ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YEŞİL ÇÖZÜCÜ VE ULTRASONİK DALGA DESTEKLİ DAĞITICI SIVI-SIVI-MİKROEKSTRAKSİYONUN OPTİMİZASYONU İLE PEYNİRDEKİ AFLATOKSİN MİKTARININ BELİRLENMESİ

Saadet BOZKAYA

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2024

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YEŞİL ÇÖZÜCÜ VE ULTRASONİK DALGA DESTEKLİ DAĞITICI SIVI-SIVI-MİKROEKSTRAKSİYONUN OPTİMİZASYONU İLE PEYNİRDEKİ AFLATOKSİN MİKTARININ BELİRLENMESİ

Saadet BOZKAYA

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. A. Ezgi ÜNLÜ BÜYÜKTOPCU

Aflatoksinler, *Aspergillus* cinsi küfler tarafından üretilen potansiyel toksik, kanserojen sekonder metabolitlerdir. Aflatoksin M1 (AFM1) B1'in hidroksillenmiş türevidir ve kontamine olmuş besin ile birlikte emziren insan ve hayvanların sütlerine geçmektedir. Dondurma, kurutma, fermantasyon, ve pastörizasyon gibi işlemler ile AFM1 miktarı azaltılamamaktadır, dolayısıyla tespiti çok önemlidir. AFM1 analizinde yüksek miktarda toksik organik çözücü ve maliyetli immunoaffinite kolon kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında ayırıcı kolon kullanımı gerektirmeyen ve organik çözücü yerine yeni nesil yeşil çözücüler olan Derin Ötektik Çözücüler (Deep Eutectic Solvents, DES) kullanıldığı ultrasonik dalga destekli dağıtıcı sıvı-sıvı mikroektraksiyon (UDD-DSSME) yöntemi geliştirilmiştir. Bu amaçla literatürde daha önce incelenmemiş olan farklı türde mentol bazlı DES'ler incelenmiş ve en iyi sonuç mentol:hekzanoik asit (1:1) ile elde edilmiştir. Mikroekstraksiyon üzerinde etkili olan parametreler olan DES hacmi, vorteks süresi, ultrasonik dalga süresi gibi paramatrelerin geri kazanım verimi (ER) üzerine etkileri incelenerek deneysel tasarımda kullanılacak seviye aralıkları belirlenmiştir. Merkezi Kompozit tasarımda faktörler sıcaklık, DES hacmi ve ultasonik dalga süresi olarak belirlenmiş ve cevap olarak zenginleştirme faktörü (EF) incelenmiştir. ANOVA analizi sonucunda cevabı en iyi ifade eden denklemin ikinci dereceden polinom olduğu belirlenmiştir (R^2=0.9863). Optimum koşullar DES miktarı 207.18 uL, ekstraksiyon süresi 7.98 dk, sıcaklık 52°C olarak belirlenmiş ve bu koşullarda EF 10.22 ± 0.31 ER değeri ise %99.43 ± 2.53 olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemin tespit limiti (LOD) 0.0038 ppb, ölçüm limiti (LOQ) 0.0127 ppb, lineer aralığı 0.0127-0.5 ppb ve tekrarlanabilirlik bağıl standart sapması (RSD) %1.90 olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yönteminin kantitatif özelliklerinin geleneksel yöntem ve literatür ile kıyaslanabilir ve uygun olduğu belirlenmiştir.

Aralık 2024, 65 sayfa

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin M1, peynir, ultrasonik dalga, derin ötektik çözücüler, sıvı-sıvı mikroekstraksiyon, optimizasyon

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF AFLATOXIN AMOUNT IN CHEESE BY THE OPTIMISATION OF GREEN SOLVENT AND ULTRASOUND-ASSISTED DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION

Saadet BOZKAYA

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. A. Ezgi ÜNLÜ BÜYÜKTOPCU

Aflatoxins are potentially toxic, carcinogenic secondary metabolites produced by molds of the *Aspergillus* genus. Aflatoxin M1 (AFM1) is the hydroxylated derivative of B1 and passes into the milk of lactating humans and animals along with contaminated food. The amount of AFM1 can't be reduced by processes such as freezing, drying, fermentation, and pasteurization, so its detection is crucial. AFM1 analysis requires high amount of organic solvent and high cost immunoaffinity column. In this study, ultrasonic wave-assisted dispersive liquid-liquid microextraction (UDD-DSSME) method was developed, which does not require the use of a separation column, additionally, new generation green solvents, as Deep Eutectic Solvents (DES) are used instead of toxic organic solvents. For this purpose, different types of menthol-based DESs were invesitgated for the first time and the best results were obtained with menthol:hexanoic acid (1:1). The effects of parameters such as DES volume, vortex time, ultrasound time were examined and the factor levels of the experimental design were determined. The factors of the Central Composite design, were determined as temperature, DES volume and ultrasound time and the enrichment factor (EF) was examined as response. ANOVA analysis showed that second-order polynomial ($R2 = 0.9863$) expressed the reslts best. Optimum conditions were determined as DES amount 207.18 uL, extraction time 7.98 min, temperature 52°C, and under these conditions, EF was determined as 10.22 ± 0.31 and ER value was determined as 99.43 ± 2.53 %. The limit of detection (LOD) of the developed method was determined as 0.0038 ppb, the limit of quantification (LOQ) was 0.0127 ppb, the linear range was 0.0127-0.5 ppb, and the repeatability relative standard deviation (RSD) was determined as 1.90%. The quantitative features of the developed method were forund to be comparable and compatible to the traditional method and the literature.

December 2024, 65 pages

Key Words: Aflatoxin M1, cheese, ultrasonic wave, deep eutectic solvents, liquid-liquid microextraction, optimization

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu yüksek lisans çalışmasının hayata geçirilmesi sürecinde tüm bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, desteğini esirgemeyen, fikirleriyle yoluma ışık tutan danışman hocam sayın Doç Dr. A. Ezgi ÜNLÜ BÜYÜKTOPCU' ya (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü), Biyo-Ar Lab'ta deneysel çalışmalarımda bana destek olan Abdülkadir KESKİN'e, deneysel çalışmalarımı gerçekleştirmem için fırsat verip teşvik eden Türk Standardları Enstitüsü'nün tüm yöneticileri ile TSE Kimya ve Gıda Laboratuvarı Ankara Müdürlüğü müdiresi sevgili müdürüm sayın Mehtap ŞAHİN'e, deneysel çalışmalarımı gerçekleştirmem için laboratuvar cihaz ve ekipmanları ile her türlü araştırma ve geliştirme imkanından faydalanmamı sağlayan Türk Standardları Enstitüsü Deney ve Kalibrasyon Merkezi Başkanlığı'na ve Deney Laboratuvarları Grup Başkanlığı'na, araştırmalarımın çeşitli aşamalarında pratik fikirleriyle önemli katkılarda bulunan sevgili arkadaşım Pınar DEMİRSOY'a, çalışmalarda kullandığım materyallerin güvenliğini temin eden dostum Oğuzhan UÇAN'a, analizlerimi gerçekleştirdiğim gecelerde güvende hissetmemi sağlayan TSE Ankara Merkez Yerleşkesi' nin saygıdeğer güvenlik personellerine ve İdari İşler Müdürü sayın Kutlay YILMAZ'a, araştırmalarım ve çalışmalarım sırasında pek çok fedakarlıklar gösteren ve hep arkamda durarak sonsuz destekleyen sevgili eşim Emre BOZKAYA ile canım oğlum A. Efe BOZKAYA'ya ve beni bu günlere hazırlayan kıymetli annem Hamiyet BOZKURT, rahmetli babam Cihangir BOZKURT ve sevgili ağabeyim M. Alp BOZKURT'a en samimi duygularımla teşekkür ederim.

Saadet BOZKAYA
Ankara, Aralık 2024

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI
ETİK ..... **i**
ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ **4**
2.1 Aflatoksinler **4**
2.2 Süt Ve Süt Ürünlerinde Aflatoksin **6**
2.3 Aflatoksin M1 Ayırma, Deriştirme ve Analiz Yöntemleri **8**
2.4 Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon **9**
2.5 Derin Ötektik Çözücüler ve Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu **12**
2.5.1 Hidrofobik derin ötektik çözücüler **14**
2.6 Kaynak Özetleri **15**
2.6.1AFM1'in derin ötektik çözücü destekli dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu 15
2.6.2 Derin ötektik çözücü ve ultrasonik dalga destekli dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu **16**
3. MATERYAL ve YÖNTEM **19**
3.1 Materyal **19**
3.1.1 Peynir örneğinin hazırlanması **19**
3.1.2 DES'lerin sentezi **20**
3.2 Aflatoksin M1 Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması **21**
3.2.1 Aflatoksin M1 kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması **21**
3.2.2 İkinci aşama standardın hazırlanması **21**
3.2.3 Kalibrasyon standartlarının hazırlanması **21**
3.3 Referans Yönteme Göre Analiz Numunesinin Hazırlanması **22**
3.3.1 Örnek hazırlama – ekstraksiyon **23**
3.3.2 Afla M1 kolon kromatografisi **23**
3.3.3 Elüsyon **23**
3.4 Yeşil Çözücü ve Ultrasonik Dalga Destekli Dağıtıcı Sıvı-Sıvı-Mikroekstraksiyo **25**
3.5 Deneysel Tasarım **28**
4. ARAŞTIRMA BULGULARI **30**
4.1 Analiz Yönteminin Geliştirilmesi **30**
4.1.1 HPLC kolonu etkisi **32**
4.1.2 Kolon fırını sıcaklığının etkisi **32**
4.1.3 Mobil faz akış hızının etkisi **32**
4.1.4 Mobil faz bileşiminin etkisi **32**

4.1.5 Enjeksiyon hacminin etkisi 33
4.2 Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon Üzerinde Etkili Parametrelerin İncelenmesi 34
4.2.1 DES türünün seçimi 34
4.2.2 DES hacminin etkisi 39
4.3 Ultrasonik Dalga Süresinin Etkisi 41
4.4 Vorteks Süresinin Etkisi 42
4.5 Deneysel Tasarım ve Optimizasyon 43
4.6 Metot Validasyonu 48
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 51
KAYNAKLAR 55
EKLER 61
EK 1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar 62
EK 2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar 63
EK 3 Çalışmada Kullanılan Malzemeler 64
ÖZGEÇMİŞ 65

SİMGELER DİZİNİ

ppm	Milyonda 1 analit miktarı
rpm	Dakikadaki devir sayısı
T	Sıcaklık
t	Süre, dk, st

Kısaltmalar

DES	Derin Ötektik Çözücü (Deep Eutectic Solvents)
DSSME	Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu
AFM1	Aflatoksin M1
LOD	Tespit Limiti
LOQ	Tayin Limiti
EF	Zenginleştirme Faktörü
ER	Ekstraksiyon Geri Kazanımı
SPE	Katı Faz Ekstraksiyon
ANOVA	Varyans Analizi (Analysis of Variance)
BBT	Box-Behnken tasarımı
YYY	Yanıt yüzey yöntemi
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Aflatoksin moleküllerinin yapısı 5
Şekil 3.1 Peynir örneğinin hazırlanması 19
Şekil 3.2 DES'lerin hazırlanması ve sentezlenen DES'ler 20
Şekil 3.3 Kalibrasyon noktalarının kromatogramları 22
Şekil 3.4 Çalışmada kullanılan kalibrasyon grafiği 22
Şekil 3.5 Peynirden aflatoksin M1'in immunoaffinite kolon ile elüsyonu 24
Şekil 3.6 Çözeltide diğer fazlardan ayrılan ACN fazı 26
Şekil 3.7 Arada kalan ACN fazının dörtlü fazdan ayrılması 26
Şekil 4.1 Referans standard yönteme göre alınan örnek kromatogram 31
Şekil 4.2 MDD ile hazırlanan numunelerdeki bulutsu yapı ve ardından gerçekleşen zahiri berraklıktaki faz ayrımı 34
Şekil 4.3 MOA ile hazırlanan numunelerden alınan anlamsız piklerden oluşan kromatogramlara örnek 35
Şekil 4.4 MB ile hazırlanan numunelerden alınan anlamsız piklerden oluşan kromatogramlara örnek 35
Şekil 4.5 AFM1 standard okuması (kolon zarar görmeden önce) 36
Şekil 4.6 AFM1 standard okuması (kolon zarar gördükten sonra) 36
Şekil 4.7 MO ile yapılan çalışma örneği 37
Şekil 4.8 ML ile yapılan çalışma örneği 37
Şekil 4.9 MDA ile yapılan çalışma örneği 38
Şekil 4.10 ML ile yapılan 0.05 ppb yükleme çalışması 38
Şekil 4.11 MH ile yapılan çalışma örneği 39
Şekil 4.12 Deneysel tasarım sonucu elde edilen YY grafikleri ve eşyükselti eğrileri 47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Bazı ülkelerde AFM1 limitleri 7
Çizelge 2.2 Peynir çeşitleri için üst sınır AFM1 değerleri 8
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan DES'lerin hazırlanması 20
Çizelge 3.2 Kalibrasyondan elde edilen piklerin numunedeki ppb karşılıkları 25
Çizelge 3.3 Deneysel tasarımın bağımsız değişkenleri ve seviyeleri 28
Çizelge 3.4 MKT ile oluşturulan deney setleri 29
Çizelge 4.1 HPLC sistem koşulları 30
Çizelge 4.2 Referans standard yönteme göre kullanılan numunedeki AFM1 miktarı 31
Çizelge 4.3 DES hacminin AFM1 geri kazanımına etkisi 40
Çizelge 4.4 200 µl DES hacmi ile geri kazanılan AFM1 miktarı (0.05 ppb yüklü) 40
Çizelge 4.5 Derişime bağlı geri kazanım aralıkları 41
Çizelge 4.6 Ultrasonik dalga süresinin AFM1 miktarına etkisi (kör numune-0.018 ppb) 41
Çizelge 4.7 Ultrasonik dalga süresinin AFM1 miktarına etkisi (0.05 ppb yüklü) 41
Çizelge 4.8 Vorteks süresinin AFM1 miktarına etkisi (0.05 ppb yüklü) 42
Çizelge 4.9 Tekrarlanabilirlik ve bağıl standart sapma değerleri 43
Çizelge 4.10 MKT ile oluşturulan deney setleri ve cevapları 44
Çizelge 4.11 MKT ile elde edilen ikinci dereceden polinom modelinin varyans analiz sonuçları 45
Çizelge 4.12 Optimize edilen yöntemin farklı yükleme sonuçları 48
Çizelge 4.13 Geliştirilen yöntemin kantitatif özellikleri 49
Çizelge 4.14 Farklı kaynaklardan aflatoksin analiz yöntemleri 50

1. GİRİŞ

Küfler; gıdalarda ve yemlerde sıklıkla görülen, yerleştikleri ürün üzerinde gelişimlerini tamamladıktan sonra çeşitli sekonder metabolitler üretmeye başlayan mikroorganizmalardır. Küfler tarafından üretilen sekonder metabolitler olan antibiyotikler insan sağlığı için faydalı olmakla birlikte yine küfler tarafından, uygun sıcaklık ve nem ortamında, mikotoksin adı verilen sağlığa zararlı toksinler de üretilir. Mikotoksinler kontamine oldukları besinler ve yemler vasıtasıyla insan ve hayvan sağlığını tehdit etmektedirler (Müller 1986, Reiss 1998, Akçelik vd. 2000).

Mikotoksinler canlılarda kanserojenik, teratojenik, mutajenik ya da toksik etkilere yol açarlar (Van Egmond ve Paulsch 1986). Mikotoksinlerin toksikolojik olarak en büyük önemi, canlılarda akut veya kronik zehirlenmelere neden olmalarıdır. Mikotoksin içeren yemle beslenen hayvanlardan elde edilen hayvansal gıdalar, toksinlerin insanlara geçmesine yol açmaktadır (Herrman 2002, Sener ve Yıldırım 2000).

Mikotoksinlerin yüksek dozda vücuda alınması sonucunda akut toksik etki nedeniyle kısa sürede ölüme kadar varabilen ağır hastalıklar gelişebilir veya mikotoksinlere uzun süreli düşük dozda maruziyet sebebiyle başta kronik organ hastalıkları olmak üzere bağışıklık sistemi ile ilgili bozukluklar beraberinde gebelikte kusurlu veya eksik organ oluşumu gibi rahatsızlıklar görülebilir. (Akçelik vd. 2000, Gilbert 2002, Özçelik vd. 2003). Aflatoksin B1'in 1 ppb düzeyindeki miktarının vücuda alınması karaciğerde tümör oluşması için yeterlidir (Timbrell 1989).

Mikotoksinler genel olarak yüksek sıcaklıklara dirençlidirler. Bazı mikotoksinler miseller içerisinde birikmekteyken birçoğu misel içinden substrat yüzeyine doğru yayılmış durumdadır. Bu nedenle küflenmiş gıdalar ve yemlerden misellerin uzaklaştırılması, üründe bulunan mikotoksin tehlikesini ortadan kaldırmaz.

1960'lı yıllarda, ağız yoluyla alındığında canlıda güçlü bir toksik etki gösteren ve bunun yanında kanserojen bir metabolit olan aflatoksinin keşfedilmesiyle birlikte toksik etkiye

neden olan sekonder metabolitler üzerinde sayısız araştırma yapılmıştır. Bu çalışmalar neticesinde mikotoksin sentezleyebilen 350 tür tanımlanmış olmakla birlikte, binlerce fungus türü ile yapılan çalışmalar göstermiştir ki küflerin büyük çoğunluğu mikotoksin oluşturamamaktadır. En çok mikotoksin üreten türlere bakıldığında ağırlıklı olarak *Aspergillus, Penicillium* ve *Fusarium* cinsleri dikkat çekmektedir. Bu küflerin meydana getirdiği mikotoksin sayısı 100 civarındadır (Müller 1986, Reiss 1998, Akçelik vd. 2000).

Gıdalarda bulunması muhtemel olan aflatoksinler toplumsal sağlığı tehdit etmektedir. Gelişmiş ülkeler, sağlık üzerindeki riskleri en aza indirmek için, kendi koşullarına bağlı olarak gıdalarda bulunmasına izin verilen en yüksek aflatoksin limitlerini belirlemişlerdir (Creepy 2002, Waters VICAM). Mikotoksinler ısıl işlemlerden etkilenmemektedir, dolayısıyla başlı başına aflatoksin içeren gıdaların yanında aflatoksin ile kontamine olmuş hayvanlardan elde edilen süt kullanılarak üretilen süt ürünleri ve peynirlerde de aflatoksin bulunmaktadır. (Oruç 2003). Gıdalar ve hayvan yemleri ile ilgili olarak 1995 yılında 77 ülkede başlatılan mikotoksin limitlerindeki düzenleme, Avrupa Birliği tarafından 1998 yılında tahıllar, sütler, fındık ve kuru meyveler gibi yaygın şekilde tüketilen gıdalarda toplam aflatoksin ve AFM1 miktarı için kritik limitler belirlenmesiyle resmiyet kazanmıştır (Çelik 2010).

Aflatoksinler için belirlenen tespit limitleri ve yapılan yasal düzenlemeler yüksek hassasiyetli çalışmalar gerektirdiğinden, aflatoksinlerin tespitine yönelik gerçekleştirilen araştırmalar önem kazanmaktadır. Analiz için geliştirilen yöntemler ince tabaka kromatografisi, sıvı kromatografi, gaz kromatografisi ve bu yöntemlerin kütle spektroskopisi ile birleştirilen uygulamaları, kapiler elektroforez ve ELISA yöntemleridir ancak HPLC cihazı ile yapılan sıvı kromatografisi analizinin hassasiyeti diğer yöntemlere göre daha yüksektir (Miklos vd. 2020). Kromatografik yöntemlerin kütle dedektörü ile beraber kullanıldığı uygulamalarda daha düşük ölçüm limitlerine inilebilmekle birlikte yüksek analiz maliyeti ve donanımlı teknik personel ihtiyacı nedeniyle bu yöntemlerin kullanımı sıklıkla tercih edilmemektedir (Kanık, 2018). Bu sebeplerden ötürü günümüzde aflatoksinlerin tespiti için öncelikle HPLC cihazları tercih edilmektedir.

Analitik cihazlar çoğunlukla gerçek örnek ortamında ön işlemler olmaksızın analizi gerçekleştirmede yetersiz kalmaktadırlar. Bu sebeple aranan analitin örnek ortamından çekilmesi ve zenginleştirilmesi maksadıyla çoğunlukla numunenin ön işlemlere tabii tutulması gerekmektedir (Sarafraz-Yazdi ve Amiri 2010). Bu amaçla uygulanan yöntemler çöktürme, sıvı sıvı ekstraksiyon (LLE), katı faz ekstraksiyon (SPE), bulutlanma noktası ekstraksiyonu (CPE), dağıtıcı katı faz ekstraksiyon (DSPE) yöntemleridir. Önzenginleştirme yöntemleri aranan analitin örnek içerisinden bir taşıyıcı faza aktarılması prensibine dayanmaktadır ancak bu yöntemlerin zenginleştirme faktörü değerlerinin düşük olması, analiz süresinin uzun olması, harcanan çözücü miktarının yüksek olması, geri kazanım oranının düşük olması, tespit ve ölçüm limitlerinin yüksek olması, ilk yatırım ve analiz maliyetinin yüksek olması gibi dezavatajları bulunmaktadır. Araştırmacılar geliştirdikleri yöntemlerle mevcut dezavantajları en aza indirmeyi hedeflemektedirler.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Aflatoksinler

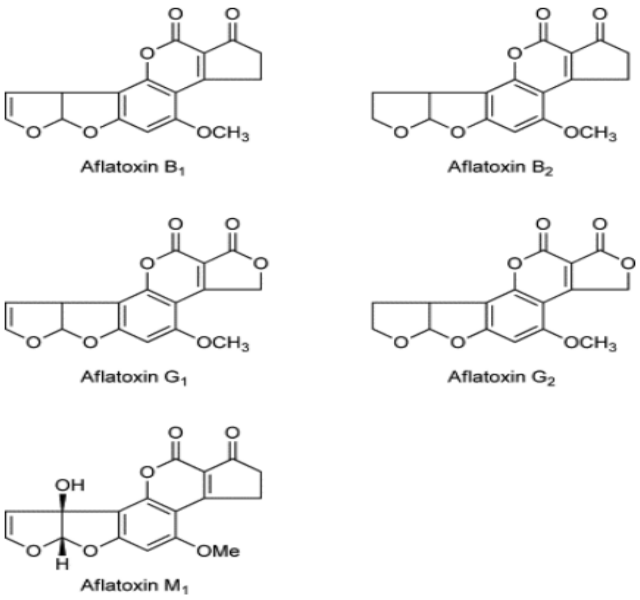
Mikotoksinler gıdalarda ve yemlerde doğal yollarla kolaylıkla oluşabildikleri ve yüksek toksik etkilere sahip oldukları için son yılların önemli bir araştırma konusudur (Goyal 2005).

Aflatoksinler mikotoksinler arasında bilinen en yüksek kanserojen etkiye sahip ve en toksik gruptur (Pittet 1998). Aflatoksinler *Aspergillus* türüne ait olan *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus'un* ürettiği potansiyel olarak toksik ve aynı zamanda kanserojen sekonder metabolitlerdir (Wood 1991). Ekinler bu küfler tarafından hasat öncesinde, hasat sonrası depolama aşamasında veya ekinlerin işlenmesi sırasında kontamine olurlar. Bulundukları ortamda 24-35 ˚C sıcaklık olması ve %7 civarında nem içeriği bulunması, aflatoksinlerin çoğalması için yeterlidir (Domijan ve Peraica 2010). Aflatoksinlerin en sık görüldüğü gıdalar kırmızıbiber, mısır, antep fıstığı, fındık, karabiber, yer fıstığı, arpa, buğday, yulaf olmasının yanında süt ve süt ürünleri ile sakatat gibi hayvansal gıdalarda da görülmektedirler (Akçelik vd. 2000, Lagana vd. 2005).

Aflatoksinler dihidro furfuran içeren kumarinler olarak tanımlanır ve 17 türevinden M1 ile M2 yanında B1, B2, G1 ve G2 öne çıkmaktadır (**Şekil 2.1**)' dir. Aflatoksinler arasında en toksik olanı Aflatoksin B1'dir (Domijan ve Peraica 2010).

AFM1 ve AFM2, Aflatoksin B1 ve Aflatoksin B2'nin hidroksillenmiş türevleridir. AFM1 ve AFM2 hayvanların da insanların da sütlerine geçer. Süt veren ineklerin Aflatoksin B1 ihtiva eden yemlerle beslenmeleri neticesinde inekler Aflatoksin B1 ile kontamine olmaktadır. Yemlerle birlikte ineklerin vücuduna bulaşan Aflatoksin B1'in bir kısmı hayvanın karaciğerinde metabolik faaliyetler sonucu Aflatoksin M1'e dönüştürülerek süt bezleri vasıtasıyla süte Aflatoksin M1 olarak salgılanmaktadırlar. Bu kontamine olmuş sütten elde edilen süt ürünleri de Aflatoksin M1 ile kontamine olmaktadırlar (Domijan ve Peraica 2010).

Aflatoksinler kloroformda, metanolde ve çok sayıda organik çözücü içerisinde tamamen çözünürken su içerisindeki çözünürlükleri oldukça düşüktür (10 ila 30 µg/mL). Aflatoksinler hayvan yemlerinde ve gıdalarda kararlıdırlar. Oksijen varlığında, 3'ten düşük ve 10'dan yüksek pH ortamlarında, UV ışığına maruz bırakıldıklarında hızlıca deaktive olurlar (Groopman ve Kensler 1988, Stoloff 1977).



Şekil 2.1 Aflatoksin moleküllerinin yapısı

Canlılarda maruz kalınan mikotoksin dozuna bağlı olarak gelişen iki farklı etkiden söz edilebilir. Birincisi mikotoksinlerin yüksek dozda alınmasının ardından akut toksik etki meydana gelmesi ile kısa sürede ağır hastalıkların gelişmesi ya da ölümün gerçekleşmesidir. İkinci etki ise mikotoksinlerin düşük dozda uzun süre alınmasıyla karaciğer, böbrek gibi kronik organ hastalıkları ile bağışıklık sistemi bozuklukları, kusurlu ve eksik organ oluşumları gibi bozuklukların görülmesidir (Akçelik vd. 2000, Gilbert 2002, Özçelik vd. 2003).

Aflatoksinler bilinen en güçlü karaciğer karsinojeni olup Aflatoksi B1 halinde diyette bulunan 1 ppb düzeyindeki miktarı karaciğerde tümör oluşması için yeterlidir (Timbrell 1989). Aflatoksinler insanlarda ve hayvanlarda teratojenik, karsinojenik, nefrotoksik, mutajenik, bağışıklık sisteminin zayıflaması ve verimde düşme gibi etkilere neden

olmaktadırlar (FAO 1989, Castecnaro ve Gregor 1998). Soğukta muhafaza etme, dondurma, ısıl işlem uygulama, fermente etme, konsantre etme, pastörize etme ve kurutma işlemleri AFM1 miktarını değiştirmemektedir, dolayısıyla kontamine olmuş süt kullanılarak üretilen süt ürünlerinde ve peynirlerde AFM1 bulunmaktadır ve tespiti büyük önem taşımaktadır. (Oruç 2003).

2.2 Süt ve Süt Ürünlerinde Aflatoksin

Sütün beslenmedeki önemi her geçen gün artmaktadır. Güncel beslenme piramidinde de en sık tüketilmesi gereken besin grubu olarak karşımıza çıkmaktadır. Sadece süt değil, süt ürünleri de benzer besin değerine sahip olup, süt ürünlerinin tüketim miktarı ve tüketim şekli toplumlara göre değişiklik göstermektedir (Tarakçı vd. 2015). Süt ve süt ürünleri, aflatoksini canlılara taşıyan en önemli gıda grubu olduğu düşünülmektedir (Stoloff 1975). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verileri göz önüne alındığında dünyada dokuz, Avrupa'da üçüncü büyük süt üreten ülke Türkiye' dir. Üretilen bu sütün kalitesinin yüksek olması, sütten üretilmiş olan peynirlerin kalitesini etkilemektedir.

Peynir, dünya çapında çok çeşitli tat ve şekillerde üretilen fermente bir süt ürünüdür ve dünyada olduğu gibi Türkiye'de de en sık tüketilen süt ürünlerindendir. İlk etapta sadece süt bileşenlerini korumanın bir yolu olarak ortaya çıkan peynir, son derece besleyici olmasının yanı sıra, epik niteliklere sahip oluşu nedeniyle kıymetli bir mutfak ürünü haline gelmiştir (Fox 1993).

Anne sütü veya ticari sütler ile süt ürünlerinde bulunma potansiyeli yüksek olan AFM1 toplumsal sağlık bakımından ciddi riskler barındırmaktadır. Bu riskleri azaltmak için gelişmiş ülkeler, süt ve süt ürünlerinde bulunmasına izin verilen en yüksek AFM1 limitlerini belirlemişlerdir. Belirlenen kritik limitler ülkelerin koşullarına bağlı olarak değişmektedir (**Çizelge 2.1**) (Creepy 2002, Waters VICAM). 1995 yılında 77 ülkede, gıdalar ve hayvan yemleri ile ilgili olarak mikotoksin limitlerinde düzenleme yapılmıştır. Avrupa Birliği tarafından 1998 yılında tahıllar, sütler, fındık ve kuru meyveler gibi yaygın şekilde tüketilen gıdalarda toplam aflatoksin ve AFM1 miktarı için kritik limitler

belirlenmiştir. Bu limit değerler, ürünlerle ilgili olarak standard gerekliliklerini karşılamak ve uluslararası arenada ticari girişimleri kontrol altında tutmak amacıyla belirlenmiştir (Çelik 2010)

Mikotoksin limit seviyeleri ile ilgili olarak tüm Avrupa ülkeleri ile Amerika Birleşik Devletleri, bazı Latin Amerika, Asya ve Afrika ülkelerinde uygulanmakta olan regülasyonların güncel bilgileri online olarak takip edilebilmektedir (Waters VICAM 2024).

Ülkemizde sütler ve süt ürünleri ile ilgili olarak getirilen yasal düzenlemelerde; çiğ sütler, ısıl işlem görmüş sütler ve süt esaslı ürünlerin imalatında kullanılan sütlerde bulunmasına izin verilen en yüksek AFM1 miktarı 0,05 µg/kg olarak belirlenmiştir. Bunun yanında bebek formülü ile devam formüllerinde, tarifine göre hazırlanmış veya tüketilmeye hazır son üründe bulunmasına izin verilen en yüksek AFM1 miktarı 0,025 µg/kg olarak belirlenmiştir (Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, 2023).

Çizelge 2.1 Bazı ülkelerde AFM1 limitleri (Waters VICAM 2024)

Ülke	Gıda	AFM1 (ppb)
ABD	Süt	0,50
Almanya	Süt	0,05
Avusturya	Süt	0,05
	Peynir	0,25
	Süt (Çocuklar için)	0,01
Belçika	Süt	0,05
Bulgaristan	Süt	0,50
Çekoslavakya	Süt (Yetişkinler için)	0,50
	Süt (Çocuklar için)	0,10
Fransa	Süt (Yetişkinler için)	0,05
	Süt (Çocuklar için)	0,03
Hollanda	Süt ve Süttozu	0,05
	Peynir	0,20
	Tereyağ	0,02
İsveç	Süt	0,05

Dünyada binden fazla peynir çeşidi olduğu bildirilmiş olmakla birlikte tanımlanabilen 400-500 arasında peynir çeşidi bulunmaktadır (Fox 1993).

Türkiye' de en yüksek miktarda üretilmekte olan ticari peynirler, beyaz, kaşar ve tulum peyniridir (Tarakçı vd. 2015). Ülkemizde üretilen peynirlerin %85 ile %89'unu beyaz, kaşar ve tulum peyniri; geriye kalan %11 ile %15' lik kısmını ise farklı çeşitlerdeki yöre peynirleri oluşturmaktadır (Tekinşen, 2003). Ülkemizde peynir üretimi 2020 yılında 767.000 ton, 2021 yılında 763.000 ton, 2022 yılında 703.000 ton ve 2023 yılında 771.000 ton şeklinde gerçekleşmiştir. Ülkemiz, peynir üretimi bakımından dünya sıralamasında ilk 5 içerisinde bulunmaktadır (TÜİK, 2024). Ülkemizde üretilen peynirlerde bulunmasına izin verilen AFM1 için üst limit değerleri **Çizelge 2.2**'de verilmiştir.

Çizelge 2.2 Peynir çeşitleri için üst sınır AFM1 değerleri (TSE Standard.Net, 2024)

Peynir Çeşidi	**Beyaz TS 591**	**Kaşar TS 3272**	**Hellim TS 12513**	**Eritme TS 2176**	**Otlu TS 13205**	**Gravyer TS 2174**	**Tulum TS 3001**	**Lor TS 13358**
AFM1 (µg/kg)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

2.3 Aflatoksin M1 Ayırma, Deriştirme ve Analiz Yöntemleri

Aflatoksin analizi için ince tabaka kromatografisi (Fallah 2010), sıvı kromatografisi (Huang vd. 2014), gaz kromatografisi ve bu yöntemlerin kütle spektroskopisi ile birleştirilen uygulamaları, kapiler elektroforez, ELISA yöntemleri kullanılmaktadır ancak HPLC ile yapılan sıvı kromatografisi analizinin hassasiyeti diğer yöntemlere göre daha yüksektir (Miklos vd. 2020). Kromatografik cihazların kütle dedektörü ile beraber kullanıldığı uygulamalar sayesinde daha düşük tespit limitlerine inilebilmektedir (Kanık, 2018).

HPLC metodu aflatoksinlerin belirlenmesinde dünyada en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. HPLC'nin yanısıra MS ile kromatografi tekniklerinin (LC-MS/MS gibi) birlikte kullanılması aflatoksinler için ölçüm limitini düşüren ve ön plana çıkan yöntemlerdendir. Son yıllarda, birçok matriks grubunda özellikle çoklu mikotoksinlerin

bir arada tayin edildiği durumlarda LC-MS/MS kullanımı yaygın hale gelmiştir. Bununla birlikte, yüksek maliyet ve donanımlı teknik personel ihtiyacı nedeniyle bu yöntemin kullanımı kısıtlı kalmıştır (Kanık, 2018). HPLC ve LC-MS/MS yöntemleri ölçüm limitlerinin düşüklüğü, elde edilen geri kazanım oranlarının yüksekliği ve metot doğrulukları açısından diğer yöntemler arasından rahatlıkla sıyrılmaktadır.

Süt ve süt ürünlerinde AFM1 analizi için herhangi bir türevlendirme basamağına ihtiyaç duyulmamakta olup floresans dedektör kullanılarak HPLC ile yeterli hassasiyette analizlenebilmektedir (Miklos vd. 2020). Geliştirilmiş hassas analiz yöntemleri bulunmasına karşın, analitik cihazlar çoğu durumda gerçek örnek ortamında analizi gerçekleştirmede başarısız olmaktadır. Bundan dolayı örneklem içerisinden aranan analiti ayırma ve zenginleştirme maksadıyla çoğunlukla numunenin ön uygulamalara tabii tutulması gerekmektedir. (Sarafraz-Yazdi ve Amiri 2010) Benzer şekilde AFM1 analizlenmeden önce diğer maddelerin potansiyel etkileşimlerini engellemek ve analitin ön deriştirme işlemi için örneğe önişlem uygulanması gerekmektedir. Bu önişlemlerin amacı analitlerin numuneden çekilebilmesi ve zenginleştirilmesidir. Bu amaçla çoğunlukla çöktürme, sıvı sıvı ekstraksiyon (LLE), katı faz ekstraksiyon (SPE), bulutlanma noktası ekstraksiyonu (CPE), dağıtıcı katı faz ekstraksiyon (DSPE) uygulanmaktadır.

Bu önzenginleştirme yöntemlerinin temeli, analitin örnek içerisinden bir taşıyıcı faza aktarılması temeline dayanır. Ancak bu yöntemlerin dezavantajı zenginleştirme faktörü değerlerinin düşük olması, sürenin çok uzun olması, çözücü miktarının litrelerce olması gibi durumlardır. Bu dezavantajların ortadan kaldırılması gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda alternatif yöntem olarak dağıtıcı sıvı sıvı mikroekstraksiyon (DSSME) yöntemi tercih edilmeye başlanmıştır.

2.4 Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon

DSSME, sıvı çözelti içinde bulunan ve çok az miktarda bulunan analitlerin zenginleştirilmesi amacıyla kullanılan, kolay ve etkin bir yöntemdir. Yöntemin amacı, sıvı içerisinde kompleks halde bulunan analitin, düşük miktarda ekstraksiyon çözücüsü

kullanılarak, ayrı bir faza geçirilmesidir (Elyas, 2011). Maliyeti düşük, zenginleştirme faktörü yüksek bir yöntemdir (Akdoğan, 2011).

Dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon Rezaee vd tarafından 2006 yılında geliştirilmiştir. Yöntemde üçlü çözücü sistemi kullanılmaktadır. Bu çözücüler ekstraksiyon çözücüsü, dağıtıcı çözücü ve analiti içeren sulu çözeltidir. Dağıtıcı çözücünün her iki çözücü ile karışabilir olması gerekmektedir (Tabaraki ve Heidarizadi 2019). Dağıtıcı çözücü olarak metanol, etanol ve aseton benzeri çözücüler kullanılmaktadır. Ekstraksiyon çözücüsü olarak ise kloroform, klorobenzen, bromobenzen gibi çözücüler kullanılmaktadır. Sulu numune ve ekstraksiyon çözücüsü içeren ortama dağıtıcı çözücü eklendiğinde bulanık bir çözelti oluşur. Ekstraksiyon çözücüsü küçük damlacıklar halinde sulu faz içinde dağılır ve iki fazın teması artırılarak kütle aktarımının verimli bir şekilde gerçekleştirilmesi sağlanır (Tabaraki ve Heidarizadi 2019). Yüksek zenginleştirme faktörü değerlerine ulaşılabilmesi için ekstraksiyon çözücüsü ve dağıtıcı çözücünün seçimi önem taşımaktadır. Bu çözücülerin hacimlerinin oranlarının iyi ayarlanması gerekmektedir. Ayrıca örneğe eklenen tuz miktarı ve örneğin pH değeri de ekstraksiyon açısından önemli parametrelerdir. Yöntemin en önemli avantajı mikro düzeydeki damlacıkların sağladığı yüksek temas yüzeyidir. Diğer avantajları arasında yüksek hız, düşük maliyet, işlem kolaylığı, yüksek ekstraksiyon geri kazanımı ile çözücü ve analit miktarının az olması sıralanabilir (Mei vd. 2019).

Yöntemin esası, analitin içinde bulunduğu sulu çözelti içerisine dağıtıcı çözelti ve ekstraksiyon çözeltisinin hızla enjekte edilmesine dayanmaktadır. Enjeksiyondan sonra, ekstraksiyon çözücüsü örnek içinde küçük damlacıklar halinde partiküller oluşturur. Bu basamakta çözelti içerisinde bulutlanmalar gözlemlenir. DSSME yönteminde ekstraksiyon çözücüsünün sulu çözelti içerisinde gözle görülebilir düzeyde belirgin şekilde damlacık ve partiküller oluşturmasında, dağıtıcı çözücünün etkisi büyüktür. Bu aşamada çok hızlı dengeye ulaşılır çünkü ekstraksiyon çözücüsü ve sulu çözelti çok büyük yüzey alanı ile birbirleriyle etkileşmektedirler. Yöntemde ekstraksiyon çözeltisinin sulu çözelti içinde dağılmasıyla hidrofobik maddeler zenginleştirilmiş olur. Elde edilen çözelti santrifüj edildiğinde ayrışan damlacıklar, santrifüj tüpünün tabanında birikir. Dipte toplanan ekstraksiyon çözücüsü, mikro enjektör yardımıyla, toplam çözeltiden

ayrıldıktan sonra analiz edilir. Bazı uygulamalarda ise analiti içeren faz toplam çözeltiden ayrıldıktan sonra çözücüsü buharlaştırılır ve uygun bir çözücü vasıtasıyla seyreltildikten sonra analiz edilir. (Elyas, 2011).

DSSME yöntemi için önemli olan basamaklar aşağıda özetlenmiştir:

Ekstraksiyon çözücüsünün seçimi: DSSME yönteminin optimize edilmesi esnasında incelenen en etkili değişken, ekstraksiyon çözücüsünün seçimidir. Ekstraksiyon çözücüsü olarak; sudan daha yüksek yoğunluğa, yüksek ekstraksiyon kapasitesine sahip ve analiz aşamasında uyumluluk gösteren sıvılar seçilir. Bunlar arasında klorobenzen, kloroform, karbon tetraklorür, tetrakloroetilen ve benzeri halojenli hidrokarbonlar kullanılmaktadır (Kartal, 2012).

Dağıtıcı çözücünün seçimi: Dağıtıcı çözücünün hem sulu fazda hem de ekstraksiyon çözücüsü içerisinde karışma özelliği olmalıdır. İki fazda da dağılabilen dağıtıcı çözücünün su ve ekstraksiyon çözücüsü ile karışım halindeyken bulutsu bir görüntüde olması gerekir.

Ekstraksiyon verimi, sulu fazla ekstraksiyon çözücüsü arasında kalan yüzeyin büyüklüğüne göre değişkenlik göstermektedir. Dağıtıcı çözücü varlığında ekstraksiyon veriminde artış gözlenir. Dağıtıcı çözücü olarak sıklıkla metanol, etanol, asetonitril, aseton ve tetrahidrofuran tercih edilir.

Ekstraksiyon çözücüsü hacminin belirlenmesi: Bu parametre zenginleştirme faktörü EF'yi direkt olarak etkiler. Ekstraksiyon çözücüsü miktarındaki artış, santrifüjden sonra elde edilen organik faz miktarında artışa neden olacağından, ekstraksiyon çözücüsü hacmi arttıkça zenginleştirme faktöründe düşüş görülmektedir. Bundan dolayı ekstraksiyon çözücüsü miktarını mümkün olduğunca düşük tutmak, zenginleştirme faktörünün yükselmesini sağlar ve aranan analitin belirlenmesindeki hassasiyeti artırır.

Dağıtıcı çözücünün hacminin belirlenmesi: Dağıtıcı çözücünün miktarı, oluşan bulutsu çözeltinin miktarını etkiler. Dağıtıcı çözücü, ekstraksiyon çözücüsünün sulu fazda dağılımında önemli bir etkiye sahiptir ve bu sayede ekstraksiyon verimini ciddi derecede etkiler. Bulutsu çözeltinin kalitesi; dağıtıcı çözücünün, sulu fazın ve ekstraksiyon çözücüsünün miktarları ile doğrudan ilişkilidir. (Akdoğan, 2011).

Ekstraksiyon süresinin belirlenmesi: Dağıtıcı çözücü ve ekstraksiyon çözücüsünün bir araya gelip bulutsu yapıyı oluşturmasından, santrifüj yardımıyla tekrar birbirinden ayrılmalarına kadar geçen süre ekstraksiyon süresidir. Bu aşamada ekstraksiyon çözücüsü ile sulu faz arasında oldukça büyük bir etkileşim alanı oluşmaktadır. Bu sayede analitler hızla sulu fazdan ekstraksiyon çözücüsü fazına geçiş yapar (Rezaee ve diğ., 2010). Bu yöntemde sistem kolaylıkla dengeye gelir, bunun sonucu olarak ekstraksiyon çok hızlı şekilde gerçekleşir. DSSME yönteminin en çok dikkat çeken yanı, ekstraksiyonun çok hızlı gerçekleşmesidir. Bunların yanında DSSME tekniğinde ekstraksiyon verimi, analitin pH'ından ve örnek çözeltisinin iyonik dağılımından da etkilenmektedir (Zang ve diğ., 2009).

2.5 Derin Ötektik Çözücüler ve Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu

DSSME yönteminde organik çözücü kullanımı bir adet analiz için oldukça az olmasına rağmen, mikro düzeydeki organik çözücü hacimlerinin binlerce örneğin analizinde kullanılma durumunda göz ardı edilemeyecek düzeylere ulaşması nedeniyle günümüzde araştırmacılar organik çözücülerin elimine edilmesine yönelik araştırmalar yapmaktadır.

Bu araştırmalarda göze çarpan çözücüler arasında yeni nesil yeşil çözücüler olan Derin Ötektik Çözücüler (Deep Eutectic Solvent, DES) yer almaktadır. Derin Ötektik Çözücüler (DES), iyonik sıvılarla benzer karakteristik ve fiziksel özellikler göstermeleri sebebiyle iyonik sıvıların yeni bir sınıfı olarak kabul edilmektedir. İyonik sıvılar, organik katyon ve anyonun birleşiminden oluşan genellikle oda sıcaklığında sıvı formda olan, düşük erime noktasına (<100°C) sahip tuzlar olarak tanımlanmıştır (Abbott vd. 2004; Zhang vd. 2012). İyonik sıvılar geleneksel çözücülere göre avantajlı olmasına rağmen yüksek maliyetlerinden ve toksisitelerindeki belirsizliklerden dolayı endüstriyel uygulamalarda

kullanımları sınırlı kalmış ve son yıllarda DES'lerin daha fazla ilgi görmesine neden olmuştur (Shamsuri ve Abdullah, 2010).

2003 yılında Abbott vd. tarafından keşfedilen DES'ler, yeşil çözücüler sınıfında yer alan hidrojen bağı verici (HBD) ve hidrojen bağı alıcısından (HBA) oluşan iki veya daha fazla bileşenin homojen şekilde karıştırılmasıyla oluşan ve oluşumunda etkin olan bileşenlerin sahip olduğundan daha düşük erime noktasına sahip karışımlardır (Abbott vd. 2003). DES'lerin sentezinin düşük maliyetli olması, kolay hazırlanması, uçuculuğu düşük, biyolojik olarak parçalanabilir ve toksik olmaması gibi üstün özellikleri onları iyonik sıvılardan ayırmaktadır (Smith vd. 2014).

Keşfinin ilk yılllarında DES'ler genellikle kolin klorür ile gliserol, üre, etilen glikol gibi bileşenler kullanılarak sentezlenmekteyken, yıllar içinde çok farklı ve çok çeşitli bileşenlerden DES oluşturulabildiği görülmüştür ve günümüzde yüzlerce farklı bileşenden oluşan ve farklı mol oranlarına sahip DES'ler sentezlenmektedir.

DES'lerin bir diğer avantajı da hidrojen bağı alıcı ve hidrojen bağı verici bileşenlerinin değiştirilerek fizikokimyasal özelliklerinin ayarlanabilmekte olması ve bu sayede birçok alanda kullanımının mümkün olmasıdır. (Cao ve Su, 2021). DES'ler, sentez, ekstraksiyon, elektrokimya ve metal işleme gibi çok çeşitli teknolojik araştırma alanlarında kullanılabilmektedirler (Smith vd. 2014; İsaifan ve Amhamed, 2018). Ayrıca çeşitli reaksiyonlarda DES'ler katalizör olarak da kullanılabilmektedir. (Musale ve Shukla, 2016; Keshavarzipour ve Tavakol, 2015). DES'lerin çözme kapasitelerinin yüksek olması sebebiyle son zamanlarda yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (Li ve Row 2019). Ayrıca çok çeşitli alanlarda toksik çözücüler yerine kullanımları araştırılmaktadır.

DES'lerin kullanıldığı DSSME yöntemi kısaca DES-DSSME olarak adlandırılmaktadır. DES-DSSME yönteminin avantajları arasında işlem kolaylığı, buharlaşmama ve yanıcı olmama özelliği, ısıl kararlılığının yüksek oluşu, toksikliğinin düşük olması ve yeniden kullanılabilir olması gibi özellikleri bulunmaktadır. Son yıllarda, özellikle 2016'dan sonra DES-DSSME yönteminin farklı bileşenlerin ekstraksiyonunda kullanımı artmıştır. DES-DSSME yöntemi kandan civa (Akramipour vd. 2018), biyolojik örneklerden nitrit

(Zhang vd. 2019) su ve gıda maddelerinden kurşun (Zounr vd. 2018) çevre bileşenlerinden arsenik (Zounr vd. 2017) gibi maddelerin ekstraksiyonunda başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

DES'lerin DSSME'de tercih edilmesinin sebebi çözme kapasitelerinin yüksek olmasıdır. Proton ve elektron alıp verme kabiliyetleri moleküller arasındaki hidrojen bağı oluşumunu kolaylaştırmaktadır. Ayrıca DES'lerin özellikleri ihtiyaca göre bileşenlerin tür ve mol oranları değiştirilerek ayarlanabilmektedir (Zainal-Abidin vd. 2017).

Son zamanlarda DSSME'nin hava-yardımlı (Wang vd. 2016), vorteks yardımlı (Zhao vd. 2017) ve ultrasonik dalga yardımlı (Tuzen ve Pekiner 2015) gibi yöntemler özel ekstraksiyon sistemleri ile de kullanımı araştırılmaktadır. Bu şekilde DSSME daha etkin olarak kullanılabilmektedir. Ayrıca çözücü miktarının az olması, enerji verimliliği ve daha az atık oluşumu gibi nedenlerle DSSME 'Yeşil Yöntem' olarak adlandırılmaktadır (Yan ve Wang 2013, Farajzadeh vd. 2012).

2.5.1 Hidrofobik derin ötektik çözücüler

Çözücüler yüksek bazlık-düşük polarite, düşük bazlık-düşük polarite, yüksek bazik-yüksek polarite ve düşük bazik-yüksek polarite olmak üzere dört grupta sınıflandırılabilir. Bu kategorilerde yeşil çözücülerin kullanımı sürdürülebilir döngü için önemli olmaktadır (Masrouri vd. 2021). Günümüze kadar sentezlenen DES'lerin çoğunluğu, hidrofilik özelliktedir ve dolayısıyla yüksek baziklik ve düşük su içeriği gerektiren uygulamalarda yetersiz kalmaktadır (van Osch vd. 2015). Su ile karışabilirliği çok düşük olan HBD ve HBA'dan oluşan hidrofobik özellikte olan ilk DES van Osch tarafından 2015 yılında kuaterner amonyum tuzları ile yüksek hidrofobik özellik gösteren yağ asidinin (dekanoik asit) birleştirilmesiyle ortaya çıkmıştır (van Osch vd. 2015). Sentezlenen bu yeni türdeki DES'ler hidrofobik DES (HDES) olarak sınıflandırılmış ve HDES'ler ile sulu ortamdan uçucu organik bileşiklerin ve kafein, vanilin gibi biyomoleküllerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir (van Osch vd. 2015). Bu çalışmanın ardından Ribeiro tarafından kısa zincirli yağ asitleri (pirüvik, laktik ve asetik asit) ile DL-mentol kullanılarak ilk doğal bazlı HDES oluşturulmuştur (Ribeiro vd. 2015). Literatürde ayrıca hem HBA hem de

HBD özelliği gösteren lidokain: dekanoik asit, laurik asit: dekanoik asit, laurik asit: nonanoik asit ve laurik asit: oktanoik asit gibi yağ asitleri kombinasyonlarında HDES'ler sentezlenmiştir (van Osch vd. 2016; Florindo vd. 2018). HDES'ler keşfinden günümüze kadar pestisitlerin, biyomoleküllerin, metal iyonlarının ve tıbbi atıkların sulu ortamdan giderilmesinde, CO_2 yakalayıcı ajan olarak, biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda, hidrometalürji ve ayırma proseslerinde kullanılmıştır (Cao ve Su 2021). Ayrıca gıdalarda bulunan katkı maddelerinin ve ağır metallerin tespitinde, gıda ambalajında sıklıkla kullanılan plastiklere eklenen plastikleştirici, UV emici ve bisfenol bileşenlerinin belirlenmesinde, farmasötik endüstride hidrofobik ilaç bileşenlerin çözünürlüklerinin iyileştirilmesinde kullanımları da mevcuttur. (Cao ve Su 2021; Boateng, 2022)

2.6 Kaynak Özetleri

2.6.1 AFM1'in derin ötektik çözücü destekli dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu

Bu bölümde DES-DSSME yönteminin farklı kaynaklardan AFM1 ekstraksiyonunda kullanımına yönelik bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Chen vd. (2022) DES-DSSME yöntemini, yenilebilir yağlardan AFM1 ektsraksiyonu ve analizinde kullanmışlardır. Bu amaçla kolin klorür, üre ve 1,4-bütandiol bileşenleri kullanılarak, farklı mol oranlarında beş adet DES hazırlanmıştır. En yüksek ekstraksiyon geri kazanımı kolin klorür-1,4-bütandiol 1:2 mol oranında elde edilmiştir. DES miktarı arttıkça ekstraksiyon geri kazanımının arttığı belirlenmiştir. DES'lerin yapısında bulunan hidrojen bağı verici 1,4-bütandiolün, AFM1'in yapısında bulunan yedi adet oksijen molekülü ile etkileşerek ekstraksiyon verimini artırdığını bildirmişlerdir.

Lesan vd. (2023) pirinçten AFM1 ekstraksiyonu ve zenginleştirme çalışmaları yapmıştır. Ekstraksiyon için basınçlı sıvı ekstraksiyon yöntemi geliştirmiş ve daha sonra DES-DSSME uygulamışlardır. Kullanılan hidrofobik DES'lerde etil metil amonyum klorür H-bağı verici ve karmakrol ve timol H-bağı alıcı olarak kullanılmıştır. Çalışmada LOD

0.02–0.07 ng/g, LOQ 0.07–0.23 ng/g ve ekstraksiyon geri kazanımı 69–82% olarak belirlenmiştir.

Kiani vd. (2022) çalışmalarında bebek mamalarındaki AFM1'in belirlenebilmesi için katı-faz ekstraksiyonu ve DSSME yöntemini kombine etmişlerdir. DES olarak metil trioktil amonyum klorür H bağı alıcı etilen glikol, n-butanol, gliserol, n-heptanol ve n-nonanol H bağı verici olarak kullanılmıştır. Çalışmada farklı DES türleri, DES hacimleri ve sürenin zenginleştirme faktörü üzerine etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre metil trioktil amonyum klorür-n-butanol 1:3 oranında en etkili DES olarak belirlenmiştir. En iyi DES miktarı 50 µl olarak belirlenmiştir. Sonuçlara göre incelenen örneklerin çoğunda olması gerekenden fazla miktarda AFM1 tespit edilmiştir.

2.6.2 Derin ötektik çözücü ve ultrasonik dalga destekli dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu

Ultrasonik dalga yöntemi ekstraksiyonda kavitasyonu artırarak etkin bir kütle aktarımı sağlamaktadır (Knorr vd. 2002). Ayrıca basit, ucuz ve etkili bir yöntemdir (Huang vd. 2009). DSSME yönteminde ultrasonik dalgalar kullanılarak kütle aktarımının artırılmasına yönelik araştırmalar yapılmaktadır. Burada ultrasonik dalga birbiri ile karışmayan iki sıvı arasındaki kütle aktarımını artırmaktadır. Bu yöntem ile ekstraksiyon çözücüsü, örneği içeren çözeltide hızlıca yayılmaktadır. Dolayısıyla sonunda fazların ayrımı işlemi kolaylıkla gerçekleşmektedir (Li ve Row 2019).

Ultrasonik dalga destekli DSSME'nin farkli bileşenlerin mikroekstraksiyonunda kullanıldığı çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Kanberoğlu vd. (2019) yaptıkları çalışmada şurup ve su örneklerinden Patent Blue V boyasının ekstraksiyonununda UD-DES-DSSME kullanmışlardır. Çalışmada pH:4 olan bir örnek çözeltisindeki Patent Blue V, Kolin Klorür (ChCl) ve Fenol' den oluşan DES fazına ekstrakte edilmiş olup çalışma kapsamında ultrasonik dalga uygulanma süresi ve santrifüj süresi optimize edilmiştir. Geliştirilen yöntemde optimum koşullarda LOD 0.37 µg/L olarak belirlenmiştir.

Lui vd. (2019)'nin çalışmalarında böcek ilacındaki deltamethrin, fenvalerate, permethrin, etofenprox ve bifenthrin'in ayrılmasında hidrofobik DES'lerin kullanımını baz alan bir UADSSME ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiştir. Kuarterner fosfonyum tuzları ve düz zincirli minobazik asitler ile hidrofobik DES'ler hazırlanmıştır. Parametre olarak ultrasonik dalga süresi, DES türü ve miktarı incelenmiştir. Optimum koşullarda önerilen DES-UADSSME metodu, çok küçük miktarda DES'in, ekstraksiyonun çok kısa süre içerisinde gerçekleştirilmesi ve analitin geri kazanımının sağlanması için yeterli olduğunu göstermiştir.

Zounr vd. (2018) su ve gıda örneklerinden kadmiyumun ön zenginleştirilmesi ve ekstraksiyonu için UD-DES-DSSME yöntemini uygulamışlardır. Kolin klorür fenol (1:4, n/n) DES'i hazırlanmıştır. Kadmiyumun ekstrakte edilmesini etkileyen parametreler olarak DES türü ve bileşimi, DES hacmi, ultrasonik dalga uygulama süresi belirlenmiştir. LOD 0.023 ng/L olarak bulunmuştur.

Wang vd. (2017) yaptıkları çalışmada; su örneklerinden UV filtrelerinin ekstraksiyonu ve hesaplanması için, basit ve hızlı UD-DES-DSSME geliştirmişlerdir. Trioktilmetil amonyum klorür ve dakanoik asit ile DES hazırlanmış ve parametre olarak DES miktarı ve ultrasonik dalga süresi incelenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda %90.2-%103.5 geri kazanım miktarı ve LOD 0.15 - 0.30 ng/mL olarak belirlenmiştir.

Literatürde AFM1 ekstraksiyonu ve analizi için ultrasonik dalga, DES ve DSSME yönteminin bir arada kullanıldığı yalnızca bir adet çalışma yer almaktadır. Bu çalışmada AFM1 sütten ekstrakte edilmiştir. **Gürsoy vd.** (2022) DES hazırlanmasında H-bağı verici olarak kolin klorür ve betain klorür kullanmış, H-bağı alıcısı olarak ise ksiloz, fruktoz, sukroz ve maltoz kullanmışlardır. Betain klorür-maltoz (1:2) DES'ile %91 ekstraksiyon geri kazanımı değeri elde etmişlerdir. Yüzey yanıt yönteminde faktör olarak en iyi DES miktarı, pH, pirogallol derişimi ve ultrasonik dalga ekstraksiyon süresini incelemişlerdir. Cevap olarak ekstraksiyon geri kazanımını ölçmüşlerdir. Optimum koşullar olarak 170 ul DES hacmi, pH 3.8, pirogallol derişimi 13.6 mM ve süre 8 dk olarak belirlemişlerdir. Ayrıca optimum koşullar altında LOD 6.1 ng/L, ekstraksiyon geri kazanımı %91, ve EF 328 olarak belirlenmiştir.

Peynirden AFM1 ekstraksiyonunun DES ve DSSME ile gerçekleştirildiği yalnızca bir adet çalışma yer almaktadır. **Masrouri vd.** (2021) tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada ultrasonik dalga kullanılmamıştır. 1 g peynir örneğine 2.1 mL asetonitril, 2 mL saf su, 0.78 g NaCl ve 1 mL n-hekzan eklenerek 3.6 dakika vorteks uygulanmıştır. Çalışmada peynirdeki bileşenlerin kullanılan çözücülere olan ilgilerinin farkına dayanılarak aranan analitin etkin ve seçici bir ekstraksiyon işlemiyle asetonitril fazına geçmesi sağlanmaya çalışılmıştır. 5 dakika 4000 rpm santrifüj işleminden sonra asetonitril fazı karışımdan ayrılarak, 64 µL N,N-dieanol ammonyum klorür ve karvakrolden oluşan yeni bir DES ile karıştırılmıştır. Karışım 5 mL saf suya enjekte edildiğinde bulanık bir karışım elde edilmiştir. 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra dipteki DES damlacıkları alınmıştır. Üzerine 5 µL asetonitril eklendikten sonra floresans dedektörlü HPLC sisteminde analiz edilmiştir. Yöntem optimizasyonu için YYY kullanılmış ve faktörler olarak asetonitril hacmi, NaCl derişimi, DES hacmi ve vorteks süresi olarak belirlenmiştir. Sonuçta yüksek tekrarlanabilirlik, yüksek geri kazanım ve LOD elde edilmiştir. LOD ve LOQ sırasıyla 0.74 ve 2.56 ng/kg olarak bulunmuştur. Ekstraksiyon geri kazanımı %94,5 ng/kg olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada optimizasyonda DES dışında yer alan faktörler peynirden yağın uzaklaştırılmasına yöneliktir.

Bu çalışmada amaç, ülkemizde en çok tüketilen besinlerden biri olan peynirin içinde bulunabilen AFM1'in etkin bir şekilde ekstraksiyonu için yeni nesil, etkin ve çevre dostu bir yöntem olan ultrasonik dalga destekli sıvı-sıvı mikroektraksiyon yönteminin Derin Ötektik Çözücüler (Deep Eutectic Solvents, DES) kullanılarak geliştirilmesidir. Bu şekilde günümüzde uygulanan yönteme alternatif bir yöntem sunularak toksik organik çözücü tüketiminin en aza indirilmesi ve yüksek geri kazanım ile AFM1 ekstraksiyonu amaçlanmaktadır. Çalışmada literatürde daha önce kullanılmamış olan DES türlerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ekstraksiyon için en iyi DES türünün belirlenmesinin ardından DES miktarı, ultrasonik dalga ekstraksiyon süresi, sıcaklık faktörleri ile MKT gerçekleştirilerek yanıt yüzeyleri incelenmiştir ve ayrıca cevap olarak zenginleştirme faktörü (EF) optimize edilmiştir. Bunun yanı sıra ekstraksiyon geri kazanım miktarı, tespit limiti (limit of detection, LOD), ölçüm limiti (limit of quantification, LOQ) ve tekrarlanabilirliği belirlenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Peynir örneğinin hazırlanması

Çalışmada kullanılan peynir örneği marketten temin edilmiştir. Yaklaşık 20 g lor peyniri örneği, filtre kağıdının üzerinde 1 saat boyunca suyunun uzaklaşması için bekletilmiştir. Ardından örnek, blender kullanılarak homojen hale getirilmiştir. Peynir örneğinin hazırlanması **Şekil 3.1**'de gösterilmiştir. Aflatoksin M1 bakımından kör numune bulmak, ülkemiz peynirleri için mümkün olmadığından hazırlanan örnek hem işlem uygulanmamış haliyle analiz edilerek kör olarak kullanılmış ve hem de örneğe 50 ng/kg analit eklenerek yükleme yapılmıştır. Bu tez çalışmasında kullanılan ve kör olarak kabul edilen numunede 0.018 ppb AFM1 bulunmaktadır ve yükleme 50 ng/kg analit eklenerek gerçekleştirilmiştir. Bu durumda yüklü numunede analizlenmesi beklenen miktar 0.068 ppb olarak değerlendirilmiştir.

Şekil 3.1 Peynir örneğinin hazırlanması

Analizde kullanılan kimyasallar, cihazlar ve malzemeler EK 1, EK 2 ve EK 3 içerisinde verilmiştir.

3.1.2 DES'lerin sentezi

Çalışmada kullanılan suyla karışmayan Mentol Bazlı Yağ Asidi ve Mentol Bazlı Yağ Alkolü olan DES'ler ısıtma ve karıştırma yöntemiyle **Çizelge 3.1**'de verildiği şekilde sentezlenmiştir (Cao ve Su 2021), ilgili görüntüler **Şekil 3.2**'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan DES'lerin hazırlanması

DES No	**DES Bileşenleri**	**Sentez Sıcaklığı**	**Sentez Süresi, dk**	**Kısa Adı**	**Kaynak**	**Erime Noktası, °C,** (Cherniakova vd 2023)
1	DL-Mentol Hexanoic Acid	70°C	120	MH	An ve Row, 2021	-3.4
2	DL-Mentol Octanoic Acid	25°C	20	MOA	Sereshiti vd., 2020	-3.42
3	DL-Mentol Dodecanol	70°C	120	MDD	An ve Row, 2021	-
4	DL-Mentol 1-Octanol	60°C	120	MO	An ve Row, 2021	15.1 (2:1)
5	DL-Mentol 1-Butanol	60°C	120	MB	An ve Row, 2021	-
6	DL-Mentol Decanoic Acid	25°C	20	MDA	Sereshiti vd., 2020	-0.61
7	DL-Mentol Lauric Acid	50°C	15	ML	Ribeiro vd., 2015	27.97

Şekil 3.2 DES'lerin hazırlanması ve sentezlenen DES'ler

3.2 Aflatoksin M1 Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması

3.2.1 Aflatoksin M1 kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Asetonitril içerisinde 10 µg/mL Stok Aflatoksin M1 Solüsyonu kullanılmıştır. Her bir ampul açıldıktan sonra 2-8˚C'ta muhafaza edilmesi halinde 2 haftaya kadar kararlıdır.

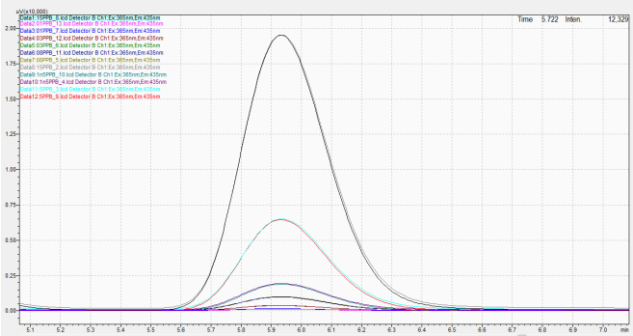
3.2.2 İkinci aşama standardın hazırlanması

10 µg/mL konsantrasyonundaki stok solüsyondan 50 µL, asetonitril ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen konsantrasyon 50 ng/mL olmuştur.

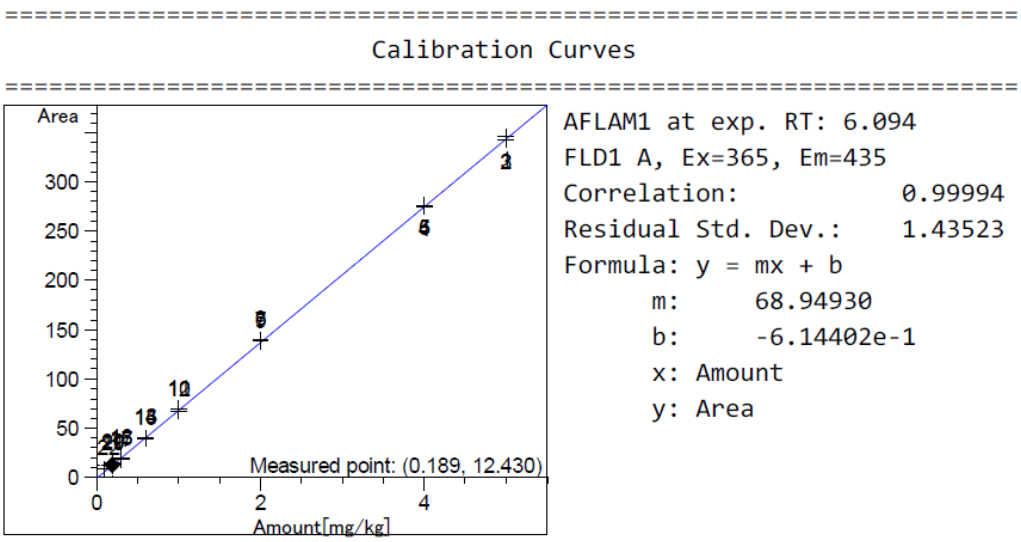
3.2.3 Kalibrasyon standartlarının hazırlanması

İkinci aşama standarttan aşağıda belirtilen hacimler çekilerek, belirtilen hacimlerde asetonitril (ACN), metanol (MeOH) ve su ilave edilerek kalibrasyon noktaları hazırlanmıştır. Hazırlanan 8 noktalı 3 tekrarlı kalibrasyon grafiği çalışmasında piklerin çakıştırılma dağılımı **Şekil 3.3**'te, kalibrasyon doğrusunun korelasyon faktörü R^2= 0.99994 olarak bulunduğu **Şekil 3.4**'te gösterilmiştir.

1) 0.1 ng/mL: 20 µL 2. aşama standart+2980 µL ACN+2000 µL MeOH+5000 µL su
2) 0.2 ng/mL: 40 µL 2. aşama standart+2960 µL ACN+2000 µL MeOH+5000 µL su
3) 0.3 ng/mL: 60 µL 2. aşama standart+2940 µL ACN+2000 µL MeOH+5000 µL su
4) 0.6 ng/mL: 120 µL 2. aşama standart+2880 µL ACN+2000 µL MeOH+5000 µL su
5) 1 ng/mL: 200 µL 2. aşama standart+2800 µL ACN+2000 µL MeOH+5000 µL su
6) 2 ng/mL: 1000 µL 2. aşama standart+2000 µL ACN+2000 µL MeOH+5000 µL su
7) 4 ng/mL: 2000 µL 2. aşama standart+1000 µL ACN+2000 µL MeOH+5000 µL su
8) 5 ng/mL: 3000 µL 2. aşama standart+0 µL ACN+2000 µL MeOH+5000 µL su



Şekil 3.3 Kalibrasyon noktalarının kromatogramları



Şekil 3.4 Çalışmada kullanılan kalibrasyon grafiği

3.3 Referans Yönteme Göre Analiz Numunesinin Hazırlanması

İmmunoaffinite kolon yardımı ile katı faz ekstraksiyon (SPE) prensibine göre peynir örneklerinden Aflatoksin M1'in ekstraksiyonunu ve analizini gerçekleştirmeye yarayan, TS EN ISO 14501: Eylül 2021'den modifiye VICAM AflaTest Afla M1 Analiz Yöntemi, referans yöntem olarak alınmıştır. Yöntemin detayları aşağıda verildiği gibidir:

3.3.1 Örnek hazırlama – ekstraksiyon

Peynir örneği rende kullanılarak küçük parçalara ayrılmıştır ve naylon torba içerisinde sallanarak iyice karıştırılmıştır. Burada hazırlanan peynir, örnek olarak kullanılmıştır. 50 g peynir örneği plastik bir behere tartılmıştır. 10 g Celite 545, 150 mL kloroform ve 2 mL doymuş sodyum klorür çözeltisi (yaklaşık 6M) ilave edildikten sonra bir mikser ile orta hızda 2-3 dakika karıştırılarak homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnek, Whatman No. 4 filtre yerleştirilerek Buchner hunisi ile, vakuma bağlı olarak 250 mL'lik Buchner konik erlene süzülmüştür. Örnek hazırlanan beher 50 mL kloroform ile yıkandıktan sonra huniye aktarılarak konik behere süzülmüştür. Süzüntünün tamamı 500 mL' lik balona aktarılmıştır. Konik erlen 25-50 mL kloroform ile yıkanıp balona aktarılmıştır. Balondaki süzüntünün tamamı 30 ˚C' de vakum altında buharlaştırılmıştır (buharlaştırma sonucunda balonda yağlı bir kalıntı kalmıştır.). Balondaki kalıntıya 2 mL metanol ilave edilip yavaşça karıştırılmıştır. Ekstrakta 60 mL PBS ilave edilip karışması için iyice çalkalanmıştır. Ekstrakt, ayırma hunisine aktarılmıştır. Balona 38 mL daha PBS ilave edilmiştir. Çözelti iyice çalkalanmıştır ve ayırma hunisine aktarılmıştır. Ayırma hunisine 50-100 mL n-hekzan ilave edilerek numunenin yağını almak için şiddetle çalkalanmıştır. Fazların ayrılması için beklenmiştir ve alttaki faz bir kaba alınmıştır.

3.3.2 Afla M1 kolon kromatografisi

Alttaki fazın tamamı (50 g numune eşdeğeri) yaklaşık 1-2 damla/saniye sabit hızla Afla M1 immünoafinite kolonundan geçirilmiştir. Kolondan yaklaşık 1-2 damla/saniye sabit hızla 20 mL saf su geçirilerek kolon yıkanmıştır. Suyun tamamı geçince kolondan bir miktar hava geçirilerek tüm suyun çıkması sağlanmıştır.

3.3.3 Elüsyon

Afla M1 kolonu plastik enjektörden ayırıldıktan sonra kolonun altına elüsyon tüpü yerleştirilmiştir. Afla M1 immünoafinite kolonunun içine 2.5 mL elüsyon solventi aktarılmıştır. Elüsyon solventinin (60:40) (asetonitril:metanol) yerçekimi ile akması

beklenmiştir. Akış duracak olursa enjektörün pistonu itilerek akış sağlanmıştır. Elüsyon solventinin tamamı geçince kolondan 2.5 mL ultra saf su geçirilmiştir ve elüsyon tüpünün içine akıtılmıştır (**Şekil 3.4**). Böylelikle toplam elüsyon hacmi 5 mL olmuştur. Eluat vorteks ile iyice karıştırılmıştır. Bu aşamada eğer eluat berrak olmazsa 0.45 um'lik enjektör ucu filtreden süzülmesi gerekmektedir fakat çalışılan numunede bu basamağa gerek kalmamıştır.

Şekil 3.5 Peynirden aflatoksin M1'in immunoaffinite kolon ile elüsyonu

Peynir numunelerinde 100 µL' lik enjeksiyonlar için kalibrasyon standartlarından elde edilen piklerin numunedeki ppb karşılıkları **Çizelge 3.2**'de gösterilmiştir. (Bunun sebebi, uygulanan metoda göre ng/mL birimiyle hazırlanan kalibrasyon tablosu için çarpan değerinin 0.1 olmasıdır.)

Çizelge 3.2 Kalibrasyondan elde edilen piklerin numunedeki ppb karşılıkları

Seyreltme faktörü ile çarpılmadan önce kalibrasyon noktaları	Seyreltme faktörü ile çarpıldıktan sonra kalibrasyon noktalarının götüreceği değerler
0.1 ppb	0.01 ppb
0.2 ppb	0.02 ppb
0.3 ppb	0.03 ppb
0.6 ppb	0.06 ppb
1 ppb	0.1 ppb
2 ppb	0.2 ppb
4 ppb	0.4 ppb
5 ppb	0.5 ppb

Seyreltme faktörünün yaklaşık 0.1 olduğu bu çalışma için kalibrasyon noktası değerleri, 0.01 ppb- 0.5 ppb arasında değerlendirme yapmaya imkân vermektedir.

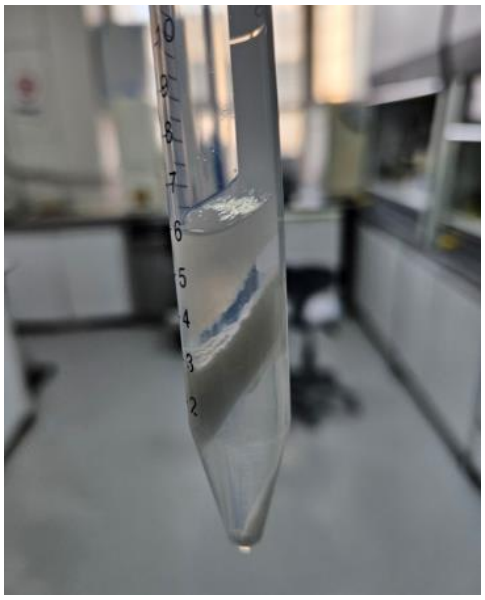
3.4 Yeşil Çözücü ve Ultrasonik Dalga Destekli Dağıtıcı Sıvı-Sıvı-Mikroekstraksiyonu

Peynir örneğinden AFM1 analizini etkileyecek yağ içeriğini uzaklaştırmak için önişlem uygulanmıştır (Masrouri vd. 2021). Bu amaçla ACN ve su eklenmiş olan örneğe, aynı aşamada yağların uzaklaşması için hekzan eklenmiştir. ACN fazına alınan analit, diğer fazlardan ayrılarak alınmıştır.

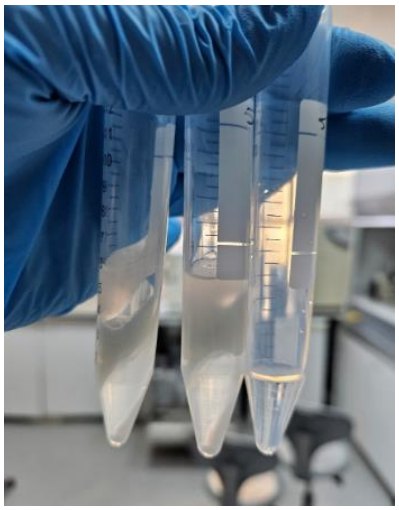
Ardından kalan homojenize sıvı üzerine hazırlamış olan yedi farklı DES türleri eklenerek ultrasonik dalga destekli DSSME gerçekleştirilmiştir (Cao ve Su 2021).

Bu amaçla 15 mL'lik cam test tüpüne, homojen hale getirilmiş olan peynirden 1,5 g alınmıştır. Üzerine 2.0 mL saf su ve 2.1 mL ACN eklenmiştir. Elde edilen çözelti manuel olarak 2 dakika boyunca çalkalanmıştır. Çözeltiye 0.78 g NaCl ve 1.0 mL n-Hekzan eklenip 3,6 dakika vortexlenmiştir ve ardından 4000 rpm' de 5 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Bu aşamada katı parçacıklar, sıvı faz, ACN ve n-Hekzan' dan oluşan dörtlü faz elde edilmiştir (**Şekil 3.5**) Aflatoksin M1'i içeren, berrak, yaklaşık 2 mL ACN

fazı damlalık yardımıyla ayrılarak (Şekil 3.6) 15 mL'lik santrifüj tüpüne konulduktan sonra üzerine 200 µl DES ilave edilmiştir. Elde edilen karışım, 10 mL'lik konik dipli cam test tüpü içerisindeki 5 mL saf suya eklenmiştir. 8 dakika ultrasonik banyoda bekletildikten sonra elde edilen bulutsu çözelti, 4000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. DES damlacıkları ACN içinde çözünmeden mikrodamlacıklar oluşturarak ekstraksiyonun hızlanmasını sağlamıştır.



Şekil 3.6 Çözeltide diğer fazlardan ayrılan ACN fazı



Şekil 3.7 Arada kalan ACN fazının dörtlü fazdan ayrılması

Santrifüj sonunda, numuneden ekstrakte edilen analiti içeren DES damlacıkları tüpteki çözeltinin yüzeyinde birikmiştir. Üstteki birikinti yaklaşık 150 µl olmaktadır. Birikintinin tamamı mikropipet yardımıyla alınarak insert vial içerisine koyulup HPLC-FLD sisteminde analiz edilmiştir. Tek seferde tek parametre yöntemiyle vorteks süresi, DES miktarı, UDE süresi ve benzeri parametrelerin etkileri incelenmiştir. Deneysel tasarım için Yanıt Yüzey Yöntemi ve Merkezi Kompozit Tasarım kullanılmıştır. Cevap olarak zenginleştirme faktörü (EF) incelenmiştir. Ayrıca ekstraksiyon geri kazanımı (ER), tespit limiti (LOD), ölçüm limiti (LOQ), yöntemin tekrarlanabilirliği ve tekrar üretilebilirliği belirlenmiştir. Merkezi kompozit tasarım ve yanıt yüzey yöntemi (YYY) ekstraksiyon verimi üzerinde etkili olan parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirilmiş ve grafikler görselleştirilmiştir. Ektraksiyon sonucunda zenginleştirme faktörü (EF) Eşitlik (1) ile hesaplanmıştır.

$$EF = \frac{Csed}{C0} \quad (1)$$

Burada,

C_{sed} : Analitin sediment fazındaki konsantrasyonu

C_0 : Analitin başlangıçtaki konsantrasyonu,

olarak ifade edilmektedir.

Ekstraksiyon geri kazanımı (ER) ise Eşitlik (2) ile hesaplanmıştır.

$$ER\% = \frac{nsed}{n0}\ x\ 100 = \frac{Csed\ x\ Vsed}{C0\ x\ M} = EF\ x\ \frac{Vsed}{M}\ x\ 100 \quad (2)$$

Burada,

n_0 : Analitin toplam miktarı

n_{sed} : Sediment fazına geçebilen analitin miktarı

V_{sed} : Sediment fazının hacmi

M : Numune miktarı

olarak ifade edilmektedir.

3.5 Deneysel Tasarım

Zenginleştirme faktörünün optimizasyonunda bağımsız değişkenler ile yanıtlar arasındaki ilişkinin belirlenebilmesi için yapılması gereken deneyler MKT ile belirlenmiş ve aralarındaki ilişkiler YYY grafikleri ile görselleştirilmiştir (Design-Expert® 9.0. Stat-Ease, Inc., USA). Tasarımda MKT'nin tercih edilmesinin sebebi, deneysel olarak uç noktaların da dikkate alınmasıdır. Box-Behnken tasarımında daha az deney sayısının yeterli olması dolayısıyla serbestlik derecesi daha düşüktür. Kromatgrafik analiz içeren deneyler en ufak bir değişiklikten yüksek derecede etkilenirler. Dolayısıyla hataya daha fazla açık olan bir alandır. Daha fazla deney sayısı tasarıma katıldığı zaman, hataların tasarımı üzerindeki olumsuz etkileri daha düşük düzeyde olmaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmasında MKT tercih edilmiştir. Çözücü olarak en yüksek %ER sağlayan DES olan MH seçilmiştir. UDE süresi, sıcaklık ve DES miktarı, bağımsız değişkenler olarak seçilmiş, %ER ise yanıt olarak belirlenmiştir. MKT ile elde edilen faktör seviyeleri **Çizelge 3.3**'te verilmiştir. Buna göre, merkezi noktada altı tekrarlı olmak üzere toplam 20 adet deney gerçekleştirilmiştir (**Çizelge 3.4**).

Çizelge 3.3 Deneysel tasarımın bağımsız değişkenleri ve seviyeleri

Bağımsız Değişkenler	Faktör Seviyeleri			
	-α	-1	1	+α
A- DES miktarı (µl)	176.36	190	230	243.64
B- Süre (dk)	0.61	3	10	12.39
C- Sıcaklık, °C	39.89	45	60	65.11

Çizelge 3.4 MKT ile oluşturulan deney setleri

Deney	Faktör 1 A: DES miktarı (µl)	Faktör 2 B: Süre (dk)	Faktör 3 C: Sıcaklık, °C
1	210.00	6.50	52.50
2	210.00	0.61	52.50
3	210.00	6.50	52.50
4	230.00	3.00	60.00
5	230.00	10.00	45.00
6	190.00	10.00	60.00
7	210.00	6.50	52.50
8	243.64	6.50	52.50
9	210.00	6.50	52.50
10	230.00	10.00	60.00
11	230.00	3.00	45.00
12	210.00	6.50	39.89
13	210.00	6.50	52.50
14	190.00	3.00	60.00
15	210.00	6.50	52.50
16	190.00	3.00	45.00
17	190.00	10.00	45.00
18	176.36	6.50	52.50
19	210.00	6.50	65.11
20	210.00	12.39	52.50

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Analiz Yönteminin Geliştirilmesi

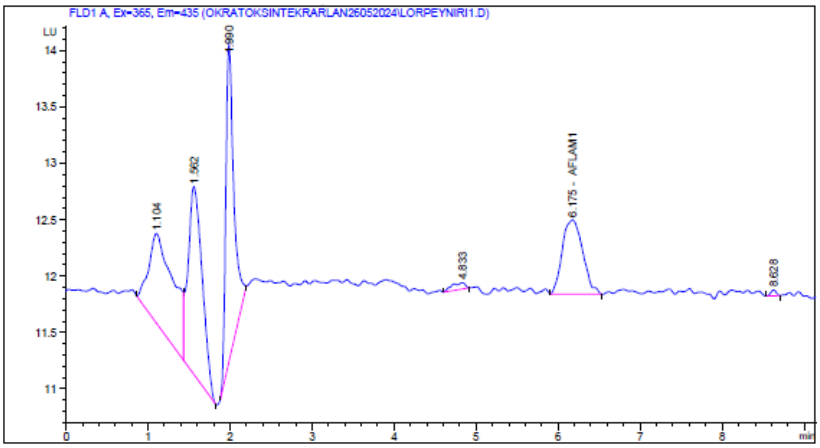
Peynir numunesi içerisinden ekstrakte edilen milyarda bir seviyenin de altında AFM1 analitini içeren çözeltiden alınacak piklerin hassasiyetle ayrılması ve tanımlanması için kullanılan kolon, kolon fırını sıcaklığı, mobil faz bileşimi, mobil faz akış hızı parametreleri, sonuca direkt etki eden sistem parametreleri olarak değerlendirilmiştir. Buradan yola çıkılarak referans alınan yöntemlerden, çalışmanın bütününde kullanılacak en uygun parametrelerin seçilmesi ve değiştirilmesi gerekebilecek parametrelerin değiştirilerek çalışma bulgularının oluşturulması önem arz etmektedir. Referans standard yöntem ile çalışmaya zemin teşkil eden referans makale koşulları, HPLC cihazı ile AFM1 analizi için genel kabul görmüş benzer parametreleri baz almışlardır. Bu bağlamda çalışmada ilk etapta Shimadzu LC-2050C 3D model HPLC ve RF – 20 A XS FLD Dedektör kullanılmış olup devamında FLD entegre edilmiş Agilent 1260 model HPLC sistemi kullanılmıştır. Sistem koşulları **Çizelge 4.1**'de verildiği şekilde çalışmalar başlatılmıştır.

Çizelge 4.1 HPLC sistem koşulları

Parametre	**Özellik**
Kolon	Eclipse EDB C18 analitik kolon (Agilent, 250 mm x 4.6 mm, 5um)
Sıcaklık	40 ºC
Mobil Faz	ACN:Su (25:75 v/v) İzokratik
Dedektör	Ex: 365, Em: 435, Gain: x1, Sensitivity: Medium, Response:1.5 Cell Temp: 25 ºC Sampling: 2.5 Hz
Akış Hızı	1 ml/dk
Enjeksiyon Hacmi	100 µL

Ayırma için Eclipse EDB C18 analitik kolon (Agilent, 250 mm x 4.6 mm, 5um) 40˚C' de şartlandırılarak kullanılmıştır. Öncelikle Madde 3.1.1.' de tarif edildiği şekilde hazırlanan peynir örneklerine referans standard yöntem uygulanmış olup numunedeki AFM1 miktarı belirlenmiştir. 50 g peynir örneği Madde 3.3.'te belirtildiği şekilde hazırlanarak, referans alınan standard metod olan TS EN ISO 14501: Eylül 2021' den modifiye edilmiş VICAM

AflaTest Afla M1 Analiz Yöntemi' nde belirtilen sistem koşullarında analiz edilmiştir. Bu kapsamda 3 adet çalışma yapılmıştır. Kullanılan numune için 3 çalışmadan alınan sonuçlar için örnek kromatogram **Şekil 4.1**'de ve sonuçların tamamı **Çizelge 4.2**'de verilmiştir:




```
================================================================================
                        External Standard Report
================================================================================

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      Monday, May 27, 2024 8:03:58 PM
Multiplier            :      0.1000
Dilution              :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FLD1 A, Ex=365, Em=435

RetTime  Type     Area     Amt/Area    Amount   Grp   Name
 [min]          [LU*s]                [mg/kg]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
  6.175 BB       11.40746 1.52846e-2 1.74358e-2    AFLAM1

Totals :                             1.74358e-2
```

Şekil 4.1 Referans standard yönteme göre alınan örnek kromatogram

Çizelge 4.2 Referans standard yönteme göre kullanılan numunedeki AFM1 miktarı

Sıra No	Sonuç, ppb
1	0.0175
2	0.0181
3	0.0188
Ortalama	0.0181

4.1.1 HPLC kolonu etkisi

Değişken parametrelerden HPLC kolonu olarak VICAM AflaTest Afla M1 Analiz Yöntemi' nde önerilen ODS-2 ve Masrouri vd. 2021'de önerilen C18 kolonun 2 çeşidi denenmiştir. Bu kolonların analiti ayırma kapasitesinde fark gözlenmemiştir.

4.1.2 Kolon fırını sıcaklığının etkisi

Kolon fırını sıcaklığı için VICAM AflaTest Afla M1 Analiz Yöntemi ve Masrouri vd. 2021 metodlarında önerilen sıcaklıklar denenmiştir. 30 ºC – 40 ºC ile yapılan çalışmalarda, 40 ºC kolon fırınında analiz daha hızlı yürüdüğü ve pikler daha belirgin göründüğü için 40 ºC ile devam edilmesine karar verilmiştir.

4.1.3 Mobil faz akış hızının etkisi

Mobil faz akış hızı hem VICAM AflaTest Afla M1 Analiz Yöntemi' nde ve hem de Masrouri vd. 2021 metodunda 1 mL/dak olarak önerildiği halde 0.7 mL/dak, 1 mL/dak ile 1,3 mL/dak denenmiştir. 0.7 mL/dak hızda pikler yayvan, 1.3 mL/dak akışta ise kolon dolgusu zarar görmeye başladığından önerilen 1 mL/dak taşıyıcı faz hızı kabul edilmiştir.

4.1.4 Mobil faz bileşiminin etkisi

Mobil faz bileşimi, baz alınan Masrouri vd. 2021 metodunda ACN:Su (25:75 v/v) İzokratik şeklinde önerilmekte olup VICAM AflaTest Afla M1 Analiz Yöntemi' nde ACN:Su:MeOH (24:68:8 v/v) İzokratik olarak verilmiştir. Metanol katkısı ile yürütme önerilen metodun numune hazırlama aşamasında metanol devreye girdiği için bu katkı yürütmede önemli olabilir fakat bu tez çalışması kapsamında baz alınan numune hazırlama yönteminde metanolle işlem bulunmadığından mobil faza metanol eklenmemiştir. Bunun haricinde metanolün, analiti içeren DES damlacıklarına doğrudan temasının bulutlanma oluşturucu bir etkisi olduğu gözlenmiştir. Bulutlanma bir süre beklenince kendiliğinden dağılmaktadır ancak gözle görülen berraklığın sahih olmadığı

yapılan analizlerle anlaşılmıştır. Metanollü viallerden bulutlanmanın dağılmasının ardından gerçekleştirilen analizlerde kolon zarar görmüş, ayırma gücü oldukça azalmıştır. Bu bulutlu faz oluşumunun sistem içerisinde akış sırasında da gerçekleşiyor olma ihtimali yüksektir. Numunenin spike yapılması aşamasında numuneye eklenen miktarı bilinen AFM1 çözeltisi içerisinde de düşük seviyede metanol bulunduğu halde analiz sırasında sorunla karşılaşılmamaktadır. Numunenin enjeksiyona hazırlanması sırasındaki yağ uzaklaştırma ve ekstraksiyon basamaklarında metanolün DES ile direkt birleşmesinde gerçekleşen etkinin bertaraf edilmiş olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmalar neticesinde mobil faz bileşimi ACN:Su (25:75 v/v) izokratik olarak belirlenmiştir.

4.1.5 Enjeksiyon hacminin etkisi

Peynir numunelerinde AFM1 için limit değer max. 0.05 ppb olduğu için cihazda bu seviyenin altında bir çalışma sürdürmek gerekmektedir. Ülkemiz peynirlerinde AFM1 miktarı 0.02 ppb ve daha altı seviyelerde seyretmektedir. Bu limit düzeyinde hassasiyeti yitirmeden çalışabilmek, doğru enjeksiyon hacminde kalibrasyon oluşturmak ve tüm çalışmayı belirlenen düzeyde devam ettirebilmek için HPLC koşullarında bu limitlere inmeyi sağlayan en uygun enjeksiyon hacminin, önerilen metodlardan birinde verildiği şekilde 100 µL olduğu görülmüştür. 100 µL enjeksiyon ile en alt seviye kalibrasyon noktası olan 0.1 ppb'nin gözlenmesinde zorluklar yaşanmıştır. Enjeksiyon hacmi olarak 50 uL denendiğinde en düşük seviye kalibrasyon noktası 0.2 ppb'ye yükselmiştir. Bu da 0.02 ppb'den daha az analit içeren numune okunamayacağı anlamına gelmektedir. Burada numune hazırlama aşamasında tartılan numune miktarı da devreye girmektedir. Numune tartımına, referans makalede önerildiği şekilde 1 g ile başlandığında ekstraksiyon yeterli seviyede gerçekleşemediğinden cihazdan alınan pikler gürültüler ile karışmaktadır. Numune tartımı 2 g'a çıkarıldığında çok yayvan ve büyüklüğü kalibrasyon grafiği ile tanımlanamayacak düzeyde anlamsız pikler oluşmaktadır. Enjeksiyon hacmini düşürerek numune tartımını artırmak çözüm olmamıştır. Bu yüzden 100 uL enjeksiyon ile devam edilmesi uygun bulunmuştur.

4.2 Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon Üzerinde Etkili Parametrelerin İncelenmesi

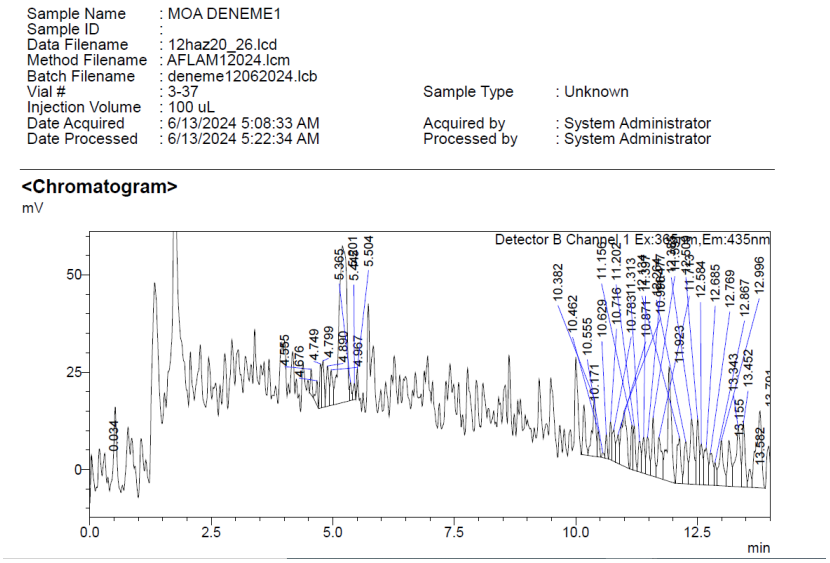
4.2.1 DES türünün seçimi

Peynir numunelerinden AFM1 analizi için gerçekleştirilen DSSME üzerine hazırlanan DES'lerin etkilerinin incelenebilmeleri amacıyla Bölüm 3.1.2 **Çizelge 3.1**'de verilen yedi adet DES türü incelenmiştir.

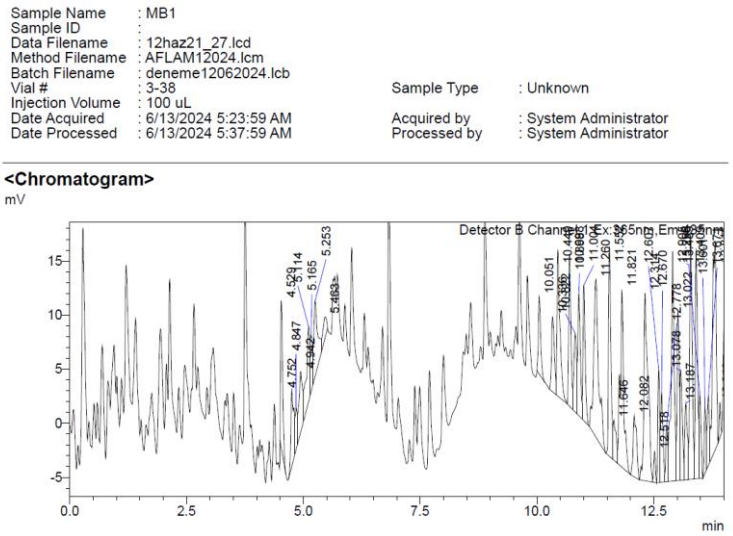
Yapılan çalışmalarda MDD ile hazırlanan numunelerde vialde bulutsu yapı ve ardından faz ayrımı gözlenmiştir. Vialdeki çözelti vorteks ile çalkalanarak fazlar bir araya getirildiğinde yeniden bulutlanma gerçekleşmekte ve ardından zamanla yeniden faz ayrımı gözlenmektedir. **Şekil 4.2**'de gösterilen bu durum, tekrar eden 3 denemenin tamamında aynı şekilde gerçekleştiğinden cihazda analiz gerçekleştirilememiştir.

Şekil 4.2 MDD ile hazırlanan numunelerdeki bulutsu yapı ve ardından gerçekleşen zahiri berraklıktaki faz ayrımı

MOA ve MB ile yapılan çalışmalardan alınan kromatogramlarda tanımlanabilecek herhangi bir pik elde edilememiştir. Çalışmada **Şekil 4.3** ve **Şekil 4.4**'te gösterildiği gibi, tanımlanamayacak anlamsız gürültülerden oluşan kromatogramlar elde edilmiştir.



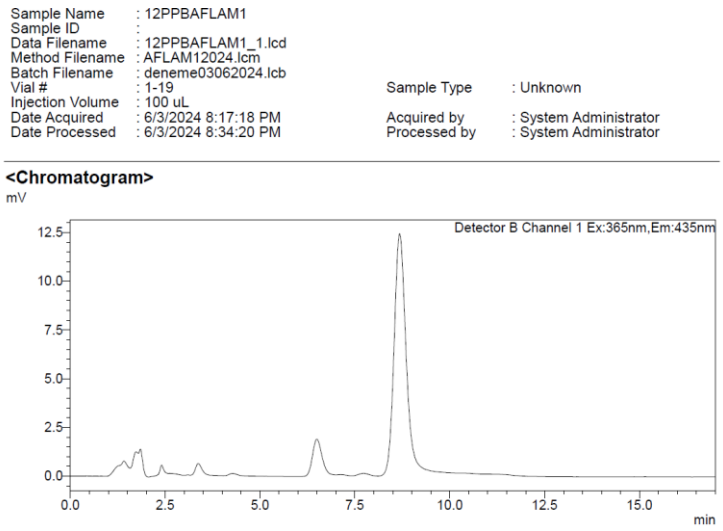
Şekil 4.3 MOA ile hazırlanan numunelerden alınan anlamsız piklerden oluşan kromatogramlara örnek



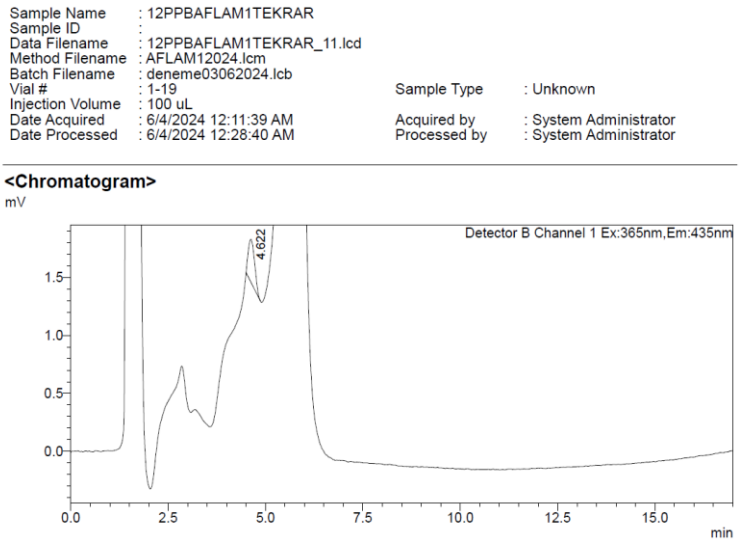
Şekil 4.4 MB ile hazırlanan numunelerden alınan anlamsız piklerden oluşan kromatogramlara örnek

Bu iki DES ile yapılan çalışmalarda sonuç alınamayınca kalma süresi kontrolü için gerçekleştirilen denemede, standart AFM1'in de analiz edilemez olduğu görülmüştür. Bu aşamada, **Şekil 4.5**'te ve **Şekil 4.6**'da gösterildiği gibi, sistem AFM1 için seçici olmaktan çıkmıştır. Çalışmada kullanılan kolon zarar görmüş olup kolon AFM1 ayrımı için

kullanılamaz hale gelmiştir. Kolonun kullanılan kimyasallardan etkilenerek dolgu malzemesinin tahrip olduğu düşünülmektedir.



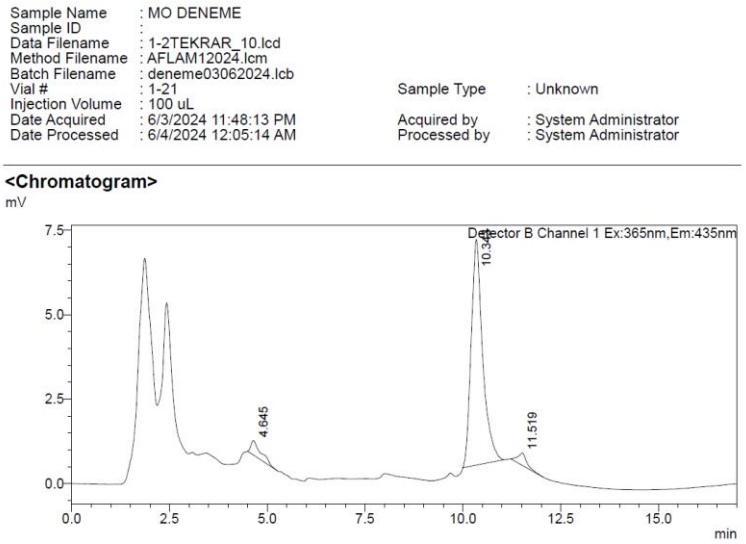
Şekil 4.5 AFM1 standard okuması (kolon zarar görmeden önce)



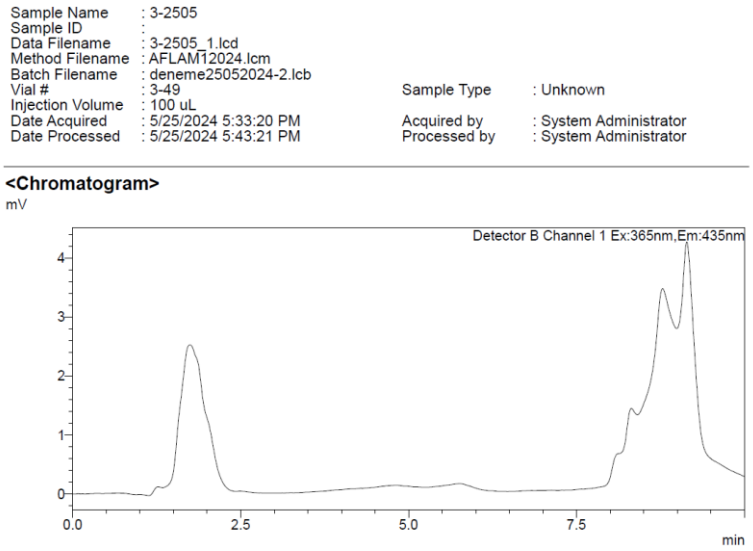
Şekil 4.6 AFM1 standard okuması (kolon zarar gördükten sonra)

MO, MDA ve ML ile yapılan çalışmalarda AFM1, örnek içerisinden geri alınamamıştır. **Şekil 4.7**, **Şekil 4.8** ve **Şekil 4.9'** dan anlaşılacağı üzere yapılan bu çalışmalar, MOA ve MB ile yapılan çalışmalarda olduğu gibi anlamsız gürültüler değil normal pik dağılımı göstermiş olmakla birlikte sonuçlarda AFM1 olarak tanımlanabilecek pik

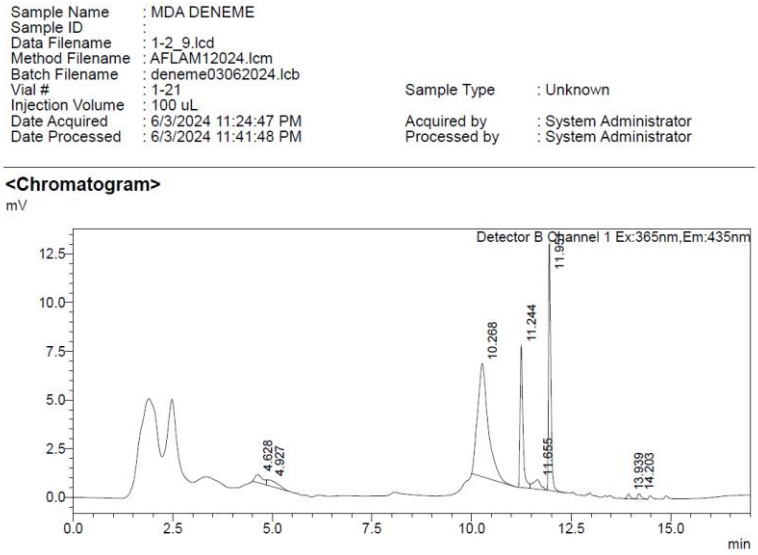
bulunmamaktadır. Örnek üzerine yükleme yapılarak hazırlanan numunelerde de herhangi bir AFM1 varlığı tespit edilemediği **Şekil 4.10**'da gösterilmiştir.



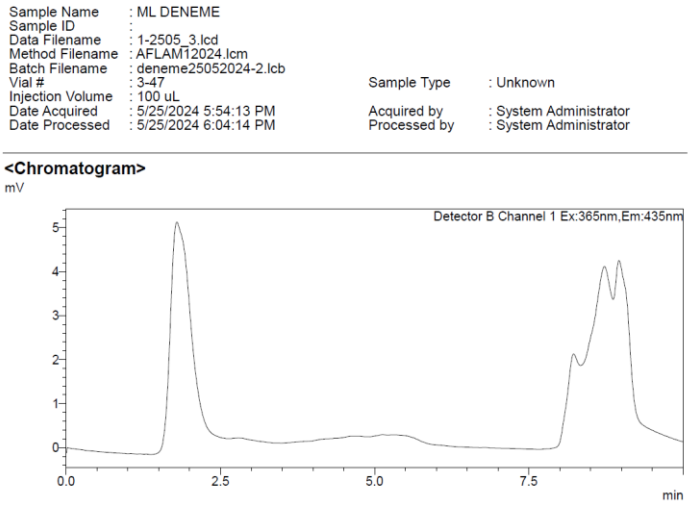
Şekil 4.7 MO ile yapılan çalışma örneği



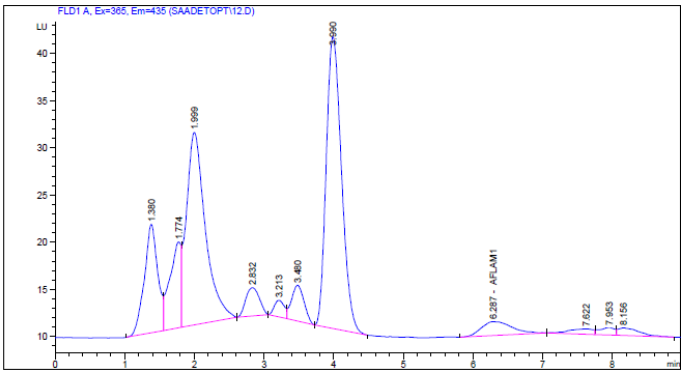
Şekil 4.8 ML ile yapılan çalışma örneği



Şekil 4.9 MDA ile yapılan çalışma örneği



Şekil 4.10 ML ile yapılan 0.05 ppb yükleme çalışması



External Standard Report

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 11/8/2024 5:00:41 PM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FLD1 A, Ex=365, Em=435

RetTime [min]	Type	Area [LU*s]	Amt/Area	Amount [mg/kg]	Grp	Name
6.287	BB	44.75959	1.47025e-2	6.58078e-1		AFLAM1

Totals : 6.58078e-1

Şekil 4.11 MH ile yapılan çalışma örneği

Yapılan çalışmaların ışığında; hazırlanan DES'ler arasında, yalnızca MH ile ekstraksiyon ve analizlerin anlamlı ve tanımlanabilir sonuçlar verdiği görülmüştür, bu nedenle tez çalışması kapsamındaki deneylere MH ile devam edilmiştir ve AFM1'in tanımlanması için alıkonma süresinin 6.2 dk. olarak bulunduğu Şekil 4.11'de gösterilmiştir.

4.2.2 DES hacminin etkisi

DSSME üzerine DES hacminin etkisinin incelendiği çalışmalara literatürde verilen 64 µL değeri ile başlanmıştır ancak bu hacimde olması beklenen faz ayrımı gözlenememiştir. Enjeksiyon hacmi ile ilgili yapılan ön çalışmalarda da 100 µl hacminin en uygun olarak belirlenmesi nedeniyle ekstraksiyonda en az DES hacmi olarak 100 µl kullanılmasına karar verilmiştir. Bu nedenle 100 µl, 150 µl, 200 µl ve 300 µl DES hacimlerinin ektraksiyon üzerine etkileri incelenmiştir.

Sonuçlar **Çizelge 4.3** 'te verilmiştir. Bun göre, 100 µl DES eklendiği durumda da geri alınan miktar enjeksiyona yetecek düzeyde olmadığı belirlenmiş ve DES hacmi artıkça geri kazanılan AFM1 miktarında azalma olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.3 DES hacminin AFM1 geri kazanımına etkisi

Eklenen DES hacmi, µl	AFM1 miktarı, ppb
100	-
150	0.03
200	0.017
300	0.008

Kör numunedeki AFM1 içeriğine en yakın değeri 200 µl DES hacminin verdiği belirlenmiştir. Bu nedenle yüklü numune ile de 200 µl DES hacminde ekstraksiyon gerçekleştirilmiş ve **Çizelge 4.4**'deki sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre 0.05 ppb yüklü numunede ortalama olarak 0.064 ppb AFM1 bulunmuştur. Kör numune 0.018 AFM1 içerdiğinden teoride analiz sonucu 0.068 ppb AFM1 bulunması gerekmektedir. Buna göre sonuçların uygun olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4 200 µl DES hacmi ile geri kazanılan AFM1 miktarı (0.05 ppb yüklü)

Sıra No	Eklenen DES hacmi, µl	AFM1 miktarı, ppb
1	200	0.067
2	200	0.061
3	200	0.063
	Ortalama	**0.064**

Yükleme yapılan numune ile gerçekleştirilen 3 adet analizin sonuçları değerlendirilerek elde edilen geri kazanım oranı olan ER değeri % 94.11 olarak hesaplanmıştır.
1 ppb seviyesinde geri kazanım faktörü limitleri **Çizelge 4.5**'te verilmiş olup (AOAC Peer Verified Methods Program, Nov 1993) bulunan geri kazanım oranı, çalışılan düzey için uygun bulunmuştur.

Çizelge 4.5 Derişime bağlı geri kazanım aralıkları

Miktar (%)	Analit Oranı	Birim	Geri Kazanım (%)
100	1	100 %	98-102
10	10^{-1}	10 %	98-102
1	10^{-2}	1 %	97-103
0.1	10^{-3}	0.1 %	95-105
0.01	10^{-4}	100 ppm	90-107
0.001	10^{-5}	10 ppm	80-110
0.0001	10^{-6}	1 ppm	80-110
0.00001	10^{-7}	100 ppb	80-110
0.000001	10^{-8}	10 ppb	60-115
0.0000001	10^{-9}	1 ppb	40-120

4.3 Ultrasonik Dalga Süresinin Etkisi

Ultrasonik dalga uygulaması referans makalede 8 dk olarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada 2, 4, 5 ve 6 dk sürelerde deneyler yapılmış ve sonuçlar **Çizelge 4.6** ve **Çizelge 4.7**'de sunulmuştur.

Çizelge 4.6 Ultrasonik dalga süresinin AFM1 miktarına etkisi (kör numune-0.018 ppb)

Sıra No	Ultrasonik Dalga Uygulama Süresi, dk	AFM1 miktarı, ppb
1	2	0.0095
2	4	0.016
3	5	0.016
4	6	0.018

Çizelge 4.7 Ultrasonik dalga süresinin AFM1 miktarına etkisi (0.05 ppb yüklü)

Sıra No	Ultrasonik Dalga Uygulama Süresi, dk	AFM1 miktarı, ppb
1	2	0.054
2	4	0.061
3	6	0.063

Madde 4.2.2’ de 8 dk ultrasonik dalga uygulanarak yapılan numunedeki AFM1 miktarının, referans yöntem ile belirlenen değerle %94.11 yaklaşımla örtüştüğü gösterilmişti. Bu çalışmada ultrasonik dalga uygulama süresinin değiştirilmesiyle yapılan denemelerde bulunan sonuçlara göre 4 dk ve üzerindeki ultrasonik dalga uygulama süresinin, AFM1 miktarı açısından benzer sonuçlar doğurabileceği gösterilmiştir.

4.4 Vorteks Süresinin Etkisi

Vorteks süresi uygulaması referans makalede 3.6 dk olarak uygulanmaktadır. 3.6 dk vorteks uygulanarak yapılan Madde 4.2.2.’ de numunedeki AFM1 miktarının, referans yöntem ile belirlenen değerle %94.11 yaklaşımla örtüştüğü gösterilmişti. Bu çalışmada vorteks uygulama süresinin değiştirilmesiyle yapılan denemelerde bulunan sonuçlara göre, Masrouri vd. 2021’de önerilen süreden uzaklaşıldıkça ekstraksiyon veriminin düşmekte olduğu görülmektedir. Yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar **Çizelge 4.8**’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8 Vorteks süresinin AFM1 miktarına etkisi (0.05 ppb yüklü)

Sıra No	Vortex Uygulama Süresi, dk	AFM1 miktarı, ppb
1	3	0.055
2	4	0.057

Yapılan çalışmalar ışığında karar verilen parametreler baz alınarak gerçekleştirilmesi planlanan tekrarlanabilirlik çalışması için 8 adet boş numune hazırlanıp analiz edilmiştir. Alınan sonuçların kendi aralarında tutarlı oldukları ve anlamlı bir veri seti elde edildiği Grubbs testiyle gösterildikten sonra bağıl standart sapma (relative standard deviation, RSD) %6.6 olarak hesaplanmıştır. Tekrarlanabilirlik standard sapmasından faydalanılarak metodun LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. Tekrarlanabilirlik standard sapması SD:0.0011 olup LOD 0.0033 ve LOQ 0.0099 olarak bulunmuştur. Sonuçlar **Çizelge 4.9**’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9 Tekrarlanabilirlik ve bağıl standart sapma değerleri

Numune sayısı	AFM1, ppb
1	0,016
2	0,018
3	0,0152
4	0,0179
5	0,0156
6	0,0156
7	0,0164
8	0,0157
ORT	0,0163
SD	0,0011
Min	0,0152
Max	0,0180
Grubbs L	1,0226
Grubbs H	1,5804
N=8, G=2,032 (Grubb 1969, T1)	OK
RSD	0,06599

4.5 Deneysel Tasarım ve Optimizasyon

Çalışmada peynir örneklerinden DES ve ultrasonik dalga destekli DSSME deneylerinde en yüksek geri kazanımı sağlayan MH DES'i kullanılarak ekstraksiyon parametrelerinin deneysel tasarım yöntemiyle optimizasyonu amaçlanmıştır. Buna göre bağımsız değişkenler DES miktarı, ultrasonik dalga süresi ve sıcaklık olarak seçilmiş ve bu parametrelerin cevap olarak belirlenen zenginleştirme faktörü üzerine etkisi Merkezi Kompozit Tasarım (MKT) kullanılarak incelenmiş ve yanıt yüzeyleri elde edilmiştir (Design-Expert® 9.0. Stat-Ease, Inc., USA). MKT ile oluşturulan deney setleri **Çizelge 4.10**' da verilmiştir.

Çizelge 4.10 MKT ile oluşturulan deney setleri ve cevapları

Deney	Faktör 1 A: DES miktarı (µl)	Faktör 2 B: Süre (dk)	Faktör 3 C: Sıcaklık, °C	Cevap EF
1	210.00	6.50	52.50	9.94
2	210.00	0.61	52.50	3.94
3	210.00	6.50	52.50	9.50
4	230.00	3.00	60.00	5.94
5	230.00	10.00	45.00	7.83
6	190.00	10.00	60.00	7.67
7	210.00	6.50	52.50	9.72
8	243.64	6.50	52.50	5.11
9	210.00	6.50	52.50	9.83
10	230.00	10.00	60.00	8.17
11	230.00	3.00	45.00	5.22
12	210.00	6.50	39.89	8.72
13	210.00	6.50	52.50	9.78
14	190.00	3.00	60.00	7.11
15	210.00	6.50	52.50	9.61
16	190.00	3.00	45.00	6.72
17	190.00	10.00	45.00	7.50
18	176.36	6.50	52.50	8.44
19	210.00	6.50	65.11	8.44
20	210.00	12.39	52.50	9.17

Elde edilen veriler ile oluşturulan model ve model parametrelerinin varyans analizi (ANOVA) sonuçları **Çizelge 4.11**'de verilmiştir. Buna göre en uygun modelin ikinci dereceden model olduğu belirlenmiştir. Model F değerinin (79.85) oldukça büyük ve model p değerinin 0.0001'den küçük olması önerilen modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Modelin regresyon katsayısı (R^2) ve düzeltilmiş regresyon katsayısı ($R^2_{düz}$) değerleri 0.9863 ve 0.9739 olarak bulunmuştur. Bu değerlerin birbirine ve de 1'e yakın olması tahmini ve deneysel değerlerin arasında yüksek bir uyumun olduğunu göstermektedir. Yeterli kesinlik (YK) değeri 25.649 olarak bulunmuş ve bu değerin 4'ten

büyük olması, EF değerinin tahmin edilmesi için modelin kullanılabileceğini doğrulamaktadır. Ayrıca düşük varyasyon katsayısı (%3.25) deneysel sonuçların güvenilirliğini ve kesinliğini göstermektedir.

Modelde yer alan lineer parametreler olan A ve B'nin ve ikinci dereceden tüm parametrelerin (A^2, B^2, C^2) istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$, ve $p<0.0001$). Bunun yanı sıra AB etkileşiminin de istatistiksek olarak önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

Çizelge 4.11 MKT ile elde edilen ikinci dereceden polinom modelinin varyans analiz sonuçları

Kaynak	**KT**	**SD**	**KTO**	**F-değeri**	**p-değeri**	
Model	48.37	9	5.37	79.85	<0.0001	Önemli
A-DES miktarı	2.87	1	2.87	42.70	<0.0001	
B- t	12.68	1	12.68	188.47	<0.0001	
C-T	4.186E-003	1	4.186E-003	0.062	0.8081	
AB	0.84	1	0.84	12.46	0.0054	
AC	0.25	1	0.25	3.69	0.0836	
BC	0.29	1	0.29	4.24	0.0666	
A^2	19.11	1	19.11	284.01	<0.0001	
B^2	14.60	1	14.60	217.01	<0.0001	
C^2	2.52	1	2.52	37.42	0.0001	
Kalıntı	0.67	10	0.067			
Uyum eksikliği	0.55	5	0.11	4.43	0.0641	Önemsiz
Saf hata	0.12	5	0.025			
Toplam	49.04	19				
Std sapma=	0.26					
C.V%=	3.25					
R^2=	0.9863					
$R^2_{düz}$ =	0.9739					
R^2_{tah}=	0.9091					
YK=	25.649					

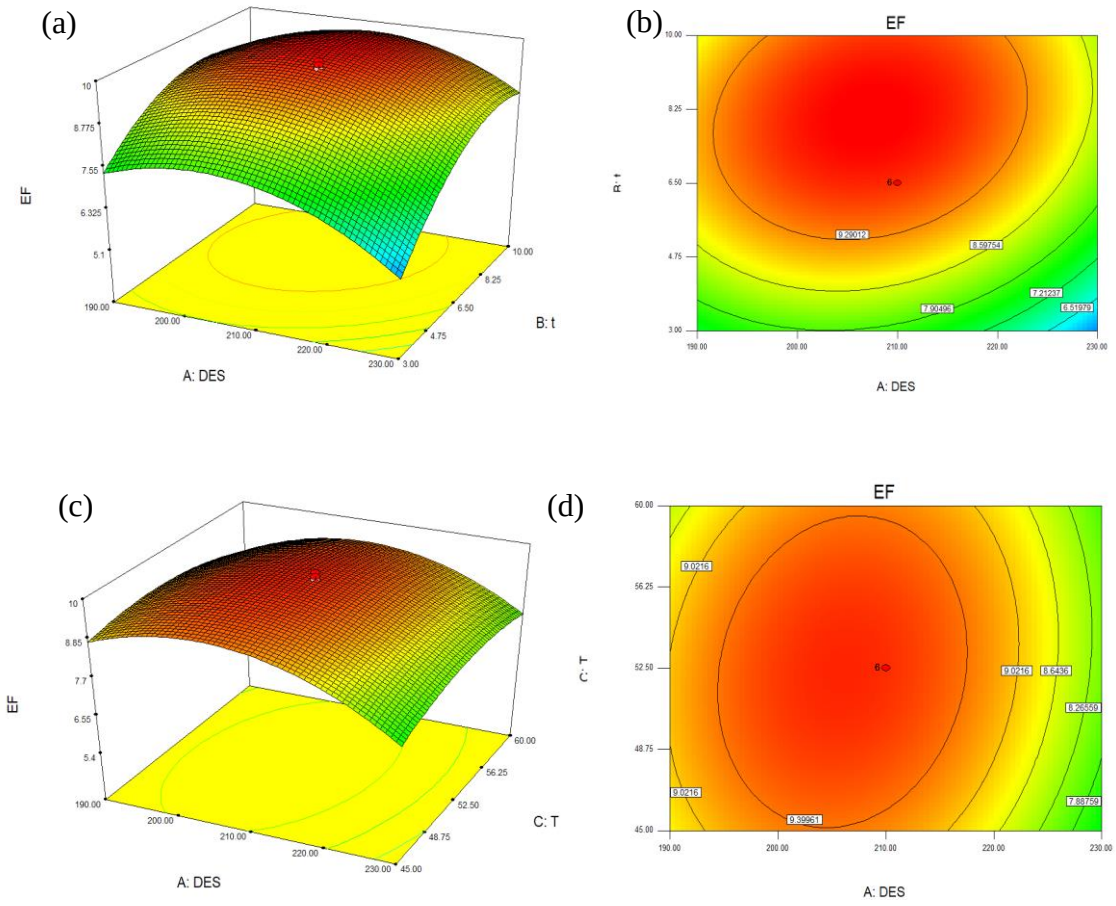
KT: Kareler toplamı, SD: Serbestlik derecesi, KTO: Kareler toplamının ortalaması

EF değeri için yapılan tasarım sonucu oluşturulan ikinci dereceden polinom denklem kodlanmış değişkenler **(Eşitlik 3)** ve gerçek değişkenler **(Eşitlik 4)** cinsinden aşağıda verilmiştir.

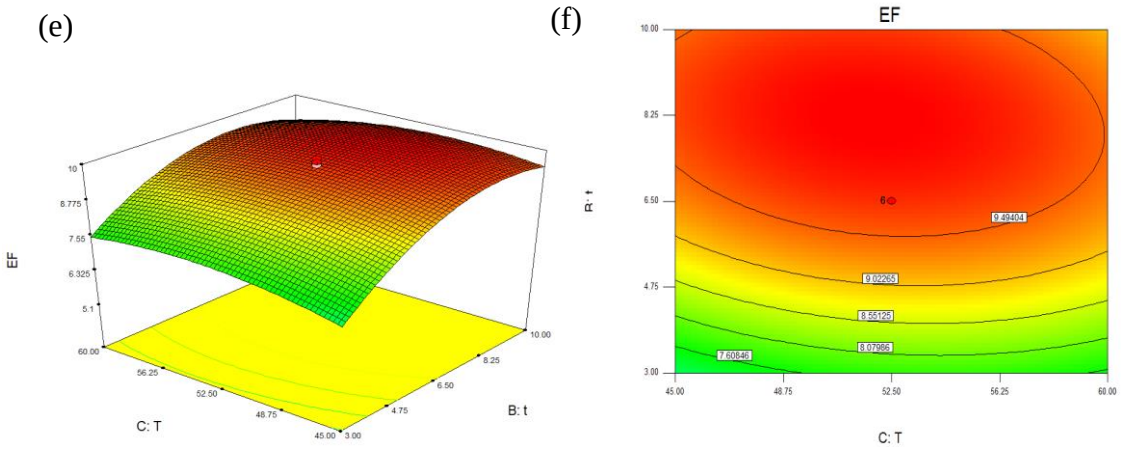
$$EF = +973 - 0.46 * A + 0.96 * B + 0.018 * C + 0.32 * A * B + 0.18 * A * C - 0.19 * B * C - 1.15 * A^2 - 1.01 * B^2 - 0.42 * C^2 \quad (3)$$

$$EF = -121.47440 + 1.09454 * DES\% + 0.74992 * t + 0.58263 * T + 4.62500E003 * DES\% * t + 1.17500 * DES\% * T - 7.19048 * t * T - 2.87912 * DES\%^2 - 0.082179 * t^2 - 7.43154 * T^2 \quad (4)$$

AFM1'in DES miktarı (µl), ekstraksiyon süresi (dk) ve sıcaklık (°C) değerlerine göre değişimini gösteren üç boyutlu yanıt yüzey grafikleri ve eşyükselti eğrileri Ş**ekil 4.12'de** gösterilmiştir.



(e) (f)



Şekil 4.12 Deneysel tasarım sonucu elde edilen YY grafikleri ve eşyükselti eğrileri

(a) ve (b): DES miktarı ve süre ile değişimi (T=52.5°C)
(c) ve (d) DES miktarı ve sıcaklık ile değişimi (t= 6.5 dk)
(e) ve (f) Sıcaklık ve süre ile değişimi (DES miktarı =210 µL)

Şekil 4.12 incelendiğinde tüm grafiklerde en yüksek EF değerinin incelen alanın ortalarında olduğu belirlenmiştir. **Şekil 4.12 a ve b'de** DES miktarı ve sürenin (t) EF üzerine etkisi görülmektedir. Buna göre DES miktarı arttıkça EF önce artmış, sonra azalmıştır. Benzer şekilde ekstraksiyon süresi arttıkça EF değeri önce artmış, sonra azalmıştır. **Şekil 4.12 c ve d'**de verilen grafiklerde DES miktarı ve sıcaklığın (T) EF üzerine etkisi incelendiğinde tüm T değerlerinde DES miktarı arttıkça EF'de önce artış, ardından tekrar düşüş gözlenmiştir. En yüksek EF değerlerine DES ve sıcaklığın orta değerlerinde ulaşıldığı belirlenmiştir. **Şekil 4.12 e ve f**'de verilen grafiklerde ise sıcaklık (T) ve sürenin (t) EF üzerine etkisi verilmiştir. Buna göre t'nin artmasıyla EF'de yüksek bir artış, sonra hafif bir azalma gözlenmiştir. T'nin değişiminin EF üzerinde çok önemli bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Bu durum, ANOVA analiz tablosunda sıcaklık ana etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmaması (p=0.8081) ile de desteklenmektedir. En yüksek EF değerlerine orta t ve orta T değerlerinde ulaşıldığı görülmektedir.

YYY grafiklerinin incelenmesinin ardından EF değerinin optimize edilmesi amaçlanmıştır. Buna göre cevabın maksimize edilmesi için program tarafından optimum koşullarda ekstraksiyon süresi 7.98 dk, sıcaklık 52°C ve DES miktarı 207 µl ve bu koşullar altında EF değeri 9.98 olarak öngörülmüştür. Deneyler optimum koşullar altında

4 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve EF değeri 10.22 ± 0.31 olarak bulunmuştur. Öngörülen ve bulunan EF değerleri birbirine oldukça yakın bulunmuştur (%2.3). Buna göre optimizasyon başarı ile gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullar altında %ER değeri ise %101.14 ± 0.92 olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen yöntemde AFM1'in ekstraksiyonu için harcanan DES miktarı, klasik yöntemle gerçekleştirilen ekstraksiyon aşamalarında harcanan organik çözücü miktarının (yaklaşık 250 ml) yanında ihmal edilebilecek derecede düşük miktarda olduğundan ve analitin geri kazanım oranı yeterli seviyede gerçekleştiğinden dolayı, geliştirilen yeni nesil mikroekstraksiyon yönteminin başarıya ulaştığı değerlendirilmiştir.

Optimize edilen yöntemin aflatoksin yüklemesi ile değişiminin belirlenebilmesi için peynir örneğine 50 ve 100 ng/kg oranında yüklemeler yapılarak EF ve %ER değerleri belirlenmiş ve **Çizelge 4.12**'de verilmiştir. Buna göre 50 ng/kg yüklemede EF 38.165±0.785, 100 ng/kg yüklemede ise EF 65.83±0.388 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla peynire yükleme yapıldığında EF değerinin arttığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.12 Optimize edilen yöntemin farklı yükleme sonuçları

Yüklenen AFM1 ng/kg	**Toplam AFM1 µg/kg**	**Bulunan AFM1 µg/kg**	**Zenginleştirme faktörü (EF)**	**Geri kazanım oranı, (%ER)**
0	0.018	0.018±0.001	10.22±0.311	101.14±0.919
50	0.068	0.067±0.001	38.165±0.785	98.45±0.608
100	0.118	0.121±0.002	65.83±0.388	102.74±0.523

4.6 Metot Validasyonu

DES kullanılarak peynirden AFM1 analizi için geliştirilen UD-DSSME yönteminin validasyonu için tespit limiti, ölçüm limiti, lineer aralık, korelasyon faktörü, gün içi ve günler arası bağıl standard sapma ve doğruluk değerleri, zenginleştirme faktörü ve ekstraksiyon geri kazanımı değerleri Çizelge 4.13'te verilmiştir.

Çizelge 4.13 Geliştirilen yöntemin kantitatif özellikleri

Parametreler	**Değerler**
Tespit Limiti (LOD:3xSD), µg/kg	0.0038
Ölçüm Limiti (LOQ:10xSD), µg/kg	0.0127
Lineer Aralık (LR), µg/kg	0.0127-0.5
r^2 (Korelasyon Faktörü)	0.999
% RSD (Gün içi)	1.90 (n=7, 50 ng/kg)
% RSD (Günler arası)	2.29 (n=7, 50 ng/kg)
Zenginleştirme Faktörü (EF)	10.22 ± 0.31 (n=4, yüklemesiz)
	38.17 ± 0.79 (n=4, 50 ppt yükleme)
	65.83 ± 0.39 (n=4, 100 ppt yükleme)
Ekstraksiyon Geri Kazanımı (ER), %	99.43 ± 2.53 (n=14)
%Doğruluk (Günler arası)	97.06-102.94
%Doğruluk (Gün içi)	97.06-101.47

Buna göre LOD ve LOQ değeri oldukça düşük bulunmuştur. Yöntemin lineer olduğu aralık 0.0127-0.5 µg/kg olarak bulunmuştur. Bu değer aralığının analitin beklenen derişiminin 50-150% aralığında olması uygundur. Ülkemizdeki AFM1 üst limiti olan 0.05 µg/kg değeri ile kıyaslandığında bu lineer aralığın 0.075 µg/kg değerine kadar çıkması yeterlidir. Genel olarak ülkemizdeki peynir çeşitliliğine bakıldığında ise AFM1 miktarının 0.02-0.04 µg/kg olarak ölçüldüğü görülmektedir. Çalışmada belirlenen lineer aralık, ülkemizdeki peynirlerde AFM1 miktarının kantitatif olarak analiz edilebilmesi için yeterlidir.

%RSD değeri, standard yöntem olan TS EN ISO 14501:Eylül 2021'den modifiye VICAM AflaTest Afla M1 Analiz Yöntemi ile karşılaştırıldığında, daha düşük olduğu için kabul edilebilir düzeydedir.

Çizelge 4.14'te farklı kaynaklardan aflatoksin analizi yapmış olan çalışmaların yöntemleri özetlenmiştir.

Çizelge 4.14 Farklı kaynaklardan aflatoksin analiz yöntemleri

Parametre	**Masrouri vd 2021**	**Gürsoy vd 2022**	**Chen vd 2022**	**Kiani vd 2022**	**Lesan vd 2023**	**Standard Yöntem**	**Tez**
Matriks	Peynir	Süt	Yağ	Bebek maması	Pirinç	Peynir	Peynir
Analit	AFM1	AFM1	AFB1	AFM1	AFB1	AFM1	AFM1
LOD, µg kg^{-1}	0.0007	0.0061	0.4	0.002	0.04	0.005	0.0038
LOQ, µg kg^{-1}	0.0025	0.02	0.8	0.005	0.14	0.014	0.0127
LR, µg/kg	0.0025-2	0.02-300	0.8-80	0.005-10	0.14-1000	0.014-5	0.0127-0.5
R^2	0.998	0.996	0.998	0.999	0.998	0.999	0.999
% RSD (Gün içi)	5.3 (n=6, 5 ng/kg)	3.3-5.1 (n=5)	5.86 (n=6)	2.7 (n=7)	5.3 (n=6)	2.64	1.90 (n=7, 50 ng/kg)
% RSD (Günler arası)	8.6 (n=6, 5 ng/kg)	4.1-6.2 (n=5)	8.71 (n=6)	3.8 (n=7)	5.8 (n=4)	3.08	2.29 (n=7, 50 ng/kg)
EF	94 ± 4 (n=3)	328 (n=6)		225	62±2 (n=3)	8	10.22 ± 0.31 (n=4, yüklemesiz)
							38.17 ± 0.79 (n=4, 50 ng/kg)
							65.83 ± 0.39 (n=4, 100 ng/kg)
ER, %	94 ± 4 (n=3)	91-99 (n=5)	101.9 (n=6)	89	78±3 (n=3)	94.58	99.43 ± 2.53 (n=14)

Çizelge 4.14'te özetlenen sonuçlara bakıldığında; yeni geliştirilen yöntemin % geri kazanım oranının, diğer çalışmalarda elde edilen sonuçlara kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Yeni metodun tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik standard sapması sonuçları, daha önce yapılmış tüm çalışmalardan daha düşüktür, bu da göstermektedir ki geliştirilen metod ile daha önce yapılan çalışmalara oranla daha yüksek tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik sağlanmıştır. Tüm bunlara ek olarak, ulaşılan LOD ve LOQ seviyeleri, diğer çalışmalara oranla yüksek olmakla birlikte ülkemiz koşullarında üretilen peynir örneklerinde beklenen AFM1 miktarları göz önünde bulundurularak değerlendirildiğinde ulaşılan LOD ve LOQ seviyleri ve lineer aralık yeterli düzeydedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında ülkemizde en çok tüketilen besinlerden biri olan peynirin içinde bulunabilen Aflatoksin M1 (AFM1) isimli mikotoksinin etkin bir şekilde ekstraksiyonu için yeni nesil, verimli ve çevre dostu bir yöntem olan ultrasonik dalga destekli sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yönteminin Derin Ötektik Çözücüler (Deep Eutectic Solvents, DES) kullanılarak geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu tez çalışması ile geliştirilen yöntem ile günümüzde uygulanmakta olan yönteme alternatif sunularak toksik organik çözücü tüketiminin en aza indirilmesi, maliyetin düşürülmesi ve yüksek zenginleştirme faktörü ve yüksek geri kazanım ile AFM1 ekstraksiyonunun gerçekleşmesi hedeflenmiştir.

Bu doğrultuda çalışma kapsamında peynirdeki AFM1'in ekstraksiyonu ve analizi için Derin Ötektik Çözücüler (Deep Eutectic Solvents, DES) kullanılarak ultrasonik dalga destekli dağıtıcı sıvı-sıvı mikroektraksiyon (UDD-DSSME) yöntemi araştırılmıştır. Tez çalışmasında öncelikle AFM1 analizinde HPLC ile analiz koşulları geliştirilmiştir. Taşıyıcı faz bileşimi, kolon sıcaklığı, akış hızı, enjeksiyon hacminin etkileri incelendiğinde sırasıyla, asetonitril:su (25:75 v/v) izokratik, 40°C, 1 ml/dk ve 100 µl olarak belirlenmiştir. Daha sonra DES'ler ile UDD-DSSME gerçekleştirilmesi amacıyla literatürde daha önce incelenmemiş olan yedi farklı mentol bazlı DES hazırlanmış ve ilk kez peynirden AFM1 ekstraksiyonunda kullanılmıştır. İncelenen DES'ler arasında en iyi yanıt veren DES türü mentol:hekzanoik asit (MH) olarak belirlenmiştir.

Literatürde, bebek sütünden AFM1 analizinde metil trioktil amonyum klorür ile (MTOAC), MTOAC:etilen glikol, MTOAC:n-bütanol, MTOAC:gliserol, MTOAC:n-heptanol ve MTOAC:n-nonanol DES'leri kullanılmıştır. En yüksek ER (%89) ve EF (225) MTOAC:n-bütanol (1:3) ile elde edilmiştir (Kiani vd 2022). Bunun yanısıra pirinçten AFM1 ekstrraksiyonunda etil metil amonyum klorür (EMAC):karvakrol ve EMAC:timol kullanılmıştır. En yüksek ER (%75) ile EMAC:karvakrol kullanılarak elde edilmiştir (Lesan vd 2023). Sütten AFM1 analizinde ise betain klorür ve kolin klorür HBD olarak kullanılarak, ksiloz, früktoz, sukroz ve maltoz HBA kullanılmış ve 8 adet

DES hazırlanmıştır. En yüksek ER (%91.4) betain klorür:maltoz (1:2) ile elde edilmiştir (Gürsoy vd 2022). Peynirden mikroekstraksiyon gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise DES türü incelenmemiş ve hazırlanan N,N-dietanol amonyum klorür:karvakrol kullanılmıştır (Masrouri vd 2022).

Yayınlanan bu çalışmalarda DES türü seçimlerinde etkili olan parametrelerden bahsedilmemiştir. Bu çalışmada incelenmek üzere seçilen DES türlerinin dağıtıcı özellik gösterebilmeleri için hidrofobik özellikte olmalarına ve ekonomik olması için ucuz bileşenler olmalarına dikkat edilmiştir. Ayrıca literatüre katkı sunulabilmesi için daha önce bu konuda kullanılmamış olan hidrofobik DES'ler arasından seçim yapılmıştır.

Geliştirilen yöntemde en iyi sonucu veren mentol:hekzanoik asit DES'inin bileşenlerinin birim maliyetleri 100 g üzerinden hesaplandığında toplamda 2.900.-TL iken, Masrouri'nin 2022 yılında yaptığı çalışmada önerilen N,N-dietanol amonyum klorür:karvakrol DES'i için bileşenlerin birim maliyeti 100 g için 27.100.-TL olarak hesaplanmaktadır. Dolayısıyla geliştirilen yöntem lietartür ile kıyaslandığında seçilen çözücü açısından daha ekonomiktir.

En iyi çözücü türünün seçilmesinin ardından mikroekstraksiyon üzerinde etkili olduğu bilinen parametreler olan DES hacmi, vorteks süresi ve ultrasonik dalga süresi paramatrelerinin AFM1 geri kazanımı üzerine etkileri tek seferde tek parametre yöntemiyle incelenmiştir. Bu deneyler deneysel tasarım için düşük ve yüksek seviye değerlerinin belirlenmesinde yardımcı olmuştur.

Deneysel tasarımda faktörlerin etkilerinin birlikte incelenebilmesi için parametreler sıcaklık, DES hacmi ve ultasonik dalga süresi olarak belirlenmiş ve zenginleştirme faktörü üzerine etkileri incelenmiştir. Sonuçların ANOVA analizleri gerçekleştirilmiş ve cevabı en iyi ifade eden denklemin ikinci dereceden polinom olduğu belirlenmiştir. Model F değerinin (79.85) oldukça büyük ve model p değerinin 0.0001'den küçük olması önerilen modelin anlamlı olduğunu göstermiştir. Modelin regresyon katsayısı (R^2) ve düzeltilmiş regresyon katsayısı ($R^2_{düz}$) değerleri 0.9863 ve 0.9739 olarak bulunmuştur. Bu

değerlerin birbirine ve de 1'e yakın olması tahmini ve deneysel değerlerin arasında yüksek bir uyumun olduğunu göstermektedir.

Modelde yer alan lineer parametreler olan A ve B'nin ve ikinci dereceden tüm parametrelerin (A^2, B^2, C^2) istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$, ve $p<0.0001$). Bunun yanı sıra AB etkileşiminin de istatistiksek olarak önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). AFM1'in DES miktarı (µl), ekstraksiyon süresi (dk) ve sıcaklık (°C) değerlerine göre değişimini gösteren üç boyutlu yanıt yüzey grafikleri ve eşyükselti eğrileri incelendiğinde optimum koşulların deneysel alanın orta noktalarına denk geldiği belirlenmiştir.

Literatürde DES kullanarak AFM1 mikroekstraksiyonunda deneysel tasarım ile optimizasyon yapan iki çalışmaya rastlanmıştır. Sütten miktoekstraksiyonun gerçekleştirildiği ilk çalışmada DES miktarı ve ultrasonik dalga süresinin yanısıra prosedürlerine özgü iki farklı parametre (pH değeri ve pirogallol derişimi) faktör olarak kullanılmış ve ER değeri optimize edilmiştir. Çalışmada ikinci dereceden polinomun cevabı en iyi ifade eden denklem olduğu belirlenmiştir ancak çalışıan deneysel bölge optimum değerin kenarında yer almıştır. Yükleme yapılan örneklerle gerçekleştirilen optimizasyon sonucu ER olarak %107 ve EF değeri 328 olarak elde edilmiştir (Gürsoy vd 2022).

Bu tez çalışması ile en çok ortak noktası olan çalışmada peynirden AFM1 mikroekstraksiyonunda ise deneysel tasarımda faktörler olarak asetonitril hacmi, tuz derişimi, DES hacmi ve vorteks süresi incelenmiştir. Cevabı ifade eden denklem yine ikinci dereceden polinom olarak bulunmuştur. Ancak R^2 ve öngörülen R^2 değerleri bu çalışmaya göre düşük bulunmuştur (R^2=0.9751 ve öngörülen R^2=0.9590). ER ve EF değerleri %94 ve 94 olarak verilmiştir.

Bu tez çalışmasında peynire AFM1 yüklemesi yapılmadan orijinal AFM1 içeriği üzerinden optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Bunun amacı, yüksek değerler sunmaktan ziyade peynirde var olan AFM1 içeriğinin EF değerini artırmaktır. Dolayısıyla EF değeri 10.22 ± 0.31 olarak optimize edilmiştir. Optimum koşullar altında altında %ER değeri ise

%101.14 ± 0.92 olarak belirlenmiştir. Bu da geliştirilen yöntemin AFM1'in tamamının ekstrakte edilebildiğini göstermektedir. Literatür ile kıyaslanabilir sonuçlar elde edilebilmesi için literatürdeki gibi 50 ve 100 ng/kg oranında yüklemeler yapılarak EF ve %ER değerleri belirlenmiş ve peynire yükleme yapıldığında EF değerinin arttığı belirlenmiştir.

Yöntem validasyonu sonucunda ilgili değerlerin tamamının kabul edilebilir düzeyde olduğu belirlenmiştir. Geliştirilen yeni yöntemin literatürde farklı kaynaklarda geliştirilen yöntemlerde olduğu gibi yüksek geri kazanım oranı ve yüksek tekrarlanabilirliğe sahip olduğu ve bu sayede alternatif bir yöntem olarak kullanımının mümkün olabileceği tespit edilmiştir.

Ülkemizde AFM1 analizi genel prosedüründe AFM1 için seçici özellikteki immunoaffinite kolon kullanılmakta ve çözücü olarak kloroform ve hekzan gibi organik çözücüler yüksek miktarda (yaklaşık 250 ml) kullanılmaktadır. Kloroformun ortamdan uzaklaştırılması için döner buharlaştırıcıda uçurma işlemi yapılmaktadır. Bunun yanı sıra her bir analiz için bir adet immunoafinite kolon kullanılmakta ve dolayısıyla gün içinde gerçekleştirilen onlarca analiz sonucu toksik organik çözücü miktarı artmakta ve kolon maliyeti yüksek seviyelere çıkmaktadır. Ekstraksiyonun son adımında ise eluatın immunoaffinite kolondan etkin şekilde süzülmesini sağlamak amacıyla ise yağsız vakum pompası entegre edilmiş vakum manifoldu ile süzme işlemi gerçekleştirilmekte olduğundan elektrik sarfiyatı da yüksektir.

Bu tez çalışmasında, hedeflendiği üzere,

- peynirden AFM1 mikroekstraksiyonunda toksik organik çözücü kullanımı yaklaşık 100 kat azaltılmış (2.1 ml ACN),
- immünoafinite kolona ihtiyaç kalmamış
- AFM1 ekstraksiyon süresi 120 dk'dan 35 dk'ya indirilmiş,
- yeşil çözücü olan DES kullanılarak UD-DLLME optimize edilebilmiş
- yüksek ER ve EF değerlerine ulaşılmış
- literatür ile kıyaslanabilir ve kabul edilebilir değerlerin elde edildiği ekonomik analiz yöntemi geliştrilmiştir.

KAYNAKLAR

Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D. L., & Rasheed, R. K. (2004). Deep Eutectic Solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids. Journal of the American Chemical Society, 126(29), 9142–9147.

Akçelik, M., Ayhan, K., Çakır, D., Doğan, H.B., Gürgün, V., Halkman, K.A., Kaleli, D., Kuleasan, H., Özkaya, F.G., Tunail, N., Tükel, Ç., 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Sim Matbaacılık, 2. Baskı, Ankara.

Akramipour, R., Golpayegani, M.R., Gheini, S., Fattahi, Z., 2018. Speciation of organic/inorganic mercury and total mercury in blood samples using vortex assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on the freezing of deep eutectic solvent followed by GFAAS, Talanta 186, 17-23.

An Y., Row K. H., 2021. Evaluation of Menthol-Based Hydrophobic Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Bisphenol A from Environment Water, Vol. 54, No:9, 1533-1545.

Anonim. 2011. Eritme Peynir Standardı. TS 2176. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

Anonim. 2013. Beyaz Peynir Standardı. TS 591. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

Anonim. 2016. Otlu Peynir Standardı. TS 13205. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

Anonim. 2016. Lor Peyniri Standardı. TS 13358. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

Anonim. 2016. Gravyer Peyniri Standardı. TS 2174. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

Anonim. 2016. Tulum Peyniri Standardı. TS 3001. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

Anonim. 2016. Kaşar Peyniri Standardı. TS 3272. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

Anonim. 2018. Hellim Peyniri Standardı. TS 12513. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

Anonim. 2023. Web Sitesi: https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=40394&MevzuatTur=7&MevzuatTertip=5 Resmi Gazete, Türk Gıda Kodeksi – Bulaşanlar Yönetmeliği Ekleri, Erişim tarihi: 20.07.2024.

Anonim. 2024.Web Sitesi: https://www.commodityregs.com/index.php?crumb=1&region=&country=&commodity=dairy&app=, Erişim Tarihi: 22.06.2024.

Anonim. 2024. Web Sitesi: https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Sut-ve-Sut-Urunleri-Uretimi-Aralik-2023-49478, Erişim tarihi: 20.07.2024.

Boateng, I. D. (2022). A Critical Review of Emerging Hydrophobic Deep Eutectic Solvents' Applications in Food Chemistry: Trends and Opportunities. In Journal of Agricultural and Food Chemistry (Vol. 70, Issue 38, pp. 11860–11879). American Chemical Society.

Cacho, JI, Campillo, N, Viñas, P, Hernández-Córdoba, M. 2016. Cloud point extraction and gas chromatography with direct microvial insert thermal desorption for the determination of haloanisoles in alcoholic beverages. Talanta 1601:282-8.

Cao, J., Su, E. 2021. Hydrophobic deep eutectic solvents: the new generation of green solvents for diversified and colorful applications in green chemistry. Journal of Cleaner Production 314, 127965.

Castegnaro, M ve Gregor, MC. 1998. Carcinogenic risk assessment of mycotoxins. Rev Med Vet. 671-678.

Chen, M., Li, M., Zhang, W., Bai, H., Ma, Q. 2022. Natural Deep Eutectic Solvent-Based Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Coupled with Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry: A Green Temperature-Mediated Analytical Strategy, J. Agric. Food Chem. 2022, 70, 35, 10919–10928.

Cherniakova, M., Varchenko, V., Belikov, K. 2024. Menthol-Based (Deep) Eutectic Solvents: A Review on Properties and Application in Extraction. The Chemical Society of Japan and Wiley-VCH GmbH. Chem. Rec. 2024, 24, e202300267.

Creppy, E.E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicology Letters. 127; 19-28.

Çelik, K.S. 2010. Gıda Ürünlerinde İmmüno Afinite Kolonunda Temizleme (Clean Up) İşleminden Sonra İyot Türevlendirmesi Yapılarak Hplc İle Aflatoksin B1, B2, G1, G2 Türevlerinin Tayini Yüksek Lisans Tezi. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Domijan, A.M. ve Peraica, M., 2010. 14.07 - Carcinogenic Mycotoxins. Vol. 14 125-137.

Fallah, AA., 2010. Aflatoxin M_ contamination in dairy products marketed in Iran during winter and summer. Food Control. 21:1478-81.

FAO. 1979. Prevention of mycotoxins. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and Nutrition paper. Rome.

Farajzadeh, M.A., Djozan, D., Khorram, P., 2012. Development of a new dispersive liquideliquid microextraction method in a narrow-bore tube for preconcentration of triazole pesticides from aqueous samples, Anal. Chim. Acta 713 70-78.

Florindo, C., Branco, L. C., & Marrucho, I. M. (2017). Development of hydrophobic deep eutectic solvents for extraction of pesticides from aqueous environments. Fluid Phase Equilibria, 448, 135–142.

Fox, P., 1993. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, p:6.

Franco, ES, Pádua, VL, Rodriguez, MDVR, Silva, DF, Rodrigues, JL. 2019. A simple liquid-liquid extraction-gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of haloacetic acids in environmental samples: Application inwater with Microcystis aeruginosa cells. Microchem J. 150:104088.

Gilbert, J., 2002. Validation of Analytical Methods for Determining Mycotoxins in Foodstuffs, Trends in Analytical Chemistry, 21, 468-470.

Goyal, R.K.,2005. Mycotoxin Prevention and Control in Foodgrains, India.

Groopman, J.D. and Kensler, T.W., 1988, Aflatoxin Exposure in Human Populations: Measurements and Relationship to Cancer, CRC Critical Review in Toxicology, 19(2), 113-145.

Gürsoy, N., Sırtbası, B., Simsek, S., Elik, A., Altunay, N., 2022. Optimization and application of ultrasound-assisted sugar based deep eutectic solvent dispersive liquid–liquid microextraction for the determination and extraction of aflatoxin M1 in milk samples, Microchemical Journal, 172 106974.

Herrman, T., 2002. Mycotoxins in Feed Grains and Ingredients, Kansas State University, MF- 2061, Feed Manufacturing, 1-3.

Huang, LC, Zheng, N, Zheng, BQ, We,n F, Cheng, JB, Han, RW, Xu, XM, Li, SL, Wang, JQ., 2014. Simultaneous determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, zearalenone and zearalenol in milk by UHPLC-MS/MS. Food Chem. 146:242-9.

Huang, W., Xue, A., Niu, H., Jia, Z., Wang, J. 2009. "Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from Folium eucommiae and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro". Food Chemistry.

Kanberoglu, G.S., Yilmaz, E., Soylak, M., 2019. Developing a new and simple ultrasound-assisted emulsification liquid phase microextraction method built upon deep eutectic solvents for Patent Blue V in syrup and water samples, Microchem. J. 145, 813-818.

Kanık, T., 2018. Bademlerde Aflatoksin Varlığının Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hitit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 61s.

Kiani, A., Sharafi, K., Jouybari, T.A., Jouybari, H.A., Biglari, H., Ebrahimzadeh, G., Fattahi, N., 2022. Quantitative analysis and carcinogenic/non-carcinogenic risk assessment of aflatoxin M1 in milk-based baby food and infant formula milk – a case study in Iran, Food Additives & Contaminants: Part A, 39:9, 1604-1618, DOI: 10.1080/19440049.2022.2096931.

Knorr, D., Ade-Omowaye, B. I. O., Heinz, V. 2002. "Nutritional improvement of plant foods by non-thermal processing". Proceedings of the Nutrition Society.

Lagana, A., Cavaliere, C., Berni, E., Spotti, E., 2005. Immunoaffinitiy Clean-up and Direct Fluorescence Measurement of Aflatoxins B1 and M1 in Pig Liver: Comparison with High-performance Liquid Chromatography Determination, Food Additives and Contaminants, 22(11), 1154-1161.

Lesan S., Mirzaei H., Khandaghi J., Mogaddam M. R. A., Javadi A., 2023. Development of deep eutectic solvent based pressurized liquid extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction; application in extraction of aflatoxins from rice samples before HPLC–FLD, Microchemical Journal 190, 108554

Li, G., Row, K. H., 2019. Utilization of deep eutectic solvents in dispersive liquid-liquid microextraction, Trends in Analytical Chemistry 120, 115651.

Liu, X., Liu, C., Qian, H., Qu, Y., Zhang, S., Lu, R., Gao, H., Zhou W. Ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on a hydrophobic deep eutectic solvent for the preconcentration of pyrethroid insecticides prior to determination by high-performance liquid chromatography, Microchem. J. 146 (2019) 614e621.

Masrouri, M., Mogaddam, MRA., Farajzadeh MA., Lotfipour, MNF., 2021. Combination of solvent extraction with deep eutectic solvent based dispersive liquid–liquid microextraction for the analysis of aflatoxinM1 in cheese samples using response surface methodology optimization, J Sep Sci 2021; 44:1501-1509.

Mei, M., Huang, X., Chen, L. 2019. Recent development and applications of poly (ionic liquid) s in microextraction techniques, TrAC Trends Anal. Chem. 112, 123-134.

Miklós, G, Angeli, C, Ambrus, Á, Nagy, A, Kardos, V, Zentai, A, Kerekes, K, Farkas, Z, Józ´wiak, Á, Bartók, T., 2020. Detection of Aflatoxins in Different Matrices and Food-Chain Positions. Front. Microbiol. 11:1916.

Müller, G.,1986. Grudlagen Der Lebesmittel Mikrobiologie, Steinkopff Verlag, 220-343, Darmstadt.

Oruç, H.H., 2003. Süt ve Süt Ürünlerinde Aflatoksin M 1 ve Türkiye' deki Durumu, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 22, (1-2-3)

Özçelik, S., Sağdıç, O., Dığrak, M., Özçelik, N., 2003. Gıda ve Yemlerde Mikotoksin Olusumunun Önlenmesi ve Eliminasyonu, I. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, Bildiriler Kitabı, 139-145, İstanbul.

Pittet, A. 1998. Natural occurence of mycotoxins in foods and feeds-an updated rewiew. Rew. Med. Vet., 149(6); 479-492.

Reiss, J., 1998. Schimmelpilze Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekaemptining, Springer Verlag, Berlin, 308, New York.

Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseini, M.R.M., Aghaee, E., Ahmadi, F., Berijani, S., 2006. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid liquid microextraction, J. Chromatogr. A 1116 (1-2) 1-9.

Ribeiro, B. D., Florindo, C., Iff, L. C., Coelho, M. A. Z., Marrucho, I. M., 2015. Menthol-based Eutectic Mixtures: Hydrophobic Low Viscosity Solvents, ACS Sustainable Chem. Eng., 3, 2469−2477.

Sarafraz-Yazdi, A., Amiri, A., 2010. "Liquid-phase microextraction", Trends Anal. Chem, 29, 1, 1–14.

Sener, S., Yıldırım, M., 2000. Veteriner Toksikoloji, Teknik Yayıncılık, İstanbul, 240-252.

Sereshti, H., Jazani, S. S., Nouri, N., Shams, G., 2020. Dispersive liquid‑liquid microextraction based on hydrophobic deep eutectic solvents: Application for tetracyclines monitoring in milk. Microchemical Journal 158, 105269.

Sorouraddin, SM, Mogaddam, MRA. 2016. Development of molecularly imprinted-solid phase extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction for selective extraction and preconcentration of triazine herbicides from aqueous samples. J Iran Chem Soc. 13(6):1093-104.

Stoloff, L., 1975. Trucksess, M., Hardin, N., Francis, O.J., Hayes, J.R., Polan, C.E. and Campbell, T.C. Stability of aflatoxin M in milk. J. Dairy Sci. 58;1789-1793.

Stoloff, L., 1977. Aflatoxins – An Overview: Mycotoxins in Human and Animal Health. Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W., Mehlman, M.A. (eds), Pathotox Publishers, Inc., 7-29, Park Forest South, Illinois.

Tabaraki, R., Heidarizadi, E. 2019. Spectrophotometric determination of phenol and chlorophenols by salting out assisted liquid-liquid extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction, Spectrochim. Acta A 215, 405-409.

Tarakçı, Z., Bölük, M., ve Karaağaç, M., 2015. Ordu İlinde Tüketicilerin Peynir Tüketim Alışkanlıkları. Ordu Üniv. Bil. Tek. Derg, 55-62.

Tekinşen, K. K. 2003. Maraş Peyniri Üretiminde Baskılama Ağırlığı ve Haşlama Suyu. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi.

Timbrell, J.A., 1989. Introduction to Toxicology, CRC Pres, ISBN:9780415247634, London England, 78-79.

Tuzen, M. ve Pekiner, O.Z., 2015. Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquideliquid microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometric for selenium speciation in foods and beverages, Food Chem. 188, 619-624.

Van Egmond, H. P. and Paulsch, W. E. 1986. Mycotoxins in milk and milk products. Neth. Milk Dairy J., 40; 175-188.

Van Osch, D.J.G.P., Zubeir, L.F., Van Den Bruinhorst, A., Rocha, M.A.A. and Kroon, M.C. 2015. Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants. Green Chemistry, 17(9); 4518–4521.

Wang, H., Hu, L., Liu, X., Yin, S., Lu, R., Zhang, S., Zhou, W., Gao, H., 2017. Deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of ultraviolet filters in water samples, J. Chromatogr. A 1516, 1-8.

Wang, X., Xu, G., Chen, P., Liu, X.Y., Fang, Y., Yang, S.Y., Wang, G.Z. 2016. Arsenic speciation analysis in environmental water, sediment and soil samples by magnetic ionic liquid-based air-assisted liquideliquid microextraction, RSC Adv. 6 (111), 110247-110254.

Wood, G.E., 1991. Aflatoxin M1 Mycotoxin and Phytoalexins, Sharma R. P. and Salunkhe D. K. (Editors), 145-163.

Yan, H., Wang, H., 2013. Recent development and applications of dispersive liquideliquid microextraction, J. Chromatogr. A 1295, 1-15.

Zainal-Abidin, M.H., Hayyan, M., Hayyan, A., Jayakumar, N.S., 2017. New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: a review, Anal. Chim. Acta 2017:979, 1-23.

Zhang, K., Li, S., Liu, C., Wang, Q., Wang, Y., Fan, J., 2019. A hydrophobic deep eutectic solvent-based vortex-assisted dispersive liquideliquid microextraction combined with HPLC for the determination of nitrite in water and biological samples, J. Sep. Sci. 2019:42 (2), 574-581.

Zhao, Z., Yang, X., Zhao, X. Bai, B., Yao, C.X., Liu, N., Wang, J.H., Zhou, C.Y. 2017. Vortexassisted dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of majör Aspergillus and Penicillium mycotoxins in rice wine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Food Control 2017: 73, 862-868.

Zounr, R.A., Tuzen, M., Khuhawar, M.Y., 2017. Ultrasound assisted deep eutectic solvent based on dispersive liquid liquid microextraction of arsenic speciation in water and environmental samples by electrothermal atomic absorption spectrometry, J. Mol. Liq. 2017:242, 441-446.

Zounr, R.A., Tuzen, M., Deligonul, N., Khuhawar, M.Y. 2018. A highly selective and sensitive ultrasonic assisted dispersive liquid phase microextraction based on deep eutectic solvent for determination of cadmium in food and water samples prior to electrothermal atomic absorption spectrometry, Food Chem. 2018:253, 277-283.

Zounr, R.A., Tuzen, M., Khuhawar, M.Y., 2018. A simple and green deep eutectic solvent based air assisted liquid phase microextraction for separation, preconcentration and determination of lead in water and food samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry, J. Mol. Liq. 2018:259, 220-226

EKLER

EK 1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

EK 2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

EK 3 Çalışmada Kullanılan Malzemeler

EK 1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal	Firma	Katalog No
DL-mentol	Sigma	W266507
Hekzan	Isolab	1.043.912.500
Etanol	Isolab	9.200.262.500
Hekzanik asit	Sigma	153745
Oktanoik asit	Sigma	C2875
Dodekanol	Sigma	126799
1-Oktanol	Sigma	472328
1-Bütanol	Merck	1.01990
Dekanoik asit	Sigma	C1875
Laurik asit	Sigma	W261408
Immunoaffinite kolon	R-Biopharm	RP71/RP70N
Aflatoksin M1	Trilogy	TAS-M15LA2
NaCl	Merck	1.06404.1000
Celite 545	Supelco	1.02693.1000
Metanol	Supelco	1.06007.2500
Kloroform	Supelco	1.02445.2500
Asetonitril	Supelco	1.00030.2500
n-Hexane	Supelco	1.04371.2500
PBS Tablet	Sigma	P4417-100TAB

EK 2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Cihaz	**Model**
Ultrasonik Banyo	IKA
Terazi	Mettler AB54-S; Scaltec
Saf Su Cihazı	Millipore
HPLC	Shimadzu 2010 Plus
Manyetik Karıştırıcı	Isolab Laborgerate GmbH
Analitik Terazi	Weighlab
Blender	Waring
Manyetik Karıştırıcılı Hotplate	IKA
Vortex	IKA
Ultrasonik Banyo	IKA
HPLC	Shimadzu
HPLC	Agilent Technologies
Santrifüj Cihazı	Nüve
Ultra Saf Su Sistemi	Millipore Milli Q Direct
Vakum Manifoldu	Agilent Technologies
Döner Buharlaştırıcı	Buchi
Isıtmalı Ultrasonik Banyo	Bandelin Sonorex

EK 3 Çalışmada Kullanılan Malzemeler

Malzeme	**Model**
Eclipse EDB C18 analitik kolon	Agilent, 250 mm x 4.6 mm, 5um
Inertsil ODS-2 analitik kolon	GL Sciences, 250 mm x 4.6 mm, 5um
100 µL Mikropipet	Eppendorf
5 mL Mikropipet	Eppendorf
1 mL Mikropipet	Eppendorf
Dijital Göstergeli Sıcaklık Ölçer	EBY