

**MOLEKÜLER BASKILANMIŞ KATI FAZ EKSTRAKSİYON
KOLONLARIN HAZIRLANMASI VE
AFLATOKSİN ÖN-DERİŞTİRİLMESİ UYGULAMALARI**

**MOLECULAR IMPRINTED SOLID PHASE EXTRACTION
COLUMNS AND THEIR APPLICATION TO
PRE-CONCENTRATION OF AFLATOXINS**

ENGİN BAYRAM

PROF. DR. ADİL DENİZLİ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

2013

ENGİN BAYRAM'ın hazırladığı “**Moleküler Baskılanmış Katı Faz Ekstraksiyon Kolonların Hazırlanması ve Aflatoksin Ön Deriştirilmesi Uygulamaları**” adlı bu çalışma aşığıdaki jüri tarafından **Kimya Anabilim Dalı**'nda **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Başkan / Danışman

(Prof. Dr. Adil DENİZLİ)

Üye

(Prof. Dr. Serap ŞENEL)

Üye

(Doç. Dr. Sinan AKGÖL)

Üye

(Doç. Dr. Handan YAVUZ)

Üye

(Doç. Dr. Lokman UZUN)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Ponyo'ya...

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

04/07/2013

ENGİN BAYRAM

ÖZET

MOLEKÜLER BASKILANMIŞ KATI FAZ EKSTRAKSİYON KOLONLARIN HAZIRLANMASI VE AFLATOKSİN ÖN-DERİŞTİRİLMESİ UYGULAMALARI

ENGİN BAYRAM

Doktora, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. ADİL DENİZLİ

Temmuz 2013, 125 sayfa

Tez kapsamında; aflatoksin baskılanmış kompozit kriyojellerin sentez, karakterizasyon ve seçici ön-deriştirme (özütleme) çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Monomer olarak N-Metakriloil-L-triptofan metil ester (MATrp) seçilmiştir. Öncelikli olarak bu monomerin sentezi gerçekleştirilmiş ve elde edilen ürün, NMR ve FTIR yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Sentezlenen monomer ve aflatoksinler kompleksleştirilmiş ve kompleksleşme, spektroflorimetrik yöntem ile karakterize edilmiştir. Bu işlemin ardından aflatoksin baskılanmış poli(2-Hidroksietilmetakrilat-N-Metakriloil-L-triptofan metil ester) monolitik polimerler, yığın polimerizasyonu yöntemi ile sentezlenmiştir. Elde edilen monolitik polimerler, öğütülerek eş boyutlu partiküller elde edilmiş ve partikül boyutları, zeta parçacık boyut ölçümü ile karakterize edilmiştir. Aflatoksin baskılanmış poli-[N-(2-Hidroksietil) metakrilamid] kompozit kriyojeli ise aflatoksin baskılanmış partiküllerin varlığında, 2-Hidroksietilmetakrilat (HEMA) ve Metilen bisakrilamidin (MBAAm), -12°C'da 24 saatlik polimerizasyonu sonucu elde edilmiş, SEM ve FTIR yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Hazırlanan kompozitler, sulu çözeltilerden aflatoksin ön-deriştirme işlemlerinde kullanılmış ve ön-deriştirme koşulları optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları kapsamında; aflatoksin derişimi, akış hızı, pH, sıcaklık ve partikül miktarının etkileri HPLC yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Kompozitin aflatoksin türlerine göre adsorpsiyon kapasiteleri sırasıyla aflatoksin B1 için 194.8 ng/g; aflatoksin B2 için 164.1 ng/g; aflatoksin G1 için 169.4 ng/g ve aflatoksin G2 için 154.9 ng/g olarak bulunmuştur. Kompozitlerin adsorpsiyon kapasiteleri, akış hızı ile ters orantılı iken; pH ve sıcaklıkla doğru orantılı olarak değişmektedir. Kompozit kriyojellerin diğer mikotoksinlere karşı seçicilikleri, okratosin A (OTA) ve aflatoksin M1 (AFT M1) varlığında gerçekleştirilen özütleme çalışmaları ile belirlenmiştir. Adı geçen çalışmalarda, ölçüm tekniği olarak LC-MS/MS kullanılmıştır. Ön-deriştirme koşullarının optimizasyonunun ardından gerçek

numunelerde (fındık, fıstık, kuru incir ve pulbiber) aflatoksin özütlemeye uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kompozit Kriyojeller, Moleküler Baskılama, Mikotoksinler, Aflatoksin Analizi.

ABSTRACT

MOLECULAR IMPRINTED SOLID PHASE EXTRACTION COLUMNS AND THEIR APPLICATION TO PRE-CONCENTRATION OF AFLATOXINS

ENGİN BAYRAM

Doctor of Philosophy, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. ADİL DENİZLİ

July 2013, 125 pages

In this study, the synthesis and characterization of aflatoxin imprinted composite cryogels prepared, and selective aflatoxin pre-concentration studies were performed. *N*-Methacryloyl-(*l*)-tryptophanmethylester (MATrp) was chosen as the complexing monomer. In the first step, functional monomer MATrp was synthesized, and resulting compound was characterized by NMR and FTIR measurements. After that, aflatoxins was complexed with MATrp, and the complex was characterized by fluorometric measurements. Then aflatoxin-imprinted poly(2-hydroxyethyl methacrylate-*N*-methacryloyl-(*l*)-tryptophane methylester) [MIP] polymers were synthesized by bulk polymerization. The resulting polymers were grinded to obtain similar-sized particles and they characterized by zeta-particle size analyser. Aflatoxin imprinted poly[2-hydroxyethylmethacrylamide] composite cryogels were synthesized via polymerization of 2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and *N,N'*-Methylenebisacrylamide (MBAAm) in presence of aflatoxin imprinted micro particles, at -12°C. The completion of the polymerization reaction requires 24 hours. Resulting composites were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM) and FTIR measurements. Aflatoxin imprinted composite cryogels were used to extract aflatoxins from aqueous solutions in order to optimize the extraction conditions. In this context, the effective factors such as aflatoxin concentration, flow rate, pH, temperature and amount of the particle in composite cryogel structure were evaluated via HPLC. The adsorption capacities of the composite cryogels according to aflatoxin species were determined as 194.8 ng/g for aflatoxin B1, 164.1 ng/g for aflatoxin B2, 169.4 ng/g for aflatoxin G1 and 154.9 ng/g for aflatoxin G2, respectively. The adsorption capacities of the composite cryogels were directly proportional to the changes in pH and temperature while that were contrary to the changes in flow rate. Ochratoxin A (OTA) and aflatoxin M1 (AFT M1) used in the competitive extraction studies for selectivity. LC-MS/MS used as an analytical tool for the measurement during the

selectivity studies. When the adsorption conditions completed the composite cryogels applied to the real samples (nut, peanut, red pepper and dried fig).

Keywords: Composite Cryogels, Molecular Imprinting, Mycotoxins, Aflatoxin Analysis

TEŞEKKÜR

Kafe Siyanür vardı alt katta ve karanlıkta genelde kaybolurdunuz. Kimyasal atık şişelerini bulurdum ben, Kafe Siyanür'ü ararken. Şimdi tamamen aydınlık ve ışık dolu orası, Bioreg orada ve tek başına bir insanın nasıl fark yaratabileceğinin bir kanıtı, bunun bir parçası olmama izin verdiği ve hayatımdaki en önemli dönüm noktalarında hep yanımda olduğu için sevgili hocam sayın Prof. Dr. Adil Denizli,

Yüksek lisans ve doktora süresince bana her zaman destek olan, profesyonel iş hayatımda edindiğim deneyimi bilimsel açıdan yorumlamamı ve değerlendirmemi sağlayan ve bütün bu süreci gastronomik alanda da deniz ürünleri ve ızgara ile destekleyen, sayın Doç. Dr. Lokman Uzun,

Kimya lisans eğitimimin başından bu güne kadar bilgi ve deneyimlerini hiçbir karşılık beklemeden paylaşan sevgili hocalarım, sayın Prof. Dr. Serap Şenel, Prof. Dr. Sinan Akgöl ve Doç. Dr. Handan Yavuz,

Lisansüstü eğitime başlamaya karar verdiğimde, beni geri çevirmeyen ve cesaretlendiren, sevgili hocam, sayın Prof. Dr. F. Sema Bektaş,

Kimyanın gülen yüzleri sevgili hocalarım, sayın Prof.Dr. Günay Kibarer ve Prof.Dr. Nursel Pekel Bayramgil,

Bütün bu süreç boyunca, başım sıkıştığında her zaman bana yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Dr. Erkut Yılmaz, Canan Armutcu ve M. Emin Çorman,

Kendimi her zaman evimde gibi hissettiğim Bioreg grubundaki çalışma arkadaşlarım, Yrd. Doç. Dr. Fatma Yılmaz, Dr. Müge Andaç, Dr. Nilay Bereli, Dr.İşık Perçin, Dr. Deniz Türkmen, Gözde Baydemir, A. Hamdi Demirçelik, Ali Derazshamshir, Bahar Ergün, Gülsü Şener, Recep Üzek ve burada ismini yazamadığım Bioreg ailesinin diğer üyeleri,

Kazana düşen sevgili arkadaşlarım Dr. Deniz Demircan, Dr. Murat Barsbay ve İlker Koç,

Yoğun iş temposu içerisinde bu zorlu süreci başarı ile tamamlamamda en büyük destekçilerimden olan sayın Nadir Gür, Murat Yayla, Nuray Çetiz, Yunus Karasaç, Emrah Çorak, Doğan Gökdeniz, Seçkin Fikirdeşici, Selim Hasay, Hacer Kaptanoğlu, Serkan Kasapoğlu, Koray-Nazlı Şahin, Birsen Yılmaz ve bütün Ant Teknik ailesi,

Kadim dostlarım Oğuz Büte ve Ercan Köse,

Önceliklerini her zaman benim önceliklerime göre değiştiren ve bunun karşılığını hiçbir zaman tam olarak veremeyeceğim sevgili ailem,

Tam doktora başladığımda başlamıştık biz de. Sen hep yanımda oldun bu süre boyunca, minnettarlığımı burada ifade etmem sanırım mümkün değil, biricik oyun arkadaşım, eşim, Sena Kayadelen,

Hepinize sonsuz teşekkürler, güç sizinle olsun!

Engin Bayram, Temmuz, 2013

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Mikotoksinler	3
2.1.1. Önemli Mikotoksinler ve Üretici Mantarları.....	4
2.1.2. Mikotoksinlerin İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri.....	5
2.1.3. Mikotoksinlerin Hayvan Sağlığı Üzerindeki Etkileri	6
2.1.4. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler	6
2.2. Aflatoksinler.....	10
2.2.1. Aflatoksinlerin Kimyasal Yapısı ve İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri.....	10
2.2.2. Aflatoksinlerin Metabolitleri	11
2.2.3. Aflatoksinlerin Analizi İçin Duyulan Gereksinim ve Güncel Limitler.....	12
2.2.4. Aflatoksin Analiz Yöntemleri	14
2.3. Moleküler Baskılama Teknolojisi	18
2.3.1. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin (MIP) Hazırlanması	19
2.3.1.1. Ön-kompleksleşme (Ön-organizasyon)	19
2.3.1.2. Polimerizasyon.....	22
2.3.1.3. Kalıp Molekülün Uzaklaştırılması (Sökülmesi).....	23
2.4. Kriyojeller.....	24
2.4.1. Kriyojellerin Hazırlanışı ve Karakterizasyonu	26
2.4.2. Hidrodinamik Özellikler	27
2.4.3. Gözenek Özelliklerinin Kontrolü	28
2.4.4. Kompozit Kriyojeller	29
2.4.5. Kriyojellerin Uygulamaları	29

3. MALZEME VE YÖNTEMLER	31
3.1. Kimyasal Malzemeler	31
3.2. Deneysel Yöntemler	31
3.2.1. Fonksiyonel Monomerin Sentezi	31
3.2.1.1. N-Metakriloil-L-triptofan metil ester (MATrp) Monomerinin Sentezi ..	31
3.2.1.2. MATrp Monomerinin Karakterizasyonu	31
3.2.1.2.1. FTIR Analizi	31
3.2.1.2.2. NMR Analizi	32
3.2.2. Ön-Polimerizasyon Kompleksinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	32
3.2.3. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Hazırlanması	32
3.2.4. Aflatoksin-MIP Kompozit Kriyojellerin Sentezi ve Karakterizasyonu	33
3.2.4.1. Aflatoksin-MIP Kompozit Kriyojellerin Sentezi	33
3.2.4.2. Aflatoksin-MIP Kompozit Kriyojellerin Karakterizasyonu	34
3.2.4.2.1. Şişme Testi	34
3.2.4.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu	35
3.2.4.2.3. FTIR Analizi	35
3.2.5. Aflatoksin-MIP Kompozit Kriyojellerin Optimizasyonu	35
3.2.6. Seçicilik Deneyleri	38
3.2.7. Gerçek Örneklerden Aflatoksin Özütlemesi	40
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	41
4.1. Fonksiyonel Monomerin Sentezi ve Karakterizasyonu	41
4.2. Ön-Polimerizasyon Kompleksinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	43
4.3. Moleküler Baskılanmış Partiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	44
4.4. AflaMIP Kompozit Kriyojellerin Sentezi ve Karakterizasyonu	46
4.4.1. Şişme Testi	46
4.4.2. Taramalı Elektron Mikroskobu	48
4.4.3. FTIR Analizi	50
4.5. AflaMIP Kompozitlerin Adsorpsiyon Koşullarının Optimizasyonu	51

4.5.1. Aflatoksin Derişiminin Etkisi	51
4.5.2. Akış Hızının Etkisi	53
4.5.3. Yükleme Tamponun pH Değerinin Etkisi	55
4.5.4. Sıcaklığın Etkisi	56
4.5.5. AflaMIP Kompozitin İçerdiği Baskılanmış Partikül Miktarının Etkisi.....	58
4.6. Seçicilik Deneyleri.....	59
4.7. Gerçek Örneklerden Aflatoksin Özütlenmesi.....	64
4.8. Kolonların Tekrar Kullanılabilirliği	73
4.9. Kompozitler Arası Tekrarlanabilirlik	75
KAYNAKLAR.....	77
EK A. HPLC YÖNTEMİ VALİDASYONU	86
A.1. Doğrusallık	86
A.2. Geri Kazanım	88
A.3. Tekrarlanabilirlik	89
EK B. SEÇİCİLİK DENEYLERİ, LC-MS/MS YÖNTEMİ VALİDASYONU.....	90
B.1. Doğrusallık	90
B.2. Tekrarlanabilirlik	92
EK C. ÇALIŞMALAR SIRASINDA ELDE EDİLEN ÇÖZELTİLERİN (ADSORPSİYON EFLÜATI, YIKAMA EFLÜATI VE ELÜAT) HPLC ANALİZLERİNDEN ELDE EDİLEN KROMATOGRAMLAR.....	93
Bölüm 4.5. AflaMIP Kriyojellerin Adsorpsiyon Koşullarının Optimizasyonu Kromatogramlar.....	93
Bölüm 4.6. Seçicilik Deneyleri Kromatogramlar	97
Bölüm 4.7. Gerçek Örneklerden Aflatoksin Özütleme Uygulamaları.....	98
ÖZGEÇMİŞ.....	110

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bazı önemli mikotoksinlerin kimyasal yapıları.	4
Şekil 2.2. Mikotoksin oluşumunu etkileyen faktörler ve bunun insan ve hayvan besin arz zinciri içerisindeki rolleri	9
Şekil 2.3. Aflatoksinlerin kimyasal yapısı.	11
Şekil 2.4. Aflatoksin B1 metabolitleri.....	12
Şekil 2.5. TFA ve İyodür reaksiyon mekanizması.	16
Şekil 2.6. Kobra Cell® düzeneği.	17
Şekil 2.7. Kobra Cell® ünitesinin yapısını oluşturan bileşenler.	17
Şekil 2.8. Bromür reaksiyon mekanizması.	18
Şekil 2.9. Moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi.	19
Şekil 2.10. Yaygın olarak kullanılan bazı monomerler.	22
Şekil 2.11. Yaygın olarak kullanılan bazı çapraz bağlayıcılar.	23
Şekil 2.12. Yaygın olarak kullanılan bazı başlatıcılar.	23
Şekil 2.13. Kriyojelin oluşumu.....	27
Şekil 3.1. Sıcaklık kontrollü olarak aflatoksin ön-deriştirilmesinde kullanılan sürekli adsorpsiyon sistemi.	36
Şekil 3.2. Ticari Olarak Satılan Aflaprep® kolonlar.	37
Şekil 4.1. MATrp monomerinin sentez reaksiyonu.	41
Şekil 4.2. MATrp monomerinin ¹ H-NMR spektrumu.	42
Şekil 4.3. MATrp monomerinin FTIR spektrumu.	42
Şekil 4.4. Ön-Polimerizasyon komplekslerinin spektrofotometre emis-yon spektrumları.....	44
Şekil 4.5. Moleküler baskılanmış polimerlerin zeta boyut analizleri.	45
Şekil 4.6. Çalışma kapsamında hazırlanan kompozitlerin kodları ve içerikleri.	46
Şekil 4.7. Kriyojellerin şişme davranışlarının belirlenmesi.	47
Şekil 4.8. Kompozitlerin SEM görüntüleri.....	49
Şekil 4.9. Kompozitlerin FTIR spektrumları.....	51

Şekil 4.10. Adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu. Aflatoksin derişiminin etkisi.....	52
Şekil 4.11. Aflatoksin derişiminin etkisi: Elüat çözeltsi HPLC kromatogramları...	53
Şekil 4.12. Adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu. Akış hızının etkisi.	54
Şekil 4.13. Akış hızının etkisi	55
Şekil 4.14. Adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu. pH değerinin etkisi.	56
Şekil 4.15. Yükleme tamponunun pH değerinin etkisi.....	56
Şekil 4.16. Adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu. Sıcaklığının etkisi.	57
Şekil 4.17. Sıcaklığın etkisi: Elüat çözeltsi	57
Şekil 4.18. Adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu. Yapıdaki partikül miktarının etkisi.	59
Şekil 4.19. AflaMIP kompozitin içerdiği partikül miktarının etkisi.....	59
Şekil 4.20. Seçicilik deneyleri. Adsorpsiyon eflüatı.	62
Şekil 4.21. Seçicilik deneyleri.....	63
Şekil 4.22. Seçicilik deneyleri:Elüat çözeltsi.....	63
Şekil 4.23. Gerçek örnekten aflatoksin özütlenmesi. AflaMIP-4 ve Aflaprep® kolonları geri kazanımlarının karşılaştırılması. Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş fındık numunesi.	65
Şekil 4.24. Gerçek örneklerden aflatoksin özütlenmesi: AflaMIP-4 kompozit kriyojel. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş fındık numunesi.....	66
Şekil 4.25. Gerçek örnekten aflatoksin özütlenmesi. AflaMIP-4 ve Aflaprep® kolonları geri kazanımlarının karşılaştırılması. Örnek: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş fıstık numunesi; örnek kütlesi: 50 g; homojenizasyon çözeltsi: 500 mL metanol:su (30:70, v/v); kolona uygulanan örnek hacmi: 10 mL.	67
Şekil 4.26. Gerçek örneklerden aflatoksin özütlenmesi. AflaMIP-4 kompozit kriyojel. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş fıstık numunesi. Elüat çözeltsi HPLC kromatogramları.....	68
Şekil 4.27. Gerçek örnekten aflatoksin özütlenmesi. AflaMIP-4 ve Aflaprep® kolonları geri kazanımlarının karşılaştırılması. Örnek: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş pul biber numunesi	69
Şekil 4.28. Gerçek örneklerden aflatoksin özütlenmesi. AflaMIP-4 kompozit kriyojel. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş pul biber numunesi.....	70

Şekil 4.29. Gerçek örnekten aflatoksin özütlenmesi. AflaMIP-4 ve Aflaprep® kolonları geri kazanımlarının karşılaştırılması. Örnek: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş kuru incir numunesi	71
Şekil 4.30. Gerçek örneklerden aflatoksin özütlenmesi. AflaMIP-4 kompozit kriyojel. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş kuru incir numunesi.	72
Şekil 4.31. Kompozit kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği.	74
Şekil 4.32. Kolonlararası tekrarlanabilirlik çalışması elüat kromatogramları (TIC-LC-MS/MS).....	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Toksin üreten mantarlar ve ilişkili oldukları mikotoksinlerin listesi	5
Çizelge 2.2. Mikotoksinlerin hayvan sağlığı üzerindeki etkileri.....	6
Çizelge 2.3. Çeşitli besinlerde oluşabilen mikotoksinler.....	7
Çizelge 2.4. Aflatoksinlerin bazı kimyasal özellikleri.	10
Çizelge 2.5. Gıdalarda izin verilen aflatoksin üst sınır değerleri (Türkiye).	13
Çizelge 2.6. Kovalent ve kovalent olmayan baskılama ile hazırlanan polimerlerin avantaj ve dezavantajları.....	21
Çizelge 2.7. Kriyojel sistemlerin potansiyel uygulamalarına bakış.	25
Çizelge 3.1. MIP’de kullanılan ligand/monomer oranları.....	32
Çizelge 3.2. AflaMIP kompozitlerin içerikleri ve polimer kodları.	34
Çizelge 3.3. LC-MS/MS parametreleri.	39
Çizelge 4.1. Kompozitlerin şişme özellikleri.	47
Çizelge 4.2. Aflatoksin baskılanmış ve baskılanmamış kompozitlere ait seçicilik sabitleri.....	61
Çizelge 4.3. İki kolon arasındaki sonuçların yüzde olarak uyumu.....	73
Çizelge 4.4. Kolonların tekrar kullanılabilirliği.....	75
Çizelge 4. 5. Kompozitler arası tekrarlanabilirlik.	75

1. GİRİŞ

Günümüzde mikotoksin dendiğinde ilk akla gelen ve üzerinde en fazla bilgi sahibi olduğumuz mikotoksin Aflatoksindir. Aflatoksinler, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ile *Aspergillus nomius* türleri tarafından sentezlenen, insan ve hayvanlarda akut ve kronik zehirlenmelere neden olan metabolitler olup, aflatoksin B1, B2, G1, G2, M1 ve M2 olmak üzere başlıca altı ana bileşikten oluşurlar. Aflatoksinler, alınma miktarına ve sürecine bağlı olarak insanlarda ve hayvanlarda akut, subakut ve kronik tipten zehirlenmelere neden olurlar. Hayvanlarda akut seyreden aflatoksin zehirlenmelerinde vücudun doğrudan etkilenen bölgesi karaciğerdir. Akut zehirlenmelerde genellikle sarılık, anoreksi, hemolitik anemi ve ishal görülür. Ayrıca karaciğer paraneoplastik hücrelerinin hasar görmesi yanında, karaciğer ve safra kanallarındaki hücrelerin hızlı bir şekilde bölünmesi başlar, kanamalar görülür ve sinir sistemi etkilenerek görevlerini yerine getiremez bir hal alır. Bunun sonucunda kramplar, felçler, denge bozuklukları meydana gelebilir. Aflatoksinlerin insan sağlığı üzerine olan etkilerinin araştırıldığı sayısız çalışmalar sonucunda, bu toksinler, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) bir alt kuruluşu olan Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC) tarafından Grup 1 kanserojen maddeler olarak tanımlanmışlardır. Ülkemizde ve birçok ülkede kirlenmiş ürünlerden tüketicileri, özellikle çocukları korumak amacıyla gıda ve yemlerdeki Aflatoksin B1 ve sütteki Aflatoksin M1 düzeylerini kontrol altına almak için yasalar oluşturmuşlardır. Bugün dünyada hemen hemen bütün ülkeler, bu tehlikeden korunmak ve ihraç ettikleri ürünlerin geri dönüşünü azaltmak için gıdalarda ve yemlerde bulunabilecek aflatoksin düzeyleri için sınır değerler belirlemektedirler.

Çevre, ilaç ve biyoteknoloji alanlarında hızlı ve verimli yeni yöntemlere sürekli ihtiyaç duyulması, bilim insanlarını, daha iyi, daha seçici ve hassas analitik çalışmaların yapılmasına yöneltmiştir. Moleküler tanıma temeline dayanan ayırma sistemleri arasında "Moleküler Baskılama" yöntemi ile hazırlanan taşıyıcılar hedef moleküle karşı gösterdikleri yüksek seçicilik nedeniyle oldukça ümit vaat etmektedirler. Moleküler baskılama yöntemi, sentetik polimerlerde fonksiyonel grupların üç boyutlu yapılarının düzenlenmesiyle, oldukça seçici bağlanma bölgeleri elde etmek amacıyla kullanılmaktadır. Moleküler baskılanmış polimerler (MIP), kolay hazırlanabilir, kararlı, ucuz ve moleküler tanıma yeteneğine sahip

olmaları gibi ilgi çekici özellikleriyle, yeni bir tür adsorbent olarak bilim insanlarının gözdesi olmuşlardır.

Kriyojeller, polimerik çözeltilerin dondurulmasıyla oluşturulan jel matrislerdir. Bu yapılar kısmen donmuş ortamda monomerlerin radikalik polimerizasyonu ile hazırlanmaktadır. Kısmen donmuş ortamda oluşan buz kristalleri gözenek oluşturucu olarak rol almakta ve bu ortamda monomerler ve başlatıcı çözünmüş olarak küçük bir fraksiyonu oluşturmaktadır. Sistem donmuş bir buz kütlesine benzemekle birlikte polimerizasyon işlemi donmamış kısımda etkin olarak gerçekleşmektedir. Eridikten sonra sürekli jel (kriyojel; Yunanca krios (kryos) buz anlamına gelir) oluşmaktadır. Meydana gelen süpermakrogözenekli kriyojeller, gözenek boyutları 5-100 µm arasında değişen birbirine bağlı gözenek ağı içermektedir. Bağlantılı gözenek yapısı nedeniyle çok düşük akış direnci göstermektedir. Geniş, bağlı gözenekler kriyojellere özgün süngersi yapı özelliğini kazandırmaktadır. Süpermakrogözenekli kriyojellerin kontrollü üretimleri, farklı özelliklerde kriyojellerin üretime olanak vermektedir. Polimerizasyon koşullarının değiştirilmesi (özellikle donma sıcaklığı, monomer derişimi, çapraz bağlayıcı oranı) elde edilen yapının özelliklerine önemli oranda yansımaktadır. Kriyojellerin gözenek yoğunluğu ve geniş gözeneklere sahip olması geniş yüzey alanı ve düşük akış direnci sağladığından, yüksek kapasitede ayırma sağlamakta ve viskoz ortamlarda çalışılmasında çok büyük kolaylık sağlamaktadır.

Tez kapsamında; moleküler baskılama yaklaşımıyla poli(2-Hidroksietilmetakrilat) /MIP (PHEMA/MIP) kompozit kriyojeller hazırlanmıştır. Hazırlanan kompozitlerin, karakterizasyonları yapılmış, sulu çözeltiden aflatoksin özütlemesi çalışmaları ile kompozit performansı optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmalarında; kompozitin kapasitesine aflatoksin derişimi, akış hızı, sıcaklık, pH ve partikül miktarı gibi etki eden faktörler incelenmiştir. Bunlara ek olarak, kompozitin seçicilikleri de incelenmiştir. Belirlenen optimum koşullar altında hem kompozitler hem de ticari aflatoksin kolonları kullanılarak gerçek numunelerden özütleme çalışmaları yapılmıştır.

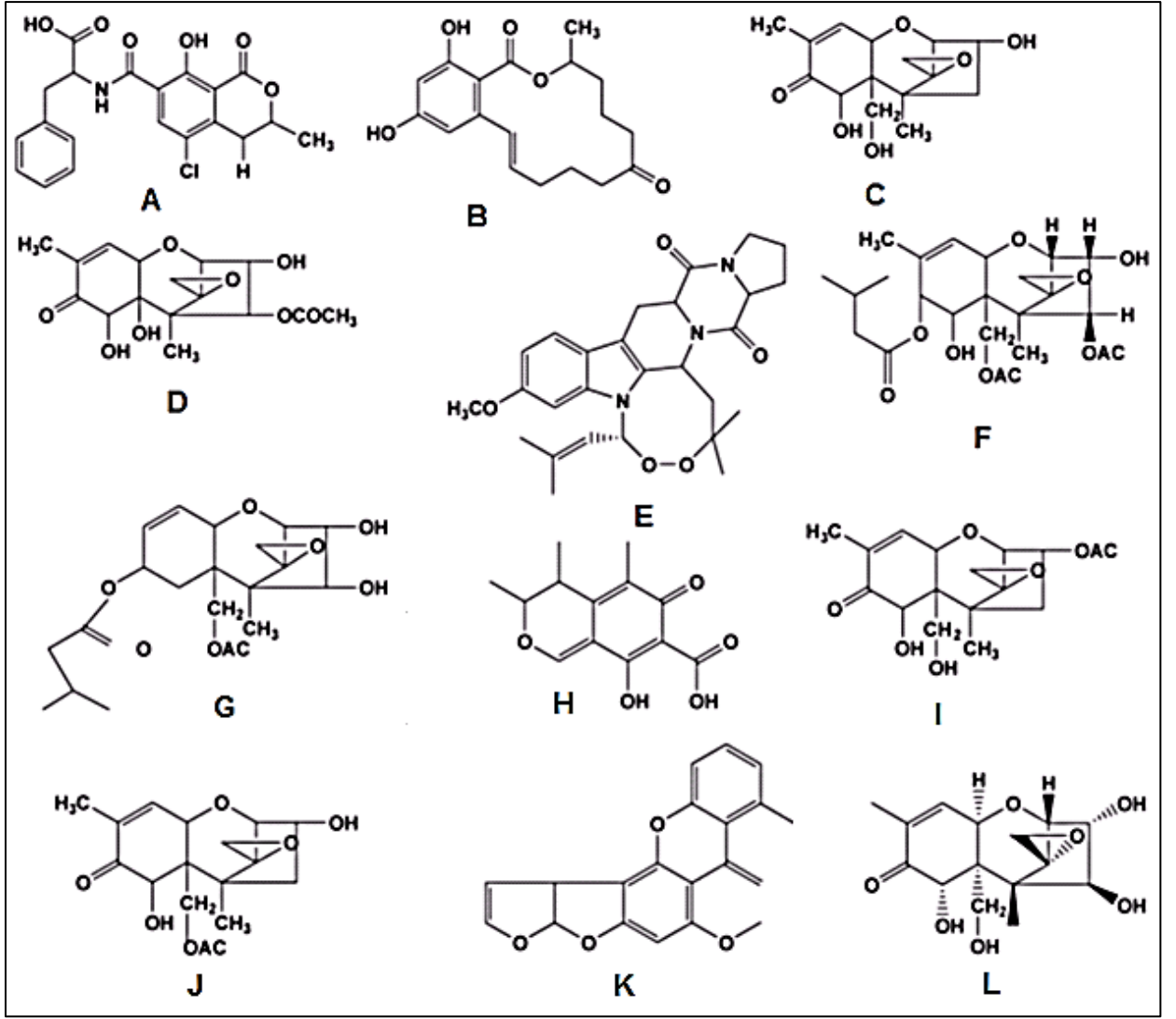
2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Mikotoksinler

Küf mantarları, uygun çevresel koşullar altında, oldukça geniş bir yelpazedeki besinlerde gelişebilirler. Tarımsal ürünlerde mantarların neden olduğu bu kirlenme, gıda üretiminin bütün basamaklarında, üretim sonrası depolama aşamasında ortaya çıkabilir ve bunun da ekonomi, gıda güvenliği ve insan ve hayvan sağlığı açısından oldukça kritik sonuçları olabilir [1-6]. 1969 yılında İngiltere’de 100.000 hindi, yem katkısı olarak kullanılan yer fıstığının sebep olduğu zehirlenme sonucu kaybedilmiştir. Zehirlenmenin temel nedeninin ise yemin depolandığı süre içerisinde, yer fıstığını tamamen istila eden *Aspergillus flavus* adı verilen bir mantarın ürettiği aflatoksinler olduğu belirlenmiştir [7,8].

Mikotoksinler, farklı mantar türleri tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir. Yüzden fazla mikotoksin tanımlanmış olmasına rağmen bunlardan sadece bir kısmı kaydadeğer bir toksik etkiye sahiptir [9]. Şekil 2.1.’de bazı önemli mikotoksinlerin kimyasal yapıları verilmiştir (aflatoksinler ayrı bir başlık altında incelendiğinden bu şekilde yer almamaktadır, bkz. Bölüm 2.2). Mikotoksin üreten mantarlar arasında en çok bilinenler; *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* ve *Penicillium* türleridir [10, 11]. Bu türler tarafından üretilen mikotoksinler arasında en fazla dikkat çekenler ise; aflatoksinler (AFT), trikotesenler (T-2 toksin), okratoksin A (OTA), zearalenon (ZON), fumonisinler (fumonisin B1), moniliformin, deoksinivalenol (DON) ve patulindir (PAT). Adı geçen mikotoksinler, farklı mantar türleri tarafından üretilebileceği gibi, bir mantar farklı kültür koşulları altında farklı mikotoksinler de üretebilir.

Bilinen mikotoksinlerin birçoğunun termal ve kimyasal kararlılığı oldukça yüksektir. Bu ise, mikotoksinlerin, işlenmiş gıdalardan geleneksel yöntemlerle sadece kısmen uzaklaştırılmasını mümkün kılmaktadır [9, 12, 13]. Bu nedenle gıda maddeleri mikotoksinlerle kirlendikten sonra onları temizlemeye çalışmak yerine, ürünün hasat, depolama ve üretim aşamalarında kontrol altında tutulup küflerin gelişimini engellemek ve bütün bu aşamalar sırasında üründe mikotoksin varlığını takip etmek çok önemlidir. Bu ise ancak hassas, güvenilir ve nisbeten düşük maliyetli analiz yöntemleri ile mümkün olabilir.



Şekil 2. 1 . Bazı önemli mikotoksinlerin kimyasal yapıları; (A) Okratoksin A (OTA); (B) Zearalenon (ZON); (C) Deoksinivalenol (DON); (D) Fusarenon (FX); (E) Verrukulojen (VCG); (F) T-2 toksin; (G) HT-2 toksin; (H) Sitrinin (CTN); (I) 3-Asetildeoksinivalenol (3-ADON); (J) 15- Asetildeoksinivalenol (15-ADON); (K) Sterigmatosistin (SMC); (L) Nivalenol (NIV) [14].

2.1.1. Önemli Mikotoksinler ve Üretici Mantarları

Mikotoksinlere bağlı zehirlenmelere sebep olan mantar türleri dört farklı gruba ayrılabilir, bunlar; *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium*'dur [10, 11]. Adı geçen beş tür içerisinde ise küresel olarak üzerinde en çok ilgiyi toplayan dolayısı ile de en fazla bilgiye sahip olunan türler *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium*'dur. Bu üç tür tarafından üretilen mikotoksinler de; aflatoksinler, okratoksinler, trikotesenler, fumonisinler, zearalenon ve patulindir. Toksin üreten mantarlar ve ilişkili oldukları mikotoksinlerin listesi Çizelge 2.1'de verilmiştir [15,16].

Çizelge 2.1. Toksin üreten mantarlar ve ilişkili oldukları mikotoksinlerin listesi

Mantar	Mikotoksin
<i>Aspergillus flavus; Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoksinler
<i>Aspergillus flavus</i>	Siklopiazonik asit
<i>Aspergillus ochraceus; Aspergillus carbonarius; Penicillium verrucosum</i>	Okratoksin A
<i>Penicillium citrinum; Penicillium expansum</i>	Sitrinin, Patulin
<i>Fusarium sporotrichioides; Fusarium poae</i>	T-2 Toksin
<i>Fusarium sporotrichioides; Fusarium poae</i>	Diasetoksisirpenol
<i>Fusarium culmorum; Fusarium graminearum</i>	Deoksinivalenol
<i>Fusarium culmorum; Fusarium graminearum</i>	Zearalenon
<i>Fusarium verticillioides; Fusarium proliFeratum</i>	Fumonisinler
<i>Alternaria alternata</i>	Tenuazonik asit
<i>Claviceps purpurea</i>	Ergot alkaloidleri

2.1.2. Mikotoksinlerin İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri

Meyve, sebze ve tahıllar, gelişmekte olan ülkelerde, toplum sağlığını olumsuz yönde etkileyecek salgın hastalıklara sebep olabilmektedir [17].

Mikotoksinler kronik maruziyet durumunda kanser gibi hastalıkları tetikleyebileceği gibi, örneğin hepatit B hastası olan bir insanın yoğun olarak aflatoksinle maruz kalması da karaciğer kanseri oluşum sürecini hızlandırabilir. Özellikle son dönemde yapılan çalışmalar, akut aflatoksin zehirlenmesi ve karaciğer kanseri arasındaki ilişki konusunda önemli bulgulara ulaşılmasını sağlamıştır. Fumonisinler, Okratoksin A (OTA) ve sitrinin (STR) ise kronik maruziyet durumunda, nefrotoksik etkileri nedeni ile ölümcül böbrek hastalıklarına sebep olabilirler [18, 19]. Zearalenon (ZON) ve metabolitlerinin ise kimyasal yapısı, estradiol, estron ve estriol gibi hormonlara benzer ve bu maddeler insan vücudunda hormonlarla yarışmalı olarak, hormon reseptörleri ile etkileşebilir ve hormonal sistemde bozukluklara sebep olabilirler [20-22].

Sonuç olarak mikotoksinlerin beslenme ve solunum yolu ile alınmaları veya deri yolu ile emilimlerinin insan sağlığı üzerinde akut ve kronik etkilerinin olduğu

belirlenmiştir. Pulmoner mikotoksikoz, zehirli küf sendromu, otoimmün hastalıklar, alerjik reaksiyonlar, kronik maruziyet durumunda kanserojen, mutajen ve teratojen etkiler, bunlar arasında sayılabilir [1, 23, 24].

2.1.3. Mikotoksinlerin Hayvan Sağlığı Üzerindeki Etkileri

Hayvansal gıda ürünlerinin, insanların beslenmesinde dolayısıyla da ekonomik sistemde önemli bir yeri vardır. Mikotoksinler ile kirlenmiş olan bitkisel gıdalar ile beslenen hayvanlarda kısa ve uzun vadeli bazı etkiler görülebilir, bu etkiler mikotoksinin türüne, hayvanın cinsi, yaşı vb. koşullara bağlı olarak değişebilir. Mikotoksinlerin hayvanlar üzerine etkileri, Çizelge 2.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Mikotoksinlerin hayvan sağlığı üzerindeki etkileri [15].

Mikotoksin	Klinik Semptomlar
Aflatoksin	Karaciğer hasarı, verimde düşme, yumurta kabuğunda yapısal bozukluklar ve hastalıklara karşı direncin azalması.
Siklopiazonik asit	Karaciğer, böbrek ve gastrointestinal sistem hasarı, kilo kaybı, zayıflık, yumurta kabuğunda yapısal bozukluklar, iştahsızlık, ishal ve dehidrasyon, depresyon, opistotonus, konvulsiyon.
Zearalenon	Boğulma, vajinal prolapsus ve kızarıklık, üreme problemleri.
Deoksinivalenol	İştahsızlık ve besini reddetme.
Trikotesenler (T-2 toksin v.b.)	İştahsızlık, kusma, deri ve gastrointestinal sistemde hassasiyet, nörotoksik etkiler, yavrularda görülen anomaliler.
Okratoksin A	Karaciğer ve böbrek hasarı.
Fumonisin B1	Lökoensefalomalasi (ELEM), Porsin Pulmoner Ödem (PPO), Rat'larda karaciğer tümörü.
Ergot alkaloidleri	Sinir sistemi hastalıkları, istem dışı kasılmalar, titreme, düşüklükler, sütten kesilme, bazı durumlarda toynak ve gagada siyahlaşma.

2.1.4. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Tarımsal ürünlerde, mantar (veya küf mantarı) gelişimi ve sonuçta mikotoksin üretimini etkileyen en önemli faktörler şu şekilde sıralanabilir:

- i) Mantar gelişimi için elverişli yapıdaki mahsul (mahsul üzerinde bulunan mantar sporları vb.).
- ii) Üründe, aşırı hava koşulları, yanlış sulama ve gübreleme sonucu üründe oluşan stres.
- iii) Üründe, tarım zararlısı böceklerin sebep olduğu hasar.
- iv) Uygun olmayan depolama koşulları [25].
- v) Mantar tarafından üretilen toksin miktarı yukarıda bahsedilen fiziksel faktörlerin yanında; karbondioksit ve oksijen miktarı, substrat bileşimi, mahsulde bulunan bulunan pestisit ve fungusit gibi kimyasal faktörlerden de etkilenir. Çeşitli bitkisel gıdalarda oluşabilen mikotoksinler Çizelge 2.3'de özetlenmiştir.

Ayrıca, ürünün etkilenmiş olduğu mantar türüne (*Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus* ve *Penicillium*) bağlı olarak, mikotoksin oluşumu, hasattan hemen önce, hemen sonra ürünün depolanma işlemi gerçekleşmeden veya depolanma sırasında gerçekleşebilir [26]. Şekil 2.2'de mikotoksin oluşumunu etkileyen faktörler ve bunun insan ve hayvan besin arz zinciri içerisindeki rolleri özetlenmiştir.

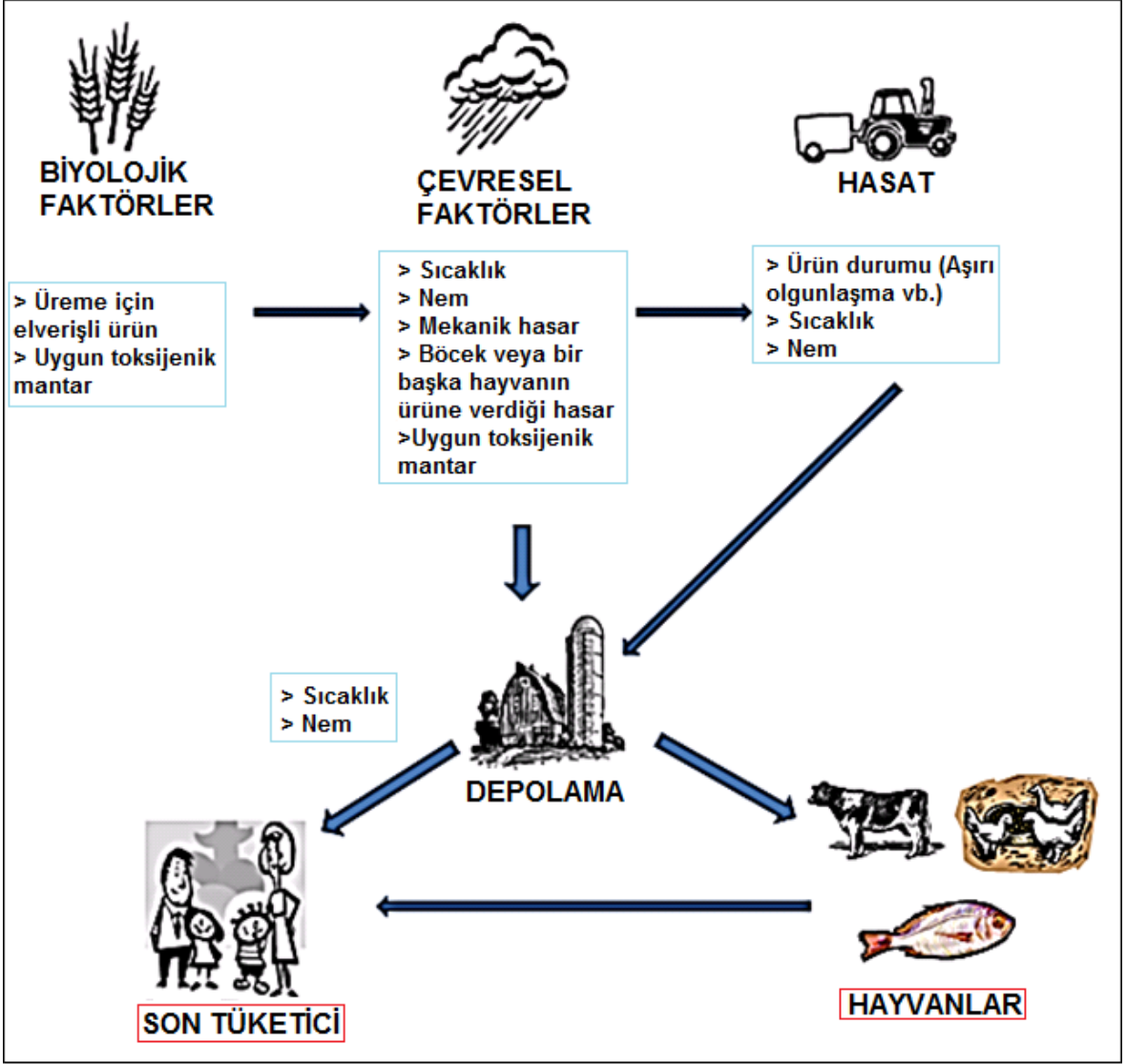
Çizelge 2.3. Çeşitli besinlerde oluşabilen mikotoksinler [27].

BESİN	MİKOTOKSİN ^a
Elma	OTA, PAT, TA, AOH
Çilek	OTA
Şeftali	OTA
Kayısı	PAT
Kiraz	OTA
Domates	OTA, TA, AOH, AFT
Armut	PAT
Üzüm	PAT, AOH, AFT, OTA
İncir	AFT

^a: AFT: Aflatoksinler, OTA: Okratoksin, PAT: Patulin, DON: Deoksinivalenol, FUM: Fumonisin, NİV: Nivalenol, ZEA: Zearalenon, HT-2: HT2 Toksin, T-2: T2 Toksin, Sterig: Sterigmatosistin, STR: Sitrinin, Ergot: Ergotamin, SRV: Sitreoviridin, AOH: Alternariol, TA: Tenuazonik asit.

Çizelge 2.3. (Devamı)

BESİN	MİKOTOKSİN^a
Ayva	PAT
Hindistan Cevizi	STR
Biber	AFT, TA
Yabanmersini	TA
Portakal	TA, AFT
Limon	TA
Mandalina	TA
Muz	PAT
Zeytin	TA, PAT
Lahana	TA
Soğan	OTA
Sarımsak	OTA
Kakao	OTA
Kahve	OTA
Fındık	AFT
Yer Fıstığı	AFT
Badem	AFT
Pamuk tohumu	AFT
Fasulye	AFT
Arpa	DON, NİV, ZEA, HT-2, T2, AFT, STR
Mısır	DON, FUM, ZEA, AFT, SRV
Yulaf	DON, NİV, HT-2, T2, OTA, STR
Pirinç	AFT, Sterig, OTA, SRV
Çavdar	Ergot, OTA
Buğday	OTA, AFT, STR, DON, NİV, ZEA, Ergot, TA



Şekil 2. 2. Mikotoksin oluşumunu etkileyen faktörler ve bunun insan ve hayvan besin arz zinciri içerisindeki rolleri [15].

Gıdalara mikotoksin bulaşması çeşitli yollarla gerçekleşir. Gıdanın gözle fark edilmiş şekilde küflenmesi mikotoksin tarafından kirlenmesine neden olabilir. Bitkisel ürünlerden; tahıllarda, baklagil tanelerinde (soya fasulyesi, fasulye vb), fındık, yer fıstığı, ceviz, Antep fıstığı, badem, ayçiçeği tohumu, pamuk tohumu gibi yağlı tohumlarda, meyvelerde ve baharatta mikotoksin kirliliği doğrudan ve önemli düzeyde meydana gelebilir. Gözle görülür şekilde tüm ürünün küflenmesi ürünün işlenmesini ve tüketimini olanaksız hale getireceğinden herhangi bir risk taşımaz. Ancak ürünün çok az bir kısmında başlayan küflenme özellikle depolanmada mikotoksin riskini artırır. Kırılan, hasar gören bitkisel ürün kabukları küf misellerinin iç taneye geçişine ve mikotoksin oluşmasına olanak sağlar [28]. Yukarıda listelenmiş olan mikotoksinleri üreten küf mantarları dolayısıyla da mikotoksinler, ilgili besinden üretilen gıda maddeleri veya bu besin ile beslenmiş

olan hayvanlardan üretilen gıda maddeleri (Taze sebze-meyve, meyve suları, şarap, kurutulmuş meyve, kuruyemiş, et ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri, kırmızı pulbiber, ekme v.b.) aracılığı ile son tüketiciye ulaşabilir [13, 29].

2.2. Aflatoksinler

Aflatoksinler *Aspergillus* türü küf mantarları tarafından üretilen mikotoksinler olup yoğunlukla, bu türün gelişmesi ve aflatoksin üretmesi için şartların oldukça uygun olduğu tropik ve alt-tropik iklimlerde üretimi gerçekleştirilen; fındık, yer fıstığı, incir, baharat gibi gıda maddelerinde ortaya çıkarlar [30, 27]. *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus nomius* aflatoksinleri sentezleyen en önemli küf mantarlarıdır. Yirmiden fazla aflatoksin türü tanımlanmış olmasına rağmen bunlardan sadece dört tanesi dikkate değer bir öneme sahiptir. Bunlar; aflatoksin G2 (AFT G2), aflatoksin G1 (AFT G1), aflatoksin B2 (AFT B2), aflatoksin B1 (AFT B1)'dir, G ve B harfleri bu maddelerin UV ışığa maruz kaldıklarında ürettikleri renklere atıfta bulunmaktadır Yeşil (G: Green), Mavi (B: Blue) [31-33].

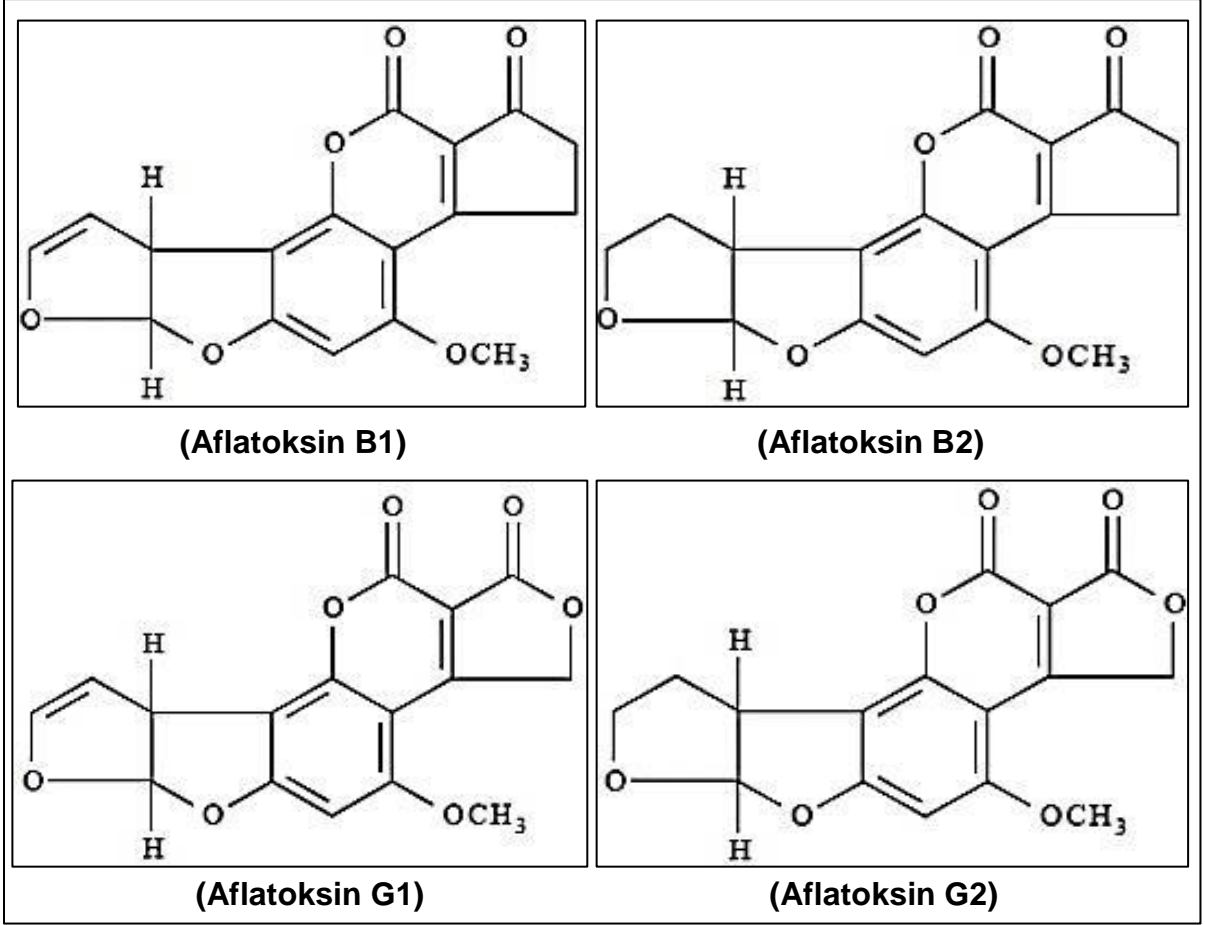
Aflatoksinler kanserojen, mutajen ve teratojen maddelerdir. Afrika ve Asya'nın karaciğer kanserinin sıklıkla görüldüğü bölgelerinde yapılan çalışmalar, beslenme ile yoğun miktarda alınan aflatoksin ile karaciğer kanseri arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmıştır, ayrıca Reye sendromu ve Hindistan çocukluk dönemi sirozunda, akut aflatoksin zehirlenmesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur [34, 7].

2.2.1. Aflatoksinlerin Kimyasal Yapısı ve İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri

Aflatoksinler, difurankumarin türevi bileşiklerdir ve kimyasal yapıları nedeni ile polar organik çözücüler, klorlu bileşikler ve aromatik hidrokarbonlar içerisinde iyi çözümler [35]. Çizelge 2.4 ve Şekil 2.3, aflatoksinler ile ilgili diğer ayrıntıları içermektedir.

Çizelge 2.4. Aflatoksinlerin bazı kimyasal özellikleri [36].

Aflatoksin	CAS No	Kapalı Formül	Molekül Ağırlığı (g/mol)
Aflatoksin B1	1162-65-8	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312.3
Aflatoksin B2	7220-81-7	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314.3
Aflatoksin G1	1165-39-5	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328.3
Aflatoksin G2	7241-98-7	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330.3



Şekil 2.3. Aflatoksinlerin kimyasal yapısı [36].

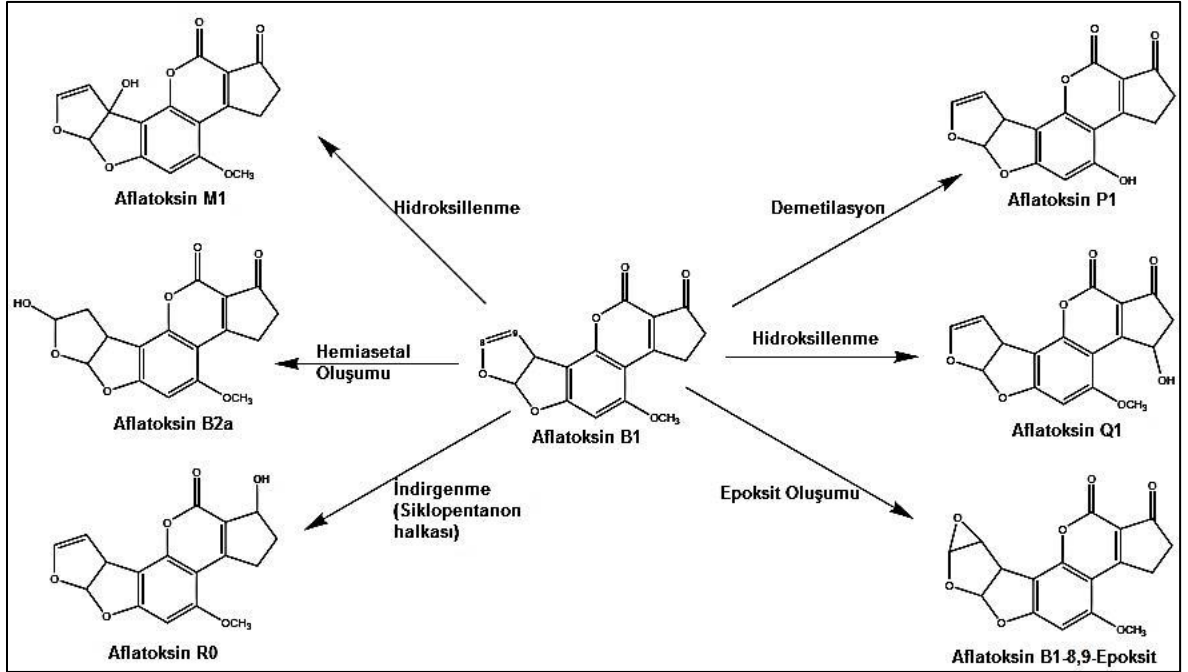
Aflatoksinler ve bu toksinlerin insan ve hayvan sağlığı üzerine etkileri uzun süredir araştırılmakta ve Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) bir alt kuruluşu olan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından Grup 1 kanserojen maddeler olarak tanımlanmaktadır [36, 37].

Aflatoksinlerin kanserojen etki mekanizması, metabolitlerden genotoksik epoksit metabolitinin oluşması ve sonrasında bu metabolitin DNA'ya eklenmesi ve tümör-baskılayıcı TP53 geninin mutasyonu olarak açıklanabilir. Özetle, aflatoksin B1'in insanlar üzerinde kanserojen etkisi olduğu üzerine kesin kanıtlar bulunmaktadır. Yapılan hayvan deneyleri aflatoksin G1'in hayvanlar üzerinde kanserojen etkisi olduğunu kanıtlamıştır. Aflatoksin B2 ve G2'nin kanserojen olduğuna dair yeterli ve kesin bir veri bulunmamakla birlikte yine de risk grubunda değerlendirilirler [36].

2.2.2. Aflatoksinlerin Metabolitleri

Hayvanlar üzerinde yapılan deneyler, aflatoksin B1'in ağız yolu ile alınmasının ardından %50 oranında ince bağırsak tarafından emildiğini, buradan da karaciğere geçerek metabolitlerine dönüştüğünü ortaya koymuştur. İnsan idrarında tespit

edilen metabolitler, aflatoksin P1 (AFT P1), aflatoksin M1 (AFT M1) ve AFT B1'in DNA'ya eklenmesi ile oluşan AFB1-N7Guanin kompleksidir [18, 34, 38, 19]. İlgili metabolitlerden AFT P1, AFT Q1 ve AFT M1'in kimyasal yapısı Şekil 2.4'de verilmiştir.



Şekil 2.4. Aflatoksin B1 metabolitleri [39-42]

İnsanlar, aflatoksinler ile kirlenmiş bitkisel gıdaları tüketmeleri yolu ile veya bu gıdalar ile beslenmiş olan hayvanlardan üretilen gıda maddelerinin (et, süt, yumurta, bebek maması, peynir vb.) tüketimi sonucu aflatoksinlere (dolayısı ile de aflatoksin metabolitlerine) maruz kalabilirler.

2.2.3. Aflatoksinlerin Analizi İçin Duyulan Gerekisim ve Güncel Limitler

Daha önceki başlıklar altında bahsedildiği üzere, aflatoksinlerin insan ve hayvan sağlığı üzerinde ciddi derecede olumsuz etkileri bulunmaktadır. Sağlık problemlerinin yanı sıra hasat esnasında ve hasat sonrası depolama sırasında kirlenmenin engellenememesi, tarımsal ürünlerde kalitenin düşmesi, gıda üretimi amacı ile yetiştirilen besi hayvanlarının üretkenliklerinin azalması veya ölümleri sonucu kaybedilmeleri sonucunu doğurur. Bu da hem ülke içi hem de ülkeler arası ekonomik faaliyetleri olumsuz etkiler. Bu nedenle bütün gıda üretim aşamalarında ve gıda son tüketiciye ulaşmadan hemen önce riskli gıda maddeleri aflatoksin içeriğinin tayin edilmesi amacı ile analiz edilmelidir. Ülkemizde ve birçok ülkede kirlenmiş ürünlerden, tüketicileri, özellikle çocukları korumak amacıyla hükümetler, gıda ve yemlerdeki aflatoksin B1 ve sütteki aflatoksin M1 düzeylerini kontrol altına

almak için yasalar oluşturmuşlardır. Bugün dünyada hemen hemen bütün ülkeler, bu tehlikeden korunmak ve ihraç ettikleri ürünlerin geri dönüşünü azaltmak için gıdalarda ve yemelerde bulunabilecek aflatoksin düzeyleri için sınır değerler belirlemektedirler. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından belirlenen ve Resmi Gazete'nin 29 Aralık 2011 tarihli (28157 3. mükerrer) sayısı ile yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği Türkiye için gıdalarda bulunabilecek aflatoksin üst sınır değerlerini belirlemektedir. Çizelge 2.5'de, ilgili yönetmelikte belirlenmiş olan değerler verilmektedir.

Çizelge 2.5. Gıdalarda izin verilen aflatoksin üst sınır değerleri (Türkiye) [43].

GIDA MADDESİ	Üst Sınır (ug/kg)		
	Aflatoksin		
	B1	B1+B2+G1+G2	M1
Yer Fıstığı ve Diğer yağlı tohumlar ¹	8	15	-
Badem, Antep Fıstığı ve Kayısı Çekirdeği ¹	12	15	-
Fındık ve Brezilya Fındığı ¹	8	15	-
Sert kabuklu meyveler ¹	8	15	-
Yer Fıstığı ve Diğer yağlı tohumlar ²	5	10	-
Badem, Antep Fıstığı ve Kayısı Çekirdeği ²	8	10	-
Fındık ve Brezilya Fındığı ²	5	10	-
Sert kabuklu meyveler ²	5	10	-
Kurutulmuş meyveler	8	10	-
Tahıllar, bunlardan elde edilen ve işlenmiş ürünler	2	4	-
Mısır ve Pirinç ¹	5	10	-

¹: Doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama ve diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan. ²: Doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan.

Çizelge 2.5. (Devamı)

Çiğ süt (ısıtılmış işlem görmüş veya süt ürünleri üretiminde kullanılacak olan)	-	-	0.05
Baharatlar (Kırmızıbiber, karabiber, hintceviz/muskat, zencefil, zerdeçal ve bunların karışımı)	5	10	-
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0.1	-	-
Bebek ve devam formülleri	-	-	0.025
Bebekler için özel amaçlı diyet gıdaları	0.1	-	0.025

2.2.4. Aflatoksin Analiz Yöntemleri

Aflatoksin analizi, aflatoksinlerin gıda maddelerinden özütlenmesi (önderiştirilmesi) ve bu özütlerin uygun bir teknik ile analizini içeren iki aşama olarak ele alınabilir.

Özütleme amacı ile sıvı faz özütleme işlemi veya katı faz özütleme işlemi (SPE-Solid Phase Extraction) kullanılabilir. SPE tekniğinde örneğin, katı faza uygulanmadan önce homojenize edilmesi ve sıvı-sıvı özütleme işlemi uygulanması gerekir. Katı faz çoğunlukla bir kolona doldurulduğundan bu teknik basitçe kolon kromatografisi olarakta nitelendirilebilir.

Katı faz olarak kullanılan dolgu malzemeleri; silikajel (SIL), siyanopropil-silan (CN) aminopropil-silan (NH₂) (normal faz kromatografisi), oktadesil-silan (C18), oktil-silan (C8) (Ters-faz kromatografisi), dietilaminoetanol (DEAE), poli(akrilamido-N-propiltrimetilamonyum klorür), (poly-APTAC) (iyon değişim kromatografisi) gibi geleneksel malzemeler olabileceği gibi yeni nesil kromatografik malzemeler de (Afinite kromatografisi) olabilir [44-48]. İmmunoafinite kromatografisi, yüksek seçicilik, hız ve uygulamadaki kolaylık gibi avantajları sayesinde örnek hazırlama amacı ile yaygın kullanılan tekniktir. Bu teknikte katı destek malzemesine kovalent olarak bağlanmış, aflatoksinlere özgü antikorlar kolon dolgu maddesi olarak kullanılır [49, 45] .

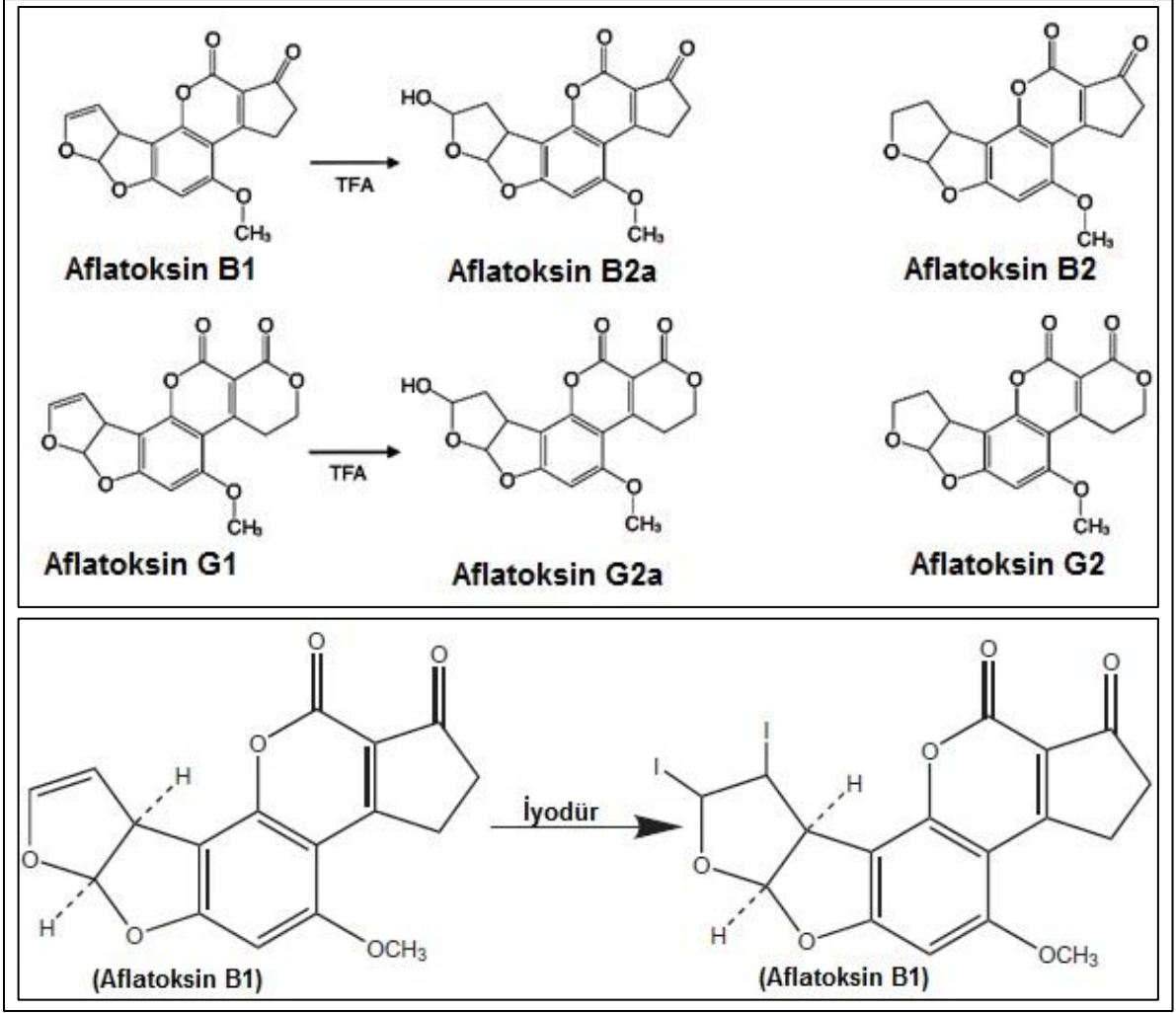
Özütleme aşamasının ardından örneklerin analizine geçilir, bu amaçla; enzim bağlı immün-assay (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay-ELISA), ince tabaka kromatografisi (Thin Layer Chromatography-TLC), kapiler elektroforez (Capillary Electrophoresis-CE), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography-HPLC), sıvı kromatografisi tekli kuadropol kütle

spektrometrisi (Liquid Chromatography- Single Quadrupole Mass Spectrometry-LCMS), sıvı kromatografisi üçlü kuadropol kütle spektrometrisi (Liquid Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry-LC-MS/MS) gibi teknikler kullanılır [1, 32, 47, 50, 51]. Kantitatif ELISA özellikle düşük derişimlerde beklenen analit-antikor özgül etkileşimleri yerine yan etkileşimlerin artması nedeni ile doğruluğun ve tekralanabilirliğinin azalması sonucu güvenilirliğini yitirmektedir. TLC ve CE uygulama açısından uzmanlık ve tecrübe gerektiren tekniklerdir. Bu nedenle özellikle rutin analiz amaçlı olarak çok fazla tercih edilmemektedirler. LC-MS, yine düşük derişimlerde iyon şiddetlerinin düşmesi ve artan girişim nedeni ile güvenilir sonuçlar vermemektedir.

LC-MS/MS, iyon fragmantasyonu yapabilmesi ve bunun sonucu olarak da çoklu-reaksiyon izleme tekniğini (Multiple Reaction Monitoring-MRM) kullanabilmesi sayesinde LC-MS'de yaşanan olumsuzluklardan etkilenmemekte ve oldukça düşük derişimlerde dahi güvenilirliğini yitirmemektedir. Ayrıca yukarıda kısaca yeterli olur) işlemi ile ve kromatografik ayrımın iyi olmadığı durumlarda dahi analizi mümkün kılar. Ancak yüksek cihaz maliyeti LC-MS/MS için hala ciddi bir handicap olarak öne çıkmaktadır. Sistem mutlaka bir HPLC'ye gereksinim duymaktadır, ayrıca azot gazı, aerosol oluşturmak için ve kurutma amaçlı olarak yüksek hacimlerde kullanılır, bu gereksinimi karşılamak ancak bir azot gazı jeneratörü ile mümkündür ve doğal olarak da cihazın maliyetini arttıran bir etkidir.

Aflatoksinler doğal floresant maddelerdir. Özellikle Aflatoksin G2 (AFT G2) ve Aflatoksin B2 (AFT B2)'nin yüksek floresan şiddeti, düşük derişimlerde dahi analizlerini mümkün kılar. Aflatoksin G1 (AFT G1) ve Aflatoksin B1 (AFT B1)'in floresans şiddeti Aflatoksin G2 ve Aflatoksin B2 kadar yüksek değildir. Bu nedenle de floresan şiddeti yüksek türlere, bazı kimyasal işlemler aracılığı ile dönüştürülmeleri gerekir (Türevlendirme) [52].

Türevlendirme işlemi, örnek HPLC kolonuna uygulanmadan önce gerçekleştirilebilir (Pre-Column Derivatization) ve bu amaçla trifloroasetik asit (TFA) kullanılır (Şekil 2.5) [53]. TFA ile türevlendirme işlemi, örneğin içerisinde bulunduğu çözeltilerin işlemde önce azot gazı altında uçurulması basamağını içerir ve bu analit kaybına sebep olur. Reaksiyon otuz dakikada ve 50°C'de gerçekleşir, bunun yanında TFA'nın oldukça korozif olması yöntemin bir başka dezavantajı olarak öne çıkmaktadır.

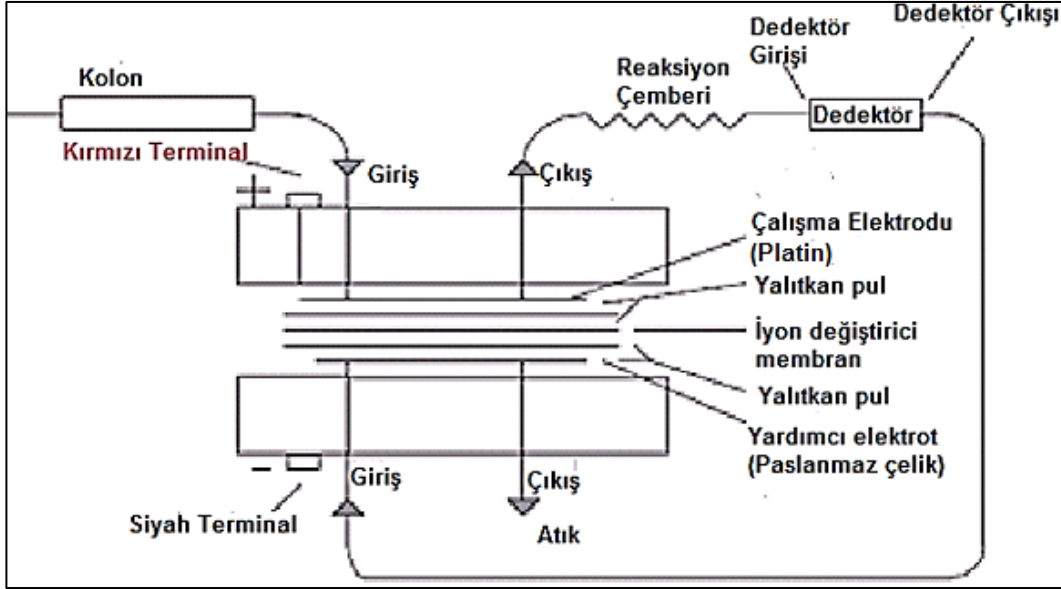


Şekil 2.5. TFA ve İyodür reaksiyon mekanizması.

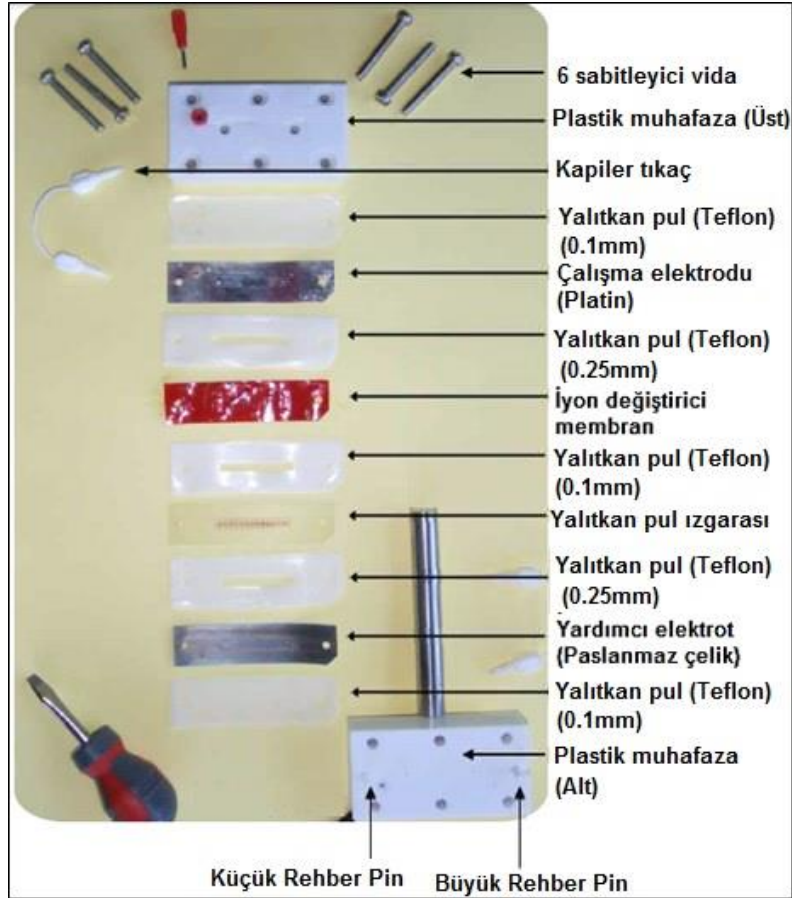
Türevlendirme, kolon öncesi olabileceği gibi kolon ile dedektör arasında da gerçekleştirilebilir (post-column derivatization), bu amaçla PBPB (piridinyum hidrobromür perbromür) veya iyot çözeltisi kullanılır [44]. Ayrıca kolon sonrası foto-türevlendirme de bu amaçla kullanılmaktadır [54]. PBPB ve İyodür çözeltilerinin, HPLC sistemine iletimi için ayrı bir HPLC pompası gerekmektedir. Analiz boyunca sisteme, bu ikinci pompa aracılığı ile reaktif iletimi sağlanır. İyot kristallerinin sistemde neden olduğu fiziksel ve mekanik arızalar, sıcaklık kontrollü bir reaksiyon çemberinin gerekliliği, PBPB'nin yüksek toksisitesi önemli bir dezavantaj olarak öne çıkmaktadır.

Kobra Cell (R-Biopharm Rhône) ünitesi temelde bir elektrokimyasal hücredir (Şekil 2.6.). Hücre içerisinde anyon değiştirici polimerik bir membran bulunmaktadır (Reichelt Thomapor Anion-Şekil Şekil 2.6 ve Şekil 2.7), elektrokimyasal olarak reaktif hale getirilen bromür, burada Aflatoksin G1 ve Aflatoksin B1 ile reaksiyona girerek floresan şiddeti yüksek Aflatoksin G2a ve Aflatoksin B2a oluşumunu sağlar

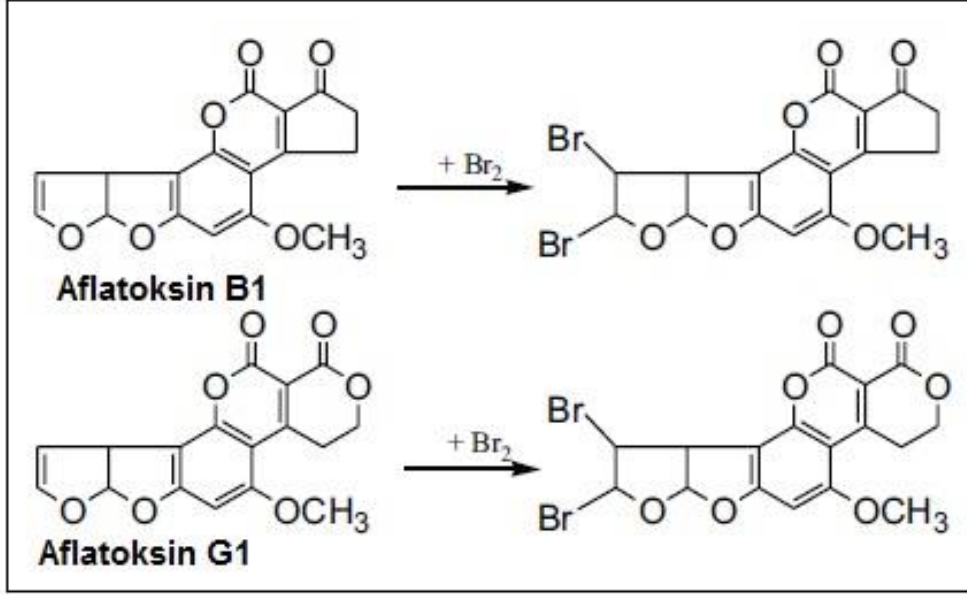
(Şekil 2.8). Reaksiyonda gerekli olan bromür, mobil faza eklenen potasyum bromür (KBr) aracılığı ile sağlanır. Bu sayede fazladan bir reaktif pompasına gerek kalmaz, reaksiyon dört saniye gibi kısa bir sürede gerçekleştiğinden herhangi bir sıcaklık kontrollü reaksiyon çemberi de gerekli değildir.



Şekil 2.6. Kobra Cell® düzeneği [55].



Şekil 2.7. Kobra Cell® ünitesinin yapısını oluşturan bileşenler [55].



Şekil 2.8. Bromür reaksiyon mekanizması [56].

Analiz yönteminin hızı, hassasiyeti ve doğruluğu ne kadar yüksek olsa da özütlenme aşaması verimi en çok etkileyen parametre olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle Kobra Cell® kolon sonrası türevlendirme yöntemi immuno-afinite özütlenmesi ile birlikte kullanılır. İmmuno-afinite kolonlarının tek kullanımlık olmaları bu yöntemin en önemli dezavantajıdır [57].

HPLC'nin kromatografik ayırmadaki yüksek performansı ile spektrofotometrik tekniklerin hibridizasyonu (High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection-HPLC/FLD) ve tekniğin, Kobra Cell kolon sonrası türevlendirme yöntemi ile desteklenmesi, uygulamadaki kolaylık, tekniğin hızlı, hassas, güvenilir ve görece düşük maliyeti, günümüzde bu tekniğin aflatoxin analizleri için en yaygın olarak kullanılan teknik olması sonucunu doğurmuştur.

2.3. Moleküler Baskılama Teknolojisi

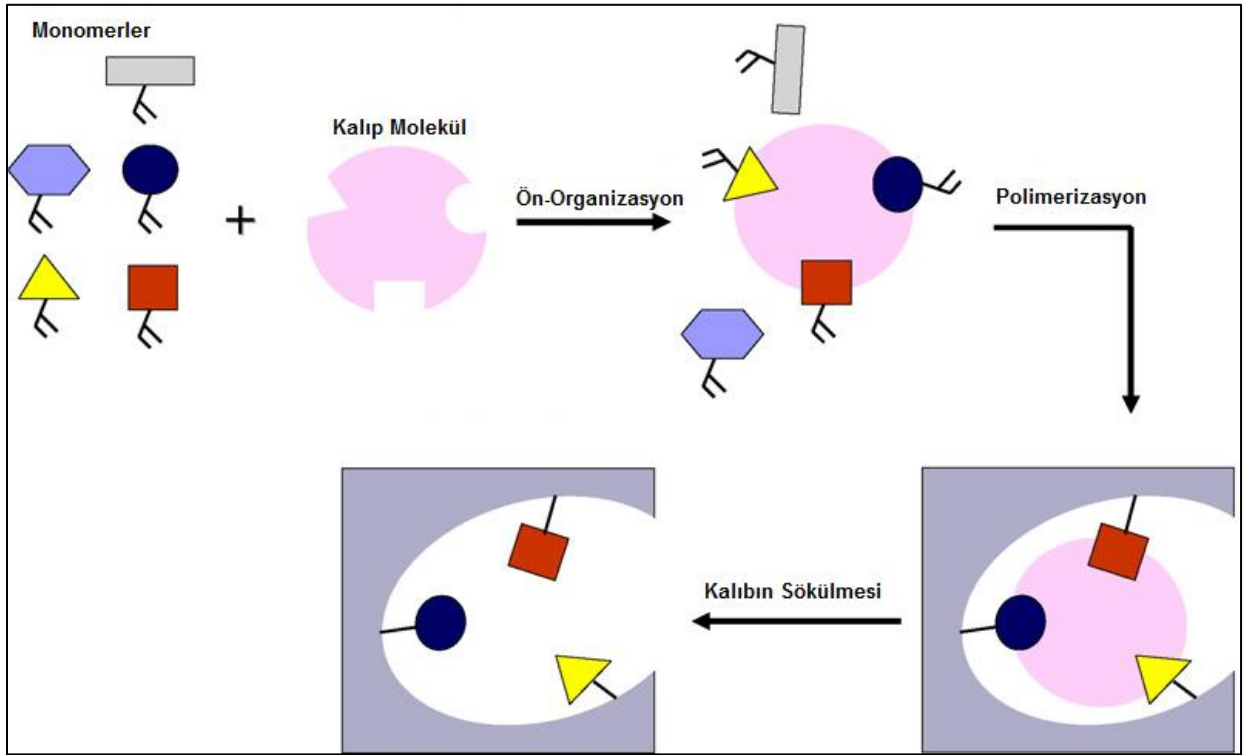
Günümüzde, analitik teknikler, gıda, çevre, ilaç ve biyoteknoloji alanlarında yoğun olarak kullanılmaktadır. Hedef analitler (kalıntı kimyasallar, biyokimyasal maddeler, elementler v.b.) çoğunlukla kompleks bir matriks (bitkisel ve hayvansal dokular ve sıvılar, toprak v.b.) içerisinde bulunduğundan, analiz yöntemi kadar numune hazırlama aşamaları ve bu aşamalarda kullanılan yöntemler de önemlidir. Örnek hazırlama yönteminin hızlı, kolay uygulanabilir, verimli ve düşük maliyetli olması yöntemin değerlendirilmesi konusunda öne çıkan önemli parametrelerdir.

Moleküler baskılama, şekil, büyüklük ve fonksiyonel grup dağılımı gibi özellikleri açısından hedef molekül (hedef analit, kalıp molekül) tamamlayıcı nitelikte olan ve bu sayede hedef moleküle karşı yüksek seçicilikte tanıma bölgelerine sahip polimerik yapıların sentezlendiği bir tekniktir.

Moleküler baskılanmış polimerler (MIP'ler), kolay hazırlanır, maliyetleri düşüktür, fiziksel dayanımları, ısı ve basınca dirençleri yüksektir. Asidik, bazik çözeltiler ve geniş bir yelpazedeki organik çözücüler ile birlikte kullanılabilirler ve birkaç yıl boyunca performanslarında değişim olmaksızın oda sıcaklığında saklanabilirler [49, 58-61, 64].

2.3.1. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin (MIP) Hazırlanması

Moleküler baskılama yöntemi temel olarak üç aşamadan oluşmaktadır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi [65].

2.3.1.1. Ön-kompleksleşme (Ön-organizasyon)

Uygun fonksiyonel gruba sahip ve polimerleşebilen monomer, kalıp molekül ile kovalent etkileşimler, kovalent olmayan; hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, elektrostatik etkileşimler, van der waals etkileşimleri gibi etkileşimlerle veya metal iyon koordinasyon etkileşimleri ile kompleks (ön-polimerizasyon kompleksi) oluşturur. Bu etkileşimde kalıp molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özellikleri önemlidir.

Fonksiyonel monomerler baskılanmış bağlanma bölgelerinde bağlanma etkileşimlerinden sorumludur. Uygulamadaki kolaylık nedeni ile, akrilik ve metakrilik asitler, bunların esterleri ve amidleri, en yaygın olarak kullanılan fonksiyonel monomerler olmuşlardır.

Baskılanan molekülün, polimerleşebilecek grup içerip içermediği, serbest radikal polimerizasyonunu engelleyecek veya yavaşlatacak bir gruba sahip olup olmadığı (tiyol grubu, hidrokinon grubu gibi) ve termal kararlılığı baskılama için önemli parametrelerdir.

Çözücüler, polimer karışımının aynı fazda bulunmasını ve polimerlerde gözenek oluşmasını sağlar. Bu nedenle çözücüye genellikle “gözenek oluşturucu” denir. Çözücü, elde edilen polimerin fiziksel özelliklerini (gözenek yapısı, gözenek boyut dağılımı, şişme özellikleri, sağlamlık ve morfoloji) kontrol edebilmek için önemli bir unsurdur. Ayrıca çözücü, özellikle kovalent olmayan yaklaşımda, baskılama sırasındaki ön-kompleks oluşumunda önemli bir role sahiptir. Genelde toluen, kloroform gibi, apolar ve aprotik çözücüler tercih edilir, kompleks oluşumu sırasında hidrofilik kuvvetler söz konusu ise de su veya protik çözücüler kullanılabilir.

Çapraz bağlayıcılar, öncelikle baskılanmış polimer matriksinin morfolojisinin kontrol edilmesini, baskılanmış molekülün veya iyonun bağlanma bölümlerinin kararlı olmasını ve polimer matriksinin de mekanik kararlılığının yüksek olmasını sağlar.

Kovalent Baskılama

Kovalent baskılama tekniğinde, polimerizasyondan önce baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer arasında kuvvetli ve tersinir bir kovalent düzenlenme gerçekleşir. Polimerizasyon işleminden sonra kovalent bağlar kırılır ve kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül polimer ile etkileştiğinde ise kovalent bağ yeniden oluşur. Bu yaklaşımın en büyük avantajı, fonksiyonel grupların sadece kalıp moleküle özgün bağlanma bölgesinde bulunmasıdır. Ancak bu yöntem ile baskılanabilecek moleküller sınırlı sayıdadır. Adı geçen yaklaşım ile sadece dioller, aldehitler, ketonlar, aminler ve karboksilik asitler baskılanabilir.

Kovalent Olmayan Baskılama

Fonksiyonel monomer ile kalıp molekülün bağlanması kovalent olmayan (hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler ve koordinasyon bağı oluşumu gibi) etkileşimler ile gerçekleşir. Polimerizasyondan sonra uygun çözücü ile kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Yöntemin kolay uygulanabilir olması, fonksiyonel monomerlerin yaygın ve kolay bulunabilir oluşu, bu yöntemin, günümüzde MIP'lerin hazırlanmasında oldukça yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır.

İki yaklaşımda da, baskılama işleminin verimi çeşitli faktörler tarafından etkilenebilir. Monomer-kalıp molekül kompleksinin kararlılığı, kompleksin ortamdaki porojen çözücü ve çapraz bağlayıcı ile etkileşimleri ve ortamdaki diğer yarışmalı moleküler etkileşimler bu faktörler arasında sayılabilir [59, 61, 66-71]. Kovalent ve kovalent olmayan baskılama ile hazırlanan polimerlerin avantaj ve dezavantajları Çizelge 2.6.'da özetlenmiştir.

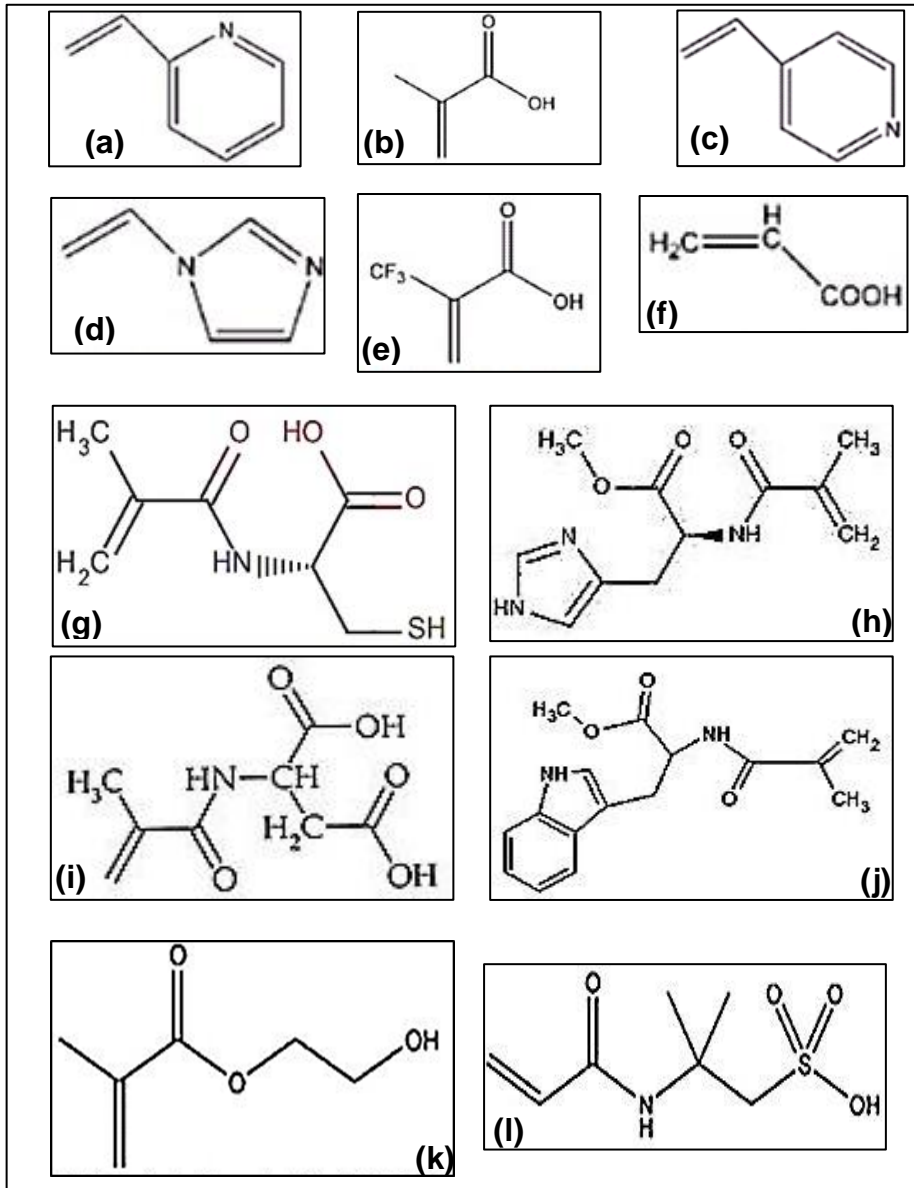
Çizelge 2.6. Kovalent ve kovalent olmayan baskılama ile hazırlanan polimerlerin avantaj ve dezavantajları [59].

	Kovalent Baskılama	Kovalent Olmayan Baskılama
Monomer-kalıp molekül kompleksinin sentezi	Gerekli, zor	Gereksiz
Polimerizasyon koşulları	Oldukça serbest	Sınırlı
Polimerizasyon sonrası kalıp molekülün uzaklaştırılması	Zor	Kolay
Baskılanacak molekülün bağlanması ve ayrılması	Yavaş	Hızlı
Baskılama etkisi	Kalıp (Hedef) moleküllerin uzaklaştırılması sonucunda baskılama etkisi azalır.	Fazla miktardaki fonksiyonel monomer spesifik olmayan bağlanma bölgeleri oluşturur ve bu da seçiciliği azaltır

2.3.1.2. Polimerizasyon

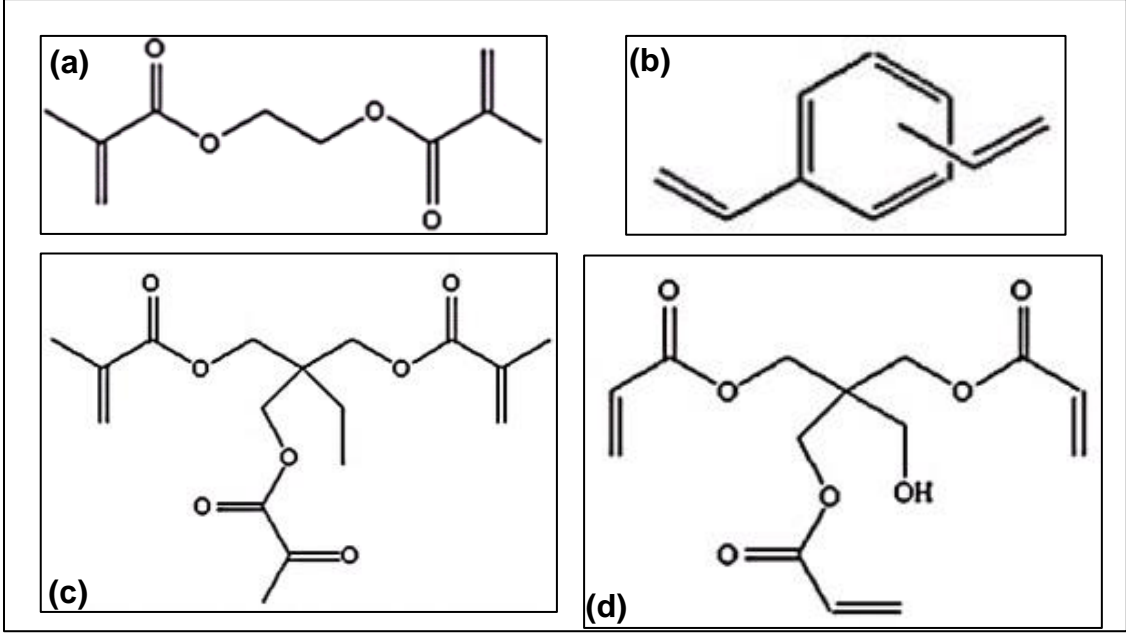
Monomer-kalıp molekül kompleksi, uygun bir çapraz bağlayıcı ve başlatıcı kullanılarak fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilir (Şekil 2.10,- 2.11).

MIP'ler hazırlanırken, genellikle serbest radikal polimerizasyonu kullanılır ve azo-başlatıcılar bu amaçla en çok kullanılan maddelerdir. En yaygın olarak kullanılan azo-başlatıcı, azobisisobutironitril (AIBN)'dir. AIBN, fotokimyasal veya termal bozunum ile serbest radikal kaynağı olarak kullanılabilir. Foto-bozunum, 40°C 'da gerçekleşirken termal bozunum bu sıcaklığın üzerindeki değerlerde gerçekleşir.



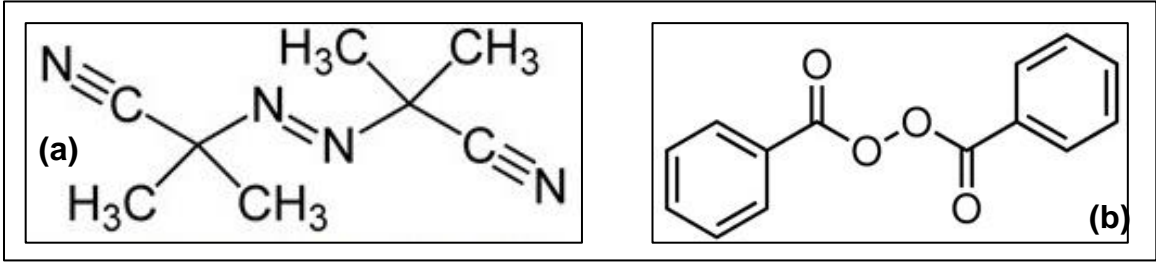
Şekil 2.10. Yaygın olarak kullanılan bazı monomerler*.

* (a) 2-vinilpiridin (2-VPY), (b) metakrilik asit (MAA), (c) 4-vinipiridin (4-VPY), (d) 1-vinilimidazol, (e) triflorometil akrilik asit (TFMAA), (f) akrilik asit, (g) metakroilamido sistein (MAC), (h) metakroilamidohistidin (MAH), (i) metakroilamidoglutamik asit (MAGA), (j) Metakroilamidotriptofan metil ester, (MATrp), (k) 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), (l) 2-Akrilamido2-metilpropan sulfonik asit.



Şekil 2.11. Yaygın olarak kullanılan bazı çapraz bağlayıcılar*.

***(a)** Etilenglikoldimetakrilat (EGDMA), **(b)** divinilbenzen (DVB), **(c)** trimetilpropan trimetakrilat (TRIM), **(d)** pentaeritriol triakrilat (PETRA)



Şekil 2.12. Yaygın olarak kullanılan bazı başlatıcılar*.

* **(a)** Azobisisobutironitril (AIBN), **(b)** benzoil peroksit (BPO)

Baskılama verimini arttırmak amacı ile fonksiyonel monomerin yüksek derişimlerde kullanılması önerilir. Bu durum molekül içi ve moleküller arası etkileşimlerin artmasına sebep olur (özellikle de moleküller bu tür etkileşimlere yatkınsa) ve monomer-kalıp kompleksi oluşumu, dolayısıyla da baskılama verimi bundan olumsuz etkilenir. Monomer, kalıp molekül, çapraz bağlayıcının fonksiyonel olarak uyumlu olması ve bunlar arasında ön polimerizasyon ve polimerizasyon sırasında ortaya çıkabilecek etkileşimlerin gözönünde bulundurulması hayati öneme sahiptir.

2.3.1.3. Kalıp Molekülün Uzaklaştırılması (Sökülmesi)

Uygun çözücü veya çözücü karışımları kullanılarak polimerik yapıdan kalıp molekülü uzaklaştırılır. Baskılanan molekülün polimerden uzaklaştırılması sonucunda polimerde baskılanan moleküle kimyasal ve topolojik (büyüklük, şekil

ve üç boyutlu yapı) olarak uygun seçici bellekler elde edilir ve bir karışımda baskılanan molekül, polimere seçici olarak bağlanabilir.

Moleküler baskılanmış polimerler (MIP), yaygın olarak, reaksiyonun serbest radikal etkisi ile başladığı, vinilik monomer karışımlarının “yığın-polimerizasyonu” ile hazırlanırlar [69]. MIP’ler hazırlanırken polimerizasyon için kullanılan fonksiyonel monomerin, hedef molekülün (kalıp/analit molekül/iyon), çapraz bağlayıcının, çözücü ve başlatıcının karakteristik özelliklerinin elde edilen polimerin morfolojisi, performansı, baskılama verimi gibi özellikleri açısından çok önemli parametreler olduğu dikkate alınmalıdır. Bu nedenle MIP’ler hazırlanırken ilgili parametreler optimize edilmelidir [59, 61, 68, 69, 72].

2.4. Kriyojeller

Kriyojeller, donma sıcaklığının altında oluşan süpermakrogözeneklere sahip jel matrislerdir[73, 74]. Klasik jellerin polimerizasyon çözeltileri homofaz sistemler iken kriyojeller, heterofaz sistemde polimerleşir. Sulu fazın büyük kısmı donarak birbirine bağlı buz kristalleri oluşturur. Bu buz kristallerinin etrafındaki donmamış sıvıda bulunan polimer öncüleri polimerleşerek buz kristallerinin etrafında bir ağ yapı oluştururlar. Tepkime tamamlanınca donmuş karışım oda sıcaklığına getirilir, buz kristalleri erir ve “kriyojel” olarak adlandırılan gözenekli polimerik ağ yapı elde edilir. Kriyojel oluşumu sırasında büyüyen buz kristalleri “gözenek oluşturucu” olarak davranır. Bu kristallerin şekil ve büyüklüğü, kriyojelin gözeneklerinin şekil ve büyüklüklerini belirler [75-77].

Kriyojeller pratik olarak bir jel oluşturan öncüllerden üretilir ve birçok değişik morfoloji ve gözeneklere sahiptirler. Kriyotropik jelleşme (kriyoyapılanma), potansiyel olarak jelleşme kapasitesi olan sistemlerin kriyojenik işleme sokulmasıyla meydana gelen spesifik türdeki jel oluşumudur. Kriyojelin temel özelliği; sıcaklığın düşürülmesiyle jelleşme meydana geldiğinde, kriyojelleşmeyi soğutmayla oluşan jelleşmeden ayırt eden çözücünün zorunlu kristallenmesidir (örneğin çözücünün herhangi bir faz geçişi olmadan meydana gelen agaroz ya da jelatin çözeltilisinin jelleşmesi).

Sistemin büyük çoğunluğunda gözenekler birbiriyle bağlantılı ve yüksek esnekliğe sahiptir. Kriyojellerde makro ve mikrogözenekli yapılar da olabilir [61, 78]. Kriyojellerin diğer özelliği, yüksek esnekliği ve süngerimsi morfolojisidir. Kriyojeller bu özellikleriyle, yüksek ve düşük molekül ağırlıklı öncüllerle hazırlanan ve sulu

ortamda serbest radikal polimerizasyon ile negatif sıcaklıkta üretilir [79]. Kriyojellerin süngersi yapıları poliakrilamid (pAAM), polihidroksimetakrilat (pHEMA), polietilenglikol (PEG), dekstranmetakrilat, polivinilalkol (PVA) temeline dayanır (Çizelge 2.7) [80].

Çizelge 2.7. Kriyojel sistemlerin potansiyel uygulamalarına bakış.

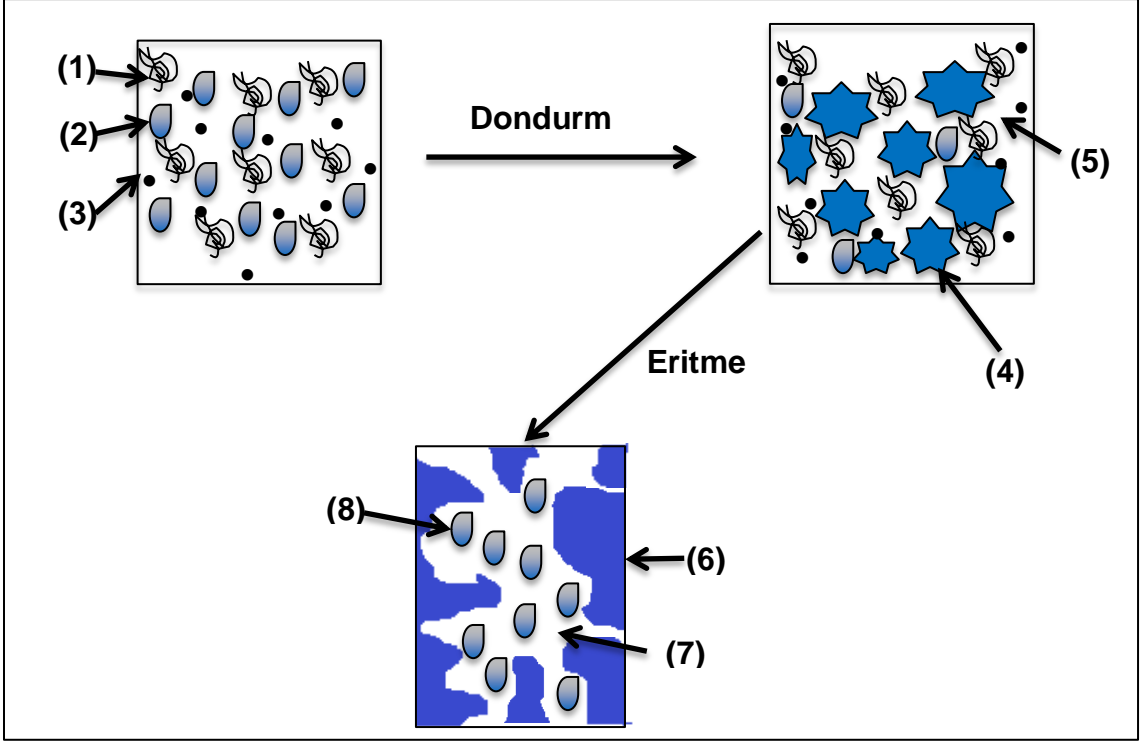
Monomer/Polimer Öncülleri	Gösterim	Gözenek Boyutu (μm)	Morfoloji	Kullanım İşlemleri
Akrilamid	pAAM	1-200	Süngerimsi ve elastik	Küçük parçaçık içeren sıvıların kromatografisi; hücre kültürü için kalıplar
Akrilamid	Aşı-pAAM	1-100	Süngerimsi ve elastik	Küçük parçaçık içeren sıvıların kromatografisi
Dimetilakrilamid	pDMAA	1-120	Süngerimsi ve elastik	Küçük parçaçık içeren sıvıların kromatografisi; hücre kültürü için kalıplar
Polivinilalkol	m-PVA	1-80	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için bozulmayan veya monolitik kromatografi ortamı için kalıplar
Polivinilalkol	b-PVA	0.1-1	Elastik	Mekanik olarak kafesleme yoluyla hücrenin immobilizasyonu. Enzimlerin kimyasal olarak immobilizasyonu
Hidroksietilmetakrilat	HEMA	1-200	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar

Çizelge 2.7. (Devamı)

Monomer/Polimer Öncülleri	Gösterim	Gözenek Boyutu (μm)	Morfoloji	Kullanım İşlemleri
Dekstran metakrilat	Dex-MA	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar
Hidroksietilmetakrilat LL-asetat-Dekstran	HEMA-LLA-D	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için bozulabilen kalıplar
Dekstran Agaroz	Ags-MG	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar
Polietilenglikol	PEG	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar
N-İzopropil akrilamid	NIPAAM	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar

2.4.1. Kriyojellerin Hazırlanışı ve Karakterizasyonu

Çözücünün kristallenme hızı ve kimyasal reaksiyon (kriyojelleşme) hızının uygun bir şekilde kontrol edilmesi, uygun özelliklere sahip kriyojellerin hazırlanmasına olanak sağlar. Kriyojel sistemde, büyüyen buz kristalleri gözenek oluşturucu olarak ve erimesinden sonra birbirine bağlı gözenekler için kalıp olarak davranmaktadır. Bundan dolayı kriyojeller, suyun donma noktasının altında (-10 ile -20°C gibi) düşük sıcaklıklarda sulu ortamda üretilir. Reaksiyon karışımı soğutulduğunda; donmuş monolitik blok iki ana parçadan oluşur. Kimyasal reaksiyon donmamış sıvı mikrofazda gerçekleşir. Reaktif içermeyen çözücünün kristalleri donma sırasında büyür, donmuş bir çerçevenin sürekli bir sistemi oluşana kadar diğer kristallerle birleşir. Kimyasal reaksiyonlar bittikten sonra erime ile birlikte sistem sıvı çözücü ile dondurulmuş sürekli makrogözenekli kanallar içeren bir matristen oluşur (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Kriyojelin oluşumu. 1: Çözeltideki makromoleküller; 2: Çözücü; 3: Düşük molekül ağırlıklı çözünen moleküller; 4: Donmuş çözücünün polikristalleri; 5: Donmamış sıvı mikrofaz; 6: Kriyojelin polimerik iskeleti; 7: Makrogözenekler; 8: Çözücü [81].

2.4.2. Hidrodinamik Özellikler

Bir sistem içinden sıvıyı yürütmek için gereken basınç olabildiğince az olmalıdır. Sabit bir ortamdan düşük akış direncini sürdürmek için en az 1.5-2 μm boyutlarında gözeneklerden akış olması gereklidir. Ortalama gözenek yoğunluğu daha küçük olan (0.3 μm 'den küçük) kromatografik ortam olarak kullanılan malzemeler için düşük bir akış hızını bile durdurmak için çok yüksek bir basınç uygulanmaktadır [82-84].

Tipik olarak monolitler, küçük gözenekler (gerekli etkileşimler için belirli yüzey alanı sağlayan) ile gözeneklerdeki akış (sıvının akmasını sağlayan) arasında uygun bir denge olan sert yapılardır. Yüzlerce mikrometreyi bulan birbirine bağlı gözeneklere sahip olan elastik ve süngerimsi kriyojel monolitler, sert yapılara sahip olan diğer monolitik sistemlerle (polimetilmetakrilat monolitleri) karşılaştırıldığında temel olarak farklı gözenekli bir yapıya sahiptirler. Büyük ve oldukça birbirine bağlı makrogözeneklerin varlığından dolayı kriyojel monolitik kolonların sıvı akış direnci çok düşüktür.

Poliakrilamid kriyojel monolitik kolonların geri basıncının değeri kriyojellerin gözeneklerine bağlıdır. Kriyojellerin gözenek büyüklüğü, gözeneklerin birbirine bağlanması, gözenek duvarlarının kalınlığı ile birlikte kriyojel monolitlerin akış direncini kontrol eder [83, 85].

2.4.3. Gözenek Özelliklerinin Kontrolü

Kriyojellerin gözenekli yapısı, özellikle pAAM kriyojellerin yarı donma sıcaklığı (T_d), çözülmüş monomerlerin derişimi, başlangıç reaksiyon karışım içeriği (amonyum persülfat, TEMED) ve kullanılan çözücü ile kontrol edilir. Son donma sıcaklığı, T_d (düşük sıcaklıktaki termostat içinde kurulan sıcaklık olarak tanımlanır) ve kullanılan çözücü, gözenekli yapıyı etkiler. Poliakrilamid kriyojellerinin hazırlanması sırasında donma sıcaklığını -10°C 'dan -30°C 'a düşürmek, bu kriyojel monolitlerin akış yolu özelliklerini ve jelleşme verimini azaltır. Donma sıcaklığı -20°C olan kriyojellerde monomer dönüşüm oranı (jelleşme verimi) % 70-90 civarındadır [86, 87]. İki türlü gözenek boyutu dağılımına sahip olan pAAM kriyojellerin oluşması iki işlemin birleşimi, yani donmamış sıvı mikrofaz içindeki makrogözeneklerin oluşması (çözücü kristalleri gözenek olarak davrandıklarında) ve donmamış sıvı fazda sentezlenen polimerin faz ayrımının birleşmesiyle meydana gelir.

Serbest radikal polimerleşme reaksiyonlarında başlatıcı amonyum persülfat (APS) ve aktifleştirici TEMED'in derişimleri, polimerleşme hızı ve oluşan polimerin molekül ağırlığı üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Polimerleşme reaksiyonu, monomerlerin polimer zincirlerini çapraz bağlamak için serbest radikaller oluşturmak üzere APS ve TEMED arasındaki reaksiyonla başlar. Serbest radikal polimerleşme reaksiyonu yoluyla negatif sıcaklıklarda kriyojeller hazırlanırken iki olası durum birbirinden ayırt edilebilmelidir:

- 1) Jelleşme meydana gelmeden önce çözeltinin donması,
- 2) Önceden jelleşmiş karışımın donması.

Polimerleşme hızı reaksiyon karışımındaki başlatıcı sistemin miktarı tarafından kontrol edilir. Böylece reaksiyon karışımındaki başlatıcı, sistemin miktarı değiştirilerek büyük ve birbirine oldukça bağlı gözenekli kriyojeller ve birbirine az bağlanmış (kapalı) ve büyük gözenekli kriyojeller hazırlanır. İlk durumda; kopolimerleşme işlemi, reaksiyon ortamının donmasından sonra geriye kalan donmamış mikrofazın içinde gerçekleşir. Bundan dolayı birbirine oldukça bağlı akış kanallarına sahip makrogözenekli yapı oluşur.

Bu yapılar partikül içeren sıvıların, mikrobiyal hücrelerin veya hücre kültür reaktörlerin kromatografik monolitik sorbentleri olarak başarıyla kullanılmaktadır [88, 89].

Kriyojellerin hazırlanması sırasında monomerlerin derişiminin % 6'dan % 15' e çıkarılması, kriyojeller içindeki gözenek hacmini % 90'dan % 80'e düşürür. Kriyojellerin hazırlanması sırasında başlangıç reaksiyonu içindeki monomer derişimini % 6'dan % 20'ye çıkarmak gözenek duvarının kalınlığını artırır ve gözeneklerin birbirine bağlanmasını azaltır. Gözenek duvarının kalınlığı, yoğunluklarıyla birlikte kriyojellerin makroskopik mekanik özelliklerini belirlerken gözenek boyutu ve gözenek duvarının yoğunluğu polimer gövdesine kimyasal olarak bağlanan ligandların ulaşabilmesini etkiler.

2.4.4. Kompozit Kriyojeller

Kompozitler, temel olarak, fiziksel ve kimyasal özellikleri farklı iki veya daha fazla bileşenden oluşur. Kompoziti oluşturan bileşenler, yapı içerisinde kendi özelliklerini (fiziksel, kimyasal ve mekanik) kaybetmezler ve mikroskopik veya makroskopik düzeyde ayırt edilebilirler. Kompozit malzemeler, günümüzde Tıp, havacılık ve uzay sanayi, yenilenebilir enerji, tekstil gibi birçok bilimsel ve endüstriyel alanda kullanılmaktadır [90-95].

Kriyojeller, geniş gözeneklere sahip polimerik yapılardır. Geniş gözenekler uygulamada kriyojellere birçok avantaj sağlamakla beraber, düşük yüzey alanı ve buna bağlı düşük adsorpsiyon verimi gibi bir sorunu da beraberinde getirir. Yüzey alanını genişleterek bu dezavantajı ortadan kaldırmak için mikro veya nano parçacıklar içeren kriyojel kompozitler hazırlanır. Bazı durumlarda ise hazırlanan kompozit kriyojelin amacı kriyojeli destek malzemesi olarak kullanarak adsorbentler için kararlı bir etkileşim ortamı sağlamaktır [96-98].

2.4.5. Kriyojellerin Uygulamaları

Kriyojellerin uygulamaları gözenekli yapıları ve işlemsel kararlılıklarıyla belirlenir. Temel olarak immobilize hücreler ve enzimlerle yapılan biyokatalizde, partikül içeren akışkanlardan hedef moleküllerin ayrılmasında, hücre organellerinin, virüslerin, mikrobiyal ve memeli hücrelerinin kromatografisinde ve memeli hücre kültürleri için üç boyutlu matris olarak biyotıp uygulamaları bulunmaktadır. Küre içeren kriyojeller ise özellikle mikrobiyal hücrelerin ve enzimlerin immobilizasyonu için kullanılmaktadır.

Makrogözenekli monolitler (1-100 µm'lik gözenekli) virüslerin, hücre organellerinin, mikrobiyal ve memeli hücrelerinin ayrılmasında kalıp olarak kullanılmaktadır [80].

3. MALZEME VE YÖNTEMLER

3.1. Kimyasal Malzemeler

2-Hidroksietil metakrilat (HEMA), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), L-Triptofan metil ester hidroklorür ve metakriloil klorür, N,N'-metilen-bis(akrilamit) (MBAAm), amonyum persülfat (APS), N,N'-Azobis-izobütironitril (AIBN), N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED) Sigma-Aldrich Chemie GmbH'den (Steinheim, Almanya) sağlanmıştır. Metanol (HPLC için uygun saflıkta), asetonitril (HPLC için uygun saflıkta), potasyum bromür, sodyum klorür, nitrik asit, diklorometan, trietilamin ve sodyum hidroksit ise Merck KGaA'dan (Darmstadt, Almanya) sağlanmıştır. Deneyler sırasında kullanılan sular Barnstead (Dubuque, IA) ROPure LP® ters ozmoz üniteli selüloz asetat membranlı (Barnstead D2731) ve Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırıcılı, iyon değişimli ultra saf su cihazından sağlanmıştır. Kullanılan cam malzemeler gece boyu % 5'lik nitrik asit çözeltisinde tutulmuş ve kullanılmadan önce deiyonize su ile durulanarak tozsuz bir ortamda kurutulmuştur.

3.2. Deneysel Yöntemler

3.2.1. Fonksiyonel Monomerin Sentezi

3.2.1.1. N-Metakriloil-L-triptofan metil ester (MATrp) Monomerinin Sentezi

N-Metakriloil-L-triptofan metil ester (MATrp) monomerinin sentezi için uygulanan yöntem kısaca şöyledir: 5.0 g L-triptofan metil ester ve 0.2 g hidrokinon, 100 mL diklorometan (CH_2Cl_2) çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Çözelti 0°C'da soğutulmuştur. 12.7 g trietilamin bu çözeltiliye ilave edilmiştir. 5.0 mL metakriloil klorür yavaşça bu çözeltinin üstüne dökülmüştür. Bu reaksiyon karışımı azot atmosferi altında manyetik karıştırıcı ile 2 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Kimyasal reaksiyonun sonunda, reaksiyona girmeyen metakriloil klorür, % 10'luk NaOH çözeltisi ile özütleme işlemi yapılmıştır. Sulu faz döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılmış ve kalan katı kısım etanolde çözülmüştür [78].

3.2.1.2. MATrp Monomerinin Karakterizasyonu

3.2.1.2.1. FTIR Analizi

MATrp monomerinin FTIR spektrumu, FTIR spektrofotometresi (Spectrum One™, Perkin Elmer, Massachusetts, ABD) kullanılarak elde edilmiştir. MATrp monomeri

(2 mg), KBr (98 mg, IR Grade, Merck, Almanya) ile homojen olarak karıştırılmış, tablet haline getirilmiş ve FTIR spektrumu çekilmiştir.

3.2.1.2.2. NMR Analizi

MATrp monomerinin proton NMR spektrumu, $CDCl_3$ içerisinde NMR (GX-400 300 MHz JEOL/Japonya) cihazı kullanılarak alınmıştır. Kimyasal kaymalar (δ) ppm cinsinden $CDCl_3$ referans alınarak rapor edilmiştir.

3.2.2. Ön-Polimerizasyon Kompleksinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Aflatoksin (kalıp molekül) ve fonksiyonel monomer MATrp Çizelge 3.1'de verilen oranlarla 1.0 mL etanol içeren tüplerde oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. Elde edilen ön kompleks karakterizasyonu, bilgisayar kontrollü Shimadzu RF-5301 PC (Shimadzu Corp. Kyoto, Japonya) marka spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. Farklı monomer oranlarında hazırlanan örneklerin 350-600 nm dalga boyu aralığında spektrumları alınmıştır.

Çizelge 3.1. MIP'de kullanılan ligand/monomer oranları.

Kompleks	Aflatoksin (nmol)	MATrp (nmol)
0	-	100
1	100	-
2	100	100
3	100	200

3.2.3. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Hazırlanması

Aflatoksin baskılanmış polimerlerin hazırlanmasında, yığın polimerizasyon yöntemi uygulanmıştır. Çalışmanın bu aşamasında 3 farklı polimer hazırlanmıştır: (i) fonksiyonel monomer içermeyen poli(HEMA) (Polimer Kodu: BOŞ); (ii) sadece fonksiyonel monomer içeren, moleküler baskılama yapılmamış poli(HEMA) (Polimer Kodu: NIP); ve (iii) fonksiyonel monomer-aflatoksin kompleksi içeren, moleküler baskılanmış poli(HEMA) (Polimer Kodu: MIP) polimerler. Yığın polimerizasyon yöntemi, MIP'ler için şu şekilde özetlenebilir: monomer fazı olarak 2-hidroksietil metakrilat (HEMA, 1 mL), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA, 2 mL) ve

aflatoksin-MATrp kompleksi (0.5 mL) karıştırılmış ve homojen çözelti elde edilene kadar sonikatörde bekletilmiştir. Ortama gözenek oluşturu ve seyreltme ajanı olarak toluen (2 mL) eklenmiş ve 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır (150 rpm, oda sıcaklığı). Polimerizasyon reaksiyonu, 25 mg AIBN eklenerek başlatılmış ve 6 saat 70°C'da sıcaklık kontrolü ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen polimerler, Retsch MM 200 marka (Düsseldorf, Almanya) bilyeli değirmen kullanılarak öğütülmüştür. Öğütülen polimerler, Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) parçacık boyut ölçüm cihazı ile karakterize edilmiştir. Zeta boyut analizi, ışık saçılması tekniği ile ölçüm yapan partiküllerin hidrodinamik boyutu (0.6 nm-6.0 µm aralığında), zeta potansiyeli (maksimum iletkenlik 200 mS) ve molekül ağırlığının (1×10^3 - 2×10^7 aralığında) tayinine olanak sağlayan bir sistemdir. Zeta boyut analizi için izlenen deneysel yöntem şu şekildedir: polimerik partikül süspansiyonu (1 mg/mL; 3 mL) nanoboyut analizörünün örnek yuvasına yerleştirilmiştir. Işık saçılması 90°'lik geliş açısında 25°C'da tayin edilmiştir. Veri analizi için, deiyonize suyun yoğunluğu (1.00 gr/ml) ve kırınma indeksi (1.33) kullanılmıştır. Işık saçılma sinyali birim saniyedeki partikül sayısı (partikül sayısı/s) olarak hesaplanmıştır. Burada şu not edilmelidir ki; örnekteki partikül derişimi ölçüm için yeterli yoğunluktadır. Baskılanmamış (NIP) ve fonksiyonel grup içermeyen polimerler (BOŞ), aynı reçete ile ön-polimerizasyon kompleksine fonksiyonel monomer (MATrp) ve fonksiyonel monomer-aflatoksin kompleksi eklenmeyerek elde edilmiştir.

3.2.4. Aflatoksin-MIP Kompozit Kriyojellerin Sentezi ve Karakterizasyonu

3.2.4.1. Aflatoksin-MIP Kompozit Kriyojellerin Sentezi

Çalışmanın bu bölümünde dört farklı aflatoksin baskılanmış kompozit kriyojel (kompozitlerden bundan sonraki bölümlerde, AflaMIP olarak bahsedilecektir) kolon formatında hazırlanmıştır (Çizelge 3.2). AflaMIP kompozitler hazırlanırken uygulanan yöntem kısaca şu şekildedir: N,N-Metilen bisakrilamid (0.283 g), suda çözülmüştür (10 mL). HEMA (1.30 mL), suda (5 mL) çözülerek MBAAm çözeltisine eklenmiştir. Bu çözeltiliye, aflatoksin baskılan(ma)mış partiküller eklenerek sonikatörde 15 dakika karıştırılmıştır (Not: AflaMIP-1'de karışıma partikül eklenmemiştir). Daha sonra 20 mg amonyum persülfat (APS) eklenmiş ve başlatıcı olarak da 25 µL H₂O₂/N,N,N',N'-tetra-metil-etilendiamin (TEMED) kullanılmıştır. Polimerizasyon, -12°C'da 24 saatte gerçekleştirilmiştir. AflaMIP kompozitlerin

içerdiği moleküler baskılanmış partikül miktarının etkisinin incelenmesi amacıyla 3 farklı miktarda MIP partikül içeren AflaMIP kompozit hazırlanmıştır. Bu süre sonunda hazırlanan AflaMIP kompozitler, oda sıcaklığına geldikten sonra reaksiyona girmemiş monomerler ve diğer artıklar polimerik yapıdan su ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Kalıp moleküllerin (aflatoksinler) uzaklaştırılması için asetonitril çözeltisi (% 100, v/v) kullanılmıştır. AflaMIP kompozitler oda sıcaklığında 48 saat süre ile asetonitril çözeltisi ile yıkanmıştır. Bu işlem filtratta kalıp molekül (aflatoksin) kalmayana kadar devam etmiştir. Aflatoksin varlığı, 365 nm dalga boyunda yapılan spektrofotometrik ölçümlerle gerçekleştirilmiştir. AflaMIP kompozitler, mikrobiyal kirlenmeyi önlemek için % 0.01 sodyum azür içeren çözeltide buzdolabında saklanmıştır.

Çizelge 3.2. AflaMIP kompozitlerin içerikleri ve polimer kodları.

Polimer Kodu	AflaMIP Kompozitin İçerdiği Partikül Türü/Miktarı
AflaMIP-1	-
AflaMIP-2	BOŞ, 200 mg
AflaMIP-3	NIP, 200 mg
AflaMIP-4	MIP, 200 mg
AflaMIP-4-50	MIP, 50 mg
AflaMIP-4-100	MIP, 100 mg
AflaMIP-4-300	MIP, 300 mg

3.2.4.2. Aflatoksin-MIP Kompozit Kriyojellerin Karakterizasyonu

3.2.4.2.1. Şişme Testi

AflaMIP kompozitlerin denge şişme oranının belirlenmesinde aşağıda verilen yöntem izlenmiştir. Kurutulmuş kompozitler, $\pm 0.0001g$ duyarlılıkla tartılmış ve 50 mL saf su içeren behere konulmuştur. Kompozitler, 24 saat sonunda sudan alınmış ve süzgeç kağıdı yardımı ile yüzeydeki su uzaklaştırılarak tartılmıştır. Aşağıdaki eşitlik yardımı ile de su içerikleri belirlenmiştir.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = [(W_s - W_0) / W_0] \times 100 \quad \text{Eşitlik (3.1), [99]}$$

W_0 ve W_s sırası ile kompozitlerin şişmeden önceki ve sonraki ağırlıklarını (g) ifade etmektedir.

AflaMIP kompozitlerin makrogözeneklerinin miktarının belirlenmesi için ise aşağıda verilen yöntem uygulanmıştır.

İlk olarak denge şişme oranına ulaşmış olan AflaMIP örnekleri tartılmıştır. Daha sonra örnekler bir enjektör içerisine alınarak, makrogözenekler içerisinde bulunan suyun uzaklaştırılması için kompozit enjektör yardımıyla sıkılmış ve tartılmıştır.

Makrogözenek miktarı ise aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Makrogözenek miktarı (\%)} = [(W_1 - W_2) / W_1] \times 100 \quad \text{Eşitlik (3.2)}$$

Bu eşitlikte W_1 denge şişme oranına ulaşmış AflaMIP kompozitin ağırlığını (g) ifade ederken, W_2 denge şişme oranına ulaşmış AflaMIP kompozitin sıkıldıktan sonraki ağırlığını (g) ifade etmektedir.

3.2.4.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu

AflaMIP kompozitlerin yüzey ve yığın yapısı, yüksek büyütme sağlaması nedeniyle taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Nova™ NanoSEM 430, Fei Company™, Oregon, ABD) ile incelenmiştir. Bu amaçla ilk basamakta kompozit kesitleri iletken bir yapıştırıcıyla SEM örnek plakası üzerine tutturulmuştur. Daha sonra örnek yüzeyi vakum altında 200 Å kalınlığında metalik altın ile kaplanarak yüzey iletken hale getirilmiştir. Hazırlanan örnekler SEM örnek yuvasına yerleştirilerek çeşitli büyütme oranlarında fotoğrafları çekilmiştir.

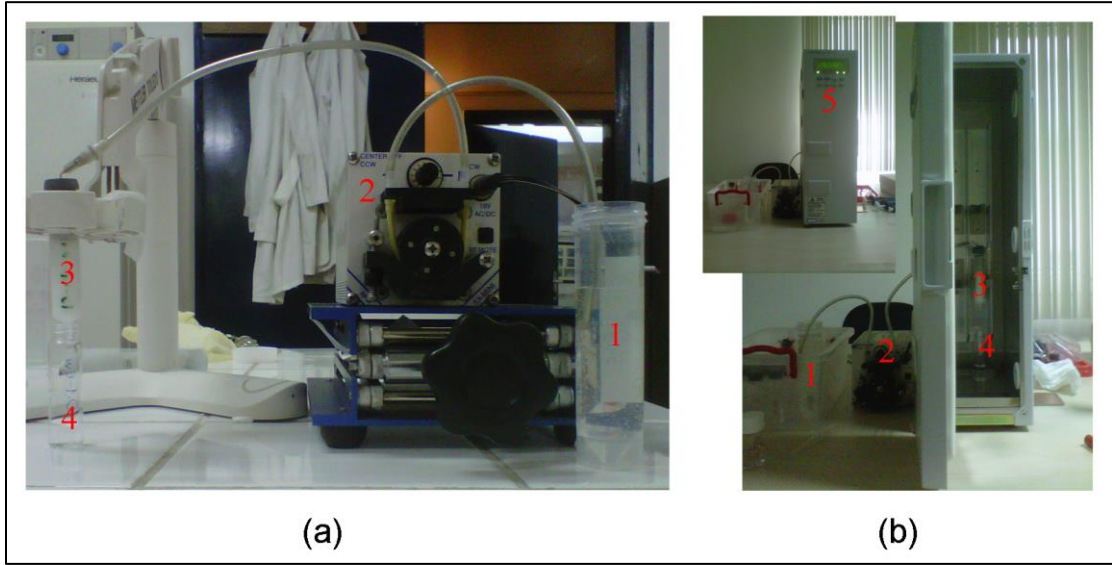
3.2.4.2.3. FTIR Analizi

AflaMIP kompozitlerin yığın yapısı FTIR (Frontier Optica™, Perkin Elmer, Massachusetts, ABD) ile incelenmiştir. Analizden önce AflaMIP kompozitler, vakum etüvünde (37°C, 200 mmHg) 24 saat kurutulmuştur. FTIR spektrumlarının elde edilmesi amacıyla 2 mg kompozit örneği, 98 mg KBr ile karıştırılarak havanda dövülmüş ve hidrolik preste 600 kg/cm² basınçta 10 dakika bekletilerek ince bir tablet haline getirilmiştir. Hazırlanan tabletin 4600-400 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında spektrumu FTIR cihazında alınmıştır.

3.2.5. Aflatoksin-MIP Kompozit Kriyojellerin Optimizasyonu

Hazırlanan AflaMIP kompozitlerin optimizasyonu sürekli adsorpsiyon sisteminde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Kullanılan sistem yükleme çözeltisi, döngüyü sağlayan peristaltik pompa, AflaMIP kompozit içeren kolon, kolon tutucu ve toplama çözeltisinden oluşmaktadır. Deneylerde kullanılan aflatoksin toplam

standart çözeltileri, ana stok çözeltisinin (1000 ng/mL) seyreltilmesi (asetonitril:H₂O; 10:90) ile hazırlanmıştır. Sıradan bir adsorpsiyon işlemi şu şekilde uygulanmıştır: AflaMIP kompozit, 5 mL fosfat tampon çözeltisi (pH: 7.0) ile dengelenmiştir, Daha sonra da, 1 mL aflatoksin içeren çözelti (adsorpsiyon çözeltisi, A) ile etkileştirilmiştir. Adsorpsiyon sonrası seçici olarak tutunmayan moleküllerin uzaklaştırılması için 6 mL yıkama çözeltisi (Y; asetonitril:H₂O; 20:80) ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. AflaMIP kompozit ile seçici olarak etkileşen aflatoksin moleküllerinin uzaklaştırılması asetonitril (E; % 100; 3 mL) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Rejenerasyon işlemi ise 4 mL su ve 4 mL fosfat tampon çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. (a) Oda sıcaklığında ve (b) sıcaklık kontrollü olarak aflatoksin önderiştirilmesinde kullanılan sürekli adsorpsiyon sistemi. 1: Yükleme çözeltisi; 2: peristaltik pompa; 3: AflaMIP kompozit; 4: toplama çözeltisi; 5: sıcaklık kontrolü için kullanılan kolon fırını.

Karşılaştırma amacıyla kullanılan Aflaprep[®] (R-Biopharm Rhone[®], Şekil 3.2) kolonları ile özütleme şu şekilde gerçekleştirilmiştir. Öncelikle 2-8°C sıcaklıktaki kolonlar oda sıcaklığına getirilmiş, ardından Aflaprep[®] kolonun önündeki ve arkasındaki tıkaçlar çıkarılmış ve homojenize edilip süzölmüş olan numuneden 10 mL (1 g numuneye karşılık gelen miktar) alınarak, akış hızı 2-3 mL/dakika olacak şekilde kolondan geçirilmiştir. Bu işlemlerin ardından yıkama basamağına geçilmiştir. Yıkama işlemi 10 mL fosfat tamponu, pH:7 çözeltisi ile gerçekleştirilmiş ve aflatoksinler 1 mL metanol (100%) ile kolondan elue edilmiştir. Elde edilen elüat, deiyonize su ile (1:1, v/v) seyreltilmiş ve 100 µL'si HPLC'ye enjekte edilmiştir.



Şekil 3.2. Ticari Olarak Satılan Aflaprep® kolonlar.

AflaMIP kompozitlerin adsorpsiyon dinamiklerinin belirlenmesi için derişim, akış hızı, pH, sıcaklık ve kompozitlerin içerdiği partikül miktarı gibi adsorpsiyona etki eden faktörler incelenmiştir. Aflatoksin derişiminin etkisini belirlemek amacıyla; yükleme çözeltisindeki aflatoksin moleküllerinin miktarı 0.025-100 ng/mL aralığında değiştirilmiştir. Akış hızının etkisinin belirlenmesi için yükleme çözeltisinin kompozit ile etkileştirilme hızı 0.43-1.50 mL/dak aralığında değiştirilmiştir. Yükleme tamponunun pH değerinin adsorpsiyona etkisini belirlemek amacıyla pH 2.0-8.0 (100 mM derişiminde uygun tampon çözeltileri kullanılmıştır) aralığında çalışılmıştır. Kolon sıcaklığının etkisinin belirlemek için adsorpsiyon deneyleri 15-40°C sıcaklıkta HPLC sisteminin kolon fırını içerisinde gerçekleştirilmiştir. AflaMIP kompozitler hazırlanırken, malzemenin içereceği moleküler baskılanmış partiküllerin miktar optimizasyonu için, farklı miktarda partikül içeren (50-300 mg) kompozitler hazırlanmış ve adsorpsiyon deneylerinde kullanılmıştır. Adsorpsiyon koşullarının optimizasyon çalışmalarında adsorpsiyon öncesi, yıkama, elüsyon ve rejenerasyon çözeltilerinden örnekler alınarak içerdiği aflatoksin miktarları belirlenmiştir. Bunun için de her çalışmadan önce, derişim aralığı 0.0125-2.5 ng/mL aralığında olan saf aflatoksin karışımları kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kullanılan aflatoksin standard karışımının belirli bir raf ömrü olması ve aflatoksinlerin floresans veriminin buna bağlı olarak değişmesi nedeni ile bu işlem çok önemlidir. Ayrıca nicel ölçüm limitleri, tekrarlanabilirlik ve geri kazanım değerleri de hesaplanarak raporlanmıştır. Hazırlanan kompozitler ile yapılan çalışmalar, ticari Aflaprep® kolonları (R-Biopharm Rhone) ile yapılan çalışmalarla paralel yürütülmüştür. Aflatoksin miktarlarının belirlenmesi

amacıyla yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) sistemi kullanılmıştır (Shimadzu Corp., Kyoto, Japonya). Kullanılan sistemde CBM-20A Lite model sistem kontrol ünitesi, LPGE ünitesi içeren LC-20AT model pompa, SIL-20AHT model otomatik enjeksiyon ünitesi, CTO-10ASVP model kolon fırını, RF-20A model floresan dedektör sistemi bulunmaktadır. Ölçümlerde kolon sonrası bromlama işlemi için KobraCell (R-BioPharm Rhône, Darmstadt, Almanya) birimi kullanılmıştır. Sıvı kromatografi sisteminde ayırma işlemi için ters faz C18 kolon (Inertsil ODS-3, 150 x 4.6 mm, 5 µm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak su (119 mg potasyum bromür, 350 µL 4 M nitrik asit içeren):metanol:asetonitril (60:20:20) içeren çözelti kullanılmıştır. Akış hızı, 1.0 mL/dakika; kolon sıcaklığı, 40°C; örnek yükleme hacmi, 100 µL ve dedektör dalga boyları, 362 nm (uyarılma) ve 425 nm (yayılma) olarak uygulanmıştır.

Çalışmalar sırasında elde edilen bütün çözeltilerin (adsorpsiyon eflüatı, yıkama eflüatı ve elüat) HPLC sistemine enjeksiyonu yapılmış ilgili kromatogramlar Ekler bölümünde verilmiştir. Deneyler kapsamında 1000'in üzerinde enjeksiyon yapılmış olup, bu nedenle çalışmalar sırasında toplam iki adet C18 HPLC kolonu kullanılmıştır.

3.2.6. Seçicilik Deneyleri

Hazırlanan AflaMIP kompozitlerin seçiciliğinin gösterilmesi amacıyla, aflatoksin özütleme işlemleri, hazırlanan dört farklı kompozit (Ayrıntılar için bkz., Bölüm 4.4, Şekil 4.6) ile aflatoksin özütleme uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca aflatoksin baskılanmış kompozitlerin (AflaMIP-4), seçicilik sabitleri, aflatoksinlerin, okratoksin A (OTA) ve aflatoksin M1 (AFT M1) ile yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları sonucu elde edilen veriler kullanılarak hesaplanmıştır (Eşitlik 3.3, 3.4 ve 3.5). Özütleme yöntemi Bölüm 3.2.5'de anlatıldığı gibi uygulanmıştır. Ancak analiz OTA ve AFT M1'in, HPLC analiz yöntemleri aflatoksinlerden farklı olduğundan, bütün türlerin analizinin tek enjeksiyonda yapılabilmesi için analiz yöntemi olarak LC-MS/MS kullanılmıştır. Kullanılan sistemde CBM-20A Lite model sistem kontrol ünitesi, 2 adet LC-20AD XR pompa, SIL-20AC XR otomatik enjeksiyon ünitesi, CTO-20AC kolon fırını, LCMS 8030, LC-MS/MS dedektör sistemi bulunmaktadır. Yöntemin ayrıntıları Çizelge 3.3'de verilmiştir.

$$K_d = \left[\frac{(C_i - C_f)}{C_f} \right] \times \frac{V}{m} \quad \text{Eşitlik (3.3), [100-102]}$$

$$K = \frac{K_{d(\text{Aflatoksin})}}{K_{d(\text{OTA veya AFTM1})}} \quad \text{Eşitlik (3.4), [100-102]}$$

$$k' = \frac{K_{d(\text{Afla MIP-4})}}{K_{d(\text{Afla MIP-3})}} \quad \text{Eşitlik (3.5), [100-102]}$$

Çizelge 3.3. LC-MS/MS parametreleri.

HPLC Parametreleri	
Mobil Faz A	Su (1 mM Amonyum asetat ve hacimce % 0.1 Asetik asit çözeltisi içeren)
Mobil Faz B	Metanol (1mM Amonyum asetat ve hacimce % 0.1 Asetik asit çözeltisi içeren)
Kolon	Inertsil ODS-4 100X2.1mm, 2um
Enjeksiyon Hacmi	20 uL
Akış Hızı	0.3 mL/dak
Çözücü Gradient Programı	4.00 dak→5.00 dak, % 50B→% 95B, 5 dak % 95B'de sabit, 10.00 dak→10.01 dak, % 50B
Kolon Fırını Sıcaklığı	40°C
MS/MS Parametreleri	
Sprey Gazı Akış Hızı	Azot, 3.0 L/dak
Kurutma Gazı Akış Hızı	Azot, 15 L/dak
Çarpışma Gazı Akış Basıncı	Argon, 230 kPa

Çizelge 3.3. (Devamı)

Polarite	(+)		
ESI İyonlaşma Gerilimi	-5kV		
MRM (Çoklu Reaksiyon İzleme) Parametreleri (MS/MS)			
	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	CE (Çarpışma Enerjisi -V)
Aflatoksin G2	331.20	245.10	-10
Aflatoksin G1	328.90	243.00	-31
Aflatoksin B2	314.90	258.90	-29
Aflatoksin B1	313.00	241.00	-37
Aflatoksin M1	328.90	273.10	-25
Okratoksin A	404.10	239.00	-23

3.2.7. Gerçek Örneklerden Aflatoksin Özütlemesi

Gerçek örneklerden aflatoksin özütleme çalışmaları dört farklı numune kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, piyasadan rastgele satın alınan fındık, fıstık, pul biber ve kuru incir numuneleri kullanılmıştır. Fındık ve fıstık numuneleri homojenizasyon öncesi havanda öğütülmüş, pul biber numunesi doğrudan kullanılmış, incir numunesi de mutfak tipi bir doğrayıcı kullanılarak küçük parçalara ayrılmıştır. Numuneler (50 g), 50 mL metanol:su karışımıyla (30:70, v/v) homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenizat süzme kağıdından (Whatman No: 4) süzülmüştür. Bu aşamada numunelerin aflatoksin içerip içermediği, immunoafinite-katı faz özütleme işlemi (Aflaprep® kolonlar) ardından HPLC-Kobra Cell®-FLD sistemi ile analiz edilmiş ve aflatoksin içermediği kesinleşen numunelere, AflaMIP kompozitlere uygulanmadan hemen önce aflatoksin standart karışımı eklenerek, aflatoksin derişimleri bilinen gıda numuneleri elde edilmiştir. Daha sonra, elde edilen çözeltiler, AflaMIP kompozitlerle (1-4) ve ticari Aflaprep® kolonları ile etkileştirilmiştir. Elde edilen veriler AflaMIP kompozitlerin etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılmıştır. Bölüm 3.2.5'de Aflaprep® özütleme aşamaları ve HPLC-Kobra Cell®-FLD analiz yöntemi ayrıntıları anlatılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

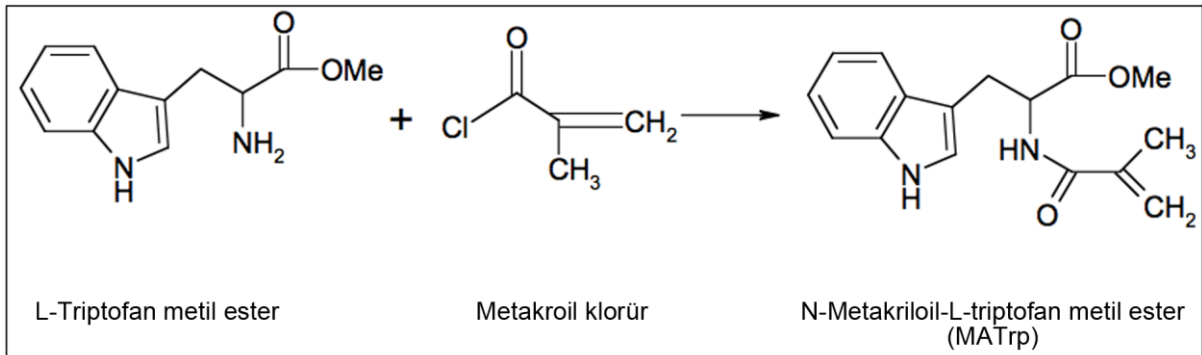
Tez kapsamında yapılan çalışmalarda; AflaMIP kompozitlerin sentez, karakterizasyonu yapılmış, özütleme uygulamaları için yöntem optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve seçici aflatoksin özütleme işlemlerine ait sonuçlar rapor edilmiştir.

Bu ön denemelerde elde edilen verilerin ışığı altında gerçek numunelerden (fındık, fıstık, pul biber ve incir) aflatoksin özütleme işlemlerine ait performans parametreleri incelenmiştir. AflaMIP kompozit-aflatoksin etkileşimlerinin etkinliğinin belirlenmesi için standart aflatoksin kolonları Aflaprep® da kullanılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Adsorpsiyon öncesi, yıkama ve elüsyon çözeltilerindeki aflatoksin miktarları kolon sonrası türevlendirme sistemi KobraCell® içeren sıvı kromatografi yöntemiyle tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar başlıklar halinde tartışılarak açıklanmaya çalışılmıştır.

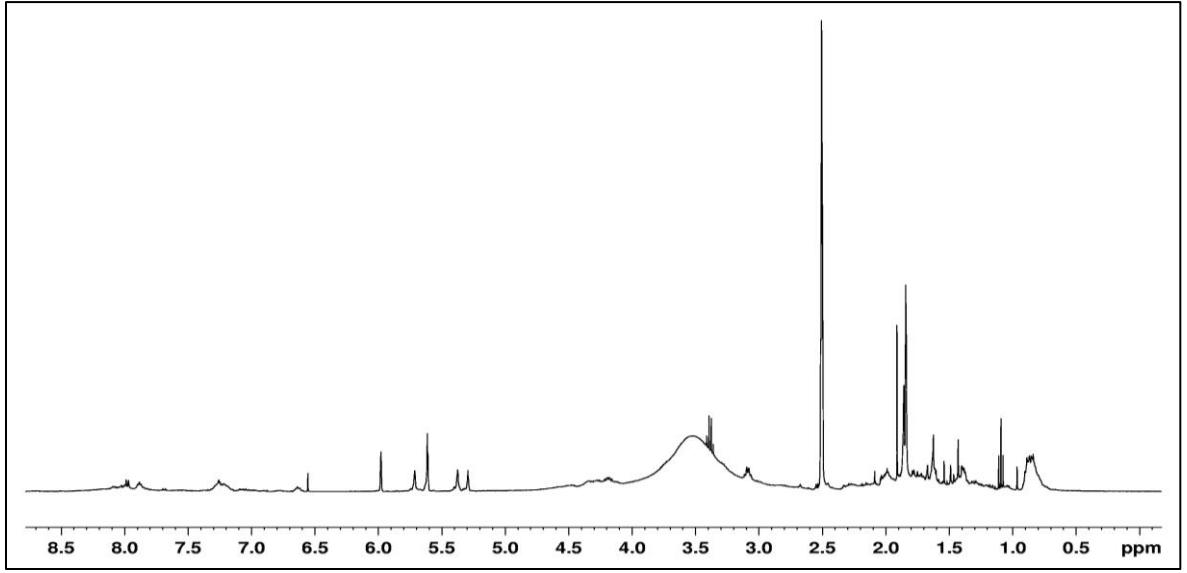
4.1. Fonksiyonel Monomerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Fonksiyonel MATrp monomeri, daha önce raporlanan [78] bir yöntem uyarınca, L-triptofan metilesterin metakriloyl klorür ile reaksiyonu sonucu elde edilmiştir (Şekil 4.1). Elde edilen fonksiyonel monomer NMR ve FTIR çalışmaları ile karakterize edilmiştir.

MATrp monomerinin kimyasal yapısının belirlenebilmesi için ¹H-NMR kullanılmıştır. Şekil 4.2 MATrp'ın ¹H-NMR spektrumunu göstermektedir. MATrp yapısında bulunan ilgili protonlara ait karakteristik pikler şunlardır: 1.86-1.88 ppm CH₂ protonları tarafından yarılan CH₃ protonları (-C=C-CH₃, vinil metil), 5.29 ppm de görülen CH₂ (-C=CH₂), ve 5.98 ppm deki CH pikleri (-CH-C-) ile aromatik halkanın CH ve NH protonları 7-8 ppm'de görülmektedir. CDCl₃ çözücü olarak kullanılmıştır.

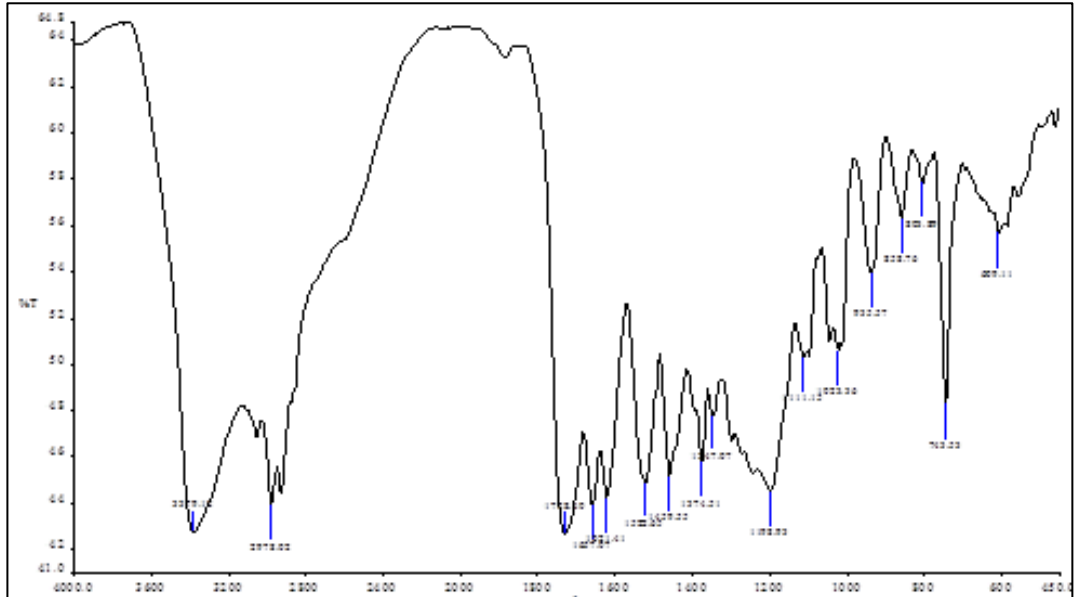


Şekil 4.1. MATrp monomerinin sentez reaksiyonu [72].



Şekil 4.2. MATrp monomerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.

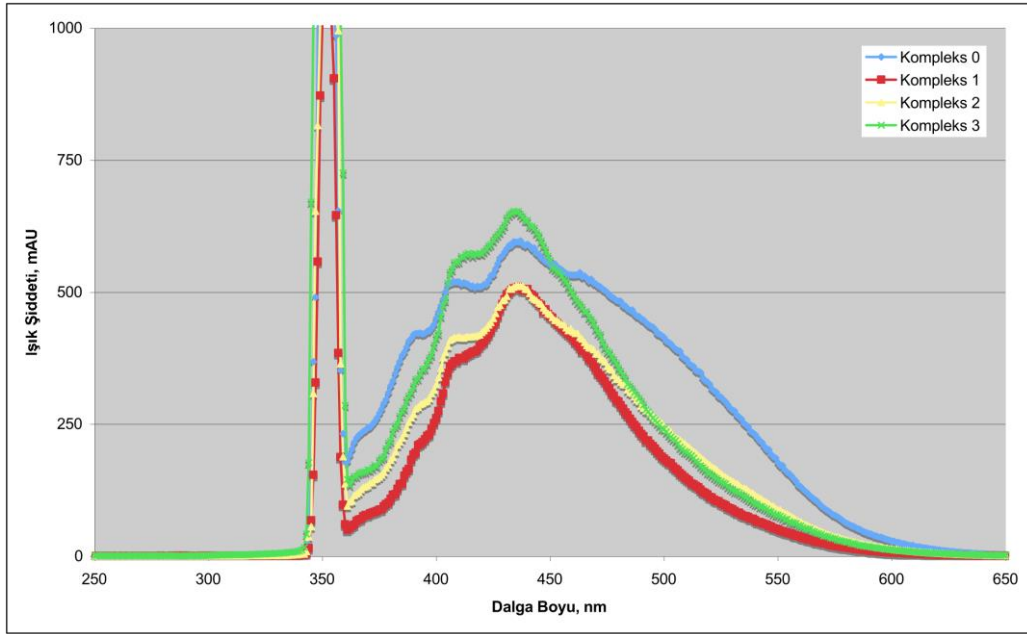
MATrp monomerinin yapısının belirlenmesi için FTIR tekniği de kullanılmıştır. Şekil 4.3' de MATrp monomerinin FTIR spektrumu verilmiştir. Şekil 4.3'de görüldüğü gibi MATrp monomerinin, N-H gerilme bandı (3379 cm^{-1}), C-H gerilme bandları (aromatik, $3100\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$; alkil, 2978 cm^{-1}), karboksilik asidin OH grubu için geniş band ($3000\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$), karboksilik asidin C=O eğilme bandı (1728 cm^{-1}), amit yapısındaki C=O gerilmesi (1657 cm^{-1}), C=C gerilmesi (1621 cm^{-1}), NH eğilme (1522 cm^{-1}), C-N gerilmesi (aromatik, $1458\text{-}1374\text{ cm}^{-1}$) ve asidin C=O bükülmesi ($1347\text{-}1198\text{ cm}^{-1}$) görülmektedir. NMR ve FTIR spektrumları MATrp monomerinin başarıyla sentezlendiğini göstermektedir.



Şekil 4.3. MATrp monomerinin FTIR spektrumu.

4.2. Ön-Polimerizasyon Kompleksinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

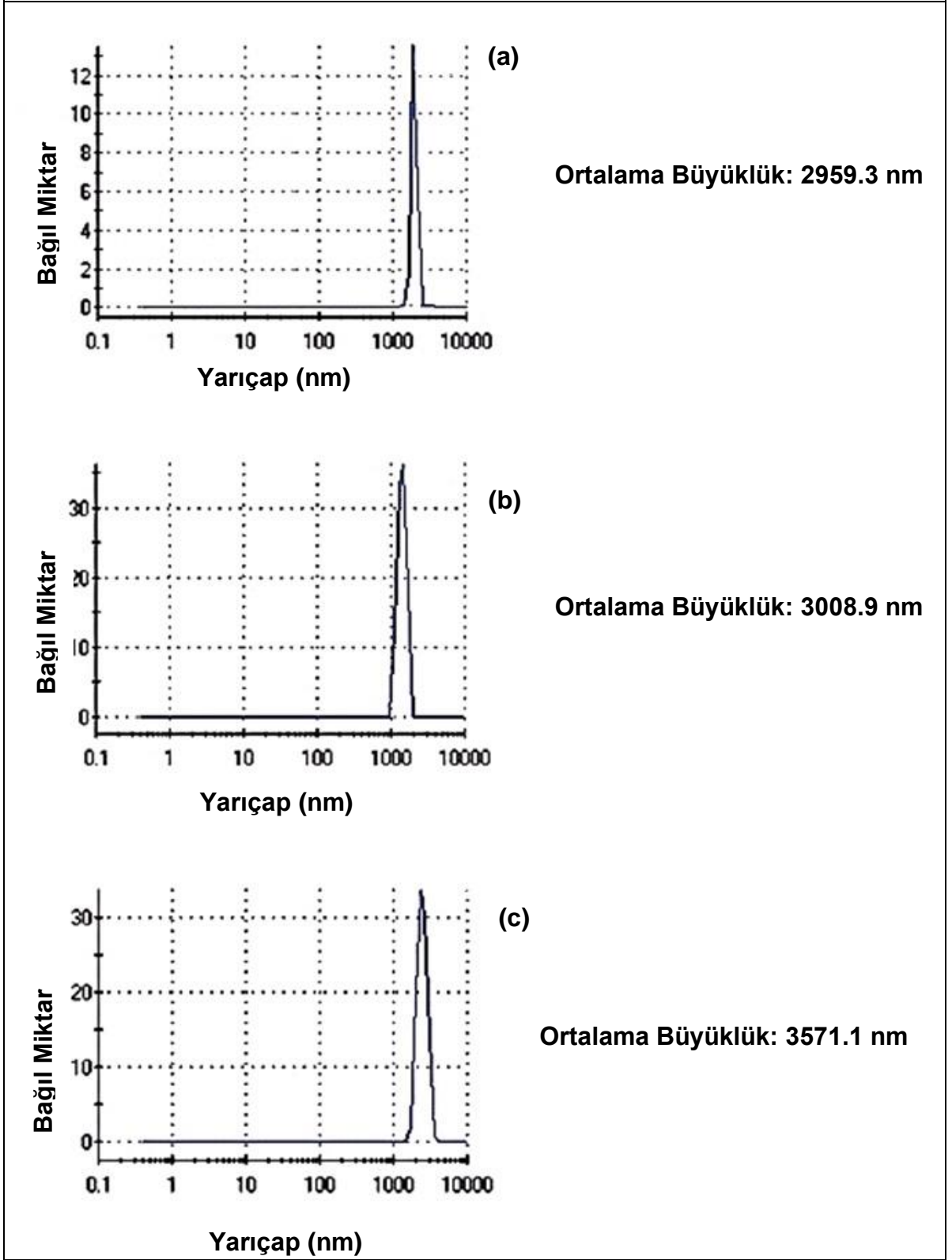
Moleküler baskılama işleminde, üretilen polimerlerin performansını belirleyen parametrelerden biri; uygun kalıp molekül:fonksiyonel monomer oranıdır. Bu amaç doğrultusunda en uygun kalıp molekül:monomer oranının belirlenmesi için aflatoksin:MATrp oranı değiştirilmiştir. Aflatoksin baskılanmış kompozitlerin hazırlanması için oluşturulan farklı aflatoksin:MATrp ön-polimerizasyon kompleksleri, spektrofotometre kullanılarak karakterize edilmiştir. Şekil 4.4'de görüldüğü gibi Kompleks 0 (MATrp monomeri, 100 nmol), 389, 410, 436 ve 467 nm'de maksimum emisyon piklerine sahiptir. Bu pikler monomerin yapısındaki aromatik halka ve eşleşmemiş elektron çiftlerinin floresans bandlarıdır. Kompleks 1 (Aflatoksin, 100 nmol) maksimum emisyon pikleri, 409 ve 437 nm'de görülmektedir. Kompleks 2 (Aflatoksin:MATrp kompleksi, 1:1), kompleks oluşumuna bağlı olarak MATrp moleküllerinin maksimum dalga boylarında kaymalar gözlenmiştir. Yeni maksimum dalga boyları, 395, 409, 438 ve 465 nm olarak belirlenmiştir. Kompleks 3 için yeni maksimum dalga boyları ise; 411 ve 433 nm olup güçlü aflatoksin-MATrp etkileşimlerine bağlı olarak 390 ve 465 nm civarındaki emisyonlara ait pikler yok olmuştur. Bu sonuçlar kompleks oluşumunu ve kompleks oluşumuna aflatoksin ve MATrp miktarlarının etkisini göstermektedir. Kompleks oluşumu ile birlikte aromatik halkadaki çift bağların ve eşleşmemiş elektronların enerjisi azalmakta ve daha yüksek dalga boyuna kayma gözlenmektedir. Ayrıca 1:2 mol oranlarındaki komplekslerin daha kararlı olduğu belirlenmiş olup bundan sonraki çalışmalarda bu mol oranına sahip kompleksler kullanılmıştır.



Şekil 4.4. Ön-Polimerizasyon komplekslerinin spektrofloretr emisyen spektrumları. Kompleks 0 (MATrp, 100 nmol); Kompleks 1 (Aflatoksin, 100 nmol); Kompleks 2 (Aflatoksin:MATrp kompleksi, 1:1); Kompleks 3 (Aflatoksin:MATrp kompleksi, 1:2).

4.3. Moleküler Baskılanmış Partiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu


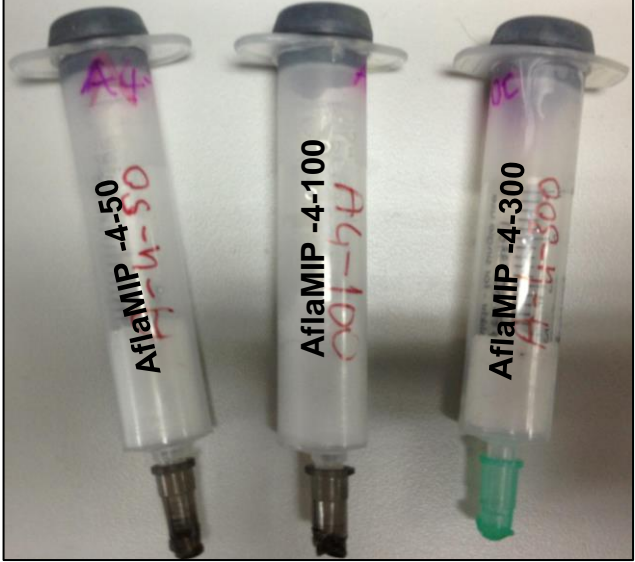
Deneysel Yöntemler bölümde de belirtildiği gibi; çalışmanın bu aşamasında 3 farklı polimer hazırlanmıştır: BOŞ, NIP ve MIP polimerler. Bu polimerlerin hazırlanmasında, yığın polimerizasyon yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen polimerler bilyeli değirmende öğütülerek mikrometre boyutlarına getirilmiştir. Bu partiküllerin boyutları, zeta boyut analizörü kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 4.5). Şekilden de görüldüğü gibi; öğütülen partiküllerin boyutları 3 mikrometre civarındadır. Partiküllerin boyut dağılımları ise; oldukça dar olup hemen hemen eş boyutlu partiküller elde edilmiştir. Partiküllerin eş boyutlu olması adsorpsiyon işlemlerinin hem tekrarlanabilir olmasını hem de benzer dinamiklerle gerçekleşmesinde önemli bir parametredir.



Şekil 4.5. Moleküler baskılanmış polimerlerin zeta boyut analizleri. (a) BOŞ; (b) NIP ve (c) MIP partiküller.

4.4. AflaMIP Kompozit Kriyojellerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Çalışmanın bu bölümünde 7 farklı AflaMIP kompozit hazırlanmıştır (Şekil 4.6). MIP partikül içeren ve içermeyen kompozitlerin (AflaMIP-1-4) karakterizasyonu, şişme testleri, taramalı elektron mikroskobu ve FTIR analizleri ile gerçekleştirilmiştir.

	AflaMIP-1: Boş kriyojel.
	AflaMIP-2: Poli(HEMA) mikropartikül içeren kompozit
	AflaMIP-3: NIP (Poli(HEMA)-MATrp) mikropartikül içeren kompozit.
	AflaMIP-4: MIP (Poli(HEMA)-MATrp-AFT) mikropartikül (200/mg) içeren kompozit.
	AflaMIP-4-50: 50/mg MIP mikropartikül içeren kompozit.
	AflaMIP-4-100: 100/mg MIP mikropartikül içeren kompozit.
	AflaMIP-4-300: 300/mg MIP mikropartikül içeren kompozit.

Şekil 4.6. Çalışma kapsamında hazırlanan kompozitlerin kodları ve içerikleri.

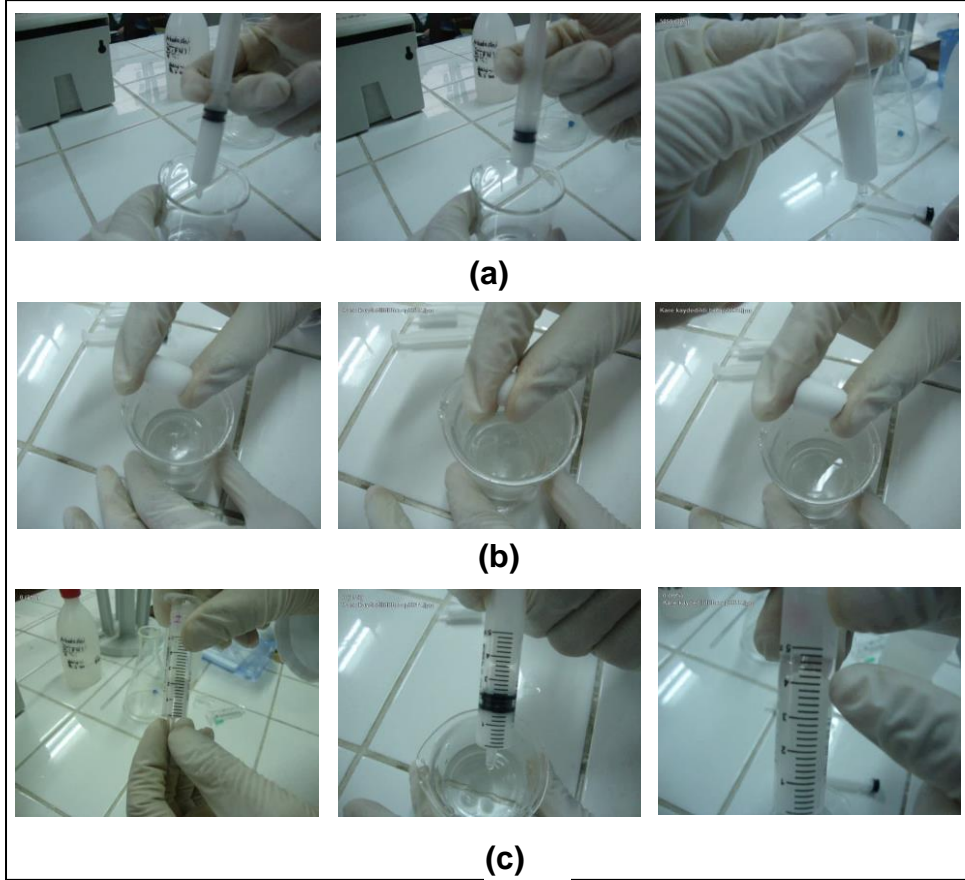
4.4.1. Şişme Testi

Hazırlanan AflaMIP kompozitler, çapraz bağlı hidrofilik yapıdadırlar. Suda çözünmeyip, polimerik zincirlerinin arasına aldıkları su molekülleri ile şişerler. Bu çalışmada; boş kriyojel AflaMIP-1, BOŞ Poli(HEMA) mikropartikül içeren AflaMIP kompozit, (AflaMIP-2), Poli(HEMA)-MATrp mikropartikül içeren AflaMIP kompozit, (AflaMIP-3) ve Poli(HEMA)-MATrp-AFT mikropartikül (200/mg) içeren AflaMIP kompozit, (AflaMIP-4) denge şişme oranları sırasıyla % 885.64, % 800.79, % 838.42 ve % 845.22'dir (Çizelge 4.1). Makrogözenek oranları ise sırasıyla %

66.70, % 69.19, % 77.22 ve % 75.20'dir. Birim kütle başına, polimerik yapıya alınabilen su miktarları ise; 8.86, 8.01, 8.38 ve 8.45 g H₂O/g kompozit olarak bulunmuştur. Partikül içermeyen kriyojel (AflaMIP-1) ile karşılaştırıldığında, partikül gömülü kriyojellerin şişme oranları oldukça yüksektir. Bu durum kriyojelik yapı içerisine gömülen partiküllerin, spesifik yüzey alanı artırmasıyla açıklanabilir. Partikül gömülü kriyojeller karşılaştırıldığında ise; AflaMIP-2'nin şişme oranı, diğer kriyojellere göre yüksektir. Bu durum, gömülen partikülün türünün de etkin bir faktör olduğunu göstermektedir. AflaMIP-2'ye boş poli(HEMA) partiküller gömülmüştür. Kriyojel yapısına ilave HEMA gruplarının girmesi, HEMA'nın hidrofilik karakterine bağlı olarak şişme oranını arttırmıştır. Baskılanmamış (AflaMIP-3) ve baskılanmış (AflaMIP-4)'ün şişme davranışları karşılaştırıldığında ise; baskılanmış kriyojellerin şişme oranları daha yüksek olduğu görülmektedir. Aradaki fark; kalıp molekülün yapıdan uzaklaştırılmasının ardından oluşan daha düzenli ve gözenekli yapıdan kaynaklanmaktadır. Bu durum, şişme oranı (bir başka ifade ile birim kriyojel kütleindeki su miktarı) baskılama işlemi ile artarken, makrogözenek miktarında azalma olmaktadır. Çünkü; kalıp moleküllerin (aflatoksin) etrafında düzenlenen fonksiyonel monomerler; makrogözenekliliği bir miktar düşürürken toplam gözenek miktarını arttırmaktadır. Burada şu not edilmelidir ki: şişme, sıkma ve kurutma işlemleri, 5 kere tekrar edilmiş ve ortalama değerleri rapor edilmiştir. Ayrıca; bu işlemler sırasında kriyojellerin yapısında herhangi bir bozulma gözlenmemiştir (Şekil 4.7). Şekil 4.7'de gerçekleştirilen şişme testleri gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Kompozitlerin şişme özellikleri.

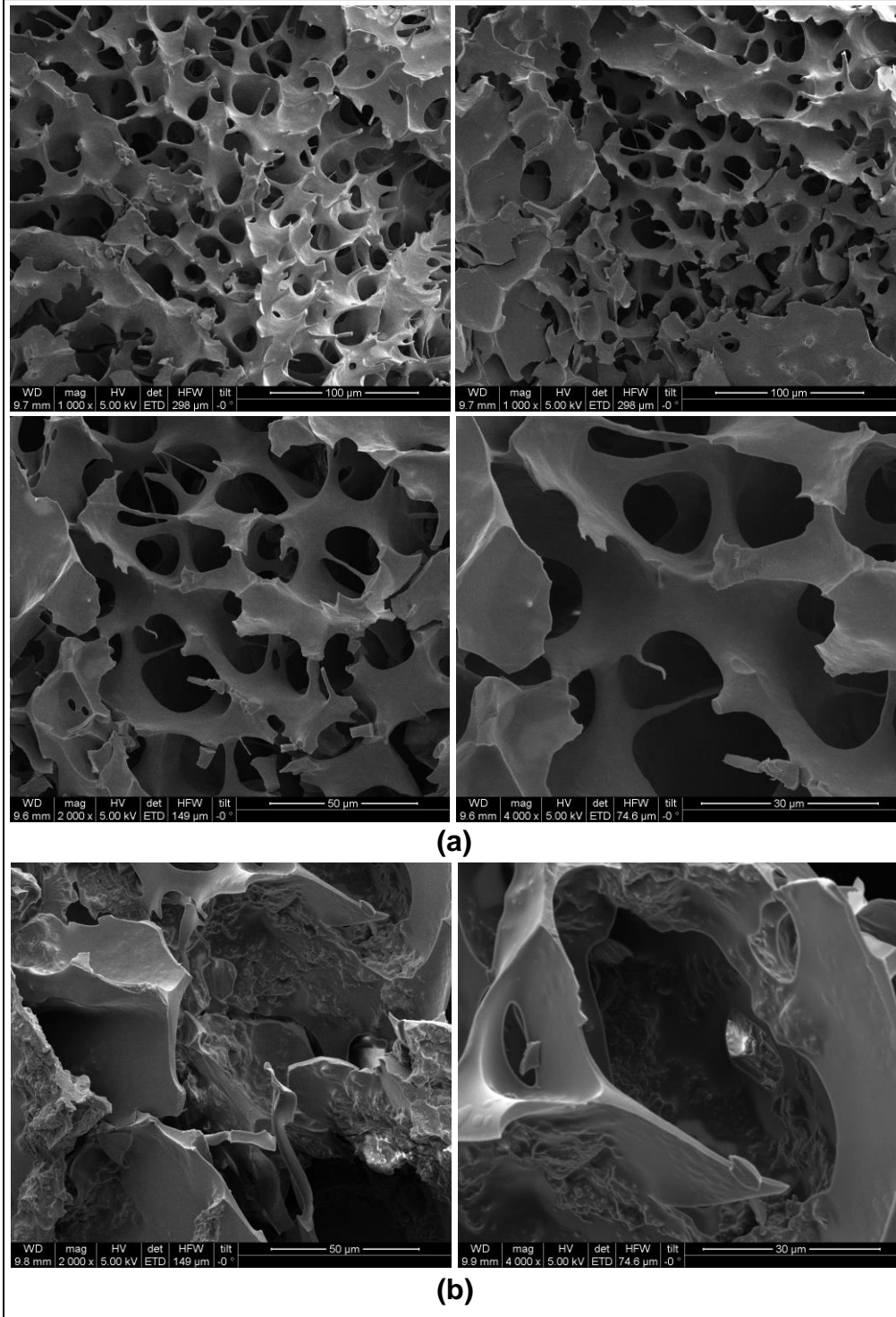
Kompozit Kodu	Şişme Oranları (%)	Makrogözenek Miktarı (%)	Su İçeriği (g su/g kriyojel)
AflaMIP-1	800.79	66.70	8.01
AflaMIP-2	885.64	69.19	8.86
AflaMIP-3	838.42	77.22	8.38
AflaMIP-4	845.22	75.20	8.45



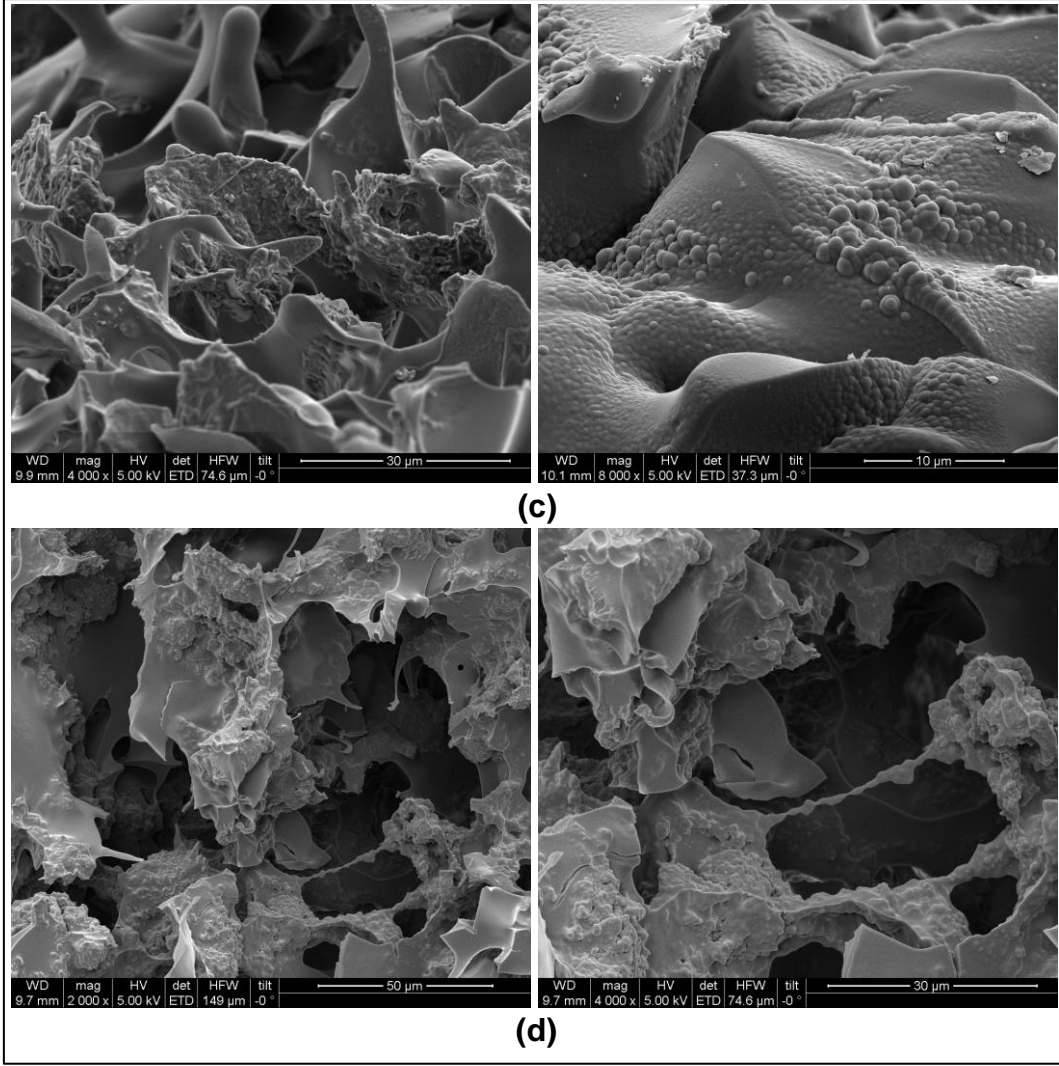
Şekil 4.7. Kriyojellerin şişme davranışlarının belirlenmesi. **(a)** Enjeksiyon ile sıkıştırma testi, **(b)** elle ile yapısal inceleme ve **(c)** hacimsel şişme testi.

4.4.2. Taramalı Elektron Mikroskobu

Hazırlanan AflaMIP kompozitlerin, yüzey morfolojisi ve iç yapısı, taramalı elektron mikroskop (SEM) fotoğrafları ile incelenmiştir. AflaMIP-1-4 kompozitlerin SEM fotoğrafları Şekil 4.8'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi; kompozitler birbiriyle bağlantılı geniş akış kanallarına sahiptir. Gözeneklerin boyutları 300 μm 'ye kadar ulaşmaktadır. Bu akış kanalları, aflatoksin özütlerinin kolayca akışına, aflatoksinlerin AflaMIP kompozitlerin yüzeyine hızlı difüzyonuna ve spesifik boşluklara (moleküler baskılanmış bölgeler) adsorpsiyonuna olanak sağlamaktadır. AflaMIP kompozitlerin yapıları incelendiğinde (Şekil 4.8b-d); partiküllerin kompozitin yapısına başarıyla eklendiği görülmektedir. Ayrıca; partiküllerin yüzeyde veya yüzeye yakın bölgelerde olduğu görülmektedir. Bu durum; adsorpsiyon kapasitesini ve hızını arttırmaktadır.



Şekil 4.8. Kompozitlerin SEM görüntüleri. **(a)** AflaMIP-1, **(b)** AflaMIP-2, **(c)** AflaMIP-3, **(d)** AflaMIP-4.

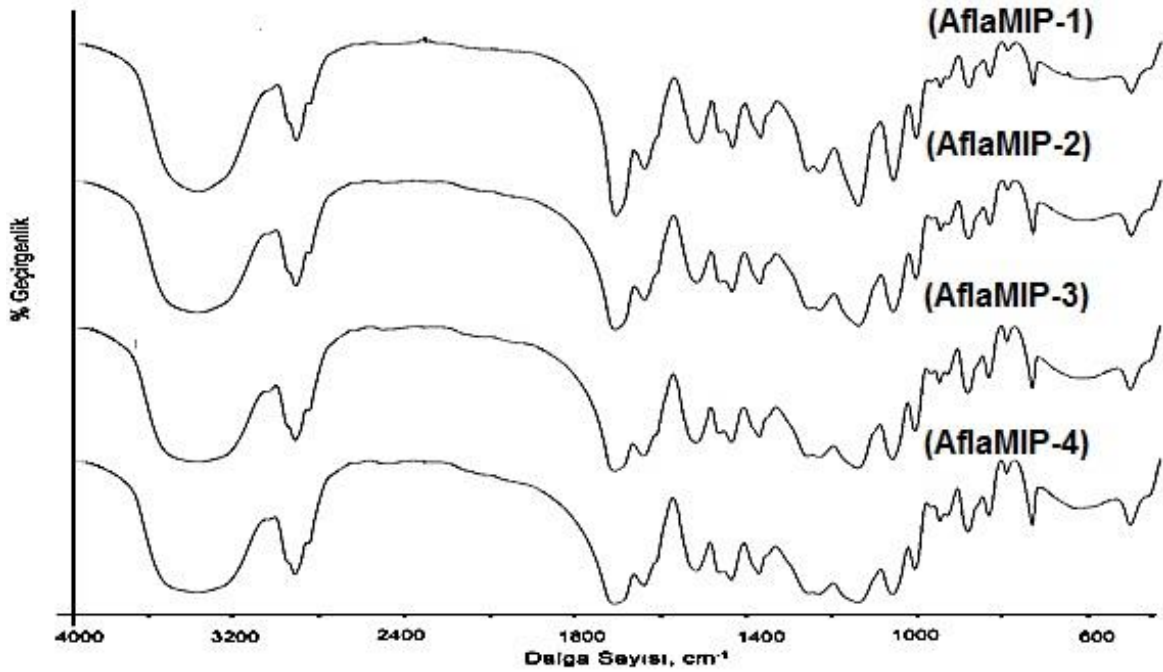


Şekil 4.8. (Devamı)

4.4.3. FTIR Analizi

AflaMIP kompozitlerin kimyasal yapı analizi için FTIR spektroskopisi yöntemi uygulanmıştır (Şekil 4.9). Şekil 4.9’de görüldüğü gibi; HEMA’nın yapısına ait; -OH bandı 3413 cm^{-1} civarında (geniş band), alifatik CH gerilme bandı 2952 cm^{-1} civarında, karbonil bandı 1727 cm^{-1} ’de görülmektedir (AflaMIP-1). AflaMIP-2’nin FTIR spektrumunda; aynı bandlar $\pm 3\text{ cm}^{-1}$ ’lik kaymalarla görülmektedir. Daha önce de belirtildiği gibi; bu kompozitler, boş poli(HEMA) partiküller bulunmaktadır. İki spektrum arasındaki temel fark; ilgili bandların farklı kimyasal çevrelerdeki aynı grupların varlığından kaynaklanan band genişlemeleri ve omuz oluşumlarıdır. AflaMIP-3 ve AflaMIP-4’ün FTIR spektrumları da birbirine benzemektedir. Bu durum; aynı miktarlarda kimyasal yapıları yakın olan partikülleri içermelerinden kaynaklanmaktadır. İlk iki spektrumdan farklı olarak; polimerik yapı içerisine giren aromatik gruplardan dolayı; $3000\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki aromatik CH gerilmeleri;

1522 cm^{-1} civarındaki amino asit temelli monomer (MATrp)'den kaynaklanan amit bandları; 1460 ve 1375 cm^{-1} civarındaki halka içi C-N gerilme bandları görülmektedir. Bu bandlar yapıya MATrp içeren polimerik partiküllerin (MIP ve NIP) başarıyla eklendiğini göstermektedir.



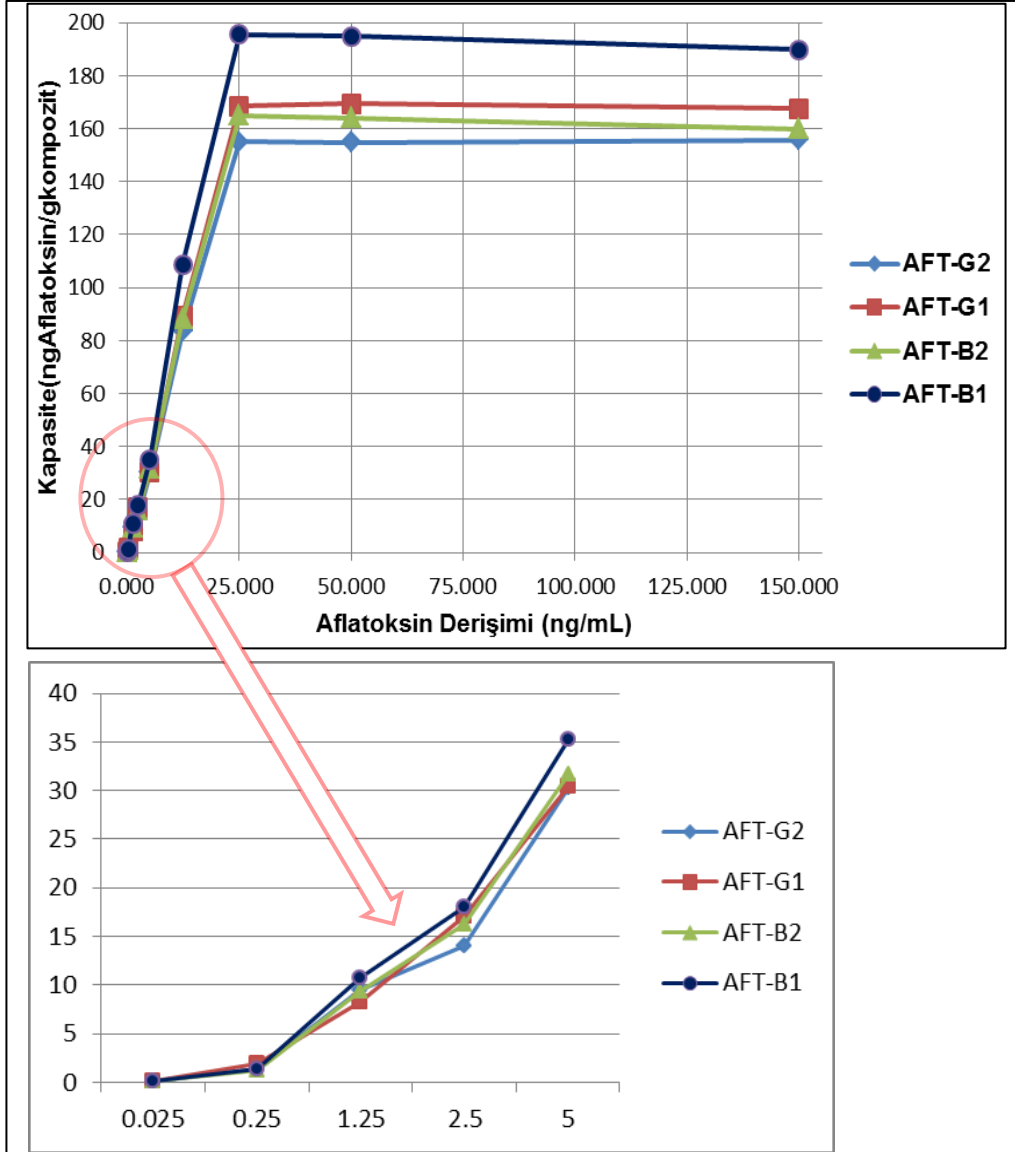
Şekil 4.9. Kompozitlerin FTIR spektrumları.

4.5. AflaMIP Kompozitlerin Adsorpsiyon Koşullarının Optimizasyonu

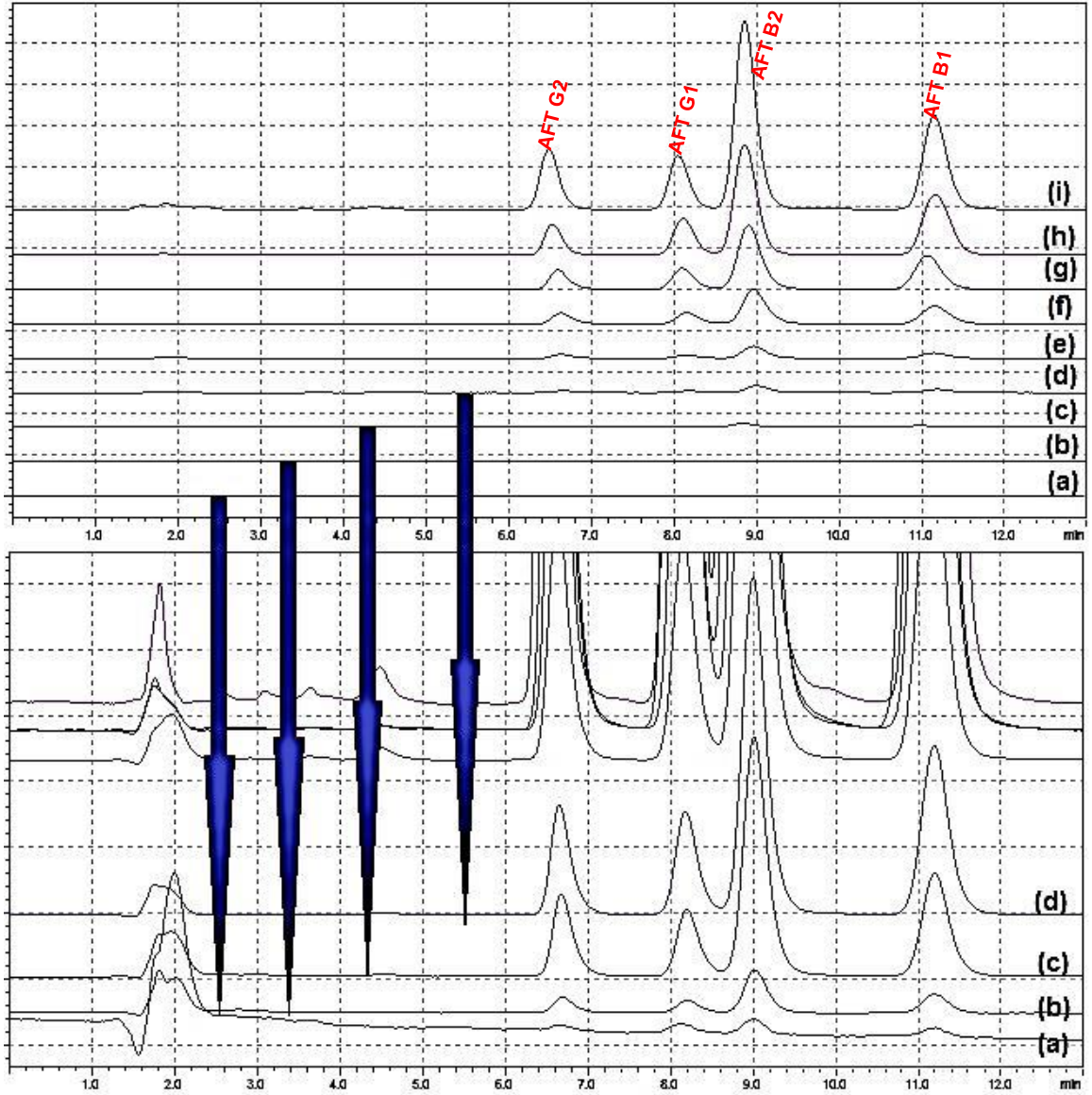
4.5.1. Aflatoksin Derişiminin Etkisi

Adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu kapsamında aflatoksin derişiminin etkisi incelenmiş ve yükleme çözeltilisindeki aflatoksin moleküllerinin miktarı 0.025-100 ng/mL aralığında değiştirilmiştir (Şekil 4.10). Şekilden 4.11'de görüldüğü gibi tüm aflatoksin türlerinin adsorpsiyon oranları oldukça yüksektir. Bu durum hazırlanan AflaMIP kompozitlerin adsorpsiyon kapasitesinin ve bağlanma eğiliminin (kat sayısının) oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Adsorpsiyon kapasitesi, başlangıçta hızlı bir şekilde artmaktadır. Grafikteki yüksek eğim, AflaMIP kompozit ile tüm aflatoksin moleküllerin yüksek afinite ile etkileştiğini göstermektedir. Bu eğilim, 25 ng/mL aflatoksin derişimine kadar devam etmektedir. Daha sonra artış hızı yavaşlayarak etkileşim bölgelerinin dolmasına bağlı olarak dengeye ulaşmaktadır. Kompozitin aflatoksin türlerine göre adsorpsiyon kapasiteleri sırasıyla aflatoksin B1 için 194.8 ng/g; aflatoksin B2 için 164.1 ng/g; aflatoksin G1

için 169.4 ng/g ve aflatoksin G2 için 154.9 ng/g olarak bulunmuştur. Burada iki önemli nokta vurgulanmalıdır: baskılama aşamasında kullanılan aflatoksin standart çözeltisi dört türden de eşit miktarda içermektedir. Bundan dolayı; tüm aflatoksin türlerine karşı yüksek afinite gözlenmektedir. İkinci konu ise elde edilen adsorpsiyon kapasiteleri birbirlerine oldukça yakındır. Bu durumda; baskılama işleminin seçici ve miktara bağımlı olarak gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 4.10. Adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu. Aflatoksin derişiminin etkisi.



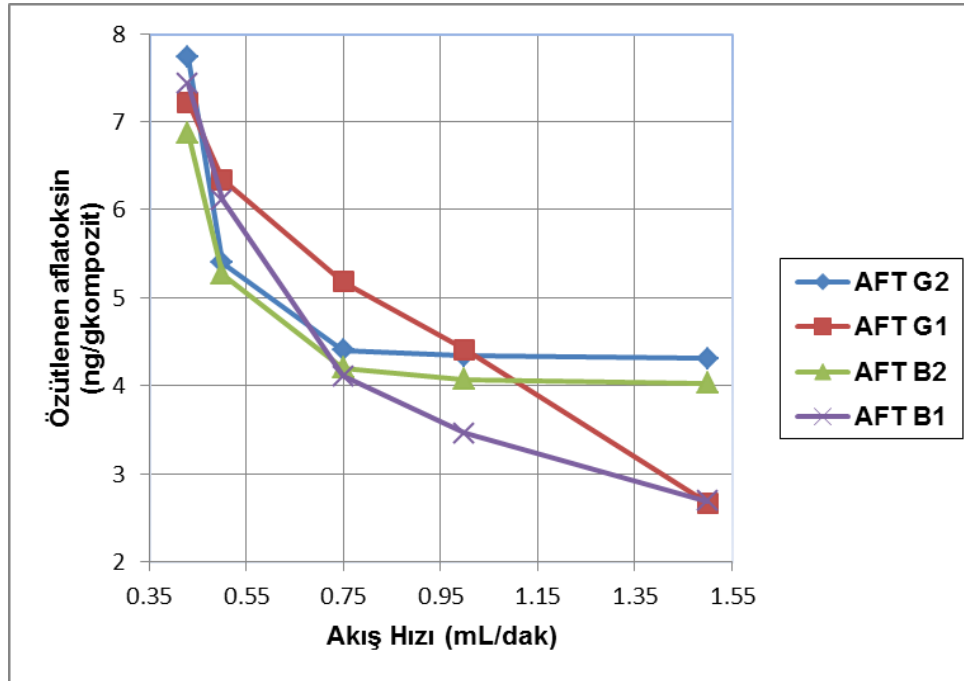
Şekil 4.11. Aflatoksin derişiminin etkisi: Elüat çözeltsi HPLC kromatogramları. (a) 0.1 ng/mL, (b) 1.0 ng/mL, (c) 5.0 ng/mL, (d) 10 ng/mL, (e) 20ng/mL, (f) 50 ng/mL, (g) 100 ng/mL, (h) 200 ng/mL, (i) 600 ng/mL (ilgili derişimler toplam aflatoksin derişimi olup tekil olarak aflatoksinlerin derişimi toplam derişimin dörtte birine eşittir.)

4.5.2. Akış Hızının Etkisi

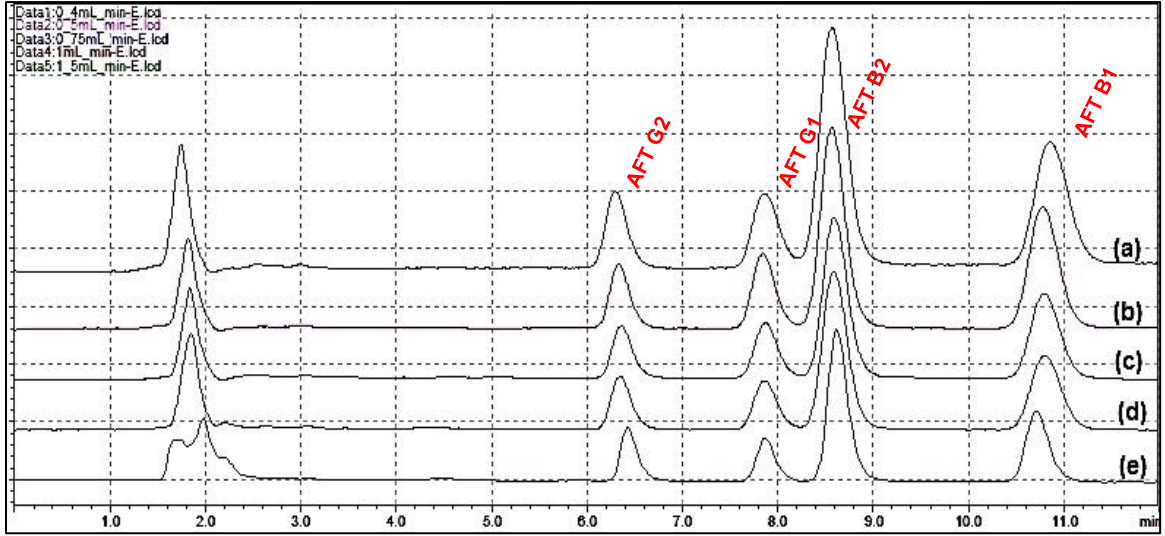
Adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu kapsamında aflatoksin yükleme çözeltsinin AflaMIP kompozit ile etkileştirilme hızı 0.43-1.50 mL/dak aralığında değiştirilmiştir. 0.43 mL/dak, çözeltiler yerçekimi etkisi ile kompozit ile etkileştirildiğinde elde edilen ortalama akış hızıdır. Akış hızının etki incelenirken aflatoksin derişimi tüm aflatoksin türlerinin derişimi 2.50 ng/mL olacak şekilde sabit tutulmuştur. Şekil 4.12 ve 4.13'de görüldüğü gibi adsorplanan aflatoksin oranı akış

hızının artması ile birlikte bir miktar azalmaktadır. AflaMIP kompozitin kapasitesindeki azalma miktarları sırasıyla aflatoksin B1 için 7.43 ng/g'dan 2.69 ng/g'a (% 36.2); aflatoksin B2 için 6.86 ng/g'dan 4.03 ng/g'a (% 41.2); aflatoksin G1 için 7.22 ng/g'dan 2.66 ng/g'a (% 63.2) ve aflatoksin G2 için 7.73 ng/g'dan 4.31 ng/g'a (% 44.2) olarak bulunmuştur.

Akış hızının artmasıyla birlikte kapasitedeki azalma iki farklı şekilde açıklanabilir. Akış hızının artması, aflatoksin moleküllerinin kompozit içerisinde alıkonma sürelerini kısaltmakta ve aflatoksin moleküllerinin için baskılanmış bölgelere difüzyonu ve seçici etkileşimi için gerekli olan yeterli süre oluşmamaktadır. Buna bağlı olarak kompozitin kapasitesi azalmaktadır. Bir diğer açıklama ise; artan akış hızı, ileri yönde difüzyonu arttırırken yanal difüzyon kısıtlanmaktadır. Buna bağlı olarak, kompozit içerisinde bulunan aktif baskılanmış bölgeler etkin olarak kullanılamamaktadır. Bu durum, kapasitenin azalması ile sonuçlanmaktadır. Bu sonuçların ışığı altında bundan sonraki çalışmalar, besleme çözeltisinin en düşük akış hızı değerinde (0.43 mL/dak) yürütülmüştür.



Şekil 4.12. Adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu. Akış hızının etkisi.

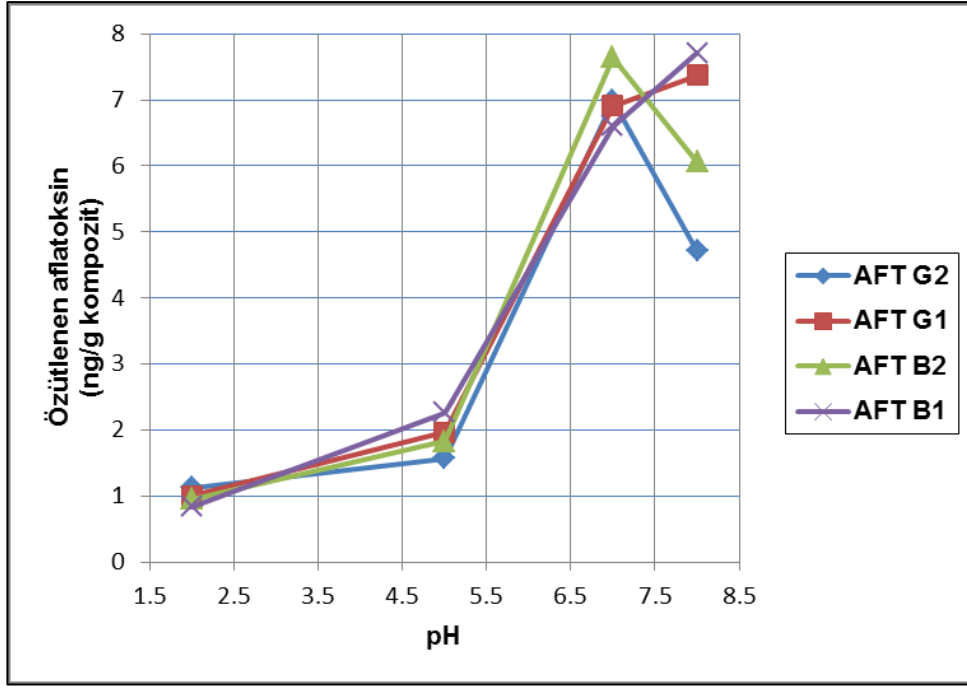


Şekil 4.13. Akış hızının etkisi: Adsorpsiyon çözeltisi derişimi: 10 ng/mL. Elüat çözeltisi HPLC kromatogramları. (a) 0.43 mL/dak, (b) 0.5 mL/dak, (c) 0.75 mL/dak, (d) 1.0 mL/dak, (e) 1.5 mL/dak

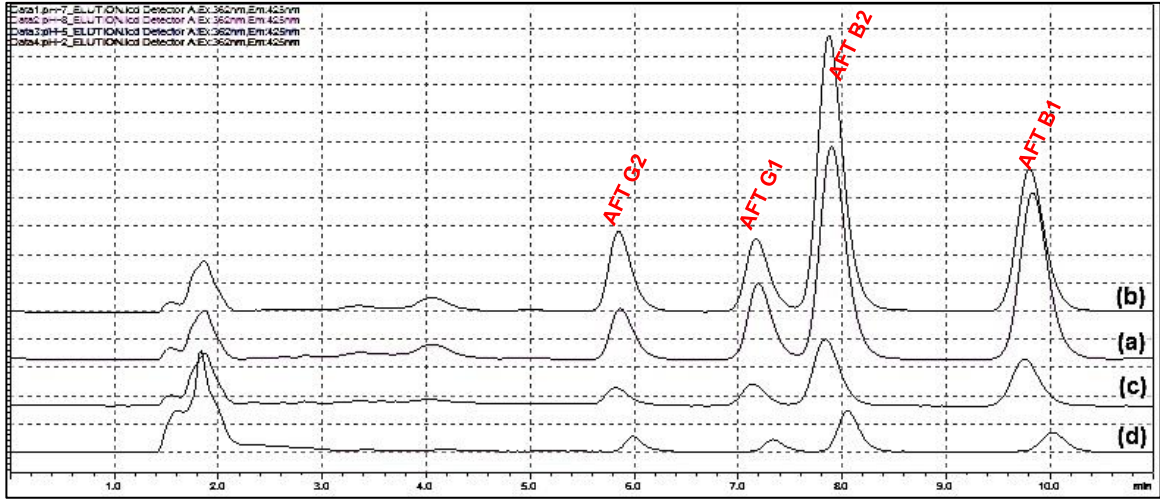
4.5.3. Yükleme Tamponunun pH Değerinin Etkisi

Adsorpsiyona yükleme tamponunun pH değerinin etkisini belirlemek amacıyla pH 2-8 (5 için asetat; 2 ve 6-8 için 100 mM fosfat tamponları kullanılmıştır) aralığında çalışılmıştır. Şekil 4.14 ve 4.15'de görüldüğü gibi aflatoksin moleküllerinin kompozite adsorpsiyon oranları pH değişimi ile birlikte önemli miktarda değişmektedir. Artan pH değerleriyle birlikte kompozitin kapasitesi artmakta ve pH 7.0 değerinde maksimum kapasiteye ulaşılmaktadır (Aflatoksin B1 için; 6.60 ng/g, Aflatoksin B2 için; 7.65 ng/g, Aflatoksin G1 için; 6.91 ng/g, Aflatoksin G2 için; 6.99 ng/g). Artan pH değerlerinde, aflatoksin B1 ve G1 için adsorpsiyon kapasitesi artarken; aflatoksin B2 ve G2 türlerinde azalma yönünde eğilim görülmektedir. Aflatoksin B1 ve G1 için kapasite, sırasıyla % 14.3 ve % 5.77 oranlarında artarken (sırasıyla pH: 7 ve pH: 8) ; aflatoksin B2 ve G2 için adsorpsiyon değerleri sırasıyla düşmektedir (aflatoksin B2 için % 20.3 ve aflatoksin G2 için % 32.6) bu nedenle daha sonraki çalışmalarda pH değeri optimum pH 7.0 olarak belirlenmiş ve uygulanmıştır. Yükleme çözeltisinin pH değerine bağlı olarak gözlenen değişimler,

B türü ve G türü aflatoksinlerin siklopentan ve sikloheksan yapılarına ve iyonlaşan yan gruplarının asitlik değerleriyle açıklanabilir.



Şekil 4.14. Adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu. pH değerinin etkisi°.

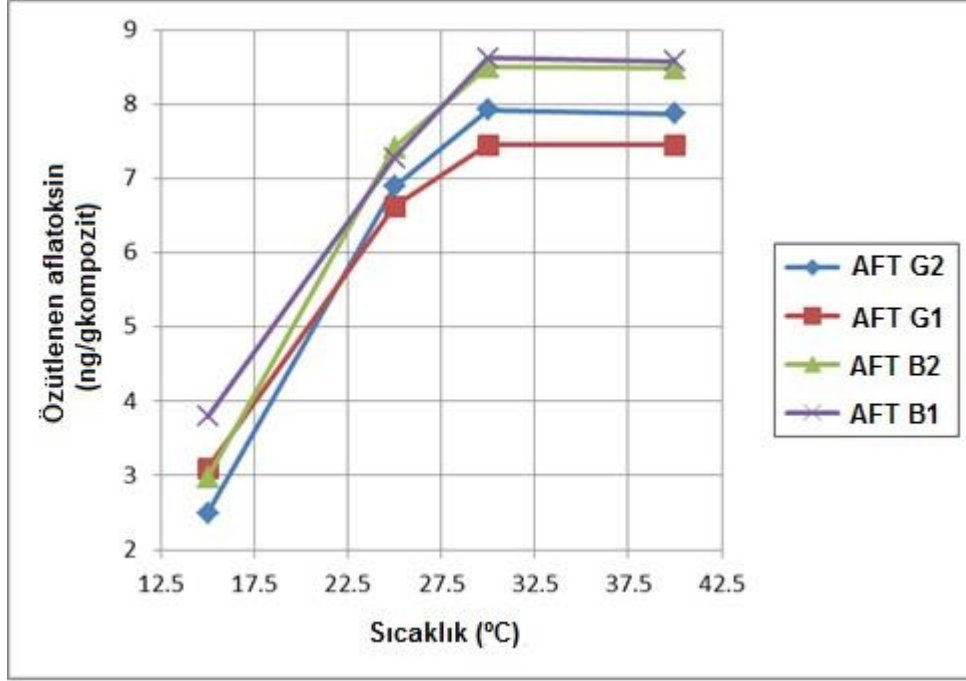


Şekil 4.15. Yükleme tamponunun pH değerinin etkisi: Adsorpsiyon çözeltisi derişimi: 10 ng/mL. Elüat çözeltisi HPLC kromatogramları. (a) pH: 2.0, (b) pH: 5.0, (c) pH: 7.0, (d) pH: 8.0

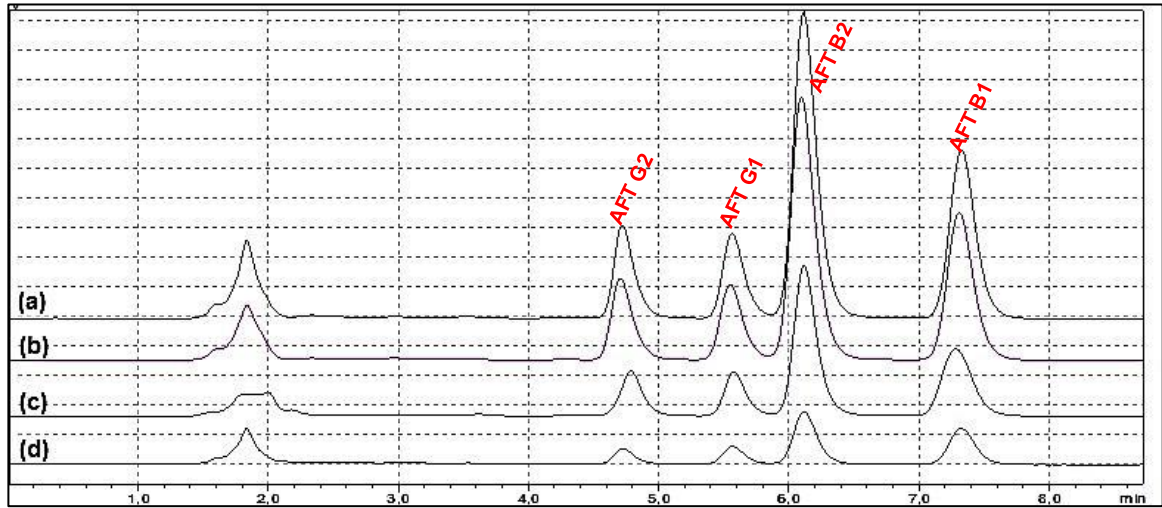
4.5.4. Sıcaklığın Etkisi

Adsorpsiyona sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla ortam sıcaklığı 15°C-40°C aralığında değiştirilmiştir. Şekil 4.16 ve 4.17'de görüldüğü gibi artan sıcaklıkla birlikte AflaMIP kompozitin adsorpsiyon kapasitesi önemli miktarda artmaktadır. Sıcaklık değerinin 15°C'dan 40°C'a artmasına bağlı olarak kompozitin kapasitesindeki artış miktarları sırasıyla aflatoxin B1 için 3.79 ng/g'dan 8.57 ng/g

(% 226.1); aflatoxin B2 için 2.97 ng/g'dan 8.48 ng/g'a (% 285.5); aflatoxin G1 için 3.10 ng/g'dan 7.45 ng/g'a (% 240.3) ve aflatoxin G2 için 2.49 ng/g'dan 7.87 ng/g'a (% 316.1) olarak bulunmuştur.



Şekil 4.16. Adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu. Sıcaklığının etkisi.



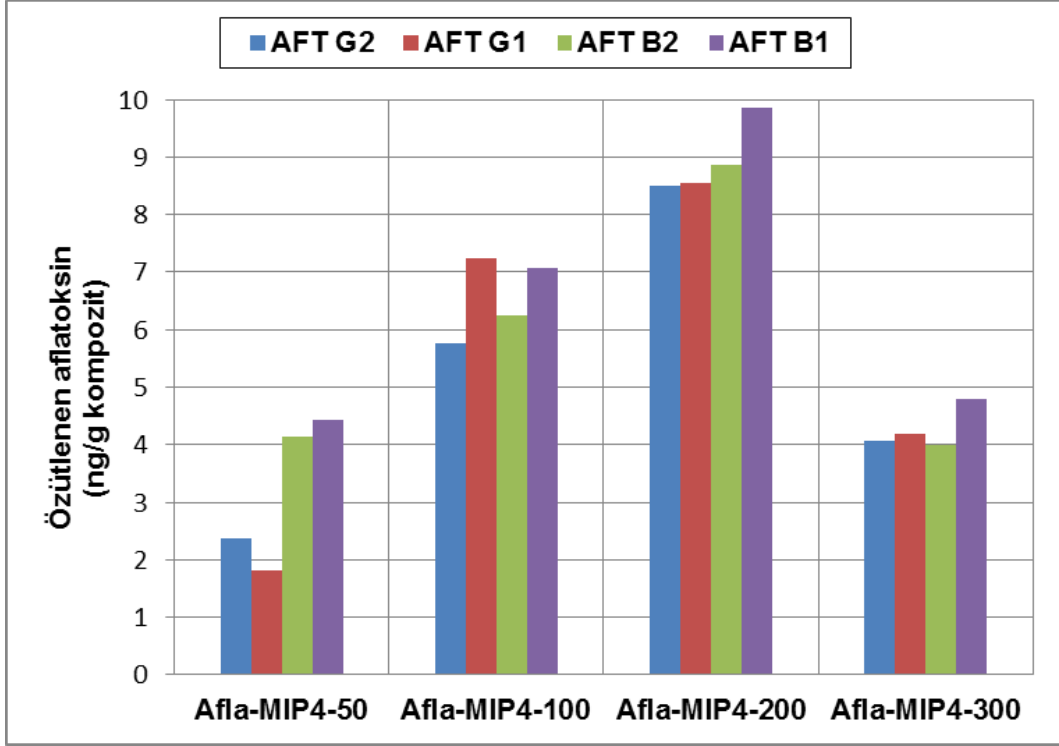
Şekil 4.17. Sıcaklığın etkisi: Adsorpsiyon çözeltisi derişimi: 10 ng/mL. Elüat çözeltisi HPLC kromatogramları. (a) T: 15°C, (b) T: 25°C, (c) T: 30°C, (d) T: 40°C

AflaMIP kompozitin kapasitesindeki artış eğilimi, kullanılan fonksiyonel monomerin ve monomer/aflatoxin arasındaki etkileşimlerin türüne bağlıdır. Bölüm 3.2.1'de verildiği gibi kullanılan fonksiyonel monomer, hidrofobik bir amino asit olan triptofandan yola çıkılarak sentezlenmiştir. Fonksiyonel monomer olarak triptofanın

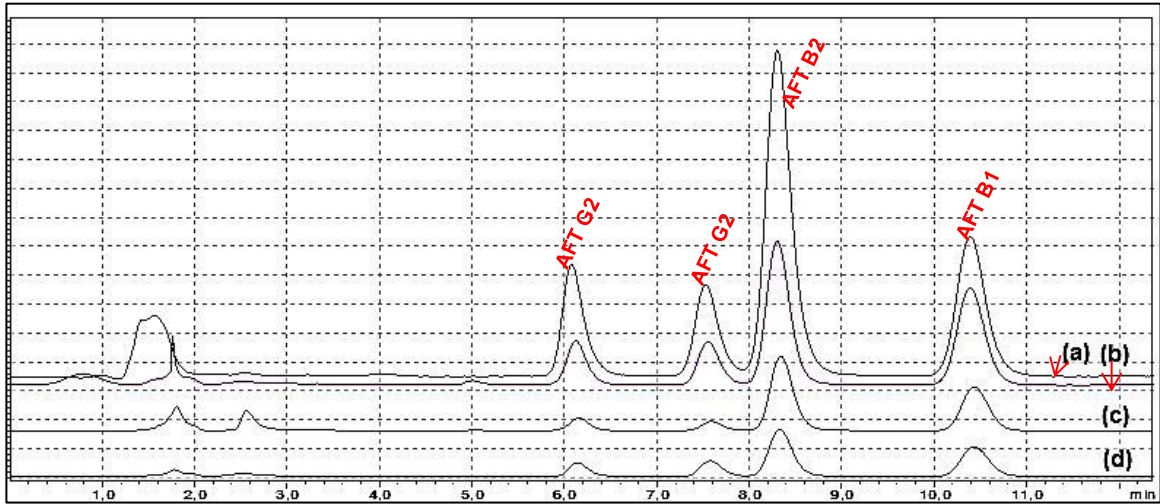
seçilmesinin sebebi de baskılanmak istenilen aflatoksin türlerinin hidrofobik özellikleridir. Bu bağlamda; kompleks oluşumu ve aflatoksin moleküllerin kararlı bir şekilde baskılanmasında en etkin etkileşimler hidrofobik etkileşimlerdir. Hidrofobik etkileşimler, entropi artışıyla yürüyen etkileşimdir ki; sıcaklık artışı bu etkileşimleri artırma yönünde etkilemektedir. Elde edilen sonuçlarda bu önveriyi doğrulamakta ve artan sıcaklıkla kompozitin kapasitesi önemli miktarda artmaktadır. Sıcaklık artışı triptofanın amino asidinin yapısında bulunan indol halkası ile aflatoksinlerin yapısında bulunan siklopentan ve sikloheksan grupları arasındaki etkileşimleri kuvvetlendirmekte ve daha yüksek adsorpsiyon kapasitelerine ulaşılmasını sağlamaktadır. Ancak işlem kolaylığı göz önüne alınarak diğer parametrelerin incelenmesi oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

4.5.5. AflaMIP Kompozitin İçerdiği Baskılanmış Partikül Miktarının Etkisi

AflaMIP kompozitin hazırlanması esnasında yapıya eklenen moleküler baskılanmış partiküllerin miktar optimizasyonu için farklı miktarda partikül içeren (50-300 mg) AflaMIP kompozitler hazırlanmış ve adsorpsiyon deneylerinde kullanılmıştır. Şekil 4.18 ve 4.19'da görüldüğü gibi hazırlanan tüm AflaMIP kompozitlerde benzer aflatoksin adsorpsiyon eğilimleri görülmektedir. En uygun miktarın belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda özellikle 200 mg partikül içeren AflaMIP kompozitin (AflaMIP-4) tüm aflatoksinlere karşı en seçici kompozit olduğu belirlenmiştir. Burada şu not edilmelidir ki; en düşük miktarda partikül içeren AflaMIP kompozitler bile izin verilen sınırlardaki aflatoksinlerin özütlenmesi için yeterli kapasite özelliklerine sahiptir. Bu durum seçicilik ve adsorpsiyon kapasitesi bağlamında başarılı bir özütleme sisteminin hazırlandığını göstermektedir.



Şekil 4.18. Adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu. Yapıdaki partikül miktarının etkisi.



Şekil 4.19. AflaMIP kompozitinin içerdiği partikül miktarının etkisi: Adsorpsiyon çözeltisi derişimi: 10 ng/mL. Elüat çözeltisi HPLC kromatogramları. (a) 50 mg MIP partikül, (b) 100 mg MIP partikül, (c) 200 mg MIP partikül, (d) 300 mg MIP partikül.

4.6. Seçicilik Deneyleri

Aflatoksin baskılanmış kompozitinin (AflaMIP-4) ve aflatoksin baskılanmamış kompozitinin (AflaMIP-3) etkinlikleri, aflatoksinlerin (AFT G2, AFT G1, AFT B2 ve

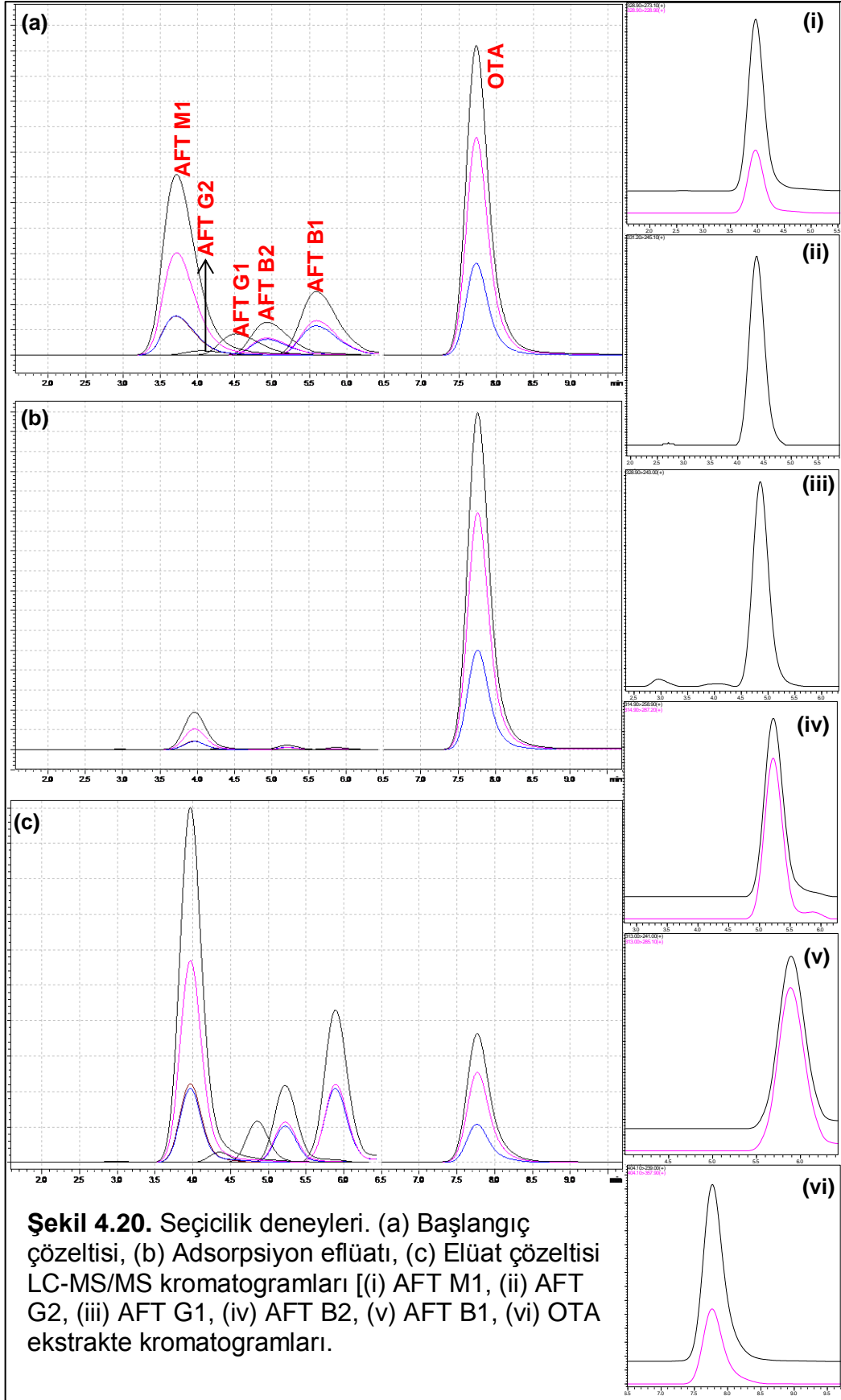
AFT B1) yanısıra OTA ve AFT M1 içeren standard karışımı ile gerçekleştirilen adsorpsiyon çalışmaları ile test edilmiş ve elde edilen veriler kullanılarak K_d , k ve k' sabitleri, Bölüm 3.2.6'da verilen eşitlikler aracılığıyla hesaplanmıştır. Daha önce de bahsedildiği gibi K_d , ilgili analite ait dağılım sabiti, k , seçicilik sabiti, k' ise bağlı seçicilik sabitidir. Çalışmaya ait sonuçlar, Çizelge 4.2'de özetlenmiştir.

AflaMIP kompozitlerin seçiciliğinin belirlenmesi için 4 farklı özellikte AflaMIP kompozit hazırlanmıştır. [AflaMIP-1: Boş poli(HEMA) kriyojel; AflaMIP-2: BOŞ poli(HEMA) partikül içeren kompozit kriyojel; AflaMIP-3: NIP kompozit kriyojel; AflaMIP-4: MIP kompozit kriyojel] hazırlanmış ve özütleme çalışmalarında kullanılmıştır. Şekil 4.20 ve 4.21'de görüldüğü gibi boş poli(HEMA) kriyojelin (AflaMIP-1) seçici olmayan aflatoksin adsorpsiyon kapasiteleri oldukça düşüktür. Poli(HEMA) partikülleri içeren AflaMIP kompozitin (AflaMIP-2) kapasite değeri ise; AflaMIP-1'e göre biraz artmış olmasına rağmen AflaMIP-4'e göre oldukça düşüktür. NIP kompozit kriyojelin (AflaMIP-3) kapasite değeri; diğer iki kompozite göre önemli miktarda artmaktadır. Bu durum AflaMIP-3'ün yapısında bulunan partiküllerin de fonksiyonel monomer (MATrp) içermesinden kaynaklanmaktadır. Fonksiyonel monomer, aflatoksin molekülleriyle hidrofobik etkileşimlere girmekte ve bir miktar aflatoksini tutmaktadır. Ancak; sadece MIP kompozit kriyojel (AflaMIP-4), seçici olarak aflatoksinleri adsorplayabileceği baskılanmış bölgelere sahiptir. Bundan dolayı, yüksek miktarda aflatoksin adsorplamaktadır.

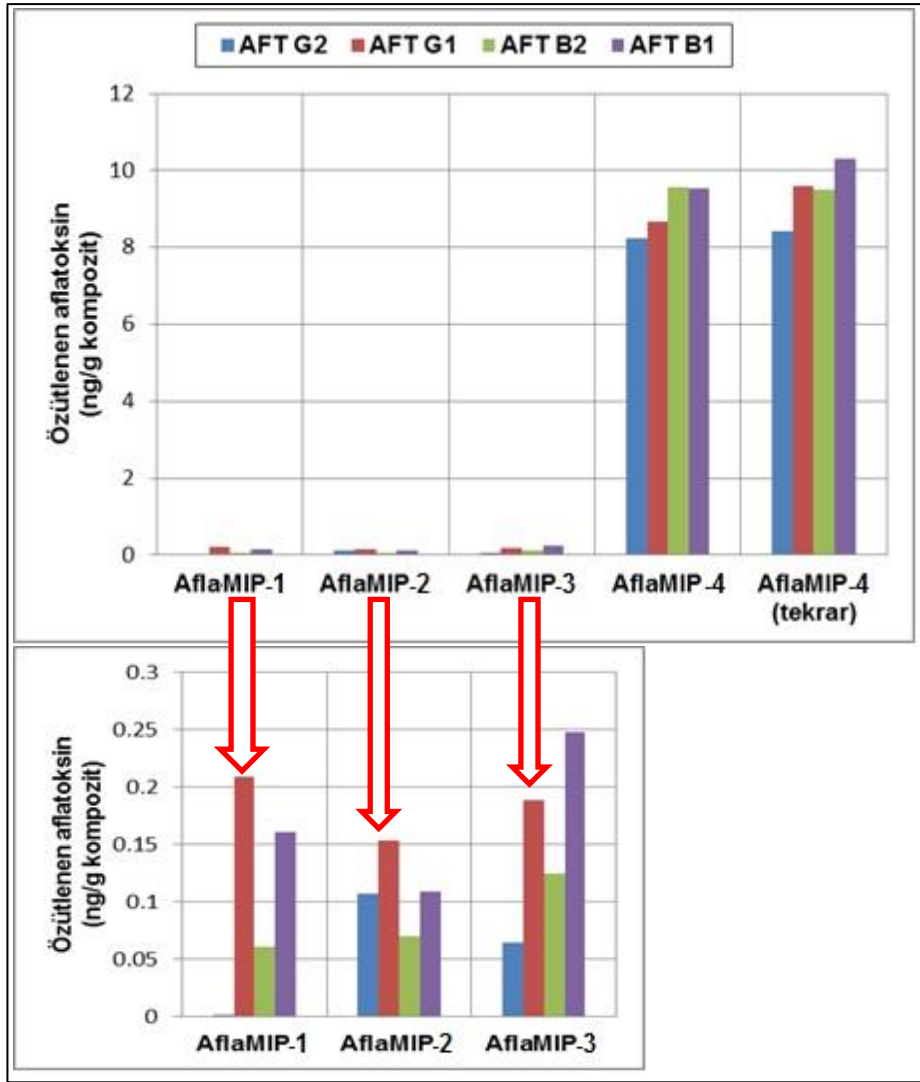
Çizelge 4.2. Aflatoksin baskılanmış ve baskılanmamış kompozitlere ait seçicilik sabitleri.

	Kd	k (AFT X/M1)*	k (AFT X/OTA)*	
AflaMIP-3	6.76	0.25	0.61	AFT G2
	7.81	0.29	0.70	AFT G1
	3.95	0.15	0.35	AFT B2
	5.06	0.19	0.45	AFT B1
	27.22	---	---	AFT M1
	11.12	---	---	OTA
AflaMIP-4	37.38	0.49	7.08	AFT G2
	139.28	1.84	26.38	AFT G1
	35.96	0.48	6.81	AFT B2
	139.32	1.84	26.39	AFT B1
	75.68	---	---	AFT M1
	5.28	---	---	OTA
k'	---	1.99	11.65	AFT G2
	---	6.41	37.57	AFT G1
	---	3.28	19.19	AFT B2
	---	9.90	58.01	AFT B1

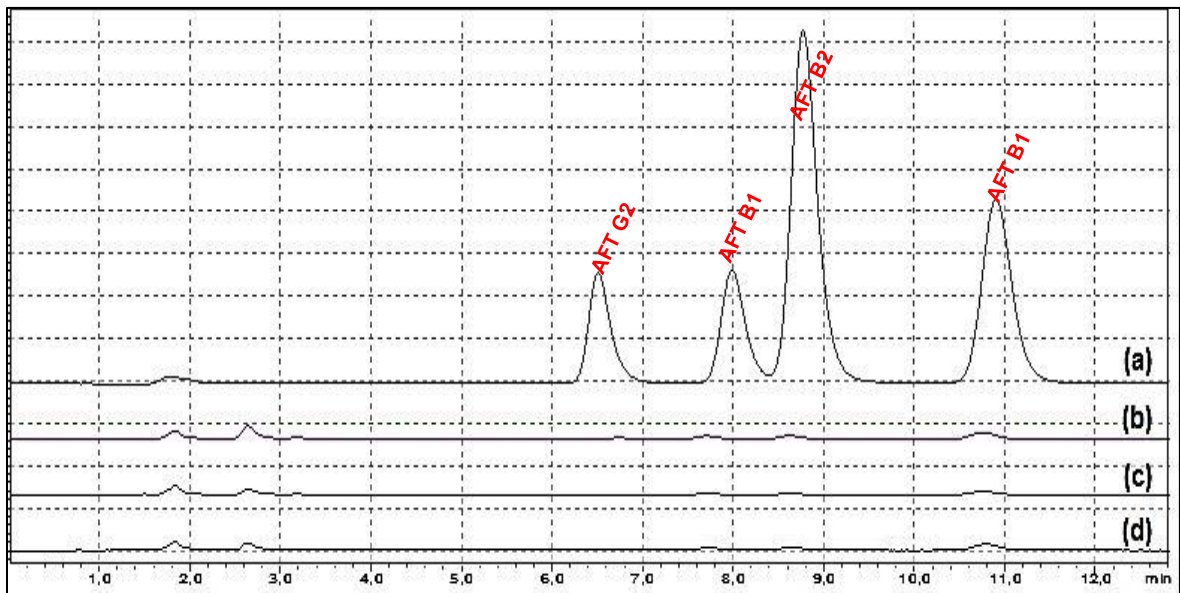
*AFT X: AFT G2, AFT G1, AFT B2, AFT B1



Şekil 4.20. Seçicilik deneyleri. (a) Başlangıç çözeltisi, (b) Adsorpsiyon eflüatı, (c) Elüat çözeltisi LC-MS/MS kromatogramları [(i) AFT M1, (ii) AFT G2, (iii) AFT G1, (iv) AFT B2, (v) AFT B1, (vi) OTA ekstrakte kromatogramları.



Şekil 4.21. Seçicilik deneyleri.

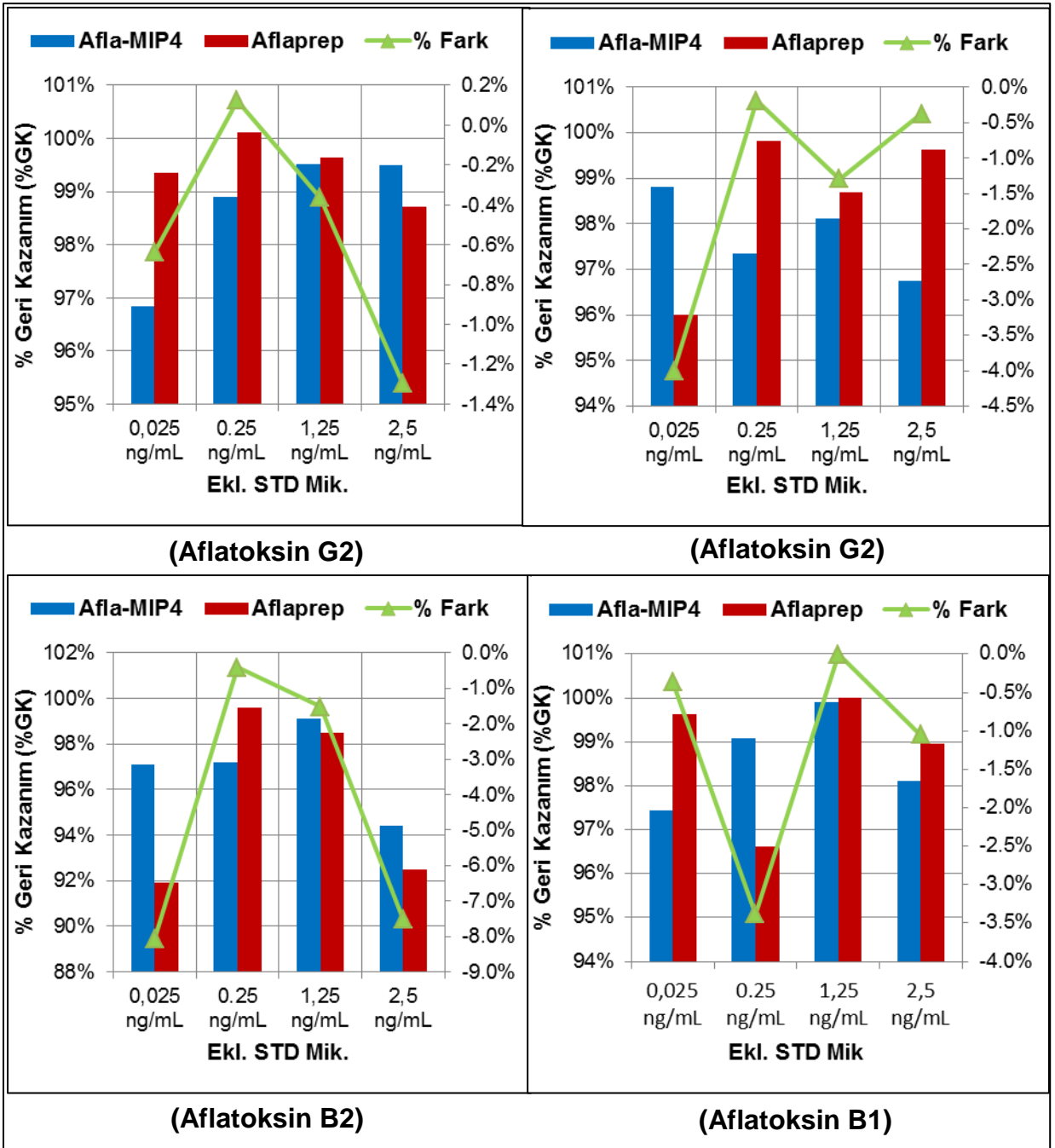


Şekil 4.22. Seçicilik deneyleri: Adsorpsiyon çözeltisi derişimi: 10 ng/mL. Elüat çözeltisi HPLC kromatogramları. (a) AflaMIP-4, (b) AflaMIP-3, (c) AflaMIP-2, (d) AflaMIP-1.

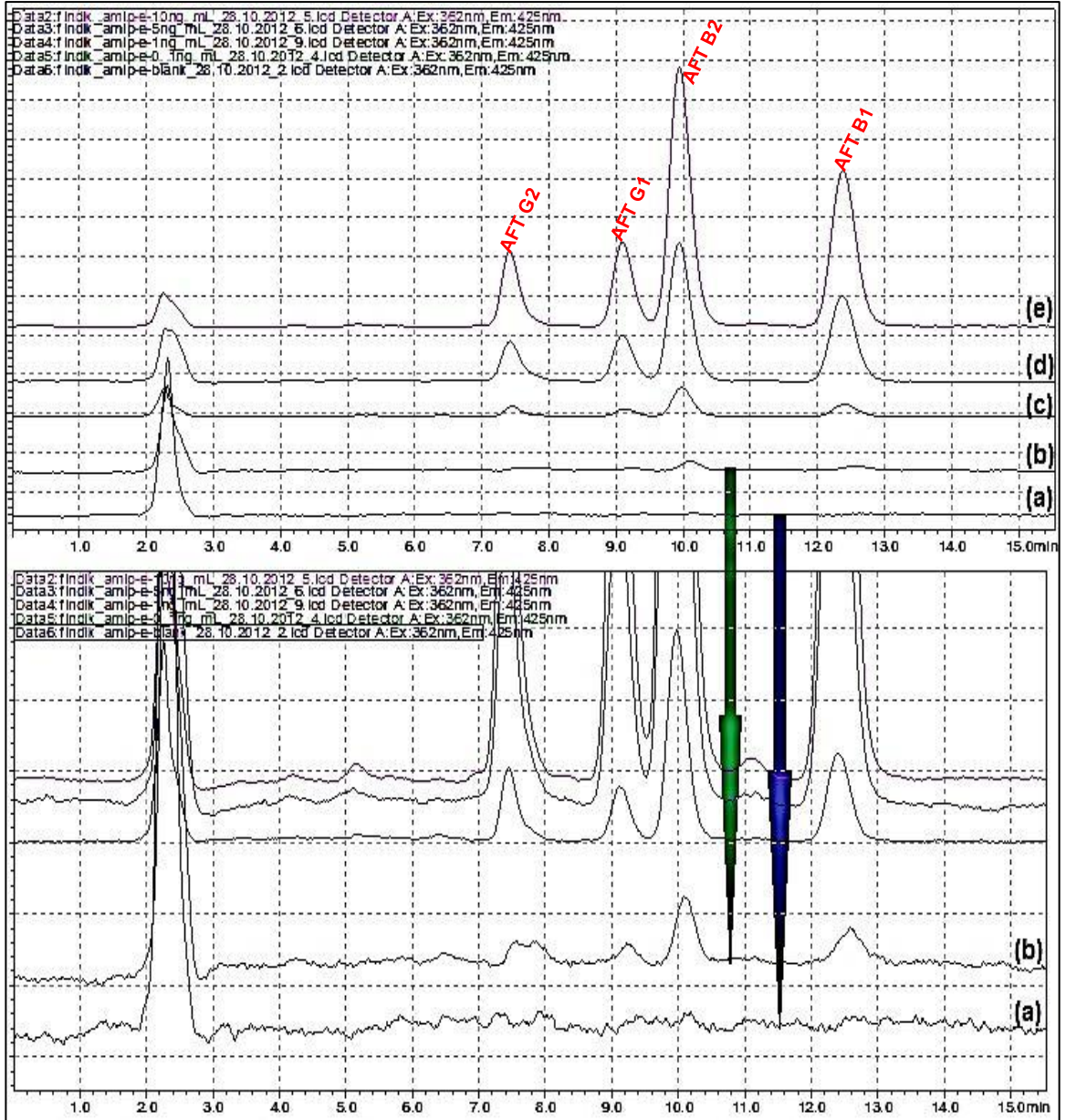
Yukarıda bahsedilen ve moleküler baskılamaya özgün olmayan etkileşimlerin önüne geçmek için, adsorpsiyon işlemi ardından, örneklerin elüsyonu önüne kompozitleri yıkama basamağı eklenmiş ve yıkama çözeltisinin derişimi optimize edilmiştir. Elüsyon çözeltisi olarak asetonitril kullanıldığından yıkama çözeltisi olarak da üç farklı derişimde (% 10, % 20 ve % 40) asetonitril:su karışımı denenmiş, yıkama sonrasındaki eflüat ve elüsyon sonrası elüat çözeltileri HPLC aracılığı ile analiz edilmiş ve sonuç olarak yüzde yirmilik asetonitril:su karışımı seçilmiştir.

4.7. Gerçek Örneklerden Aflatoksin Özütlenmesi

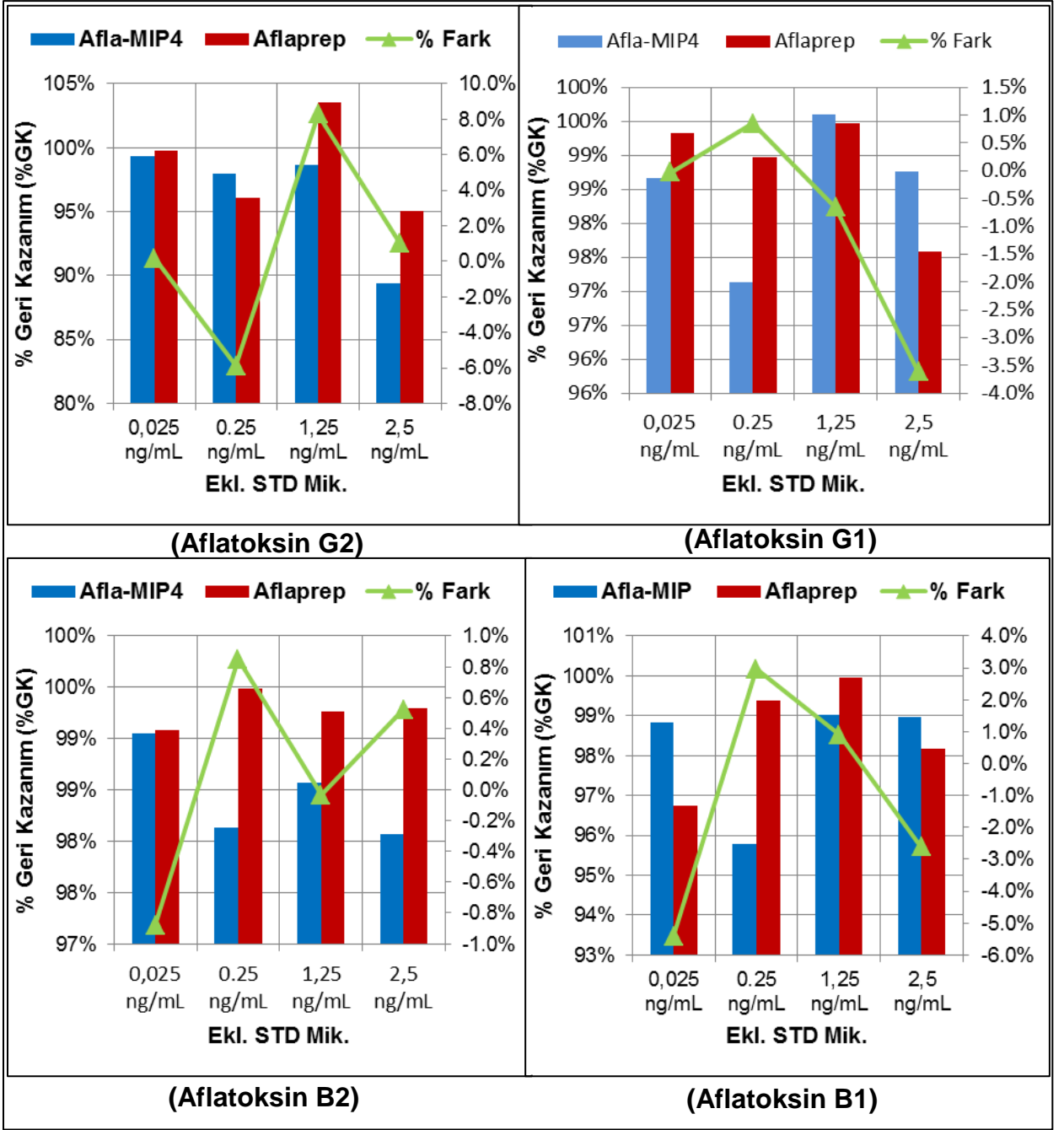
Gerçek örneklerden aflatoksin özütleme çalışmaları dört farklı numune (fındık, fıstık, kuru incir ve pul biber) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Farklı derişimlerde aflatoksin standartları eklenen örnekler hem AflaMIP-4 hem de standart özütleme (AlfaPrep) kolonları kullanılarak çelişilmiştir. Farklı derişimlerde (0.1 mg/mL, 1.0 mg/mL, 5.0 mg/mL, 10.0 mg/mL) aflatoksin eklenerek oluşturulan örnekler için elde edilen sonuçlardan(Kromatogramlar: Şekil 4.23, 4.25, 4.27 ve 4.29), herbir aflatoksin için yüzde geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. AflaMIP-4 ve Aflaprep® arasındaki geri kazanım farkları ilgili grafiklere ikincil eksen olarak eklenmiştir (Şekil 4.22, 4.24, 4.26 ve 4.28) Sonuçlar, ayrıca Çizelge 4.4'de özetlenmiştir. İlgili sonuçlardan da görüleceği üzere; AflaMIP-4 ve Aflaprep® kullanılarak elde edilen sonuçlar benzer özellik göstermektedir. AflaMIP-4 ile Aflaprep® arasındaki paralellik, hazırlanan kompozitlerin mevcut ticari kolonlara potansiyel alternatif olabileceğini göstermektedir. Burada vurgulanması gereken en önemli nokta; birçok analizde aynı AflaMIP-4 kolonun kullanılmasıdır. Bilindiği gibi; ticari Aflaprep® kolonlar tek kullanımlık olup maliyeti yüksek malzemelerdir. Bu özelliği ile hazırlanan kompozitler, düşük maliyet ve tekrar kullanılabilirlik gibi avantajlara sahiptirler. Analizler arasındaki farklar ise oldukça düşük olup uygun adsorpsiyon ve elüsyon çözeltilerinin ayarlanması ile çözülebilecek düzeydedir.



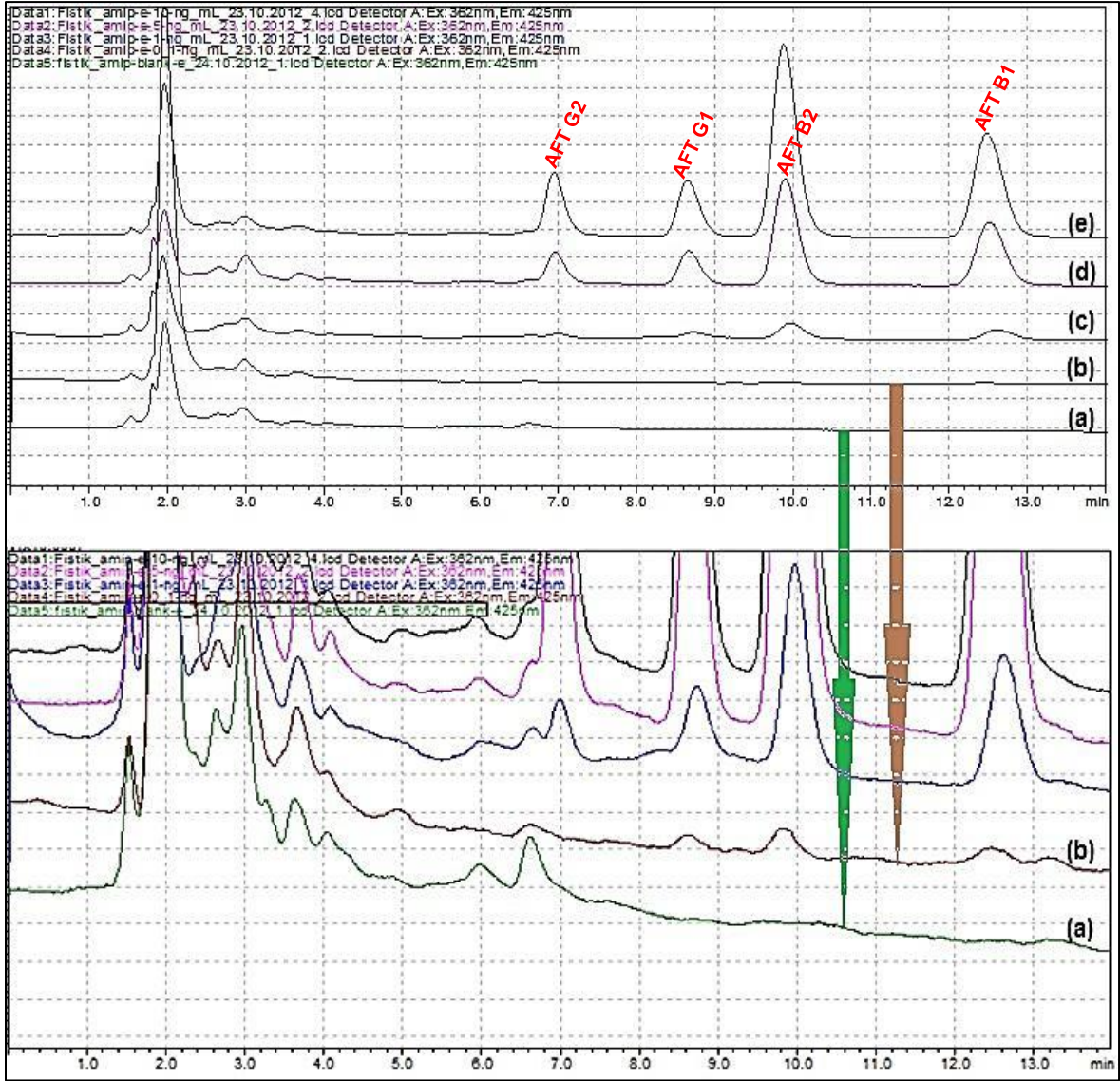
Şekil 4.23. Gerçek örnekten aflatoksin özütlenmesi. AflaMIP-4 ve Aflaprep® kolonları geri kazanımlarının karşılaştırılması. Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş fındık numunesi; örnek kütlesi: 50 g; homojenizasyon çözeltisi: 500 mL metanol:su (30:70, v/v); kolona uygulanan örnek hacmi: 10 mL.



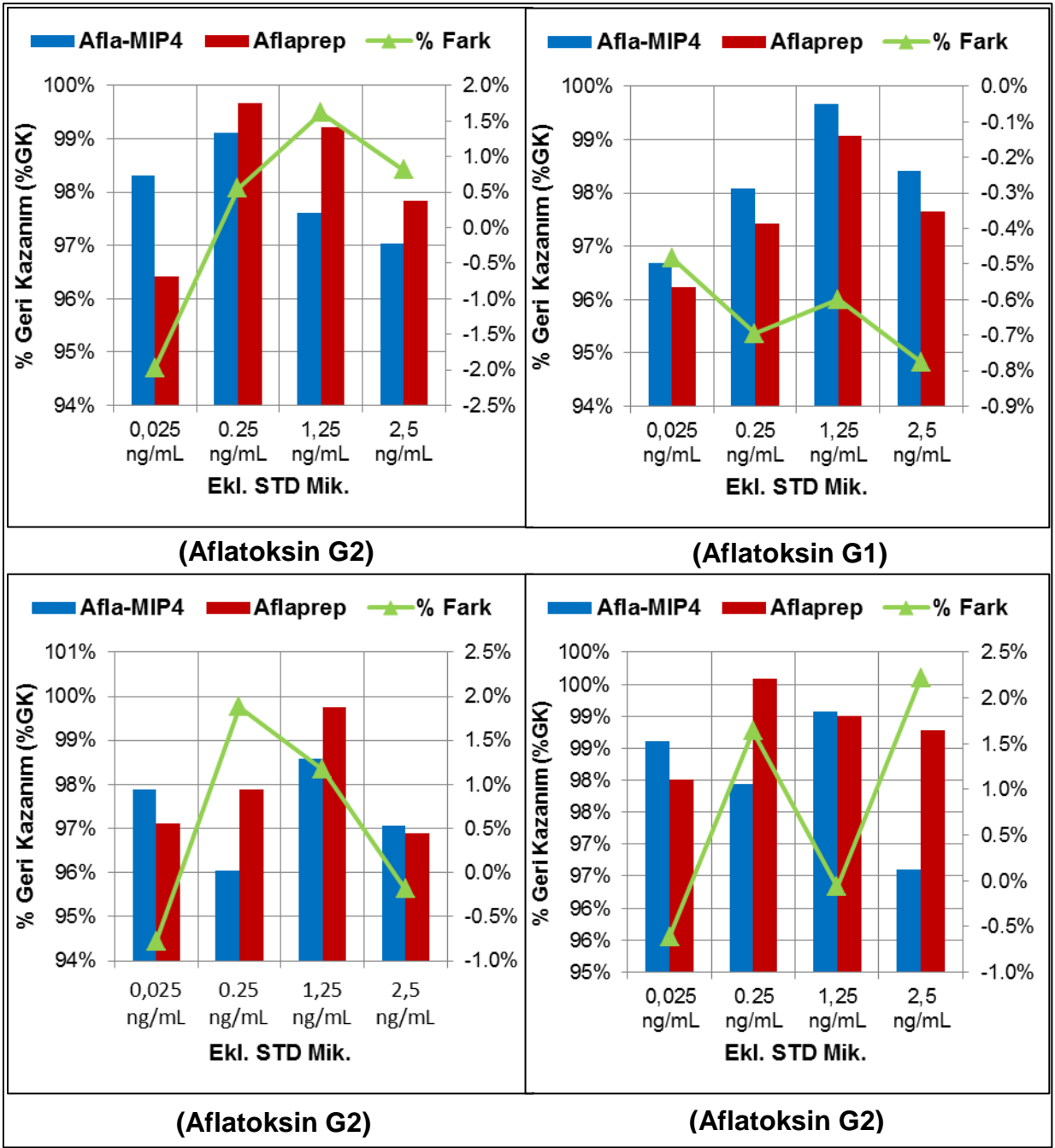
Şekil 4.24. Gerçek örneklerden aflatoksin özütlenmesi: AflaMIP-4 kompozit kriyojel. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş fındık numunesi. Elüat çözeltisi HPLC kromatogramları; (a) Aflatoksin içermeyen numune, (b) 0.1 ng/mL, (c) 1.0 ng/mL, (d) 5.0 ng/mL, (e) 10 ng/mL



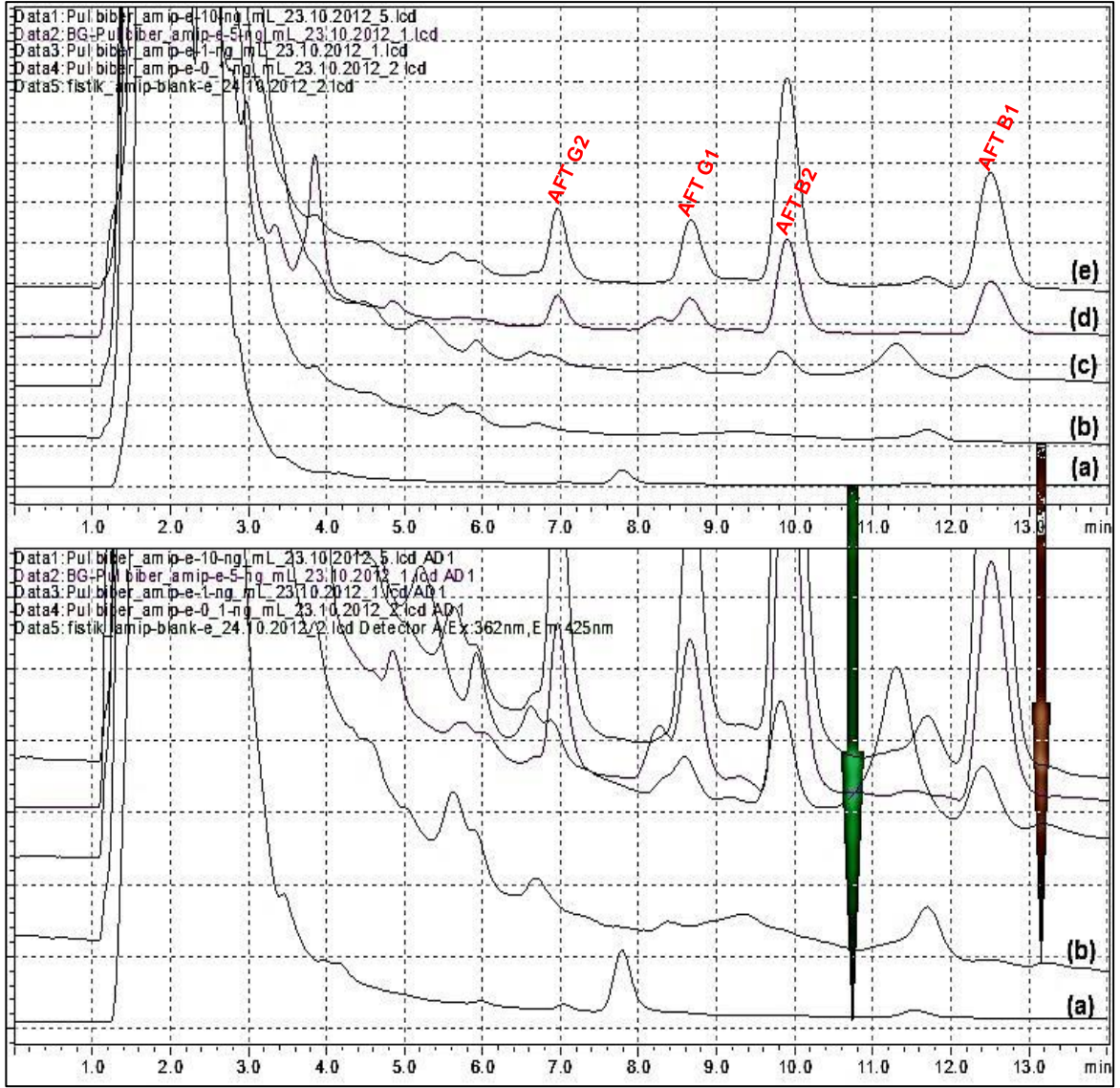
Şekil 4.25. Gerçek örnekten aflatoksin özütlenmesi. AflaMIP-4 ve Aflaprep® kolonları geri kazanımlarının karşılaştırılması. Örnek: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş fıstık numunesi; örnek kütlesi: 50 g; homojenizasyon çözeltisi: 500 mL metanol:su (30:70, v/v); kolona uygulanan örnek hacmi: 10 mL.



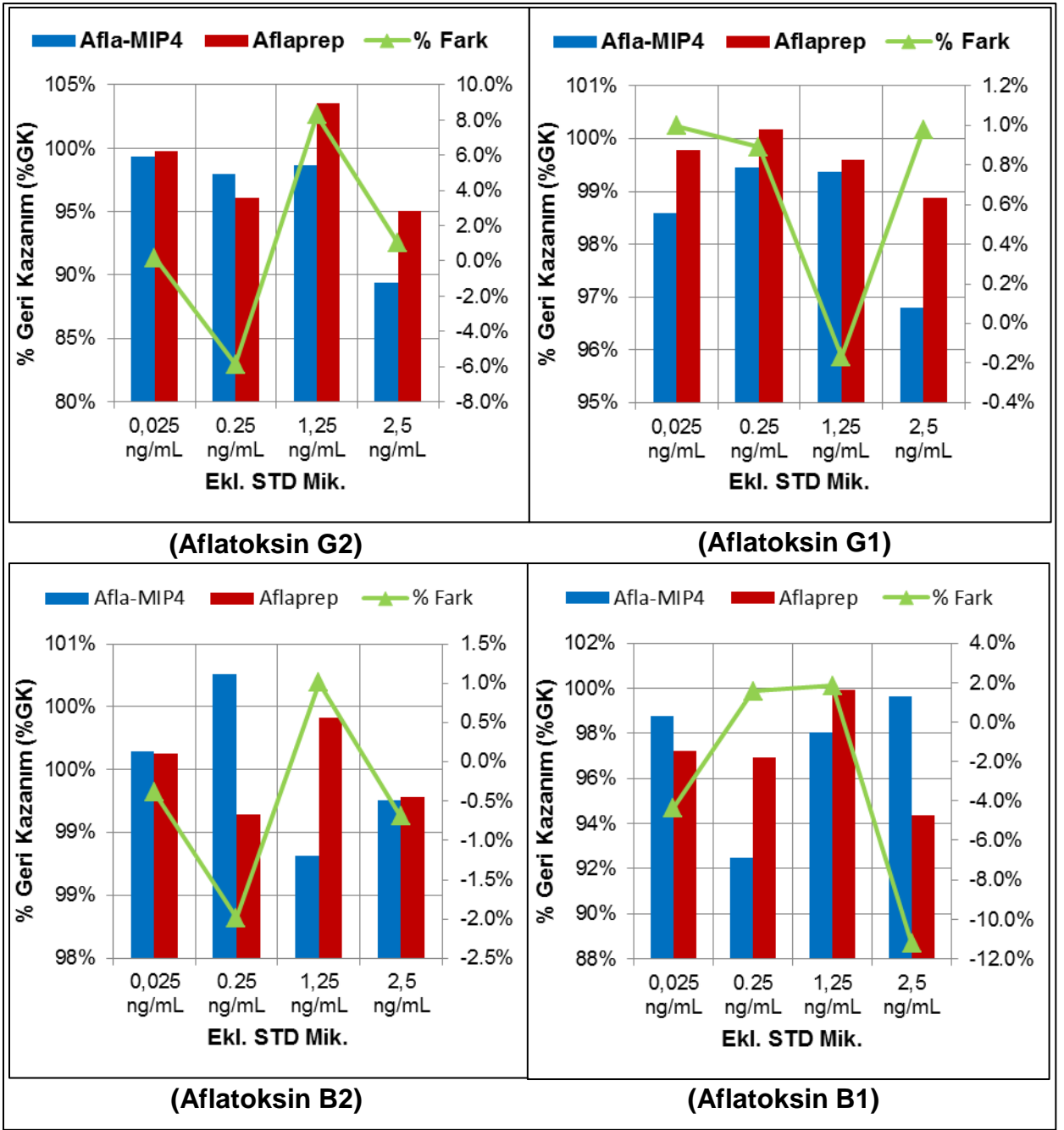
Şekil 4.26. Gerçek örneklerden aflatoksin özütlenmesi. AflaMIP-4 kompozit kriyojel. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş fıstık numunesi. Elüat çözeltisi HPLC kromatogramları; (a) Aflatoksin içermeyen numune, (b) 0.1 ng/mL, (c) 1.0 ng/mL, (d) 5.0 ng/mL, (e) 10 ng/mL



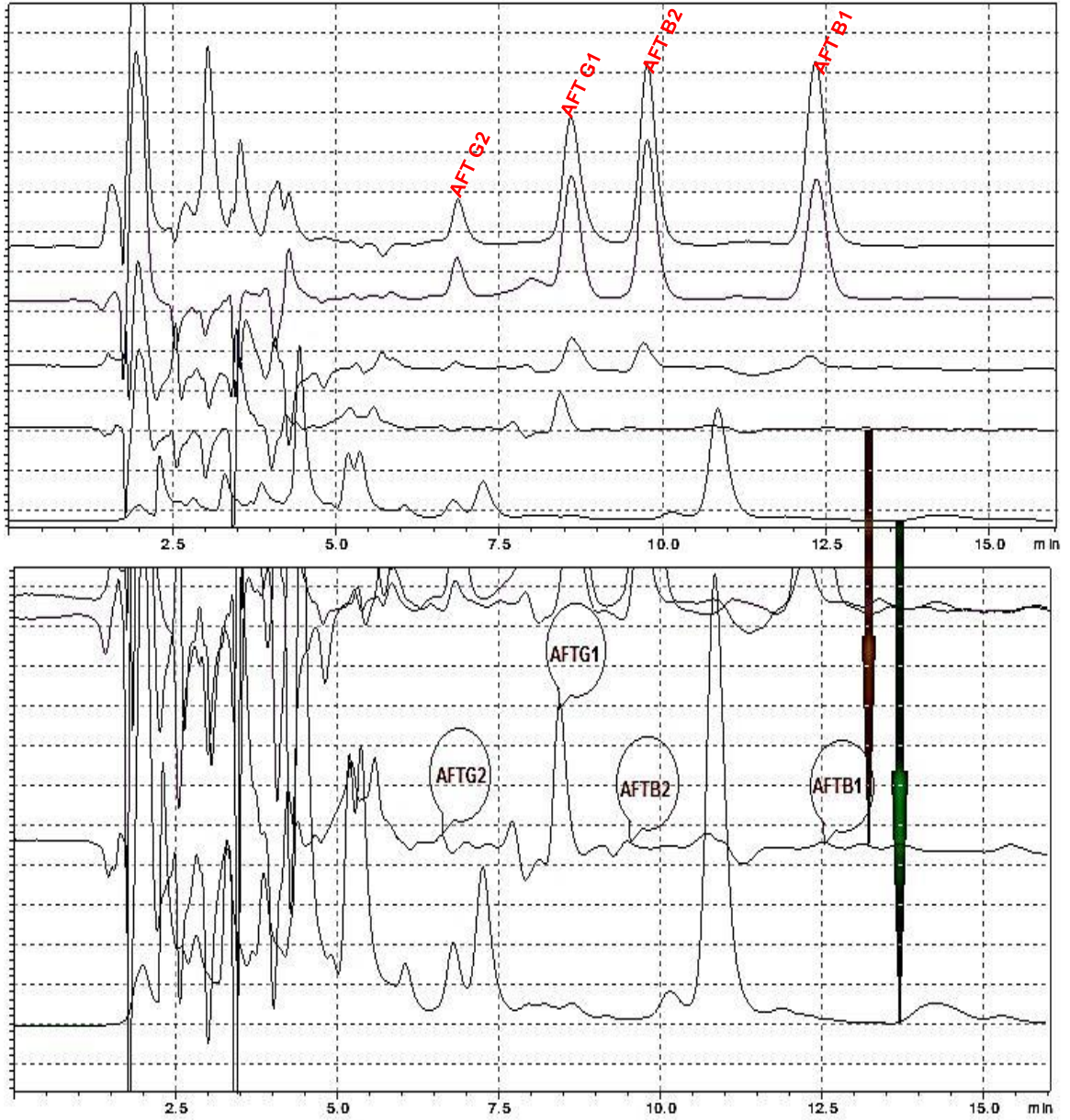
Şekil 4.27. Gerçek örnekten aflatoxin özütlenmesi. AflaMIP-4 ve Aflaprep® kolonları geri kazanımlarının karşılaştırılması. Örnek: Çeşitli derişimlerde aflatoxin standard karışımı eklenmiş pul biber numunesi; örnek kütlesi: 50 g; homojenizasyon çözeltisi: 500 mL metanol:su (30:70, v/v); kolona uygulanan örnek hacmi: 10 mL.



Şekil 4.28. Gerçek örneklerden aflatoksin özütlenmesi. AflaMIP-4 kompozit kriyojel. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş pul biber numunesi. Elüat çözeltisi HPLC kromatogramları; (a) Düşük derişimde aflatoksin içeren numune, (b) 0.1 ng/mL, (c) 1.0 ng/mL, (d) 5.0 ng/mL, (e) 10 ng/mL



Şekil 4.29. Gerçek örnekten aflatoxin özütlenmesi. AflaMIP-4 ve Aflaprep® kolonları geri kazanımlarının karşılaştırılması. Örnek: Çeşitli derişimlerde aflatoxin standard karışımı eklenmiş kuru incir numunesi.; örnek kütlesi: 50 g; homojenizasyon çözeltisi: 500 mL metanol:su (30:70, v/v); spike çözeltisi: Standart aflatoxin çözeltisi; kolona uygulanan örnek hacmi: 10 mL.



Şekil 4.30. Gerçek örneklerden aflatoksin özütlenmesi. AflaMIP-4 kompozit kriyojel. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş kuru incir numunesi. örnek kütlesi: 50 g; homojenizasyon çözeltisi: 500 mL metanol:su (30:70, v/v); kolona uygulanan örnek hacmi: 10 mL.

Çizelge 4.3. İki kolon arasındaki sonuçların yüzde olarak uyumu.

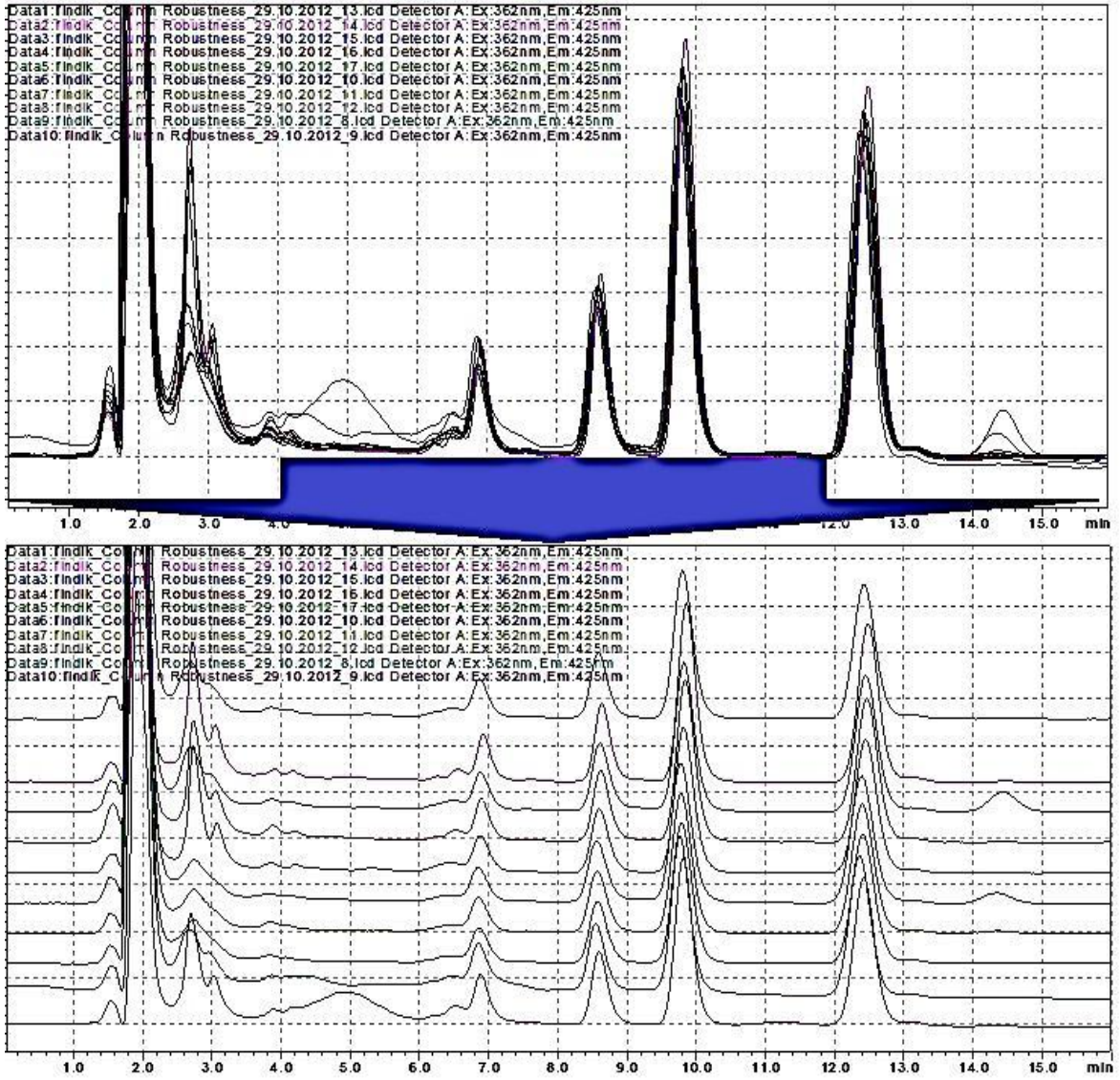
Sonuçların Uyumu (% Fark: Geri Kazanım)								
	AFTG2				AFTG1			
	Eklenen Aflatoksin Derişimi (ng/mL)				Eklenen Aflatoksin Derişimi (ng/mL)			
	0.1	1.0	5.0	10	0.1	1.0	5.0	10
Fındık	-0.64%	0.12%	-0.36%	-1.30%	-4.00%	-0.19%	-1.30%	-0.37%
Fıstık	-3.57%	3.22%	2.40%	0.88%	-0.03%	0.85%	-0.66%	-3.61%
Pul Biber	-1.98%	0.55%	1.61%	0.81%	-0.48%	-0.70%	-0.60%	-0.78%
İncir	0.17%	-5.88%	8.29%	0.99%	1.00%	0.89%	-0.17%	0.98%

Sonuçların Uyumu (% Fark: Geri Kazanım)								
	AFTB2				AFTB1			
	Eklenen Aflatoksin Derişimi (ng/ml)				Eklenen Aflatoksin Derişimi (ng/ml)			
	0.1	1.0	5.0	10	0.1	1.0	5.0	10
Fındık	-8.08%	-0.40%	-1.53%	-7.51%	-0.36%	-3.38%	-0.01%	-1.05%
Fıstık	-0.88%	0.85%	-0.03%	0.52%	-5.41%	2.97%	0.91%	-2.61%
Pul Biber	-0.78%	1.88%	1.17%	-0.19%	-0.61%	1.64%	-0.07%	2.21%
İncir	-0.38%	-1.99%	1.01%	-0.69%	-4.37%	1.56%	1.82%	-11.26%

4.8. Kolonların Tekrar Kullanılabilirliği

Bu başlık altında uygulanan deneyler, daha önce üzerinde herhangi bir adsorpsiyon-desorpsiyon çalışması yapılmamış bir kompozit ile gerçekleştirilmiştir. 20 ng/mL toplam Aflatoksin standardı eklenmiş olan fındık numunesi ile

adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü on defa tekrarlanmış ve elde edilen elüat çözeltisi HPLC ile analiz edilerek alan tekrarlanabilirliği yüzde görece standart sapma (% RSD) üzerinden kontrol edilmiştir. Elde edilen sonuçlar (Şekil 4.30 ve Çizelge 4.5), on döngünün ardından kolon kapasitesinde herhangi bir değişim olmadığını göstermiştir.



Şekil 4.31. Kompozit kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği.

Çizelge 4.4. Kolonların tekrar kullanılabilirliği.

n=10	Derişim (ng/mL)
% RSD (Aflatoksin G2)	5.44
% RSD (Aflatoksin G1)	5.61
% RSD (Aflatoksin B2)	4.11
% RSD (Aflatoksin B1)	4.41

4.9. Kompozitler Arası Tekrarlanabilirlik

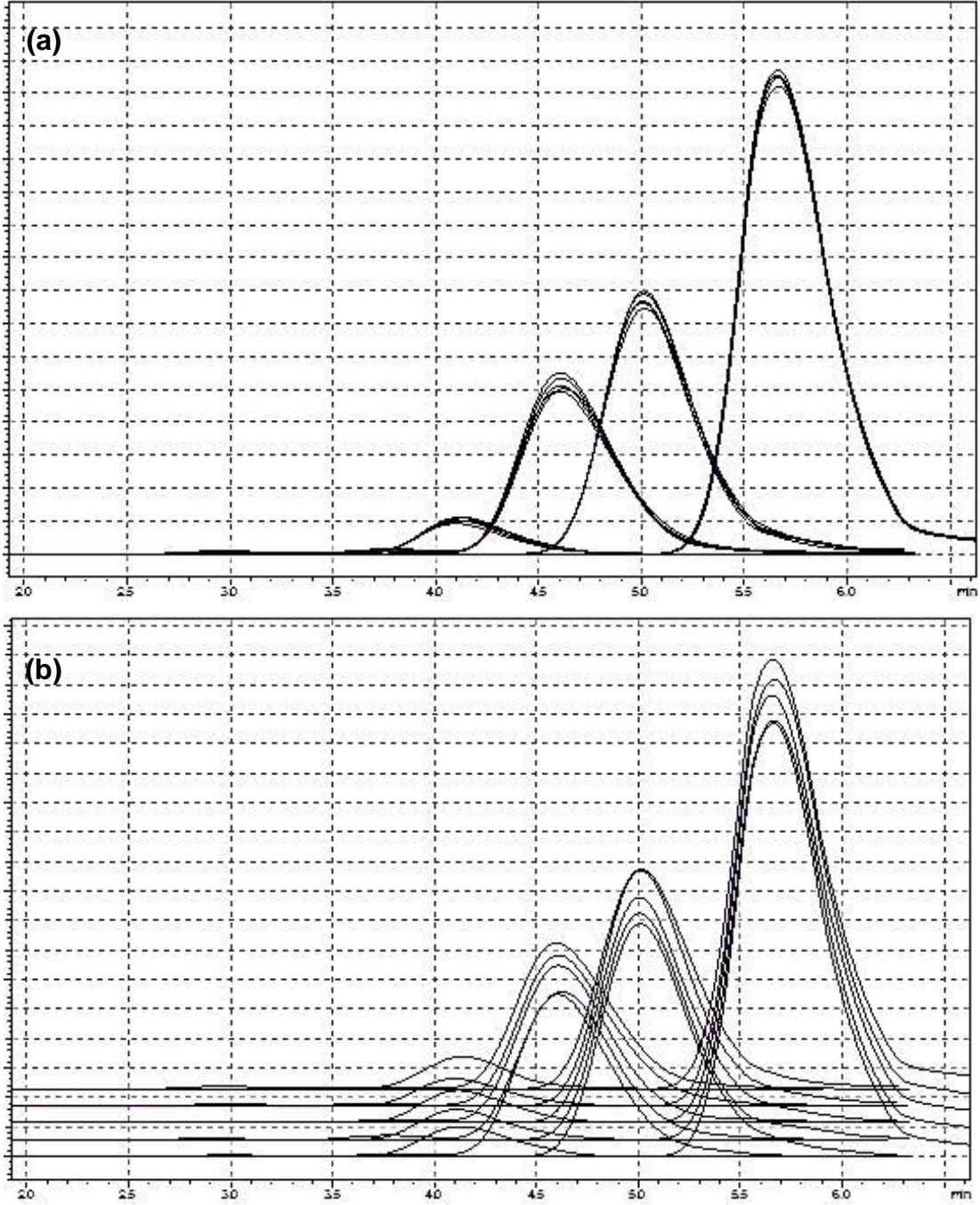
Çalışma, beş farklı AflaMIP-4 kompozit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Özütleme işlemi, 20 ng/mL derişime sahip aflatoksin standard karışımı (Çözelti, herbir aflatoksin türünden 5 ng/mL içermektedir.) eklenmiş fındık özütü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Özütleme sonucu elde edilen çözeltilerin analizi yapıldıktan sonra elde edilen derişim değerleri kullanılarak bağıl standart sapma (% RSD) değeri hesaplanmıştır.

Çizelge 4. 5. Kompozitler arası tekrarlanabilirlik.

n=5	Derişim (ng/mL)
% RSD (Aflatoksin G2)	2.83
% RSD (Aflatoksin G1)	5.57
% RSD (Aflatoksin B2)	4.93
% RSD (Aflatoksin B1)	1.14

Sonuçlar

incelenecek olursa farklı kompozitlerin, oldukça benzer sonuçlar verdiği görülecektir. Bu durum ise kompozitlerin rutin aflatoksin analizlerinde rahatlıkla kullanılabilceğinin bir göstergesidir.



Şekil 4.32. Kolonlararası tekrarlanabilirlik çalışması elüat kromatogramları (TIC-LC-MS/MS) **(a)** Üst üste çakıştırılmış görünüm. **(b)** Üst üste çakıştırılmamış görünüm.

KAYNAKLAR

- [1] Brera, C., Caputi, R., Miraglia, M., Iavicoli, I., Salerno, A., Carelli, G., Exposure assessment to mycotoxins in workplaces: aflatoxins and ochratoxin A occurrence in airborne dusts and human sera, *Microchemical Journal*, 73, 167-173, **2002**.
- [2] Chiavaro, E., Dall'Asta, C., Galaverna, G., Biancardi, A., Gambarelli, E., Dossena, A., Marchelli, R., New Reversed-phase liquid chromatographic method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. *Journal of Chromatography A*, 937, 31-40, **2001**.
- [3] Akiyama, H., Goda, Y., Tanaka, T., Toyoda, M., Determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in spices using a multifunctional column clean-up, *Journal of Chromatography A*, 932, 153-7, **2001**.
- [4] Ali, W.H., Derrien, D., Alix, F., Pérollier, C., Lépine, O., Bayouhd, S., Chapuis-Hugon, F., Pichon, V., Solid-phase extraction using molecularly imprinted polymers for selective extraction of a mycotoxin in cereals. *Journal of Chromatography A*, 1217, 6668–6673, **2010**.
- [5] Brera, C., Caputi, R., Miraglia, M., Iavicoli, I., Salerno, A., Carelli, G., Exposure assessment to mycotoxins in workplaces: aflatoxins and ochratoxin A occurrence in airborne dusts and human sera, *Microchemical Journal*, 73, 167-173, **2002**.
- [6] Bryden, W.L., Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security, *Animal Feed Science and Technology* 173, 134–158, **2012**.
- [7] Calleri, E., Marrubini, G., Brusotti, G., Massolini, G., Caccialanza, G., Development and integration of an immunoaffinity monolithic disk for the on-line solid-phase extraction and HPLC determination with fluorescence detection of aflatoxin B1 in aqueous solutions, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44, 396-403, **2007**.
- [8] Cattaneo, T.M., Marinoni, L., Barzaghi, S., Cremonesi, K., Monti, L., Testing the suitability of different high-performance liquid chromatographic methods to determine aflatoxin M1 in a soft fresh Italian cheese, *Journal of Chromatography A*, 1218, 4738-4745, **2011**.
- [9] Devreese, M., De Baere, S., De Backer, P., Croubels, S. Quantitative determination of several toxicologically important mycotoxins in pig plasma using multimycotoxin and analyte-specific high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods, *Journal of Chromatography A*, 1257, 74-80, **2012**.

- [10] Ediage, E.N., Di Mavungu, J.D, Song, S., Wu, A., Van Peteghem, C., De Saeger, S., A direct assessment of mycotoxin biomarkers in human urine samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 741, 58-69, **2012**.
- [11] Everley, R.A., Ciner, F.L., Zhan, D., Scholl, P.F., Groopman, J.D., Croley, T.R., Measurement of aflatoxin and aflatoxin metabolites in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology*, 31,150-156, **2007**.
- [12] Franco, C.M., Fente, C.A., Vázquez, B.I., Cepeda, A., Mahuzier, G., Prognon, P., Interaction between cyclodextrins and aflatoxins Q1, M1 and P1. Fluorescence and chromatographic studies. *Journal of Chromatography A*, 815, 21-29, **1998**.
- [13] Garcia, D., Ramos, A.J., Sanchis V., Marín S., Predicting mycotoxins in foods: a review. *Food Microbiology*, 26, 757-69, **2009**.
- [14] Ghali, R. Belouaer, I., Hdiri, S., Ghorbel, H., Maaroufi, K., Hedilli, A., Simultaneous HPLC determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in Tunisian sorghum and pistachios, *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 751-755, **2009**.
- [15] Gilbert, J., Anklam, E., Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs, *Trends in Analytical Chemistry*, 21, 468-486, **2002**.
- [16] Gromadzka, K., Waśkiewicz, A., Goliński, P., Swietlik, J., Occurrence of estrogenic mycotoxin - Zearalenone in aqueous environmental samples with various NOM content, *Water Research*, 43, 1051-1059, **2009**.
- [17] Hocking, A., Microbiological facts and fictions in grain storage. *Proceedings of the Australian Postharvest Technical Conference*, 25-27 June 2003 Canberra-, Australia (eds. Wright, E.J., Webb, M.C., Highley, E.), 55-58, **2003**.
- [18] IARC, *A review of human carcinogens*, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Chemical agents and related occupations, Lyon, France, **2012**.
- [19] Jaimez, J., Fente, C.A., Vazquez, B.I., Franco, C.M., Cepeda, A., Mahuzier, G., Prognon, P., Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography withfluorescence detection in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 16, 1-10, **2000**.
- [20] Jalili, M., Jinap, S., Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in commercial dried chili, *Food Control*, 24, 160-164, **2012**.

- [21] Jinap, A., Kleijnen, Z., Aflatoxin determination using in-line immunoaffinity chromatography in foods, *Food Control*, 26, 42-48, **2012**.
- [22] Jodlbauer, J., Maier, N.M., Lindner, W., Towards ochratoxin A selective molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction, *Journal of Chromatography A*, 945, 45-63, **2002**.
- [23] Josic, D., Buchacher, A., Application of monoliths as supports for affinity chromatography and fast enzymatic conversion, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49, 153-174, **2001**.
- [24] Kokkonen, M., Ojala, L., Parikka, P., Jestoi, M., Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions, *International Journal of Food Microbiology*, 143, 17-25, **2010**.
- [25] Lozinsky, V.I., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Savina, I.N., Jungyid, H., Mattiasson, B., Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, *Trends Biotechnology*, 21, 445-451, **2003**.
- [26] Lozinsky, V.I., Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: Preparation, properties and application, *Russian Chemical Review*, 71, 489-511, **2002**.
- [27] Kurtzman, M.A.D., Economic Aspects of Mycotoxins in Fruits and Vegetables, *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*, (Edited by Rivka Barkai-Golan and Nachman Paster), Academic Press, Elsevier, **2008**.
- [28] Amalaradjou, M.A.R., Venkitanarayanan, K., Detection of *Penicillium*, *Aspergillus* and *Alternaria* Species in Fruits and Vegetables, *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*, (Edited by Rivka Barkai-Golan and Nachman Paster), Academic Press, Elsevier, **2008**.
- [29] O'Riordan, M.J. Wilkinson, M.G., Comparison of analytical methods for aflatoxin determination in commercial chilli spice preparations and subsequent development of an improved method, *Food Control*, 20, 700-705, **2009**.
- [30] Papp, E., H-Otta, K., Zaray, G., Mincsovcics, E., Liquid chromatographic determination of aflatoxins, *Microchemical Journal*, 73, 39-46 **2002**.
- [31] Piletska, E., Karim, K., Coker, R., Piletsky, S., Development of the custom polymeric materials specific for aflatoxin B1 and ochratoxin A for application with the ToxiQuant T1 sensor tool, *Journal of Chromatography A*, 1217, 2543-2547, **2010**.
- [32] Plieva, F., Bober, B., Dainiak, M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Macroporous polyacrylamide monolithic gels with immobilized metal affinity ligands: The effect of porous structure and ligand coupling chemistry on protein binding, *Journal of Molecular Recognition*, 19, 305-312. **2006**.

- [33] Plieva, F., Huiting, X., Galaev, I.Y., Bergensthl, B., Mattiasson, B., Macroporous elastic polyacrylamide gels prepared at subzero temperatures: Control of porous structure, *Journal of Materials Chemistry*, 16, 4065-4073, **2006**.
- [34] Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Dainiak, M., Mattiasson, B., Effect of matrix elasticity on affinity binding and release of bioparticles. Elution of bound cells by temperature-induced shrinkage of the smart macroporous hydrogel, *Langmuir*, 23, 35-40, **2007**.
- [35] Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate containing fluids and cell culture applications, *Journal of Separation Science*, 30, 1657-1671, **2007**.
- [36] Prandini, A., Sigolo, S., Filippi, L., Battilani, P., Piva, G., Review of predictive models for Fusarium head blight and related mycotoxin contamination in wheat, *Food and Chemical Toxicology*, 47,927-931, **2009**.
- [37] Ren, Y., Zhang, Y., Shao, S., Cai, Z., Feng, L., Pan, H., Wang, Z., Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1143, 1-2, **2007**.
- [38] Rundberget, T., Skaar, I., Flåøyen, A., The presence of Penicillium and Penicillium mycotoxins in food wastes, *International Journal of Food Microbiology*, 15,181-188, **2004**.
- [39] Senyuva, H.Z., Gilbert, J., Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review, *Journal of Chromatography B*, 15,115-132, **2010**.
- [40] Svec, F., Preparation and HPLC applications of rigid macroporous organic polymer monoliths, *Journal of Separation Science*, 27, 747-766. **2004**.
- [41] Svec, F., Frechet, J.M.J., New designs of macroporous polymers and supports: From separation to biocatalysis, *Science*, 273, 205-211, **1996**.
- [42] Svec, F., Frechet, J.M.J., Molded rigid monolithic porous polymers: An inexpensive, efficient, and versatile alternative to beads for the design of materials for numerous applications, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 38, 34-48, **1999**.
- [43] Tammer, B., Lehmann, I., Nieber, K., Altenburger, R., Combined effects of mycotoxin mixtures on human T cell function, *Toxicology Letters*, 170,124-133, **2007**.
- [44] Tang, L., Guan, H., Ding, X., Wang, J.S., Modulation of aflatoxin toxicity and biomarkers by lycopene in F344 rats, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 219, 10-17, **2007**.

- [45] Tunail, N., *Gıda mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Sim Matbaacılık, Ankara, 522, 116-175, **2000**.
- [46] Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, EK1: Gıdalardaki bulaşanların maksimum limitleri, 28157 (3. Mükerrer), (**2011**).
- [47] Zöllner, P., Mayer-Helm, B., Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1136, 123-169, **2006**.
- [48] Joint FAO/WHO food standards programme, codex committee on contaminants in foods, discussion paper on aflatoxins in cereals, **2013**.
- [49] Bao-jun, X., Xiao-qin, J., Li-juan, G., Chang-keun, S., Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin, *Food Control*, 17, 271–285, **2006**.
- [50] Corcueraa, L.A., Ibáñez-Veab, M., Vettorazzia, A., González-Peñasb, E., Ceraina, A.L. Validation of a UHPLC-FLD analytical method for the simultaneous quantification of aflatoxin B1 and ochratoxin a in rat plasma, liver and kidney, *Journal of Chromatography B*, 879, 2733– 2740, **2011**.
- [51] Shimadzu, Corp., Analysis of Aflatoxins by High Performance Liquid Chromatography with Post-column Bromination, *HPLC Application Report*, **2004**.
- [52] Rhône, R.B., *KBr Cell Instruction Manual*, **2009**.
- [53] Habib, M.K., Controlled biological and biomimetic systems for landmine detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 1–18, **2007**.
- [54] Fernando, N.V., Javier, L.U., María, C., Moreno, B., Guillermo, O., Zearalenone sensing with molecularly imprinted polymers and tailored fluorescent probes, *Sensors and Actuators B*, 121, 67–73, **2007**.
- [55] Say, R., *Moleküler Baskılanmış Polimerler ve Biyokromatografi Uygulamaları*, *Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler*, (editörler: Denizli A., Küfrelioğlu Ö.İ.), Pozitif Matbaacılık, Ankara, **2010**.
- [56] Ertürk, G., Uzun, L., Tümer, M.A., Say, R., Denizli, A., Fab fragments imprinted SPR biosensor for real-time human immunoglobulin G detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 28, 97–104, **2011**.
- [57] Vasapollo, G., Sole, R.D., Mergola, L., Lazzoi, M.R., Scardino, A., Scorrano, S., Mele, G., Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective, *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 5908-5945, **2011**.
- [58] Yılmaz, F., Bereli, N., Yavuz, H., Denizli, A., Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography, *Biochemical Engineering Journal*, 43 272–279, **2009**.

- [59] Osman, B., Özer, E.T., Demirbel, E., Güçer, Ş., Beşirli, N., Synthesis and characterization of L-tryptophan containing microbeads for removal of dimethyl phthalate from aqueous phase, *Separation and Purification Technology*, 109, 40–47, **2013**.
- [60] Andac, M., Galaev, I.Y., Denizli, A., Molecularly imprinted poly(hydroxyethyl methacrylate) based cryogel for albumin depletion from human serum, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109, 259– 265, **2013**.
- [61] Verheyen, E., Schillemans, J.P., Wijk, M.V. Demeniex, M.A., Hennink, W.E., Nostrum, C.F.V. Challenges for the effective molecular imprinting of proteins, *Biomaterials*, 32, 3008-3020, **2011**.
- [62] Iqbal, N., Lieberzeit, P.A., Artificial Receptors for Mass-Sensitive Sensors: Targeting Analytes from Surfaces, Nanoparticles, and Bioanalytes by Molecular Imprinting, *Molecularly Imprinted Sensors: Overview And Applications*, (eds: Li, S., Ge, Y., Piletsky, S.A., Lunec, J.), Elsevier B.V., **2012**.
- [63] Cela-Pérez, M.C., Lasagabáster-Latorre, A., Abad-López, M.J., López-Vilariño, J.M., González-Rodríguez, M.V., A study of competitive molecular interaction effects on imprinting of molecularly imprinted polymers, *Vibrational Spectroscopy* 65, 74– 83, **2013**.
- [64] Alexander, C., Andersson, H.S., Andersson, L.I., Ansell, R.J., Kirsch, N., Nicholls, I.A., O'Mahony, J., Whitcombe, M.J., Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003, *Journal of Molecular Recognition*, 19, 106–180, **2006**.
- [65] Bereli, N., Baydemir, G., Denizli, A., Yeni Nesil Plimerik Sistemler II: Kriyojeller, *Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler*, (editörler: Denizli A., Küfrevioğlu Ö.İ.), Pozitif Matbaacılık, Ankara, **2010**.
- [66] Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Noppe, W., Mattiasson, B., Cryogel applications in microbiology, *Trends in Microbiology*, 16, 543-551, **2008**.
- [67] Baydemir, G., Bereli, N., Andaç, M., Say, R., Galaev, I.Y., Denizli, A., Supermacroporous poly(hydroxyethyl methacrylate) based cryogel with embedded bilirubin imprinted particles, *Reactive & Functional Polymers*, 69, 36–42, **2009**.
- [68] Önnby, L., Pakade, V., Mattiasson, B., Kirsebom, H., Polymer composite adsorbents using particles of molecularly imprinted polymers or aluminium oxide nanoparticles for treatment of arsenic contaminated waters, *Water Research*, 4, 4111-4120, **2012**.

- [69] Tekin, K., Uzun, L., Şahin, Ç.A., Bektaş, S., Denizli, A., Preparation and characterization of composite cryogels containing imidazole group and use in heavy metal removal, *Reactive & Functional Polymers*, 71, 985–993, **2012**.
- [70] Gibson, R.F., A review of recent research on mechanics of multifunctional composite materials and structures, *Composite Structures*, 92, 2793–2810, **2010**.
- [71] Mihaiela, I., Paulina, S., Emil, N., Liviu, M., Experimental and Theoretical Studies on Mechanical Characteristics of an Important Composite Material, *Materiale Plastice*, 46, 62-66, **2009**.
- [72] Hu, J., Zhu, Y., Huang, H., Lu, J., Recent advances in shape–memory polymers: Structure, mechanism, functionality, modeling and applications, *Progress in Polymer Science*, 37, 1720– 1763, **2012**.
- [73] Baur, J., Silverman, E., Challenges and opportunities in multifunctional nanocomposite structures for aerospace applications, *MRS Bull*, 32 328–334, **2007**.
- [74] Li, C., Thostenson, E.T., Chou, T.W., Sensors and actuators based on carbon nanotubes and their composites: a review, *Composites Science and Technology*, 68, 1227–1249, **2008**.
- [75] Anton, S.R., Sodano, H.A., A review of power harvesting using piezoelectric materials (2003–2006), *Smart Materials and Structures*, 16, R1–21, **2007**.
- [76] Plieva, F.M., Karlsson, M., Aguilar, M.R., Gomez, D., Mikhailovsky, S., Galaev, I.Y., Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels, *Soft Matter*, 1, 303-309, **2005**.
- [77] Xie, F., Liu, G., Wu, F., Guo, G., Li, G., Selective adsorption and separation of trace dissolved Fe(III) from natural water samples by double template imprinted sorbent with chelating diamines, *Chemical Engineering Journal*, 183, 372– 380, **2012**.
- [78] Say, R., Creation of recognition sites for organophosphate esters based on charge transfer and ligand exchange imprinting methods, *Analytica Chimica Acta*, 579, 74–80, **2006**.
- [79] Nicolescu, T.V., Sarbu, A., Dima, S.O., Nicolae, C., Donescu, D., Molecularly Imprinted Bulk Copolymers as Selective Sorbents for Gallic Acid, *Journal of Applied Polymer Science*, 127,366–374, **2013**.
- [80] Yavuz, H., Karakoc, V., Türkmen, D., Say, R., Denizli, A., Synthesis of cholesterol imprinted polymeric particles, *International Journal of Biological Macromolecules*, 41, 8–15, **2007**.

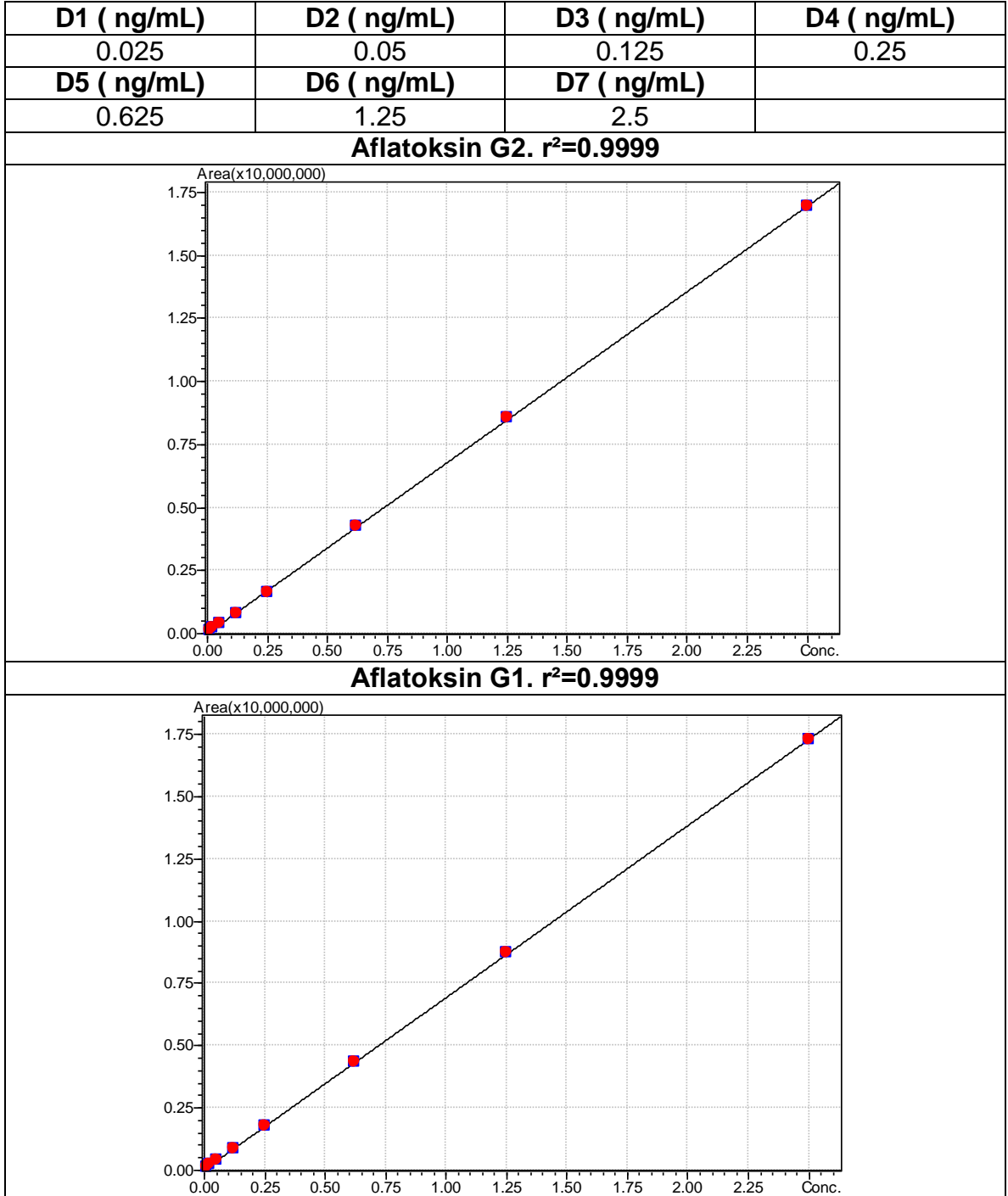
- [81] Zhao, X., Wan, J., Xu, H., Yang, X., An improved HPLC method with fluorescence detection for the determination of pyrene in rat plasma and its pharmacokinetics, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48, 1237–1242, **2008**.
- [82] Kao, T.H., Chen, C.J., Chen, B.H., An improved high performance liquid chromatography–photodiode array detection–atmospheric pressure chemical ionization–mass spectrometry method for determination of chlorophylls and their derivatives in freeze-dried and hot-air-dried *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz, *Talanta*, 86, 349– 355, **2011**.
- [83] Garcia, D., Cela, E.G., Ramos, A.J., Vicente Sanchis, Sonia Marín, Mould growth and mycotoxin production as affected by *Equisetum arvense* and *Stevia rebaudiana* extracts, *Food Control*, 22, 1378-1384, **2011**.
- [84] Sulyok, M., Krska, R., Rainer Schuhmacher, Application of an LC–MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds, *Food Chemistry*, 119, 408–416, **2010**.
- [85] Cabral, L.C., Pinto, V.F., Patriarca, A., Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods, *International Journal of Food Microbiology*, 166, 1–14, **2013**.
- [86] Juan, C., Ritieni, A., Mañes, J., Occurrence of *Fusarium* mycotoxins in Italian cereal and cereal products from organic farming, *Food Chemistry*, 141, 1747–1755, **2013**.
- [87] Boudra H., Morgavi, D.P., Mycotoxin risk evaluation in feeds contaminated by *Aspergillus fumigatus*, *Animal Feed Science and Technology*, 120, 113–123, **2005**.
- [88] Bruchim, Y., Segev, G., Sela, U., Bdolah-Abram, T., Salomon, A., Aroch, I., Accidental fatal aflatoxicosis due to contaminated commercial diet in 50 dogs, *Research in Veterinary Science*, 93, 279–287, **2012**.
- [89] Haschek, W.M., Voss, K.A., *Mycotoxins, Haschek And Rousseaux's Handbook Of Toxicologic Pathology* Third edition, (eds: Haschek, W.M., Rousseaux, C.G., Wallig M.A.), Elsevier Inc., China, **2013**.
- [90] Ouanesa, Z., Ayed-Boussemaa, I., Baatia, T., Creppyb, E.E., Bacha, H., Zearalenone induces chromosome aberrations in mouse bone marrow: preventive effect of 17-estradiol, progesterone and Vitamin E, *Mutation Research*, 565, 139–149, **2005**.
- [91] Minervini, F., Lacalandra, G.M., Filannino, A., Nicassio, M., Visconti, A., Dell'Aquila, M.E., Effects of in vitro exposure to natural levels of zearalenone and its derivatives on chromatin structure stability in equine spermatozoa, *Theriogenology*, 73, 392–403, **2010**.

- [92] Tangni, E.K., Waegeneers, N., Overmeire, I.V., Goeyens, L., Pussemier, L., Mycotoxin analyses in some home produced eggs in Belgium reveal small contribution to the total daily intake, *Science of the Total Environment*, 407, 4411–4418, **2009**.
- [93] Mclean, M., Dutton, M.F., Cellular Interactions And Metabolism of Aflatoxin: An Update, *Pharmacology & Therapeutics*, 65, 163-192, **1995**.
- [94] Bedard, L.L., Massey, T.E., Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair, *Cancer Letters*, 241, 174–183, **2006**.
- [95] Diaz, G.J., Murcia, H.W., Biotransformation of Aflatoxin B1 and Its Relationship with the Differential Toxicological Response to Aflatoxin in Commercial Poultry Species, *Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology* (Edited by Ramon, G., Gonzalez, G.), InTech, China, **2011**.
- [96] IARC, Evaluation Of Carcinogenic Risks To Humans Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene And Styrene, IARC Monographs **2002**.
- [97] Hwang, C.C., Lee, W.C., Chromatographic characteristics of cholesterol-imprinted polymers prepared by covalent and non-covalent imprinting methods, *Journal of Chromatography A*, 962, 69–78, **2002**.
- [98] Moreira, F.T.C., Dutra, R.A.F., Noronha, J.P.C., Sales, M.G.F., Electrochemical biosensor based on biomimetic material formyoglobin detection, *Electrochimica Acta*, 107, 481– 487, **2013**.
- [99] Fatoni, A., Apon Numnuam, Proespichaya Kanatharana, Warakorn Limbut, Chongdee Thammakhet, Panote Thavarungkul, A highly stable oxygen-independent glucose biosensor based on a chitosan-albumin cryogel incorporated with carbon nanotubes and ferrocene, *Sensors and Actuators B*, 185, 725– 734, **2013**.
- [100] Kumar, P.S., Önnby, L., Kirsebom, H., Arsenite adsorption on cryogels embedded with iron-aluminium double hydrous oxides: Possible polishing step for smelting wastewater?, *Journal of Hazardous Materials*, 250–251, 469– 476, **2013**.
- [101] Kostova, B., Momekova, D., Petrov, P., Momekov, G., Toncheva-Moncheva, N., Tsvetanov, C.B., Lambov, N., Poly(ethoxytriethyleneglycol acrylate) cryogels as novel sustained drug release systems for oral application, *Polymer*, 52, 1217-1222, **2011**.
- [102] Reiter, E., Zentek, J., Razzazi, E., Review on sample preparation strategies and methods used for the analysis of aflatoxins in food and feed, *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 508–524, **2009**.

EK A. HPLC Yöntemi Validasyonu

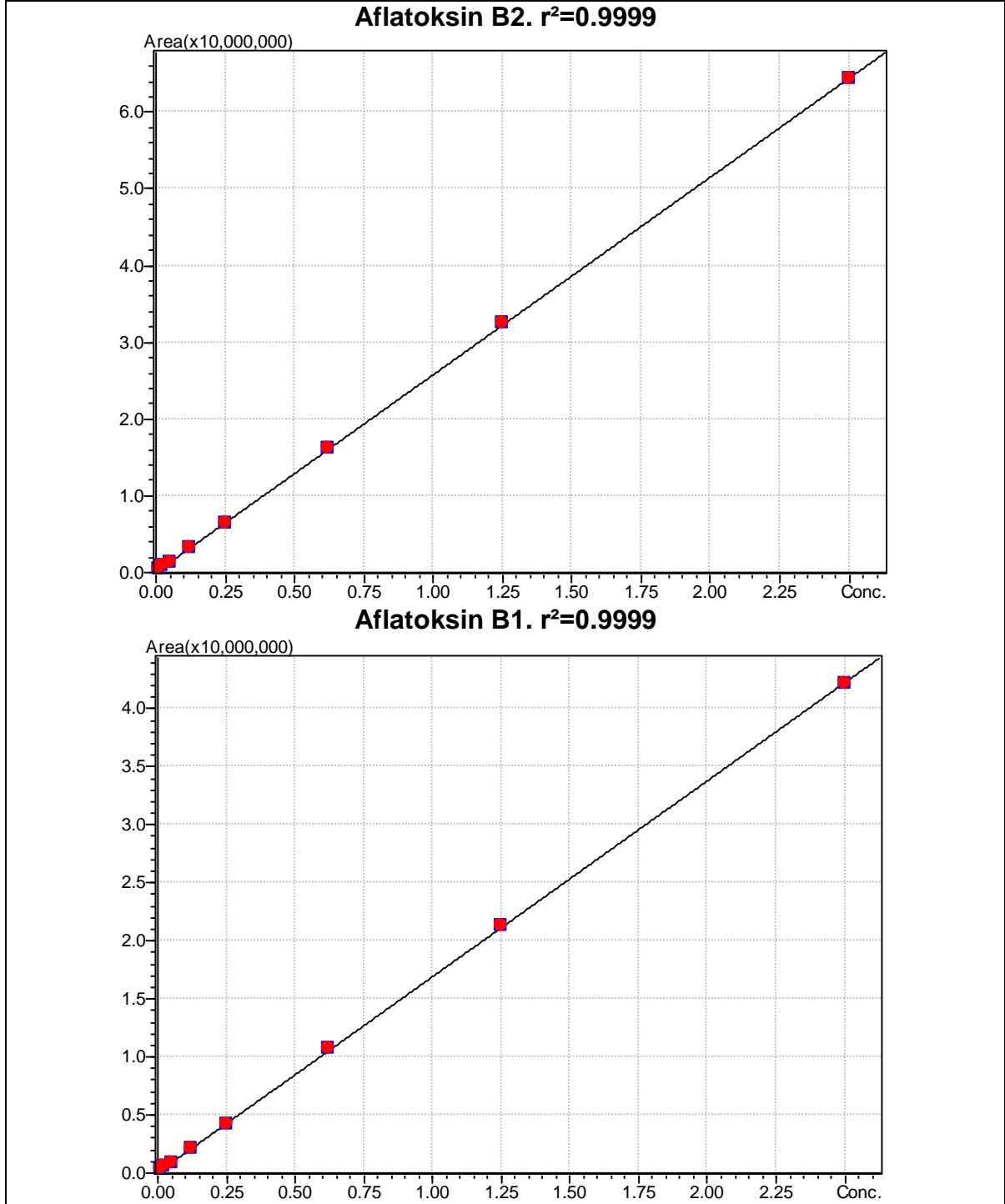
A.1. Doğrusallık

Doğrusallık çalışması için toplam aflatoksin derişimi 0.1 ng/mL ile 10 ng/mL arasından değişen yedi farklı derişimde (D1-D7) standard çözelti karışımı hazırlanıp HPLC sistemi ile analiz edilmiştir. Çalışmanın sonuçları Şekil A.1 ve Şekil A.2'de özetlenmiştir.

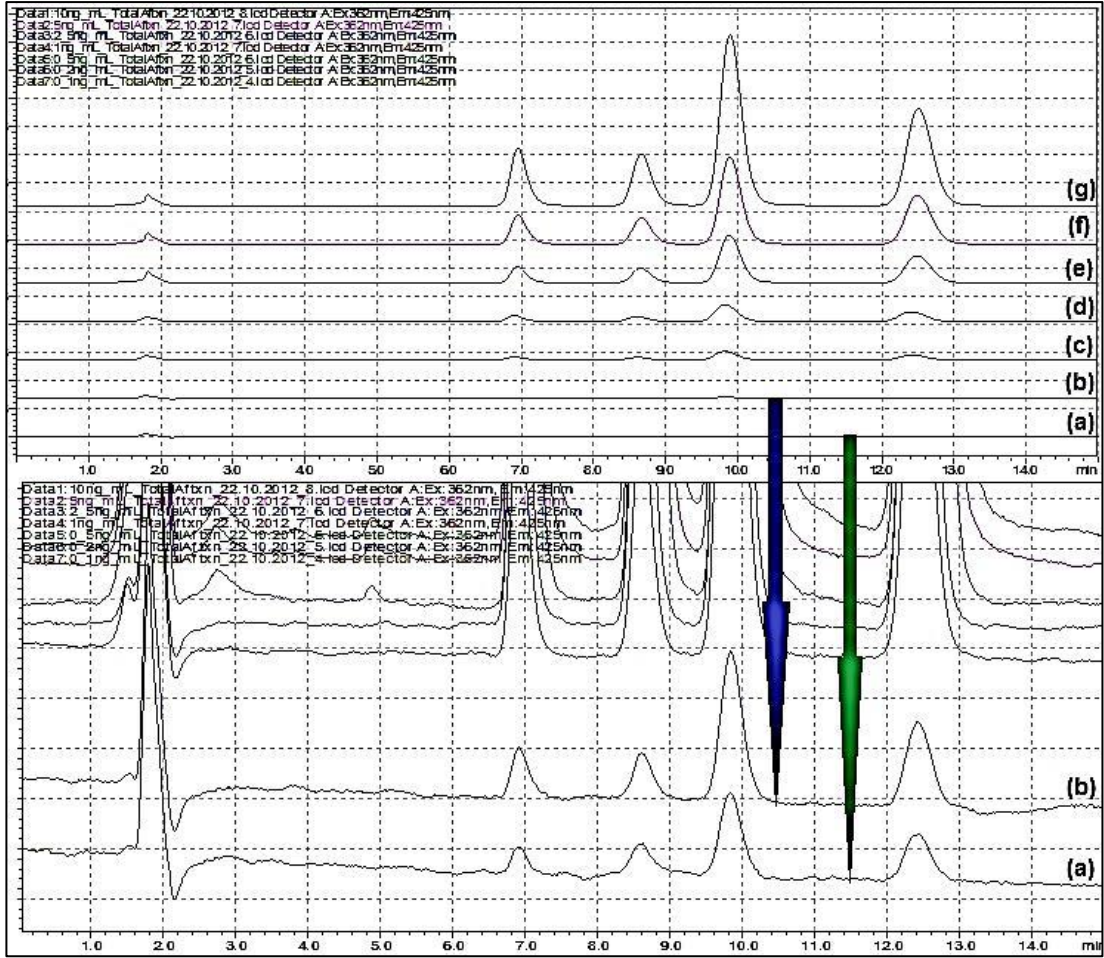


Şekil A.1. Doğrusallık çalışması sonrası elde edilen kalibrasyon eğrileri.

C1 (ng/mL)	C2 (ng/mL)	C3 (ng/mL)	C4 (ng/mL)
0.0125	0.025	0.05	0.125
C5 (ng/mL)	C6 (ng/mL)	C7 (ng/mL)	C8 (ng/mL)
0.25	0.625	1.25	2.5



Şekil A.1. (Devamı)



Şekil A.1. Doğrusallık çalışması sonrası elde edilen kromatogramlar: (a) 0.1 ng/mL, (b) 0.2 ng/mL, (c) 0.5 ng/mL, (d) 1 ng/mL, (e) 2.5 ng/mL, (f) 5 ng/mL, (g) 10 ng/mL.

A.2. Geri Kazanım

Geri kazanım çalışması. 0.1 ng/mL toplam aflatoxin standardı (Σ AFTG2G1B2B1) fındık, fıstık, kuru incir ve pul biber numunelerinin analizleri yapılarak elde edilmiştir. Ayrıca bu veriler kullanılarak ortalama sinyal/gürültü (S/N) oranları hesaplanmıştır. Sonuçlar, Çizelge A.1'de özetlenmiştir.

Çizelge A.1. Aflaprep[®] kolonların geri kazanım değerleri.

	% Geri Kazanım				Ortalama S/N
	Fındık	Fıstık	İncir	Pul Biber	
Aflatoxin G2	99.36	97.96	99.73	96.41	15
Aflatoxin G1	96.00	99.32	99.79	96.22	19
Aflatoxin B2	91.92	99.08	99.63	97.12	66
Aflatoxin B1	99.64	96.75	97.22	98.01	60

A.3. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik çalışmaları 0.1 ng/mL toplam aflatoksin standardı (Σ AFTG2G1B2B1) ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Çizelge A.2’de özetlenmiştir.

Çizelge A.2. Tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları.

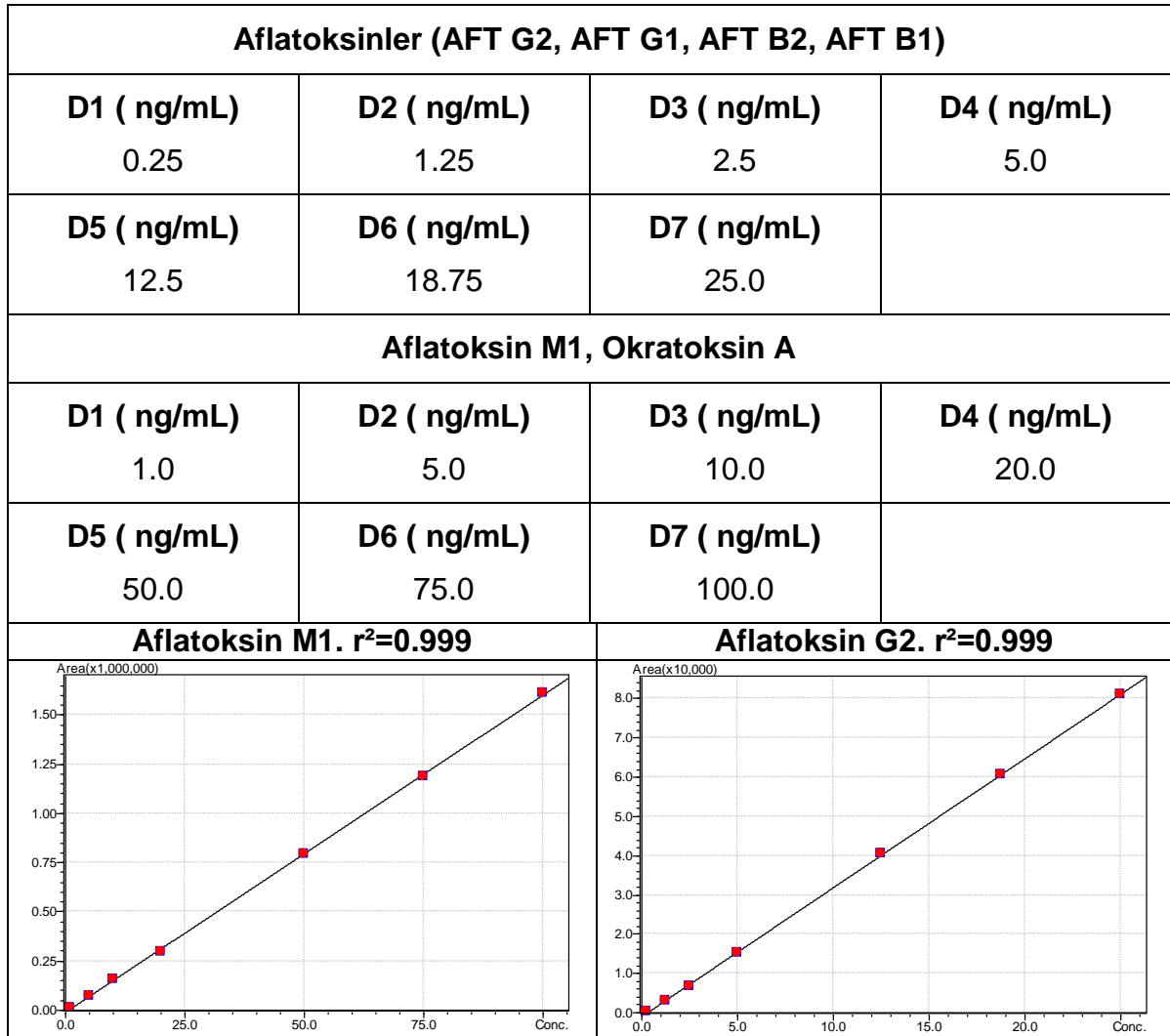
n=6	Derişim (ng/mL)
% RSD (Aflatoksin G2)	0.77
% RSD (Aflatoksin G1)	2.32
% RSD (Aflatoksin B2)	1.25
% RSD (Aflatoksin B1)	1.47

EK B. Seçicilik Deneyleri, LC-MS/MS Yöntemi Validasyonu

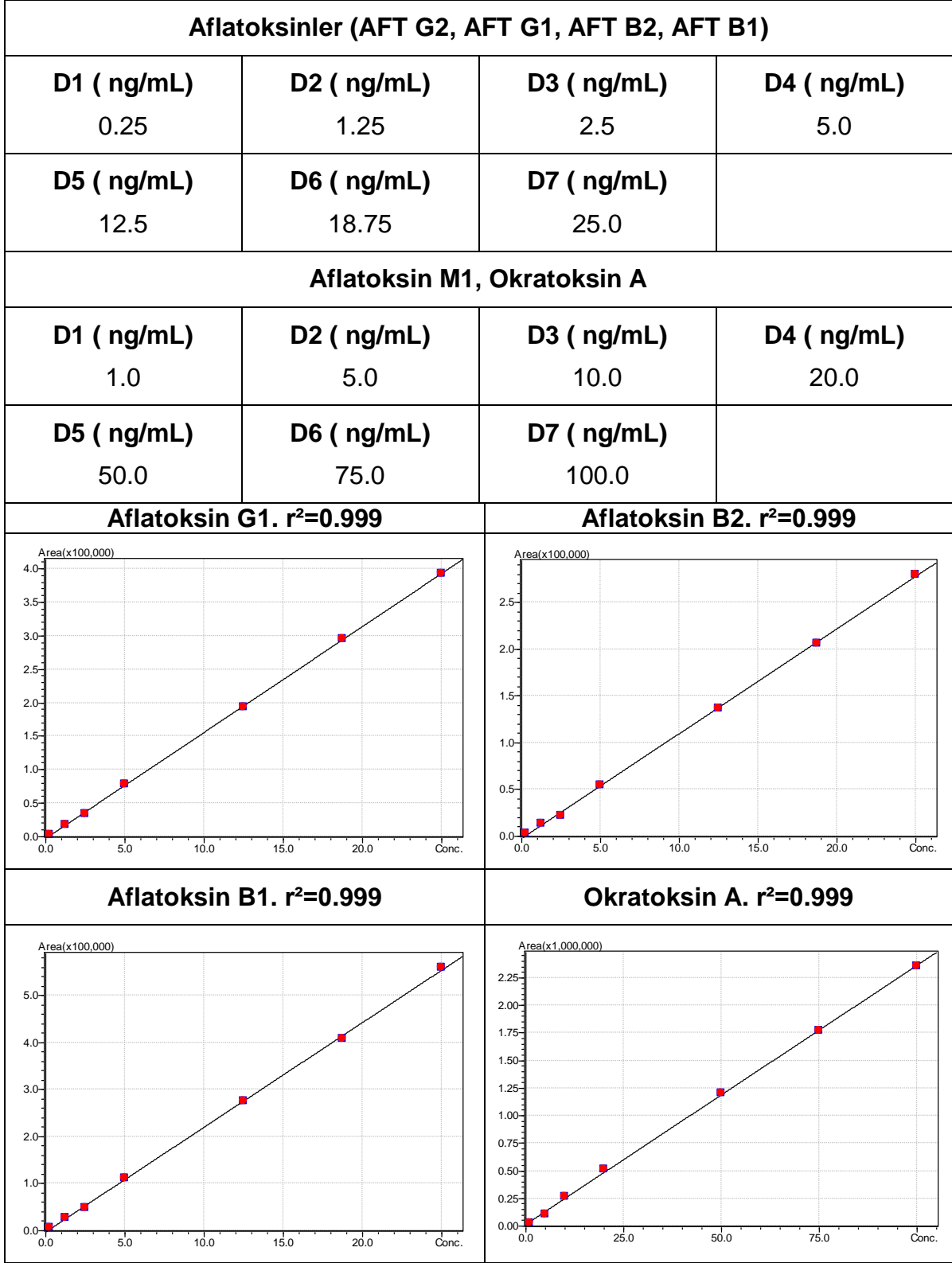
Ölçüm yöntemi sadece seçiciliğin test edilmesi amacı ile kullanıldığından doğrusallık ve tekrarlanabilirlik çalışması gerçekleştirilmiştir.

B.1. Doğrusallık

Doğrusallık çalışması için mikotoksin derişimi 1.0 ng/mL ile 100 ng/mL arasında değişen (AFT G2,G1, B2, B1 için toplam derişim) yedi farklı derişimde (D1-D7) standard çözelti karışımı hazırlanıp LC-MS/MS sistemi ile analiz edilmiştir. Çalışmanın sonuçları Şekil B.1'de özetlenmiştir (Örnek kromatogram Bölüm 4.6, Şekil 4.20'de verilmiştir.).



Şekil B.1. Doğrusallık çalışması sonrası elde edilen kalibrasyon eğrileri.



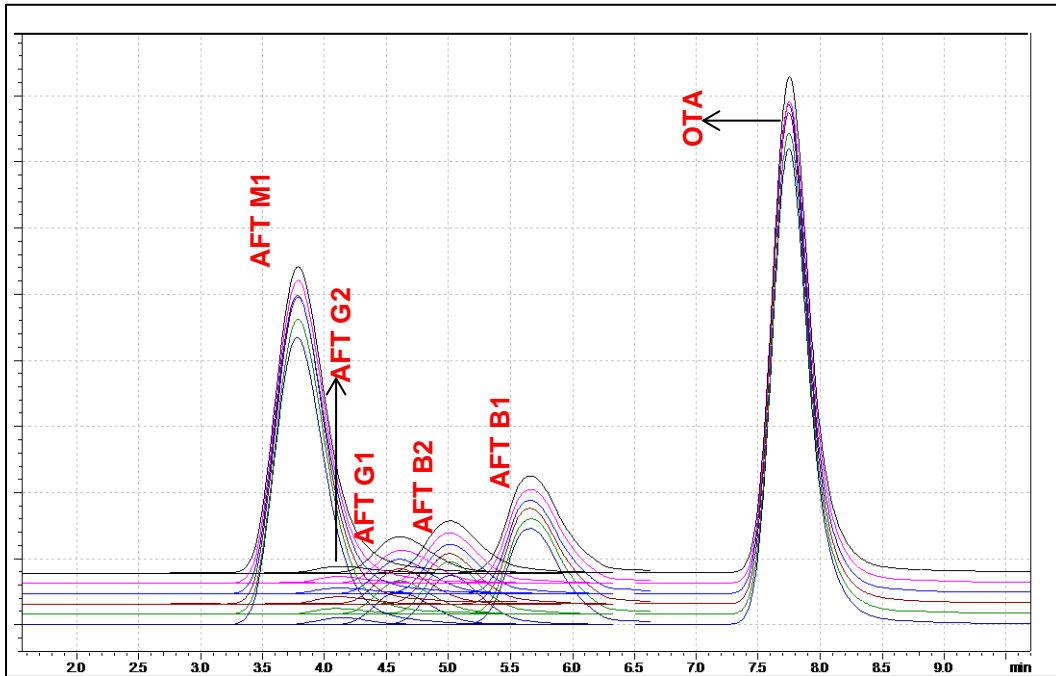
Şekil B.1. (Devamı)

B.2. Tekrarlanabilirlik

Çalışma, 10 ng/mL derişime sahip mikotoksin karışımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir, 6 ardışık enjeksiyon yapılarak bağıl standard sapma hesaplanmıştır. Sonuçlar, Çizelge B.2 ve şekil B.1’de özetlenmiştir.

Çizelge B.2. Tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları.

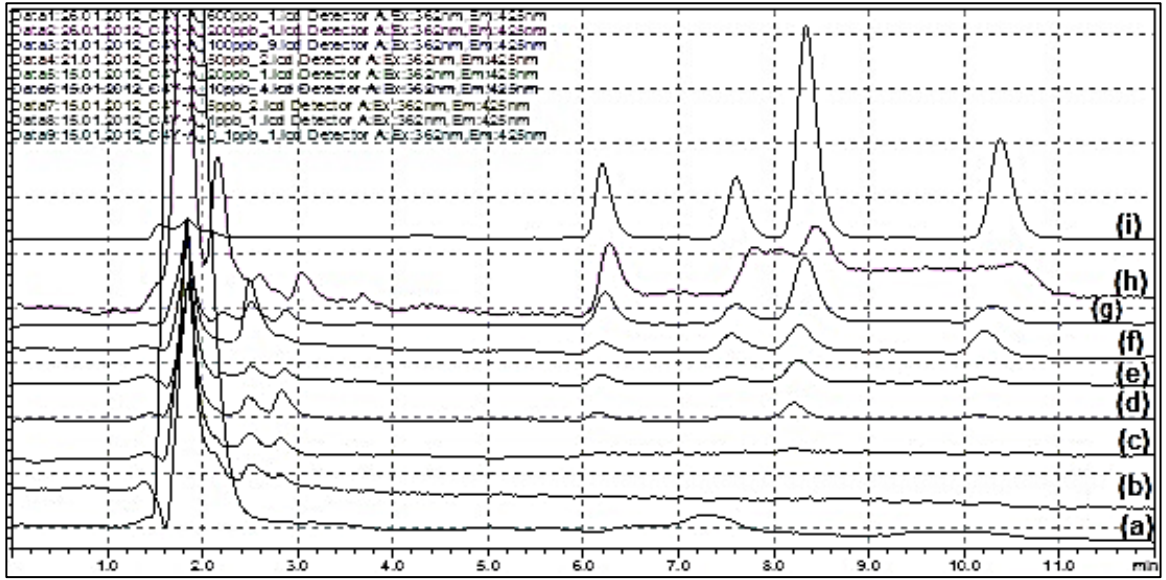
n=6	Derişim (ng/mL)
% RSD (Aflatoksin M1)	2.11
% RSD (Aflatoksin G2)	3.81
% RSD (Aflatoksin G1)	3.41
% RSD (Aflatoksin B2)	2.67
% RSD (Aflatoksin B1)	1.71
% RSD (Oktratoksin A)	1.55



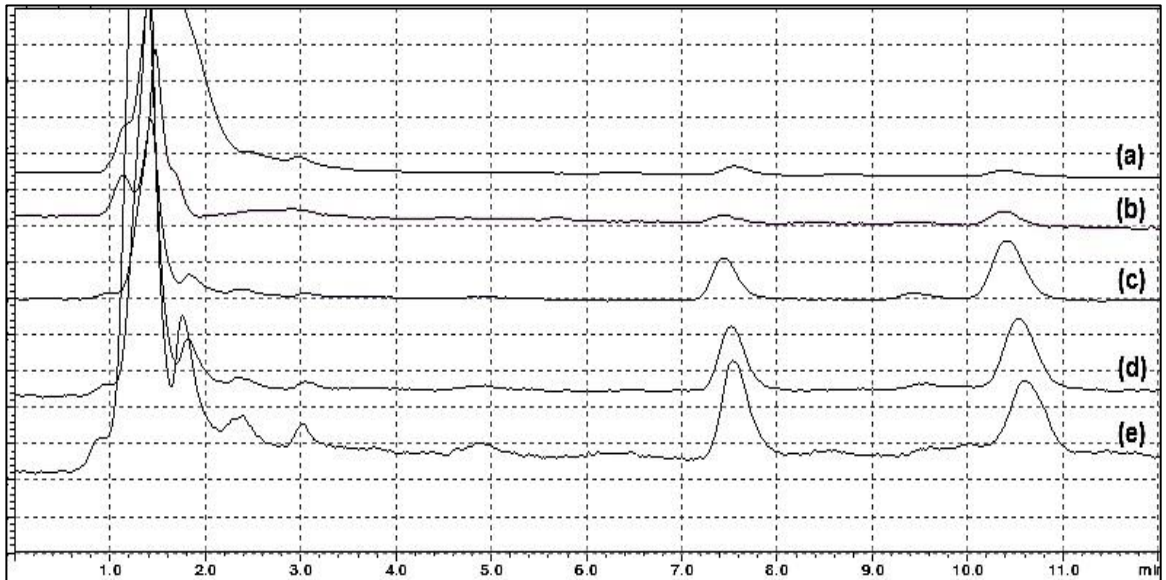
Şekil B.1. Tekrarlanabilirlik çalışması, LC-MS/MS kromatogramları.

EK C. Çalışmalar sırasında elde edilen çözeltilerin (adsorpsiyon eflüatı, yıkama eflüatı ve elüat) HPLC analizlerinden elde edilen kromatogramlar.

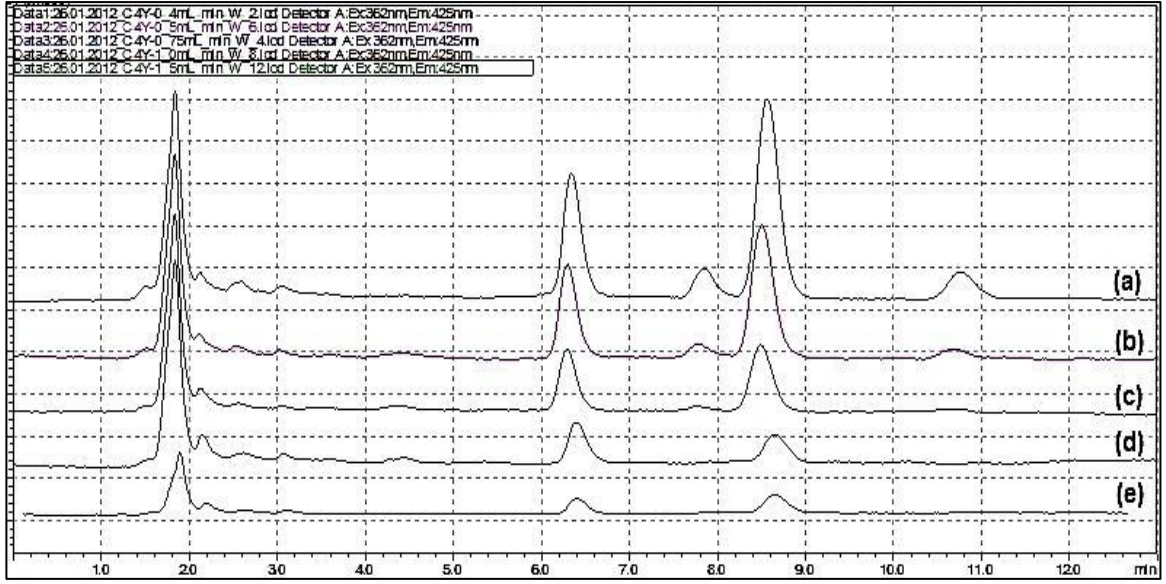
Bölüm 4.5. AflaMIP Kriyojellerin Adsorpsiyon Koşullarının Optimizasyonu Kromatogramlar



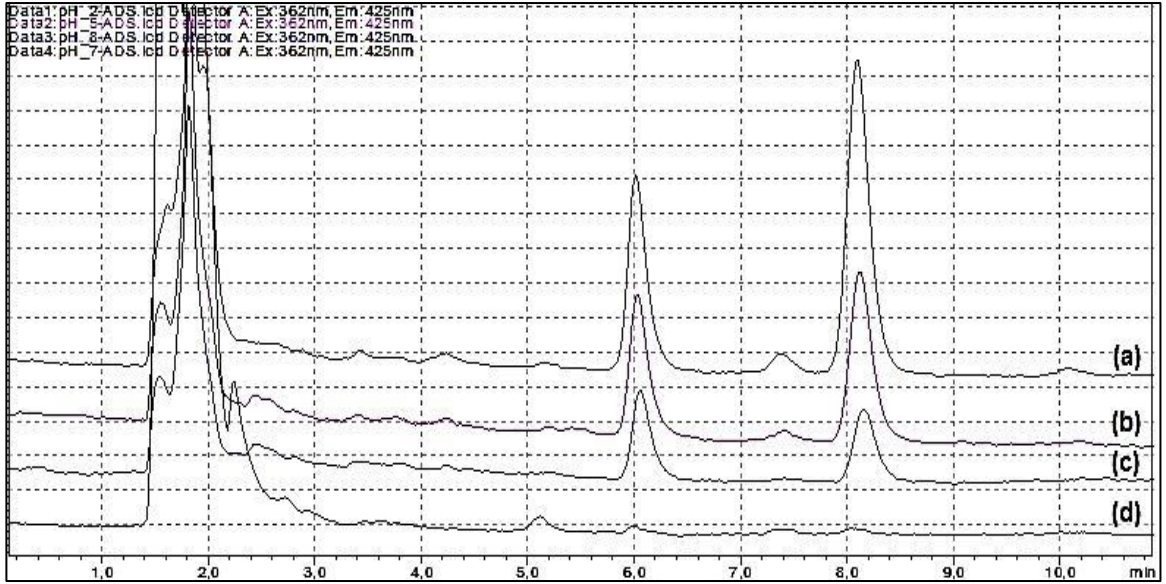
Şekil C.1. Aflatoxin derişiminin etkisi (Bölüm 4.5.1): Adsorpsiyon eflüatı HPLC kromatogramları. (a) 0.1 ng/mL, (b) 1.0 ng/mL, (c) 5.0 ng/mL, (d) 10 ng/mL, (e) 20 ng/mL, (f) 50 ng/mL, (g) 100 ng/mL, (h) 200 ng/mL, (i) 600 ng/mL



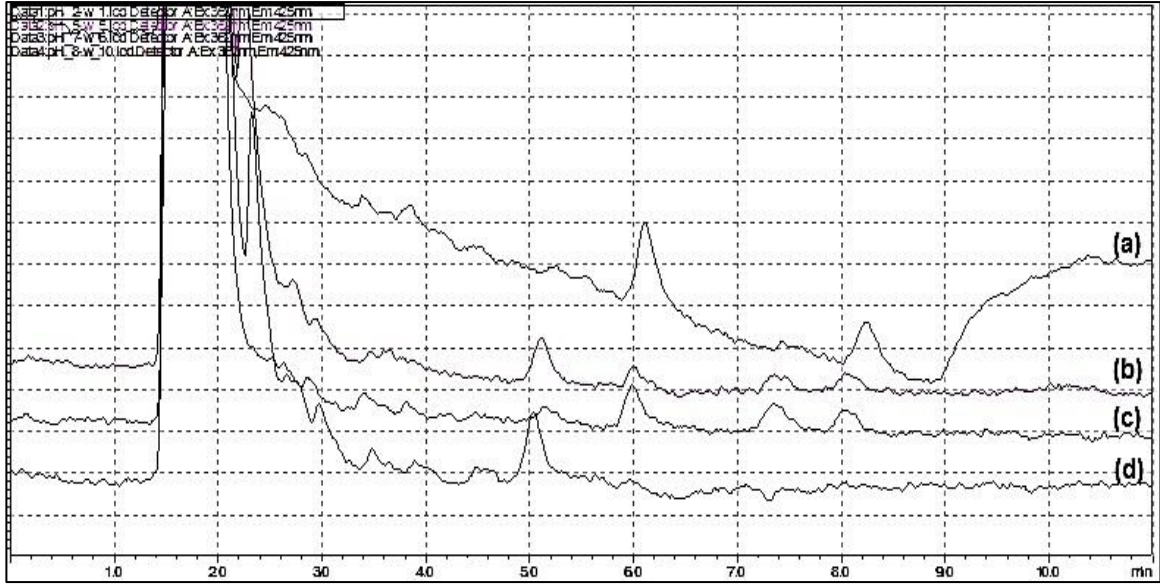
Şekil C.3. Akış hızının etkisi (Bölüm 4.5.2): Adsorpsiyon çözeltisi derişimi: 10 ng/mL. Adsorpsiyon eflüatı HPLC kromatogramları. (a) 0.43 mL/dak, (b) 0.50 mL/dak, (c) 0.75 mL/dak, (d) 1.0 mL/dak, (e) 1.5 mL/dak.



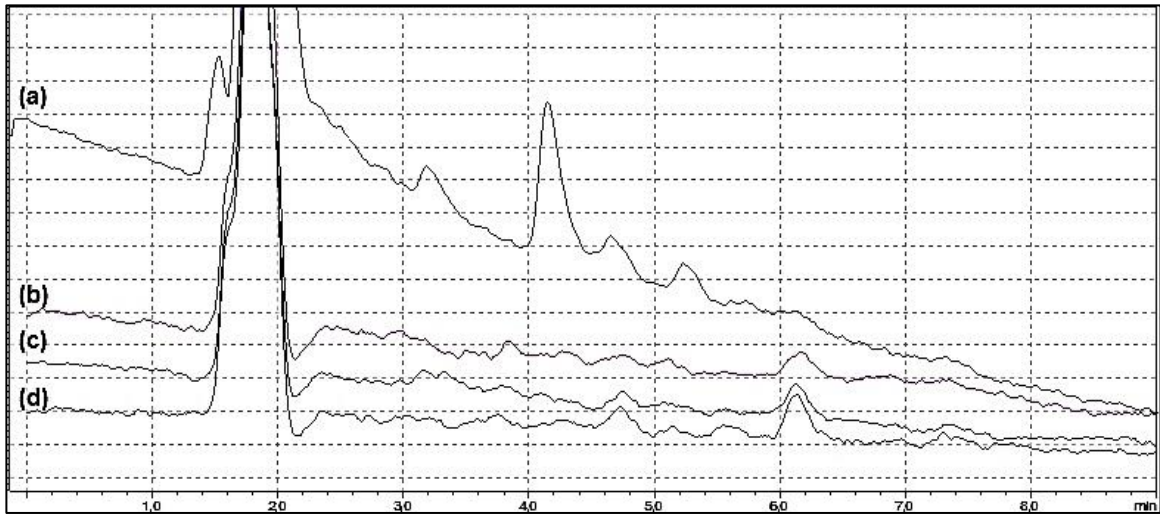
Şekil C.4. Akış hızının etkisi (Bölüm 4.5.2): Adsorpsiyon çözeltisi derişimi: 10 ng/mL. Yıkama eflüatı HPLC kromatogramları. (a) 0.43 mL/dak, (b) 0.5 mL/dak, (c) 0.75 mL/dak, (d) 1.0 mL/dak, (e) 1.5 mL/dak.



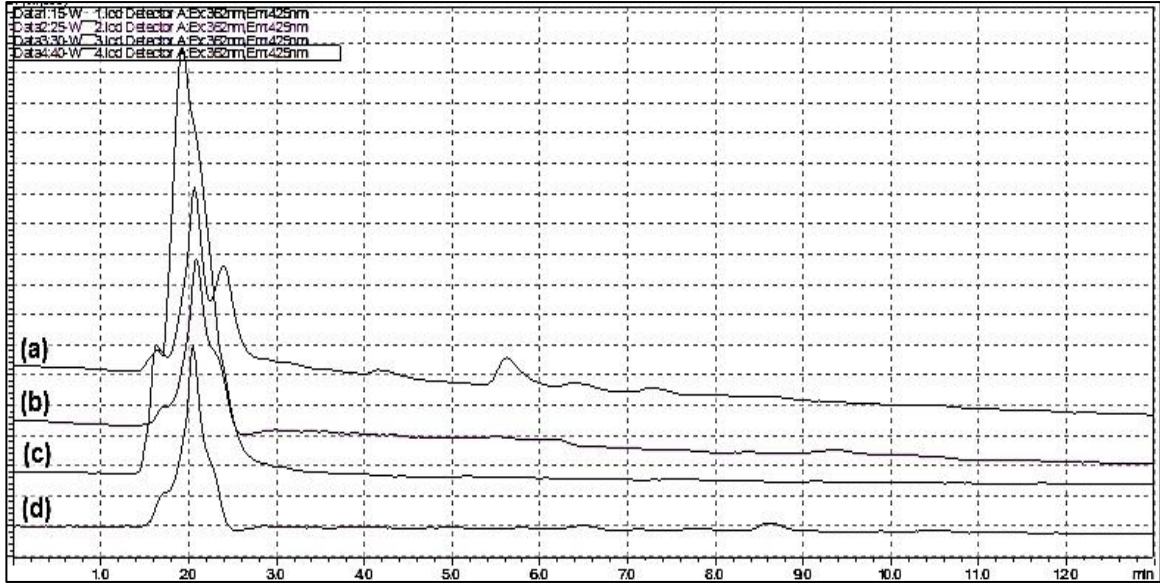
Şekil C.5. Yükleme tamponunun pH değerinin etkisi (Bölüm 4.5.3): Adsorpsiyon çözeltisi derişimi: 10 ng/mL. Adsorpsiyon eflüatı HPLC kromatogramları. (a) pH: 2.0, (b) pH: 5.0, (c) pH: 7.0, (d) pH: 8.0.



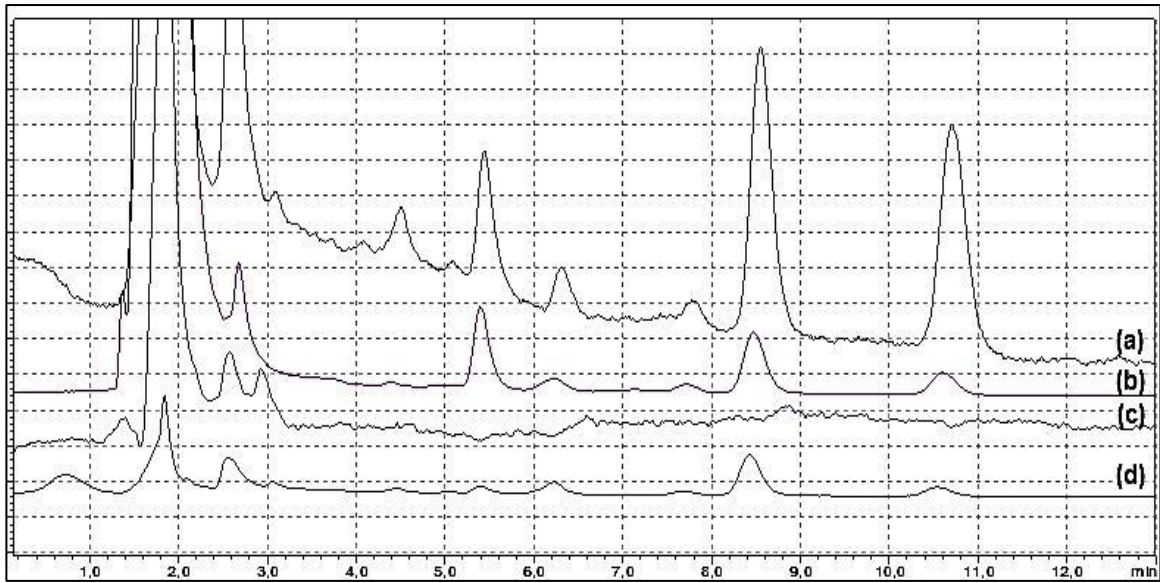
Şekil C.6. Yükleme tamponunun pH değerinin etkisi (Bölüm 4.5.3): Adsorpsiyon çözeltisi derişimi: 10 ng/mL. Yıkama eflüatı HPLC kromatogramları. (a) pH: 2.0, (b) pH: 5.0, (c) pH: 7.0, (d) pH: 8.0.



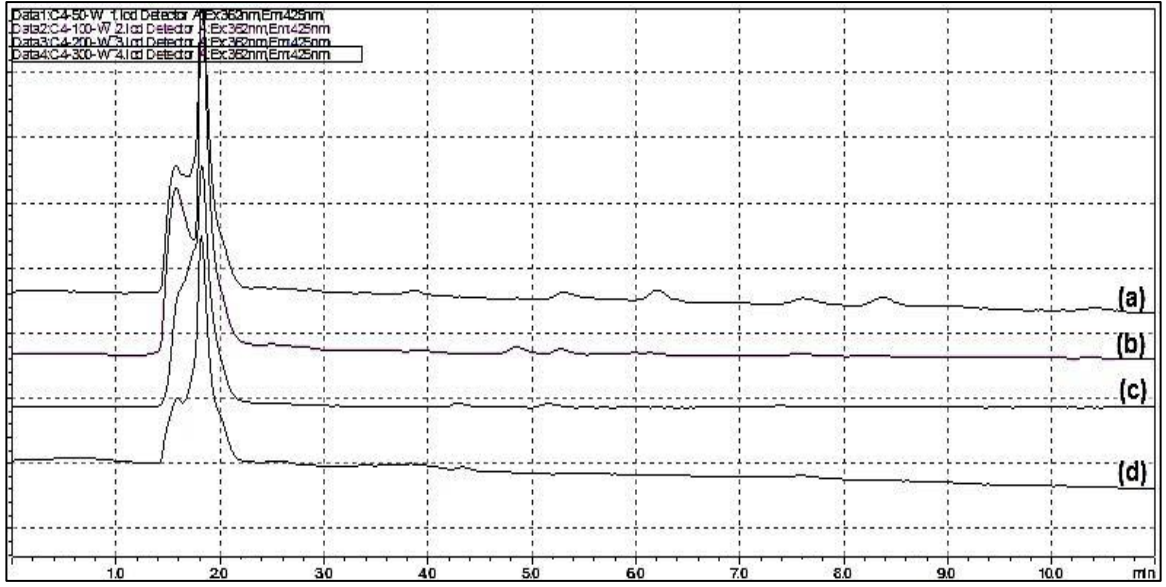
Şekil C.7. Sıcaklığın (T) etkisi (Bölüm 4.5.4): Adsorpsiyon çözeltisi derişimi: 10 ng/mL. Adsorpsiyon eflüatı çözeltisi HPLC kromatogramları. (a) T: 15°C, (b) T: 25°C, (c) T: 30°C, (d) T: 40°C.



Şekil C.8. Sıcaklığın (T) etkisi (Bölüm 4.5.4): Adsorpsiyon çözeltisi derişimi: 10 ng/mL. Yıkama eflüatı HPLC kromatogramları. (a) T: 15°C, (b) T: 25°C, (c) T: 30°C, (d) T: 40°C.

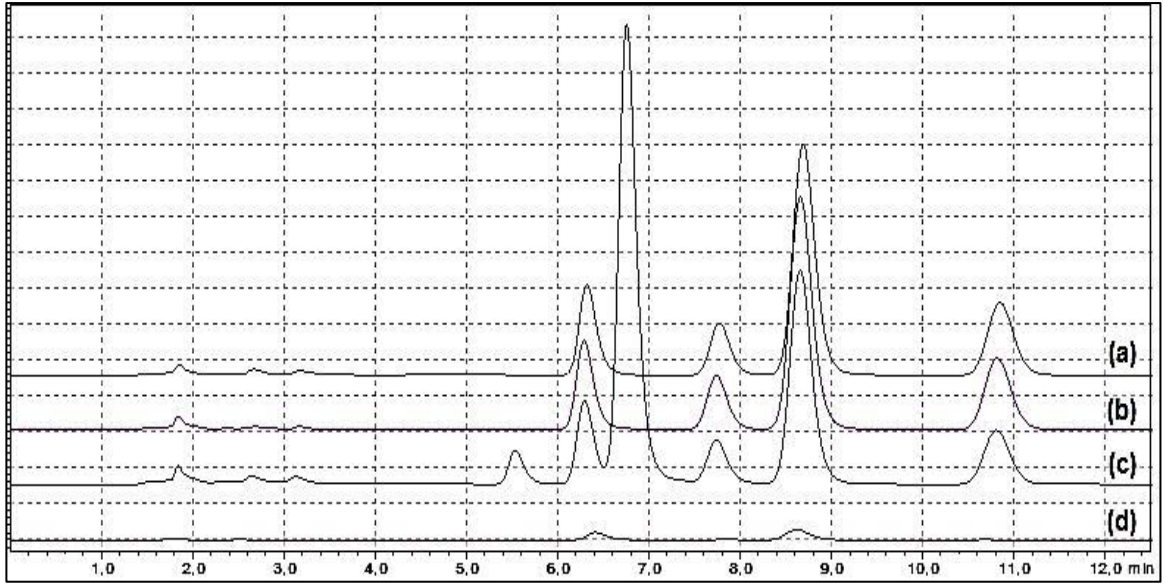


Şekil C.9. AflaMIP kompozitin içerdiği partikül miktarının etkisi (Bölüm 4.5.5): Adsorpsiyon çözeltisi derişimi: 10 ng/mL. Adsorpsiyon eflüatı HPLC kromatogramları. (a) 50mg MIP partikül, (b) 100mg MIP partikül, (c) 200mg MIP partikül, (d) 300mg MIP partikül.

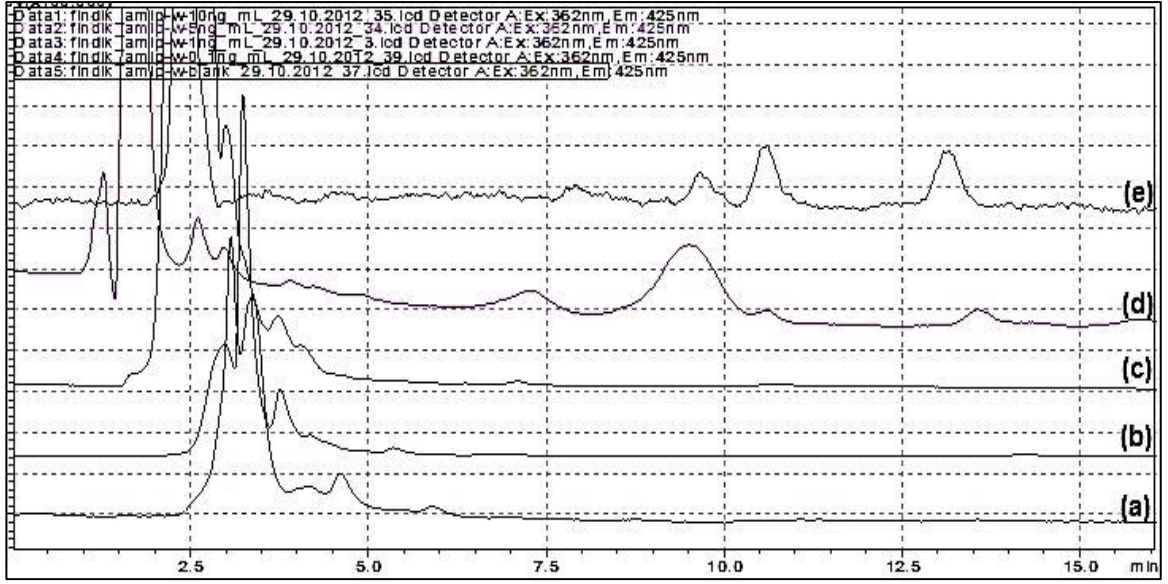


Şekil C.10. AflaMIP kompozitin içerdiği partikül miktarının etkisi (Bölüm 4.5.5): Adsorpsiyon çözeltisi derişimi: 10 ng/mL. Yıkama eflüatı HPLC kromatogramları. (a) 50 mg MIP partikül, (b) 100 mg MIP partikül, (c) 200 mg MIP partikül, (d) 300mg MIP partikül.

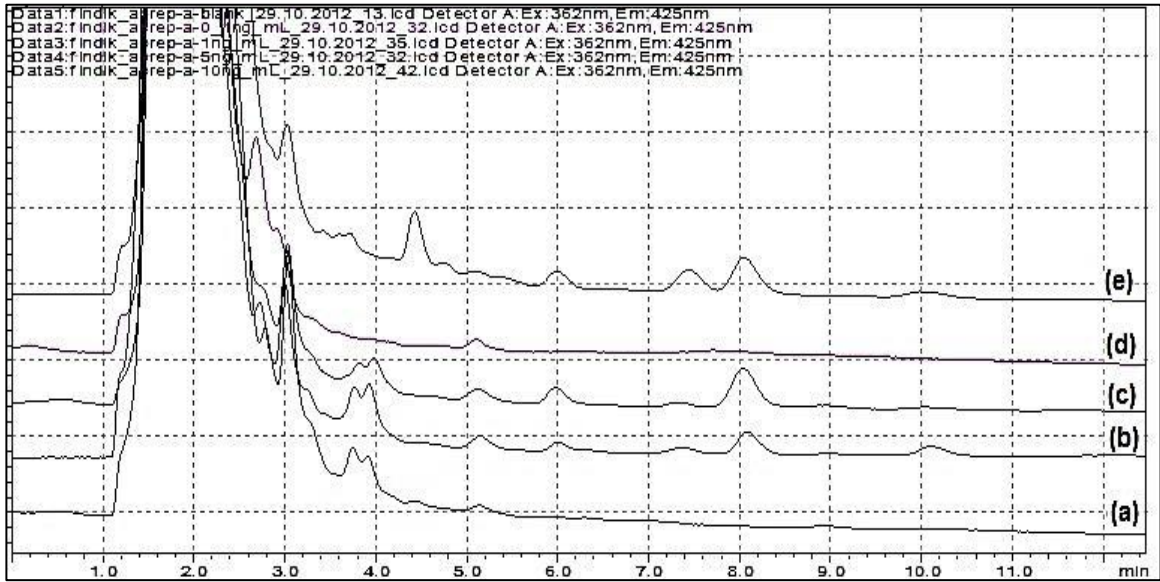
Bölüm 4.6. Seçicilik Deneyleri Kromatogramlar



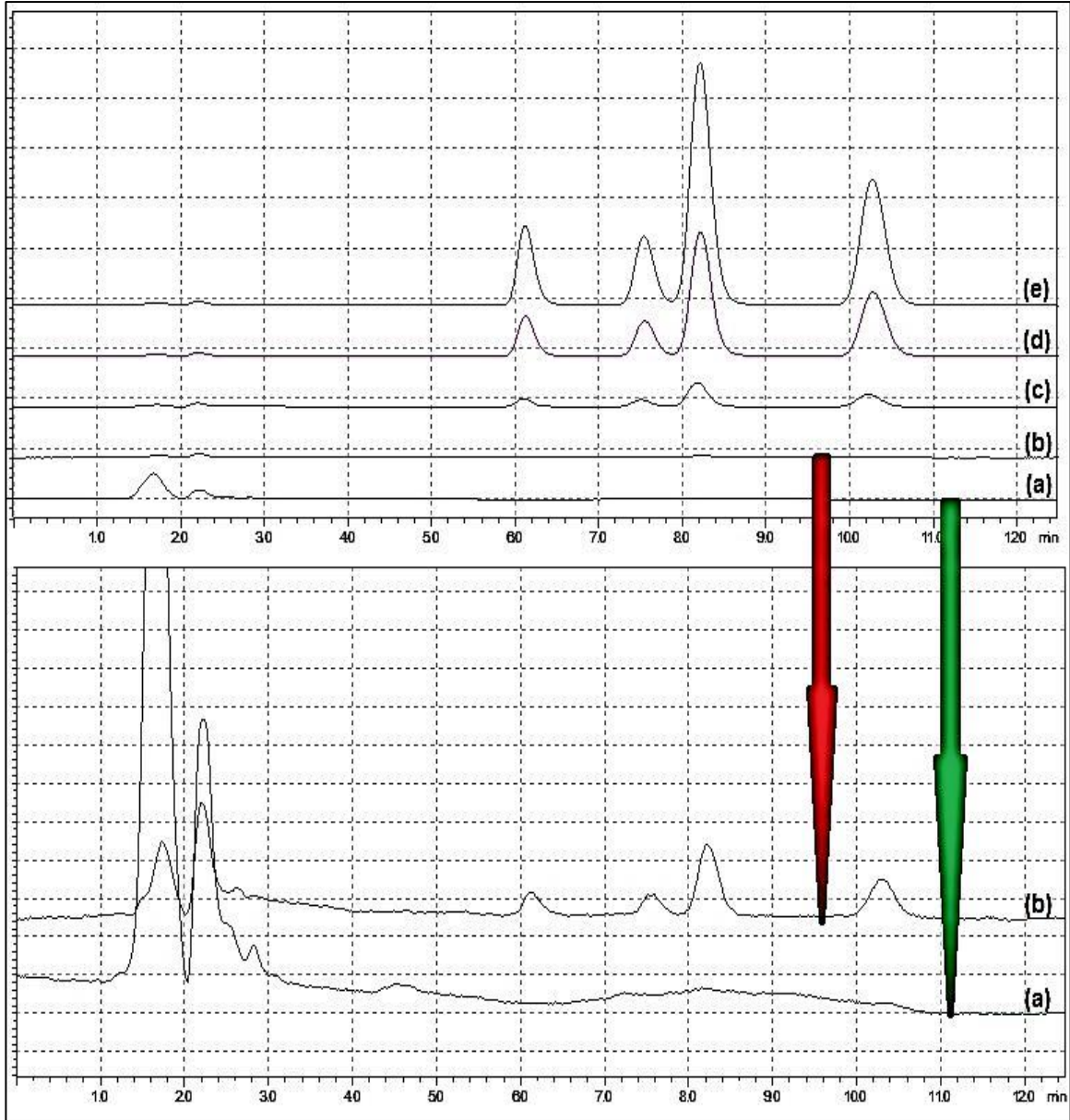
Şekil C.11. Seçicilik deneyleri (Bölüm 4.6): Adsorpsiyon çözeltisi derişimi: 10 ng/mL. Adsorpsiyon eflüatı HPLC kromatogramları. (a) AflaMIP-1, (b) AflaMIP-2, (c) AflaMIP-3, (d) AflaMIP-4.



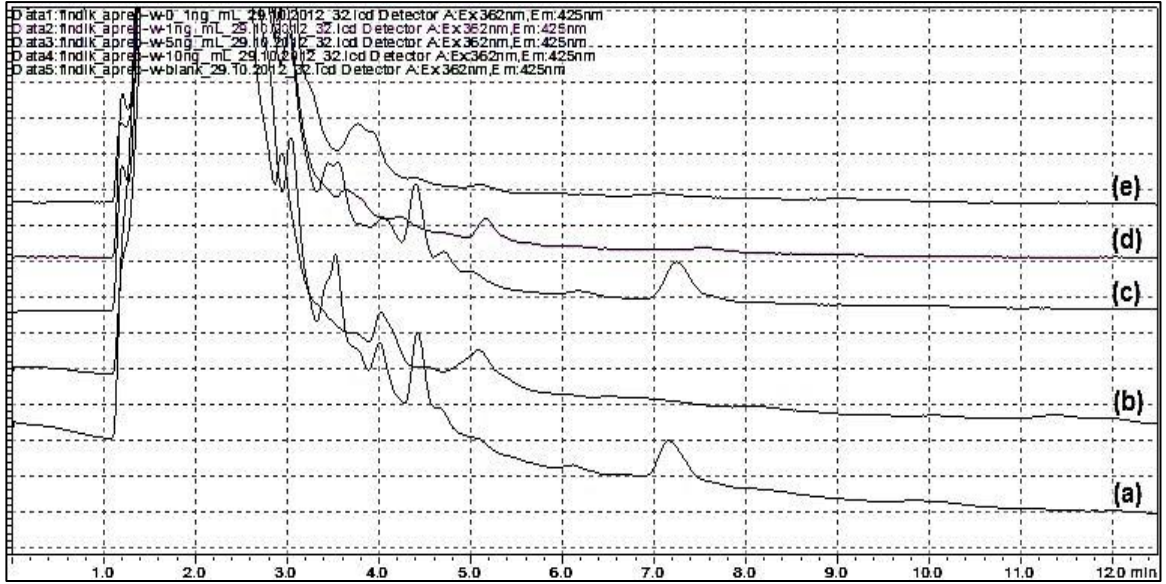
Şekil C.15. Gerçek örneklerden aflatoksin özütlenmesi (Bölüm 4.7): AflaMIP-4 kompozit kriyojel. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş fındık özütlemesi. Yıkama eflüatı HPLC kromatogramları; (a) Aflatoksin içermeyen numune, (b) 0.1 ng/mL, (c) 1.0 ng/mL, (d) 5.0 ng/mL, (e) 10 ng/mL.



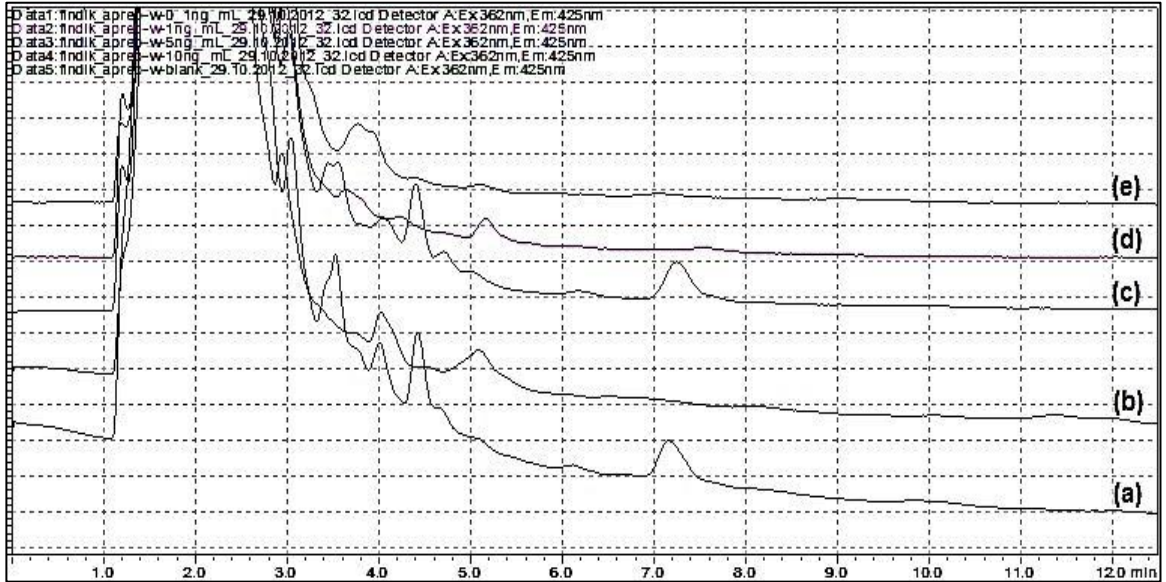
Şekil C.16. Gerçek örneklerden aflatoksin özütlenmesi (Bölüm 4.7): Aflaprep® immunoafinite kolonu. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş fındık özütlemesi. Adsorpsiyon eflüatı HPLC kromatogramları; (a) Aflatoksin içermeyen numune, (b) 0.1 ng/mL, (c) 1.0 ng/mL, (d) 5.0 ng/mL, (e) 10 ng/mL.



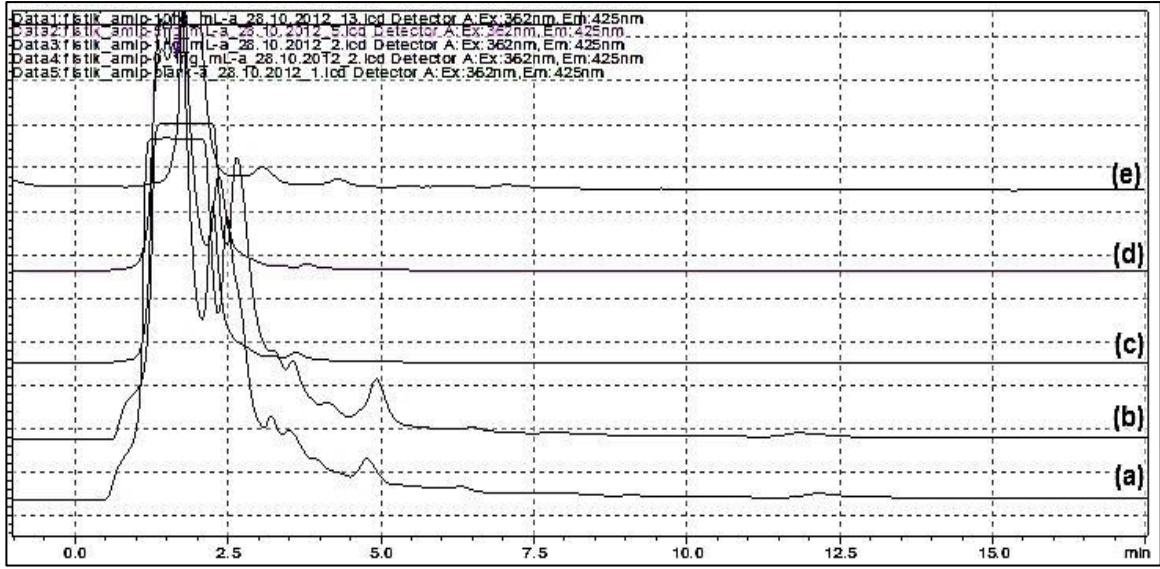
Şekil C.17. Gerçek örneklerden aflatoksin özütlenmesi (Bölüm 4.7): Aflaprep[®] immunoafinite kolonu. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş fındık özütlemesi. Elüat çözeltisi HPLC kromatogramları; (a) Aflatoksin içermeyen numune, (b) 0.1 ng/mL, (c) 1.0 ng/mL, (d) 5.0 ng/mL, (e) 10 ng/mL.



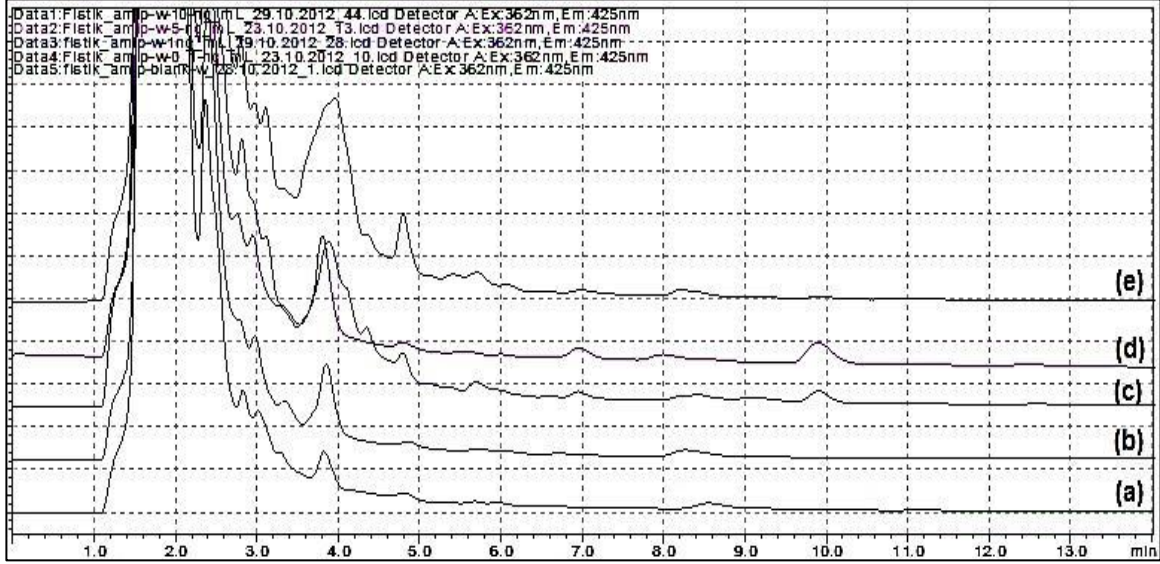
Şekil C. 18. Gerçek örneklerden aflatoxin özütlenmesi (Bölüm 4.7): Aflaprep® immunoafinite kolonu. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoxin standard karışımı eklenmiş fındık özütlemesi. Yıkama eflüatı HPLC kromatogramları; (a) Aflatoxin içermeyen numune, (b) 0.1 ng/mL, (c) 1.0 ng/mL, (d) 5.0 ng/mL, (e) 10 ng/mL.



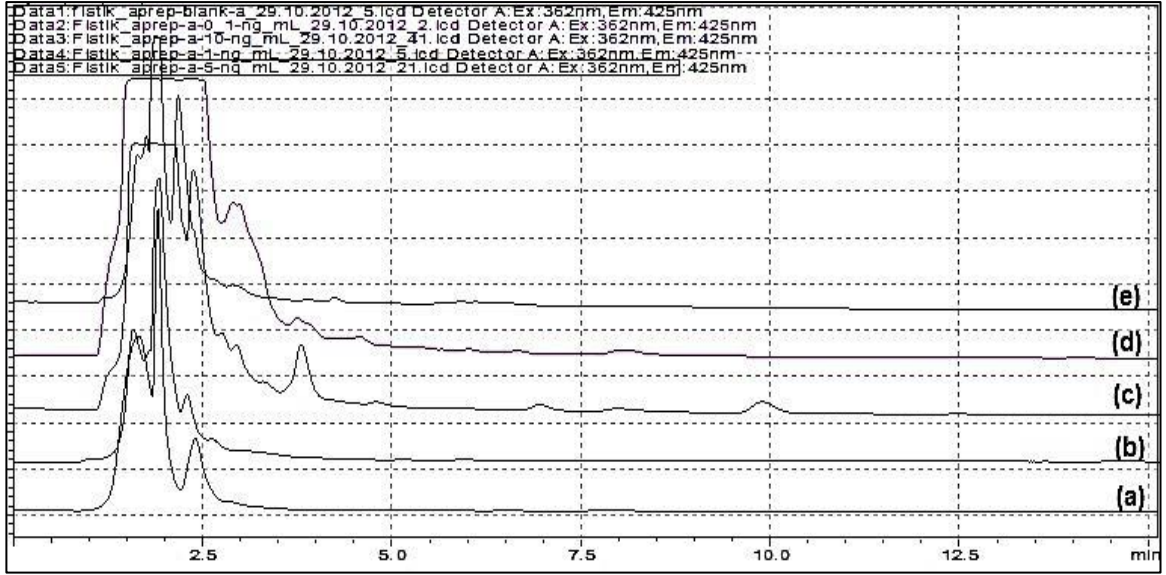
Şekil C.19. Gerçek örneklerden aflatoxin özütlenmesi (Bölüm 4.7): Aflaprep® immunoafinite kolonu. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoxin standard karışımı eklenmiş fındık özütlemesi. Yıkama eflüatı HPLC kromatogramları; (a) Aflatoxin içermeyen numune, (b) 0.1 ng/mL, (c) 1.0 ng/mL, (d) 5.0 ng/mL, (e) 10 ng/mL.



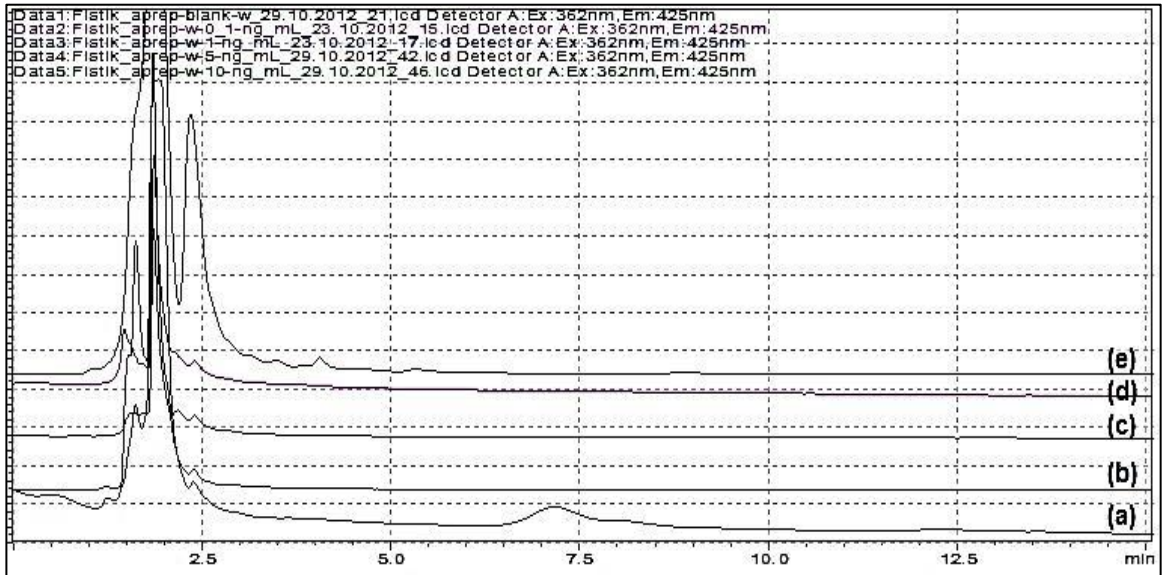
Şekil C.20. Gerçek örneklerden aflatoxin özütlenmesi (Bölüm 4.7): AflaMIP-4 kompozit kriyojel. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoxin standard karışımı eklenmiş fıstık özütlemesi. Adsorpsiyon eflüatı HPLC kromatogramları; (a) Aflatoxin içermeyen numune, (b) 0.1 ng/mL, (c) 1.0 ng/mL, (d) 5.0 ng/mL, (e) 10 ng/mL.



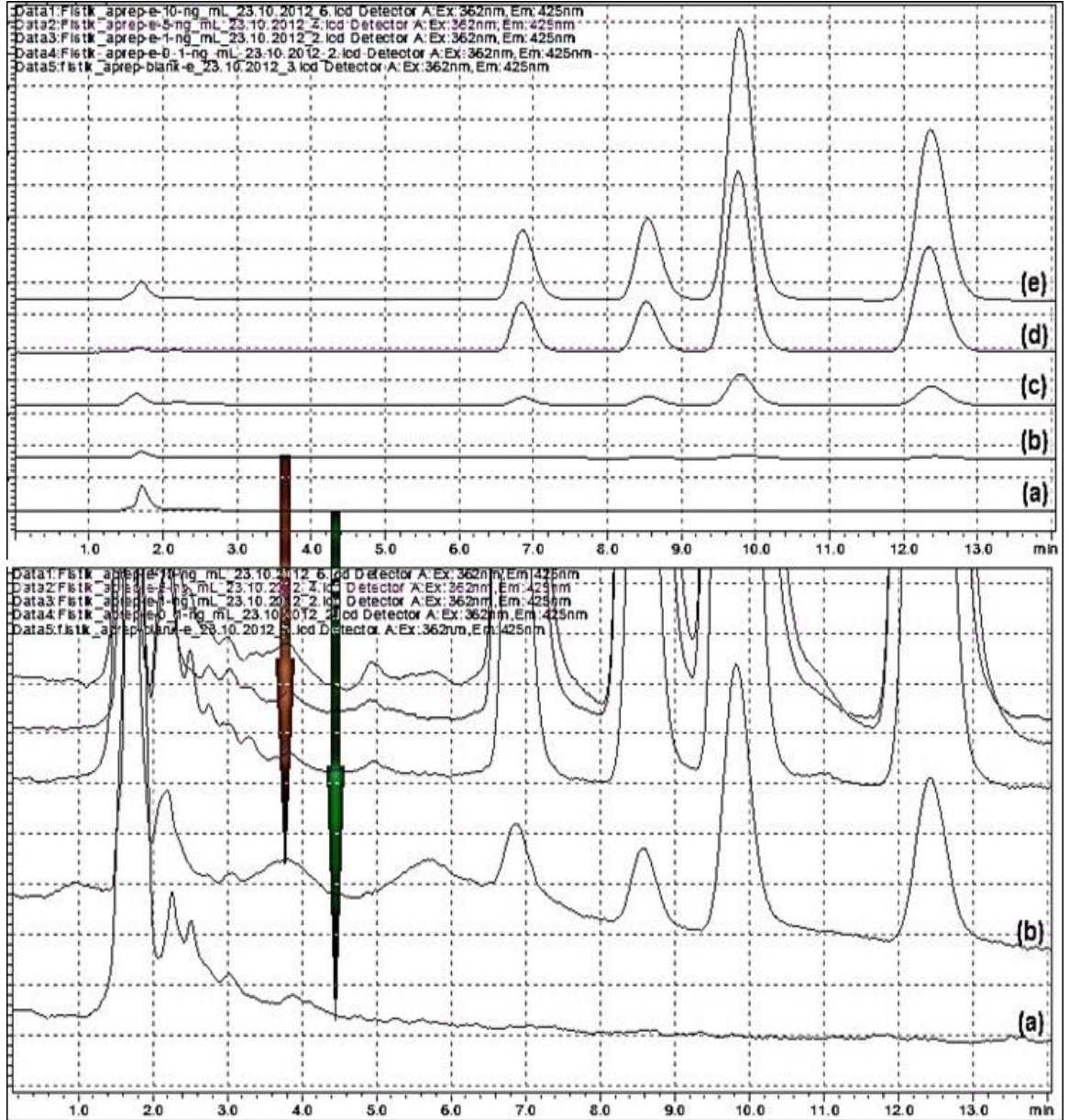
Şekil C.21. Gerçek örneklerden aflatoxin özütlenmesi (Bölüm 4.7): AflaMIP-4 kompozit kriyojel. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoxin standard karışımı eklenmiş fıstık özütlemesi. Yıkama eflüatı HPLC kromatogramları; (a) Aflatoxin içermeyen numune, (b) 0.1 ng/mL, (c) 1.0 ng/mL, (d) 5.0 ng/mL, (e) 10 ng/mL.



Şekil C.22. Gerçek örneklerden aflatoksin özütlenmesi (Bölüm 4.7): Aflaprep® immunoafinite kolonu. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş fıstık özütlemesi. Adsorpsiyon eflüatı HPLC kromatogramları; (a) Aflatoksin içermeyen numune, (b) 0.1 ng/mL, (c) 1.0 ng/mL, (d) 5.0 ng/mL, (e) 10 ng/mL.



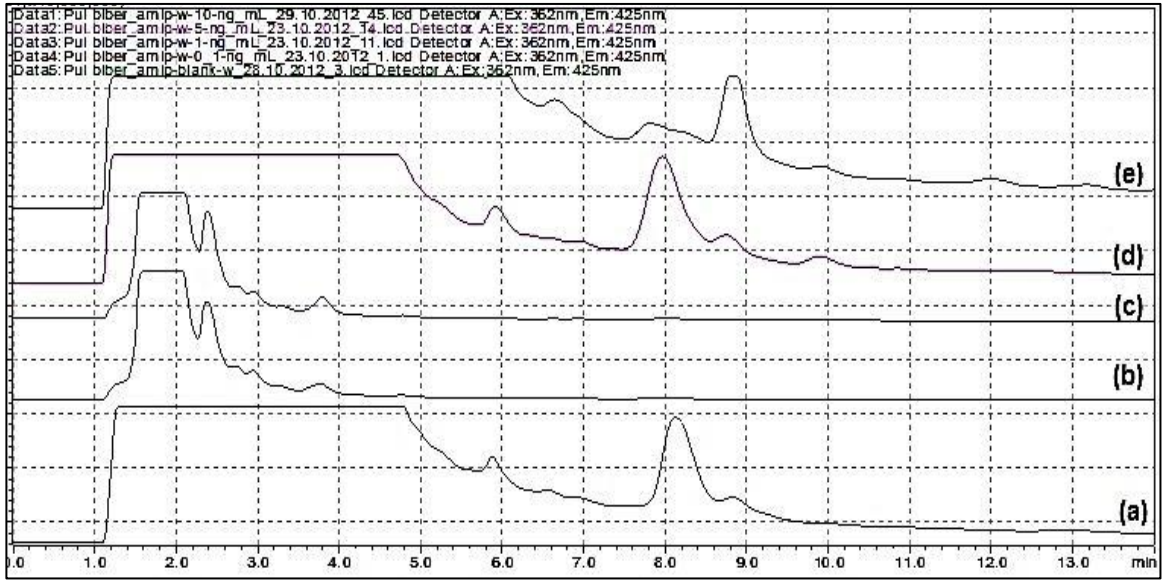
Şekil C.23. Gerçek örneklerden aflatoksin özütlenmesi (Bölüm 4.7): Aflaprep® immunoafinite kolonu. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş fıstık özütlemesi. Yıkama eflüatı HPLC kromatogramları; (a) Aflatoksin içermeyen numune, (b) 0.1 ng/mL, (c) 1.0 ng/mL, (d) 5.0 ng/mL, (e) 10 ng/mL.



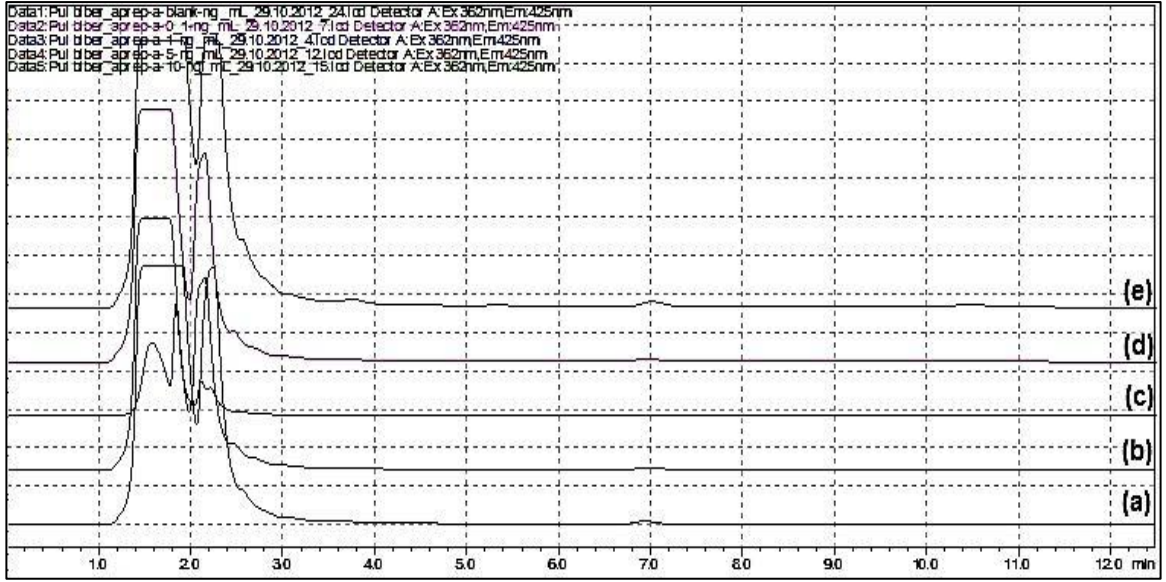
Şekil C.24. Gerçek örneklerden aflatoksin özütlenmesi (Bölüm 4.7): Aflaprep[®] immunoafinite kolonu. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş fıstık özütlemesi. Elüat çözeltisi HPLC kromatogramları; (a) Aflatoksin içermeyen numune, (b) 0.1 ng/mL, (c) 1.0 ng/mL, (d) 5.0 ng/mL, (e) 10 ng/mL.



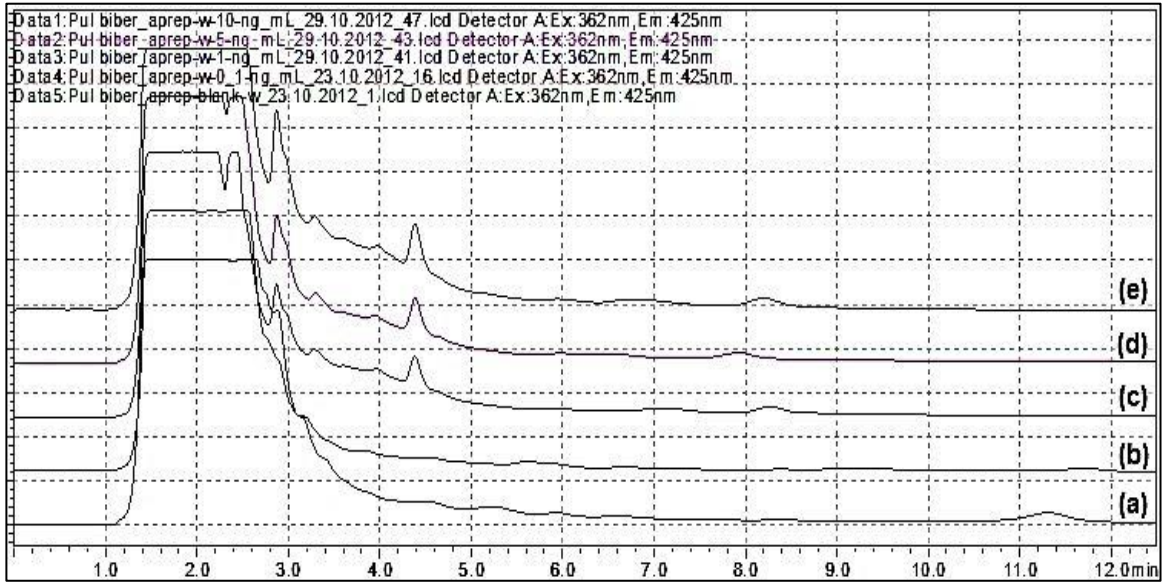
Şekil C.25. Gerçek örneklerden aflatoksin özütlenmesi (Bölüm 4.7): AflaMIP-4 kompozit kriyojel. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş pul biber özütlemesi. Adsorpsiyon eflüatı HPLC kromatogramları; (a) Düşük derişimde aflatoksin içeren numune, (b) 0.1 ng/mL, (c) 1.0 ng /mL, (d) 5.0 ng/mL, (e) 10 ng/mL.



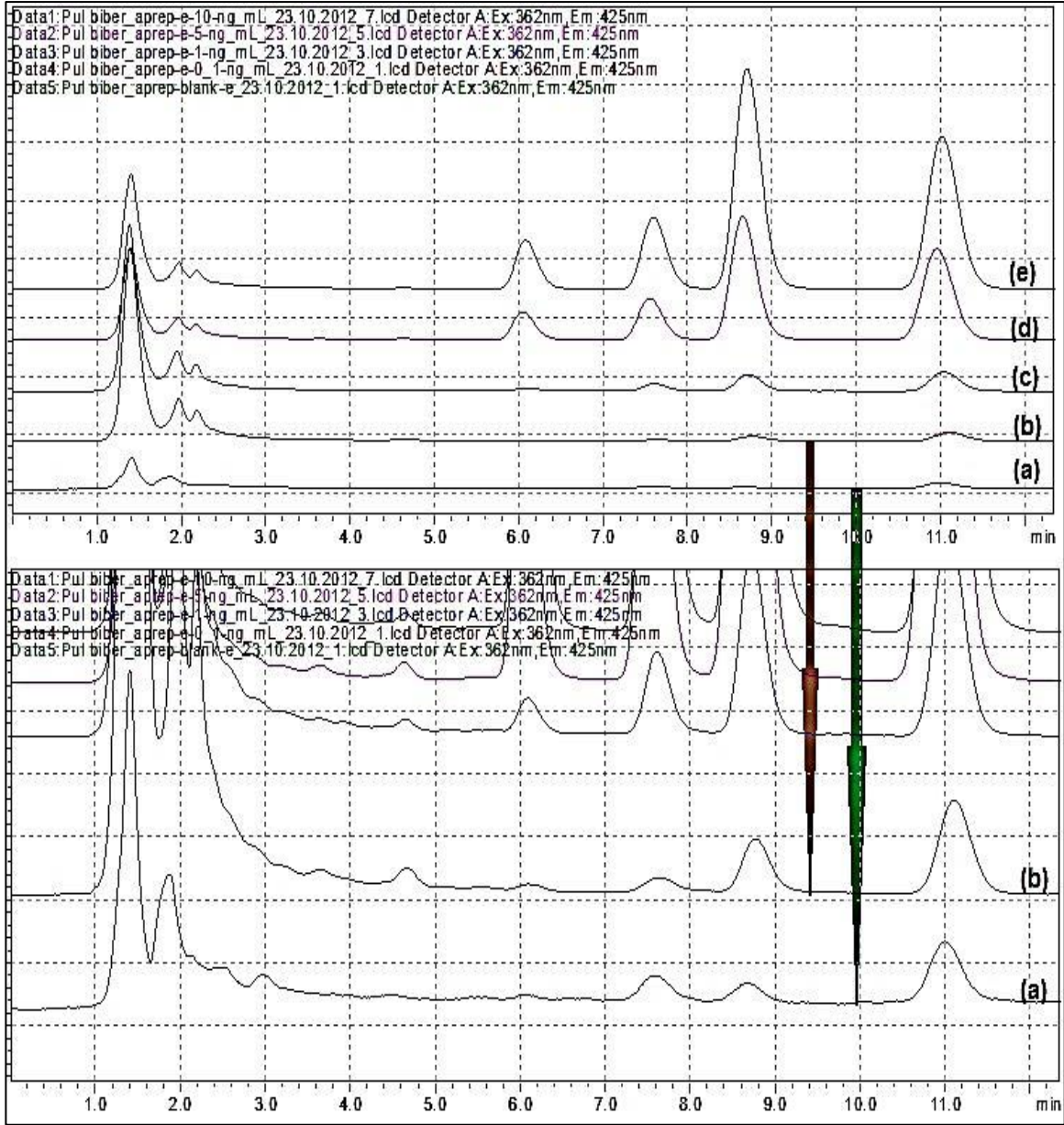
Şekil C.26. Gerçek örneklerden aflatoksin özütlenmesi (Bölüm 4.7): AflaMIP-4 kompozit kriyojel. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş pul biber özütlemesi. Yıkama eflüatı HPLC kromatogramları; (a) Düşük derişimde aflatoksin içeren numune, (b) 0.1 ng/mL, (c) 1.0 ng/mL, (d) 5.0 ng/mL, (e) 10 ng/mL.



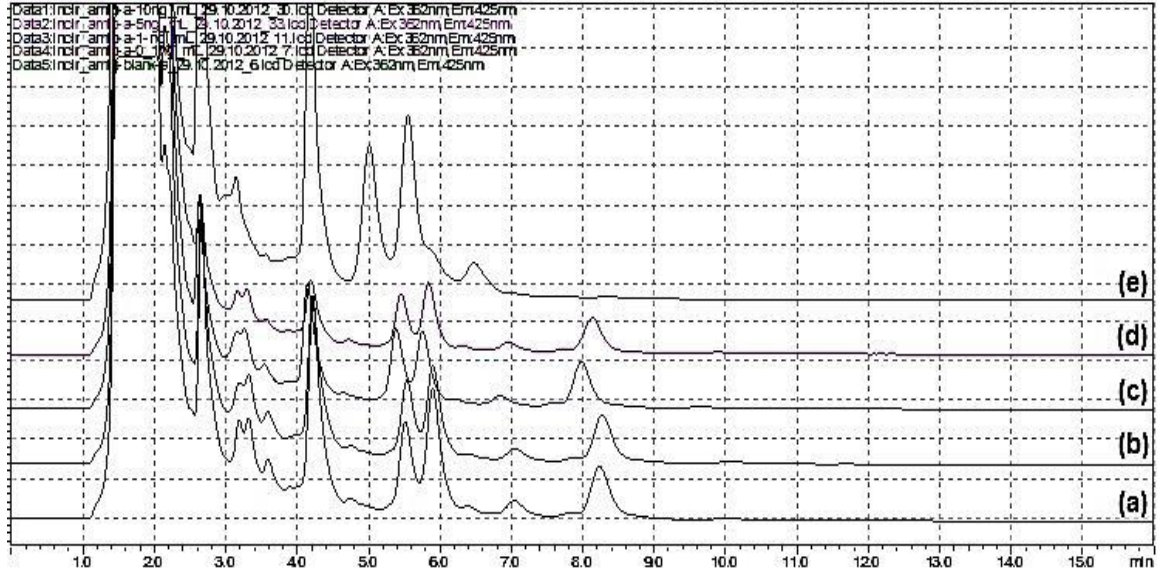
Şekil C.27. Gerçek örneklerden aflatoksin özütlenmesi (Bölüm 4.7): Aflaprep® immunoafinite kolonu. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş pul biber özütlemesi. Adsorpsiyon eflüatı HPLC kromatogramları; (a) Düşük derişimde aflatoksin içeren numune, (b) 0.1 ng/mL, (c) 1.0 ng/mL, (d) 5.0 ng/mL, (e) 10 ng/mL.



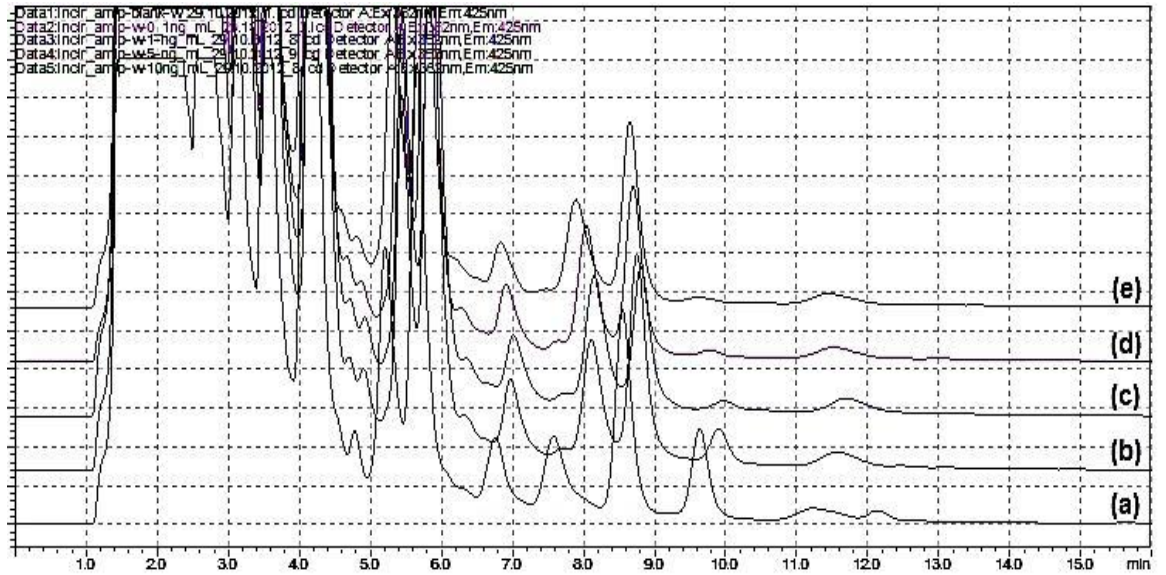
Şekil C.28. Gerçek örneklerden aflatoksin özütlenmesi (Bölüm 4.7): Aflaprep® immunoafinite kolonu. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş pul biber özütlemesi. Yıkama eflüatı HPLC kromatogramları; (a) Düşük derişimde aflatoksin içeren numune, (b) 0.1 ng/mL, (c) 1.0 ng/mL, (d) 5.0 ng/mL, (e) 10 ng/mL.



Şekil C.29. Gerçek örneklerden aflatoksin özütlenmesi (Bölüm 4.7): Aflaprep® immunoafinite kolonu. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş pul biber özütlemesi. Elüat çözeltisi HPLC kromatogramları; (a) Düşük derişimde aflatoksin içeren numune, (b) 0.1 ng/mL, (c) 1.0 ng/mL, (d) 5.0 ng/mL, (e) 10 ng/mL.



Şekil C.30. Gerçek örneklerden aflatoksin özütlenmesi (Bölüm 4.7): AflaMIP-4 kompozit kriyojel. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş kuru incir özütlemesi. Adsorpsiyon eflüatı HPLC kromatogramları; (a) Düşük derişimde aflatoksin içeren numune, (b) 0.1 ng/mL, (c) 1.0 ng/mL, (d) 5.0 ng/mL, (e) 10 ng/mL.



Şekil C.31. Gerçek örneklerden aflatoksin özütlenmesi (Bölüm 4.7): AflaMIP-4 kompozit kriyojel. Numune: Çeşitli derişimlerde aflatoksin standard karışımı eklenmiş kuru incir özütlemesi. Yıkama eflüatı HPLC kromatogramları; (a) Düşük derişimde aflatoksin içeren numune, (b) 0.1 ng/mL, (c) 1.0 ng/mL, (d) 5.0 ng/mL, (e) 10 ng/mL.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Engin BAYRAM
Doğum Yeri : Tatvan
Medeni Hali : Evli
E-posta : enginbayram@antteknik.com
Adresi : Aşağıöveçler M. 1314 C. 25/3 Çankaya/ANKARA

Eğitim

Lise : İnegöl Lisesi
Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya ABD
Doktora : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya ABD

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : İyi düzeyde

İş Deneyimi

Betamed Tıbbi Mlz. Ltd. Şti. (2004-2007),

Antteknik Cih. Ltd. Şti. (2007-)

Deneyim Alanları

Analitik Cihazlar (Kromatografi; HPLC, GC, LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS, GC-MS/MS, LC-TOF), kurulum, eğitim ve uygulamaları.

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu İle Katıldığı Toplantılar

Moleküler Baskılama Temelli Aflatoksin Ekstraksiyon Kartuşlarının Tasarımı.

Kromatografi 2012, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat.