúth J, Bíliková K, Kováčová E, Kuzmová Z, Schroder W. Immunochemical approach to detection of adulteration in honey: physiologically active royal jelly protein stimulating TNF-alpha release is a regular component of honey. *J Agric Food Chem*. 21;52(8):2154-8, 2004.
215. Park MJ, Kim BY, Park HG, Deng Y, Yoon, HJ, Choi YS, et al. Major royal jelly protein 2 acts as an antimicrobial agent and antioxidant in royal jelly. *J Asia-Pac Entomol*. 22:684-9, 2019.
216. Kamakura, M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature*. 473: 478-83, 2011.

217. Kashima Y, Kanematsu S, Asai S, Kusada M, Watanabe S, Kawashima T, et al. Identification of a novel hypocholesterolemic protein, major royal jelly protein 1, derived from royal jelly. PLoS ONE. 9:e105073, 2014.
218. Fan P, Han B, Feng M, Fang Y, Zhang L, Hu H, et al. Functional and proteomic investigations reveal major royal jelly protein 1 associated with anti-hypertension activity in mouse vascular smooth muscle cells. Sci Rep. 6:30230, 2016.
219. Abu-Serie MM, Habashy NH. Two purified proteins from royal jelly with in vitro dual anti-hepatic damage potency: Major royal jelly protein 2 and its novel isoform X1. Int J Biol Macromol. 128:782-95, 2019.
220. Okamoto I, Taniguchi Y, Kunikata T, Kohno K, Iwaki K, Ikeda M, et al. Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. Life Sci. 73:2029-45, 2003.
221. Kim BY, Lee KS, Jung B, Choi YS, Kim HK, Yoon HJ, et al. Honeybee (*Apis cerana*) major royal jelly protein 4 exhibits antimicrobial activity. J Asia-Pac Entomol. 22:175-82, 2019.
222. Bilikova K, Huang SC, Lin IP, Šimůth J, Peng CC. Structure and antimicrobial activity relationship of royalisin, an antimicrobial peptide from royal jelly of *Apis mellifera*. Peptides. 68:190-6, 2015.
223. Zhang X, Yu Y, Sun P, Fan Z, Zhang W, Feng C. Royal jelly peptides: Potential inhibitors of β -secretase in N2a/APP695swe cells. Sci Rep. 9(1):168, 2019.
224. Mohamed AA, Galal AA, Elewa YH. Comparative protective effects of royal jelly and cod liver oil against neurotoxic impact of tartrazine on male rat pups brain. Acta Histochem. 117(7):649-58, 2015.
225. Liu X, Jiang C, Chen Y, Shi F, Lai C, Shen L. Major royal jelly proteins accelerate onset of puberty and promote ovarian follicular development in immature female mice. Food Sci Hum Wellness. 9(4):338-45, 2020.
226. Habashy NH, Abu-Serie MM. The potential antiviral effect of major royal jelly protein2 and its isoform X1 against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Insight on their sialidase activity and molecular docking. J Funct Foods. 75:104282, 2020.

227. Omurtag GZ, Beyoglu D. Occurrence of deoxynivalenol (vomitoxin) in beer in Turkey detected by HPLC. *Food Control*. 18(2):163-6, 2007.
228. Keskin E, Eyupoglu OE. Determination of mycotoxins by HPLC, LC-MS/MS and health risk assessment of the mycotoxins in bee products of Turkey. *Food Chem*. 400:134086, 2023.
229. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü. Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metod Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi, 2018, https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Gida_Kont/Kimyasal_Fiziksel_Val_Ver_Rehberi.pdf (Erişim 06.02.2022).
230. Mallmann CA, Tyska D, Almeida CAA, Oliveira MS, Gressler LT. Mycotoxicological monitoring of breakfast and infant cereals marketed in Brazil. *Int J Food Microbiol*. 331:108628, 2020.
231. Aytıp Y, Akbay C, Meral H. Consumers behavior towards bee products consumption in the centre district of Kahramanmaraş province. *KSU J Agric Nat*. 22:449-55, 2019.
232. Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması (TBSA), T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 1132, Ankara, 2019.
233. EFSA Scientific Committee. Guidance on selected default values to be used by the EFSA scientific committee, scientific panels and units in the absence of actual measured data. *EFSA J*. 10(3):2579, 2012.
234. World Health Organization (WHO). Food and Agriculture Organization of the United Nations 2009. Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food. Updated Chapter 6. Dietary Exposure Assessment of Chemicals in Food. Geneva, 2020.
235. Schrenk D, Bodin L, Chipman JK, del Mazo J, Grasl-Kraupp B, Hogstrand C, et al.; EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). Risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA J*, 18(5):6113, 2020.
236. Benford D, Ceccatelli S, Cottrill B, DiNovi M, Dogliotti E, Edler L, et al.; EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). Statement on the risks for public health related to a possible increase of the

maximum level of deoxynivalenol for certain semi-processed cereal products. EFSA J. 11(12):3490, 2013.

237. Türk Gıda Kodeksi (TGK). Gıdalardaki Mikotoksin Seviyelerinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği (Tebliğ No:2018/10), <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2018/03/20180315-19-1.pdf> (Erişim 16.11.2022).
238. Sandıkçı Altunatmaz S, Yılmaz Aksu F. Arı polenin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 13(3):182-7, 2016.
239. Rodríguez-Carrasco Y, Font G, Manes J, Berrada H. Determination of mycotoxins in bee pollen by gas chromatography-tandem mass spectrometry. J Agric Food Chem. 61:1999-2005, 2013.
240. Garcia-Villanova RJ, Cordón C, González Paramás AM, Aparicio P, Garcia Rosales ME. Simultaneous immunoaffinity column cleanup and HPLC analysis of aflatoxins and ochratoxin A in Spanish bee pollen. J Agric Food Chem. 52(24):7235-9, 2004.
241. Xue XF, Selvaraj JN, Zhao L, Dong H, Liu F, Liu Y, et al. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in bee pollen by low-temperature fat precipitation and immunoaffinity column cleanup coupled with LC-MS/MS. Food Anal Methods. 7:690-6, 2014.
242. González G, Hinojo MJ, Mateo R, Medina A, Jiménez M. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. Int J Food Microbiol. 105(1):1-9, 2005.
243. Kostić AŽ, Petrović TS, Krnjaja VS, Nedić NM, Tešić ZL, Milojković-Opsenica DM, et al. Mold/aflatoxin contamination of honey bee collected pollen from different Serbian regions. J Apic Res. 56:13-20, 2017.
244. Végh R, Csóka M, Sörös C, Sipos L. Food safety hazards of bee pollen – a review. Trends Food Sci Technol. 114:490-509, 2021.