

**ULTRA YÜKSEK PERFORMANSLI  
SIVI KROMATOGRAFİSİ YÖNTEMİ İLE GIDALARDA  
BULUNAN BAZI MİKOTOKSİNLERİN TAYİNİ**

**Zuhal Arzu ŞENER  
Yüksek Lisans Tezi  
Eskişehir, 2018**

**ULTRA YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ  
İLE GİDALARDA BULUNAN BAZI MİKOTOKSİNLERİN TAYİNİ**

**Zuhal Arzu ŞENER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**Analitik Kimya Anabilim Dalı**  
**Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Elif Mine ÖNCÜ KAYA**

**Eskişehir**  
**Anadolu Üniversitesi**  
**Fen Bilimleri Enstitüsü**  
**Ağustos, 2018**

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No:1710F545.**

## **JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI**

**Zuhal Arzu ŞENER’ in “Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi İle Gıdalarda Bulunan Bazı Mikotoksinlerin Tayini”** başlıklı tezi 13/08/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği” nin ilgili maddeleri uyarınca, **Kimya** Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

| <b><u>Jüri Üyeleri</u></b> | <b><u>Unvanı Adı Soyadı</u></b>            | <b><u>İmza</u></b> |
|----------------------------|--------------------------------------------|--------------------|
| Üye (Tez Danışmanı)        | : Dr. Öğr. Üyesi Elif Mine ÖNCÜ KAYA ..... |                    |
| Üye                        | : Doç. Dr. Duygu YENİCELİ UĞUR .....       |                    |
| Üye                        | : Doç. Dr. Tufan GÜRAY .....               |                    |

**Prof. Dr. Ersin YÜCEL**  
**Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü**

## ÖZET

### ULTRA YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ İLE GIDALARDA BULUNAN BAZI MİKOTOKSİNLERİN TAYİNİ

Zuhal Arzu ŞENER

Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2018

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Elif Mine ÖNCÜ KAYA

Bu çalışmada, önemli mikotoksinlerden olan Ochratoxin A (OTA), Zearalenon (ZEA), Sitrinin (CIT) ve Sitreoviridin (CTV)'nin gıdalarda tayini için hızlı ve hassas ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) yöntemleri geliştirilmiş ve validasyonları yapılmıştır. Gıda örneklerinden çeşitli tahıl ve türevleri seçilmiştir. OTA, CIT ve ZEA, bifenil (2,1 mm×150 mm×2,6 µm) kolonunda fosforik asit içeren asetonitril:su (45:55 h/h; pH:2,2) hareketli fazı kullanılarak floresans dedektör ile  $\lambda_{ex}$ :330 nm,  $\lambda_{em}$ :500 nm (OTA ve CIT) ve  $\lambda_{uy}$ :236 nm,  $\lambda_{yay}$ :440 nm (ZEA) değerlerinde aynı anda belirlenmiştir. OTA, CIT ve ZEA için geliştirilen UHPLC-FLD yönteminin gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) değerleri sırasıyla OTA için; 0,24 µg/kg ve 0,71 µg/kg, CIT için; 0,64 µg/kg ve 1,97 µg/kg, ZEA için; 1,28 µg/kg ve 3,90 µg/kg olarak bulunmuştur. CTV için C18 (2,1 mm×100 mm×1,8 µm) kolonu ile asetonitril:su:formik asit (55:45:0,1 h/h/h) hareketli fazı kullanılmış ve floresans dedektör ile  $\lambda_{ex}$ :220 nm,  $\lambda_{em}$ :340 nm dalga boyu değerlerinde tayin edilmiştir. Gıdalarda CTV için geliştirilen UHPLC-FLD yönteminin LOD ile LOQ değerleri sırasıyla, 0,41 ve 1,25 µg/kg olarak bulunmuştur. Sonuç olarak OTA, CIT, ZEA ve CTV mikotoksinlerinin gıdalarda tayinleri için başarılı bir şekilde hızlı, seçici ve hassas UHPLC-FLD yöntemleri geliştirilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** UHPLC, Mikotoksin, Yöntem geliştirme, Validasyon, Gıda.

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF SOME MYCOTOXINS IN FOODS BY ULTRA HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD

Zuhal Arzu ŞENER

Department of Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Sciences, August, 2018

Supervisor: Dr. Elif Mine ÖNCÜ KAYA

In this study, fast and sensitive ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) methods have been developed and validated for the determination of important mycotoxins including Ochratoxin A (OTA), Zearalenon (ZEA), Citrinin (CIT) and Citreoviridin (CTV). A variety of cereals and their derivatives were selected from the food samples. OTA, CIT and ZEA were detected simultaneously on a biphenyl (2.1 mm  $\times$  150 mm  $\times$  2.6  $\mu$ m) column using a mobile phase of acetonitrile: water (45:55 v/v; pH:2.2) containing phosphoric acid by fluorescence detector at values of  $\lambda_{ex}$ :330 nm,  $\lambda_{em}$ :500 nm (OTA and CIT) and  $\lambda_{ex}$ :236 nm,  $\lambda_{em}$ :440 nm (ZEA). Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values of the developed UHPLC-FLD method for OTA, CIT and ZEA were found as 0.24  $\mu$ g/kg and 0.71  $\mu$ g/kg for OTA, 0.64  $\mu$ g/kg and 1.97  $\mu$ g/kg for CIT, and 1.28  $\mu$ g/kg and 3.90  $\mu$ g/kg for ZEA, respectively. A mobile phase of acetonitrile: water: formic acid (55: 45: 0.1 v/v/v) with a C18 column (2.1 mm  $\times$  100 mm  $\times$  1.8  $\mu$ m) was used for CTV and determined at wavelengths of  $\lambda_{ex}$ : 220 nm,  $\lambda_{em}$ : 340 nm by fluorescence detector. The LOD and LOQ values of the UHPLC-FLD method developed for CTV in foods were found to be 0.41 and 1.25  $\mu$ g/kg, respectively. As a result, a fast, selective and sensitive UHPLC-FLD methods have been successfully developed for the determination of mycotoxins of OTA, CIT, ZEA and CTV in food.

**Keywords:** UHPLC, Mycotoxin, Method development, Validation, Food.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşarak bana rehber olup destek veren değerli danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Elif Mine ÖNCÜ KAYA'ya çok teşekkür ederim.

Tezimin değerlendirilmesinde jüri üyesi olarak yer alan Sayın Doç. Dr. Duygu YENİCELİ UĞUR ve Sayın Doç. Dr. Tufan GÜRAY'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımda kullandığım iç standart maddesini sentezleyen Sayın Doç. Dr. İlker AVAN'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini hiç esirgemeyen, tüm sevgileri ile her zaman yanımda olan çok sevgili Zeynep İdil TURGUT, Serçin CEVİZLİDERE, Semra KÖSE, Ender Köse, Çiçek KIR, Tolga GARİP, Betül KALKAN, Melike ÖZHAN ve Kardelen ECEVİT'e sonsuz teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca bana inanan, her zaman ve her koşulda yanımda olan, maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen Canım Annem Nazmiye ŞENER'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını destekleyen Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığına teşekkür ederim. Proje No: 1710F545.

Zuhal Arzu ŞENER

13.08.2018

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

Bu tezin bana ait özgün bir çalışma olduğunu, çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Zuhal Arzu ŞENER

## İÇİNDEKİLER

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| BAŞLIK SAYFASI.....                                             | i   |
| JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....                                      | ii  |
| ÖZET.....                                                       | iii |
| ABSTRACT.....                                                   | iv  |
| TEŞEKKÜR.....                                                   | v   |
| ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....                | vi  |
| İÇİNDEKİLER.....                                                | vii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....                                          | x   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                            | xii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....                             | xiv |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ.....                                           | 1   |
| 2. KURAMSAL TEMELLER VE GENEL BİLGİLER.....                     | 3   |
| 2.1. Mikotoksinler.....                                         | 3   |
| 2.1.1. Okratoksin A (OTA).....                                  | 6   |
| 2.1.2. Zearalenon (ZEA).....                                    | 8   |
| 2.1.3. Sitrinin (CIT).....                                      | 9   |
| 2.1.4. Sitreoviridin (CTV).....                                 | 10  |
| 2.2. Mikotoksin Tayinlerinde Kullanılan Analitik Yöntemler..... | 12  |
| 2.3. Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (UHPLC)..... | 13  |
| 2.4. UHPLC’de Kullanılan Kolonlar.....                          | 15  |
| 2.5. Örnek Hazırlama.....                                       | 18  |
| 2.5.1. Ekstraksiyon.....                                        | 18  |
| 2.5.2. Katı faz ekstraksiyonu (SPE).....                        | 18  |
| 2.5.3. İmmunoafinite kolonlar (IAC).....                        | 19  |
| 3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER.....                                   | 21  |
| 3.1. Kullanılan Gıda Örnekleri.....                             | 21  |
| 3.2. Kimyasallar.....                                           | 21  |
| 3.3. Araç Gereç ve Cihazlar.....                                | 21  |

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4. İstatistiksel Analizler.....                                             | 23 |
| 3.5. OTA, CIT ve ZEA Deneyleri.....                                           | 23 |
| 3.5.1. Standart çözeltilerin hazırlanması.....                                | 23 |
| 3.5.2. İç standart çözeltisinin hazırlanması.....                             | 23 |
| 3.5.3. Örnek hazırlama.....                                                   | 23 |
| 3.6. CTV Deneyleri.....                                                       | 24 |
| 3.6.1. CTV standardının hazırlanması.....                                     | 24 |
| 3.6.2. CTV için örnek hazırlama.....                                          | 25 |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....                                                  | 26 |
| 4.1. OTA, CIT ve ZEA Deneyleri.....                                           | 26 |
| 4.1.1. UHPLC-FLD yöntem optimizasyon çalışmaları.....                         | 26 |
| 4.1.2. Gıda örneklerinin analize hazırlanması .....                           | 28 |
| 4.1.3. UHPLC-FLD yöntem validasyon çalışmaları.....                           | 32 |
| 4.1.3.1. Doğrusallık ve duyarlılık.....                                       | 33 |
| 4.1.3.2. Kesinlik.....                                                        | 35 |
| 4.1.3.3. Doğruluk.....                                                        | 36 |
| 4.1.3.4. Kararlılık.....                                                      | 37 |
| 4.1.4. Geliştirilen UHPLC-FLD yönteminin gıda örneklerine<br>uygulanması..... | 38 |
| 4.2. CTV Deneyleri.....                                                       | 40 |
| 4.2.1. UHPLC-FLD yöntem optimizasyon çalışmaları.....                         | 40 |
| 4.2.2. CTV için UHPLC-FLD validasyon çalışmaları.....                         | 45 |
| 4.2.2.1. Doğrusallık ve duyarlılık.....                                       | 45 |
| 4.2.2.2. Kesinlik.....                                                        | 46 |
| 4.2.2.3. Doğruluk.....                                                        | 47 |
| 4.2.2.4. Kararlılık.....                                                      | 48 |
| 4.2.2.5. Sağlamlık.....                                                       | 48 |
| 4.2.3. Geliştirilen UHPLC-FLD yönteminin gıda örneklerine<br>uygulanması..... | 49 |

|                                  |           |
|----------------------------------|-----------|
| <b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b> | <b>51</b> |
| <b>KAYNAKÇA.....</b>             | <b>53</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                  |           |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                      |                                                                                                                   |    |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 2.1.</b>  | Bazı önemli mikotoksinlerin üretici mantar türleri, bulundukları gıdalar ve neden oldukları etkiler .....         | 4  |
| <b>Çizelge 2.2.</b>  | Komisyon Yönetmeliği'ne göre gıdalarda bulunması gereken maksimum OTA ve ZEA miktarları.....                      | 6  |
| <b>Çizelge 2.3.</b>  | Mikotoksin tayinlerinde kullanılan analitik yöntemler, avantajları ve dezavantajları .....                        | 12 |
| <b>Çizelge 2.4.</b>  | UHPLC ile HPLC arasındaki farklar.....                                                                            | 13 |
| <b>Çizelge 2.5.</b>  | UHPLC sistem özellikleri, avantajları ve kısıtlamaları.....                                                       | 14 |
| <b>Çizelge 2.6.</b>  | UHPLC cihazlarında sıklıkla kullanılan farklı markalara ait bazı kolonlar.....                                    | 17 |
| <b>Çizelge 4.1.</b>  | Gıdalarda OTA, CIT ve ZEA tayininde kullanılan UHPLC-FLD koşulları.....                                           | 27 |
| <b>Çizelge 4.2.</b>  | Farklı örnek hazırlama yöntemlerinin %Geri Kazanım değerleri.....                                                 | 29 |
| <b>Çizelge 4.3.</b>  | OTA, CIT ve ZEA'nın regresyon analiz sonuçları.....                                                               | 34 |
| <b>Çizelge 4.4.</b>  | OTA, CIT ve ZEA için kesinlik sonuçları.....                                                                      | 36 |
| <b>Çizelge 4.5.</b>  | OTA, CIT ve ZEA için doğruluk sonuçları (n=2, l=3).....                                                           | 37 |
| <b>Çizelge 4.6.</b>  | OTA, CIT ve ZEA'nın farklı saklama koşullarındaki kararlılıkları.....                                             | 38 |
| <b>Çizelge 4.7.</b>  | Gıda örneklerindeki OTA, CIT ve ZEA miktarları (µg/kg) (n=5).....                                                 | 39 |
| <b>Çizelge 4.8.</b>  | Gıdalarda CTV tayininde kullanılan optimum UHPLC-FLD koşulları....                                                | 41 |
| <b>Çizelge 4.9.</b>  | Optimum UHPLC-FLD koşullarında CTV'nin 2-200 ng/ml derişim aralığında elde edilen regresyon analiz sonuçları..... | 45 |
| <b>Çizelge 4.10.</b> | CTV için kesinlik sonuçları.....                                                                                  | 47 |
| <b>Çizelge 4.11.</b> | Farklı derişimlerdeki CTV'nin, %Geri Kazanım, SS ve %BSS sonuçları.....                                           | 47 |
| <b>Çizelge 4.12.</b> | CTV'nin farklı koşullardaki kararlılık sonuçları.....                                                             | 48 |

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 4.13.</b> Metil alkolde hazırlanmış 100 ng/ml CTV'nin           |    |
| sağlamlık sonuçları.....                                                   | 49 |
| <b>Çizelge 4.14.</b> Gıda örneklerindeki CTV miktarları (µg/kg) (n=5)..... | 50 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|            |                                                                                                                    |    |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. | Okratoksin A'nın molekül yapısı.....                                                                               | 7  |
| Şekil 2.2. | Zearalenon'un molekül yapısı.....                                                                                  | 8  |
| Şekil 2.3. | Sitrinin'in molekül yapısı.....                                                                                    | 10 |
| Şekil 2.4. | Sitreoviridin'in molekül yapısı.....                                                                               | 11 |
| Şekil 2.5. | Partikül çaplarının azaltılmasının Van Deemter grafiğindeki etkileri.....                                          | 16 |
| Şekil 2.6. | Değişen partikül çaplarına göre birim uzunluk başına verimlilik karşılaştırması.....                               | 17 |
| Şekil 2.7. | SPE yönteminin uygulanışının şematik gösterimi.....                                                                | 19 |
| Şekil 2.8. | IAC yönteminin uygulanışının şematik gösterimi .....                                                               | 20 |
| Şekil 3.1. | Deneylerde kullanılan UHPLC cihazı.....                                                                            | 22 |
| Şekil 3.2. | a) OTA-CIT-ZEA deneylerinde kullanılan UHPLC kolonu,<br>b) CTV deneylerinde kullanılan UHPLC kolonu.....           | 22 |
| Şekil 3.3. | Ekstraksiyon yönteminin şematik gösterimi.....                                                                     | 24 |
| Şekil 4.1. | Optimize edilen UHPLC-FLD koşullarında; 2487 ng/ml IS,<br>100 ng/ml CIT, 100 ng/ml ZEA, 100 ng/ml OTA.....         | 27 |
| Şekil 4.2. | Mısır gevreği.....                                                                                                 | 30 |
| Şekil 4.3. | Tahıllı kraker.....                                                                                                | 30 |
| Şekil 4.4. | Pirinç unu.....                                                                                                    | 31 |
| Şekil 4.5. | Patates unu.....                                                                                                   | 31 |
| Şekil 4.6. | Küflü mısır unu.....                                                                                               | 32 |
| Şekil 4.7. | 100 ng/ml derişimlerinde CIT, ZEA ve OTA standart eklenmiş patates unu örneği.....                                 | 32 |
| Şekil 4.8. | OTA, CIT ve ZEA'nın UHPLC-FLD yöntemi ile günler arası (n=18) sonuçlarına göre çizilen kalibrasyon grafikleri..... | 35 |

|                    |                                                                                                                                                                                                                           |    |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.9.</b>  | CTV için floresans uyarma ve yayılma spektrumu.....                                                                                                                                                                       | 40 |
| <b>Şekil 4.10.</b> | 100 ng/ml CTV standardının optimum UHPLC-FLD koşullarında<br>a) 220 nm’de UV dedektör ile b) $\lambda_{uy}$ :220 nm, $\lambda_{yay}$ :340 nm dalga<br>boyu değerlerinde FLD dedektör ile elde edilen kromatogramları..... | 43 |
| <b>Şekil 4.11.</b> | a) Öğütölmüş pirinç, b) öğütölmüş buğday, c) pirinç unu<br>örneklerinin optimum UHPL-FLD koşullarındaki kromatogramları.....                                                                                              | 44 |
| <b>Şekil 4.12.</b> | CTV’nin UHPLC-FLD yöntemi ile günler arası sonuçlara<br>göre çizilen kalibrasyon grafiğı (n=18).....                                                                                                                      | 46 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|       |                                                                                 |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------|
| HPLC  | : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi                                       |
| UHPLC | : Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi                                 |
| LC    | : Sıvı Kromatografisi                                                           |
| GC    | : Gaz Kromatografisi                                                            |
| MS    | : Kütle Spektrometresi                                                          |
| UV    | : Ultraviyole                                                                   |
| FLD   | : Floresans Dedektör                                                            |
| TLC   | : İnce Tabaka Kromatografisi                                                    |
| ELISA | : Enzim Bağlanmış İmunoabsorbant                                                |
| CE    | : Kapiler Elektroforez                                                          |
| OTA   | : Okratoksin A                                                                  |
| CIT   | : Sitrinin                                                                      |
| ZEA   | : Zearalenon                                                                    |
| CTV   | : Sitreoviridin                                                                 |
| IS    | : İç Standart                                                                   |
| AF    | : Aflatoksin                                                                    |
| FUMO  | : Fumonisin                                                                     |
| EC    | : Avrupa Komisyonu (European Commission)                                        |
| FAO   | : Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)                      |
| WHO   | : Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)                               |
| ICH   | : Uluslararası Uyumluluk Konferansı (International Conference Of Harmonization) |
| IAC   | : İmmunoafinite Kolon                                                           |
| SPE   | : Katı Faz Ekstraksiyonu                                                        |
| LOD   | : Gözlenebilme Sınırı                                                           |
| LOQ   | : Tayin Alt Sınırı                                                              |
| N     | : Teorik Tabaka Sayısı                                                          |
| dp    | : Partikül Çapı                                                                 |
| SS    | : Standart Sapma                                                                |
| %BSS  | : Yüzde Bağlı Standart Sapma                                                    |

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikotoksinler, çeşitli mantar (küf) türlerinin sekonder metabolizması sonucu oluşan ve canlı organizmalar için son derece zararlı olan doğal toksinlerdir. Mikotoksinler, en çok tahıllar ve tahıl ürünleri, kahve, peynir, süt, kuru meyveler, baharatlar, üzüm, şarap, kakao ve kuru yemişler vb. gibi gıdalarda bulunmaktadır. Özellikle de uygun olmayan depolama koşullarında, nem ve sıcaklığın olduğu ortamlarda mikotoksinler kolaylıkla çoğalmaktadırlar. Mikotoksin içeren yemleri tüketen hayvanlardan elde edilen et, süt ve yumurta gibi gıdaların tüketilmesi sonucunda toksinler insanlara geçebilmektedir. Gıdalarda ve yemlerde bulunabilen mikotoksinler, bulaştıkları organizmalarda kanserojenik, mutajenik, nefrotoksik, nörotoksik, teratojenik ve immünotoksik etkiler gösterebilirler (Bhat, Rai and Karim, 2010; Fink-Gremmels, 1999; Tunail, 2000; Öksüztepe ve Erkan, 2016). En yaygın bulunan ve tarımsal ekonomi ile insan ve hayvan sağlığı açısından en çok ilgilenilen mikotoksinler arasında aflatoksinler, trikotesenler, okratoksinler, fumonisinler, zearalenon, tremorgenik toksinler ve ergot alkaloidler yer almaktadır. Mikotoksinlerin ekonomik etkisi, insan ve hayvan yaşamının kaybını, artan sağlık bakımı ve veteriner bakım maliyetlerini, hayvancılık üretiminin azalmasını, kirlenmiş gıdaların ve yemlerin ortadan kaldırılmasını ve mikotoksin sorununun ciddiyetini azaltmak için araştırma ve uygulamalara yapılan yatırımları içermektedir. Her ne kadar mikotoksinleri kontrol etmek için gıda yönetmelikleri konularak uluslararası çabalar devam etse de, faydalı önlemler yeterince uygulanmamaktadır (Zain, 2011). Bu yüzden günümüzde, tüm dünyada hem ekonomik açıdan hem de sağlık açısından sorunlara neden olan mikotoksinlerin yüksek hassasiyetle, doğru, hızlı ve güvenilir analitik yöntemlerle belirlenmesi çok büyük önem taşımaktadır. Özellikle de söz konusu gıdalar olduğunda her zaman yeni ve güvenilir analitik yöntemlere gereksinim duyulmaktadır.

Mikotoksinler, ince tabaka kromatografisi (TLC), enzim bağlanmış immunoabsorbant (ELISA), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC), kapiler elektroforez (CE), sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS) ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) gibi analitik yöntemler ile tayin edilebilmektedir (Turner, Subrahmanyam and Piletsky, 2009; Ibáñez-Vea vd., 2011). Bu yöntemler arasından son yıllarda UHPLC yöntemi gelişmiş cihaz teknolojisi ile göze çarpmaktadır. UHPLC yöntemi kısa analiz süresi ve daha az çözücü gerektirmesi ile birlikte 2 µm altındaki küçük partikül içeren

yeni nesil kolonların kullanılması nedeniyle de hassasiyet ve ayırım gücü açısından gelişmiştir (Novakova, Matysova and Solich, 2006; Swartz, 2005).

Bu tez kapsamında mikotoksinlerden gıdalarda en sık rastlanan okratoksin A (OTA), sitrinin (CIT), zearalenon (ZEA) ve sitreoviridin (CTV) ile çalışılmıştır. Bu amaçla tez çalışmasında UHPLC ile floresans dedektör (FLD) kullanılarak bazı gıdalarda bu mikotoksinlerin hızlı, duyarlı ve seçici olarak tayinleri gerçekleştirilmiştir. OTA, CIT ve ZEA için yeni bir UHPLC-FLD yöntemi geliştirilerek aynı anda tayinleri yapılmıştır. CTV için ise farklı bir UHPLC-FLD yöntemi geliştirilerek gıdalara uygulanmıştır. Ayrıca belirtilen mikotoksinlerin tayinleri için geliştirilen bu yöntemlerin validasyonu yapılmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER VE GENEL BİLGİLER

### 2.1. Mikotoksinler

Mikotoksinler, çevre koşullarına bağlı olarak çeşitli mantar (küf) türleri tarafından üretilen toksik sekonder metabolitlerdir. Mikotoksin üreten başlıca mantar türleri arasında *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* ve *Alternaria* yer almaktadır. Mikotoksinler tarımsal ürünler, hayvan yemleri ve gıdalara bulaşabilirler. Mantar bulaşmasını kontrol etme çabalarına karşın, toksik mantarlar doğada her yerdedir ve ortamın nem, sıcaklık koşulları yeterli olduğunda hasat öncesi ve sonrası küf oluşumu nedeniyle çok çeşitli tarım ürünlerini kirletebilmektedirler. Mikotoksinler en çok tahıllar, mısır, kuruyemiş, kurutulmuş meyveler gibi gıdalarda doğal olarak oluşabilirler. Ayrıca bu tür gıda ve meyvelerden üretilen tahıl bazlı gıdalar, şarap ve bira gibi yiyecek ve içeceklerde de bulunabilirler (Rahmani, Jinap and Soleimany, 2009; Lawrence and Scott, 1999; Tunail, 2000; Zain, 2011).

Mikotoksinler molekül ağırlıkları düşük, heterosiklik yapıda ve çoğunlukla küçük moleküllerdir. Günümüzde 400'den fazla sayıda mikotoksin türü belirlenmiştir. Bunlar içinde yer alan insan ve hayvan sağlığı açısından en büyük riski oluşturan en önemli mikotoksin türleri arasında aflatoksinler (AF), trikotesenler, fumonisin (FUMO), zearalenon (ZEA), okratoksin A (OTA) ve ergot alkaloidler gösterilebilir (Zain, 2011; Vardon, McLaughlin and Nardinelli, 2003).

Mikotoksinlere maruz kalmak insanlarda ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara ve mikotoksikoza yol açabilir. Mikotoksikoz, insanların mikotoksin içeren gıdaları tüketmesi sonucu ortaya çıkan zehirlenme durumu olarak tanımlanabilir. Mikotoksikoz öncelikli olarak sindirim sistemi ile mikotoksinlerin bağırsakta emilerek kana geçmesi ve oradan da etki ettiği doku ve organa yayılması ile görülebilir. Ayrıca temas ve solunum yolu ile de mikotoksinlere maruz kalınabilir. Farklı toksisitelerde, farklı doku ve organlara etki gösteren mikotoksinler, insanlarda akut ve kronik çeşitli hastalıklara sebep olabilirler. Hedeflediği organ veya doku; sinir sistemi ve beyin olan toksinler “nörotoksik”, böbreklere etki edenler “nefrotoksik”, karaciğerde etkisini gösterenler “hepatotoksik” ve bağışıklık sistemi üzerinde etkili olan toksinler ise “immunotoksik” olarak tanımlanabilmektedir. Ayrıca bazı mikotoksinlerin bu etkilerinin yanı sıra teratojenik, mutajenik, kanserojenik ve östrojenik gibi pek çok etkileri de bulunmaktadır. Bazı

mikotoksinlerin neden olduğu etkiler Çizelge 2.1’de gösterilmektedir (Bennett and Klich, 2003).

**Çizelge 2.1.** Bazı önemli mikotoksinlerin üretici mantar türleri, bulundukları gıdalar ve neden oldukları etkiler (Vardon, Mc Laughlin and Nardinelli, 2003)

| <b>Mikotoksin</b>                                                                                                       | <b>Üretici mantar türleri</b>            | <b>Bulunduğu gıda ürünleri</b>                                                                                              | <b>Oluşturduğu etki</b>                                                                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aflatoksinler<br>(B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> , M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub> ) | <i>Aspergillus</i>                       | Fıstık, mısır, buğday, pirinç, pamuk tohumu, kurutulmuş hindistan cevizi, çeşitli gıdalar, süt, yumurta, peynir, incir, yem | Hepatoksisite,<br>Safra kanalı hiperplazisi,<br>Kanama (bağırsak yolu, böbrek),<br>Karsinogenez (karaciğer tümörü).                                           |
| Sitritin                                                                                                                | <i>Aspergillus</i><br><i>Penicillium</i> | Tahıllar (buğday, arpa, mısır, pirinç), fasulye                                                                             | Nefrotoksisite,<br>Domuz nefropatisi,<br>Nörotoksisite.                                                                                                       |
| Siklopiazonik asit                                                                                                      | <i>Penicillium</i>                       | Mısır, fıstık, peynir, darı                                                                                                 | Kas nekrozu,<br>Bağırsak kanaması ve ödem,<br>Oral yaralar.                                                                                                   |
| Okratoksin A                                                                                                            | <i>Aspergillus</i><br><i>Penicillium</i> | Tahıllar (Buğday, arpa, mısır, yulaf)                                                                                       | Nefrotoksisite,<br>Domuz nefropatisi,<br>Hafif karaciğer hasarı,<br>Bağırsak iltihabı,<br>Teratogenez,<br>Karsinogenez (böbrek tümörü),<br>İdrar yolu tümörü. |
| Patulin                                                                                                                 | <i>Aspergillus</i><br><i>Penicillium</i> | Küflü gıdalar, çürümüş elma, elma suyu, buğday samanı                                                                       | Ödem (beyin, akciğer),<br>Kanama (akciğer),<br>Kılcal hasarı (karaciğer, dalak böbrek),<br>Motor sinir felci,<br>Kasılma,<br>Karsinogenez,<br>Antibiyotik.    |

**Çizelge 2.1.(Devam)** Bazı önemli mikotoksinlerin üretici mantar türleri, bulundukları gıdalar ve neden oldukları etkiler (Vardon, Mc Laughlin and Nardinelli, 2003)

|                                                                                                                                       |                    |                                                                     |                                                                                                                                                                               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Penilisilik asit                                                                                                                      | <i>Penicillium</i> | Depolanmış mısır, tahıllar, kurutulmuş fasulye, küflü tütün         | Karaciğer hasarı (karaciğer yağlanması, hücre ölümü), Böbrek hasarı, Kalp problemleri, Kan damarı genişlemesi, Antidiüretik, Tavşan cildinde ödem, Karsinogenez, Antibiotik.  |
| Penitrem                                                                                                                              | <i>Penicillium</i> | Küflü krem peyniri, ceviz, hamburger ekmeği, bira                   | Titreme, Ölüm, Koordinasyon bozukluğu, Kanlı ishal.                                                                                                                           |
| Sterigmatosistin                                                                                                                      | <i>Aspergillus</i> | Yeşil kahve, küflü buğday, tohumlar, sert peynirler, bezelye, pamuk | Karsinogenez, Hepatotoksin.                                                                                                                                                   |
| Trikotesenler (T-2 toksin, diasetoksiskirfenol, neosolaniol, nivalenol, diasetilnivalenol, deoksinivalenol, HT-2 toksin, fusarenon X) | <i>Fusarium</i>    | Mısır, buğday, ticari büyükbaş yemi, karışık yemler, arpa, yulaf    | Sindirim bozuklukları (ödem, ishal, yeme reddi), Kanama (mide, kalp, bağırsak, akciğer, dalak, böbrek), Ödem, Oral yaralar, Cilt iltihabı, Kan bozuklukları (akyuvar azlığı). |
| Zearalenone                                                                                                                           | <i>Fusarium</i>    | Mısır, küflü saman, pellet ticari yem                               | Östrojenik etki (vulva ödemi, vajina sarkması, rahim genişlemesi), Testis atrofisi, Ovaryum atrofisi, meme bezi büyümesi, düşük.                                              |
| Sitreoviridin                                                                                                                         | <i>Penicillium</i> | Pirinç, mısır, buğday, soya                                         | Nörotoksisite, Kardiyovasküler bozukluklar, Hipertansiyon, Felç.                                                                                                              |

Mikotoksinlerden kaynaklanan hastalık ve zehirlenmelerin önüne geçebilmek amacıyla Avrupa Komisyonu (European Commission, EC), Gıda ve Tarım Örgütü (Food

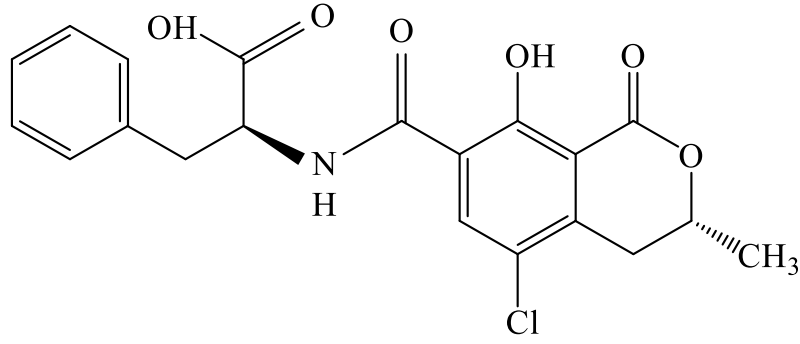
and Agriculture Organization, FAO), Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) gibi bazı sağlık örgütleri gıda ürünlerinde bulunabilecek maksimum mikotoksin miktarlarını belirlemiştir. Komisyon yönetmeliği tarafından belirtilen gıdalarda bulunması gereken maksimum OTA ve ZEA miktarları Çizelge 2.2’de gösterilmektedir (EC, 2006; FAO/WHO, 2001).

**Çizelge 2.2.** Komisyon Yönetmeliği’ne göre gıdalarda bulunması gereken maksimum OTA ve ZEA miktarları (EC, 2006, FAO, 2001)

| Gıda ürünleri                                                      | Maksimum miktar (µg/kg) |
|--------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| <b>1. OTA</b>                                                      |                         |
| İşlenmemiş tahıllar                                                | 5,0                     |
| İnsan tüketimine yönelik tahıllar, tahıllardan elde edilen ürünler | 3,0                     |
| İşlenmiş tahıl bazlı bebek mamaları                                | 0,50                    |
| <b>2. ZEA</b>                                                      |                         |
| Mısır (darı) hariç işlenmemiş tahıllar                             | 100                     |
| İşlenmemiş mısır (darı)                                            | 350                     |
| İnsan tüketimine yönelik tahıllar ve tahıl ürünleri                | 75                      |
| İşlenmiş tahıl bazlı bebek mamaları                                | 20                      |

#### 2.1.1. Okratoksin A (OTA)

OTA (Şekil 2.1), *Penicillium* ve *Aspergillus* cinsleri tarafından üretilen oldukça önemli bir mikotoksin türüdür. OTA insanlar üzerinde nefrotoksik, hepatotoksik, embriyotoksik, teratojenik, nörotoksik, immunotoksik, genotoksik ve kanserojenik etkiler gösterebilir ve yüksek toksisiteye sahiptir. OTA’nın yemlere bulaşması nedeni ile aynı etkiler hayvanlarda da gözlenebilmektedir. Çoğunlukla mısır, arpa ve buğday gibi tahıllarda bulunmakla birlikte daha az olarak kahve, kakao çekirdekleri, kuruyemiş ve kurutulmuş meyveler gibi gıdalarda da bulunabilmektedir (James and Zikankuba, 2018; Luo, Liu, and Li, 2018).



**Şekil 2.1.** Okratoksin A'nın molekül yapısı

OTA tayini için kullanılan ELISA, TLC, LC-MS, GC-MS, CE ve HPLC/UHPLC gibi çeşitli analitik yöntemler bulunmaktadır (Pereira, Fernandes and Cunha, 2014). Bu yöntemler arasında en yaygın olarak kullanılan sıvı kromatografisi temeline dayanan HPLC/UHPLC cihazları ile florimetrik dedektörlerin birlikte kullanılmasıdır (Selvaraj vd., 2015). Bu yöntemler ile analizler yapılmadan önce örnekler organik çözücülerle ekstraksiyon ve temizleme-saflaştırma işlemleri uygulanmalıdır. Yaygın olarak kullanılan örnek temizleme-saflaştırma yöntemleri katı faz ekstraksiyonu (SPE) ve immunoafinite kolonlar (IAC)'dır.

Avrupa Birliği Bilimsel Komitesi, günlük olarak alınacak okratoksin A miktarının vücut ağırlığının 5 ng/kg seviyesinin altına düşürülmesini tavsiye etmiştir (Bennett and Klich, 2003).

Martins vd. (2018) tarafından çoklu mikotoksinler ile yapılan çalışmada Portekiz'deki marketlerde bulunan kahvaltılık tahıl ürünleri incelenmiştir. OTA için HPLC-FLD yöntemi kullanılmıştır. Örnekler cihazla analizleri yapılmadan önce ekstraksiyon işlemi yapılmış ve daha sonra örnekler IAC kolon kullanılarak saflaştırılmıştır. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) değerleri sırasıyla 0,006 ve 0,019 µg/kg olarak bulunmuştur.

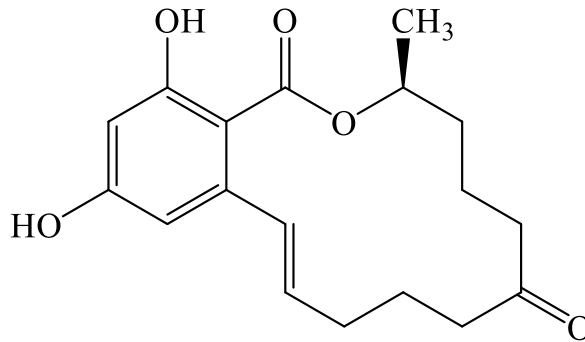
Ibanez-Vea vd. (2011) UHPLC-FLD yöntemi ile arpada OTA tayini gerçekleştirmiştir. Ekstraksiyon ve immunoafinite kolon ile işlem görmüş arpa örneklerinin analizi sonucunda LOD değeri 13 ng/kg ve LOQ değeri 150 ng/kg olarak bulunmuştur.

Kong vd., (2014) tarafından yapılan çalışmada HPLC-FLD yöntemi ile mantar üremesine elverişli gıdalarda OTA miktarları belirlenmiştir. Bu çalışmada LOQ değeri 5 µg/kg olarak bulunmuştur.

Rahmani, Jinap and Soleimany (2010) tahıllarda HPLC-FLD yöntemi ile aflatoksin, OTA ve ZEA miktarlarını belirlemişlerdir. Analizlerden önce ekstraksiyon ve örnek temizleme için IAC kolonu kullanılmıştır. OTA için elde edilen LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,05 ve 0,2 ng/g'dir.

### 2.1.2. Zearalenon (ZEA)

ZEA, *Fusarium graminearum* ve diğer *Fusarium* mantar türleri tarafından üretilen östrojenik aktiviteye sahip biyolojik olarak aktif bir mikotoksindir (Şekil 2.2). Östrojenik etkisinin yanı sıra kanserojenik etkisi de bulunmaktadır. Bu mikotoksin, özellikle pirinç, mısır ve diğer tahıllar olmak üzere çeşitli tarımsal ürünlere bulaşabilmektedir (Lawrence and Scott, 1999). ZEA üreten mantarlar, çoğunlukla ıslak, ılıman havada ve yüksek nemli depolama ortamlarında ortaya çıkmaktadır (Luo, Liu, and Li, 2018).



Şekil 2.2. Zearalenon'un molekül yapısı

Doğal olarak floresans özellik gösteren ZEA için en uygun ve en çok tercih edilen analitik yöntem floresans dedektör ile birleştirilmiş HPLC yöntemidir. ZEA için önerilen insanlardaki günlük güvenli alım miktarı 0,5 µg/kg (vücut ağırlığı) olarak belirtilmiştir (Bennett and Klich, 2003; EFSA, 2011).

Ibanez-Vea vd., (2011) UHPLC-FLD ile arpada ZEA tayini gerçekleştirmiştir. Ekstraksiyon sonrası immunoafinite kolon ile işlem görmüş arpa örneklerinin tayini sonucunda LOD değeri 340 ng/kg ve LOQ değeri 6000 ng/kg olarak bulunmuştur.

Ok vd., (2014) tarafından yapılan çalışmada erişte, tahıllı atıştırmalık ve bebek maması gibi gıdalarda HPLC-FLD ve UHPLC-FLD yöntemleriyle karşılaştırmalı olarak ZEA tayinleri yapılmıştır. Örnekler öncesinde ekstraksiyon ve immunoafinite kolon ile analize hazır hale getirilmiştir. Sonuç olarak HPLC analizlerinde LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 4,0 ve 8,1-10 µg/kg, UHPLC analizlerinde ise LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 2,5 ve 8,0-9,2 µg/kg olarak elde edilmiştir.

Boevre vd., (2012) tahıl türevi gıdalarda UHPLC-MS/MS yöntemi ile ZEA tayini yapmışlardır. Örnekler asetonitril, su ve asetik asit karışımı ile basit ekstraksiyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Bu çalışmada LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 6 ve 12 ng/g olarak bulunmuştur.

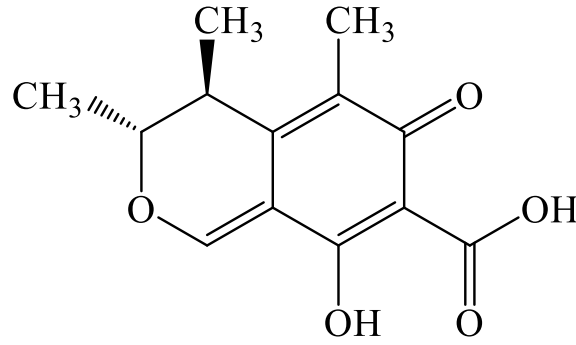
Rahmani vd., (2010)'nin yapmış olduğu çalışmada HPLC-FLD yöntemi ile tahıllarda aflatoksin, OTA ve ZEA tayinleri gerçekleştirilmiştir. Örnekler ekstraksiyon ve sonrasında IAC kolon kullanılarak hazırlanmıştır. ZEA için elde edilen LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,5 ve 2,0 ng/g olarak belirlenmiştir.

### 2.1.3. Sitrinin (CIT)

CIT (Şekil 2.3), ilk olarak *Penicillium citrinum*'dan sekonder metabolit olarak izole edilmiştir. CIT, aynı zamanda diğer *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri tarafından da üretilabilmektedir. CIT önceleri antibakteriyal özelliği sebebi ile antibiyotik olarak ilgi görmüş fakat daha sonra memeliler üzerindeki toksisitesi anlaşıncı mikotoksin olarak değerlendirilmiştir. Bu mikotoksin çok güçlü bir nefrotoksindir. Aynı zamanda immunotoksik, genotoksik ve nörotoksik etkileri de bulunmaktadır. Son bilgilere göre CIT, kanserojenik değildir ancak bu mikotoksinin OTA'nın kanserojenik etkisini arttırdığı gösterilmiştir. CIT başta mısır ve pirinç olmak üzere buğday, arpa, çavdar gibi tahıllar ve peynir, siyah zeytin, yer fıstığı ile fasulye, meyveler, meyve ve sebze suları, şifalı bitkiler, baharatlar gibi bitki kökenli ürünlerde de bulunabilmektedir (Ostry, Malir and Ruprich, 2013; EFSA, 2012; Tunail, 2000).

CIT için farklı hassasiyet ve doğruluğa sahip TLC, ELISA, HPLC (UV ve FLD dedektörleri ile), LC-MS ve GC-MS gibi çeşitli analitik yöntemler kullanılmaktadır (Xu vd., 2006).

Vazquez vd., (1996) HPLC-FLD yöntemini kullanarak peynir örneklerinde CIT tayini yapmışlardır. Örnek hazırlamada basit ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. LOD değeri  $1 \times 10^{-4}$  M olarak bulunmuştur.



Şekil 2.3. Sitrinin'in molekül yapısı

Wang vd., (2016) tarafından yapılan çalışmada UHPLC-MS/MS yöntemi ile OTA, patulin (PAT) ve CIT'in meyvelerde tayini yapılmıştır. Örnekler ekstraksiyon ve SPE yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. CIT için LOQ değeri 1-2 ng/ml olarak bulunmuştur.

Bertuzzi, Rastelli and Pietri, (2015) tarafından yapılan çalışmada İtalya'da üretilmiş kestane ve türevi gıdalarda *Aspergillus* ve *Penicillium* tarafından üreyen mikotoksinlerden bazılarının analizi yapılmıştır. LC-MS/MS yöntemi kullanılarak yapılan analizlerde LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,05 ve 0,15 µg/kg olarak bulunmuştur.

Molinie vd., (2005) Fransa marketlerinden alınan bazı kahvaltılık tahıllarda OTA, CIT ve fumonisin tayini yapmışlardır. Bunun için ekstraksiyonları gerçekleştirilen örnekler HPLC-FLD yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Bu çalışmada LOD değeri, 0,5 µg/kg ve LOQ değeri, 1,5 µg/kg olarak hesaplanmıştır.

#### 2.1.4. Sitreoviridin (CTV)

CTV (Şekil 2.4), *Penicillium citreoviride* tarafından üretilen nörotoksik bir mikotoksindir. Japonya'da ortaya çıkan sarı pirinç hastalığına neden olarak sitreoviridin gösterilmektedir. CTV'nin Beriberi ve Keshan gibi hastalıklar ile ilgili olduğu bilinmektedir. Beriberi, genellikle B1 vitamini eksikliğinden kaynaklanan ve kalp, sinirler, kaslar, sindirim sistemi gibi vücuttaki pek çok sistemi etkileyen bir hastalıktır. Çin ve Güneybatı Asya ülkelerine özgü olan Keshan hastalığı ise anormal büyük kalp, kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon, felç, kanser, egzama, katarakt, eklem ağrısı, sedef hastalığı, astım ve enfeksiyonlar gibi çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir (Carvajal-Moreno, 2015). Nörotoksik etki gösteren CTV merkezi sinir sistemi, adrenal korteks, karaciğer ve böbrekleri de etkilemektedir. CTV'ye en çok pirinç olmak üzere



## 2.2. Mikotoksin Tayinlerinde Kullanılan Analitik Yöntemler

Tarım ve gıda ürünlerinde doğal olarak meydana gelen kirlilikler sonucunda oluşan mikotoksinlerin insan ve hayvan sağlığı açısından ciddi riskleri vardır. Bu olumsuz sağlık etkileri akut veya kronik hastalıklar ve hatta bazı durumlarda ölüm bile olabilir. Bu nedenle de mikotoksinlerin belirlenmesinde hassas ve yüksek doğruluğa sahip olan analitik yöntemlere gerek duyulmaktadır (Shephard, 2011). Çizelge 2.3’de mikotoksin tayinlerinde kullanılan yöntemler ile bunların avantajları ve dezavantajları verilmiştir.

**Çizelge 2.3.** Mikotoksin tayinlerinde kullanılan analitik yöntemler, avantajları ve dezavantajları (Leslie, Bandyopadhyay and Visconti, 2005)

| Yöntem        | Avantajları                                                                                                              | Dezavantajları                                                                                                                                                                          |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TLC           | *Basit, ucuz, hızlı tarama<br>*Çoklu mikotoksinlerin eş zamanlı tayini<br>*Aflatoksinler ve OTA’ya duyarlı               | *Düşük duyarlılık (bazı mikotoksinler için)<br>*Düşük hassasiyet                                                                                                                        |
| GC            | *Çoklu mikotoksinlerin eş zamanlı tayini için yüksek duyarlılık<br>*MS dedektörü ile uyumluluk<br>*Otomatik örnekleyici  | *Pahalı ekipman<br>*Uzmanlık gerektirmesi<br>*Türevlendirme gerektirmesi<br>*Matriks girişim sorunları<br>*Doğrusal olmayan kalibrasyon grafiği<br>*Tekrarlanabilirliğinin iyi olmaması |
| HPLC/UHPLC    | *Yüksek hassasiyet<br>*Yüksek seçicilik<br>*Yüksek tekrarlanabilirlik<br>*Otomatik örnekleyici<br>*Kısa analiz süreleri  | *Pahalı ekipman<br>*Uzmanlık gerektirmesi<br>*Türevlendirme gerektirmesi                                                                                                                |
| LC/MS         | *Çoklu mikotoksinlerin eş zamanlı analizi<br>*Yüksek hassasiyet (LC-MS/MS)<br>*Herhangi bir türevlendirme gerektirmemesi | *Çok pahalı<br>*Uzmanlık gerektirmesi<br>*Hassasiyeti iyonizasyon tekniğine bağlı<br>*Nicel analiz için uygun olması                                                                    |
| Hızlı Testler | *Hızlı ve basit (5-10 dk.)<br>*Ucuz ekipman                                                                              | *Kalitatif ya da yarı kantitatif<br>*Matriks girişim problemleri                                                                                                                        |

Mikotoksin tayinlerinde bu yöntemler arasında en çok tercih edilen ve en yaygın kullanılan sıvı kromatografisi temeline dayalı olanlardır. Bu tez çalışmasında UHPLC yöntemi kullanıldığından bu yöntem ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

### 2.3. Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (UHPLC)

Son yıllarda gelişmiş cihaz ve kolon teknolojileri nedeniyle ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) cihazları, HPLC'nin yerini almaya başlamıştır. UHPLC cihazlarının çalışma prensibi klasik HPLC sistemleri ile aynıdır. UHPLC sistemleri, geleneksel HPLC sistemlerine kıyasla daha hızlı metot geliştirme, kısa analiz süresi ve iyi çözünürlükte ayırımlar sağlamaktadır. Bunun nedeni olarak bu yeni cihazların 2 µm'nin altında partikül çapına sahip yeni nesil kolon teknolojisi gösterilebilir. 2 µm'nin altına düşebilen kolon iç partikül çapı sayesinde sağladığı bu avantajların yanı sıra karmaşık örneklerin analizi için de çok uygun bir yöntemdir. Hatta yeni nesil bu kolonlarda kolon dolgu maddesinin partikül çapı 1,3 µm'ye kadar düşürülebilmektedir. Ayrıca, çoklu analizlerde çözücü sarfiyatı ve süre avantajlarının daha önemli bir boyut kazanarak cihazın yüksek maliyetinin getirdiği dezavantajı azalttığı söylenebilir. Çizelge 2.4'de UHPLC ile HPLC arasındaki farklılıklar verilmiştir. Çizelge 2.5'de UHPLC sisteminin özellikleri, avantajları ve kısıtlamaları verilmiştir. Küçük partiküllü kolonlar yüksek basınçlara neden olacağından UHPLC cihazlarının pompaları 1000-1200 bar basınca kadar çıkmaya elverişli olarak tasarlanmıştır. UHPLC sistemleri ile uyumlu olarak kimyasalların tayini için çoğunlukla ultraviyole (UV), dizi diyot (DAD), floresans (FLD), kütle spektrometrik (MS) ve elektrokimyasal dedektörler (ECD) kullanılabilmektedir (Nováková and Vlčková, 2009; Dong and Zhang, 2014).

**Çizelge 2.4.** UHPLC ile HPLC arasındaki farklar

| UHPLC                                      | HPLC                                     |
|--------------------------------------------|------------------------------------------|
| 2 µm'nin altında partikül çapında kolonlar | 3,0 µm ve 5 µm partikül çapında kolonlar |
| 1200 bara kadar basınca elverişli          | 400 bar basınç                           |
| Yüksek ayırım gücü                         | Düşük ayırım gücü                        |
| Kısa alıkonma süresi                       | Daha uzun alıkonma süresi                |
| Yüksek alet maliyeti                       | Daha düşük alet maliyeti                 |

**Çizelge 2.5. UHPLC sistem özellikleri, avantajları ve kısıtlamaları (Dong and Zhang, 2014)**

| <b>Sistem Özellikleri</b>                                        | <b>Açıklama</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Yüksek basınç limiti                                             | 2 µm'den küçük parçacıklı kolonlarda etkili kullanım basıncı; 9000-20.000 psi (600-1400 bar)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Düşük dağılım                                                    | 2-3 mm iç çaplı kolonlara uygunluk için aletin bant genişliklerinin 5-20 µL olması                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Düşük bekleme (dwell) hacmi                                      | Hızlı kolon dengelenmesi ve 100-500 µL için azaltılmış gradiyent gecikme süresi                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Diğerleri                                                        | Düzenleyici testler için yüksek hassasiyette kararlılık göstergesi metotlarda mükemmel sistem performansı (kesinlik, duyarlılık)                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Ek iyileştirmeler                                                | Sistemler, kolon/hareketli faz taraması için otomatik valfleme ile iyileştirilebilir. Birçoğu, otomatik metot geliştirme yazılımları ile uyumludur. Bazıları, daha uygun metot optimizasyonunu desteklemek için 4'lü (kuaterner) pompaya sahiptir                                                                                                                                                                 |
| <b>Avantajlar</b>                                                | <b>Açıklama</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Hızlı metot geliştirme                                           | Geleneksel HPLC'ye göre 3-10 kat verimlilik artışı. Metot optimizasyonu için kolon ve hareketli faz taramasının hızlı bir şekilde yapılması ve kısa kolonlar ile hızlı analiz                                                                                                                                                                                                                                     |
| Çok yüksek çözünürlüklü ayırmalar                                | Kompleks örneklerin analizi için 400-800 pik kapasitesi ( $P_c$ ) üreten küçük parçacıklar ile doldurulmuş uzun kolonların kullanımında 3 kata kadar ayırımın artışı                                                                                                                                                                                                                                              |
| Diğer yaklaşımlar ve dedeksiyon modları ile birleştirilebilirlik | UHPLC; Yüksek Sıcaklıklı Sıvı Kromatografisi, kabuk şeklindeki iç partiküllü (core-shell) kolonlar ya da 2 Boyutlu Sıvı Kromatografisi ile ayrı veya birleşik olarak uyumludur. UHPLC; UV, RI, MS gibi geleneksel HPLC dedeksiyon biçimlerine cevap verebilir. Yeni, önemli bant genişlemesi olmaksızın daha küçük pik hacimlerini analiz etmek için UHPLC uyumlu detektörler artan bir şekilde kullanılmaktadır. |
| Daha "yeşil teknoloji"                                           | Daha küçük iç çaplı ve kısa kolonların kullanımı ile daha hızlı analiz süresi ve düşük akış hızına bağlı olarak daha düşük örnek hacmi ve organik çözücü kullanımı                                                                                                                                                                                                                                                |

**Çizelge 2.5. (Devam) UHPLC sistem özellikleri, avantajları ve kısıtlamaları (Dong and Zhang, 2014).**

| <i>Kısıtlamalar</i>                                     | <i>Açıklama</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ekipman maliyeti ve var olan HPLC metotlarına uyumluluk | Göreceli olarak daha yüksek ekipman maliyeti (%20-50) ve öncesiyle uyumlu UHPLC sistemleri ile var olan HPLC metotlarını kullanmak problem oluşturabilir (Akış hızı aralığı, örneğin verildiği yerin boyutu ya da kolon fırınındaki kısıtlamalar)                                                                                   |
| Sabit fazda kısıtlı seçim                               | Hızlı bir şekilde gelişmesine rağmen UHPLC kolonlarının uygunluğu, ters-faz haricindeki iyon değişimi ve boyut eleme kromatografisi gibi tarzları için hala kısıtlayıcıdır.                                                                                                                                                         |
| Metot transferi                                         | UHPLC metotları, UHPLC ekipmanları olmadan geleneksel HPLC metot koşullarına çevrilebilmektedir. Farklı UHPLC sistem platformları arasındaki bekleme hacmi ve sistem dağılımı ile özellikle yüksek çözünürlüklü metotlarda viskoz ısıtmadaki farklılıklara bağlı olarak farklı laboratuvarlar arası metot transferi oldukça zordur. |

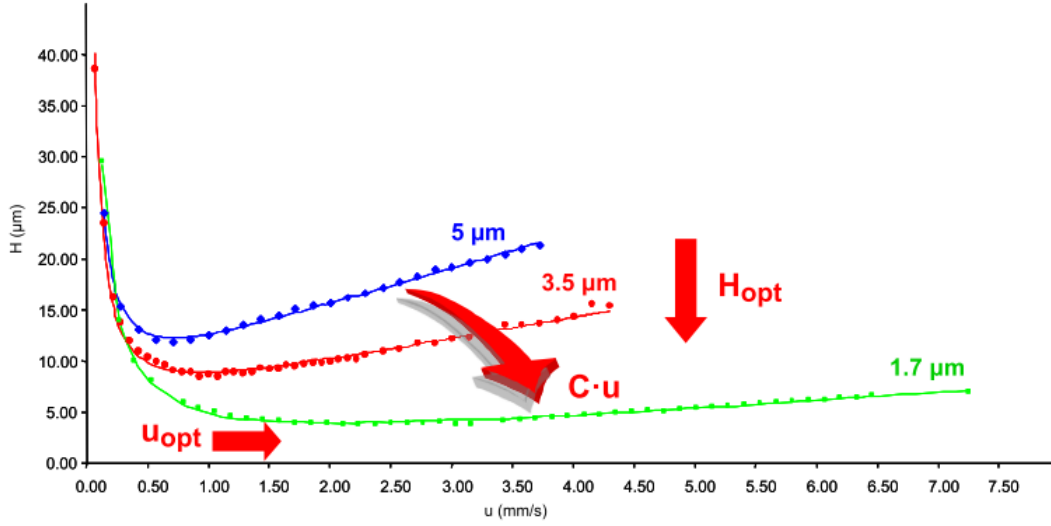
## 2.4. UHPLC’de Kullanılan Kolonlar

Ultra yüksek basınçlı sistemlerde küçük parçacıkların kullanımı, verim ve çözünürlükten ödün vermeden analizlerin hızlandırılması için en iyi çözümlerden biridir (Nováková and Vlčková, 2009). Kolon dolgu maddesi partikül çapının verimlilikle ilişkisi aşağıda gösterilen eşitlik ile açıklanabilir. Buradan hareketle teorik tabaka sayısı (N), partikül çapı ( $d_p$ ) ile ters orantılıdır. Kolon verimliliği de N ile doğru orantılı olduğundan dolayısıyla  $d_p$  küçüldükçe N artacak ve kolon verimliliği de bu doğrultuda artacaktır (Guillarme and Veuthey, 2017).

$$N = \frac{L}{h \cdot d_p}$$

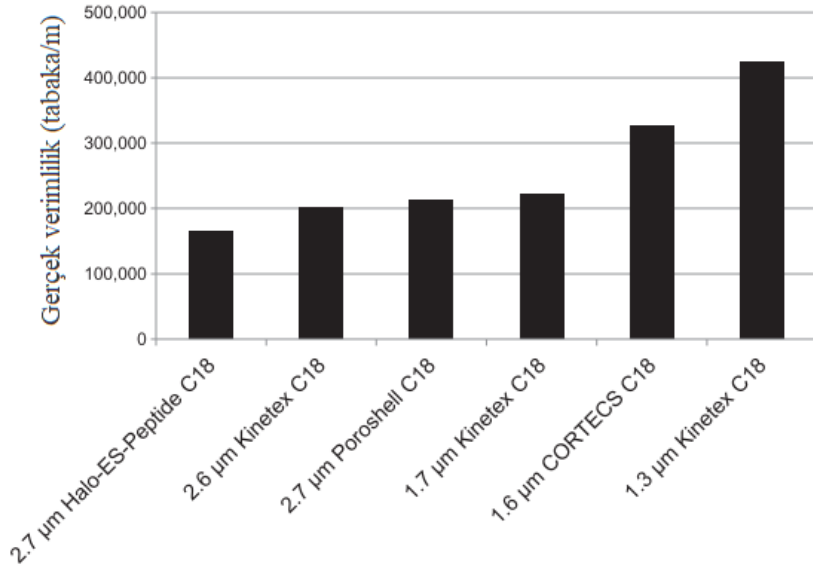
UHPLC için tasarlanan ilk ticari kolonlar 1,7  $\mu\text{m}$  partikül çapında, 2,1 x 50 mm ve 2,1 x 100 mm boyutlarında üretilmiştir (Walter and Andrews, 2014). 2  $\mu\text{m}$ ’den küçük partiküller sayesinde klasik 5,0 veya 3,0  $\mu\text{m}$  kolonlara kıyasla daha iyi ayrımlar

sağlanabilmektedir. Şekil 2.5’de görüldüğü gibi 5  $\mu\text{m}$  parçacıklı kolonlardan 1,7  $\mu\text{m}$  parçacıklı kolonlara geçildiğinde kinetik performans önemli ölçüde değiştirilebilmektedir (Guillarme and Veuthey, 2017).



Şekil 2.5. Partikül çaplarının azaltılmasının Van Deemter grafiğindeki etkileri (Guillarme and Veuthey, 2017)

Şekil 2.6’da ise aynı kolon uzunluğu ve çapına sahip kolonlarda partikül çapındaki değişimlerin verimliliğe etkisi görülmektedir. Çizelge 2.6’da UHPLC cihazları için üretilmiş farklı markalara ait çeşitli partikül çaplarında ve boyutlarında olan kolonlar görülmektedir.



**Şekil 2.6.** Değişen partikül çaplarına göre birim uzunluk başına verimlilik karşılaştırması (kolonların hepsi 2,1 x 100 mm ölçülerindedir. Sadece 1,3 µm Kinetex C18 kolon 2,1 x 50 mm ölçülerindedir) (Walter and Andrews, 2014)

**Çizelge 2.6.** UHPLC cihazlarında sıklıkla kullanılan farklı markalara ait bazı kolonlar

| Kolon                  | Partikül Çapı<br>(µm) | Çap<br>(mm)   | Uzunluk<br>(mm)   |
|------------------------|-----------------------|---------------|-------------------|
| Zorbax Eclipse XDB C18 | 1,8; 3,5              | 2,1; 3,0; 4,6 | 50, 100, 150      |
| Zorbax Eclipse C18     | 1,8; 3,5              | 2,1; 3,0; 4,6 | 50, 100, 150, 250 |
| Zorbax Extend C18      | 1,8                   | 2,1; 3,0      | 50, 100, 150      |
| Kinetex Bifenil        | 1,7; 2,6              | 2,1; 3,0; 4,6 | 30, 50, 100, 150  |
| Acquity BEH C18        | 1,7                   | 1,0; 2,1; 3,0 | 30, 50, 100, 150  |
| Kinetex HSS T3 C18     | 1,8                   | 1,0; 2,1      | 50, 100, 150      |
| Waters HILIC           | 2,7                   | 2,1; 3,0; 4,6 | 30, 50, 100, 150  |

## **2.5. Örnek Hazırlama**

Mikotoksin analizi yapılacak gıdalarda çoğunlukla aranan maddeler dışında diğer başka pek çok madde de bulunabilmektedir. Bu nedenle UHPLC ile analiz yapılmadan önce gıda örneklerinin örnek hazırlama aşamasından geçmesi gerekmektedir. Örnek hazırlamada amaç örnek maddesinde analizi yapılacak olan analitin dışında var olan bileşenlerin ve safsızlıkların uzaklaştırılmasıdır. Örnek hazırlama için başlıca, basit ekstraksiyon ve katı faz ekstraksiyonu (SPE) ve immunoafinite kolonlar (IAC) gibi diğer temizleme ve saflaştırma yöntemleri kullanılmaktadır. Ekstraksiyon için çoğunlukla metil alkol veya asetonitril gibi organik çözücüler su ile karıştırılarak kullanılır (Rahmani, Jinap and Soleimany, 2009; Turner, Subrahmanyam and Piletsky, 2009).

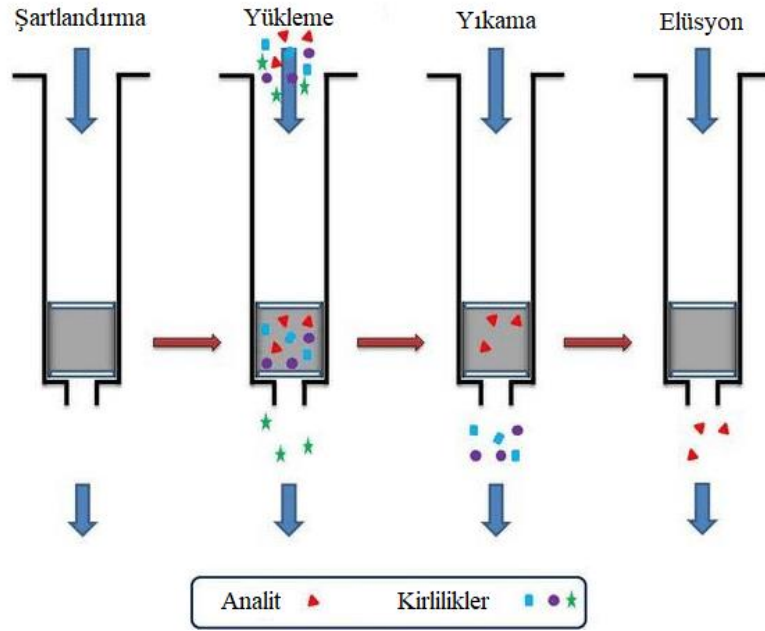
### **2.5.1. Ekstraksiyon**

Ekstraksiyon işlemi katı ya da sıvı fazda bulunan bileşik ya da bileşiklerin çözünürlük farklılıklarından faydalanarak diğer bir sıvı faza geçmesi esasına dayanarak gerçekleştirilmektedir. Kromatografik yöntemler ile ilgili yapılan çalışmalarda örnekler için ekstraksiyon işlemleri sıklıkla tercih edilmektedir. Mikotoksinler için kullanılan basit ekstraksiyon yöntemlerinde çoğunlukla organik çözücü olarak metil alkol ve asetonitril kullanılmaktadır (Turner, Subrahmanyam and Piletsky, 2009; Nováková and Vlčková, 2009).

### **2.5.2. Katı faz ekstraksiyonu (SPE)**

SPE yönteminin temel prensibi, silika jel veya diğer farklı dolgu maddeleri ile doldurulmuş küçük tek kullanımlık kartuşlar (kolon) yardımıyla sıvı halde bulunan örneklerin istenmeyen kirliklerden uzaklaştırılması, saflaştırılması ve deriştirilmesine dayanmaktadır (Turner, Subrahmanyam, and Piletsky, 2009). Katı halde olan örnekler için öncelikle bir ekstraksiyon işlemi uygulanarak örneğin sıvı hale getirilmesi sağlanır. SPE yönteminin uygulandığı Şekil 2.7’de şematik olarak gösterilmektedir. SPE yöntemi ile yapılan işlem için önce kolon şartlandırılır daha sonra elde edilen sıvı faz halindeki örnek kolona yüklenir. Sonrasında kirliliklerin temizlenmesi için yıkama işlemi yapılır. Son olarak ise kolonun içinde tutunan analiti kolondan alabilmek için elüsyon basamağı gerçekleştirilir. Elüsyon basamağına kadar yapılan işlemlerden sonra altta kalan kısımlar atılır. Elüsyon sonucu elde edilen analit içeren kısım ise gerekli işlemler (seyrelme, süzme

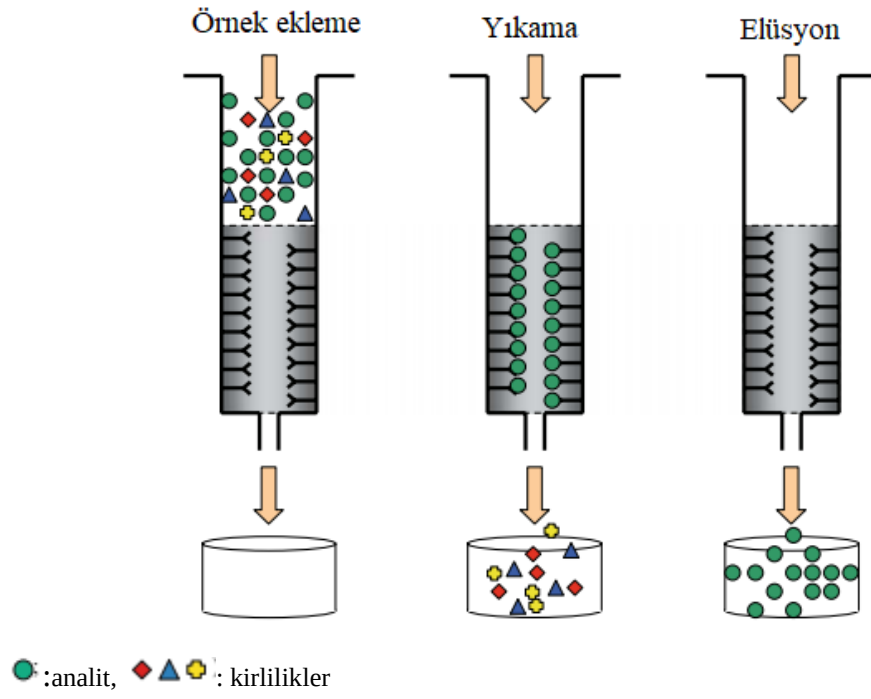
vs.) yapıldıktan sonra analiz edilmektedir (Yavuz ve Aksoy, 2006; Nováková and Vlčková, 2009).



Şekil 2.7. SPE yönteminin uygulandığının şematik gösterimi (<https-1://www.researchgate.net>)

### 2.5.3. İmmunoafinite kolonlar (IAC)

Gıdalar ile yapılan çalışmalarda örnek hazırlama aşamasında IAC yaygın olarak tercih edilen bir temizleme ve saflaştırma yöntemidir. Şekil 2.8’de gösterildiği gibi IAC’nin uygulandığı için öncelikle örnek kolona yüklenir, daha sonra yıkama ile kirlilikler kolondan atılır ve son işlem olarak elüsyon yapılarak kolonda tutulan analitler elde edilir (Şenyuva and Gilbert, 2010; Zheng, Richard and Binder, 2006).



Şekil 2.8. IAC yönteminin uygulandığının şematik gösterimi (Zheng, Richard and Binder, 2006)

### **3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER**

#### **3.1. Kullanılan Gıda Örnekleri**

Mikotoksin tayinlerinde kullanılan gıda örnekleri, Eskişehir'deki çeşitli marketlerden satın alınmıştır. Deneylerde patates unu, küflü mısır unu, buğday unu, tam buğday unu, pirinç, pirinç unu, buğday, mısır, kahvaltılık mısır gevreği ve tahıllı kraker kullanılmıştır. Pirinç, mısır ve buğday gibi iri taneli olan gıda örnekleri otomatik öğütücü cihazı ile öğütülmüştür. Bu gıda numuneleri kapalı kutularda, karanlıkta ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Küflü mısır unu, mısır ununun nemli ortamda bir sene bekletilmesi sonucunda küflendirilmesi ile elde edilmiştir.

#### **3.2. Kimyasallar**

Çalışmalarda standart madde olarak kullanılan zearalenon (ZEA) ve okratoksin A (OTA) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, A.B.D.), sitrinin Penreac AppliChem (İngiltere) ve sitreoviridin Cayman (A.B.D.) firmalarından satın alınmıştır. Deneylerde kullanılan metil alkol (MeOH), asetonitril (ACN) ve formik asit Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, A.B.D.) firmasından temin edilmiştir. Bu tez çalışmasında deneylerde kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Yüksek saflıktaki etil kumarin karboksilat (IS) maddesi ise Anadolu Üniversitesi Kimya Bölümü, Organik kimya Laboratuvarında Doç. Dr. İlker AVAN tarafından sentezlenmiştir.

#### **3.3. Araç Gereç ve Cihazlar**

Kromatografik çalışmalarda Agilent 1290 Infinity (Waldbronn, Almanya) marka UHPLC cihazı ile (Şekil 3.1), floresans (FLD) dedektör (Agilent 1260 FLD Spectra) kullanılmıştır. Ayrımlar, Phenomenex marka Kinetex Bifenil (2,1 mm×150 mm×2,6 µm) ve Agilent marka Zorbax Extend C18 (2,1 mm×100 mm×1,8 µm) kolonları kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). Deneyler sırasında kullanılan diğer cihazlar ve gereçler; ultrasonik banyo Bandelin Sonorex (Almanya), su banyosu Clifton (İngiltere), vortex Daigger Scientific Industries (A.B.D.), floresans spektrometri cihazı Varian (Avusturalya), iri taneli gıdaların öğütülmesi için Pfaff aqs (Almanya) öğütme cihazı, ultra saf su için Arium comfort (Hollanda) su saflaştırma cihazı, örneklerin süzülmesi için Sartorius (Almanya) 0.2 µm gözenek çapına sahip selüloz asetat şırınga filtreleridir.



Şekil 3.1. Deneylerde kullanılan UHPLC cihazı



Şekil 3.2. a) OTA-CIT-ZEA deneylerinde kullanılan UHPLC kolonu, b) CTV deneylerinde kullanılan UHPLC kolonu

### 3.4. İstatistiksel Analizler

Deneylerdeki tüm istatistiki hesaplamalar GraphPad Prism v.6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) ve Mikrosoft excel programları kullanılarak yapılmıştır.

### 3.5. OTA, CIT ve ZEA Deneyleri

#### 3.5.1. Standart çözeltilerin hazırlanması

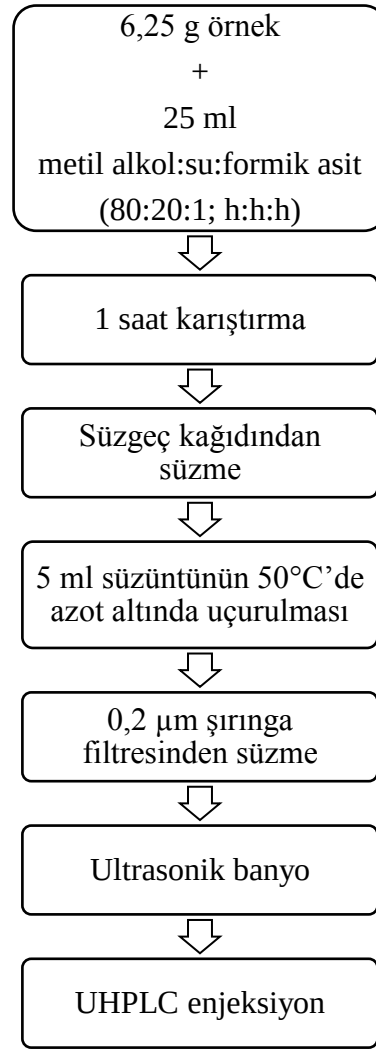
ZEA'nın standart çözeltisi, asetonitril içerisindeki 100 µg/ml'lik stok standart çözeltisinden 10 µl alınıp hareketli faz ile 1 ml'ye tamamlanarak son derişim 1000 ng/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Sitrinin standart çözeltisi, 1 mg sitrinin katısı tartıldıktan sonra 1 ml metil alkol ile çözülmüş ve 1 mg/ml'lik çözeltisi elde edilmiştir. Daha sonra bu çözeltiden hareketli faz ile gerekli seyrelmeler yapılarak derişimi 1000 ng/ml olan sitrinin standart çözeltisi hazırlanmıştır. 5 mg olarak satın alınan Okratoksin A katısı üzerine 5 ml metil alkol eklenerek 1 mg/ml'lik standart çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiden 10 µl alınıp 10 ml'ye hareketli faz ile seyreltilerek 1000 ng/ml OTA standart çözeltisi hazırlanmıştır. 1000 ng/ml olarak hazırlanan OTA, CIT ve ZEA standart çözeltilerinden hareketli faz ile gerekli seyrelmeler yapılarak çalışma standart çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu standart çözeltiler kullanılana kadar -20°C'de saklanmıştır.

#### 3.5.2. İç standart çözeltisinin hazırlanması

Deneylerde iç standart (IS) olarak etil kumarin karboksilat kullanılmıştır. 10 mg IS tartıldıktan sonra üzerine 10 ml metil alkol eklenerek derişimi  $9,994 \times 10^5$  ng/ml olan etil kumarin karboksilat çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra bu çözelti UHPLC deneylerinde kullanılmak üzere son derişimi 2487 ng/ml olacak şekilde hareketli faz ile seyreltilmiştir.

#### 3.5.3. Örnek hazırlama

Gıda örneklerinden mikotoksin ekstraksiyonu Şekil 3.2'de şematik olarak gösterilmektedir. Öncelikle 6,25 g örnek tartılarak üzerine 25 ml 80:20 (metil alkol:su; h/h) ve %1 formik asit içeren ekstraksiyon çözeltisi eklenmiştir ve 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır ve elde edilen karışım süzgeç kağıdından süzölmüştür. Daha sonra süzöntünün 5 ml'si 50°C'de azot altında uçurulduktan sonra 900 µl hareketli faz ve 100 µl IS çözeltisi ile çözülmüştür. Son olarak elde edilen çözelti 0,2 µm'lik selöloz asetat şırınga filtresinden süzölüp ultrasonik banyoda gazı giderildikten sonra örneklerin UHPLC enjeksiyonu yapılmıştır.



Şekil 3.3. Ekstraksiyon yönteminin şematik gösterimi

### 3.6. CTV Deneyleri

#### 3.6.1. CTV standardının hazırlanması

CTV'nin 1000 ng/ml'lik standart stok çözeltisi, 1 mg olarak tartılan CTV'nin 1 ml metil alkolde çözülmesi ile hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan bu standart çözelti metil alkol ile uygun şekilde seyreltilerek çalışma standart çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan standart çözeltiler -20°C'de saklanmıştır.

### **3.6.2. CTV için örnek hazırlama**

CTV deneylerinde öğütölerek elde edilen piriñ, mısıır ve buğday örnekleri kullanılmıştır. CTV ekstraksiyonu için 2 g olarak tartılan örneklere 5'er ml metil alkol eklenerek 5 dk karıştırılmıştır. Daha sonra ekstraksiyon sonucu elde edilen çözelti 0,2 µm'lık selölöz asetat şırınga filtresinden süzölmüşür. Deney öncesi örneklér metil alkol ile seyreltilip gaz giderme işleminden sonra UHPLC cihazına verilmiştir.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. OTA, CIT ve ZEA Deneyleri

#### 4.1.1. UHPLC-FLD yöntem optimizasyon çalışmaları

UHPLC-FLD yöntem optimizasyonu çalışmalarında, deneysel ve aletsel parametrelerin değiştirilmesi ile OTA, CIT ve ZEA tayini için en uygun olan koşullar belirlenmiştir. Bu amaçla akış hızı, enjeksiyon hacmi, kolon sıcaklığı, farklı özellikteki UHPLC kolonları, hareketli faz bileşimi ve floresans dedektörün dalga boyu gibi parametreler araştırılmıştır. Ayrıca deneylerde iç standart (IS) olarak diflunisal, kafein, metil paraben, etil paraben, propil paraben, bütıl paraben, naftalin, karbamezapin, ibuprofen, naproksen sodyum gibi pek çok doğal floresans özellikteki kimyasallar denenmiştir. Sonuç olarak en uygun IS, etil kumarin karboksilat olarak belirlenmiştir.

Yapılan deneyler sonucunda OTA, CIT, ZEA ve IS için en iyi ayırım bifenil kolonunda (2,1 mm x 150 mm x 2,6 $\mu$ m) gerçekleştirilmiştir.

Hareketli faz optimizasyonu: UHPLC-FLD ile en uygun hareketli fazı bulmak için yapılan çalışmalarda asetonitril:su:metil alkol ve asetonitril:su karışımlarının farklı oranları ile ve aynı zamanda formik asit, asetik asit ve fosforik asit gibi farklı asitler ile asitlendirilerek farklı pH aralıklarında denemeler yapılmıştır.

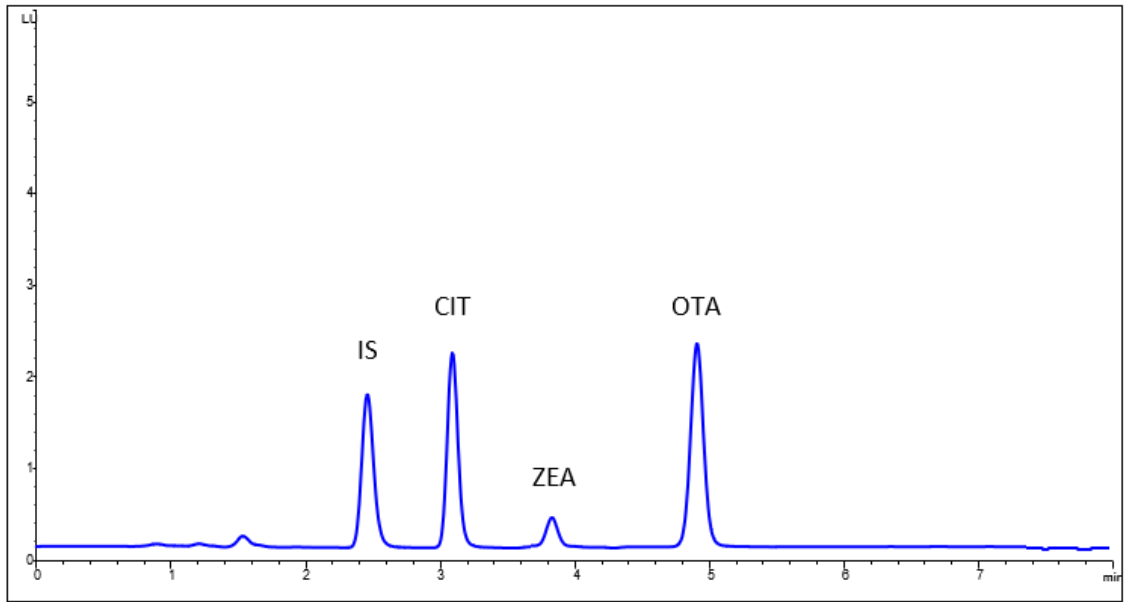
FLD dalga boyu optimizasyonu: Çalışmada ZEA için, 274 nm, 275 nm, 234 nm ve 236 nm uyarma dalga boyları ( $\lambda_{uy}$ ) ile 445 nm, 450 nm, 458 nm ve 440 nm yayılma dalga boyları ( $\lambda_{yay}$ ) denenmiştir. En iyi sonuçlar  $\lambda_{uy}$ : 236 nm ve  $\lambda_{yay}$ : 440 nm dalga değerlerinde elde edilmiştir. CIT için 330 nm ve 360 nm uyarma dalga boyu değerlerinde denemeler yapılırken, 460 nm ve 500 nm yayılma dalga boyu değerleri denenmiştir. OTA için ise  $\lambda_{uy}$ : 330 nm,  $\lambda_{yay}$ : 500 nm değerlerinde deneyler yürütülmüştür. Deneylerde CIT için de OTA ile ortak dalga boyu olan  $\lambda_{uy}$ : 330 nm  $\lambda_{yay}$ : 500 nm değerleri seçilmiştir.

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu belirlenen en uygun kromatografik koşullar Çizelge 4.1’de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Gıdalarda OTA, CIT ve ZEA tayininde kullanılan UHPLC-FLD koşulları

|                                   |                                                         |                                                  |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Kolon:</b>                     | Kinetex Bifenil kolon 100 °A (2,1 mm x 150 mm x 2,6 µm) |                                                  |
| <b>Kolon sıcaklığı:</b>           | 35°C                                                    |                                                  |
| <b>Hareketli faz:</b>             | Asetonitril:su (45:55; h/h; pH: 2,2 (fosforik asit))    |                                                  |
| <b>Akış hızı:</b>                 | 0 dk:                                                   | 0,35 ml/dk                                       |
|                                   | 2,5 dk:                                                 | 0,35 ml/dk                                       |
|                                   | 3 dk:                                                   | 0,50 ml/dk                                       |
|                                   | 10 dk:                                                  | 0,50 ml/dk                                       |
| <b>Enjeksiyon hacmi:</b>          | 10 µl                                                   |                                                  |
| <b>FLD dedektör dalga boyu:</b>   | 0-3,5 dk:                                               | $\lambda_{uy}$ : 330 nm $\lambda_{yay}$ : 500 nm |
|                                   | 3,5-4,5 dk:                                             | $\lambda_{uy}$ : 236 nm $\lambda_{yay}$ : 440 nm |
|                                   | 4,5-10 dk:                                              | $\lambda_{uy}$ : 330 nm $\lambda_{yay}$ : 500 nm |
| <b>Oto örnekleyici sıcaklığı:</b> | 4°C                                                     |                                                  |

Optimize edilen UHPLC-FLD koşulları ile 2487 ng/ml IS içeren 100'er ng/ml OTA, CIT ve ZEA karışım standart çözeltisine ait kromatogram Şekil 4.1'de görülmektedir. Geliştirilen UHPLC-FLD yöntemi ile IS ve üç mikotoksin aynı anda 5 dk içerisinde ayrılmıştır. Belirlenen optimum UHPLC-FLD koşullarında IS 2,466 dakika, CIT 3,097 dakika, ZEA 3,836 dakika ve OTA 4,913 dakikada ayrılmıştır.



**Şekil 4.1.** Optimize edilen UHPLC-FLD koşullarında; 2487 ng/ml IS, 100 ng/ml CIT, 100 ng/ml ZEA, 100 ng/ml OTA

#### 4.1.2. Gıda örneklerinin analize hazırlanması

Geliştirilen UHPLC-FLD yönteminde numune analizleri için en uygun örnek hazırlama yönteminin bulunması için çeşitli denemeler yapılmıştır. Aşağıda bu yöntemler açıklanmıştır.

**1. Yöntem:** Bu yöntem Li vd., (2016)'ya göre yapılmıştır. 1 g örnek üzerine 5 ml metil alkol:su:formik asit (79:20:1; h/h/h) karışımını içeren çözelti eklenerek 2 dk vortex ve 20 dk ultrasonik banyoda tutulmuştur. Daha sonra santrifüj işlemi yapılarak üstte kalan berrak kısım 50°C'de azot altında uçurulmuş ve uygun miktarda 500 µl mobil faz ile çözülmüştür.

**2. Yöntem:** Lattanzio vd., (2011)'e göre uyarlanan yöntemde 1 g örnek ile 5 ml asetonitril:su (84:16; h/h) karışımı kullanılarak 30 dk karıştırılması ile ekstraksiyon yapılmış ve bu ekstraksiyon çözeltisinin tamamı 50°C'de azot altında uçurulmuştur. Kurutulmuş örnek metil alkol:su (1:9; h/h) ile çözüldükten sonra C18 SPE kolonu ile saflaştırma yapılmıştır. SPE işlemi için öncelikle kolon 5 ml metil alkol ve 5 ml hacimce %2'lik HCl ile şartlandırıldıktan sonra örnek kolona yüklenmiştir. Son olarak 2 ml metil alkol ile elüsyon yapılmış ve elüent mobil faz ile seyreltilmiştir.

**3. Yöntem:** Bu yöntemde temizleme ve saflaştırma amacı ile Supel Tox Ochra Bind immuno afinite kolonu kullanılmıştır. Öncelikle örneklerin 25 ml diklorometan ve 2,5 ml 0,1 M fosforik asit içeren çözelti ile ekstraksiyonları yapılmış ve süzgeç kağıdından süzölmüştür. Elde edilen süzöntü, Supel Tox Ochra Bind kolona yüklenmiştir. Daha sonra diklorometan ve formik asit (99:1; h/h) karışımı ile örneğin elüsyonu yapılarak bu elüsyon çözeltisinin tamamı 50°C'de azot ile uçurulmuştur. Kurutulan örnek 750 µl mobil faz ile çözümlenerek UHPLC enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir.

**4. Yöntem:** Bu yöntemde Bond Elut Mycotoxin kolonu kullanılmıştır. 6,25 g olarak tartılan örneğe 25 ml metil alkol:su:formik asit (80:20:1; h/h/h) içeren çözelti eklenmiş ve 10 dk karıştırılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu çözelti süzgeç kağıdından süzölmüştür. Süzöntünün 10 ml'si Bond Elut Mycotoxin kolona yüklenmiş ve elüe edilen çözeltinin 5 ml'si alınarak 50°C'de azot altında uçurulmuştur. Kurutulmuş örnek 500 µl mobil faz ile çözüldükten sonra UHPLC'de enjeksiyonu yapılmıştır (Klötzel and Lauber, 2017).

**5. Yöntem:** Bu yöntem, Tunçel vd. (2015)'nin uyguladığı örnek hazırlama ve saflaştırma yönteminden yararlanılarak gerçekleştirilmiştir. 1 g örnek 10 ml etil alkol ile 30 dk

karıştırılıp 5000 rpm’de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan etil alkollü kısım 50°C’de azot ile uçurulmuştur. Kurutulmuş kısım 10 ml NaHCO<sub>3</sub> (%1, k/h) ile çözülerek 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra üzerine seyreltik 10 ml PBS çözeltisi (1:10, h/h) eklenmiştir. Elde edilen çözelti, önceden 10 ml PBS ile şartlandırılmış C18 SPE kolonuna yüklendikten sonra kolon 1 ml ultra saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra 4 ml metil alkol ile elüsyon yapılmıştır.

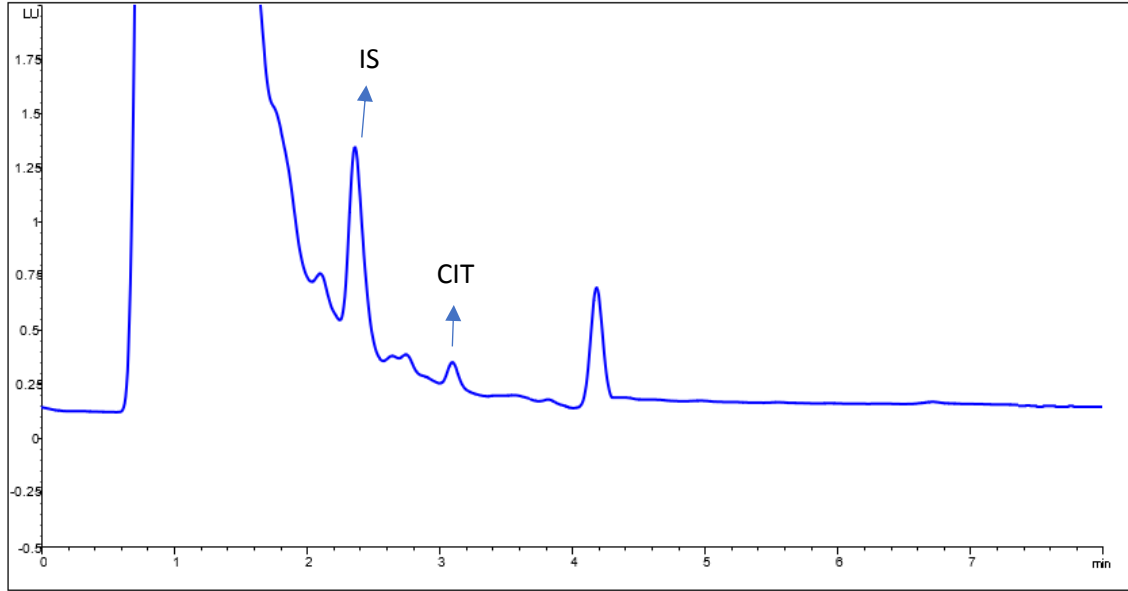
Tez çalışmasında uygulanan farklı örnek hazırlama yöntemleri sonucunda elde edilen %Geri Kazanım sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir. %Geri Kazanım değerleri, boş matriks olarak kullanılan patates unu üzerine 100 ng/ml standart mikotoksin çözeltilerinin her biri eklendikten sonra örnek hazırlama yöntemlerinde (1-5. Yöntem) belirtilen çözücülerle ekstraksiyon işlemleri yapılarak hesaplanmıştır.

**Çizelge 4.2.** Farklı örnek hazırlama yöntemlerinin %Geri Kazanım değerleri

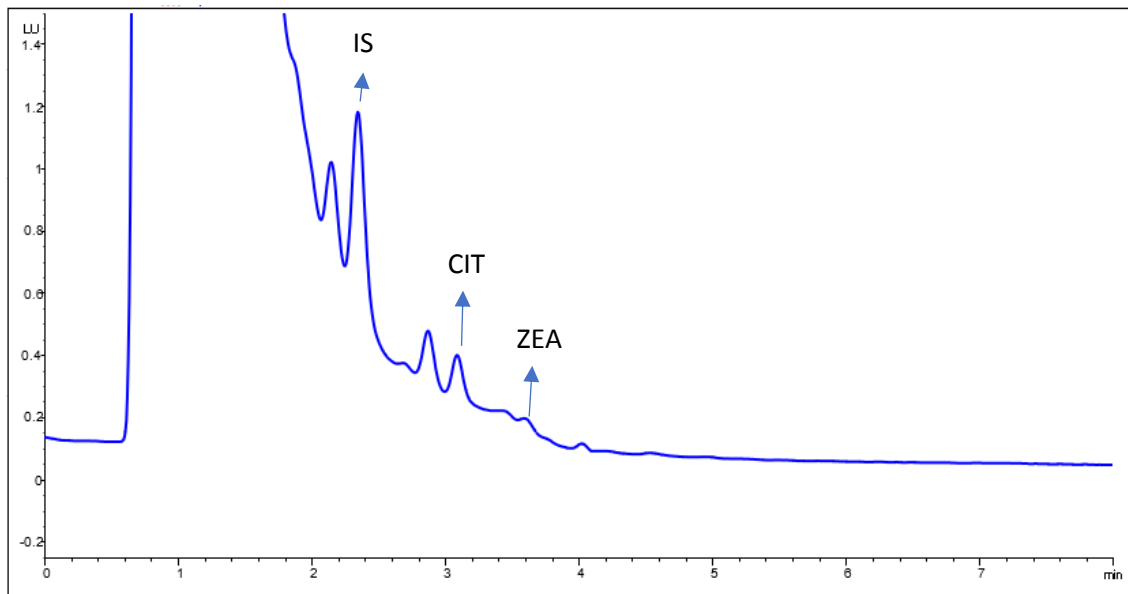
| Yöntem           | Örnek Hazırlama ve<br>Saflaştırma       | %Geri Kazanım |            |            |
|------------------|-----------------------------------------|---------------|------------|------------|
|                  |                                         | <u>CIT</u>    | <u>ZEA</u> | <u>OTA</u> |
| <b>1. Yöntem</b> | Ekstraksiyon                            | 64,75         | 98,83      | 96,85      |
| <b>2. Yöntem</b> | Ekstraksiyon ve SPE                     | 3,49          | 45,37      | 18,11      |
| <b>3. Yöntem</b> | Ekstraksiyon ve Supel Tox<br>Ochra Bind | —             | —          | 51,75      |
| <b>4. Yöntem</b> | Ekstraksiyon ve Bond Elut<br>Mycotoxin  | 38,96         | 36,00      | 38,79      |
| <b>5. Yöntem</b> | Ekstraksiyon ve SPE                     | 14,85         | 17,20      | 1,96       |

Çizelge 4.2’den de görüldüğü gibi denenen bu yöntemlerde elde edilen %Geri Kazanım değerleri uygun bulunmamıştır. 1. Yöntemin %Geri Kazanımın yüksek olması açısından diğer yöntemlere göre daha iyi olduğu görülmüş ancak bu yöntemde CIT için %Geri Kazanım değeri düşük bulunmuştur. 3. Yöntem ise sadece OTA için uygun olduğundan tercih edilmemiştir. Bu yüzden en uygun örnek hazırlama yöntemi olarak tezin 3. Gereçler ve Yöntemler bölümünde yer alan “3.5.3. Örnek hazırlama” kısmında verilen yöntem kullanılmıştır. Çünkü tezdeki gıda örneklerinden mikotoksinlerin ekstraksiyonunda kullanılan bu yöntem ile her üç mikotoksin için de yüksek %Geri Kazanımlar elde edilmiştir. Kullanılan bu yöntem ile ilgili %Geri Kazanım sonuçları, OTA, CIT ve ZEA deneylerinde yer alan “4.1.3.3. Doğruluk” başlığı altında verilmiştir.

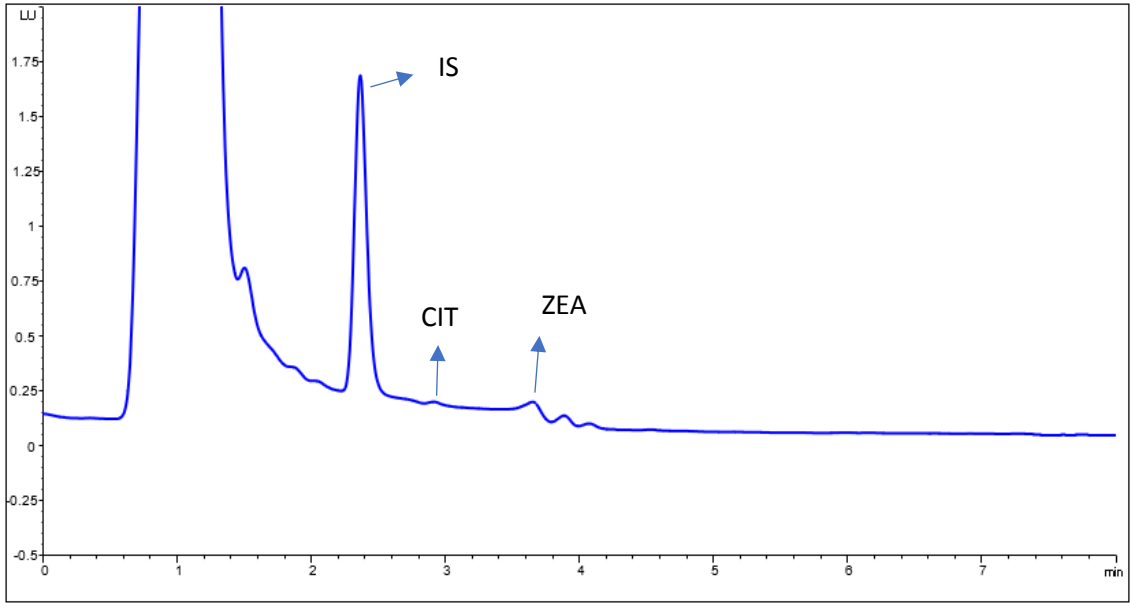
Aşağıda mısır gevreği, tahıllı kraker, pirinç unu, patates unu ve küflü mısır unu örneklerinde optimum UHPLC-FLD koşullarında gerçekleştirilen OTA, CIT ve ZEA kromatogramları gösterilmektedir (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7).



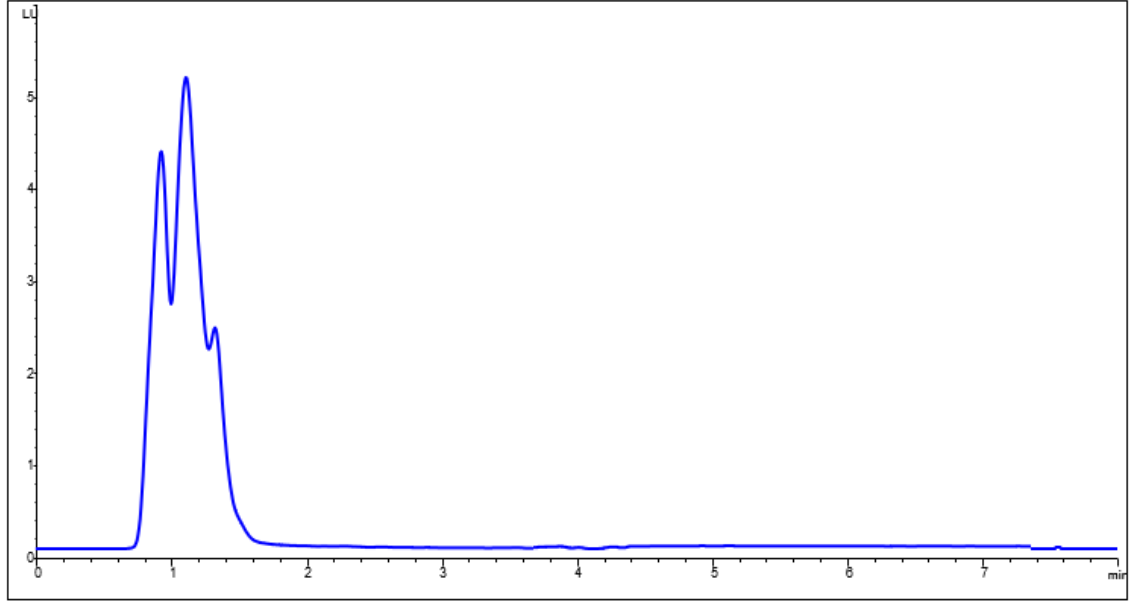
Şekil 4.2. Mısır gevreği



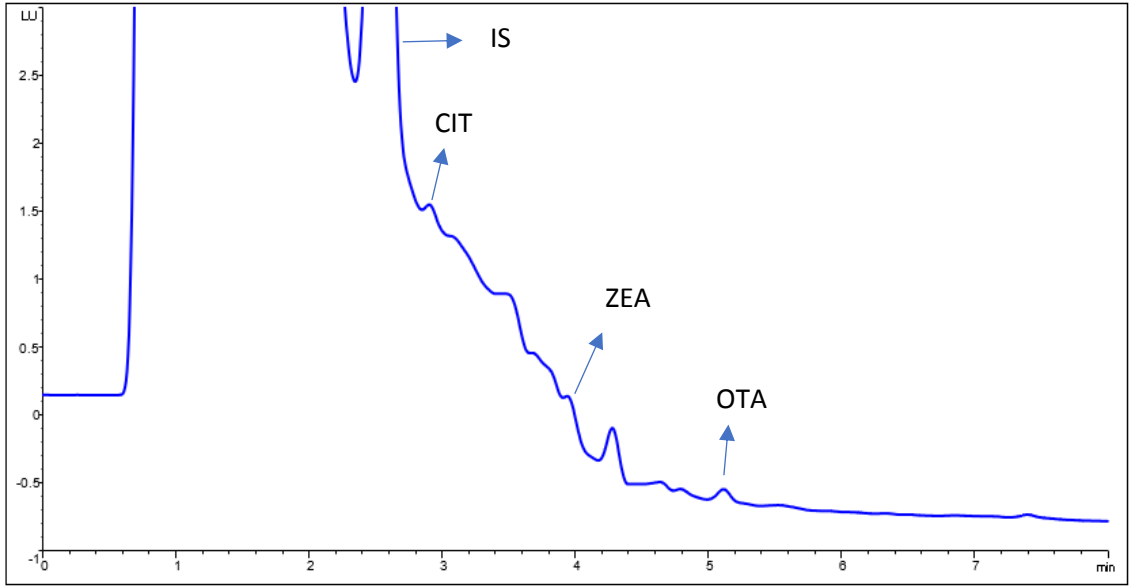
Şekil 4.3. Tahıllı kraker



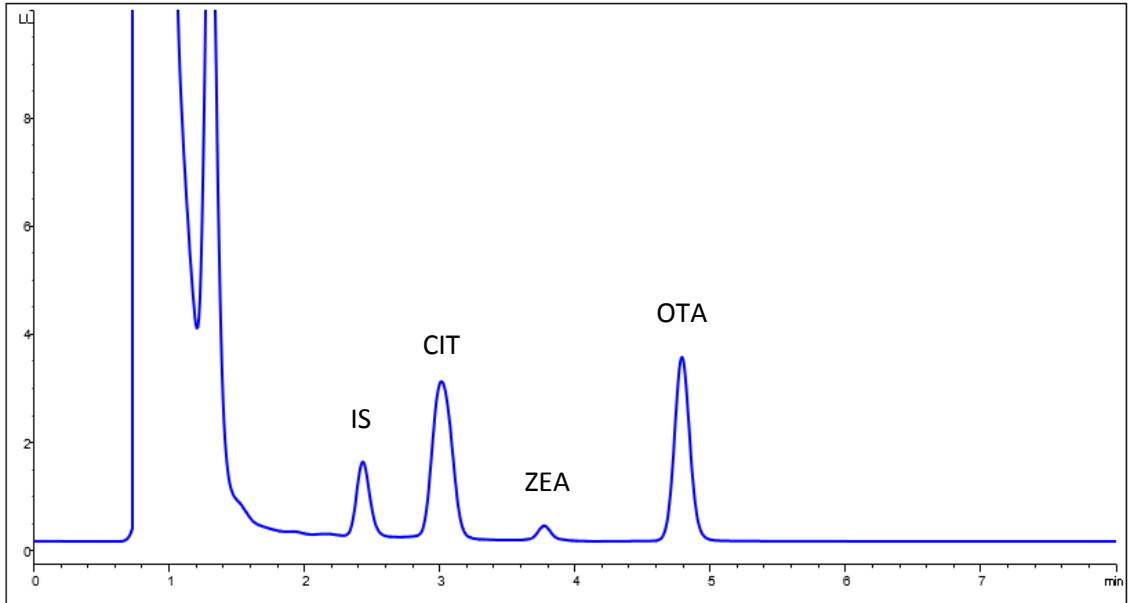
Şekil 4.4. *Pirinç unu*



Şekil 4.5. *Patates unu*



Şekil 4.6. Küflü mısır unu



Şekil 4.7. 100 ng/ml derişimlerinde CIT, ZEA ve OTA standart eklenmiş patates unu örneği

Optimize edilen bu UHPLC-FLD koşulları ile yöntemin validasyon çalışmaları yapılmıştır.

#### 4.1.3. UHPLC-FLD yöntem validasyon çalışmaları

OTA, CIT ve ZEA için geliştirilen UHPLC-FLD yöntemi, Uluslararası Uyumluluk Konferansı (International Conference on Harmonization, ICH)'na göre doğrusallık,

gözlenebilme sınırı (LOD), tayin alt sınırı (LOQ), kesinlik, doğruluk ve kararlılık (stabilite) parametreleri araştırılmak suretiyle valide edilmiştir (ICH, 1996).

#### **4.1.3.1. Doğrusallık ve duyarlılık**

UHPLC-FLD yönteminin doğrusallığı, her biri son derişimi 2487 ng/ml IS içeren OTA, CIT ve ZEA standart çözeltilerinin sekiz noktalı kalibrasyon grafikleri ile gösterilmiştir. OTA için 2-200 ng/ml, CIT için 2-200 ng/ml ve ZEA için 5-250 ng/ml derişim aralıklarında olan çözeltilerin üç ayrı günde ve 6'şar kez enjeksiyonları yapılmıştır. Hesaplamalarda standartların ve iç standardın pik normalizasyon (PN) oranları ( $R = PN_{OTA} / PN_{IS}$ ,  $PN = \text{pik alanı} / \text{pik alıkonma zamanı}$ ) kullanılarak doğrusallık çalışmaları ve miktar hesapları yapılmıştır. Yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) aşağıda verilen eşitlikler ile hesaplanmıştır.

$$LOD = 3,3 \times \text{standart sapma (SS)} / \text{eğim (m)}$$

$$LOQ = 10 \times \text{standart sapma (SS)} / \text{eğim (m)}$$

Bu formüllerde yer alan SS= Kör çözeltilinin; çok az derişimdeki madde çözeltilisinin veya kesişim değerinin standart sapması ve m= Kullanılan kalibrasyon eşitliğinin eğim değeridir.

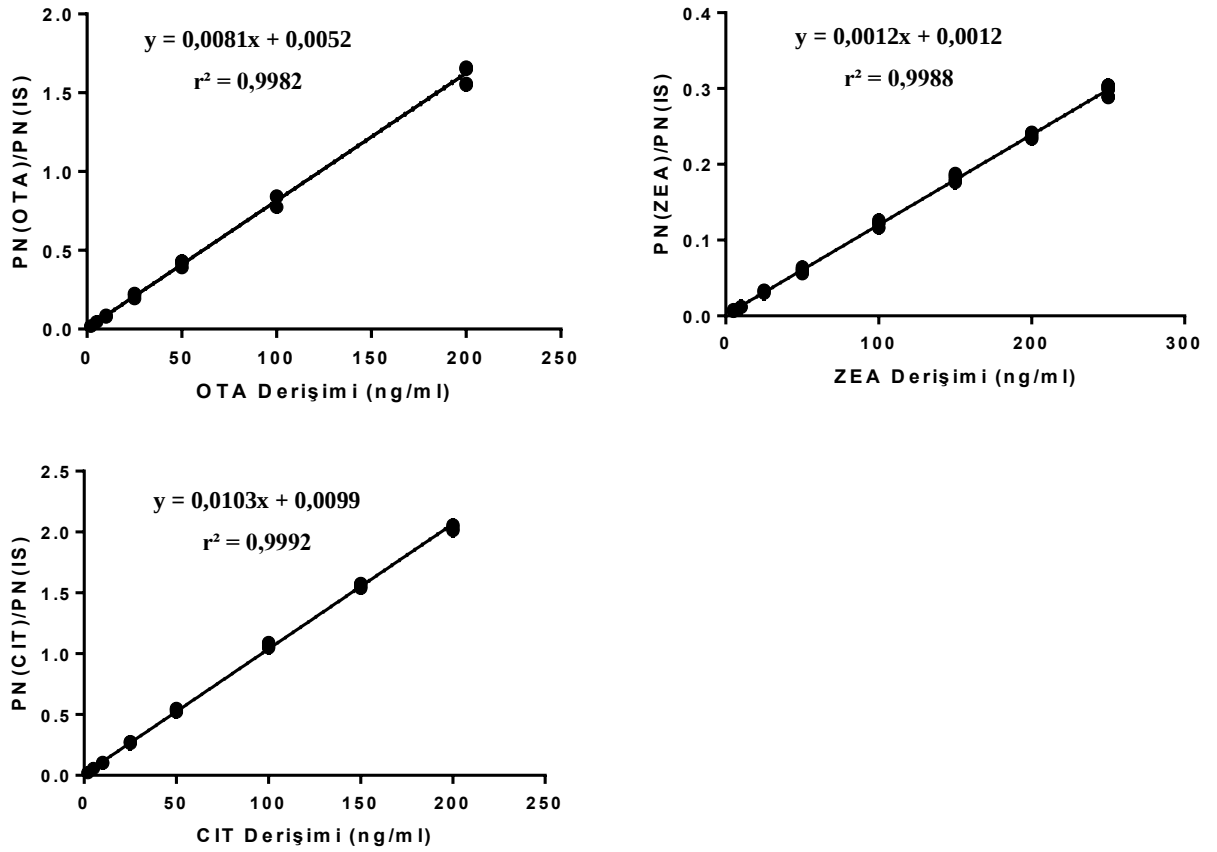
Çizelge 4.3'de OTA, CIT ve ZEA'nın regresyon analiz sonuçları ve ilgili istatistiksel değerler verilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.3'de gıda örnekleri için geliştirilen UHPLC-FLD yöntemi ile belirlenen LOD ve LOQ değerleri de bulunmaktadır.

Şekil 4.8'den de görüldüğü gibi gıda örnekleri için geliştirilen bu yöntem ile yapılan istatistiksel hesaplamalar sonucunda OTA, CIT ve ZEA için yüksek korelasyon katsayıları ile doğrusal grafikler elde edilmiştir.

**Çizelge 4.3. OTA, CIT ve ZEA'nın regresyon analiz sonuçları**

|                   | Gün İçi (n=6)                   |                                 |                                 | Günler Arası<br>(n=18)          |
|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|                   | 1. Gün                          | 2. Gün                          | 3. Gün                          |                                 |
| <b><u>CIT</u></b> |                                 |                                 |                                 |                                 |
| Eğim±SS           | 0,0102 ± 4,203×10 <sup>-5</sup> | 0,0102 ± 4,161×10 <sup>-5</sup> | 0,0103 ± 2,023×10 <sup>-5</sup> | 0,0103 ± 2,122×10 <sup>-5</sup> |
| Kesim±SS          | 0,0177 ± 0,0040                 | 0,0102 ± 0,0040                 | 0,0056 ± 0,0019                 | 0,0099 ± 0,0019                 |
| r <sup>2</sup>    | 0,9989                          | 0,9989                          | 0,9998                          | 0,9992                          |
| LOD (µg/kg)       |                                 |                                 |                                 | 0,64                            |
| LOQ (µg/kg)       |                                 |                                 |                                 | 1,97                            |
| <b><u>ZEA</u></b> |                                 |                                 |                                 |                                 |
| Eğim±SS           | 0,0012 ± 5,903×10 <sup>-6</sup> | 0,0012 ± 4,489×10 <sup>-6</sup> | 0,0011 ± 5,343×10 <sup>-6</sup> | 0,0012 ± 3,382×10 <sup>-6</sup> |
| Kesim±SS          | 0,0027 ± 0,0008                 | 0,0014 ± 0,0006                 | 0,0017 ± 0,0007                 | 0,0012 ± 0,0004                 |
| r <sup>2</sup>    | 0,9985                          | 0,9992                          | 0,9986                          | 0,9988                          |
| LOD (µg/kg)       |                                 |                                 |                                 | 1,28                            |
| LOQ (µg/kg)       |                                 |                                 |                                 | 3,90                            |
| <b><u>OTA</u></b> |                                 |                                 |                                 |                                 |
| Eğim±SS           | 0,0082 ± 1,512×10 <sup>-5</sup> | 0,0083 ± 1,122×10 <sup>-5</sup> | 0,0078 ± 6,537×10 <sup>-6</sup> | 0,0081 ± 2,798×10 <sup>-5</sup> |
| Kesim±SS          | 0,0095± 0,0013                  | 0,0028 ± 0,0010                 | 0,0015 ± 0,0006                 | 0,0052 ± 0,0025                 |
| r <sup>2</sup>    | 0,9998                          | 0,9999                          | 1,000                           | 0,9982                          |
| LOD (µg/kg)       |                                 |                                 |                                 | 0,24                            |
| LOQ (µg/kg)       |                                 |                                 |                                 | 0,71                            |

r<sup>2</sup>: regresyon katsayısı, SS: standart sapma



Şekil 4.8. OTA, CIT ve ZEA'nın UHPLC-FLD yöntemi ile günler arası ( $n=18$ ) sonuçlarına göre çizilen kalibrasyon grafikleri

#### 4.1.3.2. Kesinlik

Yöntemin kesinliği, günler içi ve günler arası tekrar edilebilirlik ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla OTA, CIT ve ZEA'nın 10, 100 ve 200 ng/ml'lik çözeltileri her birinde 2487 ng/ml IS olacak şekilde 3 set olarak hazırlanmış, 3 gün ve 6'şar kez ( $n=6$ ) enjeksiyonları yapılmıştır. Kesinlik, yüzde bağıl standart sapma (%BSS) ile verilmiştir. Kesinlik ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.4'de verilmiştir. Çizelge 4.4 incelendiğinde OTA, CIT ve ZEA için gün içi ve günler arası deneylerden elde edilen %BSS değerlerinin %5,5'den küçük olduğu bulunmuştur. Böylelikle yöntemin tekrarlanabilirliğinin iyi olduğu söylenebilir.

**Çizelge 4.4. OTA, CIT ve ZEA için kesinlik sonuçları**

| CIT (mg/ml) |           | Gün İçi (n=6) |        |        | Günler Arası (n=18) |
|-------------|-----------|---------------|--------|--------|---------------------|
|             |           | 1. Gün        | 2. Gün | 3. Gün |                     |
| 10          | $\bar{X}$ | 0,0949        | 0,0996 | 0,0999 | 0,0981              |
|             | SS        | 0,0004        | 0,0010 | 0,0006 | 0,0024              |
|             | %BSS      | 0,4648        | 0,9667 | 0,5563 | 2,4934              |
| 100         | $\bar{X}$ | 0,8859        | 0,9209 | 0,9353 | 0,9140              |
|             | SS        | 0,0036        | 0,0093 | 0,0091 | 0,0224              |
|             | %BSS      | 0,4097        | 1,0062 | 0,9700 | 2,4541              |
| 200         | $\bar{X}$ | 1,9483        | 1,9231 | 1,7599 | 1,8858              |
|             | SS        | 0,0019        | 0,0044 | 0,0082 | 0,0802              |
|             | %BSS      | 0,09756       | 0,2284 | 0,4666 | 4,2552              |
| ZEA (ng/ml) |           | Gün İçi (n=6) |        |        | Günler Arası (n=18) |
|             |           | 1. Gün        | 2. Gün | 3. Gün |                     |
| 10          | $\bar{X}$ | 0,0103        | 0,0108 | 0,0107 | 0,0106              |
|             | SS        | 0,0004        | 0,0004 | 0,0003 | 0,0006              |
|             | %BSS      | 3,8694        | 3,0261 | 2,5236 | 5,4994              |
| 100         | $\bar{X}$ | 0,1077        | 0,1124 | 0,1180 | 0,1127              |
|             | SS        | 0,0013        | 0,0015 | 0,0030 | 0,0055              |
|             | %RSD      | 1,1881        | 1,3490 | 2,4249 | 4,8844              |
| 200         | $\bar{X}$ | 0,2212        | 0,2130 | 0,2284 | 0,2209              |
|             | SD        | 0,0013        | 0,0023 | 0,0026 | 0,0067              |
|             | %BSS      | 0,5702        | 1,0878 | 1,1554 | 3,0531              |
| OTA (ng/ml) |           | Gün İçi (n=6) |        |        | Günler Arası (n=18) |
|             |           | 1. Gün        | 2. Gün | 3. Gün |                     |
| 10          | $\bar{X}$ | 0,0712        | 0,0754 | 0,0764 | 0,0742              |
|             | SS        | 0,0005        | 0,0003 | 0,0011 | 0,0024              |
|             | %BSS      | 0,6909        | 0,3615 | 1,4082 | 3,1995              |
| 100         | $\bar{X}$ | 0,7491        | 0,7510 | 0,7600 | 0,7528              |
|             | SS        | 0,0025        | 0,0027 | 0,0025 | 0,0052              |
|             | %BSS      | 0,3394        | 0,3554 | 0,3336 | 0,6985              |
| 200         | $\bar{X}$ | 1,4640        | 1,4414 | 1,4491 | 1,4517              |
|             | SS        | 0,0031        | 0,0033 | 0,0059 | 0,0107              |
|             | %BSS      | 0,2108        | 0,2317 | 0,4074 | 0,7394              |

$\bar{X}$ : ortalama; SS: standart sapma; %BSS: yüzde bağıl standart sapma

#### 4.1.3.3. Doğruluk

UHPLC-FLD yönteminin doğruluk çalışmaları, boş örnek olarak seçilen patates ununa ekstraksiyon işlemi öncesinde derişimi bilinen OTA, CIT ve ZEA standart çözeltileri eklenerek % Geri Kazanım değerlerinin hesaplanması yolu ile gerçekleştirilmiştir. % Geri Kazanım değerlerinin hesaplanması için patates ununa eklenen standart derişimleri 10, 100 ve 200 ng/ml olarak belirlenmiştir. Geri kazanım

deneyleri her bir derişim için iki paralel olarak yapılmış ve çözeltiler üçer kez enjekte edilmiştir. % Geri Kazanım değerleri aşağıda gösterilen eşitlik ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{Geri Kazanım} = (X_{\text{ölçülen değer}} / X_{\text{gerçek değer}}) \times \%100$$

Doğruluk ile ilgili verilerin hesaplanmasında doğrusallık sonucunda elde edilen kalibrasyon eğrilerinin denklemleri kullanılmıştır. Çizelge 4.5’de OTA, CIT ve ZEA’nın doğruluk sonuçları %Geri Kazanım, standart sapma ve %BSS’lar ile verilmiştir. Buna göre elde edilen yüksek %Geri Kazanım değerleri, örnek matriksinin tez kapsamında çalışılan mikotoksinlerin tayinlerine olumsuz bir etki yapmadığını yani yöntemin doğruluğunu göstermektedir.

**Çizelge 4.5.** OTA, CIT ve ZEA için doğruluk sonuçları (n=2, l=3)

|            | Matrikse Eklenen Derişim<br>(ng mL <sup>-1</sup> ) | %Geri Kazanım<br>(n=2, l=3) | SS   | %BSS |
|------------|----------------------------------------------------|-----------------------------|------|------|
| <b>CIT</b> | <b>10</b>                                          | 97,97                       | 1,99 | 2,03 |
|            | <b>100</b>                                         | 101,72                      | 0,48 | 0,47 |
|            | <b>200</b>                                         | 102,14                      | 0,61 | 0,60 |
| <b>ZEA</b> | <b>10</b>                                          | 104,26                      | 5,37 | 5,15 |
|            | <b>100</b>                                         | 98,99                       | 0,60 | 0,60 |
|            | <b>200</b>                                         | 96,00                       | 1,62 | 1,69 |
| <b>OTA</b> | <b>10</b>                                          | 98,69                       | 3,03 | 3,07 |
|            | <b>100</b>                                         | 100,98                      | 1,16 | 1,15 |
|            | <b>200</b>                                         | 98,12                       | 0,21 | 0,22 |

n: deney sayısı, l: enjeksiyon sayısı

#### 4.1.3.4. Kararlılık

OTA, CIT ve ZEA’nın her biri için kısa dönem, uzun dönem ve dondurma-çözdürme kararlılıkları 3 farklı derişimde (10, 100 ve 200 ng/ml) ve 6 kez (n=6) enjeksiyonları yapılarak incelenmiştir. Kısa dönem kararlılığı için hazırlanan çözeltiler 24 saat karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Uzun dönem kararlılık çalışmalarında hazırlanan çözeltiler 15 gün süreyle -20°C’de tutulmuştur. Dondurma-çözdürme kararlılıkları ise çözeltilerin üç döngü olarak -20°C’de dondurulması ve daha sonra oda sıcaklığında çözülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Analiz öncesi tüm çözeltiler 0,2

$\mu\text{m}$ 'lik şırınga filtresinden süzölmüştür. OTA, CIT ve ZEA'nın farklı saklama koşullarındaki kararlılıkları için hesaplanan %Geri Kazanım ve %BSS değeri Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. Çizelge 4.6'daki kararlılık verileri incelendiğinde genel olarak ZEA'nın 10 ng/ml'lik seyreltik çözeltisinin kısa dönem kararlılığı (%Geri Kazanım= %125,18) dışındaki diğer mikotoksinlerin belirtilen koşullarda uygun % Geri Kazanım değeri ile kararlı oldukları bulunmuştur.

**Çizelge 4.6.** OTA, CIT ve ZEA'nın farklı saklama koşullarındaki kararlılıkları

| Teorik<br>Derişim<br>(ng mL <sup>-1</sup> ) |     | Kısa Dönem Kararlılık<br>(24 saat, oda sıcaklığında) |      | Uzun Dönem Kararlılık<br>(15 gün, -20°C) |      | Dondurma-Çözdürme<br>Kararlılığı (3 döngü) |      |
|---------------------------------------------|-----|------------------------------------------------------|------|------------------------------------------|------|--------------------------------------------|------|
|                                             |     | %Geri Kazanım<br>(ortalama±SS)                       | %BSS | %Geri Kazanım<br>(ortalama±SS)           | %BSS | %Geri Kazanım<br>(ortalama±SS)             | %BSS |
| CIT                                         | 10  | 91,27±1,60                                           | 1,75 | 92,33±0,71                               | 0,77 | 93,88±1,06                                 | 1,13 |
|                                             | 100 | 87,61±0,23                                           | 0,26 | 93,36±0,25                               | 0,27 | 94,04±0,40                                 | 0,43 |
| ZEA                                         | 10  | 125,18±2,77                                          | 2,22 | 106,97±3,02                              | 2,83 | 102,15±2,90                                | 2,84 |
|                                             | 100 | 100,45±1,35                                          | 1,35 | 95,98±1,18                               | 1,23 | 96,01±0,56                                 | 0,58 |
| OTA                                         | 10  | 100,98±1,13                                          | 1,12 | 93,73±0,68                               | 0,72 | 94,15±1,48                                 | 1,57 |
|                                             | 100 | 99,82±0,41                                           | 0,41 | 93,50±0,18                               | 0,19 | 94,03±0,38                                 | 0,40 |

#### 4.1.4. Geliştirilen UHPLC-FLD yönteminin gıda örneklerine uygulanması

OTA, CIT ve ZEA'nın aynı anda tayini için geliştirilen ve validasyonu yapılan UHPLC-FLD yöntemi öğütölmüş mısır, tam buğday unu, mısır gevreği, tahıllı kraker, küflü mısır unu, öğütölmüş pirinç, öğütölmüş buğday, pirinç unu ve patates unu gibi çeşitli gıdalara uygulanmıştır. Çizelge 4.7'de analiz edilen gıda örneklerinde OTA, CIT ve ZEA ile miktarları ile ilgili sonuçlar verilmiştir. Deneyler 2 paralel olarak yürütölmüş ve örneklerin 3'er kez enjeksiyonları yapılmıştır. Öğütölmüş mısır, mısır gevreği, tahıllı kraker ve küflü mısır unu örneklerindeki CIT miktarları 4,40–9,97  $\mu\text{g/kg}$  aralığında bulunmuştur. ZEA, tam buğday unu, mısır gevreği ve patates unu hariç diğer tüm örneklerde 8,43–38,99  $\mu\text{g/kg}$  miktarları aralığında bulunmuştur. OTA'ya sadece küflü mısır unu örneğinde rastlanmış (0,72  $\mu\text{g/kg}$ ) ve diğer gıda örneklerindeki OTA miktarları ise bu yöntem ile tespit edilememiş yani gözlenebilme sınırının altında bulunmuştur.

**Çizelge 4.7.** Gıda örneklerindeki OTA, CIT ve ZEA miktarları ( $\mu\text{g/kg}$ ) ( $n=5$ )

| Gıda örnekleri   |           | CIT  | ZEA               | OTA               |
|------------------|-----------|------|-------------------|-------------------|
| Öğütülmüş Mısır  | $\bar{X}$ | 4,40 | 13,51             | <LOD <sup>a</sup> |
|                  | SS        | 0,16 | 0,17              | —                 |
|                  | %BSS      | 3,66 | 1,28              | —                 |
| Tam Buğday Unu   | $\bar{X}$ | <LOD | <LOQ <sup>b</sup> | <LOD              |
|                  | SS        | —    | —                 | —                 |
|                  | %BSS      | —    | —                 | —                 |
| Mısır Gevreği    | $\bar{X}$ | 4,78 | <LOD              | <LOD              |
|                  | SS        | 0,29 | —                 | —                 |
|                  | %BSS      | 6,09 | —                 | —                 |
| Tahıllı Kraker   | $\bar{X}$ | 9,97 | 8,78              | <LOD              |
|                  | SS        | 0,12 | 0,06              | —                 |
|                  | %BSS      | 1,19 | 0,68              | —                 |
| Küflü Mısır Unu  | $\bar{X}$ | 4,70 | 31,21             | 0,72              |
|                  | SS        | 0,12 | 1,53              | 0,02              |
|                  | %BSS      | 2,67 | 4,92              | 2,50              |
| Öğütülmüş Pirinç | $\bar{X}$ | <LOD | 38,99             | <LOD              |
|                  | SS        | —    | 1,71              | —                 |
|                  | %BSS      | —    | 4,38              | —                 |
| Öğütülmüş Buğday | $\bar{X}$ | <LOD | 9,07              | <LOD              |
|                  | SS        | —    | 0,07              | —                 |
|                  | %BSS      | —    | 0,82              | —                 |
| Pirinç Unu       | $\bar{X}$ | <LOD | 8,43              | <LOD              |
|                  | SS        | —    | 0,36              | —                 |
|                  | %BSS      | —    | 4,34              | —                 |
| Patates unu      | $\bar{X}$ | <LOD | <LOD              | <LOD              |
|                  | SS        | —    | —                 | —                 |
|                  | %BSS      | —    | —                 | —                 |

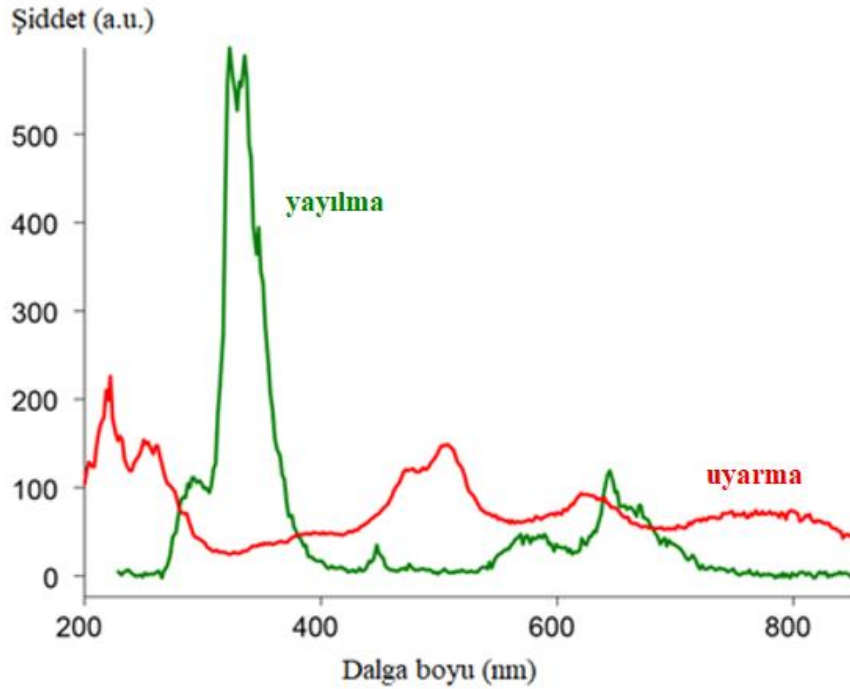
<sup>a</sup><LOD: Mikotoksin miktarı LOD değerinin altında bulunmuştur.

<sup>b</sup><LOQ: Mikotoksin miktarı LOQ değerinin altında bulunmuştur.

## 4.2. CTV Deneyleri

### 4.2.1. UHPLC-FLD yöntem optimizasyon çalışmaları

Öncelikle doğal floresans özelliğe olan CTV'nin maksimum floresans dalga boyu değerlerini belirlemek için çalışmalar yapılmıştır. Bu amaç ile metil alkolde hazırlanan 100 ng/ml'lik CTV standart çözeltisi kullanılarak floresans spektrofotometri cihazında dalga boyu taraması Şekil 4.9'da gösterildiği gibi yapılmıştır. Floresans spektrumunda yayılma dalga boyu 220-800 nm dalga boyu aralığında taranmıştır. Uyarma dalga boyu ise 200-800 nm aralığında taranmıştır. Tarama sonuçlarına göre CTV için en uygun dalga boyları  $\lambda_{uy}$ : 220 nm ve  $\lambda_{yay}$ : 340 nm olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.9. CTV için floresans uyarma ve yayılma spektrumu

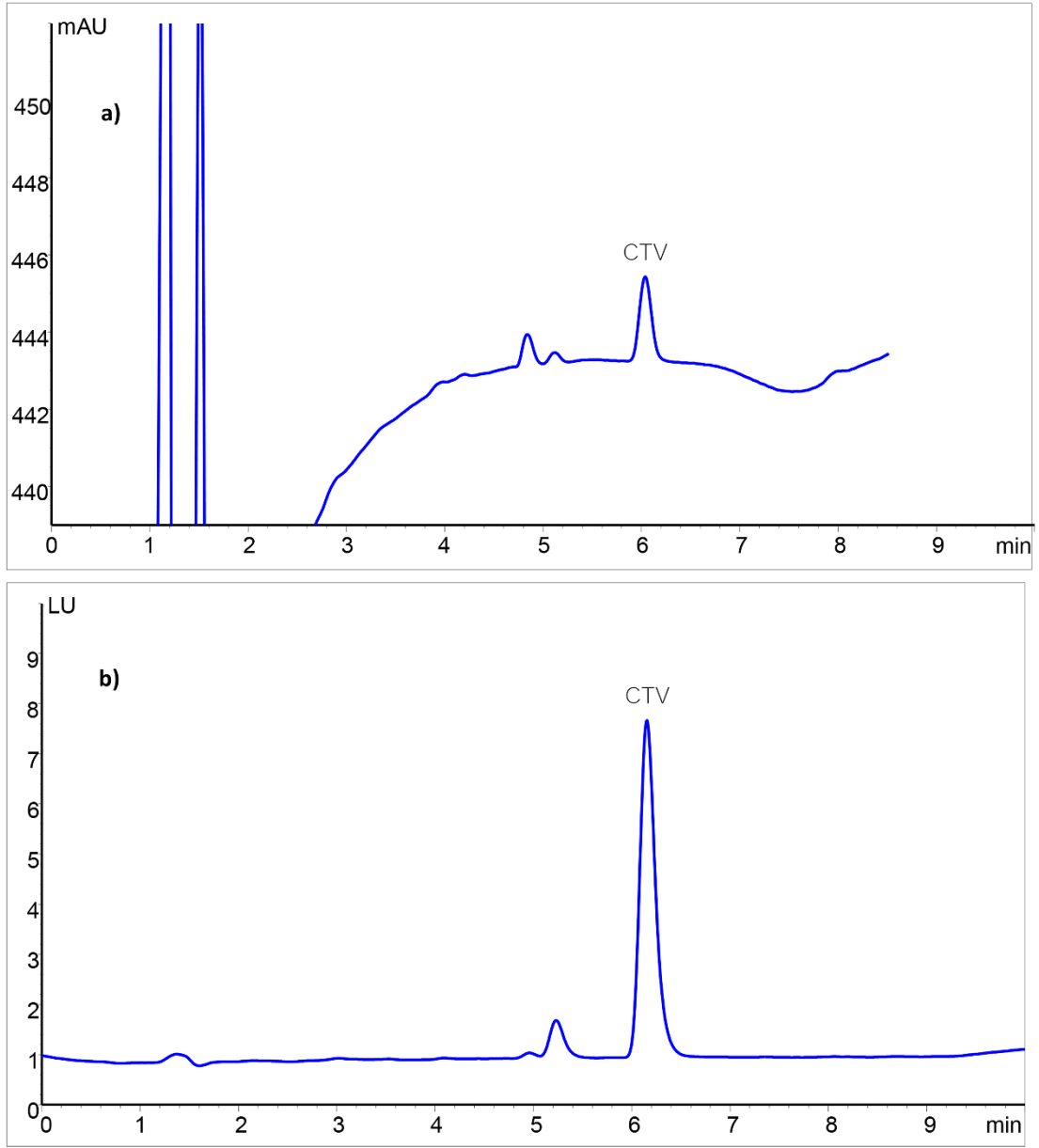
CTV için en uygun UHPLC-FLD koşullarının belirlenmesi amacıyla akış hızı, kolon sıcaklığı ve enjeksiyon hacmi gibi parametreler optimize edilmiştir. Çalışmalarda metil alkol, asetonitril ve farklı oranlarda asitler ile çeşitli hareketli faz bileşimleri denenmiştir. Ayrıca deneylerde IS olarak doğal floresans özellik gösteren parabenler (etil, propil ve bütül), diflunisal, naproksen sodyum, ibuprofen, kafein, şirincik asit, vanilik asit, salisilik asit ve karbamezapin gibi pek çok madde denenmiştir. Ancak bu IS'lerin hiçbir

çalışılan UHPLC koşullarında uygun olmamıştır. IS'lerin ya gıdalardaki diğer bileşenler ile karıştığı ya da CTV pik alanının azalmasına hatta bazılarının reaksiyona girip CTV pikinin kaybolmasına neden olduğu görülmüştür. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu elde edilen optimum UHPLC-FLD koşulları Çizelge 4.8'de gösterilmektedir.

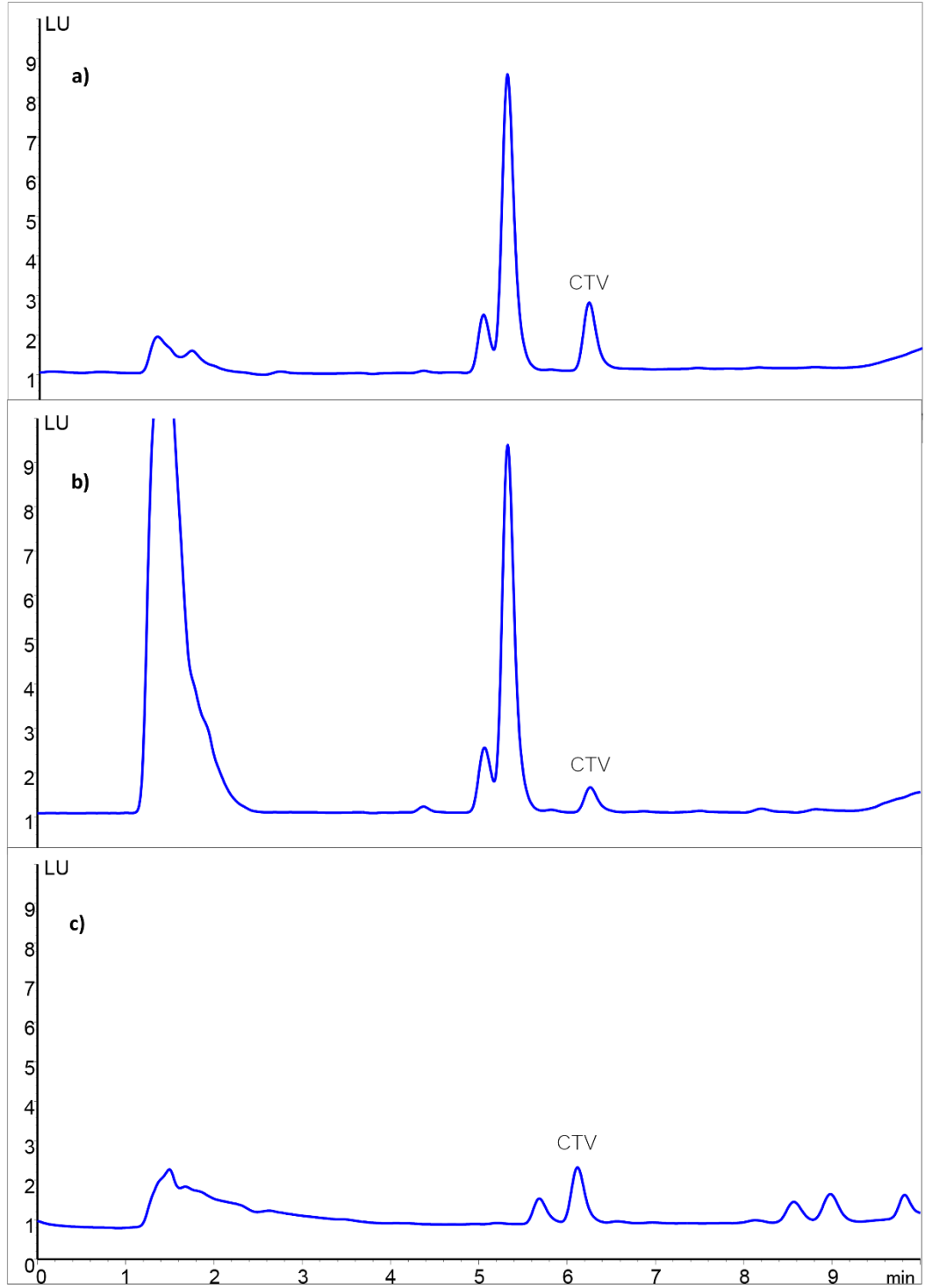
**Çizelge 4.8.** *Gıdalarda CTV tayininde kullanılan optimum UHPLC-FLD koşulları*

|                                   |                                                    |           |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------|-----------|
| <b>Kolon:</b>                     | Zorbax Extend C18 kolon (2,1 mm x 100 mm x 1,8 µm) |           |
| <b>Kolon sıcaklığı:</b>           | 30°C                                               |           |
| <b>Hareketli faz:</b>             | Asetonitril:su:formik asit (55:45:0,1; h/h/h)      |           |
| <b>Akış hızı:</b>                 | 0 dk:                                              | 0,2 ml/dk |
|                                   | 4 dk:                                              | 0,2 ml/dk |
|                                   | 4,01 dk:                                           | 0,3 ml/dk |
|                                   | 10 dk:                                             | 0,3 ml/dk |
| <b>Enjeksiyon hacmi:</b>          | 10 µl                                              |           |
| <b>FLD dedektör dalga boyu:</b>   | $\lambda_{uy}$ : 220 nm, $\lambda_{yay}$ : 340 nm  |           |
| <b>Oto örnekleyici sıcaklığı:</b> | 4°C                                                |           |

Optimum UHPLC-FLD koşullarında 220 nm UV dalga boyunda ve  $\lambda_{uy}$ : 220 nm,  $\lambda_{yay}$ : 340 nm FLD dalga boylarında elde edilen 100 ng/ml’lik CTV standart çözeltilerine ait kromatogramlar Şekil 4.10(a) ve (b)’de gösterilmektedir. Şekil 4.10’dan da görüldüğü gibi floresans dedektör ile elde edilen CTV pikinin alanının UV dedektöründen 3,9 kat daha iyi olduğu belirlenmiştir. Bu optimum koşullarda CTV 6,20 dakika alıkonma zamanında belirlenmiştir. Şekil 4.11 (a), (b), (c)’de ise optimum UHPLC-FLD koşullarında gerçekleştirilen bazı gıdalarda CTV tayinine ait kromatogramlar gösterilmektedir. CTV için geliştirilen UHPLC-FLD yönteminde uygun örnek hazırlama yöntemi için farklı iki yöntem denenmiştir. İlk yöntem Almeida vd. (2012)’e göre ekstraksiyon ve C18 SPE ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde göre, 15 gr örnek üzerine 50 ml diklorometan eklenerek 30 dk karıştırılmış ve sonrasında çözelti sinterli cam krozeden vakum altında süzölmüştür. Elde edilen süzöntünün 20 ml’si önceden 5 ml diklorometan ile şartlandırılmış C18 SPE kolona yüklenmiştir. Daha sonra 5 ml diklorometan ile elüe edilmiştir. Elüsyon sonrası elde edilen kısım rotaride uçurularak 2 ml metil alkol ile çözülmüş, 0,2 µm şırınga filtresinden süzölerek UHPLC enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Diğer yöntemde ise Chung vd. (1999)’e göre 50 g örnek üzerine 40 ml su eklenerek homojenizatörde homojenize edildikten sonra 100 ml’ye su ile seyreltiltilerek 5 M HCl ile pH 2-3’e ayarlanmıştır. Daha sonra üzerine 10 g celite 545 ve 200 ml kloroform ve eklenerek 30 dk karıştırılarak ekstraksiyon yapılmıştır. Daha sonra süzgeç kağıdından süzme işlemi sonrasında kloroform fazı rotada uçurulmuş ve kalıntı 5 ml kloroformda çözölerek UHPLC’ye enjekte edilmiştir. Bu iki örnek hazırlama yöntemlerinden ilkinde UHPLC’de belirlenen CTV alanının çok fazla arttığı yani ekstraksiyon, saflaştırma ve uçurma sırasında CTV’nin bozulduğu belirlenmiştir. Diğer kloroformlu yöntem ise hem daha zahmetli olduğundan hem de örneklerde CTV piklerinin belirlenememesinden dolayı tercih edilmemiştir.



**Şekil 4.10.** 100 ng/ml CTV standardının optimum UHPLC-FLD koşullarında a) 220 nm'de UV dedektör ile, b)  $\lambda_{uy}:220$  nm,  $\lambda_{yay}:340$  nm dalga boyu değerlerinde floresans dedektör ile elde edilen kromatogramları



**Şekil 4.11.** a) Öğütülmüş pirinç, b) öğütülmüş buğday, c) pirinç unu örneklerinin optimum UHPLC-FLD koşullarındaki kromatogramları

Optimize edilen bu UHPLC-FLD koşulları doğrultusunda yöntemin validasyon çalışmaları yapılmıştır.

#### 4.2.2. CTV için UHPLC-FLD validasyon çalışmaları

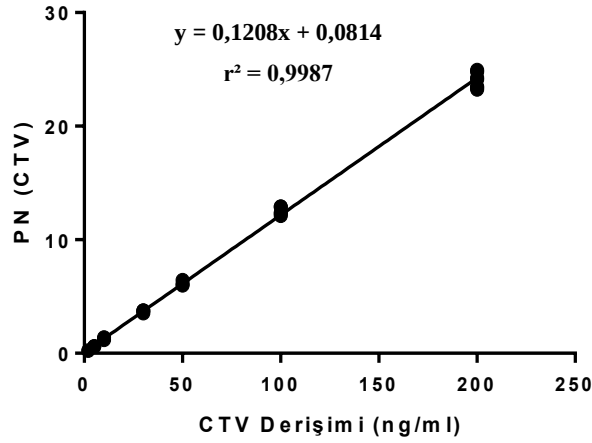
CTV için geliştirilen UHPLC-FLD yöntemi doğrusallık, LOD, LOQ, kesinlik, doğruluk, kararlılık (stabilite) ve sağlamlık parametrelerine göre valide edilmiştir (ICH, 1996).

##### 4.2.2.1. Doğrusallık ve duyarlılık

UHPLC-FLD yönteminin doğrusallık çalışmalarında CTV'nin 2-200 ng/ml derişim aralığında 7 farklı derişimde çözeltileri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Bu çözeltilerin 3 set olarak 3 günde ve 6'şar kez (n=6) enjeksiyonları yapılmıştır. Yöntemin duyarlılığı, LOD ve LOQ değerlerine göre değerlendirilmiştir. Buna göre LOD ve LOQ değerleri sırasıyla, 0,41 ve 1,25 µg/kg'dir. Sonuç olarak yüksek korelasyon katsayıları ( $r^2$ ) ile doğrusal aralıkta grafikler elde edilmiştir (Bknz. Çizelge 4.9, Şekil 4.12).

**Çizelge 4.9.** Optimum UHPLC-FLD koşullarında CTV'nin 2-200 ng/ml derişim aralığında elde edilen regresyon analiz sonuçları

|                      | Gün İçi (n=6)    |                 |                 | Günler Arası<br>(n=18) |
|----------------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------------|
|                      | 1. gün           | 2. gün          | 3. gün          |                        |
| <b>Eğim±SS</b>       | 0,1245 ± 0,0001  | 0,1208 ± 0,0006 | 0,1171 ± 0,0004 | 0,1208 ± 0,0004        |
| <b>Kesim±SS</b>      | -0,0420 ± 0,0103 | 0,2274 ± 0,0483 | 0,0725 ± 0,0328 | 0,0814 ± 0,0345        |
| <b>r<sup>2</sup></b> | 1,0000           | 0,9989          | 0,9994          | 0,9987                 |



**Şekil 4.12.** CTV'nin UHPLC-FLD yöntemi ile günler arası sonuçlara göre çizilen kalibrasyon grafiği (n=18)

#### 4.2.2.2. Kesinlik

Yöntemin kesinliği, gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik ile değerlendirilmiştir. CTV çözeltileri 10, 30 ve 100 ng/ml olarak 3 farklı derişimde hazırlanmış ve üç ayrı günde 6'şar kez (n=6) enjekte edilmiştir. Deneylerde PN değerleri, standart CTV pik alanlarının piklerin alıkonma sürelerine bölünmesi ile hesaplanmıştır. Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi ile bulunan ortalama, standart sapma ve %BSS değerleri Çizelge 4.10'da verilmiştir. Çizelge 4.10'dan da görüldüğü gibi CTV için gün içi ve günler arası analizlerden elde edilen %BSS değerleri %3'den küçüktür yani tekrarlanabilirliği yüksek sonuçlar elde edilmiştir.

**Çizelge 4.10.** CTV için kesinlik sonuçları

| 10 ng/ml CTV  | Gün İçi (n=6) |        |        | Günler Arası (n=18) |
|---------------|---------------|--------|--------|---------------------|
|               | 1. gün        | 2. gün | 3. gün |                     |
| $\bar{X}$     | 1,13          | 1,18   | 1,20   | 1,17                |
| SS            | 0,01          | 0,01   | 0,01   | 0,03                |
| %BSS          | 1,13          | 1,04   | 0,39   | 2,69                |
| 30 ng/ml CTV  | Gün İçi (n=6) |        |        | Günler Arası (n=18) |
|               | 1. gün        | 2. gün | 3. gün |                     |
| $\bar{X}$     | 3,43          | 3,41   | 3,45   | 3,43                |
| SS            | 0,04          | 0,03   | 0,01   | 0,03                |
| %BSS          | 1,14          | 0,83   | 0,11   | 0,94                |
| 100 ng/ml CTV | Gün İçi (n=6) |        |        | Günler Arası (n=18) |
|               | 1. gün        | 2. gün | 3. gün |                     |
| $\bar{X}$     | 12,22         | 12,21  | 12,22  | 12,21               |
| SS            | 0,01          | 0,02   | 0,03   | 0,02                |
| %BSS          | 0,08          | 0,18   | 0,28   | 0,19                |

#### 4.2.2.3. Doğruluk

Yöntemin doğruluğu, boş örnek olarak seçilen patates ununa ekstraksiyon işleminden önce derişimi bilinen CTV standart çözeltisi eklenerek % Geri Kazanımın hesaplanması ile değerlendirilmiştir. Geri kazanım için patates ununa 4, 10 ve 100 ng/ml olacak şekilde metil alkol ile hazırlanmış CTV standart çözeltileri eklenmiştir. Daha sonra tezin Gereçler ve Yöntemler bölümünde yer alan “3.6.2. CTV için örnek hazırlama” kısmında anlatıldığı gibi ekstraksiyon işlemi yapılmış ve deneyler 2 paralel olarak yürütülerek üçer kez enjekte edilmiştir. CTV’nin farklı derişimlerdeki % Geri Kazanım, %BSS ve SS değerleri Çizelge 4.11’de verilmiştir. Sonuç olarak %87,02-102,01 aralığında olan kabul edilebilir % Geri Kazanım değerleri elde edilmiştir.

**Çizelge 4.11.** Farklı derişimlerdeki CTV’nin, %Geri Kazanım, SS ve %BSS sonuçları

| Eklenen CTV Derişimi (ng/ml) | %Geri Kazanım (n=2, l=3) | SS   | %BSS |
|------------------------------|--------------------------|------|------|
| 4                            | 102                      | 1,64 | 1,61 |
| 10                           | 91                       | 0,18 | 0,20 |
| 100                          | 87                       | 2,39 | 2,56 |

l: enjeksiyon sayısı, n: deney sayısı

#### 4.2.2.4. Kararlılık

CTV'nin kararlılık çalışmaları, kısa dönem, uzun dönem ve dondurma-çözdürme olmak üzere metil alkol içerisinde hazırlanan çözeltiler için iki farklı derişimde (10 ve 100 ng/ml) yapılmıştır. Kısa dönem kararlılık için hazırlanan CTV standart çözeltileri 24 saat karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Uzun dönem kararlılık çalışmalarında ise hazırlanan çözeltiler -20°C'de 30 gün süreyle tutulmuştur. Dondurma-çözdürme kararlılıkları için ise CTV çözeltileri üç döngü olarak -20°C'de 24 saat bekletilmiş daha sonra oda sıcaklığında çözdürülerek deneyler gerçekleştirilmiştir. Kararlılık çalışmalarında elde edilen %Geri Kazanım ve %BSS değerleri Çizelge 4.12'de verilmiştir. Çizelge 4.12'ye göre CTV uzun dönem ve dondurma-çözdürme koşullarında oldukça kararlıdır.

**Çizelge 4.12.** CTV'nin farklı koşullardaki kararlılık sonuçları

| CTV Derişimi (ng/ml) | Kısa Dönem Kararlılık (Oda Sıcaklığında, 24 Saat) |      | Uzun Dönem Kararlılık (30 Gün, -20 °C) |      | Dondurma-Çözdürme Kararlılığı (3 Döngü) |      |
|----------------------|---------------------------------------------------|------|----------------------------------------|------|-----------------------------------------|------|
|                      | %Geri Kazanım (ortalama±SS)                       | %BSS | %Geri Kazanım (ortalama±SS)            | %BSS | %Geri Kazanım (ortalama±SS)             | %BSS |
| 10                   | bozulma                                           | —    | 89,31±1,46                             | 1,64 | 97,76±0,43                              | 0,44 |
| 100                  | bozulma                                           | —    | 88,33±0,30                             | 0,34 | 103,84±0,14                             | 0,14 |

Ancak CTV'nin 24 saat oda sıcaklığında bekletildiğinde (kısa dönem kararlılık) bozulduğu görülmüştür. Bu yüzden tüm CTV deneyleri UHPLC cihazının oto örnekleyici sıcaklığı 4°C'de tutularak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca CTV'nin oda sıcaklığındaki kararlılığının kötü olması sebebiyle tüm CTV çözeltileri, günlük olarak ve -20°C'de tutulan CTV stok çözeltisinden hazırlanmıştır.

#### 4.2.2.5. Sağlamlık

CTV için UHPLC-FLD yönteminin sağlamlığını göstermek amacıyla hareketli fazın başlangıç akış hızı, kolon sıcaklığı, hareketli fazdaki asetonitril bileşimi ve enjeksiyon hacmi gibi parametrelerde küçük değişiklikler yapılmıştır. Bu parametreler; başlangıç akış hızı 0,15 ve 0,25 ml/dk, asetonitril bileşimi %54 ve %56, kolon sıcaklığı 25°C ve 35°C ve enjeksiyon hacmi 4 ve 6 µl yapılarak değiştirilmiş ve elde edilen sonuçlar optimum koşullar altındaki sonuçlar ile karşılaştırılmış ve sağlamlık sonuçları uygun bulunmuştur. Yöntemin sağlamlığı %BSS ve ortalamanın standart hata (SH)

değerleri ile verilmiş ve bu değerlerin düşük bulunması yöntemin sağlamlığının bir göstergesidir (Çizelge 4.13).

**Çizelge 4.13.** Metil alkolde hazırlanmış 100 ng/ml CTV'nin sağlamlık sonuçları

| Parameter                          | %BSS | SH   |
|------------------------------------|------|------|
| <b>Başlangıç akış hızı (ml/dk)</b> |      |      |
| 0,15                               | 1,21 | 0,06 |
| 0,25                               | 0,49 | 0,03 |
| <b>Kolon sıcaklığı (°C)</b>        |      |      |
| 25                                 | 0,64 | 0,04 |
| 35                                 | 0,79 | 0,05 |
| <b>Asetonitril bileşimi</b>        |      |      |
| %54                                | 1,46 | 0,08 |
| %56                                | 1,08 | 0,07 |
| <b>Enjeksiyon hacmi (µl)</b>       |      |      |
| 4                                  | 1,41 | 0,06 |
| 6                                  | 1,19 | 0,08 |

#### 4.2.3. Geliştirilen UHPLC-FLD yönteminin gıda örneklerine uygulanması

CTV tayini için geliştirilen, optimizasyonu ve validasyonu yapılan UHPLC-FLD yöntemi pirinç unu, öğütülmüş pirinç, öğütülmüş buğday, buğday unu, patates unu, öğütülmüş mısır ve küflü mısır unu örneklerine uygulanmıştır. Çizelge 4.14'den de görüldüğü gibi 7 örnekteki CTV miktarları 53,34-229,36 µg/kg arasında bulunmuştur. Küflü mısır ununda ise CTV miktarı diğer örneklerden çok daha fazla (4438,30 µg/kg) bulunmuştur.

**Çizelge 4.14.** *Gıda örneklerindeki CTV miktarları ( $\mu\text{g/kg}$ ) ( $n=5$ )*

| Örnek            | $\bar{X}$ | SS    | %BSS |
|------------------|-----------|-------|------|
| Pirinç unu       | 192,75    | 0,72  | 0,37 |
| Öğütülmüş pirinç | 229,36    | 4,91  | 2,14 |
| Öğütülmüş buğday | 73,76     | 1,68  | 2,28 |
| Buğday unu       | 53,34     | 0,85  | 1,60 |
| Tam buğday unu   | 74,69     | 0,42  | 0,56 |
| Patates unu      | —         | —     | —    |
| Öğütülmüş mısır  | 71,19     | 2,19  | 3,08 |
| Küflü mısır unu  | 4438,30   | 54,51 | 1,23 |

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında ilk bakışta küflenmenin getirdiği ekonomik zarar olarak görülen ancak daha sonraları ve özellikle günümüz çağında insan ve hayvan sağlığı açısından kanserojenik ve diğer pek çok olumsuz sağlık problemi ile gündeme gelmiş olan mikotoksinlerin tayinine yönelik deneyler yapılmıştır. Bu doğrultuda insan vücuduna mikotoksin alımı çoğunlukla gıdalar yolu ile olduğundan gıdalarda en sık rastlanılan mikotoksinlerden olan OTA, CIT, ZEA ve CTV tayinleri için gelişmiş bir UHPLC-FLD sistemi kullanılarak yeni nesil UHPLC kolonlarında deneyler yürütülmüştür. Mikotoksinlerin tayinlerinde HPLC yöntemi sıkça kullanılmaktadır. Ancak son zamanlarda UHPLC yöntemi gelişmiş cihaz teknolojisi sayesinde HPLC'nin yerini almaya başlamıştır. UHPLC, kısa analiz süresi yönünden sağladığı avantaj dolayısıyla deneylerde daha az çözücü harcanması ile hem maliyet açısından hem de daha yeşil teknoloji olması nedenleri ile tercih edilmektedir. Özellikle de düşük miktarlardaki sağlığa zararlı olan mikotoksinlerin tayininde genellikle kütle spektrometresi (MS) ve floresans dedektörleri çok fazla kullanılmaktadır. Artık MS dedektörlerinin birçok araştırma merkezleri ile gıda kontrol laboratuvarlarında bulunmalarına rağmen, pahalı olması, analizci tecrübesi gerektirmesi, her araştırma laboratuvarında bulunmaması ve örneklerdeki matriks etkilerinin fazla olması nedenleri ile kullanımı diğer dedektörlere göre nispeten daha sınırlıdır. Ayrıca toplum sağlığı açısından bu kadar önemli olan mikotoksinlerin tayinleri için her zaman yeni ve güvenilir analitik yöntemlere gereksinim duyulmaktadır.

Bu tez çalışmasında OTA, CIT ve ZEA'nın aynı anda tayinleri için ve CTV'nin tek olarak tayini için yeni, basit, hızlı ve duyarlı UHPLC-FLD yöntemleri geliştirilerek validasyonları yapılmıştır. Bu yöntemlerin gıdalardaki uygulaması gösterilmiştir. Yöntemler, doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, kararlılık ve sağlamlık parametreleri açısından değerlendirilerek uygun oldukları bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla; OTA için 0,24 ve 0,71 µg/kg, CIT için 0,64 ve 1,97 µg/kg, ZEA için 1,28 ve 3,90 µg/kg'dir. CTV için ise LOD ve LOQ değerleri sırasıyla, 0,41 ve 1,25 µg/kg olarak bulunmuştur.

CIT, öğütülmüş mısır, mısır gevreği, tahıllı kraker ve küflü mısır unu örneklerinde 4,40–9,97 µg/kg miktarları aralığında bulunmuştur. ZEA, tam buğday unu, mısır gevreği ve patates unu hariç diğer tüm örneklerde 8,43–38,99 µg/kg miktarları aralığında bulunmuştur. OTA sadece küflü mısır unu örneğinde 0,72 µg/kg olarak belirlenmiş ve

diğer gıda örneklerindeki OTA miktarları ise bu yöntem ile tespit edilememiş yani gözlenebilme sınırının altında bulunmuştur. CTV miktarları ise 53,34-4438,30 µg/kg arasında bulunmuştur.

Özellikle CTV ile ilgili literatürdeki çalışmalara bakıldığında floresans dedektör kullanılarak sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır ve bilginiz dahilinde tam validasyon içeren analitik çalışmalar bulunamamıştır. Araştırmalarımıza göre CTV'nin ters faz UHPLC-FLD yöntemi ile tayini ilk defa bu tez çalışmasında yapılmıştır. Ayrıca literatürde OTA, CIT ve ZEA'nın UHPLC-FLD yöntemi ile bifenil kolon kullanılarak bir arada ve 5 dakika gibi kısa bir sürede ayrıldığı bir çalışmaya da rastlanmamıştır.

Çalışmalarda örneklerin hazırlanmasında ve temizleme yöntemleri olarak C18 SPE ve mikotoksinlere özel kolonlar kullanılarak çeşitli ekstraksiyon yöntemleri denenmiş ve bunların yüzde geri kazanımları da göz önünde bulundurulduğunda deneylerde basit ekstraksiyon yöntemleri ile daha iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Bu tez kapsamında belirlenen mikotoksinlerin tayinine yönelik geliştirilmiş olan UHPLC-FLD yöntemlerinin bu tarz çalışmalarla ilgili literatüre katkı sağlayacağı ve diğer mikotoksinlerin tayinleri için de temel oluşturacağı söylenebilir. Sonuç olarak, geliştirilmiş ve valide edilmiş bu yöntemler gıda örneklerine başarılı bir şekilde uygulanmıştır ve bu yeni yöntemler mikotoksinlerin rutin miktar tayinlerinde gıda analiz laboratuvarlarında kullanılmaları için önerilebilir.

## KAYNAKÇA

- Almeida, M.I., Almeida, N.G., Carvalho, K.L., Gonçalves, G.A.A., Silva C.N., Santos, E.A., Garcia, J.C. and Vargas, E.A. (2012) Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2, ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, and citreoviridin in rice in Brazil. *Food Addit. Contam. Part A*, 29 (4), 694-703.
- Andrade, P.D., Dantas, R.R., Moura-Alves, T.L.S. and Caldas, E.D. (2017). Determination of multi-mycotoxins in cereals and of total fumonisins in maize products using isotope labeled internal standard and liquid chromatography/tandem mass spectrometry with positive ionization. *J. Chromatogr. A*, 1490, 138-147.
- Bennett, J.W. and Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16 (3), 497-516.
- Bertuzzi, T., Rastelli, S. and Pietri, A. (2015). Aspergillus and Penicillium toxins in chestnuts and derived products produced in Italy. *Food Control*, 50, 876–880.
- Bhat, R., Rai, R.V. and Karim A.A. (2010). Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 9, 57-81.
- Boevre, M., Mavungu, J.D., Maene, P., Audenaert, K., Deforce, D., Haesaert, G., Eeckhout, M., Callebaut, A., Berthiller, F., Berthiller, C.V. and Saeger, S. (2012). Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2-toxin and some masked metabolites in different cereals and cereal-derived food. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, 29 (5), 819–835.
- Carvajal-Moreno, M. (2015). Mycotoxins that affect the human cardiovascular system. *Pharm. Anal. Acta*, 6 (5), 1–7.
- Chung, III-Min, Kim, E.-Y., Paik, S.-B. and Yu, S.H. (1999). Detection of major mycotoxins from contaminated cereals (wheat, soybean and corn). *Anal. Sci. Technol.*, 12 (6), 534-539.
- Dong, M.W. and Zhang, K. (2014). Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development. *Trends Analyt. Chem.*, 63, 21-30.
- EC (European Community), 1881/2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off J. Eur. Union L.*, 364, 5-24.

- EFSA (European Food Safety Authority) (2011). Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA Journal*, 9 (6):2197, 1-124.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2012). Scientific opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. *EFSA Journal*, 10 (3):2605, 1-81.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organisation/World Health Organisation) (2001). Ochratoxin A. In: Safety evaluation of certain mycotoxins in food, Prepared by the 56th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO Food Additives Series 47, pp 281–387. World Health Organisation, Geneva, Switzerland.
- Fink-Gremmels, J. (1999). Mycotoxins: Their implications for human and animal health. *Vet. Quart.*, 21 (4), 115-120.
- Guillarme, D. and Veuthey, J.-L. (2017). Theory and practice of UHPLC and UHPLC–MS. *Handbook of Advanced Chromatography/Mass Spectrometry Techniques*, 1-38. <https://www.researchgate.net> (Erişim tarihi: 28.07.2018).
- Ibáñez-Vea, M., Corcuera, L.A., Remiro, R., Murillo-Arbizu, M.T., González-Peñas, E. and Lizarraga, E. (2011). Validation of a UHPLC-FLD method for the simultaneous quantification of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in barley. *Food Chem.*, 127, 351-358.
- ICH (International Conference on Harmonization) topic Q2B. (1996). Validation of analytical procedures: Methodology. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. ICH, Geneva, Switzerland, CPMP/ICH/281/95.
- James, A. and Zikankuba, V.L. (2018). Mycotoxins contamination in maize alarms food safety in sub-Saharan Africa. *Food Control*, 90, 372-381.
- Klötzel, M. and Lauber, U. (2017). New SPE sorbent for clean-up of fusarium toxin-contaminated cereals & cereal-based foods, bond elut mycotoxin. *Agilent Application Note*, 1-5.
- Kong, W., Wei, R., Logrieco, A.F., Wei, J., Wen, J., Xiao, X. and Yang, M. (2014). Occurrence of toxigenic fungi and determination of mycotoxins by HPLC-FLD in

- functional foods and spices in China markets. *Food Chem.*, 146, 320-326.
- Lattanzio, V.M.T., Gatta, S.D., Suman M. and Visconti A. (2011). Development and in-house validation of a robust and sensitive solid- phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenone, T- 2 and HT- 2 toxins in cereal- based foods. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 25, 1869-1880.
- Lawrence, J.F. and Scott, P.M. (1999). HPLC methods for the determination of mycotoxins and phycotoxins. *Techniques, Applications and Quality Assurance*, Chapter 10, 413-448.
- Leslie, J.F., Bandyopadhyay, R. and Visconti, A. (2005). Mycotoxins-Detection methods, management, public health and agricultural trade. *Mycoglobe Conference "Reducing impact of mycotoxins in tropical agriculture"*, 1-423.
- Li, M., Kong, W., Li, Y., Liu, H., Liu, Q., Dou, X., Ou-yang, Z. and Yang, M. (2016). High-throughput determination of multi-mycotoxins in Chinese yam and related products by ultra fast liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry after one-step extraction. *J. Chromatogr. B*, 1022, 118-125.
- Luo, Y., Liu, X. and Li, J. (2018). Updating techniques on controlling mycotoxins - A review. *Food Control*, 89, 123–132.
- Martins, C., Assunção, R., Cunha, S.C., Fernandes, J.O., Jager, A., Petta, T., Oliveria, C.A. and Alvito, P. (2018). Assessment of multiple mycotoxins in breakfast cereals available in the Portuguese market. *Food Chem.*, 239, 132–140.
- Molinié, A., Faucet, V., Castegnaro, M. and Pfohl-Leszkowicz, A. (2005). Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B1: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. *Food Chem.*, 92, 391–400.
- Nagel, D.W., Steyn, P.S. and Ferreira, N.P. (1972). Biosynthesis of citreoviridin. *Phytochemistry*, 11, 3215–3218.
- Novakova, L., Matysova, L. and Solich, P. (2006), Advantages of application of UPLC

- in pharmaceutical analysis. *Talanta*, 68, 908–918.
- Nováková, L. and Vlčková, H. (2009). A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Anal. Chim. Acta*, 656 (1–2), 8–35.
- Ok, H.E., Choi, S.W., Kim, M. and Chun, H.S. (2014). HPLC and UPLC methods for the determination of zearalenone in noodles, cereal snacks and infant formula. *Food Chem.*, 163, 252–257.
- Ostry, V., Malir, F. and Ruprich, J. (2013), Producers and Important Dietary Sources of Ochratoxin A and Citrinin. *Toxins*, 5, 1574-1586.
- Öksüztepe, G. ve Erkan, S. (2016). Mikotoksinler ve halk sağlığı açısından önemi. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 5 (2), 190-195.
- Pereira, V.L., Fernandes, J.O. and Cunha, S.C. (2014). Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends Food Sci. Technol.*, 36, 96-136.
- Rahmani, A., Jinap, S. and Soleimany, F. (2009). Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 8, 202–251.
- Rahmani, A., Jinap, S. and Soleimany, F. (2010). Validation of the procedure for the simultaneous determination of aflatoxins ochratoxin A and zearalenone in cereals using HPLC-FLD. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, 27(12), 1683–1693.
- Rocha, M.W., Resck, I.S. and Caldas, E.D. (2015). Purification and full characterisation of citreoviridin produced by *Penicillium citreonigrum* in yeast extract sucrose (YES) medium. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, 32, 1-12.
- Rocher, J.P. and Paris, J. (1987). New Mass Spectra. *Organic Mass Spectrometry*, 22, 802.
- Rosa, C.A.R., Keller, K.M., Oliveira, A.A., Almeida, T.X., Keller, L.A.M., Marassi, A.C., Kruger, C.D., Devesa, M.V., Monteiro, B.S., Nunes, L.M.T., Astoreca, A., Cavaglieri, L.R., Direito, G.M., Eifert, E.C., Lima, T.A.S., Modernell, K.G., Nunes, F.I.B., Garcia, A.M., Luz, M.S. and Oliveira, D.C.N. (2010). Production of

- citreoviridin by *Penicillium citreonigrum* strains associated with rice consumption and beriberi cases in the Maranhao State, Brazil. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, 27(2), 241–248.
- Selvaraj, J.N., Zhou, L., Wang, Y., Zhao, Y.J., Xing, F.G., Dai, X.F. and Liu, Y. (2015). Mycotoxin detection - Recent trends at global level. *J. Integr. Agric.*, 14 (11), 2265–2281.
- Shephard, G.S. (2011). Chromatographic separation techniques for determination of mycotoxins in food and feed. Woodhead Publishing Limited, 71-89.
- Shiratori, N., Kobayashi, N., Tulayakul, P., Sugiura, Y., Takino, M., Endo, O. and Sugita-Konishi, Y. (2017). Occurrence of *Penicillium brocae* and *Penicillium citreonigrum*, which produce a mutagenic metabolite and a mycotoxin citreoviridin, respectively, in selected commercially available rice grains in Thailand. *Toxins*, 9 (194), 1-12.
- Silva, L.P., Madureira, F., Vargas, E.A., Faria, A.F. and Augusti, R. (2019). Development and validation of a multianalyte method for quantification of mycotoxins and pesticides in rice using a simple dilute and shoot procedure and UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 270, 420–427.
- Stubblefield, R.D., Greer, J.I. and Shotwell, O.L. (1988). Liquid chromatographic method for determination of citreoviridin in corn and rice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71 (4), 721-724.
- Swartz, M.E. (2005). UPLC: An introduction and review. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 28, 1253–1263.
- Şenyuva, H.Z. and Gilbert, J. (2010). Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review. *J. Chromatogr. B*, 878, 115–132.
- Tunail, N. (2000). Funguslar ve mikotoksinler. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını, Sim Matbaası, Ankara, 3. Bölüm, 13. Kısım, 522 s.
- Tunçel, M., Öncü Kaya, E.M., Uysal, Ü.D. and Güray, T. (2015). HPLC fluorescence determination of ochratoxin A utilizing a double internal standard and its application to poultry feed. *Turk J Chem*, 39, 372-381.
- Turner, N.W., Subrahmanyam, S. and Piletsky, S.A. (2009). Analytical methods for

- determination of mycotoxins: A review. *Anal. Chim. Acta*, 632, 168–180.
- Vardon, P.J., McLaughlin, C. and Nardinelli, C. (2003). *Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems. Task force report* (139). Ames (IA), A.B.D.: Council of Agriculture, Science, and Technology.
- Vazquez, B.I., Fente, C., Franco, C., Cepeda, A., Prognon, P. and Mahuzier, G. (1996). Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A and citrinin in cheese by time-resolved luminescence using terbium. *J. Chromatogr. A*, 727, 185–193.
- Yavuz, O. ve Aksoy, A. (2006). Örnek hazırlamada katı faz ekstraksiyonu. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 20 (3), 259-269.
- Walter, T.H. and Andrews, R.W. (2014). Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation. *Trends Analyt. Chem.*, 63, 14–20.
- Wang, M., Jiang, N., Xian, H., Wei, D., Shi, L. and Feng, X. (2016). A single-step solid phase extraction for the simultaneous determination of 8 mycotoxins in fruits by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1429, 22–29.
- Wicklow, D.T. and Cole, R.J. (1984). Citreoviridin in standing corn infested by *eupenicillium ochrosalmoneum*. *Mycologia*, 76 (5), 959-961.
- Wicklow, D.T., Stubblefield, R.D., Horn, B.W. and Shotwell, O.L. (1988). Citreoviridin levels in *eupenicillium ochrosalmoneum*-infested maize kernels at harvest. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 (5), 1096-1098.
- Xu, B.J., Jia, X.Q., Gu, L.J. and Sung, C.K. (2006). Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. *Food Control*, 17, 271-285.
- Zain, M.E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15, 129-144.
- Zheng, M.Z., Richard, J.L. and Binder, J. (2006). A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia*, 161, 261–273.