

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**KATI FAZ EKSTRAKSİYON KARTUŞLARININ GIDA VE YEMLERDE
AFLATOKSİN TAYİNİNDE EKSTRAKT SÜZME, SAFLAŞTIRMA VE
KONSANTRE EDİLMESİNDE KULLANILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Cansu AĞAN
DANIŞMAN : Prof. Dr. Fikret Nafi ÇOKSÖYLER
İKİNCİ DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Gökhan BORAN

Van- 2017

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**KATI FAZ EKSTRAKSİYON KARTUŞLARININ GIDA VE YEMLERDE
AFLATOKSİN TAYİNİNDE EKSTRAKT SÜZME, SAFLAŞTIRMA VE
KONSANTRE EDİLMESİNDE KULLANILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Cansu AĞAN

Bu çalışma YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından **2016-FBE-YL005** No'lu proje olarak desteklenmiştir.

Van- 2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. F. Nafi ÇOKSÖYLER danışmanlığında, Cansu AĞAN tarafından sunulan **“Katı Faz Ekstraksiyon Kartuşlarının Gıda ve Yemlerde Aflatoksin Tayininde Ekstrakt Süzme, Saflaştırma ve Konsantre Edilmesinde Kullanılması”** isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince .../.../.... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Fikret Nafi ÇOKSÖYLER

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Dilek AVŞAROĞLU ERKAN

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Raciye MERAL

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza

.....
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Cansu AĞAN

ÖZET

KATI FAZ EKSTRAKSİYON KARTUŞLARININ GIDA VE YEMLERDE AFLATOKSİN TAYİNİNDE EKSTRAKT SÜZME, SAFLAŞTIRMA VE KONSANTRE EDİLMESİNDE KULLANILMASI

AĞAN, Cansu

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı : Prof. Dr. F. Nafi ÇOKSÖYLER

Ocak 2017, 63 sayfa

Aflatoksinler (AF), esas olarak *Aspergillus flavus* türü funguslar tarafından üretilen bir grup mikotoksindir. Bitkisel kökenli gıdalarda Aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ formları önemlidir. Aflatoksin analizlerinin önemli basamağı, kromatografik ayırım öncesi örnekten aflatoksinlerin ekstraksiyonu, süzülmesi, saflaştırılması ve konsantrasyonudur. Klasik analizde bu aşamalar uzun zaman alır ve önemli ekipmanlar gerektirir. Bu çalışmada aflatoksinlerin İnce Tabaka Kromatografisi ile tayini için ekstrakt saflaştırma ve konsantre etme aşamalarını yapacak ekonomik ve pratik bir katı faz ekstraksiyon kartuşu geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla kil dahil çeşitli adsorbantlar, malzemeler ve solventler denenmiş sadece silika jel G60 ile oldukça sınırlı bir başarı elde edilmiştir. Ayrıca HPLC analizlerinde aynı amaçla kullanılan İmmuno Affinite Kolonları (IAC) klasik olarak saflaştırılmış ekstraktın yeniden temizlenmesinde kullanılarak TLC'ye yetecek miktarda oldukça temiz numune ekstraktı elde edilmiştir. Her iki kolonun başarısı Antep fıstığı örneğinde geri alma çalışması ile test edilmiştir. Ticari olabilecek bir kolon geliştirilememiş olmakla birlikte klasik yöntemle IAC ile temizleme eklenerek TLC'nin performansı çok yukarı çıkartılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin, Antep fıstığı, IAC, İnce tabaka kromatografisi

ABSTRACT

USE OF SOLID PHASE EXTRACTION CARTRIDGES FOR FILTRATION, PURIFICATION, AND CONCENTRATION OF EXTRACT FOR THE ANALYSIS OF AFLATOXINS IN FOODS AND FEEDS

AGAN, Cansu
M. Sc. Thesis, Food Engineering
Supervisor : Prof. Dr. F. Nafi ÇOKSÖYLER
January 2017, 63 pages

Aflatoxins are a group of mycotoxins, produced by mainly *Aspergillus flavus* group of fungi. Aflatoxin B1, B2, G1 and G2 are important for plant based foods. The important steps in aflatoxin analysis, prior chromatographic separation, are sample extraction and extract filtering, purification and concentration. In classical analysis, these steps take a long time and need important laboratory equipments. In this study, we tried to develop a economic and practical a solid phase extraction cartridge for extract filtering, purification and concentration for aflatoxin analysis. For this purpose, many sorbents including clays are tested. But only Silica gel G60 showed limited performance. Apart from these, Immunoaffinite column (IAC) is used for re-purification of BF method final extract to obtain highly purified extract for TLC separation. Both of applications are tested by aflatoxin skipped pistachio nut samples. In classical BF method, IAC re-purification of final extract is increased performance of TLC analysis.

Keywords: Aflatoxin, Pistachio, IAC, Thin layer chromatography



ÖN SÖZ

Aflatoksinler keşfedildikleri 1960'lı yıllardan bu yana gıdalarda en tehlikeli maddelerden biri olarak kabul edilmektedir. O yıllardan bu yana Aflatoksinler Türkiye'nin geleneksel kuru meyve ihracatının en önemli dar boğazlarından birisi olmuştur. Çok pahalı olan aflatoksin analizleri özellikle KOBİ gıda işletmeleri tarafından yapılamadığı/yaptırılamadığı için işletmeler kendi oto kontrollerini yapamamakta ve ihraç ürünlerinin geri gönderilmeleri hala devam etmektedir. Bu çalışma aflatoksin analizlerini hem kurulum masrafları ve hem de sarf masrafları olarak ucuzlatarak sorunlu sektörün kendi iç denetimlerini yapabilmeye olanak vermesi ve 60 yıldır çözülememiş bu sorunun çözümüne küçük bir katkı konmak üzere planlanan, ulusal imkanlarla metot ve ekipman geliştirme projesinin bir parçasıdır. Bu proje ile klasik aflatoksin analizinin çok uzun süren ve masraflı aşamalarını azaltacak ve piyasada kullanılan tek malzeme olan ve çok pahalı olan İmmuno Affinite Kolonlarına ucuz ve yerli bir alternatif olacak bir katı faz ekstraksiyon kartuşu geliştirilmeye çalışılmıştır. Ancak bu meşakkatli çalışmalar Danışmanımın emekliye ayrılmasından sonra tanınan sınırlı süre içinde tamamlanamamış ve sadece bu konuda ulusal imkanlarla bu sorunun çözülme potansiyeli olduğunu göstermiştir.

Bu tez çalışmasında, her türlü ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, emekli olduktan sonra bile öğrencilerine sahip çıkan danışmanım Sayın Prof. Dr. Fikret Nafi ÇOKSÖYLER'e çok teşekkür ederim. Çalışmanın her aşamasında özellikle IAC, saflaştırılmamış aflatoksin B₁ konsantre çözeltilerini, gerektiğinde saf aflatoksin standartlarını, kritik durumlarda bizle bilgi ve tecrübelerini paylaşan Tarım Köy İşleri Bakanlığı Ankara İl Kontrol Laboratuvarı Müdürlüğü Mikotoksin Referans Laboratuvarı Şefi Dr. Tuğrul Kaymak ve Hüseyin Tülay'a çok teşekkür ederim. Çalışmamda bana zeolitleri sağlayan Jeoloji Mühendisi Bülent ADIGÜZEL'e, Hiflosiperseli sağlayan Ramazan Sevgi'ye, çalışmam boyunca kameralarını kullanmama izin veren ve çekimlerde yardımcı olan Şükrü Öztürk ve Sümeyye Kara'ya, çalışmalarım bana yardım eden Doğan Yaşar ve Gizem Sarıgül'e, tüm yüksek lisans eğitimimiz boyunca birbirimize destek olarak çalışmalarımızı beraber yürüttüğümüz ekip arkadaşlarım Rukyete Aydeniz ve Berfin Elmas'a, eğitimim boyunca her türlü yardım

ve desteği gösteren, manevi olarak bana güç katan sevgili annem Fidan AĞAN'a, sevgili babam Cebail AĞAN'a ve biricik kardeşim Anıl AĞAN'a, zorlu dönemimi kolaylaştıran can dostlarıma, değerli aileme sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım. Ayrıca bu çalışmaya 2016-FBE-YL005 proje numarasıyla gerekli maddi desteği sağlayan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na teşekkürü de bir borç bilirim.

2017

Cansu AĞAN



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖN SÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
EKLER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	4
2.1. Aflatoksinler Hakkında Genel Bilgi	4
2.2. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)	7
2.3. Katı Faz Ekstraksiyonu (KFE).....	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM	11
3.1. Materyal.....	11
3.2. Yöntem.....	12
3.2.1. Aflatoksin B ₁ 'in açılması ve Aflatoksin B ₁ standartlarının konstrasyonun belirlenmesi.....	12
3.2.2. Kullanılacak materyalin testi	13
3.2.3. Adsorbant olarak kullanılan malzemelerin hazırlanması	14
3.2.4. Katı faz ekstraksiyon kartuşlarının oluşturulması	14
3.2.5. Oluşturulan normal faz kartuşun ve hazır olarak alınan ters faz kartuşun yeterli miktarda aflatoksin tutup tutmadığının gösterilmesi.....	15
3.2.6. Aflatoksin standartlarının ve Antep fıstığı numunesinin plakaya tatbiki.....	15
3.2.7. Plakaların yürütülmesi	15
3.2.8. Plakalardaki dijital görüntülerin alınması.....	16
3.2.9. Kil kolonu ile aflatoksin denemesi	16
3.2.10. Hiflosipersel kolonu ile aflatoksin denemesi.....	17
3.2.11. Zeolit kolonu ile aflatoksin denemesi.....	18

	Sayfa
3.2.12. Florisil kolonu ile aflatoksin denemesi.....	18
3.2.13. C ₁₈ kolon ile aflatoksin denemesi	19
3.2.14. Silika jel kolonu ile aflatoksin denemesi	20
3.2.15. Antep fıstığı ekstraktının tasarlanan silika jel kolondan geçirilerek süzülmesi, saflaştırılması ve yoğunlaştırılması.....	20
3.2.16. BF yöntemi kullanılarak Antep fıstığı ekstraktının elde edilmesi ve temizlenmesi	22
3.2.17. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın doğrudan TLC'ye uygulanması	24
3.2.18. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın tasarlanan silika jel kolonundan geçirilerek TLC'ye uygulanması	25
3.2.19. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın IAC'den geçirilerek TLC'ye uygulanması	25
3.2.20. Aflatoksinlerin plaka üzerinde teşhis ve tayinleri	26
3.2.21. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın temizlenmesine ait üç plakanın karşılaştırılması	27
3.2.22. Geri kazanım oranının belirlenmesi.....	27
4. BULGULAR	30
4.1. Spektrofotometrede AFB ₁ Stok Çözeltilisinin Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	30
4.2. Kullanılacak Materyalin Testi	30
4.3. Katı Faz Ekstraksiyon Kartuşlarının Oluşturulması.....	32
4.4. Oluşturulan Normal Faz Kartuşun ve Hazır Olarak Alınan Ters Faz Kartuşun Yeterli Miktarda Aflatoksin Tutup Tutmadığının Gösterilmesi.....	32
4.4.1. Kil ile oluşturulan kolon	32
4.4.2. Hiflosipersel ile oluşturulan kolon	33
4.4.3. Zeolit ile oluşturulan kolon	34
4.4.4. Florisil ile oluşturulan kolon	35
4.4.5. C ₁₈ kolonu.....	36
4.4.6. Silika jel ile oluşturulan kolon.....	37
4.4.7. Antep fıstığı ekstraktının elde edilerek tasarlanan silika jel kolondan geçirilerek süzülmesi, saflaştırılması ve yoğunlaştırılması	38
4.5. Aflatoksinlerin Plaka Üzerinde Teşhis ve Tayinleri.....	39
4.6. BF Yöntemi ile Elde Edilen Son Ekstraktın Temizlenmesine Ait Üç Plakanın Karşılaştırılması.....	45

	Sayfa
4.7. Aflatoksin Standardı, Rezolüsyon ve Antep fıstığı Numunesine Ait Piklerin Elde Edilmesi.....	46
4.8. Geri Kazanım Oranının Belirlenmesi	48
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	52
KAYNAKLAR.....	55
EKLER	58
ÖZGEÇMİŞ.....	63



ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Önemli bazı aflatoksinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri	5
Çizelge 2.2. Uyarı alan mikotoksinlerin gıda ürünlerine ve bazı ülkelere göre dağılım tablosu (EU-RASSF, 2015)	6
Çizelge 4.1. 20x20 cm'lik TLC plakasının alttan 2.0 cm bırakılan hayali hatta tatbik edilen numuneler, miktarları ve developpe sonrası benekte elde edilen aflatoksin miktarları.....	41
Çizelge 4.2. 20x20 cm'lik TLC plakasının alttan 2.0 cm bırakılan hayali hatta tatbik edilen numuneler, miktarları ve developpe sonrası benekte elde edilen aflatoksin miktarları.....	43
Çizelge 4.3. 20x20 cm'lik TLC plakasının alttan 2.0 cm bırakılan hayali hatta tatbik edilen numuneler, miktarları ve developpe sonrası benekte elde edilen aflatoksin miktarları.....	45
Çizelge 4.4. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın doğrudan TLC'ye uygulanmasında geri kazanım oranının hesaplanmasında yardımcı olunan değerler.....	48
Çizelge 4.5. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın doğrudan TLC'ye uygulanmasında geri kazanım oranının hesaplanmasında yardımcı olunan değerler (devam)	49
Çizelge 4.6. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın tasarlanan silika jel kolonundan geçirilerek TLC'ye uygulanmasında geri kazanım oranının hesaplanmasında yardımcı olunan değerler	49
Çizelge 4.7. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın silika jel kolonundan geçirilerek TLC'ye uygulanmasında geri kazanım oranının hesaplanmasında yardımcı olunan değerler (devam)	50
Çizelge 4.8. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın IAC'den geçirilerek TLC'ye uygulanmasında geri kazanım oranının hesaplanmasında yardımcı olunan değerler.....	50
Çizelge 4.9. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın IAC'den geçirilerek TLC'ye uygulanmasında geri kazanım oranının hesaplanmasında yardımcı olunan değerler (devam)	51
Çizelge 4.10. Geri kazanım oranları.....	51



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Bazı aflatoksinlerin kimyasal yapıları.....	4
Şekil 3.1. İnert taban ve üst yüzey oluşturulmasında kullanılan cam yününün temizlenmesine ait fotoğraf.....	14
Şekil 3.2. Kili destek maddesine bağlamada kullanılan uygulama çalışmaları.....	17
Şekil 3.3. C ₁₈ kolonu ile yapılan aflatoksin analiz akım şeması.....	19
Şekil 3.4. Silika jel kolon ile Antep fıstığı ekstraktının, süzülmesi, saflaştırılması ve yoğunlaştırılmasına ait analiz akım şeması.....	21
Şekil 3.5. Analizde kullanılan Antep fıstığı numuneleri	23
Şekil 3.6. BF yöntemi	24
Şekil 3.7. Elde edilen son ekstraktın tasarlanan silika jel kolonundan geçirilmesinde uygulanan işlemler.....	25
Şekil 3.8. Elde edilen son ekstraktın IAC'den geçirilmesinde uygulanan işlemler	26
Şekil 4.1. AFB ₁ çözeltisinin absorbans değeri.....	30
Şekil 4.2. Temizlenmiş cam yününün UV kabininde çekilen görüntüsü	31
Şekil 4.3. Katı faz ekstraksiyon kolonlarının yapımında kullanılan malzemelerin UV kabininde görünümü.....	31
Şekil 4.4. Kil kolonu ile denenmiş aflatoksin analizine ait plaka görüntüsü.....	33
Şekil 4.5. Hiflosipersel kolonu ile denenmiş aflatoksin analizine ait plaka Görüntüsü	34
Şekil 4.6. Zeolit kolonu ile denenmiş aflatoksin analizine ait plaka görüntüsü	35
Şekil 4.7. Florisil kolonu ile denenmiş aflatoksin analizine ait plaka görüntüsü	36
Şekil 4.8. C ₁₈ kolonu ile denenmiş aflatoksin analize ait plaka görüntüsü	37
Şekil 4.9. Silika jel kolonu ile denenmiş aflatoksin analizine ait plaka görüntüsü	38
Şekil 4.10. Silika jel kolonu ile denenmiş Antep fıstığında aflatoksin analizine ait plaka görüntüsü.....	39

Şekil**Sayfa**

Şekil 4.11. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın doğrudan TLC'ye uygulanmasına ait plaka görüntüsü	40
Şekil 4.12. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın tasarlanan silika jel kolondan geçirilerek, TLC'ye uygulanmasına ait plaka görüntüsü.....	42
Şekil 4.13. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın IAC'den geçirilerek, TLC'ye uygulanmasına ait plaka görüntüsü	44
Şekil 4.14. 20x20 cm'lik TLC plakasına tatbik edilen AFB ₁ standartlarının Microsoft Excel Programı ile elde edilen kalibrasyon grafikleri.....	47



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

cm	Santimetre
°C	Santigrat derece
dk	Dakika
g	Gram
mg	Miligram
µg	Mikrogram
ng	Nanogram
nm	Nanometre
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
%	Yüzde

Kısaltmalar

Açıklama

AF	Aflatoksin
AFB ₁	Aflatoksin B ₁
AFB ₂	Aflatoksin B ₂
AFG ₁	Aflatoksin G ₁
AFG ₂	Aflatoksin G ₂
AOAC	Analitik Kimyacılar Birliği
BF	Best Foods
DSRL	Dijital Single Reflex Camera
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
GC/MS	Gaz/Kütle Kromatografisi

HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
HPTLC	Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
IAC	Immuno Affinite Kolonu
KOBİ	Küçük ve Orta Büyüklükteki İşletmeler
LLE	Sıvı Sıvı Ekstraksiyon
RASSF	Gıda ve Yem için Hızlı Uyarı Sistemi
RIA	Radio Immuno Assay
KFE	Katı Faz Ekstraksiyon
MRL	Maksimum Kabul Edilebilir Kalıntı Düzeyi
TBME	Tetra bütıl metil eter
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
UV	Ultra Viyole

EKLER DİZİNİ

Ek	Sayfa
Ek 1. 5-10 ml'lik otomatik pipet ucu, 20 ml'lik plastik şırınga ve farklı adsorbantlar ile hazırlanan kolonların görünümü	58
Ek 2. Aflatoksinleri kolondan geri almak için kullanılan kloroformun her 0.2 ml'de UV kabininden aflatoksin ilerleyişinin gösterilmesi.....	58
Ek 3. Spayklanmış Antep fıstığı ekstraktının kolondan aseton geçirilerek her 1 ml'de UV kabininde ilerleyişinin gösterilmesi	59
Ek 4. Immuno affinite kolonu	59
Ek 5. BF yöntemi ile elde edilen ekstraktın doğrudan TLC'ye uygulanmasında gelquant görüntü analiz programı ile elde edilen pikler ve alanları.....	60
Ek 6. BF yöntemi ile elde edilen ekstraktın tasarlanan silika jel kolonundan geçirilerek TLC'ye uygulanmasında gelquant görüntü analiz programı ile elde edilen pikler ve alanları	61
Ek 7. BF yöntemi ile elde edilen ekstraktın IAC'den geçirilerek TLC'ye uygulanmasında gelquant görüntü analiz programı ile elde edilen pikler ve alanları.....	62

1. GİRİŞ

Gıda ve tarım ürünleri üretimden tüketime sunuluncaya kadar bir takım ortam şartlarına maruz kalmakta ve bulundukları ortamın olumsuz şartlarından etkilenmektedir. Buna ek olarak tarımsal ürünler hasat öncesinde veya sırasında olumsuz koşullardan etkilenmekte ve bunun neticesinde ürünlerde olmasını istemediğimiz, tüketilmesiyle birlikte insan sağlığında kötü sonuçlara neden olan sorunları meydana getirmektedir. Bunların en önemlisi küflerin yaptığı mikotoksinlerdir (Heperkan, 2006). Mikotoksinli besinleri tüketen insanlar ve mikotoksinli yemlerle beslenen hayvanların sağlığını olumsuz etkileyen hastalık “mikotoksikoz” olarak bilinmektedir.

Mikotoksinler bitki, hayvan ve dolayısıyla insanlara toksik etki gösteren fungal ikincil bileşiklerdir. Mikotoksinler, kontamite olmuş gıdalar ve yemlerle beslenen hayvanlar aracılığıyla insanlara geçmektedir (Salem ve Ahmad, 2010). Aflatoksinler bilinen en önemli mikotoksinlerden biridir.

Aflatoksinler, esas olarak *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* türü funguslar tarafından üretilen mikotoksin grubudur. Aflatoksinler birçok faktöre bağlı olarak gelişim göstermektedir. Gıda ürünlerinin üretim, işleme ve depolama aşamalarında, su aktivitesi ve sıcaklık koşullarından etkilenerek tarımsal ürünlerde ve gıda maddelerinde gelişme göstermektedir. Bu nedenle çoğu ülkede aflatoksin sorunu yaşanmaktadır.

Difuranokumarin yapısında bulunan aflatoksinlerin bugüne kadar 18 tane türeві tanımlanmış olmakla birlikte bitkisel kökenli gıda maddelerinde Aflatoksin B₁ (AFB₁), aflatoksin B₂ (AFB₂), aflatoksin G₁ (AFG₁) ve aflatoksin G₂ (AFG₂) yaygın olarak bulunmaktadır.

Aflatoksinlerin olumsuz etkilediği önemli konularından biri de ekonomik kayıplardır. İhracat ürünleri ülkeler için büyük önem arz etmekte ve herhangi bir sorunla karşılaşılması ağır ekonomik kayıplara neden olmakta ayrıca üretimin kalitesini düşürmektedir. Türkiye ihracat yapan ülkelerden biridir. Özellikle fındık, Antep fıstığı, incir, kırmızı toz ve pul biber ürünlerinde üretimde ihracatçı ülkelerden biridir ve bu ürünler aflatoksin kontaminasyonu yüksek ürünlerdir. Bu nedenle sayılan ürünlerde

aflatoksinlerin istenilen limitlerden yüksek çıkması ürünlerin geri çevrilmesine ve yüklü miktarda ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Türkiye’de ilk kez 1967 yılında Kanada’ya ihraç edilen 10 ton fındık partisinin aflatoksinli olduğu görülmüş ve ekonomik kayıplar göz önüne alınarak aflatoksin üzerine çalışmalara başlanılmıştır.

Ülkemizde özellikle aflatoksin oluşumuna hassas ihraç ürünlerimizde (incir, fındık, Antep fıstığı vb.) sıkı bir aflatoksin kontrolü yapılmaktadır. Benzer denetim yurt içi tüketim için de geçerlidir. Denetimlere rağmen iç tüketimde ve yurt dışı satışlarında aflatoksin problemi devam etmektedir. Bunun en önemli nedeni üretim aşamasında işletmelerin kendi analizleri yapacak bir oto kontrol sistemi kuramamış olmalarıdır.

Analitik yöntemlerin uygulanabilmesi ve doğru şekilde sonuçlanabilmesi için analizi yapılacak örneğin bir kaç veya daha fazla aşamalardan geçmesi gerekir. Bu aşamaların önemli noktalarından biri örneğin analize hazırlanmasıdır. Örnek hazırlama aşaması, analizlerin sonucunun etkilendiği ve zaman zaman sonucu olumsuz etkilenebildiği aşama olup, uzun ve zaman alıcıdır.

Kromatografik analizlerde örnek hazırlamanın önemli amaçlarından biri analizi yapılacak olan maddenin (analit) uygun bir çözeltide çözünmesi ve diğer bir amacında çözeltiden geçen diğer bileşenlerden ayrılmasıdır (Thurman ve Mills, 1998). Katı faz ekstraksiyonu (KFE) örnek hazırlama yöntemlerinden biridir ve diğer yöntemlere nazaran daha yaygın kullanılmaktadır.

Analitik kimyada esas olarak saflaştırma ve konsantre etme amacı ile kullanılan, enstrümantal analizlerde ise analizi yapılacak olan maddenin ön konsantrasyonu ve temizlenmesinde kullanılan yöntem katı faz ekstraksiyon kartuşudur.

Analizde kullanılacak çeşitli metotlar olmakla birlikte, sadece kromatografik metotlar (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, HPLC; İnce Tabaka Kromatografisi, TLC) doğruluk yönünden güvenilirdir. Günümüzde bir katı faz ekstraksiyon kartuşu olan İmmuno Affinite Kolonu (IAC) kullanılarak HPLC ile yapılan aflatoksin analizi hem çok pratik hem de yüksek doğruluktur. Ancak her analizde kullanılıp atılan IAC çok pahalıdır, ayrıca HPLC cihazının kurulum ve işletim maliyeti çok yüksektir. Bu nedenle küçük ve orta büyüklükteki gıda işletmeleri bunları kendi kurumlarında kullanamamaktadır. HPLC öncesi yaygın kullanılan TLC metotları çok ekonomik olmakla birlikte ekstrakt saflaştırma aşamaları pratik değildir. HPLC de kullanılan IAC ise son ekstraktı nedeni ile TLC de uygulaması pratik değildir.

Bu tezin temel amacı gıdalarda aflatoksin tayininde gıda işletmelerinde yaygın kullanımı sağlayacak kadar ekonomik, pratik ve performans yönünden AB normlarını karşılayabilen bir düzeneği ve yöntemi geliştirmek için IAC'nin yerini alabilecek ve son ekstraktı TLC'ye uygulanması kolay olan bir katı faz ekstraksiyon kartuşu tasarlamaktır. Böylece TLC ile aflatoksin tayininde söz konusu olan ekstraktın süzülmesi, durultulması, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile ekstraktın temizlenmesi ve döner vakumlu evaporatör ile ekstrakt konsantrasyonu gibi küçük bir işletmede uygulanması mümkün olmayan aşamalar ortadan kaldırılarak TLC gibi ekonomik bir yöntem ile pratik ve ucuz bir analiz yapma imkanı doğacaktır.

İkinci temel amaç ise, geliştirilen TLC analiz düzeneğinin en azından kuru incir, Antep fıstığı ve fındıkta aflatoksin analizinde kullanılabileceğinin gösterilmesidir.

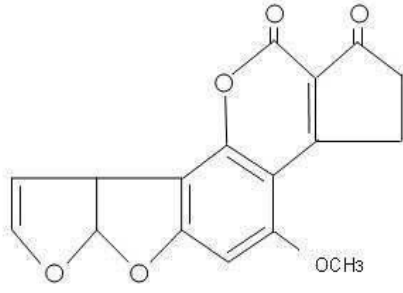
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

2.1. Aflatoksinler Hakkında Genel Bilgi

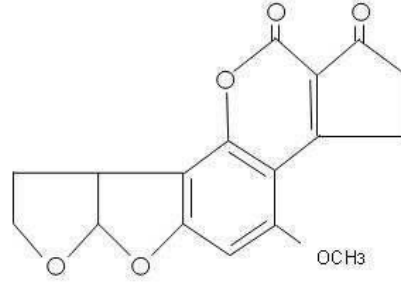
Aflatoksinlerin varlığı ilk kez İngiltere’de ve 1960 yılında 100.000’den fazla hindi ve ördek yavrusunun ölmesiyle kendini göstermiştir. (Goldblatt, 1969).

Aflatoksinler, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve nadir olarak *Aspergillus nomius* türlerine ait suşlar tarafından üretilmektedir. (Turner ve ark., 2009).

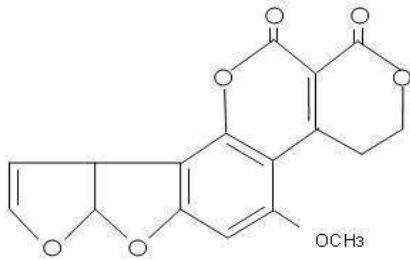
Bitkisel gıda ve yem maddelerinde en sık rastlanan 4 aflatoksinin kimyasal yapısı aşağıda verilmiştir.



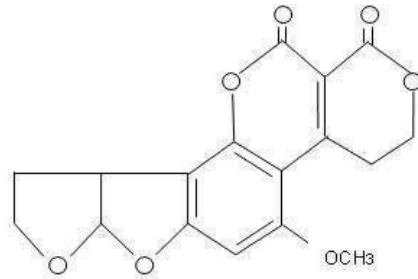
Aflatoksin B₁



Aflatoksin B₂



Aflatoksin G₁



Aflatoksin G₂

Şekil 2.1. Bazı aflatoksinlerin kimyasal yapıları (Özkaya ve Temiz, 2003).

Çizelge 2.1’de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂’nin formülü, erime noktası, ağırlığı, 360 nm’de molar adsorpsiyonu ve floresans emisyonu verilmiştir.

Çizelge 2.1. Önemli bazı aflatoksinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri (Atik, 2012)

Aflatoksin	Moleküler Formülü	Erime Noktası (°C)	Ağırlığı (g/mol)	360 nm’de Molar Adsorpsiyonu	Floresans Emisyonu (nm)
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	268-269	312	21800	425
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	286-289	314	24000	425
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	244-246	328	17700	450
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	237-240	330	17100	450

Gıda ve tarımsal ürünlerde aflatoksin oluşumunu etkileyen en önemli faktörler ortam sıcaklığı ve su aktivitesidir (a_w). Bunların dışında toksijenik suşların varlığı, kuraklık, hasat sırasında oluşan mekanik hasarlar gibi faktörler etki ederken, depolama sırasında ise nem birikimi önem arz etmektedir (Deshpande, 2002). İklimsel koşullarda *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus flavus* tropikal ve subtropikal ülkelerde çeşitli besin maddelerinde ve tarımsal gıda ürünlerinde büyük problem yaratmaktadır (Arowara ve ark., 2012).

Taze olarak tüketilen meyve ve sebzeler aflatoksin açısından pek fazla risk taşımamaktadır. Hasat ile beraber uygun olmayan koşullar neticesinde üründe bulunan küf toksin oluşturmaya başlamaktadır. İncir, üzüm, ananas, biber ve çoğu meyve için bu durum geçerlidir (Heperkan, 2014). Aflatoksinler birçok üründe meydana geliyor olmasına karşın yerfıstığı, Antep fıstığı gibi kabuklu kuru meyveler, mısır gibi hububat, pamuk tohumu, ayçiçeği tohumu gibi yağlı tohumlar ve incir gibi kurutulan meyveler, kırmızı biber ve diğer baharatlar aflatoksin oluşumuna hassas görünmektedir (Çoksöyler, 1996). Ayrıca aflatoksinli yemleri yiyen hayvanların sütlerinde de bunların türevlerine rastlanılmaktadır.

Aflatoksinlerin gıdalarda en yaygın olarak rastlanan ve gıda kontrollerinde rutin olarak analiz edilenleri 5 adet olup, bunlar AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ ve AFM₁’dir. Bunlardan en toksik olanı AFB₁ olup bilinen en kuvvetli “doğal” karsinojendir. IARC AFB₁’i 1993 yılında 1. Sınıf İnsan karsinojenleri listesine dahil etmiştir (Çoksöyler, 1996).

Avrupa Komisyonu tarafından, Avrupa birliği ülkelerinde geçerli olan yer fıstığı, fındık, kuru meyveler, tahıllar ve doğrudan tüketime sunulan veya işlem görmüş ürünlerde AFB₁ için maksimum limit 2 ng/g, toplam AF için ise 4 ng/g olarak belirlenmiştir. Doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemle tabi tutulacak olan fıstıklar için AFB₁ için maksimum limit 5 ng/g, toplam AF limiti ise 10 ng/g olarak belirlenmiştir. (Şen ve Nas, 2010).

Avrupa Birliği tarafından geliştirilmiş olan hızlı alarm sistemi (European Union Rapid Alert System for Food and Feed, EU-RASSF) ile her yıl olmak üzere gıda ve ürünlerinde uyarı alan ürünler, mikotoksinler ile ilgili bilgiler verilmektedir. Aşağıdaki tabloda EU-RASSF 2015 yılı raporuna göre uyarı alan ürünlerin dağılımı gösterilmektedir.

Çizelge 2.2. Uyarı alan mikotoksinlerin gıda ürünlerine ve bazı ülkelere göre dağılım tablosu (EU-RASSF, 2015)

Ürün	Uyarı sayısı (2015)
Fındık, fındık ürünleri ve tohumlar (Türkiye)	53
Fındık, fındık ürünleri ve tohumlar (İran)	55
Meyve ve Sebzeler (Türkiye)	48
Fındık, fındık ürünleri ve tohumlar (Çin)	97
Fındık, fındık ürünleri ve tohumlar (ABD)	37
Fındık, fındık ürünleri ve tohumlar (Almanya)	39
Fındık, fındık ürünleri ve tohumlar (İtalya)	39

Uyarı alan mikotoksinler ülkeden ülkeye farklılık göstermekle birlikte Çin 2015 yılı EU-RASSF raporuna göre en fazla uyarı alan ülke, ABD en az uyarı alan ülke olmuştur.

Aflatoksinlerin tayininde kullanılan yaygın yöntemler HPLC, ELISA ve TLC olarak sıralanabilir. Ancak bunların dışında RIA (Radio Immuno Assay), GC/MS, Elektrokimyasal teknikler, biyo-sensörler, fotometreler kullanılmaktadır. Enzim bağlanmış immunoabsorbant yöntemleri de kullanılmaktadır. Çok önceleri yaygın olan biyo-testler artık kontrol amacı ile kullanılmamaktadır. HPLC, ekipman yönüyle pahalı olmasının yanında, analiz sonucunu kısa zaman içerisinde vermesi ve TLC'ye göre hata

oranının daha az olması ve dedeksiyon limitinin hassas olmasından dolayı aflatoksin analizlerinde tercih sebebidir (Özpala, 2006).

Yaygın kullanılan HPLC ve TLC metotları doğrulama ve referans metot özelliğinde iken, ELISA metotları tarama metodu özelliğindedir ve çapraz reaksiyonlar nedeniyle hatalı pozitifleri olabilmektedir. Bu nedenle pozitif bulguları mutlaka kromatografik bir yöntem ile doğrulanmalıdır (Anklam ve ark., 2002).

İnce Tabaka Kromatografisi (TLC, HPTLC) ile aflatoksin tayin metotları 1970’li yıllardan itibaren AOAC international’ın yayınladığı resmi yöntemler içinde yer almıştır. Bu yöntem ekonomik ve pratik olmakla birlikte, teşhis ve tayin limitlerinin süt ve hububat gibi ürünlerde günümüz aflatoksin/mikotoksin kodeks limitlerini (MRL) karşılayamaması, tekrarlanabilirliğinin HPLC’nin gerisinde kalması ve kromatografi öncesi ekstrakt temizleme işlemlerinin fazlalığı nedeniyle batı ülkelerinde ve ülkemizde son yıllarda yerini HPLC’ye kaptırmıştır.

Bu ekonomik yöntemi tekrar kullanabilmek amacıyla, Stroka (2000) tarafından aflatoksin tayininde ekonomik bir metot olarak TLC’ye dayanan ve IAC ile ekstrakt temizlemeyi kullanan aflatoksin tayin metotları geliştirilmiştir. Bu çok kapsamlı çalışma bir kitap/PDF dokümanı halinde yayınlanmıştır (Stroka, 2000). Bu ana rapordan veya proje raporundan 7 adet bilimsel makale oluşturulmuştur (Stroka ve ark., 1999; Stroka ve ark., 2000; Stroka ve Anklam, 2000) Bu makaleler ve özellikle tüm detayın yer aldığı ana rapor bu çalışma için önemli bilgiler içermektedir.

2.2. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

Kromatografi, bir ayırım tekniği olarak, ilk defa 1903 yılında Rus botanikçi Tswett tarafından bitki ekstraktındaki maddelerin ayırımı için icat edilmiş bir tekniktir. Klorofilin kolonda ayrışımının renkli bantlar halinde olması nedeni ile tekniğe “kromatografi” adı verilmiştir. İlk ince tabaka uygulaması 1938’de Izmailov ve Shraiber tarafından, daha az sorbent ve daha az numune kullanan pratik bir metot arayışı nedeniyle gerçekleştirilmiştir (Sherma ve Fried, 2005).

Asıl gelişme 1946-1956 yılları arasında olmuş günümüz TLC tekniği (tank içinde plaka ve dipteki solventin kapilarite ile yukarıya doğru ilerlemesi ve plakaya önceden uygulanmış olan beneklerdeki bileşenlerin plaka üzerinde ilerleyen solvent ile

ayrımı) şekillenmiştir. Bu yıllarda yöntemin adı “Thin Layer Chromatography, TLC” olarak şekillenmiştir. TLC, 1960’lı yıllardan beri bilinen en güçlü ayırım tekniğidir. Aminoasitlerde şekerlere, organik asitlere vb. her türlü kimyasal gurubun ayrımı için metotlar geliştirilmiştir. 1969’da yayınlanan Stahl’ın ikinci kitabında tüm metotlar bulunmaktadır. 1970’lerde hazır plakalar ve 1980’lerde yüksek performanslı plakalar (HPTLC) geliştirilmiştir. Günümüzde “Ultra” İnce plakaların seperasyon kimyasının geleceğini oluşturacağı düşünülmektedir (Olesik ve ark., 2014).

Klasik TLC sistemi; 10x22x22 cm boyutlarında kapaklı bir kromatografi odası (chamber) veya tankı, plakaya numune uygulama düzeneği ve plaka üzerindeki ayrımı görüntüleyebilmek için bir UV lambası veya kabini ve kullanılıp atılan kromatografi plakalarından oluşmaktadır. Aflatoksinlerin keşfedildiği 1960 yılından itibaren, TLC tek tayin yöntemi olarak 1980’li yıllara kadar kullanıla gelmiştir. Halen dünyanın çok sayıda ülkesinde resmi yöntemler TLC’ye dayanan yöntemlerdir. Klasik TLC’nin performansı daha iyi ayırım, plaka üzerinden miktar tayini ve daha küçük miktarları teşhis yönü ile geliştirilebilir, pratikliği artırılabilir, maliyeti düşürülebilir ve böylece otokontrolde kullanımı daha kolay kabul görür. Modern TLC teknikleri bu özelliklere sahiptir ancak çok daha pahalıdır (Çoksöyler, 1996).

TLC ile aflatoksin tayininin en önemli sorunu ekstraksiyon, ekstrakt saflaştırma ve ekstraktın konsantrasyonun pratik olmamasıdır. Günümüzde HPLC analizleri için geliştirilmiş olan IAC ile ekstrakt temizleme ve saflaştırma çok mükemmel olarak yapılmakta ve saatler süren bu aşamayı 10-20 dakikaya indirmektedir. Hatta süt gibi sıvı ve sulu fazda olan numuneler hiçbir sıvı sıvı ekstraksiyona uygulanmadan IAC’den geçirilerek ekstrakte edilebilmektedirler (Çeçen, 2009). Ancak saflaştırdığı ekstrakt hacminde kalacak olan aflatoksin miktarı HPLC ile tayinde görülmeye yetecek kadar olmakla birlikte, TLC için çok yetersizdir.

TLC’de de IAC temizlemesini içeren bir yöntem geliştirilmiştir (Stroka ve ark., 2000). Ancak bu çalışmada katı faz ekstraksiyon kartuşundan (KFE) alınan metanol eluatının plakaya uygulanabilmesi için HPLC’den farklı olarak tüm ekstraktın N₂ altında kurutulması ve yeniden toluen:asetonitril (98:2) de çözülmesi gerekmiştir (Stroka, 2000). Bu nedenle numunedeki aflatoksinleri ilk metanol veya asetonitril ekstraktından, sıvı-sıvı ektrat saflaştırmalarına gerek kalmadan, TLC’ye yetecek miktarda ayırıp saflaştırıp konsantre edecek ekonomik ve kullanımı kolay bir katı faz

ekstraksiyon kartuşuna ihtiyaç vardır.

2.3. Katı Faz Ekstraksiyonu (KFE)

Sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemine alternatif olarak 1970’li yıllarda KFE yöntemi geliştirilmiştir (Ötles ve Kartal, 2015). Kalıntı analizlerinin en önemli sorunu litrelele varan sıvı veya ekstraktların ayırma hunilerinde sıvı sıvı dağılımı ile saflaştırılması, ve sonradan gelen döner vakumlu evaporatörlerde konsantrasyon işlemleridir. Bu bıkırtıcı işlemler katı faz ekstraksiyon kartuşlarının geliştirilmesi ile birçok analiz de ortadan kalkmıştır.

Kimyasal analizi yapılacak olan maddeler, gıda ve ürünleri, su, toprak gibi çevresel ürünler genellikle istenilen maddenin dışında karışık maddeler içerirler. İstenmeyen bu maddelerin (interferenslerin) örnek hazırlama aşamasında özellikle yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC), radioimmün assay (RIA) gibi cihazlar yardımıyla yapılan analizlerde analitten ayrılması çok büyük önem taşımaktadır (Yavuz ve Aksoy, 2006).

Katı faz ekstraksiyon kartuşunun avantajları; sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemine göre daha az çözücü kullanımı, klasik yöntemlere göre çevreyi kirletme oranı daha düşük olması çok sayıda örneği aynı anda ele alabilme ve tekrarlanabilirliğin yüksekliği, daha ekonomik olması ve geri kazanımın daha iyi olması gibi özellikleridir (İlgün, 2014). Katı faz ekstraksiyon yönteminde analizi yapılacak olan madde tek kullanıma mahsus kolonlardan geçirilerek saflaştırılıp konsantre edilmekte ve analizi yapılacak olan maddeye uygun solvent ile elüsyonu yapılmakta böylece enstrümental analize uygun hale getirilmektedir (Demirkan, 2007). KFE ekstraktın süzme, temizleme ve konsantrasyonunda başarı ile kullanılmaktadır. KFE’leri özellikle litrelerce su numunesinin kullanılması gerektiği çevre örneklerinde çok büyük bir başarı göstermiştir. Hatta bu örneklerde ekstraksiyon aşaması bile kartuş ile doğrudan yapılmaktadır (Simpson, 2000).

Katı faz kartuşlarının kullanım prosedürü kabaca; 1-Katı faz ekstraksiyon kartuşu uygun solvent ile şartlandırılması, 2-Örneklerin kolona yüklenmesi, 3-Kolonun uygun solventlerle yıkanarak kirliliklerin (interferenslerin) uzaklaştırılması, kolonun gerekiyorsa kurutulması ve kolondan uygun solvent ile ve küçük hacimde analitin

alınması ve son ekstraktın azot altında kurutulması şeklindedir (Pavlovic' ve ark., 2007). Birçok kalıntı analizinde olduğu gibi aflatoksin analizlerinde de sıvı sıvı ekstraksiyon ve klasik kolon kromatografisi yerini daha pratik ve daha başarılı olan KFE kartuşlarına bırakmıştır (Papp ve ark, 2002). Bunlar çeşitli olmakla birlikte en yaygın olanı İmmuno Affinite Kolonlarıdır (İAC'ler). Yine yanlış bir kanı olarak ülkemizde aflatoksin analizlerinde KFE olarak sadece İAC anılmakta ve kullanılmaktadır. Sağ (2013), aflatoksinli sütlerden aflatoksinerin ayrılmasında adsorbant olarak çeşitli killeri kullanmıştır. Bu kullanım şekillerinden birisi de 20 cm boyunda ve 2.0 cm çapında kolonlar içine çeşitli destek maddelerine (talaş, agaros jel) tutturulmuş olarak kil kullanma şeklinde olmuştur. Bu çalışmada kolona belli miktarda kil destek maddesi üzerine bağlanmasında başarılı olunmuştur. Bu çalışmada kilin saf aflatoksin çözeltisinden aflatoksineri tutmada büyük başarı görüldüğü ama süt ortamında bu başarının sınırlı olduğu belirtilmiştir. Sağ (2013) çalışmasının asıl amacının kil ile AFM₁ içeren sütlerin detoksifikasyonu olduğunu ama bunda çok sınırlı bir başarı elde edildiğini belirtmiş, ancak yöntemin kesinlikle analitik amaçlı olarak kullanılabileceğini belirtmiştir.

Bu çalışma da Sağ'ın (2013) bulgularından yola çıkarak sadece kil değil ama benzeri çok sayıda adsorbantın denenmesi amacıyla kurulmuştur. Eğer bu çalışma ile örneğin kil gibi yaygın bulunan bir adsorbant ile bir katı faz ekstraksiyon kartuşu geliştirilebilirse HPLC ile yapılan aflatoksin analizi fiyatının 100-200 TL'lerden TLC ile 5-10 TL gibi değerlere indirilebilmesi mümkün olacaktır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada amaç katı faz ekstraksiyon kartuşu geliştirmektir. Bu kartuşlar içinde analit veya interferensleri tutan ve sonra uygun bir solvent ile geri veren bir adsorbant içerirler. Bu çalışmada adsorbant olarak kil, silikajel, florisil, zeolit, hiflosipersel (diatome toprağı) kullanılmıştır. Doğal kaynaklardan sağlanan kil, zeolit ve hiflosipersel içlerindeki kirlerden arındırılmak amacı ile su, metanol, kloroform gibi gittikçe apolarlaşan bir seri solvent ile yıkanmıştır.

Çalışmada aflatoksinleri adsorbe ettiği belirlenen ve literatürde belirtilen zeolit, İzmir'den bir zeolit işletmesinden temin edilmiştir. Fakültemizin Maden Mühendisliği Bölümünde 63-212 µm, 300-400 µm, 400-500 µm boyutlarında öğütülmüştür. Ve o şekilde deneme kolonlarına doldurulmuştur.

Hiflosipersel Ankara'dan bir firmadan öğütülmüş olarak temin edilmiştir. Kullanılmadan önce usulüne göre asitle (HCl) yıkanmış ve kurutulmuştur. Analitik saflıkta temin edilen Silika jel G60 (Merck, Almanya) ve florisil (Merck, Almanya) zaten temiz ve granül yapıda oldukları için doğrudan kullanılmışlardır.

Bunların dışında Agilent firması tarafından hazır olarak temin edilen Mega Bond Elut C₁₈ kartuşu, IAC'de (VICAM-AflaTest, USA) ekstrakt temizlemede denenmiştir.

Çalışmada kullanılacak olan saf AFB₁ standardı Across Organik (İsrail) firmasından temin edilmiş ve firmanın prospektüsünde vermiş olduğu şekilde saklanmıştır. Çoksöyler (1996) tarafından kullanılan saf AFB₁ standart usulüne göre açılıp, toluen:asetonitril (90:10) ile seyreltilmiştir.

Kolonların fiziki gövdeleri olarak uygun hacimde (20 ml'lik) plastik şırınga gövdeleri ve 5-10 ml'lik otomatik pipet uçları kullanılmıştır. Çalışmada inert taban ve üst yüzey sınırlandırılmasında kullanılan cam yünü fakültemizin İnşaat Mühendisliği bölümünden temin edilmiştir. Bu amaçla kullanılacak cam yünü yine asit ve çeşitli solventlerle yıkanıp kurutulduktan sonra kolona yerleştirilmiştir.

Aflatoksinlerin kolonda tutunma ve kolondan geri alınmalarında metanol, asetonitril, diklorometan, toluen, kloroform, tetra bütül metil eter (TBME) gibi analitik

saflıkta (Merck, Almanya) solventler kullanılmıştır. Aflatoksinlerin kirlilikten arındırılmaları denemelerinde Antep fıstığı ekstraktı kullanılmıştır. Bu amaçla kullanılacak olan Antep fıstığı ezme halinde piyasadan temin edilmiş ve kullanılacağı ana kadar buzdolabında +4°C’de muhafaza edilmiştir.

Aynı Antep fıstığı geri kazanma ve son ekstraktın KFE kartuşu ile temizlemesi denemelerinde de kullanılmıştır.

Plakaları yürütmek (develope) için mobil faz olarak TBME:metanol:su (480:15:5) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Aflatoksin B₁ açılması ve Aflatoksin B₁ standartlarının konsantrasyonunun belirlenmesi

Kolon denemelerine başlanılmadan önce ilk olarak standartlar hazırlanmıştır. Aflatoksin B₁ 1 mg’lık kuru film halinde Across organik (İsrail) firmasından temin edilmiştir. Ampul açılıp içi 3-4 defa toluen:asetonitril (90:10) ile yıkanıp bir 100 ml’lik balon jode toplanmış, balon joje toluen:asetonitril (90:10) ile 100 ml’ye tamamlanmıştır. Elde edilen stok çözeltinin toluen:asetonitril (90:10) körüne karşı 200-400 nm arasında absorbans spektrumu taranmış ve 350 nm civarındaki pik noktasındaki absorbans değeri kaydedilmiştir. AFB₁ stok çözeltisinin konsantrasyonu Çizelge 2.1 de verilen molekül ağırlığı ve molar absorpsiyon değerleri alınarak aşağıdaki formülde belirlenmiştir (Çoksöyler, 1996).

$$Aflatoksin\ konsantrasyonu\ (\mu g/ml) = \frac{A \times MW \times 1000}{\epsilon} \quad (3.1)$$

A = Spektrofotometre de ölçülen absorbans değeri (350 nm civarındaki maksimum absorbans değeri)

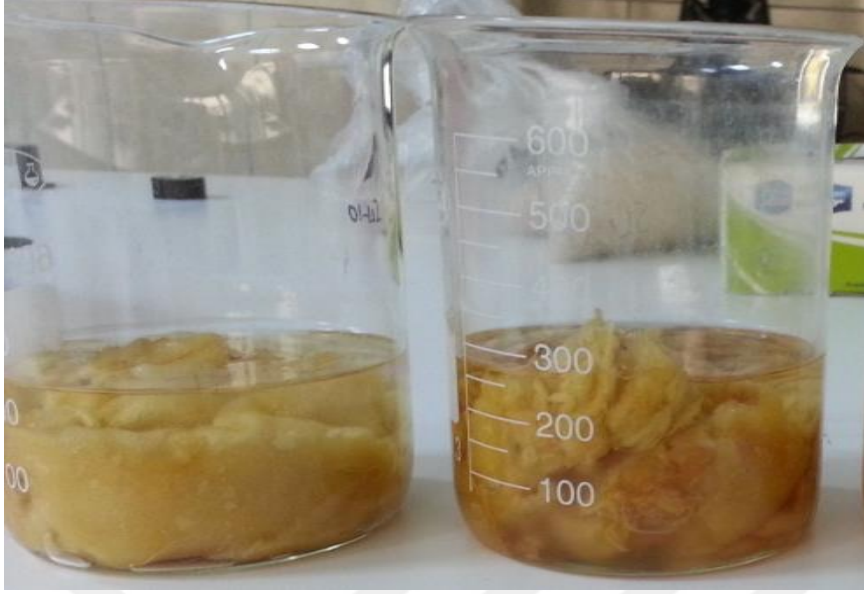
MW = Moleküler ağırlık

ϵ = AFB₁ toluen:asetonitril (90:10) de molar adsorpsiyonu : 19300 (2016, sözlü görüşme)

Hesaplama sonucu aflatoksin konsantrasyonu 8.2 µg/ml olarak bulunmuştur. Bu oran kullanılarak öncelikle 2.0 µg/ml konsantrasyonunda ana stok standardı bulunmuş ve 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 µg/ml konsantrasyonlarında ara stok standardı bulunmuştur. Aflatoksin standartları 2 ml toluen:asetonitril (90:10) ile tamamlandıktan sonra buzdolabının -18 °C bölümüne konularak muhafazası sağlanmış ve analize başlanılmadan önce buzdolabından çıkarılarak karanlık bir dolaba konulmuş, aflatoksinin ortam sıcaklığına gelmesi sağlandıktan sonra devam edilmiştir.

3.2.2. Kullanılacak materyalin testi

Kolon denemeleri için standartlar hazırlandıktan sonra, kolon için yapılacak maddelerin temiz olduğundan emin olmak, analizin kalitesinin düşürülmemesi ve UV altında floresans veren madde istenmediği için temizleme işlemi yapılmıştır. Dolgu destek maddesi olarak kullanılan cam yünü kirliliklerinden arındırılmak için ilk gün 100 g cam yünü iki adet erlen içerisine konulmuş üzerini geçecek şekilde saf su konulup bir gün bekletilmiş, ertesi gün suyun tamamı süzülmüştür. İkinci gün saf suda bekletilen cam yünün üzerini geçecek şekilde metanol konulup bir gün bekletilmiş, ertesi gün süzülmüştür. Devamında kullanılan kloroform, toluen ve hekzan içinde aynı yöntem kullanılmıştır. 5. gün sonunda süzülen hekzan plakaya pipet ile damlatılarak UV kabininde (LVP marka LVP 75 model) kirlilik durumuna bakılmıştır. Kolon olarak kullanılacak olan otomatik pipet ucunun UV kabininde (LVP marka LVP 75 model) kartuş için uygunluğuna bakılmıştır.



Şekil 3.1. İnert taban ve üst yüzey oluşturulmasında kullanılan cam yünü'nün temizlenmesine ait fotoğraf.

3.2.3. Adsorbant olarak kullanılan malzemelerin hazırlanması

Kartuş yapımında dolgu destek maddesi olarak kullanılacak olan cam yünü'nün temizlenmesinin ardından adsorbant amacı olarak kullanılan zeolitler 63-212 μm , 300-400 μm , 400-500 μm boyutlarında öğütülerek her biri ayrı erlene alınmıştır. Zeolitler ardından saf su ile yıkanmış ve etüvde 80 °C' de kurutulmuştur. Daha sonra metanolde yıkanarak etüvde 80 °C' de kurutulmuştur.

Hiflosipersel de adsorbant amacı olarak kullanılmıştır. İki ayrı kavanoz alınmış, hiflosipersel ve su kavanoza konularak bulamaç haline getirilmiştir. HCl ilave edilerek karıştırılmıştır. HCl eklenmesiyle köpürmeye başlayan hiflosiperselin köpürmesi bitene kadar HCl ilavesine devam edilmiştir. Çökme işlemi bittikten sonra iki defa saf sudan geçirilip, üzerinde biriken su şırınga yardımıyla alınmış, saf su ilave edilerek 24 saat bekletilmiştir. Aynı şekilde biriken su uzaklaştırılmış ve 65 °C'de inkübatöre konulup, kurutulmuştur.

3.2.4. Katı faz ekstraksiyon kartuşlarının oluşturulması

Adsorbant olarak kullanılacak olan malzemeler hazırlandıktan sonra 20 ml'lik plastik şırınga, ve şeffaf 5-10 ml'lik otomatik pipet uçları kolon muhafazası olarak

kullanılarak normal faz kartuşu oluşturulmuştur.

Dolgu maddesinin kolon alt ucundan kaçmaması için en alt kısma kolon tipine bağlı olarak 0.5 ve 2.0 cm yüksekliğinde Bölüm 3.2.2’de bahsedilen solventlerle yıkanmış cam yünü konmuş, onun üzerine her bir kolonda ayrı ayrı olmak üzere zeolit, kil, hiflosipersel, kolon için silikajel, kolon için florasil adsorbantlardan denenecek olanı kolon tipine bağlı olarak 1 ve 2 g miktarında eklenmiş ve eklenen adsorbant tabakasının üstü 0.1 cm yüksekliğinde cam yünü ile kolon üst adsorbant yüzeyinin düzgün olması ve kolona madde yüklenmesi sırasında kullanılan adsorbantın bozulmasını engellemek için yerleştirilmiştir.

3.2.5. Oluşturulan normal faz kartuşun ve hazır olarak alınan ters faz kartuşun yeterli miktarda aflatoksin tutup tutmadığının gösterilmesi

Normal faz kartuş olarak 5 adet kolon yapılmıştır. Bu kartuşlara elimizde bulunan 22 ve 40 ng/µl’lik karışık aflatoksin çözeltisinden farklı miktarlarda Aflatoksin eklenmiştir. Kloroform ve farklı kimyasallar ile kolondan alınıp alınmadığı test edilmiştir. Eğer aflatoksinler kolonda kalıyorsa yapılan kolonun aflatoksin tutma kapasitesinin bu düzeydeki aflatoksini tutmada yeterli olduğuna karar verilmiştir. Aflatoksinlerin kolondan kaçıp kaçmadıkları, kolondan geçirilen kloroformun ve farklı kimyasalların her ml’den bir TLC plakasına uygulanıp UV altında inceleme ile yapılmıştır.

3.2.6. Aflatoksin standartlarının ve Antep fıstığı numunesinin plakaya tatbiki

Çalışmalarda 20x20 ve 20x10 cm’lik silika jel G60 (Merk no 5554) plakalar kullanılmıştır. Silika jel G60 plakasına alttan 2.0 cm bırakılan hayali hatta birer cm aralık bırakılarak kurşun kalem ile plakaya zarar vermeden tatbik noktaları işaretlenmiştir. Tatbik işlemi, Hamilton şırınga ve Sigma-ALDRICH firmasından temin edilen kılcal kapiler pipet ile az ışık altında ve fazla zaman kaybetmeden yapılmıştır.

3.2.7. Plakaların yürütülmesi

Yürütme (develope) için klasik 10x22x22 cm boyutlarında kapaklı kromatografi

tankı kullanılmıştır. Tanka 0.5 cm yüksekliğinde Karakaş (2014) tarafından kullanılan TBME:metanol:su (480:15:5) solventi konulmuştur. Plaka tanka daldırıldıktan sonra develope edilmiştir. Solventin ilerleme yönündeki plaka boyu 10 cm olduğu için 20x10 cm'lik plakada solvent stop çizgisi çizilmemiş, 20x20 cm'lik plakalarda plakanın üst kısmından 4 cm bırakılarak solvent stop çizgisi çizilmiştir. Plaka üst sınıra ulaştığında plaka tanktan çıkarılarak karanlık bir dolapta kurutulmuştur.

3.2.8. Plakalardaki dijital görüntülerin alınması

Develope sonrası plakalar kurutulduktan sonra karanlık odada UV kabininde (LVP marka LVP 75 model) üstten Canon EOS 500D ile 20x10 cm'lik plakaların, fujifilm DSRL kamerası ile 20x20 cm'lik plakaların görüntüsü çekilmiştir.

3.2.9. Kil kolonu ile aflatoksin denemesi

Kil sahip olduğu çok küçük partiküller nedeniyle destek maddesine ihtiyaç duymaktadır. Killeri bir destek maddesine tutturmada Sağ'ın (2013) bildirdiği yöntemden yararlanılmıştır. Çalışmada kili destek maddesine bağlamak için hekzan ile sulandırılan silikon kile eklenerek hamur haline getirilmiş, tabaka halinde kağıt üzerine serildikten sonra kurutulmuştur. Kuruduktan sonra şeritler halinde kesilmiştir. Filtre kağıdı küçük ince parça ve tabaka halinde silikona batırıldıktan sonra kile batırılmış ve kilin filtre kağıdına yapışması sağlanmıştır. Yapılan iki farklı denemede filtre kağıdına tutunmuş olan kil ve şeritler halinde kesilen kil su ile yıkandıktan sonra killerin bir kısmı gitmiştir. Kil herhangi bir destek maddesi olmadan Madde 3.2.4'de belirtildiği şekilde hazırlanan kolon içine doldurulduğunda kilin kolondan aşağıya akması, kolonu şartlandırmak için kullanılan hekzan:kloroform (1:1) çözeltisinin aşağıya inmemesi ve kilin kolon içerisinde bazı yerlerinde oluşan topaklanma nedeniyle bu konuda başarılı olunamamıştır.

Bunun üzerine ekstraktın veya aflatoksin çözeltisinin içine kil ilave edip kil çöktürüldükten sonra üst çözeltide aflatoksin kalıp kalmadığı yine TLC ile izlenerek kilin ne boyutta aflatoksin tutabileceği ve sonraki geri alma solventlerine ne boyutta aflatoksinleri verebileceği test edilmiştir.

Bu amaçla 2 adet beher içerisinde 0.05 g kil konulmuş, 22 µg/ml’lik AFB₁ standardından pipet ile 1 ml alınmış ve kilin üzerine konulup karıştırılmıştır. Bir gün boyunca kuruması beklenilmiş ve spatul ile alınarak iki adet temiz vial e aktarılmıştır. Viallerin üzerine pipet ile 1 ml metanol ve 1 ml kloroform konularak karıştırılmıştır. Kilin vialin alt tarafına çökmesini sağlamak amacıyla 10 dk beklenilmiştir. Plakaya karşılaştırma yapmak için 1 ve 2. noktaya 22 µg/ml’lik aflatoksin standardı tatbik edilmiştir. Kil aşağıya çöktükten sonra üst kısmında bulunan kloroform ve metanol çözeltisinden Hamilton şırınga ile 5 µl alınarak plakaya tatbik edilmiş ve 30 dk develope edilmiştir. Plaka UV altında fotoğraflanarak görüntüsü kaydedilmiştir. Amacımız adsorbant olarak kullanılan kilin aflatoksini tutup tutmadığını belirlemek olduğu için Gelquant görüntü analiz programı ile görüntünün pikler halinde kromatogramına ve miktar tayinine ihtiyaç duyulmamıştır.



Şekil 3.2. Kili destek maddesine bağlamada kullanılan uygulama çalışmaları.

3.2.10. Hiflosipersel kolon ile aflatoksin denemesi

Kolon şartlandırılmadan 40 µg/ml’lik aflatoksin karışık standardından 5 µl alınarak kolondan geçirilmiştir. 1 ml kloroform geçirilmiş fakat kloroform kolondan aşağıya inmemiştir. Kloroformun kolonda sabit kalarak aşağıya inmemesinden dolayı kolonun içinde bulunan hiflosipersel, cam yünü ve kloroform 20 ml’lik behere boşaltılarak aflatoksin kapasitesi ölçülmeye çalışılmıştır. Tekrardan 1 ml kloroform ve 1 ml metanol konulmuş, çalkalanmıştır. Karışımdan kapiler pipet ile alınmış ve aflatoksin olup olmadığını anlamak için silika jel G60 plakasındaki bir noktaya damlatılmıştır. Plaka develope edilmeden UV kabininde (LVP marka LVP 75 model) bakılmış ve aflatoksine rastlanılmadığından dolayı develope edilmesine gerek duyulmamıştır.

3.2.11. Zeolit kolonu ile aflatoksin denemesi

Madde 3.2.4’de belirtilen şekilde hazırlanan kolon 2 ml hekzan:kloroform (1:1) ile şartlandırılarak adsorbantın aktif hale gelmesini sağlamıştır. Elimizde bulunan 22 µg/ml’lik aflatoksin karışık standardından pipet ile 0.1 ml alınarak kolondan geçirilmiştir. Aflatoksin karışık standardının kolona tutunmasını sağlamak amacıyla 2 ml hekzan:kloroform (1:1), 2 ml kloroform kolondan geçirilerek her 1 ml de viallere alınmış ve Hamilton şırınga ile plakaya 5 µl tatbik edilmiştir. Aflatoksinlerin geri alımı için 2 ml kloroform:metanol (1:1) ve 7.5 ml metanol kolondan geçirilerek her 0.5 ml’de viallere alınmış ve Hamilton şırınga ile plakaya 5 µl tatbik edilmiştir. Plaka 30 dk develope edilmiş ve daha sonra UV kabininde (LVP marka LVP 75 model) fotoğraflanarak görüntüsü kaydedilmiştir. Amacımız adsorbant olarak kullanılan zeolitin aflatoksini tutup tutmadığını belirlemek olduğu için Gelquant görüntü analiz programı ile görüntünün pikler halinde kromatogramına ve miktar tayinine ihtiyaç duyulmamıştır.

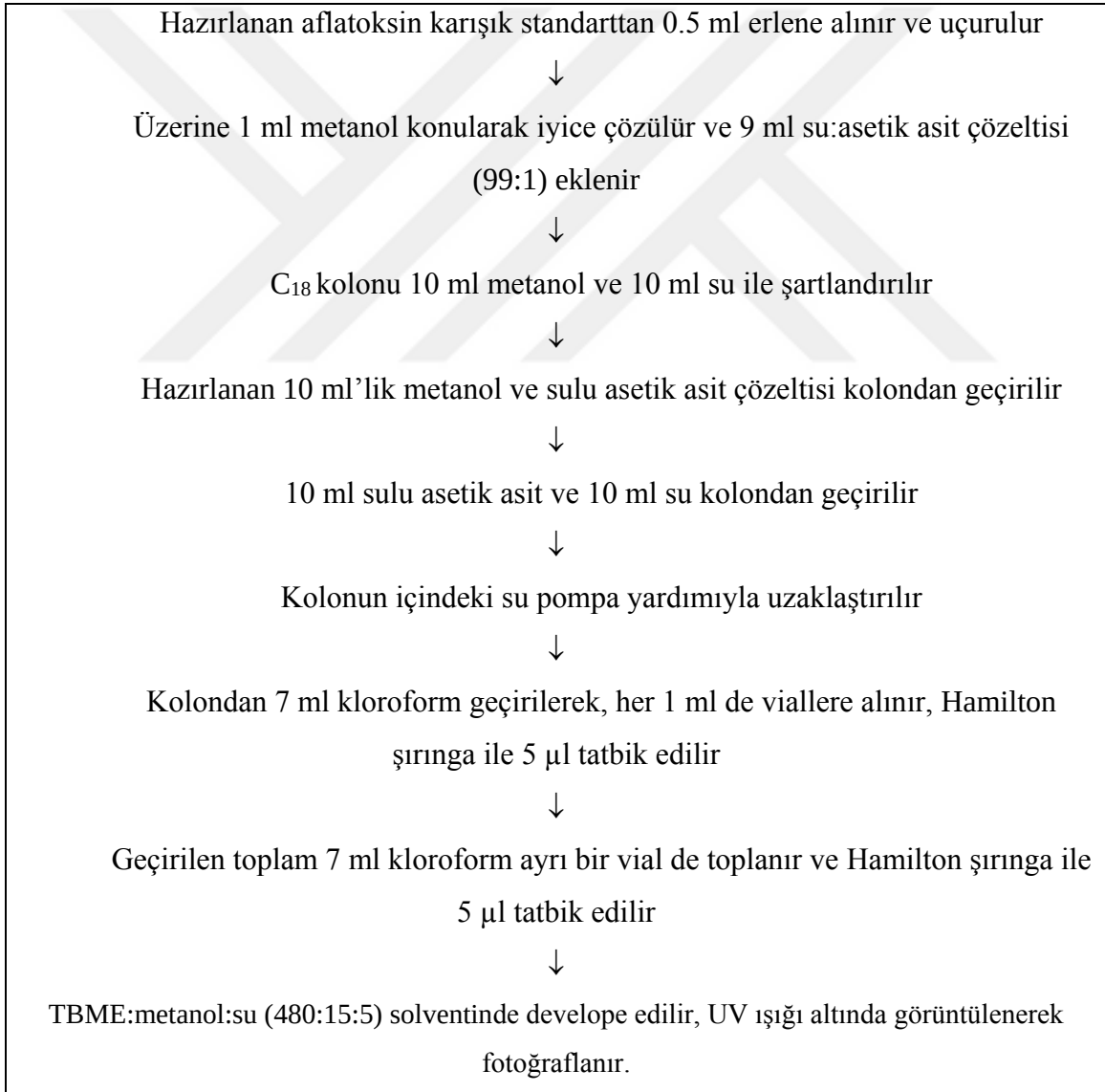
3.2.12. Florisil kolonu ile aflatoksin denemesi

Madde 3.2.4’de belirtilen şekilde hazırlanan kolon 2 ml hekzan:kloroform (1:1) ile şartlandırılarak adsorbantın aktif hale gelmesini sağlamıştır. Elimizde bulunan 40 µg/ml’lik aflatoksin karışık standardından pipet ile 0.2 ml alınarak kolondan geçirilmiştir. Aflatoksin karışık standardının kolona tutunmasını sağlamak amacıyla 1 ml kloroform kolondan geçirilmiş Hamilton şırınga ile 5 µl tatbik edilerek aflatoksinin kaçıp kaçmadığı belirlenmiştir. Aflatoksinin geri alımı için kolondan 1 ml kloroform:metanol (1:1) ve 1 ml metanol geçirilerek Hamilton şırınga ile 5 µl tatbik edilmiştir. Plakaya UV altında bakıldığında aflatoksinlerin hepsinin geri alınmadığı, kolonda olduğu kanısına varılmıştır. Kloroform ile kolona tutulmuş olan aflatoksinler geri alınmadığından dolayı metanol:asetik asit (1:1) çözeltisi kolondan geçirilmiş ve her 2 ml de viallere alınarak Hamilton şırınga ile plakaya 5 µl tatbik edilmiştir. Plaka 30 dakika yürütülmüş ve daha sonra UV kabininde (LVP marka LVP 75 model) fotoğraflanarak görüntüsü kaydedilmiştir. Amacımız adsorbant olarak kullanılan florisilin aflatoksini tutup tutmadığını belirlemek olduğu için Gelquant görüntü analiz

programı ile görüntünün pikler halinde kromatogramına ve miktar tayinine ihtiyaç duyulmamıştır.

3.2.13. C₁₈ kolon ile aflatoksin denemesi

Oluşturulan normal faz kartuşlarından sonra hazır olarak alınan Ters faz kartuş olarak kullanılan C₁₈ kolonu ile aflatoksin denemesi yapılarak yapılmadan önce elimizde bulunan her biri 0.8 µg/ml’lik aflatoksin karışık standardından 0.5 ml alınarak vial konulmuş ve 1.5 ml toluen:asetonitril (98:2) ile 2 ml’ye tamamlanarak aflatoksin standardı hazırlanmış ve uygulanan işlemler sırasıyla Şekil 3.3’de belirtilmiştir.



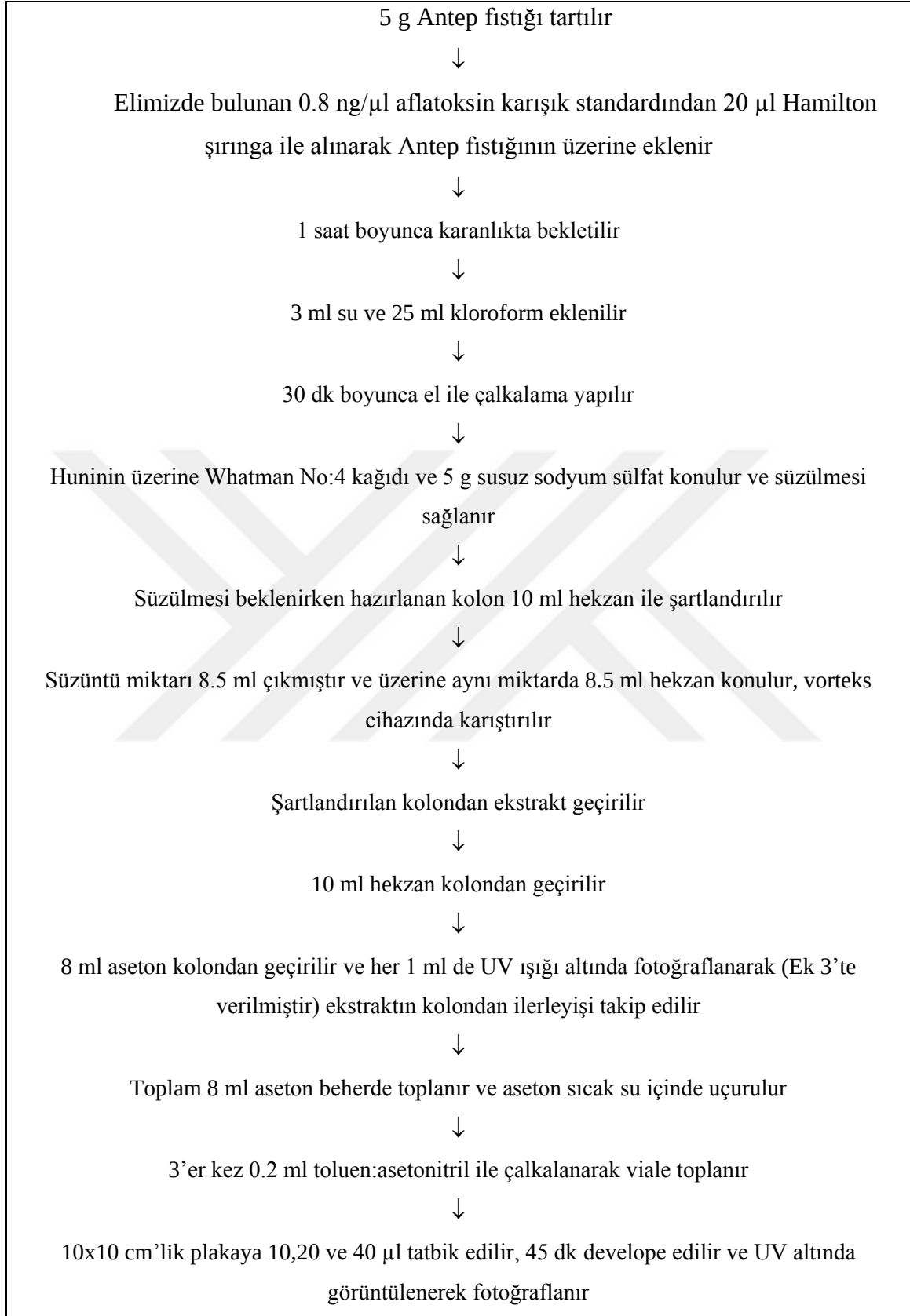
Şekil 3.3. C₁₈ kolonu ile yapılan aflatoksin analiz akım şeması.

3.2.14. Silika jel kolonu ile aflatoksin denemesi

Madde 3.2.4’de belirtilen şekilde hazırlanan kolon 2 ml hekzan:kloroform (1:1) ile şartlandırılarak adsorbantın aktif hale gelmesini sağlamıştır. Elimizde bulunan 40 µg/ml’lik aflatoksin karışık standardından pipet ile 0.05 ml alınarak kolondan geçirilmiştir. Aflatoksin karışık standardının kolona tutunmasını sağlamak amacıyla 1 ml kloroform kolondan geçirilerek her 0.2 ml’de viallere alınmış ve Hamilton şırınga ile 5 µl tatbik edilmiştir ve aflatoksin kaçıp kaçmadığı belirlenmiştir. Daha sonra kloroform:metanol (1:1) yıkama çözeltisinden 2 ml alınarak her 0.2 ml’de Hamilton şırınga ile plakaya 5 µl tatbik edilmiş ve aflatoksinlerin kolondan aşağıya geçişi izlenmiş ve Ek 2’de gösterilmiştir. Plaka 30 dakika develop edilmiş ve daha sonra UV kabininde (LVP marka LVP 75 model) fotoğraflanarak görüntüsü kaydedilmiştir.

3.2.15. Antep fıstığı ekstraktının tasarlanan silika jel kolondan geçirilerek kirliliklerinden arındırılması

Silika jel kolonun aflatoksin tuttuğunu düşünerek Antep fıstığı kullanılarak karar verilmiştir. Analize başlanılmadan önce, Madde 3.2.4’de belirtilen şekilde kolon yapılmış ve devamında uygulanan işlemler Şekil 3.4’de gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Silika jel kolon ile Antep fıstığı ekstraktının süzülmesi, saflaştırılması ve yoğunlaştırılmasına ait analiz akım şeması.

3.2.16. BF yöntemi kullanılarak Antep fıstığı ekstraktının elde edilmesi ve temizlenmesi

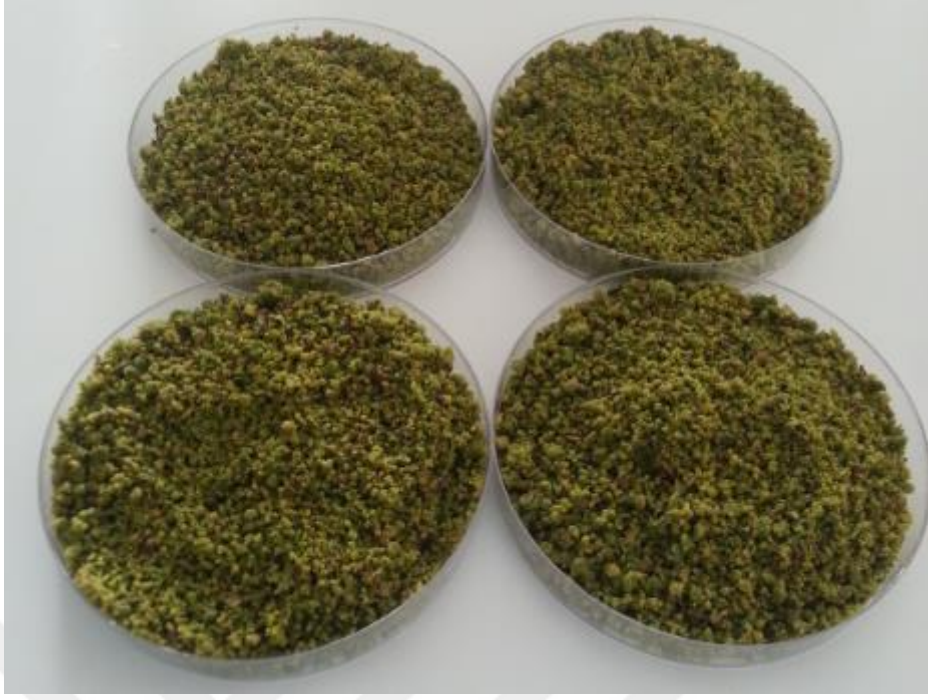
Kolonların aflatoksini tutmada başarısız olması ve tasarlanan silikajel kolonu ile Antep fıstığında analiz yapıldığında kirliliklerin yeterince ayrımı yapılmaması durumları göz önüne alınarak BF yöntemi ile Antep fıstığı ekstraktı elde edilmiştir. Elde edilen son ekstrakt 1 ml toluen:asetonitril (98:2) ile vialde alınmış ve son ekstrakt doğrudan TLC'ye uygulanarak kirliliklerin TLC'de yeterince ayrım yapıp yapılmadığı test edilmiştir. Vialde alınan son ekstraktan 0.40 ml alınmıştır. Tasarladığımız silika jel kartuştan geçirilmiş ve TLC'ye uygulanarak kartuşun temizlemesindeki başarısı denenmiştir. Son olarak 1 ml'lik vialde kalan 0.60 ml ekstrakt IAC'den geçirilerek, TLC'ye uygulanmış ve kirliliklerin TLC'de yeterince ayrım yapıp yapılmadığı test edilerek 3 ayrı analiz yapılmıştır.

Yapılan 3 ayrı analiz ayrı başlık altında açıklanmıştır.

Bu 3 ayrı deneme için öncelikle Antep fıstığı ekstraktı BF yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. BF yönteminin orijinalinde 50 g Antep fıstığı örneği, 250 ml metanol:su (55:45), 4 g sodyum klorür (NaCl) ile ekstrakte edilmekte ve 50 ml hekzan ile ekstrakt yağlarından arındırılmaktadır. Yeterli olanak bulunmayan küçük işletmeler göz önüne alınarak oranlar yarıya düşürülmüş ve çalışma yürütülmüştür.

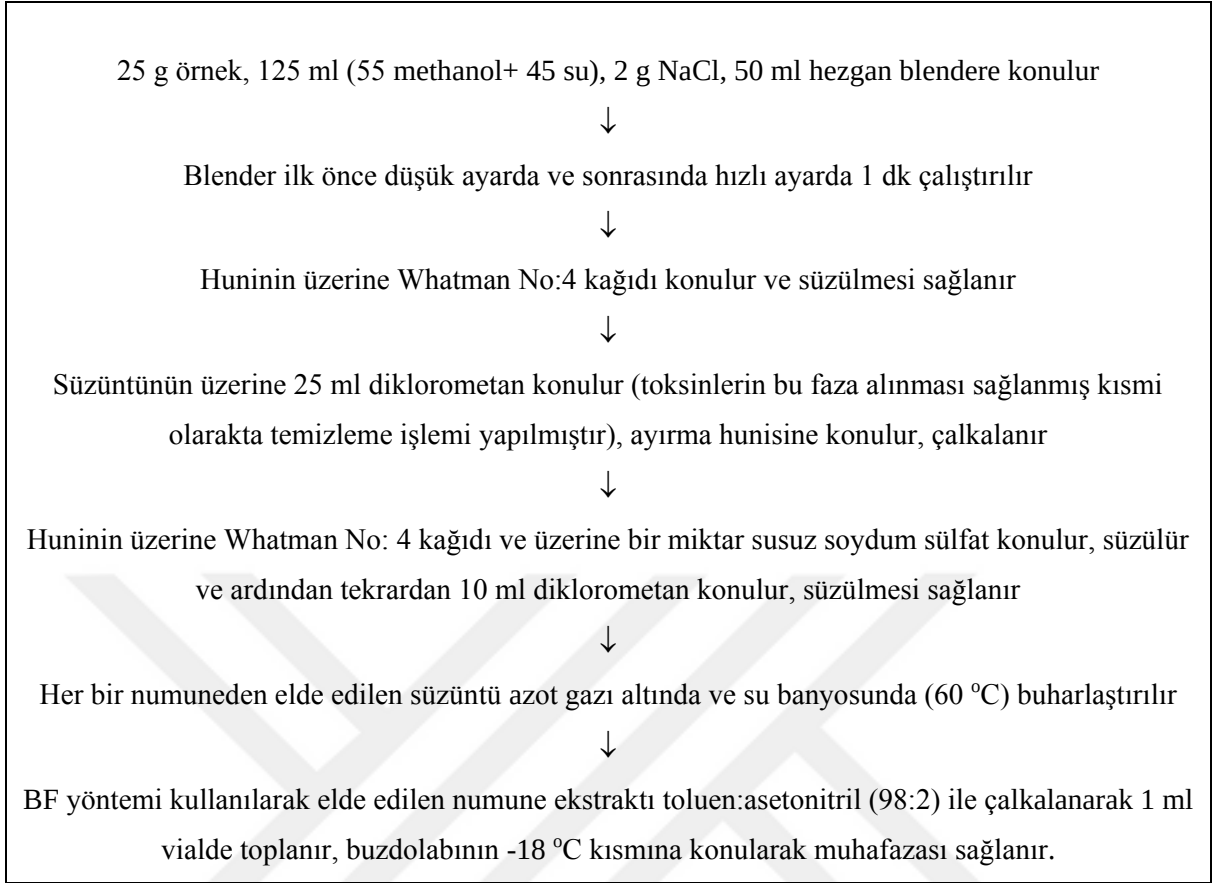
Öğütülmüş Antep fıstığı içi 4 adet petri kutusuna her biri 25 g olacak şekilde konulmuştur. İkişer paralel kör ve spayklanmış Antep fıstığı numunesinde yapılmıştır. Kör, aflatoksin içermeyen numunedir. Spayklama, Antep fıstığı üzerine istenilen konsantrasyonlarda aflatoksin eklenerek yapılan bir işlemdir.

Spayklama yapmadan önce Madde 3.2.1'de hesaplanan 2.0 µg/ml'lik aflatoksin B₁ standardı buzdolabından (-18 °C) çıkarılarak ortam sıcaklığına gelmesi için karanlık bir dolaba konulmuştur. Ortam sıcaklığına gelen aflatoksin standardından spayklama yapmak için Madde 3.2.1'de hesaplanan 2.0 µg/ml'lik aflatoksin B₁ standardından 0.125 ml alınmış ve 2 adet petri kutusunun içinde bulunan 25 g Antep fıstığı numunesinin üzerine aflatoksin bulaştırılmış ve 1 saat karanlıkta bekletilmiştir.



Şekil 3.5. Analizde kullanılan Antep fıstığı numuneleri.

2 adet kör ve spayklanan numuneler aşağıda özetlendiği şekilde ekstrakt hale getirilmiştir.



Şekil 3.6. BF yöntemi.

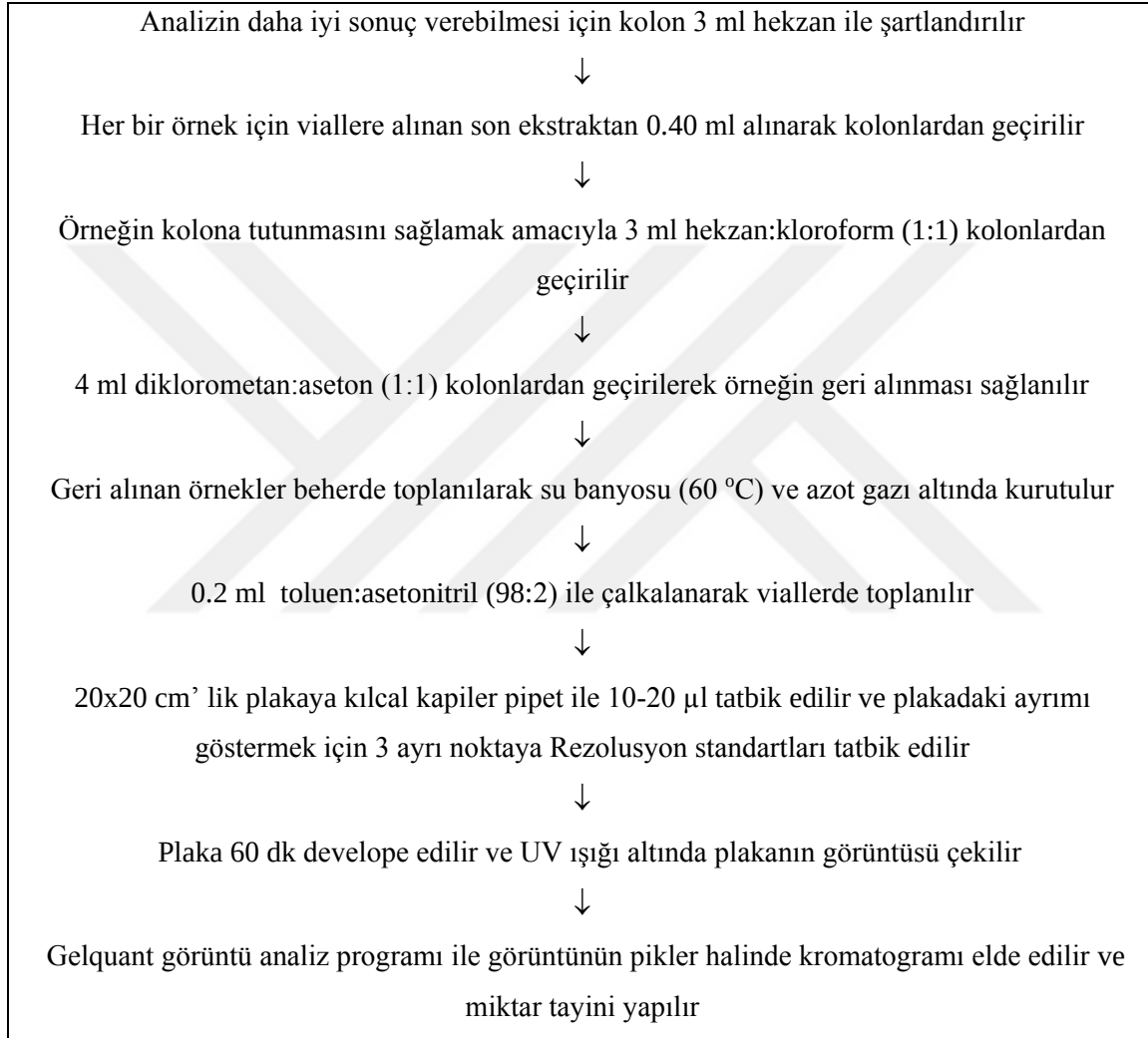
Kör 1 numunesinin süzüntü miktarı 56 ml, kör 2, spayk 1 ve spayk 2 numunesinin süzüntü miktarı 55 ml çıkmıştır.

3.2.17. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın doğrudan TLC'ye uygulanması

1 ml'lik viallerde bulunan kör 1, kör 2, spayk 1 ve spayk 2 ekstraktları 20x20 cm'lik plakaya kılcal kapiler pipet ile her bir numuneden 10 ve 20 µl tatbik edilmiştir. Kör 1 numunesi bir gün önceden plakaya 10 µl tatbik edilerek karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletilmiş ve aflatoksin kaybı olup olmadığına bakılmıştır. Plakadaki ayrımı göstermek için 3 ayrı noktaya Rezolasyon standartları tatbik edilmiştir. Plaka 60 dk develop edilmiştir. Develop edilen plakanın UV kabininde (LVP marka LVP 75 model) görüntüsü çekilmiştir. Gelquant görüntü analiz programı ile görüntünün pikler halinde kromatogramı elde edilmiş ve miktar tayini yapılmıştır.

3.2.18. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın tasarlanan silika jel kolonundan geçirilerek TLC'ye uygulanması

BF yöntemi ile temizlenen, yoğunlaştırılan vialde bulunan 1 ml'lik ekstraktan 0.40 ml alınmış ve tasarladığımız kolondan geçirilmiş, kolonun temizlemesindeki başarısı test edilmiştir.

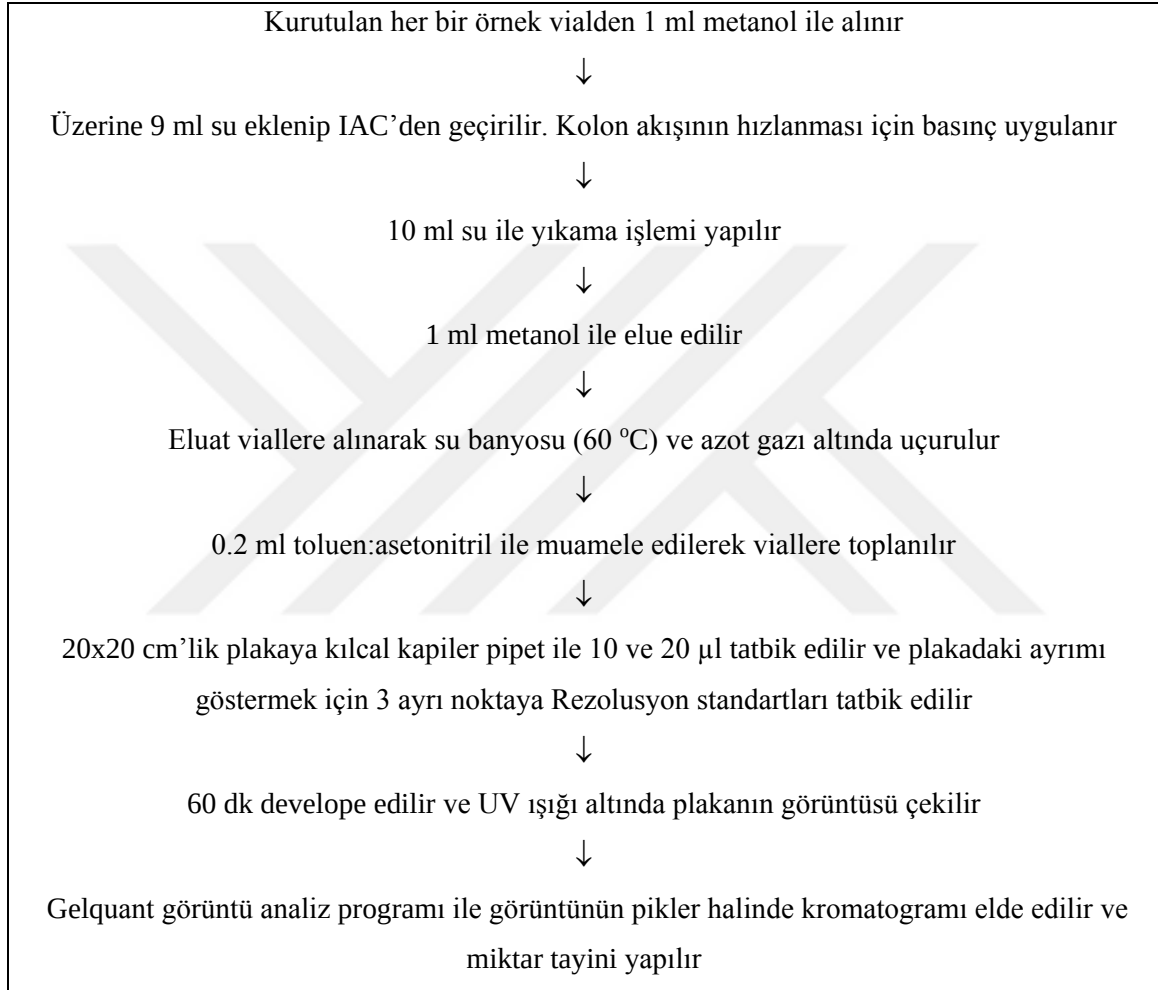


Şekil 3.7. Elde edilen son ekstraktın tasarlanan silika jel kolonundan geçirilmesinde uygulanan işlemler.

3.2.19. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın IAC'den geçirilerek TLC'ye uygulanması

Analize başlamadan önce IAC buzdolabından çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır. Her bir örnek için viallere alınan son ekstrakta kalan 0.60 ml kör 2, spayk 1 ve spayk 2 numuneleri su banyosu (60 °C) ve azot gazı altında

kurutulmuştur. BF yöntemi ile temizlenen ekstraktın ve tekrardan IAC'den geçirilen ekstraktın plaka üzerinde karşılaştırılmasını yapmak için kör 1 numunesi 20 µl plakaya tatbik edildikten sonra kurutma işlemi yapılmıştır. Kör 2 numunesinden 50 µl tatbik edilerek TLC'nin aflatoksin kapasitesine bakılmıştır. Devamında yapılan işlemler sırasıyla aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 3.8. Elde edilen son ekstraktın IAC'den geçirilmesinde uygulanan işlemler.

3.2.20. Aflatoksinlerin plaka üzerinde teşhis ve tayinleri

Aflatoksinlerin plaka üzerinde teşhisleri 365 nm UV ışığı altında ve göz ile yapılmıştır. Yöntem performansının belirlenebilmesi için Gelquant görüntü analiz programından yararlanılarak yöntem kantitatif hale getirilmiştir. Gelquant, TLC plakalarının değerlendirilmesinde kullanılan elektroforez için geliştirilmiş olan bir

programdır. Karakaş (2014) tarafından kullanılan Gelquant görüntü analiz yönteminden yararlanılmıştır. Bu yöntemde;

Plaka üzerinden UV ışığı altında beneklerin floresans görüntüsünün fotoğrafı alınmış, Photoshop CS.7 programı ile görüntü kapasitesi daraltılıp tek renkli (gri) hale getirilmiş ve sonra elektroforez için geliştirilmiş AMPL firmasından temin edilen Gelquant paket program ile görüntünün pikler halinde kromatogramı elde edilmiştir. Ayrıca kromatogramlara ait tablolar elde edilmiştir.

Plakaya 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 µg/ml'lik AFB₁ standardından 5 µl tatbik edilmiştir. Plakaya tatbik edilen aflatoksinler, Gelquant görüntü analiz programı ile elde edilen veriler kullanılarak, Microsoft Excel Programından kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Kalibrasyon grafiklerinde elde edilen veriler ile plakaya tatbik edilen benekteki aflatoksin miktarı bulunmuştur.

3.2.21. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın temizlenmesine ait üç plakanın karşılaştırılması

Aflatoksinlerin plakadaki teşhisinden sonra elde edilen plaka görüntülerine bakılarak yaptığımız analizlerin hangisinin ekstrakt temizlemede daha başarılı olduğu karşılaştırma yapılarak belirlenmiştir.

3.2.22. Geri kazanım oranının belirlenmesi

Geri kazanım oranı belirlenirken formül (3.1) kullanılmıştır. Öğütülmüş halde alınan iç Antep fıstığının aflatoksin içerdiği düşünülerek formül (3.1) da değişimler yapılmıştır. Formülde belirtilen “bulunan aflatoksin miktarı” formül (3.2) kullanılarak hesaplanmıştır. 3.2 maddesinde yer alan C değeri bulunurken Gelquant programında elde edilen pik alanları Excel programında hesaplanarak kalibrasyon denkliği bulunmuş ve (3.3) maddesinde belirtilen formülden yararlanılmıştır. W_s değeri bulunurken ekstraksiyonda kullanılan çözücülerin hacimleri yardımıyla (3.4) maddesinde belirtilen formül kullanılarak bulunmuştur.

$$\text{Geri kazanma (\%)} = \frac{\text{Bulunan aflatoksin miktarı}}{\text{Eklenen AF miktarı} + \text{Örnekten gelen AF miktarı}} \times 100 \quad (3.1)$$

$$m \text{ (ng/g)} = C \times \frac{V_1}{V_2 \times W_s} \quad (3.2)$$

Formülde yer alan;

m : Bulunan aflatoksin miktarı (ng/g)

C : Plakaya tatbik edilen benekteki aflatoksin miktarı (ng)

V₁ : Ekstraktın çözündüğü son hacim (μl)

V₂ : Beneğe tatbik edilen ekstrakt hacmi (μl)

W_s : Son ekstraktın temsil ettiği numune miktarı (g)

$$C = \frac{(PA - b)}{a} \quad (3.3)$$

C : Benekteki aflatoksin miktarı (ng)

PA : Excel programından elde edilen pik alanı

b : Kalibrasyon kurvesindeki sabit değer

a : Kalibrasyon kurvesindeki değer

$$W_s = W \times \frac{V_{m'}}{V_m} \times \frac{V_{d'}}{V_d} \quad (3.4)$$

Formülde yer alan;

W_s : Son ekstraktın temsil ettiği numune miktarı (g)

W : Metanol ile ekstrakte edilen numune miktarı

V_{m'} : Alınan metanol çözeltisinin hacmi (ml)

V_m : Ekstraksiyon çözeltisinin hacmi (ml)

V_d' : Alınan diklorometan çözeltisinin hacmi (ml)

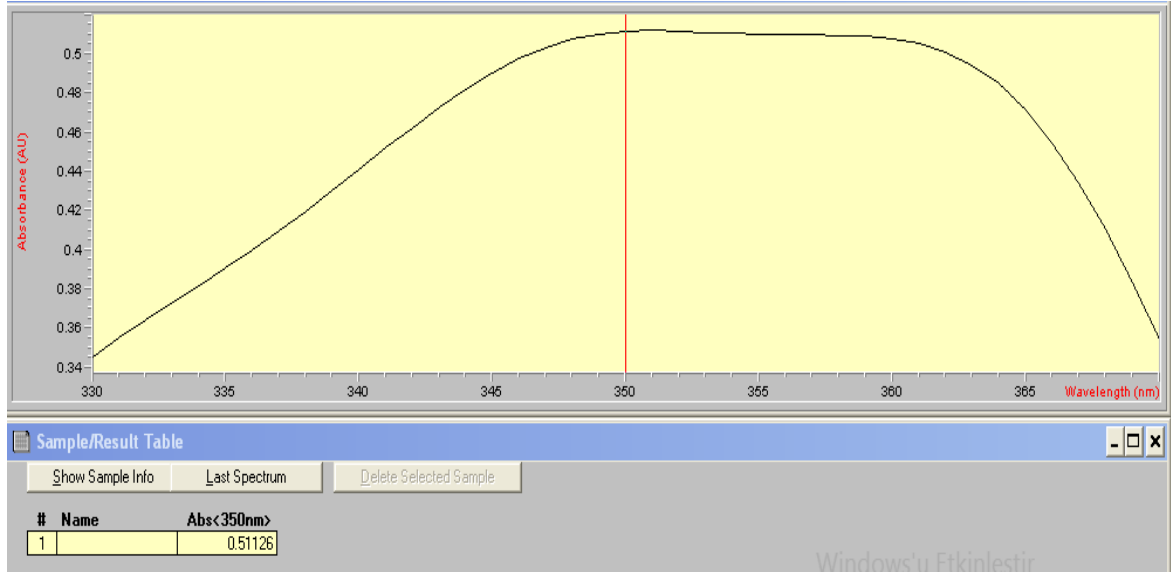
V_d : Toplam kullanılan diklorometan miktarı (ml)



4. BULGULAR

4.1. Spektrofotometrede AFB₁ Stok Çözeltisinin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

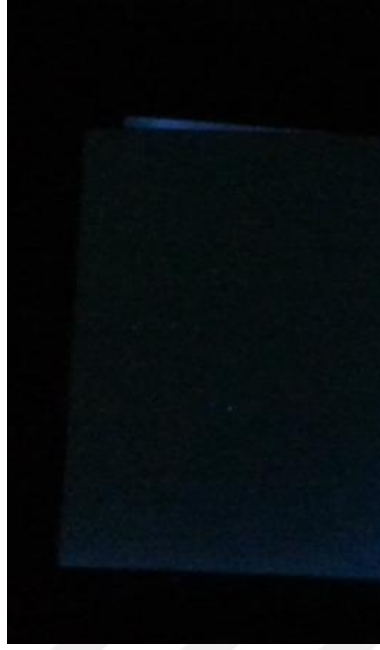
Spektrofotometrede, 240-400 nm absorbanans spektrumunda yapılan ölçüm sonucu absorbanans değeri 0.51126 olarak görülmüş ve Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. AFB₁ çözeltisinin absorbanans değeri.

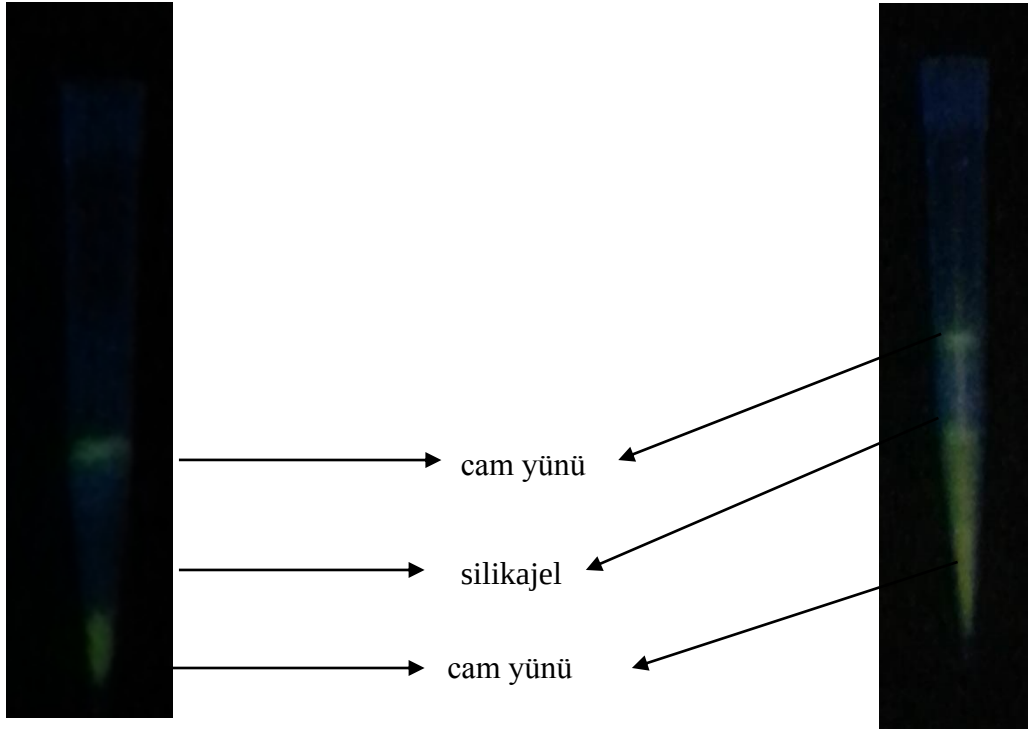
4.2. Kullanılacak Materyalin Testi

Dolgu destek maddesi olarak kullanılan cam yünü plakada damlatıldığı noktada kirliliğe rastlanılmamıştır.



Şekil 4.2. Temizlenmiş cam yününün UV kabininde çekilen görüntüsü.

Kolon yapımında kullanılan malzemeler UV altında bakıldığında (Şekil 4.3) kolon üzerinde fazla miktarda bir parlaklık görülmemiştir. Kolondan aflatoksin geçirildiğinde gözümüzün yanılmasına neden olabilecek bir durum gözlenmemiştir



Şekil 4.3. Katı faz ekstraksiyon kolonlarının yapımında kullanılan malzemelerin UV kabininde görünümü.

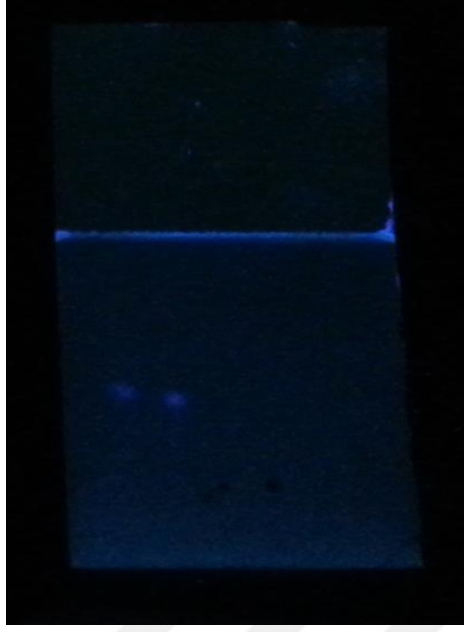
4.3. Katı Faz Ekstraksiyon Kartuşlarının Oluşturulması

Kartuş olarak kullanılan malzemelerden biri olan 20 ml’lik plastik şırıngadan solventlerin kolondan geçirilmesi esnasında akış hızının fazla olduğu görülmüştür (1 ml de 20 sn). Akış hızını azaltacak yöntem oluşturulamamasından dolayı vazgeçilmiştir. Kartuş olarak şeffaf renkli 5 ml’lik otomatik pipet ucu kullanılmış fakat aflatoksinlerin kolondan kaçışına neden olduğundan kullanılmamıştır. Onun yerine şeffaf renkli 10 ml’lik otomatik pipet ucu kullanılarak aflatoksinlerin kaçışı engellenmiştir. Adsorbant olarak kullanılan silika jelin miktarı 1 ve 2 g olacak şekilde kolona konulmuş, kolondan solvent geçimi sırasında kolaylık sağladığı, daha fazla numuneyi kolondan geçirmeye olanak verdiği için 1 g olması tercih edilmiştir.

4.4. Oluşturulan Normal Faz Kartuşun ve Hazır Olarak Alınan Ters Faz Kartuşun Yeterli Miktarda Aflatoksin Tutup Tutmadığının Gösterilmesi

4.4.1. Kil ile oluşturulan kolon

Madde 3.2.9’da belirtilen şekilde yapılan kolon denemesinde plakaya uygulanan noktalara bakıldığında (Şekil 4.4) karşılaştırma yapmak için konulan Aflatoksin standartları soldan 1 ve 2. noktada görülmektedir. Aflatoksin içeren kil karışımı plakaya tatbik edildiği noktada aflatoksine rastlanılmamış ve sadece gri renginde kil görülmektedir. Kil aflatoksini tutmuş ve geri bırakmamıştır. Kil aflatoksinin tutmada başarılı olmuş fakat aflatoksinleri geri alınması başarısızlık gösterdiğinden dolayı kilden vazgeçilmiştir.



Şekil 4.4. Kil kolonu ile denenmiş aflatoksin analizine ait plaka görüntüsü.

4.4.2. Hiflosipersel ile oluşturulan kolon

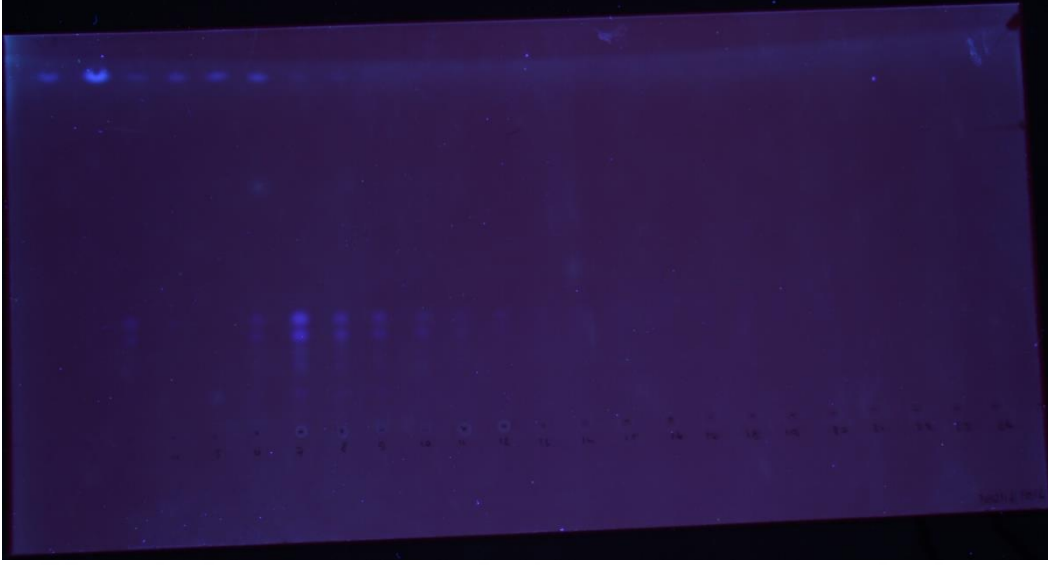
Madde 3.2.10’da belirtilen şekilde yapılan kolon denemesinde hiflosiperselin plakanın üzerine damlatıldığı noktaya UV ışığı altında bakıldığında (Şekil 4.5) benek mavi renkli ve ortası boş olarak görülmüştür. AFB₁, UV ışığı altında beneğin tamamı mavi renk olarak görülmektedir. Plakadaki mavilik hiflosipersel, cam yününden veya otomatik pipet ucunun kullanılan kimyasallarla etkileşim sonucu geldiği düşünülerek kesin olarak bir yargıya varılmadığından hiflosiperselden vazgeçilmiştir.



Şekil 4.5. Hiflosipersel kolonu ile denenmiş aflatoksin analizine ait plaka görüntüsü.

4.4.3. Zeolit ile oluşturulan kolon

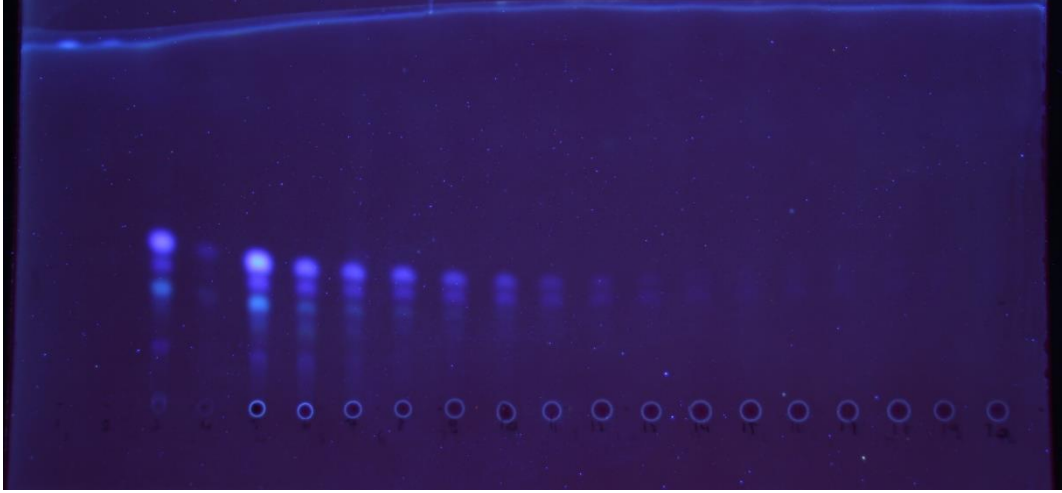
Madde 3.2.11’de belirtilen şekilde yapılan kolon denemesinde plakaya uygulanan noktalara UV ışığı altında bakıldığında (Şekil 4.6) aflatoksinleri tutmak için kullanılan solvent ile aflatoksinlerin bir kısmını tutamadığı görülmüş ve elusyon solventi ile aflatoksinlerin plakada yavaş yavaş azaldığı ve aflatoksinleri geri alım bittiğinde plakada aflatoksinler görülmemiştir. Zeolitler aflatoksinlerin geri alınımında başarılı olmuş fakat kloroform ile aflatoksinlerin bir kısmını tutamayıp bıraktığından kısmen başarı sağlamıştır. Kolondan aflatoksinlerin geçisi sırasında aflatoksinleri kolona tutamayıp bir kısmını bıraktığı için vazgeçilmiştir.



Şekil 4.6. Zeolit kolonu ile denenmiş aflatoksin analizine ait plaka görüntüsü.

4.4.4. Florisil ile oluşturulan kolon

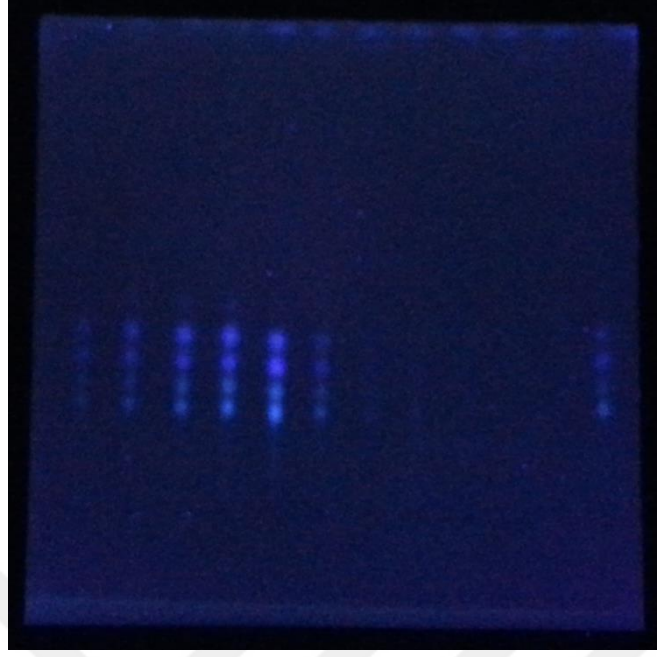
Madde 3.2.12’de belirtilen biçimde yapılan kolon denemesinde plakaya uygulanan noktalara UV ışığı altında bakıldığında (Şekil 4.7) aflatoksinleri tutmak için kullanılan solvent ile istenilen biçimde kolona tutunmuş ve 2. noktadan başlanarak kolondan geçirilen elusyon solventi ile aflatoksinlerin tamamının geri alınması beklenmiştir. UV altında plakaya bakılmış ve aflatoksinlerin hala kolonda olduğu kanısına varılması nedeniyle 4. noktadan başlanarak 20. noktaya kadar aflatoksinlerin geri alınımı için kolondan farklı elusyon solventi geçirilmiş ve gittikçe azalan miktarlarda aflatoksinler görülmüştür. Aflatoksinlerin kolondan alımı görülmüş fakat 20. noktada az miktarda aflatoksine rastlanılarak aflatoksinlerin kolondan geri alınımı sağlanamamıştır. Hem aflatoksinlerin alınamaması hem de fazla miktarda çözücü kullanılması istenilmeyen bir durum olduğundan florisil kolonundan vazgeçilmiştir.



Şekil 4.7. Florisil kolonu ile denenmiş aflatoksin analizine ait plaka görüntüsü.

4.4.5. C₁₈ Kolonu

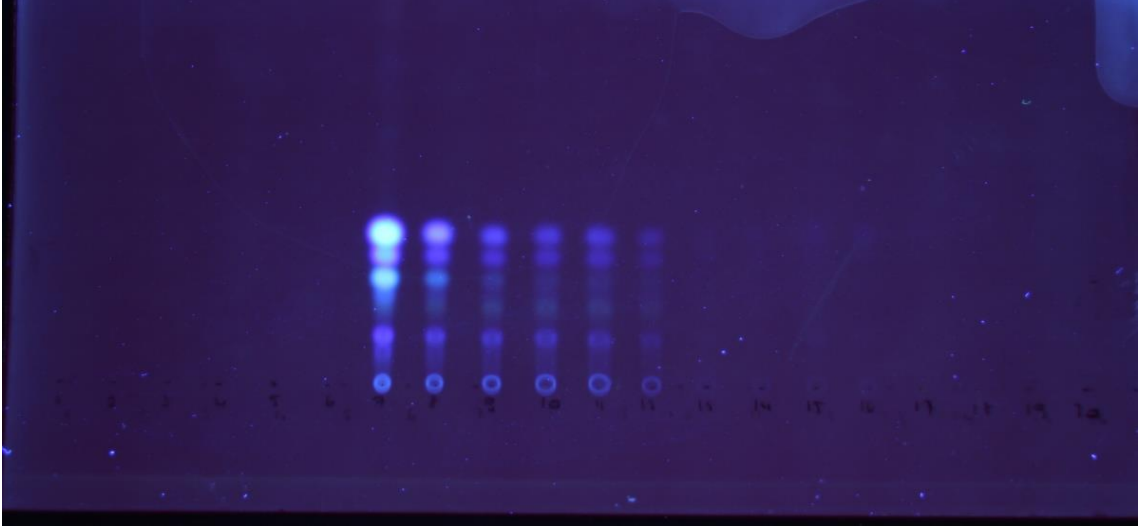
Madde 3.2.13’de belirtilen şekilde yapılan kolon denemesinde plakaya uygulanan noktalara UV ışığı altında bakıldığında (Şekil 4.8) ilk 4 benek aflatoksin standartlarına aittir. Kolondan geçirilen elusyon solventleri ile aflatoksinlerin tamamının alındığı görülmüştür. Plakada sağdaki son noktada 7 ml’de aflatoksinlerin tamamının alındığı belirlenmiştir. C₁₈ kolonunda suyu uçurma aşamasında pompa ile kurutulurken kolon bozulmuştur. İstenilen sonuçlar elde edilmesine rağmen C₁₈ kolonun tercih edilmemesinde C₁₈ kolonunun pahalı bir sistem olması ve tekrarlanabilirlik durumunun zor olması dikkate alınmıştır.



Şekil 4.8. C₁₈ kolonu ile denenmiş aflatoksin analizine ait plaka görüntüsü.

4.4.6. Silika jel ile oluşturulan kolon

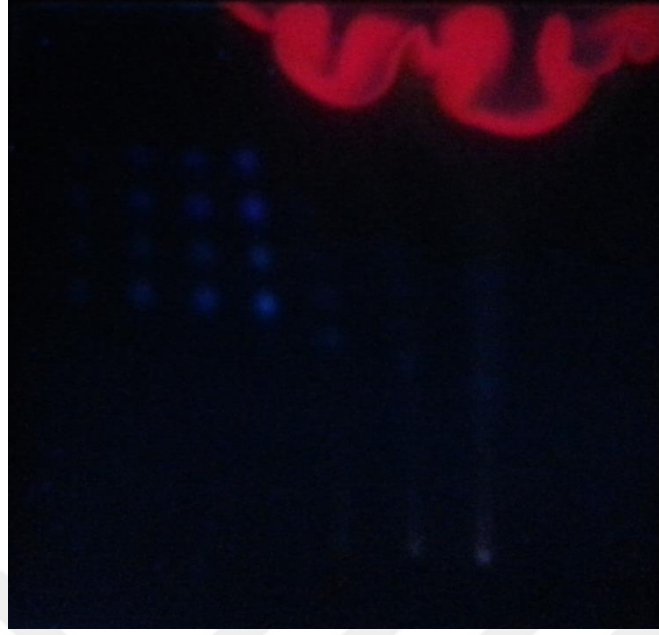
Madde 3.2.14’de belirtilen biçimde yapılan kolon denemesinde plakaya uygulanan noktalara UV ışığı altında bakıldığında (Şekil 4.9) aflatoksinleri tutmak için kullanılan solvent ile istenilen biçimde kolona tutunmuş, aflatoksinlerin geri alınımı için kolondan farklı elusyon solventi geçirilmiş ve gittikçe azalan miktarlarda aflatoksinler görülmüştür. Plakanın sonlarına doğru aflatoksinler görülmediğinden tamamının geri alındığı anlaşılmıştır. İstenilen şekilde aflatoksinler silika jele tutunmuş ve düşük miktarda kullanılan geri alma solventi ile aflatoksinler geri alınarak silika jel adsorbant olarak uygun bulunmuştur.



Şekil 4.9. Silika jel kolonu ile denenmiş aflatoksin analizine ait plaka görüntüsü.

4.4.7. Antep fıstığı ekstraktının tasarlanan silika jel kolondan geçirilerek süzülmesi, saflaştırılması ve yoğunlaştırılması

Silika jel kolonunun başarılı bulunmasından dolayı denenmiştir. Madde 3.2.15’de belirtilen şekilde yapılan denemede UV kabininde (LVP marka LVP 75 model) görüntüsü çekilen plakada (Şekil 4.10) soldan sırasıyla 4 nokta 2 μ l, 4 μ l, 6 μ l ve 8 μ l plakaya tatbik edilmiş olan 0.8 ng/ μ l aflatoksin karışık standardının görünümüdür. 5, 6 ve 7.nokta kolondan geçirilen Antep fıstığı ekstraktının aseton ile elue edilip, viallere alındıktan sonra 10 μ l, 20 μ l, 40 μ l plakaya tatbik edilen noktalardır. Tasarlanan silika jel kolonu aflatoksin ekstraktını yeterince temizleyememiş, plakada beneginin üst kısmında yoğun şekilde kirlilikler görülmüştür. Karşılaştırma yapmak için tatbik edilen aflatoksin standardına bakıldığında, Antep fıstığı ekstrakt benekleri geride kalmış ve benekler belirgin görülmemiştir. Tasarladığımız silika jel kolonu Antep fıstığı ekstraktını yeterince temizleyememiştir.

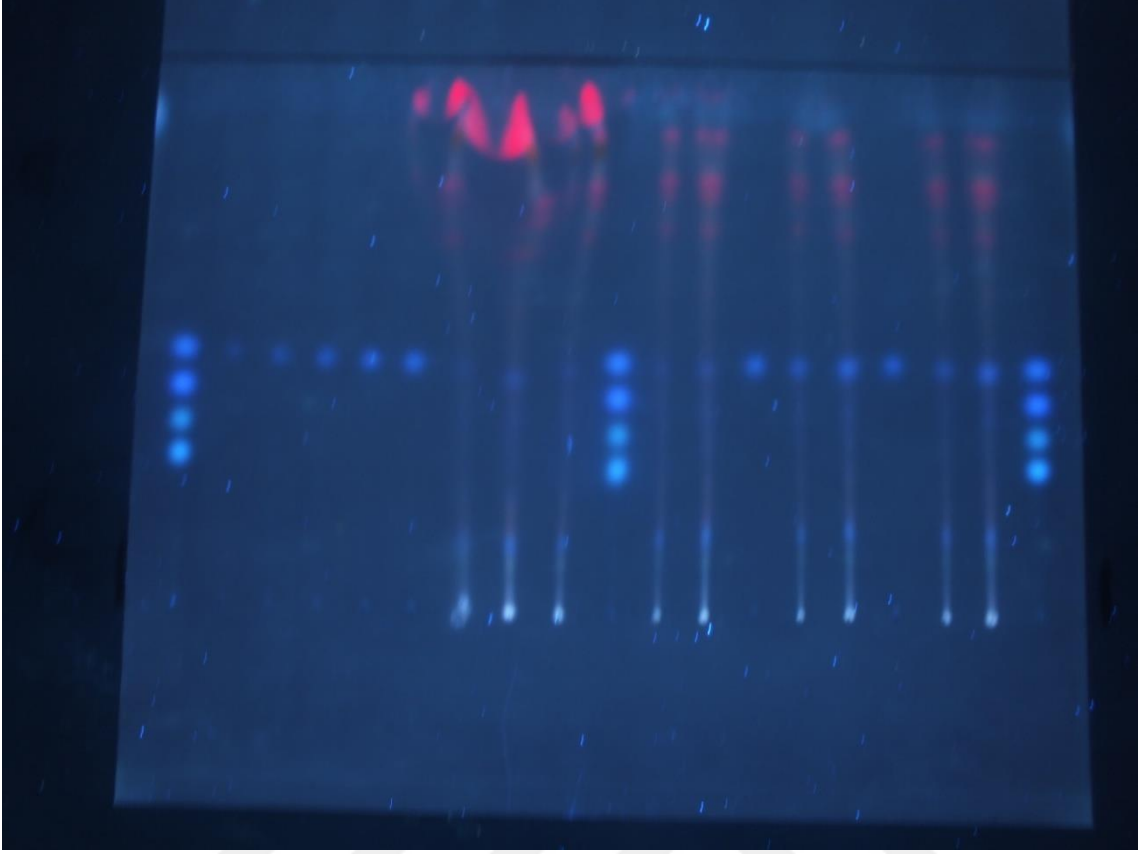


Şekil 4.10. Silika jel kolonu ile yapılan Antep fıstığında aflatoksin analizine ait plaka görüntüsü.

4.5. Aflatoksinlerin Plaka Üzerinde Teşhis ve Tayinleri

Zeolit, florisil, hiflosipersel, kil ile oluşturulan kolonların başarısız olmasından dolayı aflatoksinlerin plaka üzerinde sadece teşhisi yapılmıştır, tayini yapılamamıştır. Silika jel ile oluşturulan kolon başarılı olmuş, fakat Antep fıstığı numunesine uygulandığında kirliliklerin ayrılmayıp yoğun şekilde plakada kalması sebebiyle plaka üzerinde teşhisi yapılmış, tayini yapılamamıştır. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın doğrudan TLC'ye uygulanması, tasarlanan silika jel kolondan ve IAC'den geçirilerek TLC'ye uygulanmasına ait 3 plakada aflatoksinlerin, kör ve spayklanmış Antep fıstığı ekstraktının teşhis ve tayinleri madde 3.2.20'de verildiği şekilde yapılmış ve plaka görüntüleri Şekil 4.11, 4.12 ve 4.13'te verilmiştir. Ayrıca her bir plakanın benek numaraları, plakaya tatbik edilen numune ve miktarları, benekteki AFB₁ miktarları Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3'te belirtilmiştir.

Aflatoksin standartlarının doğrusallık grafiği, Microsoft Excel Programı ile elde edilmiş ve Şekil 4.14'de gösterilmiştir. 1.plaka için % 98.2, 2.plaka için % 93.8 ve 3.plaka için % 95.6 korelasyon ile doğrusallıkları belirlenmiştir.

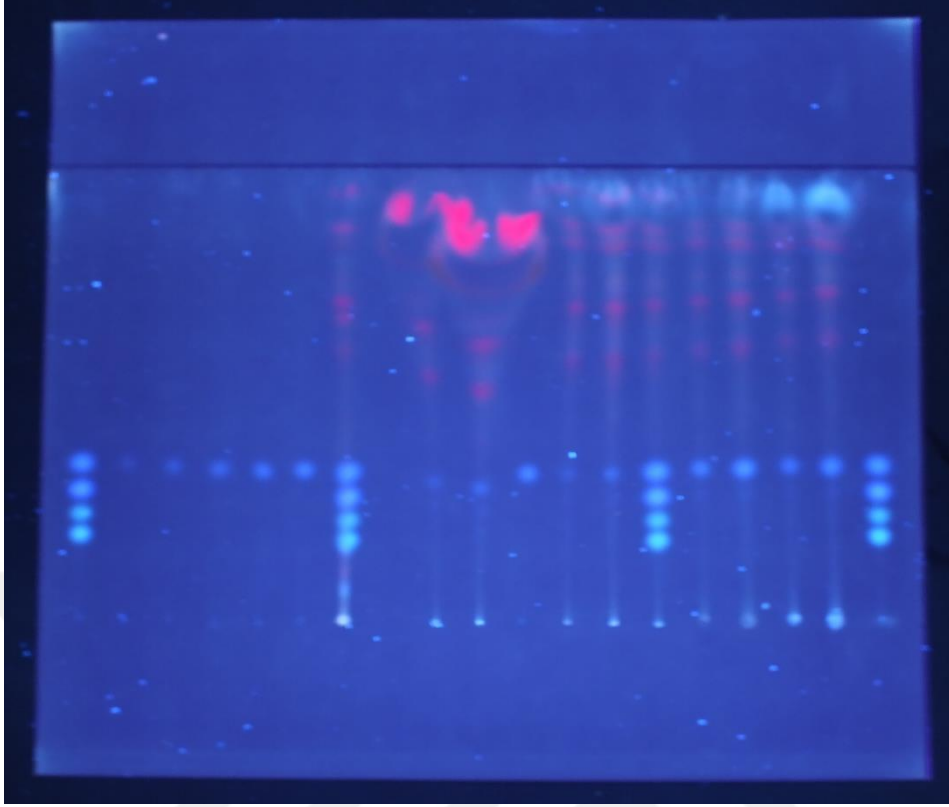


Şekil 4.11. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın doğrudan TLC'ye uygulanmasına ait plaka görüntüsü.

Çizelge 4.1. 20x20 cm'lik TLC plakasının alttan 2.0 cm bırakılan hayali hatta tatbik edilen numuneler, miktarları ve developpe sonrası benekte elde edilen aflatoksin miktarları

Benek	Tatbik edilen numune ve miktarları (µl)	Benekteki AFB ₁ miktarı (ng)
1	Rezolusyon - 5 µl	
2	0.1 µg/ml AFB ₁ standardı - 5 µl	0.5
3	0.2 µg/ml AFB ₁ standardı - 5 µl	1.0
4	0.3 µg/ml AFB ₁ standardı - 5 µl	1.5
5	0.4 µg/ml AFB ₁ standardı - 5 µl	2.0
6	0.5 µg/ml AFB ₁ standardı - 5 µl	2.5
7	Kör 1 (eski) - 10 µl	0.2189
8	Kör 1 (yeni) - 20 µl	0.2974
9	Kör 1 (yeni) - 10 µl	0.3198
10	Rezolusyon - 5 µl	
11	Kör 2 - 10 µl	0.2787
12	Kör 2 - 20 µl	0.6860
13	0,5 µg/ml AFB ₁ standardı - 5 µl	2.5
14	Spayk 1 - 10 µl	1.2130
15	Spayk 1 - 20 µl	2.1098
16	0,5 µg/ml AFB ₁ standardı - 5 µl	2.5
17	Spayk 2 - 10 µl	0.9701
18	Spayk 2 - 20 µl	1.4222
19	Rezolusyon - 5 µl	

Plakada yeterince ayırımın yapılıp yapılmadığını anlamak için tatbik edilen Rezolusyon standartlarına bakıldığında birbirinden gayet iyi ayrıldıkları görülmüştür. Aflatoksin kaybının olup olmadığını anlamak için plakaya tatbik edilen kör 1 eski numunesi (benek no 7) ile kör 1 yeni numunesi (benek no 9) karşılaştırıldığında aflatoksin kaybının 0.1009 ng olduğu görülmüştür. Tatbik edilen kör numunelerin 0.6860-0.2189 ng düzeyinde aflatoksin içerdiği belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.1).

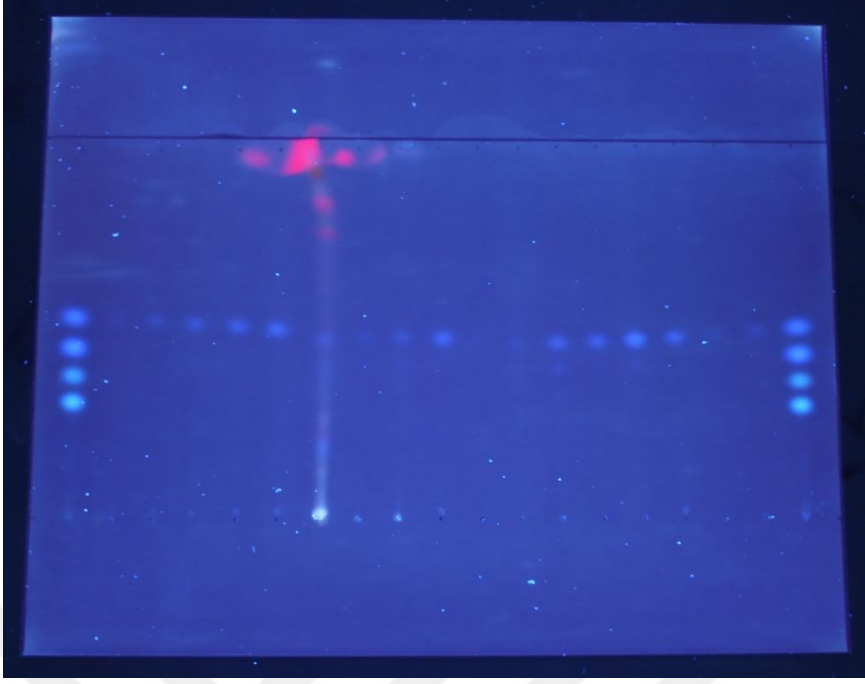


Şekil 4.12. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın tasarlanan silika jel kolondan geçirilerek, TLC'ye uygulanmasına ait plaka görüntüsü.

Çizelge 4.2. 20x20 cm'lik TLC plakasının alttan 2.0 cm hayali hatta tatbik edilen numuneler, miktarları ve developpe sonrası benekte elde edilen aflatoksin miktarları

Benek	Tatbik edilen numune ve miktarları (µl)	Benekteki AFB ₁ miktarı (ng)
1	Rezolusyon - 5 µl	
2	0.1 µg/ml AFB ₁ standardı - 5 µl	0.5
3	0.2 µg/ml AFB ₁ standardı - 5 µl	1.0
4	0.3 µg/ml AFB ₁ standardı - 5 µl	1.5
5	0.4 µg/ml AFB ₁ standardı - 5 µl	2.0
6	0.5 µg/ml AFB ₁ standardı - 5 µl	2.5
7	Kör 1 (eski) + Rezolusyon - 20 µl	5.1288
8	Rezolusyon - 5 µl	
9	Kör 1 - 10 µl	0.7871
10	Kör 1 - 20 µl	0.6330
11	0.5 µg/ml AFB ₁ standardı - 5 µl	2.5868
12	Kör 2 - 10 µl	0.5840
13	Kör 2 - 20 µl	1.0812
14	Kör 2 (yeni) + Rezolusyon - 20 µl	6.0602
15	Spayk 1 - 10 µl	2.2857
16	Spayk 1 - 20 µl	4.6456
17	Spayk 2 - 10 µl	2.0056
18	Spayk 2 - 20 µl	4.0994
19	Rezolusyon - 5 µl	

Plakada yeterince ayırımın yapıp yapılmadığını anlamak için tatbik edilen Rezolusyon standartlarına bakıldığında birbirinden gayet iyi ayrıldıkları görülmüştür. Plakaya tatbik edilen kör numunelerin 0.5840-1.0818 ng düzeyinde aflatoksin içerdiği belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.2). Kör 1 (eski) numunesi rezolusyon standartları ile birlikte tatbik edildiğinde benek (benek no 7) üzerinde kirlilik oluşturarak benekteki ayırımı bulanık hale getirmiştir. Kör 2 (yeni) numunesi (benek no 14) de aynı şekilde görülmüş fakat bir gün önceden bekletilen kör 1 numunesi ile karşılaştırıldığında kirlilik oranının az olduğu ve ayırımın daha net olduğu görülmüştür.



Şekil 4.13. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın IAC'den geçirilerek TLC'ye uygulanmasına ait plaka görüntüsü.

Çizelge 4.3. 20x20 cm'lik TLC plakasının alttan 2.0 cm hayali hatta tatbik edilen numuneler, miktarları ve developpe sonrası benekte elde edilen aflatoksin miktarları

Benek	Tatbik edilen numune ve miktarları (µl)	Benekteki AFB ₁ miktarı (ng)
1	Rezolusyon - 5 µl	
2	0.1 µg/ml AFB ₁ standardı - 5 µl	0.5
3	0.2 µg/ml AFB ₁ standardı - 5 µl	1.0
4	0.3 µg/ml AFB ₁ standardı - 5 µl	1.5
5	0.4 µg/ml AFB ₁ standardı - 5 µl	2.0
6	0.5 µg/ml AFB ₁ standardı - 5 µl	2.5
7	Kör 1 (BF uygulanan) - 10 µl	1.6316
8	Kör 1 - 5 µl	0.6744
9	Kör 1 - 10 µl	1.2477
10	0,5 µg/ml AFB ₁ standardı - 5 µl	2.4192
11	Kör 2 - 5 µl	0.6645
12	Kör 2 - 10 µl	0.7691
13	Kör 2 - 50 µl	2.0503
14	Spayk 1 - 5 µl	2.0254
15	Spayk 1 - 10 µl	3.8399
16	0,5 µg/ml AFB ₁ standardı - 5	2.3793
17	Spayk 2 - 5 µl	0.5049
18	Spayk 2 - 10 µl	0.8938
19	Rezolusyon - 5 µl	

Plakada yeterince ayrımın yapıp yapılmadığını anlamak için tatbik edilen Rezolusyon standartlarına bakıldığında birbirinden gayet iyi ayrıldıkları görülmüştür. Plakaya tatbik edilen kör numunelerin 0.6645-1.2477 ng düzeyinde aflatoksin içerdiği belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.3)

4.6. BF Yöntemi ile Elde Edilen Son Ekstraktın Temizlenmesine ait Üç Plakanın Karşılaştırılması

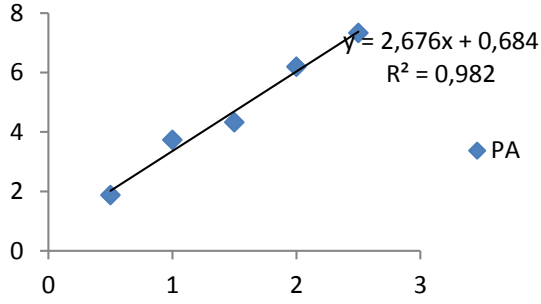
BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın direkt TLC'ye uygulandığı plakaya bakıldığında (Bkz. Şekil 4.11) kör ve spayk numunelerinin kirliliklerinden ayrılmadığı görülmüştür. Tatbik edildiği noktada parlaklıklar oluşturmuştur. BF yönteminde temizlediğimizi düşündüğümüz kör ve spayk numunelerinin daha iyi temizlenmesi için

tasarladığımız silika jel kolondan geçirilip TLC'ye uygulanan plakaya bakıldığında (Bkz. Şekil 4.12) kirliliklerin ayrılmadığı görülmüştür. İlk defa denenmiş olan bu yöntemde 1.plakaya göre bir farklılık görülmemiştir. IAC'den geçirilip TLC'ye uygulanan plakaya bakıldığında (Bkz. Şekil 4.13) kirliliklerin yeterince ayrıldığı görülmüş ve plaka üzerinde karşılaştırma yapmak için BF yöntemi ile temizlenen ekstrakt (benek no 7) ve tekrardan IAC'den geçirilen ekstrakta (benek no 9) bakıldığında BF uygulanan Kör 1 numunesinde kirliliklerin ayrılmadığı, hala var olduğu görülmüştür.

4.7. Aflatoksin Standardı, Rezolüsyon ve Antep Fıstığı Numunesine Ait Piklerin Elde Edilmesi

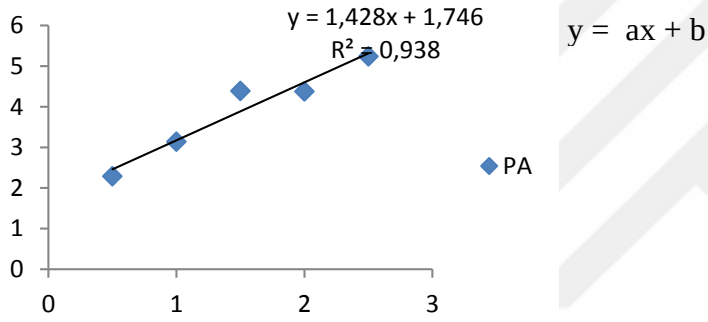
Üç plakaya tatbik edilmiş olan aflatoksin standartları, rezolüsyon ve Antep fıstığı numunesine ait pikler elde edilmiştir. Pikleri elde ederken UV kabininde (LVP marka LVP 75 model) plakaların fotoğrafı çekilmiş ve Photostop programı ile gri hale getirildikten sonra Gelquant programı ile veriler işlenmiştir. 3 plakaya ait pikler Ek 5, 6 ve 7'de verilmiştir.

PA (pik alanı)



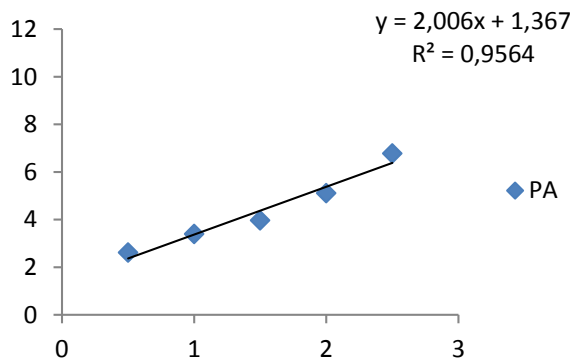
aflatoxin miktarı (ng)

PA (pik alanı)



aflatoxin miktarı (ng)

PA (pik alanı)



aflatoxin miktarı (ng)

Şekil 4.14. 20x20 cm'lik TLC plakasına tatbik edilen AFB₁ standartlarının Microsoft Excel Programı ile elde edilen kalibrasyon grafikleri.

4.8. Geri Kazanım Oranının Belirlenmesi

25 g Antep fıstığı numunesi, 125 ml metanol:su (55+45) ile ekstrakte edilmiş kör 1 numunesinde 56 ml, kör 2, spayk 1 ve spayk 2 numunesinde 55 ml süzöntü elde edilmiştir ve madde 3.2.22’de belirtilen formüller kullanılarak hesaplama yapılmıştır. Kör 1 ve kör 2 numunelerinde aflatoksin bulunmuş ve hesaplamalara eklenmiştir. Benekte görülen aflatoksin miktarı hesaplanırken Microsoft Excel Programından elde edilen kalibrasyon kurvelerinden yararlanılmıştır.

Çizelge 4.4. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın doğrudan TLC’ye uygulanmasında geri kazanım oranının hesaplanmasında yardımcı olunan değerler

Örnek	Numune miktarı (g)	MeOH:H ₂ O	Solventin alınan kısmı (ml)	Son ekstraktın temsil ettiği numune miktarı (g)
		ekstraksiyon solventinin hacmi (ml)		
Kör 1 (eski)	25	125	56	11.2
Kör 1 (yeni)	25	125	56	11.2
Kör 1 (yeni)	25	125	56	11.2
Kör 2	25	125	55	11
Kör 2	25	125	55	11
Spayk 1	25	125	55	11
Spayk 1	25	125	55	11
Spayk 2	25	125	55	11
Spayk 2	25	125	55	11

Çizelge 4.5. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın doğrudan TLC'ye uygulanmasında geri kazanım oranının hesaplanmasında yardımcı olunan değerler (devam)

Pik alanı	Benekte görülen aflatoksin miktarı (ng) *	Son ekstraktın çözündüğü hacim (µl)	Plakaya tatbik edilen numune miktarı (µl)	Numunede bulunan aflatoksin miktarı (ng/g)
1.27	0.2189	1000	10	1.95
1.48	0.2974	1000	20	1.32
1.54	0.3198	1000	10	2.90
1.43	0.2787	1000	10	2.53
2.52	0.6860	1000	20	3.11
3.93	1.2130	1000	10	11.02
6.33	2.1098	1000	20	9.59
3.28	0.9701	1000	10	8.81
4.49	1.4222	1000	20	6.46

*1 plaka için kalibrasyon denkliği aynı olduğundan dolayı çizelgede belirtilmemiştir.

Çizelge 4.6. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın tasarlanan silika jel kolonundan geçirilerek TLC'ye uygulanmasında geri kazanım oranının hesaplanmasında yardımcı olunan değerler

Örnek	BF son ekstraktın temsil ettiği numune miktarı	BF son ekstrakt miktarı (µl)	Silika kolonuna uygulanan BF ekstrakt miktarı (µl)	Silika kolonuna uygulanan BF ekstrakt miktarının temsil ettiği numune miktarı (g)
Kör 1	11.2	1000	400	4.48
Kör 1	11.2	1000	400	4.48
Kör 2	11	1000	400	4.40
Kör 2	11	1000	400	4.40
Spayk 1	11	1000	400	4.40
Spayk 1	11	1000	400	4.40
Spayk 2	11	1000	400	4.40
Spayk 2	11	1000	400	4.40

Çizelge 4.7. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın silika jel kolonundan geçirilerek TLC'ye uygulanmasında geri kazanım oranının hesaplanmasında yardımcı olunan değerler (devam)

Pik alanı	Benekte görülen aflatoksin miktarı (ng) *	Son ekstraktın çözündüğü hacim (µl)	Plakaya tatbik edilen numune miktarı (µl)	Numunede bulunan aflatoksin miktarı (ng/g)
2.87	0.7871	200	10	3.51
2.65	0.6330	200	20	1.41
2.58	0.5840	200	10	2.65
3.29	1.0812	200	20	2.45
5.01	2.2857	200	10	10.37
8.38	4.6456	200	20	10.54
4.61	2.0056	200	10	9.10
7.6	4.0994	200	20	9.30

*1 plaka için kalibrasyon denkliği aynı olduğundan dolayı çizelgede belirtilmemiştir.

Çizelge 4.8. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın IAC'den geçirilerek TLC'ye uygulanmasında geri kazanım oranının hesaplanmasında yardımcı olunan değerler

Örnek	BF son ekstraktın temsil ettiği numune miktarı	BF son ekstrakt miktarı (µl)	IAC'ye uygulanan BF ekstrak miktarı (µl)	IAC'ye uygulanan BF ekstrakt miktarının temsil ettiği numune miktarı (g)
Kör 1	11.2	1000	600	6.72
Kör 1	11.2	1000	600	6.72
Kör 2	11	1000	600	6.60
Kör 2	11	1000	600	6.60
Kör 2	11	1000	600	6.60
Spayk 1	11	1000	600	6.60
Spayk 1	11	1000	600	6.60
Spayk 2	11	1000	600	6.60
Spayk 2	11	1000	600	6.60

Çizelge 4.9. BF yöntemi ile elde edilen son ekstraktın IAC'den geçirilerek TLC'ye uygulanmasında geri kazanım oranının hesaplanmasında yardımcı olunan değerler (devam)

Pik Alanı	Benekte görülen aflatoksin miktarı (ng) *	Son Ekstraktın çözündüğü hacim (µl)	Plakaya tatbik edilen numune miktarı (µl)	Numunede bulunan aflatoksin miktarı (ng/g)
2.72	0.6744	200	5	4.01
3.87	1.2477	200	10	3.70
2.7	0.6645	200	5	4.02
2.91	0.7691	200	10	2.33
5.48	2.0503	200	50	1.23
5.43	2.0254	200	5	12.27
9.07	3.8399	200	10	11.63
2.38	0.5049	200	5	3.05
3.16	0.8938	200	10	2.70

*1 plaka için kalibrasyon denkliği aynı olduğundan dolayı çizelgede belirtilmemiştir.

Çizelge 4.10. Geri kazanım oranları

Örnek	Geri Kazanım Oranı (%)		
	TLC	Silika jel kolon	IAC
Spayk 1	85	76	87
Spayk 1	84	92	84
Spayk 2	77	71	21.7
Spayk 2	49	74	21.8

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, gerçekleşmesini istediğimiz amaçlardan biri gıdalarda aflatoksin tayininde gıda işletmelerinde yaygın kullanımı sağlayacak kadar ekonomik, pratik ve performans yönünden AB normlarını karşılayabilen bir düzeneği ve yöntemi geliştirmek için IAC'nin yerini alabilecek ve son ekstraktı TLC'ye uygulanması kolay olan bir katı faz ekstraksiyon kartuşu tasarlamaktır. Bu amaçla kil, florisil, silikajel, zeolit, diatome toprağı adsorbant olarak kullanılmıştır. Kolon fiziki yapısını oluşturmak için çeşitli boylarda otomatik pipet uçları, 20 ml'lik plastik şırıngalar denenmiştir. Plastik şırınganın UV ışığı altında mavi renkli floresans vermesi ve akış hızını azaltacak yöntem geliştirilemediğinden dolayı uygun görülmemiştir. Otomatik pipet uçlarından büyüğünün kartuş için uygun görülmesinde fazla miktarda çözeltiyi kolona yüklemenin kolay olduğu, kolondan geçirilen çözeltinin basınç ile akış hızının arttırılmasının daha kolay olduğu belirlenmiştir. İnert taban ve üst yüzey oluşturulmasında kirliliklerinden arındırılan cam yünü kullanılmıştır.

Kil, hiflosipersel, zeolit, florisil ve silika jel ile kolon hazırlanmış ve bu kolondan AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ geçirilerek başarısı test edilmiştir. Philips (1999), aflatoksin ve diğer mikotoksinlerin kil ile adsorbsiyonunu değerlendirdiğinde, aflatoksinlerin kil partiküllerinin kenarında ve en çok olarak tabakalar arasında tutulduğunu göstermiştir. Kartuşun başarısında kolondan geçirilen aflatoksinlerin tamamını tutabiliyor olması, yıkama için kullanılan çözeltilerle hiç aflatoksin kaybı meydana gelmemesi ve elüsyon için kullanılan solventin 1-10 ml'si ile aflatoksinlerin tamamının kolondan alınması esastır. Bu durumu sağlayan tek kolon silika jel olmuştur ve elusyon solventi ile 2.2 ml'de aflatoksinlerin tamamı geri alınmıştır. Kil, hiflosipersel ve florisil aflatoksinleri tutmuş fakat geri vermeyerek kısmen başarı sağlamıştır. Zeolit aflatoksinlerin bir kısmını geri bıraktığı için başarısız olmuştur. C₁₈ kolonu aflatoksinleri 7 ml de geri almış fakat pahalı bir yöntem olduğundan tercih edilmemiştir.

Plaka olarak Stroka ve ark. (2000) tarafından da kullanılan silika jel G60 hazır kaplanmış plakalar kullanılmış ve solvent tercihinde TBME:metanol:su (480:15:5) çözeltisi seçilmiştir.

Tezin ikinci amacı geliştirilen TLC analiz düzeneğinin en azından kuru incir, Antep fıstığı ve fındıkta aflatoksin analizinde kullanılabileceğinin gösterilmesidir. Bu amaçla matriks olarak Antep fıstığı seçilmiş ve seçilmesinde ekstraktının plaka üzerinde fazla kirlilik bırakmaması etkili olmuştur. Başarılı olarak bulunan silika jel kolonu ile ekstraktı elde edilerek yoğunlaştırılmış numune plakanın üst kısmında yoğun şekilde kırmızı renklerde kirliliklere rastlanılmıştır. Tasarladığımız silika jel kolonu Antep fıstığı ekstraktını temizleyememiş fakat aflatoksinleri tutmayı başardığından dolayı kısmen başarı sağlanmıştır.

Oluşturulan kolonların başarısız olması yeni bir yöntem aranmasına neden olmuştur. BF yöntemi likitte başarılı şekilde kullanılan ekstrakt temizleme olayıdır. Bu çalışmada TLC’de denenerek başarısına bakılmış ve aynı ekstrakt tasarlanan silika jel kolondan geçirilerek ilk defa böyle bir yöntem denenmiş, kolonun temizleyip temizlemediğine bakılmış ve aynı ekstrakt IAC’den geçirilerek TLC’ye uygulanmış ve TLC’deki başarısı denenmiştir.

Bu amaçla 2 adet kör ve 2 adet spayklanmış Antep fıstığı BF yöntemi ile ekstraktı elde edilmiştir. Doğrudan TLC’ye uygulanan plaka incelendiğinde, plakanın üzerinde kirlilikler görülmüştür. Kirliliklerin yeterince ayrımı sağlanamamıştır. BF yönteminde elde edilen son ekstrakt tasarlanan silika jel kolondan geçirildikten sonra TLC’ye uygulanan plaka incelendiğinde kör ve spayk numunelerinin kolona tutunduğu ve geri alındığı görülmüştür fakat plaka üzerinde kirlilikler görülmüştür. Tasarladığımız silika jel kolonu kısmen başarı göstermiştir. BF yönteminde elde edilen son ekstraktın IAC’den geçirildikten sonra TLC’ye uygulanmasına ait plaka incelendiğinde diğer iki plakaya oranla kirliliklerden ayrıldığı görülmüştür.

Yapılan çalışmada üçer plakaya tatbik edilen 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ng içeren AFB₁ standartları Excel’de yaptığımız hesaplamalar sonucunda, pik alanının regresyonuna ait R² değerleri %95.6, %93.8 ve %98.2 olarak bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.14) Kalibrasyon kurvesine bakılarak yöntemin doğruluğunu ve görüntü analiz programının başarılı olduğu kanısına varılmıştır.

Yapılan üç analizin geri kazanım oranı hesaplanmıştır. Doğrudan TLC’ye uygulanan ekstraktın geri kazanım oranı %85, %84, %77, %49. Silika jel kolonundan geçirilen ekstraktın geri kazanım oranı %76, %92, %71, %74. Geri kazanım oranlarına bakıldığında silika jel kolonunda IAC’den geçirilen TLC’ye uygulanan ekstraktın geri

kazanım oranı %87, %84, %21.7, %21.8. IAC ile yapılan denemede iyi bir kazanım elde edilir (Turner ve ark., 2009). IAC'den geçirilen ekstraktın TLC'deki geri kazanım oranlarına bakıldığında yüksek oranlarda geri kazanım elde edilmiş ve TLC'nin başarılı olduğu görülmüştür. Geri kazanım değerlerinde Spayk 2 numunesinin düşük çıkmasının nedeni tam olarak anlaşılamamıştır.

Sonuç olarak; Çeşitli adsorbantlarla yapılan kolon denemelerinde başarı sağlanamamış yalnızca silika jel ile sınırlı bir başarı elde edilmiştir. Silika jel aflatoksinleri tutmuş fakat Antep fıstığı örneğinde başarısız olmuştur. Yeni bir yöntem kullanılarak yapılan silika jel kolonunda yeterli düzeyde kirlilikler ayrılmamıştır. Ticari olabilecek bir kolon geliştirilememiştir. HPLC analizlerinde aynı amaç ile kullanılan IAC, klasik olarak saflaştırılmış ekstraktın yeniden temizlenmesinde kullanılmış TLC'ye yetecek miktarda temiz ekstrakt elde edilmiştir. Klasik yöntemle IAC ile temizleme eklenerek TLC'nin performansının çok yukarı çıkartmıştır.

KAYNAKLAR

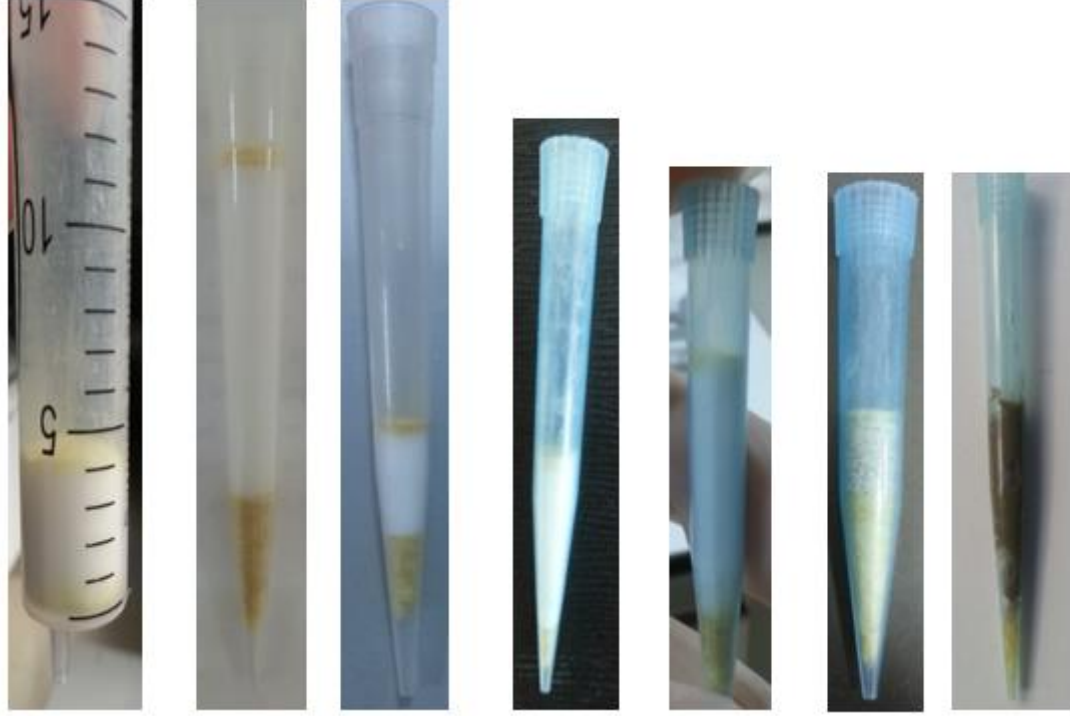
- AOAC., 2000. Official Method 970.45. Association of Official Agricultural Chemists
Official Methods of Analysis. www.aoac.org.
- Arowora. K.A., Abiodun, A.A., Adetunji, C.O., Sanu, F.T., Afolayan, S.S., Ogundele, B.A. 2012. levels of aflatoxins in some agricultural commodities sold at baboko market in ilorin, Nigeria. *Global Journal of Science Frontier Research Agriculture and Veterinary Sciences*, 12 (10): 31-33.
- Atik İ., 2012. *Aydın İlinde Doğal Olarak Kurutulan, Geleneksel ve Endüstriyel İşlenen İncirlerin Bazı Özellikleri ve Aflatoksin İçerikleri* (yüksek lisans tezi, basılmamış), Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- Anklam, E., Stroka, J., Achim Boenke, A., 2002. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins, *Food Control*, 13: 173–183.
- Çeçen, A. 2009. *Ahırda ve Merada Beslenen Hayvanların Sütlerinde Aflatoksin M₁ Oluşumunun Karşılaştırılması* (yüksek lisans tezi, basılmamış). YYÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Çoksöyler, N. 1996. *Gıda ve Yem Sanayinde Mikotoksinlerin Önemi ve Kontrolü*. MEÜ, Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Uygulamalı Kurs ve Seminerleri, Mersin.
- Demirkan, İ., 2007. *Kromatografik Gıda Analizlerinde, Örnek Hazırlama Aşamasına Yönelik Ters Faz Polimerik Katı Faz Ekstraksiyon Malzemelerin Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu* (yüksek lisans tezi, basılmamış). Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Kayseri.
- Deshpande, S.S. 2002. *In Handbook of Food Toxicology*. New York, USA, Marcel Dekker Inc. 387-411.
- Goldblatt, L. A., 1969. *Aflatoxin Scientific Background, Control and Implications*. New York, London. 472.
- Heperkan, D., 2006. Mikotoksinlerin biyolojik yöntemler ve kimyasal bağlayıcılarla uzaklaştırılmasındaki güncel gelişmeler. *Türkiye 9. Gıda Kongresi*. 24-26 Mayıs 2006, Bolu.

- Heperkan, D., 2014. **Gıdalarda Mikotoksinler**. 1.Baskı (Editör: Heperkan, D.) Sidas Yayınevi, İzmir, 29-42.
- İlgün, A. 2014. **Analitik Kimyada Örnek Hazırlama Teknikleri** (yüksek lisans tezi, basılmamış). Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Kayseri.
- Karakaş, T. 2014. **İnce Tabaka Kromatografisinde Yeni Bir Teknikle Kırmızıbiberde Aflatoksin Tayini** (yüksek lisans tezi, basılmamış). YYÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van
- Kaymak, T., Tülay, H., 2016. AFB₁ toluen:asetonitril (90+10) de Molar Adsorbsiyonu, Ankara İl Kontrol Laboratuvarı Mikotoksin Referans Laboratuvarı (kişisel iletişim).
- Olesik, S., Beilke, M., Newsome, T., Beres, M., 2014. UTLC: Possibly the future of analytical separation. electrospun polyacrylonitrile nanofibers as miniaturised layer materials for UTLC. **International Symposium for High-Performance Thin-Layer Chromatography**, Lyon 2-4 July 2014. Book of Abstract p:26
- Ötles, S., Kartal, C., 2015. Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and applications in food samples. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, 15(1): 5–15.
- Özkaya, S., Temiz, A., 2003. Aflatoksinler: kimyasal yapıları, toksisiteleri ve detoksifikasyonları. **Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi**, 1: 1–21.
- Özpala, A., 2006. **Aydın Yöresi Kuru İncirlerinde Aflatoksin Tayini ve Yöntemlerin Karşılaştırılması** (yüksek lisans tezi, basılmamış), Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Papp, E., H-Otta, K., Zaray, G., Mincsovcics, E., 2002. Liquid chromatographic determination of aflatoxins. **Microchemical Journal**, 73: 39–46.
- Pavlovic, D.M., Babic S., Horvat, A.J.M., Macan, M.K. 2007. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. **Trends in Analytical Chemistry**, 26 (11): 1062-1075.
- Phillips, T. D., 1999. Dietary Clay in the Chemoprevention of Aflatoxin-Induced Disease. **The Journal of Toxicological Sciences**, 52: 118-126.
- RASSF (Rapid Alert System for Food and Feed). 2015. The RASFF preliminary annual report, <http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert>. Erişim tarihi Temmuz, 2015.

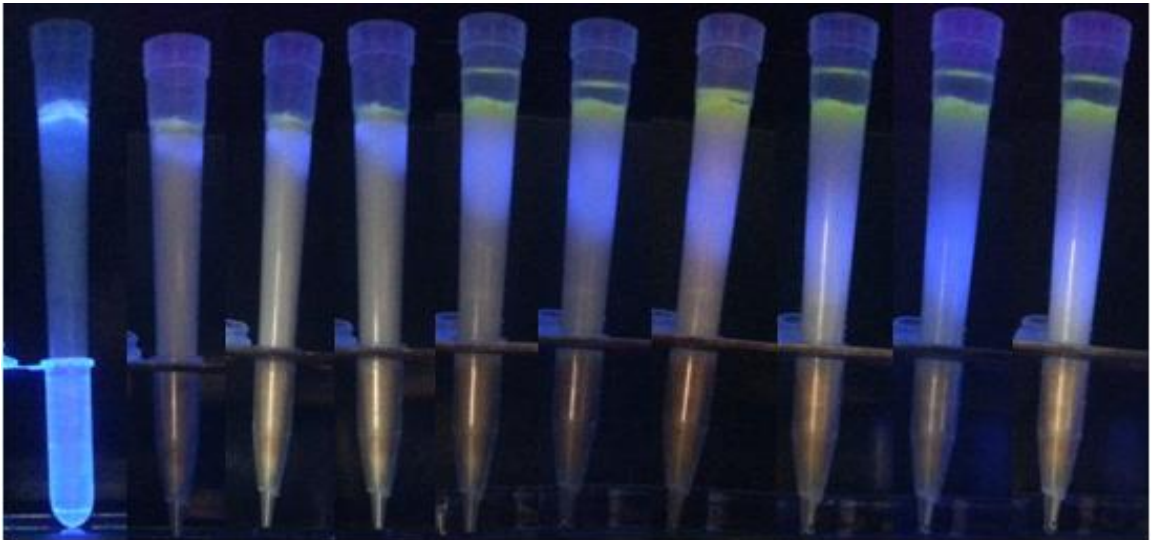
- Sağ, H., 2013. **Aflatoksin M₁ İçeren Sütlerin Kil ile Detoksifikasyonu.** (yüksek lisans tezi, basılmamış). Yüzücü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Van.
- Salem, N. M., Ahmad. R. 2010. Mycotoxins in food from Jordan: Preliminary survey. **Food Control**, **21** (8): 1099–103.
- Sherma, J., Fried, B. 2005. **Handbook of Thin Layer Chromatography.** Third Edition, Revised and Expanded. Easton, Pennsylvania, USA. 1186.
- Simpson, N., J., K., 2000. **Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications.** Marcel Dekker, USA. ISBN: 0-8247-0021-Xz
- Stroka, J., Joerissen U., Petz M, Anklam E., 1999. Investigation of various extractants for the analysis of aflatoxin B₁ in different food and feedmatrices, **Food Additives and Contaminants**, **16**: 331-338.
- Stroka, J., 2000. Determination of Aflatoxins in Food and Feed with Simple and Optimised Methods. <http://elpub.bib.uni-wuppertal.de/edocs/dokumente/fb09/diss2000/stroka/d090031.pdf> Son erişim tarihi: 22.08.2014
- Stroka, J., Anklam, E. 2000. Development of a simplifield densitometre fort he determination of aflatoxins thin layer chromatography. **Journal Chromatography of A**, **904**: 263-268.
- Şen, L., Nas, S., 2010. Fındık ve Antep fıstığının mikotoksin problemi. **Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi**, **5** (1): 49-56.
- Thurman E.M., Mills M.S., 1998. **Solid-Phase Extraction Principles and Practice**, John Wiley and Sons, Inc. 1-45.
- Turner, N.W., Subrahmanyam, S., Piletsky, S.A. 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **An İnternational Journal Devoted to All Brances of Analytical Chemistry**, **632** (2):168-180.
- Yavuz, O., Aksoy, A. 2006. Örnek hazırlamada katı faz ekstraksiyonu metodu. **Fırat Üniversitesi Sağlık Bil. Dergisi**, **20** (3): 259-269.

EKLER

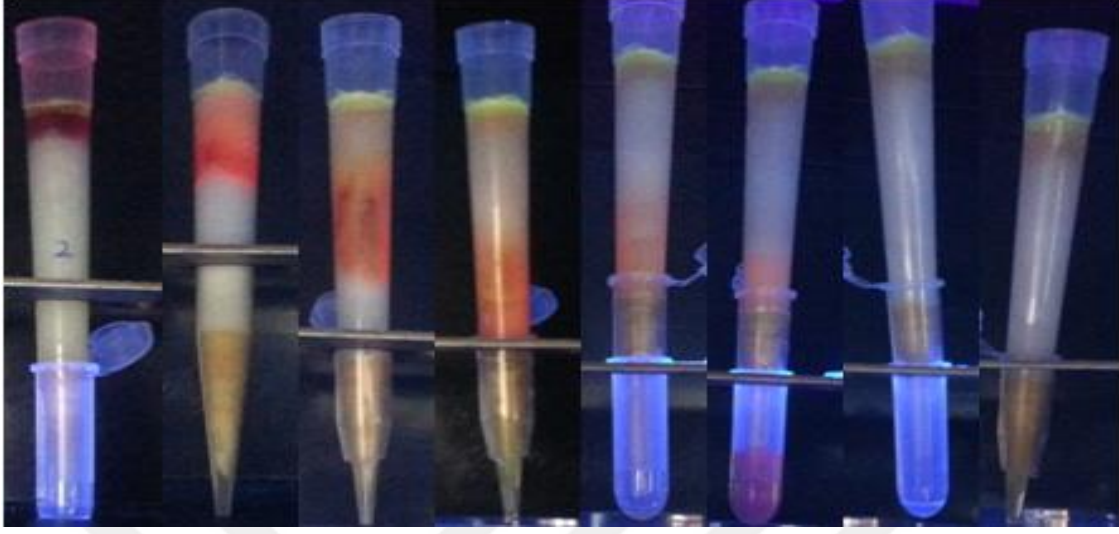
Ek 1. 5-10 ml'lik otomatik pipet ucu, 20 ml'lik plastik şırınga ve farklı adsorbantlar ile hazırlanan kolonların görünümü



Ek 2. Aflatoksinleri kolondan geri almak için kullanılan kloroformun her 0.2 ml'de UV kabininden aflatoksin ilerleyişinin gösterilmesi



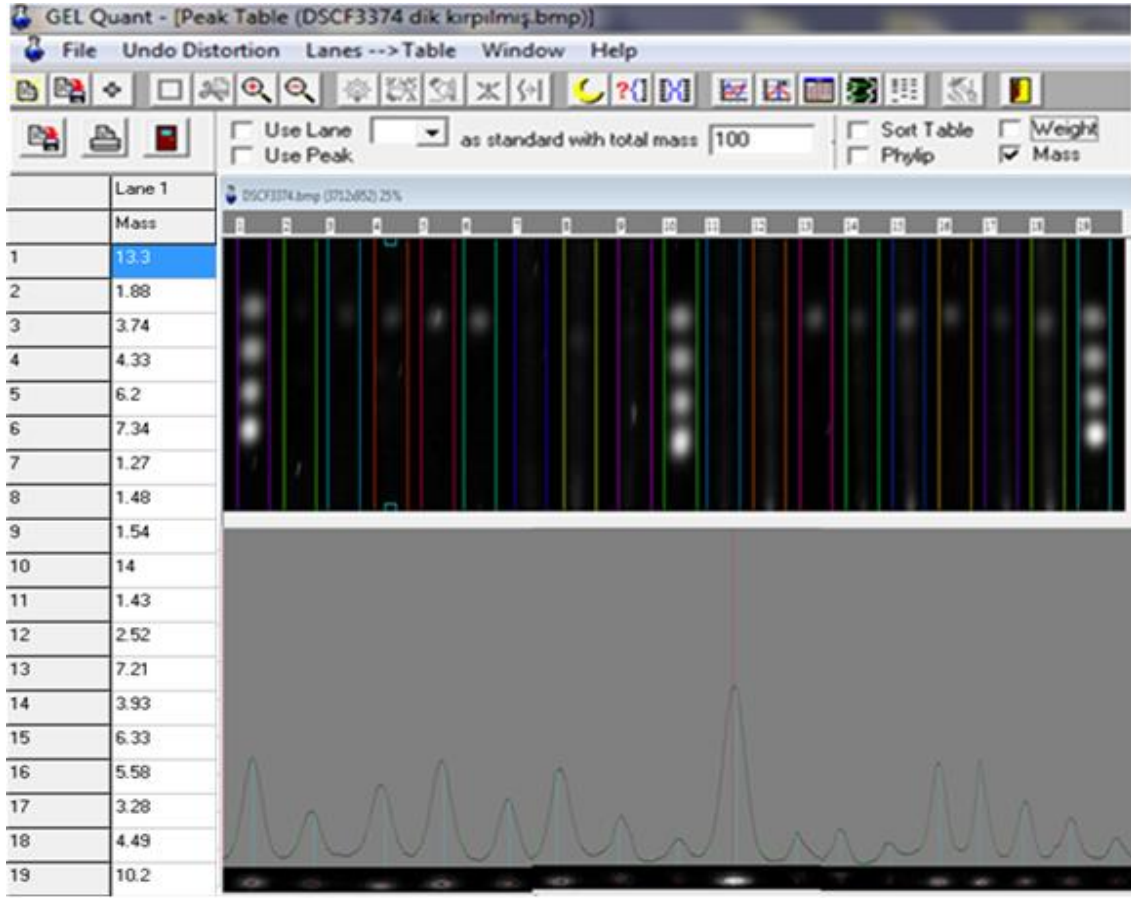
Ek 3. Spayklanmış Antep fıstığı ekstraktının kolondan aseton geçirilerek her 1 ml’de UV kabininde aflatoksin ilerleyişinin gösterilmesi



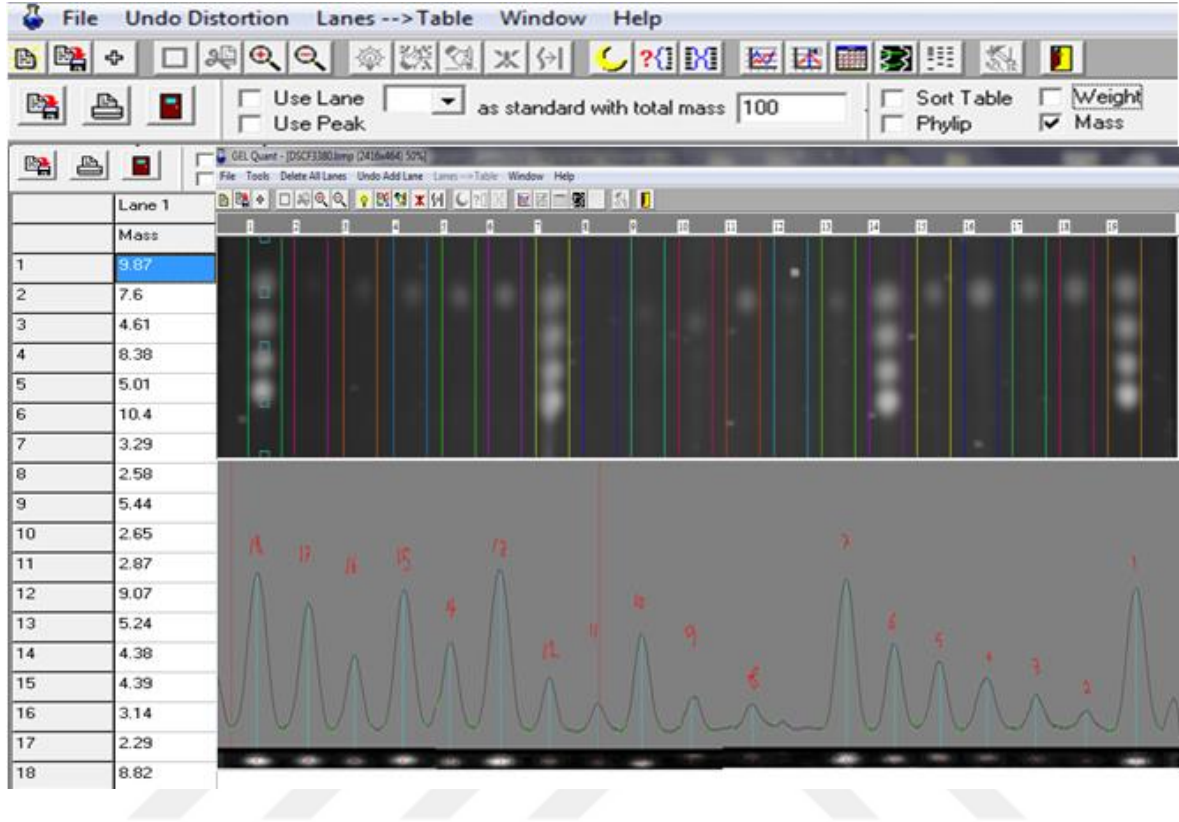
Ek 4. Immuno affinite kolonu



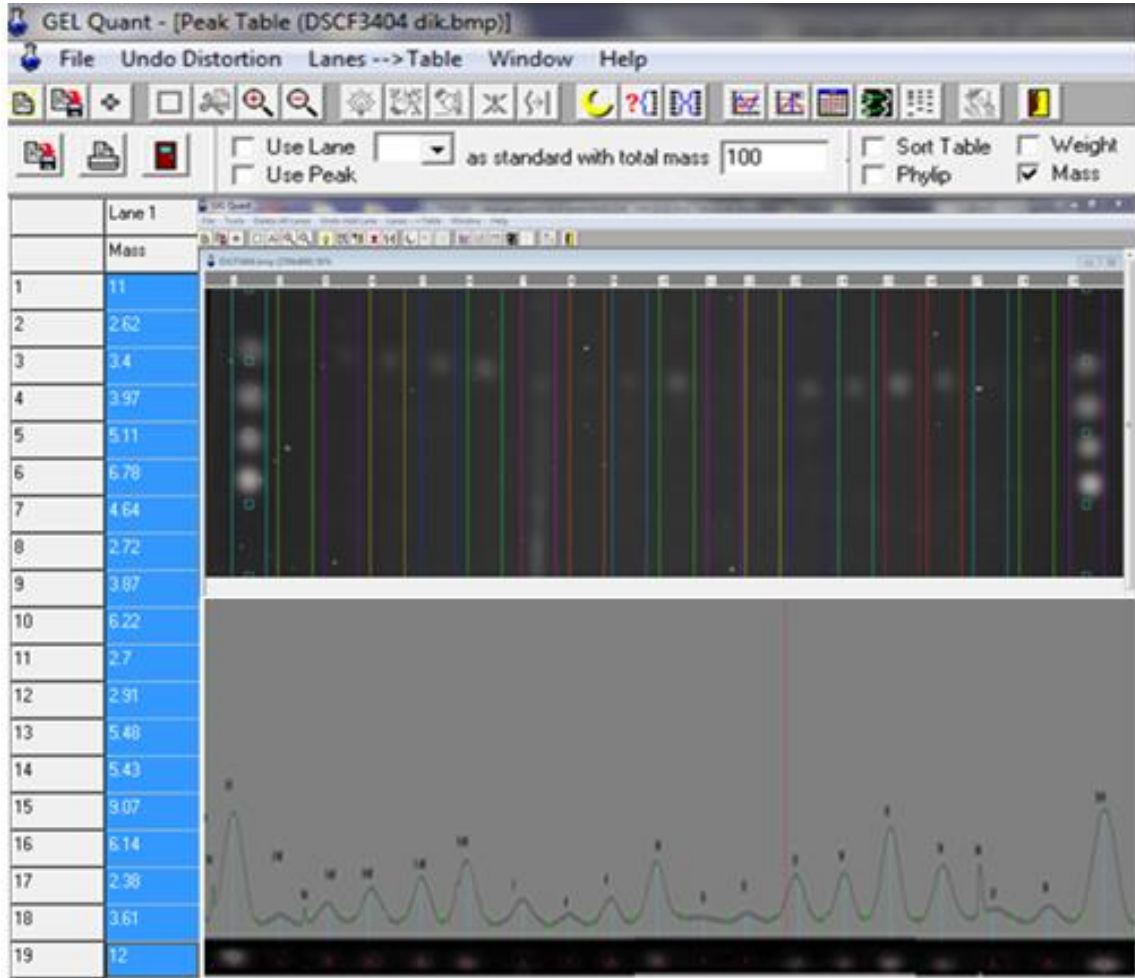
Ek 5. BF yöntemi ile elde edilen ekstraktın doğrudan TLC'ye uygulanmasında gelquant görüntü analiz programı ile edilen pikler ve alanları



Ek 6. BF yöntemi ile elde edilen ekstraktın tasarlanan silika jel kolonundan geçirilerek TLC'ye uygulanmasında gelquant görüntü analiz programı ile elde edilen pikler ve alanları



Ek 7. BF yöntemi ile elde edilen ekstraktın IAC'den geçirilerek TLC'ye uygulanmasında gelquant görüntü analiz programı ile elde edilen pikler ve alanları



ÖZ GEÇMİŞ

Cansu AĞAN 1989 yılında Malatya ilinde doğdu. İlköğrenimini Abdulkadir Eriş İlköğretim Okulu, orta öğrenimini Kemal Özalper İlköğretim Okulu ve lise öğrenimini ise Gazi Anadolu Lisesi'nde tamamladı. Ön lisans eğitimine 2009 yılında Adıyaman Üniversitesi'nde başladı. 2012 yılında ön lisans eğitimini lisans olarak tamamlamak üzere Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nde başladı. Bu bölümden 2014 yılında mezun oldu.

