

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



Değişik Gıda Örneklerinde Bazı Temel ve Toksik Elementlerin
Biyolojik Aktivitesinin Yeni Metotlar Kullanarak ICP-MS İle Belirlenmesi

Proje No: FBA-12-3932

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Prof. Dr. Şerife TOKALIOĞLU
Fen Fakültesi Kimya Bölümü

Proje Yürütücüsü
Adı Soyadı
Birimi/Bölümü

Ocak 2014
KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı, FBA-12-3932 kodu ile maddi olarak destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarlarında çalışma imkanını sağlayan, İngiltere Plymouth Üniversitesi School of Geography, Earth & Environmental Sciences bölümünün değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Paul Worsfold, Dr. Robert Clough ve Dr. Mike Foulkes'a içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	7
2. GENEL BİLGİLER	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM	9
4. BULGULAR	12
4.1. Kullanılan Aletler	12
4.2. Kullanılan Reaktifler ve Çözeltiler	12
4.3. Örnek Hazırlama	10
4.4. Örneklerin Toplam Asit Çözünürleştirilmesi	12
4.5. In vitro BARGE metot	12
4.6. Yöntemin Analitik Performansı	16
4.7. Vitamin Örneklerinde Eser Elementlerin Toplam Derişimleri	16
4.8. Eser Elementlerin Biyoerişilebilirliği	16
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	23
6. KAYNAKLAR	23

ÖZET

Bu çalışmada Avrupa Biyoerişilebilirlik araştırma grubu tarafından geliştirilen in vitro BARGE metodu kullanılarak 10 vitamin örneği ve üç sertifikalı referans maddedeki Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se ve Zn'nun biyoerişilebilirliği araştırıldı. Vitamin örneklerinin toplam asit parçalaması, mide çözeltisi ve mide-bağırsak çözeltisinden ekstrakte edilen Cu, Fe, Mg, Mn ve Zn derişimleri ICP-OES ile, Cr, Mo ve Se derişimleri ise ICP-MS ile tayin edildi. Mide sıvısı kullanılarak ekstrakte edilen elementlerin biyoerişilebilirliği Cr:%13-89, Cu: %9-79, Fe: %55-99, Mg: % 33-95, Mn: % 83-94, Mo: %42-101, Se: %74-125, Zn: % 81-104 dür. Mide-bağırsak sıvısı kullanılarak ekstrakte edilen metallerin biyoerişilebilirliği: Cr: % 6-65, Cu: % 27-66, Fe: % 3-14, Mg: % 34-91, Mn: % 53-62, Mo: % 40-109, Se: % 53-146, Zn: % 3-35 dir.

Keywords: BARGE metot, biyoerişilebilirlik, vitamin, ICP-MS, ICP-OES

ABSTRACT

In this study, the Unified Bioaccessibility Research Group of Europe (BARGE) in vitro method was used to assess the bioaccessibility of Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se, and Zn in ten nutritional supplement samples and three certified reference materials. The total digest, gastric phase and gastro-intestinal phase concentrations of Cu, Fe, Mg, Mn and Zn were determined by ICP-OES and Cr, Mo and Se by ICP-MS. The bioaccessible fractions of the elements in the gastric phase for the nutritional supplements were in the range 13–89% for Cr, 9–79% for Cu, 55–99% for Fe, 33–95% for Mg, 83–94% for Mn, 42–101% for Mo, 74–125% for Se and 81–104% for Zn. The range for the gastrointestinal phase was 6–65% for Cr, 27–66% for Cu, 3–14% for Fe, 34–91% for Mg, 53–62% for Mn, 40–109% for Mo, 53–146% for Se and 3–35% for Zn.

Keywords: BARGE method, bioaccessibility, nutritional supplement, ICP-MS, ICP-OES

1.GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Yeterli ve dengeli beslenme sağlığın temelini oluşturmakla birlikte, bireyin besin ögesi gereksinimini karşılamak amacıyla tükettiği besin kaynakları aynı zamanda ağır metal içeriği fazla ise uzun dönemde sağlığı üzerinde ciddi ve olumsuz etkilere sahip olabilir. Gıdalarda bulunan eser elementlerin muhtemel etkilerini belirlemek için, gıdadaki toplam metal içeriğini bilmek yeterli değildir. Bunun yanında insanlar için biyoalınabilir olan miktarlarını da bilmek gerekir. Biyoalınabilirlik, farklı gıdalar, gıda bileşenleri ve sindirim sistemi ile ilgili ortamlarda farklılık gösterdiği için beslenmede önemli bir faktördür. Parçalama, absorpsiyon, taşıma, ve elimine etme gibi birçok işleme bağlıdır. Bir kimyasalın biyoalınabilirliği canlı organizma tarafından kimyasalın absorbe edilen miktarı olarak tanımlanır. Biyoerişilebilirlik sindirim sisteminde çözünür olan fraksiyon olarak tanımlanır ve absorpsiyon için available dir.

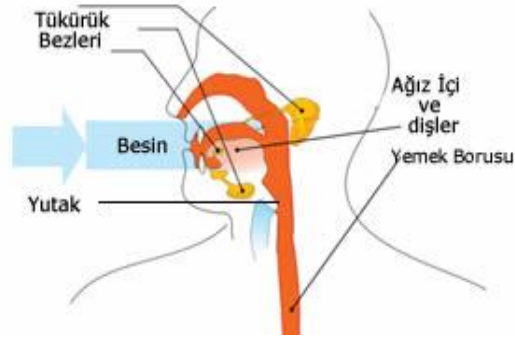
Biyoerişilebilirlik insanların sağlık risk değerlendirmesinde önemli bir araçtır. Bu çalışmada insan sindirim sisteminde (tükrük, mide, onikiparmak bağırsağı ve safra) bulunan sıvılara benzer sentetik sıvı ortamlar hazırlanmış ve her bir ortamda çözünür metal düzeyleri ICP-MS kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca Her bir elementin biyoerişilebilirliği ve örneklerdeki kimyasal formu arasındaki ilişki incelenmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

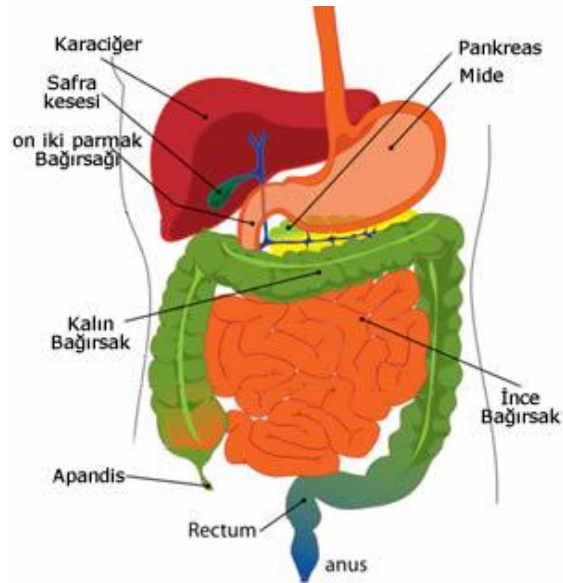
Sindirim Sistemi Organları ve Görevleri (<http://tr.wikipedia.org>):

İnsan sindirim sistemi, mekanik (fiziksel) ve kimyasal sindirim olarak ikiye ayrılır. Mekanik sindirim, molekülleri küçük moleküllere ayırmaktır. Kimyasal sindirim ise besinleri en küçük yapı taşına kadar ayırmaktır. Sindirim sistemi, sindirim borusu (sindirim kanalı) ile sindirim bezlerini içeren, yiyeceğin vücuda alınımı, sindirilmesi, gerekli besin ve enerjinin absorbe edilmesi ve atık maddelerin vücuttan atılması ile ilgilenen organ sistemidir. Ana sindirim organları; ağız, yutak, yemek borusu, mide, ince bağırsak, kalın bağırsak ve anüs'dür. Yardımcı sindirim organları, karaciğer ve pankreas'dır.

Ağız ve Dişler: Besinlerin dişler yardımıyla parçalandığı, mekanik sindiriminin yapıldığı yerdir. Ağızda besinleri ıslatıp yumuşatan tükürük salgısı bulunur. Tükürük salgısı içindeki enzimler karbonhidratların kimyasal sindirimini de gerçekleştirir.



Mide: Midede besinlerin mekanik ve kimyasal sindirimi gerçekleştirilir. Mide, kasılıp gevşeme hareketleri yaparak besinleri mekanik olarak sindirmektedir. Bu yöntemle bulamaç haline getirilen besinler daha sonra kimyasal sindirime uğrarlar. Mide özsuyu içinde bulunan mide asidi ve bazı enzimler kimyasal sindirimi gerçekleştirir. Özellikle proteinler midedeki enzimlerin yardımıyla kimyasal olarak parçalanmaya başlar. Midenin düşük pH (1-4 arası) seviyesi, mideye giriş yapan birçok mikroorganizma için ölümcüldür.



Karaciğer: Safra kesesi yardımıyla safra salgısı üretir. Safra sıvısının görevi büyük yağ tanelerini küçük yağ parçalarına dönüştürerek mekanik sindirim gerçekleştirmektedir. Karaciğerin bir başka görevi ise proteinlerin sindirimiyle oluşan zehirli amonyak maddesini üreye dönüştürmektir.

Pankreas: Sindirim sisteminin yan bir organıdır. Tüm besinlerin kimyasal sindirimini yapan enzimler salgılar. Pankreas hem sindirim enzimleri (bikarbonat ve tripsin, kemotripsin, lipaz ve pankreatik amilaz gibi) hem de hormon üreten bir bez olduğu için “karma bez” olarak

tanımlanmaktadır. Pankreas çeşitli enzimler içeren sıvıyı ince bağırsağa salgılar. Böylece bu bezler sindirimde yer almış olurlar.

İnce Bağırsak: Oniki parmak bağırsağı (duodenum), boş bağırsak (jejunum) ve kıvrımlı bağırsak (ileum) olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır. İnce bağırsağa pankreas ve karaciğerden gelen enzimler dökülmektedir. Bu sayede karbonhidrat, yağ ve proteinlerin kimyasal sindirimi tamamlanmış olur. **Duodenum** veya oniki parmak bağırsağı, sindirim sistemi anatomisinde mide ile jejunumu birleştiren bir tüptür. İnce bağırsağın ilk ve en kısa kısmıdır. Duodenumun pH seviyesi yaklaşık 6'dır. **Jejunum**, duodenum ve ileum arasındadır. Yetişkinlerde ince bağırsak ortalama 5.5-6 m uzunluğundadır. Bunun 2.5 m'si jejunumdur. pH seviyesi 7 ile 8 arasındadır. Duodenum ve jejunum'u **ileum** takip eder. İnsanlarda, ileum uzunluğu 2-4 m ve pH genellikle 7 ile 8 arasındadır.

Kalın Bağırsak: Kalın bağırsakta sindirim gerçekleşmez. Sindirilmiş besinlerden geriye kalan posa kalın bağırsakta ilerlerken su ve minerallerin emilimi gerçekleştirir.

Besinlerin sindirim alanlarını gösteren aşağıdaki tabloda da görüldüğü gibi tüm besinlerin kimyasal sindirimi ince bağırsakta tamamlanır. Kalınbağırsakta sindirim gerçekleşmez.

BESİNLER	AĞIZ	MİDE	İNCE BAĞIRSAK	KALIN BAĞIRSAK
KARBONHİDRAT	+	-	+	-
PROTEİN	-	+	+	-
YAĞ	-	-	+	-

3.GEREÇ VE YÖNTEM

BARGE (Bioaccessibility research group of Europe) metodu Avrupa Biyoerişilebilirlik Araştırma Grubu tarafından toprak, toz veya gıda gibi örneklerden insanlar için metallerin biyoerişilebilirliğini değerlendirmek amacı ile geliştirilen in vitro metottur. Bu metot ile mide (gastric) ve mide-bağırsak (gastro-intestinal) sindirim sistemine benzer sentetik çözeltiler hazırlanarak, örnek ortamlarından bu çözeltiler ile ekstrakte edilen metal yüzdeleri (biyoerişilebilir fraksiyonlar) belirlemek amaçlanır.

Bu çalışmada BARGE metodu kullanarak vitamin örneklerindeki temel ve toksik elementlerin (Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se ve Zn) biyoerişilebilirlik oranı araştırılmıştır. Bu metot

kullanılarak, insan sindirim sisteminde (tükrük, mide, onikiparmak bağırsağı ve safra) bulunan sıvılara benzer sentetik sıvı ortamlar hazırlanmış ve her bir ortamda çözünür metal düzeyleri ICP-OES ve ICP-MS kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca vitamin örneklerindeki metalin bulunduğu form ile metal biyoerişilebilirlik oranı arasındaki ilişki de incelenmiştir.

In vitro biyoerişilebilirlik metodu kullanarak gıda örneklerindeki metallerin tayinine ilişkin yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Khouzam ve ark., ekmek, beyaz peynirin farklı çeşitleri, meyve ve sebzelerdeki beş temel elementin (Fe, Zn, Cu, Mn ve Mo) biyoerişilebilirlik oranını in vitro mide ve bağırsak ile ilgili sindirim metodu kullanarak değerlendirmişlerdir. Ekmek, kabak ve salatalıktan Fe ve Zn'nun çok küçük bir kesrinin (%10) biyoerişilebilir olduğunu, elmadaki Fe'in biyoerişilebilir olmadığını (<%10), fakat elmanın Zn için (%56) iyi bir kaynak olduğunu bulmuştur. Peynirdeki Fe'in çoğu (>%50) ve Cu ve Mo'nin %50 den fazlası biyoerişilebilir olarak bulunmuştur [1].

Maulvault ve ark., Hg, Cd ve As'in biyoalınabilirliğini ham ve pişmiş siyah kılıç balığında ve yenilebilir yengeçde in vitro mide ve bağırsak ile ilgili sindirim metodu kullanarak araştırmışlardır. Ayrıca bu ürünlerin tüketimi ile oluşabilecek toksik tehlikeler de incelenmiştir. Cd ve As, ham ve pişmiş ürünlerde yüksek biyoerişilebilirlik oranı gösterirken (% 100), Hg daha düşük (% 40) biyoerişilebilirlik göstermiştir [2].

Gonzales ve ark., modifiye edilmiş in vitro metodu yenebilir deniz yosunu örnekleri için Cr, Co, Mn ve V biyoerişilebilirliğini değerlendirmek amacı ile uygulamışlardır [3].

Ovca ve ark., balkabağındaki Zn türleri ve onun insan sindirim sistemindeki muhtemel parçalanması ve biyoerişilebilirliği için fizyolojik temelli ekstraksiyon testi (PBET) metodunu kullanmışlardır. [4].

In vitro biyoerişilebilirlik metodu kullanarak toprak örneklerindeki metallerin tayinine ilişkin yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Denys ve ark., farklı topraklardan Sb'nun biyoerişilebilirliğini BARGE metodunu kullanarak araştırmışlardır. Bu amaçla ağız, mide ve ince bağırsak ortamına uygun sentetik sindirim sistemi çözeltileri hazırlanmıştır [5].

Pelfrene ve ark., Fransa’da iki fabrika (Pb ve Zn yayan) emisyonundan etkilenen bir alanda toprak kirlenmesinin neden olduğu sağlık risklerinin değerlendirmesini amaçlamışlardır. İki fabrika çevresinden toplanan 36 adet toprak örneğinde eser element düzeylerini belirlemişlerdir. Bu amaçla BARGE metodunu, tekli ve ardışık ekstraksiyon metotlarını kullanmışlardır [6].

Okorie ve ark., 19 şehir toprağında 7 potansiyel toksik elementin (As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb ve Zn) biyoerişilebilirliğini değerlendirmek için in vitro mide ve bağırsak ile ilgili sindirim metodu (BARGE) kullanmıştır. [7].

Intawongse ve Dean, kirli bir toprakta yetişen sebzelerdeki metallerin biyoerişilebilirliği için PBET ekstraksiyon testini kullanmıştır. Havuç, marul, turp ve ısıpanak sebzeleri metal kirliliği olan bir toprakta yetiştirilmiştir. Bitkideki toplam metal içeriği ICP-MS ile tayin edilmiştir. Bitki rnekleri in vitro fizyolojik temelli ekstraksiyon metodu (PBET) kullanılarak metal biyoerişilebilirliği için ekstrakte edilmiştir [8].

Colombo ve ark., cadde tozu, katalizör ve metal hidroksitlerde Pt, Pd ve Rh’un biyoalınabilirliği için PBET metodunu kullanmışlardır [9].

Turner ve Price, platin grubu elementleri ve bir katalizör zehiri olan Pb’nun otomobil katalitik konvertrlerinden yayılan parçacıklardan biyoerişilebilirliğini, insan mide ve bağırsak sisteminde karşılaşılan kimyasal şartların dikkate alındığı PBET metodunu kullanarak araştırmışlardır [10].

Karadaş ve Kara, Balıkesir’in ilçesi olan Balya’dan alınan toprak örneklerinde PBET metodu ile As, Ba, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, ve Zn biyoerişilebilirliğini araştırmışlardır [11]. Aynı toprak örneklerine BCR ardışık ekstraksiyon yöntemini de uygulayarak, kemometrik değerlendirme yapmışlardır [12].

Sediment, toz ve toprak gibi katı örneklerden BARGE ve/veya PBET metodunu kullanarak in vitro çalışmaları literatürde yer almaktadır [13-23]. Fakat gıda örneklerinden özellikle BARGE metodunu kullanarak metal biyoerişilebilirliğini ilişkin çok az sayıda çalışma vardır [1-4]. řu ana kadar Türkiye’de bu amaçla yapılan bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

4. BULGULAR

4.1. Kullanılan Aletler

ICP-MS (Thermo Scientific X-series II, Hemel, Hempstead, UK) Cr, Se ve Mo tayini için kullanıldı. ICP-OES (Varyan 725-ES, Melbourne, Australia) Fe, Mg, Cu, Mn ve Zn tayini için kullanıldı. Herbir instrümentin performansı çoklu element çözeltileri kullanılarak günlük kontrol edildi. Tüm pH ölçümleri Oakton pH 6 Acorn Series pH metre (Cole parmer, London, UK) kullanılarak yapıldı. Termostatik olarak kontrollü su banyolu çalkalayıcı (Clifton NES10D, Nickel Electro, Weston-Super-Mare, UK) ve santrifüj (MSE Centaur 2, Fisher Scientific, Loughborough, UK) in vitro mide ve mide-bağırsak ekstraksiyonları için kullanıldı. Toplam metal tayini için sıcak asit parçalamaları otomatik olarak kontrollü ısıtıcı blok kullanarak gerçekleştirildi.

4.2. Kullanılan Reaktifler ve Çözeltiler

Kullanılan tüm reaktifler analitik saflıktadır. Tüm çözeltiler ultra saflıkta su kullanılarak hazırlandı (18.2 MΩ cm, Elgastst Maxima, ELGA Process water, marlow, UK). Tüm malzemeler % 10 (v/v)'luk HNO₃ içeren asit banyosunda 24 saat çalkalandı ve sonra saf su ile yıkandı. ICP-MS için 10 µg L⁻¹ In¹¹⁵, ve ICP-OES için 100 µg L⁻¹ Y tüm kör, örnek ve kalibrasyon çözeltilerine iç standart olarak eklendi.

4.3. Örnek Hazırlama

10 adet vitamin örneği Plymouth, UK'daki bir eczaneden satın alındı. Her bir örnekten 5 adet alınarak havanda öğütüldü. Karıştırılarak homojen hale getirildi. Plastik kaplarda saklandı. 10 vitamin örneği S1-S10 olarak numaralandırıldı.

4.4. Örneklerin Toplam Asit Çözünürleştirilmesi

Yaklaşık 0.25 g örnek (n = 5) tartıldı ve tüplere yerleştirildi. 5 mL derişik HNO₃ eklendi. En az 60 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Örnekler ısıtıcı blok üzerinde 30 dak 120°C de, sonra en az 2 saat 140°C de parçalandı. Soğutma sonrası örnekler, % 2 HNO₃: % 5 metanol karışımı ile 50 mL'ye tamamlandı.

4.5. In vitro BARGE metot

Katı matrikslerden inorganik kontaminantların biyoerişilebilirliğinin belirlenmesi için kullanılan Unified BARGE metodu aşağıdaki gibidir.

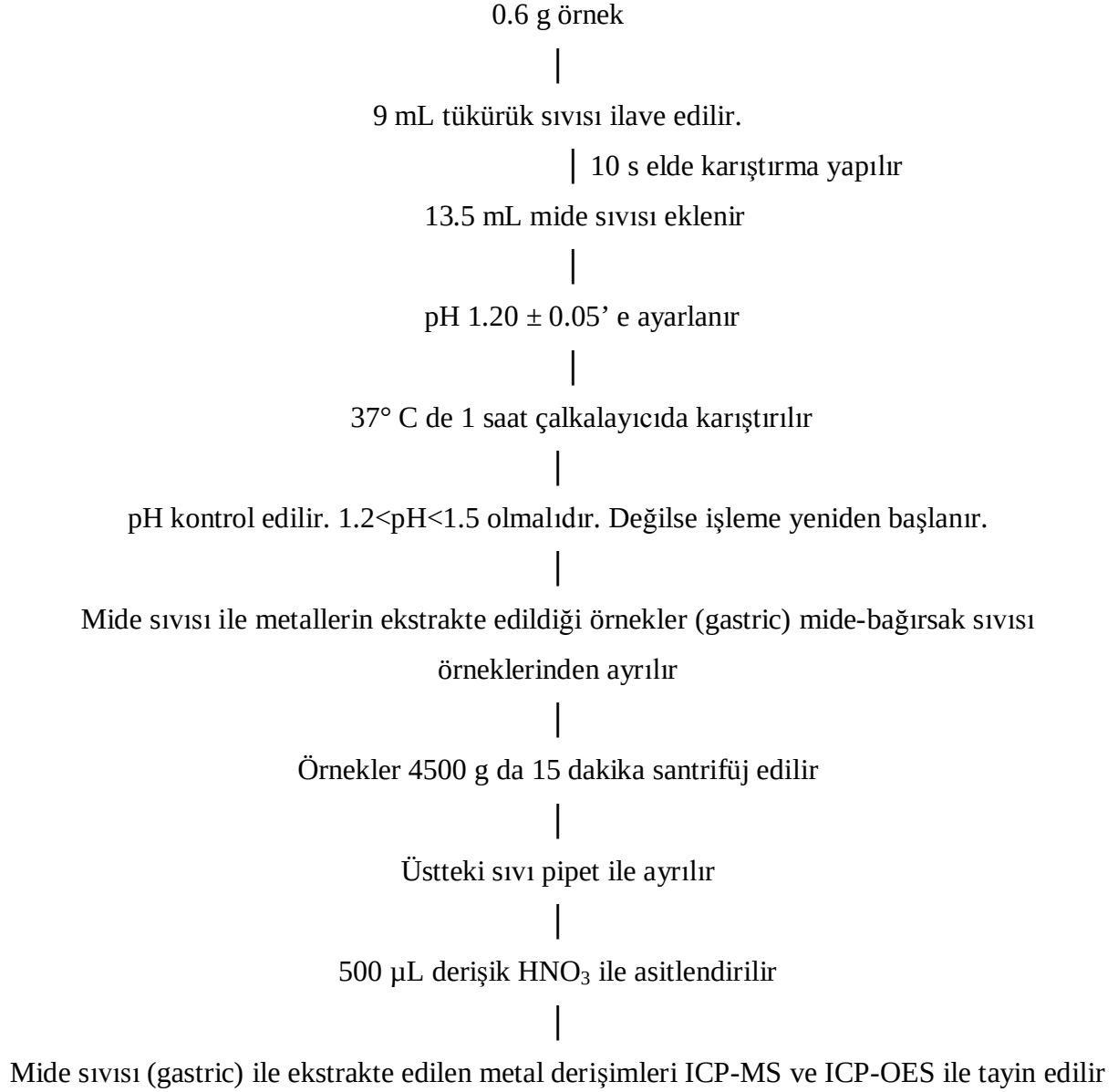
Yöntem, insan mide-bağırsak sistemi için üç farklı işlem tanımlar. Ağız (5 dakika), mide (1 saat) ve ince bağırsak (4 saat). Bu yöntem için 4 sıvı gereklidir. Tükürük (saliva), mide (gastric), onikiparmak bağırsağı (duodenal) ve safra (bile). Tüm sıvılar yöntemin uygulamasından önceki gün hazırlanmalıdır. Bu sıvıların hazırlanmasında kullanılan inorganik ve organik reaktifler ve enzimlerin miktarları ile ilgili bilgiler Tablo 1’de

Tablo 1. 250 mL inorganik çözelti (I) ve 250 mL organik çözelti (O) ile her bir sıvının (S,G, D, B) 500 mL sinin hazırlanması için kullanılan reaktiflerin hacimleri ve kütleleri

	Reaktifler	Tükürük sıvısı (S)	Mide sıvısı (G)	Oniki parmak bağırsak sıvısı (D)	Safra sıvısı (B)	Hacim (mL)
İnorganik Çözelti(I)	KCl	448	412	282	188	250
	NaH ₂ PO ₄	444	133	-	-	
	KSCN	100	-	-	-	
	Na ₂ SO ₄	285	-	-	-	
	NaCl	149	1376	3506	2630	
	CaCl ₂	-	200	-	-	
	NH ₄ Cl	-	153	-	-	
	NaHCO ₃	-	-	2803.5	2893	
	KH ₂ PO ₄	-	-	40	-	
	MgCl ₂	-	-	25	-	
	NaOH (1 M)	0.9 mL	-	-	-	
	HCl (%37)	-	4.15 mL	90 µL	90 µL	
Organik çözelti(O)	Üre	100 mg	42.5	50	125	250
	Glukoz		325	-	-	
	Glukuronik asit		10	-	-	
	Glukozamin hidroklorür		165	-	-	
Enzimler	Alfaamilaz	72.5 mg				250+250=500
	Mukin	25 mg				
	Ürik asit	75 mg				
	Bovin serum albümin	-				
	Pepsin	-				
	CaCl ₂	-				
	Pankreatin	-				
	Lipaz	-				
	Safra	-				
pH	I+O	6.5 ± 0.5	1.1 ± 0.1	7.4 ± 0.2	8 ± 0.2	

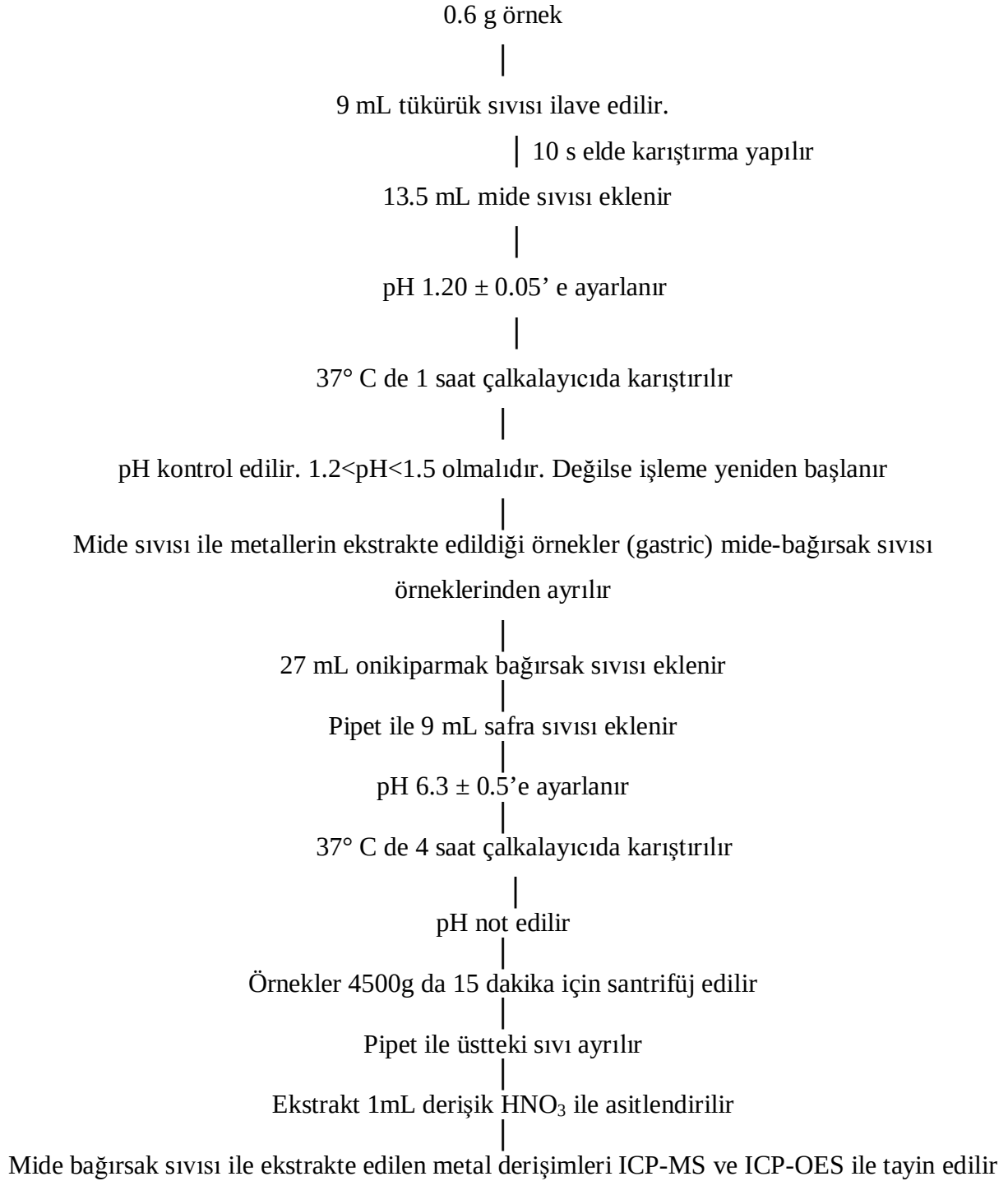
BARGE metodu için şema aşağıda verilmiştir.

(a) Örneklerden mide sıvısı ile metallerin ekstraksiyonu işlemi:



Şema 1

(b) Örneklerden mide-bağırsak sıvısı ile metallerin ekstraksiyonu işlemi:



Şema 2

Her bir vitamin örneği çözünürleştirildikten sonra, toplam metal derişimleri ICP-MS ve ICP-OES ile belirlendi. Örneklerin mide ve mide-bağırsak ekstraktlarının ağır metal içerikleri (biyoerişilebilir metal derişimi) de ICP-MS ve ICP-OES kullanarak belirlendi. Her bir metal için hem mide, hem de mide-bağırsak çözeltilerinden ekstrakte edilen metal yüzdeleri (% biyoerişilebilirlik oranı) aşağıdaki şekilde hesap edildi.

$$\% \text{ Biyoerişilebilirlik faktörü (BF)} = \frac{\text{Biyoerişilebilir metal derişimi } (\mu\text{g g}^{-1})}{\text{Örnekteki toplam metal derişimi } (\mu\text{g g}^{-1})} \times 100$$

4.6. Yöntemin Analitik Performansı

ICP-OES ve ICP-MS kullanarak toplam parçalama ve barge metotları için gözlenebilme sınırı ve tayin sınırı değerleri hesaplandı. Sonuçlar Tablo 2’de görölmektedir. İki sertifikalı referans maddenin analizi (n=5) her bir element için toplam parçalama işleminin doğruluğunu değerlendirmek için yapıldı. Ortalama geri kazanma değerleri, Cr için % 89, Cu için % 118, Fe için % 86, Mg için %110, Mn için % 118, Mo için % 112, Se için % 118 ve Zn için % 99’dır.

4.7. Vitamin Örneklerinde Eser Elementlerin Toplam Derişimleri

Vitamin örneklerindeki eser elementlerin toplam derişimleri ($\mu\text{g g}^{-1}$) Tablo 3-6’da verilmiştir. Elementlerin toplam derişimleri, Cr için 8.46-130, Cu için 101-1350, Fe için 4150-14600, Mg için 21300-146000, Mn için 317-3530, Mo için 5.94-13.5, Se için 2.33-230 ve Zn için 2740-37800 $\mu\text{g g}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

4.8. Eser Elementlerin Biyoerişilebilirliği

Vitamin örneklerinin mide sıvısı (gastric) ile ekstraksiyonu sonucu en yüksek biyoerişilebilirlik oranları (%): Fe için 55-99, Mg için 33-95, Mn için 83-94, Mo için 73-98, Se için 74-125, ve Zn için 81-104 olarak bulunurken, daha düşük biyoerişilebilirlik oranları Cr için 13-77 ve Cu için 9-79 bulundu. Cu için gastrik fazında en yüksek biyoerişilebilirlik faktörü S2 için % 63 ve S10 için % 79 bulunmuştur. Cu, bu örneklerde kolayca absorbe edilen kuprik glukonat formunda bulunur. Diğer örnekler için Cu daha düşük biyoerişilebilirlik faktörüne (% 9-19) sahiptir. Bu örneklerde Cu, Cu(II) sülfat olarak bulunur. Cr için en yüksek biyoerişilebilirlik faktörü (% 77) 10 no’lu örnek için bulunmuştur. Krom, bu örnekte CrCl_3 gibi inorganik formları ile karşılaştırıldığında daha yüksek absorpsiyon etkinliği olan

Cr(III) pikolinat olarak bulunur. Elementin kimyasal formu farklı pH ve kimyasal çevrelerde elementin biyoerişilebilirliğini belirlemede önemli bir rol oynar.

Mide-bağırsak sıvısından ekstrakte edilen elementler için en yüksek biyoerişilebilirlik faktörü Mg için % 34-91, Mo için % 93-109 ve Se için %53-146 olarak bulunmuştur. Bilhassa selenyum, safra asitleri ve pepsin ile kompleks oluşturarak çözünür hale gelir. Cr, Fe ve Zn için düşük biyoerişilebilirlik faktörleri, çalışılan pH'da ($\text{pH } 6.3 \pm 0.5$) bu elementlerin nispeten çözünmeyen hidroksit, fosfat ve/veya karbonat türlerinin oluşmasındandır.

Tablo 6, sertifikalı referans materyaller için elementlerin biyoerişilebilirlik faktörlerini gösterir. Ayrıca BGS 102 sertifikalı referans maddesinde As ve Pb tayini yapılmıştır. Sonuçlar sertifikalı değerler ile uyumlu olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, vitamin örneklerindeki tüm elementler için mide sıvısı fazında ortalama biyoerişilebilirlik sırası; Se (96.7 %) > Zn (91.6 %) $\approx$ Mn (91.4 %) > Mo (83.3 %) $\approx$ Fe (81.8 %) > Mg (77.4 %) > Cr (37.4 %) > Cu (30.9 %) şeklinde olup, mide-bağırsak sıvısı için bu sıra, Se (99.6 %) $\approx$ Mo (98.7 %) > Mg (72.4 %) > Mn (58.3 %) > Cu (46.5 %) > Cr (27.0 %) > Zn (18.6 %) > Fe (9.3 %) şeklindedir. İlaveten de biyoerişilebilirlik faktörleri vitamin örneklerindeki elementin kimyasal formu ve örnek matriks bileşenleri tarafından etkilenmektedir.

Tablo 2. ICP-OES ve ICP-MS Kullanarak Toplam Parçalama ve BARGE Metotları İçin Gözlenebilme Sınırı ve Tayin Sınırı Değerleri

Toplam parçalama metodu			BARGE metot			
			Mide sıvısı ile ekstraksiyon yöntemi		Mide-bağırsak sıvısı ile ekstraksiyon yöntemi	
ICP-OES	Ortalama $\pm$ s.d.	LOQ	Ortalama $\pm$ s.d.	LOQ	Ortalama $\pm$ s.d.	LOQ
	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Cu	0.006 $\pm$ 0.005	0.060	0.005 $\pm$ 0.003	0.040	0.0131 $\pm$ 0.029	0.30
Fe	0.025 $\pm$ 0.008	0.10	0.0820 $\pm$ 0.046	0.54	0.0249 $\pm$ 0.009	0.12
Mg	0.110 $\pm$ 0.058	0.68	0.662 $\pm$ 0.44	5.1	1.22 $\pm$ 1.5	16
Mn	0.003 $\pm$ 0.003	0.030	0.013 $\pm$ 0.020	0.21	0.02 $\pm$ 0.04	0.37
Zn	0.0416 $\pm$ 0.044	0.48	0.0841 $\pm$ 0.099	1.1	0.0351 $\pm$ 0.024	0.28
ICP-MS	Ortalama $\pm$ s.d.	LOQ	Ortalama $\pm$ s.d.	LOQ	Ortalama $\pm$ s.d.	LOQ
	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)
Cr	0.360 $\pm$ 0.19	2.2	0.191 $\pm$ 0.15	1.7	0.130 $\pm$ 0.15	1.6
Mo	0.0978 $\pm$ 0.10	1.1	0.101 $\pm$ 0.068	0.78	0.0907 $\pm$ 0.027	0.36
Se	0.211 $\pm$ 0.29	3.1	0.258 $\pm$ 0.066	0.92	0.277 $\pm$ 0.10	1.3

Tablo 3. Vitamin Örneklerindeki Mg, Mo ve Se'un Toplam ve BARGE Metodu Analiz Sonuçları (n=5)

Örnek	Element	Kimyasal form	Etiket değeri (mg kg ⁻¹)	Toplam parçalama (mg kg ⁻¹)	GK (%)	Gastrik faz (mg kg ⁻¹)	BF (%)	Gastro- intestinal faz (mg kg ⁻¹)	BF (%)
S1	Mg	Oxide, stearate	24300	24600 ± 880	101	21500 ± 1400	87	20800 ± 1300	84
S2	Mg	Oxide, stearate,	70280	84500 ± 3400	120	60200 ± 2800	71	62900 ± 4300	74
S3	Mg	Stearate	19000	21300 ± 790	112	19900 ± 1400	93	16300 ± 1000	76
S4	Mg	Oxide, stearate	50100	53000 ± 3300	106	43500 ± 2700	82	37000 ± 4000	70
S5	Mg	Oxide, stearate	75800	75700 ± 2500	100	61000 ± 6100	81	59200 ± 8900	78
S6	Mg	Oxide, stearate,	61900	60700 ± 1700	98	57800 ± 4000	95	55200 ± 4300	91
S9	Mg	Oxide, stearate	134000	146000 ± 13000	109	48600 ± 6000	33	49400 ± 5000	34
S10	Mg	Oxide, stearate	78300	79200 ± 6900	101	61100 ± 2700	77	55800 ± 3700	70
S1	Mo	Molybdenum yeast	10.0	12.3 ± 6.0	127	9.73 ± 2.8	79	13.4 ± 5.0	109
S2	Mo	Sodium molybdate	7.00	5.94 ± 2.8	85	4.34 ± 0.76	73	5.58 ± 2.30	94
S3	Mo	Sodium molybdate complexed with citric acid	7.90	13.5 ± 0.28	171	13.2 ± 1.0	98	12.6 ± 0.28	93
S1	Se	Selenium yeast	2.40	2.33 ± 0.32	96	2.26 ± 0.24	97	2.21 ± 0.25	95
S2	Se	Sodium selenate	7.00	7.91 ± 0.21	113	6.28 ± 0.34	79	5.30 ± 0.42	67
S3	Se	Sodium selenite	10.0	9.65 ± 0.22	94	7.19 ± 0.28	74	5.13 ± 0.30	53
S4	Se	Sodium selenate	26.0	31.0 ± 1.2	117	30.7 ± 1.7	99	33.4 ± 0.82	108
S5	Se	Sodium selenate	76.0	51.7 ± 9.1	68	64.6 ± 9.0	125	75.3 ± 17	146
S6	Se	Sodium selenate	186	118 ± 15	63	142 ± 24	120	140 ± 61	119
S7	Se	L-Selenomethionine	249	230 ± 6.0	93	228 ± 27	99	232 ± 12	101
S8	Se	Selenium yeast	200	212 ± 18	106	204 ± 18	96	240 ± 29	113
S9	Se	Sodium selenate	27.0	31.2 ± 9.1	117	32.3 ± 9.8	104	36.4 ± 8.3	117
S10	Se	Sodium selenate	8.10	10.4 ± 2.3	128	7.72 ± 2.1	74	8.00 ± 2.3	77

GK(%): % Geri kazanma

Tablo 4. Vitamin Örneklerindeki Fe, Mn ve Zn'nun Toplam ve BARGE Metodu Analiz Sonuçları (n=5)

Örnek	Element	Kimyasal form	Etiket değeri (mg kg ⁻¹)	Toplam parçalama (mg kg ⁻¹)	GK (%)	Gastric faz (mg kg ⁻¹)	BF (%)	Gastro- intestinal faz (mg kg ⁻¹)	BF (%)
S1	Fe	Fe(II) fumarate	8750	8080 ± 130	92	7080 ± 250	88	1100 ± 450	14
S2	Fe	Fe(II) gluconate	4220	4150 ± 32	98	3490 ± 140	84		
S3	Fe	Fe(II) sulphate	4750	4680 ± 94	99	4320 ± 160	92		
S4	Fe	Fe(II) sulphate / iron oxide	4400	7260 ± 540	165	3970 ± 240	55		
S5	Fe	Fe(II) fumarate / iron oxide	6060	5800 ± 56	96	5240 ± 780	90	464 ± 43	8
S6	Fe	Fe(II) fumarate	7430	9710 ± 230	131	6000 ± 110	62	1180 ± 110	12
S9	Fe	Fe(II) fumarate	15100	14600 ± 450	96	12300 ± 190	84	440 ± 160	3
S10	Fe	Fe(II) gluconate	3130	2580 ± 200	82	2550 ± 130	99		
S1	Mn	Sulphate	972	947 ± 26	97	889 ± 19	94		
S2	Mn	Gluconate	1400	1440 ± 20	103	1290 ± 37	89	858 ± 87	60
S3	Mn	Carbonate	317	317 ± 15	100	300 ± 10	94		
S4	Mn	Sulphate	352	356 ± 17	101	330 ± 20	92		
S5	Mn	Sulphate	1520	1450 ± 18	96	1340 ± 93	92	767 ± 130	53
S6	Mn	Sulphate	3710	3530 ± 68	95	3080 ± 100	87	2200 ± 180	62
S10	Mn	Gluconate	3130	2740 ± 110	87	2510 ± 84	92		
S1	Zn	Oxide	7290	7220 ± 470	99	6910 ± 310	96	2520 ± 270	35
S2	Zn	Gluconate	4220	4450 ± 340	105	3620 ± 300	81		
S3	Zn	Oxide	3170	3170 ± 180	100	2960 ± 200	94		
S4	Zn	Oxide	2930	2740 ± 200	94	2510 ± 180	91		
S5	Zn	Sulphate	11400	11000 ± 510	97	10200 ± 720	92	1780 ± 290	16
S6	Zn	Sulphate	18600	18800 ± 1400	101	16300 ± 1300	87	4740 ± 750	25
S7	Zn	Gluconate	37300	37800 ± 1900	101	34200 ± 3700	91	859 ± 330	2
S9	Zn	Sulphate	13400	12700 ± 980	95	11200 ± 410	88	339 ± 42	3
S10	Zn	Gluconate	3130	2770 ± 230	89	2870 ± 210	104		

GK(%): % Geri kazanma

Tablo 5. Vitamin Örneklerindeki Cr ve Cu'nun Toplam ve BARGE Metodu Analiz Sonuçları (n=5)

Örnek	Element	Kimyasal form	Etiket değeri (mg kg ⁻¹)	Toplam parçalama (mg kg ⁻¹)	GK (%)	Gastric faz (mg kg ⁻¹)	GK (%)	Gastro-intestinal faz (mg kg ⁻¹)	BF (%)
S1	Cr	Yeast	10.0	8.46 ± 0.31	87	1.38 ± 0.18	16		
S2	Cr	Chloride	7.00	11.8 ± 1.8	169	1.51 ± 0.044	13		
S3	Cr	Chloride	7.90	9.45 ± 0.22	119	4.38 ± 0.42	46		
S4	Cr	Chloride	22.0	26.7 ± 2.4	121	16.7 ± 0.86	63		
S5	Cr	Trichloride	121	130 ± 18	107	19.1 ± 2.1	15	8.14 ± 1.1	6
S6	Cr	Trichloride	62.0	58.0 ± 5.5	94	18.6 ± 4.2	32	6.00 ± 0.59	10
S10	Cr	Picolinate	6.30	10.4 ± 0.35	165	8.02 ± 0.20	77	6.75 ± 0.75	65
S1	Cu	Cu(II) sulphate	972	1130 ± 12	116	203 ± 13	18	311 ± 45	27
S2	Cu	Cu(II) gluconate	141	163 ± 5.8	116	103 ± 16	63	107 ± 4.9	66
S3	Cu	Cu(II) sulphate	317	352 ± 5.9	111	65.9 ± 4.8	19		
S5	Cu	Cu(II) sulphate	758	930 ± 37	123	83.5 ± 15	9	388 ± 46	42
S6	Cu	Cu(II) sulphate	1240	1350 ± 110	109	130 ± 8.2	10		
S9	Cu	Cu(II) sulphate	891	1030 ± 220	115	187 ± 63	18		
S10	Cu	Cu(II) gluconate	78.0	101 ± 6.3	129	79.6 ± 4.7	79		

GK(%): % Geri kazanma

Tablo 6. Sertifikalı Referans Maddelerin Toplam ve BARGE Metodu Analiz Sonuçları (n=5)

Reference material	Element	Certified value (mg kg ⁻¹)	Total digestion (mg kg ⁻¹)	R (%)	Gastric phase (mg kg ⁻¹)	BF (%)	Gastro-intestinal phase (mg kg ⁻¹)	BF (%)
DC73350	Cr	0.55 ± 0.07	0.490 ± 0.10	89				
BGS 102	Cr	225 ± 3			28.0 ± 1.2	12	11.0 ± 0.54	5
DC73350	Cu	9.3 ± 1.0	11.0 ± 0.56	118				
SRM 1567a	Cu	2.1 ± 0.2	2.50 ± 0.18	119	1.60 ± 0.054	76		
DC73350	Fe	274 ± 17	198 ± 10	72				
SRM 1567a	Fe	14.1 ± 0.5	14.0 ± 0.91	99	7.50 ± 0.30	53		
BGS 102	Fe	132000 ± 8000			537 ± 59	0.4	1040 ± 61	0.8
DC73350	Mg	6500 ± 500	6330 ± 240	97				
SRM 1567a	Mg	400 ± 20	490 ± 40	122	330 ± 7.0	82	270 ± 52	67
DC73350	Mn	4 5 ± 4	52.0 ± 7.5	116				
SRM 1567a	Mn	9.4 ± 0.9	11.2 ± 0.92	119	8.30 ± 0.18	88	5.47 ± 0.48	59
BGS 102	Mn	7330 ± 49			1720 ± 60	23	1480 ± 45	20
DC73350	Mo	0.18 ± 0.01	0.200 ± 0.004	111				
SRM 1567a	Mo	0.48 ± 0.03	0.540 ± 0.040	112	0.160 ± 0.005	33	0.370 ± 0.030	77
BGS 102	Mo				0.0730 ± 0.007		1.06 ± 0.037	
DC73350	Se	0.14 ± 0.02	0.180 ± 0.02	128				
SRM 1567a	Se	1.1 ± 0.2	1.20 ± 0.13	109	1.00 ± 0.10	91	1.10 ± 0.10	100
BGS 102	Se				0.809 ± 0.057		0.325 ± 0.057	
SRM 1567a	Zn	11.6 ± 0.4	11.5 ± 0.82	99	9.34 ± 0.20	80		

GK(%): % Geri kazanma

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Projemiz amacına ulaşmıştır. Projeden elde edilen sonuçlar etki faktörü yüksek ve SCI’da taranan Food Chemistry dergisinin 150 (2014) 321–327 sayısında basılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] R. B. Khouzam, P. Pohl, R. Lobiski, Bioaccessibility of essential elements from white cheese, bread, fruit and vegetables, *Talanta* 86 (2011) 425-428.
- [2] A. L. Maulvault, R. Machado, C. Afonso, H. M. Lourenço, M. L. Nunes, I. Coelho, T. Langerholc, A. Marques, Bioaccessibility of Hg, Cd and As in cooked black scabbard fish and edible crab, *Food and Chemical Toxicology* 49 (2011) 2808-2815.
- [3] R. D-Gonzales, V. R-Hortas, C.G-Sartal, A. M-Pineiro, M. del C. B-Alonso, P. B-Barrera, Evaluation of an in vitro method to estimate trace elements bioavailability in edible seaweeds, *Talanta* 82 (2010) 1668-1673.
- [4] A. Ovca, J. T. Van Elteren, I. Falnoga, V.S. Šelih, Speciation of zinc in pumpkin seeds (*Cucurbita pepo*) and degradation of its species in the human digestive tract, *Food Chemistry* 128 (2011) 839-846.
- [5] S. Denys, K. Tack, J. Caboche, P. Delalain, Bioaccessibility, solid phase distribution, and speciation of Sb in soils and in digestive fluids, *Chemosphere* 74(2008) 711-716.
- [6] A. Pelfréne, C. Waterlot, M. Mazzuca, C. Nisse, G. Bidar, F. Douay, Assessing Cd, Pb, Zn human bioaccessibility in smelter-contaminated agricultural topsoils (northern France), *Environ. Geochem. Health* 33 (2011) 477-493.
- [7] A. Okorie, J. Entwistle, J. R. Dean, The application of in vitro gastrointestinal extraction to assess oral bioaccessibility of potentially toxic elements from an urban recreational site, *Applied Geochemistry* 26 (2011) 789-796.
- [8] M. Intawongse, J. R. Dean, Use of the physiologically-based extraction test to assess the oral bioaccessibility of metals in vegetable plants grown in contaminated soil, *Environmental Pollution* 152 (2008) 60-72.

- [9] C. Colombo, A. J. Monhemius, J. A. Plant, The estimation of the bioavailabilities of platinum, palladium and rhodium in vehicle exhaust catalyst and road dusts using a physiologically based extraction test, *Sci. Total Environ.* 389 (2008) 46-51.
- [10] A. Turner, S. Price, Bioaccessibility of platinum group elements in automotive catalytic converter particulates, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 9443-9448.
- [11] C. Karadaş, D. Kara, In vitro gastro-intestinal method for the assessment of heavy metal bioavailability in contaminated soils, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18 (2011) 620-628.
- [12] C. Karadaş, D. Kara, Chemometric evaluation for the relation of BCR sequential extraction method and in vitro gastro-intestinal method for the assessment of metal bioavailability in contaminated soils in Turkey, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, in press.
- [13] L. Vasiluk, M.D. Dutton, B. Hale, In vitro estimates of bioaccessible nickel in field-contaminated soils, and comparison with in vivo measurement of bioavailability and identification of mineralogy, *Sci. Total Environ.* 409 (2011) 2700-2706.
- [14] A. Broadway, M. R. Cave, J. Wragg, F. M. Fordyce, R.J.F. Bewley, M.C. Graham, B.T. Ngwenya, J.G. Farmer, Determination of the bioaccessibility of chromium in Glasgow soil and the implications for human health risk assessment, *Sci. Total Environ.* 409 (2010) 267-277.
- [15] A.L. Juhasz, J. Weber, R. Naidu, D. Gancarz, A. Rofo, D. Todor, E. Smith, Determination of cadmium relative bioavailability in contaminated soils and its prediction using in vitro methodologies, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 5240-5247.
- [16] R. D-Rey, F. Daz-Fierros, M.T. Barral, Trace metals in river bed sediments: An assessment of their partitioning and bioavailability by using multivariate exploratory analysis, *J. Environ. Manage.* 91 (2010) 2471-2477.
- [17] A. Pelfrêne, C. Waterlot, F. Douay, Investigation of DGT as a metal speciation tool in artificial human gastrointestinal fluids, *Anal. Chim. Acta*, 699 (2011) 177-186.
- [18] M. Button, M. J. Watts, M.R. Cave, C. F. Harrington, G.T. Jenkin, Earthworms and in vitro physiologically-based extraction tests: complementary tools for a holistic approach

towards understanding risk at arsenic-contaminated sites, *Environ. Geochem. Health* 31 (2009) 273-282.

[19] A.G. Oomen, C.J.M. Rompelberg, M.A. Bruil, C.J.G. Dobbe, D.P.K.H. Pereboom, A.J.A.M. Sips, Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants, *Arc. Environ. Contam. Toxicol.* 44 (2003) 281-287.

[20] A. Okorie, J. Entwistle, J. R. Dean, Estimation of daily intake of potentially toxic elements from urban street dust and the role of oral bioaccessibility testing, *Chemosphere*, 86 (2012) 460-467.

[21] A. L. Juhasz, J. Weber, E. Smith, Influence of saliva, gastric and intestinal phases on the prediction of As relative bioavailability using the Unified Bioaccessibility Research Group of Europe Method (UBM), *J. Hazard. Mater.* 197 (2011) 161-168.

[22] J. Wragg, M. Cave, N. Basta, E. Brandon, S. Casteel, S. Denys, C. Gron, A. Oomen, K. Reimer, K. Tack, T.V. de Wiele, An inter-laboratory trial of the unified BARGE bioaccessibility method for arsenic, cadmium and lead in soil, *Sci. Total Environ.* 409 (2011) 4016-4030.

[23] H. Roussel, C. Waterlot, A. Pelfrene, C. Pruvot, M. Mazzuca, F. Douay, Cd, Pb, and Zn oral bioaccessibility of urban soils contaminated in the past by atmosphere emissions from two lead and zinc smelters, *Arc. Environ. Contam. Toxicol.* 58 (2010) 945-954.