

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



Gıda Ekstraktlarında Biyoerişilebilirlik Metotları Kullanılarak HPLC-ICP-MS ile
Arsenik Türlemesi

Proje No: FBA-2015-5939

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Prof. Dr. Şerife TOKALIOĞLU
Fen Fakültesi Kimya Bölümü

Proje Yürütücüsü

Nisan 2016

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı, FBA-2015-5939 kodu ile maddi olarak destekleyen Erciyes Üniversitesi 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 Cihazlar	12
4.2. Kullanılan Reaktifler ve Çözeltiler	13
4.3. Referans Materyaller	13
4.4. Örnek Hazırlama	14
4.5. Örneklerin Mikrodalga Asit Çözünürleştirilmesi	14
4.6. In vitro BARGE Metot	14
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	18
5.1. Arsenik Türleri Kararlılık Testleri	18
5.2. Pirinç ve Pırasa Örnek Analizi	19
5.3. Lup Hacminin Etkisi	20
5.4. BGS Guidance Material 102 Sertifikalı Referans Madde Analizi	20
6. KAYNAKLAR	22

ÖZET

Bu çalışmada BARGE (Bioaccessibility research group of Europe) biyoerişilebilirlik metodu kullanılarak bazı gıda örneklerinde arsenik türlemesi yapıldı. Bu amaçla tükürük, mide ve bağırsak sindirim sisteminde bulunan sıvılara benzer sentetik çözeltiler hazırlandı. BARGE metodu kullanılarak gıda örneklerdeki biyoerişilebilir arsenik yüzdeleri belirlendi. Gıda ekstraktlarında HPLC-ICP-MS ile kullanılarak tayin edilen arsenik türleri, arsenit As(III), arsenat, As(V), dimetilarsinik asit (DMA), monometilarsinik asit (MMA), arsenobetain (AsB) ve arsenokolin (AsC) dir. Pirinç örneği için biyoerişilebilirlik faktörü %25-%61 arasında bulundu. Mide ve mide-bağırsak sıvısı ekstraktları için As türleri biyoerişilebilirlik sırası, pirinç örneği için DMA.>As(III)>As(V) ve pırasa örneği için As(III)>DMA>As(V) şeklindedir.

Anahtar Kelimeler: BARGE metot, biyoerişilebilirlik, HPLC- ICP-MS, As türlemesi

ABSTRACT

In this study, As speciation was made in some food samples by using BARGE (the Unified Bioaccessibility Research Group of Europe) bioaccessibility method. For this, the synthetic solutions were prepared in which they are similar to saliva, gastric and intestinal digestion systems. Bioaccessibility (%) of As in food samples was determined by BARGE method. As species determined in the food extracts by HPLC-ICP-MS are as follows: arsenide, As(III); arsenate, As(V), dimethylarsinic acid (DMA); monomethylarsonous acid (MMA), arsenobetaine (AsB) ve arsenocholine (AsC). Bioaccessibility (%) in rice sample was found to be between 25 and 61%. The bioaccessibility sequence for both gastric and gastrointestinal extracts was found to be DMA.>As(III)>As(V) for rice sample and As(III)>DMA>As(V) for leek sample.

Keywords: BARGE method, bioaccessibility, HPLC- ICP-MS, As speciation

1.GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Gıdalarda bulunan eser düzeydeki metallerin etkilerini belirlemek için, gıdadaki toplam metal içeriğini bilmek yeterli değildir. Canlılar 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. Bir kimyasalın biyoalınabilirliği canlı organizma tarafından kimyasalın absorbe edilen miktarı olarak tanımlanır. Biyoerişilebilirlik sindirim sisteminde çözünür olan bir bileşiğin fraksiyonudur ve absorpsiyon için uygundur.

Biyoerişilebilirlik insanların sağlık risk değerlendirmesinde önemli bir araçtır. Gıda örneklerindeki biyoerişilebilir arsenik türlerini belirlemek için, bu çalışmada Avrupa Biyoerişilebilirlik araştırma grubu tarafından geliştirilen metot [(The Bioaccessibility Research Group of Europe (BARGE))] kullanıldı. Bu metot ile, ağız, mide ve bağırsak sindirim sisteminde bulunan sıvılara benzer sentetik çözeltiler hazırlandı ve her bir ortamda çözünür arsenik yüzdeleri HPLC-ICP-MS ile belirlendi. HPLC-ICP-MS ile gıda ekstraktlarında tayin edilen arsenik türleri, arsenit As(III), arsenat, As(V), dimetilarsonik asit (DMA), monometilarsonik asit (MMA), arsenobetain (AsB) ve arsenokolin (AsC) dir. Gıda örneklerinin toplam As içeriğini belirlemek için mikrodalga ile çözünürleştirme yöntemi kullanıldı. Herbir As türünün % biyoerişilebilirliği belirlendi.

2. GENEL BİLGİLER

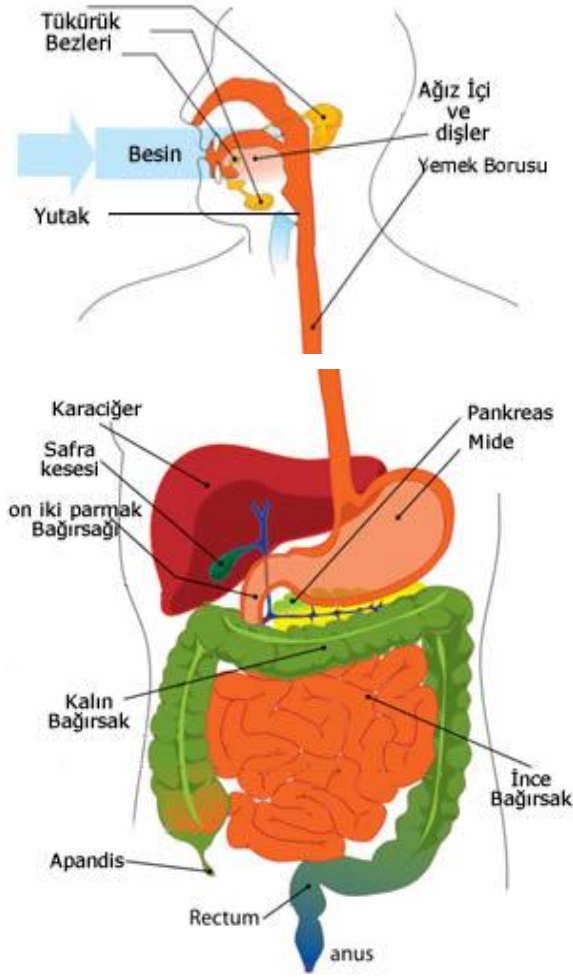
Arsenik çok toksik bileşiklere sahip bir element olup, düşük dozda arseniğe maruz kalmak insanlarda kanser başta olmak üzere deri yaraları, nörolojik kusurlar ve damar tıkanıklığı gibi ciddi negatif sağlık etkilerine yol açar. Zıt sağlık etkileri, alınan arseniğin dozuna ve maruz kalma süresine bağlıdır. Arseniğin toksikliği kimyasal çevresine bağlıdır. Arsenik doğal çevrede dört oksidasyon basamağında bulunur. Bunlar: As(V, arsenat), As(III, arsenit), As(O, arsenik) ve As(-III, arsin). İnorganik As formları, As(III) ve As(V) en toksik arsenik formlarıdır. Her iki inorganik As türü de kanserle ilişkili olmasına rağmen, As(III), As(V)'den 10 kat daha toksiktir. MMA(V), DMA(V) ve arseniğin diğer organik formları genel olarak toksik özellik göstermez. Bu nedenle arseniğin gıda örneklerindeki potansiyel toksikliği sadece toplam As derişimine değil, aynı zamanda onun kimyasal türlerine de bağlıdır.

Çevrede arseniğe maruz kalmak için en yaygın doğal kaynaklar, volkanik kayalar, deniz kayaları, hidrotermal birikimler, kömür ve petrol gibi fosil yakıtlardır. Madencilik, endüstriyel aktiviteler ve arsenikli pestisitlerin kullanımı gibi insan aktiviteleri çevrede arsenik düzeylerinin artmasına katkıda bulunur. İnsanlar farklı yollardan arseniği alabilir. Bunlar, doğrudan arsenik içeren suların içilmesi ile ya da ürün-toprak-su sistemi yolu ile As alımı şeklindedir. Arsenik bitki kökleri ve sebzeler tarafından tarım toprağından absorbe edilir veya sulama suyundan alınır ve bu şekilde besin zincirine girer. Yer altı suyu ve toprakta US Çevre Koruma Ajansı (USEPA) tarafından belirlenen toplam As derişimi için sınır değerler, sırası ile $10 \mu\text{g L}^{-1}$ and 20 mg kg^{-1} dır.

Gıdalar için alınabilir As miktarı toprakta çözünebilir As ile yakından ilgilidir. Toprak pH'ı, redoks potansiyeli, toprak mikroorganizmaları, organik madde içeriğı, diğer elementler ile etkileşme/yarışma, kirleticilerin kimyasal formları tarım toprağındaki As çözünlülüğünü ve alınabilirliğini etkiler. Tarım topraklarının şartları bir bölgeden diğerine değışebilir. Bu nedenle besleyici ve kirleticilerin kök vasıtası ile fitoalınabilirliğı değışebilir.

Gıdalarda As'in spesifik kimyasal formlarının ölçülmesi ve ayrılması için metotlar risk değlendirmesi için gereklidir. Gıda ile insan vücuduna toksik kimyasallar girer ve bu nedenle kontaminantlar açısından gıda güvenliğini değlendirmede bu metotlar büyük önem taşır. Arseniğın toksikliğı, onun kimyasal formuna bağılı olduğundan dolayı gıdalarda arsenik türlemesi toplam As derişimini tayin etmekden daha önemlidir. Üstelik gıda örneğinde biyoalınabilir olan toksik elementin miktarının belirlenmesi insan sağığı açısından risk değlendirmesinde ciddi önem taşımaktadır. Biyoalınabilirlik, farklı gıdalar, gıda bileşenleri ve sindirim sistemi ile ilgili ortamlarda farklılık gösterdiği için beslenmede önemli bir faktördür. Parçalama, absorpsiyon, taşıma, kullanma ve elimine etme gibi birçok işleme bağılıdır.

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, yiyeceğın 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.



3.GEREÇ VE YÖNTEM

BARGE (Bioaccessibility research group of Europe) metodu

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 yüzdelерini (biyoerişilebilir fraksiyonlar) belirlemek amaçlanır.

Bu çalışmada BARGE metodu kullanarak bazı gıda örneklerindeki (pirinç ve pırasa) inorganik ve organik arsenik türlerinin biyoerişilebilirlik oranı HPLC-ICP-MS ile araştırılmıştır.

Gıda örneklerinde HPLC-ICP-MS ile As türlemesine ilişkin çalışmalar literatürde az sayıda mevcuttur. Yine biyoerişilebilir metotlar kullanılarak bu örneklerden metal ekstraksiyonuna ilişkin çalışmalar oldukça yenidir. BARGE ya da PBET metotlarını kullanarak insan sindirim sistemine benzer sentetik sıvı ortamlar hazırlamak ve As türlemesi yapmak, biyoerişilebilir As türlerini HPLC-ICP-MS ile tayin etmek konusundaki çalışmalar dünyada çok yenidir. **Özellikle bu çalışmada kullanılan BARGE metodunu kullanarak gıda örneklerinde As türlemesine ve bu türlerin biyoerişilebilirliğinin belirlenmesine yönelik Türkiye de yapılmış herhangi bir çalışma söz konusu değildir.**

a) In vitro sindirim sistemi metodu kullanarak gıda örneklerinde metallerin biyoerişilebilirliğine ilişkin yapılan çalışmalar:

Khouzam ve ark., ekmek, beyaz peynirin farklı çeşitleri, meyve ve sebzelerdeki beş temel elementin (Fe, Zn, Cu, Mn ve Mo) biyoalınabilirliğini in vitro mide ve bağırsak ile ilgili sindirim metodu kullanarak değerlendirmişlerdir. Ekmek, kabak ve salatalıktan Fe ve Zn'nun çok küçük bir kesrinin (%10) biyoalınabilir olduğunu, elmadaki Fe'in biyoalınabilir 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 biyoalınabilir 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 biyoalınabilirlik gösterirken (% 100), Hg daha düşük (% 40) biyoalınabilirlik göstermiştir [2].

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

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

Tokalioğlu ve ark., BARGE metodunu kullanarak on vitamin örneği ve üç sertifikalı referans maddeden Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se ve Zn'nun biyoerişilebilirliğini ICP-MS ile belirlemişlerdir [5].

b) HPLC-ICP-MS ile gıda örneklerinde As tayinine ilişkin yapılan çalışmalar:

Narukawa ve ark., pirinç unu örneklerindeki As türlerinin ekstraksiyonunu farklı ekstrakte edici çözücüler kullanarak araştırmışlardır. Her bir türün derişimini ısı yardımlı ekstraksiyon sonrası HPLC-ICP-MS ile belirlemişlerdir. Örneklerde As(III), As(V) ve DMAA bulunmuş, ayrıca As(III) ve As(V) için ekstraksiyon etkinliği araştırılmıştır [6].

Zmonoski ve ark., Brezilya ve İspanya deniz ürünlerinde inorganik ve organik arsenik türlerinin tayini için analitik bir metot geliştirmiştir. Arsenik türlemesi anyon ve katyon değiştirici reçineli sıvı kromatografisi (LC) ve ICP-MS ile gerçekleştirilmiştir. Tüm örneklerde arsenobetain temel tür olarak bulunmuştur [7].

Cao ve ark., polar, polar olmayan ve inorganik As türlerinin kuru deniz ürünlerinde ardışık ekstraksiyon sonrası HPLC-ICP-MS ile tayin etmişlerdir. Bu ürünlerde arsenobetain ve As(V)'in baskın türler olduğunu bulmuşlardır [8].

Raber ve ark., balık, pirinç ve buğday örneklerinde inorganik As'in tayini için anyon değiştiricili HPLC-ICP-MS kullanmışlardır. Ekstraksiyon trifloroasetik asit/H₂O₂ ile yapılmış ve hareketli faz olarak malonik asit tamponu kullanılmıştır [9].

Sartal ve ark., dört adet yenebilir su yosununda pişirme sonrası anyon değiştirici içeren HPLC ve ICP-MS kombine sistem ile As türlemesini yapmışlardır. Türleme çalışmaları bu örneklerin pişirme suyunda gerçekleştirilmiştir [10].

Rosas-Castor ve ark., mısırdaki As derişiminin sulama suyu ve toprak parametreleri ile ilişkisini detaylı olarak araştırmıştır [11].

Rodriguez ve ark., altı farklı balık sosunda HPLC-ICP-MS ile As türlemesi yapmışlardır. Major bileşen arsenobetaindir. Balık sosu örneklerinde arsenit ve arsenat bulunamamıştır [12].

Değişik örneklerde As türlemesine ilişkin çalışmalar literatürde verilmiştir [13-20].

c) HPLC-ICP-MS ile gıda örneklerinde biyoerişilebilirlik metotları kullanılarak As türlemesine ilişkin yapılan çalışmalar:

Koch ve ark., Kanada gıda örneklerinin ekstraktlarında As türlemesi ve onun biyoerişilebilirliğini belirlemişlerdir. Biyoerişilebilirlik ekstraksiyon metodu olarak PBET kullanmışlardır. Dut örneğinde toksik As türlerine rastlanırken, mantar da daha az toksik As türleri bulunmuştur [21].

Horner ve Beauchemin, Pişmiş ve pişmemiş pirinçlerde on-line olarak ICP-MS ile eşleşmeli iyon değiştirme kromatografisi kullanarak As türlemesi ve biyoerişilebilirlik çalışmışlardır. Örneklerdeki 4 önemli As türü, As(III), MMA, DMA, ve As(V), 5 dakika içinde ayrılmıştır [22].

Gıda örneklerinden HPLC-ICP-MS ile As biyoerişilebilirliğine ilişkin literatürde az sayıda çalışma vardır [21,22]. Fakat BARGE metodunu kullanarak As türlemesi ve biyoerişilebilirliğine ilişkin HPLC-ICP-MS ile şu ana kadar ulusal ya da uluslararası yapılan bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

4. BULGULAR

4.1. Kullanılan Cihazlar

HPLC-ICP-MS birleşik sistemi (Jasco LG-2080-02 and Thermo Scientific X-series II, Hemel Hempstead, UK) As(III), As(V), DMA, MMA, AsB and AsC tayin etmek için kullanıldı. ICP-MS'in performansı 10 ng/mL Ba, Li, In, Ce, and U içeren mutielement çözelti ile günlük olarak kontrol edildi. ICP-MS cihazının tune ayarı He'da %7'lik H₂ gazı kullanılarak çarpışma/hücre modunda yapıldı. Bu ayar ile ¹⁴⁰Ce¹⁶O:¹⁴⁰Ce oranını minimum yapıldı ve maksimum kararlı sinyal elde edildi. 10 ng/ml In içeren çözelti ile saniyede > 80000 sayım ile yüksek bir duyarlılık sağlandı. HPLC-ICP-MS ikili sistemi için HPLC'nin hareketli fazından kaynaklanan ³¹P sinyali, sinyal kararlılığı açısından nebulizör gazının optimizasyonunu yapmak için kullanıldı.

Arsenik türleri Hamilton PRP-X100 anyon değiştiricili kolon (250 mm uzunluk, iç çapı 4.1 mm, dolgu maddesi parçacık boyutu: 10 µm) ile ayrıldı. Hareketli faz olarak % 1(v/v)'lik

metanolde 20 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (BDH, Analar) kullanıldı. Bu çözeltinin pH'ı NH_3 ile pH 6'ya ayarlandı. Akış hızı 1.2 mL/dakika olacak şekilde ayarlandı. A Rheodyne 9010 enjeksiyon valfi örnekteki tahmini As derişimine bağılı olarak kullanılan 20 µl ya da 200 µl örnek lup hacmi ile dolduruldu. HPLC kolonundan çıkan elüent, direkt olarak ICP-MS cihazının nebulizörüne bağlandı. $m/z=75$ deki arsenik iyon şiddeti cihazın “time –resolved analysis” modu kullanılarak 15 dakika boyunca izlendi. Pik alanı dikkate alınarak yapılan ölçümlerde kalibrasyon doğrusu için korelasyon katsayısı en az 0.999 olarak elde edildi.

Tüm pH ölçümleri Voltcraft pH-100 ATC pH metre ile yapıldı. pH metre, kullanım öncesi pH 4 ve 7 tampon çözeltileri ile günlük olarak kalibre edildi. Çalkalayıcı ve termostatik olarak kontrollü su banyosu (Clifton NES10D, Nickel Electro, WestonSuper-Mare, UK) in vitro mide ve mide-bağırsak ekstraksiyonları için kullanıldı. Santrifüj (MSE Centaur 2, Fisher Scientific, Loughborough, UK) ise katı-sıvı faz ayırımları için kullanıldı. Gıda örneklerinin asit parçalaması, 100 mL'lik kapaklı teflon kapları içeren mikrodalga fırın (GA Mars Xpress microwave lab station, CEM, USA) ile yapıldı.

4.2. Kullanılan Reaktifler ve Çözeltiler

Kullanılan tüm reaktifler analitik saflıktadır. Tüm çözeltiler ultra yüksek saflıkta su kullanılarak hazırlandı (18.2 MΩ cm, Elgastat Maxima, ELGA Process Water, Marlow, UK). Tüm malzemeler % 2 (v/v)'lik HNO_3 içeren asit banyosunda 24 saat çalkalandı ve sonra ultra yüksek saflıkta su ile yıkandı. Arsenik oksit, As(III) ve kokodilik asit sodyum trihidrat tuzu $[(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}, \text{DMA}]$ Sigma Aldrich'den (Gillingham, Dorset, UK) satın alındı. Disodyummetilarsonathekzahidrat tuzu $(\text{CH}_3\text{AsNa}_2\text{O}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}, \text{MMA})$, Sigma Aldrich'den satın alındı. $\text{Na}_2\text{HAsO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -As(V) ve amonyumdihidrojen ortofosfat, AnalaR BDH Lutterworth, Leicestershire, UK'den ve In, Ir iç standart çözeltileri VWR International (MERCK)'den elde edildi. Kullanılan metanol HPLC analitik saflıktaydı.

1000 mg L^{-1} As(V), 1000 mg L^{-1} DMA ve 1000 mg L^{-1} MMA stok çözeltileri, ilgili tuzlarından uygun miktarların suda çözülmesi ile hazırlandı. 1000 mg L^{-1} As(III) çözeltisi için belirli miktarda As_2O_3 bir behere tartıldı ve 4 mL derişik HCl eklendi. Çözünme sonrası 50 mL'lik balonjojede ultra saf su ile tamamlandı. 20 mg L^{-1} As(III), 10 mg L^{-1} As(V), 10 mg L^{-1} DMA, 10 mg L^{-1} MMA, 20 mg L^{-1} AsB ve 20 mg L^{-1} AsC çözeltileri, 1000 mg L^{-1} 'lik stok çözeltilerinden seyreltme ile hazırlandı. Tekli ya da çoklu As türlerini içeren kalibrasyon

standart çözeltileri (10-100 ng mL⁻¹) günlük olarak 0.1 M HNO₃ de hazırlandı. Gerçek örnekler için standart çözelti derişimleri 1-20 ng mL⁻¹ olarak günlük hazırlandı. Numune enjeksiyonu şırınga ile yapıldı.

Derişik HCl (12 mol L⁻¹), derişik HNO₃ (16 mol L⁻¹), NaCl, NH₄Cl, susuz Na₂SO₄, CaCl₂.2H₂O, NaOH ve NaHCO₃ Fisher Scientific (Loughborough, UK)'den, susuz D(+) glucose, D-glucuronic acid, pancreatin, pepsin, albumin, KSCN, mucin (pig), D(+) glucosamine hydrochloride, lipase (pig), α -amylase (bacillus species), urea ve bile tuzları (bovine)Sigma–Aldrich (Gillingham, Dorset, UK)'den ve KH₂PO₄, NaH₂PO₄, MgCl₂.6H₂O, KCl, ve urik asit kimyasalları VWR (Lutterworth, UK)'den elde edildi.

4.3. Referans Materyaller

BARGE metodunun doğruluğu için BGS Guidance Material 102 (an ironstone soil from Lincolnshire, UK) kullanıldı. Bu referans materyal BARGE metodu için hazırlanmış sertifikalı materyaldir. Ayrıca National Institute for Environmental Studies (NIES, Japan) Rice Flour Unpolished 10-a sertifikalı referans materyal analizi yapıldı. Analizlerde yaklaşık 0.30 g BGS 102 ve 0.60 g NIES Unpolished rice 10-a tartıldı.

4.4. Örnek Hazırlama

İki pirinç örneği, TUR1 and TUR5 Türkiye'deki farklı marketlerden satın alındı. Pırasa örneği ise Devon, UK'den satın alındı. Kurutulan ve öğütölen örnekler analize hazır hale getirildi.

4.5. Örneklerin Mikrodalga Asit Çözünürleştirmesi

0.25 g'lık kurutulmuş gıda örnekleri 3 paralel olmak üzere teflon kaplar içine tartıldı. Üzerine 5 ml HNO₃ (70%) and 2 ml H₂O₂ (30%) ilave edildi. Örnekler 1600 W da 43 dakika toplam parçalama zamanında parçalandı. Parçalamanın ilk basamağında sıcaklık 15 dakika içinde 160 °C ye ulaştı ve 5 dakika bu sıcaklıkta kaldı. Parçalamanın ikinci adımında sıcaklık 8 dakikada 160 °C'den 200 °C ye artırıldı ve 15 dakika bu sıcaklıkta örnekler parçalandı. Parçalama sonrası Teflon reaksiyon kapları oda sıcaklığına soğutuldu ve örnekler balonjojelere aktarıldı ve %2 (v/v)'lik HNO₃ ile tamamlandı. Örnek ve standart çözeltilerine son hacimde 10 µg l⁻¹ In ve Ir içerecek şekilde iç standart eklendi.

4.6. In vitro BARGE Metot

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

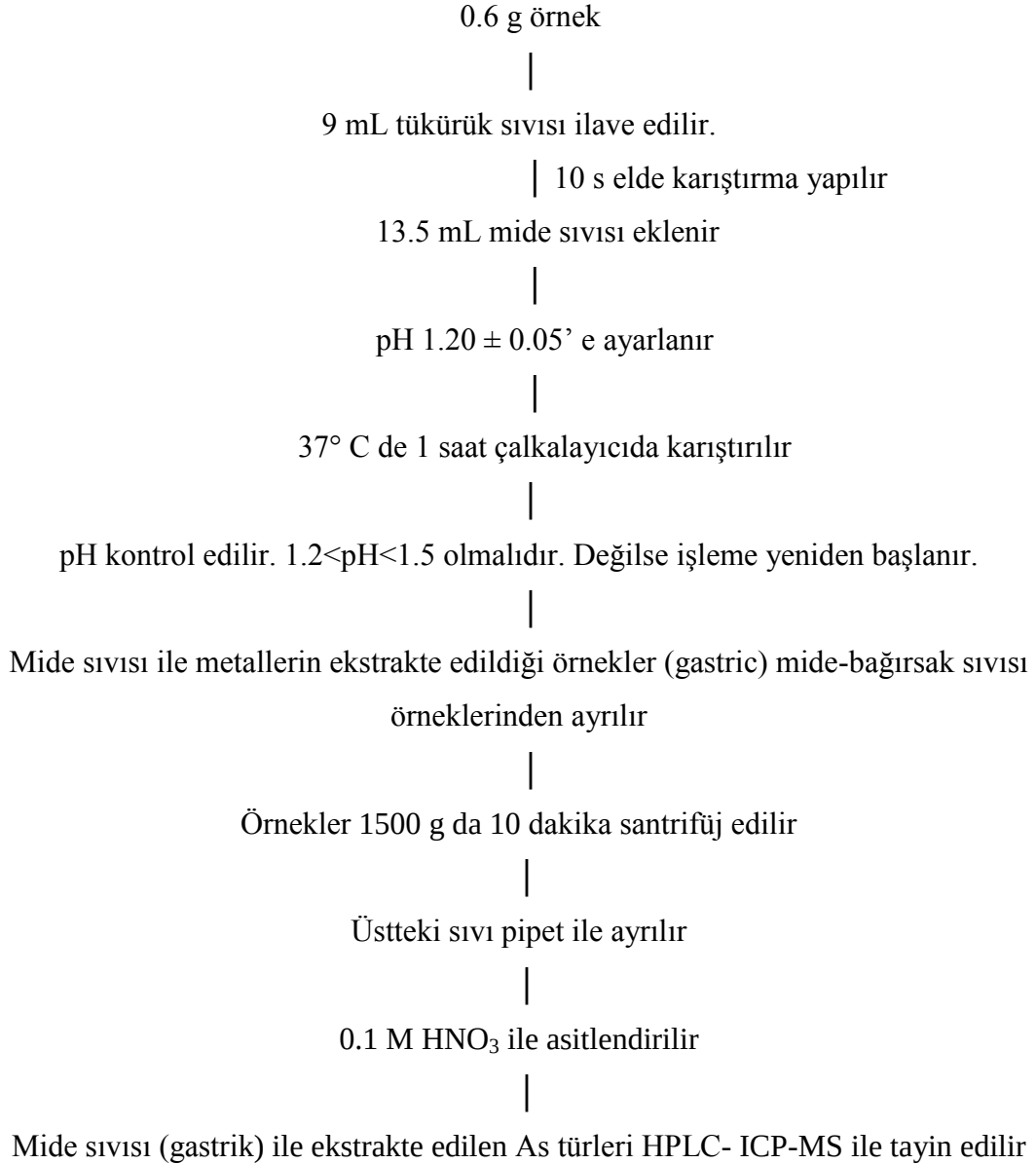
Yöntem, mide-bağırsak sistemi için üç farklı işlem tanımlar. Ağız (5 dakika), mide (1 saat) ve ince bağırsak (4 saat). Bu yöntem için 4 sıvı gereklidir. Tükürük (saliva), mide (gastric), onikiparmak bağırsağı (duodenal) ve safra (bile). Tüm sıvılar yöntemin uygulamasından önceki gün hazırlanmalıdır.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

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± 0.2	

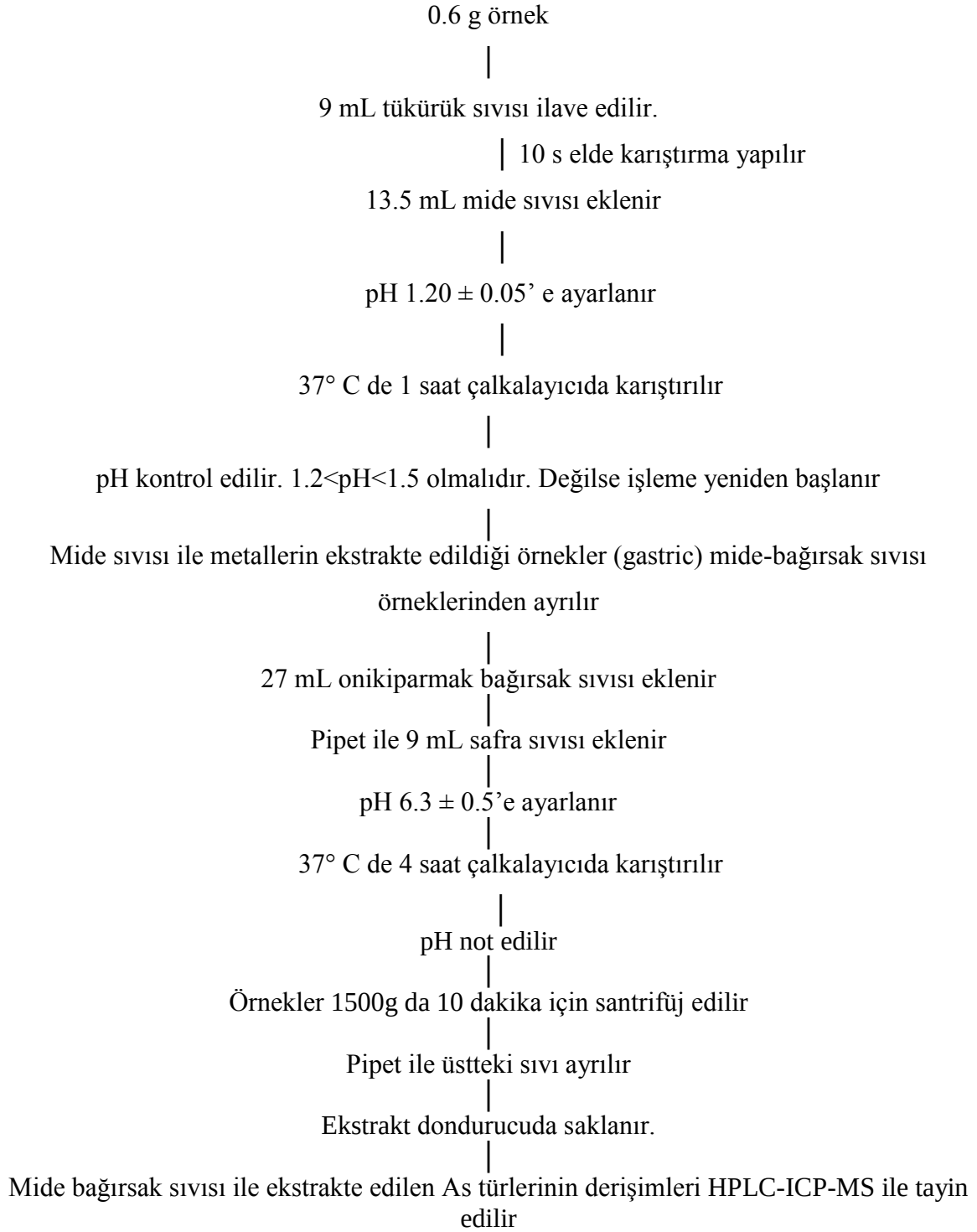
BARGE metodu için şema aşağıda verilmiştir.

(a) Örneklerden mide sıvısı ile As türlerinin ekstraksiyonu işlemi:



Şema 1

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



Şema 2

Her bir gıda örneği çözünürleştirildikten sonra, toplam As türlerinin derişimleri HPLC-ICP-MS tayin edildi. BARGE metodu uygulandıktan sonra mide ve mide-bağırsak ekstraktlarının farklı As türlerinin derişimleri (biyoerişilebilir metal derişimi) de HPLC-ICP-MS kullanılarak belirlendi. Her bir As türü için için hem mide, hem de mide-bağırsak çözeltilerinden ekstrakte edilen metal yüzdeleri (% biyoerişilebilirlik oranı) aşağıdaki şekilde hesap edildi.

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

Biyoerişilebilir As türünün derişiminin hesabında hem mide hem de mide-bağırsak sıvısından ekstrakte edilen As(III), As(V), DMA ve MMA derişimleri dikkate alınmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Arsenik Türleri Kararlılık Testleri

Gerçek örneklerdeki herbir As türünün BARGE metodu uygulandıktan sonra farklı bir forma dönüşüp dönüşmediğini belirlemek için As türleri kararlılık testi yapıldı. Herbir As türünden önce tek tek (As(III), As(V), DMA, MMA, AsB ve AsC), ve sonra dört As türü birarada olmak üzere (As(III), As(V), DMA ve MMA) BARGE model çözeltilerine ekleme yapıldı. Eklenen herbir As türünün derişimi $50 \mu\text{g L}^{-1}$ idi. Analizler HPLC-ICP-MS ile yapıldı. Hem tek tek As türlerini içeren deney sonucunda hem de dört As türü birarada iken elde edilen deney sonucunda As türlerinin BARGE işlemi uygulanması sonrasında başka herhangi bir forma dönüşmediği gözlemlendi. Herbir As türü için hem mide hem de mide-bağırsak ekstraktları için elde edilen geri kazanma değerleri 90%-114% arasında değişti. Deney sonuçları Tablo 2’de görülmektedir.

Table 2 BARGE As türleri kararlılık testi sonuçları (n=3)

As türleri	BARGE fazı	Geri Kazanma (Ölçülen/Tahmini değer) x 100		
		Ortalama	SD	%RSD
Standartlar				
As(III)	Mide sıvısı	104	3.8	4
As(III)	Mide-bağırsak sıvısı	108	2.6	2
As(V)	Mide sıvısı	108	3.5	3
As(V)	Mide-bağırsak sıvısı	106	8.8	8
DMA	Mide sıvısı	99	2.9	3
DMA	Mide-bağırsak sıvısı	106	3.5	3
MMA	Mide sıvısı	103	2.1	2
MMA	Mide-bağırsak sıvısı	107	2.4	2
AsB	Mide sıvısı	103	12	12
AsB	Mide-bağırsak sıvısı	114	4.7	4
AsC	Mide sıvısı	103	2.8	3
AsC	Mide-bağırsak sıvısı	103	2.8	3
Karışık standartlar				
As(III)	Mide sıvısı	106	4.0	4
As(III)	Mide-bağırsak sıvısı	90	4.6	5
As(V)	Mide sıvısı	93	5.4	6
As(V)	Mide-bağırsak sıvısı	99	7.1	7
DMA	Mide sıvısı	103	3.2	3
DMA	Mide-bağırsak sıvısı	90	3.6	4
MMA	Mide sıvısı	103	5.0	5
MMA	Mide-bağırsak sıvısı	97	4.6	5

5.2. Pirinç ve Pırasa Örnek Analizi

Pirinç (TUR1) ve pırasa örneklerinde bulunan As türlerinin derişimlerini belirlemek için bu örneklerle BARGE yöntemi uygulandı. BARGE ekstraktlarında bulunan her bir As türünün ölçülen miktarı, önceden bu örneklerde tayin edilen her bir As türünün toplam miktarı ile karşılaştırıldı. Her bir As türü için % BF hesaplandı. Sonuçlar Tablo 3’de görölmektedir. Pirinç örneği için BF %25-%61 arasında değışti. Mide ve mide-bağırsak sıvısı ekstraktları için As türleri biyoerişilebilirlik sırası, pirinç örneği için DMA.>As(III)>As(V) ve pırasa örneği için As(III)>DMA>As(V) şeklindedir. Pırasa örneklerinde As(V) için biyoerişilebilirlik faktörü değeri yüksek bulundu. Diğer pirinç örneği (TUR5) ve sertifikalı referans materyal (NIES Rice flour CRM) için BARGE metodu uygulandı. Fakat bu örneklerdeki As türlerinin derişimi çok düşük olduğu için (< 0.5 mg/kg) çalışma şartlarında

HPLC-ICP-MS ile As türlerinin tayini yapılamadı. Pirinç ve pırasa örneğinde AsB ve AsC bulunamadı. Gıda örneklerinin analiz sonuçları Tablo 3’de görülmektedir.

Table 3 Gıda örneklerinin analiz sonuçları

Gıda	As türleri	BARGE fazı	BF /%		
			Ortalama	SD	%RSD
Pirinç TUR1	As(III)	Mide sıvısı	46	6.1	13
	As(III)	Mide-bağırsak sıvısı	61	6.6	11
	As(V)	Mide sıvısı	27	1.9	7
	As(V)	Mide-bağırsak sıvısı	25	1.3	5
	DMA	Mide sıvısı	58	3.1	5
	DMA	Mide-bağırsak sıvısı	56	7.8	14
	MMA	Mide sıvısı	-		
	MMA	Mide-bağırsak sıvısı	-		
Pırasa (Lifton)	As(III)	Mide sıvısı	31	0.6	2
	As(III)	Mide-bağırsak sıvısı	28	2.1	8
	As(V)	Mide sıvısı	204	6.1	3
	As(V)	Mide-bağırsak sıvısı	205	7.5	4
	DMA	Mide sıvısı	-		
	DMA	Mide-bağırsak sıvısı	-		
	MMA	Mide sıvısı	-		
	MMA	Mide-bağırsak sıvısı	-		

5.3. Lup Hacminin Etkisi

20 µl ve 200 µl lik lup hacimleri kör olarak kullanılan 0.1 M HNO₃ için çalışıldı. 20 µl loop hacmi ile çalışıldığında kromatogramda herhangi bir pik gözlenmedi. 200 µl lup hacmi çalışıldığında kromatogramda As(V) tutunma zamanı öncesinde bir pik gözlemlendi.

5.4. BGS Guidance Material 102 Sertifikalı Referans Madde Analizi

Ekstrakte edilebilir As(V) için biyoerişilebilirlik metodunun doğruluğu BGS guidance materyali kullanılarak test edildi. Sadece As(V), mide sıvısı ve mide-bağırsak sıvısı ekstraktlarında HPLC-ICP-MS metodu ile tayin edildi. Sonuçların karşılaştırılması açısından biyoerişilebilir As miktarı ve ilaveten de Pb derişimi ICP-MS ile de tayin edildi. As için iki ölçüm sonucunda elde edilen sonuçlar belirsizlik sınırları içinde birbirleri ile uyumlu olarak bulundu. BGS Guidance Material 102’nin analizi sonucu HPLC-ICP-MS ile mide sıvısında (3.65 ± 0.09 mg kg⁻¹) ve mide-bağırsak sıvısında bulunan (3.75 ± 0.06 mg kg⁻¹) As(V)

derişimleri Hamilton ve ark., (25) tarafından bulunan As(V) derişimleri ile uyumlu idi. Bu derişimler mide sıvısı için $3.9 \pm 0.36 \text{ mg kg}^{-1}$ ve mide-bağırsak sıvısı için $3.3 \pm 0.41 \text{ mg kg}^{-1}$. Ayrıca BGS 102’de BARGE metodu uygulandıktan sonra ICP-MS ile mide sıvısı ekstraktında $10.6 \pm 0.8 \text{ mg kg}^{-1}$ Pb derişimi bulundu. Pb için sertikalı değer $13 \pm 6 \text{ mg kg}^{-1}$ dir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4’de verilmiştir.

Table 4. BGS102 sertifikalı referans madde analizi sonuçları

BGS102	BARGE fazı	BGS 102’den ekstrakte edilen As kütle fraksiyonu,mg/kg	SD	RSD%	BF / %	SD	RSD%
HPLC-ICP-MS							
As(V)	Mide sıvısı	3.65	0.09	2.5	68	1.7	2.5
As(V)	Mide-bağırsak sıvısı	3.75	0.06	1.7	70	1.2	1.7
ICP-MS							
As	Mide sıvısı	3.85	0.29	7.6	71	5	7.6
As	Mide-bağırsak sıvısı	3.65	0.20	5.4	68	4	5.4
Sertifikalı değer	Mide sıvısı						
As(V)	Mide-bağırsak sıvısı	5.4	2.4	44			
Hamilton et al. (2015)	Mide sıvısı	3.9	0.36	9.2			
	Mide-bağırsak sıvısı	3.3	0.41	12.4			

Projemiz amacına ulaşmıştır. Projeden elde edilen sonuçlar SCI’da taranan ve etki faktörü yüksek dergilerden birinde yayınlanmak üzere yazım aşamasındadır.

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] Ş. Tokalıoğlu, R. Clough, M. Foulkes, P. Worsfold, Bioaccessibility of Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se and Zn from nutritional supplements by the unified BARGE method, *Food Chemistry* 150 (2014) 321-327.
- [6] T. Narukawa, T. Suzuki, K. Inagaki, A. Hioki, Extraction techniques for arsenic species in rice flour and their speciation by HPLC-ICP-MS, *Talanta* 130 (2014) 213-220.
- [7] A.V. Zmozinski, T. L-Mirandes, J. F. L-Sanches, M. M. Da Silva, Establishment of a method for determination of arsenic species in seafood by LC-ICP-MS, *Food Chemistry* 173 (2015) 1073-1082.
- [8] X. Cao, C. Hao, G. Wang, H. Yang, D. Chen, X. Wang, Sequential extraction combined with HPLC-ICP-MS for As speciation in dry seafood products, *Food Chemistry* 113 (2009) 720-726.

- [9] G. Raber, N. Stock, P. Hanel, M. Murko, J. Navratilova, K. A. Francesconi, An improved HPLC–ICPMS method for determining inorganic arsenic in food: Application to rice, wheat and tuna fish, *Food Chemistry* 134 (2012) 524–532.
- [10] C. G. Sartal, M. del C. B.-Alonso, P. B.-Barrera, Effect of the cooking procedure on the arsenic speciation in the bioavailable (dialyzable) fraction from seaweed,, *Microchemical Journal* 105 (2012) 65–71.
- [11] J.M. R.Castor, J.L. G.-Mar, A. H.-Ramírez, M.T. G.-González, L. H.-Reyes, Arsenic accumulation in maize crop (*Zea mays*): A review, *Science of the Total Environment* 488–489 (2014) 176–187.
- [12] I.B. Rodriguez, G. Raber, W. Goessler, Arsenic speciation in fish sauce samples determined by HPLC coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *Food Chemistry* 112 (2009) 1084–1087.
- [13] S.-W. Lia, J. Lia, H.-B. Lia, R. Naidub, L.Q. Maac, Arsenic bioaccessibility in contaminated soils: Coupling in vitro assays with sequential and HNO₃ extraction, *Journal of Hazardous Materials* 295 (2015) 145–152.
- [14] A. M.-Piñeiroa, J. M. Piñeirob, P. H.-Hermeloa, P. B.-Barreraa, S. M.-Lorenzob, P. L.-Mahiab, D. P.-Rodriguezb, Application of fast ultrasound water-bath assisted enzymatic hydrolysis – High performance liquid chromatography–inductively coupled plasma-mass spectrometry procedures for arsenic speciation in seafood materials, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 6970– 6980.
- [15] M. Burguera, J. L. Burguera, Analytical methodology for speciation of arsenic in environmental and biological samples, *Talanta* 44 (1997) 1581- 1604.
- [16] M. P.-Martinez, P. Viñas, A. Fisher, S.J. Hill, Comparison of enzymatic extraction procedures for use with directly coupled high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of arsenic in baby foods, *Analytica Chimica Acta* 441 (2001) 29–36.

- [17] D. Zhao, H.-B. Li, J.-Y. Xu, J. Luo, L. Q. Ma, Arsenic extraction and speciation in plants: Method comparison and development, *Science of the Total Environment* 523 (2015) 138–145.
- [18] H. Jiang, B. Hu, B. Chen, L. Xia, Hollow fiber liquid phase microextraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry for the speciation of arsenic (III) and arsenic (V) in fresh waters and human hair extracts, *Analytica Chimica Acta* 634 (2009) 15–21.
- [19] M. Welna, A. S.-Madeja, P. Pohl, Comparison of strategies for sample preparation prior to spectrometric measurements for determination and speciation of arsenic in rice, *Trends in Analytical Chemistry* 65 (2015) 122–136.
- [20] M. Rosende, L. M. Magalhães, M. A. Segundo, M. Miró, Assessing oral bioaccessibility of trace elements in soils under worst-case scenarios by automated in-line dynamic extraction as a front end to inductively coupled plasma atomic emission spectrometry *Analytica Chimica Acta* 842 (2014) 1–10.
- [21] I. Koch, J. Dee, K. House, J. Sui, J. Zhang, A. McKnight-Whitford, K. J. Reimer, Bioaccessibility and speciation of arsenic in country foods from contaminated sites in Canada, *Science of the Total Environment* 449 (2013) 1–8.
- [22] Nolan S. Horner, Diane Beauchemin, A simple method using on-line continuous leaching and ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation analysis of bio-accessible arsenic in rice, *Analytica Chimica Acta* 717 (2012) 1–6.
- [23] 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 *Science of the Total Environment* 409 (2011) 4016-4030.

[24] C. Karadaş, D. Kara, In vitro gastro-intestinal method for the assessment of heavy metal bioavailability in contaminated soils, *Environmental Science Pollution Research* 18 (2011) 620-628.

[25] E. M. Hamilton, T. S. Barlow, C. J.B. Gowing, M. J. Watts, Bioaccessibility performance data for fifty-seven elements in guidance material BGS 102, *Microchemical Journal* 123 (2015) 131–138.