

T.C.  
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**GIDALARDA İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ İLE  
AFLATOKSİNLERİN KANTİTATİF TAYİNİNDE  
GÖRÜNTÜ ANALİZİNİN KULLANILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Rukyete AYDENİZ  
DANIŞMAN: Prof. Dr. Fikret Nafi ÇOKSÖYLER  
İKİNCİ DANIŞMAN: Gökhan BORAN

VAN-2017

T.C.  
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**GIDALARDA İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ İLE  
AFLATOKSİNLERİN KANTİTATİF TAYİNİNDE  
GÖRÜNTÜ ANALİZİNİN KULLANILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Rukyete AYDENİZ

Bu çalışma YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından **2016-FBE-YL004** nolu proje ile desteklenmiştir.

VAN-2017

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı'nda Prof. Dr. Fikret Nafi ÇOKSÖYLER danışmanlığında Rukyete AYDENİZ tarafından sunulan "**Gıdalarda İnce Tabaka Kromatografisi İle Aflatoksinlerin Kantitatif tayininde Görüntü Analizinin Kullanılması**" isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince .../01/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile başarılı bulunmuş Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:

İmza:

Üye:

İmza:

Üye:

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../..... tarih ve .....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza

Enstitü Müdürü

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Rukyete AYDENİZ

## ÖZET

### GIDALARDA İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ İLE AFLATOKSİNLERİN KANTİTATİF TAYİNİNDE GÖRÜNTÜ ANALİZİNİN KULLANILMASI

AYDENİZ, Rukyete  
Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı  
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Fikret Nafi ÇOKSÖYLER  
Ocak 2017, 44 sayfa

İnce tabaka kromatografisinde (TLC) aflatoksinlerin miktar tayininde “densitometreler” kullanılmaktadır. Pahalı olan bu cihaz yerine, numune beneklerinin standart benekleri ile göz ile karşılaştırılması (GK) şeklinde yarı kantitatif bir tayin çok daha yaygındır. Bu çalışmada TLC’de miktar tayininde göz ile analizin (GA) GK’ya nazaran başarısı ortaya konulmaya çalışılmıştır. GA için, plakaların dijital görüntülerini elde etmede bir jel elektroforezi görüntüleme cihazı, cep telefonu kamerası ve iki farklı DSLR (Dijital Single Reflex) kamera karşılaştırılmıştır. Daha sonra çalışmaya tek bir DSLR kamera ile devam edilmiştir. GK “duyusal” bir test olduğu için, karşılaştırmada sıralama ve üçgen testi gibi duyuşsal teknikler kullanılmış ve ayrıca kalibrasyon kurvesi ile miktar tayini de denenmiştir. Görüntü analizinde ticari bir jel elektroforezi programı (JEP) ile bu proje için özel hazırlanan bir yazılım (ÖY) kullanılmıştır. GK için 10 kişilik bir panelist görev yapmıştır. Sıralamaların, gerçek sıralamaya karşı regresyonuna ait doğrusal korelasyon katsayıları; kişilerin GK’sında  $R^2$  0,02-1 arasında JEP ile yapılan sıralamalarda 0,87-0,96 arasında ve ÖY ile yapılan sıralamalarda 0,93-1 arasında değişmiştir. Üçgen testi şeklinde uygulanan farklılık testlerinde panelistlerin tamamı ancak %50 düzeyindeki farklılığı belirlerken, görüntü analizi programları ise %10’a kadar farklılıkları istatistikî önemlilikte belirleyebilmişlerdir. JEP ve ÖY’nin kalibrasyon kurvelerine ait  $R^2$  değerleri sırasıyla 0,98 ve 0,96 olurken göz ile yapılan tayinlerde bu değer hem çok geride hemde kişilere bağımlı olarak değişken olmuştur. Sonuç olarak GA gözle tayinden daha pratik, hiç bir ilave yük getirmeyen “tam kantitatif” bir yaklaşımdır.

**Anahtar kelimeler:** Aflatoksin, Görüntü analizi, İnce tabaka kromatografisi, Kantitatif tayin, Üçgen testi



## ABSTRACT

### USE OF VISUAL ANALYSIS FOR QUATITATIVE DETERMINATION OF AFLATOXINS BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY IN FOODS

AYDENİZ, Rukyete

M.Sc Thesis, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Fikret Nafi ÇOKSÖYLER

January 2017, 44 pages

Densitometers are used in quantification of aflatoxins on Thin Layer Chromatography (TLC). Instead of expensive equipment, a semi-quantitative evaluation is also much more common in comparison with visual inspection. The promising technique, image processing is not widespread in TLC. There has not been conducted a study about quantification by image processing of aflatoxins on TLC in our department so far. This study is performed in order to demonstrate whether the performance of image processing is higher than visual inspection for quantification of aflatoxin spots on TLC plate. The digital images of plates obtained by a gel imaging equipment, mobile phone camera and two different DSLR cameras. DSLR cameras detected pale spots better than the others. Although the visual inspection is a kind of sensory analysis, sensory methods such as “ranking” and “triangle tests” are used for comparison. Additionally, quantification by calibration curve is also performed by image processing. In image processing two different software, as an gel electrophoreses program and a specially prepared soft ware for this thesis are used. To evaluate ranking performance of visual inspection and image processing regression analysis is performed. Ranking by image processing is found better than the ranking by visual inspection. At difference tests, visual inspection is only successful at the %50 differences, but image processing identified lower degree differences.

**Keywords:** Aflatoxin, Image processing, Quantification, Thin layer chromatography, Triangle test



## ÖN SÖZ

Aflatoksinler gıdalarda en tehlikeli bulaşanlardan kabul edilmektedir. Özellikle Türkiye'nin geleneksel ihraç ürünleri olan kuru meyveler aflatoksin oluşumuna maruz kalmakta ve bu da ihracatının en önemli darboğazlarından birisi olmaktadır. Aflatoksin analizleri "günümüzde" HPLC ile yapılmaktadır ve bu nedenle çok pahalıdır ve özellikle KOBİ gıda işletmeleri tarafından yapılamadığı/yaptırılmadığı için işletmeler kendi oto kontrollerini yapamamakta ve ihraç ürünlerinin aflatoksin nedeniyle geri gönderilmeleri hala devam etmektedir. Bundan 20-30 yıl önce kullanılan TLC ise çok ekonomik olmasına karşılık, özellikle "densitometre" olmaksızın, göz ile yapılan numune ve standart karşılaştırması sonucu tam kantitatif bir sonuç vermemesi, teşhis limitinin HPLC kadar düşük olmaması nedeniyle tercih edilmemektedir Her alanda kantitatif değerlendirmelerde yaygın olarak kullanılan "görüntü analizi" tekniğinin neden TLC plakaları üzerinde miktar tayininde yaygınlaşmadığı tarafımızdan anlaşılır bir konu olmamıştır. Hele TLC ile aflatoksin tayininde görüntü analizi ile miktar tayini yapan hiçbir bilimsel çalışmaya -Bölümümüzde bir yüksek lisans tezi dışında rastlanmamıştır. Bu çalışma aflatoksin analizlerini ekonomik hale getirme ile ilgili bir projenin bir parçasıdır. Görüntü analizi ile TLC plakası üzerinde miktar tayini yapılabileceğini göstermek, densitometrik analiz kadar olmasa bile göz ile yapılan tayine karşın daha başarılı olabileceğini ortaya koymak, dijital kameraların mobil telefonun bir parçası olduğu günümüzde görüntü üzerinden yapılan tayinin gözle incelemenin yerini kolaylıkla ve başarı ile alabileceğini göstermek için yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında, her türlü ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, düşünceleriyle, çalışmalarıyla her zaman bana destek veren ve emekli olduktan sonra bile öğrencilerine sahip çıkan danışmanım Sayın Prof. Dr. Fikret Nafi ÇOKSÖYLER'e çok teşekkür ederim.

Görüntü çekimlerinde jel görüntüleme cihazını kullanma imkanı veren Tıp Fakültesi Temel Tıp Bölümü'nden Doç. Dr. Hüseyin Güdücüoğlu'na, Canon 5D Mark II kamerası ile çalışmama katkı sağlayan Savaş Onur ŞEN'e ve Fujifilm kamerasını kullandığımız Sümeyye KARA'ya, panelist olarak görev alan YYÜ Gıda Mühendisliği 3. ve 4. sınıf öğrencilerine, tüm çalışmaları birlikte yürüttüğümüz ekip arkadaşlarım

Berfin ELMAS ve Cansu AĞAN'a teŝekkürü bir borç bilirim. Ayrıca eğitim hayatım boyunca aldığım kararlarda desteğini eksik etmeyen ve bana güç veren babam Ahmet AYDENİZ ve annem Fatma AYDENİZ, biricik kardeşim, sevgili ailem, çalışmalarım esnasında manevi olarak bana destek ve moral veren ve duysal analizime katılan değerli arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmaya 2016-FBE-YL004 proje numarasıyla gerekli maddi desteği sağlayan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne çok teşekkür ederim.

2017

Rukyete AYDENİZ

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
ÖN SÖZ.....	v
ÇİZELGELER LİSTESİ .....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xiii
EKLER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ .....	3
2.1. Aflatoksinler hakkında genel bilgi .....	3
2.2. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC).....	5
2.3. Görüntü ve Göz ile Analiz.....	6
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	9
3.1. Materyal.....	9
3.2. Yöntem .....	9
3.2.1. Aflatoksin standart çözeltilerinin hazırlanması .....	9
3.2.2. Çözeltilerin plakaya tatbiki .....	10
3.2.3. Plakaların developesi.....	10
3.2.4. Plakalardaki dijital görüntülerin alınması .....	10
3.2.5. Plaka üzerinde beneklerin gözle incelenmesi.....	11
3.2.6. Plaka üzerindeki beneklerin dijital görüntülerinin alınması ve görüntüleme ekipmanlarının karşılaştırılması.....	11
3.2.7. Gel Quant programı ile görüntü analizi.....	12
3.2.8. Gıdalarda ince tabaka kromatografisi ile kantitatif tayininde görüntü analizinin kullanılması projesi için hazırlattırılan özel yazılım ile tayin	12
3.2.9. Göz ile yapılan tayin, jel elektroforezi programı ile yapılan tayin ve proje için hazırlanan özel yazılım ile tayinin karşılaştırılması.....	12

3.2.9.1. Sıralama testi.....	13
3.2.9.2. Üçgen testi .....	13
3.2.9.3.Kalibrasyon kurvesi ile miktar tayini.....	15
4. BULGULAR .....	17
4.1. Aflatoksin çözeltilerinin hazırlanması.....	17
4.2. Plaka üzerindeki beneklerin dijital görüntülerinin alınması ve görüntüleme ekipmanlarının karşılaştırılması.....	19
4.3. Göz ile yapılan tayin, Gel Quant jel elektroforezi programı ile yapılan tayin ve proje için hazırlanan özel yazılım ile tayinin karşılaştırılması .....	24
4.3.1. Sıralama Testi.....	24
4.3.2. Üçgen testi.....	27
4.3.3 Kalibrasyon kurvesi ile miktar tayini .....	29
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	32
KAYNAKLAR.....	34
EKLER .....	36
ÖZ GEÇMİŞ.....	45

## ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. İstatistiki farklılıkları belirleme tablosu.....	14
Çizelge 4.1. Standartların numara ve konsantrasyonları.....	18
Çizelge 4.2. Jel görüntüleyicisi, Canon 5D MARK II DSLR kamera, cep telefonu, Fujifilm DSLR kamera konsantrasyonuna karşı GELQUANT pik alanları..	21
Çizelge 4.3. Üçgen testi için seçilen kombinasyonlar ve benek görüntüleri.....	28
Çizelge 4.4. Panelistlerin 12 kombinasyonda verdikleri doğru cevaplar.....	39



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Bazı aflatoksinlerin kimyasal yapıları.....	4
Şekil 4.1. Konsantrasyonların hazırlanması.....	19
Şekil 4.2. Bio_Rad jel görüntüleme cihazı ile çekilen görüntü.....	20
Şekil 4.3. Canon 5D Mark II kamera ile çekilen görüntü.....	20
Şekil 4.4. Samsung GalaxyNote4 cep telefonu kamerasıyla çekilen görüntü.....	20
Şekil 4.5. Fujifilm kamera ile çekilen görüntü.....	21
Şekil 4.6. Samsung GakaxyNote4 cep telefonu kamerası ile çekilen görüntünün regresyon grafiği.....	22
Şekil 4.7. Canon 5D mark II camera ile çekilen görüntünün regresyon grafiği.....	22
Şekil 4.8. Jel görüntü cihazı ile çekilen görüntünün regresyon grafiği.....	23
Şekil 4.9. Fujifilm DSLR kamera ile çekilen görüntünün regresyon grafiği.....	23
Şekil 4.10. Gel Quant programının sıralama regresyon grafiği.....	25
Şekil 4.11. Özel olarak geliştirilen programın sıralama regresyon grafiği.....	25
Şekil 4.12. Üçüncü panelistin sıralama regresyon grafiği.....	26
Şekil 4.13. İlk panelistin gözle tayinin regresyon sonucu.....	26
Şekil 4.14. Birinci panelistin plakaya ikinci kez yaptığı gözle tayin regresyon grafiği.....	27
Şekil 4.15. Özel geliştirilen programda YuodunPlot tekniği ile miktar tayinin regresyon grafiği.....	30
Şekil 4.16. Gel Quant programının YuodunPlot tekniği ile miktar tayinin regresyon grafiği.....	30
Şekil 4.17. Panelistlerden en iyi gözün gördüğü miktar tayinin regresyon grafiği.....	31
Şekil 4.18. Panelistlerden kötü gözün gördüğü miktar tayinin regresyon grafiği.....	31



## SİMGELER VE KISALTMALAR

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

### Simgeler

### Açıklama

<b>mg</b>	miligram
<b>ng</b>	nanogram
<b>µl</b>	mikrolitre
<b>ml</b>	mililitre
<b>cm</b>	santimetre
<b>kg</b>	kilogram

### Kısaltmalar

### Açıklama

<b>GA</b>	Görüntü Analizi
<b>GK</b>	Göz ile Karşılaştırma
<b>JEP</b>	Jel Elektroforezi Programı
<b>ÖY</b>	Özel Yazılım
<b>KOBİ</b>	Küçük ve Orta Büyüklükteki İşletmeler
<b>TLC</b>	İnce Tabaka Kromatografisi
<b>HPLC</b>	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
<b>HPTLC</b>	Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
<b>ELISA</b>	Enzim Bağlantılı İmmunosorbent deneyi
<b>TBME</b>	Tetr Butil Metil Eter
<b>UV</b>	Ultra Viole (Mor Ötesi)
<b>DSRL</b>	Digital Single Reflex Camera
<b>AOAC</b>	Analitik Kimyacılar Birliği
<b>FAO</b>	Dünya Gıda ve Tarım Örgütü
<b>AFB<sub>1</sub></b>	Aflatoksin B <sub>1</sub>

<b>AFB<sub>2</sub></b>	Aflatoksin B <sub>2</sub>
<b>AFG<sub>1</sub></b>	Aflatoksin G <sub>1</sub>
<b>AFG<sub>2</sub></b>	Aflatoksin G <sub>2</sub>
<b>AFM<sub>1</sub></b>	Aflatoksin M <sub>1</sub>
<b>AFM<sub>2</sub></b>	Aflatoksin M <sub>2</sub>
<b>Rf</b>	Solventin aldığı yolun aflatoksinin aldığı yola oranı



## EKLER DİZİNİ

<b>Ek</b>	<b>Sayfa</b>
Ek 1. Standart hazırlama .....	35
Ek 2. Vialerin değişik konsantrasyonlarda hazırlanan standartları.....	35
Ek 3. 20×10 cm'lik karşılaştırma plakası.....	35
Ek 4. 10×10 cm'lik sıralama plakaları.....	36



## 1. GİRİŞ

Aflatoksinler; esas olarak *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* türleri tarafından oluşturulan bir mikotoksin grubudur. Aflatoksin sorunu, insan sağlığı için büyük bir tehlike oluşturmasının yanısıra, birçok ülke için ekonomik yönden de önem taşımaktadır. Aflatoksinle kontamine olan gıdaları ihraç etmek mümkün olmamakta ve çoğu kez ürün imha edilmek zorunda kalmakta veya denetim mekanizması yetersiz olan ülkelerde iç pazarda tüketime sunulmaktadır. Bu durum ağır ekonomik kayıplara yol açmakta ve söz konusu ülkelerde insan sağlığı açısından tehdit oluşturmaktadır. Ayrıca yemlerde bulunan aflatoksin de, hayvanlarda ölüme kadar giden çok çeşitli etkilerinin yanısıra verim düşüklüğüne yol açarak ekonomik sorunlara neden olabilmektedir. Bütün bu nedenlerle, gıda ve yemlerde aflatoksin oluşumunun önlenmesi büyük önem taşımaktadır (Abbas, 2005).

Sorunun çözümünün önemli bir parçası işletmelerde ham maddeden mamule kadar tüm aşamalarda aflatoksin analizleri ile kontroldür. Günümüzde aflatoksinlerin tayininde metanol su ile ekstraksiyon, ekstraktın immuno affinite kolon ile temizlenmesi HPLC ile ters faz kromatografik ayırım, kolon sonrası türevlendirme ve floresans dedektör ile teşhis ve tayin tek yöntem haline gelmiştir. HPLC çok pahalı bir cihazdır ve sarf malzemeleri de pahalıdır. Bu nedenle orta ve küçük işletmeler kurulması mümkün olamamaktadır. Bundan 20-30 yıl öncesine kadar kullanılan TLC, çok ekonomik olmakla birlikte; kromatografik ayırımın yetersizliği, teşhis ve tayin limitlerinin yeterince düşük olmaması ve TLC'de kantitatif tayini yapacak ve kromatogramdaki beneklerin floresans yoğunluklarını okuyan densitometreler çok pahalı olması densitometresiz, gözle yapılan numune ve standart beneklerinin karşılaştırılması şeklindeki miktar tayininin yetersiz kalması gibi nedenlerle günümüzün ihtiyaçlarını karşılayamama gibi önemli sorunları vardır. Bu nedenle aflatoksin tayinlerinde ülkemizde ve batı ülkelerinde HPLC metotları resmi metotlar haline gelmiştir. Ancak hem bu cihazın fiyatı ve hemde kullandığı sarf malzemelerinin çok pahalı olması nedeniyle aflatoksin sorunu olan KOBİ işletmeleri bu analizleri yeterince yapamamakta/yaptıramamakta ve dolayısıyla aflatoksin yönünden otokontrollerini yapamamaktadırlar.

Tezin temel amacı klasik olarak aflatoksin miktarının TLC üzerinde gözle tayini (TSE,1985) ile aynı şartlarda elde edilen plaka görüntüsü üzerinde yapılan görüntü analizi ile miktar tayini karşılaştırılarak görüntü ile miktar tayininin ne kadar daha başarılı ve yüksek performanslı olabileceğini ortaya koymak ve bu hipotezi bilimsel bir çalışma ile ispatlamaktır. Ayrıca gözle yapılan miktar tayininde gözün göremediği düzeyler doğal olarak miktar tayini sınırları içine girmemektedir (Teşhis limitinin altında, tayinin altında gibi). Oysaki günümüzde herhangi bir dijital kamerayla çekilen plaka görüntüsünde bu düşük düzeydeki benekler görülür hale gelebilmekte ve dolayısıyla görüntü üzerinde yapılan miktar tayininde teşhis ve tayin limitleri daha da düşebilmektedir. Böylece tezin bir diğer amacı da UV altında plakanın fotoğraf çekiminin parametreleri (diyafram açıklığı, enstantane, hassasiyet vb.) üzerinde değişiklikler yaparak gözle görünemeyen benekleri görünür hale getirmek ve metodun teşhis ve tayin limitini düşürmektir. Böylece bir ölçüde TLC'nin performansı HPLC'nin performansına yaklaştırılmış olur.

Yukarıda sayılan amaç ve hedeflerle plaka üzerinden gözle yapılan tayinden daha başarılı bir kantitatif değerlendirme yapılarak, günümüz popüler teknolojinin laboratuvar teknolojisinde nasıl kullanılabileceği gösterilmiştir.

## 2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

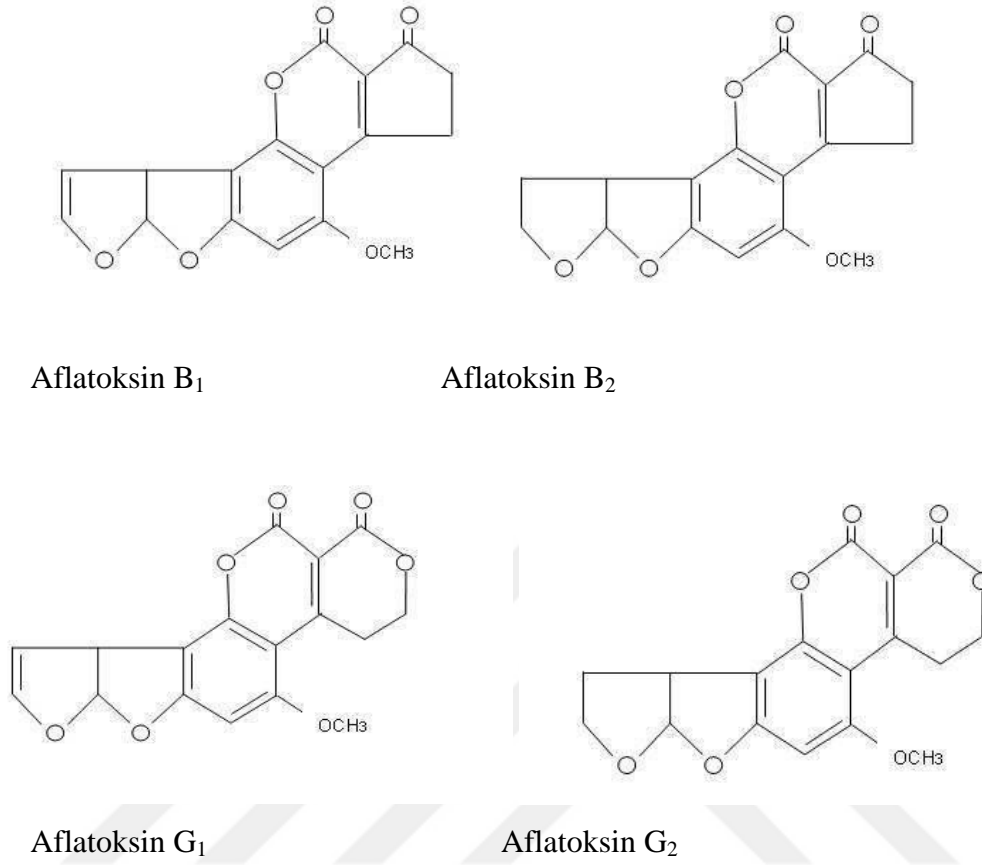
### 2.1. Aflatoksinler hakkında genel bilgi

Mikotoksin kelimesi, Yunanca fungus anlamına gelen “Mycos” ve latince zehir anlamına gelen “Toxikon” kelimelerinin bileşiminden oluşmuştur. Mikotoksikosis, mikotoksinler ile kontamine olmuş gıda ve yemleri tüketen insan ve hayvanlarda meydana gelen hastalığa verilen isimdir. Mikotoksinlerden üzerinde en çok çalışma yapılan mikotoksinler aflatoksinlerdir. Toksinin asıl etmeninin *Aspergillus flavus* adlı bir fungus olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle keşfedilen bu toksine *Aspergillus flavus* toksin yani, aflatoksin adı verilmiştir.

Toksinin, kanatlılarda bir çeşit karaciğer kanserine neden olması ve aynı etkiyi diğer deney hayvanlarında da göstermesi, insan için de benzer bir karsinojen etken olabileceği kaygısını yaratmıştır. İşte bu bileşikler gıda ile vücuda alındığında kanserojen, mutajen, teratojen, tremojen, hemoraljen, dermatojen, neurotojen, netrojen etkileri olup; karaciğer, böbrek, kas, sinir dokularında ve hormon sisteminde önemli kronik zararlamalar yaparlar ve zaman zaman da akut ölümcül etkileri de görülmektedir. Mikotoksinlerin en önemli özelliği, vücutta biriken toksisitesi olması ve zamana bağlı olarak geri dönüşümü olmayan bozukluklar bırakmasıdır. Bu zararlar kişilerin beslenme, yaş, stres durumları ile etkileşim halindedir. Yaşın toksin hassasiyeti ile ters orantılı olduğu bildirilmektedir (Çoksöyler,1996).

Bilinen mikotoksinler içinde en fazla toksik etkiye sahip olup, doğada yaygın olarak bulunan *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* funguslarının metabolitleri olan aflatoksinlerdir. Aflatoksinler esas olarak bu türler tarafından oluşturulan ve birbirine yakın bileşimde 17 kadar mikotoksine verilen genel isimdir (FAO,1990). Bu aflatoksinlerden en önemli formu AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>2</sub> olup gıdalarda en çok bu aflatoksinler aranmaktadır. Aflatoksin içeren yemlerle beslenen süt sığırlarında aflatoksinler, AFM<sub>1</sub> ve AFM<sub>2</sub> şeklinde iki farklı yapıya dönüşürler. Aflatoksin B<sub>1</sub>'den daha küçük Rf'e sahip ve UV ışığı altında mavi menekşe renk veren bu faktöre süt toksini adı verilmiştir (Abbas, 2005).

Bitkisel gıda ve yem maddelerinde en sık rastlanan dört farklı aflatoksinin kimyasal yapısı aşağıda verilmiştir



Şekil 2.1. Bazı aflatoksinlerin kimyasal yapıları (Özkaya ve Temiz, 2003).

Mikotoksinler müsaade edilebilir limit düzeylerinin belirlenmesinde mikotoksinlerin toksik etkileri yanında; o ülkedeki ürünlerde mikotoksin düzeyi; pratikte kullanılabilir analiz metotlarını güvenli olarak tayin edebilecekleri minimum toksin düzeyi, mikotoksinlerin ürünlerde dağılımının getirdiği problemler ve ülke içi-dışı ticaret ve ilgili mevzuat etkili olabilmektedir. Bunun yanında halk sağlığı ve ekonomik kayıplar düşünülerek aflatoksinlerin gıdalarda bulunma düzeylerine çok sayıda ülke tarafından yasal sınırlamalar getirilmiştir. Günümüzde Türkiye’de gıda ürünlerinde izin verilen aflatoksin B<sub>1</sub> için alt ve üst limitler 0,10-12 µg/kg, toplam aflatoksinin (AFB<sub>1</sub>+AFB<sub>2</sub>+AFG<sub>1</sub>+AFG<sub>2</sub>) kabul edilebilir alt ve üst limitleri 4-15 µg/kg, aflatoksin M<sub>1</sub> için alt ve üst limitler 0,025-0,050 µg/kg arasındadır.

Böylesine eser miktarda olan kontaminasyon seviyelerinin tespiti, çok duyarlı ve kesin sonuçlar veren metotların geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu amaçla değişik

gıda maddelerinden mikotoksinlerin ayırımı ve teşhisi için birçok farklı metot geliştirilmiştir. Bunlar TLC, HPTLC, HPLC, Mini kolon kromatografisi, ELISA, Kapiler Elektroferez vb. gibi yöntemlerdir. Bunların bir kısmı kantitatif, bir kısmı da kalitatif yöntemlerdir (Çoksöyler,1996).

Yaygın kullanılan HPLC ve TLC metotları doğrulama ve referans metot özelliğinde iken, ELISA metotları tarama metodu özelliğindedir ve çapraz reaksiyonlar nedeniyle sahte pozitifleri olabilmektedir. Bu nedenle pozitif bulguları mutlaka kromatografik bir yöntem ile doğrulanmalıdır ancak daha da önemlisi sahte negatifleri olabilmektedir (Anklamvd, 2002).

İnce Tabaka Kromatografisi (TLC), Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC) ile aflatoksin tayin metotları 1970'li yıllardan itibaren AOAC International'ın yayınladığı resmi metotlar içinde yer almıştır. Ancak teşhis ve tayin limitlerinin süt ve hububat gibi ürünlerde günümüz aflatoksin/mikotoksin kodeks limitlerini (MRL) karşılayamaması, tekrarlanabilirliğinin HPLC'nin gerisinde kalması ve kromatografi öncesi ekstrakt temizleme işlemlerinin fazlalığı nedeniyle batı ülkelerinde son aflatoksin tayini metotlarının hemen hemen hepsi HPLC metodudur.

## **2.2. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)**

Kromatografi, bir ayırım tekniği olarak, ilk defa 1903 yılında Rus botanikçi Tswett tarafından bitki ekstraktındaki maddelerin ayırımı için kullanılmış ve renk renk ayırışan bantlar nedeni ile tekniğe "kromatografi" adı verilmiştir. İlk ince tabaka uygulaması 1938'de Izmailov ve Shraiber tarafından, daha az sorbent ve daha az numune kullanan pratik bir metot arayışı nedeniyle gerçekleştirilmiştir (Sherma ve Fried, 2005).

Asıl gelişme 1946-1956 yılları arasında olmuş ve günümüz TLC tekniği (tank içinde plaka ve dipteki solventin kapilarite ile yukarıya doğru ilerlemesi ve plakaya önceden uygulanmış olan beneklerdeki bileşenlerin plaka üzerinde ilerleyen solvent ile ayırımı) şekillenmiştir. Bu yıllarda yöntemin adı "Thin Layer Chromatography, TLC" olarak şekillenmiştir. TLC 60'lı yıllarda bilinen en güçlü ayırım tekniğidir. Aminoasitlerden şekerlere, organik asitlere vb. her türlü kimyasal gurubun ayırımı için metotlar geliştirilmiştir. 1969'da yayınlanan Stahl'ın ikinci kitabında tüm metotlar bulunmaktadır. 1970'lerde hazır plakalar ve 1980'lerde yüksek performanslı plakalar

(HPTLC) geliştirilmiştir. Günümüzde “Ultra” ince plakaların seperasyon kimyasının geleceğini oluşturacağı düşünülmektedir (Olesik vd, 2014).

Klasik TLC sistemi; 10x22x22 cm boyutlarında kapaklı bir kromatografi odası (chamber) veya tankı, plakaya numune uygulama düzeneği ve plaka üzerindeki ayrımı görüntüleyebilmek için bir UV lambası veya kabini ve kullanılıp atılan kromatografi plakalarından oluşmaktadır. Aflatoksinlerin keşfedildiği 1960 yılından itibaren TLC tek tayin yöntemi olarak 1980’li yıllara kadar kullanıla gelmiştir. Halen dünyanın çok sayıda ülkesinde resmi yöntemler TLC’ye dayanan yöntemlerdir. Klasik TLC’nin performansı daha iyi ayırım, plaka üzerinden miktar tayini ve daha küçük miktarları teşhis yönü ile geliştirilebilir, pratikliği artırılabilir, maliyeti düşürülebilir ve böylece otokontrolde kullanımı daha kolay kabul görür. Modern TLC teknikleri bu özelliklere sahiptir ancak çok daha pahalıdır (Çoksöyler, 1996).

TLC ile aflatoksinin miktar tayininde kullanılan densitometreler çok pahalı bir sistem olduğundan dolayı densitometre yerine Görüntü Analiz Tekniği kullanılarak daha pratik ve ucuz bir yöntemin kullanılabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur.

### 2.3. Görüntü ve Göz ile Analiz

Günümüzde hızlı teknolojik gelişim içerisinde canlılardaki yapılar incelenerek bulunan yeni özellikler bilgisayar ortamına aktarılmaya çalışılmaktadır. Görüntü işleme açısından insan algılama sistemi; görüntü yakalama, gruplama ve analiz konusunda bilinen karmaşık sistemdir. Görüntü işleme ise, bir görüntüden başka bir görüntünün elde edilmesi için kullanılan tekniklerin bütünüdür. Görüntü işleme teknikleri, görüntünün insan veya bilgisayar tarafından anlaşılabilmesi ya da yorumlanabilmesini sağlamayı hedeflemektedir (Hisar, 2011).

Ruiz ve Ochoa (1997) tek boyutlu TLC ile ayırdıkları lipitlerin miktarını görüntü analizi ile belirlemişlerdir. Bu yolla lipidlerin miktarlarını nanomol düzeyinde belirleyebilmişlerdir.

Hung ve Tie-xin (2008), *Echinacea purpurea* (L.) Moench (ekinezya, kirpi otu) bitkisinde şikorik asit tayininde TLC miktar tayininde görüntü analizini kullanmışlardır. Araştırmacılar, bu yolla miktar tayininin çok ekonomik olduğu ve metot performansının da iyi olduğunu belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada kalibrasyon kurvesinin 0.25-1.0 µg

aralığında doğrusal olup  $R^2$  değerinin 0.9917 olduğunu ve tayinin teşhis limitinin 0.067  $\mu\text{g}$  olarak hesaplandığını bildirmişlerdir.

Bansan ve ark. (2008), çok basit bir görüntü analizi algoritması kullanarak (beneklerin 2 bit'lik görüntülerini oluşturup miktarla orantılı giden benek alanının hesaplanması) biyodizel içindeki %0.1 düzeyindeki gliserolün miktar tayinini yapabilmişlerdir.

Görüntü analizi ile densitometrenin karşılaştırılmasına ait iki farklı çalışmanın birincisinde; Vovk ve Prosek (1997), densitometre ile görüntü analizini TLC plakalarının kantitatif değerlendirmesi için karşılaştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada 2 görüntü analizi sisteminin de hassasiyet yönünden densitometrik değerlendirmenin çok gerisinde kaldığını belirtmişlerdir. Buna karşılık Ceftriaxonesodium (CFX) miktarının TLC üzerinde densitometre ve görüntü analizi ile karşılaştırmalı yapılan bir diğer çalışmada hem densitometre hem de görüntü analizi ile elde edilen standart kurvelerin  $R^2$  değerleri 0.99'dan yukarı bulunmuş ve görüntü analizinin densitometre ile mukayese edilebilir sonuçlar verdiğini, miktar tayini için pahalı densitometrelere gerek olmadığını belirtmişlerdir.

Aflatoksinlerin kantitatif tayininde TLC ve görüntü analizinin kullanıldığı çok az çalışma vardır. Bölümümüzde; Karakaş (2014), TLC'de aflatoksinlerin tayininde görüntü analizinden yararlanmışır. Bu çalışmada plakaya numune ile birlikte bir seri aflatoksins standartları uygulanmış, plakanın 365 nm UV ışığı altında dijital kamera ile görüntüsü alınmış ve bu görüntüler Photoshop CS.7 programı kullanılarak renk gri hale getirilmiş ve bir jel elektroforezi değerlendirme programı olan Gel Quant programı ile bu işlenmiş görüntü üzerinden aflatoksin beneklerinin dijital görüntüleri pikler haline getirilmiştir. Program piklerin alanlarının toplam alanın %'si olarak vermektedir. Bu değerler kullanılarak standart piklerinin relatif alanından kalibrasyon kurveleri çizilmiş ve numunenin rölatif alanı kullanılarak kalibrasyon kurvesi üzerinden numune benegindeki aflatoksin miktarı hesaplanmıştır. Bu çalışmada kalibrasyon kurvesinin  $R^2$  değeri 0.91-0.99 arasında değişmiştir.

Göz ile aflatoksin tayinini görüntü analizi ile karşılaştıran hiçbir bilimsel çalışmaya rastlanmamıştır.

Göz ile aflatoksin tayini standart ve numune beneklerine bakarak bunları floresans yoğunlukları yönünden karşılaştırmaya dayanmaktadır. Bu karşılaştırma

seçilen numune beneğinin hangi standart beneğinden daha yoğun ve/veya hangi standart beneğinden daha soluk olduğuna bakmak şeklinde yapılmakta ve farksız görülen ile de aynı kabul edilmektedir (Çoksöyler, 1996). Literatürde adlandırılmamış olmakla birlikte biz buna duyusal analiz diyebiliriz.

Duyusal analiz, duyu organlarımızla değerlendirmeye dayanır. Duyusal analizin eşik testi, farklılıkların testi ve dereceleme gibi çeşitleri vardır (Abbas, 2005).



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Bu çalışmamızda materyal olarak Sigma firmasından sağlanan Aflatoksin B<sub>1</sub> saf standardından hazırlanan değişik konsantrasyonlarda aflatoksin çözeltileri, 20×20 cm'lik ince tabaka kromatografisi plakaları (Merck 5553) ve Sigma Aldrich marka 10 µl'lik kapilar pipetler, çeşitli develop solventleri kullanılmıştır. Ekipman olarak klasik TLC tankı, LVP marka LVP 75 model UV kabini, AMPL firmasından satın alınan paket program Gel Quant Jel elektroforezi görüntüleme sistemi, Samsung GalaxyNote4 Cep telefonu kamerası, Fujifilm Marka ve Canon 5D mark II marka dijital DSLR kameralar kullanılmıştır. Ayrıca bu proje için özel olmak üzere aflatoksin beneklerini doğrudan ilk kamera görüntülerini kullanarak sayısallaştıran ve sonuçları listeler halinde veren, hata düzeltme özelliği bulunan bir görüntü analizi yazılımı da hazırlanmıştır.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Aflatoksin standart çözeltilerinin hazırlanması

50 adet vial numaralandırılarak kapakları ile birlikte tartılmış, tartımlar bilgisayara kaydedilmiştir. Boş beher ağzı alüminyum folyo ile kapatılıp tartılmıştır. (Gr:19,2653). Behere yaklaşık olarak 7 ml Asetonitril:tolüen (98+2) ilave edilip tartılmış (solvent+vial:25,4875) üstüne standarttan 1 ml eklenip tartılmıştır (solv+beher+std:26,2054). Daha önceden tartımı yapılan viallere asetonitril:toluen (98+2) solventi ilave edilip tartılmış ve tartımlar kaydedilmiş ve çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Hazırlanan yeni standarttan değişik konsantrasyonlarda numune elde edilmiştir. Başka bir deyişle tüm çözeltiler gravimetrik olarak hazırlanarak AFB<sub>1</sub> konsantrasyonları belli bir çözelti serisi elde edilmiştir.

### 3.2.2. Çözeltilerin plakaya tatbiki

Çalışmalarda 10×10 cm ve 20×10 cm'lik silikajel G60 plakalar kullanılmıştır. Plakaya tabandan itibaren 2 cm yukarıda hayali bir hat üzerine birer cm aralıklarla kurşun kalemle plakaya zarar vermeksizin tatbik noktaları işaretlenmiştir. Bu noktalara yukarıda madde 3.2.1'de verilen standartlar AFB<sub>1</sub> çözeltileri kapiler kılcal 10 µl'lik pipetler kullanarak örnekler tatbik edilmiştir. AFB<sub>1</sub> çözeltileri pipete 1-2 sn içinde kapilarite ile 10 µl çizgisine kadar alınmış kendi özel puarı ile yaklaşık 0,2 µl'lik porsiyonlar halinde pipet içindeki AFB<sub>1</sub> çözeltisi uygulanmıştır. Uygulamada benek çapının 0,5 cm civarında kalmasına özellikle dikkat edilmiştir. Her uygulanan beneğin üzeri ışık almaması için alüminyum folyo ile örtülmüştür. Tüm çalışma ışığı azaltılmış oda ışığında yapılmış spotlar kurduktan sonra plaka devolope edilmiştir.

### 3.2.3. Plakaların developesi

Developede klasik kromatografi tankı kullanılmıştır (22×22×10). Tanka 0,5cm yüksekliğinde Karakaş (2014) tarafından kullanılan TBME:metanol:su (480:15:5) solventi konulmuştur. Plaka tanka daldırıldıktan sonra devolope edilmiştir. Solventin ilerleme yönündeki plaka boyu 10 cm olduğu için klasik TLC'den farklı olarak tepeye solvent stop çizgisi çizilmemiştir. Plakalar, solvent plakanın tepe noktasına ulaşınca kadar devolope edilmiştir. Plaka üst sınıra ulaştığı anda plaka tanktan çıkarılıp kurutulmuştur.

### 3.2.4. Plakalardaki dijital görüntülerin alınması

Develope sonrası plakalar kurutulduktan sonra karanlık odada UV kabininde üstten fujifilm DSLR kamera, Canon 5D mark II Kamera ve jel elektroforezi görüntüleme sistemi (Bio-Rad), kamera ve Samsung GalaxyNote4 ile fotoğrafları çekilmiştir. Bio-Rad cihazı kendi optimizasyonunu yaptığı için onun çekim şartlarına müdahale edilememiştir. Cep telefonu kamerasında pozlama değeri ve ISO ayarı değiştirilerek sınırlı bir optimizasyona gidilmiştir. Ancak diğer DSLR kameraları ile çeşitli ISO, enstantene ve diyafram değerlerinde görüntüler alınarak en iyi (soluk görüntülerin zeminden farklı olarak görülebilmesi ve plakadaki en parlak beneğin

yanmaması, full beyaz gelmemesine dikkat ederek) görüntü optimizasyonu yapılmıştır. Fujifilm kamera ile 1/8 -1/6-1/3-1 sn'lerinde elde edilen görüntüler Gel Quant programı ile değerlendirilerek her beneğe ait miktar değerleri elde edilmiştir. Elde edilen değerlerin gerçek değerlere karşı değişimi doğrusal ve logaritmik regresyon ile ortaya konmuştur. Bunlara ait regresyon grafikleri EK 14 ile EK17'de arasında yer almaktadır.

### **3.2.5. Plaka üzerinde beneklerin gözle incelenmesi**

Plakaların görüntüleri alındıktan sonra gözle incelemeye geçildi. Plakada aflatoksinlerin gözle incelenmesi, karşılaştırılması ve miktar tayini 10 kişi (panelist) tarafından yapılmıştır. Gözle tayinde (Çoksöyler, 1996)'da belirtildiği gibi gözlemci gözleri karanlığa alıştıktan sonra standart beneklerin şekillerini, parlaklıklarını ve testin amacına göre de parlaklık ve büyüklüklerinin birbirinden farklılıklarını veya benzerliklerini tespit etmeye çalışılmış ve kararlarını yazıcıya söylemişlerdir.

### **3.2.6. Plaka üzerindeki beneklerin dijital görüntülerinin alınması ve görüntüleme ekipmanlarının karşılaştırılması**

Bu amaçla 20x10cm'lik bir cam TLC plakasına AFB<sub>1</sub> çözeltilerinden rastgele seçilen 19 tanesi sıra ile uygulanmış developpe edilen plakanın aşağıda belirtilen 4 görüntüleme aracı ile dijital görüntüleri alınmıştır.

Bu görüntüleme cihazları; üniversitemiz Tıp Fakültesi, Temel Tıp bölümünde bulunan Gel Doc XR+ marka bir jel görüntüleme cihazı, Samsung GalaxyNote4 marka cep telefonu kamerası, Fujifilm marka DSLR kamera ve Canon 5D Mark II marka profesyonel DSLR kameralarıdır. Bunlardan Jel görüntüleme cihazı özel alttan aydınlatma sistemi olduğu için dört görüntüleme cihazının karşılaştırılmasında Cam sırtlı TLC plakası kullanılmıştır. Diğer çalışmalar sadece Fujifilm DSLR kamera kullanıldığı için üstten aydınlatmaya uygun olan alüminyum sırtlı TLC plakaları kullanılmıştır.

### **3.2.7. Gel Quant programı ile görüntü analizi**

Madde 3.2.6'da belirtilen kameralar ile 10×10 cm ve 20×10cm'lik plakalardan elde edilen görüntüler ilk önce photoshop CS.7 programı kullanılarak görüntü gri tonlama (siyah beyaz) hale getirilmiş ve BMP formatında kaydedilmiştir. BMP formatında kaydedilen görüntü Gel Quant jel elektroforez programında açılıp beneklerin pikleri ve pik alanları oluşturulmuştur. Görüntü analizi yapılırken program spot parlaklığının yetersiz olduğu durumlarda spotu (beneği) pik olarak görmez veya plakada varsa bir kirlilik (toz) pik olarak gördüğü durumlarda elle düzeltme yapılmıştır. Pik alanı oluşmayan beneğin pik alanı oluşturulmuş ve programın kirlilik olarak gördüğü pikler kaldırılmıştır. Program piklerin alanlarının toplam alanın %'si olarak vermektedir (Karakaş,2014). Görüntünün photoshop CS.7 programında tonlamanın gri hale getirilmesi EK 5'te, görüntüdeki beneklerin pik alanı EK 6'da verilmiştir.

### **3.2.8. Gıdalarda ince tabaka kromatografisi ile kantitatif tayininde görüntü analizinin kullanılması projesi için hazırlattırılan özel yazılım ile tayin**

Bu çalışmamız için özel geliştirilen programda tayin yaparken ilk olarak programda görüntü açılmıştır. Mavi renk benekler üzerinden işlem yapılacağı için mavi rengin bulunduğu kutu aktif hale getirilmiştir. Ardından soldan sağa doğru plakadaki beneklerin üzerine tıklanıp hesaplama işlemi yapılmıştır. Doğru sonucu aldığımızı görmek için benek iki defa tıklanıp programdan hesaplama işlemi yapılmıştır aynı sonuç alındıysa beneğin hemen altından boş alana tıklayıp kör nokta da hesaplanmıştır ardından pik kaydedilmiştir. Aynı işlemler tüm pikler için yapılmıştır.

### **3.2.9. Göz ile yapılan tayin, jel elektroforezi programı ile yapılan tayin ve proje için hazırlanan özel yazılım ile tayinin karşılaştırılması**

Duyusal bir değerlendirme olan göz ile beneklerin floresan yoğunluklarının karşılaştırılması, kişilerin UV kabininde plaka üzerindeki benekleri gözlemleyerek yoğunluklarını karşılaştırma şeklinde yapılmıştır. Görüntü analizi yöntemi olan diğer iki yöntem (GelQuant ile projeye özel yazdırılan program) ise plakaların UV altında Fujifilm marka DSLR kamerası ile çekilen dijital görüntüleri kullanılarak yapılmıştır. Karşılaştırma üç ayrı kategoride yapılmıştır. Bunlardan ikisi duyuşsal analizlerde

kullanılan sıralama testi ve farklılıkları ortaya koyan üçgen testidir. Üçüncü kategori ise enstrumental analizlerde kullanılan kalibrasyon kurvesi ile miktar tayinidir.

### 3.2.9.1. Sıralama testi

Bu amaçla 4 adet 10X10 cm'lik plaka üzerine rast gele seçilen standartlar ile 9'ar noktaya 10'ar µl AFB1 çözeltisi tatbik edilmiş develop edilmiş plakalar 10 kişi tarafından gözle incelenerek soluktan parlağa doğru beneklerin sıra numaralarını sıraya dizmeleri istenmiştir. Plakalar her kişi/paneliste ikişer defa sıralama için sunulmuştur. Panelistlerin yaptıkları sıralama beneklerdeki aflatoksin miktarlarının gerçek sıra numaralarına karşı doğrusal regresyon ile değerlendirilmiştir. Görüntü analizi programları ile yapılan değerlendirmeler için plakaların UV altında çekilen dijital görüntüleri kullanılmış ve her iki programla da benek floresans yoğunlukları miktarlara çevrilmiştir. Programların benekler için belirlediği miktarların sıra numaraları panelistlerde yapıldığı gibi gerçek miktarların sıra numaralarına karşı doğrusal regresyon ile değerlendirilmiştir. Bu regresyon analizlerinin grafikleri şekil 3.17-3.20 arasında verilmiştir.

### 3.2.9.2. Üçgen testi

Testte 5 farklılık düzeyi test edilmiştir. Bu farklılıklar sırasıyla; %50, %30, %20, %10, %5'tir. Her farklılık düzeyinde hazırlanmış olan ikişer plakalarda biri farklı ve ikisi aynı olmak üzere üçer adet standart uygulamasından oluşan 6 set 20×10 cm'lik plakaya tatbik edilmiştir. Tatbik edilen kombinasyonlar ve bu kombinasyona ait plaka görüntüleri sadece beneklerin bulunduğu kısımlar şeritler halinde kesilerek oluşturulan tablo, çizelge 4.3'te verilmiştir. Üçgen testinde ikisi bir birinin aynı üçüncüsü farklı olan üç düzeyden farklı olanın bulunması istenmektedir. Eğer düzeylerden birine "A" ve diğerine "B" dersek karşımıza AAB, ABA, ABB, BBA, BAB, BAA şeklinde 6 kombinasyon çıkar. Bu kombinasyonlardan oluşan 10 plaka panelistin önüne rastgele bir sıra ile konulmuştur. Her üçlü yapıda farklı olanın hangisi olduğu paneliste sorulmuştur ve tek olanı numarası ile birlikte söylemeleri istenmiştir (1-2, 2-3, 3-3, 4-1, 5-2 gibi).

Farklı olanın tamamen tesadüfi olarak bulunma ihtimali 1/3'tür. Panelist çok sayıda önüne konulan bu testlerde farklı olanı yakalama oranı 1/3'ten önemli ölçüde büyükse bu düzeydeki farklılık panelistler tarafından algılanıyor anlamına gelmektedir. İstatistiki önemde farklılıkları belirleme sayıları Huss (1995) tarafından verilen tabloda yer almaktadır. Yaptığımız çalışmada n=12'den yararlanılmıştır.

Çizelge 3.1. İstatistiki farklılıkları belirleme tablosu

Önemlilik düzeyi (%)					Önemlilik düzeyi (%)				
n	10	5	1	0.1	n	10	5	1	0.1
3	3	3	-	-	26	13	14	15	17
4	4	4	-	-	27	13	14	16	18
5	4	4	5	-	28	14	15	16	18
					29	14	15	17	19
					30	14	15	17	19
6	5	5	6	-	31	15	16	18	20
7	5	5	6	7	32	15	16	18	20
8	5	6	7	8	33	15	17	18	21
9	6	6	7	8	34	16	17	19	21
10	6	7	8	9	35	16	17	19	22
11	7	7	8	10	36	17	18	20	22
12	7	8	9	10	42	19	20	22	25
13	8	8	9	11	48	21	22	25	27
14	8	9	10	11	54	23	25	27	30
15	8	9	10	12	60	26	27	30	33
16	9	9	11	12	66	28	29	32	35
17	9	10	11	13	72	30	32	34	38
18	10	10	12	13	78	32	34	37	40
19	10	11	12	14	84	35	36	39	43
20	10	11	13	14	90	37	38	42	45
					96	39	41	44	48
21	11	12	13	15					
22	11	12	14	15					
23	12	12	14	16					
24	12	13	15	16					
25	12	13	15	17					

Testin yapılışı yine Huss (1995) tarafından önerildiği şekilde tüm kombinasyonlar ikişer defa hazırlanmış ve toplam 12 kombinasyon birer küçük kağıda yazılmış ve kağıtlar başka biri tarafından karıştırılmış ve bu karışımdan kağıtlar elle rastgele alınarak kombinasyonların plaka üzerinde sıraları belirlenmiştir. Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi 12 kombinasyondan en az 8'inin doğru olarak belirlenmesi durumunda

farklılık  $p=0.05$  düzeyinde önemlidir demektir. Değerlendirmelerimizde esas olarak bu düzey benimsenmiştir. Tüm farklılık düzeylerinde panelistlerin ve programların doğru cevap sayıları çizelge 4.4'te verilmiştir.

### 3.2.9.3. Kalibrasyon kurvesi ile miktar tayini

Bu amaçla 20X10 cm'lik plakada ilk 6 adedi artan bir seri olacak şekilde 0,02-0,03-0,05-0,1-0,2-0,3 ng/μl çözeltilerinden 10'ar μl tatbik edilerek her bir benekte sırasıyla 0,2-0,3-0,5-1-2-3 ng AFB<sub>1</sub> olan bir kalibrasyon kurvesi oluşturulmuştur. Daha sonraki benekler rastgele seçilen aflatoxin çözeltilerinden 10'ar μl tatbik edilerek karşılaştırma yapanlar ve programı kullananlar tarafından bilinmeyen bir seri benek oluşturulmuştur. Plaka develope edildikten sonra, plakanın UV kabininde dijital görüntüsü alınmıştır.

Kalibrasyon kurvesi ile miktar tayini Gel Quant ve özel programla yapılan görüntü analiz sonuçları için aşağıdaki gibi kullanılmıştır.

Kullandığımız iki görüntü analiz programı ile tüm AFB<sub>1</sub> benekleri sayısallaştırılmıştır. Her iki programda da ilk 6 standart benek serisine ait AFB<sub>1</sub> miktarlarına karşılık o benekler için programların verdiği sayısal değerler kullanılarak Microsoft excel'de bir kalibrasyon kurvesi elde edilmiştir. Kurvelerin program tarafından denklemleri ve R<sup>2</sup> değerlerinin yazılması sağlanmıştır. Bu kalibrasyon kurvesi denklemleri kullanılarak geri kalan 13 beneğe ait o program tarafından bulunan değerler aflatoxin miktarına çevrilmiştir. Bu çevrimde aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$C = \frac{(PA-b)}{a} \quad (3.1)$$

C : Benekte aflatoxin miktarı (ng)

PA: Kullanılan programdan elde edilen o beneğe ait floresans değeri

b : Kalibrasyon kurvesindeki sabit değer

a : Kalibrasyon kurvesindeki değer

Program ve kalibrasyon kurvesi ile hesaplanan bu miktar değerlerinin gerçeği yansıtmaya durumu YuodunPlot tekniği ile ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu teknikle prensip olarak farklı analitik düzeylerde aflatoxin içeren bir seri numunenin bir yarısı

referans metot ile diğer yarısı geliştirilen metot ile analiz edilmiştir. Elde edilen sayı çifti (x,y: referans, geliştirilen) bir x, y grafiğinde referans değerin x, geliştirilen metodunki y değerini olmak üzere işlenir. X' e karşı Y'nin grafiği ve regresyon denkliği bize geliştirilen metodun performansını gösterir. Bu çalışmada x değerleri o benekler için tatbik edilen aflatoksin miktarları y değerleri ise o benekler için kalibrasyon kurvesi ile hesaplanan aflatoksin miktarlarını temsil etmektedir.

Göz ile yapılan tayinlerde de oksyler (1996)'de belirtilen karşılaştırma yöntemi kullanılmıştır. Ancak farklılık olarak, standart serisi aralarındaki farklılıkların %30'a kadar olduğu 3.5, 5.0 ve 6.5 birimlerini temsil eden 3'l bir seri olmayıp; 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0 ve 3.0 ng AFB<sub>1</sub>'den oluşan altılı bir seridir. Plakayı gözle inceleyen kişi 6. noktadan sonraki her noktayı bu 6 standart beneği ile aynı olduğuna (bu durumda numune beneğindeki AFB<sub>1</sub> miktarı o standart beneği ile aynı olduğuna karar verilecek) veya hangi iki standart beneğinin arasında olduğuna (bu durumda beneğin içerdiği AFB<sub>1</sub> miktarının arasında olduğu iki standart beneğinin ortalaması kadar olduğuna) karar vermiştir. Gözle tayin edilen değerlerin gerçeği yansıtma düzeyi yine regresyon analizi ile yapılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Aflatoksin çözeltilerinin hazırlanması

Çalışmamızda rastgele, birbirinden küçük farklılıklar gösteren ancak konsantrasyonları tarafımızdan net olarak bilinen 50 adet 1.5 ml'lik AFB<sub>1</sub> çözeltisi hazırlanmıştır. Çözeltilerin hazırlanmasında volumetrik cihazlar değil 0.1 mg hassasiyetindeki analitik terazi kullanılmıştır. Bu çözeltiler her türlü ön tahmini (ön yargıyı) ortadan kaldırmak amacıyla rastgele numaralandırılmıştır. Çözeltiler kullanılmadığı zamanlarda buzlukta muhafaza edilmiş kullanılacakları zaman karanlık odada oda sıcaklığına gelmeleri sağlanmıştır. Kullanılma sürecinde kapakları en fazla 2 sn açık kalmış ve kullanım boyunca solvent buharlaşması neticesinde konsantrasyon artışına mümkün olduğunca müsaade edilmemiştir. Herhangi bir nedenle şüpheye düşülen standart iptal edilerek sistemden çıkarılmıştır. Şekil 4.1'de bu standartların muhafaza şekli çizelge 4.1'de ise bunların numaraları ve konsantrasyonları görülmektedir.

Çizelge 4.1. Standartların numara ve konsantrasyonları.

Vial no	Boş vial (g)	solv+boş (g)	Solvent	B+so+st	Standart	Dilüsyon oranı
1	2,733	3,505	0,772	3,5312	0,0262	0,032823854
2	2,7546	3,2126	0,458	3,4114	0,1988	0,302679659
3	2,7482	3,3335	0,5853	3,4895	0,156	0,210441117
4	2,7524	3,5446	0,7922	3,5773	0,0327	0,039641169
5	2,7148	iptal	#DEĞER!		0	#DEĞER!
6	2,7087	3,3862	0,6775	3,5305	0,1443	0,175590168
7	2,7386	3,5074	0,7688	3,5745	0,0671	0,08027276
8	2,7352	3,3276	0,5924	3,4165	0,0889	0,130485836
9	2,6753	3,2992	0,6239	3,5019	0,2027	0,245221389
10	2,7146	3,5005	0,7859	3,5615	0,061	0,072027394
11	2,7149	3,4073	0,6924	3,5462	0,1389	0,167087694
12	2,7338	3,5612	0,8274	3,5797	0,0185	0,021870197
13	2,7129	3,4478	0,7349	3,626	0,1782	0,195159347
14	2,7488	3,3054	0,5566	3,4196	0,1142	0,170244484
15	2,7015	3,3164	0,6149	3,4545	0,1381	0,183399734
16	2,7547	3,3554	0,6007	3,5642	0,2088	0,257936998
17	2,7153	3,52	0,8047	3,5472	0,0272	0,032696238
18	2,7148	3,0497	0,3349	3,7252	0,6755	0,66854711
19	2,7543	iptal	#DEĞER!		0	#DEĞER!
20	2,7537	3,5127	0,759	3,5732	0,0605	0,073825503
21	2,6992	3,46	0,7608	3,5067	0,0467	0,057832817
22	2,7268	3,327	0,6002	3,5206	0,1936	0,243890149
23	2,7543	3,4904	0,7361	3,5473	0,0569	0,071752837
24	2,7593	3,393	0,6337	3,5525	0,1595	0,201084216
25	2,716	3,4428	0,7268	3,5117	0,0689	0,086590424
26	2,7224	3,0689	0,3465	3,7296	0,6607	0,655976966
27	2,7255	3,1519	0,4264	3,658	0,5061	0,542734584
28	2,7349	3,0277	0,2928	3,7096	0,6819	0,15527724
29	2,7369	3,2276	0,4907	3,5745	0,3469	0,414159503
30	2,7145	3,322	0,6075	3,511	0,189	0,237288136
31	2,753	3,3852	0,6322	3,6116	0,2264	0,263685069
32	2,7537	3,3704	0,6167	3,5627	0,1923	0,237700865
33	2,7419	3,1099	0,368	3,4856	0,3757	0,505176819
34	2,7356	2,9174	0,1818	3,5834	0,666	0,785562633
35	2,7301	3,2265	0,4964	3,4509	0,2244	0,311320755
36	2,7558	3,2295	0,4737	3,4571	0,2276	0,32454014
37	2,7309	3,1476	0,4167	3,5649	0,4173	0,500359712
38	2,7324	3,0567	0,3243	3,7409	0,6842	0,678433317
39	iptal		#DEĞER!		0	#DEĞER!
40	2,7033	3,3783	0,675		-3,3783	1,249694817
41	2,7045	iptal	#DEĞER!	3,579	#DEĞER!	#DEĞER!
42	2,7423	3,3929	0,6506	3,5499	0,157	0,19440317
43	2,7212	3,4811	0,7599	3,5528	0,0717	0,086219336
44	2,7348	2,7348	0	3,4414	0,7066	1
45	2,7217	3,2526	0,5309	3,5089	0,2563	0,32558435
46	2,7242	2,9445	0,2203	3,5922	0,6477	0,746198157
47	2,7444	3,1675	0,4231	3,4875	0,32	0,430628448
48	2,7169	3,0355	0,3186	3,3565	0,321	0,501876173
49	2,7308	3,55	0,8192	3,9373	0,3873	0,321011189
50	2,7071	3,1538	0,4467	3,556	0,4022	0,47378961

Tüm karşılaştırma ve sıralama çalışmaları konsantrasyonları 0.021-0.785 ng/ $\mu$ l arasında değişen 50 aflatoksin B<sub>1</sub> çözeltisi kullanılarak yapılmıştır. Bu çözeltilerden her benek için 10'ar  $\mu$ l uygulandığından plaka üzerindeki beneklerin içerdikleri aflatoksin miktarları da 0.21-7.85 ng arasında değişmiştir.

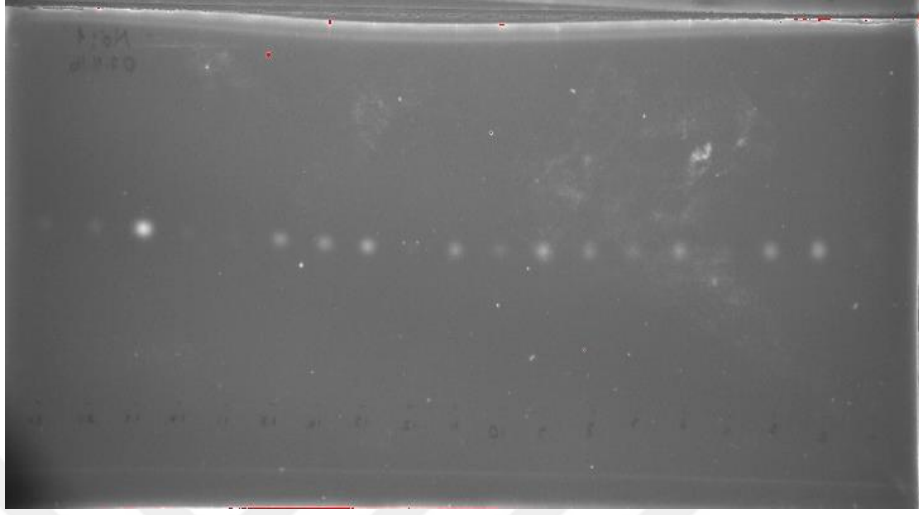


Şekil 4.1. Konsantrasyonların hazırlanması.

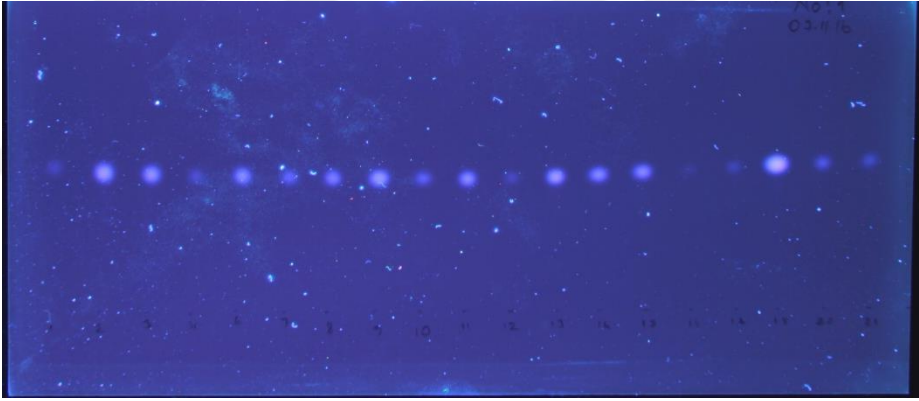
#### 4.2. Plaka üzerindeki beneklerin dijital görüntülerinin alınması ve görüntüleme ekipmanlarının karşılaştırılması

Bu amaçla Bio\_Rad jel görüntüleme cihazı, Samsung GalaxyNote4 marka cep telefonu kamerası, Fujifilm marka DSLR kamera ve Canon 5D Mark II marka DSLR kameraları kullanılmıştır. Bu cihazlardan sadece jel görüntüleme cihazının ışık kaynağı alttan UV verme şeklinde olduğu için bu dörtlü karşılaştırmada cam sırtlı TLC plakası kullanılmıştır. Plakaya vial numaralarına göre kabaca konsantrasyonu düşük olan standarttan başlanarak 19 benek plakaya tatbik edilmiştir. Jel elektroforez görüntüleme cihazı komple bir sistem olduğu için görüntü o cihazdan bilgisayar çıktısı olarak alınmıştır. Diğer üç plakanın dört görüntüleme cihazında üstten aydınlatma yapan bölümümüzde var olan UV lambası(365 nm, 30 W) altında 365 nm UV ışığı açılmış olarak gözleme penceresindeki saydam plaka çıkarılıp yerine fotoğraf makinesi koyarak görüntü alınmıştır. Bu şartlarda kaba gelecek çevre ışıklarını engellemek için çevre tamamen karartılmıştır. Kabin ve makinenin birleşim noktası siyah kumaşlarla sarılmıştır. Canon5D mark II makinasında yapılan çalışmada özel tripod kullanılmıştır. Fujifilm DSLR kamera ve cep

telefonu kamerası elle tutularak görüntü alınmıştır. Bunlara ait görüntüler şekil 4.2-4.5' te verilmiştir. Bu dört görüntüye ait regresyon grafikleri şekil 4.6-4.9'da verilmiştir.



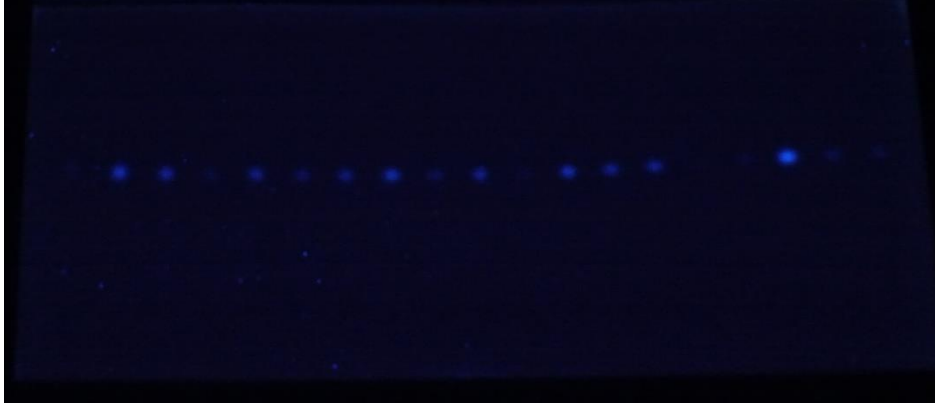
Şekil 4.2. Bio\_RadJel görüntüleme cihazı ile çekilen görüntü.



Şekil 4.3. Canon 5D Mark II kamera ile çekilen görüntü.



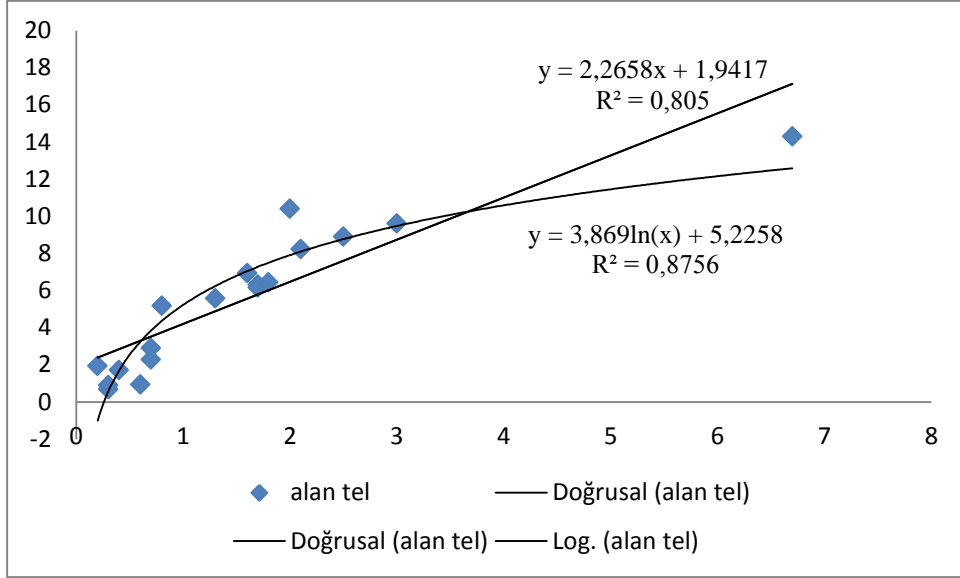
Şekil 4.4. Samsung Galaxy Note4 cep telefonu kamerasıyla çekilen görüntü.



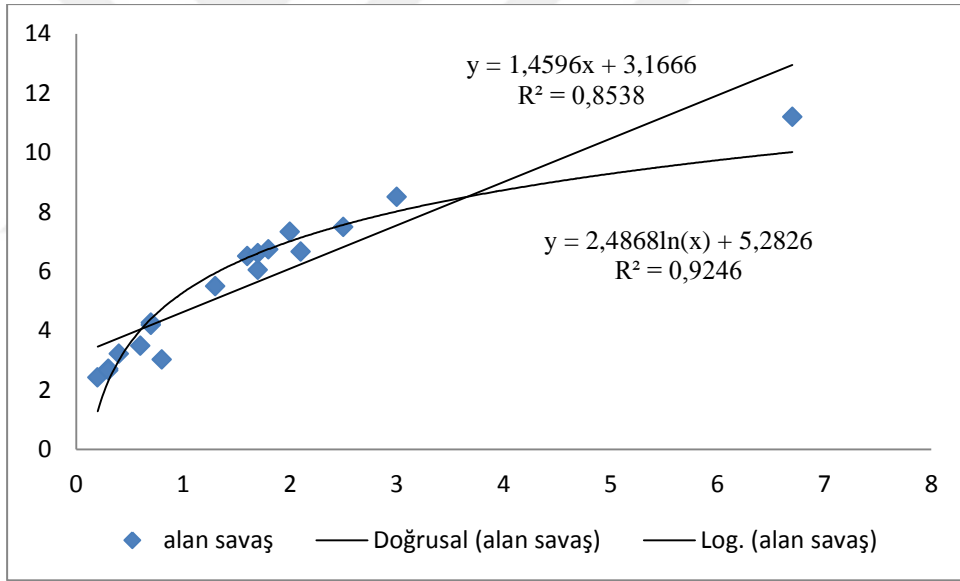
Şekil 4.5. Fujifilm kamera ile çekilen görüntü.

Çizelge 4.2. Jel görüntüleyicisi, Canon 5D MARK II DSLR kamera, cep telefonu, Fujifilm DSLR kamera ile aflatoxin konsantrasyonuna karşı GEL QUANT pik alanları

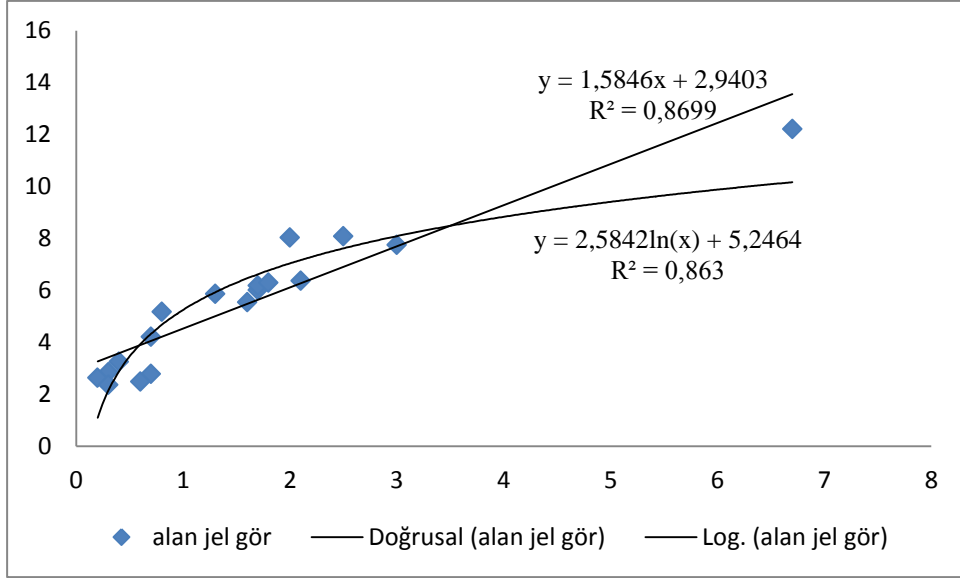
konsantrasyon	jel görüntüleyicisi	Canon 5D Mark II	Samsung GalaxyNote4	Fujifilm
0,3	2,84	2,71	0,673	1,59
3	7,74	8,5	9,6	9,59
2,1	6,36	6,65	8,22	6,9
0,4	3,24	3,21	1,7	2,15
1,6	5,54	6,5	6,93	6,2
0,8	5,16	3,02	5,18	3,32
1,3	5,86	5,49	5,57	4,86
2,5	8,07	7,49	8,9	8,85
0,7	2,77	4,18	2,89	3,31
1,7	6	6,04	6,31	6,1
0,2	2,63	2,42	1,94	1,4
2	8,02	7,32	10,4	8,03
1,7	6,17	6,6	6,16	6,35
1,8	6,29	6,73	6,43	6,5
0,3	2,36	2,65	0,898	0,654
6,7	12,2	11,2	14,3	1,58



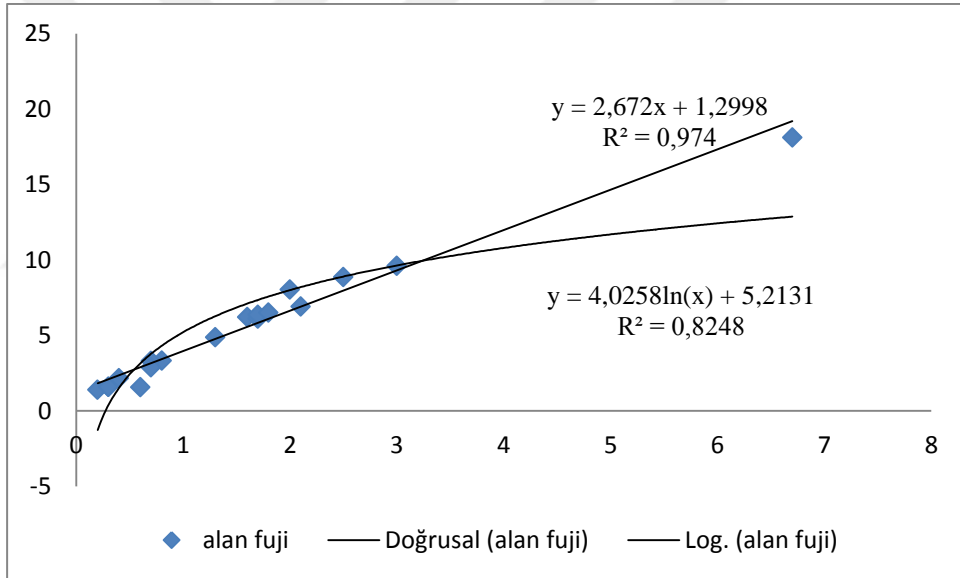
Şekil 4.6. Samsung Gakaxy Note4 cep telefonu kamerası ile çekilen görüntünün regresyon grafiği.



Şekil 4.7. Canon 5D mark II camera ile çekilen görüntünün regresyon grafiği.



Şekil 4.8. Bio\_Rad jel görüntü cihazı ile çekilen görüntünün regresyon grafiği.



Şekil 4.9. Fujifilm DSLR kamera ile çekilen görüntünün regresyon grafiği.

Canon 5D DSLR kamerasından çekilen görüntüye ait regresyon analizinde  $R^2$  değeri 0,85, Jel görüntüleme cihazından çekilen görüntünün regresyon analizinde  $R^2$  değeri 0,86, cep telefonu ile çekilen görüntüye ait regresyon grafiğinin  $R^2$  değeri 0,80'dir, Fujijilm kamera ile çekilen görüntünün  $R^2$  değeri ise 0,97 bulunmuştur.

Cep telefonu kamerası ile çekilen görüntülerde en soluk beneklerin görülmemesi ve miktarlar ile floresans parlaklığı arasındaki hesaplanan korelasyon katsayısının 0,80 gibi analitik amaçlar için çok düşük bir değer olması nedeniyle cep telefonu görüntüsü kullanımından vazgeçilmiştir. Diğer iki DSLR kamera arasında önemli bir farklılık

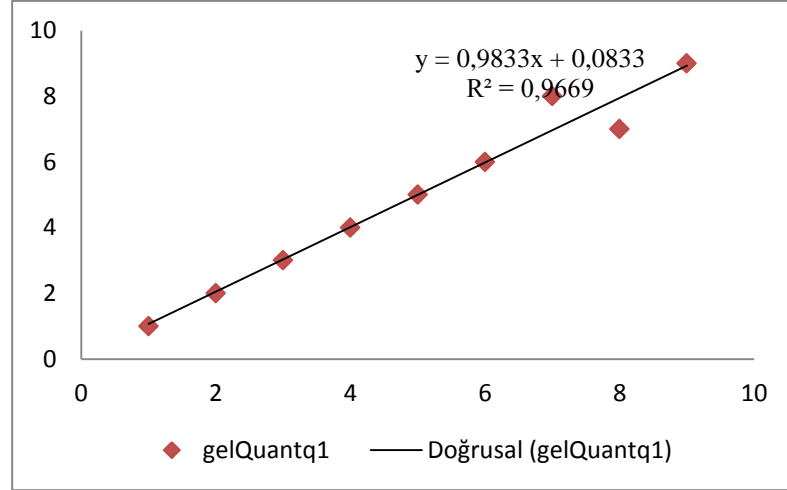
olmaması nedeniyle kullanımı daha kolay, pratik ve uygulayıcı olduğundan Fujifilm kamera ile çalışmaya devam edilmiştir. Fujifilm kameranın da farklı parametrelerde çekilen görüntülerin pik alanları oluşturularak regresyon analizlerine bakılmıştır. Parametrelerin doğrusal ve logaritmik regresyon grafikleri Ek 14-17 arasında verilmiştir. Elde edilen regresyon analizlerine bakıldığında ISO 400 1/6 3.6 f parametrelerinde sonuç başarılı bulunmuş ve bundan sonraki bölümlerinde bu parametreler kullanılarak görüntüler alınmıştır.

### **4.3. Göz ile yapılan tayin, Gel Quant jel elektroforezi programı ile yapılan tayin ve proje için hazırlanan özel yazılım ile tayinin karşılaştırılması**

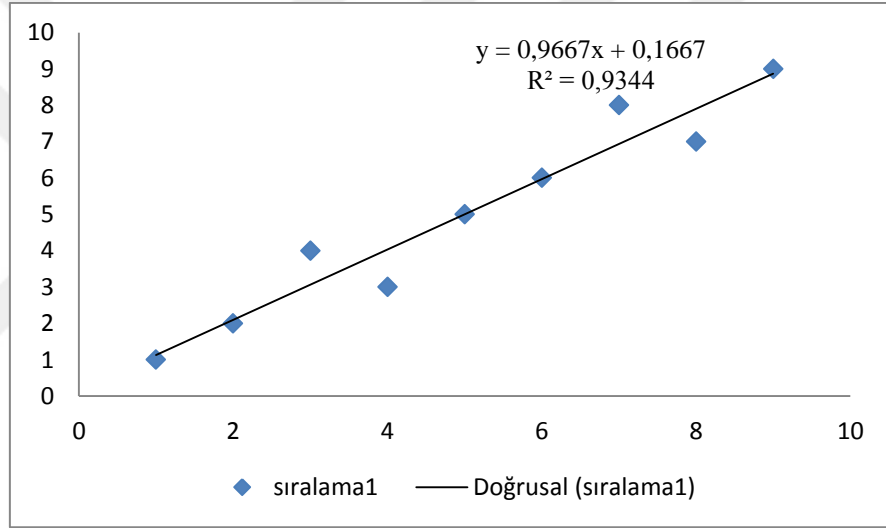
Duyusal bir değerlendirme olan göz ile beneklerin floresan yoğunluklarının karşılaştırılması, kişilerin UV kabininde plaka üzerindeki benekleri gözlemleyerek yoğunluklarını karşılaştırma şeklinde yapılmıştır. Görüntü analizi yöntemi olan diğer iki yöntem (GelQuant ile projeye özel yazdırılan program) ise plakaların UV altında Fujifilm marka DSLR kamerası ile çekilen dijital görüntüleri kullanılarak yapılmıştır. Karşılaştırma üç ayrı kategoride yapılmıştır. Bunlardan ikisi duysal analizlerde kullanılan sıralama testi ve farklılıkları ortaya koyan üçgen testidir. Üçüncü kategori ise Enstrumental analizlerde kullanılan kalibrasyon kurvesi ile miktar tayinidir.

#### **4.3.1. Sıralama Testi**

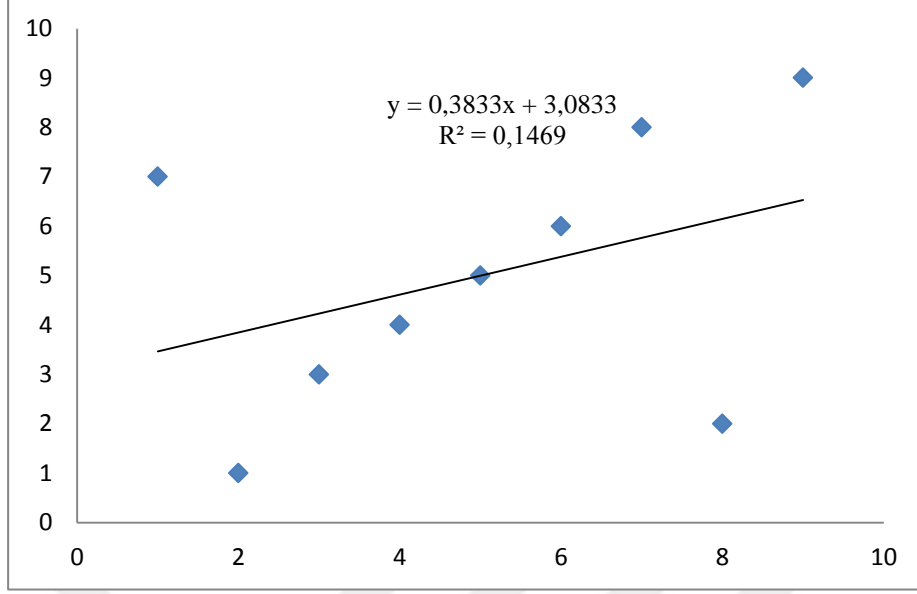
Bu amaçla 4 adet 10X10 cm'lik plaka üzerine rastgele seçilen standartlar ile 9'ar noktaya 10'ar µl AFB<sub>1</sub> çözeltisi tatbik edilmiş developpe edilen plakalar 10 kişi tarafından gözle incelenerek soluktan parlağa doğru beneklerin sıra numaralarını sıraya dizmeleri istenmiştir. Her panelistin verdiği cevaplar kaydedilmiştir. Plakalar her kişi/paneliste ikişer defa sıralama için sunulmuştur Panelistlerin yaptıkları sıralama beneklerdeki aflatoksin miktarlarının gerçek sıra numaralarına karşı doğrusal regresyon ile değerlendirilmiştir. İkinci defa panelistlere verilen plakaların incelenmesinde farklı cevaplar alınmıştır. Bu da gözün plakayı incelerken yanıltıcı olabileceğini göstermiştir. Sıralamaya ait bir panelistin aynı plakaya iki defalık gözle tayinin regresyon grafikleri şekil 4.13-4.14'te gösterilmiştir. Görüntülerin görüntü analiz teknikleri tayininde gözle tayinden başarılı bulunulduğunu gösteren regresyon grafikleri sırasıyla şekil 4.10-4.11'de verilmiştir.



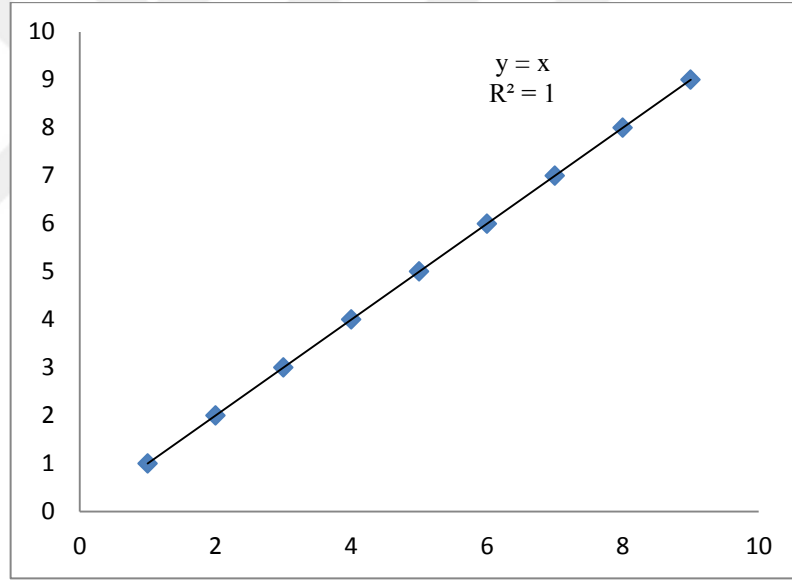
Şekil 4.10. Gel Quant programının sıralama regresyon grafiği.



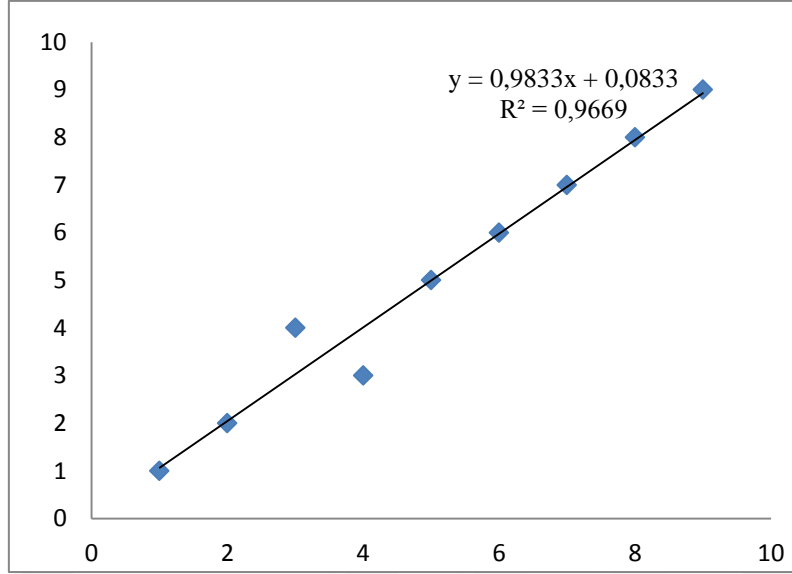
Şekil 4.11. Özel olarak geliştirilen programın sıralama regresyon grafiği.



Şekil 4.12.Üçüncü panelistin sıralama regresyon grafiği.



Şekil 4.13. Birincipanelistin plakaya ilk gözle tayinin regresyon sonucu.













Şekil 4.14. Birinci panelistin plakaya ikinci kez yaptığı gözle tayin regresyon grafiği

#### 4.3.2. Üçgen testi

Üçgen testi için  $20 \times 10$  cm'lik plaka üzerine altı adet üçlü set ile 6 kombinasyon halinde plakaya tatbik yapılmıştır. Her farklılık düzeyi için ikişer plaka hazırlanmıştır. Verilen cevaplar doğrultusunda iki plakadan çıkan sonuçtan kaçar tane doğru cevap verilmesi üzerinden değerlendirme yapılmıştır. Panelistlerin yaptığı karşılaştırma Huss (1995) tarafından belirtildiği gibi yapılmıştır. Kombinasyonların diziliş sırası ve plakalara ait görüntüler çizelge 4.3'te verilmiştir. Panelistlerin verdiği doğru cevaplar çizelge 4.4'te verilmiştir.

Görüntü analizi programları aynı veya farklı ifadesini kullanmamakta ve sadece bize miktarları sayısal olarak vermektedir. Bu durumda birbirine diğerinden daha yakın olan iki değer aynı, diğeri farklı olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.3. Üçgen testi için seçilen kombinasyonlar ve benek görüntüleri

Test edilen farklılık düzeyi	Plaka No	Kombinasyonlar	Plaka görüntüsü
%50 A:3ng B:2ng	1	BAA;AAB;ABB; ABB,BAB;BAB	
	2	BBA;AAB;ABA; ABA;BAA;BBA	
%30 A:2,6ng B:2ng	1	ABA;BBA;ABB; BAB;AAB;AAB	
	2	BAA;BAA;BBA; BAB;ABA;ABB	
%20 A:2,4ng B:2ng	1	ABB;ABA;AAB; ABA;AAB;BAB	
	2	BAA;BBA;ABB; BBA;BAA;BAB	
%10 A:2,3ng B:2,1 ng	1	BBA;BAA;BAB; ABBABA;AAB	
	2	ABB;AAB;BAB; BAA;BBA;ABA	
%5 A:1,8 ng B:1,7 ng	1	BAB;AAB;AAB; ABB;ABA;ABB	
	2	BAA;ABA;BBA; BAB;BBA;BAA	

Çizelge 4.4 Panelistlerin 12 kombinasyonda verdikleri doğru cevaplar

Panelist veya program	12 kombinasyonda doğru cevap sayıları				
	%50 Farklılık	%30 Farklılık	%20 Farklılık	%10 Farklılık	%5 Farklılık
1. Panelist	11***	10***	8*	7	2
2. Panelist	11***	10***	7	6	3
3. Panelist	8*	8*	7	6	3
4. Panelist	10***	4	4	5	4
5. Panelist	8*	7	4	3	2
6. Panelist	12***	6	7	5	1
7. Panelist	11***	10***	10***	4	1
8. Panelist	9**	6	6	4	1
9. Panelist	11***	5	7	3	2
10. Panelist	11***	8*	8*	3	2
GelQuant prg.	12***	12***	12***	10***	6
Projeye özel Prg.	12***	12***	10***	9**	2

\*p=0.05 düzeyinde önemli

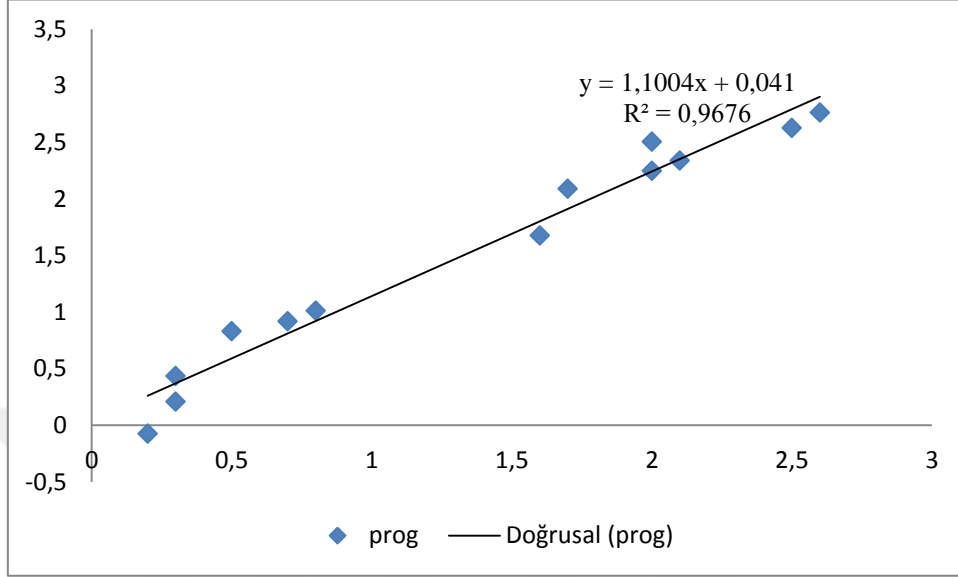
\*\*p=0.01 düzeyinde önemli

\*\*\*p=0.001 düzeyinde önemli

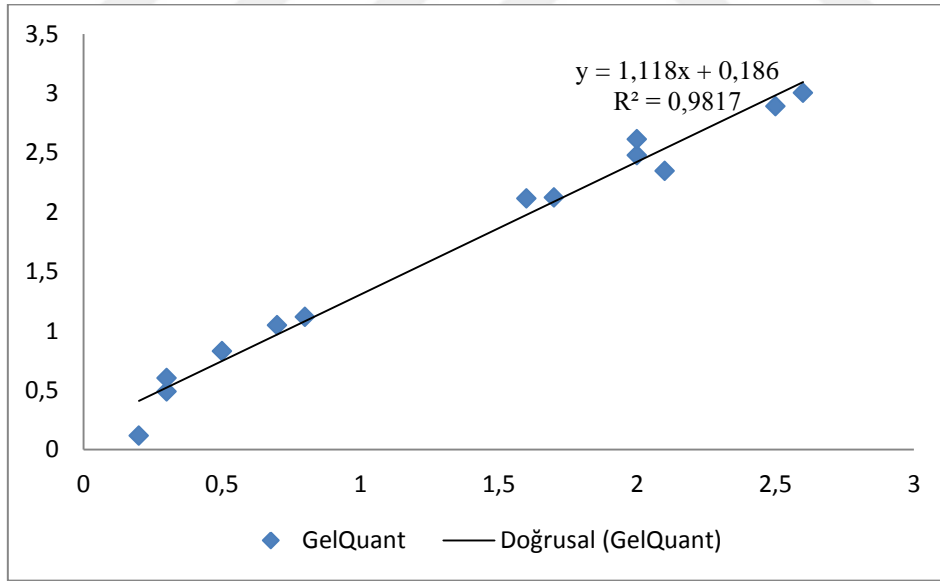
### 4.3.3 Kalibrasyon kurvesi ile miktar tayini

Bu çalışma 20X10 cm'lik plakada ilk 6 adedi artan seride olmak üzere diğer 13 adedi rastgele seçilerek tatbik edilen plakada 10 kişilik panelist grubu tarafından yapılan karşılaştırma analizinde panelistlerin verdiği cevaplar doğrultusunda elde edilen verilerle görüntü analiz teknikleriyle elde edilen verilen Microsoft excel programında madde 3.2.9.3'te belirtildiği gibi yapılmıştır. Çalışma sonucunda gözle analiz tekniği görüntü analiz tekniklerinin gerisinde kalmış, görüntü analiz tekniklerinden Gel Quant ile yapılan

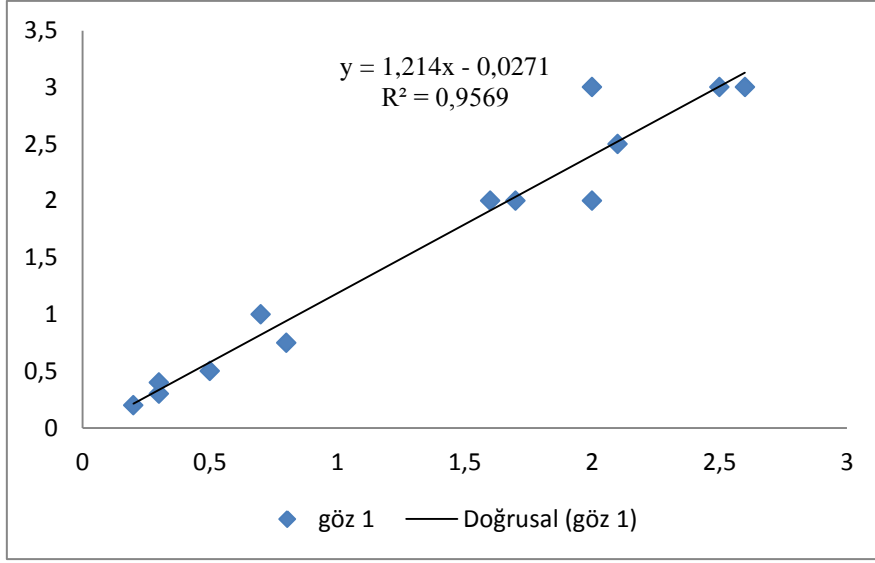
analiz sonucu özel geliştirilen program sonucundan daha başarılı bulunmuştur. Göz ve görüntü analiz tekniklerinin regresyon grafikleri şekil 4.14-4.17’de gösterilmiştir.



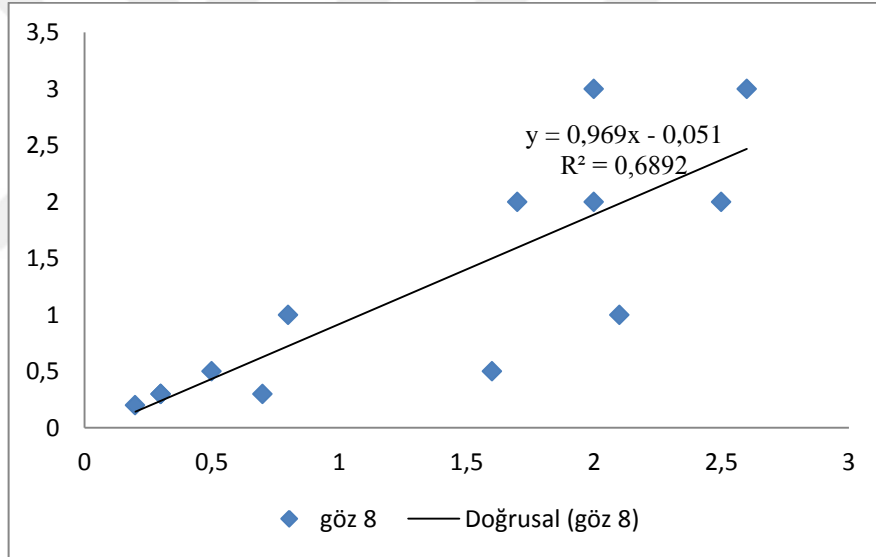
Şekil 4.15. Özel geliştirilen programda YuodunPlot tekniği ile miktar tayinin regresyon grafiği.



Şekil 4.16. Gel Quant programının YuodunPlot tekniği ile miktar tayinin regresyon grafiği.



Şekil 4.17. Panelistlerden en iyi gözün gördüğü miktar tayinin regresyon grafiği.



Şekil 4.18. Panelistlerden kötü gözün gördüğü miktar tayinin regresyon grafiği.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gözle yapılan karşılaştırma tayininde panelistlerle yapılan analizlerin  $R^2$  değerleri 0,68-0,95 arasında değişmektedir. Gel Quant ile yapılan karşılaştırma analizinde  $R^2$  değeri 0,98, özel olarak geliştirilen programın  $R^2$  değeri 0,96 olarak belirlenmiştir.

Sıralama testinde panelistlerin  $R^2$  değerleri 0,1-1 arasında değişmektedir. Gel Quant ile yapılan sıralama analizinde  $R^2$  değerleri 0,87-0,96 arası özel olarak geliştirilen programda  $R^2$  değerleri 0,72-1 arasında değişmektedir.

Sıralama ve karşılaştırma analizlerinin  $R^2$  değerlerine bakıldığında görüntü analizleri ile yapılan sonuçlar göz ile yapılan sonuçtan çok daha iyi olduğunu göstermektedir.

Panelistlerin hepsi %50 düzeyindeki farklılığı belirlemişlerdir. Ancak bunlardan 2 tanesi %5 düzeyinde, biri %1 düzeyinde, geri kalan kişiler %0.1 düzeyinde farklılığı belirlemişlerdir. Panelistlerden hiçbiri %10 ve %5 düzeyindeki farklılığı gözlemleyememiştir, belirleyememiştir ( $p>0.05$ ).

Gözle aflatoksin tayininde %30 düzeyi gözle görülür bir tayin olarak görülebilmektedir (Çoksöyler, 1995). Bu çalışmada %30 düzeyinde dört panelist farklılıkları belirlemiş aynı panelistlerin üçü %20 düzeyindeki farklılıkları %5 ve % 0.1 düzeyinde belirleyebilmişlerdir.

Her iki görüntü analiz programı da %10'a kadar olan farklılıkları belirlemiş, %5 farklılığı ise belirleyememiştir ( $p>0.05$ ). Yüzde on düzeyinde ise Gel Quant programı  $p=0.001$  düzeyinde başarılı olurken özel olarak geliştirilen programın başarısı  $p=0.01$  düzeyinde olmuştur. Sonuç olarak eş yapma denemelerine göre görüntü analizleri ile farklılıkları belirleme gözle yapılan karşılaştırmanın çok ilerisindedir ve ondan çok daha başarılıdır. Sadece bu tez projesi için yazılan sınırlı bir programın gözle tayinden bu derece önemli farklılık göstermesi görüntü analizinin çok kolaylıkla ve pratik bir şekilde gözle tayinin yerini alabileceğini göstermektedir.

TLC'de aflatoksinin miktar tayininde görüntü ile tayinde Gel Quant  $R^2$  değeri 0,98, özel olarak geliştirilen programın  $R^2$  değeri 0,96,göz ile tayinde  $R^2$  değeri 0,95-

0,68 arasında değişmektedir. Bu durum kullanılan her iki görüntü programının miktar tayin sonuçları gözle tayinden başarılı bulunduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışmasında yapılan çalışmalarda Aflatoksinin TLC’de miktar tayininde görüntü ile tayinin gözle tayinden başarılı bulunduğu gösterilmiştir. Bu kadar ekonomik, ilave hiçbir yük getirmeyen, gözle tayinden hem çok daha pratik, hem de çok daha başarılı olan bu yöntemin bu tez çalışmasının yayınlanması ve/veya bu tezden hazırlanan makalenin yayınlanması sonucu ülkemizde ve dünyada hızla yaygınlaşacağı düşünülmektedir. Özellikle HPLC alamayan gelişmekte olan ülke kurumları ve KOBİ gıda işletmelerinin bu yöntemi kullanabilmeleri için tez hemen herkes tarafından indirilebilir olarak sınıflandırılacaktır. Elde edilen bilimsel ve teknolojik sonuçların bir kar amacı güdülmeden ihtiyaç sahiplerine ulaşmasının önünde engel oluşmaması için sonuçlar patent ile koruma altına alınmayacaktır.

## KAYNAKLAR

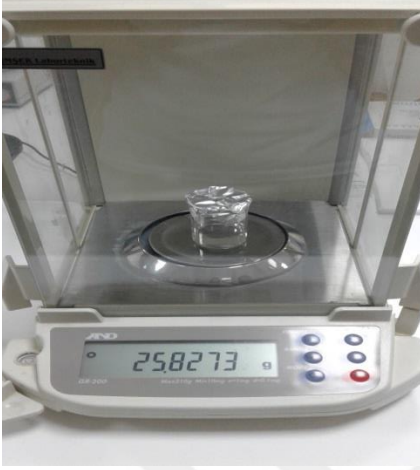
- Abbas, H.K., 2005, *Aflatoxin And Food Safety*. Taylor & Francis Group, London New York ISBN: 0-8247-2303-1
- Anklam, E., Stroka, J., Achim Boenke, A., 2002. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins, *Food Control*, **13**: 173–183.
- Bansal, K., MnCrady, J., Hansen, A., Bhalerao, K., 2008, Thin layer chromatography and image analysis to detect glycerol in biodiesel. *The Science and Technology of Fuel and Energy* **87**: 3369-3372
- Çoksöyler, N., 1996. *Gıda ve Yem Sanayinde Mikotoksinlerin Önemi ve Kontrolü*. MEÜ Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Uygulamalı Kurs ve Seminerleri, Mersin
- Hisar, H., 2011. *Çölyak Hastalığına Ait Evrelerin Görüntü Analizi ve Sınıflandırması*, Erciyes Üniversitesi Fen Bil. Enst, (yüksek lisans tezi, basılmamış) Kayseri
- Huss, H.H., 1995. Quality and quality changes in fresh fish <http://www.fao.org/docrep/v7180e/V7180E00.HTM#Contents> Erişim tarihi: 5.12.2016,
- Karakaş, T. 2014. *İnce Tabaka Kromatografisinde Yeni Bir Teknikle Kırmızı Biberde Aflatoksin Tayini*, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bil. Enst, (yüksek lisans tezi, basılmamış) Van
- Olesik, S., Beilke, M., Newsome, T., Beres, M., 2014. UTLC: Possibly the future of analytical separation. electrospun polyacrylonitrile nanofibers as miniaturised layer materials for UTLC. *International Symposium for High-Performance Thin-Layer Chromatography*, Lyon 2-4 July 2014. Book of Abstract p:26
- Özkaya, S., Temiz, A., 2003. Aflatoksinler: Kimyasal yapıları, toksisiteleri ve detoksifikasyonları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, **1**, 1–21.
- Ruiz, J. I., Ochoa, B.1997. Quantification in the subnanomolarrange of phospholipids and neutrallipids by monodimensional thin layer chromatography and image analysis, *Journal of Lipid Research Volrime*, **38**:1487-1489.

- Tie-xin, T., Hong, W., 2008, An image analysis system for thin-layer chromatography quantification and its validation, *Journal of Chromatographic Science*, **46** (6): 560-564.
- Vovk, I., Prosek, M., 1997. Reproducibility of densitometric and image analysing quantitative evaluation of thin layer chromatograms, *Journal of Chromatography. A*, **779**:329-33



## EKLER

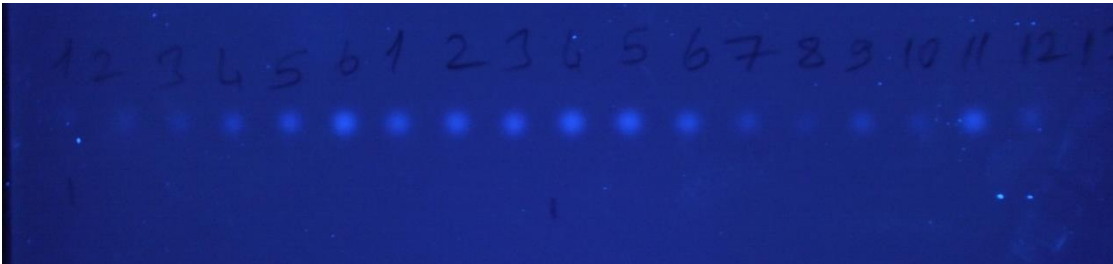
EK 1: Standart hazırlama



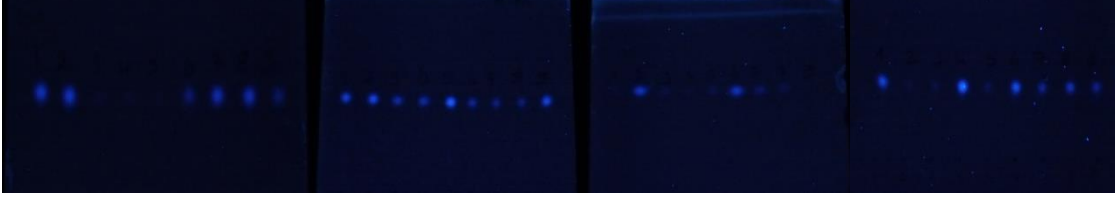
EK 2: Viallere değişik konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar



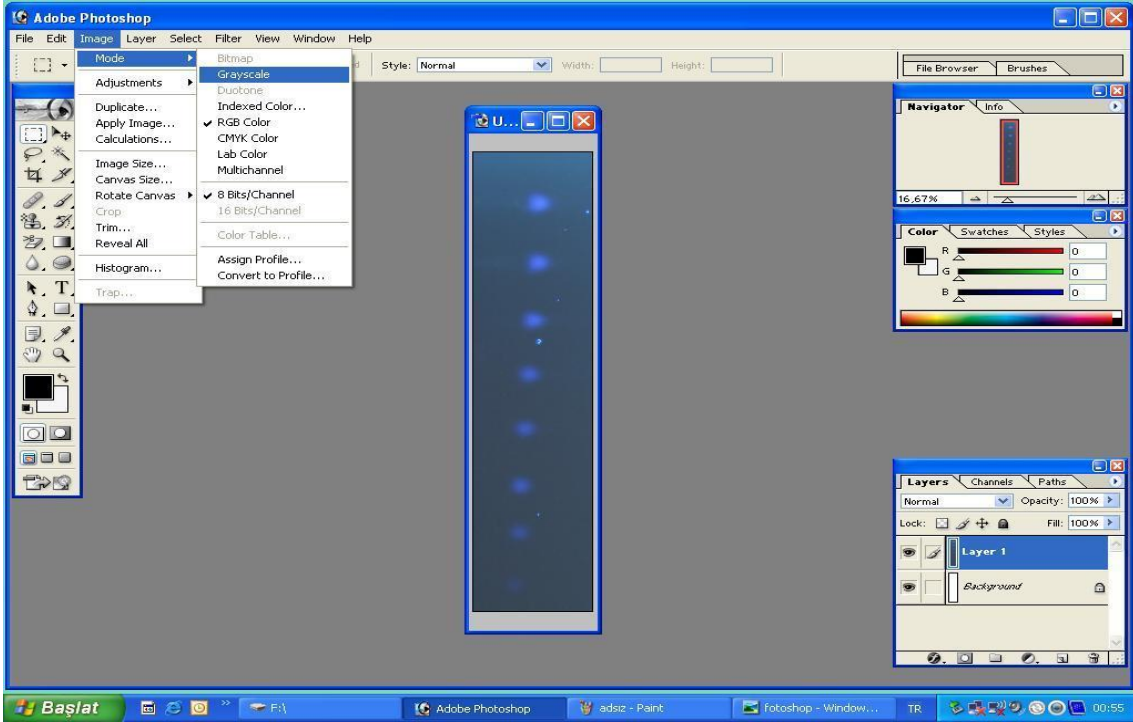
EK 3: 20×10'luk karşılaştırma plakası



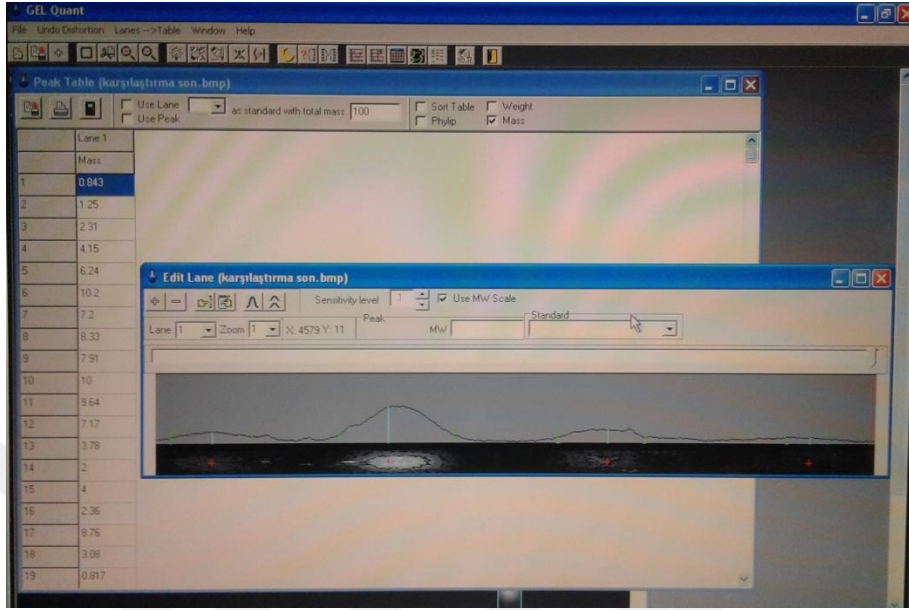
#### EK 4: 10×10'luk Sıralama Plakaları



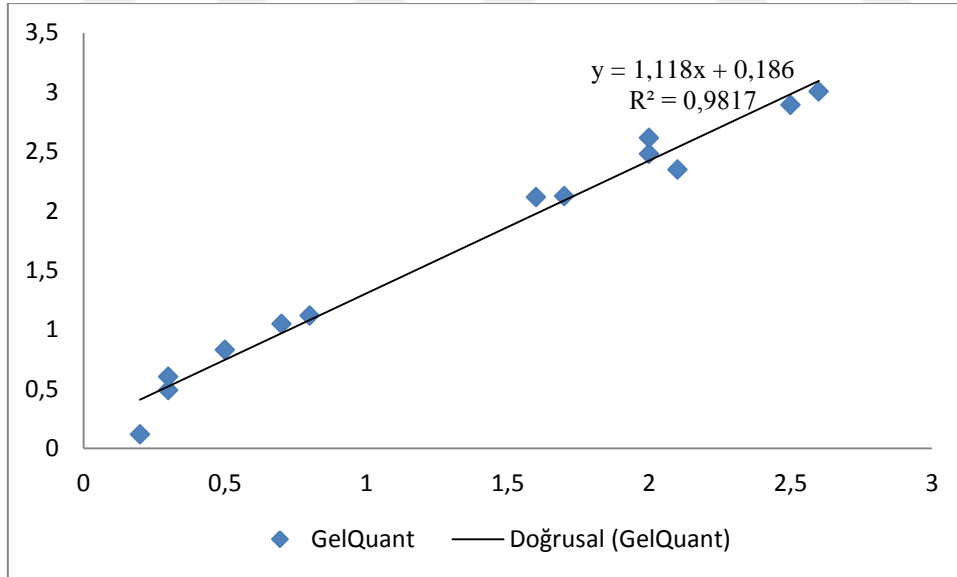
#### EK 5: Gel Quant analizi öncesi görüntünün photoshopCS.7 programında grileştirilmesi



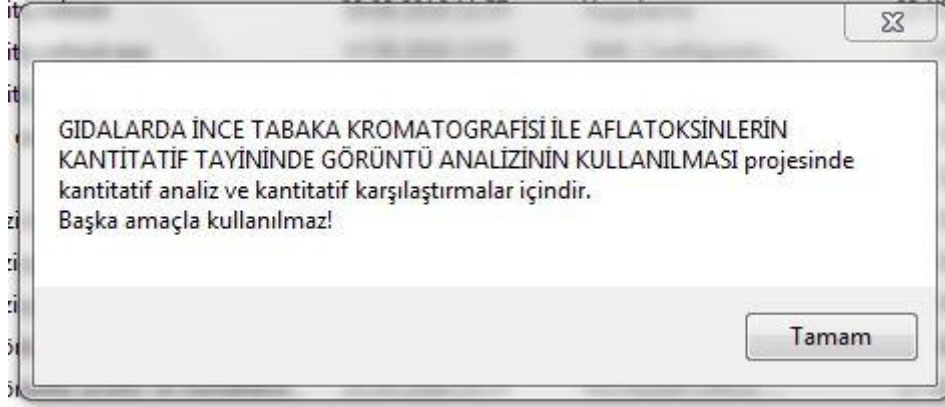
EK 6: Karşılaştırma plakasına ait gel Quant ile beneklerin pik ve pik alanları



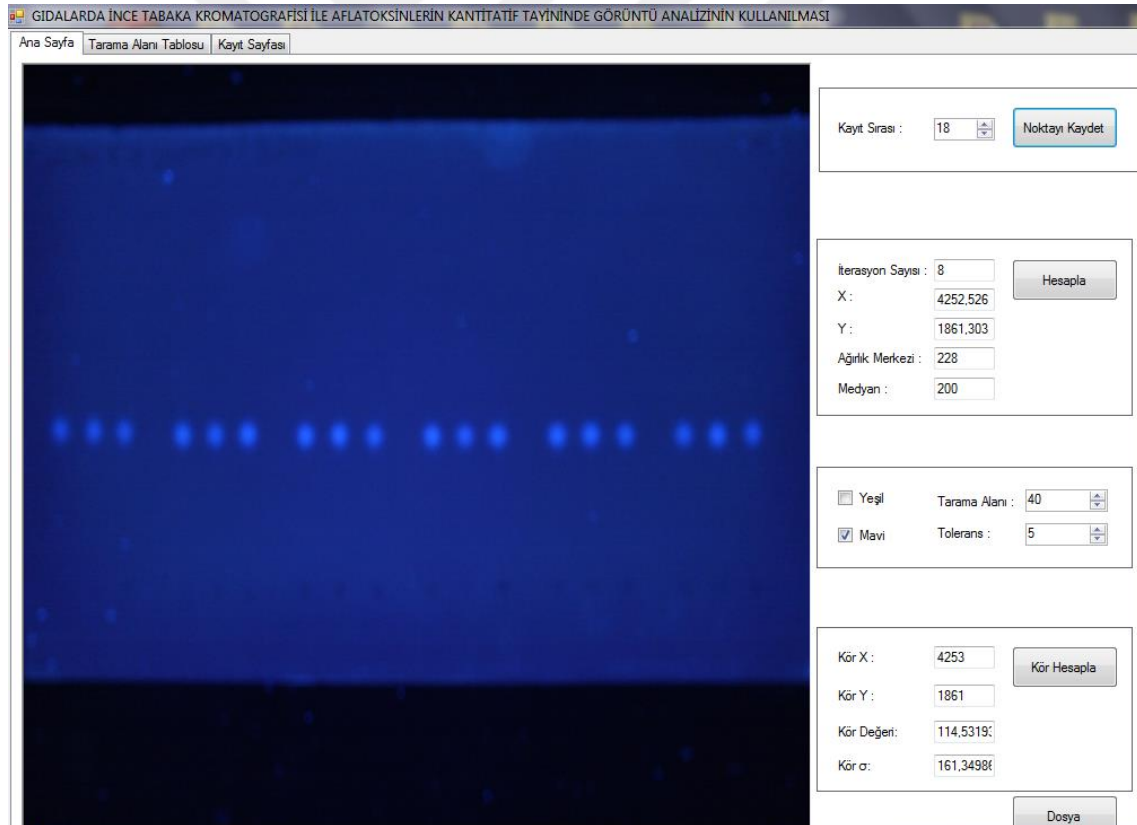
EK 7: Karşılaştırma plakasına ait Gel Quant regresyon grafiği



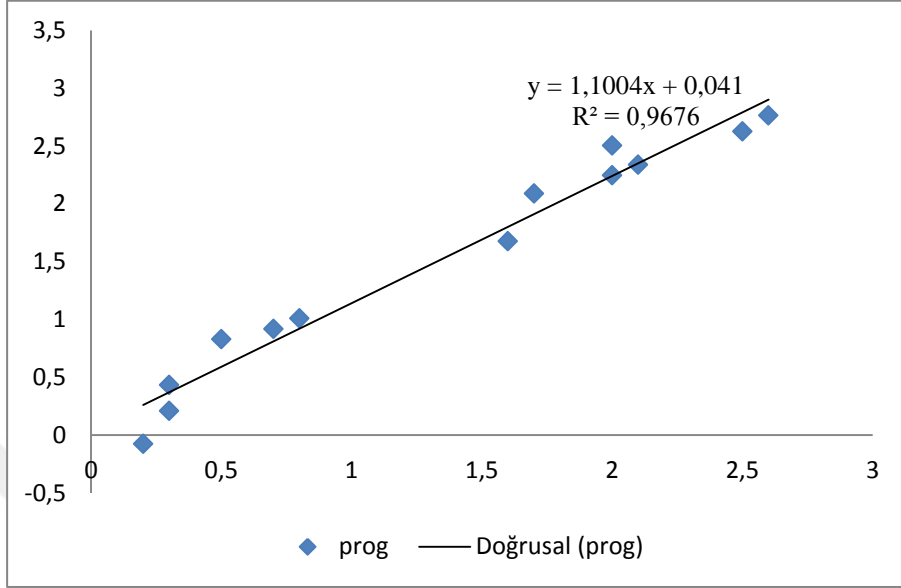
### EK 8: Özel olarak geliştirilen programın çalıştırılması



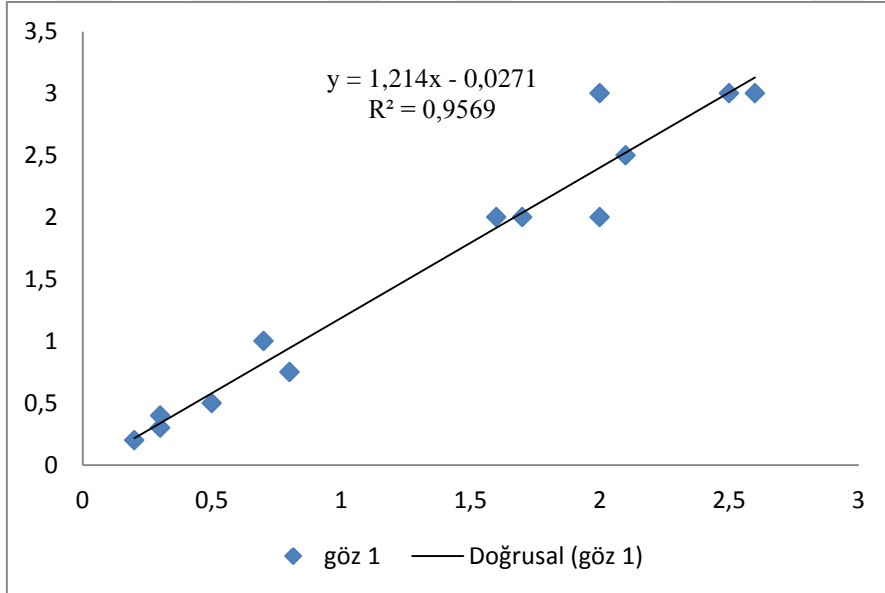
### EK 9: Programda görüntünün açılması ve hesaplama



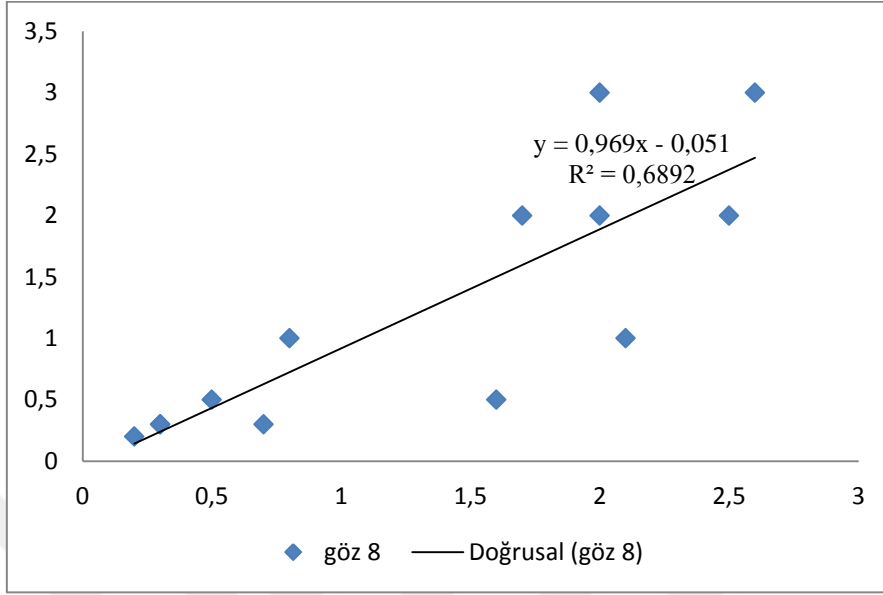
EK 10: Karşılaştırmaya plakasına ait özel program regresyon grafiği



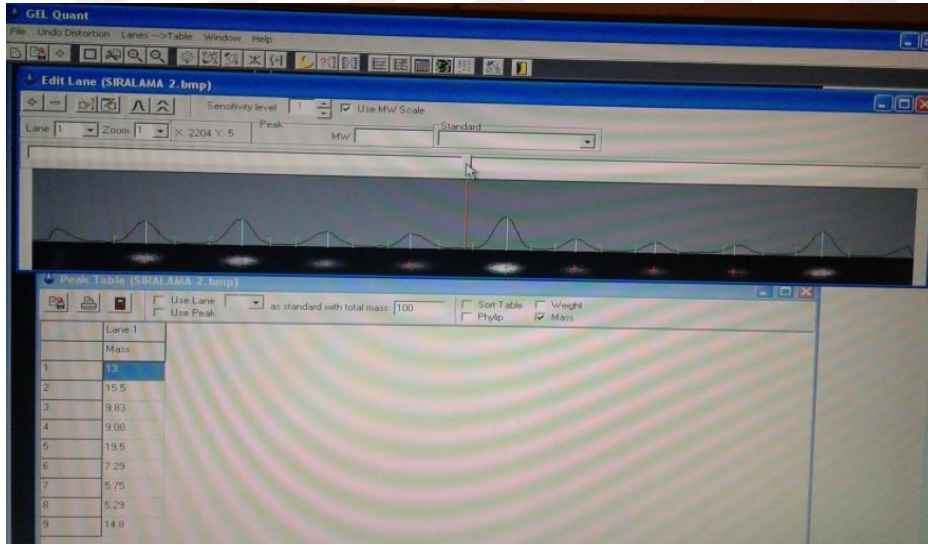
EK 11: Karşılaştırma Plakasına ait en iyi gözün regresyon grafiği



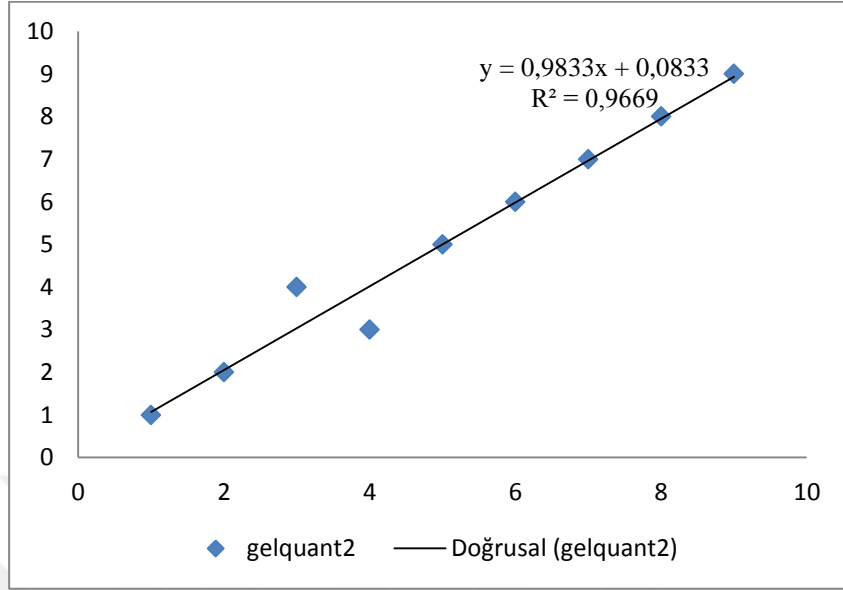
EK 12: Karşılaştırma plakasına ait kötü gözün regresyon grafiği



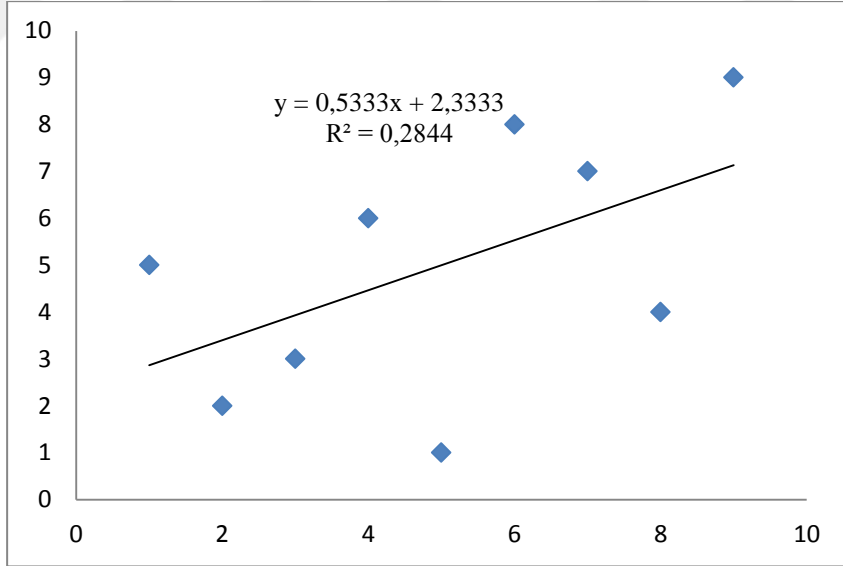
EK 13: Sıralamaya ait 2.plakanın Gel Quantprogramı ile beneklerin pik ve pik alanı



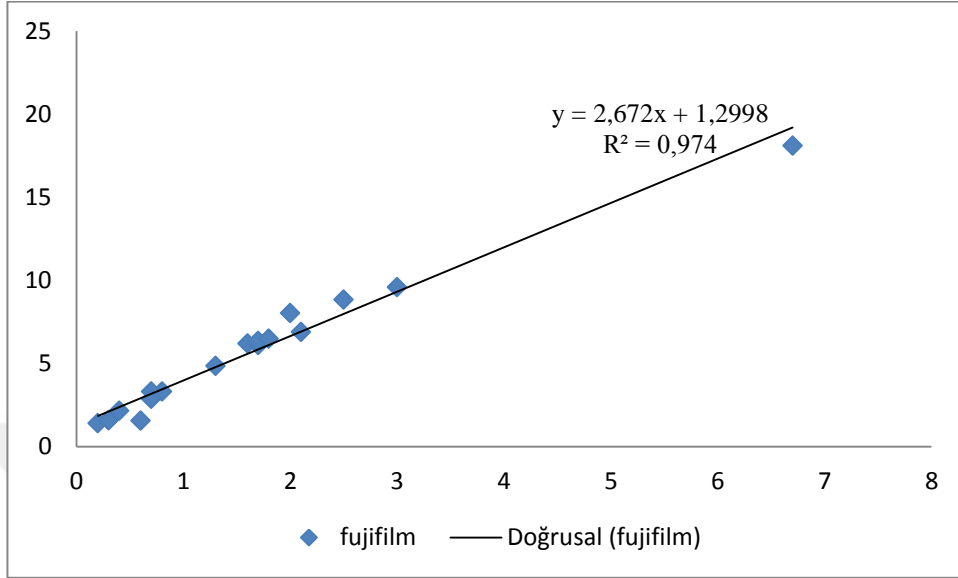
EK 14:Sıralamaya ait 2. plakanın Gel Quant programı ile tayin regresyon grafiği



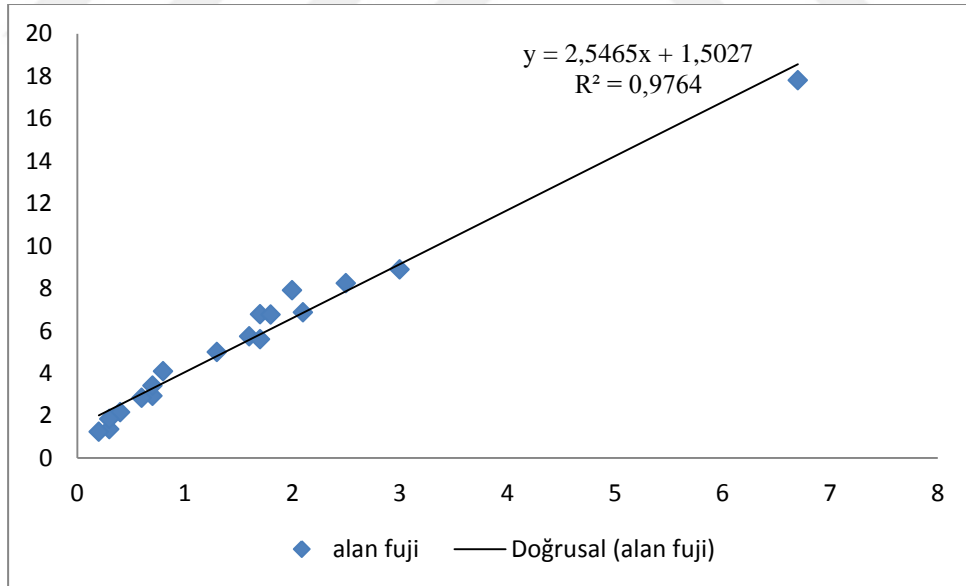
EK:15Sıralamaya ait 2. Plakanın 10. panelistin gözle tayin regresyon grafiği



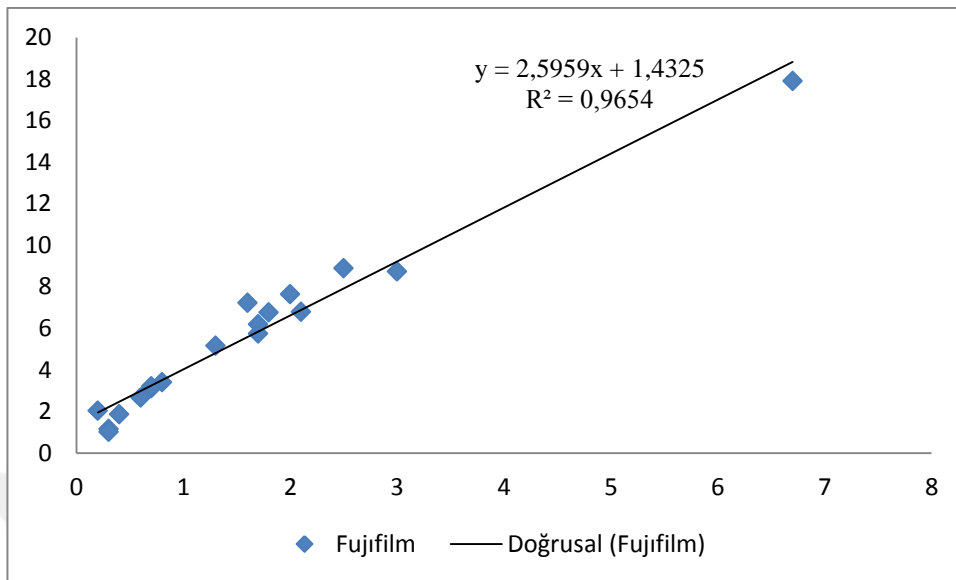
EK 16: Fujifilm DSLR kamera ile ASA 400, 1/6 sn, 3.6 f



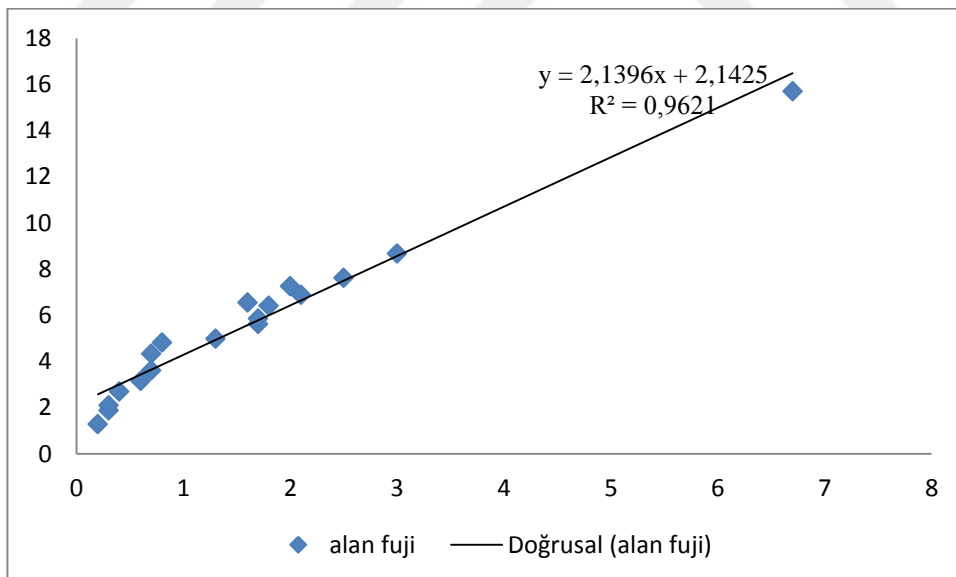
EK 17: Fujifilm ASA400, 1 sn



EK 18: Fujifilm DSLR kamera ASA 400, 1/3 sn, 3.6 f



EK 19: Fujifilm kamera ASA400, 8 sn, 3.2 f



## ÖZ GEÇMİŞ

10 Nisan 1993 tarihinde Diyarbakır ili Kulp ilçesinde dünyaya geldi. İlk, orta ve lise eğitimini Diyarbakır ili Bismil ilçesinde tamamladı. 2008 yılında Dicle Üniversitesi Gıda Teknolojisi Bölümünü kazandı. 2012 yılında lisans eğitimini tamamlamak için Yüzüncü Yıl Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümüne yerleşti ve 2014 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.

