

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**UHPLC-MS/MS KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE PİRİNÇ VE YULAF
ÖRNEKLERİNDE ÇOKLU MİKOTOKSİN TESPİTİNE YÖNELİK ANALİZ
METODU GELİŞTİRİLMESİ**

Meryem YILDIZ ÖCAL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

OCAK 2021

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**UHPLC-MS/MS KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE PİRİNÇ VE YULAF
ÖRNEKLERİNDE ÇOKLU MİKOTOKSİN TESPİTİNE YÖNELİK ANALİZ
METODU GELİŞTİRİLMESİ**

Meryem YILDIZ ÖCAL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

OCAK 2021

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**UHPLC-MS/MS KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE PİRİNÇ VE YULAF
ÖRNEKLERİNDE ÇOKLU MİKOTOKSİN TESPİTİNE YÖNELİK ANALİZ
METODU GELİŞTİRİLMESİ**

Meryem YILDIZ ÖCAL

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FDK-2018-3220 nolu proje ile desteklenmiştir.**

OCAK 2021

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

UHPLC-MS/MS KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE PİRİNÇ VE YULAF
ÖRNEKLERİNDE ÇOKLU MİKOTOKSİN TESPİTİNE YÖNELİK ANALİZ
METODU GELİŞTİRİLMESİ

Meryem YILDIZ ÖCAL
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez 21/01/2021 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Muharrem CERTEL (Danışman)
Prof. Dr. Mustafa ERBAŞ
Prof. Dr. Yahya TÜLEK
Prof. Dr. Hülya GÜL
Doç. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

ÖZET

UHPLC-MS/MS KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE PİRİNÇ VE YULAF ÖRNEKLERİNDE ÇOKLU MİKOTOKSİN TESPİTİNE YÖNELİK ANALİZ METODU GELİŞTİRİLMESİ

Meryem YILDIZ ÖCAL

Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Muharrem CERTEL

Ocak 2021; 177 sayfa

Bu çalışmada, pirinç ve yulaf örneklerinde eser miktarda bulunabilecek 8 tane mikotoksin ve metabolitinin kalıntılarının ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresinde (UHPLC-MS/MS) analizi için yeni bir metot geliştirilmiştir. Analitler, “seyrelt ve enjekte et (dilute and shoot)” ve QuEChERS ekstraksiyonu kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Geliştirilen analiz yönteminin güvenilirliğini test etmek amacıyla metot validasyonu yapılmıştır. Seyrelt ve enjekte et yönteminde en yüksek verimi elde etmek için çözgen bileşimi ve hacmi, çalkalama süresi ve hızı parametreleri optimize edilmiştir. QuEChERS ekstraksiyonu EN 15662 standart yöntemine göre yapılmıştır. Sıvı kromatografisi kısmında hareketli fazın bileşimi, akış hızı, kolon sıcaklığı, enjeksiyon hacmi ve gradyan bileşimi parametreleri açısından en uygun koşullar belirlenmiştir. Kütle spektrometresinde ise analitlerin yüksek seçicilikte ve hassasiyette tespit edilebilmesi için sheath ve yardımcı gazlarının akış hızları, kapiler ve buharlaştırma sıcaklıkları ve sprey voltajı parametreleri optimize edilmiştir. Metot validasyonunda doğrusallık ve ölçüm aralığı, seçicilik, tespit limiti, tayin limiti, doğruluk ve kesinlik parametreleri belirlenmiştir.

Araştırma sonucunda, 1. Basamak QuEChERS yöntemi ile analitlerin en fazla %99,0’u ekstrakte edilebilirken, seyrelt ve enjekte et yönteminde bu oran %98,4’dür. Her iki yöntemde geri kazanım değerlerinin ve bağıl standart sapma değerlerinin birbirine yakın olması seyrelt ve enjekte et yönteminin başarılı bir şekilde QuEChERS yöntemi yerine kullanılabileceğini ve böylece ekstraksiyon kiti maliyetinden tasarruf edilebileceğini göstermektedir. Ayrıca her iki yöntemde de temizleme aşaması olmadan örneklerin hazırlanması ile zamandan ve maliyetten tasarruf edilmiştir. Metot validasyonu sonucunda elde edilen veriler, analiz yönteminin eser miktarda analitlerin yüksek seçicilik, doğruluk ve kesinlikte analizi için uygun olduğunu göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Mikotoksin, QuEChERS, Seyrelt ve enjekte et, UHPLC-MS/MS, Validasyon

JÜRİ: Prof. Dr. Muharrem CERTEL

Prof. Dr. Mustafa ERBAŞ

Prof. Dr. Yahya TÜLEK

Prof. Dr. Hülya GÜL

Doç. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF AN ANALYSIS METHOD FOR DETERMINATION OF RESIDUES AND METABOLITE IN RICE AND OAT BY ULTRA-HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED TO TANDEM MASS SPECTROMETRY

Meryem YILDIZ ÖCAL

PhD Thesis in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Muharrem CERTEL

January 2021; 177 pages

In this study, a new method was developed for the analysis of the residues and their metabolites of 8 mycotoxins in rice and oat by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. All analytes were extracted using “dilute and shoot” and first step QuEChERS extraction. The developed method was validated to test the reliability of the analyses. Solvent composition and volume, shaker speed and time were optimized in dilute and shoot method to obtain the highest yield. QuEChERS extraction was performed according to EN 15662 method. The optimum conditions were determined in terms of composition of the mobile phase, flow rate, column temperature, injection volume and gradient composition in liquid chromatography. Sheath and auxiliary gas flow rates, capillary and vaporizer temperatures and spray voltage were optimized to detect the analytes in high selectivity and sensitivity in mass spectrometry. Linearity, dynamic range, selectivity, limit of detection, limit of quantification, accuracy and precision were determined in method validation.

As a result of the research, while maximum 99.0% of the analytes can be extracted with the 1st Step QuEChERS method, this rate is 98.4% in the dilute and shoot method. The fact that the recovery values and relative standard deviation values are close to each other in both methods indicates that the dilute and shoot method can be used successfully instead of the QuEChERS method, thus saving the cost of the extraction kit. In addition, in both methods, time and cost were saved by preparing samples without a cleaning step. Data obtained as a result of method validation showed that this method is suitable for analysis of trace amounts of analytes with high selectivity, accuracy and precision.

KEYWORDS: Dilute and shoot, Multi-mycotoxin, QuEChERS, UHPLC-MS/MS, Validation

COMMITTEE: Prof. Dr. Muharrem CERTEL

Prof. Dr. Mustafa ERBAŞ

Prof. Dr. Yahya TÜLEK

Prof. Dr. Hülya GÜL

Assoc. Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

ÖNSÖZ

Gıda güvenirliliği, gıdalarda olabilecek fiziksel, kimyasal, biyolojik ve her türlü zararların bertaraf edilmesi için alınan tedbirlerin bütünüdür. Bu amaçla ham maddeden başlayarak gıdanın tüketimine kadar tüm aşamalarda kontrollerin yapılarak uygun tedbirlerin alınması gerekmektedir. Günümüzde gıda maddelerinin daha güvenli bir şekilde tüketilebilmesi için gerekli uygulamaların yapılmasına rağmen piyasa kontrollerinde gıdaların sıklıkla mikotoksinlerle kontamine olduğu ve tüketicilerin gıda kaynaklı hastalıklara maruz kaldığı görülmektedir.

Gıda ve tarım ürünlerinde mikotoksin kalıntısı ciddi ve tüm dünyada yaygın bir sorundur. Mikotoksin kalıntıları, gıda güvenliği kapsamında tüketici sağlığını olumsuz yönde etkileyen etkenlerden bir tanesidir. Mikotoksinler zehirli kimyasal bileşiklerdir ve küf veya mantarlar tarafından ikincil metabolit olarak üretilmektedir. Bu mikotoksinler gıda ve yem maddelerinde oluşur ve insan ve hayvan sağlığı için büyük öneme sahiptirler. Gıdalarda mikotoksin kalıntıları yetersiz hasat uygulamaları, yanlış kurutma, paketlenme ve uygun olmayan depolama ve taşıma koşulları sonucunda ortaya çıkmaktadır. Mikotoksinler insan ve hayvan sağlığını tehdit etmekte, gıda ve yemlerin israfına bağlı olarak ekonomik kayıplara neden olmakta ve bunun sonucunda uluslararası ticareti engellemektedir. Tüm bu sorunların çözümü için öncelikle mikotoksin oluşumunu engelleyen uygun yöntemlerin geliştirilmesi, yasal düzenlemeler ve mikotoksin problemini hafifletmek için bazı uygulamaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Uygun olmayan koşullarda üretilen ve depolanan ürünlerde mikotoksin kalıntısına rastlanmaktadır. Bu durum insan sağlığı yanında ülke ekonomisini de olumsuz yönde etkilemektedir. Gıdaların uygun olmayan şekilde hasatı ve sonrasında yanlış muhafazası sonucunda gıdalarda oluşacak mikotoksin kalıntıların tespit edilmesi gıda güvenliğini ve buna bağlı olarak insan ve hayvan sağlığını korumak amacıyla üzerinde durulması gereken çok önemli bir konudur. Bu yüzden gıdalarda bulunan kalıntıların kontrolü ve tespiti için güvenilir analitik metotlara ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada, gıdalarda özellikle eser miktarda bulunan kalıntıları yüksek doğrulukta ve kesinlikte tespit edecek uygun analiz yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. İnsanların günlük tüketiminde önemli bir yer tutan pirinç ve son yıllarda yüksek besin değerine sahip olması ve diyet besin olarak tüketimi yaygınlaşan ve ayrıca hayvan yemi olarak da kullanılan yulafta bulunabilecek kalıntıların analizi üzerinde durulmuştur. Çalışmamızda pirinç ve yulafta bulunması muhtemel ve insan ve hayvan sağlığı için tehlike oluşturabilecek mikotoksin ve metabolitin tandem kütle spektrometresi ile analizi gerçekleştirilmiştir. Örnek hazırlama aşaması, analitik yöntemin istenilen amaca uygun olarak başarılı bir şekilde uygulanması açısından önemlidir. Bu amaçla, çalışmamızda ilgili analitlerin gıda matriksinden yüksek verimde ekstrakte edilmesi amacıyla seyrelt ve enjekte et (dilute and shoot) ekstraksiyonu ve 1. basamak QuEChERS ekstraksiyonu kullanılmıştır.

Tez çalışmam sırasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Muharrem CERTEL'e, çalışmam sırasında görüş ve önerileri ile bana yol gösteren tez izleme komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. Mustafa ERBAŞ'a (Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi) ve Doç Dr. Mehmet Fatih CENGİZ'e (Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi), *A. versicolor* küfünün tez çalışması kapsamında

kullanımına olanak sağlayan Prof. Dr. Ahmet ASAN'a (Trakya Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyoloji Bölümü), kütle spektrometresinde yaptığım analizlerde değerli görüşleri ve teknik destekleri ile bana yardımcı olan Sayın Öğretim Görevlisi Dr. Timur TONGUR'a (Akdeniz Üniversitesi Fen Fakóltesi) ve Öğr. Gör. Taner ERKAYMAZ'a (Süleyman Demirel Üniversitesi Gül ve Gül Ürünleri Araştırma ve Uygulama Merkezi), tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Dr. Öğr. Ü. Ülgen İlknur KONAK'a (Avrasya Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakóltesi Gıda Mühendisliği Bölümü) ve Öğr. Gör. Dr. H. Aydan YATMAZ'a (Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi), her konuda bilgisiyle yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Ü. Fundagül EREM'e (Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Mühendislik Fakóltesi Gıda Mühendisliği Bölümü), tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Fatma ERSÖZ'e (Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakóltesi), tez yazımı süresince bana bilgisi ile yardımcı olan Gıda Mühendisi Nisa DURAK'a, tez çalışmam süresince anlayışı ve yardımları ile bana destek olan İlçe Müdürlüğünde ekip arkadaşım Sayın Gıda Mühendisi Tuba DİLER'e, mesai arkadaşım Deniz Barbaros DİKMEN'e, tez çalışmam süresince anlayışla izinlerimi kullanmama olanak sağlayan İlçe Müdürüm Ziraat Mühendisi Sayın Ömür Ozan ÇAKAL'a, hayatım boyunca maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan canım aileme, sabırlı ve anlayışı ile her zaman yanımda olan sevgili eşim Kılıçaslan ÖCAL'a ve biricik kızım Nil Melis ÖCAL'a, araştırmamı maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne ve cihazlarını kullanma imkanı sunan Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi Müdürü Sayın Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ.....	iii
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xviii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	7
2.1. Başlıca Mikotoksinler.....	10
2.1.1. Okratoksin A.....	10
2.1.2. Fumonisinler	11
2.1.3. Trikotesenler	12
2.1.3.1. Deoksinivalenol.....	13
2.1.3.2. Nivalenol	14
2.1.4. Zearalenon	15
2.1.5. Sterigmatosistin	17
2.2. Ekstraksiyon	19
2.2.1. Sıvı-faz ekstraksiyon.....	21
2.2.1.1. QuEChERS.....	21
2.2.1.2. Seyrelt ve enjekte et (Dilute and Shoot method) ekstraksiyonu	23
2.3. Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (UHPLC)	24
2.4. Kütle Spektrometresi	27
2.4.1. İyonizasyon kaynakları	29
2.4.2. Elektrosprey iyonizasyon.....	33
2.4.3. Analizörler	39
2.5. Metot Validasyonu	45
2.6. Gıdalarda Kütle Spektrometresi Kullanılarak Yapılan Mikotoksin Kalıntı Analizi Çalışmaları	48
3. MATERYAL VE METOT.....	53
3.1. Materyal.....	53
3.2. Metot	54

3.2.1. Standart çözeltilerin hazırlanması.....	54
3.2.2. Ekstraksiyon yöntemleri	54
3.2.2.1. QuEChERS yöntemi	54
3.2.2.2. Seyrelt ve enjekte et (dilute and shoot) ekstraksiyonu	54
3.2.3. Ultra yüksek performans sıvı kromatografisi	54
3.2.4. Kütle spektrometresi	55
3.2.5. Metot validasyonu	56
3.2.5.1. Doğrusallık ve ölçüm aralığı	56
3.2.5.2. Seçicilik.....	56
3.2.5.3. Tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ)	56
3.2.5.4. Doğruluk ve kesinlik	57
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	59
4.1. İnfüzyon	59
4.2. UHPLC’de Metot Geliştirme	64
4.2.1. Hareketli faz B’de asetronitril (MeCN) veya metanol (MeOH) kullanıldığının analiz sonuçlarına etkisi.....	67
4.2.2. Hareketli faz A (% 0,3 formik asit, 5 mM amonyum format/su) sabit tutularak, hareketli faz B’de (metanol) farklı konsantrasyonlarda formik, asetik asit, amonyum format ve amonyum asetat kullanımının analiz sonuçlarına etkisi	69
4.2.2.1. Formik asit	69
4.2.2.2. Asetik asit.....	70
4.2.2.3. 1 mM Amonyum format ve amonyum asetat	70
4.2.2.4. Hareketli faz B’de formik, asetik asit ve amonyum format ve amonyum asetat kullanımının sinyal seviyesi üzerine etkilerinin karşılaştırılması	71
4.2.3. Hareketli faz B’de %0,2 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve amonyum asetat kullanımının analiz sonuçlarına etkisi	75
4.2.4. Hareketli faz B (%0,2 asetik asit/MeOH; pH:3,70) sabit tutularak A fazında formik, asetik asit ve 1 mM amonyum format ve amonyum asetat kullanımının analiz sonuçlarına etkisi	80
4.2.4.1. Formik asit	80
4.2.4.2. Asetik asit.....	81
4.2.4.3. 1 mM amonyum format, 1 mM amonyum asetat.....	82
4.2.4.4. Hareketli faz A’da formik, asetik asit ve amonyum format-amonyum asetat kullanımının sinyal seviyesi üzerine etkilerinin karşılaştırılması	83

4.2.5. Hareketli faz B (%0,2 asetik asit/MeOH, pH: 3,70) sabit tutularak A fazında (% 0,1 asetik asit/su) asetik asit ile birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının analiz sonuçlarına etkisi.....	87
4.2.6. Akış hızını belirlemek için yapılan analizlerin sonuçları	91
4.2.7. Kolon sıcaklığını belirlemek için yapılan analizlerin sonuçları	96
4.2.8. Enjeksiyon hacmini belirlemek için yapılan analizlerin sonuçları.....	100
4.2.9. Gradient denemeleri.....	103
4.2.10. UHPLC’de oluşturulan analiz metodu.....	106
4.3. HESI Parametrelerinin Belirlenmesi	107
4.3.1. Kapiler ve buharlaştırma sıcaklık değerleri	107
4.3.2. Sheath ve yardımcı gaz değerleri.....	109
4.3.3. Sprey voltaj değerleri.....	109
4.4. Seyrelt ve Enjekte Et Ekstraksiyon Yönteminin Geliştirilmesi	110
4.4.1. Ekstraksiyonda kullanılan çözgenin belirlenmesi.....	110
4.4.2. Çalkalama süresi ve hızının belirlenmesi	112
4.5. Metot Validasyonu	116
4.5.1. Doğrusallık ve ölçüm aralığı.....	116
4.5.2. Seçicilik	121
4.5.3. Tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ).....	130
4.5.4. Doğruluk ve kesinlik.....	132
4.6. Örneklerin Analizi	137
5. SONUÇLAR	147
6. KAYNAKLAR.....	149
7. EKLER	169
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “UHPLC-MS/MS Kütle Spektrometresi İle Piriç ve Yulaf örneklerinde  oklu Mikotoksin Tespitine Yönelik Analiz Metodu Geliştirilmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değ rlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

21/01/2021

Meryem YILDIZ       

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Da	:dalton
dk	:dakika
eV	:elektronvolt
g	:gram
kg	:kilogram
kV	:kilovolt
mbar	:milibar
mg	:miligram
mL	:mililitre
mM	:milimolar
mm	:milimetre
MPa	:megapascal
ms	:milisaniye
ppb	:milyarda bir
psi	:pound/inçkare
rpm	:devir/dakika
s	:saniye
V	:volt
µL	:mikrolitre
µm	:mikrometre
%	:yüzde
°C	:santigrat derece
,	:Ondalık ayırıcı olarak virgül kullanılmıştır

Kısaltmalar

ACN	Asetonitril
AOAC	:Resmi Analitik Kimyagerler Derneği
APCI	:Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon
API	:Atmosferik basınç iyonizasyon
CAS	:Kimyasal Kuramlar Servisi
CEN	:Avrupa Standartlar Komitesi
CI	:Kimyasal iyonizasyon
CID	:Çarpışma etkili ayrışma
dSPE	:Dispersif katı faz ekstraksiyonu
EI	:Elektron iyonizasyon
ESI	:Elektrosprey iyonlaşma kaynağı
Eurachem	:Avrupa Analitik Kimya Örgütü
FAB	:Hızlı atom bombardımanı
FD	:Alan desorpsiyonu
GC-MS	:Gaz kromatografi-kütle spektrometresi
GAP	:İyi Tarım Uygulamaları
GMP	:İyi Üretim Uygulamaları
HACCP	:Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları
HPLC	:Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ICR	:İyon siklotron rezonans
INN	:Uluslararası tescilli olmayan adı
ISO	:Uluslararası Standardizasyon Komitesi
IUPAC	:Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
LC-MS	:Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi
LD	:Lazer desorpsiyonu

MALDI	:Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon
MRL	:Maksimum kalıntı limiti
PD	:Plazma desorpsiyonu
PSA	:Primer sekonder amin
QqQ	:Üçlü kuadropol
SIMS	:İkincil iyon kütle spektrometresi
TOF	:Uçuş zamanlı
UHPLC	:Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi
WHO	:Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Okratoksin A kimyasal yapısı	11
Şekil 2.2. Fumonisin B1 ve B2'nin kimyasal yapısı	11
Şekil 2.3. Deoksinivalenolun kimyasal yapısı	14
Şekil 2.4. Nivalenolun kimyasal yapısı	15
Şekil 2.5. Zearalenon ve türevlerinin kimyasal yapıları a) zearalenon b) α -zearalenol c) β -zearalenol	16
Şekil 2.6. Sterigmatosistinin kimyasal yapısı	18
Şekil 2.7. Seyrelt ve enjekte et yönteminin şematik gösterimi	24
Şekil 2.8. UHPLC cihazının kısımları	27
Şekil 2.9. Kütle spektrometresinin genel kısımları	28
Şekil 2.10. Elektron iyonizasyon (EI) kaynağının şeması	31
Şekil 2.11. APCI iyon kaynağının temel bileşenleri	33
Şekil 2.12. ESI'de iyon oluşumu	36
Şekil 2.13. Yüklü damlacıklardan iyonların gaz fazına desorpsiyonu a) yük-kalıntı modeli b) iyon desorpsiyon modeli	36
Şekil 2.14. Ion Max yapısı	38
Şekil 2.15. Kuadropol kütle analizörü	40
Şekil 2.16. Tekli (üstte) ve tandem (altta) kütle spektrometresinin karşılaştırılması	41
Şekil 2.17. Kuadropol iyon tuzağı yapısı	42
Şekil 2.18. Üçlü kuadropol sistemi	43
Şekil 3.1. Gradyent elüsyon görünümü	55
Şekil 4.1. Nivalenola ait infüzyon görüntüsü	60
Şekil 4.2. Deoksinivalenola ait infüzyon görüntüsü	61
Şekil 4.3. FB1'e ait infüzyon görüntüsü	61
Şekil 4.4. Beta-zearalenol'a ait infüzyon görüntüsü	62

Şekil 4.5. Fumonisin B2'ye ait infüzyon görüntüsü	62
Şekil 4.6. Okratoksin A'ya ait infüzyon görüntüsü	63
Şekil 4.7. Zearalenon'a ait infüzyon görüntüsü	63
Şekil 4.8. Sterigmatosistin'e ait infüzyon görüntüsü	64
Şekil 4.9. Sterigmatosistin'in iki hareketli faz (MeCN-MeOH) kullanılarak elde edilen kromatogramları	68
Şekil 4.10. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın nivalenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi	72
Şekil 4.11. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın deoksinivalenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi	72
Şekil 4.12. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın fumonisin B1'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	73
Şekil 4.13. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın beta zearalenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi	73
Şekil 4.14. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın fumonisin B2'nin sinyal seviyesi üzerine etkisi	74
Şekil 4.15. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın okratoksin A'nın sinyal seviyesi üzerine etkisi	74
Şekil 4.16. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın zearalenon'un sinyal seviyesi üzerine etkisi	75
Şekil 4.17. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın sterigmatosistin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	75
Şekil 4.18. % 0,2 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının nivalenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi	76
Şekil 4.19. % 0,2 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının deoksinivalenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi	76
Şekil 4.20. % 0,2 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının fumonisin B1'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	77
Şekil 4.21. % 0,2 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının beta zearalenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi	77
Şekil 4.22. % 0,2 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının fumonisin B2'nin sinyal seviyesi üzerine etkisi	78

Şekil 4.23. % 0,2 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının okratoksin A'nın sinyal seviyesi üzerine etkisi	78
Şekil 4.24. % 0,2 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının zearalenon'un sinyal seviyesi üzerine etkisi.....	79
Şekil 4.25. % 0,2 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının sterigmatosistin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	79
Şekil 4.26. Farklı konsantrasyonda formik asit ilavesinin nivalenolün pik şekli ve sinyal seviyesi üzerine etkisi.....	81
Şekil 4.27. Farklı konsantrasyonda formik asit ilavesinin deoksinivalenolün pik şekli ve sinyal seviyesi üzerine etkisi	81
Şekil 4.28. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın nivalenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi.....	83
Şekil 4.29. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın deoksinivalenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi	84
Şekil 4.30. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın fumonis B1'in sinyal seviyesi üzerine etkisi.....	84
Şekil 4.31. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın beta zearalenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi	85
Şekil 4.32. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın fumonis B2'nin sinyal seviyesi üzerine etkisi.....	85
Şekil 4.33. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın okratoksin A'nın sinyal seviyesi üzerine etkisi	86
Şekil 4.34. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın zearalenon'un sinyal seviyesi üzerine etkisi.....	86
Şekil 4.35. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın sterigmatosistin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	87
Şekil 4.36. % 0,1 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının nivalenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi	88
Şekil 4.37. % 0,1 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının deoksinivalenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi.....	88
Şekil 4.38. % 0,1 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının fumonis B1'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	89
Şekil 4.39. % 0,1 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının beta zearalenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi.....	89

Şekil 4.40. % 0,1 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının fumonisin B2'nin sinyal seviyesi üzerine etkisi	90
Şekil 4.41. % 0,1 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının okratoksin A'nın sinyal seviyesi üzerine etkisi	90
Şekil 4.42. % 0,1 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının zearalenon'un sinyal seviyesi üzerine etkisi.....	91
Şekil 4.43. % 0,1 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının sterigmatosistin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi.....	91
Şekil 4.44. Nivalenol için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar.....	92
Şekil 4.45. Deoksinivalenol için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar	93
Şekil 4.46. Fumonisin B1 için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar.....	93
Şekil 4.47. Beta Zearalenol için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar	94
Şekil 4.48. Fumonisin B2 için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar.....	94
Şekil 4.49. Okratoksin A için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar.....	95
Şekil 4.50. Zearalenon için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar	95
Şekil 4.51. Sterigmatosistin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar	96
Şekil 4.52. Nivalenol için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar.....	97
Şekil 4.53. Deoksinivalenol için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar	97
Şekil 4.54. Fumonisin B1 için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar.....	98
Şekil 4.55. Beta Zearalenol için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar	98
Şekil 4.56. Fumonisin B2 için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar.....	99
Şekil 4.57. Okratoksin A için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar.....	99
Şekil 4.58. Zearalenon için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar	99
Şekil 4.59. Sterigmatosistin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar	100
Şekil 4.60. Nivalenol için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar	101
Şekil 4.61. Deoksinivalenol için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar.	101
Şekil 4.62. Fumonisin B1 için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar	101
Şekil 4.63. Beta Zearalenol için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar..	102

Şekil 4.64. Fumonisin B2 için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar	102
Şekil 4.65. Okratoksin A için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar	102
Şekil 4.66. Zearalenon için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar	103
Şekil 4.67. Sterigmatosistin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar ..	103
Şekil 4.68. Nivalenol için farklı gradiente ait kromatogramlar	104
Şekil 4.69. Deoksinivalenol için farklı gradiente ait kromatogramlar	104
Şekil 4.70. Fumonisin B1 için farklı gradiente ait kromatogramlar	104
Şekil 4.71. Beta Zearalenol için farklı gradiente ait kromatogramlar	105
Şekil 4.72. Fumonisin B2 için farklı gradiente ait kromatogramlar	105
Şekil 4.73. Okratoksin A için farklı gradiente ait kromatogramlar	105
Şekil 4.74. Zearalenon için farklı gradiente ait kromatogramlar	106
Şekil 4.75. Sterigmatosistin için farklı gradiente ait kromatogramlar	106
Şekil 4.76. Çalkalama işleminin görünümü	113
Şekil 4.77. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş pirinç örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar seyrelt ve enjekte et yöntemi ile elde edilmiştir)	122
Şekil 4.78. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş yulaf örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar seyrelt ve enjekte et yöntemi ile elde edilmiştir)	124
Şekil 4.79. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş pirinç örneklere ait kromatogramlar (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)	126
Şekil 4.80. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş yulaf örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)	128
Şekil 4.81. <i>A. versicolor</i> küfü görünümü	139
Şekil 4.82. <i>A. versicolor</i> ile kontamine pirinç örneğinde STE iyon oranları (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)	139
Şekil 4.83. <i>A. versicolor</i> ile kontamine pirinç örneğinde STE iyon oranları (ekstraktlar seyrelt ve enjekte et yöntemi ile elde edilmiştir)	140
Şekil 4.84. <i>A. versicolor</i> ile kontamine yulaf örneğinde STE iyon oranları (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)	140
Şekil 4.85. <i>A. versicolor</i> ile kontamine yulaf örneğinde STE iyon oranları (ekstraktlar seyrelt ve enjekte et yöntemi ile elde edilmiştir)	141

Şekil 4.86. Pirinç (P1) örneğinde FB1 iyon oranları (ekstraktlar seyrelt ve enjekte et yöntemi ile elde edilmiştir)	141
Şekil 4.87. Pirinç (P3) örneğinde FB1 iyon oranları (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)	142
Şekil 4.88. Pirinç (P6) örneğinde FB1 iyon oranları (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)	142
Şekil 4.89. Pirinç (P8) örneğinde FB1 iyon oranları (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)	143
Şekil 4.90. <i>A. versicolor</i> ile kontamine pirinç örneğinde FB1 iyon oranları (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)	143
Şekil 4.91. <i>A. versicolor</i> ile kontamine pirinç örneğinde FB1 iyon oranları (ekstraktlar seyrelt ve enjekte et yöntemi ile elde edilmiştir)	144
Şekil 4.92. <i>A. versicolor</i> ile kontamine yulaf örneğinde FB1 iyon oranları (ekstraktlar seyrelt ve enjekte et yöntemi ile elde edilmiştir)	144
Şekil 4.93. <i>A. versicolor</i> ile kontamine yulaf örneğinde FB1 iyon oranları (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)	145

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Mikotoksinler ve metabolitlerinin uluslararası tescilli olmayan adı (INN), Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından belirtilen adı, Kimyasal Kuramlar Servisi (CAS) tarafından belirtilen kayıt numaraları, molekül formülü ve molekül ağırlığı.....	19
Çizelge 2.2. Partikül Boyutunun Tarihi	25
Çizelge 2.3. İyonizasyon modları	31
Çizelge 2.4. Kütle spektrometresinde kullanılan mevcut iyonizasyon yöntemlerinin çeşitli özelliklerinin özeti	38
Çizelge 2.5. Üçlü Kuadrupol sistemde uygulanabilen MS/MS tarama modları	44
Çizelge 3.1. Standartların saflık derecesi ve depolama sıcaklığı.....	53
Çizelge 3.2. Hareketli faz oranları	55
Çizelge 3.3. Kontrol panelindeki parametrelerin değerleri.....	56
Çizelge 4.1. Analitler için belirlenen ana iyon, moleküler iyon, parçalanma iyonları, çarpışma enerjileri ve alıkonma zamanı (RT).....	60
Çizelge 4.2. Analitlerin MeCN ve MeOH'daki tespit zamanı ve sinyal miktarı.....	67
Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda formik asit ilavesinin sinyal miktarına etkisi	69
Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda asetik asit ilavesinin sinyal miktarına etkisi	70
Çizelge 4.5. 1 mM Amonyum format ve Amonyum asetat ilavesinin sinyal miktarına etkisi	71
Çizelge 4.6. Farklı konsantrasyonlarda formik asit ilavesinin sinyal miktarına etkisi	80
Çizelge 4.7. Farklı konsantrasyonlarda asetik asit ilavesinin sinyal miktarına etkisi	82
Çizelge 4.8. 1 mM Amonyum format ve amonyum asetat ilavesinin sinyal miktarına etkisi	83
Çizelge 4.9. Kapiler ve buharlaştırma sıcaklıklarının sinyal miktarına etkisi	108
Çizelge 4.10. Sheath ve yardımcı gaz değerlerinin sinyal miktarına etkisi	109
Çizelge 4.11. Sprey voltajının sinyal miktarına etkisi	110

Çizelge 4.12. Pirinçte çözgen bileşiminin ve karışım oranlarının sinyal miktarına etkisi	112
Çizelge 4.13. Yulafta çözgen bileşiminin ve karışım oranlarının sinyal miktarına etkisi	112
Çizelge 4.14. Pirinçte analitlerin sinyal miktarlarının ekstraksiyon hızına (200, 250 ve 300 rpm) ve ekstraksiyon süresine (5, 10 ve 15 dk) bağlı olarak değişimi	114
Çizelge 4.15. Yulafta analitlerin sinyal miktarlarının ekstraksiyon hızına (200, 250 ve 300 rpm) ve ekstraksiyon süresine (5, 10 ve 15 dk) bağlı olarak değişimi	115
Çizelge 4.16. Standartlarla hazırlanan analit verilerini temsil eden en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayısı	118
Çizelge 4.17. Pirinç örneğinde QuEChERS ile yapılan ekstraksiyon sonucunda analit verilerini temsil eden en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayısı	118
Çizelge 4.18. Pirinç örneğinde “seyrelt ve enjekte et” yöntemi ile yapılan ekstraksiyon sonucunda analit verilerini temsil eden en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayısı	119
Çizelge 4.19. Yulafta QuEChERS ile yapılan ekstraksiyon sonucunda analit verilerini temsil eden en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayısı	119
Çizelge 4.20. Yulafta “seyrelt ve enjekte et” yöntemi ile yapılan ekstraksiyon sonucunda analit verilerini temsil eden en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayısı	120
Çizelge 4.21. Matriks etkisi (% SSE)	121
Çizelge 4.22. Analitlere ait LOD ($\mu\text{g/kg}$) ve LOQ değerleri ($\mu\text{g/kg}$)	131
Çizelge 4.23. Pirinç ile yapılan analizlere ait geri kazanım oranları, gün içi ve günler arası bağıl standart sapma değerleri	135
Çizelge 4.24. Yulaf ile yapılan analizlere ait geri kazanım oranları, gün içi ve günler arası bağıl standart sapma değerleri	136
Çizelge 4.25. Referans metot ve geliştirilen metodun karşılaştırılması	137

1. GİRİŞ

Gıda ve tarım ürünlerinin toksijenik küf türleri tarafından kontaminasyonu ciddi ve yaygın bir sorundur (Munkvold 2003). Mikotoksinler insan ve hayvan sağlığını tehdit etmekte, uluslararası ticareti engellemekte, gıda ve yemlerin israfına neden olmakta ve tüm bunlar için kaynakların araştırmaya yönlendirilmesi, yasal düzenlemeler ve mikotoksin problemini hafifletmek için bazı uygulamaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir (Hussein ve Brasel 2001; Stoev 2013). Yetersiz hasat uygulamaları, yanlış kurutma, paketlenme ve uygun olmayan depolama ve taşıma koşulları küf üretimi ve mikotoksin oluşum riskini arttırmaktadır.

Günümüzde genellikle taze ürünlerin güvenli saklanması için kimyasal fumigantlar veya kimyasal bazlı koruyucu ajanlar kullanılmaktadır. Ancak tüketicilerin güvenli ve kaliteli gıdalara olan artan ilgisi ve isteği kimyasallara daha iyi alternatiflerin araştırılmasını zorunlu hale getirmektedir (Bhat vd 2010). Bu da güvenli gıda üretiminde ve tüketiminde belirli sistemlerin kullanılması ile mümkün olmaktadır. Temel prensibi, gıda kaynaklı tehlikelerin önlenmesi, azaltılması, kontrol edilmesi veya elimine edilmesi olan İyi Tarım Uygulamaları (GAP), İyi Üretim Uygulamaları (GMP) ve Kritik Kontrol Noktalarında Tehlike Analizi Uygulamaları (HACCP) bu sistemlerin başında gelmektedir (Malik vd. 2010; Ünüsan 2019).

Mikotoksinlere maruz kalmayı en aza indirmek için toksinlerin kabul edilebilir sınırını belirlemek için uygun mevzuat olmalıdır. Bu tür mevzuat, tarım sektöründe kimyasalların uygunsuz kullanımına, buğday, pirinç ve diğer ürünlerin depolanmasında önlem alınmasına yardımcı olacaktır. İnsanlar ve hayvanların sağlığı için gelecekte bu ürünlerin uygun şekilde kontrol edilmesi gerekmektedir (Kan ve Meijer 2007; VanEgmond vd. 2007). Bu açıdan gıdalarda eser miktarda bulunabilecek kalıntı ve kontaminantların belirlenmesi günümüzde giderek artan bir ilgi görmektedir (Sun vd. 2012).

Mikotoksinler zehirli kimyasal bileşiklerdir ve küf veya mantarlar tarafından ikincil metabolit olarak üretilmektedir. Bu mikotoksinler gıda ve yem maddelerinde oluşur ve insan ve hayvan sağlığı için büyük öneme sahiptirler. Mantarlar tarafından üretildiğinden, görünür küf kontaminasyonu yüzeysel olmasına rağmen mikotoksinler hastalıklı veya küflü tahıllarla ilişkili bulunmuştur. Bazı gıda kaynaklı mikotoksinlerin etkileri akuttur ve şiddetli hastalık belirtileri çok hızlı ortaya çıkar. Gıdalarda oluşan diğer mikotoksinlerin sağlık üzerinde kanserlerin indüksiyonu ve bağışıklık yetersizliği gibi daha uzun süreli kronik veya kümülatif etkileri vardır (Tola ve Kebede 2016).

Mantarlar birçok organ sistemini etkileyerek insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere neden olabilmektedir. Bu etkiler alerji ve enfeksiyona ek olarak mantarların spesifik koşullarda ürettiği mikotoksin ve organik kimyasalların neden olduğu çeşitli toksikolojik etkilerdir (Fung ve Clark 2014). Klinisyenler mikotoksinleri genellikle etkiledikleri organa göre sınıflandırmaktadırlar. Bu nedenle mikotoksinler, hepatotoksinler, nefrotoksinler, nörotoksinler, immünotoksinler vb. olarak sınıflandırılabilir. Hücre biyologları onları teratojenler, mutajenler, kanserojenler ve alerjenler gibi genel gruplara ayırır. Organik kimyacılar, kimyasal yapılarına göre örneğin, laktonlar, kumarinler; biyokimyacılar biyosentetik kökenlerine göre (poliketidler, amino asitten türetilmiş vb.); doktorlar ise neden oldukları hastalıklara göre

örneğin, St. Anthony'nin ateşi, stachybotryotoxicosis gibi sınıflandırmaya çalışmaktadırlar (Bennett ve Klich 2003).

İnsan ve hayvan sağlığı için gıdalardaki ve yemlerdeki mikotoksin oluşumunu etkileyen çok sayıda faktör vardır. Mikotoksin kontaminasyonunu ve üretimini etkileyen bu faktörler fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörler olarak karakterize edilmektedir. Fiziksel faktörler mikotoksin üretimi ve mantar kolonizasyonu için elverişli olan sıcaklık, bağıl nem ve böcekler gibi çevresel faktörlerdir. Kuraklık, sıcaklık artışı ve bağıl nemdeki artış gibi stresler seçici olarak mikotoksijenik mantarların kolonizasyonunu ve metabolizmasını değiştirerek mikotoksin üretimini değiştirebilmektedir. Kimyasal faktörler arasında mantar ilaçları ve/veya gübre kullanımı yer almaktadır. Biyolojik faktörler ise kolonize toksijenik mantar türleri ile substrat arasındaki etkileşime dayalı faktörlerdir (Russell vd. 1991; D'Mello ve Macdonald 1997). Üretilen mikotoksinlerin doğası ve miktarı substrat türleri, nem içeriği, mevcut beslenme, sıcaklık, çevre ortamdaki nem, mantar kolonisinin olgunluğu, diğer mantarlarla birlikte ortaya çıkma, diğer mikroorganizmalarla rekabet, stres faktörleri, böcek aktivitesinden dolayı substratın fiziksel hasarı ve diğer ilişkili faktörler gibi çeşitli faktörlerin etkileşimlerinden etkilenmektedir (Bhat vd. 2010).

Modern mikotoksikoloji, 1961 yılında İngiltere'de çok sayıda hayvan kaybının içeriğinde fıstık bulunan yem tüketimine bağlı olarak aflatoksinin keşfiyle başladı. Aflatoksinlerin karsinojenitesi, immünoşüpresif doğası ve aflatoksinlerin sadece tahıllarda depolanma sorunu olmadığı aslında bazı tahılların hasat öncesi kontamine olduğunun bulunmasından sonra toplam mikotoksin sorunu analitik kimyagerleri, mikrobiyologları, ziraat mühendisleri, entomologlar, bitki patoloğları, bitki yetiştiricileri, genetikçiler, tıp ve veterinerlik uygulayıcıları ve üreticileri de içeren çok disiplinli bir konu olmuştur. Bu grupların kombine etkileşimli çabaları birçok yeni mikotoksinin ve hayvan hastalıklarıyla ilgisinin keşfedilmesine yol açmıştır (Richard 2007)

Bir küf türü birçok farklı mikotoksin üretebildiği gibi birkaç tür de aynı mikotoksini üretebilmektedir. Bir hammaddede üretilen toksin spektrumu büyük ölçüde hammaddeye, kontaminasyon türü ve bileşimine, çevre koşullarına, iklim faktörlerine ve hasat öncesi tarımsal uygulamalara, hasat, kurutma, depolama gibi işleme uygulamalarını kirlüten bir veya daha fazla mantar türüne/suşuna bağlıdır (Chilaka vd. 2017)

Sonuç olarak, uygun sıcaklıkta, uygun olmayan bir şekilde saklanan ve uzun süre nemi alan tüm mahsuller ve tahıllar küf oluşumunu kolaylaştırır ve mikotoksin kontaminasyonuna maruz kalabilir (Ahmad ve Jae-Hyuk 2017). Uygun önlemler alınmadıkça mantar büyümesi ve mikotoksin üretimi engellenemez.

Araştırmacılar 400'den fazla mikotoksin çeşidini izole ve karakterize ettiler. En önemli ve son derece toksik mikotoksinler arasında aflatoksin, okratoksin A, trikotekenler, zearalenon, B1 ve B2 fumonisinler (FB1, FB2), tremorjenik toksinler ve ergot alkaloidleri bulunmaktadır (Margherita vd. 2012). Gıdalarda ve yemlerde sık ve sorunlu mikotoksin kontaminasyonuna neden olan başlıca mantarlar *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium* türlerinin üyeleridir (Ahmad ve Jae-Hyuk 2017)

Gıda örneğindeki mikotoksin seviyesinin belirlenmesi örnekleme, örnek hazırlama, ekstraksiyon ve enstrümantel ve enstrümantel olmayan tespit yöntemlerini

içermektedir (Ahmad ve Jae-Hyuk 2017). Bir analizin en önemli basamağı olan numune hazırlama aşaması, analizde sonraki basamakları etkilediğinden dolayı analitlerin tanımlanmasında, onaylanmasında ve miktarının belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu aşama, çeşitli matrikslerden ilgili bileşiklerin izolasyonunu ve/veya ekstraksiyonunu içermektedir. Matriksten mikotoksinlerin ekstraksiyonu toksinlerin yapısına bağlıdır. Ekstraksiyonda kullanılan çözücünün seçimi farklı kimyasal karışımlar matriksten toksinlerin izolasyonunda kullanılacak ekstraksiyon yöntemini etkilediğinden dolayı önemlidir (Turner vd. 2009). Ekstraksiyon ve temizleme aşamalarından sonra analitlerin tanımlanmasını sağlayacak güvenilir, yüksek verimli ve etkili analitik metotların uygulanması gerekmektedir.

İnce Tabaka Kromatografisi görsel değerlendirmeye veya enstrümantel dansitometriye dayanan en eski kantitatif yöntemlerden biridir. Mikotoksin analizindeki son gelişmeler ultraviyole, diyot dizisi, flüoresans veya kütle spektrometri dedektörleri ile birleştirilen yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve azaltılmış kolon ambalaj malzemesi ile birleştirilen ultra HPLC hem tespit hem de ölçüm için hızlı ve uygun kromatografik teknolojiler getirmiştir. Son derece gelişmiş sıvı kromatografi teknikleri, kütle spektrometrisi ve HPLC ile birleştirilmiş kütle spektrometrik veya floresan dedektörleri sıklıkla mikotoksin analizinde kullanılırken, sınırlı duyarlılık ve özgüllük nedeniyle diğer kromatografik teknikler nadiren kullanılır. HPLC-FLD (floresans ile birleştirilmiş HPLC) tek mikotoksin analizi için kullanılırken HPLC-MS / MS (kütle spektrometresi ile birleştirilmiş HPLC), birden fazla mikotoksinin eşzamanlı olarak belirlenmesi için en iyi seçimdir (Ahmad ve Jae-Hyuk 2017). Kuadrupol kütle analizörünün (özellikle üçlü kuadrupol, QqQ) bulunduğu kütle spektrometresine bağlanan yüksek performanslı sıvı kromatografisi, çeşitli kimyasal kalıntıların nicel ve onaylı analizleri için yaygın olarak kullanılan bir analiz tekniğidir. Son yıllarda analiz verimini artırmak ve analizin süresini kısaltmak amacıyla geleneksel yüksek performanslı sıvı kromatografisinin (HPLC) yerine ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) kullanılmaktadır (Guillarme vd. 2010).

Kontamine gıdaların tüketimi, deri teması ve solunum yoluyla mikotoksinlere maruz kalınmaktadır. Mikotoksinlerin hayvan ve insan gıdalarına kontaminasyonu birçok hastalığın ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Mikotoksinler hayvanlarda hayvan verimliliğinde azalma, bağışıklığın baskılanmasına bağlı olarak hastalık oluşumunda artma, hayati organlara zarar, üreme kapasitesine müdahale ve bazı durumlarda ölüm gibi geniş bir etkiye sahiptir. Bazı zehirlenmeler hayvanların ve nadiren de insanların ölümüne neden olmaktadır (Bhat vd. 2010).

Mikotoksinden kaynaklanan insan hastalıkları, sınır tanımadan dünyanın büyük bir bölümünde görülmektedir. Şu anda bilinen binlerce mantar ikincil metabolitleri vardır ancak sadece birkaç grup güvenlik ve ekonomik açıdan önemlidir. Bunlar, esas olarak *Aspergillus* türleri tarafından üretilen aflatoksinler (AF'ler); *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilen okratoksin A (OTA), ve öncelikle birçok *Fusarium* türleri tarafından üretilen zearalenon (ZEN), fumonisinler (FB) ve trikotekenlerdir (TCs) (Binder vd. 2007; Streit vd. 2013; Clarke vd. 2014).

Mikotoksinin ekonomik etkisi, insan ve hayvan kaybından hayvansal üretimin azalmasına, kontamine gıda ve yemin bertaraf edilmesi ve araştırma yatırımlarına kadar oldukça çeşitlidir (Hussein ve Brasel 2001). Mikotoksinin insanlar ve çiftlik hayvanları

üzerindeki zararlı etkilerinin sonucu olarak dünyadaki çok sayıda ülke, tüketime sunulan çeşitli gıdalarda mikotoksin sınırlarını belirleyen düzenlemeler uygulamaktadır. 1993 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO)-Uluslararası Kansere Araştırmaları Ajansı AFT, OTA, TCs, ZEN ve FB'lerin kanserojenik potansiyelini değerlendirmiştir (WHO and IARC 1993; IARC 2002)

Birçok uluslararası ajans mikotoksinler için evrensel düzenleyici sınırların standardizasyonuna ulaşmaya çalışmaktadır. Şu anda, 100'ün üzerinde ülkenin gıda endüstrisinde mikotoksinlerle ilgili yasal düzenlemelerinin olduğu bilinmektedir (Hans vd. 2007). Geçen yüzyılda gıda bazlı mikotoksinlerde yapılan çalışmalara göre limitler belirlenmektedir. EFSA ve Kodeks Alimentarius tarafından toplanan bilimsel verilerin Gıda Bilimsel Komitesinde değerlendirilmesi ve komitenin görüşlerine göre, gıda ve hayvan yemlerinde izin verilen mikotoksin aralığı, bir dizi Avrupa direktifleri ve Avrupa Komisyonu düzenlemeleri ile belirlenmektedir. Bunun sonucunda diğer birçok ülkede gıdaları kirletebilecek zararlı mikotoksinlerden tüketicileri korumak için aflatoxin limitlerini uygulamaktadır. Komisyon Düzenlemeleri, maksimum seviyelerin gıda tüketimi ile ilgili risk göz önünde bulundurularak iyi tarım ve üretim uygulamalarıyla makul bir şekilde ulaşılabilen limitlere göre belirlenmesi gerektiği görüşündedir. İyi tarım ve üretim uygulamaları gelişmelere uyumluluğun kesin olarak takip edilmesini gerektirir. Bebeklerin, küçük çocukların ve bağışıklığı zayıflamış savunmasız tüketici grubuna mensup olan dezavantajlı kişilerin sağlığının korunması için olabilecek en düşük mikotoksin seviyelerinin oluşturulması gerekmektedir. Uluslararası ticaretin gelişmesiyle birlikte mikotoksinlerin gıdaya kontaminasyonu ve onların toksikolojik özellikleriyle ilgili çalışmalar da artmıştır. Bunun sonucu olarak Avrupa Birliğinde mikotoksinlerle ilgili düzenlemelerde de değişiklik yapılmıştır. Gıda maddelerindeki belirli kontaminatların maksimum seviyelerini belirleyen Komisyon Yönetmeliği 466/2001 gıda ve yemlerdeki mikotoksin kontaminasyonu ile ilgili mevcut anlayışa göre birçok kez önemli ölçüde değiştirilmiştir. Şu anda gıdalardaki mikotoksinlerin maksimum seviyeleri AB 1881/2006 sayılı Komisyon Tüzüğü, aflatoxin ve Okratoksin A için 105/2010/EC ve Fusarium toksinleri ile ilgili 1126/2007/EC Komisyon Tüzüklerine göre belirlenmiştir (Ukwuru vd. 2017). Ülkemizde ise 1881/2006/EC sayılı Gıdalardaki Belirli Bulaşanların Maksimum Limitlerinin Belirlenmesi Hakkında Avrupa Birliği Komisyon Tüzüğüne paralel olarak hazırlanan TGK- Bulaşanlar Yönetmeliğine göre gıdalarda bulunabilen belirli bulaşanların maksimum limitleri belirlenmiştir (Anonim 2011).

Gıda ve yemlerin güvenliği konusunda artan ilgi mikotoksinlerin tespit edilmesi için birçok metodun geliştirilmesine neden olmuştur. Potansiyel sağlık riskleri çok düşük konsantrasyonlarda oluştuğundan hassas ve güvenilir metodların geliştirilmesi önem arz etmektedir. Gıdalardaki ve yemdeki mikotoksin kalıntılarının analizinde yaygın olarak kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS), mikotoksinlerin ve maskelenmiş mikotoksinler dahil olmak üzere metabolitlerinin türevlendirmeye ihtiyaç duymadan düşük tespit limiti, analitlerin yapısı hakkında bilgi toplama, minimum örnek hazırlığı ve polaritelerinde farklılık gösteren çok çeşitli analitlerin analizine imkan tanıması gibi özellikleriyle en yeni ortaya çıkan analitik metod haline gelmiştir (Shephard 2008; Turner vd. 2009; Berthiller vd. 2007). Kütle spektrometresi, elektriksel veya manyetik alan veya bu ikisinin birleşimi kullanılarak vakum altında analitten iyonların oluşması, oluşan iyonların

kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılması, analiz edilmesi ve bu değerlerin ölçülmesine dayalı olarak çalışmaktadır (Lavagnini vd. 2006).

Gıdalarda çoklu mikotoksin analizi için seyrelt ve enjekte et metodu (Sulyok vd. 2006; Spanjer vd. 2008; Beltrán vd. 2009; Malachova vd. 2014; De Santis vd. 2017; Franco vd. 2018; Silva vd. 2019; Scarpino vd. 2019; Abreu vd. 2020; Sulyok vd. 2020) ve 1. Aşama QuEChERS ekstraksiyon metodu (Frenich vd. 2011; Arroyo-Manzanares vd. 2013, 2014; Azaiez vd. 2014; De Colli vd. 2020) sıklıkla kullanılmaktadır. Bu ekstraksiyon yöntemlerinin yağ ve pigment bakımından yoğun matrislere uygulanması çoğu zaman zor olabilmektedir. Matris bileşenlerinin konsantrasyonunun analitlerden daha fazla olması, analit iyonlarını baskılamasından dolayı analitlerin sinyal seviyesini ve böylece ekstraksiyon ve kromatografi verimini olumsuz yönde etkilemekte ve analitlerin tespitinde güçlükler neden olmaktadır (Chamkasem vd. 2013). Böyle durumlarda analiz edilen mikotoksinlerde kayıplara yol açsa da temizleme aşamasına gerek olabilmektedir. Temizleme aşaması olmadan çoklu mikotoksinlerin tespitini sağlayan metotlar analit kaybını önlemesi açısından daha avantajlı olmaktadır (Sulyok vd. 2007).

Pirinçte mikotoksin kontaminasyonu genellikle buğday veya mısırdan olduğundan daha düşüktür. Bununla birlikte, pirincin aflatoxin B1, B2, G1, G2 (AFS), sitrinin, deoksinivalenol (DON), fumonisin B1, B2, B3 (FB), fusarenon-X (Fus.-X), nivalenol (NIV), okratoksin A (OTA), sterigmatocystin (STE) ve zearalenon (ZEN) gibi mikotoksinler ile kontamine olduğuna dair bazı raporlar vardır (Tanaka vd. 2007). Yulaf, diğer ılıman tahıllar gibi, hem hasattan önce hem de depolama sırasında tarlada bir dizi mantar tarafından istila edilebilir. Esas olarak *Fusarium*, *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsine ait olan bu mantar türlerinden bazıları, çok çeşitli ikincil metabolitler üretebilir. Bunlar, olgunlaşan taneleri hasat öncesi veya hasat sonrası hayvanlar ve insanlar için toksik olabilen mikotoksinlerle kirlenme yeteneğine sahiptir. Bu toksinlerden bazıları kanıtlanmış veya şüphelenilen kanserojenlerdir. Çoğu mikotoksin ısıya çok dayanıklıdır, böylece bir kez oluştuktan sonra gıda kaynağından uzaklaştırılması zordur. Hayvan yemi için kullanılan tahıllar genellikle daha yüksek miktarda mikotoksin içermesi muhtemel yan ürünleri kullanır. Hayvan dokuları bu kimyasal bileşikler alacak ve bu şekilde mikotoksinler insan gıda zincirine yeniden sokulabilecektir. Bu nedenle, 1980'lerin ortalarından itibaren insan beslenmesi için yulaf kullanımının daha popüler hale gelmesi nedeniyle, birçok çalışma yulafta fusariotoksinler (nivalenol, deoksinivalenol, zearalenon, HT-2 ve T-2), okratoksinler ve aflatoxinler ile kontamine olduğunu göstermektedir (Medina ve Magan 2011).

Bu çalışmada, daha önce yapılmış çalışmalardan farklı olarak pirinç ve yulaf örneklerinde eser miktarda bulunabilecek nivalenol, deoksinivalenol, fumonisin B1, fumonisin B2, okratoksin A, sterigmatocystin, zearalenon ve türevi beta zearalenol kalıntılarının yüksek bir doğruluk ve kesinlik ile belirlenmesini sağlayacak bir analiz metodunun geliştirilmesi amaçlanmıştır. Farklı matristeki mikotoksin kalıntılarının izole edilmesi amacıyla karşılaştırmalı olarak sıvı faz ekstraksiyon yöntemleri ("seyrelt ve enjekte et (dilute and shoot)" ve 1. aşama QuEChERS yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan ekstraksiyon metotlarının amacı temizleme aşaması olmaksızın matriste bulunan interferasyonları azaltarak enstrümantel sisteme etkilerini minimize etmektir. Temizleme aşaması olmadan hem zamandan hem de maliyetten tasarruf edilmesi amaçlanmaktadır. En uygun ekstraksiyon koşulu belirlendikten sonra mikotoksin

kalıntılarının karakterize edilmesi amacıyla elektrosprey iyonlaşma kaynağına (ESI) sahip, hassas ölçüm yapan ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresinden (UHPLC-MS/MS) yararlanılmıştır. Tez kapsamındaki mikotoksinler pirinç ve yulafı daha sıklıkla rastlanması ve tüketiciler için potansiyel toksisitelerine göre seçilmiştir. Piyasadan toplanan 49 pirinç ve yulaf örneği ve *A.versicolor* ile kontamine pirinç ve yulaf örneği her iki ekstraksiyon yöntemiyle hazırlanarak geliştirilen metotla analiz edilmiştir.



2. KAYNAK TARAMASI

Bitki türleri, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve başka canlılara zararlı olan maddelere toksin denilmektedir (Turner vd. 2009). Mikotoksinler, tarımsal ürünlerde farklı iklim koşullarında büyüyen *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* ve *Claviceps* türleri de dahil olmak üzere çok çeşitli filamentli mantarlar tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir. Mikotoksinler her yerde bulunabilir ve çeşitli gıda maddelerini ve tarımsal ürünleri kirletir ve bu ürünler tüketildiğinde insanlar ve hayvanlar üzerinde toksik etki yaratır (Majeed vd. 2018; Marin vd. 2013; Atkins ve Norman 1998).

Gıda ve tarımsal ürünlerin çeşitli türlerdeki toksijenik küfler (mantarlar) tarafından kirletilmesi ciddi ve yaygın olarak ihmal edilen bir sorundur. On yıllarca süren kapsamlı araştırmalardan bağımsız olarak, küf enfeksiyonu hala zorlu ve ciddi bir sorun olmaya devam etmektedir (Munkvold 2003). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından dünyadaki gıdaların % 25'inin küflerle kirletildiği ve mikotoksinlerden etkilendiği tahmin edilmektedir (Mannon ve Johnson 1985). Kötü hasat uygulamaları, uygun olmayan kurutma, taşıma, paketlenme, depolama ve dağıtım koşulları mantarların büyümesine katkıda bulunur ve mikotoksin üretimi riskini artırmaktadır. Gıda zincirinde mikotoksin oluşumu, dünyanın karşı karşıya olduğu önlenemez ve ciddi bir sorundur. Bu nedenle gıda güvenliğinin sağlanması açısından kontrol altına alınması gerekmektedir. Tüketici güvenliğini korumak adına etkili eylemlerin yapıldığından emin olmak için mutlaka bir izleme sistemi olmalıdır (Bhat vd. 2010; Atkins ve Norman 1998).

İnsanların mikotoksinlere karşı reaksiyonları eski zamanlardan beri bilinmektedir. Orta Çağ boyunca birçok Avrupalı için arpa ekmeğinin temel gıda olduğu zamanlarda çok sayıda ergot zehirlenmesi salgınları ortaya çıkmıştır. Halüsinasyon, manik depresyon, kangren, kürtaj ve doğurganlığın azalması gibi semptomlara ve ağırlı ölümlere neden olmuştur. Zehirlenmeler *Claviceps purpurea* küfü ile kontamine tahıllarda oluşan ergot mikotoksinine bağlıdır. Bazı tarihçiler tarafından ergot zehirlenmesinin Orta Çağdaki Avrupa nüfusunun sınırlı olmasının önemli bir nedeni olduğuna, 18. yüzyılın ortalarında patates ve buğdayın temel gıda olarak görülmesiyle de Avrupalı nüfusunun arttığına inanılmaktadır (Smith vd. 1994).

Küfler uygun sıcaklık ve nem koşullarında ikincil metabolit üretimini arttırmaktadır. Küfler tahılların ve depolanmış yemlerin normal mikrofloralarının bir parçasıdır fakat mikotoksin oluşumu mevcut küflere, uygulanan yöntemlere, ürünün kompozisyonuna, hasat, işleme ve depolama uygulamalarına bağlıdır. Üretilen toksin miktarı nem, bağıl nem, sıcaklık ve fiziki zarar gibi fiziksel, karbondioksit, oksijen, substrat kompozisyonu, pestisit ve fungusit gibi kimyasal ve bitki türü, stres, böcek ve spor yükü gibi biyolojik faktörlere bağlıdır (Ukwuru vd. 2017).

Mikotoksinler, mantar türlerine bağlı olarak dünyanın ılıman ve tropikal bölgelerinde ortaya çıkabilir. Etkilenen başlıca gıda ürünleri tahıllar, fındık, kuru meyve, kahve, kakao, baharatlar, yağlı tohumlar, kuru bezelye, fasulye ve meyveler, özellikle elmalardır. Mikotoksinler ayrıca, üretiminde kirlenmiş arpa, diğer tahıllar ve üzümün kullanılmasından kaynaklanan bira ve şarapta da bulunabilir. Mikotoksinler gıda zincirine bitkisel ürünler olarak doğrudan girebildikleri gibi hayvanların mikotoksin içeren yemlerle beslenmelerine bağlı olarak süt, et ve diğer ürünlerdeki kalıntı şeklinde dolaylı

olarak da girebilmektedirler. Genellikle genotipik olarak spesifikler, ancak bir veya daha fazla mantar türü tarafından üretilebilirler (Turner vd. 2009).

1960'lerden beri yaklaşık 400 den fazla mikotoksin türü keşfedilmiş ve genellikle yapısal özelliklerine ve önemli toksik etkilerine göre gruplandırılmıştır. Mikotoksinler siklopeptitler, polisetoasitler, terpenler ve azotlu metabolitler olarak biyolojik kökenlerine ve yapılarına bağlı olarak sınıflandırılmışlardır. Devegowda vd. (1998) önemli bazı mikotoksinlerin dünya genelinde dağılımını kapsamlı olarak rapor etmişlerdir. Buna göre Asya ve Afrika kıtalarında aflatoksin major toksin iken Avustralyada aflatoksin ve fumonisinler; Kuzey Amerikada aflatoksin, okratoksin, zearalenone ve vomitoksin; Güney Amerikada aflatoksin, okratoksin, zearalenone, vomitoksin (DON) ve T-2 toksin; Doğu Avrupa ülkelerinde ZEN ve vomitoksin ve Batı Avrupa bölgelerinde okratoksin, ZEN ve vomitoksindir. Ancak uluslararası ticaretin artması ve karantina engellerinin gevşemesiyle bu toksinlerin dünyanın her yerinde tespit edilmesi çok uzak değildir.

Bilimsel literatüre göre birçok mikotoksin olmasına rağmen bunların çoğu laboratuvar koşullarında bulunmuştur. Bunlardan sadece nispeten küçük bir kısmı gıdalarda ve hayvan yemlerinde yeterince yüksek seviyelerde ve sıklıkla doğal olarak olduğu görülmektedir. *Aspergillus*, *Fusarium*, ve *Penicillium* türlerine ait küfler memelilerde ve tahıllarda ekonomik kayıplara ve hastalıklara neden olan etkiler yaratırlar. Küfler genellikle hasattan önce tohumu enfekte eden bitki patojeni ve tohum ve taneleri depolamada enfekte eden ve bitki patojeninden daha az neme ihtiyaç duyan depo küfü olarak 2 gruba ayrılırlar. En çok kontamine olan ürünler mısır, yerfıstığı, buğday, arpa, yulaf ve süpürge darısıdır (Bennett ve Klich 2003).

Mantarların konak canlıda yaptığı hastalıklara mikozis denilmektedir. Mikotoksikozis toksik mantar toksinlerine deri, solunum ve diyetle maruz kalınması sonucu oluşmaktadır (Bennett ve Klich 2003). İşkembe mikroflorası mikotoksinleri parçalayabilmektedir. Bu nedenle geniş getirenler insanlara göre daha az mikotoksinlerden etkilenmektedirler. Günümüzde ilgilenilen ve dünya çapında gıdaları kontamine eden başlıca toksinler aflatoksinler, okratoksin A, fumonisinler, patulin, moniliformin, sterigmatosistin, trikotesenler ve zearalenondur (Atkins ve Norman 1998; Huffman vd. 2010).

İnsan sağlığı riskleri genellikle aflatoksinler, deoksinivalenol, fumonisinler, okratoksin ve ergot alkaloidleri gibi mikotoksinlerle kontamine olmuş gıdaların doğrudan tüketimi ile ilişkilidir. Bu toksinlerin bir kısmı hasat öncesi oluşurken (aflatoksinler, DON, ergot toksinleri), bazıları da (fumonisinler, okratoksinler) genellikle hasat sonrası süreçte oluşmaktadırlar. İnsanlarda mikotoksikozisin genel semptomları kusma, ishal ve diğer gastro-intestinal problemlerdir. Genel olarak mikotoksinler bağışıklık sistemini baskırlarlar. Mikotoksinlerin bağışıklık sistemi üzerine etkileri Sharma (1993) tarafından daha önce mükemmel bir şekilde gözden geçirilmiştir. Hücre çoğalması ve protein sentezini engelleyerek bağışıklık sistemini baskılayabilen mikotoksinlerden çoğunluğu genellikle DON ve T-2 toksini gibi toksinleri içeren trikotesenlerdir.

Bireysel etkilerle karşılaştırıldığında mikotoksinlerin çoklu olarak özellikle hayvancılıkta sağlık ve verimlilik üzerine daha büyük olumsuz etkiler yarattığı bildirilmektedir (Smith ve Seddon 1998). Mikotoksinler hayvanlarda hayvan

verimliliğinde azalma, bağışıklığın baskılanmasına bağlı olarak hastalık oluşumunda artma, hayati organlara zarar, üreme kapasitesine müdahale ve bazı durumlarda ölüm gibi geniş bir etkiye sahiptir (Bhat vd. 2010).

Gıdalarda mikotoksin kontaminasyonunu önlemek için etkili önlemler alınmalıdır. İlk ve en önemli öncelik, hasattan önce tarlada ve hasattan sonra depolamada mikotoksin üretiminin engellenmesidir. Bir dizi farklı tarımsal uygulama, örneğin ürün rotasyonu, büyüyen dirençli çeşitler, toprak işleme, böcek kontrolü ve bitki hastalıklarının biyolojik ve kimyasal kontrolü, tarladaki ürünlerin üretimini düşüren mikotoksin üreten mantarların büyümesini engellemek için geliştirilmiştir. Hasat sonrası önlemler depolama sırasında mikotoksin üretiminden kaçınmak için çok önemlidir. Özellikle nem ve sıcaklık depolama sırasında küf oluşumunu etkileyen iki ana faktördür. Gıda üretimi sırasında gıda maddelerinin detoksifikasyonu için çeşitli hasat sonrası yöntemler kullanılabilir. Fiziksel uzaklaştırma, daha az toksik bileşiklere kimyasal dönüşüm, enzimatik detoksifikasyon veya yüzeye adsorpsiyonla mikrobiyal degradasyon gibi gıda proseslerinin mikotoksin düzeyi üzerinde değerli etkilerinin olduğu bildirilmektedir (Shanakhat vd. 2018).

Genellikle tarım ürünlerinde mikotoksin kontaminasyonunu önlemek için;

1. Hasat öncesi yöntemler:

- a. dayanıklı çeşitleri kullanma
- b. saha yönetimi
- c. biyolojik ve kimyasal ajanların kullanımı
- d. hasat yönetimi

2. Hasat sonrası yöntemler:

- a. gelişmiş kurutma yöntemleri
- b. iyi saklama koşulları
- c. doğal ve kimyasal ajanların kullanımı
- d. ısınlama yöntemleri kullanılmaktadır.

İyi Tarım uygulamaları, erken ekim ve kullanımı önerilen bitkisel üretim uygulamaları, kurak stresini azaltmak için sulama, erken hasat, hasat sırasında çekirdek hasarının önlenmesi, depolama (yeterli kurutma ve % 13 nemin altında uygun depolama, depolama tesislerini temiz ve kuru tutmak ve İyi Üretim Uygulamaları ile mikotoksin oluşumu önlenmektedir (Ukwuru vd. 2017).

2.1. Başlıca Mikotoksinler

2.1.1. Okratoksin A

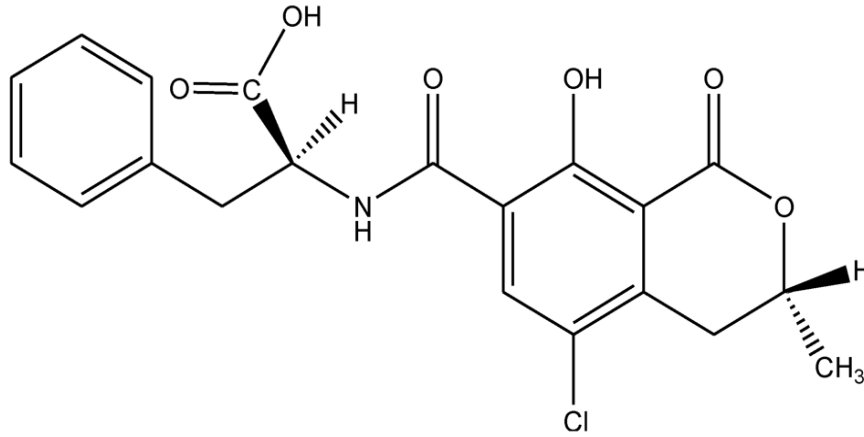
Okratoksinler *Penicillium* ve *Aspergillus* cinsi küfler tarafından üretilmektedirler. *Aspergillus ochraceus* OTA üreten ilk tür olduğu için önemlidir. 2004 yılında OTA üreten benzer özellikte ikinci bir tür bulunmuştur ve *A.westerdijkiae* olarak isimlendirilmiştir. Daha sonraki yıllarda benzer yapıya sahip küf türü *A.steynii* tanımlanmıştır. Bu küf türlerinin *A.ochraceus*'dan çok daha fazla oranda OTA ürettiği tespit edilmiştir. *Aspergillus* türleri arasında *Aspergillus carbonarius*'un önemli OTA üreticisi olduğu bilinmektedir (Gil-Serna vd. 2011).

Okratoksin A (OTA) okratoksinler içerisinde en toksik metabolittir. Okratoksinler yapısal olarak L-fenilalanine bağlı izokumarin türevleri ile ilişkili bir gruptur. Şekil 2.1'de OTA'nın kimyasal yapısı gösterilmektedir. OTA'nın dekloro analogu olan okratoksin B (OTB), etil esteri okratoksin C, izokumarik türevi okratoksin α (Ota) ve onun dekloro analogu okratoksin β (OT β)'dir (El Khoury ve Atoui 2010).

OTA, kristalize, renksiz, suda az ve sulu sodyum bikarbonat çözeltilerinde iyi çözünebilen ve pKa değeri 7.1 olan zayıf asit özellikte bir bileşiktir. OTA UV ışık altında asit ortamlarda yeşil, alkali ortamlarda mavi fluoresans verir. OTA asidik veya nötral pH'da, polar çözücülerde (etanol, metanol, ksilen ve kloroform gibi) iyi çözünür (El Khoury ve Atoui 2010). OTA'nın stabilitesinin yüksek olduğu bilinmektedir. Yaygın gıda hazırlama sıcaklığına dayanıklıdır. 250°C'nin üzerinde birkaç dakika bekletildiğinde konsantrasyonunun düştüğü belirtilmektedir (Marin vd. 2013).

OTA'nın yapısı fenilalaninin yapısına benzerdir ve bu nedenle böbrek ve karaciğerde protein sentezini ve fenil alanin aktivitesini inhibe edebilir (Mantle 2002). OTA farelerde ve sıçanlarda karsinogeniktir ve insanlarda hastalığa neden olan etken madde olarak görülmektedir. OTA sıklıkla tümörle ilişkili olarak böbreklerde görülen Balkan Endemik Nefropatiye sebep olduğu bildirilmektedir (Pfohl- Leszkowicz vd. 2002). OTA'nın RNA ve DNA sentezini engellediği ve memelilerde immünotoksik, genotoksik, nörotoksik ve embriyotoksik olduğu bilinmektedir (Mantle 2002). OTA Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından hayvanlar için kanserojen olduğuna dair yeterli kanıt olduğu fakat insanlar üzerinde yeterli kanıt olmadığını belirterek insanlar için olası karsinogen (Grup 2B) olarak sınıflandırmıştır.

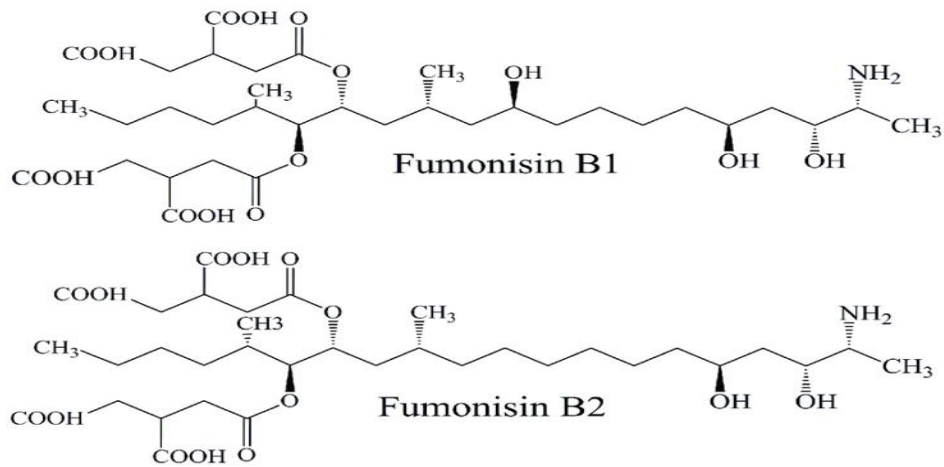
Aynı substuratta AFB1 ile birlikte bulunduklarında AFB1'in mutajenisitesini arttırdığı bildirilmektedir (Sedmikova vd. 2001).



Şekil 2.1. Okratoksin A kimyasal yapısı (El Khoury ve Atoui 2010)

2.1.2. Fumonisinler

İlk defa 1988 yılında isole edilen fumonisinler (macrofusin, mw: 721.8, $C_{34}H_{59}NO_{15}$) oldukça yüksek karsinojenik etkiye sahiptirler (Gelderblom vd 1988; Bennett ve Klich 2003). Şekil 2.2’de Fumonisin B1 ve B2’nin kimyasal yapısı verilmekte olup, şekilden de görüldüğü üzere fumonisinler hidrofilik özelliktedir ve birçok mikotoksinde kimyasal yapı olarak farklı olup, organik çözücülerde tamamen çözünmemektedirler. FBler *Alternaria alternata*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. Anthophilum* ve *F. nygamai* gibi *Fusarium* türleri tarafından üretilmektedir (Bennett ve Klich 2003). Şimdiye kadar izole edilen 28 adet fumonisin bulunmakta olup A, B, C ve P olarak dört seriden oluşmaktadır (Rheeder vd. 2002). FB1, FB2 ve FB3 tahılların doğal kontaminantları olarak analiz edilen başlıca fumonisinlerdir. *F. verticillioides* birçok mikotoksin üretirken bunlardan en önemlisi fumonisin B1(FB1) dir ve IARC tarafından Grup 2B (olası karsinojenik) olarak sınıflandırılmaktadır (Ostry vd. 2017). Karsinojenik fumonisin B2 (FB2)’nin ilk defa endüstriyel olarak önemli olan *Aspergillus niger* tarafından üretildiği bildirilmiştir (Frisvad vd. 2007).



Şekil 2.2. Fumonisin B1 ve B2’nin kimyasal yapısı (Kostić vd. 2019)

Fumonisin B1 in ısıtma işlemine dayanıklı olduğu, kaynatmadan sonra FB1 seviyesinde azalma olmadığı bildirilmektedir (Alberts vd. 1990). Marin vd. (1995) farklı su aktivitelerinde (0,968, 0,956, 0,944, 0,925) ve farklı sıcaklıklarda (25 °C ve 30 °C) yaptıkları çalışmada FB1 ve FB2 konsantrasyonunun tüm su aktivite değerlerinde ve sıcaklıklarda zamanla artış gösterdiğini bildirmektedirler. Toksisitesi 150 °C'nin üzerindeki proseslerle minimize edilebilmektedir (Marin vd. 2013).

Fumonisinler yapısal olarak sfinganine benzerdir ve FB1 sfingolipid metabolizmasını bozarak toksik etkilerini gösterir. Bu mekanizmanın etkileri protein kinaz aktivitesi, hücre büyümesi ve farklılaşması, hücre ölümü (apoptoz), kanserojenlik ve lipid peroksidasyonuna katılım olarak yansır (Yazar ve Omurtag 2008). Fumonisin esas olarak karaciğer ve böbreklerde etkilidir ve deney hayvanlarında ciddi toksisiteye neden olmaktadır (Mazzoni vd. 2011). Hidrofilik özellikleri nedeniyle sığırlardan süte taşınmaz ve yenilebilir dokularda az miktarda FB1 birikir (Richard 2007).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda fumonisinlerin insan sağlığı üzerine doğrudan olumsuz etkilere neden olduğuna dair bir kanıt bulunmamaktadır. *F. verticilloides* ve fumonisinlerle kontamine olmuş mısır ve mısır ürünlerini tüketen insanlarda özofagus kanseri görülme sıklığının yüksek olduğu tespit edilmiştir. Güney Afrika'nın Transkei bölgesinde ve Çin'de *Fusarium* türleri ile kontamine olmuş mısır ve mısır ürünlerini tüketen insanlarda sırasıyla özofagus ve karaciğer kanseri görülme sıklığındaki artış fumonisinler ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca insanlarda nöral tüp defekti (NTD) oluşturabileceği, Meksika-Teksas sınırında görülen NTD'nin fumonisinler ile ilişkilendirildiği rapor edilmiştir (Marin vd. 2013).

Mısır ve mısır bazlı gıda ve yemlere ek olarak fumonisinlerin fasulyede, pirinçte, süpürge darısında, buğday şehriyesinde, köride, acı biber turşusunda, polende ve mısır bazlı fermente ajanlarda tespit edildiği bildirilmektedir (Ho ve Durst 2003; Kostić vd. 2019).

2.1.3. Trikotesenler

Trikoteseenler (TC), genellikle *Fusarium* türü mantarlar tarafından üretilen ve kimyasal olarak seskiterpenoidlere ait olan mikotoksinlerdir. *Myrothecium*, *Spicellum*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium*, *Trichoderma*, ve *Trichothecium* türleri tarafından da üretilebilmektedir (Ueno 1983; Bottalico ve Perrone 2002; Cole vd. 2003). Genellikle *Fusarium* türleri nemli serin ortamlarda mahsulde büyür ve ürünü enfekte ederler. Trikoteseenler genel olarak hem depolama / öğütme hem de gıdaların işlenmesi / pişirilmesi sırasında çok kararlı bileşiklerdir ve yüksek sıcaklıklarla bozulmazlar (EFSA 2011; Eriksen ve Alexander 1998).

TC'ler tüm mikotoksinlerin içinde kimyasal olarak en fazla çeşite sahip olanlarıdır. Bugüne kadar 180 den fazla trikoteseen ve bunların türevi isole ve karakterize edilmiştir (Yazar ve Omurtag 2008). Trikoteseenler ortak 12,13-epoksitrikotes-9-en (EPT) halkası içeren toksin ailesidir. EPT çekirdek yapısına göre A, B, C ve D olmak üzere dört farklı gruba ayrılırlar. A, B ve C grupları C-8 pozisyonundaki yer değiştirmeye bağlı olarak farklılaşabilirler. D tipi trikoteseenlerde C-4 ve C-15 konumunu birbirine bağlayan ek halka vardır. A ve B tipi izole edilmiş toksinlerin büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır (Berger vd. 1999; McCormick vd. 2011).

Trikotesenler arasında T-2 toksini, diasetoksiskirpenol (DAS), deoksinivalenol (DON veya vomitoksin olarak bilinir) ve nivalenol bulunur (Trenholm vd 1986). A grubundan olan T-2 toksini ve scirpentriol ile B grubuna dahil olan deoksinivalenol (DON) ve nivalenol (NIV) ve türevleri tarım ürünlerinde en çok kontaminasyona neden olan trikotesenlerdir. DON ve NIV'in doğada bulunma sıklığı, T-2 toksini ve scirpentriole göre daha fazladır (Hsueh vd. 1999). Bunların arasında DON en yaygın ve üzerinde en çok çalışılanıdır ancak en az toksik olanıdır (Bennet ve Klich 2003). Hem T-2 toksini hem de DAS en toksiktir ve polar olmayan çözücülerde (örneğin etil asetat ve dietil eter) çözünürken, DON ve ana bileşiği nivalenol, alkoller gibi polar çözücüler içinde çözünür (Trenholm vd. 1986).

TC'lerin Sibirya'da ilk kez 1890'larda insanlarda görülen "taumelge treide" (şaşırtıcı tahıllar) olarak adlandırılan hastalığa neden olduğundan şüphelenilmektedir. Trikotesen mikotoksikozun (kabuklu tane toksikozu) kontamine gıdaların (buğday, mısır, pirinç) tüketiminin ardından birkaç saat sonra ortaya çıktığı bildirilmiştir. Mevcut raporlar Japonya'da (Ueno 1971), Çin (Wang vd. 1993) ve Hindistan'da (Ramakrishna vd. 1989) zehirlenmelerin meydana geldiğini göstermektedir. 1990'larda Kuzey Amerika'da ciddi salgın hastalıklardan biri olan *Fusarium* kafa yanıklığı (*Fusarium* head blight) ABD'de tahmini 3 milyar dolarlık ekonomik kayıba yol açmıştır (Mc- Mullen vd. 1997). Trikoten mikotoksikozun ana belirtileri karın ağrısı, bulantı, kusma, ishal, baş dönmesi ve baş ağrısıdır (Bhat vd. 2010). TC'ler 1932 yılında Rusyada görülen gastrointestinal toksik aleukia (ATA) toksikozunun nedeni olarak görülmektedir (Yazar ve Omurtag 2008). Trikotesenler, 1942-47 yılları arasında Sibirya yakınlarındaki Orenburg bölgesinde kışı geçiren darı, buğday ve arpa tüketimine bağlı olarak nüfusun %10'undan fazlasının ölümüyle ilişkili bulunmuştur. Rusya'da yapılan kapsamlı araştırmalar sonucunda *Fusarium* mantar türlerinden bir toksinin ATA'nın etken maddesi olduğunu ortaya koymuştur. Sonuç olarak güçlü bir trikotesen toksin olan T-2'nin muhtemel ajan olduğu kanıtlanmıştır (Yagen vd. 1977; Eriksen 2003). Bu mikotoksin ailesi kusma, ishal, kilo kaybı, sinir bozuklukları, kardiyovasküler değişiklikler, immünodepresyon, hemostatik düzensizlikler, cilt toksisitesi, üreme kapasitesinde azalma ve kemik iliği hasarı gibi çoklu organ etkilerine neden olur (Wannemacher ve Wiener 1997). TC'lerin 1970'lerin sonlarında Güneydoğu Asya ve Afganistan'daki siviller ve mültecilere kimyasal silah olarak kullanıldığı bildirilmiştir. TC'lerden T-2 toksini, DON, diasetilnivalenol ve NIV kimyasal silah olarak kullanılmaktadır (Sudakin 2003; Steyn ve Stander 1999).

2.1.3.1. Deoksinivalenol

Vomitoksin veya DON olarak da bilinen deoksinivalenol esas olarak *Fusarium graminearum* ve bazı bölgelerde de *F. culmorum* tarafından üretilmektedir (Richard 2000). DON bu küfler tarafından üretilen zearalenon toksini ile birlikte bulunabilir. DON'a genellikle kontamine buğday ve mısırdan hazırlanan gıda ürünlerinde rastlanmaktadır (Rotter vd. 1996).

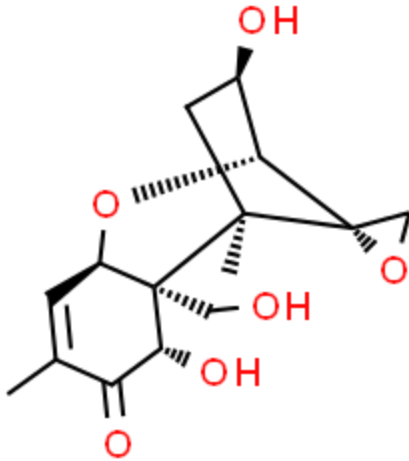
DON birçok hasat sonrası üründe bulunduğu, öğütme, pişirme ve ısıtma gibi çeşitli gıda işleme proseslerinde aktif kalabildiği ve oldukça dayanıklı olduğu düşünülmektedir (Petska ve Smolinski 2005). DON ve onun metaboliti olan de-epoksi-DON'un düşük miktarlarda yumurtada (Sypecka vd. 2004) ve düşük seviyelerde birada (Scott 1996) tespit edildiği bildirilmektedir. Belçika'da yapılan bir çalışmada da evde

yetiştirilen tavuklardan elde edilen 20 yumurtada DON(2,6-17,9 ng/g) ve onun metaboliti de-epoksi-DON'un (2,4-23,7 ng/g) tespit edildiği bildirilmiştir (Tangnia vd. 2008). Şekil 2.3'de DON'un kimyasal yapısı verilmiştir (Anonymous 1).

DON'la kontamine ürün tüketiminin süt sığırlarında süt üretiminde azalmaya, domuzda kusmaya, birçok hayvan türünde bağışıklık sisteminin zayıflamasına ve üreme performansında azalmaya neden olduğu bildirilmektedir (Jones vd. 1994; Zhou vd. 2000). Bu toksinle kontamine buğday ile hazırlanan evcil hayvan yemleri akut toksisiteye neden olmaktadır. DON bağışıklığı baskılamaktadır ve bu da hayvanlarda böbrek problemlerine neden olabilmektedir (Pestka ve Bondy 1994). DON ile kontamine olmuş tahıl tüketen insanların da benzer kusma sendromu sergilediği bildirilmektedir (Bhat vd. 1989). Toksik seviyelerde bu toksini tüketen hayvanların kanında veya dokularında DON'un önemli ölçüde taşındığı görülmemektedir (Prelusky 1994). Kontamine buğday ve arpada pişirme ve maltlama işleminin toksin seviyesini olumsuz etkilediği bildirilmektedir (Richard 2000).

Tarlada bir önceki sezondan kalan mahsülde bulunan organizmalar yeni mahsül için bulaşı kaynağı olabilmektedir. Organizmalar nemli ve serin ortamlarda iyi çalışır ve mahsülün kontaminasyonu, organizmanın konidyumlarının rüzgarla dağılarak mısır püsküllerine veya anterlerdeki küçük tanelere bulaşmasıyla meydana gelmektedir. Mantar konakçı kulağına veya çiçeklere nüfus eder ve mısırdaki kulak çürüklüğüne veya küçük tanelerde kafa yanıklığı hastalığına neden olur. Belli çevresel faktörler geç büyüme sezonunda mahsülde DON'un gelişmesine uygundur. Bazı ürünlerde organizmanın hastalık yapması için DON üretimi gereklidir (Richard 2007).

Böcek zararlılarının kontrol edildiği ve %14 nemin altında uygun koşullarda depolamanın bu toksijenik mantarlar tarafından üretilen toksinin daha fazla birikimini minimize edeceği bildirilmektedir (Richard 2007).



Şekil 2.3. Deoksinivalenolun kimyasal yapısı

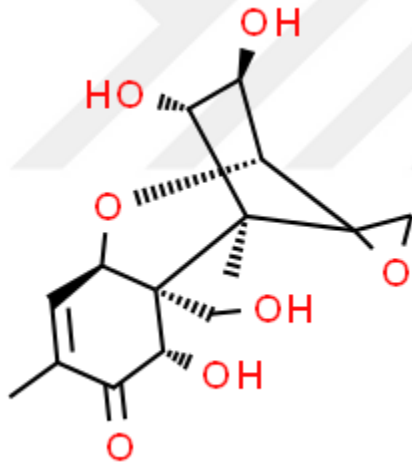
2.1.3.2. Nivalenol

Nivalenol (3,4,7,15-tetrahidroksi-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-on) doğal olarak oluşan TC'lerin en iyi bilinenlerinden biridir (Yazar ve Omurtag 2008).

Nivalenol, *Fusarium cerealis* ve *Fusarium poae* ve daha az ölçüde *Fusarium culmorum* ve *Fusarium graminearum* gibi *Fusarium* cinsi mantarlar tarafından üretilen bir mikotoksindir. Bu mantarlar çeşitli tahıl ürünlerinde (buğday, mısır, arpa, yulaf ve çavdar) ve işlenmiş tahıllarda (malt, bira ve ekmek) bol miktarda bulunur. Kore, Çin ve diğer ülkelerde üretilen tahıllarda ve gıdalarda sıklıkla tespit edilmiştir ve gıda kaynaklı çeşitli hastalıklara yol açtığı düşünülmektedir (Ito vd. 1986).

Trikotesen üreten mantarlar toprak mantarlarıdır ve tarlada ürün üzerinde yetişen önemli bitki patojenleridir. Kimyasal olarak nivalenol, tip B trikotesene aittir (Eriksen ve Alexander 1998; IARC 1993). Şekil 2.4’de NIV’in kimyasal yapısı gösterilmektedir (Anonymous 2).

NIV, memeli hücrelerinde güçlü bir protein, RNA, DNA sentezi inhibitörüdür ve in vivo çoğalan hücrelerin nekrozuna neden olur (Ito vd. 1986). Bu nedenle, NIV özellikle lenfoid organlar ve bağırsak mukozası gibi hızla bölünen dokulara toksiktir (Maragos vd. 2006). NIV’in, HL60 hücrelerinde programlanmış hücre ölümünü (apoptozis) indüklemeye yetenekleri vardır (Ueno vd. 1995). Deney hayvanlarında NIV’in kanserojenliği konusunda yeterli kanıt yoktur. Ayrıca insanlar üzerindeki etkisi ile ilgili hiçbir veri mevcut değildir (Yazar ve Omurtag 2008). Türkiye’de gıdalarda ve yemlerde bulunması ile ilgili yasal bir düzenleme mevcut değildir.



Şekil 2.4. Nivalenolun kimyasal yapısı

2.1.4. Zearalenon

ZEN, kimyasal olarak bir keto grubu ve bir olefinik çift bağ taşıyan makrosiklik β -resorsilik asit lakton (RAL) olarak sınıflandırılabilir. ZEN ve metabolitlerinin kimyasal yapısı Şekil 2.5’de gösterilmiştir. ZEN’in, asetonitril, metilen klorür, metanol, etanol ve aseton gibi çözücülerdeki çözünürlüğü yüksektir. ZEN’in gıdalarda pişirme, işleme, öğütme ve depolama süresince dayanıklı olduğu ve bozunmanın sadece 150 °C’nin üstündeki sıcaklıklarda veya alkali koşullar altında olduğu gözlenmiştir (Yazar ve Omurtag 2008; Minervini ve Dell’Aquila 2008; EFSA 2011).

ZEN’in hayvanlarda oluşan metabolitleri: α -zearalenol (α ZOL), β -zearalenol (β -ZOL), α -zearalanol (α -ZAL), β -zearalanol (β -ZAL) ve az miktarda zearalanon2 (ZAN)

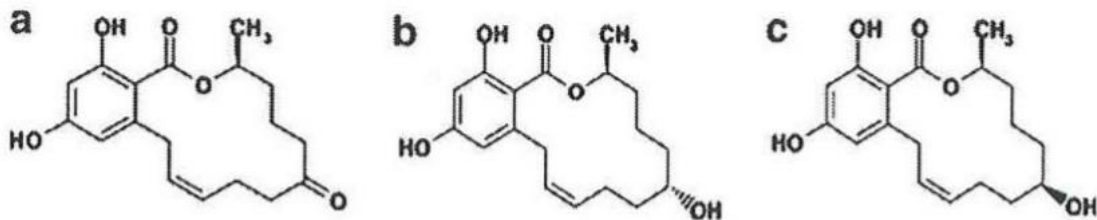
gibi indirgenmiş faz I metabolitleri ve ZEN'in glukoz, sülfat ve glukuronik asit ile konjuge faz II türevleridir (Metzler vd. 2010; Berthiller vd. 2013). α ZOL ve β -ZOL en önemli ZEN türevleridir. α ZOL ve östrojen reseptörleri arasındaki güçlü benzeşmeden dolayı, α ZOL 'un östrojenik potansiyeli ZEN ve β -ZOL'den daha yüksektir. ZEN kontaminasyonu genellikle DON ile birlikte çok az da aflatoksinle olur. ZEN'in kısmi olarak yüksek sıcaklıkla uzaklaştırıldığı bildirilmektedir (Zinedine vd. 2007).

Zearalenon domuzlarda vulvovajinit olarak bilinen üreme bozukluğunun nedeni olarak keşfedilmiştir (Moss 2002). Amerika, Avrupa ve Asya'nın ılıman bölgelerindeki en yaygın *Fusarium* mikotoksinlerinden biridir (Krska vd. 2003). Başlıca *F. graminearum* ve *F. semitectum* tarafından üretilmektedir (Bhatnagar vd. 2002). Doğal olarak oluşan östrojenlere yapısal benzerliği ve insanlarda ve hayvanlarda östrojenik etkilere yol açması nedeniyle östrojenik mikotoksin olarak tanımlanmaktadır (Bennet ve Klich 2003).

Önceden F-2 toksini olarak bilinen ZEN dört hidroksil türevi formunda ortaya çıkabilir. ZEN, *Fusarium* türleri tarafından üretilen steroidal olmayan, östrojenik bir mikotoksidir. *Fusarium* spp tarafından üretilen mikotoksinler DON, NIV, T-2 ve DAS'ı da içeren östrojenik olmayan TC'ler ve ZEN ve zearalenol dahil mikoöstrojenler olmak üzere iki genel tiptir. ZEN ve bazı metabolitleri östrojen reseptörlerine rekabetçi bir şekilde bağlanmaktadır (Yazar ve Omurtag 2008).

ZEN, toksik etkisinin büyük çoğunluğunu östrojen reseptörlerine (ER) bağlanma yeteneği ve dolayısıyla, özellikle dişilerde, üreme sisteminin endokrin regülasyonunu bozmasıyla ilişkili olduğu bilinmektedir (EFSA 2017). ZEN ve metabolitlerinin anabolik aktiviteleri vardır ve karaciğer, böbrek ve immün sistem üzerine toksik etki gösterirler (Abbès vd. 2006). Ayrıca, hücre ölümünü indüklediği, lipid peroksidasyonuna neden olduğu, protein ve DNA sentezini inhibe ederek genotoksik etkiler gösterebileceği ve böbrekte fagolizozomal hassasiyete neden olabileceği bildirilmiştir (Gao vd. 2013).

ZEN genellikle mısırdan bulunur ancak dünyanın çeşitli ülkelerinde arpa, süpürge darısı, çavdar, pirinç ve buğday gibi diğer ürünlerde de bulunabilir. Genellikle *Fusarium* türleri küflü serin ortam koşullarında büyür ve ürünü istila eder. Zearalenon esas olarak bir tarla kirleticisi iken, toksin üretimi kötü depolama koşullarında da olabilir (EFSA 2011; Ünüsan 2019). ZEN, buğday, arpa, yulaf gibi tahıllarda DON ile ve mısırdan fumonisinler ile birlikte bulunabilir (González vd. 1999).



Şekil 2.5. Zearalenon ve türevlerinin kimyasal yapıları a) zearalenon b) α -zearalenol c) β -zearalenol (Minervini ve Dell'Aquila 2008)

2.1.5. Sterigmatosistin

Sterigmatosistin (STE), hayvanlarda farklı toksikolojik, mutajenik ve karsinojenik etkiler gösteren ve Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü (IARC) tarafından 2B kanserojen madde olarak sınıflandırılan, yaklaşık 15 çeşit küf tarafından üretilen bir metabolittir. STE'nin en önemli üreticisi *Aspergillus versicolor*'ın belli suşlarıdır (Cole 1976; Veršilovskis ve De Saeger 2010; Viegas vd. 2018).

Sterigmatosistinin asıl üreticisi olan *Aspergillus versicolor* düşük su aktivitesinde (<0,8) gelişebildiğinden kserofiliktir. *Aspergillus versicolor* için minimum ve maksimum büyüme sıcaklığı 4-40°C, optimum sıcaklık ise 30°C'dir. STE üretimi için optimum sıcaklık 23-29°C arasındır (Atalla vd. 2003).

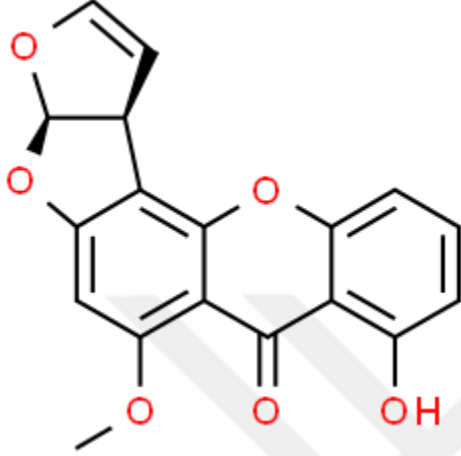
Sterigmatosistin, açık sarı renkte iğne şeklinde kristalleşir ve metanol, etanol, asetonitril, benzen ve kloroformda kolaylıkla çözünür. Sıcak etanolik potasyum hidroksit ile reaksiyona girer ve metil sülfat ve metil iyodad ile metillenir. Erime noktası 246°C, maksimum ultraviyole ışığı absorbanısı 245-325 nm, moleküler formülasyonu C₁₈H₁₂O₆ dır. Şekil 2.6'da kimyasal yapısı görülmektedir (Anonymous 3). Yapısal olarak Aflatoksin B1 e benzerdir ve aynı 7,8 -dihidrofuro (2,3-b)furan yapısına sahiptir (Rodricks 1969; Tunail 2000).

Sterigmatosistin gıdalarda doğal olarak az görülür. Bu nedenle gıdalarda bulunması üzerine sınırlı sayıda araştırma gerçekleştirilmiştir. Sterigmatosistin hububatta, ekmekte, kolzada, soya fasulyesinde, peynirde, baharatlarda, kakao çekirdeğinde, sebzelerde, antep fıstığı çekirdeğinde, kahve çekirdeğinde ve yemlerde bulunduğu dair araştırma sonuç raporları vardır. Ayrıca yüksek seviyelerde sterigmatosistin, *Aspergillus versicolor* ile kontamine olmuş meskenlerde ve inşaat malzemelerinde de tespit edilmiştir (Gravesen vd. 1999; Nielsen vd. 1999; Engelhart vd 2002). Hububatların *Aspergillus* küfleriyle kontaminasyonu, Avrupa'nın (kuzey, kuzeybatı, kuzeydoğu ve orta Avrupa) iklim koşulları altında özellikle depolama süresince mümkündür. Hububatların hasattan sonra *Aspergillus* ile kontaminasyonu, sterigmatosistin ve AFB1 ile Okratoksin A gibi diğer toksinlerin olası üretiminden dolayı sağlık riski içermektedir (Veršilovskis ve De Saeger 2010).

Aflatoksinler ile yapısal benzerlikleri nedeniyle genotoksisite ve karsinojenisite dahil benzer toksik etkiler göstermektedirler (Miller ve Trenholm 1994; EFSA Gıda Zincirindeki Kontaminantlar Paneli (CONTAM) 2013). Bununla birlikte, aflatoksinlerin aksine, sadece STE oluşumu ve toksisitesi hakkında sınırlı bilgi mevcuttur.

2013 yılında Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından gıda ve yemlerde STE hakkında bilimsel bir görüş sunulmuştur. EFSA Gıda Zincirindeki Kontaminantlar Paneli (CONTAM) bu görüşten sorumluydu. Bununla birlikte, Avrupa nüfusu için maruz kalma verilerinin olmaması nedeniyle, STE için maruz kalma marjı ve kanserojen maddeler için yaklaşım uygulanamadı ve bu nedenle, STE' nin insan sağlığı için riski karakterize edilemedi. Panelde doğru bir şekilde diyetle maruz kalmanın değerlendirilebilmesi için Avrupa ülkelerinde gıda ve yemlerde daha fazla veriye ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir (EFSA Gıda Zincirindeki Kontaminantlar Paneli (CONTAM) 2013).

Çek Cumhuriyeti ve Slovakya’da gıdalardaki sterigmatosistin seviyesiyle ilgili düzenlemeler yapılmıştır. Toksin için izin verilen sınır, pirinç, sebze, un, kümes hayvanları, et ve süt için 5 µg/kg, diğer gıdalar için ise 20 µg/kg olarak belirlenmiştir. Diğer ülkelerde ise yasal düzenlemeler yoktur. Bu yüzden kontrol ve izleme programları da bulunmamaktadır (Stroka vd. 2004). Ülkemizde de yasal bir düzenleme bulunmamaktadır.



Şekil 2.6. Sterigmatosistin kimyasal yapısı

Çizelge 2.1’de bu tez kapsamında kullanılan mikotoksinler ve metabolitlerinin uluslararası tescilli olmayan adı (INN), Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından belirtilen adı, Kimyasal Kuramlar Servisi (CAS) tarafından belirtilen kayıt numaraları, molekül formülü ve molekül ağırlığı belirtilmiştir.

Çizelge 2.1. Mikotoksinler ve metabolitlerinin uluslararası tescilli olmayan adı (INN), Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından belirtilen adı, Kimyasal Kuramlar Servisi (CAS) tarafından belirtilen kayıt numaraları, molekül formülü ve molekül ağırlığı

INN adı	IUPAC adı	CAS numarası	Molekül formülü	M.A. (g/mol)
Okratoksin A	(2S)-2-[[[(3R)-5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-3,4-dihydroisochromene-7-carbonyl]amino]-3-phenylpropanoic acid	303-47-9	C ₂₀ H ₁₈ ClNO ₆	403,8
Fumonisin B1	2-[2-[19-amino-6-(3,4-dicarboxybutanoyloxy)-11,16,18-trihydroxy-5,9-dimethylcosan-7-yl]oxy-2-oxoethyl]butanedioic acid	116355-83-0	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	721,8
Fumonisin B2	2-[2-[19-amino-6-(3,4-dicarboxybutanoyloxy)-16,18-dihydroxy-5,9-dimethylcosan-7-yl]oxy-2-oxoethyl]butanedioic acid	116355-84-1	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705,8
Deoksinivalenol	(1R,2R,3S,7R,9R,10R,12S)-3,10-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)-1,5-dimethylspiro[8-oxatricyclo[7.2.1.0 ^{2,7}]dodec-5-ene-12,2'-oxirane]-4-one	51481-10-8	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	296,31
Nivalenol	(1S,2R,3S,7R,9R,10R,11S,12R)-3,10,11-trihydroxy-2-(hydroxymethyl)-1,5-dimethylspiro[8-oxatricyclo[7.2.1.0 ^{2,7}]dodec-5-ene-12,2'-oxirane]-4-one	23282-20-4	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	312,31
Zearalenone	(4S,12E)-16,18-dihydroxy-4-methyl-3-oxabicyclo[12.4.0]octadeca-1(14),12,15,17-tetraene-2,8-dione	17924-92-4	C ₁₈ H ₂₂ O ₅	318,4
Sterigmatosistin	(3S,7R)-15-hydroxy-11-methoxy-6,8,20-trioxapentacyclo[10.8.0.0 ^{2,9} .0 ^{3,7} .0 ^{14,19}]icosa-1,4,9,11,14,16,18-heptaen-13-one	10048-13-2	C ₁₈ H ₁₂ O ₆	324,3
β Zearalenol	(4S,8S,12E)-8,16,18-trihydroxy-4-methyl-3-oxabicyclo[12.4.0]octadeca-1(14),12,15,17-tetraen-2-one	71030-11-0	C ₁₈ H ₂₄ O ₅	320,4

2.2. Ekstraksiyon

Mikotoksinlerin daha sıklıkla gündeme gelmesi ve insan sağlığı üzerindeki ciddi etkilerinden dolayı gıda güvenliği artan bir ilgi görmektedir. Böylece gıdalardaki mikotoksinlerin tespit edilmesi için analitik yöntemlerin geliştirilmesi özellikle önem kazanmaktadır. Bu amaçla; hızlı, seçici ve hassas yöntemler kullanılarak gıdalarda olabildiği kadar düşük konsantrasyon seviyelerinde bulunabilecek mikotoksin kalıntılarının tespit edilmesi önemlidir. Analiz edilen matriksin çeşitliliği ve yapısına bağlı olarak analitik prosedürler genel olarak ekstraksiyon, temizleme, ayırma, tespit etme, veri analizi ve doğrulama aşamalarından oluşmaktadır. Her bir aşama, analizin doğruluğu, güvenilirliği ve performansı açısından kendi içerisinde önem arz etmektedir (Da Silva vd. 2019; Dean 2009).

Numune hazırlama, herhangi bir analitik prosedürde çok önemli bir adımdır. Bu adımın amacı, temiz özütlerle farklı matrislerde bulunan önemli sayıda analit için uygun geri kazanımı sağlamaktır. Analitik Kimya'nın mevcut eğilimleri basit, hızlı, uygun

maliyetli ve yüksek verimli protokollerle tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, doğruluk, kesinlik, seçicilik, hassasiyet ve tespit edilebilirlikten ödün vermeden hareket etmeyi içerir. Ayrıca, “Yeşil Analitik Kimya”nın 12 prensibiyle bağlantılı olarak ve çevre kirliliğini azaltmak amacıyla, bilim adamları tüketilen organik çözücüler ve reaktanları azaltmaya çalışıyor, gerekli örnek sayısını ve boyutunu en aza indirerek, minyatür ve otomatik teknikler kullanmaya çalışmaktadırlar. Bir analitik prosedürün örnek toplamadan veri işlemeye kadar tüm adımları çevre dostu yöntemler elde etmek için değiştirilmeye yatkındır. Numune hazırlamanın genellikle çözücüler, kimyasal maddeler, enerji ve zaman gibi yüksek miktarda kaynak tükettiği unutulmamalıdır. Bu nedenle analitik bilimi daha verimli ekstraksiyon geliştirmek için büyük çaba harcamaktadır (Gałuszka vd. 2013; Ibañez ve Cifuentes 2017).

Analitik yöntemin toplam süresinin yaklaşık 2/3 ‘ünü kapsayan örnek hazırlama aşaması, bir analiz yönteminin başarısı için en önemli basamağını oluşturmaktadır. Bu aşama seçilecek tespit yöntemini de etkilemektedir (Turner vd. 2009). Gıda gibi homojen yapıda olmayan karmaşık yapıli matrikslerde eser (trace) kalıntı ve kontaminantların belirlenmesi için enstrümental analiz aşamasından önce örnek hazırlama işleminin uygun şekilde yapılması önemlidir. Bu aşamada hem süreyi hem de hata kaynaklarını azaltmak için işlem basamaklarını minimize etmek gerekmektedir (Smith 2003).

Seçilecek ekstraksiyon yöntemi analitin fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Moleküler ağırlık, yük, çözünürlük (hidrofobiklik), polarite veya uçuculuktaiki farklılıklara göre uygun ekstraksiyon yöntemi seçilmektedir. İmmünoafinite ve baskılı polimerler gibi bazı ekstraksiyon yöntemleri, spesifik yapısal gruplar için seçiciliği kullanır veya biyolojik bir seçiciliği taklit ederek istenen analitin ekstraksiyonunu mümkün kılar. Ekstraksiyonun temel işlevi, matriksi analiz için uygun formda örneğe dönüştürmektir. Ekstraksiyon yöntemlerinin uygulanış biçimlerinde farklılık olmasına rağmen; interferans (girişim) oluşturan maddeleri uzaklaştırmak, analitin konsantrasyonunda artış sağlamak, analitin ayrılması ve tespiti için uygun forma dönüştürmek ve örnek matriksindeki varyasyondan bağımsız olarak sağlam ve tekrarlanabilir yöntem sağlamak gibi ortak amaçları vardır. En uygun örnek hazırlama işlemi ile analiz süresinin kısaltılması ve hata kaynaklarının azaltılması, duyarlılığın artırılması ve tanımlama, doğrulama ve miktar belirleme işlemlerinin doğru bir şekilde yapılması mümkün olmaktadır (Smith 2003; Ridgway vd. 2007; Otles ve Ozyurt 2014).

Örnek materyalinin fizikokimyasal özelliği ve analiz edilecek toksinin çeşidine göre kullanılacak olan ekstraksiyon metodu seçilir. Ekstraksiyon çözücüsünün seçimi, analitin fiziksel ve kimyasal özellikleri, çözücü maliyeti ve güvenliği, analit olmayan maddenin ekstraksiyon çözücüsü içindeki çözünürlüğü ve ekstraksiyondan sonraki işlem aşamaları dahil olmak üzere birçok şeye bağlıdır. İdeal olarak, ekstraksiyon çözücüsü sadece ilgili mikotoksini numune matrisinden çıkarmalıdır. Bununla birlikte, gıdaların karmaşık yapısı ve tamamen spesifik bir ekstraksiyon çözücüsünün bulunmaması nedeniyle, kullanılan ekstraksiyon çözücüsü, hem analit hem de ilişkili matrisin özelliklerine göre ayarlanmalıdır. İstenilen mikotoksinleri uzaklaştıracak spesifik bir çözücü bulunmadığından mümkün olduğunca çok mikotoksini uzaklaştıracak çözücünün seçilmesi amaçlanmaktadır (Rahmani vd. 2009; Zhang vd. 2018).

Karmaşık matrislerde mikotoksinlerin belirlenmesi ve miktar tayini için sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisine (LC-MS / MS) dayalı analitik yöntemler

kullanılmaktadır. Ekstraksiyon işleminden gelen girişimleri azaltarak matris etkilerini mümkün olduğunca azaltmak amacıyla sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı faz ekstraksiyonu (SPE), hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE), matris katı faz dispersiyonu ve seyrelt ve enjekte et (dilute and shoot) gibi çok çeşitli numune hazırlama yöntemleri kullanılmaktadır (Serrano vd. 2013).

2.2.1. Sıvı-faz ekstraksiyon

Sıvı-faz ekstraksiyon, çözünen maddelerin katı matristen çözgene geçişini içeren bir ayırma prosesidir. Uygun organik çözücünün seçimi, analiti en yüksek verimlilikle özütlemeyi amaçlamalıdır. Matris içerisindeki diğer bileşiklerin ise çözgüde çözünmemesi gerekmektedir. Bunda ekstrakte edilecek mikotoksinlerin polaritesi önemli bir konudur. Çözücünün kolay geri kazanılması, toksik olmaması, yanıcı olmaması, uçuculuğu, dayanıklılığı, UV ışığı geçirgenliği ve çevresel etkileri de dikkate alınmalıdır. Mikotoksinleri ekstrakte etmek için kullanılan en etkili çözücüler genellikle metanol, aseton, asetonitril, etil asetat, dietil eter, toluen ve kloroform gibi nispeten polar çözücüler veya bunların karışımlarıdır (Rahmani vd 2009). Analitin fizikokimyasal yapısına ve matrise bağlı olarak çözücü karışımına asit veya bazik tamponlar sıklıkla eklenmektedir (Krska vd. 2008; Alshannaq ve Yu 2017).

Son yıllarda, mikotoksinlerin ekstraksiyonunda zamandan ve ekonomiden tasarruf amaçlı sıvı-faz ekstraksiyon işlemini gerçekleştirmek için manuel ekstraksiyon uygulamalarından (QuEChERS) ve seyrelt ve enjekte et (dilute and shoot) uygulamaları da kullanılmaktadır.

2.2.1.1. QuEChERS

Analitik kimyagerler çok çeşitli örnek matrislerinden hedef bileşiklerin kalitesi, özgünlüğü, güvenliği ve izlenebilirliği için daha hızlı, daha kesin, daha çevre dostu ve daha doğru yöntemleri geliştirmek için sürekli olarak çalışmaktadırlar. Bu bağlamda QuEChERS yöntemi, numune miktarını ve laboratuvar araç gereçleri ile birlikte kullanılan organik çözücü miktarını azaltmasıyla en umut verici, kullanıcı dostu ve yüksek verimli ekstraksiyon metodlarından biridir (Perestrelo vd. 2019). QuEChERS metodunun en önemli avantajları çok farklı polaritedeki pestisitlerin yüksek geri kazanımlarına olanak sağlaması, yüksek verimli olması, daha az çaba, zaman ve organik çözücü kullanımı nedeniyle son derece basit ve ucuz bir yöntem olması ve tesadüfi veya sistematik hataların en aza indirilebilmesidir (Yavuz ve Aksoy 2016).

Hızlı (quick), kolay (easy), ucuz (cheap), etkili (effective), sağlam (rugged) ve güvenli (safe) kelimelerinin baş harflerinden oluşan QuEChERS yöntemi, Anastassiades vd. (2003) tarafından meyve ve sebzelerde pestisit kalıntılarının analizi için geliştirilen bir ekstraksiyon yöntemidir. Ekstraksiyon ve temizleme aşaması olarak 2 adımdan oluşmaktadır. Orijinal metotta ilk adımda analitler magnezyum sülfat ($MgSO_4$) veya sodyum klorür ($NaCl$) gibi tuzların varlığında asetonitril ile ekstrakte edildikten sonra ikinci adımda elde edilen ekstrat susuz $MgSO_4$ ve primer sekonder amin (PSA) ile temizlenmektedir (clean-up) (Arroyo-Manzanares vd 2014). Sonraki yıllarda, bu yöntemin performansını artırmak amacıyla içeriğinde bazı değişiklikler yapılarak yöntem daha etkili ve verimli hale getirilmiştir (Lehotay vd. 2010). Ancak genel olarak bu yöntem iki aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşama, gıdalardaki analitlerin susuz magnezyum

sülfat ($MgSO_4$) veya sodyum klorür ($NaCl$) gibi tuzların varlığında asetonitril, metanol, etilasetat veya aseton ile ekstrakte edilmesini; ikinci aşama ise elde edilen ekstraktın susuz $MgSO_4$, PSA, C18 veya aktif kömür yardımıyla dispersif katı faz ekstraksiyonu (dSPE) kullanılarak temizlenmesini (clean-up) kapsamaktadır (Bruzzoniti vd. 2014).

Ekstraksiyon çözücüsü hedef analite göre modifiye edilebilmektedir. Orijinal QuEChERS metotta asetonitril, aseton ve etil asetata göre geniş polarite aralığındaki pestisitleri yüksek verim ve seçicilikle ekstrakte edebildiği ve interferans etki oluşturabilecek lipofilik maddeleri, mumları, yağları ve pigmentlerin bileşiklerini en az düzeyde çözdüğü için tercih edilmiştir (Anastassiades vd. 2003; González-Curbelo vd. 2015). Hedef analitin ekstraksiyon verimini arttırmak için etil asetat, metanol, diklorometan, ve hekzan gibi diğer organik çözücüler ile birlikte kullanımı kadar asetonitrilin formik asit, asetik asit ve sitrik asit ile asitlendirildiği bazı çözücü modifikasyonları önerilmektedir. Analizin yapılışı oldukça esnek olup, analitin ve matriksin yapısına bağlı olarak yöntemin uygulanışı değiştirilebilmektedir. Matris etkilerinin azaltılması, hassasiyetteki artış ve uygulanan yöntemin analitik performansını belirleyen karmaşık matrikslerden hedef analitin geri kazanımı, QuEChERS protokolünün optimizasyonunu haklı gösteren nedenlerden bazılarıdır (Perestrelo vd. 2019).

Bazı uygulamalarda, analitin ekstraksiyon sırasında stabilitesini sağlamak, geri kazanımını arttırmak ve ortamın pH'sını ayarlamak ve muhafaza etmek amacıyla ilk aşamada asetonitril, asetik asit (%1) ve sodyum asetat ile birlikte kullanılmaktadır (Lehotay vd. 2005). İlk aşamada kullanılan tuzlar, çözücü ile gıdanın yapısında bulunan su arasında faz ayrımını sağlamaktadır. Hedef analit ve matriksten ekstrakte edilen diğer bileşikler sıvı fazda polaritelerine göre ayrılmakta; analit çözgen fazına geçerken diğer bileşikler su fazına geçmektedir (Bruzzoniti vd. 2014).

Literatürde ekstraksiyonun ikinci aşamasında en yaygın olarak kullanıldığı belirtilen sorbentler PSA, C18 ve aktif kömürdür. PSA, şeker ve organik asitler gibi polar bileşikleri; C18, yağ gibi hidrofobik bileşikleri; aktif kömür ise meyve ve sebze matrikslerinde bulunan klorofil gibi pigmentleri uzaklaştırmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu aşamada kullanılan susuz $MgSO_4$, ekstraktaki suyu tutmakta ve matriksten gelen interferans etki yaratan bileşiklerin uygun sorbent üzerinde tutunmasını artırmaktadır (Bruzzoniti vd. 2014; Moldoveanu ve David 2015; Perestrelo vd. 2019).

“Yeşil Kimya” özellikleri ile birlikte yöntemin doğasında var olan avantajların bir sonucu olarak, çevreden, tarımsal ve biyoanalitik matrikslerden farklı bileşik gruplarının ekstraksiyonu için yöntem hızla genişlemiştir. Geleneksel uygulama alanının ötesinde, çok çeşitli kontaminantların, antibiyotiklerin, ilaçların, uyuşturucu ve et, balık, kan, şarap ve toprak gibi diğer bileşiklerin ekstraksiyonu gibi diğer alanlarda da kullanılmaya başlanmıştır (Lehotay vd. 2010). Örnek boyutları dahil birçok değişikliğin yapılabilmesi ve bu esnekliklerle yüksek geri kazanımlar sağlanmasıyla bir çok QuEChERS versiyonu ortaya çıkmıştır.

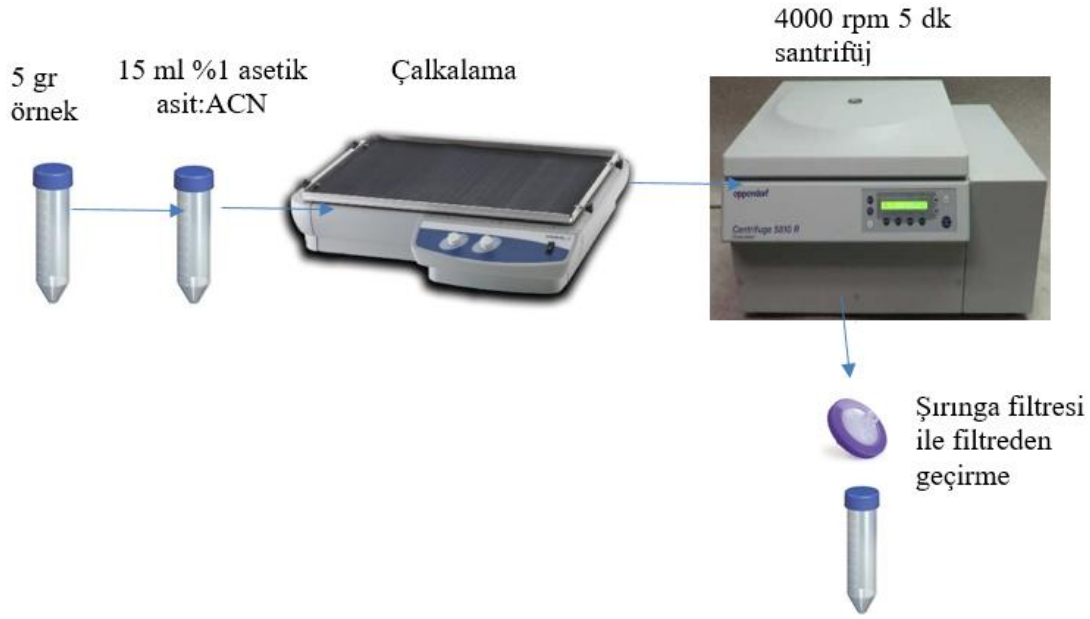
İlk ve belki de en alakalı değişiklikler matriksin pH sına bağlı olarak ekstraksiyon sırasında iyonizasyon ve / veya bozunma olan pestisitler için geliştirilmiştir. Orijinal metodun alkali ortama duyarlı pestisitlerde (kaptan, klorotalonil, folpet vb. fungusitler) stabilite problemlerine yol açması gibi sakıncaları formik asit eklenmesi, asetat ve sitrat

tamponların kullanılması ile giderilmiş ve örnek hazırlama yönteminin standardize edildiği iki önemli valide edilmiş versiyonu, AOAC Resmi Metot 2007.01 ve EN Metot 15662 daha yayınlanmıştır (Yavuz ve Aksoy 2016). Anastassiades ve arkadaşları tarafından geliştirilen CEN Standart Yöntem EN 15662 metodu sitrat tamponlama kullanırken Lehotay tarafından geliştirilen AOAC Resmi Yöntem 2007.01 metodu ise asetat tamponlama kullanmıştır (Santana-Mayor vd. 2019).

QuEChERS bazlı ekstraksiyon metotları gıdalarda farklı mikotoksinlerin tespitinde de kullanılmaktadır. Bu çalışmaların bir kısmında ikinci aşama olan temizleme aşamasının kullanımına ihtiyaç duyulmadığı belirtilmektedir (Arroyo-Manzanares vd. 2014; Miro-Abella vd. 2017; Annunziata vd. 2017; Reichert vd. 2018; Choochuay vd. 2018; Qian vd. 2018; Meerpoel vd. 2018; Bouafifsa vd. 2018).

2.2.1.2. Seyrelt ve enjekte et (Dilute and Shoot method) ekstraksiyonu

Temizlenmeden ham ekstraktların analizine dayanan seyrelt ve enjekte et yaklaşımı, dedektör olarak MS'in kullanıldığı çoklu toksin analizi için geliştirilmiştir. Bu tekniğin avantajı, LC-MS analizinden önce basit seyreltmedir. Bununla birlikte, birlikte yıkanan bileşikler sinyalleri artırabilir veya baskılayabilir. LC-MS'deki matris etkisi bilinen bir sorundur ve metodun kullanımını sınırlandırmaktadır. Yanlış pozitif veya negatif sonuçlara yol açabilmektedir. Ancak uygun bir numune hazırlama stratejisi kullanılarak bu etkileşimler belirli bir dereceye kadar ortadan kaldırılabilir. Baskılama, numuneden numuneye değişir ve her bir matris için dikkatlice araştırılmalıdır (Nelson ve Dolan 2002). Güvenilir sonuçlar elde etmek için standartların kör örneğe uygulanması gerekir. Ek olarak, kullanılan matriks için farklı seyreltme çözücülerinden en uygun olanını bulmak için araştırılmalıdır (Mol vd. 2008). İyon baskılama problemi, en çok tercihen izotop etiketli standartlar kullanılarak çözülebilir. Seyrelt ve enjekte et yönteminin başarısının büyük ölçüde bireysel aletlerin hassasiyetine ve yalnızca en gelişmiş ve son derece gelişmiş LC-MS cihazlarının kullanılmasıyla ulaşılabildiği bildirilmektedir. Seyrelt ve enjekte et tekniği, analiz maliyetini düşürmesi ve analiz süresini kısaltması nedeniyle çoklu mikotoksin analizinde sık sık kullanılmaktadır. Fakat numune ekstraktının basit seyreltilmesi eğer ayrıca bir temizleme aşaması uygulanmamışsa LOQ değerinin artmasına ve diğer taraftan örnek konsantrasyonu metodun performansını ciddi şekilde etkileyen matriks etkisine neden olmaktadır. İzotop kullanılması matriks etkisini ortadan kaldırabilir ancak maliyetin artması ve izotop standartlarının bulunabilirliğinin dikkate alınması gerekmektedir. Bu yüzden örnek hazırlama aşamasından kaçınmak ve analiz maliyetini düşürmek için matriks uyumlu kalibrasyon kullanılmaktadır (De Santis vd. 2017). Şekil 2.7'de seyrelt ve enjekte et yönteminin şematik gösterimi verilmektedir.



Şekil 2.7. Seyrelt ve enjekte et yönteminin şematik gösterimi

2.3. Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (UHPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), 30 yıldan fazla süredir dünya çapında laboratuvarlarda kullanılan yaygın bir teknolojidir. Bu tekniğin gelişmesindeki başlıca etkenlerden biri, etkili ayrımı sağlayabilecek kolon dolgu malzemelerinin evrimi olmuştur. Bu evrimin temel ilkeleri van Deemter denklemi ile literatürde yer almaktadır. Bu denklem, doğrusal hız (akış hızı), plaka yüksekliği (HETP, veya kolon verimi) ve partikül boyutu arasındaki ilişkiyi tanımlayan, kromatografinin performansını belirlemek için kullanılan deneysel bir formüldür (Swartz 2005; Villiers vd. 2006). UHPLC’de 2 μ m den daha düşük kolon dolgu malzemesi kullanılırken HPLC ‘de genellikle 3 ile 5 μ m arasında kolon dolgu malzemesi kullanılmaktadır. Kolon dolgu malzemesinin partikül boyutu azalırken, verimlilik ve dolayısıyla çözünürlük de artmaktadır (Sheliya ve Shah 2013). LC'nin keşfinden beri, araştırmacılar çözünürlüğü ve verimliliği artırarak piklerin ayrımını iyileştirmeye çalışmaktadırlar. Teorisyenler yıllardır küçük partikül boyutunun kullanımının yüksek plaka sayıları ve daha hızlı ayırmalarla sonuçlandığını ortaya koymuşlardır. LC'nin tarihine bakıldığında 1950'lerde geliştirilen ilk partikül çapının 100–200 μ m’den günümüze gelene kadar 2 μ m’nin altına kadar önemli bir boyut düşüşünü göstermektedir. Partikül boyutunun azalması analiz veriminin artması ve analiz süresinin kısalması açısından önemli gelişmeler sağlamıştır. 2004 yılında ise 1,7 μ m boyutunda küçük partiküllü, gözenekli silika malzemesi ticari olarak piyasaya sürülmüştür. Partikül boyutunun zamanla değişimi Çizelge 2.2’de görülmektedir (Nguyen vd. 2006).

Çizelge 2.2. Partikül Boyutunun Tarihi (Nguyen vd. 2006)

Yıl	Partikül boyutu	Plakalar/15 cm
1950s	100 µm	200
1967	50 µm	1000
1972	10 µm	6000
1985	5 µm	12000
1992	3-3,5 µm	22000
1996 ^a	1,5 µm	30000
2000	2,5 µm	25000
2004	1,7 µm	30000

a) Gözeneksin silika veya reçineler

Van Deemter denklemi partikül boyutunun küçültülmesiyle verimliliğin arttığını gösteriyor ancak partikül boyutunun küçülmesi de sistemde kolon geri basıncının artmasına neden olmaktadır. Buna bağlı olarak, geleneksel HPLC ekipmanlarının basınç limitinden dolayı yüksek basınç değerlerine karşı dayanıklı bir sistem olan UHPLC cihazı geliştirilmiştir. Geleneksel sıvı kromatografilerinde maksimum geri basınç 350-400 bar arasında değişirken; UHPLC’de bu değer 1035 bar’a kadar çıkabilmektedir (Novákova vd. 2006; Villiers vd. 2006; Taleuzzaman vd. 2015). MacNair vd. (1997,1999) ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisini test ettikleri çalışmada, hareketli fazın küçük partikül boyutlu kolon malzemesinden yüksek basınç vasıtasıyla geçerken sürtünmeden dolayı ısınma olduğunu; bu ısının özellikle geniş çaptaki kolon içerisinde hemen dağılması mümkün olmadığı için hareketli fazın sıcaklığında artışa ve analitin yapısında değişimlere neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca kolon içerisinde oluşan sıcaklık dalgalanmaları analitin tespit zamanının değişmesine ve pikte bant genişlemesine yol açarak analizin güvenilirliğini azalttığı bildirilmektedir. Bu olumsuz durumu elimine etmek amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda kolon çapının azaltılmasının iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir (Nguyen vd. 2006; Novákova vd. 2006; Villiers vd. 2006).

Partikül boyutunun yanı sıra yüksek basınçta başarılı bir pik ayrımı elde etmek için sabit fazın yani kolon dolgu materyalinin kalitesi ve stabilitesi de önemlidir. Silika bazlı kolonlar yüksek basınca karşı mekanik olarak dayanıklıdır; ancak sınırlı pH aralığında çalışması ve bazik analitlerde sinyal piklerinde kuyruk oluşturmaları açısından dezavantajları mevcuttur. Polimer bazlı kolonların kullanımı bu sınırlamayı ortadan kaldırabilir fakat bu kolonların düşük verimlilikleri ve sınırlı kapasiteleri açısından sorunlar vardır. 2000 yılında iki materyalin en iyi avantajları kullanılarak hibrit kolon materyali üretimi yapılmıştır. Bu kolonlar yüksek verimlilikle, geniş pH aralığında kullanılabilen ve mekanik olarak dayanıklı kolonlardır. Fakat UPLC için gerekli gelişmiş mekanik dayanıklılığı sağlamak için ikinci jenerasyon köprülü etil hibrid (BEH) teknolojisi geliştirilmiştir. Günümüzde bu teknoloji kullanılarak C18, C8, fenil ve amid fonksiyonel gruplarını içeren hibrit kolon dolgu materyalleri üretilmektedir. Böylece sert işlem koşullarında kolon performansı yüksek ve ömrü uzun olabilmektedir (Swartz 2005).

UHPLC’nin avantajları;

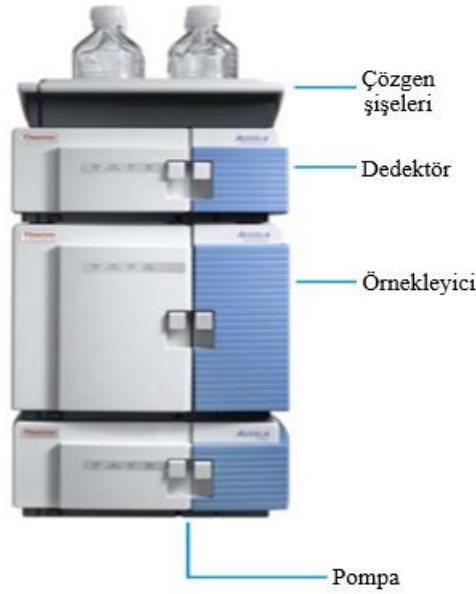
- Analiz süresinin kısılması

- Yüksek verimlilikte ayırım sağlanması,
- Hassasiyetin artması
- Çoklu kalıntı analizlerinde kullanılabilmesi
- Maliyetin azalması
- Daha az çözgen tüketimidir

Dezevantajları;

Artan basınç nedeniyle kolonun daha fazla bakıma ihtiyaç duyması ve kullanım ömrünün azalmasıdır. Partikül boyutunun 2 µm civarında olduğunda yüksek basıncın olumsuz etkisi olmaksızın benzer veya daha yüksek performans elde edildiği bildirilmiştir. Ayrıca daha düşük partikül boyutunda kolonun kullanımı sınırlıdır (Sheliya ve Shah 2013).

UHPLC en altta pompa, pompanın üzerinde örnekleyici ve en üstte dedektör olmak üzere 3 temel kısımdan oluşmaktadır. Şekil 2.8’de UHPLC cihazının temel kısımları belirtilmiştir. Cihazın en üstünde analizde kullanılacak hareketli fazları içeren şişeler bulunmaktadır. Bu şişelerden belirli bir hat boyunca çözgen pompaya iletilmektedir. Burada analizde gradiyent elüsyon kullanılması durumunda hareketli fazlar karıştırılarak, hareketli faz bileşimi istenilen oranda hazırlanmakta ve pompa yardımıyla kolona iletilmektedir. Bu arada analiz edilecek örnek örnekleyicide vial içerisinden şırınga aracılığıyla enjeksiyon valfine bağlı olan örnek lupuna aktarılmaktadır. Buradan da hareketli fazın akıtılmasıyla örnek kolona taşınmaktadır. Kolondan geçen bileşikler kısa uzunlukta bir bağlantı yardımıyla dedektöre iletilmektedir. Yaygın olarak kullanılan dedektörler; ultraviyole/görünür ışık (UV/Vis), fotodiyot (PDA) ve refraktif indekstir (RI) (Anonymous 2010).



Şekil 2.8. UHPLC cihazının kısımları (Anonymous 2010)

2.4. Kütle Spektrometresi

Kütle spektrometrisi (MS) yüksek hassasiyeti, seçiciliği, doğruluğu ve yüksek verim yeteneğine sahip olması nedeniyle birçok bilimsel alanda kullanılan en güçlü analitik tekniklerden biridir. Moleküler ağırlığın ve elemental bileşiminin belirlenmesinden kompleks biyo organik moleküllerin ve polimerlerin yapısının analizine kadar çeşitli analitik problemleri çözmek için kullanılmaktadır (Zagorevskii 2003). Sıvı kromatografinin (LC) kütle spektrometresi ile birleştirilmesi bazı bileşiklerin miktarının belirlenmesi ve daha kesin tanımlanmasına imkan sağladığı için tercih edilmiştir (Andrey 2003).

Kütle spektrometresi, her bir bileşiğin ve atomun yüklü iyonlara (genellikle pozitif) dönüştürülerek moleküler kütesini belirleyen bir analiz tekniğidir. Çoğu zaman, molekülün yapısı da belirlenebilmektedir. Bu teknik, bir analit ile ilgili yüksek seçicilik ve hassasiyette kantitatif bilgi sağlanması açısından da eşsiz bir niteliğe sahiptir. Bu yüzden, bu cihaz bilinmeyen bileşiklerin tanımlanmasında, bileşiklerin miktarının tespit edilmesinde ve bileşiklerin kimyasal ve yapısal özelliklerinin belirlenmesinde fizik, kimya, tıbbi kimya, eczacılık bilimi, jeoloji, kozmo kimya, nükleer bilim, malzeme bilimi, arkeoloji, petrol endüstrisi, adli tıp ve çevre bilimi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Dass 2007).

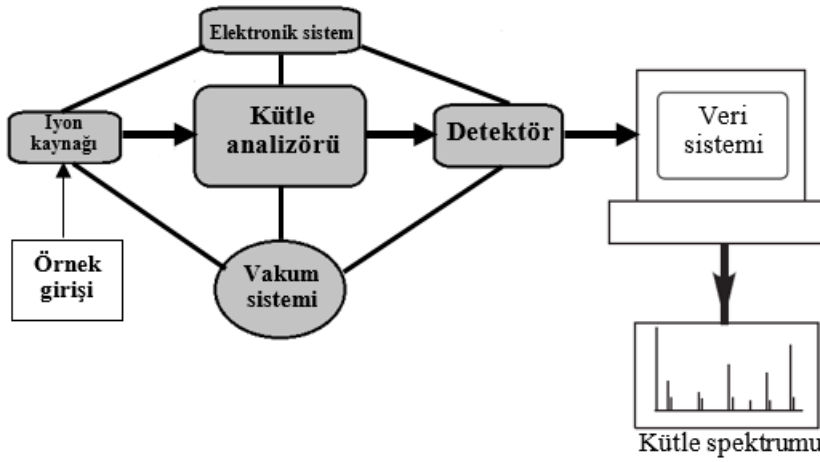
Kütle spektrometresi iyon kaynağı, kütle analizörü ve detektör olmak üzere 3 temel kısımdan oluşmaktadır. Kütle spektrometresinde temel adımlar aşağıda belirtilmiştir.

1-İyonizasyon: Numune (analit) kütle spektrometresinin iyon kaynağına aktarılır; analiz edilen bileşiğin iyonları üretilir ve gaz fazına dönüştürülür;

2-İyonlar, kütle-yük oranlarına göre ayrılır ve analiz edilir;

3-İyonlar tespit edilir ve ilgili sinyaller kaydedilir, depolanır ve bir kütle spektrumuna dönüştürülür.

Analizörler ve dedektörler, güçlü vakum pompalama sistemleri gerektiren 10^{-3} – 10^{-9} Torr gibi düşük basınçlarda çalışmalıdır. İyonlar ve arka plan molekülleri arasındaki çarpışmaların önlenmesi gerektiğinden, başarılı bir kütle analizi için bu çok önemlidir. (Zagorevskii 2003; Dass 2007; Westman-Brinkmalm ve Brinkmalm 2009). Kütle analizörü, dedektörler ve birçok iyon kaynağı çalışması sırasında düşük basınçta yani yüksek vakum ortamına gereksinim duyulduğu için cihazın pompa sistemine ihtiyacı vardır. Ayrıca, dedektör tarafından alınan sinyallerin kaydedilmesi için de bilgisayar tabanlı bir veri sistemi gerekmektedir. Bilgisayar, sinyallerin m/z değerlerine göre bağlı bolluğunu grafik halinde kütle spektrumu şeklinde göstermektedir (Dass 2007; Westman-Brinkmalm ve Brinkmalm 2009).



Şekil 2.9. Kütle spektrometresinin genel kısımları (Dass 2007)

Şekil 2.9’da kütle spektrometresinin temel kısımları belirtilmiştir. Bu temel kısımlar;

Örnek girişi: Numuneyi iyon kaynağına aktarır. Atmosferik basınçtan iyon kaynağı vakumuna aktarım yapılırken numunenin molekül bütünlüğünün korunması gerekmektedir.

İyon kaynağı: Nötr örnek moleküllerini gaz faz iyonlarına dönüştürür.

Kütle analizörü: İyon türlerini ayırır ve kütle analizi yapar. İyonların hareketini kontrol etmek için kütle analizörlerinde manyetik ve / veya elektrik alanlar kullanılır.

Dedektör: Kütlelerine göre ayrılmış iyonların iyon yükünü artırır ve ölçer.

Veri sistemi: Kaydeder, işler ve depolar. Veriler insanın görebileceği forma (bilgisayar taraması veya yazıcı çıktısı olarak) dönüştürülür.

Vakum sistemi: Kütle spektrometresinde düşük basınç sağlar. Birçok cihaz optimal vakum sistemi sağlamak için farklı pompa sistemi kullanır. İyon kaynağında

genellikle 10^{-4} ile 10^{-8} torr, kütle analizöründe ise 10^{-8} torr gibi daha düşük basınç gereklidir.

Temel kısımların yüksek vakum altında çalışması, oluşan iyonların başka bileşikler ile çarpışmasını veya etkileşime girmesini engelleyerek ortamda serbestçe hareket etmesini sağlamaktadır. Çarpışma, moleküler iyonların parçalanmasına ve ayrıca iyon-molekül etkileşimlerinden dolayı farklı türlerin ortaya çıkmasına yol açabilmektedir. Bunun sonucunda da duyarlılık azalmakta, ölçüm belirsizliği artmakta ve çözünürlük düşmektedir (Dass 2007).

Bileşiklerin nötral formunun aksine iyonların hareketini ve yönünü değiştirmek daha kolay olduğu için kütle spektrometresinde ölçümler yüklü parçacıklarla gerçekleştirilir. Elektrik ve manyetik kuvvetler uygulayarak, iyonik türlerin enerjisi ve hızı kontrol edilebilir ve her ikisi de ayrılmalara ve tespit edilmelerine yardımcı olur. Buna karşılık, nötr gaz fazındaki türler rastgele ve amaçsız bir şekilde hareket ederler. İyonlaşma, analit moleküllerinin veya atomlarının yapısından bir elektron uzaklaştırılması veya yapısına bir proton ilave edilmesi sonucunda gaz-fazı iyonlarına dönüştürülmesi ile gerçekleşmektedir. Bu dönüşüm sırasında açığa çıkan enerji, molekülü belirli bağlardan kırarak karakteristik parçalarına (fragment) ayırmaktadır (Dass 2007).

2.4.1. İyonizasyon kaynakları

MS cihazına veya uygulamasına bakılmaksızın, MS analizindeki ilk adım hedef analitlerin sıvı veya katı fazdan iyonize gaz fazına dönüştürülmesidir. Analitlerden yüklü parçacıkların oluşturulması (iyonizasyon) çeşitli teknikler ile gerçekleşmektedir. İyonizasyon kaynağının seçimi MS analizini önemli ölçüde etkilemektedir (Awad 2015). Bazı iyon kaynakları düşük basınç altında bazıları ise atmosferik basınçta çalışır ve yapıları birbirinden farklıdır. İyon kaynağı, yüksek algılama hassasiyeti için bir gereklilik olan yüksek iyonizasyon verimliliği, kararlı iyon demeti, düşük enerjili yayılma, minimum arka plan iyon akımı ve numunelerle minimum çapraz bulaşma gerekliliğini sağlamalıdır (Dass 2007). İyonizasyon metodunun seçimi MS'den elde edilecek kalitatif ve kantitatif verileri önemli ölçüde değiştirebilmektedir. İdeal iyonizasyon seçimi, istenilen uygulama kadar analitin yapısına da bağlıdır (Awad 2015).

Analitin iyonizasyonu, herhangi bir bileşik sınıfının kütle spektrometresi ile analizinde ilk önemli ve zorlu adımdır. Başarılı bir kütle spektrometrik deneyin anahtarı, büyük ölçüde nötr bir bileşiği gaz fazındaki iyonik türe dönüştürme yaklaşımında yatmaktadır. Yıllar içinde çok çeşitli iyonizasyon teknikleri kullanılabilir hale geldi, ancak hiçbirinin evrensel bir çekiciliği yoktu. Bazı tekniklerde iyonizasyon, sırasıyla bir radikal katyon veya anyon üretmek için bir analit tarafından bir elektronun uzaklaştırılması veya yakalanması yoluyla gerçekleştirilir. Diğerlerinde, sırasıyla $[M + H]^+$ veya $[M - H]^-$ iyonlarını vermek için bir proton eklenir veya çıkarılır. Alkali metal katyonları (örneğin Na^+ ve K^+) ve anyonlarla (örneğin Cl^-) eklenme de bazı yöntemlerde gözlenir. Belirli bir yöntemin seçimi, büyük ölçüde araştırılan örneğin doğasına ve istenen bilgi türüne göre belirlenir (Dass 2007).

Kütle spektrometresi son 50 yıl süresince sürekli bir değişim ve gelişim içerisinde olmuştur. Yeni iyonizasyon teknikleri ile yeni yöntemlerin geliştirilmesi bu cihazın kullanım alanını da genişletmiştir. İlk olarak kullanılan iyonizasyon yöntemleri; alan

desorpsiyonu (FD), plazma desorpsiyonu (PD), ikincil iyon kütle spektrometresi (SIMS), lazer desorpsiyonu (LD), hızlı atom bombardımanı (FAB) ve termosprey (TS) iyonlaştırmadır. Bu metotlardan bazıları şimdi çok az biliniyor ancak hepsi yeni tekniklerin geliştirilmesine zemin hazırlamıştır (Cole 2010).

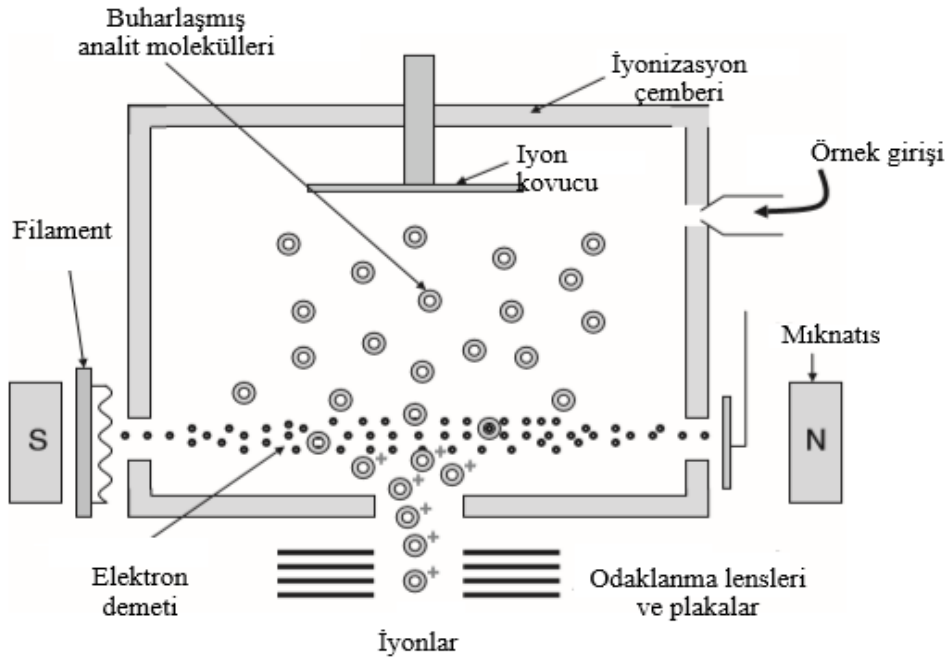
Günümüzde ise en yaygın kullanılan teknikler; elektron iyonizasyon (elektron çarpması-EI), kimyasal iyonizasyon (CI), matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon (MALDI) ve atmosferik basınç iyonizasyondur (elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI)) (Wang ve Turnipseed 2012). İyonlaşma sırasında meydana gelen parçalanma derecesine bağlı olarak, bu yöntemler, sert (hard) ve yumuşak (soft) iyonizasyon teknikleri olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. Çizelge 2.3’de bazı iyonizasyon modları verilmektedir (Dass 2007). Sert iyonizasyon kaynakları gaz fazındaki ve düşük molekül ağırlığındaki (<1000 Da) örnekler için; yumuşak iyonizasyon kaynakları ise düşük uçuculuktaki ve yüksek molekül ağırlığındaki sıvı veya katı örnekler için kullanılmaktadır. Bu yüzden, EI ve CI teknikleri genellikle gaz kromatografisinde; ESI ve MALDI ise sıvı kromatografisinde kullanılmaktadır (Bush 2000). Ayrıca bu iyonizasyon kaynaklarından bazıları düşük basınç ortamında çalışırken (EI, CI, MALDI), bazıları (ESI, APCI) ise atmosferik basınçta çalışmaktadır (Dass 2007).

Elektron iyonizasyon (EI) ilk defa 1918 yılında Dempster tarafından kullanılan en eski iyonizasyon tekniklerinden biridir. EI tekniğinde, gaz fazındaki örnek molekülleri düşük basınç altında (10^{-5} - 10^{-6} tor) tungsten veya renyum filamentinden yayılan yüksek enerjili elektronlar (70 eV) ile bombardımana uğramaktadır. Genellikle düşük molekül ağırlıklı bileşikler uçucudur ve molekül ağırlığı 1–800 Da arasındaki moleküllerin analizi yapılmaktadır. İyonizasyon çemberinde hızlandırılmış elektronlardan bazıları buharlaşmış nötral moleküllerle çarpışır ve çarpışma sırasında hedef molekülün yapısından bir elektron koparak molekül pozitif iyon (moleküler iyon) haline dönüşmektedir. Eğer analit yüksek elektron affinitesine sahipse molekülün yapısına elektron eklenmesi sonucunda negatif iyonlar oluşmaktadır; ancak negatif iyondan yararlanılarak yapılan ölçümler sınırlıdır. İyonizasyon işleminin gerçekleşmesi için bombardıman yapılan elektronların kinetik enerjilerinin, molekülün iyonizasyon enerjisini aşması çok önemlidir. EI’nin yüksek vakum ortamında gerçekleşmesi moleküller arası çarpışmayı engellemektedir (Busch 2003; Somogyi 2008; Dass 2007). EI’nin uygulanmasındaki önemli bir sınırlama, analitlerin iyonizasyondan önce gaz fazı molekülleri olarak mevcut olması gerekliliğidir. Bu kısıtlama, birçok termal olarak kararsız ve uçucu olmayan bileşiği EI için erişilemez hale getirir. Bazı bileşiklerin uçuculuğu kimyasal türevlendirme ile artırılabilir. Bununla birlikte, bu ek numune işleme adımı, eser miktarda numune için pratik bir çözüm değildir. Ayrıca, türevlendirme tamamlanmadığında ve türetilmiş alanların sayısı bilinmediğinde orijinal bileşiğin moleküler kütlelerinin belirlenmesinde belirsizlik yaratabilir. EI’nin diğer bir ciddi sınırlaması, birçok bileşiğin EI koşulları altında stabil olmamasıdır. EI tekniğinin uygulanmasındaki en önemli sınırlama, elektron bombardımanı sırasında analit molekülüne kazandırılan fazla enerji ile molekülün hızlı bir şekilde parçalanması sonucunda moleküler iyonun kütle spektrumunda gözlenememesi veya düşük sinyal gücü (intensity) vermesinden dolayı diğer sinyallerden ayırt edilmemesidir (Vestal 2001; Dass 2007). Şekil 2.10’da elektron iyonizasyon kaynağının şeması verilmiştir.

Çizelge 2.3. İyonizasyon modları (Dass 2007)

Atomik iyonizasyon	Moleküler iyonizasyon		
	Örnek fazı	Mod	Basınç*
Termal iyonizasyon	Gaz faz	Elektron iyonizasyon	HV
Kıvılcım kaynağı		Kimyasal iyonizasyon	IV
Kızdırma deşarjı		Foto iyonizasyon	HV
Endüktifli eşleşmiş plazma		Alan iyonizasyon	HV
Rezonans iyonizasyon		Yarı kararlı atom bombardıman	HV
	Sıvı faz	Termosprey	LV
		Atmosferik basınç CI	AP
		Atmosferik basınç PI	AP
		Elektrosprey	AP
	Katı faz	Plasma desorpsiyonu	HV
		Alan desorpsiyonu	HV
		İkincil iyon MS	HV
		Hızlı atom bombardmanı	HV
		Matriks destekli lazer desorpsiyon	HV

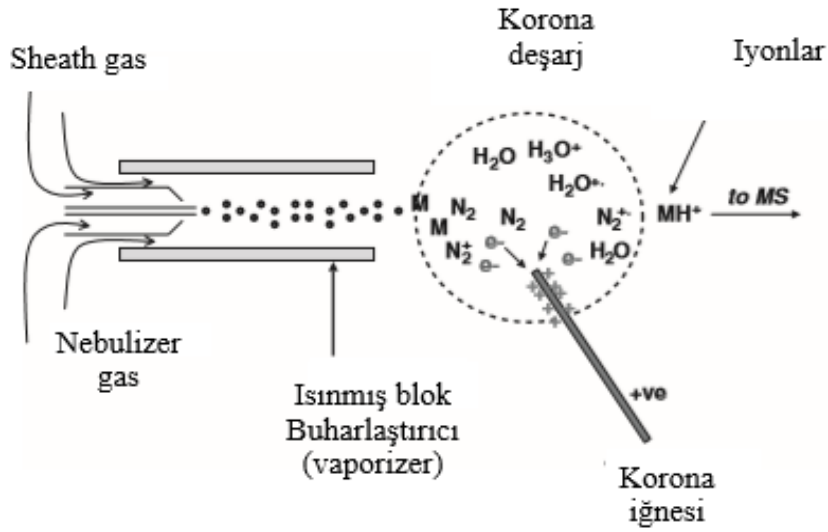
*HV, yüksek vakum, IV, orta vakum, LV, düşük vakum, AP, atmosferik basınç

**Şekil 2.10.** Elektron iyonizasyon (EI) kaynağının şeması (Somogyi 2008)

CI tekniği, Munson ve Field tarafından geliştirilmiş ve başlangıçta hidrokarbonlara ve petro kimyasallara uygulanmıştır (Vestal 2001). CI, analitin (molekül) bir proton transfer işlemi yoluyla iyonize edildiği bir gaz fazı iyon molekülü reaksiyonudur. CI tekniği, molekülün parçalanmasını azaltmakta ve moleküler iyonların oluşumunu artırmaktadır. Bu açıdan, EI tekniğine göre daha yumuşak bir iyonizasyon

teknigidir (Bush 2000; Ardrey 2003). Ancak EI tekniğı ile kıyaslandığında hassasiyeti daha düşüktür (Li vd. 2015). EI tekniğinde analit direkt olarak elektron ışınına maruz kalarak iyonlaşırken; CI tekniğı 3 aşamada gerçekleşmektedir. Birinci aşamada, kısmi basıncı numune basıncından 10 ila 100 kat daha yüksek olan reaktif gaz, 200-500 eV elektron ışınıyla bombardıman edilerek 0.1 ila 1 torr basınçta iyonize edilir. İkinci adımda, iyon-molekül reaksiyonları ile bir veya daha fazla kararlı reaktif iyon üretilir. Son olarak, numune molekülleri, kararlı reaktif iyonları ile gaz fazı iyon-molekül reaksiyonları ile iyonize edilir. En yaygın kullanılan reaktif gazlar; metan, isobütan ve amonyaktır. Diğerlerine kıyasla daha düşük protein afinitesine sahip olduğu için içlerinde en yaygın kullanılan metan (CH₄) gazı iyonlaşarak CH₅⁺ iyonlarını oluşturmaktadır ve bu iyonlar analit molekülleri ile reaksiyona girerek pozitif yüklerini analite geçirmektedir (Ardrey 2003; Dass 2007; Somogyi 2008; Westman-Brinkmalm ve Brinkmalm 2009). Hem EI hem de CI tekniğı, en değerli, sıcaklığa dayanıklı polar biyolojik bileşiklerin iyonizasyonunda yetersiz kalmıştır (El Aneed vd. 2009).

İyonizasyonun vakum ortamında değil de atmosferik basınç ortamında meydana geldiği tekniklere genel olarak atmosferik basınç iyonizasyon (API) teknikleri denilmektedir. Bu kapsamda yer alan atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) ve elektrosprey iyonizasyon (ESI), özellikle sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi sistemi için kullanım alanı çok yaygın olan tekniklerdir. Bu tekniklerde, EI ve CI tekniklerine göre analit molekülünde daha az parçalanma gözlenmekte, moleküler iyon büyük oranda korunmakta ve böylece duyarlılık ve seçicilik artmaktadır (Li vd 2015). Özellikle karmaşık yapıları örneklerde yapılan eser miktardaki bileşiklerin analizinde bu durum çok önemlidir. En fazla 1500 Da kütle aralığına sahip nispeten daha az polar ve termal olarak kararlı bileşiklere uygulanmaktadır. CI tekniğı ile aynı iyonlaşma ilkesine sahip olan atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) tekniğinin CI tekniğinden farkı, iyonlaşmanın atmosferik basınç ortamında gerçekleşmesidir. Böylece örnek molekülleri ve reaktif iyonlar arasında daha fazla iyon-molekül etkileşimi gerçekleşerek iyonizasyon verimi ve tespit hassasiyeti önemli düzeyde artmaktadır (Dass 2007). Bu iyonizasyon tekniğı numunelerin kaynağa püskürtülmesi açısından ESI ile benzerlikler göstermektedir. APCI tekniğinde, analit molekülleri buharlaştırılabilir diye örnekler 400°C'nin üstünde ısıtılmış iyonizasyon kaynağına püskürtülür. Bu da bu tekniğin ısıya duyarlı bileşiklerin analizine uygun olmadığını göstermektedir (Somogyi 2008). Şekil 2.11'de APCI'nın temel bileşenleri belirtilmiştir. Bu teknikte sıvı kromatografisinden gelen hareketli faz ve içerisindeki analit molekülleri, sıcak nebulizer probundan (350-500 °C) yardımcı (auxiliary) gaz (N₂) eşliğinde geçerek çok ince partiküller (sprey) halinde dağılmaktadır. Ortamda analit partiküllerinden daha fazla miktarda bulunan hareketli faz partikülleri, korona deşarjı (corona discharge) tarafından sağlanan elektron akışına maruz kalmada önceliğe sahiptir. İyon haline geçen hareketli faz partikülleri veya yardımcı gaz (N₂⁺ veya N₄⁺), analit partikülleri ile etkileşime girerek yüklerini (genellikle proton transferi) onlara aktarmaktadır. Böylece analit molekülleri iyon haline geçmektedir (Dass 2007; Westman-Brinkmalm ve Brinkmalm 2009; Li vd 2015). APCI tekniğı, steroid türevleri, böcek ilaçları, lipitler ve farmasötik ilaçlar gibi küçük moleküllerin analizinde kullanılmaktadır (Somogyi 2008).



Şekil 2.11. APCI iyon kaynağının temel bileşenleri (Somogyi 2008)

2.4.2. Elektrosprey iyonizasyon

Elektrosprey iyonizasyon (ESI) çok çeşitli sıvı faz numunelerine uygulanabilen bir API tekniğidir. ESI, günümüzde kimyasal ve biyokimyasal analizlerde en yaygın kullanılan iyonizasyon tekniklerinden biridir. Kütle spektrometresi ile birleştirilmesi sıvı örneklerde moleküler kompozisyonun belirlenmesine olanak sağlamıştır. Elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi (ESI-MS) ile proteinler, peptitler, oligonükleotitler, karbonhidratlar, polisakkaritler gibi büyük ve uçucu olmayan biyo moleküllerin ve diğer iyonizasyon yöntemleri kullanıldığında buharlaşamayacak kadar büyük veya kırılğan diğer bileşiklerin kütle belirlenmesi yapılabilmektedir (Wilms 2011). ESI-MS günümüzde birçok çeşitli uçucu olmayan ve termal olarak kararsız basit inorganik kimyasallar ve karmaşık biyolojik yapılarda kalitatif ve kantitatif çalışmalarda kullanılmaktadır (Yamashita ve Fenn 1984) ESI, yumuşak iyonizasyon, yüksek iyon iletimi, düşük akış hızlarında yüksek hassasiyet, büyük biyomolekülleri ve kovalent olmayan kompleks bileşikler analiz edebilmesi ve gelişmiş kütle doğruluğu sağlaması nedenleri ile en yaygın kullanılan iyonizasyon tekniğidir (Bökman 2002).

İlk kütle spektrometresi 1912'de icat edildi ve o zamandan beri sadece küçük inorganik moleküllerin analizinden, kütle sınırlaması olmaksızın biyolojik makro moleküllerin analizine kadar zamanla gelişmiştir. Sert iyonizasyon tekniklerinin kullanılması proteinler, nükleik asitler ve kompleks karbonhidratlar gibi kompleks biyomoleküllerin yıkımı ile sonuçlanmıştır. Elektrosprey iyonizasyonu (ESI) ve matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI) gibi yumuşak iyonizasyon tekniklerinin geliştirilmesi sonucu biyomoleküllerin iyonlara dönüştürülmesi gerçekleştirilmiştir. Yumuşak iyonizasyon, iyonizasyon işlemi sırasında analite minimum düzeyde iç enerjinin aktarıldığını ve parçalanmanın düşük olduğunu ifade etmektedir (El-Aneed vd. 2009).

Elektrosprey kavramı 1968'de Malcom Dole tarafından keşfinden sonra ESI-MS ile biyolojik makromoleküllerin analizi John Fenn'e 2002 yılında kimya alanında Nobel

ödülü kazandırmıştır (Dass 2007; Westman-Brinkmalm ve Brinkmalm 2009). ESI, zamanla LC-MS sistemlerinde kullanılan en önemli arayüz parçası olmuştur. APCI tekniği gibi atmosferik basınç altında gerçekleşen ESI, APCI tekniğinin aksine, yüksek molekül ağırlıklı, ısıya duyarlı ve polar bileşiklerin iyonizasyonu için kullanılmaktadır (Blasco ve Picó 2007). Adından da anlaşılacağı gibi, elektro sprey iyonizasyonu, yoğun bir elektrik alanının etkisi altında yüksek yüklü damlacıkların üretildiği bir prosedir (Dass 2007).

ESI-MS'de kullanılan elektro sprey iyon kaynağı iki elektrotlu bir sistemdir. Birinci elektrot veya çalışma elektrotu, yüklü damlacıkların üretildiği noktada veya bu noktanın yukarısına yerleştirilen çözelti ile temas halinde olan metal kapiler tüptür. Bu elektrot, yayıcı (emitter) elektrot olarak adlandırılmakta ve analitik açıdan reaksiyonlar bu elektrotta meydana gelmektedir. İkinci elektrot veya karşıt (counter) elektrot ise, kütle spektrometresinin bir parçası olan örnekleme konisi (sampler cone) veya örneğin analizöre geçişini sağlayan giriş kapiler aparatlarından biridir (De la Mora 2000; Berkel ve Kertesz 2007).

İyonlaşma yöntemleri arasında ESI, atmosferik basınçta ince bir iğneden püskürtülen bir solüsyonun içinden doğrudan iyonlar üretmesi açısından benzersizdir. ESI tekniğinin prensibi, sürekli akış halinde olan ve analit moleküllerini içeren uçucu polar çözgenin, atmosferik basınçta, paslanmaz çelik kapiler tüpten (yayıcı elektrot) geçerken, bu tüpün uç kısmına yüksek elektrik voltajı (3-6 kV) uygulanması sonucunda kapiler tüpün ucu ile analizörün girişi (sampler cone veya heated capillary, karşıt elektrot) arasında oluşan elektriksel alanda yüklü damlacıklar halinde dağılmasına dayanmaktadır. Yığın çözücü içinde bulunan iyonlar veya daha doğrusu, nötr çözücü moleküllerinin son buharlaşması gerçekleştiğinde damlacıkta oluşan iyonlar, iyon mercekleleriyle odaklanır ve kütle spektrometresine geçirilmek üzere deliklerden örneklenir (Ho vd. 2003; Berkel ve Kertesz 2007; Dass 2007; El Aneed vd. 2009). Kapiler tüpün dış yüzeyinden, sıvı ile aynı eksen doğrultusunda akan sheath gaz (kuru N₂) sprey oluşumunu daha iyi hale getirmekte ve aynı zamanda kapilerin ucundan gelen yüklü partiküllerin analizörün girişine ulaşmasına yardımcı olmaktadır (Banarjee ve Mazumdar 2012).

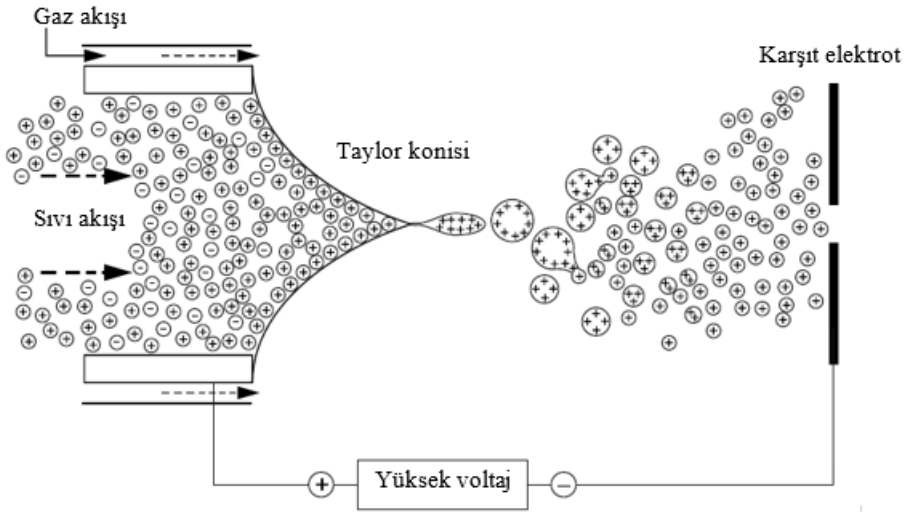
ESI tekniğinde, çözeltiden gaz fazı iyonlarının oluşumu 3 temel aşamadan oluşmaktadır. (1) yüklü damlacıkların oluşumu (2) çözgenin buharlaştırılması (3) yük oranı yüksek damlacıklardan gaz faz iyonların oluşumu. Bütün aşamalar atmosferik basınç altında gerçekleşmektedir (Ho vd. 2003; Kebarle ve Verkerk 2010).

İlk aşamada, kapiler tüpün içinden geçen sıvıya güçlü elektriksel alan uygulandığında yük dağılımı gerçekleşecektir. Kolombik ve dipol çekim kuvvetlerinin etkisiyle sıvının yapısındaki yükler Coulomb yasasına bağlı olarak ayrılmaktadır. Eğer sıvı yeterince iletkenliğe sahipse, elektroforetik hareket, ayrılan katyonları (pozitif modda) elektriksel alanın en kuvvetli olduğu noktaya (kapilerin uç yüzeyi) doğru iletirken, anyonları ise iki elektrotu birbirine bağlayan ve bunlara elektrik potansiyeli sağlayan metal tel üzerinden yüzeyden uzaklaştırmaktadır. Bu yük ayrımı sıvıda yeni bir kuvvetin oluşmasına neden olmakta ve sıvının yüzey gerilimi bu kuvveti etkisiz hale getiremediği zaman sıvı kapilerin ucunda konik bir yapı halini almaktadır. Bu yapıya Taylor konisi denilmektedir. Ayrılma kuvvetinin yüzey geriliminden daha güçlü olduğu yeterli yüksek potansiyel altında sıvı, koninin tepe noktasından damlacıklar halinde ayrılacaktır (Gaskell 1997; Bökman 2002; Kebarle ve Verkerk 2010).

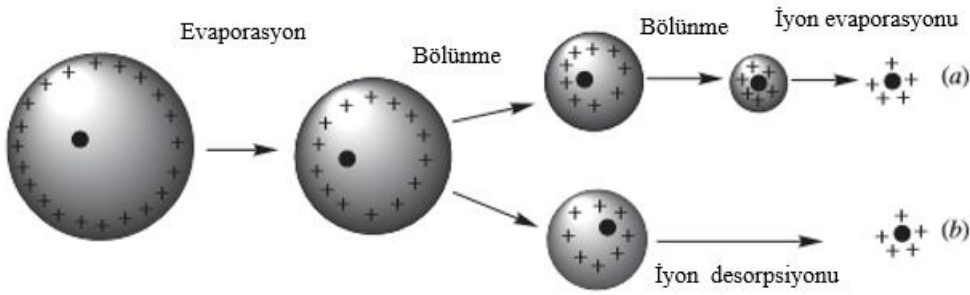
İkinci aşamada, elektrosprey ucun çıkışında oluşan yüklü damlacıklar ortamdaki potansiyel değişimden dolayı sheath gaz akışının yardımıyla kütle spektrometresinin analizör girişine (karşıt elektrot) doğru sürüklenmektedir. Yüklü damlacıklar sürüklenirken, sıcak azot gazı (yardımcı gaz) uygulanmasıyla çözgen buharlaşmakta ve yüklü damlacıkların boyutu azalmakta ancak yük miktarı sabit kalmaktadır. Damlacık boyutu azalırken, yüzeydeki yük yoğunluğu ve dolayısıyla yüklerin elektrostatik itme gücü artmaktadır. Sonuç olarak, belirli bir noktada (Rayleigh limit) damlacıklar stabil olmayan bir hal almakta ve Kolombik kuvvetler yüzey gerilimini aşarak damlacıkların bölünmesine (fizyon) neden olmaktadır. Bu işlem, neredeyse hiç çözücü molekülü bulunmayana ve yalnızca protonlanmış (veya protonu giderilmiş) analit molekülleri olana kadar devam edebilir. Bu noktada damlacık tipik olarak küçük, yüksek yüklü, yavru damlacıklarından oluşan bir fışkırmaya neden olur (Cole 1997; Somogyi 2008; Kebarle ve Verkerk 2010). Çözgen damlacıklardan buharlaştığında, damlacıkların pH, viskozite, yüzey gerilimi ve hidrofobiklik gibi özellikleri değişebilmektedir (Bökman 2002).

Üçüncü aşamada, devam eden çözgen evaporasyonu ile birlikte damlacık boyutu oldukça küçülmekte ve sürekli parçalanma sonucunda damlacıkların yapısındaki analit iyonları gaz fazında açığa çıkmaktadır. Damlacıklardan iyonların desorpsiyonu iyon-kalıntı modeli (charge-residue model (CRM)) ve iyon desorpsiyon modeli (ion-desorption model (IDM)) olmak üzere 2 farklı mekanizmayla açıklanmaktadır. CRM modeline göre çözücü evaporasyonu ve bölünme damlacık boyutu sadece bir tek molekül içerene dek birçok kez tekrarlanmaktadır. Son solvent buharlaştığında bu molekül damlacıkların yükünü koruyarak ortam gazına bırakılır. IDM modelinin temeli de çözücü buharlaşması ve damlacık bölünmesine dayanır. Ancak çözünmüş iyonların gaz fazına bırakılması yüzey yük yoğunluğundan kaynaklanan elektrik alanı yeterince yüksek ancak Rayleigh kararsızlık sınırından düşük olduğu ara damlacık boyutunda (10 to 20 nm) gerçekleşir.

İyonlar, CRM veya IDM tarafından gaz fazına aktarıldıktan sonra, kütle spektrometresi içinde kütle-yük oranına göre analiz edilmeye hazırdırlar (Bökman 2002; Dass 2007; Kebarle ve Verkerk 2010). Şekil 2.12’de ESI sisteminde iyonların oluşumu ve Şekil 2.13’de Yüklü damlacıklardan iyonların gaz fazına desorpsiyonu belirtilmiştir (Dass 2007; Westman-Brinkmalm ve Brinkmalm 2009).



Şekil 2.12. ESI’de iyon oluşumu (Westman-Brinkmalm ve Brinkmalm 2009)



Şekil 2.13. Yüklü damlacıklardan iyonların gaz fazına desorpsiyonu a) yük-kalıntı modeli b) iyon desorpsiyon modeli (Dass 2007)

Çok yüksek algılama hassasiyeti (attomolden femtomole) ESI-MS'nin ayırt edici özelliğidir. Bununla birlikte, bu kadar yüksek hassasiyet seviyelerine ulaşmak için çeşitli faktörlerin kontrol edilmesi gerekir. Bir analiznin hassasiyetinin belirleyicilerinden biri, yük aktarım süreçlerinin işleyiş kolaylığıdır. Analit konsantrasyonu, pKa (veya pKb) ve PA değerleri, yüzey aktivitesi, elektrolitlerin veya diğer türlerin varlığı, pH ve numune molekülünün şekli ve boyutu genellikle analit iyon akımını etkileyen faktörlerden bazılarıdır.

Asidik özellikteki analitler için pKa veya bazik özellikteki analitler için pKb değeri analitin proton (H atomu) alarak veya vererek yük kazanacağını ve buna bağlı olarak iyonizasyon modunun pozitif veya negatif olacağını belirlemek açısından önemlidir (Dass 2007; Kebarle ve Verkerk 2010).

İyonizasyon verimliliği, akış hızı, arayüz tasarımı, çözücü bileşimi ve analit özellikleri gibi bir dizi faktörden etkilenir. Genel olarak, ES yayıcıya sıvı akışı azaldıkça

iyonizasyon verimliliği artar. Bu artışın nedeni, daha düşük akış hızlarında daha küçük yüklü damlacıkların üretilmesidir. Daha küçük damlacıklar, daha verimli solvent buharlaşmasını sağlar ve gaz fazı iyonları oluşturmak için daha az Kolombik fizyon olayına ihtiyaç vardır. Daha küçük başlangıç damlacıkları ve analit molekülü başına artan yük miktarı, daha düşük yüzey aktivitesine sahip analitlerin iyonizasyonunu ve kantitasyonu iyileştirir ve matrisin baskılama etkilerini azaltır. Genel olarak ESI kaynağı 1-10 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızında çalışmaktadır. Sprey, daha yüksek akış hızlarında büyük boyutta damlacıklar oluşturarak elektriksel akımda soruna yol açtığı için işlem stabil olmamaktadır (Page vd. 2007; Dass 2007).

Çözücü bileşiminin ESI kütle spektrumu üzerinde önemli etkileri vardır. Öncelikle çözücü kümelerinin oluşumu, arka plan kimyasal gürültünün kaynağını oluşturur. İdeal çözücü analit içinde kümelenmemelidir. Ayrıca çözücü bileşimi, sıvıların yüzey gerilimini düşürmesi ve gaz faz iyonlarının oluşumunu kolaylaştırması açısından da önemlidir. Saf su gibi yüksek yüzey gerilimine sahip sıvıların elektrosprey işlemi metanol, etanol, izopropanol ve asetonitril gibi çözücülere kıyasla daha zor gerçekleşmektedir (Manisali vd 2006; Page vd 2007; Dass 2007). Ancak gradient sistemlerde saf su hareketli faz bileşiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Genellikle, çoğu organik analitin ESI yanıtı, daha yüksek organik çözücü oranı içeren çözeltilerde daha yüksektir. Bu daha yüksek yanıt, daha uçucu bir çözücü kullanıldığında analitin daha verimli bir şekilde çözülmesi ve yüzey geriliminin azalmasına bağlı olarak spreyn stabilitesinin artmasının bir sonucu olabilir. Yüzey gerilimi yüksek sıvılara elektrosprey ile iyonlaşması için daha yüksek kapiler voltajı uygulanmaktadır. Örneğin, metanolün iyonlaşması için gerekli olan kapiler voltajı 2,2 kV iken, suyun iyonlaşması için gerekli olan voltaj 4 kV'tur (Cech ve Enke 2001; Kebarle ve Verkerk 2010).

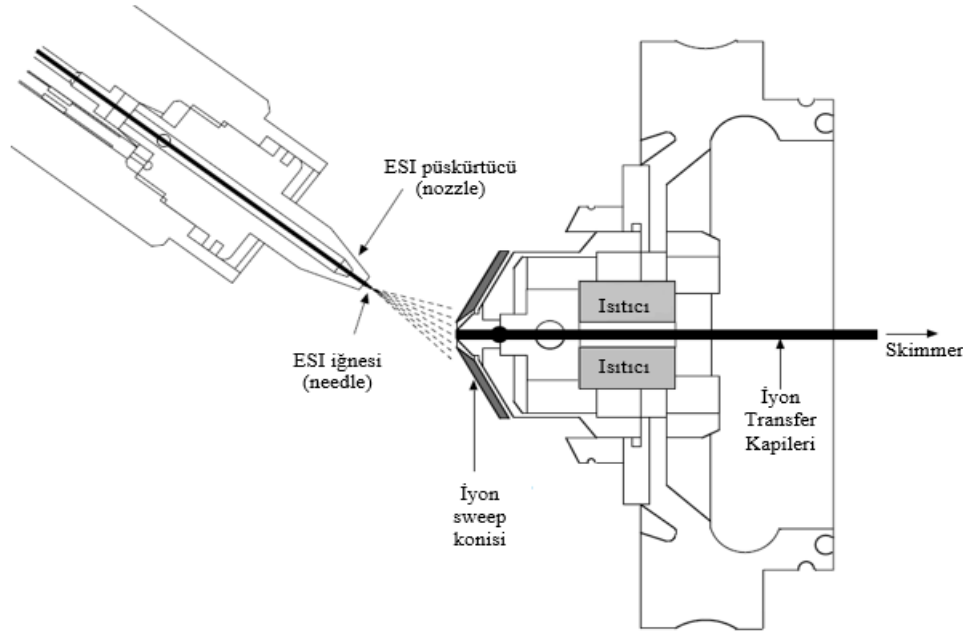
Yardımcı gazın ve kapiler tüpün sıcaklık değerleri iyonlaşma üzerine etkilidir. Yardımcı gazın sıcaklığı, ESI probunun ucunda oluşan damlacıkların analizöre gidiş yolunda çözgenin buharlaşarak uzaklaşması açısından önemlidir (Janusson vd 2015). Damlacıklardan açığa çıkan yüklü analitlerin bazıları örnekleme konisi veya yüksek vakum ve atmosferik basınçta tutulan ve genellikle 0,2 mm iç çap, 60 mm uzunluk ve 100-300°C' ye ısıtılmış olan kapiler tüpten geçerek kütle spektrometresinin analizörüne salınır. Isıtılmış kapiler, içinden geçen iyonların tamamen çözülmesini sağlamaktadır. Kurutma gazı ve ısıtılmış kapiler kullanılması, sistemin sağlamlığını artırarak iyonların küme oluşum derecesini azaltmaktadır (Banarjee ve Mazumdar 2012).

Yardımcı ve sheath gaz akış hızları da iyonlaşma işleminde etkilidir (Janusson vd 2015). ESI işlemi sonucunda, analitin iyonları ile birlikte nötral formları da spreyn içerisinde mevcuttur. Nötral moleküllerin, iyonlar ile analizöre girmemesi için spreyn kapilerinin yönünün, kütle spektrometresinin girişi ile aynı eksen doğrultusunda olmaması gerekmektedir. Genellikle gaz fazına geçen küçük damlacıklar spreyn dış bölgesinde daha yoğun olduğu için ESI probunun, analizör girişinden çok az eksen dışı olacak şekilde konumlandırılması iyonların nötral formlarına göre daha çok analizöre girmesini sağlamaktadır. Elektrosprey iğnesi, örnekleme deliğinden yanal olarak uzağa hareket ettirildiğinde, daha büyük iyonlara verilen yanıt, daha küçük iyonların tepkisinden önemli ölçüde daha fazla azalmaktadır (Cech ve Enke 2001; Bökman 2002).

İyonlaşmayı etkileyen diğer bir faktör analit konsantrasyonudur. Damlacık yüzey alanına paralel olarak yüzeydeki iyon miktarı da sınırlı olmaktadır. Analit

konsantrasyonunun yüksek olduğu durumda, damlacık yüzeyi tamamen analit iyonları ile dolduğu zaman fazla iyonlar damlacıkların iç kısmında sıkışmaktadır (Bökman 2002).

Şekil 2.14’de İyon Max yapısı ve Çizelge 2.4’de Kütle spektrometresinde kullanılan mevcut iyonizasyon yöntemlerinin çeşitli özelliklerinin özeti belirtilmiştir.



Şekil 2.14. İon Max yapısı (Manisali vd. 2006)

Çizelge 2.4. Kütle spektrometresinde kullanılan mevcut iyonizasyon yöntemlerinin çeşitli özelliklerinin özeti (El-Aneed vd. 2009)

İyonizasyon tekniği	Analit yapısı	Örnek tanımı	Kütle aralığı	Açıklama
Elektron iyonizasyon (EI)	Uçucu, ısıya dayanıklı	Gas kromatografisi katı veya sıvı prob	<1000 Da	Sert metot: esas olarak parça iyonlar
Kimyasal iyonizasyon (CI)	Uçucu, ısıya dayanıklı	Gas kromatografisi, katı veya sıvı prob	<1000 Da	Yumuşak metot: moleküler iyon
Hızlı atom bombardımanı (FAB)	Organometalik bileşikler	Sıvı kromatografisi: direkt enjeksiyon	<5000 Da; optimal aralık 200-2000	Yumuşak metot: matriks gerekli
Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon (MALDI)	biyomoleküller(proteinler, DNA, glikokonjugatlar)	Örnek matriksle birlikte kristalize edilir	500000 Da kadar	Çok yumuşak metot, Tekli yüklü iyonlar
Elektrosprey iyonizasyon(ESI)	Organik ve inorganik bileşikler	Örnek çözelti içerisinde	Çok düşük kütlelerden olağanüstü yükseklerle	Çok yumuşak metot, Çoklu yüklü iyonlar

2.4.3. Analizörler

Kütle spektrometresinin performansı büyük ölçüde kütle analizörünün tasarımına ve ilgili iyon optiğine bağlıdır. Kütle analizörü, tüm iyonları kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayırmak ve tüm ayrılan iyonları tek bir odak noktasına toplamak olmak üzere iki hayati işlevi yerine getirmektedir. Bu kısımda, iyonların hareketleri manyetik ve/veya elektriksel alan ile gerçekleşmektedir. Bu alanda hareketli yüklü bir parçacık sahip olduğu momentuma (kütle.hız) ve kinetik enerjiye bağlı olarak diğer bir yüklü parçacıktan ayrılmaktadır. Bu temel özelliklere dayanarak çalışan manyetik sektör, kuadrupol (Q), kuadrupol iyon tuzağı (QIT), uçuş zamanlı (TOF), orbitrap ve iyon siklotron rezonans (ICR) analizörleri günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kütle analizörlerinin çalışma performansı aşağıda belirtilen özelliklerine göre değerlendirilmektedir (Dass 2007; El Aneed vd. 2009; Hart-Smith ve Blanksby 2012).

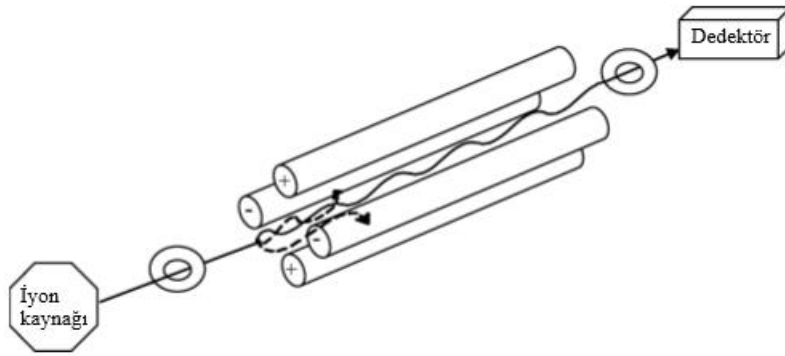
- Kütle aralığı (analiz edilebilen en yüksek m/z değeri)
- çözünürlük (komşu iki iyonu ayırabilme yeteneği)
- verim (tek bir iyonizasyon işleminde oluşan ilgili iyonların oranı)
- doğruluk (ölçülen kütle değeri ile tam kütle değeri arasındaki fark)
- dinamik aralık (ölçülebilen en yüksek sinyal değerinin en düşük sinyal değerine oranı)
- hız (birim zamanda elde edilen spektrumların sayısı)
- hassasiyet (analitin belirli bir güven aralığında tespit edilebilen en düşük miktarı)

Tandem MS (MS/MS) yeteneği, kapasitesi, küçük boyut ve düşük maliyette kütle spektrometresinin diğer istenilen özellikleridir. Tandem MS kompleks karışımların analizine yardımcı olmaktadır (Dass 2007).

Mikotoksin kalıntı analizinde kuadrupol, kuadrupol iyon tuzağı, uçuş zamanlı ve orbitrap analizörleri kullanılmaktadır. Ancak en çok kullanılanı üçlü kuadrupol analizörüdür. Uçuş zamanlı kütle analizörü üçlü kuadropole göre mikotoksin analizinde daha az kullanılmaktadır. Her sistem mikotoksin kalıntı analiz uygulamaları açısından kendine özgü tasarımı, işlevi ve performansı bakımından avantajlara ve dezavantajlara sahiptir (Malik vd. 2010).

Kuadrupol, bugüne kadar laboratuvarlarda en yaygın kullanılan kütle analizörüdür. Dört kutuplu bu kütle analizörünün prensibi ilk olarak 1950'lerde Nobel ödüllü fizikçi Paul Wolfgang tarafından tanımlanmış ve GC-MS için çok uygun bir iyon filtresi olmuştur. Bu analizör, sadece kütle analizörü olarak kullanılmamakta; sık sık iyon transfer optiği ve çarpışma hücresi (collision cell) olarak da kullanılmaktadır. Şekil 2.15 'de kuadropol kütle analizörünün temsili gösterilmiş olup, tekli kuadrupol, birbirine paralel 4 metal çubuktan oluşmaktadır. Her zıt yüklü metal çubuk çifti birbiriyle

elektriksel olarak bağlıdır ve bir çift çubuk ile diğeri arasında radyo frekansı (RF) voltajı uygulanmaktadır. RF voltajına ilave olarak doğru akım (DC) voltajı da uygulanarak iyonizasyon çemberinde oluşturulan iyonların çubuklar arasından geçmesi sağlanmaktadır. Belirli voltaj oranlarında (DC/RF) sadece istenilen m/z değerindeki iyonlar detektöre ulaşmaktadır. Kütle ayrımı, elektrotlara uygulanan DC ve RF potansiyellerinin oluşturduğu yüksek frekanslı elektriksel alanda iyonların sabit titreşim hareketi ile sağlanmaktadır. Diğer iyonlar kararsız yörüngelerinden dolayı çubuklar ile çarpışmakta ve detektöre ulaşamamaktadır. Bu, belirli bir iyonun seçilmesine veya voltajları değiştirerek tarama yapılmasına izin verir (Blasco ve Picó 2007; Dass 2007; El-Aneed vd. 2009).



Şekil 2.15. Kuadropol kütle analizörü (El-Aneed vd. 2009)

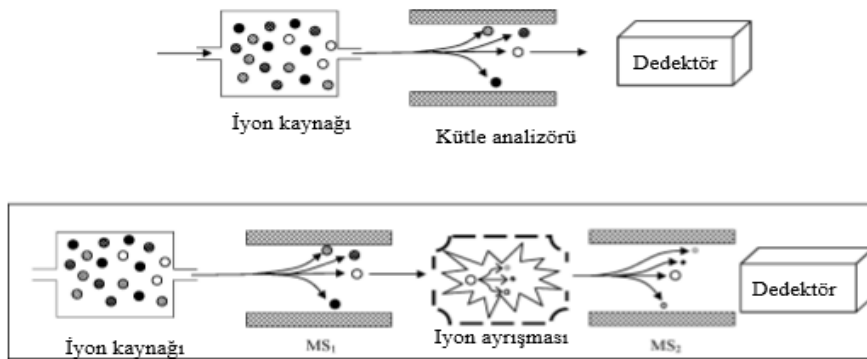
Kuadropol kütle analizörünün birincil kullanımı, düşük kütleli bileşiklerin analizi içindir. ESI'nin ortaya çıkması ve çok yüklü iyonlar üretme özelliğiyle birlikte, yüksek kütleli biopolimerler de rahatlıkla analiz edilebilmektedir. Düşük maliyet, mekanik basitlik, yüksek tarama hızları, yüksek iletim, artan duyarlılık, iyonların ilk enerji dağılımından bağımsızlık ve doğrusal kütle aralığı, kuadropol kütle analizörünün diğer yararlı özellikleridir. Buna ek olarak, iyon kaynağı göreceli olarak daha yüksek basınçlarda çalıştırılabilir, bu da kuadropollerin indüktif olarak bağlanmış plazma (ICP), gaz kromatografisi (GC), sıvı kromatografisi (LC) ve kapiler elektroforez (CE) ile bağlanmasını pratik olarak mümkün kılmaktadır (Dass 2007).

Tekli sistemler genel olarak EI ile çalışan GC-MS cihazlarının bir parçası olmuştur. Bunun nedeni, EI ile hedef molekülün yüksek enerjili elektronlar ile çarpışarak birçok fragmente ayrılmasıdır. Böylece analizörde istenilen kütledeki fragment ilave bir ayırma işlemine gerek kalmadan analiz edilebilmektedir. Bu analizör LC sistemi ile birlikte de kullanılabilir. Ancak ESI veya APCI işlemlerinde iyonlar fragmentlere ayrılmadan moleküllerin proton kazanması veya kaybetmesi ile oluştuğundan dolayı tekli sistemler ile yapılan taramalarda molekül yapısı ile ilgili çok az bilgiye ulaşılmaktadır. Kuadropol sistemler çözünürlük, seçicilik ve kütle doğruluğu açısından yetersiz olduğu için günümüzde tekli analizörün yerine tandem (MS/MS) veya yüksek çözünürlüklü (HR) kütle spektrometreleri kullanılmaktadır. Çünkü karmaşık yapıli matrikslerle yapılan analizlerde ilgili analitin doğru ve güvenilir bir şekilde tespiti önemlidir (Blasco ve Picó 2007; Wang ve Turnipseed 2012).

Tandem MS / MS tekniklerinin hızlı gelişimi, yumuşak iyonizasyon tekniklerinin (ESI, nano-ESI ve MALDI) tanıtılmasıyla birlikte hızlanmıştır. Yumuşak iyonizasyon teknikleri genellikle moleküler kütle tayini için çok önemli olan bozulmamış, parçalanmayan iyonları sağlar. Bununla birlikte, bir moleküler kütle (doğru bile olsa), sadece yapısal izomerlerin olası varlığı nedeniyle bileşiğin yapısı hakkında yeterli bilgi sağlamaz. Örneğin, YAGFL ve AFGLY peptitleri tam olarak aynı MW'ye sahiptir, ancak dizileri bakımından önemli ölçüde farklılık gösterirler. Tandem kütle spektrometresi, orijinal olarak kararlı, parçalanmayan iyonlar hakkında yapısal bilgi elde etmek için paha biçilmez bir analitik tekniktir. Tek aşamalı MS ve ardışık MS / MS arasındaki temel fark, iyonizasyon kaynağında oluşan iyonların ardışık aşamalı bir kütle analizörü ile ayrılmasıdır. Sorun, kaynaktan çıkan iyonların bir karışımın belirli bileşenlerinin moleküler iyonlarını temsil edebilmesi veya daha düşük m/z iyonlarının bazılarının daha büyük m/z oranına sahip iyonların fragmanları olabilmesidir (yani, bunlar bir öncü – Parçacık ilişkisi). İyonizasyondan önce bir ayırma tekniği (GC veya HPLC) kullanılsa bile, bir karışımın farklı bileşenlerini temsil eden iyonların aynı alıkonma zamanında tespit edilmesi birleştirme (coelution) meydana getirebilir. Bununla birlikte, tandem kütle spektrometresi ile, herhangi bir tek iyon seçilebilir ve ardından seçilen iyonun parçalarını oluşturmak için etkinleştirilebilir (Somogyi 2008).

Tandem kütle analizörleri

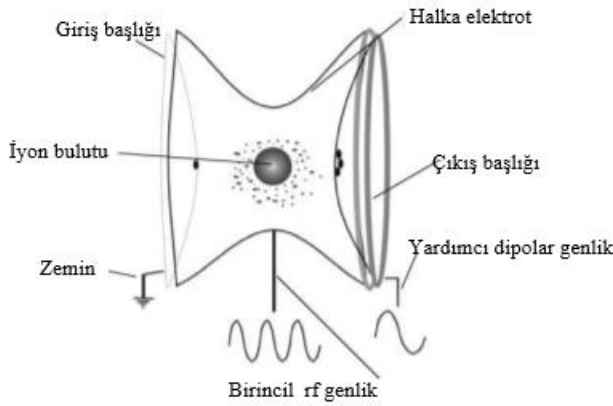
Tandem kütle spektrometresi, daha sonra ayrışmaya ve ardından parça veya ürün iyonlarının üretimine tabi tutulabilen bir spesifik m/z (yani öncül) izolasyonuna dayanır. Bu amaca ulaşmak için, birden fazla kütle analizörü bir seri halinde bağlanabilir, böylece ilk analizör tarafından iyon izolasyonu gerçekleştirilir, ardından çarpışma hücresinde iyon parçalanması yapılırken, son analizör fragman iyonlarını m/z değerlerine göre ayırır. Şekil 2.16'da tekli ve tandem kütle spektrometresinin karşılaştırılması gösterilmiştir (El Aneed vd. 2009).



Şekil 2.16. Tekli (üstte) ve tandem (altta) kütle spektrometresinin karşılaştırılması (El-Aneed vd. 2009)

Kuadrupol iyon tuzağı (QIT), çoğunlukla dört kutuplu iyon tuzağı olarak bilinen Paul tuzağı, 1958'de Paul ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş ve bu katkı Wolfgang Paul'a 1989 Nobel Fizik Ödülünü kazandırmıştır. Kuadrupol iyon tuzağı, hem gazların belirli bir süre hapsedilebildiği bir iyon deposu olarak hem de önemli bir kütle aralığı ve değişken kütle çözünürlüğüne sahip bir kütle spektrometresi olarak işlev gören bir

cihazdır. QIT'nın üçlü elektrot yapısı, Şekil 2.17'de belirtilmiş olup, merkezde halka şeklinde bir elektrot ve her biri bir hiperbolik geometriye sahip iki özdeş uç kapak elektrottan oluşur. Çalışma prensibi kuadropol analizörü ile aynıdır; aralarında geometrik şekil açısından fark vardır. Bu sistem, merkezde halka şeklinde metal bir elektrot ve bu elektrodun her iki tarafını kapatan hiperbolik iki elektrottan oluşan üç boyutlu bir yapıdır. Bu şekilde iyonların hapsediği bir alan yaratılmıştır. İyon hareketleri kuadropol analizöründe olduğu gibi DC ve RF potansiyelleri ile sağlanmaktadır. DC potansiyelindeki artış ile birlikte istenilen m/z 'ye sahip iyonlar, diğer iyonların tuzaktan ayrılması sonucunda onlardan ayrılmaktadır. İyonları tuzağın merkezinde tutmak ve iyonların soğumasını sağlamak için tuzağın içine yaklaşık 10^{-3} tor basınçta helyum (He) gazı gönderilmektedir. Daha sonra RF potansiyelindeki artış ile birlikte de tuzağın içinde kalan iyonlar çıkarılmakta ve detektöre iletilmektedir (March 1997; Dass 2007; Blasco ve Picó 2007; Westman-Brinkmalm ve Brinkmalm 2009).

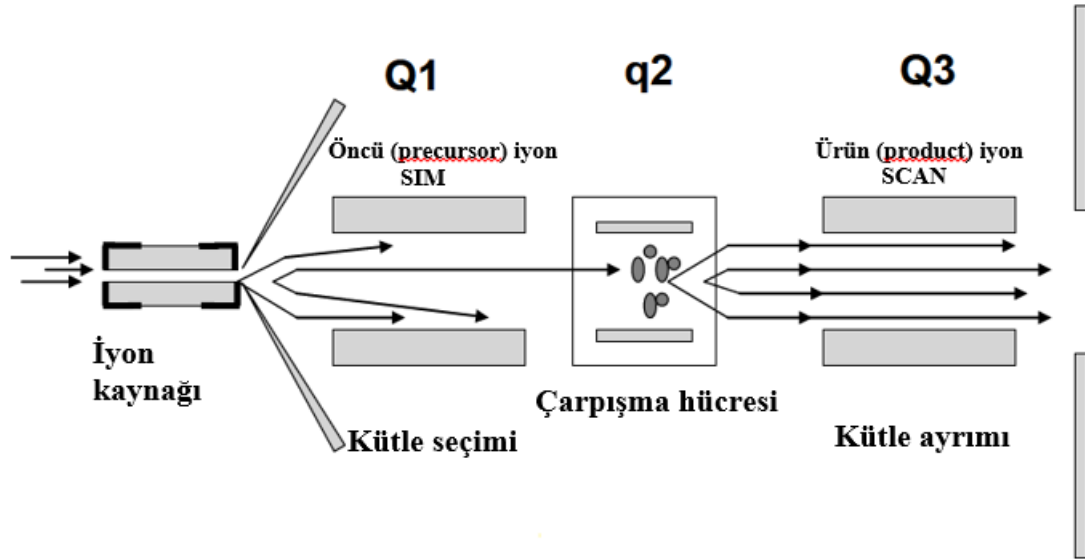


Şekil 2.17. Kuadropol iyon tuzağı yapısı (Blasco ve Picó 2007)

Kuadropol uçuş zamanlı kütle spektrometresi (QToF), TOF tüpünden önce dört kutuplu bir kütle filtresinin uygulandığı, gıda toksik analizi alanında kullanılmaya başlanan bir başka tandem kütle spektrometresidir. Doğrusal TOF kütle spektrometresi çok basittir. Yalnızca bir iyon hızlandırıcı bölge, bir uçuş tüpü ve bir detektörden oluşur. Teoride, tüm iyonlar hızlanma sırasında aynı potansiyel farkını yaşarlar ve sonuç olarak, uçuş tüpünün başlangıcında aynı kinetik enerjiye ve dolayısıyla kütlelerine bağlı olarak farklı hızlara sahiptirler. Bu nedenle dedektöre varış süreleri kütleleri ile orantılıdır ve artan kütle sırasına göre dedektöre ulaşırlar. Basit bir doğrusal TOF aletinin en büyük eksikliği, aynı m/z iyonlarının uçuş zamanı değişimlerinden kaynaklanan yetersiz kütle çözünürlüğüdür. Sonuç olarak, modern TOF cihazları, çözünürlüğü artırmak için genellikle reflektörler kullanır. QToF'da, bir çarpışma hücresi (Q1 q2 TOF) olarak ikinci bir radyo frekansı (rf) - yalnızca kuadropol eklenerek bir adım daha ileri götürülmüştür. TOF analizörü daha sonra q2'de oluşan fragman iyonları için doğru kütle verileri sağlamak için kullanılır. QToF, tek MS'de ve MS / MS çalışma modlarında çalışabilir. İlkinde, ilk kuadropol bant geçiş modunda çalıştırılır ve analiz, ToF analizöründe gerçekleştirilir. MS/MS için, birinci kuadropolda bir öncü iyon seçilir, ikincisi çarpışmanın neden olduğu ayrışmayı üretir ve parça iyonlarının kütle analizi ToF analizöründe gerçekleştirilir. Tandem MS yetenekleri sayesinde, ürün iyonu tam

spektrumları elde edilir ve bir iyon kromatogramını yeniden oluşturmak için herhangi bir iyon seçilebilir (Blasco ve Picó 2007).

Üçlü kuadropol (QqQ) kantitatif analizlerde en yaygın kullanılan ve 1970'lerin sonunda piyasaya sürülen tandem kütle analizörüdür. Bu MS/MS cihazı üç ardışık kuadropolden (Q1 q2 Q3 ; Q:kütle çözümleyen kuadropol, q: sadece rf kuadropol) oluşmaktadır. Bunlardan ilki (Q1) ve sonuncusu (Q3) kütle filtresi olarak kullanılmakta; ikinci kuadropolde ise m/z seçimi veya taraması yapılmamaktadır. İkinci kuadropolde, ilk kuadropolde seçilen öncü iyonun fragmentlere ayrılması gerçekleşmektedir. Bu amaçla hücreye azot (N₂) veya argon (Ar) nötral gazları doldurulmaktadır. İlk ve sonuncu kuadropollere DC ve RF uygulanırken; ortadaki kuadropole sadece RF uygulanarak burada oluşan tüm iyonların diğer kuadropole geçişi sağlanmaktadır. İlk kuadropolde istenilen m/z değerindeki öncü (precursor) iyon seçilerek ikinci kuadropole geçmekte; buradaki gaz ile çarpışan iyonlar fragmentlerine ayrılmakta ve bu fragmentlerin hepsi üçüncü kuadropole aktarılmaktadır. Her öncü iyonun ürün iyonlarına parçalanma enerjisi ana iyonun kimyasal yapısının farklı olmasından dolayı aynı değildir. Bu yüzden ikinci kuadropolde çarpışma enerjisi değerinin öncü iyonlara göre optimize edilmesi önemlidir. Üçüncü kuadropolde öncü iyonla özgü oluşan ürün (product) iyonların taraması yapıp bu iyonlar seçildikten sonra detektöre aktarılmaktadır (Blasco ve Picó 2007; Dass 2007; El-Aneed vd. 2009; Westman-Brinkmalm ve Brinkmalm 2009). Şekil 2.18'de Üçlü kuadropol sistemi ve Çizelge 2.5'de Üçlü kuadropol sistemde uygulanabilen MS/MS tarama modları belirtilmiştir.



Şekil 2.18. Üçlü kuadropol sistemi (Blasco ve Picó 2007)

Çizelge 2.5. Üçlü Kuadrupol sistemde uygulanabilen MS/MS tarama modları (Somogyi 2008)

Tarama modu	Kuadrupol 1 (Q1)	Kuadrupol 2 (Q2)	Kuadrupol 3 (Q3)
Ürün iyonu	İstenilen m/z seç	İyon aktivasyonu / ayrışması	m/z parçalarını tara
Öncü iyon	Belirli bir parçanın ebeveynlerini tara, F	İyon aktivasyonu / ayrışması	Parçayı seç ve izle
Nötr kayıp	Tara	İyon aktivasyonu / ayrışması	Nötr kütle değişimi ile tara
Seçili/Çoklu Reaksiyon izleme (SRM veya MRM)	İstenilen m/z seç	İyon aktivasyonu / ayrışması	İstenilen parçayı seç ve izle
İyon-molekül	İstenilen m/z seç	İyon-molekül reaksiyonları	Reaksiyon ürünlerini tara

Çoğu ardışık MS/MS uygulamasında ürün iyon tarama modu, seçilen (öncü) bir iyonun yapısal bilgilerini elde etmek için kullanılır. Ürün iyon taramalarının çeşitliliği, kantitasyon ve kinetik çalışmalar için yararlı bir teknik olan çoklu reaksiyon izlemede (MRM) de kullanılır. Öncü iyon tarama modunda, belirli bir parça iyonu (F) oluşturan tüm öncüler tespit edilir. Bu modda, ikinci kuadrupol parçanın verilen m/z değerine ayarlanır ve ilk kuadrupol yazılımının öncül iyon spektrumunu yeniden oluşturabilmesi için taranır. Başka bir deyişle, yazılım belirli bir parçanın olduğu öncül iyonları bulur. Nötr kayıp taramasında hem birinci hem de ikinci kuadrupol eşzamanlı bir şekilde taranır, yani taramaları nötrlerin istenen kütlesi kadar kaydırılır. Nötr kayıp ölçümleri, bu nedenle, özellikle analitin laboratuvar (veya doğal) modifikasyonlarının tespiti için kullanışlıdır. Daha yüksek hassasiyet istenirse, ikinci kuadrupol parçaların geniş bir kütle aralığında taranmaz, bunun yerine, yalnızca seçilen bir parçayı veya parçaları izler (SRM veya MRM taramaları). Seçili reaksiyon izleme modu (SRM) - tekli veya çoklu (MRM) - analitik prosedürlerde tespit limitini geliştirir. Q1 ve Q3 kuadrupol tek bir kütlede sabitlenmiştir. (Blasco ve Picó 2007; Somogyi 2008).

Dedektör, analizörde m/z oranlarına göre ayrılan iyonların enerjilerini elektrik enerjisine dönüştürerek, verilerin bilgisayar sisteminde insan gözü tarafından kolayca algılanabilen biçimde görüntülenmesini sağlamaktadır. Hassasiyet, doğruluk, çözünürlük, tepki süresi, kararlılık, geniş dinamik aralık ve düşük gürültü, herhangi bir iyon dedektöründe aranan en önemli özelliklerdir (Dass 2007; Medhe 2018). Kütle spektrometrelerinde kullanılan dedektörler iki ana kategoriye ayrılmaktadır. İlk grupta, yüksek hassasiyetli izotop oranlarının ölçüldüğü sektör analizörleri ile birlikte kullanılan, fotoğraf plakası ve Faraday kabı gibi gelen sinyalleri doğrudan ölçen dedektörler; ikinci grupta ise sintalasyon sayıcı ve elektron çoğaltıcı gibi gelen sinyalleri yeterli yoğunlukta vermek amacıyla artıran sinyal çoğaltıcının (multiplier) kullanıldığı dedektörlerdir. Dedektör seçimi uygulamaya bağlı olarak değişmektedir (Evans 1990).

2.5. Metot Validasyonu

Analitik bilgiler, üretilen ürünün, üretim sürecini değerlendirmek için kararlar alınmasında, ürünün yasal sınırlara uygunluğunun kontrolünde, hukuki işlerde, uluslararası ticarete karar almada, sağlık sorunları ve çevre ile ilgili konular olmak üzere çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Dünya çapında her gün sayısız laboratuvarında çeşitli nedenlerle binlerce test ve ölçüm yapılmaktadır. Bu testler ticaret için malları değerlendirmenin bir yolu olarak, sağlık hizmetlerini desteklemek, içme suyu, gıda ve yem kalitesini kontrol etmek, bir alışımın temel bileşiminin uçakta kullanımına uygunluğunu test etmek, cezai soruşturmalarda vücut sıvılarının adli analizi gibi neredeyse toplumun her yönünü bir şekilde analitik çalışmalarla desteklemektedir. Analitik ölçümleri gerçekleştirmenin maliyeti yüksektir ve bu sonuçlara dayanarak verilen kararlar da ek maliyetler ortaya çıkabilir. Örneğin, gıdanın tüketim için uygun olmadığını gösteren testler tazminat taleplerine neden olabilir; yasaklanmış ilaçların varlığını doğrulayan testler para cezası, hapis cezası ve hatta bazı ülkelerde idam cezası ile sonuçlanabilir. Açıkçası, doğru bir ölçüm yapmak ve sonucun doğru olduğunun gösterilebilmesi önemlidir. Sonuç olarak, analitik sonuçların üreticisi sadece sonuçların güvenilir olmalarını değil aynı zamanda sonuçların kullanıcıya güven veren tüm unsurları içermesini sağlamalıdır (Boqué vd. 2002; Anonymous 2014).

Bir analitik ölçümün amacı; tutarlı, güvenilir ve doğru verilerin elde edilmesidir. Valide edilmiş analitik metotların bu amaca ulaşmada büyük bir rolü vardır. Metot validasyonu sonucunda elde edilen veriler, iyi bir analitik çalışmanın ayrılmaz bir parçası olarak, analitik sonuçların kalitesini, güvenilirliğini ve tutarlılığını sorgulamak amacıyla kullanılmaktadır. Bir metot, belirli bir amaç için kullanılacağına, performans özelliklerinin yeterli olduğunun gösterilmesi gerektiğinde valide edilmelidir. Validasyon çalışması, yeni bir metot geliştirildiğinde veya bir analitik metot, rutin analizlerde kullanılmaya başlanmadan önce ve başka bir laboratuvarında kullanılmak amacıyla transfer edildiğinde metodun güvenilirliğini ve tutarlılığını kontrol etmek amacıyla yapılmalıdır. Ayrıca metot uzun bir aradan sonra tekrar kullanılacağına ve farklı özellikte bir cihaz veya matriks kullanılması gibi metot şartlarının veya parametrelerinin değiştiği durumlarda da valide edilmiş bir metodun tekrar validasyonu yapılmalıdır. Metot validasyonu, sanayi komiteleri ve düzenleyici kurumlardan literatürde büyük ilgi görmüştür (Huber 2010; Anonymous 2014; Chauhan vd. 2015). Validasyon verilen kullanım veya verilen uygulamanın gerektirdiği kadar kapsamlı olmalıdır. Validasyonun kapsamı, uygulamaya, yapılan değişikliklere ve uygulanacak metodun durumuna bağlıdır. Validasyon ayrıca, standart metotla yeni metodun sonuçlarının denkliğini göstermek için gereklidir. Metot validasyonu temel olarak, analitik gerekliliğin tanımlandığı ve uygulanacak metodun ihtiyaç duyulan gereksinimi karşılayacak yeteneğe sahip olduğunun onaylanması sürecidir. Bu, özellikle kalite yönetimi ve akreditasyon bağlamında önemli bir konudur (Peters vd. 2007; Anonymous 2014).

Yasaların ve kalite standartlarının, analitik metotların validasyonunu gerektiren analitik laboratuvarlar üzerinde etkisi vardır. Yasalar validasyon kelimesini doğrudan kullanabilir, özel parametreler listeleyebilir veya “test edilen metot kullanım amacı için uygun olmalı” şeklinde validasyonu yorumlayabilir. Validasyon gereksinimleri için farklı kuruluşlar tarafından sağlanan yönergelerin kapsamı büyük ölçüde değişir, ancak validasyonun amacı her zaman geçerli bir analitik test sonuçları elde etmektir. Metot validasyonu, doğrudan nicel verilerin kalitesini etkilediği için metot geliştirme ile

yakından ilgilidir. Validasyon sayesinde geliştirilen metodun kabul edilebilirliği güvence altına alınmaktadır. Geliştirilen analitik metodun validasyon ihtiyacı, uluslararası rekabet, yüksek ticari ve market değerine sahip ürünlere kalite standartı getirmek ve teknik nedenlerle ortaya çıkmıştır. Analitik metodların validasyonuna ilişkin birçok kuruluşun farklı ihtiyaçları karşılayan bilgi kaynakları mevcuttur. Bu yüzden, metod validasyonu için rehberlik yapacak uygun kaynağın seçilip uygulanması önemlidir. Temel olarak bu kaynaklar Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC), Uluslararası Standardizasyon Komitesi (ISO), Avrupa Analitik Kimya Örgütü (Eurachem) ve Resmi Analitik Kimyagerler Derneği (AOAC International) gibi bağımsız bilimsel kuruluşlar tarafından sağlanmaktadır. Bu kuruluşlar, ulusal/bölgesel düzenleyici otoritelerden ve uluslararası düzenleyici standart ve uygulamaları oluşturan uluslararası kuruluşlardan oluşmaktadır. Kullanılacak metod ISO, Avrupa Standartlar Komitesi (CEN), AOAC gibi uluslararası standart onaylayan kuruluşlar tarafından valide edilmiş ise kullanıcı, kendi kullanımı için metodun sadece var olan performans verilerini doğrulamaya ve/veya saptamaya ihtiyaç duyacaktır. Dolayısıyla bu yaklaşım, metodu kullanan laboratuvarın iş yükünü azaltacaktır (Huber 2010; Kay ve MacNeil 2012; Anonymous 2014; Chauhan vd. 2015).

Analitik metodlar spesifik uygulamaların gereksinimleri dikkate alınarak valide edilmelidir. Bu yüzden metod validasyonu için, metodun gereklilik listesini karşılayan ve birçok farklı uygulamada kullanılabilecek genel bir yol olarak tek bir yöntemin olduğunu düşünmek yanıltıcıdır. Aksine, tanımlama, amaçlanan bir kullanım için özel gereksinimlerin, yöntemin performans yeteneklerinin belirlenmesinden önce tanımlanması gerektiği anlamına gelir (Boqué vd. 2002). Analitik sistemin tanımlanması metodun türü ve amacı, ölçülen analitin türü ve konsantrasyonu, materyal veya matriksin türüne göre hangi metodun kullanılacağı ve metod protokolünü içerir. İyi bir analizin temeli, analitik gerekliliğin açık bir spesifikasyonuna dayanır. İkincisi, asgari amaca uygunluk kriterlerini veya belirli bir sorunu çözmek için yöntemin karşılaması gereken farklı performans kriterlerini yansıtır. Performans parametrelerinin seçimi analitik yöntemin durumuna göre değişmektedir. Yöntem daha önce uluslararası protokole göre tamamen valide edilmişse, geniş kapsamlı laboratuvar içi (in-house) validasyonun yapılması gerekmezken, laboratuvar içi yeni geliştirilen metoda ait herhangi bir performans kriteri belirlenmemişse mümkün olduğu kadar çok sayıda validasyon parametresinin (tam validasyon) incelenmesi gerekmektedir (Taverniers vd. 2004). Genel olarak metod validasyonu için incelenmesi önerilen performans kriterleri; doğrusallık (linearity), ölçüm aralığı (range), seçicilik (selectivity), tespit limiti (limit of detection-LOD), tayin limiti (limit of quantification-LOQ), doğruluk (accuracy) ve kesinliktir (precision) (Taverniers vd. 2004; Peters vd. 2007; Huber 2010; Kay ve MacNeil 2012).

Seçicilik, tespit edilecek analitin matriks içerisinde bulunan safsızlıklar, bozunma ürünleri ve diğer matriks bileşenlerinden ayırt edilerek ölçülmesini ifade etmektedir. Analitik yöntemlerin çoğunda, ölçüm aşamasında üretilen sinyalin numunedeki girişim yapan bileşiklerin varlığından değil, yalnızca ilgili analite bağlı olduğundan emin olmak gerekir. Bu nedenle, analitik yöntemin seçiciliğini (veya özgüllüğünü) test etmek gerekir. Bir metodun seçiciliği genellikle, ilgilenilen analitin numunelerde girişim yapan belirli bileşenlerin yanında ölçülebilme yeteneğinin çalışılmasıyla incelenir (Boqué vd. 2002; Huber 2010; Eldin 2011; Anonymous 2014). Bunun için, kör numuneye (analiti içermeyen örnek) farklı konsantrasyonda aranan analit eklenerek girişim unsurlarının

oluşup oluşmadığı incelenmektedir. Sıvı kromatografide seçicilik, optimum kolonun seçilmesi ve mobil faz bileşimi, kolon sıcaklığı ve detektör dalga boyu gibi kromatografik koşulların ayarlanmasıyla elde edilir. Kromatografik ayırmanın yanı sıra, numune hazırlama aşaması da en iyi seçicilik için optimize edilebilir. Günümüzde yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrik cihazların kullanılması eser miktardaki analitlerin belirlenmesinde çok iyi seçicilik sağlanmaktadır. Uygun bir kalibrasyon modelinin seçimi analit miktarının güvenilir bir şekilde tespit edilmesi için önemlidir. Bu nedenle, analit konsantrasyonu ile cihazda vermiş olduğu sinyal arasındaki ilişki incelenmelidir. Bu açıdan, doğrusallık ve ölçüm aralığı analitik çalışmalarda belirlenmesi gereken iki önemli parametredir. Tüm kantitatif yöntemlerde, analit konsantrasyonlarının veya analitik metodun uygulanabileceği özel değerlerin aralığının yani ölçüm aralığının belirlenmesi gerekir. Doğrusallık, analit konsantrasyonu ile sinyalin doğru orantılı olarak değiştiği alt ve üst sınırları belirtmektedir. Analizlerde analitlerin ölçüm aralığı bu sınırlar içerisinde olmalıdır. Ölçüm aralığının alt sınırını, tayin limiti (LOQ) değeri belirlemektedir. Çalışma aralığının en üst sınırı analitik duyarlılıkta belirgin bir bozulmanın gözlemlendiği derişimdir. (Boqué vd. 2002; Taverniers vd. 2004; Peters vd. 2007; Huber 2010; Kay ve MacNeil 2012).

Analitik yöntemin doğruluğu, analiz sonucunda elde edilen verilerin gerçek değere yakınlığını ifade etmektedir. Doğruluk, gerçeklik ve kesinlik parametrelerini kapsamaktadır. Gerçeklik, bir değer bilinen gerçek değere yakınlığını (sapma-bias) belirtmektedir. Bu değer, bir ölçüm metodunun gerçek sonucu verebilme kabiliyetini ifade eden sistematik hatalardan etkilenmektedir. Gerçek değer, sertifikalı referans maddelerin kullanıldığı valide edilmiş bir metod uygulanarak belirlenmektedir. Ancak sertifikalı referans madde ve metodun bulunmadığı durumlarda geri kazanım çalışması yapılarak da belirlenebilmektedir. Bu kapsamda validasyon çalışmasının yapılacağı matrikse (blank) tespit edilecek analit bilinen konsantrasyonda ilave edilerek analiz edilmektedir. Kesinlik ise, aynı örnekten elde edilen ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığını ifade etmektedir. Kesinlik tekrarlanabilirlik (repeatability), ara kesinlik (intermediate precision) ve tekrar üretilebilirlik (reproducibility) olmak üzere 3 farklı şekilde belirlenmektedir. Tekrarlanabilirlik, sonuçlar arasındaki en küçük varyasyonu vermesi beklenen, bir analistin, aynı laboratuvarında, aynı cihazla kısa bir zaman aralığında gerçekleştirdiği ölçümlerin dağılımının ölçüsüdür. Tekrar üretilebilirlik ise sonuçlar arasındaki en yüksek varyasyonu vermesi beklenen, aynı metodu kullanan laboratuvarlar arası sonuçların dağılımının ölçüsüdür. Bu iki uç nokta arasında “ara kesinlik”, aynı laboratuvarında farklı günlerde farklı analistler tarafından yapılan ölçümlerin varyasyonudur. Bir metodun kesinliği standart sapma veya bağıl standart sapma (RSD) değeri ile belirlenmektedir (Taverniers vd. 2004; Peters vd. 2007; Huber 2010; Kay ve MacNeil 2012; Anonymous 2014).

Analit sinyalinin kör numune sinyalinden ayrılması ve uygun bir kesinlikte sonuçların elde edilmesi eser miktarda analit konsantrasyonlarında çalışılması durumunda daha da önem arz etmektedir. Bu durum için tespit limiti ve tayin limiti kavramları oluşturulmuştur. Tespit limiti, örnek içerisinde yer alan analitin tespit edilebilen ancak değeri tam olarak ölçülemeyen en düşük miktarı ya da konsantrasyonudur. Kromatogramda bu değer, analit pikinin yüksekliğinin (sinyal-S) temel taban çizgisinden (baseline) yani gürültü seviyesinden (N) en az 3 kat yüksek olmasını ifade etmektedir. Tespit limitinin altında kalan nicel verilerin ölçümü

yapılabilmektedir ancak bu değerlerin ölçümündeki belirsizlik gerçek değerden oldukça yüksek olduğu için ölçümler doğru ve kesin olmamaktadır. Tayin limiti ise bir kimyasal ölçüm işleminin bir analiti yeterli şekilde nicelendirme yeteneğini gösteren bir performans özelliğidir ve kabul edilebilir bir hassasiyet ve doğruluk düzeyinde belirlenebilen en düşük analit miktarı veya konsantrasyonu olarak tanımlanır ve raporlama limiti olarak da bilinmektedir. Genellikle tespit limiti ve tayin limiti en düşük konsantrasyonda analitin örnek körü üzerine eklenerek yapılan çoklu analiz sonuçlarının standart sapmasının hesaplanması ile elde edilmektedir. Belirlenen standart sapmanın 3 ile çarpılması sonucunda tespit limiti, 10 ile çarpılması sonucunda tayin limiti hesaplanmaktadır. Bu sayılar, sırasıyla ölçümlerde maksimum kabul edilebilir bağıl belirsizlik yüzdeleri olan %33 ve %10 değerlerinin karşılığı olan katsayılardır (Boqué vd. 2002; Taverniers vd. 2004; Peters vd. 2007; Huber 2010; Kay ve MacNeil 2012).

2.6. Gıdalarda Kütle Spektrometresi Kullanılarak Yapılan Mikotoksin Kalıntı Analizi Çalışmaları

Sulyok vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, buğday ve mısırdaki 39 mikotoksin herhangi bir temizleme işlemi olmadan seyrelt ve enjekte et yöntemi ile ekstrakte edildikten sonra LC-ESI-MS/MS cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. Ekstraksiyonda kullanılan çözücü oranları ACN/H₂O/HAc 79+20+1 (v/v/v) dir. Analizde gradiyent elüsyon kullanılmıştır ve analiz süresi 42 dakikadır. Buğdayda geri kazanım değeri %32,2'nin altında bağıl standart sapma ile %43-104; mısırdaki ise %40,4'ün altında bağıl standart sapma ile %57-110 aralığında bulunmuştur. LOD değeri buğdayda 0,03-170 ppb; mısırdaki ise 0,03-220 ppb olarak tespit edilmiştir. Sulyok vd. (2007) bu çalışmalarının kapsamını 39 analitten 87 analite çıkararak genişletmiş ve yine seyrelt ve enjekte et yöntemi kullanarak HPLC-ESI-MS/MS ile analizini yapmışlardır. Öğütülmüş ekmek kırıntılarında bir önceki çalışmadaki ekstraksiyon çözücü bileşimini kullanmışlar ve gradiyent elüsyon kullanılarak yapılan analizin süresi pozitif ve negatif modda toplam 42 dakikadır. LOD değeri 0.02-225 ppb, geri kazanım değeri % 22,8'in altında bağıl standart sapma ile % 31-285 olarak belirlenmiştir. Berthiller vd. (2007) Sulyok vd. (2006) 'nin çalışmasının daha da genişletildiğini ve 90 mikotoksin ve metabolitinin tahıllarda LC-ESI-MS/MS ile analiz edildiğini bildirmektedir. Gradiyent elüsyon kullanılarak yapılan analiz negatif ve pozitif iyonizasyon modunda toplam 45 dakika sürmektedir. LOD değeri 0,03-30 ppb aralığında hesaplanmıştır.

Çin'de gıdalarda ve yemde yapılan bir diğer çalışmada 17 *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium* toksini LC-MS/MS (üçlü kuadropol) cihazı ile analiz edilmiştir. Örnekler ACN/H₂O 84+16 (v/v) ekstraksiyon çözücüsü ile ekstrakte edilmiş ve katı faz ekstraksiyon kartuşu ile temizleme işlemi yapılmıştır. Gradiyent elüsyon kullanılarak yapılan analiz pozitif iyonizasyon modunda 6,5 dakika negatif iyonizasyon modunda 4 dakika sürmektedir. Doğrusallık 17 mikotoksin için 0,99'un üzerinde korelasyon katsayısı ile 10 pozitif iyon için 0,05-20 ppb, 7 negatif iyon için 0,5-50 ppb aralığında elde edilmiştir. %70-119 arasında geri kazanım sağlanmıştır (Ren vd. 2007).

Lattanzio vd. (2007) tarafından İtalya'da yapılan bir diğer çalışmada mısırdaki farklı polariteye ve kimyasal yapıya sahip 11 mikotoksin LC-ESI-MS/MS (üçlü kuadropol) ile analiz edilmiştir. Etkili bir ekstraksiyon sağlamak için fosfat tamponlu bir çözelti ve ardından metanol ile çift ekstraksiyon uygulanmış temizleme aşamasında da bu mikotoksinlerin antikorlarını içeren çoklu toksin immüno affinite kolon kullanılmıştır.

Gradyent elüsyon kullanılarak yapılan analiz 56 dakika sürmektedir. LOD değeri 0,3-4,2 ppb arasında hesaplanmıştır. Geri kazanım %13'ün altında bağıl standart sapma ile %79'un üzerinde elde edilmiştir. Hollanda'da yerfıstığı, antep fıstığı, buğday, mısır, mısır gevreği, kuru üzüm ve incirde yapılan çalışmada örnekler ACN/H₂O 80+20 (v/v) ekstraksiyon çözeltisi ile ekstrakte edildikten sonra 33 mikotoksin LC-ESI-MS/MS ile analiz edilmiştir. Gradyent elüsyonla yapılan analizin süresi 30 dakikadır. Aflatoksinler ve OTA için LOQ değeri 1 ppb, DON için 50 ppb ve diğer toksinler için ise 10-200 ppb aralığında hesaplanmıştır. Geri kazanım çalışmalarında mikotoksinler %26-126 oranlarında elde edilmiştir (Spanjer vd. 2008).

Beltran vd. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada farklı gıda maddelerinde 11 mikotoksin ACN/H₂O 80+20 (v/v) % 0,1 asetik asitli ekstraksiyon çözücüsü ile ekstrakte edilerek UHPLC-MS/MS (üçlü kuadrupol) ile analizi yapılmıştır. Matriks uyumlu yapılan kalibrasyonda doğrusal aralık 0,99'un üzerinde korelasyon katsayısı ile aflatoksin ve OTA için 0,05-100 ppb, diğer toksinler için 1-100 ppb değerinde elde edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla DON için 25-45 ppb, 80-150 ppb; HT-2 için 2-5 ppb, 6,5-15 ppb ve diğer toksinler için ise 0,1-1 ppb ve 0,3-3,5 ppb olarak hesaplanmıştır. Geri kazanım oranı % 20'nin altında bağıl standart sapma ile %70-110 aralığında elde edilmiştir. Frenich vd. (2009) tarafından yapılan başka bir çalışmada mısır, ceviz, büskivi ve kahvaltılık çerezler ACN/H₂O 80+20 (v/v) ile ekstrakte edilerek 12 mikotoksin UHPLC-MS/MS (üçlü kuadrupol) cihazı ile analiz edilmiştir. Matriks uyumlu yapılan kalibrasyonda doğrusal aralık 0,98'in üzerinde korelasyon katsayısı ile aflatoksin M1 için 0,1-10 ppb, diğer toksinler için 1-100 ppb değerinde elde edilmiştir. Gradyent elüsyon kullanılarak yapılan analizin süresi 8,5 dakikadır. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,01-2,1 ppb ve 0,03-6,3 ppb olarak hesaplanmıştır. Geri kazanım değeri 5 ve 50 ppb'de %25'in altında bağıl standart sapma ile %70-108,4 olarak elde edilmiştir.

Romagnoli vd. (2010) tarafından kahvaltılık çerezler ve bebek gıdalarında yapılan çalışmada 4 mikotoksin LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Gradyent elüsyonda yapılan analiz 30 dakika sürmektedir. Ekstraksiyonda çoklu mikotoksin immuno affinite kolon kullanılmıştır. LOD değeri DON için 60 ppb, diğer toksinler için 10 ppb olarak hesaplanmıştır. Tüm toksinler için korelasyon katsayısı $r^2 = 0,999$ olarak DON için 60-480 ppb, ZEN için 10-60 ppb ve T-2 ve HT-2 için ise 10-80 ppb aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Tüm analitler için %60-100 arasında geri kazanım sağlanmıştır. Frenich vd. (2011)'nin yaptıkları başka bir çalışmada yumurta örnekleri QuEChERS ile ekstraksiyon yapıldıktan sonra daha fazla bir temizleme aşamasına ihtiyaç duyulmadan 10 mikotoksin UHPLC-MS/MS (üçlü kuadrupol) ile analizi yapılmıştır. Matriks uyumlu yapılan kalibrasyonda doğrusal aralık 0,98'in üzerinde korelasyon katsayısı ile elde edilmiştir. Gradyent elüsyon kullanılarak yapılan analiz 7 dakika sürmektedir. 10, 25, 50 ve 100 ppb'de geri kazanım çalışması yapılmış ve AFG1 ve OTA'da 10 ppb ve AFG2'de 50 ppb haricinde % 25'in altında bağıl standart sapma ile % 70-110 aralığında geri kazanım elde edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,5-5 ppb ve 1-10 ppb aralığında hesaplanmıştır.

Pirinç, buğday, yulaf ve arpayı içeren tahılda mikotoksin analizi için yapılan diğer bir çalışmada 11 tane mikotoksin ACN/H₂O/HAc 79+20+1 (v/v/v) ile ekstraksiyonundan sonra herhangi bir temizleme aşaması olmadan LC-MS/MS (üçlü kuadrupol) ile analizi yapılmıştır. Gradyent elüsyon kullanılarak 25 dakika süre içerisinde örnekler analiz edilmiştir. LOD değeri 0,01-20 ppb, LOQ değeri ise 0,02-40 ppb olarak hesaplanmıştır.

Geri kazanım değeri %76,8-108,4 ve bağıl standart sapma değeri %6,8-14,4 aralığında değişmektedir (Soleimany vd. 2012). Juan vd. (2012) tarafından yapılan çoklu mikotoksin analizinde buğday, yulaf, arpa ve kılçıksız buğday ACN/H₂O 84+16 (v/v) ekstraksiyon çözücüsü ile ekstrakte edilerek 12 mikotoksin LC-MS/MS (üçlü kuadrupol) ile analiz edilmiştir. Tüm mikotoksinler için 0,992'nin üzerinde korelasyon katsayısıyla doğrusallık elde edilmiştir. Gradyent elüsyonda yapılan analiz 15 dk sürmektedir. LOQ değeri 2,5-25 ppb arasında hesaplanmıştır. Geri kazanım tüm analitler için %70 'in üzerinde elde edilmiş ve tekrarlanabilirlik bağıl standart sapması %11'in altında belirlenmiştir.

Abia vd. (2013) tarafından tahıl, fındık ve onların ürünlerinde yapılan bir çalışmada 69 mikotoksin ve metaboliti ACN/H₂O/HAc 79+20+1 (v/v/v) ile ekstraksiyonundan sonra herhangi bir temizleme aşaması olmadan LC-ESI-MS/MS (üçlü kuadrupol) ile analizi yapılmıştır. Gradyent elüsyon kullanılarak 20,5 dakika süre içerisinde örnekler analiz edilmiştir. LOD ve geri kazanım değerleri sırasıyla 0,0002-5 ppb ve % 37- 582 aralığında tespit edilmiştir. Tayvan'da pirinç, mısır, buğday ve yerfıstığında yapılan bir diğer çalışmada ekstraksiyonda immüno affinite kolon kullanılmış ve 11 mikotoksin LC-MS/MS cihazı ile analiz edilmiştir. Gradyent elüsyon kullanılarak yapılan analiz 9 dakika sürmektedir. Matriks uyumlu kalibrasyon kullanılmıştır. LOD değeri FB1 ve FB2 için 20 ppb diğer toksinler için ise 5 ppb'nin altında hesaplanmıştır. Geri kazanım değeri %15'in altında bağıl standart sapma ile %70-120 arasında elde edilmiştir (Tang vd. 2013).

Arroyo-Manzanares vd. (2013) tarafından çerezler ve çekirdeklerde yapılan çoklu mikotoksin analizinde UHPLC-MS/MS cihazı kullanılmış ve 14 mikotoksin analiz edilmiştir. Aflatoksinler dışındaki diğer toksinler QuEChERS'in ilk aşamasına dayalı olarak ekstrakte edilmiştir. Gradyent elüsyonda yapılan analizin süresi 8 dakikadır. Matriks uyumlu kalibrasyonda tüm analitler için 0,99'un üzerinde korelasyon katsayısı ile doğrusallık elde edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,17-45,1 ppb ve 0,57-150 ppb olarak hesaplanmıştır. Metodun kesinliği her zaman %11 'in altında ve geri kazanım değeri %60,7-104,3 arasında elde edilmiştir. 2014 yılında Arroyo-Manzanares vd. (2014) tarafından yapılan başka bir çalışmada 15 tane mikotoksin UHPLC-MS/MS (üçlü kuadrupol) ile analiz edilmiştir. Çalışmada karabuğday, kinoa, amarant tohumları ve pirinç QuEChERS yöntemi ile ekstraksiyonu yapıldıktan sonra daha fazla bir temizleme aşamasına ihtiyaç duyulmadan cihaza enjekte edilmiştir. Gradyent programda yapılan analizin süresi 8 dakikadır. Matriks uyumlu yapılan kalibrasyonda doğrusal aralık 0,9953-0,9993 korelasyon katsayısı ile 0,23-10000 ppb değerinde elde edilmiştir. Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik değeri tüm konsantrasyonlarda %12'nin altında ve tüm mikotoksinler için geri kazanım değeri %60-103,5 arasında belirlenmiştir. LOQ değeri ise 0,23-233 ppb olarak hesaplanmıştır (Arroyo-Manzanares vd. 2014).

İspanya'da yapılan bir diğer çalışmada kuru meyvelerde QuEChERS yöntemiyle ekstraksiyon yapıldıktan sonra ileri bir temizleme aşaması yapılmadan 16 mikotoksin LC-ESI-MS/MS (üçlü kuadrupol) ile analiz edilmiştir. 0,0998'in üzerinde korelasyon katsayısı ile doğrusallık elde edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,08-15 ppb ve 0,2-45 ppb olarak hesaplanmıştır. Geri kazanım değeri %60-135 ve günüçi ve günler arası tekrarlanabilirlik sırasıyla $\leq$ %9-20 elde edilmiştir (Azaiez vd. 2014). Malachova vd. (2014) tarafından 4 farklı matrikste 295 küf ve bakteri metabolitinin seyrelt ve enjekte et yöntemi kullanılarak LC-MS/MS ile analizi yapılmıştır. Matriks olarak bebekler için

yüksek su içerikli elma püresi, yüksek yağ içerikli fındık, yüksek nişasta ve düşük su içerikli mısır ve zor ve benzersiz yapısıyla yeşil biber seçilmiştir. Ekstraksiyon çözücü bileşimi ACN/H₂O/HAc 79+20+1 (v/v/v) 'dir. Analiz negatif ve pozitif modda 15,5 dk sürmüştür. LOD değeri 0,006-134,6 ppb, LOQ değeri 0,021-448,6 ppb olarak hesaplanmıştır. Bazı analitler için geri kazanım oranı %70-120 aralığının dışında olsa da tekrarlanabilirlik çoğunda (%89-97) kabul edilebilir değer olan %20'nin altında belirlenmiştir.

Desmarchelier vd. (2014) tarafından yapılan başka bir çalışmada 7 farklı matrikste 15 mikotoksin HPLC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Ekstraksiyonda QuEChERS yöntemi uygulanmış ve temizleme aşaması immuno affinite kolon ile yapılmıştır. Gradyent elüsyon kullanılarak yapılan analiz 19 dakika sürmektedir. Tüm analitler için 0,99'un üzerinde doğrusalılık elde edilmiştir. LOQ değeri aflatoksin ve OTA için sırasıyla 0,05-0,25 ppb'dir. Geri kazanım %71-118 arasında, kesinlik %33'ün altında bağıl standart sapma ile ve %78-117 arasında doğruluk elde edilmiştir. Belçika'da 3 farklı çeşitteki süpürge darısında 23 mikotoksin LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Ekstraksiyonda metanol ve etil asetat çözeltisi kullanılmış ve temizleme katı faz ekstraksiyon kartuşu ile yapılmıştır. Gradyent elüsyonda yapılan analizin süresi 28 dakikadır. Matriks uyumlu yapılan kalibrasyonda tüm analitler için 0,9'un üzerinde doğrusalılık elde edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1,2-50 ppb ve 2,5-100 ppb olarak hesaplanmıştır. Tekrarlanabilirlik %7-22 ve ara kesinlik %14-44 arasında bağıl standart sapma olarak elde edilmiştir (Ediage vd. 2015).

De Santis vd. (2017) tarafından tahıl bazlı örneklerde 7 tane (AFB1, OTA, DON, FB1, T-2, HT-2, ZEN) mikotoksin seyrelt ve enjekte et yöntemi ile ekstrakte edildikten sonra LC-MS/MS cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. Ekstraksiyonda en iyi sonuç ACN/H₂O/HAc 79+20+1 (v/v/v) çözücü oranlarında elde edilmiştir. Gradyent elüsyon ile yapılan analizin süresi 16,5 dakikadır. Doğrusallık korelasyon katsayısının belirlenmesiyle test edilmiş ve tüm analitler için 0,9901-0,9997 korelasyon katsayısı ile doğrusalılık elde edilmiştir. Bağıl standart sapma % 6-20 olarak belirlenmiştir. Doğruluğun göstergesi olarak yapılan geri kazanım çalışmaları sonucunda % 52-119 aralığında değerler elde edilmiştir. LOQ değeri 0,06-20 ppb olarak belirlenmiştir. Güney Kore'de yapılan bir başka çalışmada kahverengi pirinç, mısır, darı, süpürge darısı ve karışık tahıllarda 13 mikotoksin immuno affinite kolonla temizlendikten sonra LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Doğrusallık 0,993'ün üzerinde korelasyon katsayısı ile 1,3-53 ppb aralığında elde edilmiştir. Geri kazanım %0,1-14,3 bağıl standart sapma ile %73,9-133 arasında elde edilmiştir (Kim vd. 2017).

Fildişi sahili'nde pirinç, mısır ve yer fıstığı ürünlerinde bulunabilecek 77 tane mikotoksinin analizi Manizan vd. (2018) tarafından yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemi QuEChERS ile yapılmış ve analiz için UHPLC-MS/MS kullanılmıştır. LOD ve LOQ değerleri de sırasıyla 0,005-125 ppb ve 0,01-250 ppb aralığında hesaplanmıştır. Brezilya'da yapılan bir diğer çalışmada mısır unu, buğday unu, pirinç ve fasülyede 9 mikotoksin LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Ekstraksiyonda seyrelt ve enjekte et yöntemi uygulanmış ve çözücü olarak ACN/H₂O/HAc 80+20+0,1 (v/v/v) kullanılmıştır. Gradyent elüsyonda yapılan analizin süresi 10 dakikadır. Tüm analitler için 0,99'un üzerinde korelasyon katsayısı ile doğrusalılık elde edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,12-6,1 ppb ve 0,3-18,8 ppb arasında hesaplanmıştır. Tüm analitler için % 93-111 arasında geri kazanım sağlanmıştır (Franco vd. 2018).

Jedziniak vd. (2019) tarafından yapılan başka bir çoklu mikotoksin analizinde 8 mikotoksin LC-MS/MS (üçlü kuadropol) ile analiz edilmiştir. Hayvan yeminde yapılan analizde ekstraksiyonda dilüsyon ve immuno affinité kolonun (İAK) etkinliği karşılaştırılmıştır. Çözücü olarak ACN/H₂O/formik asit 79+20+1 (v/v/v) kullanılmıştır. Gradyent elüsyonda analiz 16 dakika sürmektedir. Geri kazanım dilüsyon prosedüründe %88-110, İAK prosedüründe %78-120 aralığında elde edilmiştir. Dilüsyon ve İAK prosedürlerinde laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik sırasıyla %7,8-22,4 ve %12-35,5 olarak elde edilmiştir. Dilüsyon yönteminde kesinlik ve doğruluğun daha iyi olduğu, işlem basamağının azlığı nedeniyle daha az zamanda çoklu analizlerde kolaylık sağladığı öte yandan İAK prosedüründe temizleme aşamasında kolon kullanılması tecrübe gerektirdiği, daha çok zaman aldığı ve de pahalı olduğu belirtilmektedir.

Brezilya’da pirinçte yapılan bir çalışmada 10 tane mikotoksin analizi yapılmıştır. Bu amaçla seyrelt ve enjekte et ekstraksiyon yöntemi ve UHPLC-MS/MS (üçlü kuadropol) cihazı kullanılmıştır. Gradyent elüsyonun kullanıldığı analizin süresi 7 dakikadır. Doğrusallık AFB1 ve AFB2 için 0,3-9 ppb; AFG1, AFG2, citrioviridin ve OTA için 0,5-18 ppb; DON ve ZEN için 25-900 ppb ve FB1 ve FB2 için 50-1800 ppb değerleri arasında 0,9998’in üzerinde bir korelasyon katsayısı ile tespit edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,3-51,5 ppb ve 0,5-103,1 ppb aralığında hesaplanmıştır. Geri kazanım çalışmalarında %3,1-18,3 bağıl standart sapma ile %85,9-104,6 değerleri elde edilmiştir (Da Silva vd. 2019). Scarpino vd. (2019) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise mısır ve buğdayda eser miktarda bulunabilen 17 tane mikotoksinin analizi yapılmıştır. Seyrelt ve enjekte et ekstraksiyon yöntemiyle matriksten ekstrakte edilen mikotoksinler direkt olarak ve temizleme kartuşu ile temizlenmiş olmak üzere 2 farklı şekilde HPLC-ESI-TQ-MS/MS (üçlü kuadropol) cihazı ile analiz edilmiştir. Gradyent elüsyon kullanılarak yapılan analiz negatif iyonizasyon modunda 15 dakika, pozitif iyonizasyon modunda ise 13 dakika sürmektedir. Analiz için kullanılan kalibrasyon eğrisi analitlerin konsantrasyonuna göre farklı değerlerde hazırlanmıştır. Bu aralıklarda uygun korelasyon katsayısı ($r^2 \geq 0,99$) ile doğrusallık elde edilmiştir. Geri kazanım çalışmalarında mikotoksinler %41-134 oranlarında elde edilmiştir. Bağıl standart sapma ise %1-28 aralığında tespit edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,3-3 ppb ve 1-10 ppb aralığında hesaplanmıştır. Abreu vd. (2020) tarafından kakaoda yapılan bir çalışmada QuEChERS ve seyrelt ve enjekte et yaklaşımına dayanarak ekstrakte edilen 42 mikotoksin LC-MS/MS cihazı ile analiz edilmiştir. Gradyent elüsyon kullanılan analizin süresi 8,5 dakikadır. 42 mikotoksinden 34’ü nicel 8 tanesi nitel olarak belirlenmiştir. LOQ değerleri 1-33 ppb arasında hesaplanmıştır. ZEN’in de dahil olduğu 4 toksinde geri kazanım oranı istenilen %70-120 değerinin arasında tespit edilmiştir. Ekstraksiyon aşamasında NaCl ilave edilmesi ve -70 °C’de 15 dk bekletilmesinin matriks etkisini azalttığı ve ileri bir temizleme aşamasına ihtiyaç duyulmadığı belirtilmiştir. De Colli vd. (2020) tarafından yapılan bir diğer çalışmada 42 mikotoksin temizleme aşaması olmadan QuEChERS yöntemiyle ekstrakte edilerek UHPLC-MS/MS (üçlü kuadropol) cihazı ile analiz edilmiştir. Analizde 2 farklı gradyent elüsyon kullanılmıştır ve analiz süresi toplam 19 dakikadır. Metot birkaç analitin dışında diğer tüm analitler için 0,99’un üzerinde korelasyon katsayısı ile doğrusallık göstermiştir. Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik koşullarında, gerçeklik % 78-158 arasında, kesinlik ise %1,7-49,9 arasında elde edilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan 13 farklı markaya ait 39 pirinç örneği ve 10 farklı kavuzlu ve kavuzsuz yulaf örneği Antalya'da bulunan marketlerden ve Konya ve Çorumdaki işletmelerden temin edilmiştir. Pirinç örnekleri; 33 tanesi ambalajlı olarak, 1 örnek kavuzlu pirinç, diğer 5 örnek dökme olarak ambalajsız, yulaf örnekleri ise 2 örnek işlenmiş yulaf ezmesi, 2 örnek kavuzsuz ve diğer 6 örnek ise kavuzlu olarak temin edilmiştir.

Çalışma kapsamında kullanılan nivalenol, deoksinivalenol, beta zearalenol, fumonisin B2, zearalenon, okratoksin A ve sterigmatosistin standartları Sigma-Aldrich Co., (USA) firmasından, fumonisin B1 standardı ise Cayman Chemical (USA) firmasından temin edilmiştir. Standartların saflık dereceleri ve saklama koşulları Çizelge 3.1'de belirtilmiştir. *Aspergillus versicolor* küfü Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Ahmet ASAN'dan temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Standartların saflık derecesi ve depolama sıcaklığı

Standart	Saflık (%)	Saklama sıcaklığı (°C)
Nivalenol (NIV)	99,4	-20
Deoksinivalenol (DON)	99	-20
Beta zearalenol (Beta-ZOL)	98	-20
Fumonisin B1 (FB1)	95	-20
Fumonisin B2 (FB2)	97,5	-20
Zearalenon (ZEN)	99	-20
Okratoksin A (OTA)	98,7	-20
Sterigmatosistin (STE)	98	-20

Standart çözelti hazırlama, ekstraksiyon ve kromatografik analiz aşamalarında metanol, asetonitril, aseton, formik asit, asetik asit, amonyum format (Sigma-Aldrich, Almanya), amonyum asetat (Merck, Almanya) kimyasalları kullanılmıştır. Kimyasallar LC-MS sistemlerinde kullanılmaya uygun analitik saflıktadır. Ultra saf su Milli-Q (Millipore, Fransa) sistemi ile elde edilmiştir. Naylon filtre (0,22 µm) Millipore (İrlanda) firmasından ve QuEChERS ekstraksiyon kitleri Agilent (ABD) firmasından temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Standart çözeltilerin hazırlanması

Her bir mikotoksin stok çözeltisi, derişimi 1000 ppm olacak şekilde çözünürlüklerine bağılı olarak metanol, asetonitril veya metanol ve aseton karışımında hazırlanmıştır ve -18 °C’de amber renkli tüplerde muhafaza edilmiştir. Araştırmada kullanılan mikotoksinlerin tamamını içeren mix standart karışım metanol ile hazırlanmıştır ve analizler bu karışım kullanılarak yapılmıştır.

3.2.2. Ekstraksiyon yöntemleri

Pirinç ve yulaf örnekleri, QuEChERS ve seyrelt ve enjekte et (dilute and shoot) yöntemleri ile 2 farklı şekilde ekstraksiyon işlemine tabi tutularak analiz edilmiştir.

3.2.2.1. QuEChERS yöntemi

Pirinç ve yulaf örneklerinin QuEChERS yöntemine göre ekstraksiyonu için CEN Standart Yöntem EN 15662 metodu uygulanmıştır.

Örneklerin ekstraksiyon aşamasında, parçalayıcıda (Waring Commercial 7010 HS, USA), öğütülen 5 g numune 50 mL’lik santrifüj tüpüne tartılarak üzerine 10 mL ultra saf su ilave edilmiştir ve 30 s elle çalkalanmıştır. Sonra, üzerine 15 mL %1’lik asetik asit içeren asetonitril ilave edilerek tekrar 30 s elle çalkalanmıştır. Daha sonra, Agilent EN QuEChERS ekstraksiyon kiti (4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g sodyum sitrat dihidrat, 0,5 g sodyum hidrojen sitrat seskijidrat) ilave edilmiştir ve 1,5 dk elle çalkalanmıştır. Tüpler, 20 °C’de 4000 rpm’de 5 dk santrifüj (Eppendorf 5810R, Almanya) edilmiştir. Tüpler santrifüj işleminden sonra 0,22 µm’lik naylon filtreden geçirilerek viallere aktarılmış ve analiz edilmiştir.

3.2.2.2. Seyrelt ve enjekte et (dilute and shoot) ekstraksiyonu

Ekstraksiyon aşaması için parçalayıcıda (Waring Commercial 7010 HS, USA), öğütülen 5 g numune 50 mL’lik santrifüj tüpüne tartılarak üzerine 15 mL’lik %1’lik asetik asit içeren asetonitril ilave edilerek 90 s elle çalkalanmıştır. Sonra VWR Std 5000 çalkalayıcı (USA) kullanılarak pirinç örnekleri 200 rpm de 5 dk, yulaf örnekleri ise 300 rpm de 10 dk çalkalanmıştır.

Tüpler, 20 °C’de 4000 rpm’de 5 dk santrifüj edildikten sonra ekstrakt 0,22 µm’lik naylon filtreden geçirilmiş ve viallere aktarılarak analiz edilmiştir.

3.2.3. Ultra yüksek performans sıvı kromatografisi

Araştırmada Accela Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (Thermo Scientific, ABD) cihazı kullanılarak kromatografik ayırım Hypersil Gold (50 mm x 2,1 mm, 1,9 µm, Thermo Scientific, ABD) kolonu ile yapılmıştır. Hareketli faz bileşimleri aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandıktan sonra mobil fazlar sonikatörde 10 dk bekletilmiştir.

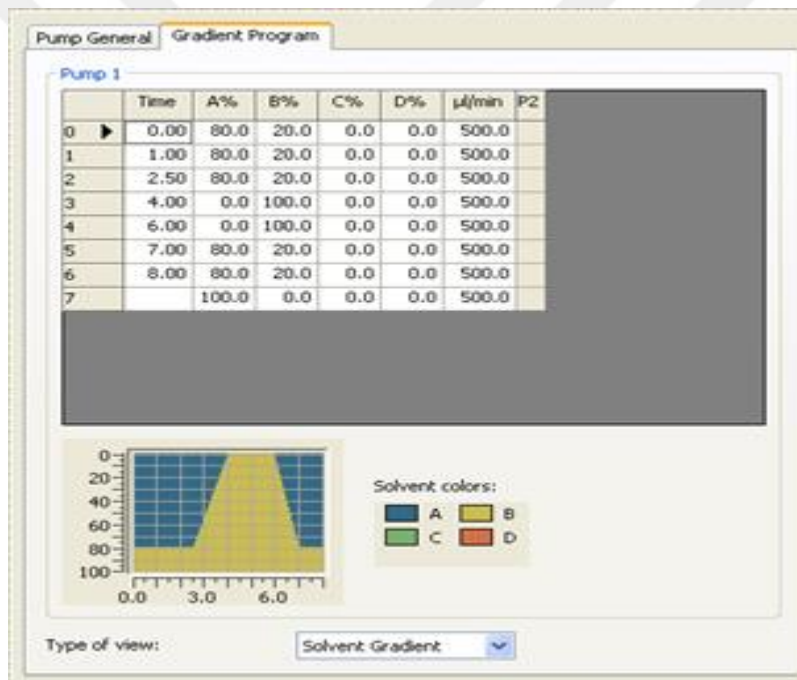
Hareketli faz (A): % 0,1 asetik asit /su

Hareketli faz (B): % 0,2 asetik asit /metanol

Kolon akış hızı 0,5 mL/dk, kolon sıcaklığı 30 °C ve enjeksiyon hacmi 10 µL'dir. Gradyent elüsyon kullanılarak yapılan analizin süresi 8 dakikadır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Hareketli faz oranları

Dakika	A fazı (%)	B fazı (%)	
0	80	20	} Analitlerin tespit edilmesi
1	80	20	
2,5	80	20	
4	0	100	} Kolonun yıkanması
6	0	100	
7	80	20	} Kolonun şartlandırılması
8	80	20	



Şekil 3.1. Gradyent elüsyon görünümü

3.2.4. Kütle spektrometresi

Analizin kütle spektrometresi ile yapılan kısmında TSQ Quantum Access Max (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazı kullanılmıştır. Analizler pozitif iyon modunda gerçekleştirilmiştir. Kromatografik değerlendirmelerin yapılmasında Xcalibur 2.1 yazılımı kullanılmıştır. Analizörde tespit yapılırken cihazın kontrol panelinde belirtilen tarama (scan) ve iyon kaynağı (HESI) parametrelerinin değerleri Çizelge 3.3'de belirtilmiştir.

Cihazın kütle kalibrasyonu için Polytyrosine, 1-3-6 (m/z 182, 508, 997) pozitif iyon mod kalibrasyon çözeltisi kullanılmıştır. Cihazın kalibrasyonu ve ayarlama (tune)

işlemi TSQ serisi başlangıç klavuzunda belirtildiği gibi yapılmıştır (Anonymous 2008). Cihazın ayarlama işlemi yapılırken elde edilen ekran görüntüsü Ek-1 ve Ek-2’de verilmiştir. Cihazda Exactive Tune 2.0 ve Xcalibur 2.1 yazılımı kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Kontrol panelindeki parametrelerin değerleri

HESI parametreler	Panelindeki
Sheath gaz basıncı (Arb)	40
Yardımcı gaz basıncı (Arb)	20
Sprey voltajı(kV)	3,5
Kapiler sıcaklığı (°C)	250
Buharlaştırma sıcaklığı (°C)	350
Kapiler voltajı (V)	35
Tube lens voltajı (V)	82

3.2.5. Metot validasyonu

Metot validasyonu, Avrupa Birliği Komisyon Kararı’na (No:2002/657/EC) uygun olarak yapılmış olup bu kapsamda aşağıdaki parametreler değerlendirilmiştir (Anonymous 2002).

3.2.5.1. Doğrusallık ve ölçüm aralığı

Ölçüm aralığının belirlenmesi, metodun uygulama aralığının belirlenmesi açısından önemlidir. Doğruluk ve kesinlik çalışmaları bu aralığı kapsayacak konsantrasyonlarda yapılmaktadır. Doğrusallık, kalibrasyon eğrisinde ölçülen analit konsantrasyonunun ve ölçüm cihazından elde edilen yanıtın doğru orantılı olarak görüldüğü aralıktır. Her bir analit için matriks uyumlu kalibrasyon grafiği altı farklı konsantrasyonda OTA, STE ve FB2 (0, 5, 10, 20, 50, 100 µg/kg) ZEN, DON, FB1 ve Beta-ZOL (0, 25, 50, 100, 250, 500 µg/kg), NIV(0, 250, 500, 1000, 2500, 5000 µg/kg) hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için iki tekrarlı okuma yapılmıştır. Elde edilen sonuçların doğrusallığı, korelasyon katsayısı (r^2) hesaplanarak değerlendirilmiştir.

3.2.5.2. Seçicilik

Seçicilik, analiz için uygulanan metodun, analiti örnek matriksindeki diğer bileşiklerden ayırt edebilme yeteneğidir. Seçicilik, kör numunelerin ve belirli konsantrasyonda analitleri içeren zenginleştirilmiş numunelerin analizi sonucunda elde edilen kromatogramların karşılaştırılması ile belirlenmiştir. Kromatogramlarda analitlerin alıkonma zamanlarında olası girişim unsurlarının olup olmadığı kontrol edilmiştir (Kaklamanos vd. 2013).

3.2.5.3. Tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ)

Tespit limiti, zemin gürültüsünden farklı olarak tespit edilebilen fakat değeri tam olarak ölçülemeyen en düşük analit konsantrasyonudur. LOD’nin belirlenmesi için örnek körü üzerine toksin standart karışımından cihazda görülebildiği ve tekrarlanabilirliğinin

yapılabildiği en düşük konsantrasyonda analitler ilave edilerek aynı gün içerisinde 10 ayrı analiz yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda elde edilen değerlerin standart sapması hesaplanmış ve bu değerin 3 katı LOD değeri olarak belirtilmiştir. Tayin limiti ise, kabul edilebilir doğrulukta ve kesinlikte ölçülebilen en düşük analit konsantrasyonudur. LOQ, LOD'nin tespit edilmesi için yapılan analizler sonucunda hesaplanan standart sapmanın 10 katı alınarak belirlenmiştir.

3.2.5.4. Doğruluk ve kesinlik

Doğruluk, analiz sonucunda elde edilen verilerin gerçek değere; kesinlik ise ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığını ifade etmektedir. Doğruluk, laboratuvar örneklerinin doğrusal aralıktaki belirli konsantrasyonlarda OTA, STE ve FB2 için (5, 20, 50 µg/kg), ZEN, DON, beta-ZOL ve FB1 için (25, 100, 250 µg/kg) ve NIV için (250, 1000, 2500 µg/kg) standart maddeler ile zenginleştirilerek yapılan geri kazanım çalışmaları sonucunda elde edilen değerler; kesinlik ise elde edilen bu değerlerin bağıl standart sapması (%RSD) ile değerlendirilmiştir. Geri kazanım oranı (%R) ve yüzde bağıl standart sapma değerleri sırasıyla 3.1 ve 3.2'deki denklemler kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\%R = \frac{\text{zenginleştirilmiş örneğin belirlenen konsantrasyonu}}{\text{zenginleştirme konsantrasyonu}} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\%RSD = \frac{\text{standart sapma}}{\text{ortalama geri kazanım}} \times 100 \quad (3.2)$$

Kesinliğin, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik olmak üzere 2 ayrı ölçümü mevcuttur. Tekrarlanabilirlik, aynı gün içerisinde 3 farklı konsantrasyonda yapılan ve her bir konsantrasyonda 6 kez tekrarlanan analiz sonucunda elde edilen değerlerin; tekrar üretilebilirlik ise, tekrarlanabilirlik çalışmasının 3 farklı günde yapılması sonucunda elde edilen değerlerin bağıl standart sapması hesaplanarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

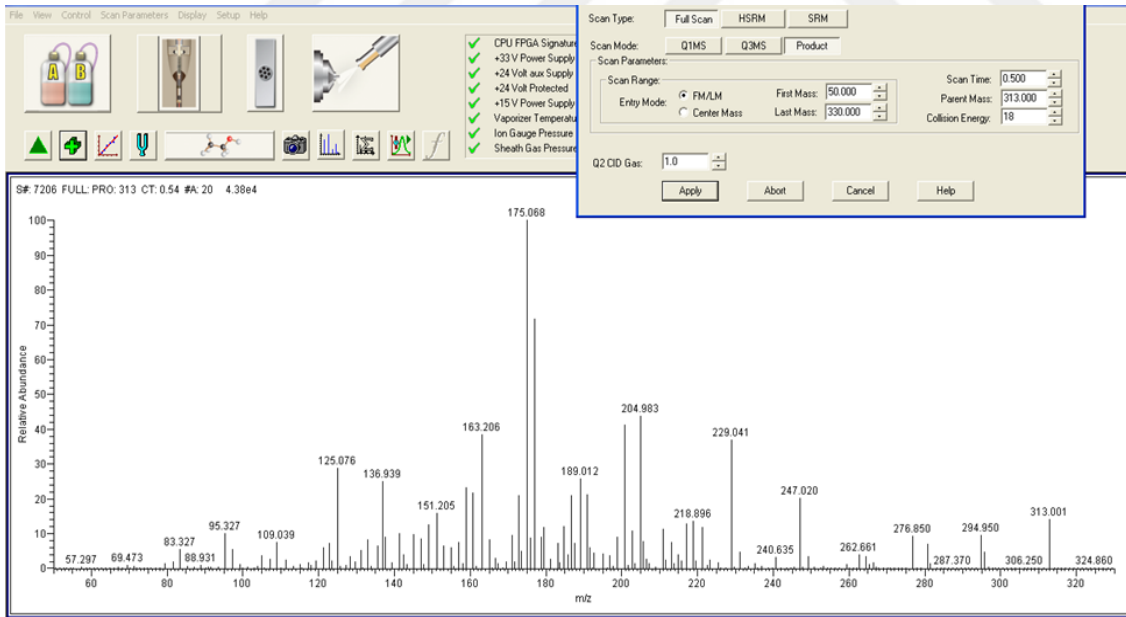
4.1. İnfüzyon

Tez çalışmasında kullanılan mikotoksinlerin tespit edilebilmesi için öncelikle her bir analitin parçalanma iyonlarının olduğu çarpışma enerjileri belirlenmiştir. Bu amaçla, her bir analitin kütle spektrometresine konsantrasyonu 1 µg/mL olacak şekilde hazırlanan standart çözeltilerinin ayrı ayrı infüzyonu yapılmıştır. Her bir analite özgü ve yoğun olarak bulunan parçalanma iyonlarının en az ikisi seçilmiştir. Çalışmalar tam tarama ve pozitif iyon tespit modunda gerçekleştirilmiştir. Tarama aralığı ana (moleküler) iyon ve parçalanma iyonlarını içerecek şekilde seçilmiştir. Çizelge 4.1’de çalışmada kullanılan mikotoksinlerin belirlenen ana iyonları, moleküler iyon, parçalanma iyonları, çarpışma enerjileri ve alıkonma zamanları verilmiştir. Şekil 4.1-4.8’de mikotoksinlere ait infüzyon görüntüleri verilmiştir.

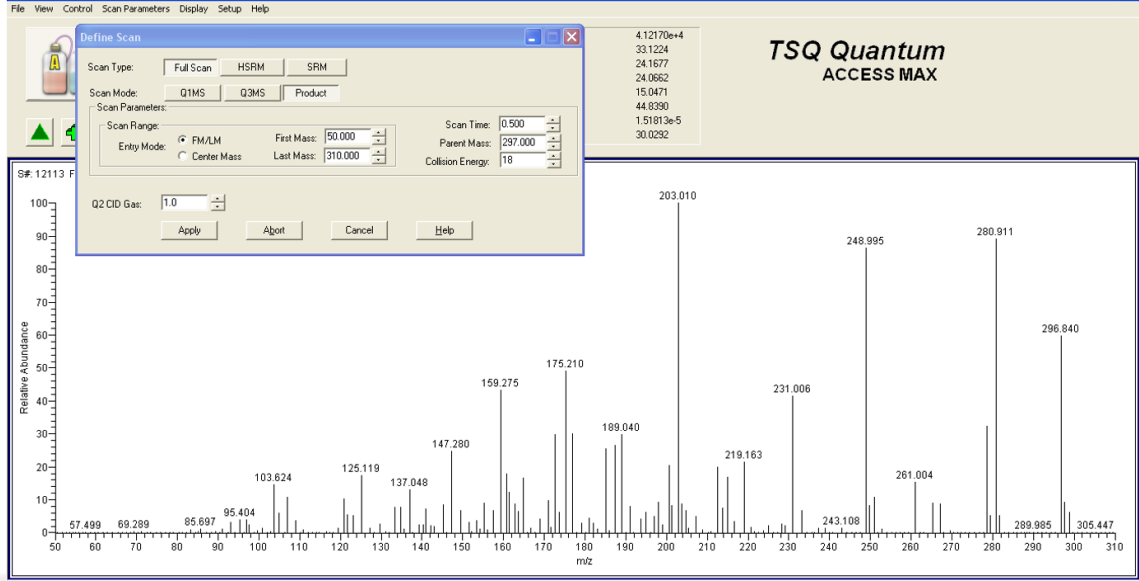
Çalışmada kromatografik ayırım için ters faz kromatografi tekniği kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan kolon (Hypersil GOLD, Thermo Scientific, ABD) ile en fazla 1250 bar basınçta, 60 °C sıcaklıkta ve pH 2-11 aralığında çalışılmaktadır. Kromatografik koşulları belirlemek amacıyla hareketli faz bileşimi, akış hızı, örnek enjeksiyon miktarı, kolon sıcaklığı ve gradiyent elüsyon oranı koşulları belirlenmiştir. Çalışmada mikotoksin karışımını içeren mix kullanılmıştır. Analizler SRM modunda gerçekleştirilmiştir. SRM geçişleri için daha önce yapılan infüzyon sonucunda tespit edilen ana iyon, parçalanma iyonları ve çarpışma enerjileri kullanılmıştır. Her bir analit için alıkonma zamanları SRM geçişleri göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir. Parçalanma iyonlarından absorbansı daha yüksek olan miktar analizi için diğeri ise tanımlama için seçilmiştir. Ekstrakte iyon kromatogramlarında her iki iyon pikinin tamamıyla örtüşmesi ve örnek ekstraktında ölçülen iyon oran değişiminin Avrupa Birliği Komisyon Kararı’nda (No:2002/657/EC) ve SANTE/12089/2016’da belirtildiği gibi ($\pm$ %30) olması göz önünde bulundurulmuştur (Anonymous 2002, 2016). Ayrıca optimize edilmiş UHPLC-ESI-MS/MS minimum en az üç tanımlama gerekliliği olan alıkonma zamanı, moleküler ağırlık ve karakteristik parçalanma iyonları şartını karşılamaktadır.

Çizelge 4.1. Analitler için belirlenen ana iyon, moleküler iyon, parçalanma iyonları, çarpışma enerjileri ve alıkonma zamanı (RT)

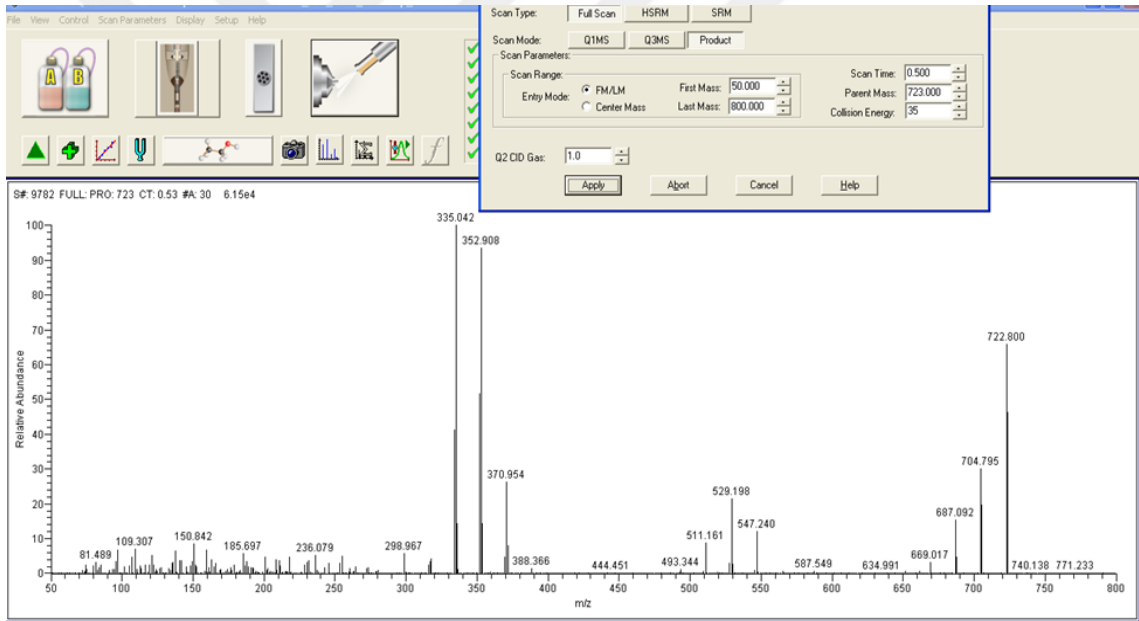
Analit	Ana iyon	Moleküler iyon	Parçalanma İyonları	Çarpışma enerjileri (eV)	RT
Nivalenol	313	$[M+H]^+$	175/201	18/18	0,49
Deoksinivalenol	297	$[M+H]^+$	249/203/280,9	15/18/20	0,75
Fumonisin B1	723	$[M+H]^+$	335/353/705	35/35/35	4,29
Beta Zearalenol	321	$[M+H]^+$	303/285/267	10/10/10	4,34
Fumonisin B2	706	$[M+H]^+$	336/354/318	35/35/35	4,46
Okratoksin A	426	$[M+Na]^+$	261/279	25/25	4,46
Zearalenone	319	$[M+H]^+$	283/301/187	15/15/15	4,47
Sterigmatosistin	325	$[M+H]^+$	310/281	25/25	4,52



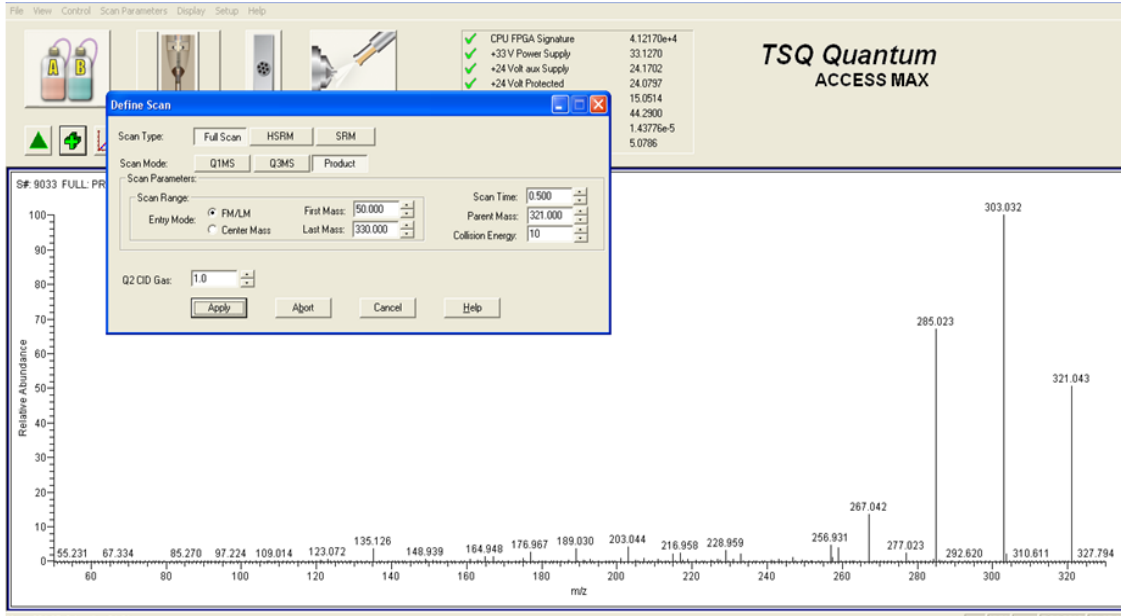
Şekil 4.1. Nivalenola ait infüzyon görüntüsü



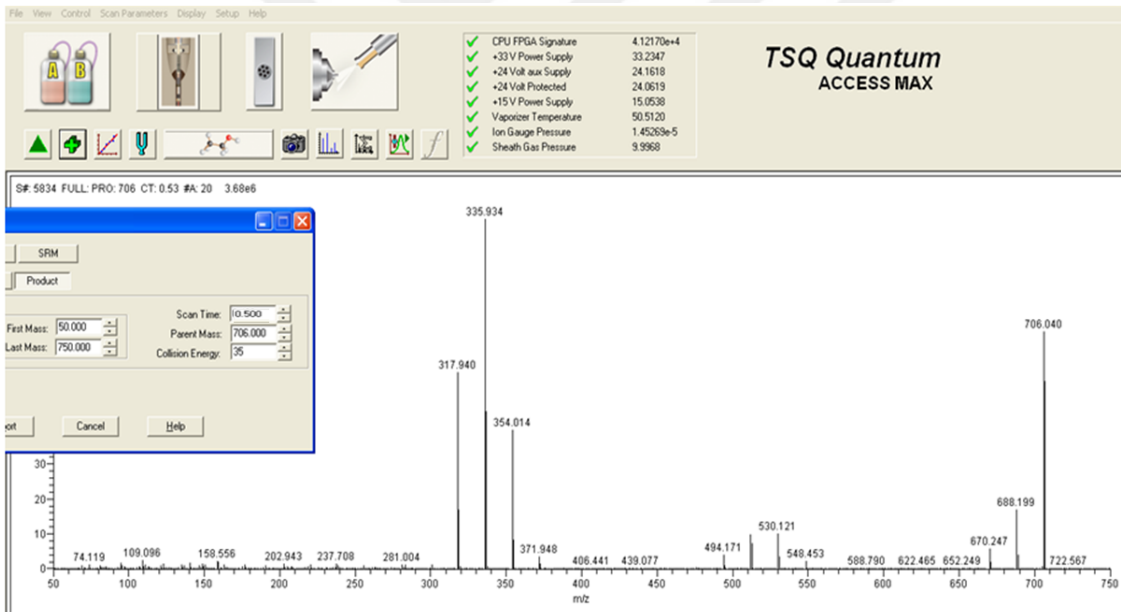
Şekil 4.2. Deoksinivalenola ait infüzyon görüntüsü



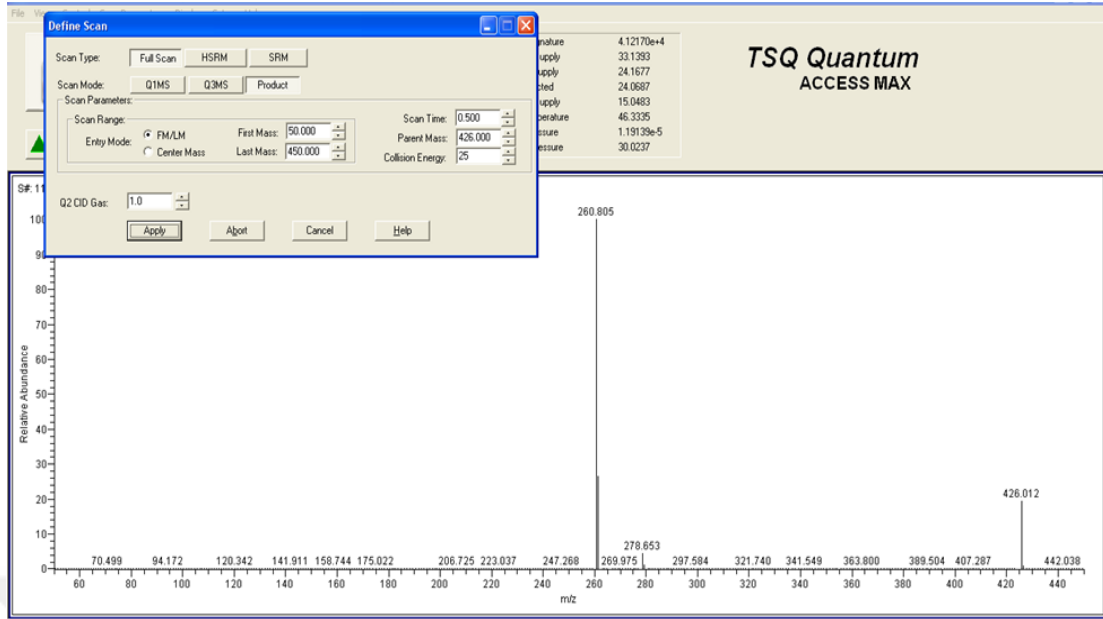
Şekil 4.3. FB1'e ait infüzyon görüntüsü



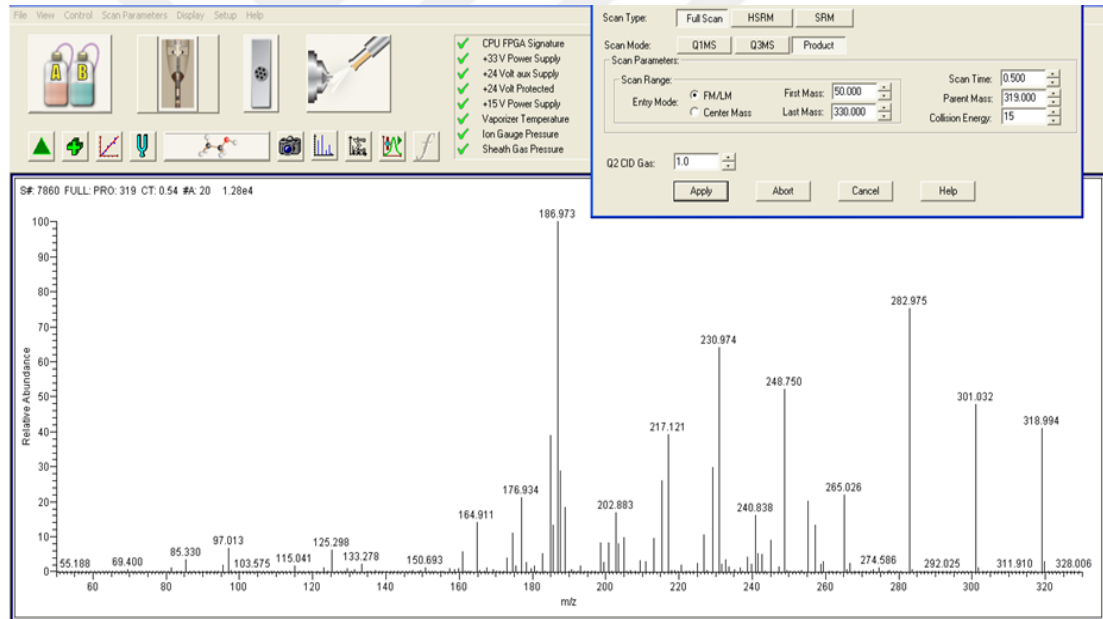
Şekil 4.4. Beta-zearalenol'a ait infüzyon görüntüsü



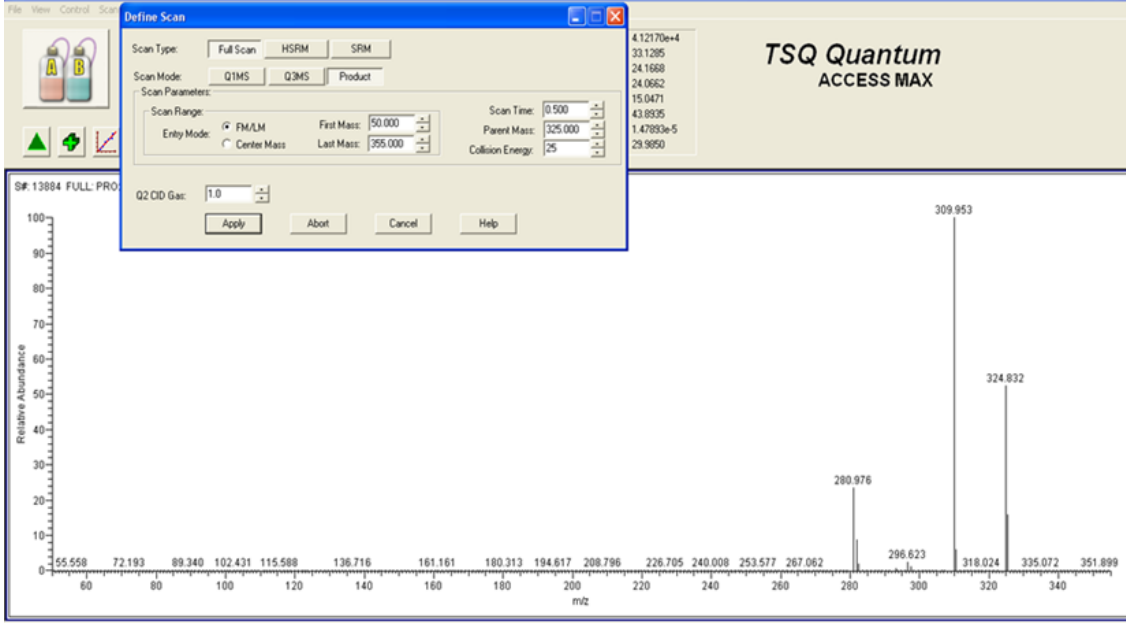
Şekil 4.5. Fumonisin B2'ye ait infüzyon görüntüsü



Şekil 4.6. Okratoksin A'ya ait infüzyon görüntüsü



Şekil 4.7. Zearalenon'a ait infüzyon görüntüsü



Şekil 4.8. Sterigmatosistin'e ait infüzyon görüntüsü

4.2. UHPLC'de Metot Geliştirme

Metot oluşturma aşaması ilk önce Ultra Yüksek Basınç Sıvı Kromatografi (UHPLC) kısmında gerçekleştirilmiştir. UHPLC'de metot geliştirmenin ilk aşaması kromatografik modun veya tekniğin seçimidir. Bu çalışmada ters-faz kromatografi kullanılmıştır. Tez faz kromatografi en yaygın HPLC ayırma tekniğidir ve hidrofobik kısımlara sahip olan ve baskın bir polar karaktere sahip olmayan bileşiklerin ayırımında kullanılmaktadır. Burada sabit faz apolar, hareketli faz ise polar özelliğe sahiptir. Bu yöntem polar ve iyonik analitlerin analizi için oldukça uygundur. Literatürde mikotoksin analizi için yapılan çalışmalarda genel olarak analitlerin ayırımı için ters-faz kromatografi uygulanmıştır. Kromatografik yöntem seçildikten sonra analitlerin iyi bir şekilde ayırımını sağlayacak koşulların seçimi, metot geliştirmenin diğer aşamasıdır. Kromatografik ayırımlarda kolon dolgu maddesinin, partikül boyutunun, kolon uzunluğunun, akışın gradiyent veya izokratik olmasının, hareketli fazın akış hızının, sıcaklığın ve enjeksiyon hacminin etkileri vardır (Niessen 2006; Moldoveanu ve David 2013).

Ters-faz kromatografide analitin iki faz arasındaki dağılımı, analitin hidrofobitesine bağlı olarak adsorpsiyon-desorpsiyon şeklinde dönüşümlü olarak değişmektedir. Durağan faz bir hidrofobik karaktere sahiptir ve mobil faz, bir polar veya kısmen polar karaktere sahiptir. Mobil faz tipik olarak kısmen sulu, kısmen organik bir çözücüdür ve sabit fazdan daha polardır. Sabit fazın analitlerin tutulmasına ve ayrılmasına etkisinin araştırıldığı çalışmalarda genel olarak mikotoksinlerin C18 dolgu materyalinin olduğu sabit fazda iyi sonuç verdiği, diğer benzer kolonlardan daha iyi ayırma verimliliği ve hassasiyeti gösterdiği tespit edilmiştir (Moldoveanu ve David 2013; Frenich vd. 2014). Bu çalışmada kullanılan kolonun (Hypersil GOLD, Thermo Scientific, ABD) özelliği, 18 karbonlu hidrokarbondan (C₁₈) oluşan apolar sabit faz üzerine polar bileşiklerin ilave edilmesidir (endcapped). Böylece polar bileşiklerin tutulmasında daha yüksek verim elde edilmesine ilave olarak bu özellikteki bileşiklerin kuyruk oluşumu önlenmekte ve düzgün pik şekilleri elde edilmektedir. Ayrıca analizde yüksek oranda su fazı içeren hareketli

fazların (%100'e kadar) kullanımına olanak sağlamaktadır. Bu kolon ile en fazla 1250 bar basınçta, 60 °C sıcaklıkta ve pH 2-11 aralığında çalışılmaktadır (Anonymous 2013). LC'de metot geliştirme aşamasında kullanılan hareketli faz bileşimi, akış hızı ve kolon sıcaklığı parametrelerinin değerleri kolonun bu özellikleri dikkate alınarak belirlenmiştir. Literatür çalışmalarında kolon partikül çapının azaltılmasının (<2 µm), kolon etkinliğini artırarak piklerin daha keskin ve simetrik olmasını sağladığı belirlenmiştir. Prensipite sabit akış hızında kolon iç çapı ne kadar küçük olursa doğrusal hız o kadar yüksek olmaktadır. Bu da analiz süresinin daha kısa olması anlamına gelmektedir (Kromidas 2017). Ayrıca yapılan bir çalışmada, 50 ve 150 mm uzunlukta aynı dolgu materyaline (C₁₈) sahip iki kolonun ayırma kapasitesi incelendiğinde, her iki kolonun da benzer etkinlikte ayırma sağladığı ancak kısa kolonda analiz süresinin daha kısa olduğu belirtilmektedir (Da Silva vd. 2019).

Hareketli faz seçimi, kromatografik ayırmanın başarısını etkileyen kritik adımlardan bir tanesidir. Çözücüler, kullanılacak HPLC çeşidine, analitlerin yapısına, durağan fazın seçimine ve analitlerin ölçümünde kullanılan dedektöre bağlı olarak seçilmektedir. Hareketli fazın seçimi, analit iyonizasyonu ve kütle spektrometresinin duyarlılığı açısından da analizde etkili olmaktadır (Blasco ve Picó 2007; Moldoveanu ve David 2013). Mikotoksinlerin ayrılması için kullanılan mobil fazlar, temelde sulu bir çözelti ve bir organik çözücü, metanol veya asetonitrilin karışımlarıdır. Genel olarak, mobil faz katkı maddeleri veya modifiye ediciler, iyon bolluğunu arttırmak, sodyum eklentilerini baskılamak ve kromatografik tepe şeklini iyileştirmek için kullanılmaktadır (Frenich vd. 2014). Kromatografik ayırılarda kullanılan hareketli fazın seçiminde viskozite önemli bir parametredir. Düşük viskoziteli sıvılar belirli akış hızında yüksek viskoziteli sıvılara göre daha düşük basınç oluşturmaktadır. Bu nedenle HPLC'de düşük viskoziteli sıvılar tercih edilmektedir. Sıvı kromatografisinde yaygın olarak kullanılan su, metanol ve asetonitrilin viskoziteleri sırasıyla 1, 0,6 ve 0,37 mPA.s'dir. Suyun viskozitesi baz alınarak, 1'den büyük viskozite değerine sahip sıvılar sistemde yüksek basınca neden olduklarından sıvı kromatografisi için uygun değildir. Kolonda oluşan basınç maksimum akış hızını kısıtlamakta ve böylece toplam analiz süresini etkilemektedir (Meyer 2010; Moldoveanu ve David 2013). Hareketli fazın akış hızının belirlenmesinde pik şeklinin ve sinyal miktarının yanı sıra fazın sistemde oluşturduğu basınç da göz önünde bulundurulmuştur.

Analizde hareketli faz için kullanılacak organik sıvılar belirlendikten sonra kromatografik ayırma gradiyent veya izokratik elüsyondan hangisinin kullanılacağı belirlenmiştir. Gradyent (ayırma süresince çözücü bileşiminin modifikasyonu) elüsyon genellikle 2 çözeltinin farklı oranda karıştırılması ile elde edilmektedir. 3 veya 4 çözeltinin kullanımı yaygın değildir. Gradyent elüsyonun rolü, kısmi sulu çözeltide organik çözücü gibi mobil fazın belli bileşenini artırmaktır. Mobil faz bileşimi ayırma sağlanması, hızlı ayırma ve analitlerin ölçümünü etkilemeden dedektöre teslimini sağlamak için uygun şekilde seçilmektedir (Moldoveanu ve David 2013). Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde çoklu mikotoksin analizinde analitlerin farklı kimyasal yapılarından dolayı gradiyent elüsyonun çoğunlukla kullanıldığı görülmektedir (Sulyok vd. 2006; Berthiller vd. 2007; Abia vd. 2007; Ren vd. 2007; Frenich vd. 2009; Romagnoli vd. 2010; Soleimany vd. 2012; Arroro-Manzanares vd. 2014; De Santis vd. 2017; Da Silva vd. 2019; Scarpino vd. 2019; Abreu vd. 2020). Bu yüzden, bu çalışmada gradiyent elüsyon kullanılmıştır. Analizde gradiyent elüsyon kullanıldığında su-organik faz oranları

iyonizasyonda oldukça önemlidir. Organik sıvıların ESI’de iyonizasyonu iletkenliklerine ve yüzey gerilimlerine bağlı olarak azalmakta veya artmaktadır. Yüzey gerilimi yüksek olan sıvıların iyonizasyonda stabil sprey oluşturması ve yüklü damlacıklardan buharlaşarak uzaklaşması oldukça zor olmaktadır. Bu yüzden, yüzey gerilimi metanol veya asetonitrile göre daha yüksek olan suyun hareketli fazda %70-80 oranından fazla kullanılması duyarlılığı azaltmaktadır. Ancak, yüksek oranda organik faz kullanılması da duyarlılığın azalmasına neden olmaktadır. Çünkü saf organik çözümlerin iletkenlikleri oldukça düşüktür. Hareketli fazda belirli oranlarda suyun kullanılması damlacık oluşumunu iyileştirmektedir (Blasco ve Picó 2007).

Hareketli faz ile ilişkili olarak genellikle mobil faz katkıları veya modifiye ediciler iyon bolluğunu arttırmak, sodyum eklentilerini baskılamak ve kromatografik pik şeklini iyileştirmek amacıyla hareketli faz asetik asit, formik asit, amonyum asetat ve amonyum format gibi katkıları ilave edilerek hazırlanmaktadır (Frenich vd. 2014). Asetik asit (CH_3COOH) ve formik asit (HCOOH) bu amaçla en yaygın kullanılan düşük molekül ağırlıklı, uçucu organik asitlerdir ve hareketli fazda genel olarak %0,1-0,3 konsantrasyon aralığında bulunmaktadır. Bu asitlerin yaygın kullanılmasının 2 ana sebebi vardır. Bunlardan birincisi, birçok kromatografik ayırmanın analit tutulması ve pik şekli açısından asidik koşullarda daha iyi gerçekleşmesidir. İkincisi ise birçok kütle spektrometresi ölçümünün molekülere proton ilavesi sonucunda moleküler iyon $[\text{M}+\text{H}]^+$ oluşmasına olanak sağlayan pozitif iyon modunda yapılmasıdır (Emmert 2006). Asitlerin yanı sıra, analitlerin asitlere duyarlı olduğu veya düşük pH’da ayırmanın sağlanamadığı ve nötral koşulların gerekli olduğu durumlarda bu asitlerin yerine amonyum asetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) ve amonyum format (HCOONH_4) gibi uçucu tuzları hareketli faza ilave edilmektedir. Ancak asitlerle kıyaslandığında bu tuzların kullanımında bazı sınırlamalar mevcuttur. Bunlardan bir tanesi bu tuzların organik çözümlerde çözünürlüğünün düşük olmasıdır; diğeri ise gradiyent akışta pH değişimlerine neden olmasıdır. Bu tuzların suda çözünürlüğü oldukça iyidir, metanolde orta düzeyde ve asetonitrilde ise oldukça düşüktür. Bu özellikleri hareketli fazın asetonitril seçildiği koşullarda sistemde sorunlara neden olmaktadır. Diğer yandan tuzlar tarafından sağlanan hafif asidik pH hem pozitif hem de negatif iyon modunda tespitin yapılmasına olanak sağlamaktadır (Emmert ve Leitner 2006; Soleimany vd. 2012). Genel olarak ESI sisteminin kullanıldığı durumlarda amonyum format ve amonyum asetatın 0,5-10 mM konsantrasyon aralığında kullanılmaları iyonizasyon kaynağının etkinliği açısından önemlidir (Kromidas 2008; Frenich vd. 2014).

Bu kısımda su ve sıvı faz olmak üzere iki hareketli fazın bileşimindeki değişimlerin analitlerin cihazda gösterdiği sinyal büyüklüğü üzerine etkisinin belirlenmesinin yanı sıra akış hızı, kolon sıcaklığı ve enjeksiyon hacmi değerleri de incelenmiştir. Analitlerin mix standart karışımı metanol ile seyreltilmiştir. Analizler mix standart karışımı kullanılarak yapılmıştır. UHPLC cihazında metot geliştirme aşamasında başlangıç parametreleri olarak Arroyo-Manzanares vd. (2014) tarafından LC-MS/MS cihazı kullanılarak geliştirilen hareketli faz bileşimleri, akış hızı, kolon sıcaklığı ve enjeksiyon hacmi değerleri baz alınmıştır. Bu değerler; hareketli faz (A) % 0,3 formik asit, 5 mM amonyum format/su, hareketli faz (B) %0,3 formik asit, 5 mM amonyum format/MeOH, kolon akış hızı 0,4 mL/dk, kolon sıcaklığı 35 °C ve enjeksiyon hacmi 5 µL’dir. Kütle spektrometresinde kullanılan parametreler ise sheath gaz akış hızı 30 birim,

yardımcı gaz akış hızı 10 birim, sprey voltajı 3,2 kV, kapiler sıcaklığı 250 °C, kapiler voltajı 35 V, tube lens voltajı 82 V ve buharlaştırma sıcaklığı 300 °C'dir.

4.2.1. Hareketli faz B'de asetonitril (MeCN) veya metanol (MeOH) kullanılmasının analiz sonuçlarına etkisi

Ters-faz kromatografide iyonize olan analitlerin tutulması büyük ölçüde onların iyonizasyon ve çözünme durumlarına bağlı olarak değişmektedir. Bu özellikleri hareketli fazın pH'sına, iyonik şiddetine, uçuculuğuna, yüzey gerilimine, viskozitesine, iletkenliğine, iyonik kuvvetine ve dielektrik sabiti gibi özelliklerine ve faza ilave edilen katkıların pKa'sına bağlı olarak ESI sisteminde analitin iyonlaşması üzerinde etkili olmaktadır. Ters-faz kromatografide yaygın olarak kullanılan organik sıvılar asetonitril ve metanoldür. Bu sıvıların viskozite, yüzey gerilimi ve dielektrik sabiti gibi fiziksel özellikleri analizin seçiciliğini oldukça etkilemektedir. Ayrıca organik fazın seçiminde ekstraksiyon çözgeni ve hareketli fazın sulu kısmı ile karışabilir özellikte olması dikkate alınmalıdır (Peri-Okonny 2001; Moldoveanu ve David 2013).

Bu aşamada hareketli faz A (% 0,3 formik asit, 5 mM amonyum format/su) sabit tutulup B fazında metanol (%0,3 formik asit) yerine asetonitrilin (%0,3 formik asit) kullanılmasının piklerin sinyal büyüklüğüne ve şekline etkisi incelenmiştir. Çizelge 4.2'de belirtildiği üzere metanol kullanılarak yapılan analizlerde analitlerin tespiti deoksinivenol hariç asetonitrile göre daha geç olmuştur. Şekil 4.9'da STE'nin iki hareketli faz (MeCN-MeOH) kullanılarak elde edilen kromatogramları verilmiştir.

Çizelge 4.2. Analitlerin MeCN ve MeOH'daki tespit zamanı ve sinyal miktarı

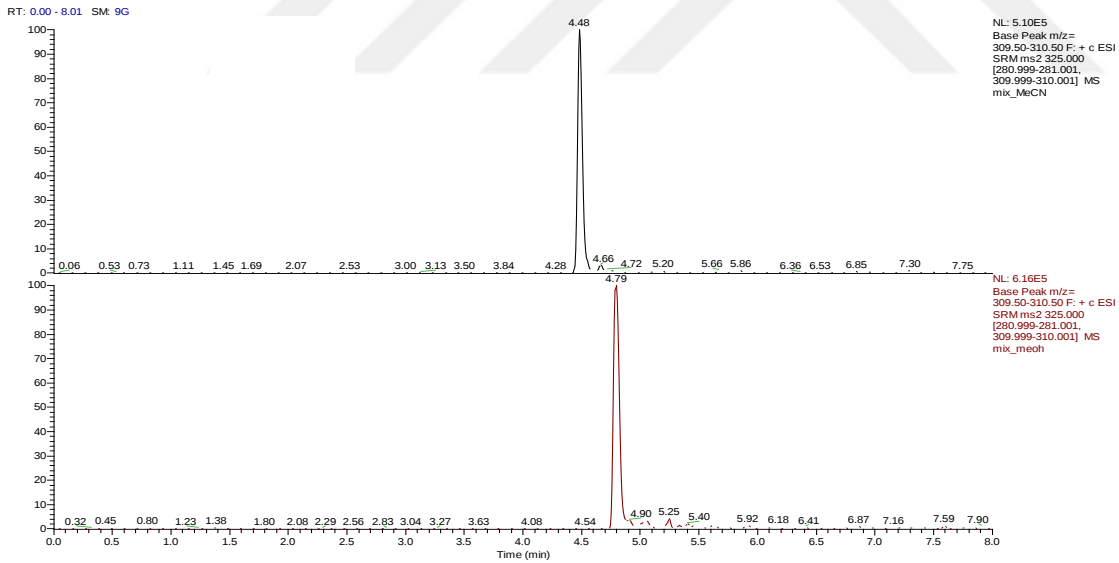
Analit		Tespit zamanı (RT, dk)	Sinyal seviyesi (Ortalama ± Std Sapma)
Nivalenol	MeCN	0,04	5,91E3 ±0,1
	MeOH	0,84	3,39E4 ±0,11
Deoksinivalenol	MeCN	0,62	6,06E3 ±0,06
	MeOH	0,45	1,57E4 ±0,13
Fumonisin B1	MeCN	4,0	4,99E5 ±0,11
	MeOH	4,58	2,96E5 ±0,04
Beta Zearalenol	MeCN	4,17	2,26E4 ±0,15
	MeOH	4,61	2,01E5 ±0,2
Fumonisin B2	MeCN	4,16	2,76E5 ±0,3
	MeOH	4,77	5,02E5 ±0,19
Okratoksin A	MeCN	3,89	3,96E3 ±0,04
	MeOH	3,92	1,49E4 ±0,12
Zearalenol	MeCN	4,47	5,88E3 ±0,32
	MeOH	4,75	6,50E3 ±0,09
Sterigmatosistin	MeCN	4,48	5,30E5 ±0,2
	MeOH	4,79	6,29E5 ±0,11

*Akış hızı 0,4 mL/dk, kolon sıcaklığı 35 °C, enjeksiyon hacmi 5 µL

Analitlerin tespit zamanında en fazla 0,8 dk'lık bir kayma tespit edilmiştir. Bu durumun nedeninin metanolün viskozitesinin asetonitrile göre daha yüksek olmasından

kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak pik alanları incelendiğinde, analitlerin Fumonisin B1 hariç metanolde daha yüksek sinyal verdiği belirlenmiştir.

Literatürde mikotoksinlerin kromatografik ayrımında hareketli faz olarak asetonitrilin, metanolün veya karışımlarının kullanıldığı, ancak metanolün daha çok tercih edildiği çalışmaların mevcut olduğu belirlenmiştir. Kromatografik analizlerde asetonitrilin tercih edilmesinin başlıca nedeni düşük viskozitesinden dolayı kolonda düşük basınç oluşturmastır. Metanol kullanımında ise sulu faz ile özellikle %40-50 oranında karışımında en yüksek basınç değeri gözlenmektedir. Buna karşın, asetonitrile kıyasla hem fiyatı daha ucuzdur hem de daha az toksiktir. Ayrıca metanolün polaritesinin daha yüksek olması hareketli faza ilave edilen katkıların (tampon) sistemdeki akış hatlarında çökmesini engellemektedir (García-Alvarez-Coque vd. 2015). Frenich vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada da hareketli faz olarak metanol kullanıldığında tüm analitlerde özellikle DON, T-2 ve HT-2 gibi trikotesenler için asetonitrile göre duyarlılığın daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Soleimany vd. (2012) tarafından tahıllarda mikotoksin tespitine yönelik geliştirilen metotta da mobil faz olarak asetonitril ve metanol kullanımının değerlendirildiği ve tüm analitler için metanolde daha düşük gürültü elde edildiği ve bu nedenle metanol kullanılmasına karar verildiği belirtilmektedir. De Santis vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada ise asetonitril ve metanolle yaptıkları denemelerde önemli bir fark olmadığı, metanolün daha çevre dostu olması nedeniyle tercih edildiği bildirilmektedir. Da Silva vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada da asetonitril kullanıldığında FB1 ve FB2’de istenmeyen asimetrisi görüldüğü ve bu nedenle metanolün tercih edildiği bildirilmektedir.



Şekil 4.9. Sterigmatosistin’in iki hareketli faz (MeCN-MeOH) kullanılarak elde edilen kromatogramları

Hem sinyal miktarı hem de ayırma gücü açısından analizlere metanol kullanılarak devam edilmesine karar verilmiştir. Hareketli fazda metanol kullanıldığında metotta kullanılan kolon sıcaklığı ve enjeksiyon hacmi değerleri değiştirilmemiştir.

4.2.2. Hareketli faz A (% 0,3 formik asit, 5 mM amonyum format/su) sabit tutularak, hareketli faz B’de (metanol) farklı konsantrasyonlarda formik, asetik asit, amonyum format ve amonyum asetat kullanımının analiz sonuçlarına etkisi

Hareketli faz B için metanol belirlendikten sonra farklı iyonlaştırma ajanlarının (formik ve asetik asit) ve bunların konsantrasyonlarının piklerin şekline ve sinyal miktarına etkisi araştırılmıştır.

4.2.2.1. Formik asit

Hareketli faz B’de farklı konsantrasyonlarda (%0,1, 0,2 ve 0,3) formik asit kullanımının analitlerin sinyal miktarına etkisini incelemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.3’de belirtilmiştir. Hareketli fazın pH değerleri sırasıyla 3,60, 3,51 ve 3,03’tür. Analitlerin farklı konsantrasyonlarda hazırlanan hareketli fazla yapılan analiz sonuçları incelendiğinde pik şekillerinde ve tutulma sürelerinde farklılık gözlenmemiştir. Yapılan istatistik analizi sonucunda konsantrasyon farkının FB1, beta-ZOL, OTA ve ZEN üzerinde önemli derecede etkili olduğu diğer analitler için ise konsantrasyon farkının sinyal miktarı üzerinde önemli derecede etkili olmadığı görülmüştür.

Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda formik asit ilavesinin sinyal miktarına etkisi

Analit	%0,1	%0,2	%0,3
Nivalenol	1,22E4±0,84	2,86E4±0,62	3,52E4±0,9
Deoksinivalenol	8,74E3±0,9	1,20E4±0,25	1,20E4±0,27
Fumonisin B1	4,44E5 ^a ±0,56	5,83E5 ^b ±0,17	5,13E5 ^{ab} ±0,23
Beta Zearalenol	4,23E4 ^a ±2,30	2,34E5 ^b ±0,12	2,81E5 ^b ±0,47
Fumonisin B2	5,64E5±0,28	5,35E5±0,38	5,26E5±0,76
Okratoksin A	1,83E4 ^a ±2,08	5,87E4 ^b ±0,2	5,10E4 ^{ab} ±0,52
Zearalenol	1,22E4 ^a ±0,27	6,64E4 ^{ab} ±2,03	9,50E4 ^b ±3,68
Sterigmatosistin	8,68E5±2,30	7,48E5±0,08	7,24E5±0,18

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

Analitlerden NIV, beta-ZOL ve ZEN’ in sinyal miktarı konsantrasyon farkı arttıkça artmakta iken STE ve FB2’de sinyal miktarında düşüş tespit edilmiştir. DON’da önce artış sonra ise sabit kaldığı, FB1 ve OTA’da ise konsantrasyon farkının önce sinyal miktarını arttırdığı sonra ise düşüşe neden olduğu görülmüştür. Tüm analitler birlikte değerlendirildiğinde %0.2 formik asit ilavesinin diğer konsantrasyonlara göre sinyal miktarı üzerinde daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

4.2.2.2. Asetik asit

Hareketli faz B’de farklı konsantrasyonlarda (%0,1, 0,2 ve 0,5) asetik asit kullanımının analitlerin sinyal miktarına etkisini incelemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.4’de verilmiştir. Hareketli fazın pH değerleri sırasıyla 3,85, 3,70 ve 3,22’dir. Analitlerin farklı konsantrasyonlarda hazırlanan hareketli fazla yapılan analiz sonuçları incelendiğinde pik şekillerinde ve tutulma sürelerinde farklılık gözlenmemiştir. Yapılan istatistik analizi neticesinde konsantrasyon farkının FB1, beta-ZOL, FB2 ve STE üzerinde önemli derecede etkili olduğu diğer analitler için ise konsantrasyon farkının sinyal miktarı üzerinde önemli derecede etkisinin olmadığı görülmüştür. Asetik asit konsantrasyonu arttıkça FB1 ve FB2’nin sinyal miktarında artış gözlenirken DON’da tam tersi olarak sinyal miktarında düşüş tespit edilmiştir. Beta-ZOL, OTA, STE ve NIV’de konsantrasyon farkı arttıkça önce sinyal miktarında artış sonra ise düşüş gözlenirken NIV’de başlangıç sinyal miktarına göre daha fazla düşüş gözlenmiştir. ZEN’de ise tam tersi olarak sinyal miktarında önce düşüş sonra ise artış gözlenmiştir. Tüm analitler birlikte değerlendirildiğinde analitlerden beta-ZOL, OTA, ZEN ve STE’de en yüksek sinyal miktarının %0,2 asetik asit ilavesinde elde edildiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda asetik asit ilavesinin sinyal miktarına etkisi

Analit	%0,1	%0,2	%0,5
Nivalenol	3,19E4± 2,63	3,27E4±2,9	2,40E4±1,61
Deoksinivalenol	1,21E4±0,23	1,16E4±0,15	9,62E3±1,39
Fumonisin B1	4,49E5 ^a ±0,42	6,08E5 ^b ±0,69	6,16E5 ^b ±0,13
Beta Zearalenol	1,71E5 ^a ±0,05	4,20E5 ^b ±0,15	2,78E5 ^c ±0,36
Fumonisin B2	4,76E5 ^a ±0,16	5,53E5 ^{ab} ±0,42	5,66E5 ^b ±0,1
Okratoksin A	3,39E4±0,91	5,39E4±0,15	4,19E4±0,23
Zearalenol	6,55E4±0,81	1,31E5±0,35	6,54E4±0,09
Sterigmatosistin	6,91E5 ^a ±0,77	1,11E6 ^b ±0,08	1,09E6 ^b ±0,07

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

4.2.2.3. 1 mM Amonyum format ve amonyum asetat

B fazında 1 mM Amonyum format ve Amonyum asetat kullanımının analitlerin sinyal miktarına etkisini incelemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.5’de

belirtilmiştir. Hareketli fazın pH değerleri sırasıyla 5,50 ve 5,60 dır. Analitlerden NIV, DON ve OTA'nın sinyal miktarı amonyum format ilavesinde daha yüksek iken diğer analitlerin sinyal miktarının amonyum asetat ilavesinde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

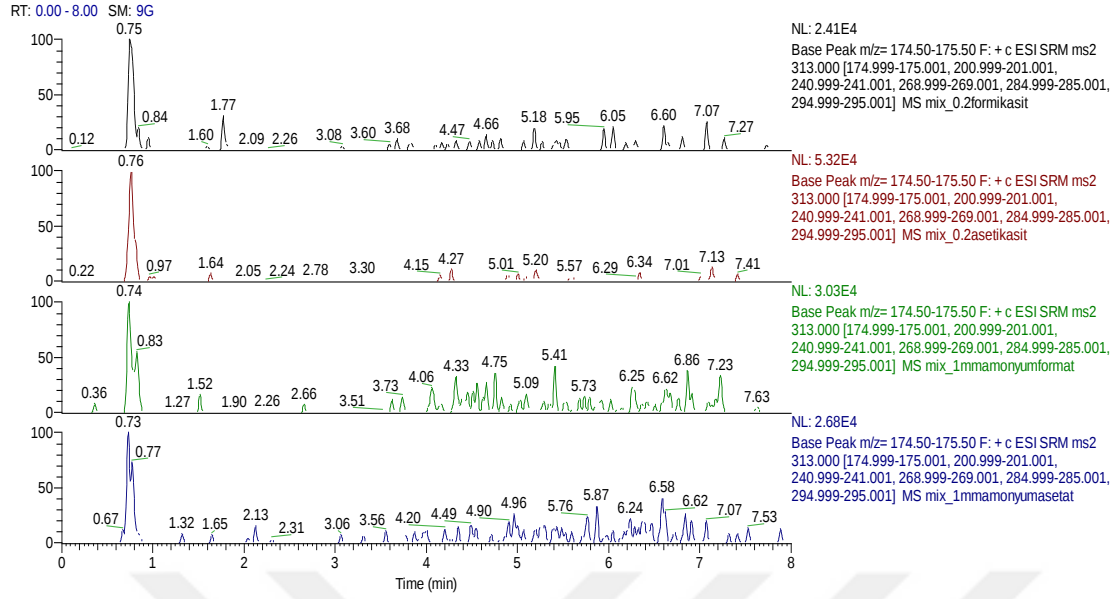
Çizelge 4.5. 1 mM Amonyum format ve Amonyum asetat ilavesinin sinyal miktarına etkisi

Analit	1 mM Amonyum format	1 mM Amonyum asetat
Nivalenol	3,08E4±0,07	3,04E4±0,5
Deoksinivalenol	9,24E3±3,20	8,62E3±0,6
Fumonisin B1	3,62E5±0,10	4,51E5±0,13
Beta Zearalenol	1,61E5±0,06	3,80E5±0,47
Fumonisin B2	3,72E5±0,25	4,93E5±0,1
Okratoksin A	1,28E4±0,25	1,08E4±0,16
Zearalenol	3,84E4±1,04	1,38E5±0,16
Sterigmatosistin	4,77E5±0,35	8,95E5±0,54

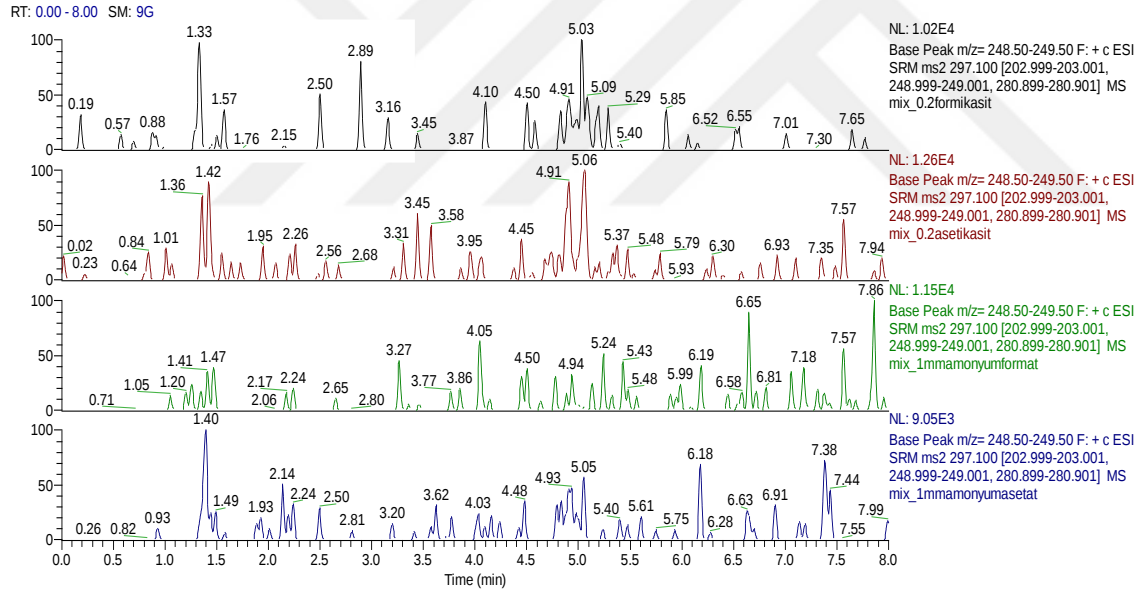
*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

4.2.2.4. Hareketli faz B'de formik, asetik asit ve amonyum format ve amonyum asetat kullanımının sinyal seviyesi üzerine etkilerinin karşılaştırılması

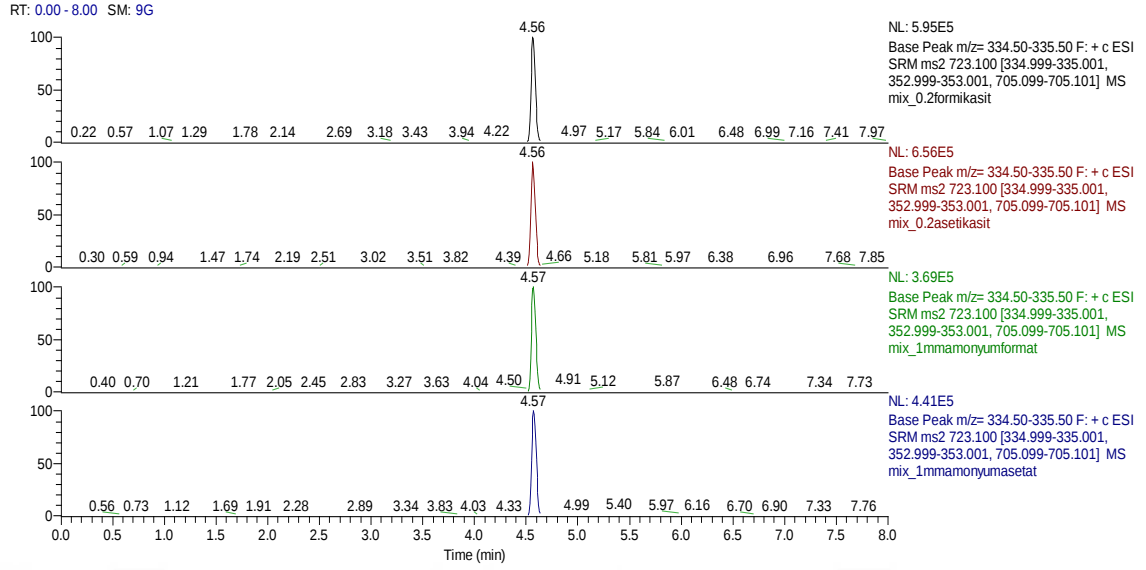
Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan asetik asit/MeOH, formik asit/MeOH ve 1 mM amonyum format ve amonyum asetat ile yapılan analizler sonucunda; en yüksek sinyal miktarı elde edilen %0,2 formik asit/MeOH, %0,2 asetik asit/MeOH ve 1 mM amonyum format ve amonyum asetatın karşılaştırılması yapılmıştır. Belirlenen bu konsantrasyonlardaki analit kromatogramları Şekil 4.10-4.17'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, analitlerin en yüksek sinyal miktarı ZEN hariç diğer analitler için asetik asit kullanıldığında elde edilmiştir. Hafif asidik koşullarda çalışılması mikotoksinlerin kromatografik ayrımını kolaylaştırmakta ve kütle spektrometresinde iyonizasyonunu artırmaktadır. Literatürde mikotoksinlerin analizi için yapılan çalışmalarda fumonisinlerin yapısında 4 karboksilik grubun bulunduğu ve iyi bir pik şeklinin elde edilmesi için asidik kromatografik koşulların kullanılabileceği bildirilmektedir (Sulyok vd. 2006). Bu çalışmadaki analiz sonuçları incelendiğinde de benzer şekilde fumonisinlerin sinyal miktarının %0,2 asetik asit ilavesinde en yüksek değeri verdiği tespit edilmiştir.



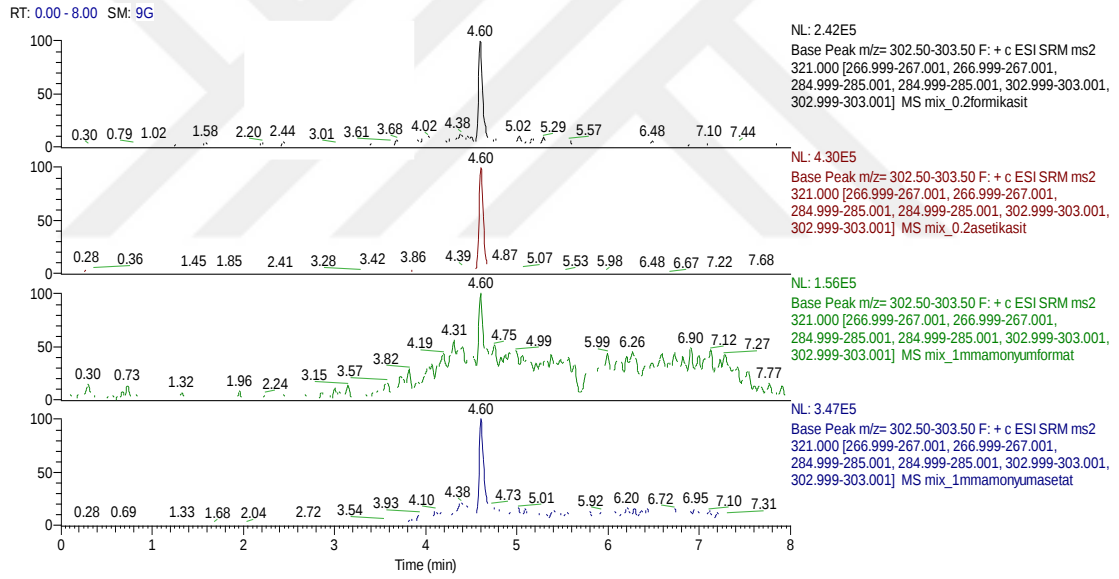
Şekil 4.10. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın nivalenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi



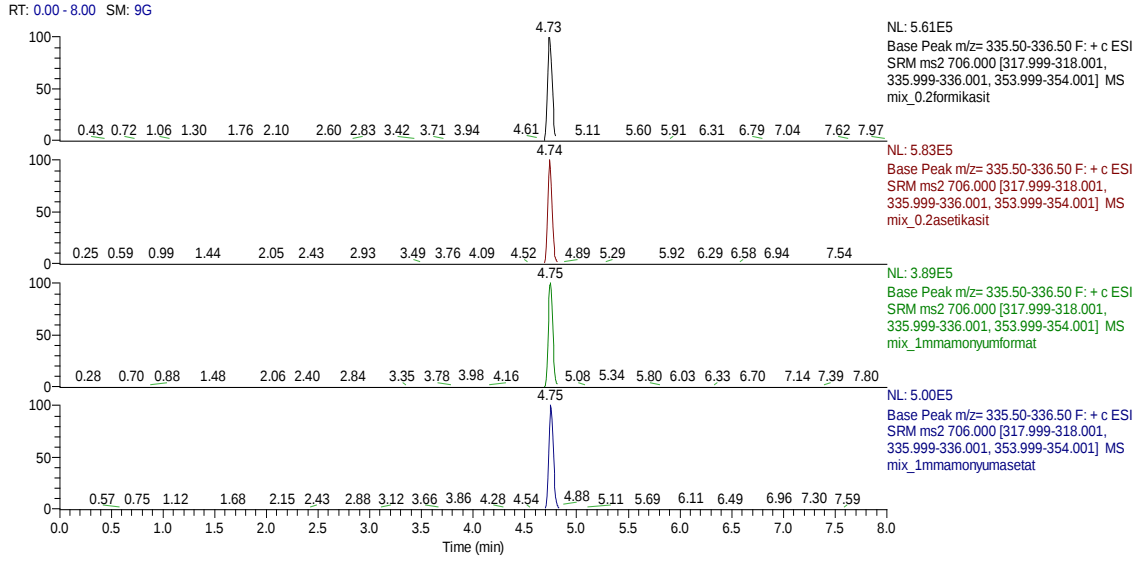
Şekil 4.11. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın deoksinivalenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi



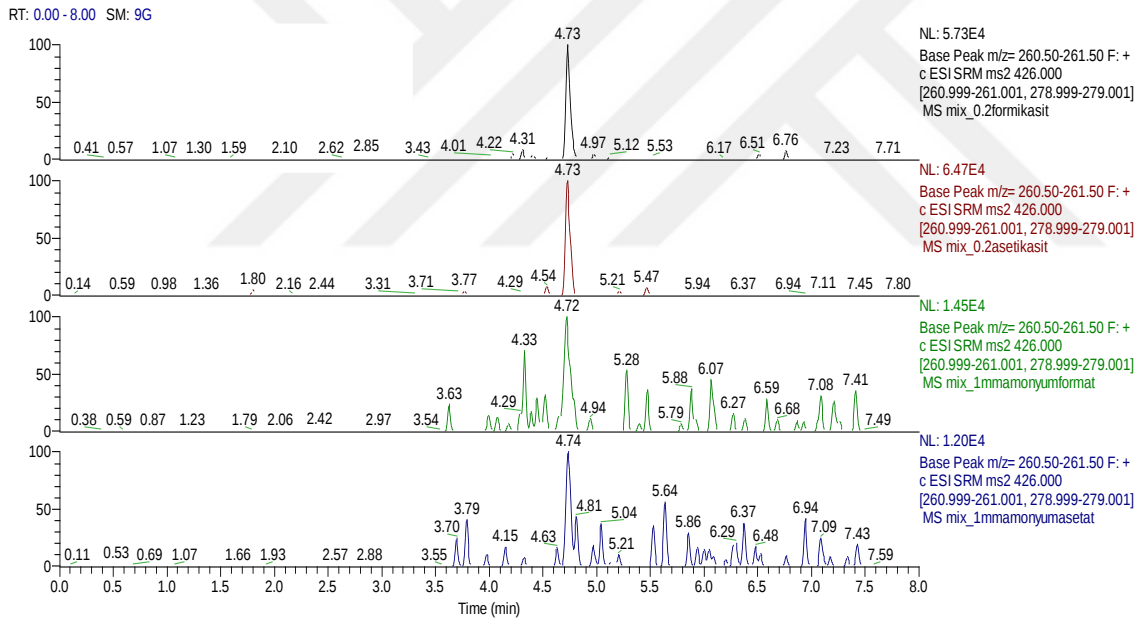
Şekil 4.12. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın fumonisin B1'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



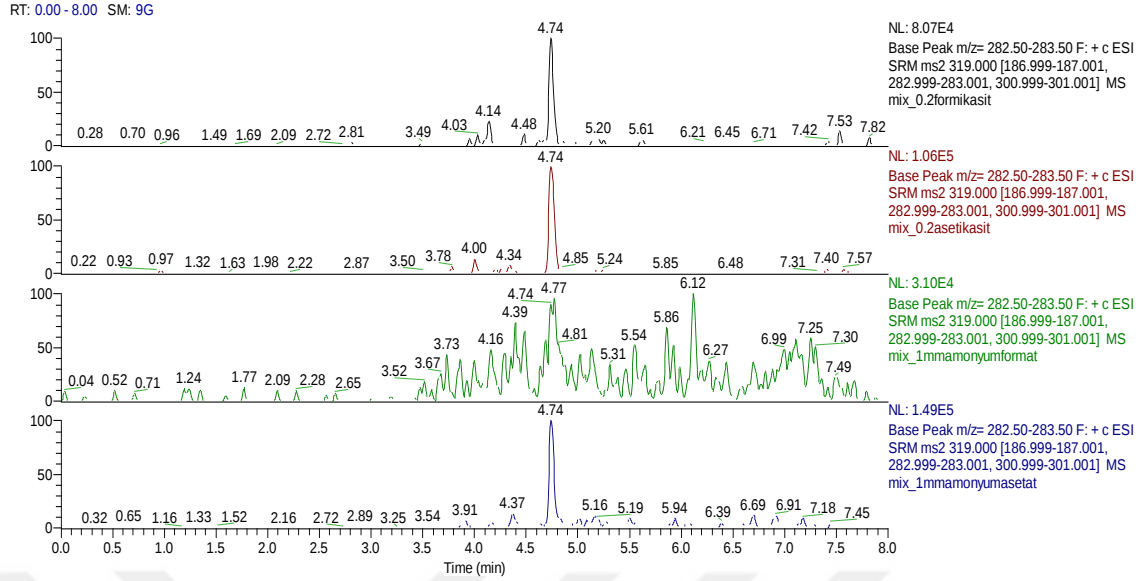
Şekil 4.13. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın beta zearelenol'un sinyal seviyesi üzerine etkisi



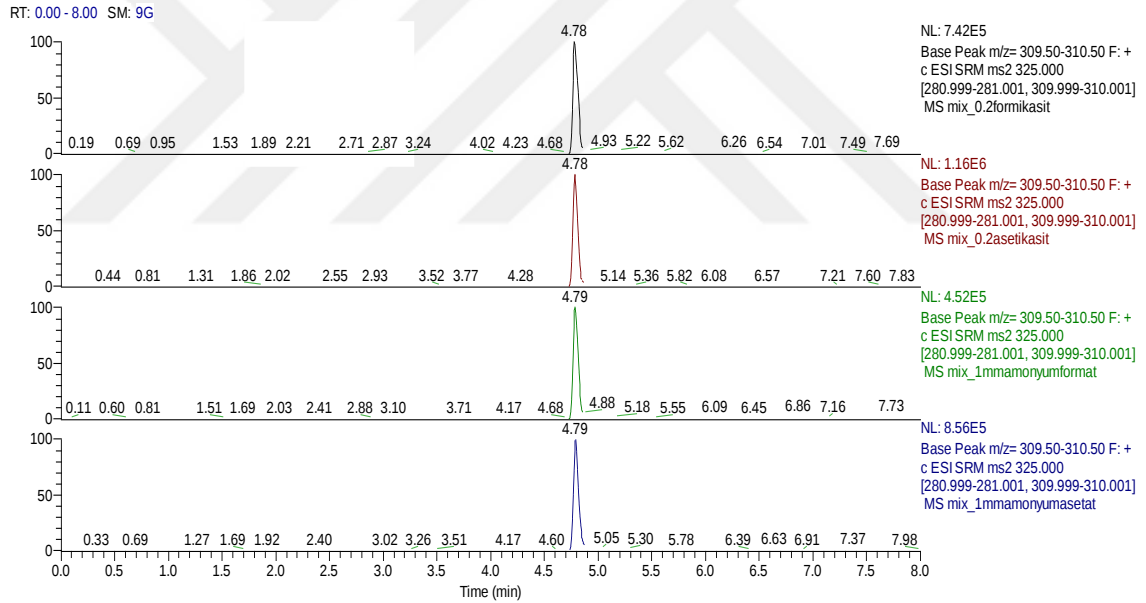
Şekil 4.14. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın fumonisin B2'nin sinyal seviyesi üzerine etkisi



Şekil 4.15. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın okratoksin A'nın sinyal seviyesi üzerine etkisi



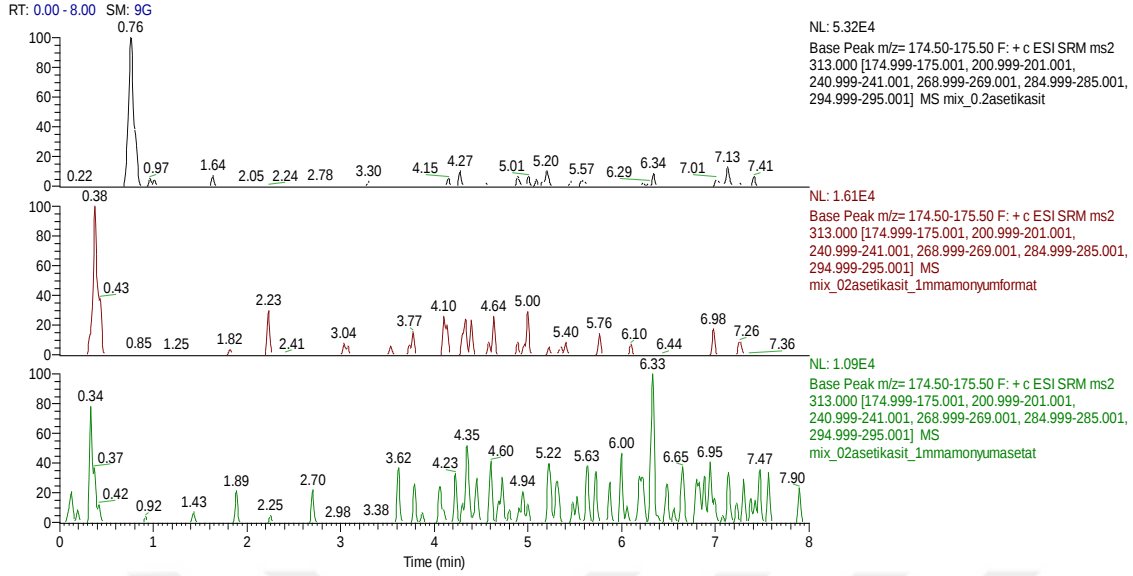
Şekil 4.16. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın zearalenon'un sinyal seviyesi üzerine etkisi



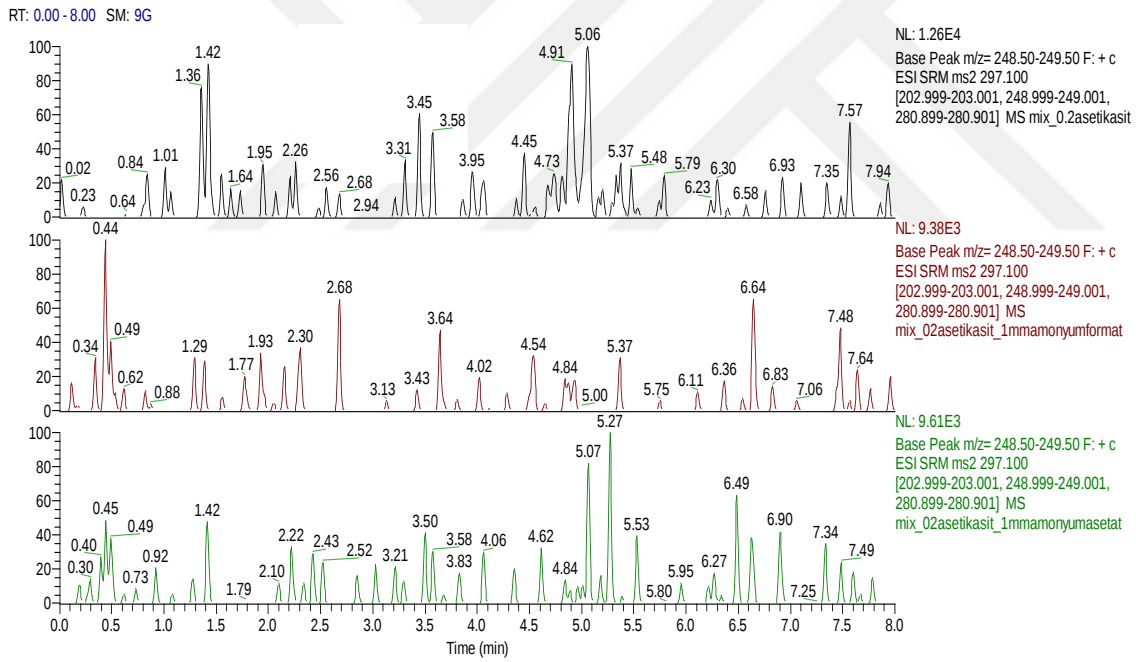
Şekil 4.17. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın sterigmatocystin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi

4.2.3. Hareketli faz B'de %0,2 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve amonyum asetat kullanımının analiz sonuçlarına etkisi

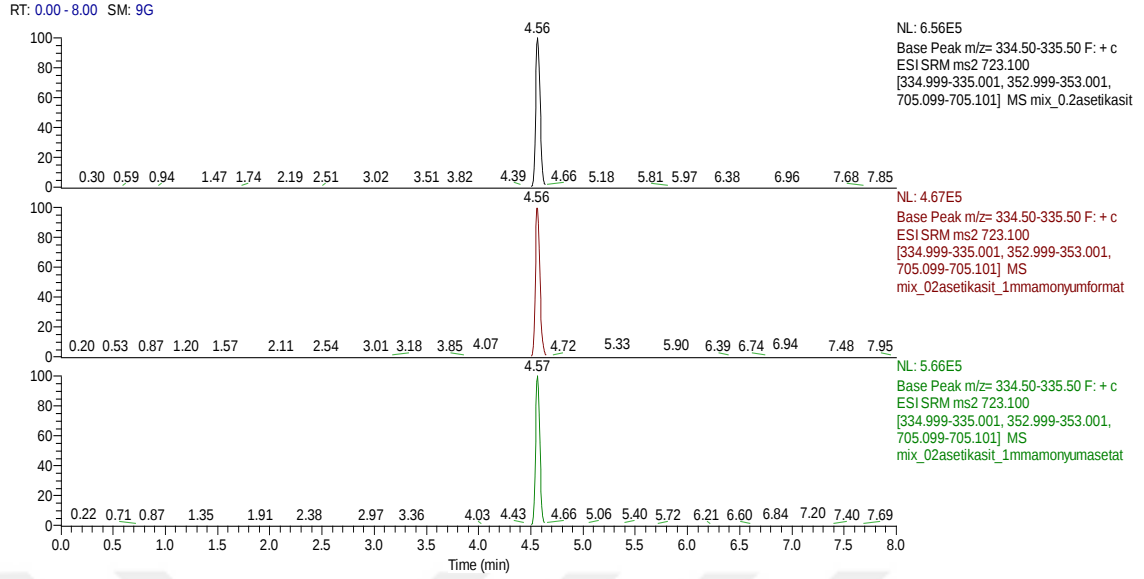
Hareketli faz B'de %0,2 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve amonyum asetat kullanımının analitlerin sinyal seviyesine etkileri incelenmiştir. Analitlere ait kromatogramlar Şekil 4.18-4.25'te gösterilmiştir.



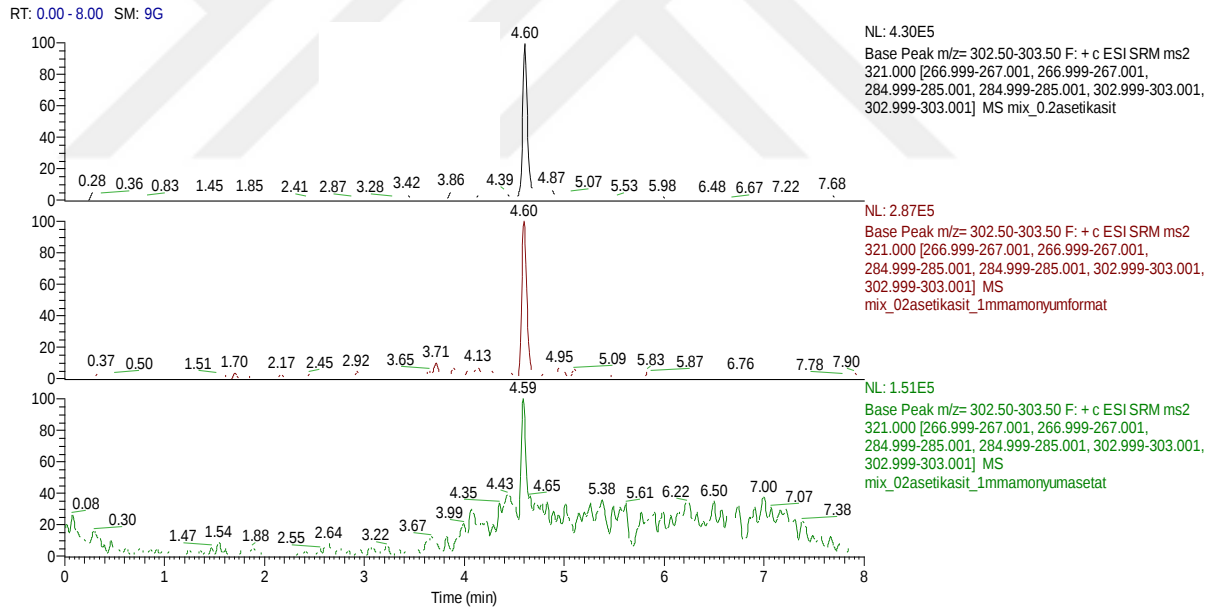
Şekil 4.18. % 0,2 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının nivalenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi



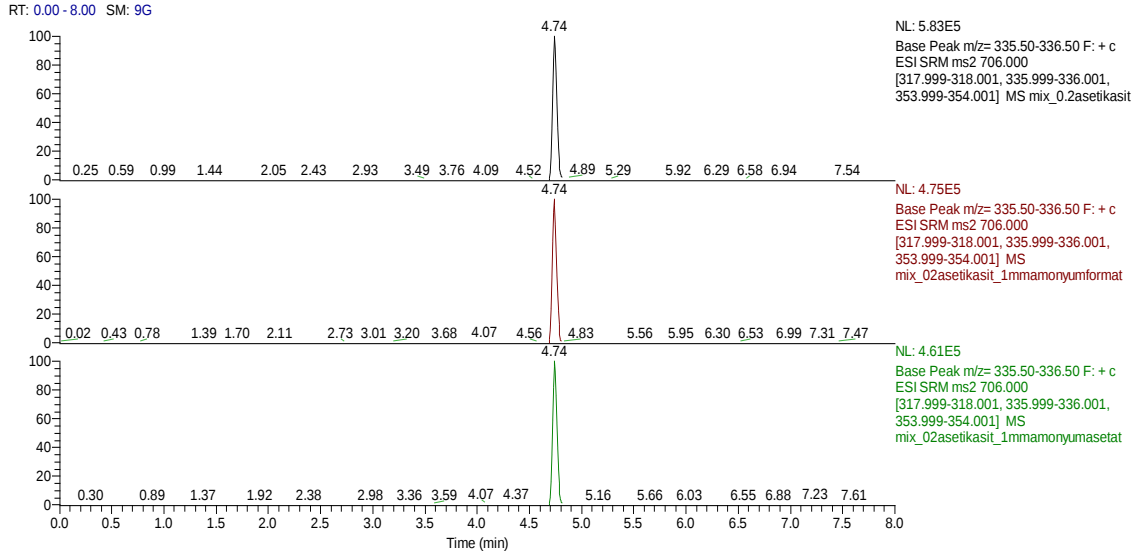
Şekil 4.19. % 0,2 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının deksinivalenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi



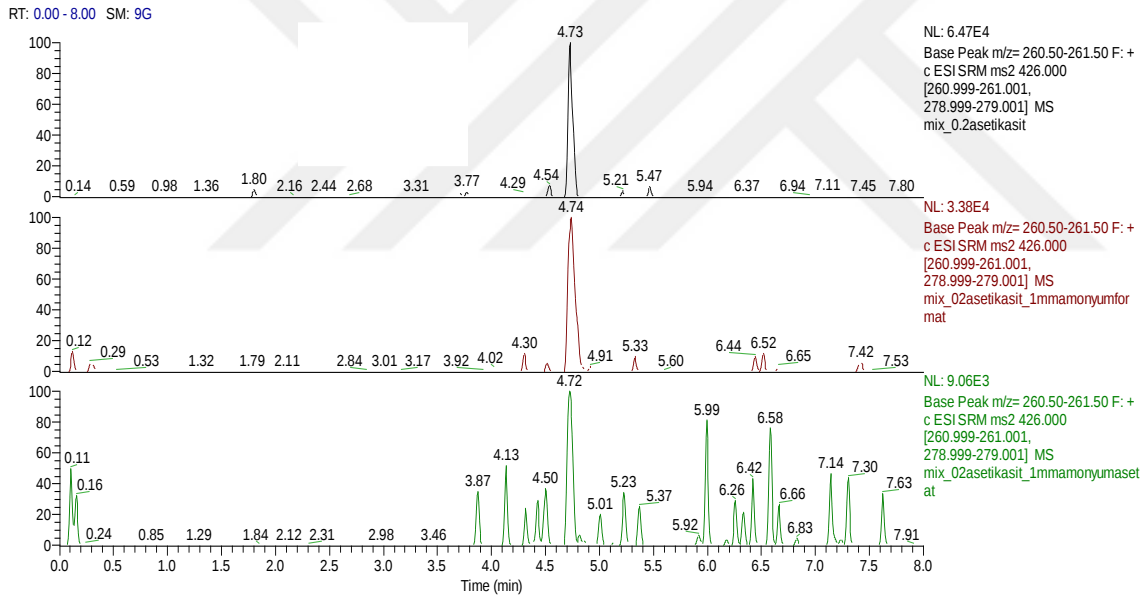
Şekil 4.20. % 0,2 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının fumonisin B1'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



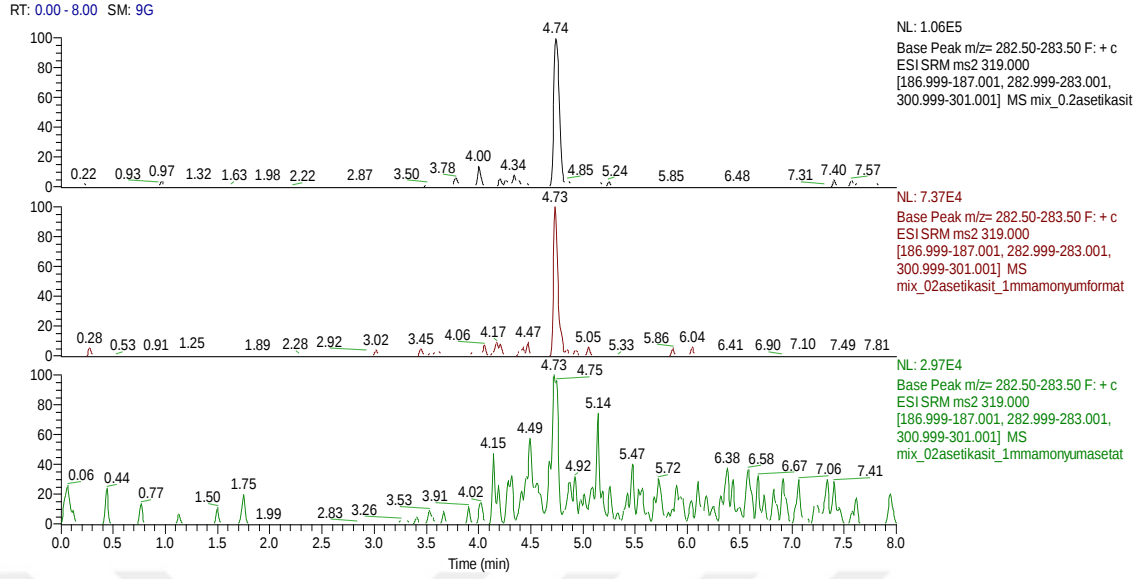
Şekil 4.21. % 0,2 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının beta zearalenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi



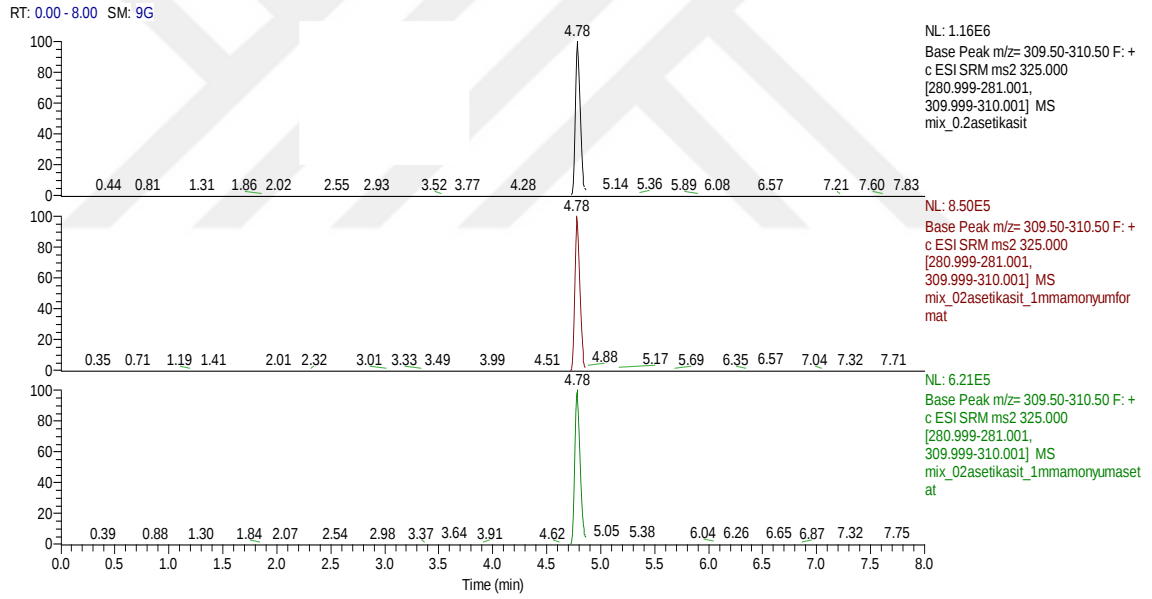
Şekil 4.22. % 0,2 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının fumonisin B2'nin sinyal seviyesi üzerine etkisi



Şekil 4.23. % 0,2 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının okratoksin A'nın sinyal seviyesi üzerine etkisi



Şekil 4.24. % 0,2 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının zearalenon'un sinyal seviyesi üzerine etkisi



Şekil 4.25. % 0,2 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının sterigmatocystin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi

Hareketli faz bileşimine ilave olarak katılan 1 mM amonyum format ve amonyum asetatın analitlerin sinyal seviyesinde artışa neden olmadığı, analitlerin tümünde %0,2 asetik asitte sinyal miktarının en yüksek olduğu ve iyonlaşmada daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

4.2.4. Hareketli faz B (%0,2 asetik asit/MeOH; pH:3,70) sabit tutularak A fazında formik, asetik asit ve 1 mM amonyum format ve amonyum asetat kullanımının analiz sonuçlarına etkisi

4.2.4.1. Formik asit

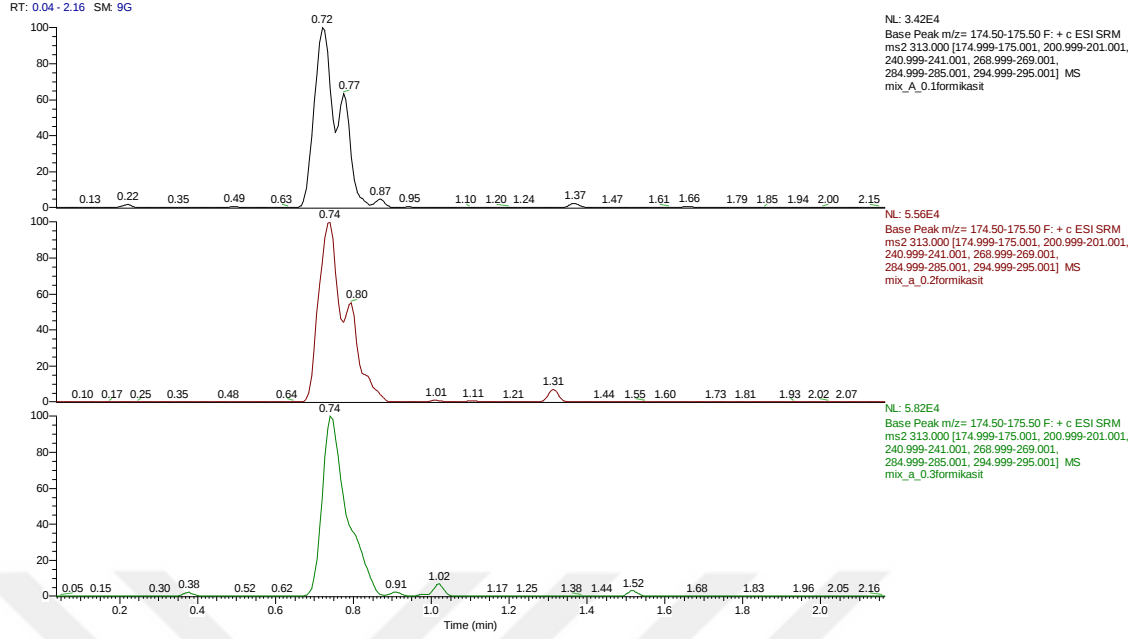
Hareketli faz A'da farklı konsantrasyonlarda (%0,1, 0,2 ve 0,3) formik asit kullanımının analitlerin sinyal miktarına etkisini incelemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.6'da belirtilmiştir. Hareketli fazın pH değerleri sırasıyla 2,70, 2,55 ve 2,42'dir. Analiz sonuçları incelendiğinde NIV ve DON hariç diğer analitlerin pik şekillerinde ve tutulma sürelerinde farklılık gözlenmemiştir. Şekil 4.26-4.27'de farklı konsantrasyonlarda formik asit ilavesinin NIV ve DON'un pik şekli ve sinyal seviyesine etkisine ait kromatogramlar verilmiştir. Konsantrasyon farkının analitlerin sinyal miktarı üzerine istatistiki olarak önemli derecede etkisinin olmadığı ve sinyal miktarının NIV ve FB2'de konsantrasyon farkı arttıkça arttığı, STE'de ise tam tersi olarak sinyal miktarında azalma olduğu görülmüştür. DON'da konsantrasyon farkı arttıkça sinyal miktarında önce azalma sonra artış gözlenirken, FB1, beta-ZOL, OTA ve ZEN'de önce artış sonra ise azalma tespit edilmiştir. FB1 ve beta-ZOL'da her ne kadar önce artış sonra azalma tespit edilse de ilk başlangıç konsantrasyonuna göre %0,3 formik asitte %0,1'e göre artış olduğu görülmektedir. Tüm analitler açısından hem sinyal miktarı hem de pik şekilleri açısından %0,3 formik asit ilavesinin diğer konsantrasyonlara göre daha iyi sonuç verdiği görülmüştür.

Çizelge 4.6. Farklı konsantrasyonlarda formik asit ilavesinin sinyal miktarına etkisi

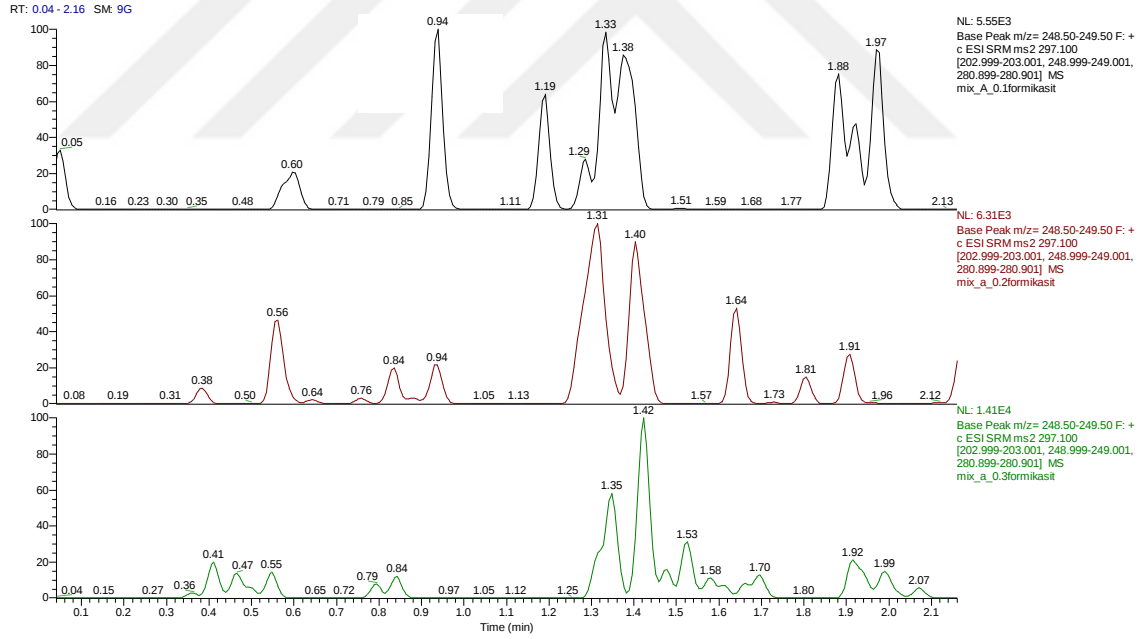
Analit	%0,1	%0,2	%0,3
Nivalenol	4,33E4±1,28	5,33E4±0,33	5,66E4±0,23
Deoksinivalenol	1,01E4±0,48	7,30E3±1,39	1,33E4±0,11
Fumonisin B1	8,80E5±0,49	9,79E5±0,13	9,06E5±0,38
Beta Zearalenol	7,84E5±1,42	1,01E6±0,03	9,24E5±1,65
Fumonisin B2	8,87E5±1,75	1,06E6±0	1,11E6±0,05
Okratoksin A	4,25E4±0,11	4,27E4±1,51	4,03E4±0,54
Zearalenol	2,17E5±0,08	3,15E5±0,42	2,14E5±0,56
Sterigmatosistin	9,34E5±2,06	7,79E5±0,2	6,04E5±0,83

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir



Şekil 4.26. Farklı konsantrasyonda formik asit ilavesinin nivalenolün pik şekli ve sinyal seviyesi üzerine etkisi



Şekil 4.27. Farklı konsantrasyonda formik asit ilavesinin deoksinivalenolün pik şekli ve sinyal seviyesi üzerine etkisi

4.2.4.2. Asetik asit

Hareketli faz A'da farklı konsantrasyonlarda (%0,1, 0,2 ve 0,5) asetik asit kullanımının analitlerin sinyal miktarına etkisini incelemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.7'de belirtilmiştir. Hareketli fazın pH değerleri sırasıyla 3,22, 3,08 ve

2,65'dir. Analiz sonuçları incelendiğinde analitlerin pik şekillerinde ve tutulma sürelerinde farklılık gözlenmemiştir. Ayrıca konsantrasyon farkının DON ve STE hariç diğer analitlerin sinyal miktarı üzerine istatistiki olarak önemli derecede etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle daha az kimyasal kullanımı ve kolon ömrü dikkate alınarak en düşük konsantrasyon seçilerek diğer A fazı denemeleri ile karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.7. Farklı konsantrasyonlarda asetik asit ilavesinin sinyal miktarına etkisi

Analit	%0,1	%0,2	%0,5
Nivalenol	5,10E4± 2,01	5,86E4±0,8	7,64E4±0,41
Deoksinivalenol	6,79E3 ^a ±1,87	8,36E3 ^{ab} ±0,47	1,46E4 ^b ±0,3
Fumonisin B1	1,20E6±0,08	1,21E6±0,17	1,04E6±0
Beta Zearalenol	1,28E6±0,07	1,33E6±0,09	1,29E6±0,02
Fumonisin B2	1,30E6±0,09	1,35E6±0,05	1,20E6±0,17
Okratoksin A	7,63E4±0,2	8,82E4±0,87	7,57E4±1,59
Zearalenol	2,45E5±0,01	2,62E5±0,3	2,42E5±0,26
Sterigmatosistin	7,13E5 ^b ±0,25	6,32E5 ^{ab} ±0,07	5,91E5 ^a ±0,43

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

* Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

4.2.4.3. 1 mM amonyum format, 1 mM amonyum asetat

Hareketli faz A'da 1mM amonyum format ve amonyum asetat kullanımının analitlerin sinyal miktarına etkisini incelemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.8'de belirtilmiştir. Hareketli fazın pH değerleri sırasıyla 5,89 ve 6,37'dir. Analiz sonuçları incelendiğinde analitlerin pik şekillerinde ve tutulma sürelerinde önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Tüm analitler için amonyum format ilavesinde sinyal miktarının daha yüksek olduğu görülmüştür.

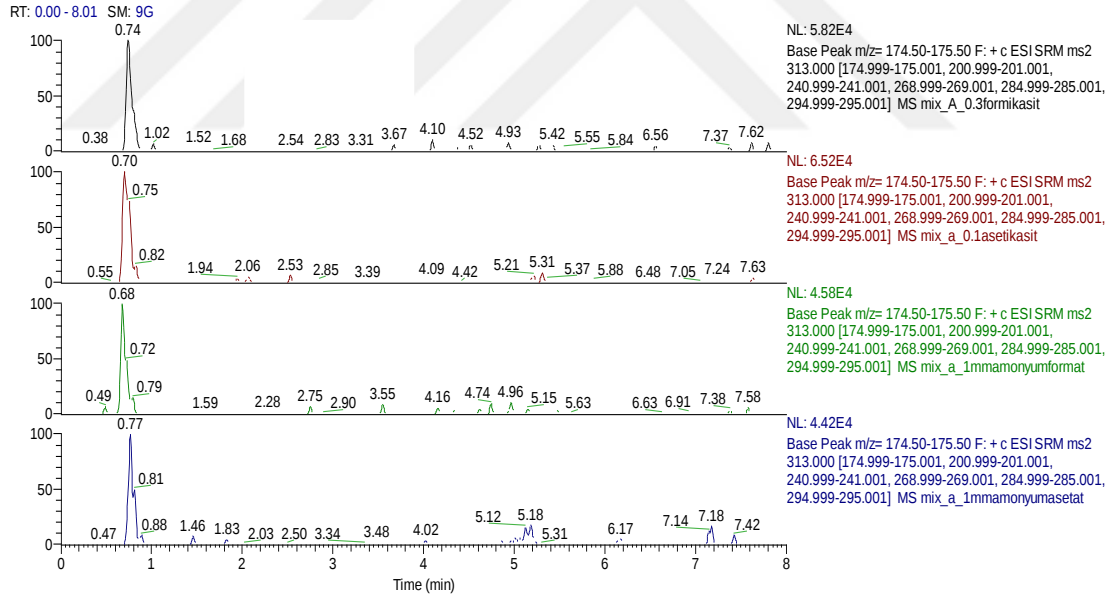
Çizelge 4.8. 1 mM Amonyum format ve amonyum asetat ilavesinin sinyal miktarına etkisi

Analit	1 mM Amonyum format	1 mM Amonyum asetat
Nivalenol	3,50E4±1,53	4,27E4±0,22
Deoksinivalenol	1,19E4±0,13	7,86E3±1,93
Fumonisin B1	7,28E5±0,35	5,77E5±0,35
Beta Zearalenol	5,73E5±0,8	2,97E5±0,03
Fumonisin B2	8,12E5±0,84	6,75E5±0,94
Okratoksin A	7,48E4±1,37	4,96E4±0,9
Zearalenol	1,54E5±0,31	6,42E4±0,03
Sterigmatosistin	8,63E5±0,7	4,56E5±1,39

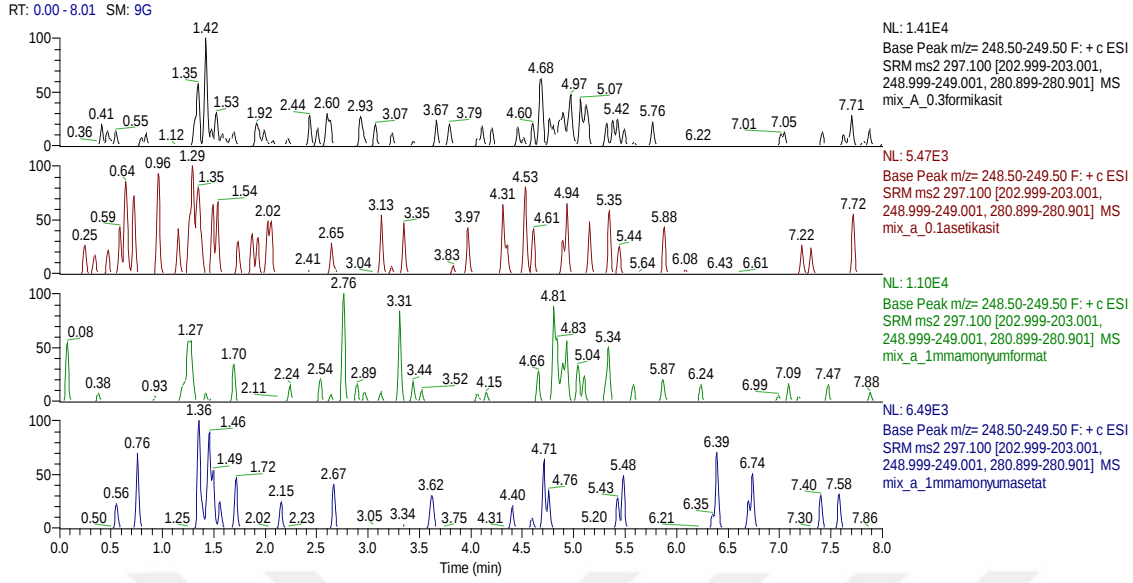
*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

4.2.4.4. Hareketli faz A'da formik, asetik asit ve amonyum format-amonyum asetat kullanımının sinyal seviyesi üzerine etkilerinin karşılaştırılması

Hareketli faz A'da formik, asetik asit ve 1 mM amonyum format ve amonyum asetat kullanımının analitlerin sinyal seviyelerine etkileri incelenmiştir. Analitlere ait kromatogramlar Şekil 4.28-4.35'de gösterilmiştir.



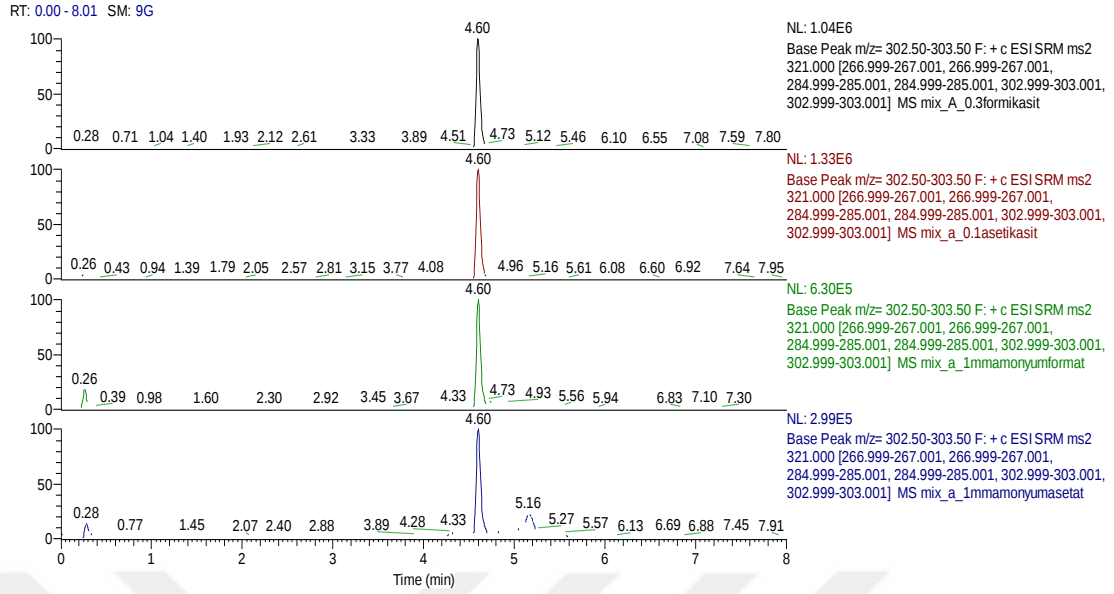
Şekil 4.28. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın nivalenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi



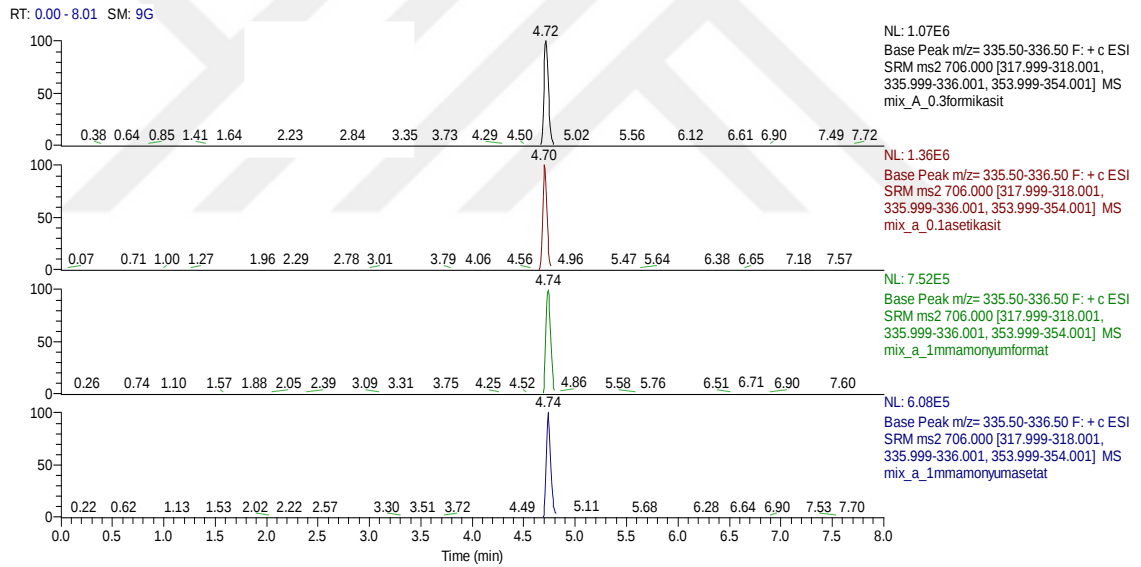
Şekil 4.29. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın deoksinivalenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi



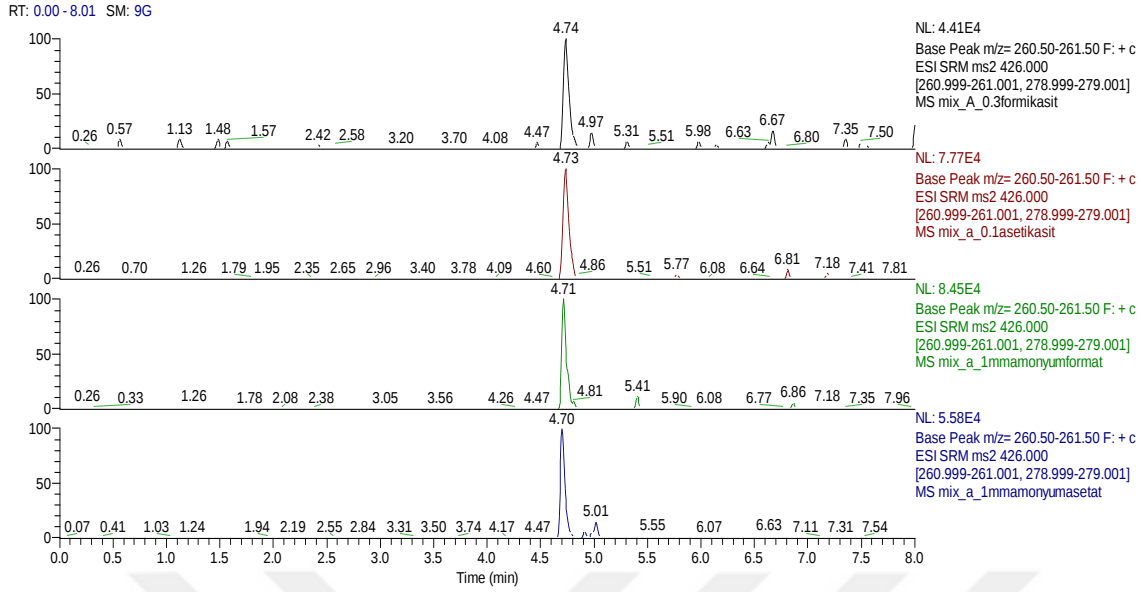
Şekil 4.30. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın fumonisin B1'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



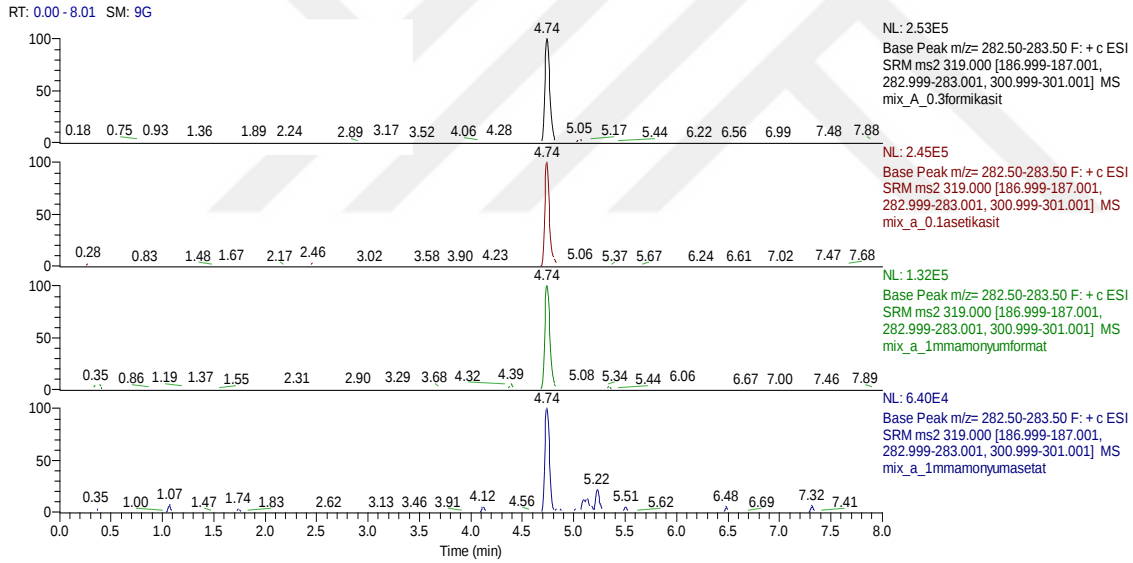
Şekil 4.31. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın beta zearalenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi



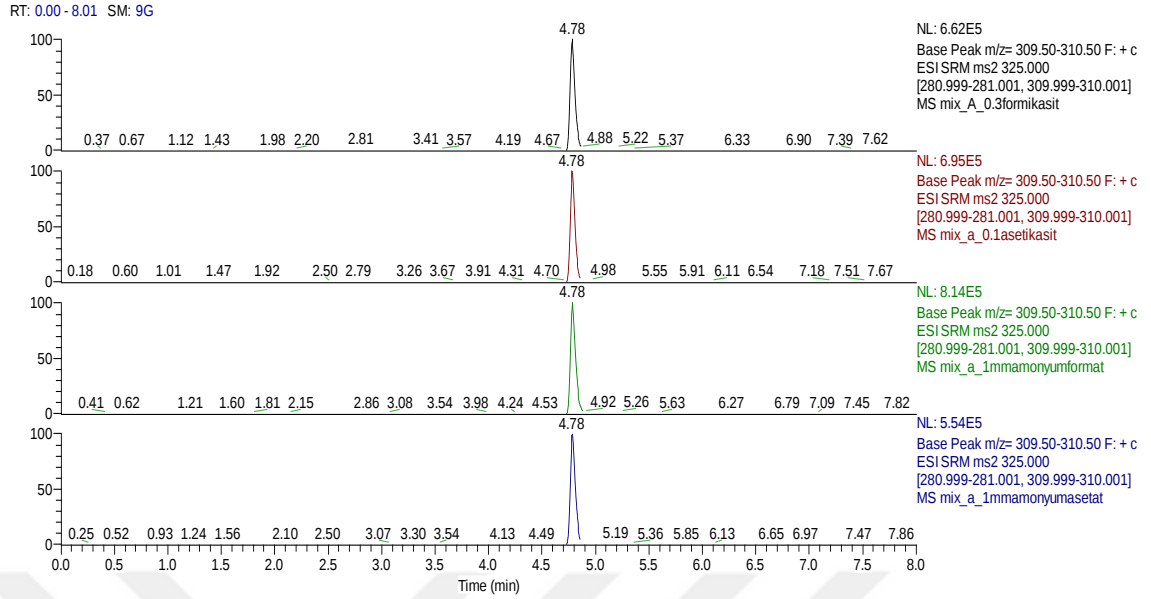
Şekil 4.32. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın fumonisins B2'nin sinyal seviyesi üzerine etkisi



Şekil 4.33. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın okratoksin A'nın sinyal seviyesi üzerine etkisi



Şekil 4.34. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın zearalenon'un sinyal seviyesi üzerine etkisi

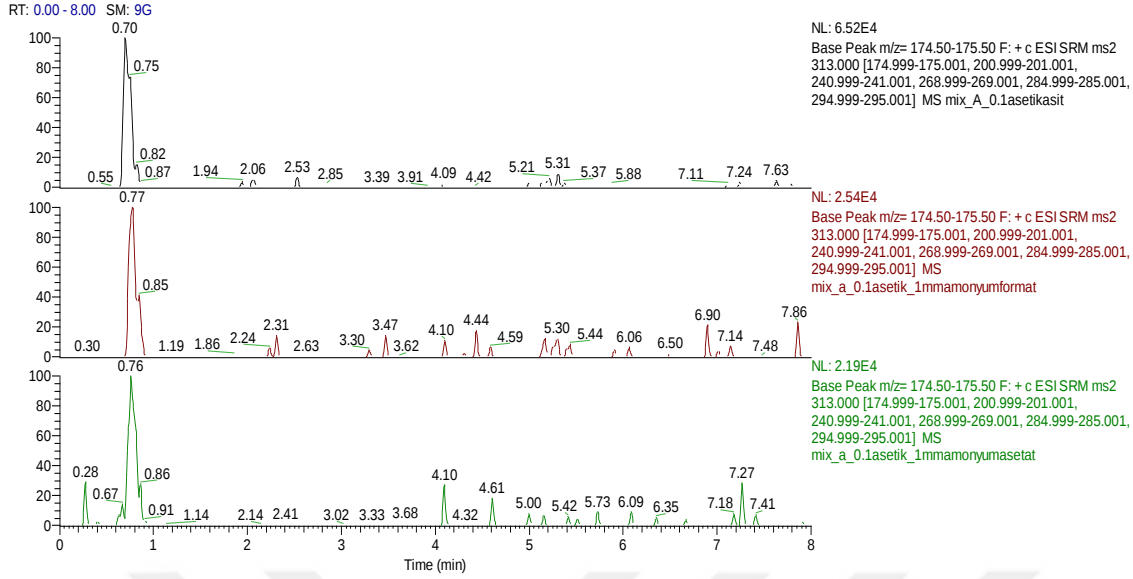


Şekil 4.35. Formik, asetik asit ve amonyum format, amonyum asetatın sterigmatocystin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi

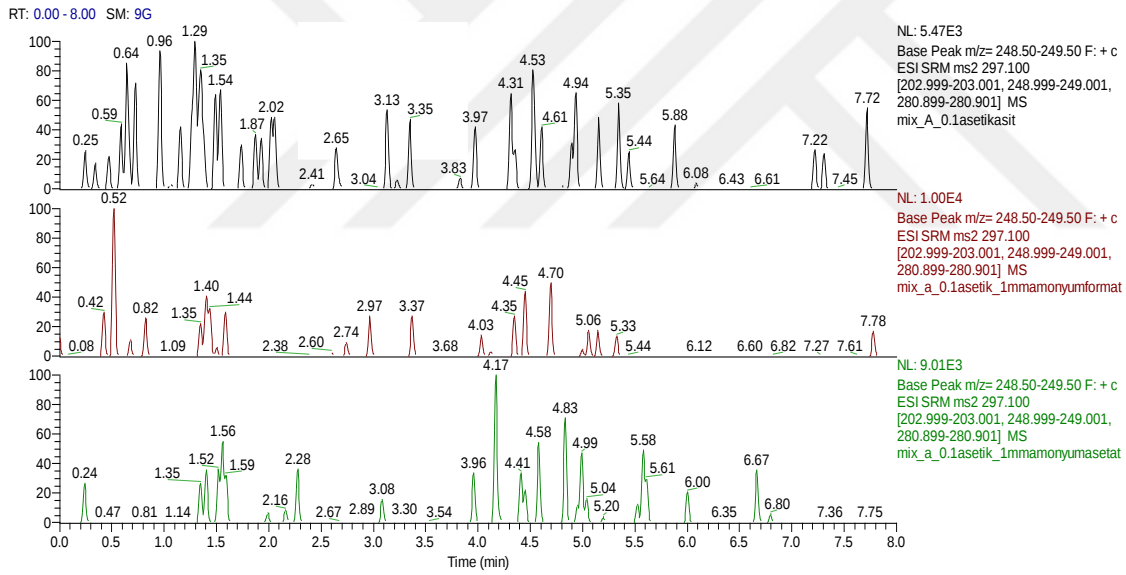
Elde edilen sonuçlara göre, analitlerden NIV, FB1, beta-ZOL ve FB2'nin en yüksek sinyal miktarı asetik asit kullanıldığında elde edilmiştir. Tüm analitler birlikte değerlendirildiğinde % 0,1 asetik asit ilavesinin iyonlaşmada daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

4.2.5. Hareketli faz B (%0,2 asetik asit/MeOH, pH: 3,70) sabit tutularak A fazında (% 0,1 asetik asit/su) asetik asit ile birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının analiz sonuçlarına etkisi

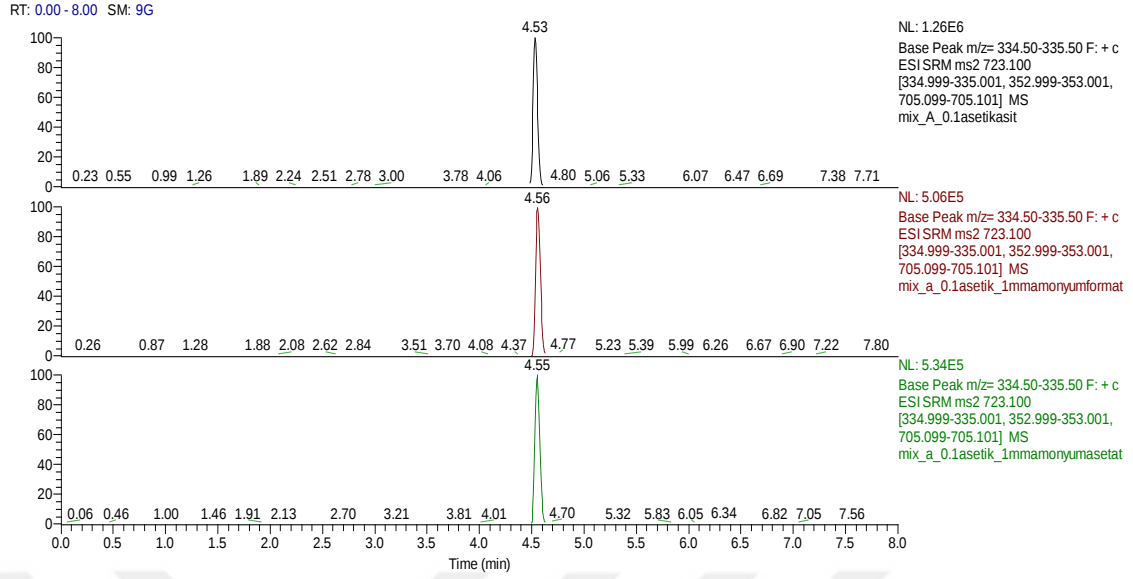
Hareketli faz A'da asetik aside ilave olarak 1 mM amonyum format ve amonyum asetat kullanımının analitlerin sinyal miktarına etkisini incelemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Şekil 4.36-4.43'de belirtilmiştir. Hareketli fazın pH değerleri sırasıyla 3,22, 3,86 ve 4,86'dır. Analiz sonuçları incelendiğinde DON hariç diğer analitlerin pik şekillerinde ve tutulma sürelerinde önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Elde edilen sonuçlara göre, ilave olarak amonyum format veya amonyum asetat kullanımının NIV, FB1, beta-ZOL, FB2 ve ZEN'in sinyal miktarında artışa neden olmadığı, en yüksek sinyal miktarının asetik asit yalnız başına kullanıldığında elde edildiği tespit edilmiştir. Bu nedenle A fazında %0,1 asetik asit kullanılması uygun görülmüştür.



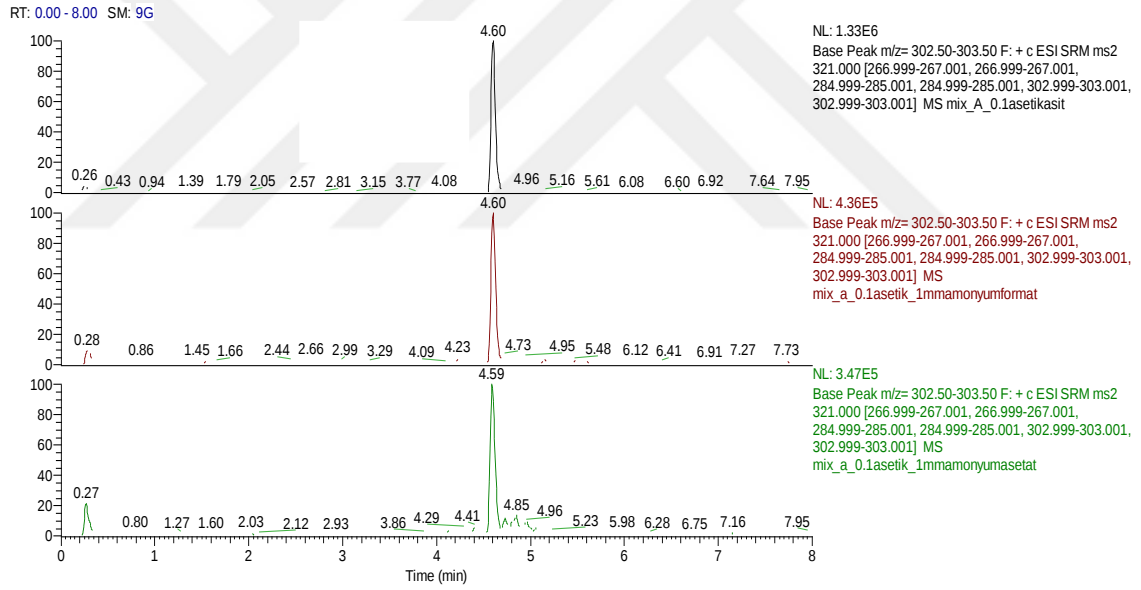
Şekil 4.36. % 0,1 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının nivalenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi



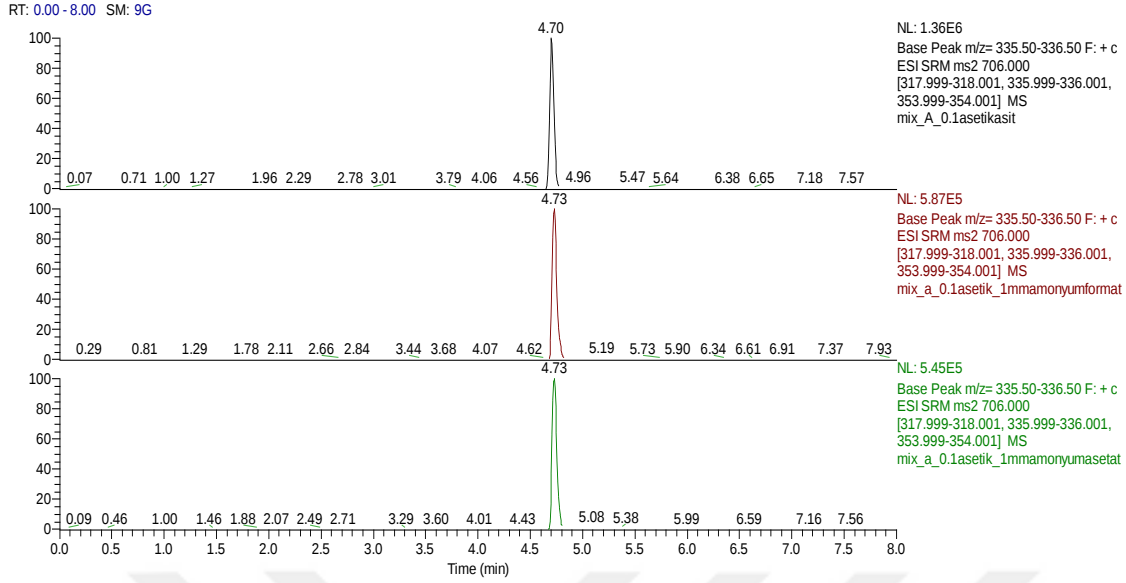
Şekil 4.37. % 0,1 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının deksinivalenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi



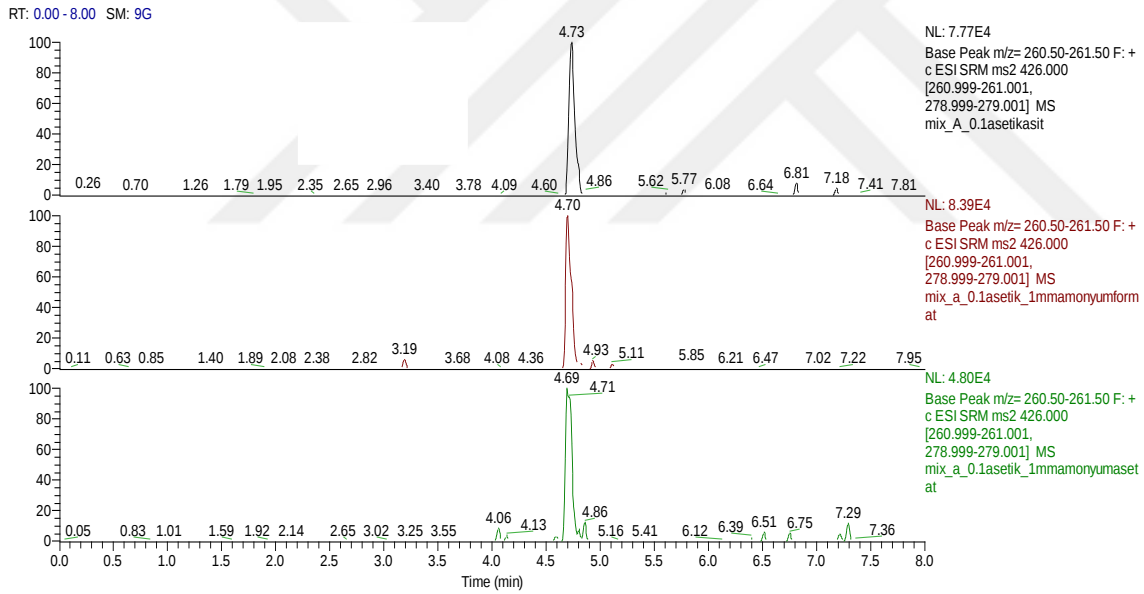
Şekil 4.38. % 0,1 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının fumonisin B1'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



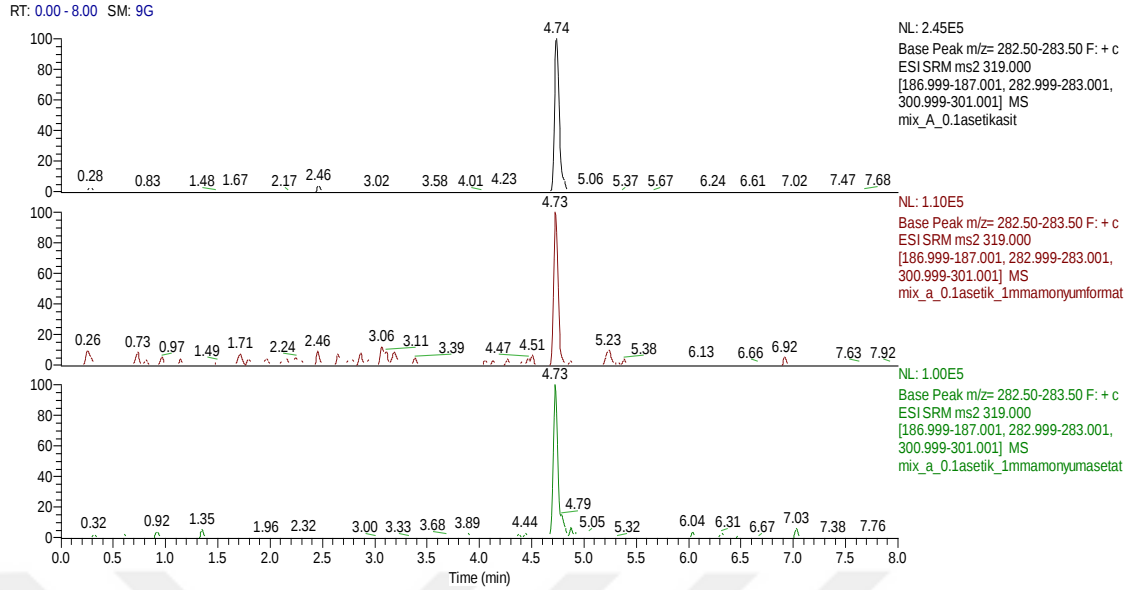
Şekil 4.39. % 0,1 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının beta zearealenol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi



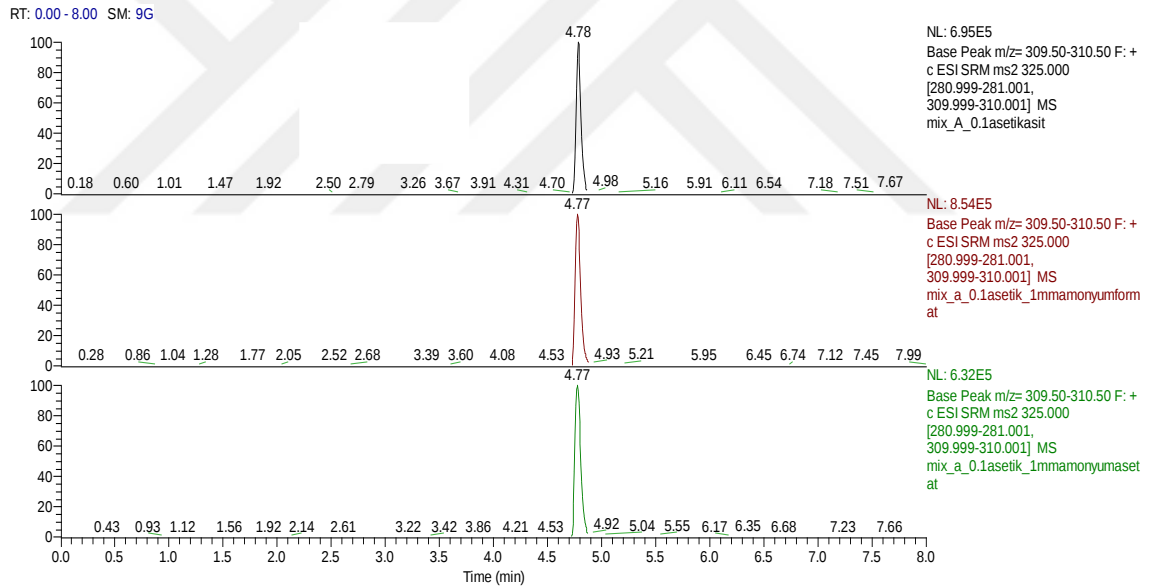
Şekil 4.40. % 0,1 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının fumonisin B2'nin sinyal seviyesi üzerine etkisi



Şekil 4.41. % 0,1 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının okratoksin A'nın sinyal seviyesi üzerine etkisi



Şekil 4.42. % 0,1 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının zearalenon'un sinyal seviyesi üzerine etkisi

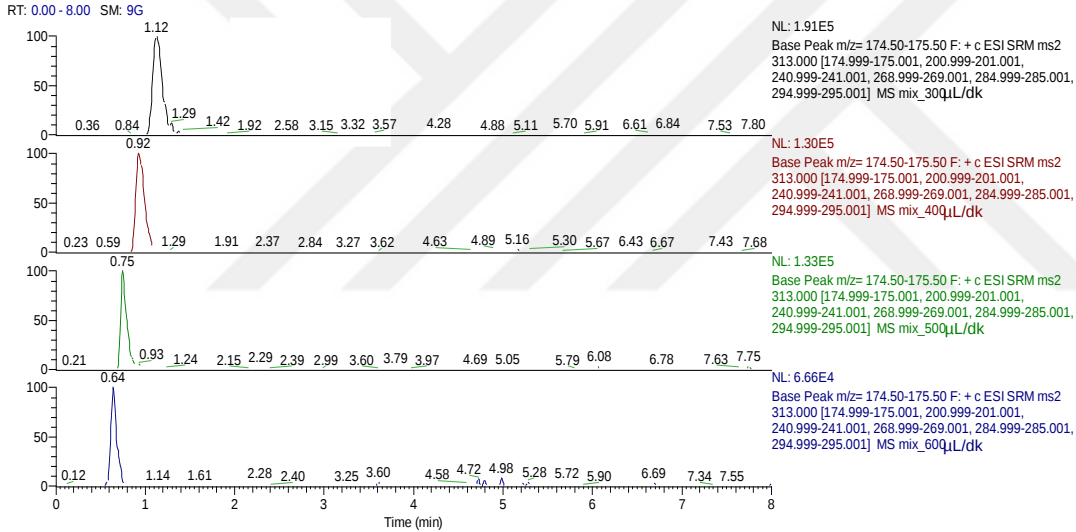


Şekil 4.43. % 0,1 asetik asitle birlikte 1 mM amonyum format ve 1 mM amonyum asetat kullanımının sterigmatocystin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi

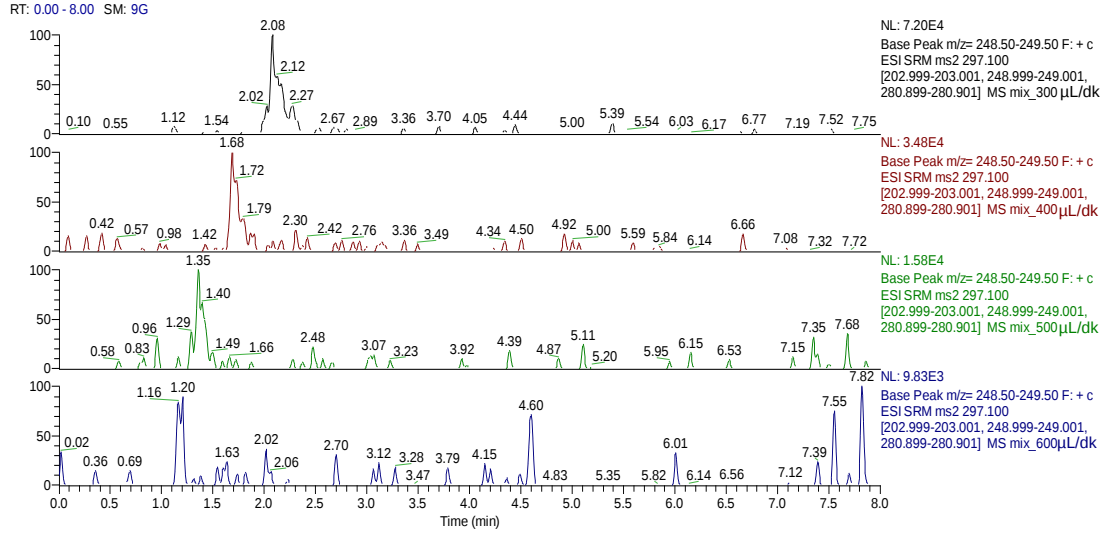
4.2.6. Akış hızını belirlemek için yapılan analizlerin sonuçları

Çalışma kapsamında kullanılan her bir mikotoksinin farklı akış hızlarında (0,3, 0,4, 0,5 ve 0,6 mL/dk) belirlenen sinyal miktarları ve pik şekilleri tespit edilmiştir. Literatürde genel olarak iyonizasyon veriminin akış hızı düştükçe arttığı belirtilmektedir. Bu artışın başlıca nedeni ise düşük akış hızında spreyde daha küçük yüklü damlacıkların oluşmasıdır. Bu damlacıklardan çözgenin uzaklaşması daha kolay olduğu için analizöre giren yüklü partiküllerin miktarı artmaktadır (Page vd. 2007). Yapılan bu çalışmada analitlerin sinyal miktarının yüksek akış hızında (0,6 mL/dk) düştüğü tespit edilmiştir.

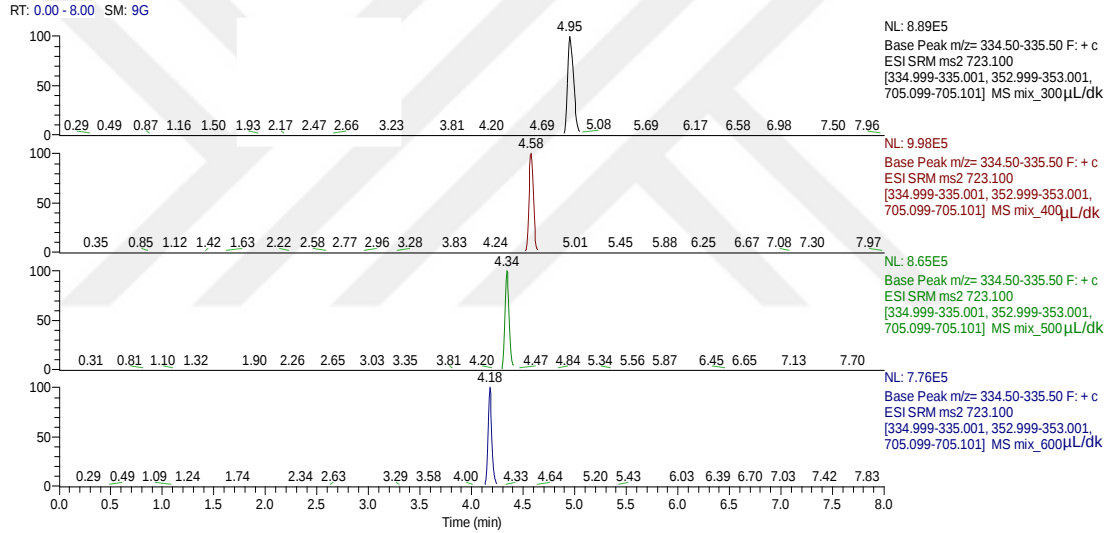
Akış hızı aynı zamanda analitlerin kolonda etkili bir şekilde ayrımı ve keskin pik şekillerinin elde edilmesi açısından da önemlidir. Pik şeklinin düzgün olması miktar belirleme çalışmalarında dikkate alınmaktadır. Kromatografide ideal koşullarda pik şekilleri genellikle Gaussian eğrilerine benzemektedir ve simetriktir. Ancak çalışma sırasında birçok pikin önünde (fronting) genişleme veya arkasında kuyruk (tailing) oluşumundan dolayı simetrik olmadığı gözlemlenmiştir. Kolonda meydana gelen bant genişlemesi analitlerin kolonda kalma süresi ve hareketli fazın akış hızı ile bağlantılıdır. Pikin arkasında oluşan kuyruk analitin sabit faz ile arasındaki adsorpsiyon, önünde oluşan genişleme ise kolonun fazla yüklenmesi veya analitin kolondaki kimyasal reaksiyonu sonucunda oluşmaktadır (Dong 2006). Şekil 4.44-4.51 incelendiğinde düşük akış hızlarında (0,3 ve 0,4 mL/dk) özellikle nivalenol ve deoksinivalenol analitlerinde piklerin önünde genişleme veya arkasında kuyruk oluşumu belirlenmiştir. Düşük akış hızlarında bu analitlerin piklerinin geniş olması sabit faz ile daha fazla etkileşime girdiklerini göstermektedir. Sonuçlar incelendiğinde 0,5 mL/dk akış hızının hem analitlerin vermiş olduğu sinyal miktarı hem de pik şekilleri açısından en iyi sonucu verdiği tespit edilmiştir.



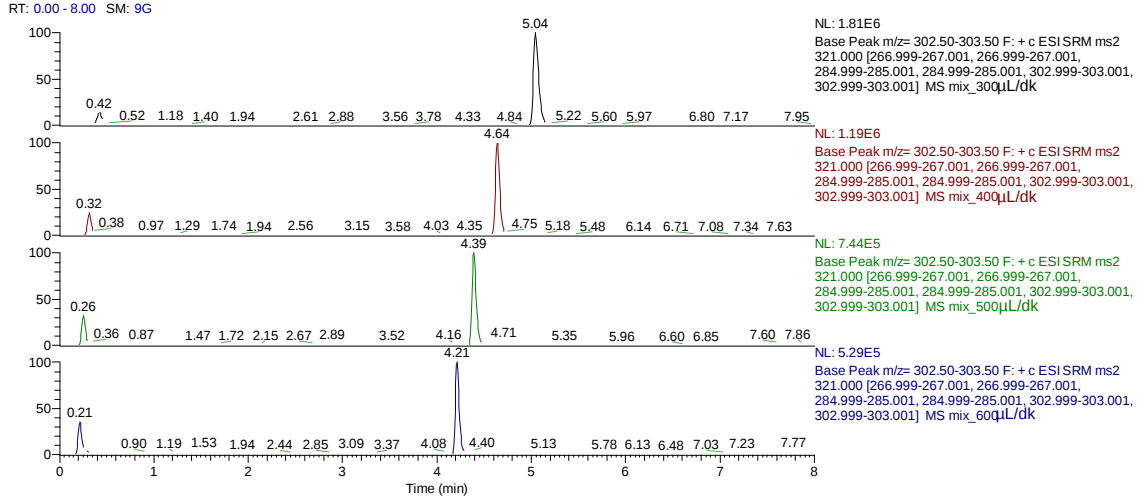
Şekil 4.44. Nivalenol için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar



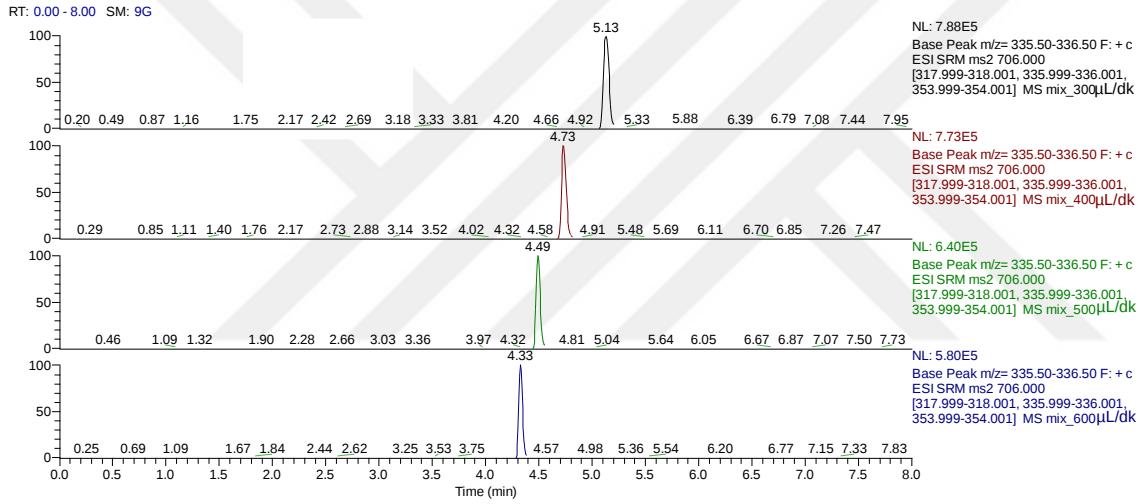
Şekil 4.45. Deoksinivalenol için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar



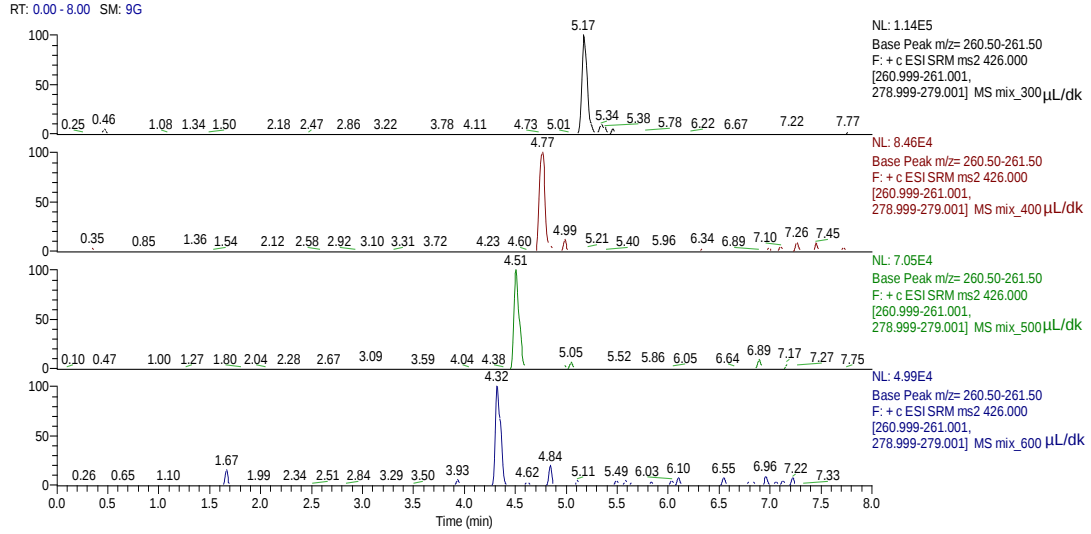
Şekil 4.46. Fumonisin B1 için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar



Şekil 4.47. Beta Zearalenol için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar



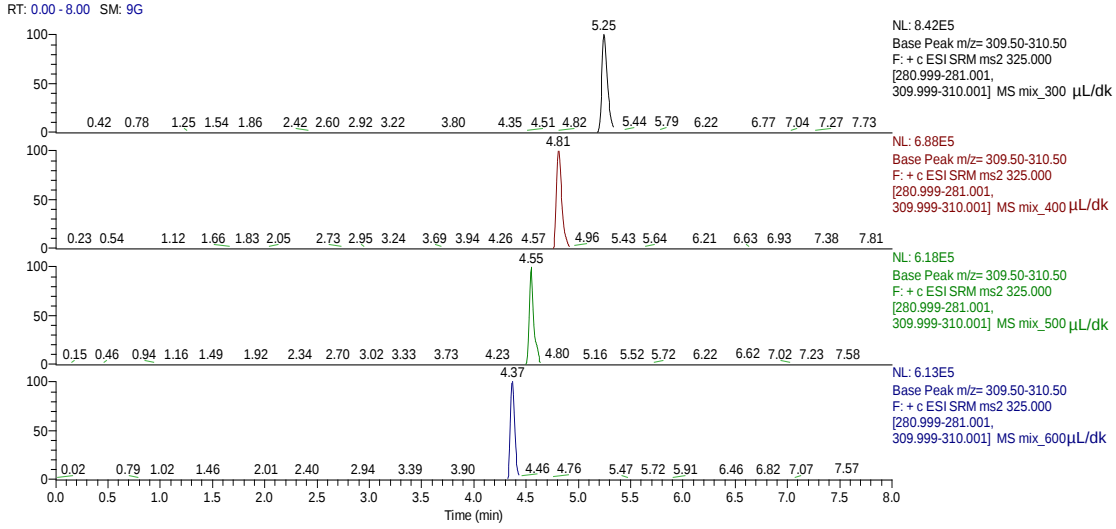
Şekil 4.48. Fumonisin B2 için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar



Şekil 4.49. Okratoksin A için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar



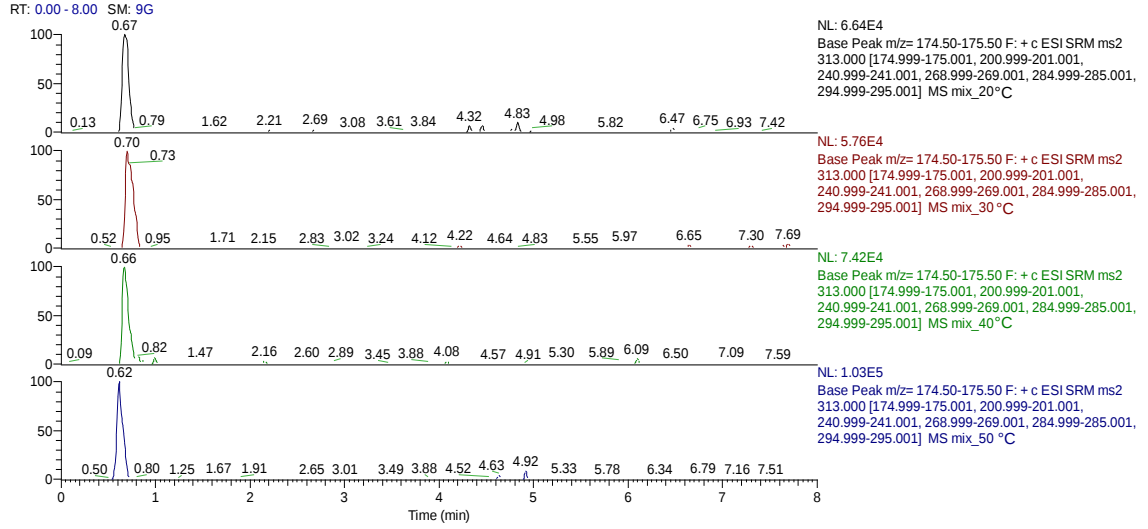
Şekil 4.50. Zearalenon için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar



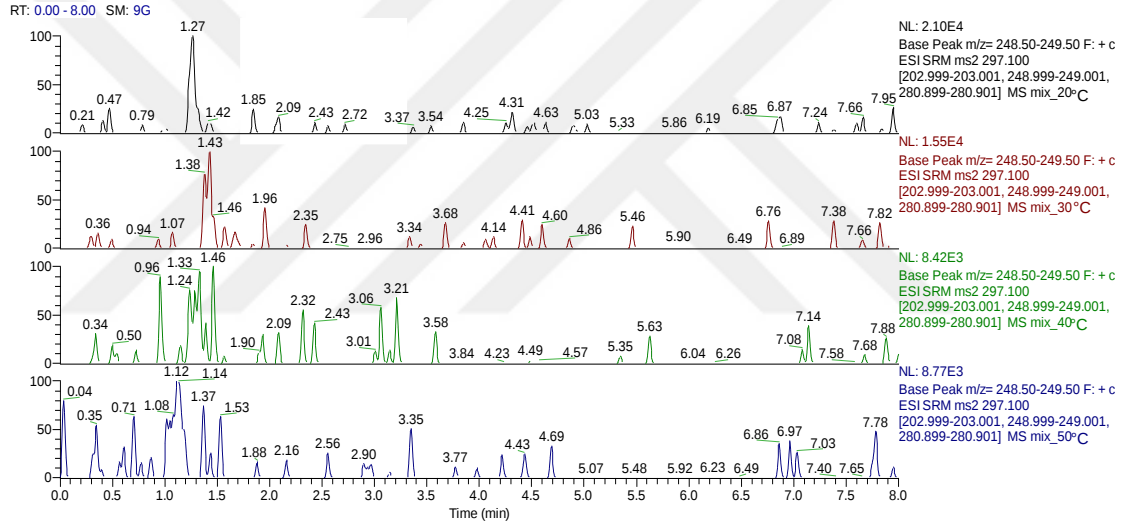
Şekil 4.51. Sterigmatosistin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar

4.2.7. Kolon sıcaklığını belirlemek için yapılan analizlerin sonuçları

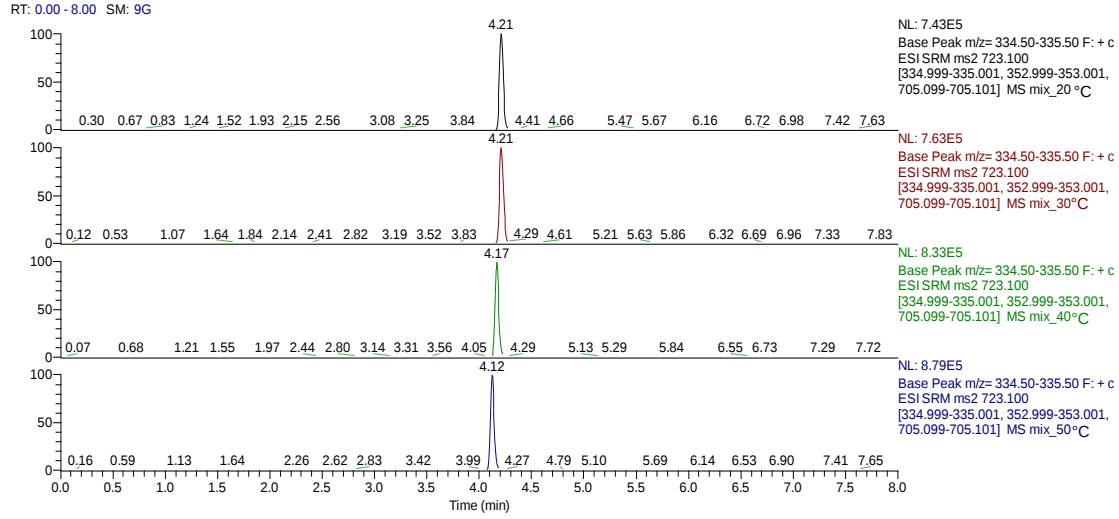
Hareketli faz akış hızı 0,5 mL/dk olarak belirlendikten sonra farklı kolon sıcaklıklarının (20, 30, 40 ve 50 °C) sinyal miktarı ve pik şekli üzerine etkisi incelenmiştir. Kolon sıcaklığı analit ile durgun faz arasındaki etkileşimi, hareketli fazın viskozitesini ve durgun faz yapısının hareketli faz içerisinde çözünmesini etkilediğinden kromatografik ayrımlar üzerine doğrudan etki etmektedir. HPLC'de yüksek sıcaklığın kullanılması, UHPLC daha küçük partiküllerin kullanılmasıyla benzer olarak daha iyi performans ve daha kısa analiz süresi sağlamaktadır. Kolon sıcaklığı arttığında, kromatografik ayırma işlemi daha hızlı hale gelir ve genel olarak daha fazla verim elde edilmektedir. Ancak kromatografik analizde yüksek sıcaklıkların kullanılması sıcaklığa duyarlı bileşiklerin yapısının olumsuz etkilenmesine neden olduğu gibi hareketli fazda baloncuk oluşumuna ve kromatogramda hayalet veya negatif piklerin görünmesine de neden olmaktadır. Bunlara ilaveten sıcaklık artışı pik çözünürlüğünü düşürmektedir. Ayrıca 50 veya 60 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda sabit fazın yapısında çözünmeler olabilmekte ve buna bağlı olarak kolonun kullanım ömrü azalmaktadır. Sonuç olarak, LC'de uygun bir kolon sıcaklığı kontrolü, önemli pik çiftlerinin çözünürlüğü veya bireysel örnek bileşiklerinin tutunma sürelerine göre tanımlanması açısından gereklidir (Kromidas 2000; Heidorn 2016). Şekil 4.52-4.59 incelendiğinde sıcaklık artışının genel olarak analitlerin sinyal miktarını arttırdığı ancak deoksinivalenol analitinin kromatogramdaki pik şekillerinin 40 °C'de ve üzerinde bozulduğu ve sinyal seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.53). Kolon sıcaklığının artışı analitlerin elüsyonunu hızlandırmasına rağmen ayırma etkinliğinin düşmesine neden olmuştur. Analiz sonuçları incelendiğinde 30 °C sıcaklıkta yapılan analizlerin hem sinyal miktarı hem de pik şekli açısından en iyi sonuçları verdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle 30 °C sıcaklıkta analizlere devam edilmiştir.



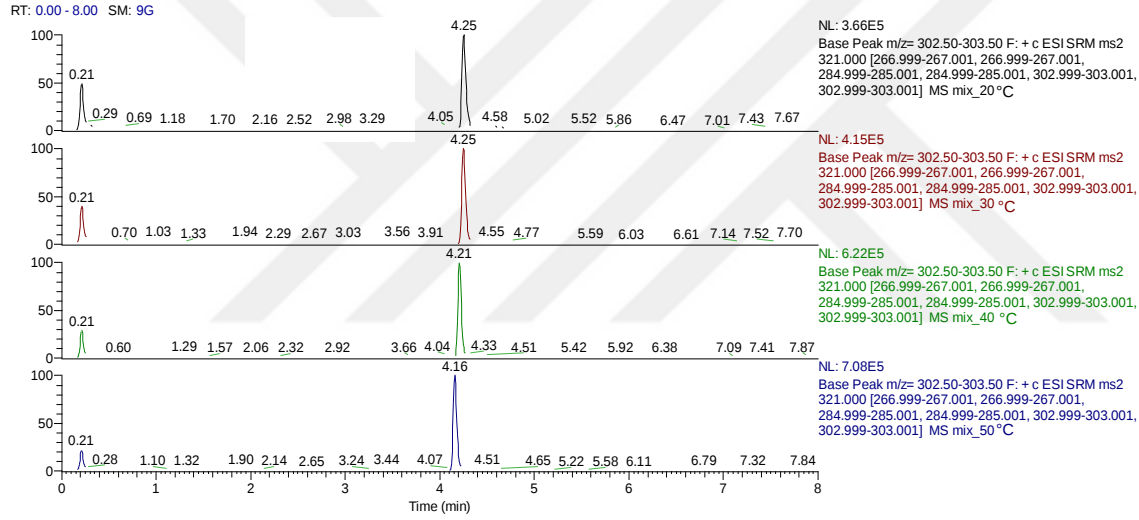
Şekil 4.52. Nivalenol için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar



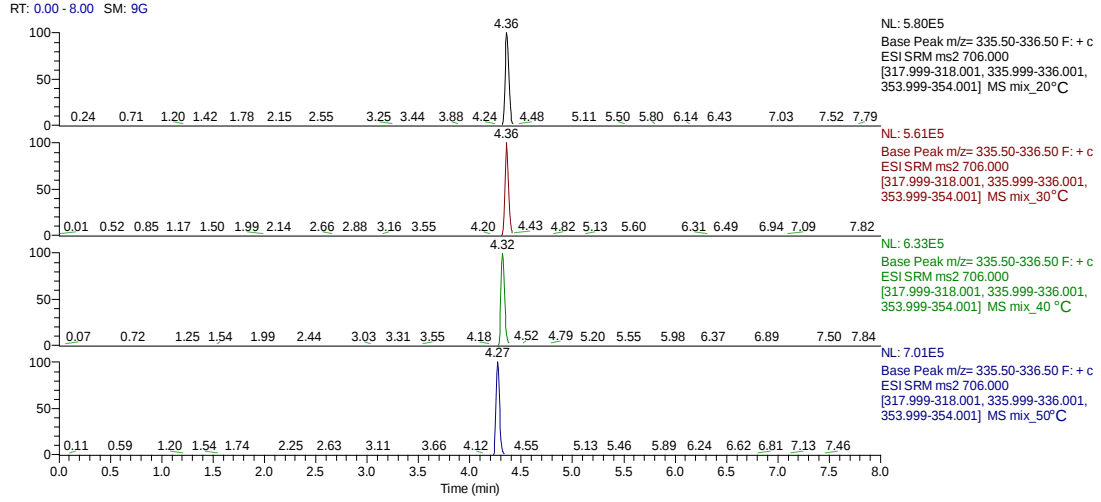
Şekil 4.53. Deoksinivalenol için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar



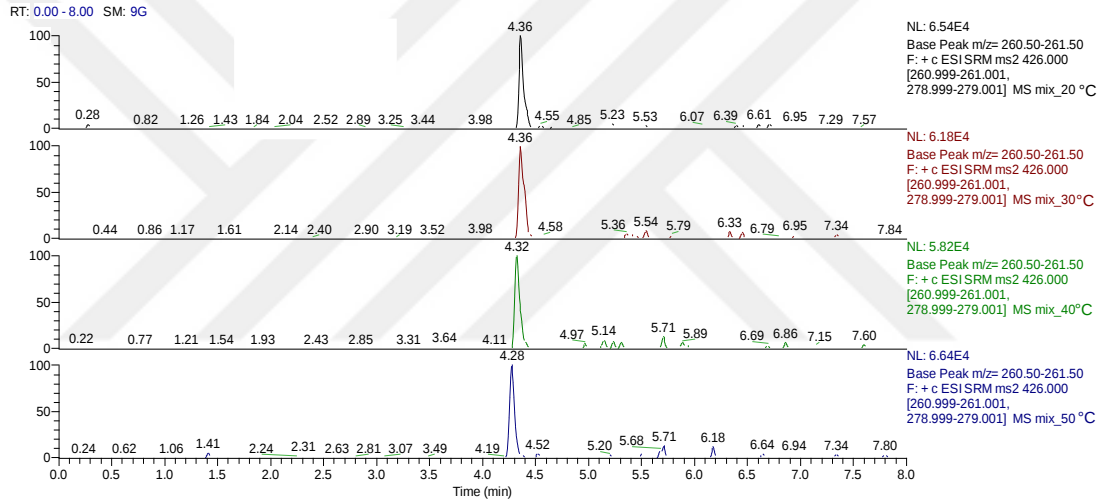
Şekil 4.54. Fumonisin B1 için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar



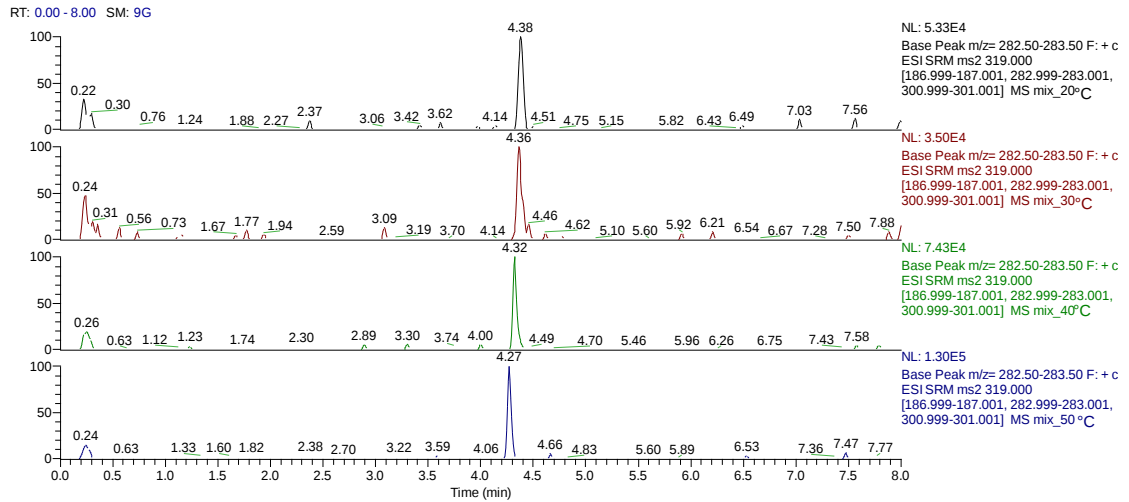
Şekil 4.55. Beta Zearalenol için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar



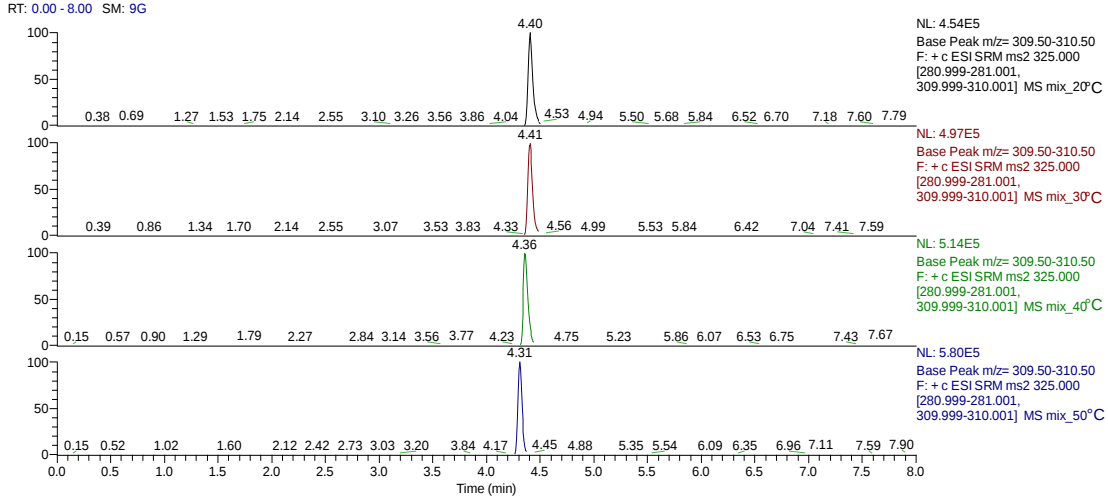
Şekil 4.56. Fumonisin B2 için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar



Şekil 4.57. Okratoksin A için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar



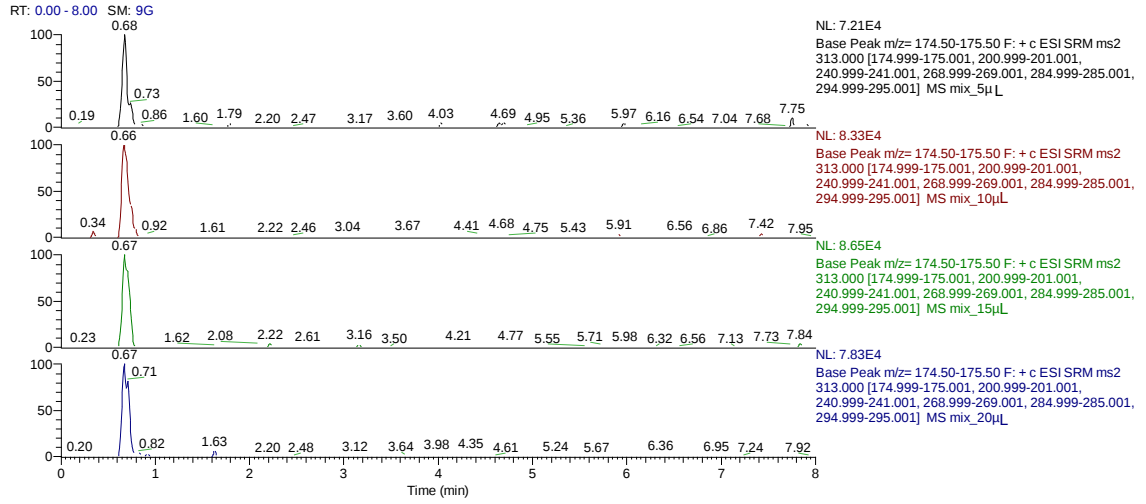
Şekil 4.58. Zearalenon için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar



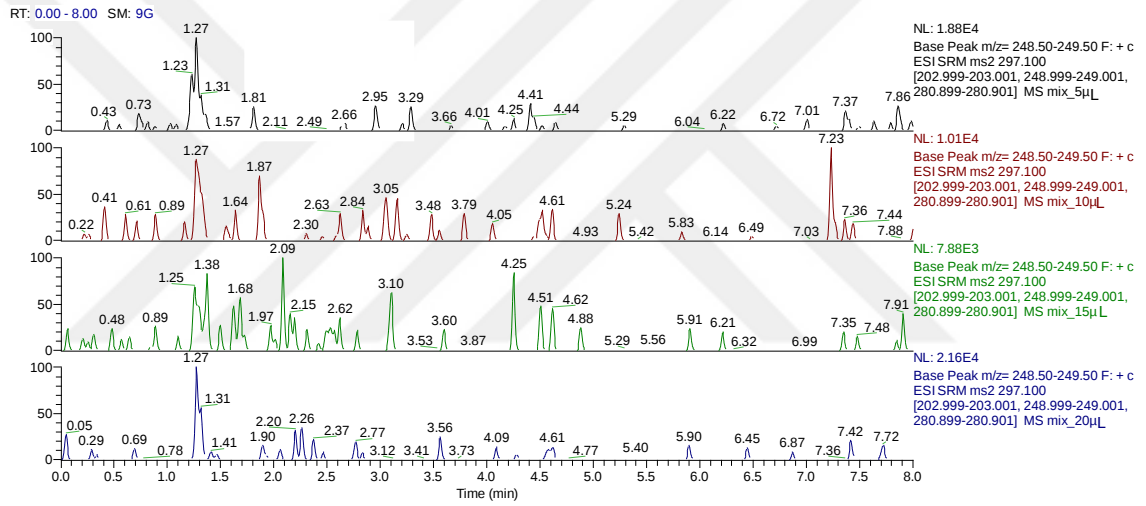
Şekil 4.59. Sterigmatosistin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar

4.2.8. Enjeksiyon hacmini belirlemek için yapılan analizlerin sonuçları

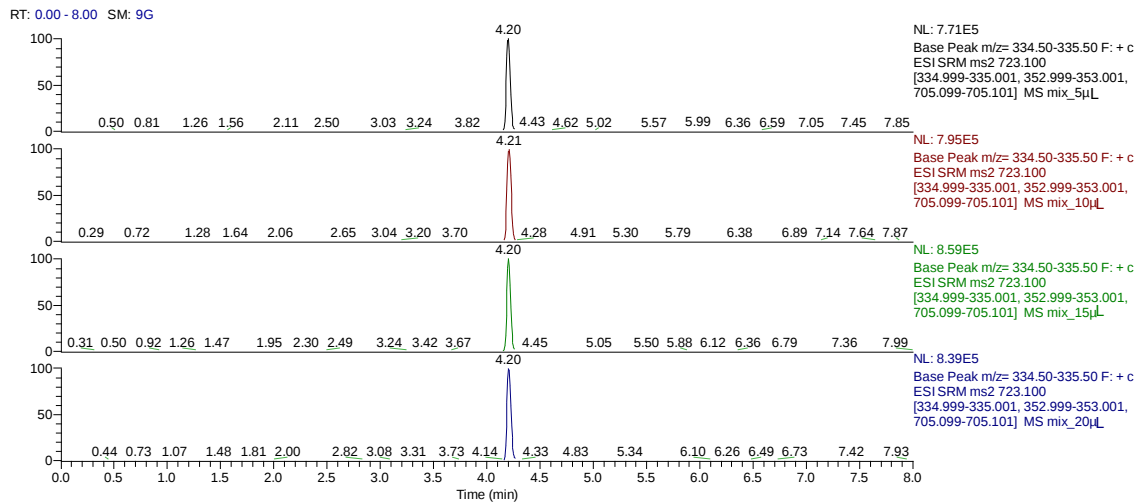
0,5 mL/dk akış hızı ve 30 °C kolon sıcaklığı seçildikten sonra enjeksiyon hacminin (5, 10, 15 ve 20 µL) analitlerin pik şekli üzerine etkisi incelenmiştir. Kromatografik ayrımlarda kolona enjekte edilen miktar bant genişlemesi, pikin önünde genişleme veya arkasında kuyruk oluşumu açısından önemlidir. Gereğinden fazla örnek hacminin kullanılması sonucunda pikler genişlemekte ve asimetric olmaktadır; aynı zamanda analitlerin tespit zamanı değişmektedir (Meyer 2010). Şekil 4.60-4.67 incelendiğinde enjeksiyon hacmi arttıkça DON analitinin kromatogramında pik şekillerinde bozulmalar ve tespit zamanlarında değişimler belirlenmiştir. Ayrıca ZEN ve STE kromatogramlarında 10 µL'den sonra sinyal seviyelerinde azalma görülmektedir. (Şekil 4.66-4.67). Enjeksiyon hacminin 10 µL seçilmesi hem pik şekilleri hem de buna bağlı olarak miktar tayininde doğru sonuçların elde edilmesi açısından önemlidir. Analitlerin düşük enjeksiyon hacminde de oldukça yüksek sinyal değerlerine ulaşması fazla örnek miktarının kullanılmasını önlemektedir. Bu durum aynı zamanda kütle spektrometresinde analizörde oluşacak kirliliğin azaltılması açısından da önemlidir.



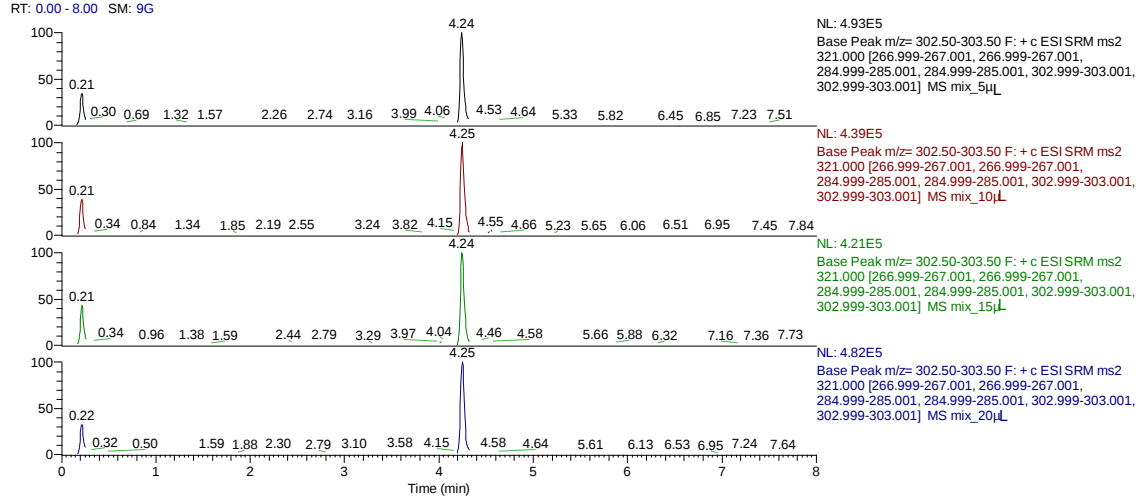
Şekil 4.60. Nivalenol için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar



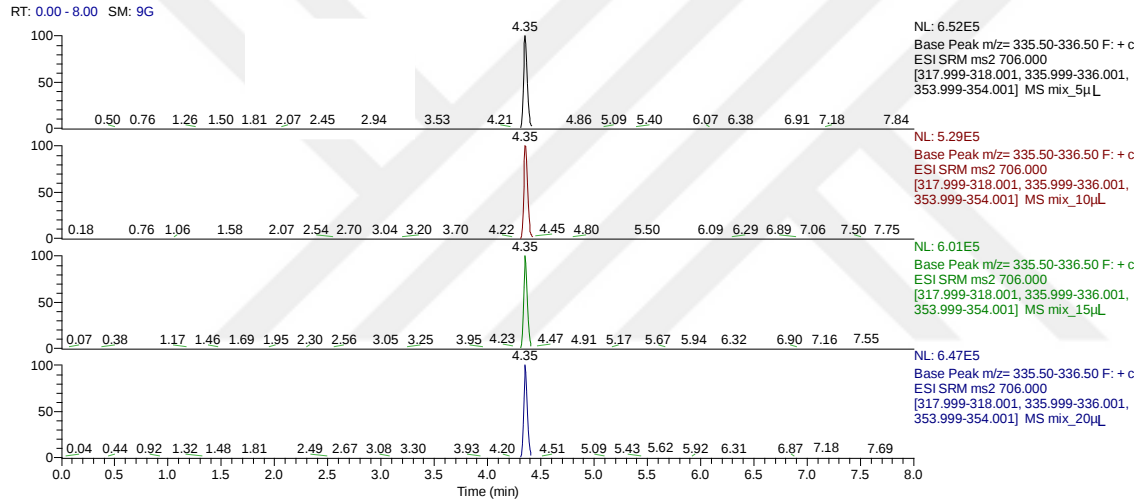
Şekil 4.61. Deoksinivalenol için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar



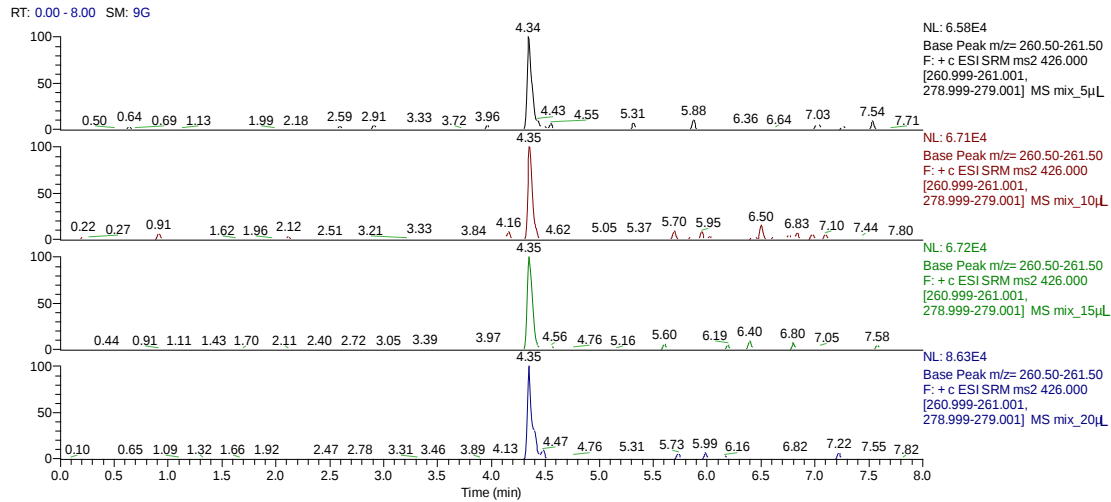
Şekil 4.62. Fumonisin B1 için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar



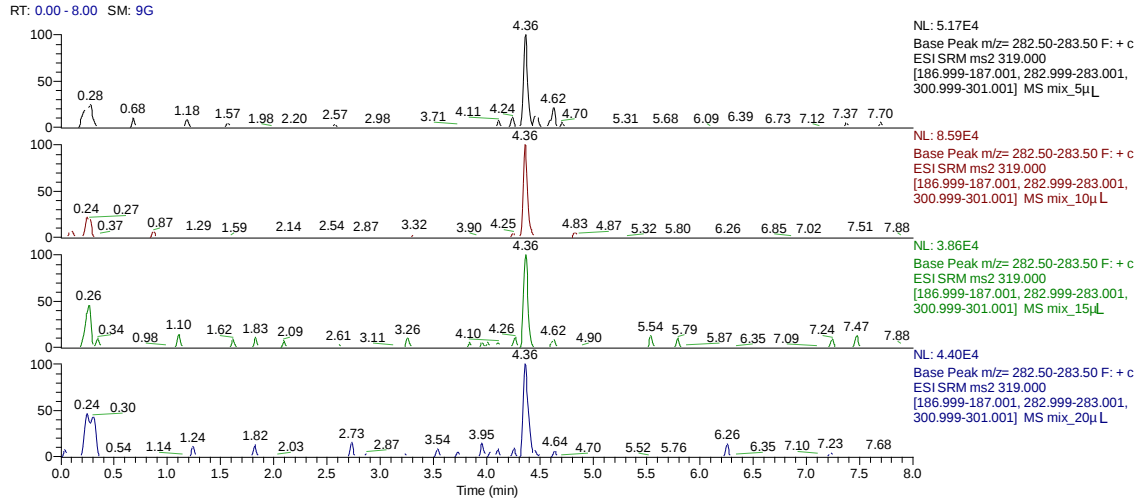
Şekil 4.63. Beta Zearalenol için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar



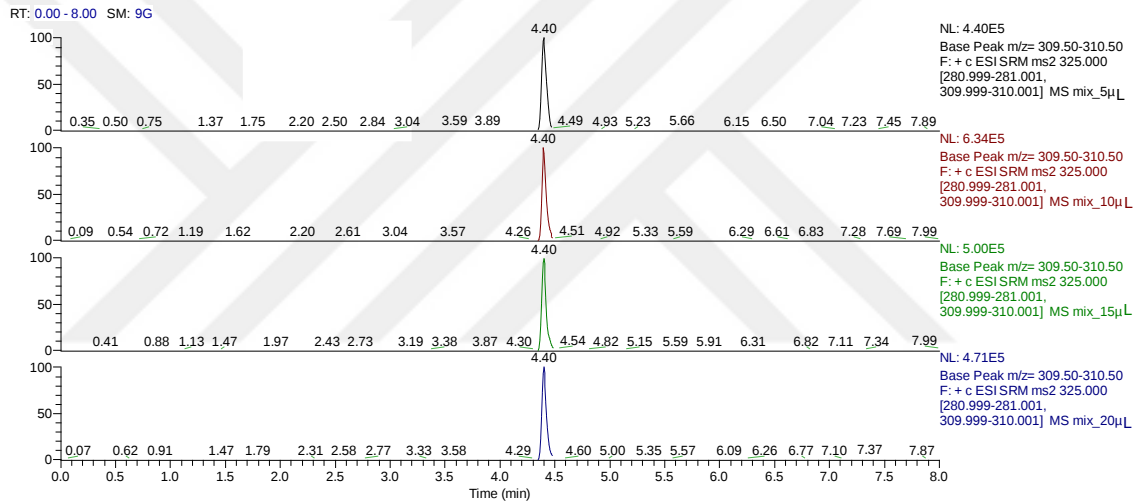
Şekil 4.64. Fumonisin B2 için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar



Şekil 4.65. Okratoksin A için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar



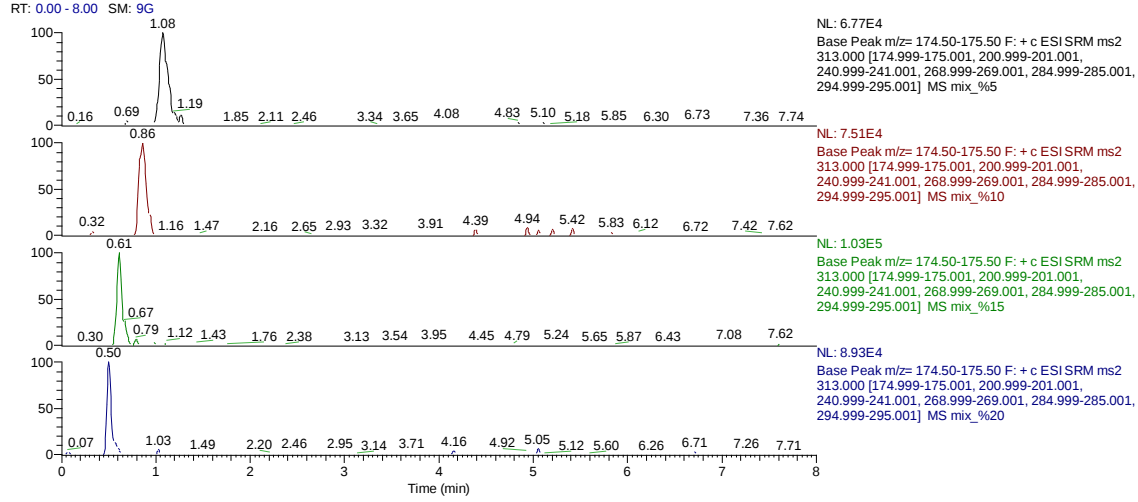
Şekil 4.66. Zearalenon için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar



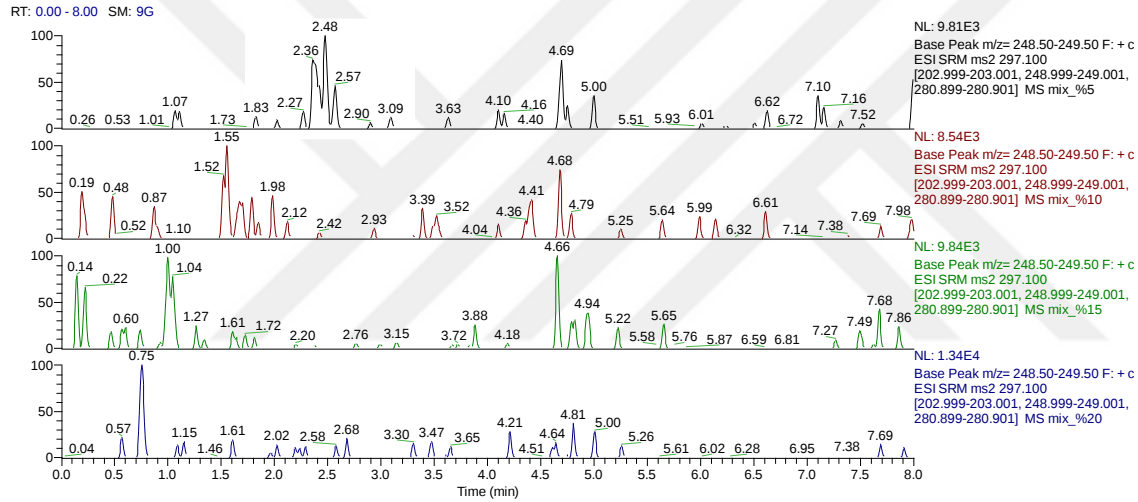
Şekil 4.67. Sterigmatosistin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar

4.2.9. Gradient denemeleri

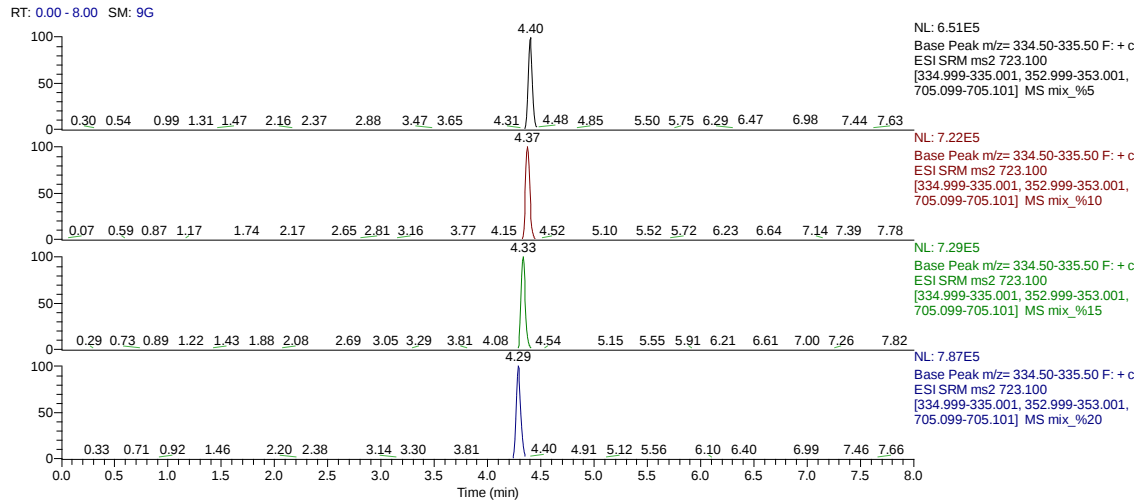
Bu çalışmada %5'den %20'ye değişen oranlarda (%5, %10, %15 ve %20) başlangıç mobil faz B denemeleri yapılmıştır. Şekil 4.68-4.75 incelendiğinde analitlerin çoğunda artan metanol oranıyla birlikte pik şekli ve sinyal seviyesinde artış gözlenmiştir. Özellikle DON için %20 metanol başlangıç değerinde en iyi pik şekli ve sinyal seviyesi elde edilmiştir (Şekil 4.69). Tüm analitler için pik şekli, sinyal seviyeleri ve alıkonma zamanları göz önünde bulundurularak %20 metanol başlangıç oranı seçilmiştir. Frenich vd. (2009) tarafından yapılan çoklu mikotoksin analizinde de benzer şekilde başlangıç metanol seviyesi arttıkça pik şeklinin ve duyarlılığın arttığı, analiz süresinin kısaldığı ancak %40 metanol başlangıç değerinde ise pik şekillerinin kötüleştiği belirtilmektedir.



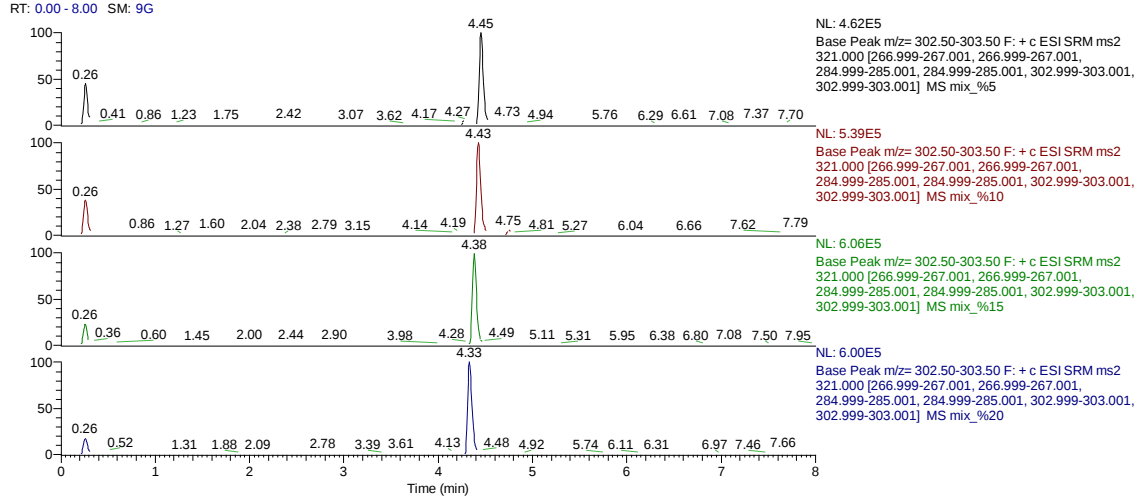
Şekil 4.68. Nivalenol için farklı gradiyente ait kromatogramlar



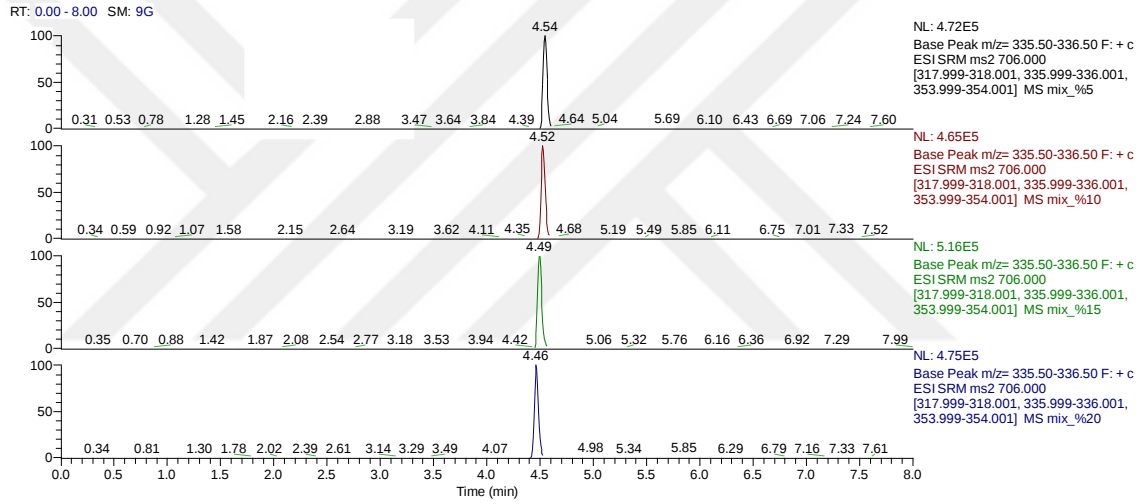
Şekil 4.69. Deoksinivalenol için farklı gradiyente ait kromatogramlar



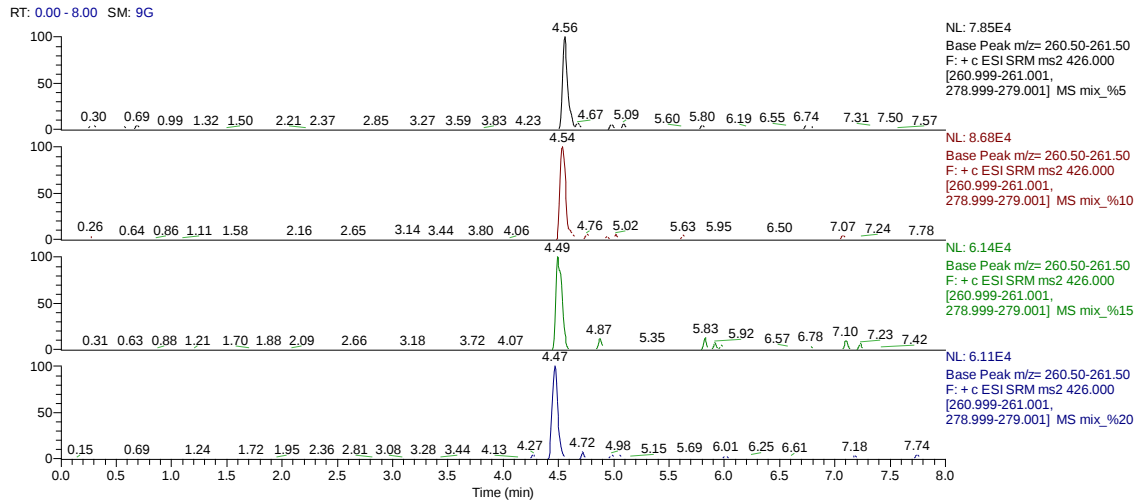
Şekil 4.70. Fumonisin B1 için farklı gradiyente ait kromatogramlar



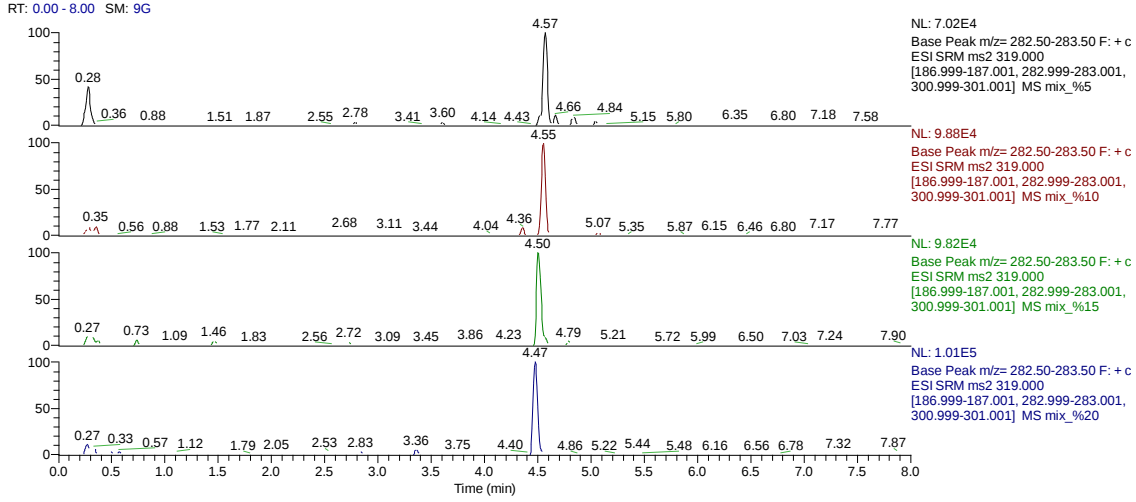
Şekil 4.71. Beta Zearalenol için farklı gradiyente ait kromatogramlar



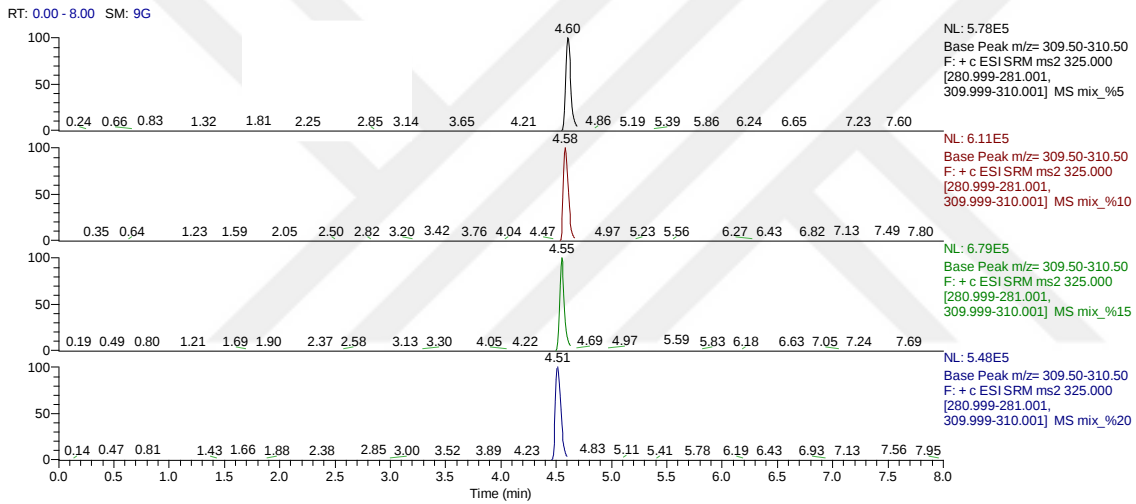
Şekil 4.72. Fumonisin B2 için farklı gradiyente ait kromatogramlar



Şekil 4.73. Okratoksin A için farklı gradiyente ait kromatogramlar



Şekil 4.74. Zearalenon için farklı gradiyente ait kromatogramlar



Şekil 4.75. Sterigmatosistin için farklı gradiyente ait kromatogramlar

4.2.10. UHPLC’de oluşturulan analiz metodu

Yapılan analizler sonucunda analitlerin pik şekilleri ve sinyal miktarları açısından en uygun hareketli faz bileşimlerinin aşağıda belirtilen şekilde olmasına karar verilmiştir. Bu koşullarda en uygun kolon akış hızının 500 µL/dk, kolon sıcaklığının 30°C ve enjeksiyon hacminin 10 µL olduğu tespit edilmiştir.

Hareketli faz (A): % 0,1 asetik asit/su

Hareketli faz (B): % 0,2 asetik asit /MeOH

Analiz süresi 8 dakikadır, ancak ilk 4,6 dakikasında tüm analitler tespit edilmiştir. Sonraki 6. dakikaya kadar sürede kolondan %100 organik faz akıtılarak kolonun temizlenmesi amaçlanmıştır. Son 2 dakikalık sürede de hareketli fazların analiz başlangıç oranları kolondan akıtılarak kolonun bir sonraki enjeksiyon için şartlanması sağlanmıştır.

4.3. HESI Parametrelerinin Belirlenmesi

UHPLC cihazında analitlerin daha yüksek pik alanı verdiği, daha iyi pik şekli ve ayırım gösterdiği metot belirlendikten sonra kütle spektrometresi kısmındaki parametrelerin belirlenmesine geçilmiştir. Bu aşamada, iyonlaşmayı ve oluşan iyonların kütle analizörüne iletimini sağlayan sheath ve yardımcı gazların akış hızları, kapiler ve buharlaştırma sıcaklıkları ve sprej voltajı değerleri tespit edilmiştir. Analitlerin yapısından dolayı pozitif iyonlaşma modu (ESI+) kullanılmıştır.

4.3.1. Kapiler ve buharlaştırma sıcaklık değerleri

ESI ile oluşan yüklü damlacıklar ısıtılmış kapilere doğru iletilirken ısıtılmış azot gazı ile bu damlacıklardan yüklü partiküller açığa çıkmaktadır. Bu yüzden kapiler ve azot gazının (sheath gaz) sıcaklığının iyonların analizöre iletiminde önemli etkisi vardır. Kapiler sıcaklığı 100-300°C aralığında ayarlanabilmektedir (Banerjee ve Mazumdar 2012). Düşük sıcaklıklarda iyonların transfer verimi yüksek sıcaklıklara göre daha iyi bir şekilde gerçekleşmektedir. Bu durum, kapilerin içindeki yüklü damlacıkların boyutu ve sayısı ile ilgilidir. Düşük kapiler sıcaklığında, damlacık boyutu daha büyüktür ve daha düşük hızda hareket etmektedir. Bu durum, damlacıkların kapilerin iç duvarına çarparak yok olmasına engel olmaktadır. Sıcaklık artışı ise çözgenin uzaklaşmasına yardımcı olarak damlacık boyutunun küçülmesine ve gaz faz iyonların sayısının artmasına yol açmaktadır. Ancak bu durum yüklü taneciklerin hızında artışa neden olduğu için kapilerin iç duvarına çarparak sinyalde kayıplara neden olmaktadır. Bu yüzden sıcaklık ayarının iyi bir şekilde yapılması gerekmektedir (Page vd. 2007). Buharlaştırma sıcaklığı, ESI’de oluşan iyonların analizöre iletimini sağlayan azot gazının ısıtılmasını sağlayarak sinyal miktarına önemli düzeyde etki etmektedir. Spreyde oluşan damlacıklardan çözgenin uzaklaştırılması analizöre giren iyonların miktarında artış sağlamaktadır (Ho vd. 2003).

Cihazın kullanım rehberinde (Anonymous 2009) akış hızına bağlı olarak kapiler sıcaklığının 240-380 °C arasında olduğu ve literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde ise genel olarak buharlaştırma sıcaklığının kapiler sıcaklığından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu bilgilere dayanarak bu çalışmada Çizelge 4.9’da belirtilen değerler kullanılmıştır. Kapiler ve buharlaştırma sıcaklığını belirlerken yapılan analizlerde sheath ve yardımcı gaz değerleri sırasıyla 30 ve 10; sprej voltajı 3,2 kV’tur. Analiz sonuçları incelendiğinde kapiler ve buharlaştırma sıcaklıklarının analitlerin sinyal miktarı üzerine istatistiki olarak önemli derecede etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.9). En yüksek sinyal miktarı NIV, OTA ve STE analitlerinde kapiler sıcaklığı 250°C’ye ve buharlaştırma sıcaklığı 350°C’ye ayarlandığında elde edilmiştir. Diğer analitlerde farklı uygulamalarda en yüksek sinyal miktarı elde edilmiş olup, analitlerin tümü değerlendirildiğinde kapiler sıcaklığının 250°C ve buharlaştırma sıcaklığının 350°C olmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4.9. Kapiler ve buharlaştırma sıcaklıklarının sinyal miktarına etkisi

Kapiler sıcaklığı(°C)	250			300	
Buharlaştırma sıcaklığı (°C)	300	350	400	350	400
Nivalenol	1,02E5 ^{ab} ±0,19	1,32E5 ^b ±0,11	9,83E4 ^{ab} ±4,34	8,89E4 ^{ab} ±0,12	6,02E4 ^a ±0,02
Deoksinivalenol	2,27E4±0,36	1,46E4±0,95	1,96E4±0,47	2,56E4±0,08	2,49E4±0,12
Fumonisin B1	7,38E5 ^a ±0,01	8,57E5 ^a ±0,27	1,04E6 ^b ±0,04	1,11E6 ^b ±0,06	1,10E6 ^b ±0,11
Beta zearalenol	5,90E5 ^a ±0,43	8,28E5 ^b ±0,01	1,14E6 ^c ±0	1,01E6 ^c ±0,01	1,13E6 ^c ±0,11
Fumonisin B2	5,45E5 ^a ±0,84	6,02E5 ^{ab} ±0,09	6,65E5 ^{bc} ±0,49	5,56E5 ^{ab} ±0,08	7,38E5 ^c ±0,1
Okratoksin A	5,98E4 ^a ±1,64	8,25E4 ^b ±0,27	8,19E4 ^b ±0,26	8,14E4 ^b ±0,2	8,04E4 ^b ±0,2
Zearalonone	8,49E4 ^a ±3,55	9,40E4 ^a ±0,18	1,19E5 ^a ±0	1,18E5 ^a ±0,01	1,70E5 ^b ±0,13
Sterigmatosistin	5,47E5 ^a ±0,06	6,79E5 ^b ±1,06	6,48E5 ^{ab} ±0,01	6,56E5 ^{ab} ±0,08	6,58E5 ^{ab} ±0,11

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

4.3.2. Sheath ve yardımcı gaz değerleri

Sheath gaz kapilerden kapilerin ucuna gelen sıvının iyi bir şekilde spreye dönüşümü açısından önemlidir. Bu gaz aynı zamanda ESI probunda oluşan yüklü damlacıkların analizör girişine iletimini de sağlamaktadır. Yardımcı gaz ise oluşan yüklü damlacıklardan çözgenin uzaklaştırılmasını sağlayarak boyutunun azaltılmasında rol almaktadır (Banerjee ve Mazumdar 2012). Cihazın kullanım kitabında belirtildiği üzere 400 µL ve yukarısında akış hızında sheath ve yardımcı gaz için minimum değerler sırasıyla 30 ve 10'dur (Anonymous 2008). Bu bilgiye dayanarak analizde kullanılmak üzere belirlenen sheath ve yardımcı gaz değerleri ve sinyal miktarına etkileri Çizelge 4.10'da belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, DON, FB1, FB2 ve OTA analitlerinde en yüksek sinyal miktarı sheath gaz 40 ve yardımcı gaz 20 olarak ayarlandığında elde edilmiştir. Analitlerin %50'sinde sheath gaz 40 ve yardımcı gaz 20 değerinde en yüksek sinyal miktarı elde edildiğinden bu parametrelerde denemelere devam edilmiştir.

Çizelge 4.10. Sheath ve yardımcı gaz değerlerinin sinyal miktarına etkisi

Sheath gaz(Arb)	40		50	
Yardımcı gaz(Arb)	10	20	10	20
Nivalenol	1,17E5 ^a ±0,02	2,05E5 ^b ±0,04	1,42E5 ^a ±0,04	2,07E5 ^b ±0,06
Deoksinivalenol	1,56E4 ^a ±0,06	2,97E4 ^c ±0,05	1,59E4 ^a ±0,02	2,49E4 ^b ±0,02
Fumonisin B1	9,18E5 ^a ±0,17	1,20E6 ^b ±0,15	8,90E5 ^a ±0,21	9,10E5 ^a ±0,07
Beta zearalenol	7,33E5 ^a ±0,11	1,37E6 ^c ±0,05	9,24E5 ^b ±0,08	1,44E6 ^c ±0,05
Fumonisin B2	5,83E5±0,1	6,10E5±0,14	6,02E5±0,03	5,83E5±0,1
Okratoksin A	3,61E4 ^a ±0,13	8,17E4 ^c ±0,04	6,38E4 ^b ±0,07	6,42E4 ^b ±0,12
Zearalonone	9,10E4 ^a ±0,14	2,13E5 ^c ±0,1	1,38E5 ^b ±0,03	2,76E5 ^d ±0,06
Sterigmatosistin	5,13E5 ^{ab} ±0,10	4,97E5 ^a ±0,05	6,06E5 ^d ±0,47	5,77E5 ^{bc} ±0,05

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

4.3.3. Sprey voltaj değerleri

Sprey voltajı kapilerin çıkışındaki uca uygulandığından, burada oluşturduğu elektiriksel alan ile sıvı yüzeyinden yüklü damlacıkların oluşarak ayrılmasında önemli rol oynamaktadır. Metanol ilavesinin olmadığı sulu çözeltiler ile stabil sprej oluşumu oldukça zor veya imkansızdır. Sulu çözeltinin oranının arttığı durumlarda stabil sprej oluşumu, voltajın artırılması ile gözlemlenmiştir (Cech ve Enke 2001). Bu bilgiye dayanarak analizde kullanılmak üzere belirlenen sprej voltajı değerleri ve sinyal miktarına etkileri Çizelge 4.11'de belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, FB1, FB2, OTA ve STE analitlerinde en yüksek sinyal miktarına 3,5 kV değerinde ulaşıldığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.11. Sprey voltajının sinyal miktarına etkisi

Sprey voltajı(kV)	3	3,5	4
Nivalenol	2,46E5b± 0,06	2,12E5a±0,12	2,26E5ab±0,06
Deoksinivalenol	4,14E4b±0,08	3,69E4a±0,08	4,17E4b±0,05
Fumonisin B1	1,06E6±0,13	1,11E6±0,12	1,08E6±0,03
Beta Zearalenol	1,45E6a±0,08	2,11E6b±0,13	2,49E6c±0,02
Fumonisin B2	5,44E5a±0,09	6,98E5c±0,04	6,67E5b±0,05
Okratoksin A	6,74E4b±0,08	7,44E4c±0,09	6,16E4a±0,19
Zearalenol	1,77E5a±0,04	4,84E5b±0,23	6,07E5c±0,05
Sterigmatosistin	5,12E5a±0,11	5,77E5b±0,05	5,61E5b±0,13

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

4.4. Seyrelet ve Enjekte Et Ekstraksiyon Yönteminin Geliştirilmesi

Bu yöntemde öncelikle numuneyi temsil edebilecek örnek miktarı literatürde benzer çalışmalar dikkate alınarak 5g olarak belirlenmiştir (Scarpino vd. 2019; Da Silva vd. 2019). Seyrelet ve enjekte et yöntemi farklı kimyasal yapıya sahip mikotoksin gruplarının analizinde maliyeti düşürmek ve örnek hazırlama süresini azaltmak amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (Sulyok vd. 2006; De Santis 2017). Bu yöntemde örnek ekstraktının basit seyreltilmesi LOQ değerinin artmasına neden olabilmektedir. Diğer taraftan örnek konsantrasyonu güçlü matriks etkisinden dolayı metot performansını etkilemektedir. İzotop kullanılması matriks etkisinin üstesinden gelinmesi amacıyla kullanılabilir ancak bu da ekstra maliyet artışına neden olmaktadır. Bu nedenle örnek hazırlama süresini kısaltmak ve maliyeti düşürmek için matriks uyumlu kalibrasyon kullanılmaktadır. Ekstraksiyonu etkileyen değişkenler arasında ekstraksiyon çözgeni, miktarı ve ekstraksiyon süresi parametreleri gelmektedir. Bu nedenle ekstraksiyon çözeltisinin, kullanılacak çözelti miktarının ve çalkalama süresi ve hızının ekstraksiyon verimi üzerine etkileri incelenmiştir.

4.4.1. Ekstraksiyonda kullanılan çözgenin belirlenmesi

Ekstraksiyonda kullanılan çözücü bileşimi çoklu toksin analiz metodunun geliştirilmesinde analitlerin farklı kimyasal yapılarından dolayı kritik parametrelerden biridir (Sulyok vd. 2006). Literatürde mikotoksinlerin farklı kimyasal yapılarından dolayı ekstraksiyon çözgeni olarak MeOH ve ACN'in farklı oranlarda sulu karışımının ve asetonitrilin sulu karışımının asetik asitle asitlendirilerek kullanıldığı görülmektedir

(Sulyok vd. 2006; Sulyok vd. 2007; De Santis vd. 2017; Franco vd. 2018; Da Silva vd. 2019). Sulyok vd. (2006) tarafından buğday ve mısırdaki 39 mikotoksinin tespitine yönelik yaptıkları çalışmada seyrelt ve enjekte et yönteminde analitlerin farklı yapısından dolayı ACN ve MeOH'un farklı sulu çözeltileri asetik asit ilave edilerek ve ilave edilmeden test edilmiş ve tüm analitler için en iyi ekstraksiyonun ACN/H₂O/HAc 79+20+1 (v/v/v) ekstraksiyon çözeltisi kullanıldığında elde edildiği belirtilmiştir.

De Santis vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada da çoklu mikotoksin analizinde seyrelt ve enjekte et yönteminde çözgen olarak CH₃OH:H₂O 80:20, CH₃CN:H₂O:CH₃COOH 79:20:1 ve EtOH:H₂O 2:1 test edildiği ve geri kazanım ve tekrarlanabilirlik bağıl standart sapmasına göre CH₃CN:H₂O:CH₃COOH 79:20:1'in tercih edildiği bildirilmiştir. Franco vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada seyrelt ve enjekte et yönteminde çözgen olarak asetonitril:su: asetik asit (80:20:0,1) kullanıldığı bildirilmiştir. Da Silva vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada seyrelt ve enjekte et yönteminde çözücü bileşiminin (asetonitril:su 9:1 v/v ve 8:2 v/v) ve asetik asit ilavesinin (%1 ve %2) test edildiği ve en iyi koşulun asetonitril:su 8:2 v/v ve % 2 asetik asit ilavesinde elde edildiği belirtilmiştir. Bu ekstraksiyon tekniğinin optimizasyonu genel olarak uygun ekstraksiyon çözgeninin seçimi ile başlamaktadır. Kullanılacak çözgenin ilgili analitleri çözerek matriksten ayrılmasını sağlarken diğer matriks bileşiklerinin ekstraksiyonunu en aza indirmesi gerekmektedir. Bu yüzden, çözgenin polaritesi hedef analitin polaritesine yakın olmalıdır. Polar olmayan ve lipofilik bileşikler için genel olarak hegzan ve pentan gibi polar olmayan ve su ile karışmayan çözgenler kullanılırken; polar yapıda olan asetonitril, metanol ve su, polar ve hidrofilik özellikteki bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılmaktadır (Carabias-Martínez vd. 2005). Ayrıca çözgen seçiminde ekstraksiyondan sonra analiz için kullanılacak tekniğin de göz önünde bulundurulması gerekmektedir. LC sistemlerde hareketli faz olarak kullanılan asetonitril ve metanolün ekstraksiyonda kullanılması ekstraktların doğrudan cihaza enjeksiyonuna olanak sağlarken, diğer çözgenlerin kullanılması durumunda evaporasyon gibi ek işlemlerin yapılması gerekmektedir (Luthria vd. 2004).

Bu çalışmada, literatürdeki çözgen bileşimi de dikkate alınarak mikotoksinlerin polar yapısından dolayı çözgen olarak asetonitril tercih edilmiş ve asetonitrilin hem tek olarak hem su ile karışımı (ACN:H₂O 80:20 v/v) ve hem de asetik asit (%1) ilave edilerek test edilmiştir. Her bir deneme de çözgen miktarı 10 ml ve 15 ml olarak denenmiştir. Çözgen bileşiminin ve karışım oranlarının ekstraksiyon verimi üzerine etkisi analitlerin cihazda vermiş olduğu sinyal seviyesi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonuçları Çizelge 4.12 ve 4.13'de belirtilmiştir.

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, analitlerin çoğunun ekstraksiyonunda asetonitrilin sulu karışımının en yüksek geri kazanım değerlerini verdiği tespit edilmiştir. Ancak çalışma kapsamında değerlendirilen analitlerden OTA tolere edilebilen en düşük üst limite sahip olduğundan değerlendirme bu toksine göre yapılmıştır. Benzer şekilde Da Silva vd. (2019) yaptıkları çalışmada seyrelt ve enjekte et yönteminin optimizasyonunda çalışma kapsamındaki analitlerden en düşük tolere edilebilir üst limite sahip olan AFB1'e göre karar verildiği bildirilmektedir. Tez kapsamındaki analitlerden OTA'nın cihazda vermiş olduğu sinyal miktarı pirinçte ACN % 1 asetik asit içerdiği durumda elde edildiğinden tercih edilmiştir. Her iki matriks için 15 ml de çalışılması ve ekstraktın temiz olarak eldesi daha rahat olduğu için çözelti hacmine 15 ml olarak karar verilmiştir. Ekstrakt içerisinde analitler dışında diğer bileşiklerin yoğun olarak bulunması

kromatografik analizde sorunlara neden olmaktadır. LC-MS analizinde hem kolon ömrü açısından hem de kütle analizörünün kirliliği açısından ekstraktın mümkün olduğunca temiz olması önemlidir.

Çizelge 4.12. Pirinçte çözgen bileşiminin ve karışım oranlarının sinyal miktarına etkisi

Çözgen bileşimi	ACN 10 mL	ACN 15 mL	ACN:H ₂ O 10 mL	ACN:H ₂ O 15mL	ACN - %1a.asit 10 mL	ACN -%1a.asit 15 mL
Nivalenol	8,96E4 ^a ±0,01	8,49E4 ^c ±0,5	7,34E4 ^b ±0,14	5,45E4 ^a ±0,25	8,47E4 ^c ±0,02	7,34E4 ^b ±0,4
Deoksivalenol	4,78E3±1,47	4,53E3±0,19	3,46E3±0,9	3,34E3±0,69	3,54E3±0,48	2,75E3±0,44
Fumonisin B1	3,84E3 ^a ±0,92	3,27E5 ^a ±0,55	1,13E4 ^c ±0,01	7,31E3 ^b ±1,21	4,68E3 ^{ab} ±0,96	4,09E3 ^a ±0,24
Beta zearalenol	2,23E5 ^a ±0,03	2,01E5 ^a ±0,02	2,96E5 ^c ±0,08	2,68E5 ^b ±0,14	2,61E5 ^b ±0,12	2,17E5 ^a ±0,02
Fumonisin B2	3,81E4 ^a ±0,29	3,14E4 ^a ±0,1	6,09E4 ^b ±0,06	5,39E4 ^b ±0,25	3,20E4 ^a ±0,26	3,66E4 ^a ±0,17
Okratoksin A	2,57E3 ^a ±0,41	2,33E3 ^a ±0,13	3,32E3 ^a ±0,14	3,06E3 ^a ±0,21	5,83E3 ^b ±1,13	4,07E3 ^{ab} ±0,7
Zearalonone	5,13E4 ^a ±0,36	3,78E4 ^a ±0,17	4,16E5 ^e ±0,07	3,54E5 ^d ±0,05	1,28E5 ^c ±0,08	1,01E5 ^b ±0,06
Sterigmatosistin	7,20E4 ^b ±0,34	5,07E4 ^a ±0,43	2,13E5 ^c ±0,09	5,04E4 ^a ±0,43	7,05E4 ^b ±0,02	4,71E4 ^a ±0,26

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

Çizelge 4.13. Yulafta çözgen bileşiminin ve karışım oranlarının sinyal miktarına etkisi

Çözgen bileşimi	ACN-10 Ml	ACN-15 mL	ACN:H ₂ O 10 mL	ACN:H ₂ O 15mL	ACN %1a.asit- 10 mL	ACN %1a.asit 15 mL
Nivalenol	2,76E5 ^{bc} ±0,06	2,91E5 ^c ±0,19	2,51E5 ^{ab} ±0,04	2,37E5 ^a ±0,02	2,63E5 ^{abc} ±0,08	2,67E5 ^{abc} ±0,08
Deoksivalenol	7,72E3±0,29	5,61E3±0,66	5,67E3±0,28	5,54E3±1,23	6,16E3±0,4	6,57E3±0,8
Fumonisin B1	3,52E4±0,09	3,14E4±0,06	3,54E4±0,39	3,94E4±0,01	3,78E4±0,08	3,84E4±0,64
Beta zearalenol	4,10E5 ^c ±0,35	5,02E5 ^d ±0,04	3,22E5 ^a ±0,01	3,67E5 ^b ±0,08	4,23E5 ^c ±0,01	4,98E5 ^d ±0,21
Fumonisin B2	2,89E4 ^b ±0,24	2,47E4 ^{ab} ±0,27	2,21E4 ^{ab} ±0,22	4,06E4 ^c ±0,35	2,42E4 ^{ab} ±0,06	1,79E4 ^a ±0,08
Okratoksin A	5,46E3±2,4	3,64E3±0,04	5,55E3±1,57	4,66E3±0,84	4,50E3±0,9	4,65E3±0,08
Zearalonone	8,80E4 ^a ±0,06	8,72E4 ^a ±0,45	8,53E4 ^a ±0,15	8,43E4 ^a ±0,4	1,10E5 ^b ±0,04	1,19E5 ^b ±0,11
Sterigmatosistin	2,27E4±0,19	2,10E4±0,13	9,82E4±7,69	1,63E4±0,08	2,31E4±0,3	2,0E4±0,17

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

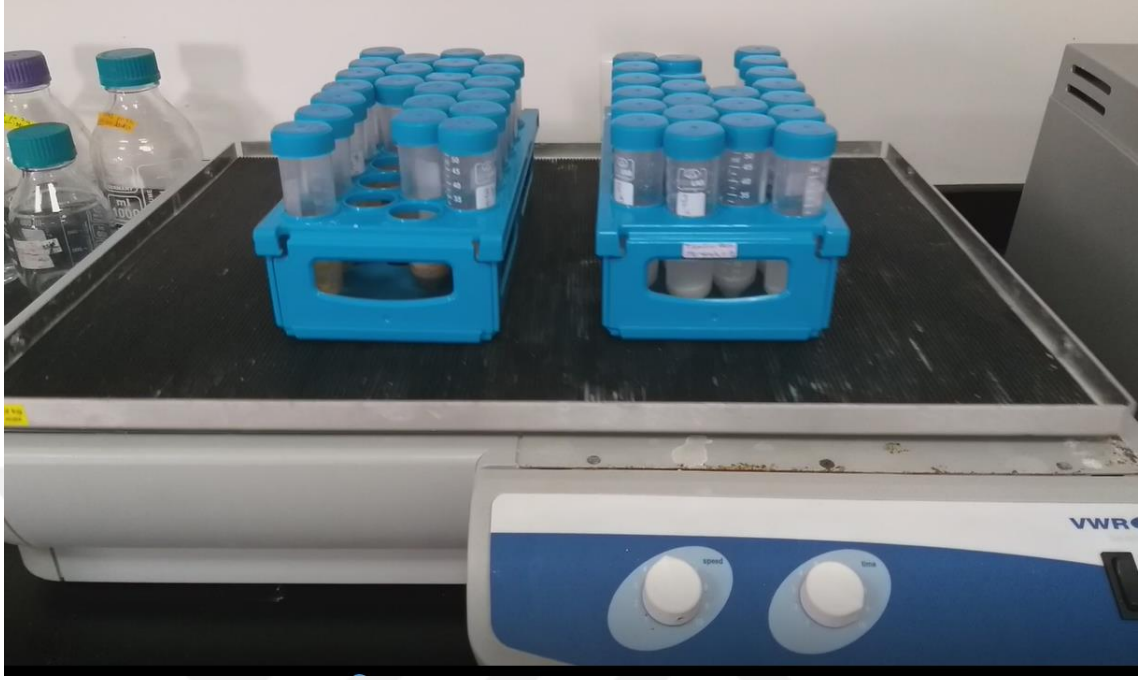
*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

4.4.2. Çalkalama süresi ve hızının belirlenmesi

Ekstraksiyonda kullanılacak çözgen bileşimi ve hacmi belirlendikten sonra uygulanacak çalkalama hızı ve süresinin analitlerin sinyal seviyesine etkisini belirlemek amacıyla pirinç ve yulaf örneklerine 15 ml %0,1 asetik asitli ACN çözeltisi ilave edilerek elle 1 dk çalkalanmış ve tüpler Şekil 4.76'de görünümü verilen VWR Std 5000 çalkalayıcı (USA)'da 4 (200 rpm), 5 (250 rpm) ve 6 (300 rpm) ayarında 5,10 ve 15 dk çalkalama işlemine tabi tutulmuştur. Tüpler, 20 °C'de 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra ekstraktlar 0,22 µm'lik naylon filtreden geçirilerek viale alınmış ve analitlerin cihazda verdikleri sinyal seviyeleri ölçülmüştür.

Ekstraksiyon aşamasından sonra ekstraktların doğrudan cihaza enjekte edilmesi hem cihazın LC kısmında kolonun tıkanmasına ve kullanım ömrünün azalmasına hem de özellikle MS kısmındaki parçaların kirlenmesine ve tıkanmasına yol açarak analitlerin

seçiciliğinin azalmasına neden olmaktadır. Bu nedenle ekstraktlar 0,22 µm'lik naylon filtreden geçirilip cihaza enjekte edilmiştir.



Şekil 4.76. Çalkalama işleminin görünümü

Çizelge 4.14-4.15’de analitlere ait değerler verilmektedir. Veriler incelendiğinde uygulamalar arasında istatistiki olarak önemli farkın olduğu, pirinçte analitlerden NIV, FB1, beta-ZOL, FB2 ve OTA’nın 200 rpm de 5 dk çalkalamada yüksek sinyal seviyesine ulaşıldığı, yulafta ise analitlerden NIV, FB1, beta-ZOL, ZEN ve STE’nin 300 rpm’de 10 dk çalkalamada yüksek sinyal seviyesine ulaşıldığı görülmektedir. Yulaf matriksinin kabuklu olmasından dolayı çalkalama hızı ve süresi arttıkça genel olarak başlangıç sinyal seviyesine göre artış olduğu, analitlerin çoğunda 300 rpm de 10 dakika çalkalamada en yüksek sinyal seviyesi elde edildiği görülmektedir. Bu nedenle pirinçte çalkalama işlemi 200 rpm de 5 dk; yulafta ise 300 rpm de 10 dk olacak şekilde karar verilmiştir. Frenich vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada, mikotoksinlerin T-2 ve HT-2 hariç başka çalkalama işlemine ihtiyaç duymadan sadece vorteksle ekstrakte edilebileceğini; yaptıkları çalışmada da 10 dakikaya kadar ekstraksiyonda pik alanının arttığını, daha sonra ise sabit kaldığını bu nedenle ekstraksiyon süresinin 10 dk olarak belirlendiği belirtilmektedir.

Çizelge 4.14. Pirinçte analitlerin sinyal miktarlarının ekstraksiyon hızına (200, 250 ve 300 rpm) ve ekstraksiyon süresine (5, 10 ve 15 dk) bağlı olarak değişimi

Hız (rpm)	200			250			300		
Süre (dk)	5	10	15	5	10	15	5	10	15
Nivalenol	3,38E4 ^d ±0,12	2,76E4 ^b ±0,04	2,57E4 ^{ab} ±0,04	2,47E4 ^a ±0,04	2,71E4 ^b ±0,09	3,26E4 ^d ±0,04	3,03E4 ^c ±0,08	3,23E4 ^{cd} ±0,07	2,73E4 ^b ±0,08
Deoksinivalenol	2,55E3 ^e ±0,05	1,68E3 ^{ab} ±0,13	3,97E3 ^g ±0,03	1,89E3 ^{bc} ±0,02	2,94E3 ^f ±0,07	2,06E3 ^{cd} ±0,04	1,85E3 ^{bc} ±0,05	2,21E3 ^d ±0,09	1,48E3 ^a ±0,03
Fumonisin B1	2,14E4 ^d ±0,07	2,55E3 ^{ab} ±0,06	2,85E3 ^b ±0,05	2,65E3 ^{ab} ±0,06	3,08E3 ^b ±0,03	2,66E3 ^{ab} ±0,05	5,45E3 ^c ±0,05	2,54E3 ^{ab} ±0,07	2,02E3 ^a ±0,09
Beta zearalenol	1,26E5 ^c ±0,04	1,21E5 ^{abc} ±0,09	1,12E5 ^{abc} ±0,08	1,04E5 ^a ±0,02	1,26E5 ^c ±0,04	1,08E5 ^{ab} ±0,03	1,16E5 ^{abc} ±0,06	1,26E5 ^{bc} ±0,05	1,26E5 ^{bc} ±0,05
Fumonisin B2	4,56E4 ^d ±0,05	1,91E4 ^{ab} ±0,09	2,43E4 ^c ±0,08	1,85E4 ^{ab} ±0,06	2,57E4 ^c ±0,04	1,78E4 ^a ±0,03	1,99E4 ^b ±0,02	1,88E4 ^{ab} ±0,03	1,96E4 ^b ±0,01
Okratoksin A	4,01E3 ^f ±0,09	3,23E3 ^d ±0,08	3,27E3 ^d ±0,03	2,55E3 ^b ±0,06	2,25E3 ^a ±0,06	3,47E3 ^e ±0,04	2,77E3 ^c ±0,03	2,80E3 ^c ±0,02	2,44E3 ^b ±0,07
Zearalonone	6,66E4 ^g ±0,05	6,32E4 ^{ef} ±0,08	7,43E4 ^h ±0,08	5,86E4 ^{bc} ±0,04	5,06E4 ^a ±0,05	6,18E4 ^{de} ±0,03	6,47E4 ^{fg} ±0,04	5,73E4 ^b ±0,07	6,01E4 ^{cd} ±0,09
Sterigmatosistin	1,94E4 ^{bc} ±0,07	1,74E4 ^{ab} ±0,06	1,81E4 ^{ab} ±0,1	2,42E4 ^f ±0,09	1,68E4 ^a ±0,03	2,17E4 ^d ±0,04	2,14E4 ^{cd} ±0,02	1,81E4 ^{ab} ±0,1	2,17E4 ^d ±0,04

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

Çizelge 4.15. Yulafta analitlerin sinyal miktarlarının ekstraksiyon hızına (200, 250 ve 300 rpm) ve ekstraksiyon süresine (5, 10 ve 15 dk) bağlı olarak değişimi

Hız (rpm)	200			250			300		
Süre (dk)	5	10	15	5	10	15	5	10	15
Nivalenol	1,03E5 ^a ±0,01	1,07E5 ^{ab} ±0,03	9,79E4 ^a ±0,02	9,82E4 ^a ±0,03	1,12E5 ^{ab} ±0,09	1,39E5 ^{cd} ±0,12	1,30E5 ^{bc} ±0,1	1,60E5 ^d ±0,12	9,73E4 ^a ±0,03
Deoksinivalenol	1,90E3 ^a ±0,1	3,21E3 ^d ±0,09	2,86E3 ^c ±0,14	2,84E3 ^c ±0,06	2,96E3 ^{cd} ±0,14	2,24E3 ^b ±0,07	2,91E3 ^{cd} ±0,09	2,72E3 ^c ±0,1	2,38E3 ^b ±0,03
Fumonisin B1	1,48E4 ^a ±0,03	1,96E4 ^{bc} ±0,05	1,66E4 ^{ab} ±0,15	1,86E4 ^b ±0,09	1,77E4 ^{ab} ±0,13	2,26E4 ^{cd} ±0,15	2,43E4 ^{de} ±0,1	2,68E4 ^e ±0,15	2,60E4 ^{de} ±0,1
Beta zearalenol	2,08E5 ^a ±0,13	2,24E5 ^{ab} ±0,06	2,22E5 ^{ab} ±0,04	2,35E5 ^{ab} ±0,16	2,30E5 ^{ab} ±0,16	2,66E5 ^{bc} ±0,24	2,45E5 ^{abc} ±0,15	2,79E5 ^c ±0,01	2,16E5 ^a ±0,05
Fumonisin B2	1,34E5 ^a ±0,06	1,60E5 ^{ab} ±0,1	1,51E5 ^{ab} ±0,1	1,86E5 ^b ±0,15	1,74E5 ^{ab} ±0,17	1,81E5 ^b ±0,1	1,71E5 ^{ab} ±0,1	1,61E5 ^{abc} ±0,14	1,88E5 ^b ±0,05
Oktratoksın A	4,90E3 ^d ±0,1	1,81E3 ^a ±0,09	2,22E3 ^{ab} ±0,09	5,31E3 ^e ±0,2	2,36E3 ^{bc} ±0,15	2,70E3 ^c ±0,2	2,10E3 ^{ab} ±0,06	2,34E3 ^{bc} ±0,08	2,07E3 ^{ab} ±0,04
Zearalonone	5,41E4 ^c ±0,1	4,51E4 ^a ±0,09	6,39E4 ^d ±0,13	4,95E4 ^c ±0,06	5,32E4 ^{bc} ±0,13	7,56E4 ^f ±0,16	6,81E4 ^e ±0,1	7,57E4 ^f ±0,15	5,62E4 ^c ±0,08
Sterigmatosistin	1,95E4 ^c ±0,02	1,65E4 ^{bc} ±0,15	1,70E4 ^{bc} ±0,16	1,62E4 ^{bc} ±0,18	9,13E3 ^a ±0,07	1,60E4 ^{bc} ±0,19	1,41E4 ^b ±0,1	1,96E4 ^c ±0,14	1,74E4 ^{bc} ±0,04

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

4.5. Metot Validasyonu

Geliştirilen metotların geçerliliğini sağlamak amacıyla laboratuvar içi metot validasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, doğrusalılık ve ölçüm aralığı, seçicilik, tespit limiti (LOD), tayin limiti (LOQ), doğruluk ve kesinlik parametreleri belirlenmiştir. Metot validasyonu için kullanılan ham verilerin tamamı Ek 3-6'da verilmiştir.

4.5.1. Doğrusallık ve ölçüm aralığı

Metot validasyonunda öncelikle analitlere ait kalibrasyon grafiğinin belirlenmesi gerekmektedir. Kalibrasyon modeli, doğrusalılık deneylerine ve analit konsantrasyonunun sinyal ile ilişkisinin şekline göre seçilmektedir. Kalibrasyon grafikleri, analit konsantrasyonları ile bu konsantrasyonlarda analitlerin cihaz dedektöründe gösterdikleri yanıt arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Bu ilişki korelasyon denklemi ile ifade edilmektedir ve denkleme ait korelasyon katsayısının $(r^2) \geq 0,999$ olması denklemin kabul edilebilir olduğunu belirtmektedir. Kalibrasyon grafikleri en düşük analit konsantrasyonundan başlanarak en az 6 nokta (kör dahil) ile çizilmelidir. Ölçüm aralığı, kalibrasyon grafiği elde edilirken kullanılan en düşük ve en yüksek konsantrasyonlar ile tanımlanmaktadır (Araujo 2009; Kay ve MacNeil 2012).

Kalibrasyon grafiği çizdirilirken belirlenen konsantrasyonlardaki standart çözeltiler uygun çözücü ile hazırlanmaktadır. Ancak, matriks numuneleri çözücü ile hazırlanan kalibrasyon grafikleri ile değerlendirildiğinde, matriksin içinde bulunan bileşenlerin analit sinyallerini etkilediği gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak, analitlerin miktarı doğru bir şekilde hesaplanamamaktadır. Bu durum matriks etkisi olarak bilinmektedir ve matriks kaynaklı girişim unsurlarının neden olduğu bu olumsuzluğu elimine etmek için matriks uyumlu kalibrasyon grafikleri oluşturulmaktadır (Lopes vd. 2012).

Kalibrasyon grafikleri, analitik metodun kullanılacağı farklı bileşimdeki matrikslerin her biri için belirlenmelidir. Bu durum, matriks yapısındaki farklı girişim unsurlarının cihazda verdiği yanıtın farklı olmasından ve analitlerin ekstraksiyon (geri kazanım) düzeyinin matrikse bağlı olarak değişmesinden kaynaklanmaktadır (Anonymous 2014). Bu yüzden, bu çalışmada metot validasyonu için pirinç ve yulaf örneklerinde mikotoksinleri içermeyen 2 farklı matrikse sahip numuneler seçilmiştir. Bu numuneler, pirinç ve kabuklu yulaf örnekleridir.

Kalibrasyon grafiklerinin çiziminin matriks uyumlu yapılması miktar belirleme çalışmalarında doğru sonuçların elde edilmesi açısından önemlidir. Matriks etkisi, matriksten gelen girişim unsurlarından kaynaklanan ve ESI işlemi sırasında analitlerin iyonizasyonu üzerine iyon baskılama veya artırma şeklinde etkisi olan bir durumdur. Bu durumda bileşiğin iyonlaşma verimliliği hedef analitle birlikte ayrılan maddelerin varlığından ötürü değişmektedir (Taylor 2005). Örnek ekstraksiyonu, ekstraktın temizlenmesi ve kromatografik işlemler LC-MS analizlerinde uygulanması zorunlu olan ve matriks etkisini azaltan uygulamalardır. Ancak hangi işlem uygulanırsa uygulansın matriks etkisini tamamen elimine etmek mümkün değildir. Bunun sonucunda, örnekte bulunan girişim unsurları analitle etkileşerek analitin dedektörde vermiş olduğu yanıtı değiştirmektedir veya kendileri dedektörde yanıt oluşturmaktadır. Bu yüzden, LC-MS'de miktar belirleme çalışmalarında analiz sonucunun doğruluğunu artırmak amacıyla

matriks uyumlu kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi gerekmektedir (Kruve vd. 2015; Kay ve MacNeil 2012, Wang ve Turnipseed 2012). Literatür çalışmalarında da mikotoksinlerin pirinç (Arroyo-Manzanares vd. 2013; Da Silva vd 2019), yenilebilir tohum ve fıstık (Arroyo-Manzanares vd. 2014), karışık tahıl bazlı ürünler (Bltran vd. 2009, De Santis vd. 2017) ve tahıllar (Frenich vd. 2009; Soleimany vd 2012; Scarpino vd. 2019) gibi gıdalarda yapılan analizlerinde genel olarak matriks uyumlu kalibrasyon kullanılmıştır.

Matriks uyumlu kalibrasyon grafikleri çizilirken hazırlanan konsantrasyonların, örneğin ekstrakt içeriğini yansıtmaması gerekmektedir. Bu yüzden, bu çalışmada 2 farklı matriksten “seyrelt ve enjekte et” ve QuEChERS ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstraktlara artan konsantrasyonda standart karışım çözeltisinden ilave edilmiştir. Kalibrasyon grafikleri OTA, STE ve FB2 (0, 5, 10, 20, 50, 100 µg/kg); ZEN, DON, FB1 ve Beta-ZOL (0, 25, 50, 100, 250, 500 µg/kg); NIV(0, 250, 500, 1000, 2500, 5000 µg/kg) olmak üzere 6 noktalı olacak şekilde oluşturulmuştur. Kalibrasyon grafikleri belirtilen bu değerlere karşı dedektörün vermiş olduğu yanıtı göre çizilmiştir. Analitik ölçüm aralıkları genel olarak analitlerin maksimum kalıntı miktarı (MRL) baz alınarak belirlenmektedir (Wang ve Turnipseed 2012). Ancak bu çalışmanın en önemli amacı, pirinç ve yulafta eser miktarda bulunan kalıntıların tespit edilebilmesi için tandem kütle spektrometresinden yararlanarak çok düşük konsantrasyonlarda ölçüm yapabilmektir. Bu amaçla, LOQ değerlerine göre kalibrasyon grafiğinin başlangıç konsantrasyonu belirlenmiş ve 6 noktalı olacak şekilde konsantrasyonlar ayarlanmıştır. Kalibrasyon grafikleri çizilirken kullanılacak modelin belirlenmesi doğru sonuçların elde edilmesi açısından önemlidir (Kay ve MacNeil 2012). Bu çalışmada, $r^2 \geq 0,999$ değerleri ile tüm kalibrasyon grafiklerinde doğrusal model uygulanmıştır. Bu model uygulanarak elde edilen kalibrasyon denklemleri Çizelge 16-20’de belirtilmiştir. Literatürde tahıllarda mikotoksinlerin analiz edildiği çalışmalarda (Sulyok vd. 2006; Soleimany vd 2012, Malachova vd. 2014; De Santis vd. 2017) doğrusal kalibrasyon grafiği kullanılmıştır.

Çizelge 4.16. Standartlarla hazırlanan analit verilerini temsil eden en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayısı

Analit	Denklem	Korelasyon katsayısı (r^2)
Nivalenol	$y=3957,53+135,234x$	0,9998
Deoksinivalenol	$y=1593,77+270,829x$	0,9998
Fumonisin B1	$y=-26728,1+7325,7x$	0,9998
Beta zearalenol	$y=74330,5+19569,4x$	0,9999
Fumonisin B2	$y=-65756,2+15596,5x$	0,9994
Okratoksin A	$y=1004,66+5843,84x$	0,9997
Zearalenon	$y=6298,59+6119,38x$	0,9999
Sterigmatosistin	$y=-11001,3+38372,1x$	0,9998

*Denklemden 'x' analit konsantrasyonunu, 'y' alanını ifade etmektedir

Çizelge 4.17. Pirinç örneğinde QuEChERS ile yapılan ekstraksiyon sonucunda analit verilerini temsil eden en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayısı

Analit	Denklem	Korelasyon katsayısı (r^2)
Nivalenol	$y=-872,363+30,4084x$	0,9997
Deoksinivalenol	$y=-409,707+181,548x$	0,9999
Fumonisin B1	$y=-20951+7162,65x$	0,9999
Beta zearalenol	$y=139403+21753x$	0,9999
Fumonisin B2	$y=25275,1+50376,4x$	0,9999
Okratoksin A	$y=4562,74+8032,24x$	0,9999
Zearalenon	$y=67504,9+7658,86x$	0,9998
Sterigmatosistin	$y=25422,2+55301,5x$	0,9998

*Denklemden 'x' analit konsantrasyonunu, 'y' alanını ifade etmektedir

Çizelge 4.18. Pirinç örneğinde “seyrelt ve enjekte et” yöntemi ile yapılan ekstraksiyon sonucunda analit verilerini temsil eden en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayısı

Analit	Denklem	Korelasyon katsayısı (r^2)
Nivalenol	$y=4063,58+38,3485x$	0,9997
Deoksinivalenol	$y=348,956+238,162x$	0,9999
Fumonisin B1	$y=-17126,4+6258,07x$	0,9998
Beta zearalenol	$y=240412+20895,2x$	0,9998
Fumonisin B2	$y=-56647,4+44981,1x$	0,9998
Okratoksin A	$y=5688,64+4346,7x$	0,9999
Zearalenon	$y=64226,8+6955,41x$	0,9997
Sterigmatosistin	$y=29500,4+61786,8x$	0,9999

*Denklemde ‘x’ analit konsantrasyonunu, ‘y’ alanını ifade etmektedir

Çizelge 4.19. Yulafta QuEChERS ile yapılan ekstraksiyon sonucunda analit verilerini temsil eden en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayısı

Analit	Denklem	Korelasyon katsayısı (r^2)
Nivalenol	$y=1429,01+40,7201x$	0,9999
Deoksinivalenol	$y=5076,09+125,675x$	0,9999
Fumonisin B1	$y=-10356,3+6383,36x$	0,9999
Beta zearalenol	$y=149172+10345,2x$	0,9998
Fumonisin B2	$y=-36105,6+40435,8x$	0,9997
Okratoksin A	$y=3885,02+1626,43x$	0,9999
Zearalenon	$y=45176,4+3187,66x$	0,9999
Sterigmatosistin	$y=2340,78+41745,3x$	0,9999

*Denklemde ‘x’ analit konsantrasyonunu, ‘y’ alanını ifade etmektedir

Çizelge 4.20. Yulafta “seyrelt ve enjekte et” yöntemi ile yapılan ekstraksiyon sonucunda analit verilerini temsil eden en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayısı

Analit	Denklem	Korelasyon katsayısı (r ²)
Nivalenol	y=-433,403+45,7657x	0,9999
Deoksinivalenol	y=866,381+268,053x	0,9999
Fumonisin B1	y=-13350,8+6368,36x	0,9999
Beta zearalenol	y=359990+16599,8x	0,9999
Fumonisin B2	y=-22586+42504x	0,9999
Okratoksin A	y=7969,69+3442,83x	0,9999
Zearalenon	y=46913,4+4749,02x	0,9999
Sterigmatosistin	y=24983,8+48936,9x	0,9999

*Denklemden ‘x’ analit konsantrasyonunu, ‘y’ alanını ifade etmektedir

Pirinç ve yulaf örneklerinde iki farklı ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen kalibrasyondan 4.1’deki denkleme göre hesaplanan matriks etkisi Çizelge 4.21’de görülmektedir.

Matriks etkisinin derecesi büyük ölçüde analit/matriks bileşimine bağlıdır. Matriks etkisini ölçmek için her matriks için her bir analitin sinyal artırma/baskılanması (SSE) matriks uyumlu kalibrasyon grafiğinin eğiminin standart çözelti ile hazırlanan kalibrasyon grafiğinin eğimine oranının yüzdesi alınarak hesaplanmıştır (Beltran vd. 2009).

$$SSE (\%) = \frac{\text{matriks uyumlu kalibrasyonun eğimi}}{\text{standart çözelti kalibrasyonunun eğimi}} \times 100 \quad (4.1)$$

Mevzuatta matriks etkisi ile ilgili kabul edilebilir bir aralık yoktur. Malachova vd. (2014) yaptıkları çalışmada %90-110 arasında matriks etkisine sahip analitlerin matriks etkisinden etkilenmediklerini kabul ettiklerini bildirmektedir. Buna göre pirinçte ve yulafta her iki ekstraksiyon yönteminde de analitlerin %12,5’i %90-110 arasında matriks etkisine sahiptir. Seyrelt ve enjekte et yönteminde her iki matriks için analitlerin %37,5’inde hafif baskılama gözlenirken (SSE %72-89), QuEChERS yönteminde pirinçte analitlerin %25’inde, yulafta ise %62,5’inde daha fazla baskılama (SSE<%72) görülmektedir. Her iki ekstraksiyon yönteminde pirinç ve yulaf matrikslerinde FB2 analitinde matriks etkisinin sinyal seviyesini oldukça arttırdığı (SSE>%110) görülmektedir. Matriks etkisinin analitlerin sinyal seviyesini artırma/baskılama etkisini

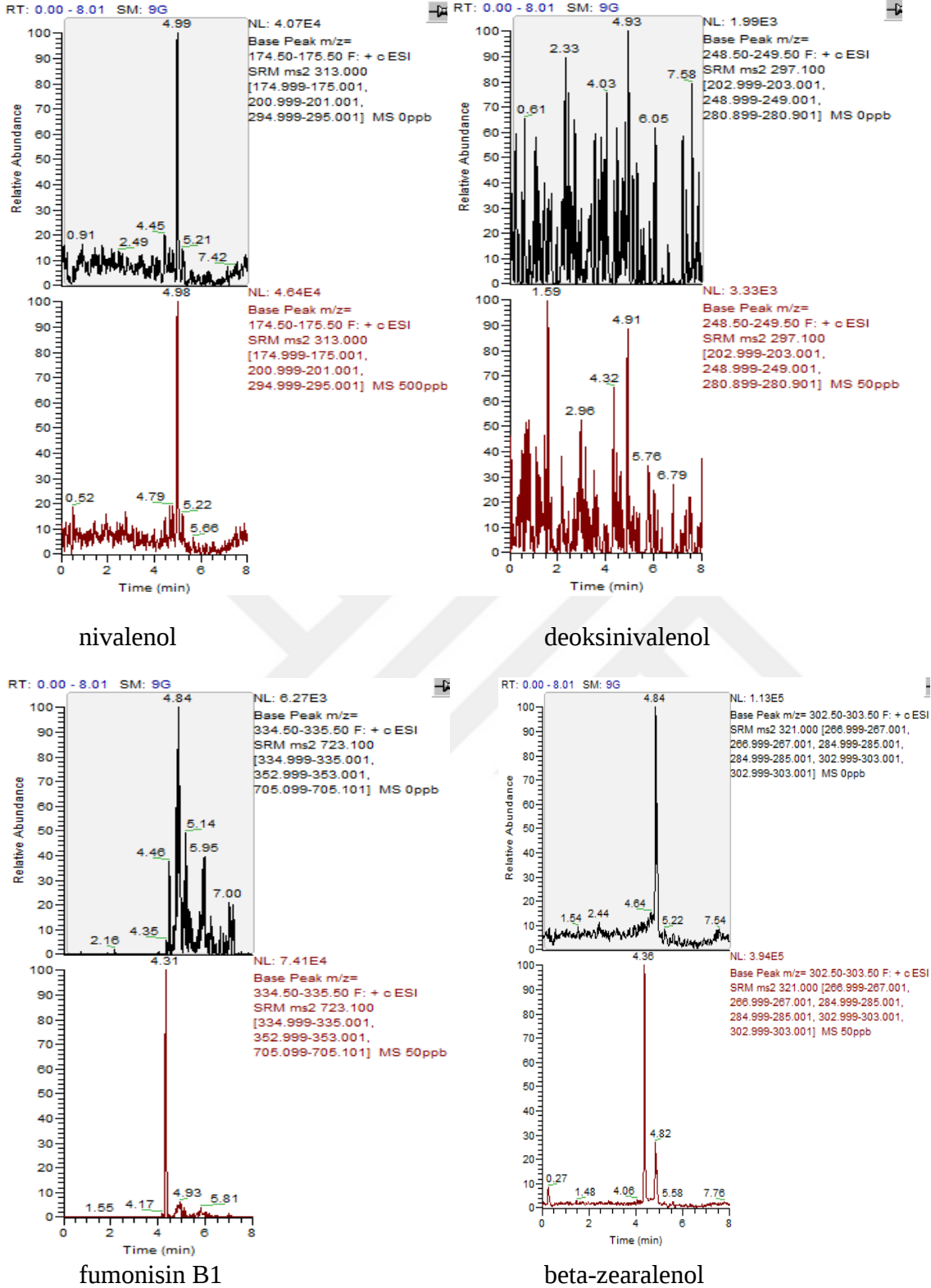
mümkün olduğunca ortadan kaldırarak analiz sonucunun doğruluğunu artırmak amacıyla matriks uyumlu kalibrasyon kullanılmıştır.

Çizelge 4.21. Matriks etkisi (% SSE)

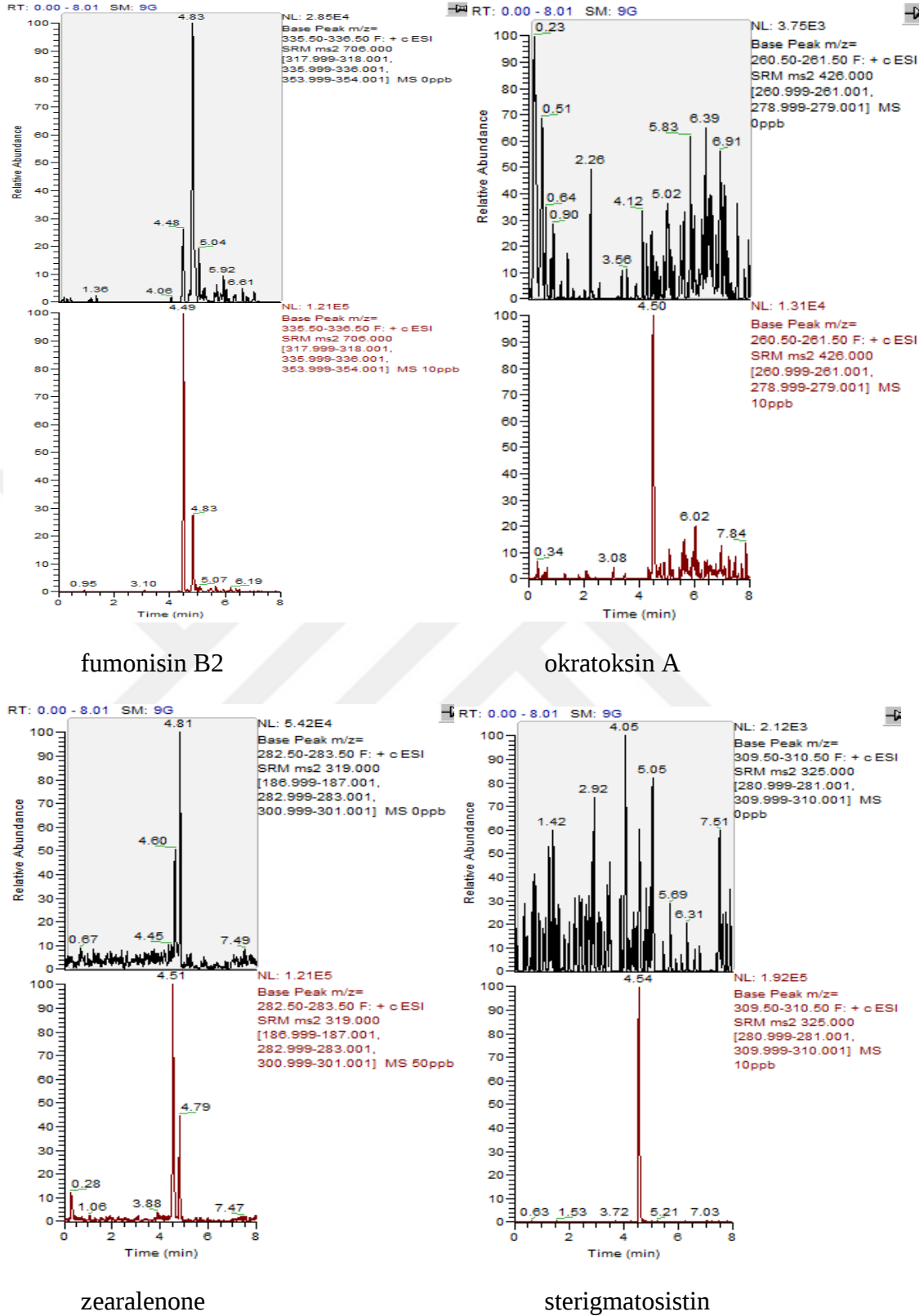
	PİRİNÇ		YULAF	
	QuEChERS	Seyrelt ve enjekte et	QuEChERS	Seyrelt ve enjekte et
Nivalenol	22,5	28,4	30,1	33,8
Deoksinivalenol	67,0	87,9	46,4	99,0
Fumonisin B1	97,8	85,4	87,1	87,0
Beta zearalenol	111,2	106,8	52,9	84,8
Fumonisin B2	323,0	288,4	259,2	272,5
Okratoksin A	137,4	74,4	27,8	59,0
Zearalenon	125,2	113,7	52,1	77,6
Sterigmatosistin	144,1	161,0	108,8	127,5

4.5.2. Seçicilik

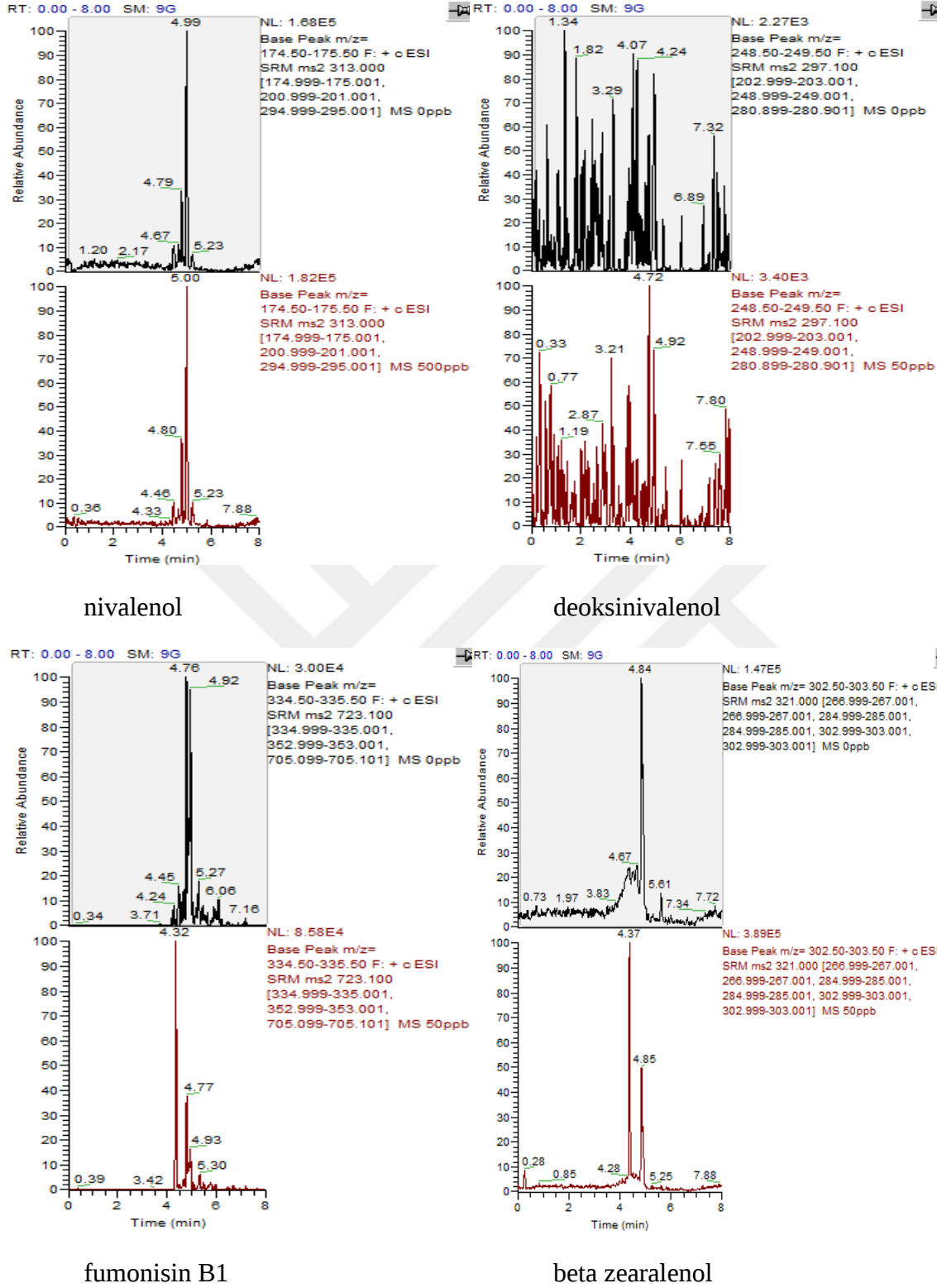
Tandem kütle spektrometrelerinin (MSMS), yüksek çözünürlük gücüne sahip olması analizlerde seçiciliğin artmasını sağlamaktadır. Bu durum matrikste özellikle eser miktarda bulunan analitlerin diğer matriks bileşiklerinden ayrılabilmesinde önemlidir. Analitin alıkonma zamanında başka bir kromatografik sinyalin olmaması kimyasal veya matriks etkileşiminin olmadığını göstermektedir (Frenich vd. 2009). Geliştirilen metodun seçiciliğini belirlemek amacıyla 2 farklı matriksteki kör numuneler ve farklı konsantrasyonda standart karışım ilave edilen numuneler QuEChERS ve “seyrelt ve enjekte et” yöntemi ile ekstrakte edilip analiz edilmiştir. Analitlere ait kromatogramlar Şekil 4.77-4.80’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde analizlerin yüksek seçicilikte yapıldığı belirlenmiştir.



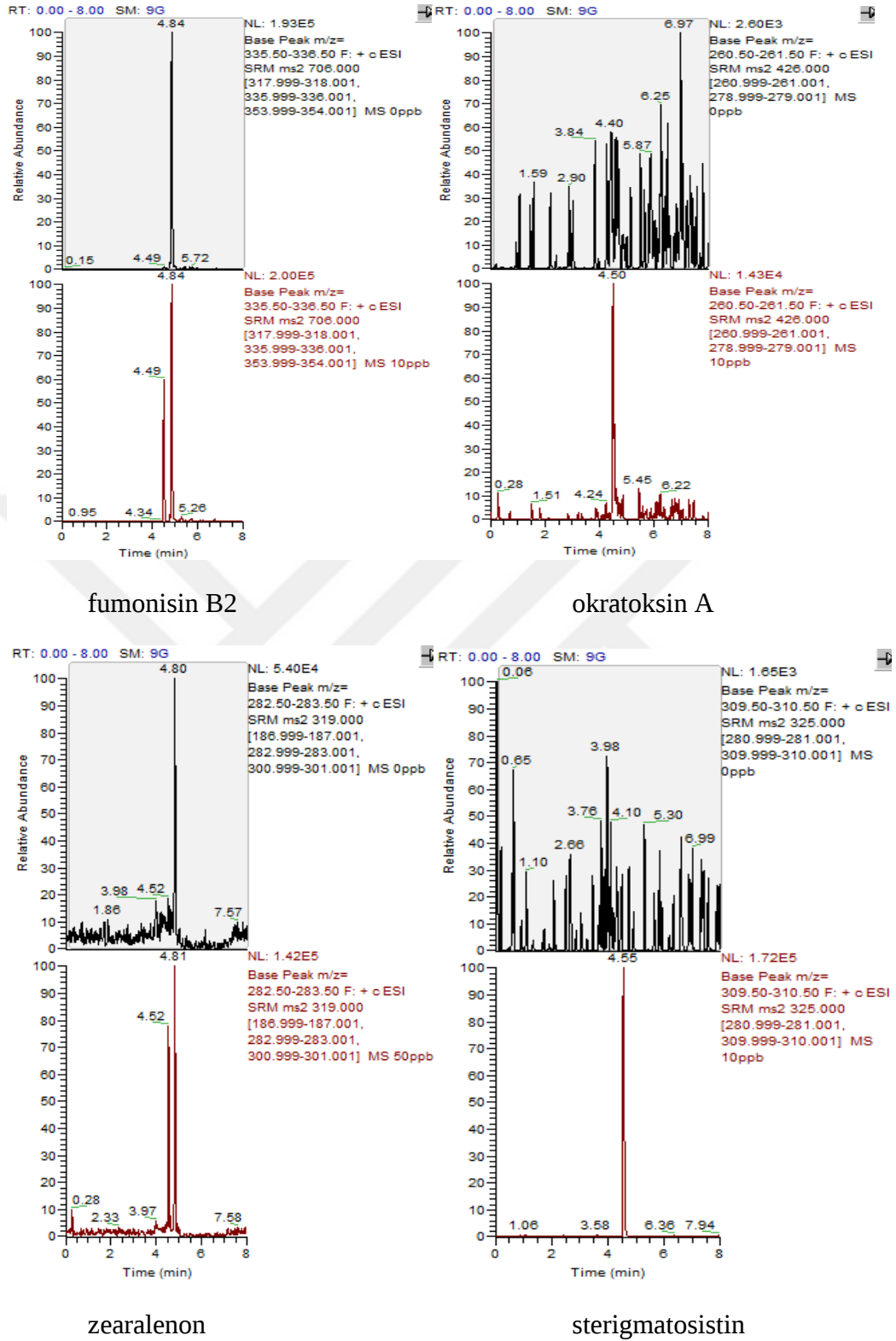
Şekil 4.77. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş pirinç örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar seyrelt ve enjekte et yöntemi ile elde edilmiştir)



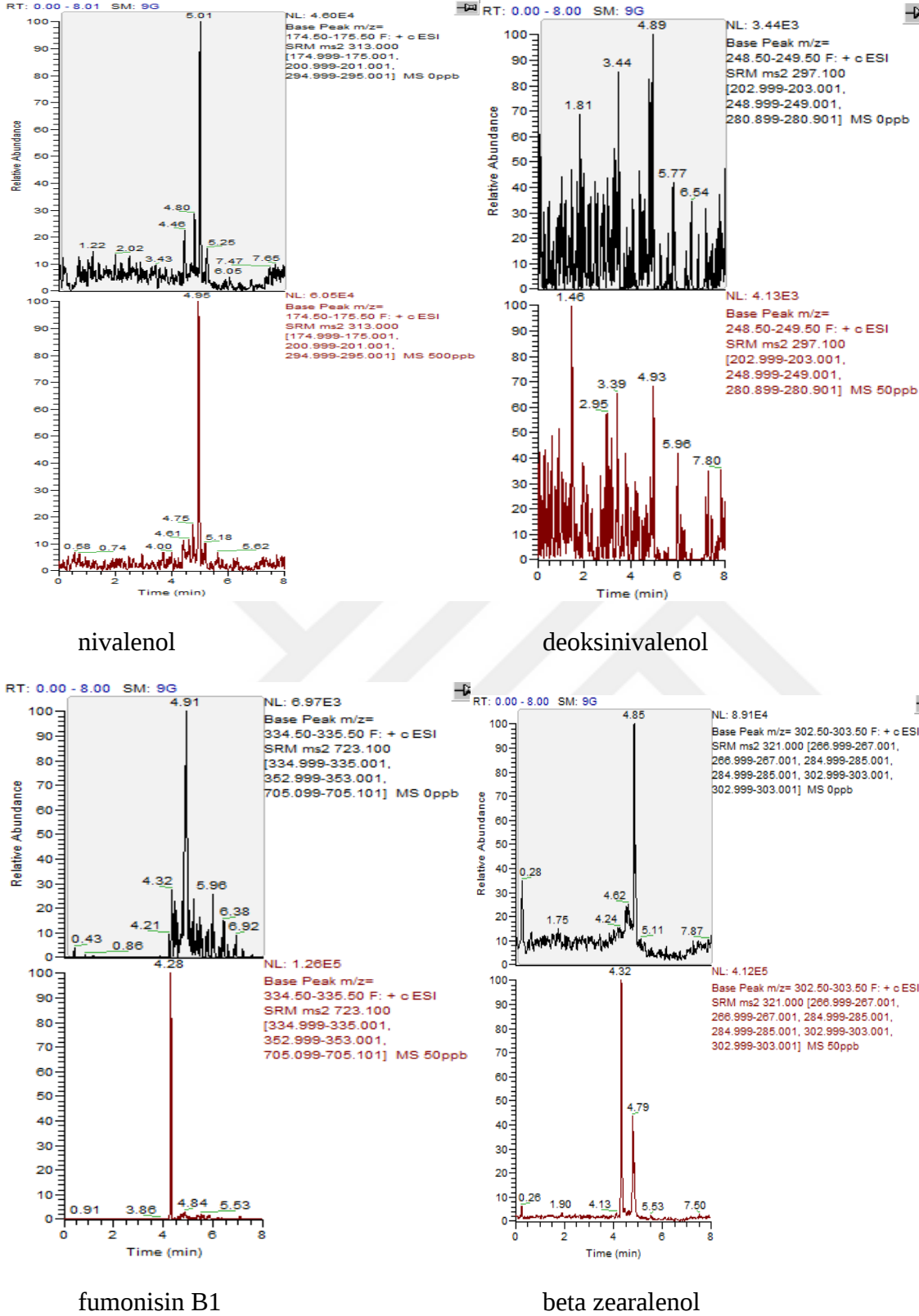
Şekil 4.77. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş pirinç örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar seyrelt ve enjekte et yöntemi ile elde edilmiştir) (devamı)



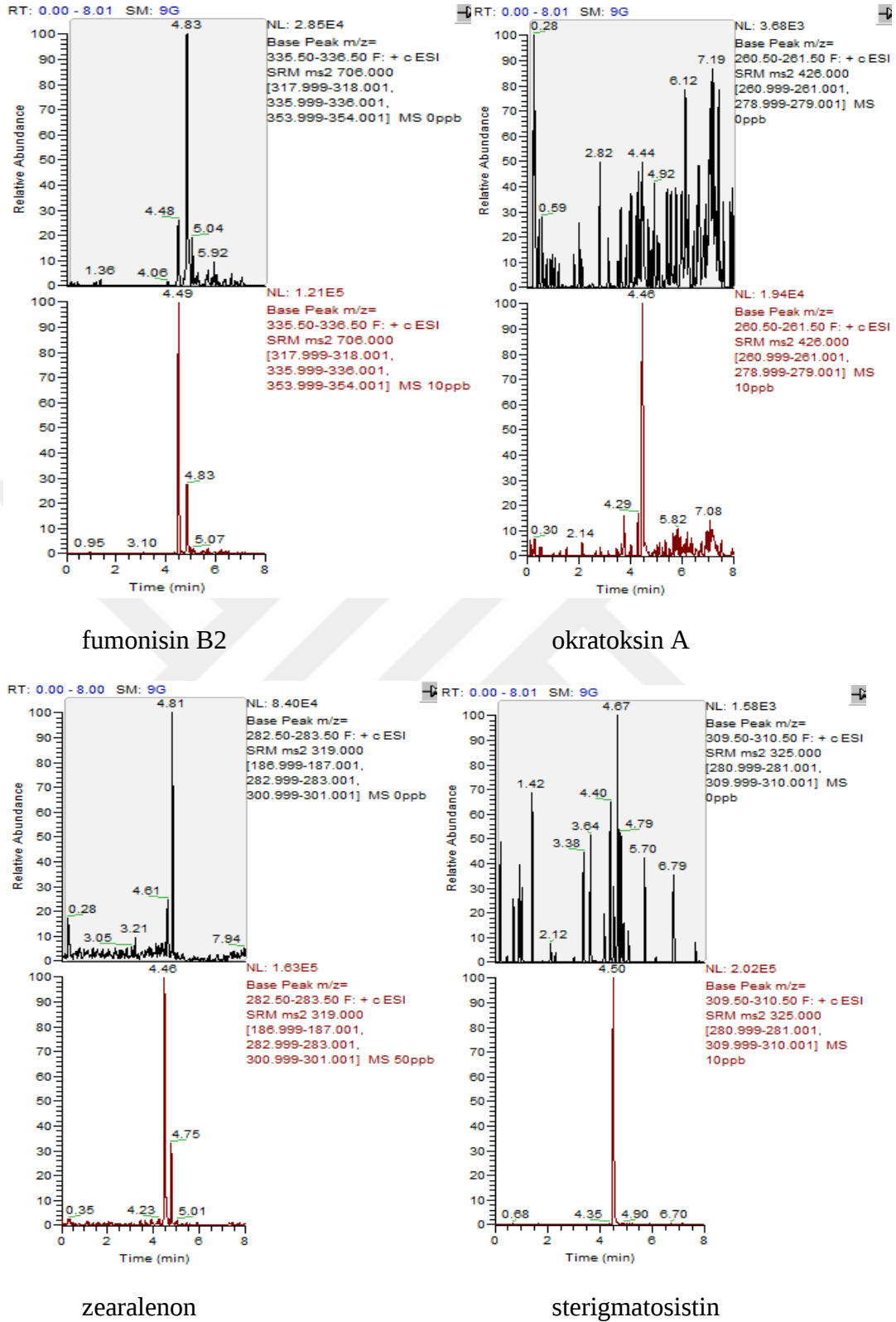
Şekil 4.78. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş yulaf örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar seyrelt ve enjekte et yöntemi ile elde edilmiştir)



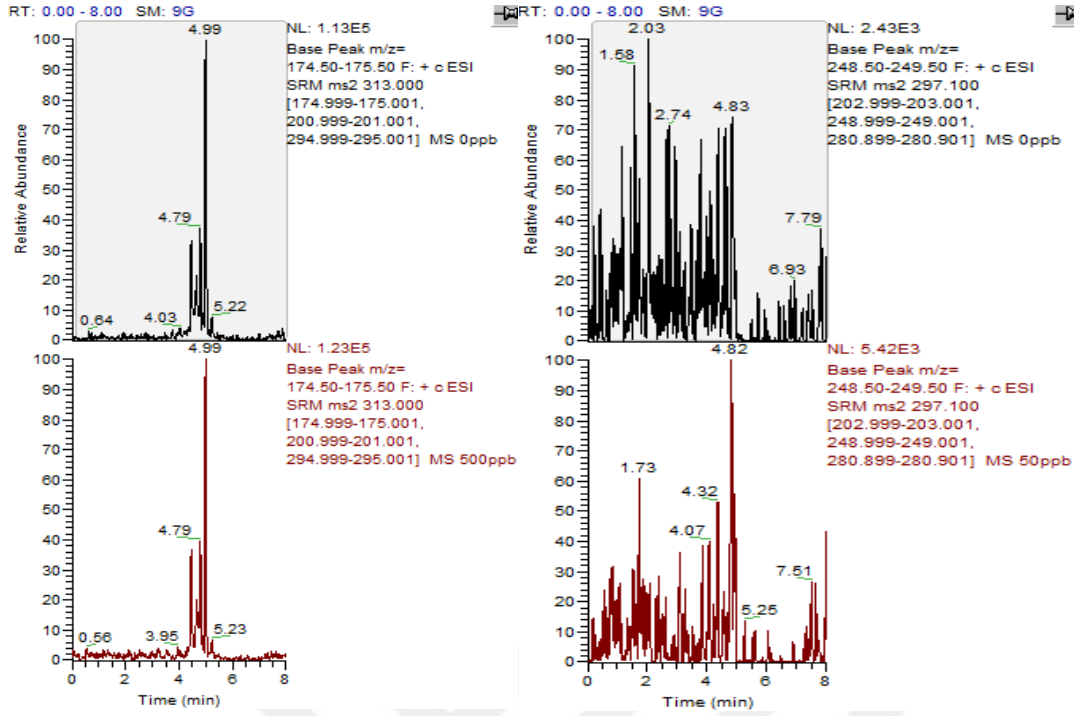
Şekil 4.78. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş yulaf örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar seyrelt ve enjekte et yöntemi ile elde edilmiştir) (devamı)



Şekil 4.79. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş pirinç örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)

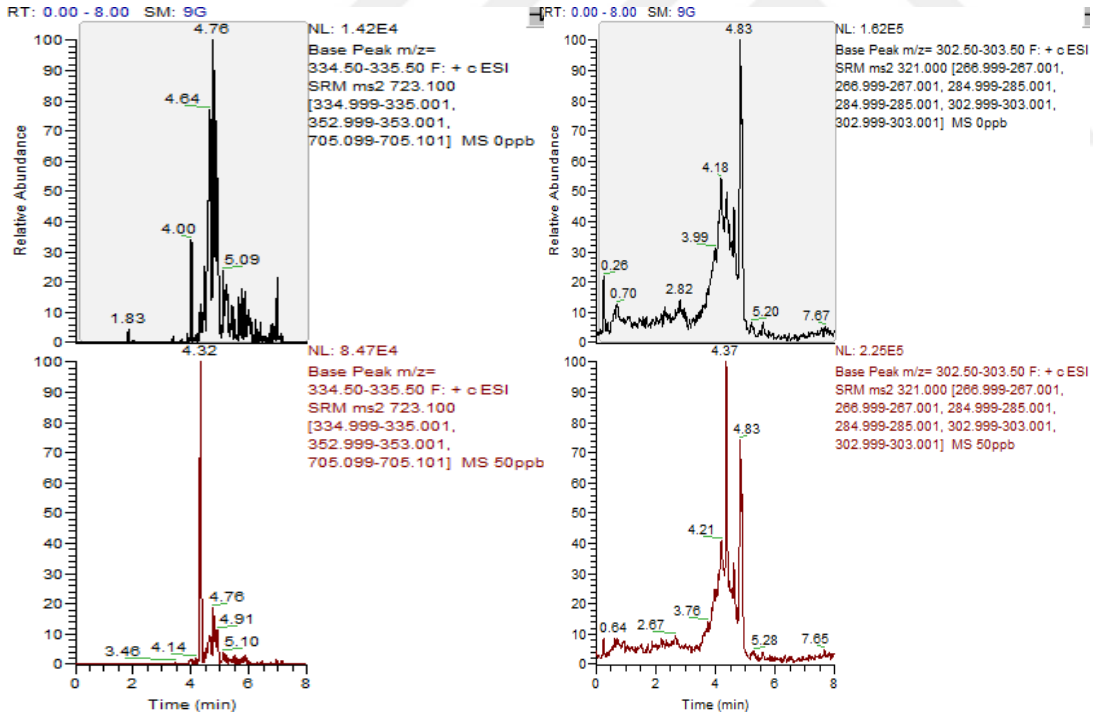


Şekil 4.79. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş pirinç örneklere ait kromatogramlar (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir) (devamı)



nivalenol

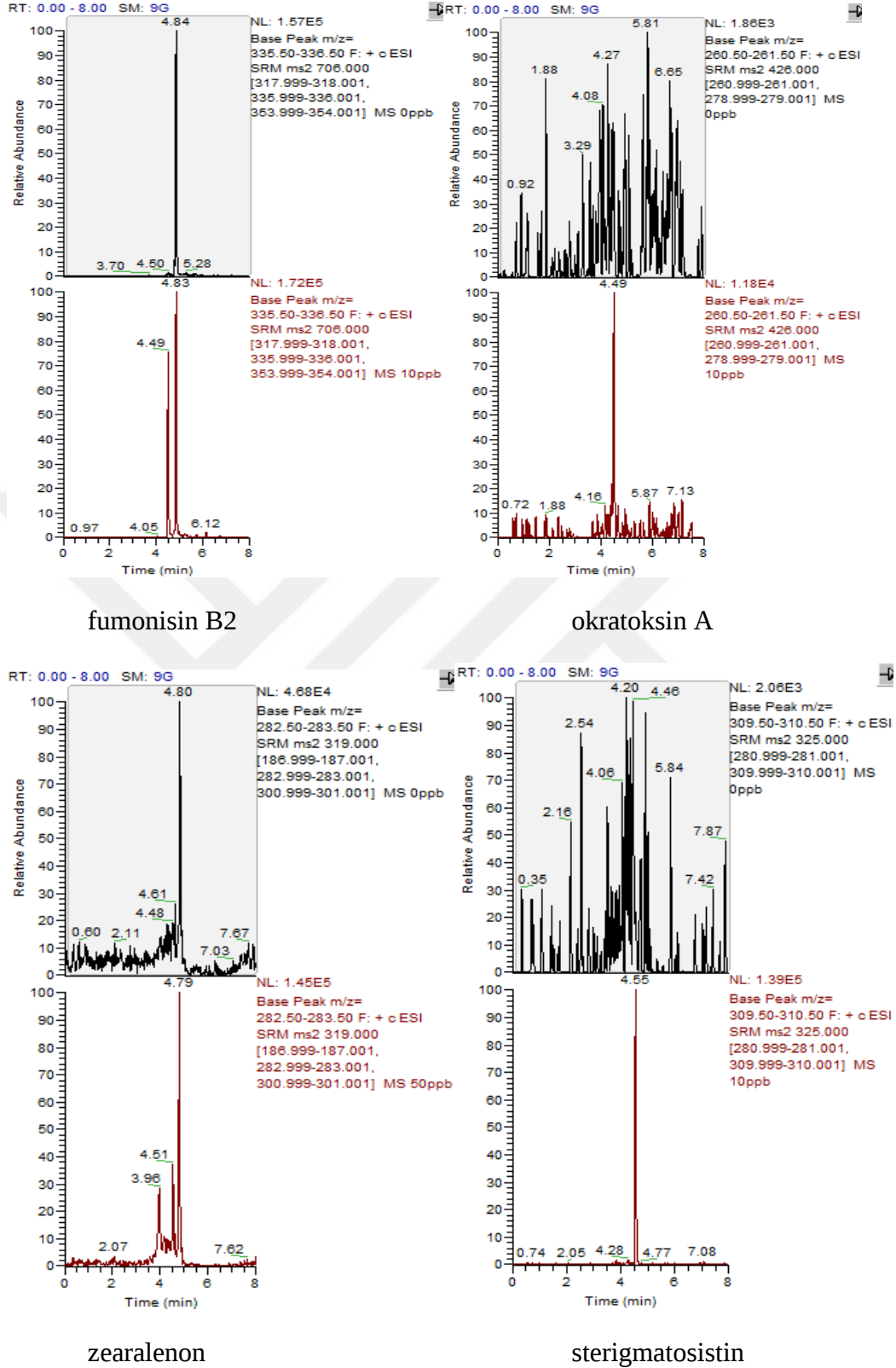
deoksinivalenol



fumonisin B1

beta zearalenol

Şekil 4.80. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş yulaf örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)



Şekil 4.80. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş yulaf örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir) (devamı)

4.5.3. Tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ)

Analitler için bulunan LOQ değerlerinin, o analite ait MRL değerinin altında veya daha çok tercih edilen miktar olan $\frac{1}{2}$ MRL değerinde olması gerekmektedir (Kay ve MacNeil 2012). Daha önce de belirtildiği üzere ülkemizde 1881/2006/EC sayılı Gıdalardaki Belirli Bulaşanların Maksimum Limitlerinin Belirlenmesi Hakkında Avrupa Birliği Komisyon Tüzüğüne paralel olarak hazırlanan TGK- Bulaşanlar Yönetmeliğine göre gıdalarda bulunabilen belirli bulaşanların maksimum limitleri belirlenmiştir. Bu yönetmelikte aflatoksinler (B1, B1+B2+G1+G2 ve M1), OTA, Patulin, DON, ZEN ve fumonisinler (FB1+FB2) için maksimum limit belirlenmiş olup, tez çalışması kapsamındaki NIV, beta ZOL ve STE için geçerli bir limit bulunmamaktadır. Bu çalışmada analitlerin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,1-9,80 ve 0,32-32,67 µg/kg aralığında tespit edilmiştir (Çizelge 4.22).

Literatürde tahıllarda seyrelt ve enjekte et yöntemi ile elde edilen ekstraktlar LC/ESI-MS/MS ile analiz edilmiş ve mikotoksinlerin LOD değerleri 0,03-220 µg/kg olarak belirlenmiştir (Sulyok vd 2006). Berthiller vd (2007) Sulyok vd (2006) 'nin çalışmasının daha da genişletildiğini ve 90 mikotoksin ve metabolitinin tahıllarda LC-ESI-MS/MS ile analiz edildiğini bildirmektedir. LOD değeri 0,03-30 ppb aralığında hesaplanmıştır. Frenich vd. (2009) tarafından tahıllarda yapılan diğer bir çalışmada ACN/H₂O (80/20v/v) ile basit ekstraksiyondan elde edilen ekstraktlar UHPLC-MS/MS ile analiz edilmiş ve mikotoksinlerin LOQ değerleri 0,03-6,30 µg/kg arasında tespit edilmiştir. Beltran vd (2009) tarafından yapılan bir çalışmada farklı gıda maddelerinde 11 mikotoksin ACN/H₂O 80+20 (v/v) % 0,1 asetik asitli ekstraksiyon çözücüsü ile ekstrakte edilerek UHPLC-MS/MS (üçlü kuadrupol) ile analizi yapılmıştır. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla DON için 25-45 ppb, 80-150 ppb; HT-2 için 2-5 ppb, 6,5-15 ppb ve diğer toksinler için ise 0,1-1 ppb ve 0,3-3,5 ppb olarak hesaplanmıştır. Romagnoli vd (2010) tarafından kahvaltılık çerezler ve bebek gıdalarında yapılan çalışmada 4 mikotoksin LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. LOD değeri DON için 60 ppb, diğer toksinler için 10 ppb olarak hesaplanmıştır. Frenich vd (2011)'nin yaptıkları başka bir çalışmada yumurta örnekleri 1. basamak QuEChERS ile ekstraksiyon yapıldıktan sonra daha fazla bir temizleme aşamasına ihtiyaç duyulmadan 10 mikotoksin UHPLC-MS/MS (üçlü kuadrupol) ile analizi yapılmıştır. Çalışmada LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,5-5 ppb ve 1-10 ppb aralığında hesaplanmıştır.

Tahıllarda mikotoksin tespitine yönelik yapılan başka bir çalışmada ACN/H₂O/asetik asit (79/20/1 v/v/v) ile basit ekstraksiyondan sonra ileri bir temizleme aşamasına ihtiyaç duyulmadan elde edilen ekstraktlar LC-MS/MS ile analiz edilmiş ve analitlerin LOQ değerleri 0,02-40 ng/g arasında tespit edilmiştir (Soleimany vd. 2012). Juan vd (2012) tarafından yapılan çoklu mikotoksin analizinde buğday, yulaf, arpa ve kılçıksız buğday ACN/H₂O 84+16 (v/v) ekstraksiyon çözücüsü ile ekstrakte edilerek 12 mikotoksin LC-MS/MS (üçlü kuadrupol) ile analiz edilmiştir. LOQ değeri 2,5-25 ppb arasında hesaplanmıştır. Tang vd. (2013) tarafından pirinç, mısır, buğday ve yerfıstığında yapılan bir diğer çalışmada ekstraksiyonda immüno affinite kolon kullanılmış ve 11 mikotoksin LC-MS/MS cihazı ile analiz edilmiştir. LOD değeri FB1 ve FB2 için 20 ppb diğer toksinler için ise 5 ppb'nin altında hesaplanmıştır.

Arroyo-Manzanares vd (2013) tarafından yenilebilir çerezler ve çekirdeklerde yapılan çoklu mikotoksin analizinde UHPLC-MS/MS cihazı kullanılmış ve 14

mikotoksin analiz edilmiştir. Aflatoksinler dışındaki diğer toksinler QuEChERS'in ilk aşamasına dayalı olarak ekstrakte edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,17-45,1 ppb ve 0,57-150 ppb olarak hesaplanmıştır. Tahıllarda yapılan diğer bir çalışmada, Arroyo-Manzanares vd (2014) tarafından temizleme aşaması olmadan QuEChERS yönteminin ilk aşaması kullanılarak elde edilen ekstraktlar UHPLC-MS/MS cihazı ile analizi yapılmış ve mikotoksinlerin LOQ değerlerinin 0,23-233 µg/kg aralığında olduğu belirlenmiştir. Azaiez vd. (2014) tarafından yapılan bir diğer çalışmada kuru meyvelerde QuEChERS yöntemiyle ekstraksiyon yapıldıktan sonra ileri bir temizleme aşaması yapılmadan 16 mikotoksin LC-ESI-MS/MS (üçlü kuadropol) ile analiz edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,08-15 ppb ve 0,2-45 ppb olarak hesaplanmıştır.

Desmarchelier vd (2014) tarafından yapılan başka bir çalışmada 7 farklı matrikste 15 mikotoksin HPLC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Ekstraksiyonda QuEChERS yöntemi uygulanmış ve temizleme aşaması immuno affinite kolon ile yapılmıştır. LOQ değeri aflatoksin ve OTA için sırasıyla 0,05-0,25 ppb'dir. Pirincin de içinde bulunduğu karmaşık tahıl bazlı ürünlerde mikotoksin analizi için seyrelt ve enjekte et yöntemi kullanılarak elde edilen ekstraktlar LC-MS/MS ile analiz edilmiş ve mikotoksinlerin LOQ değerlerinin 0,06-20 µg/kg aralığında olduğu tespit edilmiştir (De Santis vd. 2017). Franco vd. (2018) tarafından pirincin de içinde bulunduğu farklı matrikslerde yapılan diğer bir çalışmada yine seyrelt ve enjekte et yöntemi kullanılmış ve ekstraksiyon sonucunda LC-MS/MS cihazında analiz edilen örneklerdeki mikotoksinlerin LOQ değerlerinin 0,3-18,8 µg/kg aralığında olduğu tespit edilmiştir. Pirinçte yapılan bir diğer çalışmada mikotoksin analizinde seyrelt ve enjekte et yöntemi kullanılarak elde edilen ekstraktlar UHPLC-MS/MS cihazı ile analiz edilmiş ve analitlerin LOQ değerinin 0,5-103,1 µg/kg aralığında değiştiği tespit edilmiştir (Da Silva vd. 2019). Scarpino vd (2019) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise mısır ve buğdayda eser miktarda bulunabilen 17 tane mikotoksinin analizi yapılmıştır. Seyrelt ve enjekte et ekstraksiyon yöntemiyle matriksten ekstrakte edilen mikotoksinler direkt olarak ve temizleme kartuşu ile temizlenmiş olmak üzere 2 farklı şekilde HPLC-ESI-TQ-MS/MS (üçlü kuadropol) cihazı ile analiz edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,3-3 ppb ve 1-10 ppb aralığında hesaplanmıştır.

Çizelge 4.22. Analitlere ait LOD (µg/kg) ve LOQ değerleri (µg/kg)

	QuEChERS				Seyrelt ve enjekte et			
	Pirinç		Yulaf		Pirinç		Yulaf	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Nivalenol	6,31	21,02	6,36	21,22	9,80	32,67	5,89	19,64
Deoksinivalenol	0,87	2,92	1,38	4,60	0,61	2,04	1,34	4,48
Fumonisin B1	1,81	6,02	1,03	3,42	1,67	5,57	0,80	2,67
Beta zearalenol	0,75	2,49	0,76	2,52	0,92	3,07	0,69	2,29
Fumonisin B2	0,11	0,37	0,59	1,97	0,13	0,44	0,55	1,85
Okratoksin A	0,25	0,82	0,10	0,32	0,16	0,52	0,14	0,47
Zearalenone	0,78	2,60	0,82	2,73	0,61	2,03	0,97	3,23
Sterigmatosistin	0,32	1,05	0,41	1,36	0,32	1,07	0,40	1,32

Abreu vd (2020) tarafından kakaoda yapılan bir çalışmada QuEChERS ve seyrelt ve enjekte et yaklaşımına dayanılarak ekstrakte edilen 42 mikotoksin LC-MS/MS cihazı ile analiz edilmiştir. LOQ değerleri 1-33 ppb arasında hesaplanmıştır. De Colli vd (2020) tarafından yapılan bir diğer çalışmada yulaf 42 mikotoksin temizleme aşaması olmadan QuEChERS yöntemiyle ekstrakte edilerek UHPLC-MS/MS (üçlü kuadropol) cihazı ile analiz edilmiştir. Yapılan çalışmada LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,14-33 µg/kg ve 0,5-100 µg/kg arasında elde edilmiştir.

4.5.4. Doğruluk ve kesinlik

Literatür kısmında da belirtildiği gibi doğruluk, analiz sonucunda elde edilen değer ile gerçek değer birbirine yakınlığını ifade etmektedir. Doğruluğun tespiti için sertifikalı referans madde ve referans metot kullanılmaktadır. Ancak, bunların bulunmadığı durumlarda doğruluk geri kazanım çalışması ile belirlenmektedir. Bu çalışmada, geliştirilen analiz metodunun doğruluk çalışması için kör numuneler olarak seçilen pirinç ve yulafa OTA, STE ve FB2 için 5, 20 ve 50 µg/kg; ZEN, DON, FB1 ve Beta-ZOL için 25,100 ve 250 µg/kg; ve NIV için (250, 1000 ve 2500 µg/kg) olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda standart karışımdan ilave edilmiştir. Bu değerler çalışmanın ölçüm aralığında bulunmaktadır ve geri kazanım çalışması her bir konsantrasyonda 6 tekrarlı yapılmıştır. Kesinlik ise ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığını ifade etmektedir ve birbirinden bağımsız analiz sonuçlarının arasındaki tutarlılığı göstermektedir. Kesinlik, doğruluğun bir bileşenidir ve tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik olarak 2 ölçümü mevcuttur. Bu çalışmada, tekrarlanabilirlik aynı gün içerisinde kör numunelerin yukarıda belirtildiği gibi 3 farklı konsantrasyonda zenginleştirilerek her bir konsantrasyonda 6 tekrarlı yapılan analiz sonucunda elde edilen değerlerin; tekrar üretilebilirlik ise tekrarlanabilirlik çalışmasının 3 farklı günde yapılması sonucunda elde edilen değerlerin bağıl standart sapması (%RSD) hesaplanarak değerlendirilmiştir. Çizelge 4.23-4.24’de iki farklı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak elde edilen ekstraktların analiz edilmesi sonucunda elde edilen verilere göre hesaplanan % geri kazanım oranları ve bağıl standart sapma değerleri verilmiştir. Çizelgelerde tekrarlanabilirlik gün içi RSD ve tekrar üretilebilirlik ise günler arası RSD olarak belirtilmiştir.

Literatürde gıdalarda mikotoksin kalıntılarının yapıldığı analizlerde genel olarak validasyon çalışması için bu grubun MRL değeri veya bu değer 1/2 konsantrasyonu (0,5 MRL) kullanılmıştır. Analitik metotların validasyon çalışmasında baz alınan Avrupa Birliği Komisyon Kararı’na göre 10 µg/kg konsantrasyonda yapılan çalışmalar için geri kazanım değeri %60-115, tekrarlanabilirlik RSD’si <%20, tekrar üretilebilirlik RSD’si ise <%30 olarak kararlaştırılmıştır. Metot validasyonunun bu konsantrasyonun altındaki değerlerde yapıldığı durumlarda RSD değerlerinin mümkün olduğunca düşük olması gerektiği belirtilmiştir (Anonymous 2002).

Elde edilen sonuçlara göre, analitlerin geri kazanım oranlarının pirinçte QuEChERS yönteminde %72,2-98,6 ve seyrelt ve enjekte et yönteminde %70,8-97,9; yulaf 42 mikotoksin temizleme aşaması olmadan QuEChERS yönteminde %73,2-99,0 ve seyrelt ve enjekte et yönteminde %71,0-98,4 değerleri arasında değiştiği tespit edilmiştir. Gün içi RSD değerlerinin pirinçte QuEChERS yönteminde %1,0-9,5 ve seyrelt ve enjekte et yönteminde %0,7-12,9; yulaf 42 mikotoksin temizleme aşaması olmadan QuEChERS yönteminde %0,7-6,9 ve seyrelt ve enjekte et yönteminde %1,0-7,4 değerleri arasında; günler arası RSD değerlerinin pirinçte QuEChERS yönteminde %0,9-17,9 ve

seyrelt ve enjekte et yönteminde %0,7-18,8; yulafta QuEChERS yönteminde %0,3-19,1 ve seyrelt ve enjekte et yönteminde %0,6-19,2 değerleri arasında değiştiği belirlenmiştir.

Veriler incelendiğinde bu çalışmada elde edilen sonuçların standartlara uygun olduğu gözlemlenmiştir. Her iki ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen geri kazanım oranlarının birbirine yakın olduğu ve QuEChERS yönteminde geri kazanımın pirinçte % 0,7-1,4; yulafta %0,6-2,2 arasında yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca her iki ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen değerlerin hem gün içi hem de günler arası RSD değerlerinin birbirine yakın olduğu, seyrelt ve enjekte et yöntemi ile elde edilen gün içi RSD değerlerin yulafta %0,3-0,5 arasında daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Sulyok vd (2006) tarafından buğday ve mısırdaki mikotoksin analizinde validasyon çalışması her bir analit için farklı konsantrasyonda olmak üzere 3,30-4000 µg/kg düzeyinde yapılmıştır ve seyrelt ve enjekte et yönteminde geri kazanım değerleri en düşük konsantrasyonda %40,4'ün altında bağıl standart sapma ile %57-110 aralığında elde edilmiştir. Frenich vd. (2009) tarafından tahıl ve ürünlerinde yapılan çalışmada tek basamaklı ekstraksiyon yöntemi uygulanmış ve geri kazanım oranları % 20,4'ün altında bağıl standart sapma ile % 70,2-108,4 arasında tespit edilmiştir. Beltran vd (2009) tarafından yapılan bir çalışmada ise farklı gıda maddelerinde 11 mikotoksin ACN/H₂O 80+20 (v/v) % 0,1 asetik asitli ekstraksiyon çözütüsü ile ekstrakte edilerek UHPLC-MS/MS (üçlü kuadropol) ile analizi yapılmıştır. Geri kazanım oranı % 20'nin altında bağıl standart sapma ile %70-110 aralığında elde edilmiştir.

Romagnoli vd (2010) tarafından kahvaltılık çerezler ve bebek gıdalarında yapılan çalışmada 4 mikotoksin LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Tüm analitler için %60-100 arasında geri kazanım sağlanmıştır. Frenich vd (2011)'nin yaptıkları başka bir çalışmada yumurta örnekleri QuEChERS ile ekstraksiyon yapıldıktan sonra daha fazla bir temizleme aşamasına ihtiyaç duyulmadan 10 mikotoksin UHPLC-MS/MS (üçlü kuadropol) ile analizi yapılmıştır. 10, 25, 50 ve 100 ppb'de geri kazanım çalışması yapılmış ve AFG1 ve OTA'da 10 ppb ve AFG2'de 50 ppb haricinde % 25'in altında bağıl standart sapma ile % 70-110 aralığında geri kazanım elde edilmiştir. Soleimany vd. (2012) tarafından tahıllarda mikotoksin tespitine yönelik yapılan çalışmada ileri bir temizleme aşamasına ihtiyaç duymadan basit ekstraksiyonla yapılan çalışmada ise geri kazanım oranı % 76,8-108,4 arasında tespit edilmiştir.

Juan vd (2012) tarafından yapılan çoklu mikotoksin analizinde buğday, yulaf, arpa ve kılçıksız buğday ACN/H₂O 84+16 (v/v) ekstraksiyon çözütüsü ile ekstrakte edilerek 12 mikotoksin LC-MS/MS (üçlü kuadropol) ile analiz edilmiştir. Geri kazanım tüm analitler için %70 'in üzerinde elde edilmiş ve tekrarlanabilirlik bağıl standart sapması %11'in altında belirlenmiştir. Arroyo-Manzanares vd (2013) tarafından yenilebilir çerezler ve çekirdeklerde yapılan çoklu mikotoksin analizinde UHPLC-MS/MS cihazı kullanılmış ve 14 mikotoksin analiz edilmiştir. Metodun kesinliği her zaman %11 'in altında ve geri kazanım değeri %60,7-104,3 arasında elde edilmiştir. Arroyo-Manzanares vd. (2014) tarafından pirincinde içinde bulunduğu farklı matrikslerde 1. basamak QuEChERS ile temizleme aşaması uygulanmadan yapılan ekstraksiyondan elde edilen ekstraktlarda mikotoksinlerin geri kazanım oranları %12'nin altında bağıl standart sapma ile % 60,0-103,5 arasında tespit edilmiştir.

Malachova vd. (2014) tarafından 4 farklı gıda matriksinde 295 bakteriyel ve fungal metabolitin tespitine yönelik yapılan çalışmada bu tez çalışması kapsamındaki

analitler için geri kazanım oranı %44-158 arasında tespit edilmiştir. Azaiez vd. (2014) tarafından yapılan bir diğer çalışmada kuru meyvelerde QuEChERS yöntemiyle ekstraksiyon yapıldıktan sonra ileri bir temizleme aşaması yapılmadan 16 mikotoksin LC-ESI-MS/MS (üçlü kuadrupol) ile analiz edilmiştir. Geri kazanım değeri %60-135 arasında elde edilmiştir. Desmarchelier vd (2014) tarafından yapılan başka bir çalışmada 7 farklı matrikste 15 mikotoksin HPLC–MS/MS ile analiz edilmiştir. Ekstraksiyonda QuEChERS yöntemi uygulanmış ve temizleme aşaması immuno affinite kolon ile yapılmıştır. Geri kazanım %71-118 arasında, kesinlik %33'ün altında bağıl standart sapma ile ve %78-117 arasında doğruluk elde edilmiştir.

De Santis vd. (2017) tarafından pirincinde içinde bulunduğu karmaşık tahıl ürünlerinde mikotoksin tayini üzerine yapılan çalışmada seyrelt ve enjekte et yöntemi uygulanmış ve geri kazanım oranları %20'nin altında bağıl standart sapma ile %52-119 arasında tespit edilmiştir. Franco vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada benzer şekilde seyrelt ve enjekte et yöntemi uygulanmış ve pirinçinde içinde bulunduğu farklı matrikslerde geri kazanım oranları %93-111 arasında tespit edilmiştir. Da Silva vd. (2019) tarafından pirinçte yapılan diğer bir çalışmada ise yine seyrelt ve enjekte et yöntemi kullanılmıştır ve validasyon çalışması 3 farklı konsantrasyonda OTA için 1,5, 3,0 ve 4,5 µg/kg; DON ve ZEN için 50, 100 ve 150 µg/kg; FB1 ve FB2 için 100, 200 ve 300 µg/kg'da gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım değerlerinin %3,1-18,3 bağıl standart sapma ile %85,9-104,6 arasında olduğu tespit edilmiştir.

Scarpino vd. (2019) tarafından buğday ve mısırdaki *Aspergillus* ve *Fusarium* mikotoksinlerinin tespitine yönelik yapılan çalışmada da ekstraksiyon seyrelt ve enjekte et yöntemi ve Oasis Prime HLB kartuşu kullanılarak yapılmış ve geri kazanım oranları mısırdaki seyrelt ve enjekte et yönteminde %62-106, Oasis Prime HLB metotta ZEN (%41) hariç %63-114; buğdayda seyrelt ve enjekte et ve Oasis Prime HLB metotta FB1 hariç (%41 ve %44) sırasıyla %63-128 ve %61-125 arasında tespit edilmiştir.

Abreu vd (2020) tarafından kakaoda yapılan bir çalışmada QuEChERS ve seyrelt ve enjekte et yaklaşımına dayanarak ekstrakte edilen 42 mikotoksin LC-MS/MS cihazı ile analiz edilmiştir. ZEN'in de dahil olduğu 4 toksinde geri kazanım oranı istenilen %70-120 değerinin arasında tespit edilmiştir. De Colli vd (2020) tarafından yapılan bir diğer çalışmada yulafta 42 mikotoksin temizleme aşaması olmadan QuEChERS yöntemiyle ekstrakte edilerek UHPLC-MS/MS (üçlü kuadrupol) cihazı ile analiz edilmiştir. Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik koşullarında, gerçeklik % 78-158 arasında, kesinlik ise %1,7-49,9 arasında elde edilmiştir.

Çizelge 4.23. Pirinç ile yapılan analizlere ait geri kazanım oranları, gün içi ve günler arası bağıl standart sapma değerleri

	QuEChERS									Seyrelt ve enjekte et								
	1. konsantrasyon			2. konsantrasyon			3. konsantrasyon			1. konsantrasyon			2. konsantrasyon			3. konsantrasyon		
	% ortalama geri kazanım	Gün içi, % RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, % RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, % RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, % RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, % RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, % RSD	Günler arası, %RSD
Nivalenol	98,5	1,0	0,9	85,0	4,3	13,5	94,0	3,6	14,3	93,1	1,3	18,7	90,9	6,2	8,7	92,4	3,5	18,4
Deoksinivalenol	96,6	2,0	1,5	91,4	4,5	16,8	93,6	4,7	10,2	97,9	0,8	0,73	94,9	5,8	13,5	90,3	5,9	12,5
Fumonisin B1	82,2	5,7	7,1	85,8	5,4	12,2	73,6	7,3	16	84,3	5,1	4,6	75,6	5,0	15,8	70,9	6,4	18,8
Beta zearalenol	98,4	1,3	0,9	87,3	4,2	15,6	82,1	4,0	14,4	95,4	2,2	1,8	88,9	4,8	12,5	85,6	8,5	6,0
Fumonisin B2	75,2	4,7	4,9	78,0	6,2	9,3	72,4	6,7	10,2	80,6	4,7	5,4	82,3	12,9	15,4	70,8	6,5	16,5
Okratoksin A	85,5	1,7	1,6	87,9	7,2	14,9	85,5	4,5	16,2	95,7	1,5	0,8	91,0	7,1	7,6	90,2	5,8	12,1
Zearalenone	98,6	1,4	1,7	95,6	4,5	15,7	76,5	9,2	10,6	97,9	0,7	0,9	95,3	3,9	17,9	91,8	4,3	11,5
Sterigmatosistin	73,9	2,9	3	73,7	9,5	15,1	72,2	7,1	17,9	81,4	11,8	13,8	89,6	4,9	17,3	79,1	4,2	16,7

Çizelge 4.24. Yulaf ile yapılan analizlere ait geri kazanım oranları, gün içi ve günler arası bağıl standart sapma değerleri

	QuEChERS									Seyrelt ve enjekte et								
	1. konsantrasyon			2. konsantrasyon			3. konsantrasyon			1. konsantrasyon			2. konsantrasyon			3. konsantrasyon		
	% ortalama geri kazanım	Gün içi, % RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, % RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, % RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, % RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, % RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, % RSD	Günler arası, %RSD
Nivalenol	99,0	1,0	1,1	95,4	4,3	13,1	94,3	5,7	8,9	94,3	1,1	1,2	95,5	7,4	16,6	95,5	5,7	15,8
Deoksinivalenol	98,7	1,6	0,7	97,8	4,1	15,3	95,1	4,8	10,7	97,3	1,4	1,0	92,9	3,3	16,8	93,6	5,4	10,9
Fumonisin B1	96,5	1,9	1,6	93,5	3,8	17,1	81,5	6,9	13,7	95,3	3,2	3,5	92,6	4,2	12,6	80,5	4,9	16,4
Beta zearalenol	97,8	0,7	0,7	94,9	3,7	14,8	96,9	3,5	15,8	98,4	1,2	1,2	97,2	4,4	10,6	96,4	5,0	9,0
Fumonisin B2	93,4	4,5	4,6	81,8	4,6	17,4	83,9	3,7	17,6	81,8	5,3	5,3	84,7	4,8	15,8	93,5	3,8	15,6
Okratoksin A	98,6	1,0	0,3	95,8	4,7	14,1	94,1	5,8	13,4	97,6	1,0	0,8	92,6	5,7	17,3	93,4	4,9	11,0
Zearalenone	98,1	1,0	1,0	94,9	3,8	14,1	92,2	5,3	12,2	97,1	1,0	0,6	90,2	5,0	12,3	90,2	5,8	17,2
Sterigmatosistin	76,1	3,3	4,6	78,2	5,4	17,3	73,2	4,1	19,1	74,0	3,1	2,6	73,7	6,3	19,2	71,0	6,6	16,2

4.6. Referans Metot ile Geliştirilen Metodun Karşılaştırılması

Çizelge 4.25’te referans metot ile geliştirilen metodun karşılaştırılması verilmiştir.

Çizelge 4.25. Referans metot ve geliştirilen metodun karşılaştırılması

	Referans metot	Geliştirilen metot	
Mobil faz	A: %0,3 formik asit, 5mM a.format:su B: %0,3 formik asit, 5 mM a.format:MeOH	A:%0,1 asetik asit:su B: %0,2 asetik asit:MeOH	
Örnek hazırlama	1. basamak QuEChERS+azot altında kurutma	1. Basamak QuEChERS	Seyrelt ve enjekte et
Doğrusallık	Korelasyon katsayısı (r^2)		
NIV	0,9978	0,9997	0,9997
DON	0,9970	0,9999	0,9999
FB1	0,9977	0,9999	0,9998
FB2	0,9993	0,9999	0,9998
OTA	0,999	0,9999	0,9999
ZEN	0,9988	0,9998	0,9997
STE	0,9982	0,9998	0,9999
LOD/LOQ			
NIV	69,8/233	6,31/21,02	9,80/32,67
DON	5,45/18,2	0,87/2,92	0,61/2,04
FB1	0,2/0,65	1,81/6,02	1,67/5,57
FB2	0,30/1,01	0,11/0,37	0,13/0,44
OTA	0,14/0,48	0,25/0,82	0,16/0,52
ZEN	6,82/22,7	0,78/2,60	0,61/2,03
STE	0,10/0,32	0,32/1,05	0,32/1,07
Geri kazanım(%)			
NIV	60,0-70,1	85,0-98,5	90,9-93,1
DON	81,0-97,6	90,3-97,9	90,3-97,9
FB1	62,8-91,5	73,6-85,8	70,9-84,3
FB2	70,9-97,8	72,4-78,0	70,8-82,3
OTA	94,2-102,8	85,5-87,9	90,2-95,7
ZEN	72,3-98,2	76,5-98,6	91,8-97,9
STE	62,1-98,5	72,2-73,9	79,1-89,6
Gün içi % RSD			
NIV	3,3-7,5	1,0-4,3	1,3-6,2
DON	2,3-9,8	2,0-4,7	0,8-5,9
FB1	0,7-7,3	5,4-7,3	5,0-6,4
FB2	1,3-7,5	4,7-9,3	4,7-12,9
OTA	1,8-8,3	1,7-7,2	1,5-7,1
ZEN	1,5-9,9	1,4-9,2	0,7-4,3
STE	3,5-10,3	2,9-9,5	4,2-11,8

UHPLC cihazında metot geliştirme aşamasında başlangıç parametreleri olarak Arroyo-Manzanares vd. (2014) tarafından geliştirilen metot referans olarak kullanılmış olup, Çizelge 4.25'ten görüleceği üzere referans metotta örnek hazırlama aşamasında 1. basamak QuEChERS ekstraksiyonundan sonra azot altında kurutma işlemi yapılmıştır. Geliştirilen metotta QuEChERS ve seyrelt ve enjekte et ekstraksiyonundan sonra ilave bir işlem uygulanmadan örneğin cihaza enjeksiyonu yapılarak analiz gerçekleştirilmiş ve böylece örnek hazırlama süresi kısaltılmıştır. Doğrusallık çalışmasında referans metotta analitlerin tümü için 0,9970 üzerinde doğrusallık elde edilirken geliştirilen metotta 0,999'un üzerinde doğrusallık elde edilmiştir.

Tespit ve tayin limiti çalışmalarında NIV, DON, FB2 ve ZEN için geliştirilen metotta daha düşük değerler elde edilirken FB1, OTA ve STE için referans metodun değerleri geliştirilen metottan daha düşüktür. Bunun nedeninin seyrelt ve enjekte et ve 1. basamak QuEChERS'tan sonra ilave bir işlemin uygulanmamasının analitlerin LOD ve LOQ değerini arttırmış olabileceği düşünülmektedir.

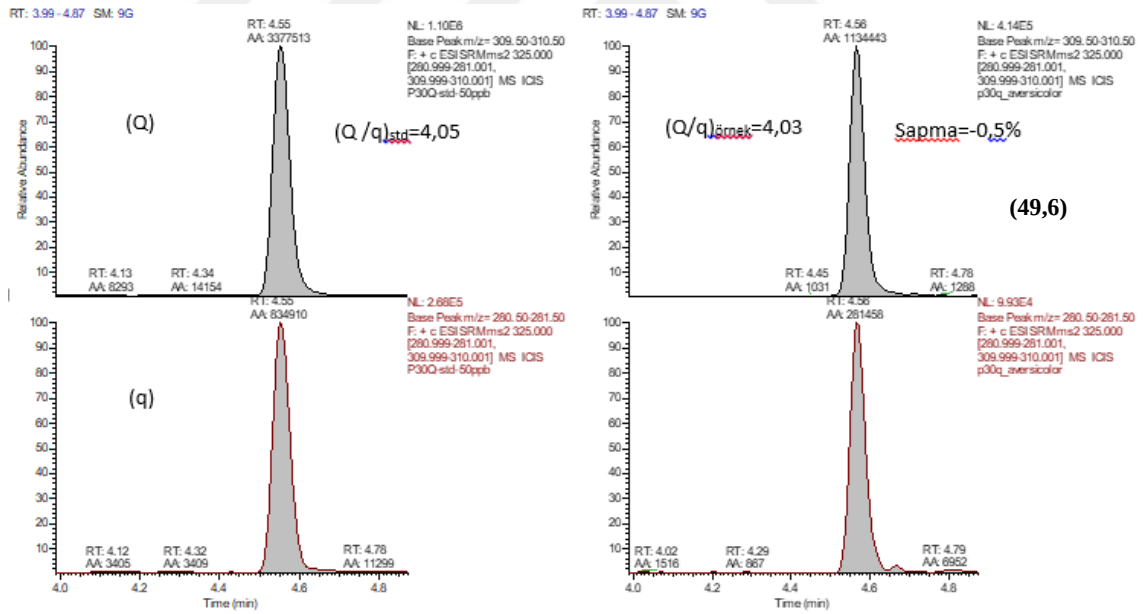
Geri kazanım ve tekrarlanabilirlik (Gün içi %RSD) çalışmalarında, FB2 ve OTA için referans metotta daha yüksek geri kazanım ve daha düşük gün içi % RSD değerleri elde edilmiş ancak diğer analitlerde geliştirilen metotta daha yüksek geri kazanım ve daha düşük tekrarlanabilirlik değerlerine ulaşılmıştır. Referans metotta geri kazanım değerleri %60,0-102,8 iken geliştirilen metotta %70,8-98,6 değerleri arasında elde edilmiştir. Gün içi %RSD referans metotta 10,3'ten küçük iken geliştirilen metotta 12,9 değerinden küçük olarak tespit edilmiştir.

4.7. Örneklerin Analizi

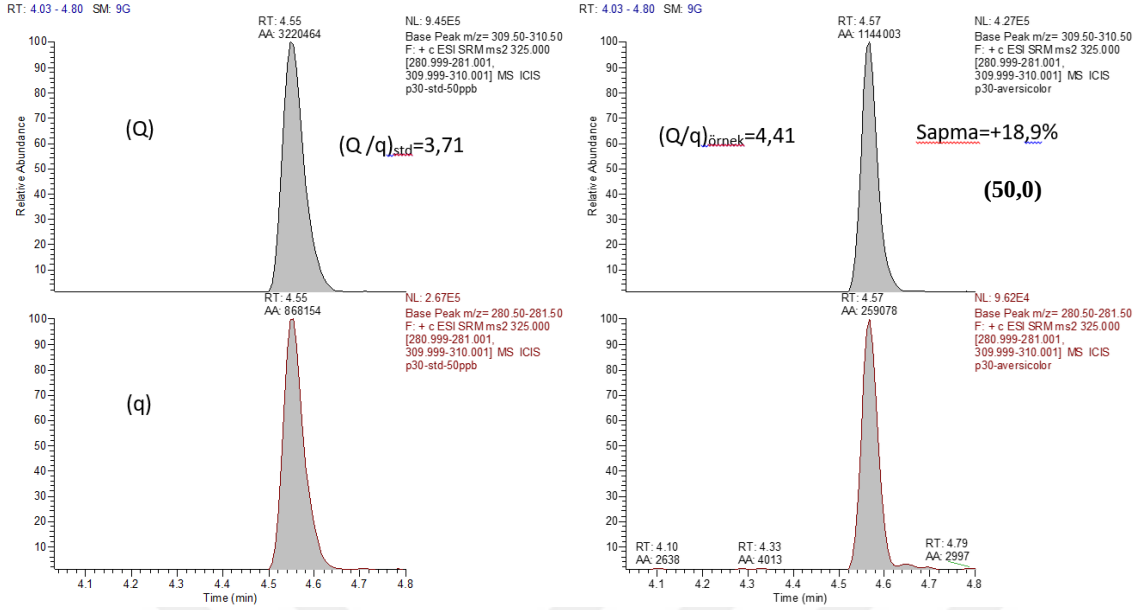
Çalışma kapsamında 39 pirinç ve 10 yulaf örneği ile *Aspergillus versicolor* ile kontamine pirinç ve yulaf örnekleri her iki ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilip geliştirilen metot ile analiz edilmiştir. Şekil 4.81'de görüntüsü verilen ve çalışma süresince pasajı yapılan *A. versicolor* küfü ile kör pirinç ve yulaf örnekleri kontamine edilmiş ve etüvde 25 °C'de 10 gün inkübe edilmiştir. Pozitif örnekler Q/q iyon oranındaki sapma ile doğrulanmıştır. Bunun için tüm pozitif örneklerin iyon oranları hesaplanmış ve standart madde iyon oranı ile karşılaştırılarak % sapma değeri olarak Şekil 4.82-4.93 'da verilmiştir. Şekillerde kontaminasyon düzeyi ppb olarak parantez içinde gösterilmiştir. 39 pirinç örneğinden 10'unda (%25,6) 9,1-24,4 ppb arasında FB1, *A. versicolor* ile kontamine pirinç ve yulaf örneklerinde ise sırasıyla 49,6-69,5 ppb arasında STE ve 6,3-9,7 ppb arasında FB1 tespit edilmiştir. Analiz edilen 10 yulaf örneğinde mikotoksin tespit edilmemiştir.



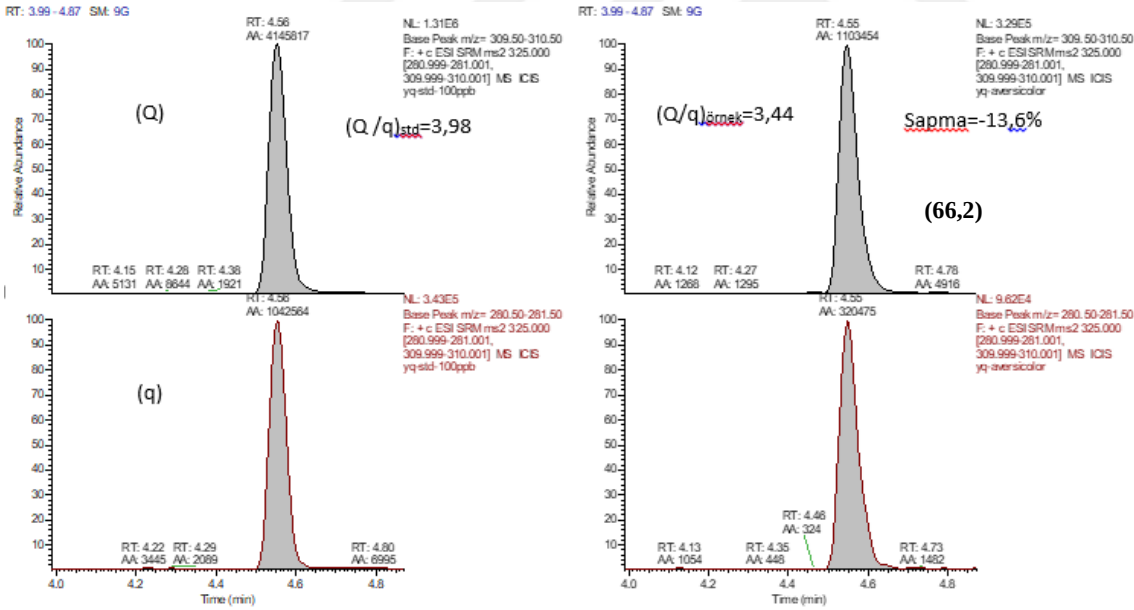
Şekil 4.81. *A. versicolor* küfü görünümü



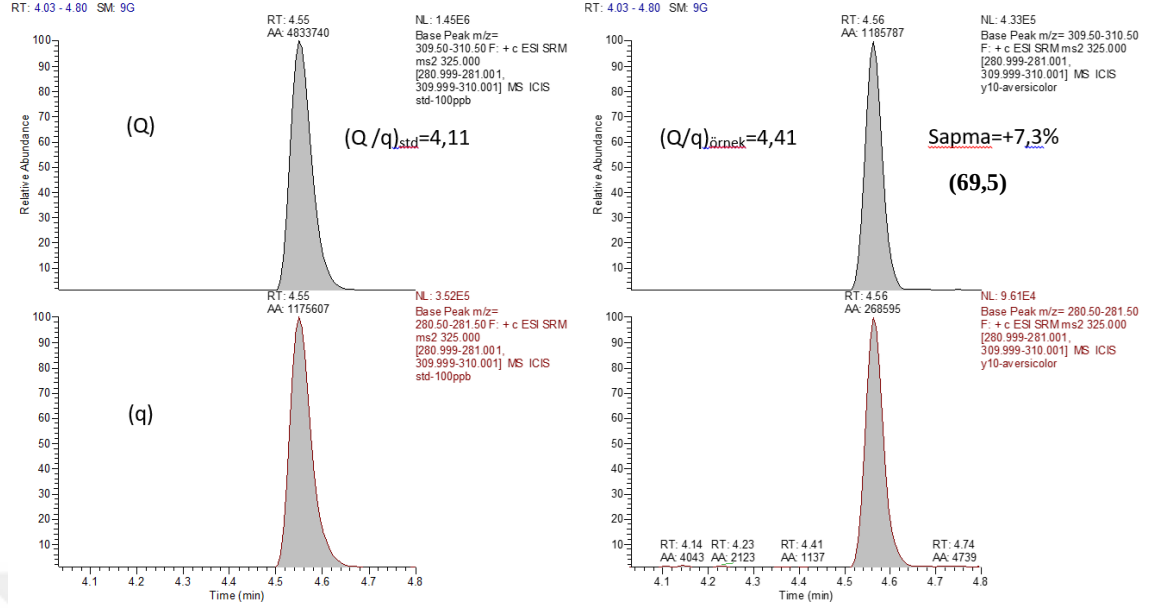
Şekil 4.82. *A. versicolor* ile kontamine pirinç örneğinde STE iyon oranları (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)



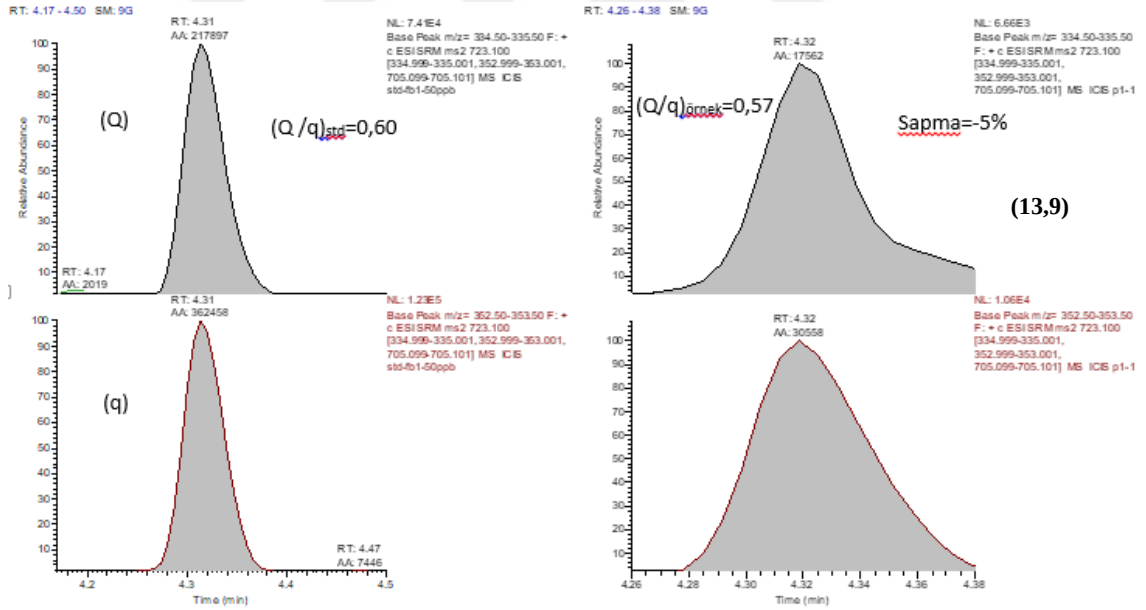
Şekil 4.83. *A. versicolor* ile kontamine pirinç örneğinde STE iyon oranları (ekstraktlar seyrelt ve enjekte et yöntemi ile elde edilmiştir)



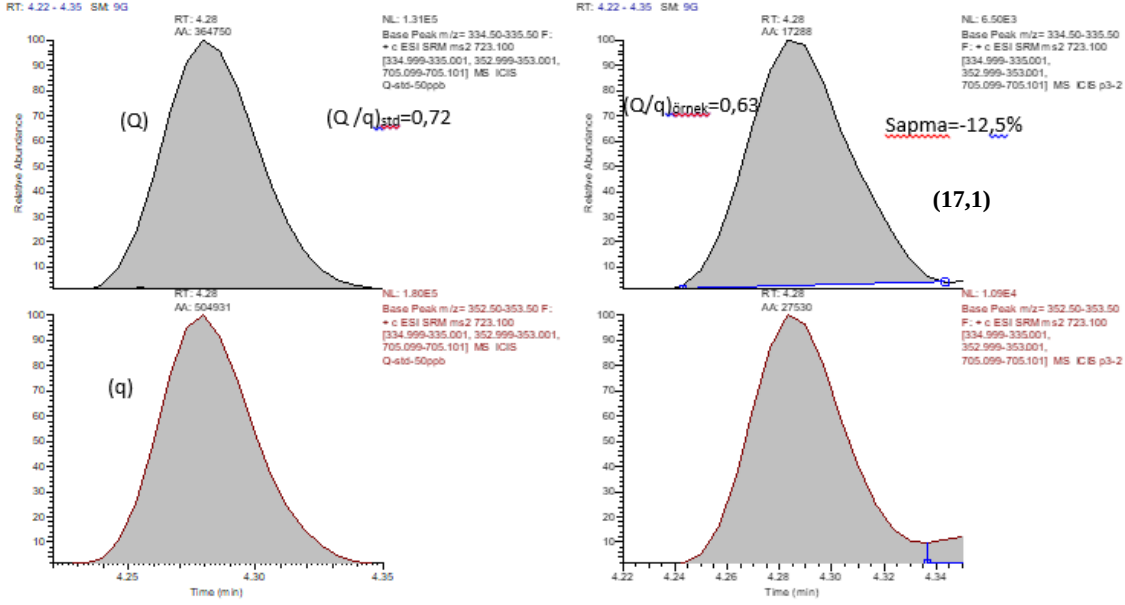
Şekil 4.84. *A. versicolor* ile kontamine yulaf örneğinde STE iyon oranları (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)



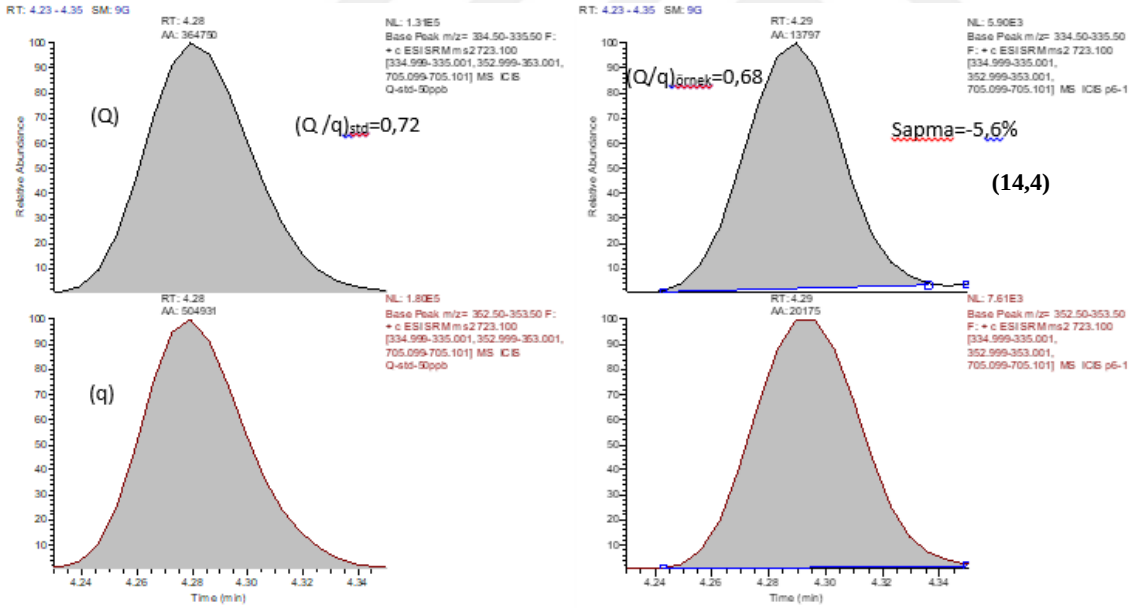
Şekil 4.85. *A. versicolor* ile kontamine yulaf örneğinde STE iyon oranları (ekstraktlar seyrelt ve enjekte et yöntemi ile elde edilmiştir)



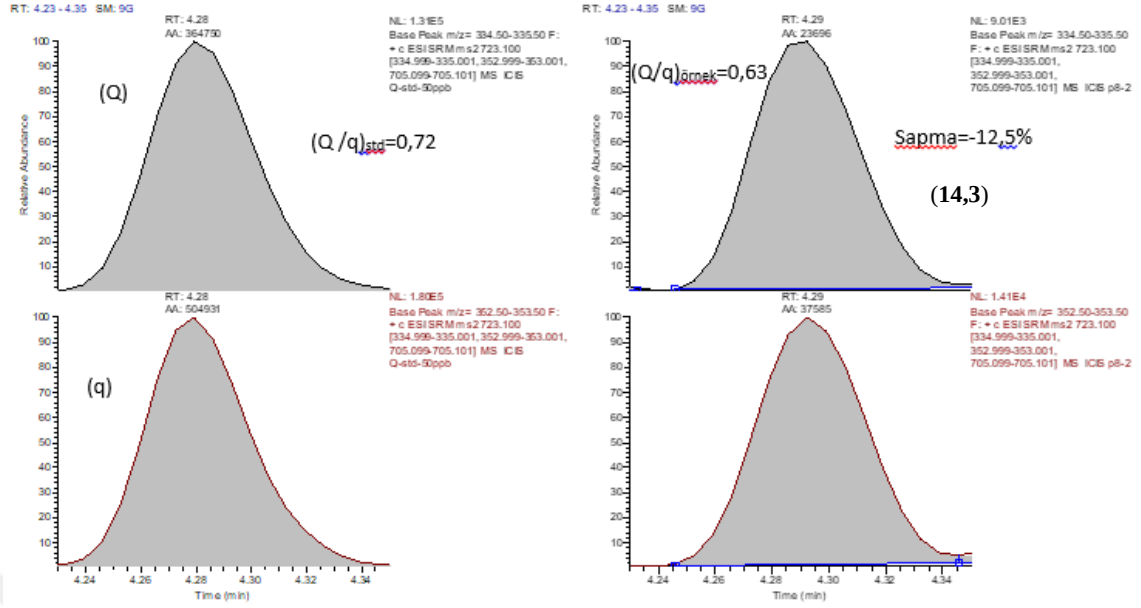
Şekil 4.86. Piriç (P1) örneğinde FB1 iyon oranları (ekstraktlar seyrelt ve enjekte et yöntemi ile elde edilmiştir)



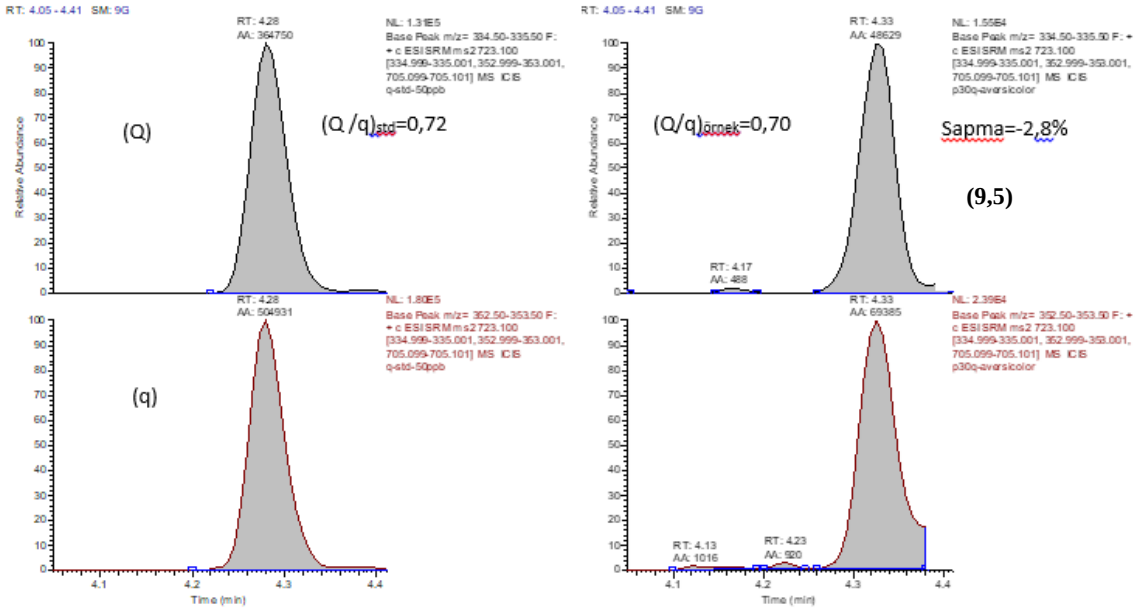
Şekil 4.87. Pirinç (P3) örneğinde FB1 iyon oranları (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)



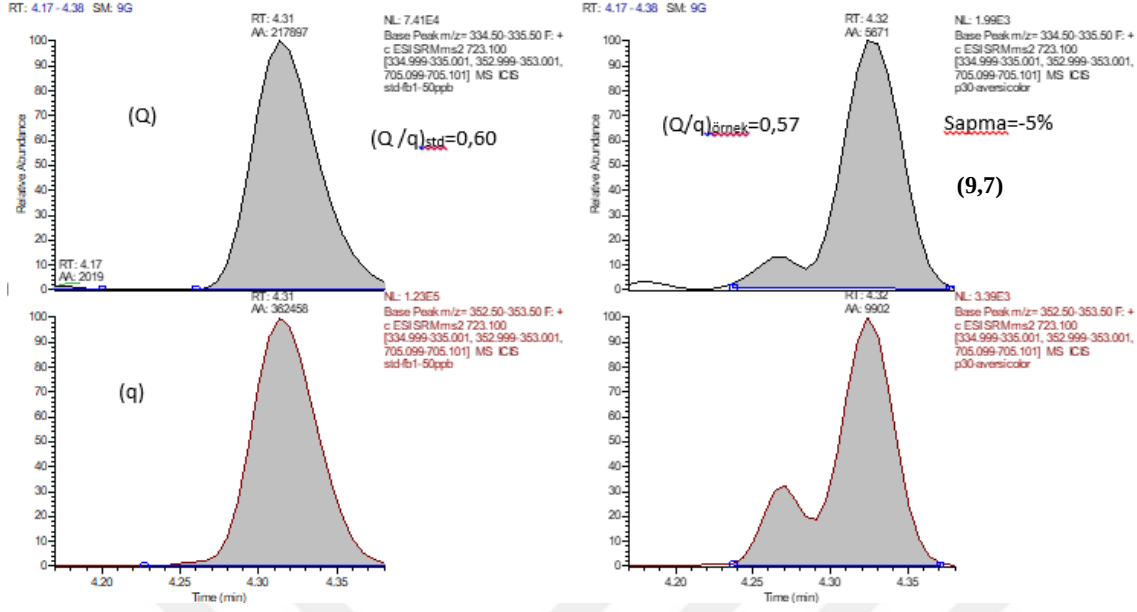
Şekil 4.88. Pirinç (P6) örneğinde FB1 iyon oranları (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)



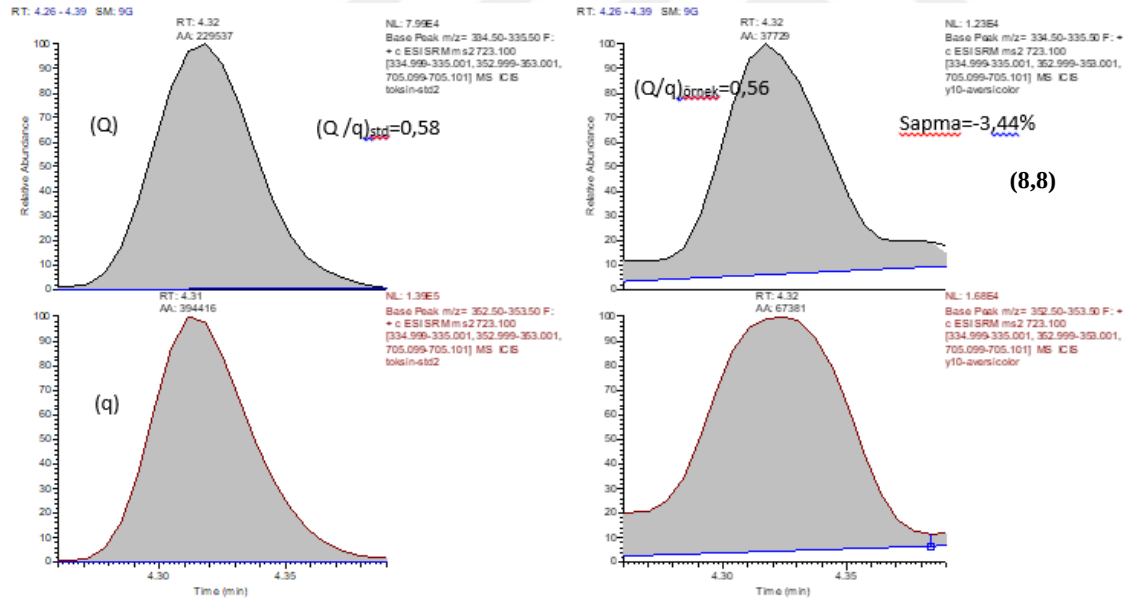
Şekil 4.89. Pirinç (P8) örneğinde FB1 iyon oranları (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)



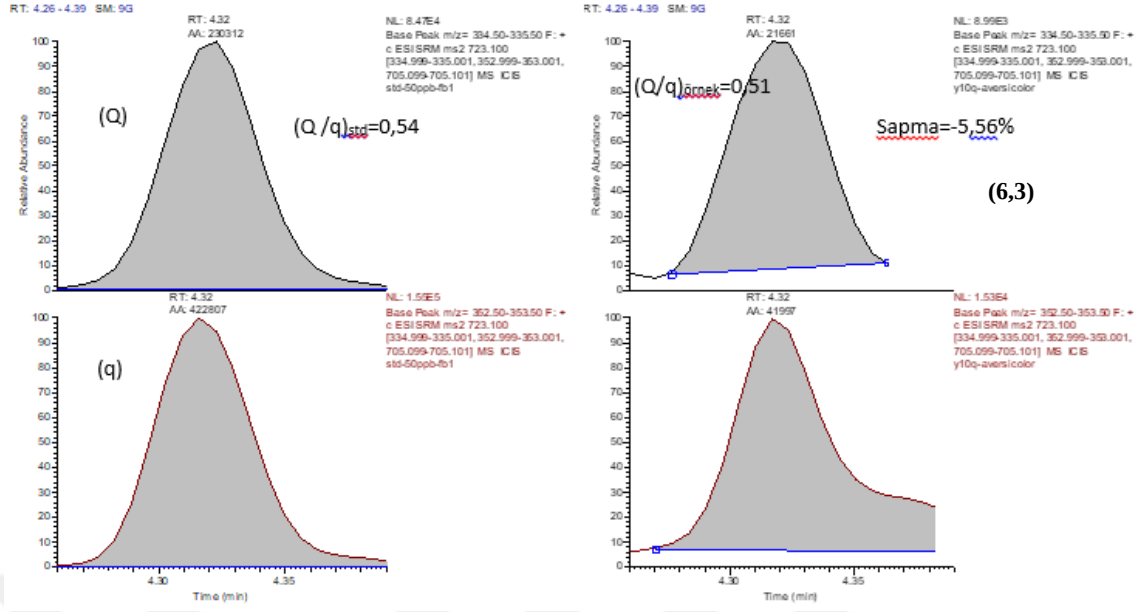
Şekil 4.90. *A. versicolor* ile kontamine pirinç örneğinde FB1 iyon oranları (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)



Şekil 4.91. *A. versicolor* ile kontamine pirinç örneğinde FB1 iyon oranları (ekstraktlar seyrelt ve enjekte et yöntemi ile elde edilmiştir)



Şekil 4.92. *A. versicolor* ile kontamine yulaf örneğinde FB1 iyon oranları (ekstraktlar seyrelt ve enjekte et yöntemi ile elde edilmiştir)



Şekil 4.93. *A. versicolor* ile kontamine yulaf örneğinde FB1 iyon oranları (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)

5. SONUÇLAR

Mikotoksinler, gıdalarda bulunabilen ve insan sağlığını tehdit eden başlıca toksinlerdendir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve diğer uluslararası örgütler, hem insan hem de hayvan sağlığı için mikotoksine maruz kalma sonucunda ortaya çıkan risklere dikkat çekmektedir. Gıdalarda olumsuz şartlar sonucunda oluşabilecek mikotoksin kalıntıları insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Kalıntıların neden olduğu sağlık problemleri özellikle beslenmede önemli bir yeri olan pirinç ve insan ve hayvan beslenmesinde kullanılan yulafın tüketiminden dolayı daha da önem arz etmektedir. Bu açıdan gıdalarda eser miktarda bulunabilecek kalıntı ve kontaminantların belirlenmesi günümüzde giderek artan bir ilgi görmektedir. Bu çalışmada, pirinçte ve yulafta eser miktarda bulunabilecek 8 tane (1 tanesi metabolit) mikotoksin kalıntılarının UHPLC-MS/MS cihazı kullanılarak yüksek çözünürlükte analizi yapılmıştır. Analitlerin matriksten ekstraksiyonu için QuEChERS ve seyrelt ve enjekte et ekstraksiyonu olmak üzere 2 farklı yöntem kullanılmıştır.

QuEChERS ekstraksiyonu genel olarak gıdalardaki pestisit kalıntılarının analizinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Ancak bu yöntemin son yıllarda mikotoksin kalıntı analizinde de uygulandığı bildirilmiştir. Bu çalışmada, bu ekstraksiyon işlemi için CEN Standart Yöntem EN 15662 yöntemi uygulanmıştır. Seyrelt ve enjekte et yönteminde ekstraksiyonun yapıldığı standart bir yöntem bulunmamaktadır. Analiz edilecek bileşiklerin fiziksel ve kimyasal yapısına ve özelliklerine bağlı olarak farklı çeşitte analitler için uygulanabilmektedir. Bu çalışmada pirinç ve yulaftan mikotoksinlerin yüksek verimlilikle ekstraksiyonunun gerçekleşmesi amacıyla ekstraksiyonda kullanılan çözgen bileşimi ve hacmi ve matriksle etkileşim süresi ve çalkalama hızı parametreleri optimize edilmiştir. Ekstraksiyonda kullanılacak çözgenin seçiminde analitlerin matriksten ekstrakta yüksek oranda, diğer matriks bileşenlerinin ise en az miktarda geçmesi amaçlanmıştır. Bu durum göz önünde bulundurularak asetonitril % 1 asetik asit ile karıştırılarak kullanılmıştır. Parametrelerin optimizasyonu sonucunda en yüksek verim pirinçte 200 rpm de 5 dk ve yulafta 300 rpm de 10 dk değerlerinde elde edilmiştir.

Ekstrakte edilen analitler tek bir enjeksiyon ile 8 dk (4.6 dk analitlerin tespiti-3.4 dk kolon yıkama ve şartlandırma) içerisinde tespit edilmiştir. Kütle spektrometresinde analitlerin miktar tayini için doğru sonuçların elde edilmesi amacıyla sıvı kromatografisi kısmında düzgün pik şeklini ve yeterli sinyal büyüklüğünü sağlayan bir metot geliştirilmiştir. Metot geliştirme aşamasında hareketli fazın akış hızı, kolon sıcaklığı ve enjeksiyon hacmi parametreleri açısından en uygun koşullar belirlenmiştir. Bu çalışmada en iyi analiz koşulu olarak akış hızı 0,5 mL/dk, kolon sıcaklığı 30 °C ve enjeksiyon hacmi 10 µL olarak belirlenmiştir.

Kütle spektrometresinde ise analit miktarlarının yüksek seçicilikte ve hassasiyette tespit edilebilmesi için cihaz parametreleri optimize edilmiştir. ESI kısmında analitlerin iyonlaşmasını ve oluşan iyonların kütle analizörüne iletimini sağlayan parametrelerin optimizasyonu sonucunda analitlerden MS'de en iyi yanıtın, sheath ve yardımcı gazların akış hızları sırasıyla 40 ve 20, kapiler ve buharlaştırma sıcaklıkları sırasıyla 250 °C ve 350 °C ve sprej voltajı değeri 3,5 kV olduğu durumda alındığı belirlenmiştir.

Geliştirilen analiz yönteminin güvenilirliğini ve tutarlılığını test etmek amacıyla metod validasyonu çalışması gerçekleştirilmiştir. Bunun için 2 farklı matrikste (pirinç ve kabuklu yulaf) 3 farklı konsantrasyonda OTA, STE ve FB2 için 5, 20 ve 50 µg/kg; ZEN, DON, FB1 ve Beta-ZOL için 25,100 ve 250 µg/kg; ve NIV için (250, 1000 ve 2500 µg/kg) ve 3 farklı günde 6 tekrarlı geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar 2 farklı ekstraksiyon yönteminde uygulanmıştır. Bu çalışmada 2 farklı matrikste tüm analitlerin matriks uyumlu kalibrasyon ile elde edilen korelasyon katsayıları 0,999'un üzerinde elde edilmiştir. Ekstraksiyon veriminin belirlenmesi amacıyla yapılan geri kazanım çalışmalarında, QuEChERS yöntemi ile analitlerin en fazla %99,0'u ekstrakte edilebilirken, seyrelt ve enjekte et yönteminde bu oran %98,4'dür. Ayrıca her iki yöntemle elde edilen verilerin bağıl standart sapmasının yakın olduğu; seyrelt ve enjekte et yönteminde bağıl standart sapmanın %19,2'den, QuEChERS yönteminde ise %19,1'den küçük olduğu belirlenmiştir. Her iki yöntemde geri kazanım değerlerinin ve bağıl standart sapma değerlerinin birbirine yakın olması seyrelt ve enjekte et yönteminin başarılı bir şekilde QuEChERS yöntemi yerine kullanılabileceğini ve böylece ekstraksiyon kiti maliyetinden tasarruf edilebileceğini göstermektedir. Her iki yöntemde de temizleme aşaması kullanılmadan ekstrakt 0,22 µm naylon filtreden geçirilerek temiz bir ekstrakt elde edilmiş ve böylece ekstraksiyon süresi kısaltılmıştır. Validasyon çalışması sonucunda analitlerin LOQ değerleri 0,37-32,67 µg/kg aralığında tespit edilmiştir. LOQ değerinin düşük olması, cihazın performansının eser miktarda analitlerin tespiti ve miktarının belirlenmesi açısından uygun olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışma ile pirinç ve yulafta eser miktarda bulunan mikotoksin ve metabolitlerinin hem 1. basamak QuEChERS hem de seyrelt ve enjekte et yöntemiyle yüksek oranda matriksten alınması sağlanmıştır ve analitlerin analizi yüksek seçicilik, doğruluk ve kesinlikte gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen analiz metodu kullanılarak 39 pirinç ve 10 yulaf örneğinde ve *Aspergillus versicolor* ile kontamine pirinç ve yulafta yapılan analiz sonuçlarına göre 39 pirinç örneğinden 10'unda (%25,6) yasal limitin oldukça altında 9,1-24,4 ppb arasında FB1, *A. versicolor* ile kontamine pirinç ve yulaf örneklerinde ise sırasıyla 49,6-69.5 ppb arasında STE ve 6,3-9,7 ppb arasında FB1 tespit edilmiştir. *A. versicolor* küfü ile birlikte FB1'in tespit edilmesi kontamine örnekte Fumonisin B1 üreticisi küfün de varlığını göstermektedir. Pozitif örnekler iyon oranları ile doğrulanmıştır. Analiz edilen 10 yulaf örneğinde mikotoksin tespit edilmemiştir.

6. KAYNAKLAR

- Abbès, S., Ouanes, Z., Ben Salah-Abbes, J., Houas, Z., Oueslati, R., Bacha, H. and Othman, O. 2006. The Protective Effect of Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate Against Haematological, Biochemical and Pathological Changes Induced by Zearalenone in Mice, *Toxicon.*, 47(5), 567.
- Abia, W.A., Warth, B., Sulyok, M., Krska, R., Tchana, A.N., Njobeh, P.B., Dutton, M.F. and Moundipa, P.F. 2013. Determination of multi-mycotoxin occurrence in cereals, nuts and their products in Cameroon by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Control.* 438-453.
- Abreu, D.C.P., Oliveira, F.A.S., Vargas, E.A., Madureira, F.D., Magalhães, E.J. Silva, L.P. and Saczk, A.A. 2020. Methodology development based on “dilute and shoot” and QuEChERS for determination of multiple mycotoxins in cocoa by LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 412:1757–1767.
- Ahmad A. and Jae-Hyuk Y 2017. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14: 632.
- Alberts, J.F., Gelderblom, C.A., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Van Schalkwyk, D.J. and Behrend, Y. 1990. Effects of temperature and incubation period on protection of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1729-1733.
- Alshannaq, A. and Yu, J.H. 2017. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *Int J Environ Res Public Health.* 14(6):632.
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D. and Schenck, F.J. 2003. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal Of AOAC International*, 86: 412- 431.
- Andrey, R.E. 2003. Liquid Chromatography-mass spectrometry: A Introduction. UK.
- Anonymous 1. Deoxynivalenol. (<http://chemspider.com>) [Son erişim tarihi: 10.01.2021]
- Anonymous 2. Nivalenol. (<http://chemspider.com>) [Son erişim tarihi: 10.01.2021]
- Anonymous 3. Sterigmatocystin. (<http://chemspider.com>) [Son erişim tarihi: 10.01.2021]
- Anonymous 2002. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC).
- Anonymous 2008. TSQ Series Getting Started Guide. Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany.

- Anonymous 2009. H-ESI Probe User Guide. Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany.
- Anonymous 2010. Accela LC System getting connected guide. Thermo Fisher Scientific, United State.
- Anonim. 2011. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği.
- Anonymous 2013. Thermo Scientific Hypersil GOLD HPLC Columns, Phase Overview. Thermo Fisher Scientific, United State.
- Anonymous 2014. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods-A laboratory guide to method validation and related topics, In: B. Magnusson U. Örnemark (Editors), www.eurachem.org
- Anonymous 2016. European Commission Health and Food Safety Directorate-General (DG SANTE). Guidance document on identification of mycotoxin in food and feed. SANTE/12089/2016, European Commission – DG SANTE: Bruxelles, Belgium.
- Annunziata, L., Stramenga, A., Visciano, P., Schirone, M., De Colli, L., Colagrande, M.N., Campana, G. and Scortichini, G. 2017. Simultaneous determination of aflatoxins, T-2 and HT-2 toxins, and fumonisins in cereal-derived products by QuEChERS extraction coupled with LC-MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 409:5143-5155.
- Araujo, P. 2009. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*, 877: 2224-2234.
- Arroyo-Manzanares, N., Huertas-Perez, J., Gamiz-Gracia, L. and Garcia-Campana, A.M. 2013. A new approach in sample treatment combined with UHPLC-MS/MS for the determination of multiclass mycotoxins in edible nuts and seeds. *Talanta*. 115: 61-67.
- Arroyo-Manzanares, N., Huertas-Perez, J., Garcia-Campana, A.M. and Gamiz-Gracia, L. 2014. Simple methodology for the determination of mycotoxins in pseudocereals, spelt and rice. *Food Control*. 36: 94-101.
- Atalla, M.M., Hassanein, N.M., El-Beih, A.A. & Youssef, Y.A. 2003. Mycotoxin production in wheat grains by different *Aspergilli* in relation to different relative humidities and storage periods. *Nahrung*, 47: 6-10.
- Atkins, D. and Norman, J. 1998. Mycotoxins and food safety. *Nutrition & Food Science*. 260–266.
- Awad, H., Khamis, M.M. and El-Aneed, A. 2015. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. *Applied Spectroscopy Reviews*, 50:158–175.

- Azaiez, I., Giusti, F., Sagratini, G., Mañes, J. and Fernández-Franzón, M. 2014. Multi-mycotoxins Analysis in Dried Fruit by LC/MS/MS and a Modified QuEChERS Procedure. *Food Anal. Methods*. 7:935–945
- Banerjee, S. and Mazumdar, S. 2012. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012:1-40.
- Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J. V. and Hernández, F. 2009. Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23: 1801-1809.
- Bennett, J.W. and Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*, 16: 497–516.
- Berger, U., Oehme, M. and Kuhn, F. 1999. Quantitative determination and structure elucidation of type A- and B- trichothecenes by HPLC/ ion trap multiple mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 47: 4240-5.
- Berkel, G.J.V. and Kertesz, V. 2007. Using the electrochemistry of the electrospray ion source. *Analytical Chemistry*. 79: 5510-5520.
- Berthiller, F., Crews, C., Dall'Asta, C., De Saeger, S., Haesaert, G., Karlovsky, P., Oswald, I.P., Seefelder, W., Speijers, G. and Stroka J. 2013. Masked mycotoxins: A review. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57: 165-186.
- Berthiller, F., Sulyok, M., Krska, R. and Schuhmacher, R. 2007. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 33-37.
- Bhat, R.V., Ramakrishna, Y., Beedu, S.R. and Munshi, K.L. 1989. Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould damaged wheat products in Kashmir Valley, India. *Lancet* 1, 35–37.
- Bhat, R., Ravishankar, V. and Karim, A.A. 2010. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 57-81.
- Bhatnagar, D., Yu, J. and Ehrlich, K.C. 2002. Toxins of filamentous fungi. *Chem. Immunol.* 81, 167–206.
- Binder, E.M., Tan, L.M., Chin, L.J., Handl, J. and Richard, J. 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology* 137: 265-282.
- Blasco, C. and Picó, Y. 2007. Liquid-chromatography-mass spectrometry. In: Y. Picó (Editor), *Food Toxicants Analysis*, Elsevier, pp.509-559, London, UK.

- Boqué, R., Maroto, A., Riu, J. and Rius, F. X. 2002. Validation of Analytical Methods. *Grasas y Aceites* 128 Vol. 53. Fasc. 1.: 128-143.
- Bouafifssa, Y., Manyes, L., Rahouti, M., Manes, J., Berrada, H., Zinedine, A. and Fernandez-Franzon, M. 2018. Multi-occurrence of twenty mycotoxins in pasta and a risk assessment in the Moroccan population, *Toxins* 10: 432.
- Bottalico, A. and Perrone, G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-green cereals in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 611-624.
- Bökman, C.F. 2002. Analytical Aspects of Atmospheric Pressure Ionisation in Mass Spectrometry. Ph.D. Thesis, Uppsala University, 46p.
- Bruzzoniti, M.C., Checchini, L., De Carlo, R.M., Orlandini, S., Rivoira, L. and Del Bubba, M. 2014. QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406: 4089-4116.
- Busch, K.L. 2000. Mass spectrometry. In: I. Wilson C. Poole M. Cooke (Editors), *Encyclopedia of Separation Science*, Academic Press, San Diego, CA, pp. 174-189.
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Revilla-Ruiz, P. and Hernández-Méndez, J. 2005. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *Journal of Chromatography A*, 1089: 1-17.
- Cech, N.B. and Enke, C.G. 2001. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization Fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews*, 20: 362-387.
- Chamkasem N, Ollis Lw, Harmon T, Lee S. and Mercer G. 2013. Analysis of 136 pesticides in avocado using a modified QuEChERS method with LC-MS/MS and GC-MS/MS. *J Agric Food Chem.* 61(10):2315–29.
- Chilaka, C.A., De Boevre, M., Atanda, O.O. and De Saeger, S. 2017. The Status of *Fusarium* Mycotoxins in Sub-Saharan Africa: A Review of Emerging Trends and Post-Harvest Mitigation Strategies towards Food Control. *Toxins*. 1-36.
- Chauhan, A., Mittu, B. and Chauhan, P. 2015. Analytical Method Development and Validation: A Concise Review. *J Anal Bioanal Tech.* 2015: 6:1.
- Choochuay, S., Phakam, J., Jala, P., Maneeboon, T. and Tansakul, N. 2018. Determination of aflatoxin B 1 in feedstuffs without clean-up step by high-performance liquid chromatography. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2018: 1-8,

- Clarke, R., Connolly, L., Frizzell, C. and Elliott, C.T. 2014. Cytotoxic assessment of the regulated, co existing mycotoxins aflatoxin B1, fumonisin B1 and ochratoxin, in single, binary and tertiary mixtures. *Toxicon* . 90: 70-81.
- Cole, R.J., 1976. Mycotoxins and other fungal related food problems. Editör J.V.Rodricks, Advenced Chem. Ser. 149.Am. Chem. Soc.,Washington, D.C., 68-89.
- Cole, R. 1997. Electrospray Ionization Mass Spectrometry. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Cole, R.A., Jarvis, B.B. and Schweikert, M.A. 2003. Handbook of Secondary Metabolites; Academic Press: New York, NY, USA, pp. 199–560.
- Cole, R.L. 2010. Electrospray and MALDI Mass spectrometry. Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications. John & Sons. Inc. Hoboken, New Jersey.
- Da Silva, L.P., Madureira, F., Vargas, E.A., Faria, A.F. and Augustia, R. 2019. Development and validation of a multianalyte method for quantification of mycotoxins and pesticides in rice using a simple dilute and shoot procedure and UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry*. 270: 420-427.
- Dass, C. 2007. Basics of mass spectrometry. In: C. Dass (Editor), Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry. Wiley, Canada, pp. 3-194.
- Dean, J.R. 2009. Comparison of extraction methods. In: J.R. Dean (Editor), Extraction Techniques in Analytical Sciences, Wiley, United Kingdom, pp. 221-240.
- De Colli, L., Elliott, C., Finnan, J., Grant, J., Arendt, E.K., McCormick, S.P. and Danaher, M. 2020. Determination of 42 mycotoxins in oats using a mechanically assisted QuEChERS sample preparation and UHPLC-MS/MS detection. *Journal of Chromatography B*. 1150:12287.
- De La Mora, J.F., Van Berkel, G., Enke, C., Cole, R. , Martinez-Sanchez, M. and Fenn, J. 2000. Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 35(8): 804-817.
- De Santis, B., Debegnach, F., Gregori, E., Russo, S., Marchegiani, F. and Moracci, G. 2017. Development of a LC-MS/MS method for the multi-mycotoxin determination in composite cereal-based samples. *Toxins*. 9:169.
- Desmarchelier A., Tessiot, S., Bessairea, T., Racault, L., Fiorese, E., Urbani, A., Chanc, W., Chengc, P. and Mottier, P. 2014. Combining the quick, easy, cheap, effective, rugged and safe approach and clean-up by immunoaffinity column for the analysis of 15 mycotoxins by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1337: 75–84.

- Devegowda, G., Radu, M.V.L., Nazar, A. and Swamy H.V.L.M. 1998. Mycotoxin picture worldwide: novel solutions for their counteraction. In: Proceedings of Alltech's 14th Annual Symposium, Biotechnology in Feed industry. Passport of the year 2000. Nottingham, U.K.: Nottingham Univ. Press.
- D'Mello, J. P. F., & Macdonald, A. M. C. 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 69, 155–166. [http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)81630-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401(97)81630-6).
- Dong, M.W. 2006. Basic Terms and Concepts. In: M.W. Dong (Editor), *Modern HPLC for Practicing Scientists*, Wiley, New Jersey, pp. 16-46.
- Ediage, E. N., Van Poucke, C. and De Saeger, S. 2015. A multi-analyte LC–MS/MS method for the analysis of 23 mycotoxins in different sorghum varieties: The forgotten sample matrix. *Food Chemistry*. 177: 397-404.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. 2011. Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA Journal*. 9(6):2197.
- EFSA Contam Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), 2013. Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. *EFSA Journal*. 11(6), 3254, 81.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) 2017. Risk for animal health related to presence of zearalenone and its modified forms in feed. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4851>. Son erişim tarihi:13.12.2020
- El-Anead, A., Cohen, A. and Banoub, J. 2009. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*. 44: 210-230.
- Eldin, A.İ.B. 2011. Validation of an Analytical Procedure. In: *Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas*. Shoyama, Y. (Ed.) InTech. pp. 17-24
- El Khoury, A. and Atoui, A. (2010). Ochratoxin A: General overview and actual molecular status. *Toxins*. 2, 461-493.
- Emmert, J. 2006. Mobile phase additives for LC-MS. Part 1: Acids. www.sigma-aldrich.com.
- Emmert, J. and Leitner, A. 2006. Mobile phase additives for LC-MS. Part 3: Neutral salts. www.sigma-aldrich.com.
- Engelhart, S., Loock, A., Skutlarek, D., Sagunski, H., Lommel, A., Farber, H. And Exner, M. 2002. Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 3886-3890.

- Eriksen G.S., and Alexander, J. (eds) 1998. *Fusarium Toxins in Cereals: A Risk Assessment*. Copenhagen, Nordic Council Of Ministers, TemaNord, Copenhagen, pp.502 fa, 45-58.
- Eriksen, G.S. 2003. *Metabolism and Toxicity of Trichothecenes*, Doctoral thesis, Uppsala, Sweden,
- Evans, S. 1990. Detectors. In: J.L. Cole (Editor), *Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA, pp. 61-86.
- Franco, L.T., Petta, T., Vendrametto, M.E. and Oliveria, C.A.F. 2018. Performance and Application of a “Dilute-and-Shoot” LC-MS/MS Method for Determination of Mycotoxins in Food Products in São Paulo, Brazil. *International Journal of Food Engineering*. 4: 206-211.
- Frenich, A.G., Vidal, J.L.M., Romero-Gonzalez, R. and Aguilera-Luiz, M.M. 2009. Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 117:705-712.
- Frenich, A.G., Romero-Gonzalez, R., Gomez-Perez, M.L. and Vidal, J.L.M. 2011. Multi-mycotoxin analysis in eggs in using QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high pressure liquid chromatography coupled triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1218:4349-4356.
- Frenich, A.G., Romero-González, R. and Aguilera-Luiz, M.M. 2014. Comprehensive analysis of toxics (pesticides, veterinary drugs and mycotoxins) in food by UHPLC-MS. *Trends in Analytical Chemistry*. 63: 158-169.
- Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Samson, R.A., Larsen, T.O. and Thrane, U. 2007. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *J. Agric. Food Chem.* 55: 9727-9732.
- Fung, F. & Clark, R.F. 2004 Health Effects of Mycotoxins: A Toxicological Overview, *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. 42:2, 217-234.
- Gałaszka, A., Migaszewski, Z. and Namiesnik J. 2013. The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices, *Trac. Trends Anal. Chem.* 50: 78-84.
- Gao, F., Jiang, L., Chena, M., Geng, C., Yanga, G., Jia, F., Zhong, L. and Liua, X. 2013. Genotoxic effects induced by zearalenone in a human embryonic kidney cell line. *Mutation Research*. 755: 6– 10.
- García-Alvarez-Coque, M.C., Baeza-Baeza, J.J. and Ramis-Ramos, G. 2015. Reversed phase liquid chromatography. In: J.L. Anderson A. Berthod V.P. Estévez A.M. Stalcup (Editors), *Analytical Separation Science*, Wiley, New Jersey, pp. 159-198.

- Gaskell, S. 1997. Electrospray: Principles and Practice. *Journal of Mass Spectrometry*. 32: 677-688.
- Gelderblom, W. C. A., Jaskiewicz, K., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Horak, R. M., Vleggaar, R., & Kriek, N. P. J. 1988. Fumonisin-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied & Environmental Microbiology*. 54: 1806-1811.
- Gil-Serna, J., Patiño, B., Cortés, L., Gonzálezjaén, M.T. and Vázquez, C. 2011. Mechanisms involved in reduction of ochratoxin A produced by *Aspergillus westerdijkae* using *Debaryomyces hansenii* CYC 1244. *International Journal of Food Microbiology*. 151(1): 113-118.
- González, H.H., Martínez, E.J., Pacin, A.M., Resnik, S.L. and Sydenham, E.W. 1999, Natural cooccurrence of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins in field trial corn in Argentina. *Food Addit. Contam.* 16: 565-569.
- González-Curbelo, M.Á., Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A.V., González-Sálamo, J., Hernández-Borges, J. and Rodríguez-Delgado, M.Á. 2015. Evolution and applications of the QuEChERS method. *Trends in Analytical Chemistry*. 71: 169-185.
- Gravesen, S., Nielsen, P.A., Iversen, R. and Nielsen, K.F. 1999. Microfungal contamination of damp buildings-examples of risk constructions and risk materials. *Environ. Health Perspect.* 3: 505-508.
- Guillarme, D., Schappler, J., Rudaz, S. and Veuthey, J.L. 2010. Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*. 29: 15-27.
- Hart-Smith, G. and Blanksby, S.J. 2012. Mass analysis. In: C. Barner-Kowollik T. Gruendling J. Falkenhagen S. Weidner (Editors), *Mass Spectrometry in Polymer Chemistry*, Wiley, New Jersey, pp. 5-32.
- Hans, P.E., Schothorst, R.C. and Jonker, M.A. (2007) Regulations relating to mycotoxins in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 389: 147-157.
- Heidorn, M. 2016. The Role of Temperature and Column Thermostatting in Liquid Chromatography Thermo Fisher Scientific, Germering, Germany.
- Ho, J.A. and Durst, R.A. 2003. Detection of fumonisin B1: Comparison of flow-injection liposome immunoanalysis with high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 312: 7-13.
- Hsueh C-C, Liu Y. and Freund M.S. 1999. Indirect electrochemical detection of type-B trichothecene mycotoxins. *Anal Chem.* 71: 4075-80.

- Huffman J, Gerber R. and Du, L (2010) Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers*. 93: 764-776.
- Huber, L. 2010. Validation of analytical methods. Agilent Technologies, Germany.
- Hussein, H.S. and Brasel J.M. 2001: Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. 167: 101-134.
- IARC. 1993. Toxins derived from *Fusarium moniliforme*: Fumonisin B1 and B2 and fusarin C. Lyon, France,
- IARC. 2002. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Fumonisin B1. Lyon, France.
- Ibanez, E. and Cifuentes, A. 2017. Comprehensive Analytical Chemistry. Green extraction techniques: principles, advances and applications. Elsevier. p.674.
- Ito, Y., Ohtsubo, K., Ishii, K. and Ueno, Y. 1986. Effects of nivalenol on pregnancy and fetal development of mice. *Mycotoxin Research*. 2: 71-77.
- Janusson, E., Hesketh, A.V., Bamford, K.L., Hatlelid, K., Higgins, R. and Mcindoe, J.S. 2015. Spatial effects on electrospray ionization response. *International Journal of Mass Spectrometry*. 388: 1-8.
- Jedziniak, P., Pietruszka, K. and Posniak, A. 2019. Multiple mycotoxins analysis in animal feed with LC-MS/MS: Comparison of extract dilution and immunoaffinity clean-up. *Journal of Separation Science*. 42: 1240-1247.
- Jones, F.T., Genter, M.B., Hagler, W.M., Hansen, J.A., Mowrey, B.A., Poore, M.H. and Whitlow, L.W. 1994. Understanding and coping with effects of mycotoxins in livestock feed and forage. *North Carolina Cooperative Extension Service*. p 1–14.
- Juan, C., Ritieni, A. and Manes, J. 2012. Determination of trichothecenes and zearalenones in grain cereal, flour and bread by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 134: 2389-2397.
- Kan, C.A. and Meijer, G.A.L. 2007. The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*. 133: 84–108.
- Kay, J.F. and Macneil, J.D. 2012. Method development and method validation. In: J. Wang J.D. MacNeil J.F. Kay (Editors), *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*, Wiley, pp. 278-308, New Jersey.
- Kebarle, P. and Verkerk, U.H. 2010. On the mechanism of electrospray ionization mass spectrometry. In: R.B.Cole (Editor), *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry*, Wiley, Canada, pp. 1-46,

- Kim, D.H., Hong, S.Y., Kang, J.W., Cho, S.M., Lee, K.R., An, T.K., Lee, C. and Chung, S.H. 2017. Simultaneous Determination of Multi-Mycotoxins in Cereal Grains Collected from South Korea by LC/MS/MS. *Toxins (Basel)*.16;9(3):106.
- Kostić, A. Ž., Milinčić, D. D., Petrović, T. S., Krnjaja, V. S., Stanojević, S. P., Barać, M. B., Tešić, Ž. L., & Pešić, M. B. 2019. Mycotoxins and Mycotoxin Producing Fungi in Pollen. Review. *Toxins*. 11(2): 64.
- Kromidas, S. 2000. How critical are temperature changes? In: S. Kromidas (Editor), *Practical Problem Solving in HPLC*, Wiley, New York, pp. 45-46.
- Kromidas, S. 2008. Which mobile phases are compatible with LC-MS? In: S. Kromidas (Editor), *More Practical Problem Solving in HPLC*, Wiley, New York, pp. 195-196.
- Kromidas, S. 2017. *The HPLC-MS Handbook for practitioners*. Wiley-VCH Verlag GmbH , pp.260.
- Krska, R., Pettersson, H., Josephs, R.D., Lemmens, M., Macdonald, S. and Welzig, E. 2003. Zearalenone in maize: stability testing and matrix characterization of a certified reference material. *Food Addit. Contam. Part A*. 20: 1141-1152.
- Krska, R., Schubert-Ullrich, P., Molinelli, A., Sulyok, M., Macdonald, S. and Crews, C. 2008. Mycotoxin analysis: An update. *Food Additives and Contaminants*. 25(2): 152–163.
- Lattanzio, V.M.T., Solfrizzo, M., Powers, S. and Visconti, A. 2007. Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and Fuserium toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup. *Rapid Communications in Mass spectrometry*. 21: 3253-3261.
- Lavagnini, I., Magro, F., Seraglia, R. and Traldi, P. 2006. What instrumental approaches are available. In: I. Lavagnini J.D. MacNeil J.F. Kay (Editors), *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*, Wiley, New Jersey, pp. 111-123.
- Lehotay, S.J., Mastovska, K. and Lightfield, A.R. 2005. Use of buffering to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *Journal of AOAC International*, 88: 615- 629.
- Lehotay, S.J., Anastassiades M. and Majors, R.E. 2010. The QuEChERS Revolution. <http://www.chromatographyonline.com/quechers-revolution>.
- Li, D.X., Gan, L., Bronja, A. and Schmitz, O.J. 2015. Gas chromatography coupled to atmospheric pressure ionization mass spectrometry (GC-API-MS): Review. *Analytica Chimica Acta*. 891: 43-61.
- Lopes, R.P., Passos, É.E.F., Filho, J.F.A., Vargas, E.A., Augusti, D.V. and Augusti, R. 2012. Development and validation of a method for the determination of

- sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LC-MS/MS analysis. *Food Control*, 28: 192-198.
- Luthria, D., Vinjamoori, D., Noel, K. and Ezzell, J. 2004. Accelerated solvent extraction. In: D.L. Luthria (Editor), *Oil Extraction and Analysis: Critical Issues and Competitive Studies*, AOCS, Illinois, pp. 25-38.
- March, R.E. 1997. Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal Of Mass Spectrometry*. 32: 351-369.
- MacNair, J.E., Lewis, K.C. and Jorgenson, J.W. 1997. Ultrahigh-pressure reversed-phase liquid chromatography in packed capillary columns. *Anal. Chem.* 69: 983-9.
- MacNair, J.E., Patel, K.D. and Jorgenson, J.W. 1999. Ultrahigh-Pressure Reversed-Phase Capillary Liquid Chromatography: Isocratic and Gradient Elution Using Columns Packed with 1.0- μ m Particles. *Anal. Chem.* 71: 700.
- Majeed S, De Boevre M, De Saeger S, Raufwaqa R, Tawab A, Habib F, Rahman M, Iqbal M 2018. Multiple Mycotoxins in Rice; Occurrence and Health Risk Assessment in Children and Adults of Punjab, Pakistan. *Toxins* 10: 77-107.
- Malachova, A., Sulyok, M., Beltran, E., Berthiller, F., and Krska, R. 2014. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography – tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all relevant mycotoxins in four model food matrices. *J. Chromatogr. A*. 1362, 145-156.
- Malik, A.K., Blasco, C. and Picó, Y. 2010. Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety. *Journal of Chromatography A*. 1217: 4018-4040.
- MANISALI, I., CHEN, D.D.Y. and SCHNEIDER, B.B. 2006. Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: past, present, and future. *Trends in Analytical Chemistry*, 25: 243-256.
- Manizan, A.L., Oplatowska-Stachowiak, M., Piro-Metayer, I., Campbell, K., Koffi-Nevry, R., Elliott, C., Akaki, D., Montet, D., Brabet, C. 2018. Multi-mycotoxin determination in rice, maize and peanut products most consumed in Cote d'Ivoire by UHPLC-MS/MS. *Food Control*. 87: 22-30.
- Mantle, P.G. 2002. Risk assessment and the importance of ochratoxins. *Int. Biodeterior. Biodegradation*. 50: 143–146.
- Maragos, C., Bumsan, M., Sugita-Konishi, Y. 2006. Production and characterization of a monoclonal antibody that cross-reacts with the mycotoxins nivalenol and 4-deoxynivalenol. *Food Addit. Contam.* 23: 816-825.
- Margherita F., Salvatore S. and Gea O.C 2012. Carcinogen Role of Food by Mycotoxins and Knowledge Gap, Carcinogen, Dr. Margarita Pesheva (Ed.), Available from:

<http://www.intechopen.com/books/carcinogen/carcinogen-role-of-food-by-mycotoxins-and-knowledge-gap>. Son erişim tarihi: 13.12.2020

- Marin, S., Sanchis, V., Vinas, I., Canela, R. and Magan, N. 1995. Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B1 and B2 production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 298-301.
- Marin S, Ramos A.J., Cano-Sancho, G. and Sanchis, V. 2013. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology.* 60: 218-237.
- Mannon, J. And E. Johnson. 1985. Fungi down on the farm. *New Scientist.* 105 (1446):12-16.
- Mazzoni, E., Scandolaro, A., Giorni, P., Pietri, A. and Battilani, P. 2011. Field control of *Fusarium* ear rot, *Ostrinia nubilalis* (Hübner), and fumonisins in maize kernels. *Pest Manag. Sci.* 67: 458–465.
- Mc Mullen, M., Jones, R. and Gallenberg, D. 1997. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Dis.* 81:1340–1348.
- McCormick, S. P., Stanley, A. M., Stover, N.A. and Alexander, N. J. 2011. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins.* 3: 802-814.
- Medina A. and Magan. N. 2011 An overview of oat contamination with mycotoxins: Strategies for their control. Nova Science Publisher, Inc. pp. 97-124.
- Medhe, S. 2018. Mass Spectrometry: Detectors Review. *Chemical and Biomolecular Engineering.* 3(4): 51-58.
- Meerpoel, C., Vidal, A., di Mavungu, J.D., Huybrechts, B., Tangni, E.K., Devreese, M., Croubels, S., De Saeger, S. 2018. Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of citrinin and ochratoxin A in a variety of feed and foodstuffs, *J. Chromatogr. A.* 1580:100-109.
- Metzler, M., Pfeiffer, E. and Hildebrand, A.A. 2010. Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. *World Mycotoxin Journal.* 3: 385-401.
- Meyer, V.R. 2010. Solvent properties. In: V.R. Meyer (Editor), *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, Wiley, United Kingdom, pp. 81-89.
- Miller, J.D. and Trenholm, L. eds. 1994. Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin: ACCI pres. pp.552.
- Minervini, F. and Dell'Aquila, M.E. 2008. Zearalenone and Reproductive Function in Farm Animals. *Int. J. Mol. Sci.* 9: 2570-2584.

- Miro-Abella, E., Herrero, P., Canela, N., Arola, L., Borrull, F., Ras, R. and Fontanals, N. 2017. Determination of mycotoxins in plant-based beverages using QuEChERS and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 229:366-372.
- Mol, H.G.J., Plaza-Bolanos, P., Zomer, P., de Reijk, T.C., Stolker, A.A.M. & Mulder, P.P.J. 2008. Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins and veterinary drugs in feed and food matrixes. *Analytical Chemistry*. 80: 9450-9459.
- Moldoveanu, S. and David, V. 2015. Solid-phase extraction. In: S. Moldoveanu V. David (Editors), *Modern Sample Preparation for Chromatography*, Elsevier, USA, pp. 191-286.
- Moldoveanu, S. and David, V. 2013. Basic information about HPLC. In: *Essentials in Modern HPLC Separations*. Elsevier, pp. 145-188, USA.
- Moss, M.O. 2002. Mycotoxin review-2. Fusarium. *Mycologist*. 16: 158-161.
- Munkvold, G.P. 2003. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Ann Rev Phytopath.* 41:99–116.
- Nelson, M. D. & Dolan, J. W. 2002 Ion Suppression in LC–MS–MS — A Case Study. *LCGC North America*, 20, 24-32.
- Nielsen, K.F., Gravesen, S., Nielsen, P.A., Andersen, B., Thrane, U., Frisvad, J.C. 1999. Production of mycotoxins on artificially and naturally infested building materials. *Mycopathologia*. 145: 43-56.
- Niessen, W.M.A. 2006. Mass spectrometry. In: J. Cazes (Editor), *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, CRC Press, Boca Raton, pp. 23-50.
- Nováková, L., Matysová, L. and Solich, P. 2006. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*. 68: 908-918.
- Nguyen, D.T.T., Guillarme, D., Rudaz, S. and Veuthey, J.L. 2006. Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. *Journal of Separation Science*. 29: 1836-1848.
- Ostry, V., Malir, F., Toman, J. and Grosse, Y. 2017. Mycotoxins as human carcinogens-the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Res.* 33: 65–73.
- Otles S. and Ozyurt V.H. 2014 Sampling and Sample Preparation. In: Cheung P. (eds) *Handbook of Food Chemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-41609-5_39-1 Son erişim tarihi: 13.12.2020

- Qian, M., Yang, H., Li, Z., Liu, Y., Wang, J., Wu, H., Ji, X., Xu, J. 2018. Detection of 13 mycotoxins in feed using modified QuEChERS with dispersive magnetic materials and UHPLC-MS/MS. *J. Sep. Sci.* 41: 756-764.
- Page, J.S., Kelly, R.T., Tang, K. and Smith, R.D. 2007. Ionization and Transmission Efficiency in an Electrospray Ionization–Mass Spectrometry Interface. *J. Am Soc Mass Spectrom* 2007, 18, 1582–1590.
- Pestka, J.J. and Bondy, G.S. 1994. Immunotoxic effects of mycotoxins. In: Miller, J.D., Trenholm, H.L. (Eds.), *Mycotoxins in Grain-Compounds other than Aflatoxin*. Eagan Press, St. Paul, pp. 339–358.
- Pestka, J.J. and Smolinski, A.T. 2005. Deoxynivalenol: Toxicology and potential effects on humans. *J. Environ. Sci. Health B*. 8: 39-69.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N., Castegnaro, M., 2002. Balkan endemic nephropathy and associated urogenital tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Additives and Contaminants* 19: 282–302.
- Prelusky, D.B., 1994. Residues of food products of animal origin. In: Miller, J.D., Trenholm, H.L. (Eds.), *Mycotoxins in Grain-Compounds other than Aflatoxin*. Eagan Press, St. Paul, pp. 404–419.
- Perestrelo, R., Silva, P., Porto-Figueira, P., Pereira, J.A.M., Silva, C., Medina, S., Camara, J.S. 2019. QuEChERS-Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. *Analytica Chimica Acta*. 1070:1-28.
- Peri-Okonny, U.L. 2001. Effects of eluent pH and different types of acidic modifiers on the retention and electrospray ionization efficiency of basic analytes in LC-ESI-MS. Ph.D. Thesis, Seton Hall University, 175p.
- Peters, F.T., Drummer, O.H. and Musshoff, F. 2007. Validation of new methods. *Forensic Science International*, 165: 216-224.
- Rahmani A., Jinap, S. and Soleimany, F. 2009. Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins. *Comprehensive Reviews in Food Science And Food Safety*—Vol. 8: 202-251.
- Ramakrishna, Y., Bhat, R.V. and Ravindranath, V. 1989. Production of deoxynivalenol by *Fusarium* isolates from samples of wheat associated with a human mycotoxicosis outbreak and from sorghum cultivars. *Appl Environ Microbiol.* 55: 2619–20.
- Reichert, B., De Kok, A., Pizzutti, I.R., Scholten, J., Cardoso, C.D., Spanjer, M. 2018. Simultaneous determination of 117 pesticides and 30 mycotoxins in raw coffee, without clean-up, by LC-ESI-MS/MS analysis, *Anal. Chim. Acta* 1004: 40-50.

- Ren, Y., Zhang, Y., Shao, S., Cai, Z., Feng, L., Pan, H., Wang, Z. 2007. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in food and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1143: 48-64.
- Rheeder, J.P., Marasas, W.F. and Vismer, H.F. 2002. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2101–2105.
- Richard, J.L. 2000. Mycotoxins—an overview. In: Richard, J.L. (Ed.), *Romer Labs' Guide to Mycotoxins*, vol. 1, pp. 1–48.
- Richard J.L. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *International Journal of Food Microbiology*. 119: 3-10.
- Ridgway, K., Lalljie, S.P.D. and Smith, R.M. 2007. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A*. 1153: 36-53.
- Rodricks, J.V. 1969. Fungal metabolites which contain substituted 7,8-dihydrofuro-[2,3-b]furans (DHFF) and 2,3,7,8-tetrahydrofuro[2,3-b]furans (THFF). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 17: 457-461.
- Romagnoli, B., Ferrariand, M. And Bergamini, C. 2010. Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in breakfast cereals and baby food by high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 45, 1075–1080.
- Rotter B.A, Prelusky D.B. and Pestka J.J. 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J Toxicol Environ Health*. 48:1–34.
- Russell, L., Cox, D.F., Larsen, G., Bodwell, K. And Nelson, C.E. 1991. Incidence of molds and mycotoxins in commercial animal feed mills in seven midwestern states 1988–1989. *J. Anim. Sci.* 69: 5–12.
- Santana-Mayor, A., Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A.V. and Rodríguez-Delgado, M.A. 2019. Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 116: 214-235.
- Scarpino, V., Reyneri, A. and Blandino, M. 2019. Development and Comparison of Two Multiresidue Methods for the Determination of 17 *Aspergillus* and *Fusarium* Mycotoxins in Cereals Using HPLC-ESI-TQ-MS/MS. *Frontiers in Microbiology*. 10: 1-12.
- Scott, P.M. 1996. Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *J AOAC Int* 79:875–82.

- Sedmikova, M., Reisnerova, H., Dufkova, Z., Barta, I. & Jilek, F. 2001. Potential hazard of simultaneous occurrence of aflatoxin B₁ and ochratoxin A. *Veterinarni Medicina-Praha*. 46(6): 169-174.
- Serrano, A.B., Font, G., Mañes, J. and Ferrer, E. 2013. Comparative assessment of three extraction procedures for determination of emerging Fusarium mycotoxins in pasta by LC-MS/MS. *Food Control*. 32: 105–114.
- Shanakhat, H., Sorrentino, A., Raiola, A., Romano, A., Masi, P. and Cavella, S. 2018. Current methods for mycotoxins analysis and innovative strategies for their reduction in cereals: an overview. *J Sci Food Agric*. 98: 4003–4013.
- Sharma, R.P. 1993. Immunotoxicity of mycotoxins. *J Dairy Sci*. 76: 892–897.
- Sheliya, K.G. and Shah, K.V. 2013. Ultra performance liquid chromatography (UPLC): A modern chromatography technique. *An International Journal Of Pharmaceutical Sciences*. 78-99.
- Shephard, G.S. (2008). Determination of mycotoxins in human foods. *Chemical Society Reviews*. 37: 2468-2477.
- Smith T.K. and Seddon I.R. 1998. Toxicological synergism between Fusarium mycotoxins in feeds. In: Lyons TP, Jacques KA, editors. *Biotechnology in the feed industry*. Loughborough, U.K.: Nottingham Univ. Press. p 257–69.
- Smith, J.E. and Lewis, C.W. (1994), *Mycotoxins in Human Nutrition and Health*, European Commission DG XII, Science Research and Development, EUR 16048 EN.
- Smith, R.M. 2003. Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A*. 1000: 3-27.
- Soleimany, F., Jinap, S. and Abas, F. 2012. Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 130: 1055-1060.
- Somogyi, Á. 2008. Mass spectrometry instrumentation and techniques. *Medical Applications of Mass Spectrometry* K. Vékey, A. Telekes and A. Vertes (editors). 93-140.
- Spanjer, M. C., Rensen, P. M., and Scholten, J. M. 2008. LC-MS/MS multimethod for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Addit. Contam.* 25, 472-489.
- Steyn, P.S. and Stander, M.A. 1999. "Mycotoxins with Special Reference to the Carcinogenic Mycotoxins: Aflatoxins, Ochratoxins and Fumonisins", Ballantyne, B., Marrs, T.C., Syversen, T.C.M., (Eds.) *General And Applied Toxicology*, United Kingdom, Macmillian Reference Ltd., pp. 2145.

- Stoev, S.D. 2013. Food safety and increasing hazard of mycotoxin occurrence in foods and feeds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53: 887-901.
- Streit, E., Naehrer, K., Rodrigues, I. and Schatzmayr, G. 2013. Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long - term analysis with special focus on Europe and Asia. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 93: 2892-2899.
- Stroka, J., Dasko, L., Spangenberg, B. & Anklam, E. 2004. Determination of the mycotoxin, sterigmatocystin, by thin layer chromatography and reagent-free derivatisation. *Journal of Liquid chromatography & Related Technologies.* 27: 2101-2111.
- Sudakin, D.L. 2003, Trichothecenes in the environment: Relevance to human health. *Toxicol. Lett.* 143: 97-107.
- Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R. and Schuhmacher, R. 2006. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20: 2649–2659.
- Sulyok, M., Krska, R. and Schuhmacher, R. 2007. A liquid chromatography/ tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Anal Bioanal Chem.* 389(5):1505–23.
- Sulyok, M., Stadler, D., Steiner, D. and Krska, R. 2020. Validation of an LC-MS/MS-based dilute-and-shoot approach for the quantification of > 500 mycotoxins and other secondary metabolites in food crops: challenges and solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* .412:2607–2620.
- Sun, H., Ge, X., Lv, Y. and Wang, A. 2012. Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. *Journal of Chromatography A.* 1237: 1-23.
- Sypecka, Z., Kelly, M. and Breteton, P. 2004. Deoxynivalenol and zearalenone residues in eggs of laying hens fed with a naturally contaminated diet: effects on egg production and estimation of transmission rates from feed to eggs. *J Agric Food Chem.* 52: 5463–71.
- Swartz, M.E. 2005. UPLC™: An introduction and review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.* 28: 1253-1263.
- Taleuzzaman, M., Ali, S., Gilani, S.J., Imam, S.S. and Hafeez, A. 2015. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review. *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry.* 2(6) 1056.
- Tanaka, K., Sago, Y., Zheng, Y., Nakagawa, H. and Kushiro, M. 2007 Mycotoxins in rice. *International Journal of Food Microbiology.* 119: 59–66.

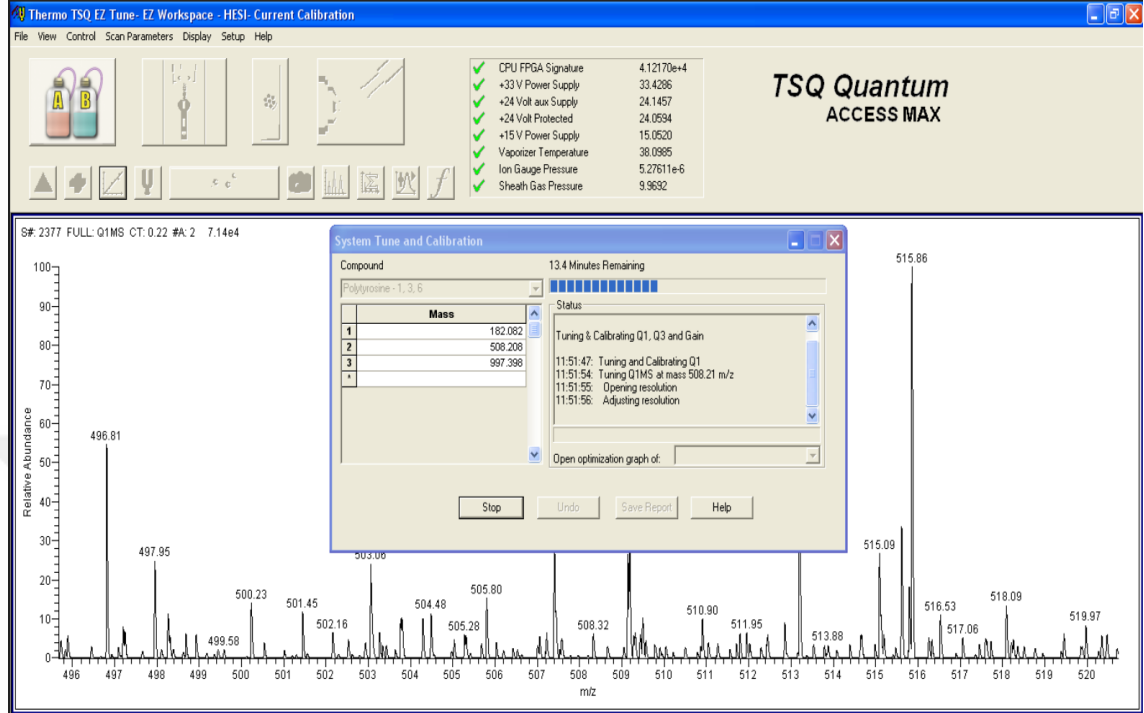
- Tang Y.Y., Lin, H.Y., Chen, Y.C., Su, W.T., Wang, S.C., Chiueh, L.C. and Shin, Y.C. 2013. Development of a Quantitative Multi-Mycotoxin Method in Rice, Maize, Wheat and Peanut Using UPLC-MS/MS. *Food Anal. Methods*. 6: 727–736
- Tangnia, E. K., Waegeneersa, N., Overmeireb, I.V., Goeyensb, L. and Pussemier, L. 2008. Mycotoxin analyses in some home-produced eggs in Belgium reveal small contribution to the total daily intake. *Sci Total Environ*. 407:4411–4418.
- Taylor, P.J. 2005. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*. 38: 328–334.
- Taverniers, I., De Loose, M. and Bockstaele, E.V. 2004. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, 23: 535-552.
- Tola, M. & Kebede, B. 2016. Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review, *Cogent Food & Agriculture*, 2:1, 1191103. pp.1-12.
- Trenholm, H.L., Friend, D.W., Hamilton, R.M.G., Thompson, B.K. and Hartin, K.E. 1986. Incidence and toxicology of deoxynivalenol as an emerging mycotoxin problem. In: Proc. VI International Conf. on the Mycoses. Pan American Health Organization, Washington, DC.
- Tunail, N. 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve uygulamaları. Funguslar ve mikotoksinler. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını, 3. Bölüm, 13. Kısım, Ankara.
- Turner, N.W., Subrahmanyam, S. and Piletsky, S.A. 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*. 632: 168-180.
- Ueno Y. 1971. Toxicological and biological properties of fusarenon-X, a cytotoxic mycotoxin of *Fusarium nivale* Fn-2B. In: Purchase IFH, editor. Proc Symp Mycotoxins Hum Health 2–4 Sep 1970, Pretoria, South Africa. London: MacMillan. p 163–78.
- Ueno, Y. 1983. Trichothecenes-Chemical, Biological and Toxicological Aspects. Elsevier, Tokyo, Japan.135-146
- Ueno, Y., Umemori, K., Nimi, E., Tanuma, S., Nagata, S., Sugamata, M., Ihara, T., Sekijima, M., Kawai, K. and Ueno, I. 1995, Induction of apoptosis by T-2 toxin and other natural toxins in HL-60 human promyelotic leukemia cells. *Nat. Toxins* 3, 129-137.
- Ukwuru, M.U., Ohaegbu, C.G. and Muritala, A. 2017. An Overview of Mycotoxin Contamination of Food and Feeds. *Journal of Biochemical and Microbial Toxicology*. 1-11.

- Ünüsan, N. 2019. Systematic review of mycotoxins in food and feeds in Turkey. *Food Control*. 97: 1-14.
- Van Egmond, H. P., Schothorst, R. C., & Jonker, M. A. (2007). Regulations relating to mycotoxins in food: Perspectives in a global and European context. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 389: 147–157.
- Wang, Z.G., Feng, J.N. and Tong, Z. 1993. Human toxicosis caused by mouldy rice contaminated by Fusarium and T-2 toxin. *Biomed Environ Sci*. 6: 65–70.
- Wang, J. and Turnipseed, S.B. 2012. Chemical analysis: Quantitative and confirmatory methods. In: J. Wang J.D. MacNeil J.F. Kay (Editors), *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*, Wiley, New Jersey, pp. 187-226.
- Wannemacher, R.W. AND Wiener S.L. 1997. Trichothecene Mycotoxins. Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Office of The Surgeon General Department of the Army, USA, pp. 655-676.
- Westman-Brinkmalm, A. and Brinkmalm, G. 2009. A mass spectrometer's building blocks. In: R. Ekman J. Silberring A. Westman-Brinkmalm A. Kraj (Editors), *Mass Spectrometry: instrumentation, interpretation, and applications*, Wiley, New Jersey, pp. 15-88.
- World Health Organization, & International Agency for Research on Cancer (1993) Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.
- Wilm, M.2011. Principles of Electrospray Ionization. *Molecular & Cellular Proteomics* DOI:10.7 10.1074/mcp.M111.009407–1
- Veršilovskis, A. & De Saeger, S. 2010. Sterigmatocystin: occurrence in foodstuffs and analytical methods-An overview. *Molecular Nutrition & Food Research*. 54: 136-147.
- Vestal, M. L. 2001. Methods of Ion Generation. *Chem. Rev*. 101: 361–375.
- Viegas, C., Nurme, J., Piecková, E. & Viegas, S. 2020. Sterigmatocystin in foodstuffs and feed: aspects to consider. *Mycology*. 11:2, 91-104.
- Villiers, A., Lestremat, F., Szucs, R., Gélébart, S., David, F. and Sandra, P. 2006. Evaluation of ultra performance liquid chromatography Part I. Possibilities and limitations. *Journal of Chromatography A*. 1127: 60-69.
- Yagen, B., Joffe, A.Z., Horn, P., Mor, N. and Lutsky, I.I. 1977. Toxins from a strain involved in ATA. In: Rodericks JV, Hesseltine CW, Mehlman MA, eds. *Mycotoxins in Human and Animal Health*. Park Forest South, Ill: Pathotox Publishers; pp. 329–336.

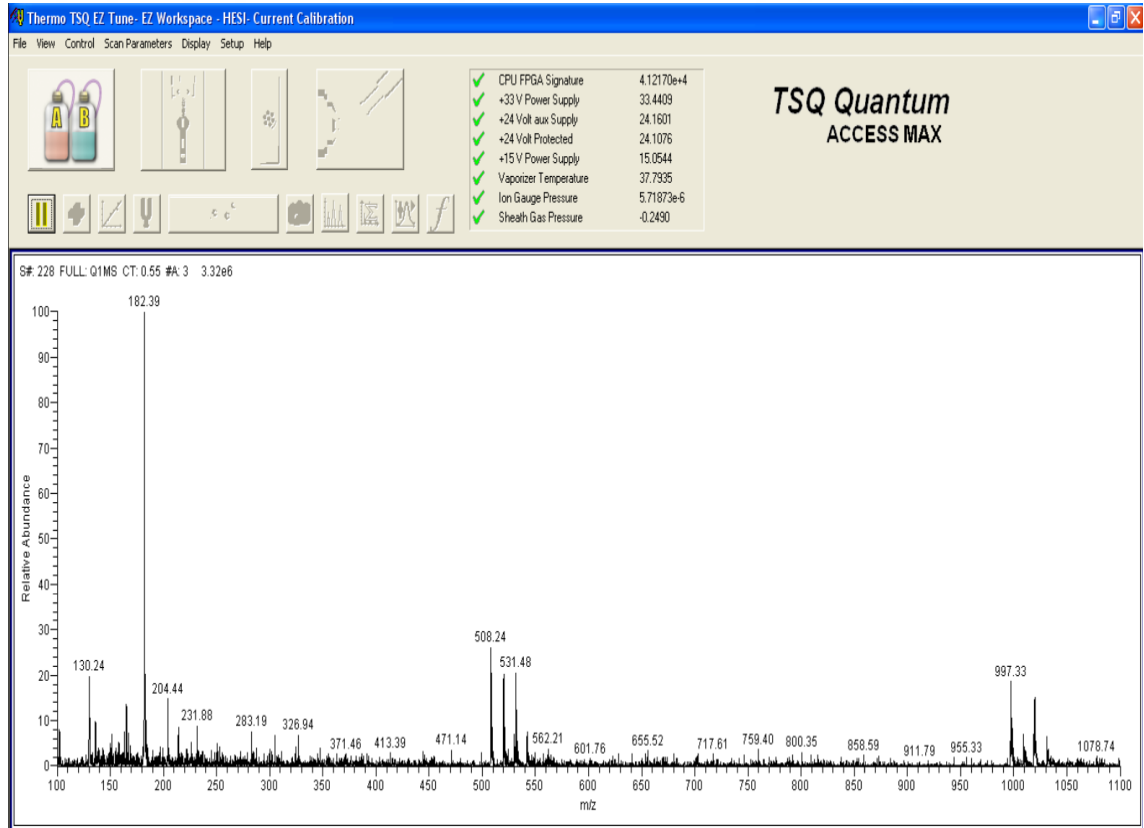
- Yavuz, O. ve Aksoy, A. 2016. Pestisit analizlerinde kullanılan metotlar. Türkiye Klinikleri *J. Vet. Sci. Pharmacol Toxicol. Special Topics*. 2: 89-100.
- Yazar, S. and Omurtag, G.Z. 2008. Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. *International Journal of Molecular Science*. 9: 2062-2090.
- Yamashita, M. and Fenn, J.B. 1984. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* 88: 4451–4459.
- Zagorevskii, D. 2003. Fundamentals: Physical Methods, Theoretical Analysis, and Case Studies in Comprehensive Coordination Chemistry II,
- Zhang, L., Dou, X., Zhang, C., Logrieco, A.F. and Yang M. A. 2018. Review of Current Methods for Analysis of Mycotoxins in Herbal Medicines. *Toxins*. 10(2): 65.
- Zhou, H.R., Harkema, J.R., Hotchkiss, J.A., Yan, D., Roth, R.A. and Pestka, J.J. 2000. Lipopolysaccharide and the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol) synergistically induce apoptosis in murine lymphoid organs. *Toxicol Sci*. 53: 253–63.
- Zinedine, A., Soriano, J. M., Molto, J. C., & Manes, J. (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*. 45(1): 1-18.

7. EKLER

Ek 1. Cihazın ayarlama işlemi yapılırken ekran görüntüsü(1)



Ek 2. Cihazın ayarlama işlemi yapılırken ekran görüntüsü(2)



Ek 3. Pirinçte yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (seyrelt ve enjekte et)

Nivalenol								
250 ppb			1000 ppb			2500 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
229,045	232,646	234,593	937,880	944,970	829,400	2313,525	2285,075	2205,925
232,932	235,288	233,847	930,270	947,630	804,700	2381,300	2398,750	2203,100
239,602	231,743	232,668	924,770	952,940	807,960	2378,475	2393,625	2200,150
235,100	234,303	232,642	931,550	963,230	869,620	2423,475	2413,000	2279,375
232,227	234,025	230,731	930,560	956,840	911,690	2253,275	2358,400	2213,400
235,080	232,675	233,387	945,940	954,290	810,230	2242,375	2378,950	2257,075
Deoksinivalenol								
25 ppb			100 ppb			250 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
24,725	24,477	24,433	90,220	97,339	96,906	223,535	229,608	217,113
24,829	24,610	24,498	97,413	96,301	97,486	213,820	217,550	216,040
24,814	24,208	24,150	85,415	97,102	96,037	217,720	248,998	221,393
24,751	24,424	24,577	77,081	97,278	96,081	212,358	241,233	218,678
24,398	24,491	24,485	95,093	96,221	98,749	237,095	249,443	213,685
24,705	24,385	24,528	98,344	96,729	98,875	219,133	248,678	216,180
Fumonisin B1								
25 ppb			100 ppb			250 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
20,762	20,586	22,485	79,352	71,317	76,610	193,855	163,525	160,990
19,966	21,649	21,515	83,339	71,860	76,092	187,780	170,945	161,075
20,097	20,864	20,099	81,634	73,224	78,424	189,088	158,758	173,935
19,544	22,213	20,881	79,304	71,429	70,578	180,175	173,233	193,533
19,494	21,256	21,922	78,294	72,189	72,387	188,970	180,300	177,035
20,689	21,587	23,571	77,127	74,512	73,825	187,243	175,183	174,115
Beta zearalenol								
25 ppb			100 ppb			250 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
23,834	23,809	24,133	81,045	93,942	93,469	195,085	217,655	227,663
23,098	24,945	24,167	80,644	88,949	91,183	190,863	224,280	242,373
23,378	24,665	22,933	83,126	93,901	91,407	190,280	221,555	234,985
23,760	24,243	23,956	84,164	91,618	89,662	189,175	220,800	223,125
23,191	23,809	23,440	85,057	90,371	91,207	189,305	219,160	226,640
23,504	24,091	23,827	88,023	90,243	91,498	187,665	215,335	230,408

Ek 3. Pirinçte yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (seyrelt ve enjekte et) (devamı)

Fumonisin B2								
5 ppb			20 ppb			50 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
3,876	4,622	4,029	20,009	14,723	18,342	35,442	35,673	34,724
3,898	4,106	4,031	20,853	14,916	17,757	37,348	39,731	34,273
3,948	4,116	4,311	20,388	15,526	16,184	34,623	37,998	33,394
3,839	3,961	4,063	15,089	13,746	16,505	37,953	36,941	31,514
3,885	4,067	4,092	15,162	14,652	14,869	35,590	34,775	32,741
3,819	3,913	3,959	16,058	15,560	15,979	37,895	35,003	31,361
Okratoksin A								
5 ppb			20 ppb			50 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
4,741	4,686	4,879	17,165	18,788	19,712	43,178	46,404	43,401
4,827	4,755	4,795	16,820	17,832	19,115	45,918	50,377	42,908
4,744	4,911	4,672	16,276	18,081	19,545	41,018	48,673	43,507
4,731	4,740	4,850	16,275	18,536	19,255	44,734	50,772	43,568
4,761	4,779	4,923	16,561	20,181	19,178	44,196	45,183	44,965
4,775	4,753	4,692	16,506	19,157	18,870	45,297	44,721	42,583
Zearalenone								
25 ppb			100 ppb			250 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
24,454	24,448	24,419	90,313	98,525	90,333	237,196	237,623	219,340
24,381	24,460	24,454	93,525	96,959	91,128	236,362	238,493	220,188
24,192	24,261	24,739	93,208	98,202	102,586	233,316	231,950	212,425
24,586	24,747	24,703	90,333	97,703	94,605	242,884	238,100	218,580
24,800	24,610	24,279	91,128	97,483	98,807	234,819	226,598	217,423
24,418	24,559	24,575	93,601	97,827	97,848	236,430	236,555	213,713
Sterigmatosistin								
5 ppb			20 ppb			50 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
4,824	3,727	3,619	18,802	16,251	16,584	40,070	41,854	37,727
4,610	3,816	3,706	19,184	18,057	17,751	41,305	42,436	38,400
4,872	3,778	3,737	19,010	17,487	18,259	39,615	39,083	38,060
4,778	3,737	3,774	18,530	18,530	16,802	40,268	38,580	37,368
4,642	3,740	3,811	18,108	17,637	17,166	40,716	41,101	38,047
4,701	3,821	3,861	18,779	18,779	16,930	40,342	40,435	36,713

Ek 4. Yulafta yapılan validasyon çalışması sonucu elde edilen ham veriler (seyrelt ve enjekte et)

Nivalenol								
250 ppb			1000 ppb			2500 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
235,605	239,728	236,595	1001,750	961,200	991,680	2008,525	2491,700	2448,050
229,454	237,543	236,083	995,970	965,670	1002,190	2401,525	2488,000	2410,800
231,196	239,260	238,533	994,180	983,030	961,970	2426,625	2476,175	2378,650
232,682	236,170	236,823	996,750	802,860	980,430	2059,950	2465,450	2389,800
232,943	236,388	236,385	986,580	817,690	979,150	2444,925	2439,875	2325,550
235,084	235,423	235,085	1012,010	796,320	965,660	2463,225	2448,150	2428,275
Deoksinivalenol								
25 ppb			100 ppb			250 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
23,906	24,340	24,535	92,722	95,632	92,484	240,415	221,005	242,103
23,152	24,488	24,377	92,564	96,124	92,350	244,133	228,710	239,785
24,481	24,745	24,075	86,798	96,252	91,997	242,465	211,585	240,428
24,417	24,328	24,308	91,633	96,605	92,048	235,950	200,670	244,083
24,150	24,296	24,631	91,168	97,207	92,742	236,920	242,210	241,240
24,006	24,383	24,209	85,875	94,876	92,372	239,040	218,405	241,855
Fumonisin B1								
25 ppb			100 ppb			250 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
24,281	24,795	23,820	94,518	92,501	94,281	204,518	191,915	205,215
24,517	24,459	22,386	95,953	86,147	93,295	200,358	190,755	201,753
24,189	24,282	22,773	95,650	88,023	92,857	200,093	197,518	205,305
24,149	24,430	23,095	93,866	85,685	92,559	215,890	197,468	204,510
23,688	24,514	22,414	98,847	87,155	94,421	209,130	177,400	210,905
24,062	24,088	22,827	95,861	87,939	96,866	217,635	187,558	205,800
Beta zearalenol								
25 ppb			100 ppb			250 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
24,493	24,855	23,854	90,833	99,957	100,648	247,138	220,378	251,660
24,820	24,730	24,722	91,085	100,033	98,961	249,915	223,535	250,073
24,517	24,823	23,958	91,443	99,486	99,218	249,710	223,598	249,145
24,627	24,785	24,838	87,576	101,452	100,548	248,588	224,688	248,453
24,318	24,965	24,692	94,365	100,870	99,932	249,850	232,895	246,650
24,639	24,733	24,531	95,193	100,110	98,788	249,078	223,770	249,045

Ek 4. Yulafta yapılan validasyon çalışması sonucu elde edilen ham veriler (seyrelt ve enjekte et) (devamı)

Fumonisin B2								
5 ppb			20 ppb			50 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
4,184	4,385	3,919	18,000	16,097	16,702	48,281	46,981	44,922
3,982	4,302	3,903	18,117	17,192	16,231	47,641	47,438	45,743
3,929	4,285	3,882	17,352	16,018	15,838	48,088	47,428	46,477
4,093	4,240	3,930	18,025	16,228	16,563	47,843	47,537	41,932
4,268	4,246	3,751	18,233	16,398	17,507	47,881	48,138	46,021
4,499	4,250	3,814	16,770	16,152	17,539	48,786	46,937	43,523
Okratoksin A								
5 ppb			20 ppb			50 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
4,934	4,945	4,819	18,456	17,100	19,864	45,934	47,739	47,009
4,830	4,930	4,820	19,928	18,300	19,392	43,175	47,187	46,013
4,882	4,847	4,881	18,913	18,698	19,522	44,635	49,175	49,136
4,874	4,886	4,934	18,765	18,171	19,768	42,744	47,797	47,608
4,780	4,901	4,906	19,401	16,636	18,628	42,564	48,803	49,549
4,844	4,911	4,874	17,650	17,076	17,138	44,655	49,219	47,269
Zearalenone								
25 ppb			100 ppb			250 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
24,720	24,072	24,337	89,418	96,710	82,331	233,225	225,688	235,335
24,202	24,127	24,354	85,048	95,262	88,406	229,575	232,015	227,445
24,630	24,133	24,099	88,983	93,735	92,917	204,868	226,560	227,760
23,701	24,308	24,254	83,034	91,651	87,315	221,253	242,613	237,188
24,095	23,988	24,557	91,986	97,662	87,972	195,785	240,763	225,380
24,430	24,340	24,286	90,091	94,290	86,038	199,218	228,793	225,993
Sterigmatosistin								
5 ppb			20 ppb			50 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
3,648	3,707	3,689	15,363	14,761	14,989	39,565	34,692	34,064
3,952	3,608	3,535	14,979	16,267	15,637	36,644	35,114	31,526
3,891	3,710	3,763	14,652	14,963	12,266	38,118	35,875	33,728
3,897	3,661	3,564	15,352	15,212	13,233	36,445	36,280	34,299
3,739	3,763	3,630	14,486	14,383	13,701	36,477	39,765	32,212
3,879	3,709	3,709	15,573	14,966	14,511	33,716	37,583	32,911

Ek 5. Pirinçte yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (QuEChERS)

Nivalenol								
250 ppb			1000 ppb			2500 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
249,971	244,632	243,880	886,910	829,800	800,840	2270,950	2282,325	2491,750
247,708	246,032	244,335	868,430	820,320	824,910	2292,075	2298,975	2513,375
246,911	243,967	245,287	905,500	820,510	828,250	2278,600	2262,625	2460,175
249,018	248,422	247,092	926,490	838,140	839,980	2304,850	2286,100	2407,050
252,647	245,067	245,380	914,290	836,680	846,320	2300,575	2314,900	2394,575
247,241	243,825	243,902	868,430	816,540	831,850	2331,425	2336,100	2478,525
Deoksinivalenol								
25 ppb			100 ppb			250 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
24,442	23,897	24,274	91,561	89,233	87,911	241,845	237,863	214,303
24,393	23,980	24,835	92,629	89,365	87,671	243,220	240,420	219,960
24,653	24,480	23,692	92,759	89,781	88,785	243,710	242,370	229,748
24,716	23,397	23,930	100,542	89,620	88,888	242,658	241,393	214,658
24,435	23,530	24,306	99,384	89,792	89,055	239,583	241,415	220,318
24,708	24,430	23,204	99,450	89,370	89,385	239,535	240,973	220,025
Fumonisin B1								
25 ppb			100 ppb			250 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
19,604	20,429	21,141	81,475	89,275	88,299	178,308	194,698	189,130
19,813	20,951	22,210	83,620	93,164	83,341	188,145	189,098	176,495
18,257	20,435	20,908	81,956	93,339	84,759	179,868	187,823	158,758
19,259	21,379	21,893	84,707	88,776	83,415	185,720	191,585	149,233
18,655	22,053	21,203	81,326	88,605	75,497	193,915	191,710	191,763
19,652	21,689	21,535	83,358	91,913	87,692	160,985	195,250	185,858
Beta zearalenol								
25 ppb			100 ppb			250 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
24,631	24,658	24,294	93,049	85,416	84,120	211,910	208,915	188,690
24,690	24,717	24,771	94,484	85,263	84,001	211,265	208,800	193,790
24,287	24,705	24,971	94,809	85,664	83,518	211,370	217,153	195,903
24,789	24,932	24,963	88,272	84,531	85,438	210,268	212,105	197,150
24,300	24,782	24,261	90,637	86,246	85,043	207,243	211,195	194,495
24,328	24,749	23,788	88,782	85,638	85,769	206,055	207,705	198,670

Ek 5. Pirinçte yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (QuEChERS) (devamı)

Fumonisin B2								
5 ppb			20 ppb			50 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
3,521	3,809	3,724	16,735	15,081	14,104	36,344	38,814	32,742
3,591	3,818	3,818	16,774	15,024	14,997	34,259	38,900	37,193
3,591	3,924	3,731	16,946	15,501	14,373	33,372	38,978	35,125
3,600	3,843	4,201	16,434	15,930	14,937	33,240	40,693	33,094
3,579	3,781	3,889	16,714	15,194	14,984	35,221	38,969	34,753
3,562	3,990	3,739	17,190	15,035	14,620	35,615	37,682	36,300
Okratoksin A								
5 ppb			20 ppb			50 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
4,218	4,227	4,335	14,044	17,827	17,816	44,764	41,457	43,430
4,410	4,197	4,320	15,533	18,626	18,253	44,175	45,158	41,064
4,230	4,184	4,348	16,102	17,734	18,136	43,710	43,028	39,722
4,370	4,198	4,310	18,665	18,583	18,402	43,096	43,043	39,543
4,275	4,228	4,263	16,909	17,289	18,829	43,258	44,530	39,985
4,129	4,285	4,299	17,013	18,194	18,583	43,132	45,7005	40,452
Zearalenone								
25 ppb			100 ppb			250 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
24,235	24,912	24,800	90,801	96,174	100,073	180,075	175,600	234,593
24,452	24,719	24,994	95,981	93,999	99,913	183,163	183,828	221,198
24,600	24,789	25,143	87,565	89,707	99,019	177,913	184,360	177,718
24,434	24,899	24,871	94,126	94,548	101,946	190,298	184,093	227,895
23,853	24,617	24,899	94,037	99,617	101,748	183,633	185,503	187,343
24,065	24,967	24,881	96,558	89,491	95,694	182,643	194,753	188,350
Sterigmatosistin								
5 ppb			20 ppb			50 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
3,784	3,805	3,576	14,255	13,922	14,094	35,917	37,206	31,775
3,832	3,731	3,839	16,285	14,167	17,637	37,369	37,515	38,749
3,612	3,712	3,898	13,574	13,873	17,223	35,528	38,400	37,515
3,711	3,644	3,517	13,814	13,786	15,413	32,109	38,503	33,124
3,644	3,572	3,806	15,136	13,331	13,101	32,692	37,368	36,248
3,743	3,743	3,590	13,560	15,632	16,571	33,311	40,759	36,428

Ek 6. Yulafta yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (QuEChERS)

Nivalenol								
250 ppb			1000 ppb			2500 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
250,626	241,948	249,740	940,170	980,670	915,790	2473,425	2215,125	2375,250
249,206	247,495	248,000	971,090	998,420	935,010	2468,350	2141,250	2449,950
247,782	248,185	249,393	957,690	1037,360	915,260	2489,750	2234,775	2431,400
248,186	249,255	246,773	971,130	981,450	906,060	2470,250	2309,125	2320,125
251,478	248,438	242,810	977,020	975,040	907,980	2468,825	2037,300	2360,725
249,434	245,928	246,490	971,200	970,640	864,090	2433,725	2251,225	2495,450
Deoksinivalenol								
25 ppb			100 ppb			250 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
25,813	24,428	24,620	99,796	95,257	103,887	248,660	228,233	239,340
24,155	24,232	24,730	101,725	96,975	100,281	245,835	222,663	240,463
24,960	24,895	24,905	97,113	93,881	100,047	238,483	222,105	249,235
24,994	24,988	24,450	99,806	87,149	100,836	237,705	233,540	248,168
24,329	24,685	24,616	97,736	97,098	98,713	245,820	229,093	248,683
24,882	24,288	24,603	99,435	90,860	99,208	249,060	210,048	244,120
Fumonisin B1								
25 ppb			100 ppb			250 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
23,535	23,763	24,320	87,046	89,370	92,950	227,265	206,338	196,148
23,780	24,408	24,410	94,651	93,980	96,549	223,140	207,378	192,188
23,795	24,596	24,871	91,445	96,140	97,006	206,825	205,398	188,210
23,782	23,792	24,602	90,547	95,703	97,585	199,048	203,463	189,178
23,324	23,825	24,551	88,023	94,277	98,153	199,088	233,520	182,193
23,470	24,437	24,002	88,372	95,039	96,283	203,195	216,010	190,300
Beta zearalenol								
25 ppb			100 ppb			250 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
24,739	24,255	24,415	96,732	90,330	98,869	238,180	239,300	243,168
24,537	24,098	24,543	97,502	88,330	98,756	228,250	249,078	247,693
24,413	24,453	24,365	96,890	89,599	97,782	228,583	249,130	250,930
24,301	24,308	24,350	96,556	90,002	93,792	228,445	251,323	251,880
24,230	24,480	24,637	96,693	92,197	96,921	230,495	249,425	238,098
24,401	24,664	24,487	98,593	93,444	96,129	243,283	247,108	246,973

Ek 6. Yulafta yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (QuEChERS) (devamı)

Fumonisin B2								
5 ppb			20 ppb			50 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
4,447	4,827	4,381	15,668	16,050	17,487	42,878	42,245	42,197
4,535	4,777	4,473	16,067	16,136	17,727	43,109	41,833	40,318
4,308	4,663	4,575	15,236	15,035	16,454	43,987	41,073	38,625
4,700	4,802	4,505	15,508	16,233	17,224	44,368	41,622	41,432
4,850	4,991	4,665	16,739	16,095	17,057	44,653	42,075	40,564
4,860	4,918	4,659	16,907	15,891	16,798	41,532	42,982	40,017
Okratoksin A								
5 ppb			20 ppb			50 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
4,941	4,973	4,836	19,889	19,366	18,573	49,844	49,804	41,637
4,956	4,860	4,950	19,988	19,837	19,012	46,612	44,904	43,664
4,916	4,963	4,968	19,859	19,280	18,064	45,985	49,266	42,444
4,940	4,878	4,851	20,113	17,182	18,085	49,872	49,045	46,950
4,980	4,916	4,942	19,665	19,737	17,818	50,231	46,775	45,147
4,972	4,976	4,989	20,215	19,544	18,818	49,691	48,637	46,075
Zearalenone								
25 ppb			100 ppb			250 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
24,230	24,693	24,690	98,768	94,609	88,071	243,285	220,578	209,835
24,577	24,459	24,978	97,449	96,165	93,888	248,048	224,198	225,610
25,125	24,635	24,304	98,889	94,535	92,874	244,258	226,670	228,273
24,677	24,556	24,254	97,603	97,018	87,860	237,983	223,460	212,515
24,382	24,344	24,238	97,260	97,877	89,035	238,075	241,740	216,223
24,425	24,354	24,454	97,288	97,165	92,107	244,225	243,145	220,648
Sterigmatosistin								
5 ppb			20 ppb			50 ppb		
1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün	1. gün	2.gün	3.gün
3,662	4,003	3,927	15,268	17,290	15,641	37,073	38,934	34,665
3,651	3,847	3,846	15,754	15,239	15,393	36,937	38,853	35,462
3,669	3,946	3,925	14,898	17,177	15,679	37,310	39,156	34,897
3,648	3,780	3,871	14,508	15,746	15,573	36,688	37,583	35,796
3,657	3,721	3,758	14,012	15,949	15,994	35,758	37,364	34,084
3,559	3,728	3,801	14,642	16,319	16,438	35,719	37,063	35,442

ÖZGEÇMİŞ



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2013-2021	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği A.B.D., Antalya
Lisans 2016-2020	Anadolu Üniversitesi İktisat Fakültesi, Uluslararası İlişkiler Bölümü, Eskişehir
Yüksek Lisans 2010-2013	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği A.B.D., Antalya
Lisans 1997-2001	Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Kontrol Görevlisi 2004-Devam Ediyor	Tarım ve Orman Bakanlığı Manavgat İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, Manavgat, Antalya
Gıda Mühendisi 2002-2004	Sezer Turizm Eğitim Sağlık Gıda San. Ve Tic. A.Ş. Manavgat, Antalya

ESERLER

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1- **Yıldız Öcal, M.** and Erol, T. (2017). Investigation of Food Borne Infections in Antalya. II. Uluslararası Turizm ve Mikrobiyal Gıda Güvenliği Kongresi. 13-14 Aralık 2017. Antalya.

2-Erol, T. and **Yıldız Öcal, M.** (2017).Official Controls on Hotels. II. Uluslararası Turizm ve Mikrobiyal Gıda Güvenliği Kongresi. 13-14 Aralık 2017. Antalya.