

**OKRATOKSİN A TAYİNİ İÇİN MONOLİTİK AFİNİTE
KOLONLARININ HAZIRLANMASI VE İKİ-BOYUTLU HPLC
SİSTEMİNDE ÇEVİRİMİÇİ ANALİZLERİN İNCELENMESİ**

**PREPARATION OF MONOLITHIC AFFINITY COLUMNS
FOR OCHRATOXIN A DETERMINATION AND
INVESTIGATION OF ONLINE ANALYSES IN THE TWO-
DIMENSIONAL HPLC SYSTEMS**

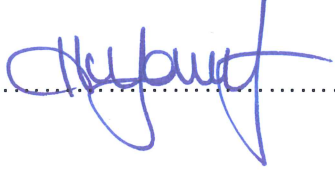
CANAN ARMUTCU ÇORMAN

PROF. DR. ADİL DENİZLİ
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

CANAN ARMUTCU ÇORMAN'ın hazırladığı “Okratoksin A Tayini için Monolitik Afinite Kolonlarının Hazırlanması ve İki-boyutlu HPLC Sisteminde Çevrimiçi Analizlerin İncelenmesi” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

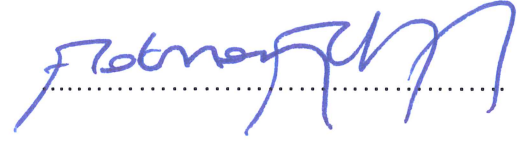
Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ
Başkan



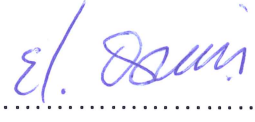
Prof. Dr. Adil DENİZLİ
Danışman



Doç. Dr. Lokman UZUN
Üye



Doç. Dr. Bilgen OSMAN
Üye



Yrd. Doç. Dr. Fatma YILMAZ
Üye



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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin/Raporumun 28/11/2019 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

28 / 11 / 2017

CANAN ARMUTCU ÇORMAN



Canım Babama...

ETİK

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

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

beyan ederim.

28/11/2017



CANAN ARMUTCU ÇORMAN

ÖZET

OKRATOKSİN A TAYİNİ İÇİN MONOLİTİK AFİNİTE KOLONLARININ HAZIRLANMASI VE İKİ-BOYUTLU HPLC SİSTEMİNDE ÇEVİRİMİÇİ ANALİZLERİN İNCELENMESİ

Canan ARMUTCU ÇORMAN

Doktora, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Kasım 2017, 125 sayfa

Sunulan tez kapsamında, besinlerdeki Okratoksin A (OTA) seviyelerinin insan sağlığı açısından tolere edilebilir düzeyde olup olmadığını gözlemleyebilmek için OTA tayinine yönelik monolitik afinite kolonlarının hazırlanması ve eş zamanlı olarak analizlerin iki-boyutlu HPLC (2D-HPLC) sisteminde incelenmesi hedeflenmiştir. Çalışmada son yılların gözde araştırma konuları olan monolitik kolonlar, çok-boyutlu kromatografik teknikler ve gıda maddelerindeki mikotoksin analizi konularının birleştirilmesi amaçlanmıştır. Piyasadaki Okratoksin A immünoafinite kolonlarına alternatif kolonlar oluşturmak için çelik HPLC kolonlarında hidrofobik afinite temelli monolitik kolonlar tasarlanmıştır. Bu doğrultuda, ilk olarak hidrofobik ligand olarak kullanılan L-fenilalanin molekülünün polimerleşebilen türevi olan N-metakriloil-L-fenilalanin (MAPA) monomeri sentezlenmiştir. Monolitik kolonlar, MAPA monomeri ile 2-hidroksietil metakrilat (HEMA)'ın yığın polimerizasyonu ile çelik kolonların içerisinde 75°C'lik su banyosunda 3.5 saatte sentezlenmiştir. Monolitik kolonlar, taramalı elektron mikroskopu (SEM), elementel analiz, Fourier dönüşümlü toplam yansıması azaltılmış infrared spektroskopisi (FTIR-ATR), Raman spektroskopisi ve geri

basınç-akış hızı ilişkisi yöntemleri ile karakterize edilmiştir. İlk aşamada, hazırlanan monolitik afinite kolonları ile okratoksin A analiz koşullarının optimizasyonu tek-boyutlu HPLC (1D-HPLC) sisteminde incelenmiştir. Optimizasyon çalışmaları kapsamında; OTA derişimi (0.5-20 ng/mL), MAPA monomer miktarı (0-250 µmol), hareketli faz [ACN:H₂O (% 2 HAc içeren) (40:60-45:55-51:49-55:45-60:40)], akış hızı (0.25-1.5 mL/dk), sıcaklık (25°C-40°C) ve enjeksiyon hacmi (10-100 µL) etkileri incelenmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise hidrofobik temelli monolitik kolonlar birinci boyutta ayırma kolonu olarak, ters faz C18 kolonu ise ikinci boyutta analitik kolon olarak HPLC sistemine entegre edilmiştir. Gıda maddelerindeki (bira, şarap, mısır ve kahve) OTA eş zamanlı olarak iki-boyutlu HPLC sisteminde analiz edilmiştir. 2-5 ng/mL OTA çözeltileri için gün içi tekrar kullanılabilirlik % RSD değerleri % 0.21-% 0.49 ve % geri kazanım değerleri % 104.44-% 107.33 olarak; günler arası tekrar kullanılabilirlik % RSD değerleri ise % 0.44-% 1.31 ve % geri kazanım değerleri de % 104.34-% 107.03 olarak bulunmuştur. Monolitik kolonların gün içi ve günler arası tekrar kullanılabilirlik değerlerinde belirgin bir azalma olmadan defalarca kullanılabilceği ve bu yüzden piyasada OTA'nın analizinde kullanılan tek kullanımlık immünoafinite kolonlarına alternatif olabileceği kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Monolitik HPLC kolonlar, İki-boyutlu HPLC sistemi, Mikotoksinler, Okratoksin A Analizi.

ABSTRACT

PREPARATION OF MONOLITHIC AFFINITY COLUMNS FOR OCHRATOXIN A DETERMINATION AND INVESTIGATION OF ONLINE ANALYSES IN THE TWO-DIMENSIONAL HPLC SYSTEMS

Canan ARMUTCU ÇORMAN

Doctor of Philosophy, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

November 2017, 125 pages

The aim of this thesis is the preparation of monolithic affinity columns and simultaneous determination of Ochratoxin A (OTA) in food by assessing tolerable levels for humans with two-dimensional HPLC (2D-HPLC) system. It was aimed to combine the hot topics of recent researches such as monolithic columns, multidimensional chromatographic techniques and mycotoxin analysis in foodstuffs. Hydrophobic affinity-based monolithic columns were designed in steel HPLC columns to create alternative columns for disposable OTA immunoaffinity columns on the market. First, the N-methacryloyl-L-phenylalanine (MAPA) monomer which is polymerizable derivative of the L-phenylalanine molecule used as the hydrophobic ligand, was synthesized. Monolithic columns were synthesized by the bulk polymerization of MAPA and 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) conducted in a steel HPLC column at 75°C (temperature controlled water bath) for 3.5 h. Monolithic columns are characterized by scanning electron microscopy (SEM), elemental analysis, Fourier transform infrared-attenuated total reflectance spectroscopy (FTIR-ATR), Raman spectroscopy and back pressure-flow rate dynamics. In the first step, optimization of the analysis conditions for OTA with the

monolithic affinity columns prepared was studied in a one-dimensional HPLC (1D-HPLC) system. In this context, OTA concentrations (0.5-20 ng/mL), MAPA monomer content (0-250 μ mol), mobile phase [ACN:H₂O (containing 2% HAc) (40:60-45:55-51:49-55:60)], flow rate (0.25-1.5 mL/min), temperature (25°C-40°C) and injection volume (10-100 μ L) were investigated. In the second step of the study, two different columns in the first dimension hydrophobic based monolithic columns as separation column and in the second dimension reverse phase C18 column as analytical column were integrated into HPLC system. OTA in foodstuffs (beer, wine, corn and coffee) was simultaneously analyzed in a two-dimensional HPLC system. The intra-day RSD% were varied from 0.21%-0.49% with recoveries obtained varying between 104.44% and 107.33% whereas the inter-day RSD% were varied from 0.44%-1.31% with recoveries found to be 104.34%-107.03% to the concentration of OTA at 2-5 ng/mL. It has been demonstrated that monolithic columns could be used for OTA analysis to alternative single-use disposable immunoaffinity columns on the market, which can be used repeatedly without significant loss in intra-day and inter-day reusability values.

Keywords: Monolithic HPLC columns, Two-dimensional HPLC system, Mycotoxins, Analysis of Ochratoxin A.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, sadece bilimsel anlamda değil sahip olduğu eşsiz bilgisiyle hayatıma yön veren, desteğini benden esirgemeyerek her zaman yanımda olduğunu hissettiren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Hayata ve bilime olan sevgisiyle her daim örnek aldığım, doktora öğrenimim ve tez çalışmam boyunca beni her zaman destekleyen, her başım sıkıştığında yanına koştuğum; bıkmadan, usanmadan, beni dinleyen, sıkıntılarımı paylaşan, önerileriyle katkıda bulunan, hakkını asla ödeyemeyeceğim, çok sevdiğim ağabeyim, hocam Doç. Dr. Lokman Uzun'a,

Biyokimya araştırma grubuna katıldığım günden itibaren bana her türlü desteği sağlayan, bilimsel tecrübelerinden yararlandığım Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz, Doç. Dr. Nilay Bereli, Doç. Dr. Deniz Türkmen ve Yrd. Doç. Dr. Fatma Yılmaz'a,

Bilimsel katkısı ve hoşgörüsü için değerli jüri üyesi sevgili hocam Doç. Dr. Bilgen Osman'a,

Doktora tez çalışmalarım boyunca sürekli kafasını şişirdiğim, kilometrelerce uzakta olsa bile bir telefon ile tüm sorunlarımı çözen, desteğini her zaman hissettiğim Dr. Engin Bayram'a,

Parçası olmaktan mutluluk duyduğum, kendimi ikinci evimde hissettiren Biyokimya Araştırma Grubundaki tüm arkadaşlarıma,

Yüksek lisans öğrenimleri sırasında biyokimya araştırma grubuna dahil olduklarında benimde hayatıma dahil olan çok sevdiğim arkadaşlarım Çiğdem Çiçek ve Evin Mine Dursun'a,

Finansal olarak bu tezin tamamlanmasında 1002 Hızlı Destek kapsamında 114Z708 numaralı proje ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a,

Hayatım boyunca her koşulda bana destek veren ve sabır gösteren, önceliklerini her zaman benim önceliklerime göre değiştiren ve bunun karşılığını hiçbir zaman tam olarak ödeyemeceğim, bugünlere gelmemde en büyük katkıları olan, bu hayatta hiç birşeye asla değişmeyeceğim canım aileme,

Yanımda olamasa da varlığını her zaman en derinlerde hissettiğim, herkese ve herşeye rağmen kızına hep inanan, benim bugünlere gelmem de en büyük emeği olan canım babama,

Tanıştığım günden itibaren her anımda yanımda olan, beni hep destekleyen, her türlü zorlukta bana güç veren, bu süreçteki en büyük destekçim, hayat arkadaşım, sevgili eşim, Emin'e

Doğduğu günden itibaren hayatımıza neşe, huzur ve anlam katan dünyalar güzeli Selen'ime,

Sonsuz Teşekkürler...

Canan Armutcu Çorman

Kasım 2017, Ankara

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | iii |
| TEŞEKKÜR | v |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| ÇİZELGELER | x |
| ŞEKİLLER | xi |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | xv |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Mikotoksinler | 3 |
| 2.1.1. Önemli Mikotoksinler ve Onları Üreten Mantarlar | 4 |
| 2.1.2. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler | 5 |
| 2.1.3. Mikotoksinlerin Canlılar Üzerindeki Etkileri | 8 |
| 2.2. Okratoksin A | 8 |
| 2.2.1. Okratoksin A'nın Kimyasal Yapısı | 9 |
| 2.2.2. OTA'nın İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri | 10 |
| 2.2.3. OTA'nın metabolitleri | 11 |
| 2.2.4. OTA'nın Gıda Maddelerindeki Güncel Limitleri | 12 |
| 2.2.5. OTA Analiz Yöntemleri | 14 |
| 2.3. Monolitler | 15 |
| 2.3.1. Monolitik Malzemelerin Tarihsel Geçmişi | 15 |
| 2.3.2. Yeni Nesil Kolon Dolgu Malzemesi Olarak Monolitler | 17 |
| 2.3.3. Monolitlerin Gözenek Yapısı ve Gözenek Özelliklerinin Kontrolü | 17 |
| 2.3.4. Monolitlerin Avantajları | 18 |
| 2.4. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) | 18 |
| 2.4.1. İki-boyutlu Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (2D-HPLC) | 19 |
| 2.4.1.1. 2D-HPLC İçin Önemli Performans Parametreleri | 20 |
| 2.4.1.1.1. Pik Kapasitesi | 20 |
| 2.4.1.1.2. Ortogonalite | 22 |
| 2.4.1.1.3. Ayırıcılık | 23 |
| 2.4.1.1.4. Örnekleme hızı/ sıklığı | 23 |

| | |
|---|----|
| 2.4.1.2. Yöntem Geliştirme | 23 |
| 2.4.2. Çevrimdışı 2D-HPLC..... | 27 |
| 2.4.3. Çevrimiçi 2D-HPLC | 27 |
| 2.4.3.1. Heart-cutting Modu | 28 |
| 2.4.3.2. Kapsamlı Mod..... | 28 |
| 2.4.4. 2D-HPLC Uygulamaları..... | 29 |
| 2.4.4.1. Çevresel Uygulamalar | 29 |
| 2.4.4.2. Biyolojik Örneklerdeki Uygulamalar | 30 |
| 2.4.4.3. Gıdalardaki Uygulamalar | 31 |
| 2.4.4.4. İlaçlardaki Uygulamalar | 33 |
| 2.4.4.5. Sentetik Polimerlerdeki Uygulamalar..... | 34 |
| 3. MALZEME VE YÖNTEMLER..... | 35 |
| 3.1. Kimyasal Malzemeler..... | 35 |
| 3.2. Deneysel Yöntemler | 35 |
| 3.2.1. N-Metakriloil-L-Fenilalanin (MAPA) Monomerinin Sentezlenmesi..... | 35 |
| 3.2.2. P(HEMA) ve P(HEMAPA) Monolitik HPLC Kolonların Hazırlanması . | 36 |
| 3.2.3. P(HEMA) ve P(HEMAPA) Monolitik Kolonların Karakterizasyonu | 37 |
| 3.2.3.1. FTIR-ATR ile Yapı Analizi..... | 37 |
| 3.2.3.2. Raman ile Yapı Analizi | 37 |
| 3.2.3.3. Geri Basınç-Akış Hızı İlişkisinin İncelenmesi..... | 38 |
| 3.2.3.4. Yüzey Morfolojisi | 38 |
| 3.2.3.5. Elementel Analiz..... | 38 |
| 3.2.4. P(HEMAPA) Monolitik Kolonların Tek-Boyutlu Kullanımı için Optimizasyonu..... | 38 |
| 3.2.5. P(HEMAPA) Monolitik Kolonların İki-Boyutlu HPLC Sisteminde Kullanımı | 40 |
| 3.2.6. İmmünoafinite-Katı Faz Özütleme İşleminin Uygulanabilirliği..... | 42 |
| 3.2.7. Gerçek Örneklerden OTA Özütlemesi..... | 42 |
| 3.2.8. P(HEMAPA) Monolitik Kolonların Tek ve İki-Boyutlu HPLC Sisteminde Tekrar Kullanılabilirliği | 45 |
| 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA..... | 46 |
| 4.1. N-Metakriloil-L-Fenilalanin (MAPA) Monomerin Karakterizasyonu..... | 46 |
| 4.2. P(HEMA) ve P(HEMAPA) Monolitik Kolonların Karakterizasyonu..... | 47 |
| 4.2.1. FTIR-ATR ile Yapı Analizi | 47 |

| | |
|---|-----|
| 4.2.2. Raman ile Yapı Analizi | 48 |
| 4.2.3. Geri Basınç-Akış Hızı İlişkisinin İncelenmesi | 49 |
| 4.2.4. Elementel Analiz..... | 50 |
| 4.2.5. Yüzey Morfolojisi | 51 |
| 4.3. P(HEMAPA) Monolitik Kolonun Tek-Boyutlu Kullanımı İçin Adsorpsiyon Koşullarının Optimizasyonu | 52 |
| 4.3.1. Hareketli Faz Etkisinin İncelenmesi..... | 52 |
| 4.3.2. OTA Derişim Etkisinin İncelenmesi | 54 |
| 4.3.3. Akış Hızı Etkisinin İncelenmesi | 60 |
| 4.3.4. Sıcaklık Etkisinin İncelenmesi | 61 |
| 4.3.5. Enjeksiyon Hacmi Etkisinin İncelenmesi | 62 |
| 4.3.6. P(HEMAPA) Monolitik Kolonların Tek-Boyutlu HPLC Sisteminde Tekrar Kullanılabilirliği | 64 |
| 4.4. P(HEMAPA)-4 Monolitik Kolonların İki-Boyutlu HPLC Sisteminde Kullanımı | 69 |
| 4.4.1. İki-Boyutlu HPLC Sisteminde OTA Derişim Etkisinin İncelenmesi | 69 |
| 4.4.2. İmmünoafinite-Katı Faz Özütleme İşleminin Uygulanabilirliği..... | 72 |
| 4.4.3. Gerçek Örneklerden OTA Özütlemesi..... | 74 |
| 4.4.4. İki-Boyutlu HPLC Sisteminde Tekrar Kullanılabilirlik | 79 |
| 4.4.5. Literatür Karşılaştırması | 85 |
| 5. YORUM | 87 |
| KAYNAKLAR..... | 89 |
| ÖZGEÇMİŞ | 104 |

ÇİZELGELER

Sayfa

| | |
|--|----|
| Çizelge 2.1. Mikotoksin üreten mantar türleri ve oluşturdukları mikotoksinlerin listesi. | 5 |
| Çizelge 2.2. Bazı mikotoksinler ve onların bulaştığı tarım ürünlerini ve gıda maddeleri [16-18]. | 7 |
| Çizelge 2.3. Okratoksin A'nın kimyasal yapısı ve ilgili metabolitleri [25]. | 10 |
| Çizelge 2.4. Gıdalarda izin verilen okratoksin A üst sınır değerleri (Türkiye) [45]. | 13 |
| Çizelge 3.1. Monolitik kolonların reçetesi ve polimerizasyon koşulları..... | 36 |
| Çizelge 3.2. Tek-boyutlu HPLC parametreleri..... | 40 |
| Çizelge 3.3. İki-Boyutlu HPLC parametreleri..... | 41 |
| Çizelge 3.4. Ters faz C18 kolonu HPLC parametreleri. | 42 |
| Çizelge 3.5. Gıda örnekleri için Ochraprep® özütleme aşamaları. | 44 |
| Çizelge 4.1. P(HEMAPA) monolitik kolonların elementel analiz sonuçları. | 51 |
| Çizelge 4.2. P(HEMAPA)-4 monolitik kolonun gün içi ve günler arası tekrar kullanılabilirliğinin RSD ve geri kazanım değerleri. | 69 |
| Çizelge 4.3. Geri kazanılan OTA derişimleri ve OTA adsorpsiyon kapasiteleri. .. | 78 |
| Çizelge 4.4. P(HEMAPA)-4_C18 monolitik kolonların gün içi ve günler arası tekrar kullanılabilirliğinin RSD ve geri kazanım değerleri. | 85 |
| Çizelge 4.5. Literatür karşılaştırması..... | 86 |

ŞEKİLLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| Şekil 2.1. Bazı önemli mikotoksinlerin kimyasal yapıları [12]. | 4 |
| Şekil 2.2. Toksik mantarların gelişimine ve mikotoksinlerin oluşumuna etki eden faktörler [12]. | 6 |
| Şekil 2.3. Okratoksin A'nın kimyasal yapısı [25]. | 9 |
| Şekil 2.4. OTA'nın metabolitleri [40]. | 11 |
| Şekil 2.5. (A) Tek-boyutlu ve (B) İki-boyutlu HPLC sistemlerine ait çizimler [106]. | 19 |
| Şekil 3.1. Monolitik kolonun hazırlanmasının şematik gösterimi. | 37 |
| Şekil 3.2. Ticari Olarak Satılan Ochraprep® kolonlar..... | 43 |
| Şekil 4.1. MAPA monomerinin sentez reaksiyonu..... | 46 |
| Şekil 4.2. P(HEMAPA) monolitik kolonların olası kimyasal yapısı..... | 47 |
| Şekil 4.3. MAPA monomeri, P(HEMA) ve farklı miktarlarda MAPA monomeri içeren P(HEMAPA) monolitik kolonlara ait FTIR- ATR spektrumları. (a) MAPA monomeri; (b) P(HEMA); (c) P(HEMAPA)-1; (d) P(HEMAPA)-2; (e) P(HEMAPA)-3; (f) P(HEMAPA)-4. | 48 |
| Şekil 4.4. MAPA monomeri, P(HEMA) ve farklı miktarlarda MAPA monomeri içeren P(HEMAPA) monolitik kolonlara ait RAMAN spektrumları. (a) MAPA monomeri; (b) P(HEMA); (c) P(HEMAPA)-1; (d) P(HEMAPA)-2; (e) P(HEMAPA)-3; (f) P(HEMAPA)-4. | 49 |
| Şekil 4.5. P(HEMAPA)-4, P(HEMA) ve boş kolonlarda geri basınç-akış hızı ilişkisinin incelenmesi. Akış hızı: 0.1-1.5 mL/dk. | 50 |
| Şekil 4.6. Monolitik kolonların SEM fotoğrafları. (a) P(HEMA), (b) P(HEMAPA)-4..... | 52 |
| Şekil 4.7. P(HEMAPA)-4 monolitik kolonda OTA adsorpsiyonuna hareketli faz etkisi. OTA derişimi: 2.0 ng/mL; Sıcaklık: 40°C; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL; Akış hızı: 0.5 mL/dk..... | 53 |
| Şekil 4.8. P(HEMA) monolitik kolonda OTA adsorpsiyonuna OTA başlangıç derişiminin etkisi. Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H ₂ O (% 2 HAc içeren); Sıcaklık: 40°C; Akış hızı: 0.5 mL/dk. | 55 |

- Şekil 4.9. P(HEMAPA)-1 monolitik kolonda OTA adsorpsiyonuna OTA başlangıç derişimin etkisi. Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Sıcaklık: 40°C; Akış hızı: 0.5 mL/dk. 56
- Şekil 4.10. P(HEMAPA)-2 monolitik kolonda OTA adsorpsiyonuna OTA başlangıç derişimin etkisi. Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Sıcaklık: 40°C; Akış hızı: 0.5 mL/dk. 57
- Şekil 4.11. P(HEMAPA)-3 monolitik kolonda OTA adsorpsiyonuna OTA başlangıç derişimin etkisi. Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Sıcaklık: 40°C; Akış hızı: 0.5 mL/dk. 58
- Şekil 4.12. P(HEMAPA)-4 monolitik kolonda OTA adsorpsiyonuna OTA başlangıç derişimin etkisi. Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Sıcaklık: 40°C; Akış hızı: 0.5 mL/dk. 59
- Şekil 4.13. P(HEMA), P(HEMAPA)-1, P(HEMAPA)-2, P(HEMAPA)-3 ve P(HEMAPA)-4 monolitik kolonlarda OTA adsorpsiyonuna OTA başlangıç derişimin etkisi. Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Sıcaklık: 40°C; Akış hızı: 0.5 mL/dk. 60
- Şekil 4.14. P(HEMAPA)-4 monolitik kolonda OTA adsorpsiyonuna akış hızı etkisi. OTA derişimi: 2.0 ng/mL; Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Enjeksiyon Hacmi: 100 µL; Sıcaklık: 40°C. 61
- Şekil 4.15. P(HEMAPA)-4 monolitik kolonda OTA adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi. OTA derişimi: 2.0 ng/mL; Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Enjeksiyon Hacmi: 100 µL; Akış hızı: 0.5 mL/dk. 62
- Şekil 4.16. P(HEMAPA)-4 monolitik kolonda OTA adsorpsiyonuna enjeksiyon hacmi etkisi. OTA derişimi: 2.0 ng/mL; Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Sıcaklık: 40°C, Akış hızı: 0.5 mL/dk. 63
- Şekil 4.17. P(HEMAPA)-4 monolitik kolonla gün içi tekrar kullanım. (a) OTA derişimi: 0.5 ng/mL; (b) OTA derişimi: 4 ng/mL; Sıcaklık: 40°C; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL; Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Akış hızı: 0.5 mL/dk. 65
- Şekil 4.18. P(HEMAPA)-4 monolitik kolonla günler arası tekrar kullanım. (a) OTA derişimi: 0.5 ng/mL; (b) OTA derişimi: 4 ng/mL; Sıcaklık: 40°C; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL; Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Akış hızı: 0.5 mL/dk. 66

- Şekil 4.19. P(HEMAPA)-4 monolitik kolonla gün içi tekrar kullanım, adsorpsiyon kapasitesi ve % kalan kapasite. (a) OTA derişimi: 0.5 ng/mL; (b) OTA derişimi: 4 ng/mL; Sıcaklık: 40°C; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL; Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Akış hızı: 0.5 mL/dk. 67
- Şekil 4.20. P(HEMAPA)-4 monolitik kolonla günler arası tekrar kullanım, adsorpsiyon kapasitesi ve % kalan kapasite. (a) OTA derişimi: 0.5 ng/mL; (b) OTA derişimi: 4 ng/mL; Sıcaklık: 40°C; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL; Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Akış hızı: 0.5 mL/dk..... 68
- Şekil 4.21. P(HEMAPA)-4_C18 ve P(HEMA)_C18 iki-boyutlu HPLC sisteminde OTA adsorpsiyonuna OTA başlangıç derişimin etkisi. Enjeksiyon Hacmi: 100 µL; Sıcaklık: 40°C. 70
- Şekil 4.22. Birinci kolon: P(HEMAPA)-4 monolitik kolon. İkinci Kolon: C18. Sıcaklık: 40°C; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL..... 71
- Şekil 4.23. Birinci kolon: P(HEMA) monolitik kolon. İkinci Kolon: C18. Sıcaklık: 40°C; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL..... 72
- Şekil 4.24. Ochraprep kolonundan geçirilip elüe edilen ve Ochraprep kolonu kullanılmayan OTA örneklerinin ticari C18 kolonu kullanılarak analiz edilmesi. OTA derişimi: 0.5 ng/mL ve 5.0 ng/mL; Sıcaklık: 40°C; Akış Hızı: 1.0 mL/dk; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL. 73
- Şekil 4.25. 2 ng/mL derişiminde OTA standartı eklenen ve OTA standartı eklenmeyen bira numunesinden P(HEMAPA)-4_C18 ve Ochraprep_C18 kolonları ile OTA özütlenmesi. 75
- Şekil 4.26. 2 ng/mL derişiminde OTA standartı eklenen ve Ota standartı eklenmeyen şarap numunesinden P(HEMAPA)-4_C18 ve Ochraprep_C18 kolonları ile OTA özütlenmesi. 76
- Şekil 4.27. 5 ng/mL derişiminde OTA standartı eklenen ve Ota standartı eklenmeyen mısır numunesinden P(HEMAPA)-4_C18 ve Ochraprep_C18 kolonları ile OTA özütlenmesi. 77
- Şekil 4.28. 10 ng/mL derişiminde OTA standartı eklenen ve Ota standartı eklenmeyen kahve numunesinden P(HEMAPA)-4_C18 ve Ochraprep_C18 kolonları ile OTA özütlenmesi. 78

- Şekil 4.29. P(HEMAPA)-4_C18 monolitik kolonlarla iki-boyutlu HPLC sisteminde gün içi tekrar kullanım. (a) OTA derişimi: 2 ng/mL; (b) OTA derişimi: 4 ng/mL; (c) OTA derişimi: 5 ng/mL; Sıcaklık: 40°C; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL. 81
- Şekil 4.30. P(HEMAPA)-4_C18 monolitik kolonlarla iki-boyutlu HPLC sisteminde günler arası tekrar kullanım. (a) OTA derişimi: 2 ng/mL; (b) OTA derişimi: 4 ng/mL; (c) OTA derişimi: 5 ng/mL; Sıcaklık: 40°C; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL..... 82
- Şekil 4.31. P(HEMAPA)-4_C18 monolitik kolonlarla iki-boyutlu HPLC sisteminde gün içi tekrar kullanım, adsorpsiyon kapasitesi ve % kalan kapasite. (a) OTA derişimi: 2 ng/mL; (b) OTA derişimi: 4 ng/mL; (c) OTA derişimi: 5 ng/mL; Sıcaklık: 40°C; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL..... 83
- Şekil 4.32. P(HEMAPA)-4_C18 monolitik kolonlarla iki-boyutlu HPLC sisteminde günler arası tekrar kullanım, adsorpsiyon kapasitesi ve % kalan kapasite. (a) OTA derişimi: 2 ng/mL; (b) OTA derişimi: 4 ng/mL; (c) OTA derişimi: 5 ng/mL; Sıcaklık: 40°C; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL. .. 84

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

| | |
|-------|-------------------------------|
| PC | Pik Kapasitesi |
| R_s | Ayırıcılık |
| t_R | Alıkonma zamanı |
| Q | Adsorpsiyon kapasitesi (ng/g) |

Kısaltmalar

| | |
|---------|---|
| OTA | Okratoksin A |
| HPLC | Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi |
| 1D-HPLC | Tek-Boyutlu Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi |
| 2D-HPLC | İki-Boyutlu Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi |
| HEMA | 2-Hidroksietil Metakrilat |
| EGDMA | Etilen Glikol Dimetakrilat |
| MAPA | N-Metakriloil-L-Fenilalanin |
| RSD | Göreceli Standart Sapma |
| ACN | Asetonitril |
| HAC | Asetik asit |
| SEM | Taramalı Elektron Mikroskobu |
| KPS | Potasyum persülfat |
| LOD | Teşhis sınırı |
| LOQ | Tayin alt sınırı |
| IAC | İmmünoafinite Kolonları |
| SPE | Katı Faz Özütleme |
| FD | Floresan Dedektör |
| RP | Ters Faz |

1. GİRİŞ

Gıda maddelerinde üreyebilen, bu yolla günlük yaşantıda çok sık temasın söz konusu olabildiği küfler ve özellikle bunların oluşturdukları toksik metabolitler, üzerinde önemle durulan bir araştırma konusudur. Son yıllarda mikotoksinlerin gıdalarda görülmesi dışsatımlarda sıkıntılar yaşanmasına, ihracattan dönen ya da toksin bulunması nedeniyle dış pazara gönderilemeyen ürünlerin iç pazarda değerlendirilmesine neden olmuştur. Özellikle iç pazara yönelik kontrollerdeki eksikliklerden kaynaklanan açıklar yüzünden, önemli sağlık sorunlarını da beraberinde getirmektedir. İnsanlarda ve benzer şekilde hayvanlarda mikotoksin, dozuna bağlı olarak farklı etki göstermektedir. Canlılar mikotoksin ile maruz kaldıklarında erken doğum, bağışıklık sisteminin baskılanması (immünosupresif), kanda lökosit sayısının azalması (lökopeni), doğurganlığın azalması, kanser veya geri dönüşü olmayan ciddi hasarlara ve hatta ölüm ile sonuçlanan akut toksik etkiler ile karşı karşıya kalmaktadır. Bundan dolayı, bu sorunları minimum düzeye indirebilmek adına, besinlerdeki mikotoksin seviyelerinin tolere edilebilir düzeyde olup olmadığını gözlemleyebilmek için yeni, güvenilir, tekrarlanabilir, ucuz ve kısa sürede analizi gerçekleştirecek monolitik afinite kolonlarının hazırlanması ve eş zamanlı olarak analizlerin iki-boyutlu HPLC (2D-HPLC) sistemlerinde incelenmesi hedeflenmiştir.

Okratoksin A (OTA) toksik bir metabolittir ve bazı *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilen, çeşitli hayvan yemlerinde, insan gıdalarında ve çeşitli batı ülkelerinde insan kan örneklerinin % 80'inde bulunmuştur. Çeşitli araştırmalar OTA'nın, karsinojenik, genotoksik, teratojenik, immünotoksik ve nefrotoksik olduğunu ortaya koymaktadır. OTA, DNA kırılmaları, protein sentezinin inhibisyonu ve glikoneogenez, lipid peroksidasyonu, mitokondrideki oksidatif fosforilasyonun bozulması, kanın pıhtılaşmasının engellenmesi ve apoptotik etkisi nedeniyle büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle son yıllarda OTA'nın, insanlarda toksik ve karsinojenik etkileri üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır.

Monolitik destek malzemeleri literatüre 1950'li yıllarda girmiş olmasına rağmen ilk başarılı kromatografi uygulamaları 1990'lı yıllarda rapor edilmiştir. Bu polimerizasyon tekniğinin dolgulu kolonlara karşı en önemli avantajı, partiküller arası ölü hacimlerinin olmayışıdır. Ayrıca; geniş ve birbirine bağlantılı akış kanalları yüksek akış hızlarında çalışmaya olanak sağlamaktadır. Geri basıncın az

olması, iletim ile kütle aktarımı ve difüzyon yolunun kısa oluşu gibi kinetik avantajları da bulunmaktadır. Bu ve benzeri üstün özellikleri monolitleri, yeni nesil alternatif destek malzemeleri yapmakta ve yeni polimer temelli monolitik kolonların hazırlanması konusunda çalışmaların sayısı hızla artmaktadır.

Gıda maddeleri üzerinde yapılan çalışmalarda örnekleme yapılacak besin ortamının karmaşık doğası, uygulanması gereken kromatografik ayırmanın oldukça yüksek seçicilikte olmasını zorunlu kılmaktadır. Bu kapsamda; özellikle farklı sıvı kromatografisi modları (ters faz, hidrofilik, afinite, jel geçirgenlik vb.) ayırma amacıyla kullanılmaktadır. Kromatografik ayırmanın veriminin artırılması için iki-boyutlu kromatografik ayırma yeni bir alternatif olarak değerlendirilmektedir. İki-boyutlu yüksek performans sıvı kromatografisi tekniğinde, gerçek örneklerde bulunan eser miktardaki bileşiklerin analizinde gerekli olan; zaman alıcı, yoğun iş gücü gerektiren, kontaminasyona yol açan, daha fazla organik çözücü gerektiren, sonuç olarak analitik hataları artıran ön işlem basamaklarına ihtiyaç duyulmamaktadır. İki-boyutlu HPLC (2D-HPLC) tekniği, "çevrimiçi" olarak adlandırılan bir adımda tüm bu işlemleri sağlayarak özellikle gıda kontrol ve tarama programlarında toksik metabolitlerin kantitatif analizleri için performansı önemli düzeyde arttıran popüler bir teknik haline gelmiştir.

Bu çalışmada, piyasadaki OTA analizi için kullanılan immünoafinite kolonlarına alternatif kolonlar oluşturmak için afinite etkileşimleri temeline dayalı yeni nesil monolitik HPLC kolonlarının hazırlanması, hazırlanan kolonlar ile OTA'nın 2D-HPLC sisteminde çevrimiçi analizlerin incelenmesi ve gıda maddelerindeki OTA'nın eş zamanlı olarak tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikotoksinler

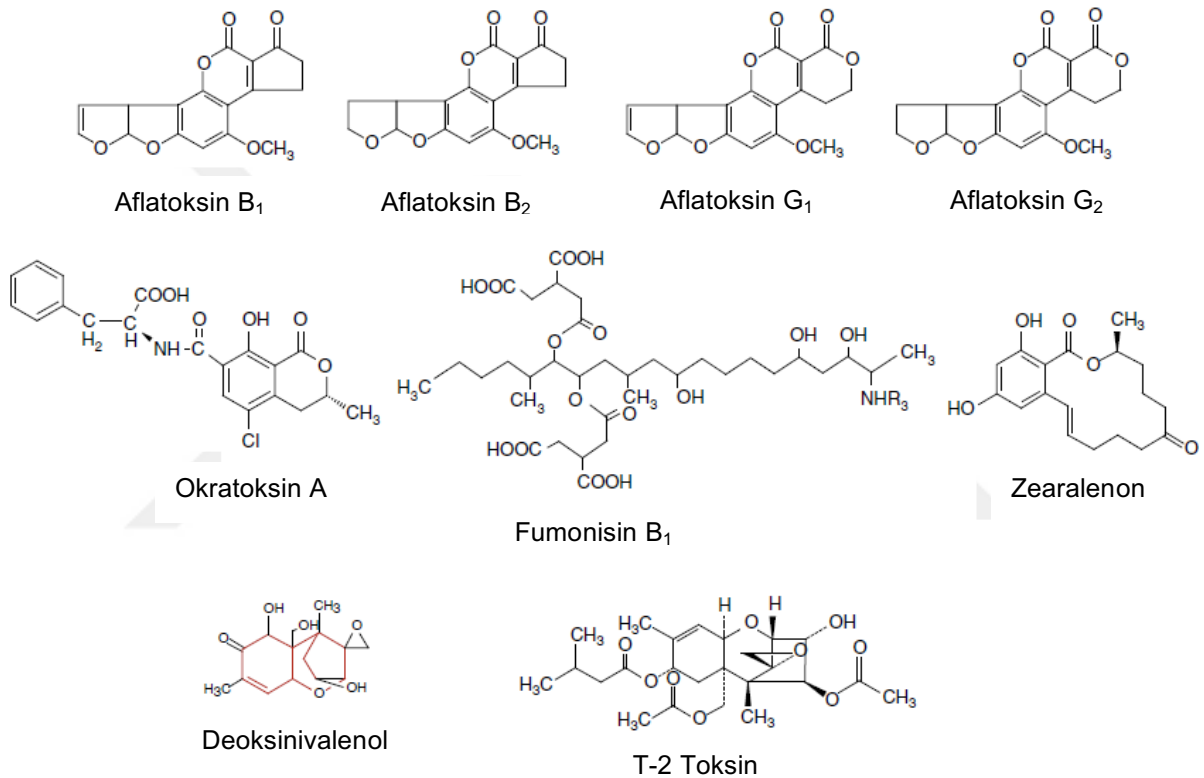
Mikotoksinler, farklı mantar türleri tarafından üretilen toksik ikincil metabolitlerdir ve aynı zamanda bu metabolitlerin mantarların gelişimi üzerinde herhangi bir rolü yoktur. Mikotoksin terimi; mantar anlamına gelen “myco” (miko) ile kimyasal toksik anlamına gelen “toxin” (toksin) kelimelerinden türetilmiştir [1, 2].

Mikotoksinler kimyasal yapıları bakımından birbirlerinden oldukça farklı moleküllerdir. Molekül ağırlığı neredeyse 50 Da olan tek heterosiklik halkadan oluşabildiği gibi toplam molekül ağırlığı 500 Da'dan fazla olan düzensiz olarak biraraya gelen 6 ile 8 halkadan da oluşabilmektedir [1, 3, 4].

Tarımsal ürünlerin ve hayvan yemlerinin mikotoksin ile kontaminasyonu dünya çapında bir sorundur. Gelişmiş ülkelerde küflü tarımsal ürünlerin insanlar tarafından tüketimi söz konusu değilken, çiftlik hayvanları tarafından tüketimi gerçekleşmektedir. Bundan dolayı, mikotoksin kontaminasyonu gelişmiş ülkelerde hayvan sağlığı açısından önemli bir problemdir. Gelişmekte olan ülkelerde ise gıda üretiminin azlığı, üretim sonrası depolama koşullarının ve dağıtımındaki kötü koşullar insanların yüksek mikotoksin seviyelerine maruz kalmasına neden olur [2, 5-7].

Mikotoksinler yıllar öncesinde var olmasına rağmen, mikotoksinleri insan ve özellikle hayvan hastalıklarındaki çoğu durumda tespit etmek zor olmuştur. Orta çağda, Orta Avrupa'da ergot alkaloidleri ile kontamine olmuş çavdar unundan yapılan ekmeği yiyen binlerce insan ergot zehirlenmesine maruz kalmış ve ergotizm (insana etkili olan en eski ve en fazla bilinen mikotoksikoz) yüzünden hayatını kaybetmiştir. Ergotizime, *Claviceps purpurea* adı verilen bir mantarın ürettiği alkaloidlerin sebep olduğunu belirlenmiştir. İnsan ve hayvan sağlığı açısından ciddi sorunlara neden olan mikotoksinler 1960'lı yılların başlarına kadar pek fazla dikkat çekmemiştir. 1969 yılında İngiltere'de meydana gelen 100.000 hindi palazının ölümü yem katkısı olarak kullanılan Brezilya yer fıstığının sebep olduğu zehirlenme sonucu gerçekleşmiştir. Zehirlenmenin nedeninin *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus flavus* adı verilen mantarların ürettiği aflatoksinler olduğu belirlenmiştir [2, 8, 9].

Yaklaşık 100.000 mantar türü tanımlanmış olmasına rağmen bunlardan 300 kadarı potansiyel toksik etkiye sahiptir ve bu önemli mikotoksinleri üreten mantarlar *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* ve *Alternaria*'dır. Bu türler tarafından üretilen önemli mikotoksinlerin en fazla bilinenleri; aflatoksinler (AF), okratoksin A (OTA), zearalenon (ZON) ve bazı trikotosenler (fumonisinler (fumonisin B1), deoksinivalon, T-2 toksin)'dir. Önemli mikotoksinlerden bazılarının kimyasal yapısı Şekil 2.1'de verilmiştir [10-13].



Şekil 2.1. Bazı önemli mikotoksinlerin kimyasal yapıları [12].

2.1.1. Önemli Mikotoksinler ve Onları Üreten Mantarlar

Dünya genelinde en sık karşılaşılan ve mikotoksinlerin oluşmasına sebep olan mantar türleri 5 farklı gruba ayrılabilir, bunlar; *Alternaria*, *Aspergillus*, *Claviceps*, *Fusarium* ve *Penicillium*'dur. Ancak insan ve hayvan sağlığı açısından daha toksik bileşiklerin oluşmasına neden olan mantar türleri ise *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium*'dur. Bu önemli mantar türleri tarafından üretilen mikotoksinler de; aflatoksinler, okratoksinler, trikotosenler, zearalenon, fumonisinler, patulindir ve ergot alkaloidleridir [11-15]. Mikotoksin üreten mantar türleri ve oluşturdukları mikotoksinlerin listesi Çizelge 2.1'de verilmiştir [12, 15].

Çizelge 2.1. Mikotoksin üreten mantar türleri ve oluşturdukları mikotoksinlerin listesi.

| Mantar | Kısaltma | Mikotoksin |
|--|-----------------|-------------------|
| <i>Aspergillus flavus</i> ; <i>Aspergillus parasiticus</i> | AF | Aflatoksin |
| <i>Alternaria tenuissima</i> | ALT | Altertoksin |
| <i>Aspergillus ochraceus</i> ; <i>Aspergillus carbonarius</i> ; <i>Penicillium verrucosum</i> ; <i>Penicillium nordicum</i> | OTA | Okratoksin A |
| <i>Penicillium expansum</i> ; <i>Bysochlamis nivea</i> ; <i>Aspergillus clavatus</i> | PAT | Patulin |
| <i>Fusarium sporotrichioides</i> ; <i>Fusarium langsethiae</i> | T-2 | T-2 Toksin |
| <i>Fusarium avenaceum</i> ; <i>Fusarium tricinctum</i> | ENN | Enniatin |
| <i>Fusarium graminearum</i> ; <i>Fusarium culmorum</i> ; <i>Fusarium cerealis</i> | DON | Deoksinivalenol |
| <i>Fusarium graminearum</i> ; <i>Fusarium culmorum</i> ; <i>Fusarium equiseti</i> | ZEN | Zearalenon |
| <i>Fusarium verticillioides</i> ; <i>Fusarium proliferatum</i> | FB | Fumonisin |
| <i>Alternaria alternata</i> | TeA | Tenuazonik asit |
| <i>Claviceps purpurea</i> ; <i>Claviceps fusiformis</i> ; <i>Claviceps africana</i> , | EA | Ergot alkaloidi |
| <i>Fusarium avenaceum</i> ; <i>Fusarium tricinctum</i> | MON | Moniliformin |

2.1.2. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler

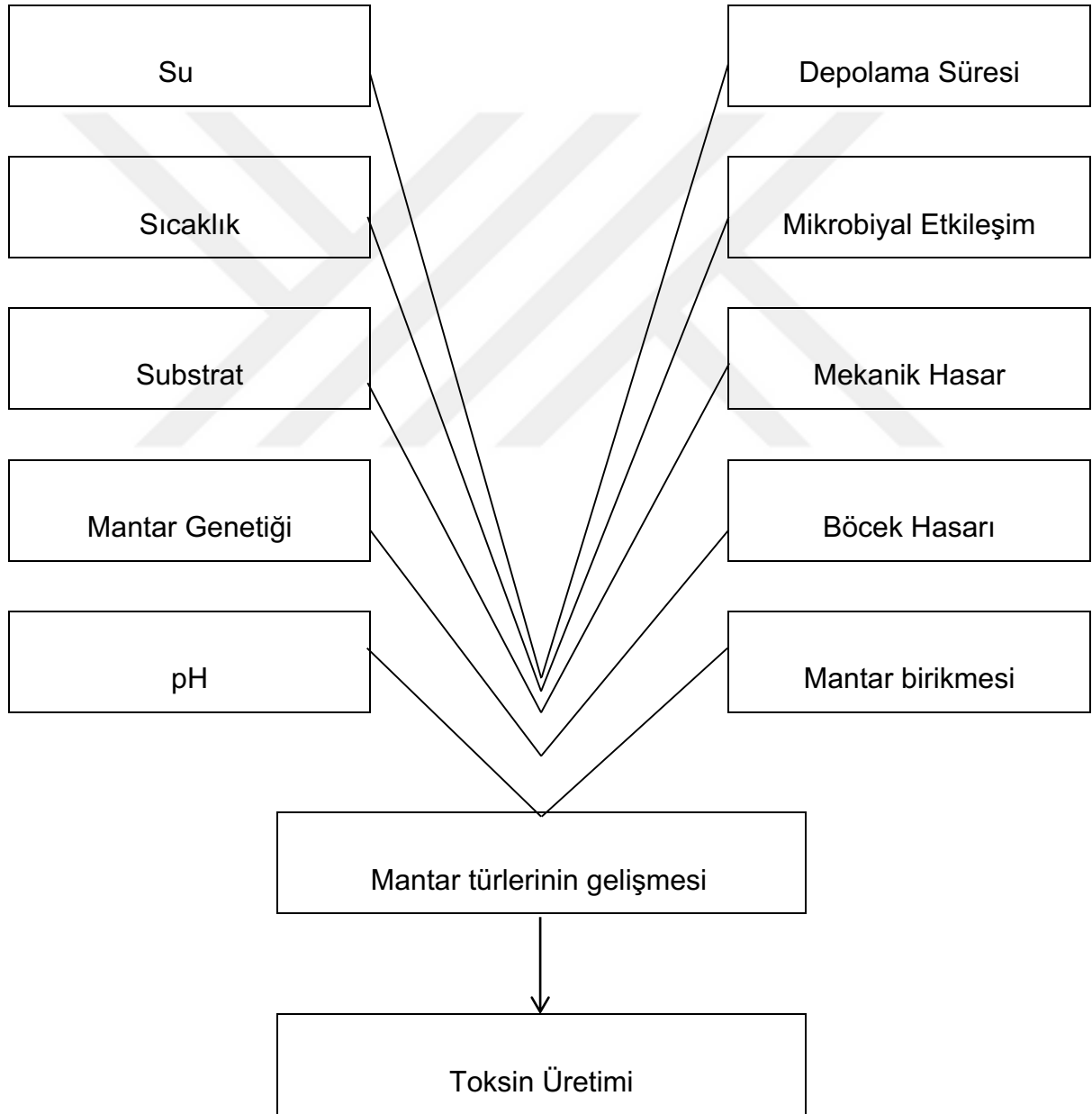
Toksijenik mantarların gelişimine ve mikotoksin oluşumuna etki eden faktörler üç ana grup altında toplanmaktadır.

a) Fiziksel Faktörler: Çevrenin sıcaklığı, nem, bağıl nem, substratın su aktivitesi, pH, atmosferdeki gazların oranı, havalandırma ve mekanik hasarlar.

b) Kimyasal Faktörler: Karbondioksit ve oksijen miktarı, substrat bileşimi, mahsülde bulunan pestisit ve fungusit türü ve miktarı.

c) Biyolojik Faktörler: Mikotoksin üretebilme kabiliyeti, mahsülde bulunan uygun mantar sporları, akarların ve böceklerin varlığı, mikotoksin oluşturan küfler ile birbiriyle rekabet eden diğer küflerin aynı ortamda bulunması, mikrobiyal detoksifikasyon [12, 14].

Şekil 2.2'de toksijenik mantarların gelişimine ve mikotoksinlerin oluşumuna etki eden faktörler özetlenmiştir.



Şekil 2.2. Toksijenik mantarların gelişimine ve mikotoksinlerin oluşumuna etki eden faktörler [12].

Günümüzde birçok tarım ürünleri ve gıda maddeleri Okratoksin A, aflatoksin, patulin, deoksinivalenol, zearalenon vb. gibi mikotoksinler ile kirlenmektedir. Çizelge 2.2’de bazı önemli mikotoksinleri, onların bulaştığı tarım ürünleri ve gıda maddeleri özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Bazı mikotoksinler ve onların bulaştığı tarım ürünlerini ve gıda maddeleri [16-18].

| Mikotoksin | Bulunabileceği Tarım Ürünleri ve Gıda Maddeleri |
|-------------------|---|
| Aflatoksin | Tahıl taneleri (buğday, mısır, arpa), baklagiller, fındık, yer fıstığı, baharat (kırmızı biber), hindistan cevizi, antepfıstığı, kuru üzüm, kahve, incir, süt ve süt ürünleri |
| Okratoksin A | Tahıl taneleri (buğday, mısır, arpa), baklagiller, fındık, yer fıstığı, kuru üzüm, kahve, kakao, meyve suyu, şarap, bira, bebe maması, özel tıbbi amaçlı diyet yiyecekleri |
| Patulin | Meyve ve meyve ürünleri (özellikle elma, elma suyu ve elma sirkesi), nektarin, fındık, yer fıstığı, tahıl taneleri, domates salçası, mantar |
| Deoksinivalenol | Tahıl taneleri, patates, kabuksuz meyve, üzüm, bebek maması |
| Zearalenon | Tahıl taneleri (buğday, mısır, arpa, yulaf), baklagiller, zeytinyağı, bebek maması |
| T-2 Toksin | Tahıl taneleri (arpa, yulaf), bebek maması |

İnsan ve hayvanların besin zincirlerine mikotoksinlerin bulaşması doğrudan ve dolaylı kirlenme ile gerçekleşir. Gıda maddelerinin ve hayvan yemlerinin mikotoksinlerle dolaylı kirlenmesi; toksijenik mantarlar ile daha önceden kirlenmiş, ham maddelerin ve katkı maddelerinin gıda üretiminde kullanılmasıyla gerçekleşir. Doğrudan kirlenme ise gıda maddelerinin ve hayvan yemlerinin toksijenik mantar ile enfekte olması ve gözle fark edilir şekilde küflenmesiyle meydana gelmektedir.

Gıda maddeleri ve hayvan yemlerinin toksijenik mantar ile kirlenmesi, onların üretimi, işlenmesi, taşınması ve ağırlıklı olarak da depolanma evresinde meydana gelir. İnsanlar tarafından mikotoksinlerin alımı, mikotoksinler bulaşmış bitkisel ürünleri veya bu besinler ile beslenmiş olan hayvanlardan üretilen gıda maddeleri aracılığı ile gerçekleşmektedir [4].

2.1.3. Mikotoksinlerin Canlılar Üzerindeki Etkileri

İnsanların ve hayvanların mikotoksine maruz kalma riski her zaman vardır ve bundan dolayı halk sağlığı alanında mikotoksin sorunu büyük bir problemdir [19]. İnsanlarda ve benzer şekilde hayvanlarda mikotoksin, dozuna bağlı olarak farklı etki göstermektedir. Canlılar yüksek dozda mikotoksin ile maruz kaldıklarında erken doğum, bağışıklık sisteminin baskılanması (immünosupresif), kanda lökosit sayısının azalması (lökopeni), doğurganlığın azalması ve ölüm ile sonuçlanan akut toksik etkiler ile karşı karşıya kalmaktadır. Düşük dozda mikotoksin alınması sonucunda ise kusma, ishal, böbrek ve karaciğer hasarları, akciğer ödemi ve tümör gibi klinik semptomlar görülmektedir. Düşük dozda mikotoksin alındığında görülen klinik semptomlar, canlılar tarafından uzun süre alındığında kanser veya geri dönüşü olmayan ciddi hasarlara neden olan akut toksik etkiler olarak sınıflandırılabilirler [10, 13, 20].

2.2. Okratoksin A

1960 yılında mikotoksin biliminin başlamasıyla, insan ve hayvan sağlığında doğal toksinlerin etkileri incelenmiş ve Okratoksin A (OTA)'nın Aflatoksinler ile birlikte hayvanlara toksik olan mantar metabolitlerinin birinci gruplarından biri olduğu tanımlanmıştır [21].

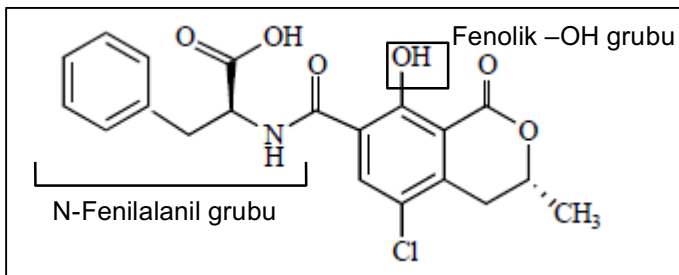
OTA, okratoksinler grubu içerisindeki en toksik olan mikotoksindir. *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsine ait mantar türleri tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir. OTA, *Aspergillus* cinsi mantarlardan *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. carbonarius* ve *A. flavus* tarafından üretilirken *Penicillium* cinsi OTA üreticisi ise *P. verrucosum*'dur [22, 23]. OTA, birçok gıda ürünleri ve alkollü içeceklerde tespit edilmiştir. OTA tahıllarda (buğday, mısır, arpa), kahvede, kakaoda, baharatlarda, bebek maması, bira, üzüm suyu ve şarapta yaygın olarak bulunan tüm dünyayı ilgilendiren bir kirleticidir. Bu ürünler arasında tahılların OTA alımının % 50-80'ini oluşturduğu kabul edilmektedir [23-27].

OTA nefrotoksik, karsinojenik, teratojenik, hepatoksik ve immünotoksik etkilere sahiptir [25-27]. İnsanlarda Balkan Endemik Nefropati (BEN)'nin etiyolojik etmenidir ve idrar yolu (mesane) dahil tümörler ile ilişkilendirilir [28]. Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından 1993 yılında insanlar için muhtemel karsinojen madde olarak 2B grubu içerisinde sınıflandırılmıştır. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından 2006 yılında insanlar için okratoksinlerin tolere edilebilir haftalık alımı 120 ng OTA/kg vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir [29, 30].

2.2.1. Okratoksin A'nın Kimyasal Yapısı

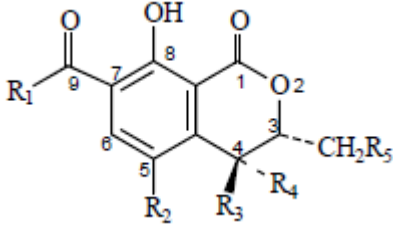
Kapalı formülü $C_{20}H_{18}O_6NCl$ ve molekül ağırlığı 403.82 g/mol'dür. IUPAC tarafından Okratoksin A molekülünün açık formülü ise L-fenilalanin-N-[(5-kloro-3,4-dihidro-8-hidroksi-3-methyl-1-oxo-1H-2-benzopirran-7)-karbonil]-(R)-izokumarin olarak açıklanmıştır [21, 23]. CAS numarası 303-47-9'dur. OTA, 7-karboksi-5-kloro-8-hidroksi-3,4dihidro-3R-metilizokumarin (okratoksin α ; $OT\alpha$)'in 7-karboksil grubuna L- β -fenilalanilin peptid bağıyla bağlanmasıyla oluşmuştur [31]. Şekil 2.3 ve Çizelge 2.3, Okratoksin A ve ilgili metabolitleri hakkında ayrıntıları içermektedir.

OTA, beyaz renkte, kristalize bir bileşiktir. Polar organik çözücülerde yüksek oranda çözünen; sudaki çözünürlüğü az olan ancak sulu hidrojen karbonatta çözünebilen bileşiktir. Isıya karşı oldukça dirençlidir. Kaynama noktası benzende $90^\circ C$ iken ksilende $171^\circ C$ 'dir [21, 23]. OTA zayıf asidik özellik göstermektedir. Fenilalanin kısmının karboksil grubu ve izokumarin kısmının fenolik hidroksil grubu için OTA'nın pKa değerleri sırasıyla 4.2-4.4 ve 7.0-7.3'dür [32]. Ultraviyole altında asit solüsyonunda yeşil, alkalik solüsyonunda mavi floresan ışımaya verir. OTA, asitlere karşı dayanıklı ve ortam sıcaklığına karşı da oldukça kararlıdır [33].



Şekil 2.3. Okratoksin A'nın kimyasal yapısı [25].

Çizelge 2.3. Okratoksin A'nın kimyasal yapısı ve ilgili metabolitleri [25].

|  | | | | | |
|--|-------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Bileşik | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ |
| Okratoksin A (OTA) | Fenilalanil | Cl | H | H | H |
| Okratoksin B (OTB) | Fenilalanil | H | H | H | H |
| Okratoksin C (OTC) | Fenilalanil etil ester | Cl | H | H | H |
| Okratoksin α (OT α) | OH | Cl | H | H | H |
| Okratoksin β (OT β) | OH | H | H | H | H |
| 4-(R)-hidroksiokratoksin A | Fenilalanil | Cl | H | OH | H |
| 4-(S)-hidroksiokratoksin A | Fenilalanil | Cl | OH | H | H |
| 10- hidroksiokratoksin A | Fenilalanil | Cl | H | H | OH |
| 4-(R)-hidroksiokratoksin B | Fenilalanil | Cl | H | OH | H |
| OTHQ | Fenilalanil | OH | H | H | H |
| Okratoksin A metil ester | Fenilalanil metil ester | Cl | H | H | H |
| Okratoksin B metil ester | Fenilalanil metil ester | H | H | H | H |

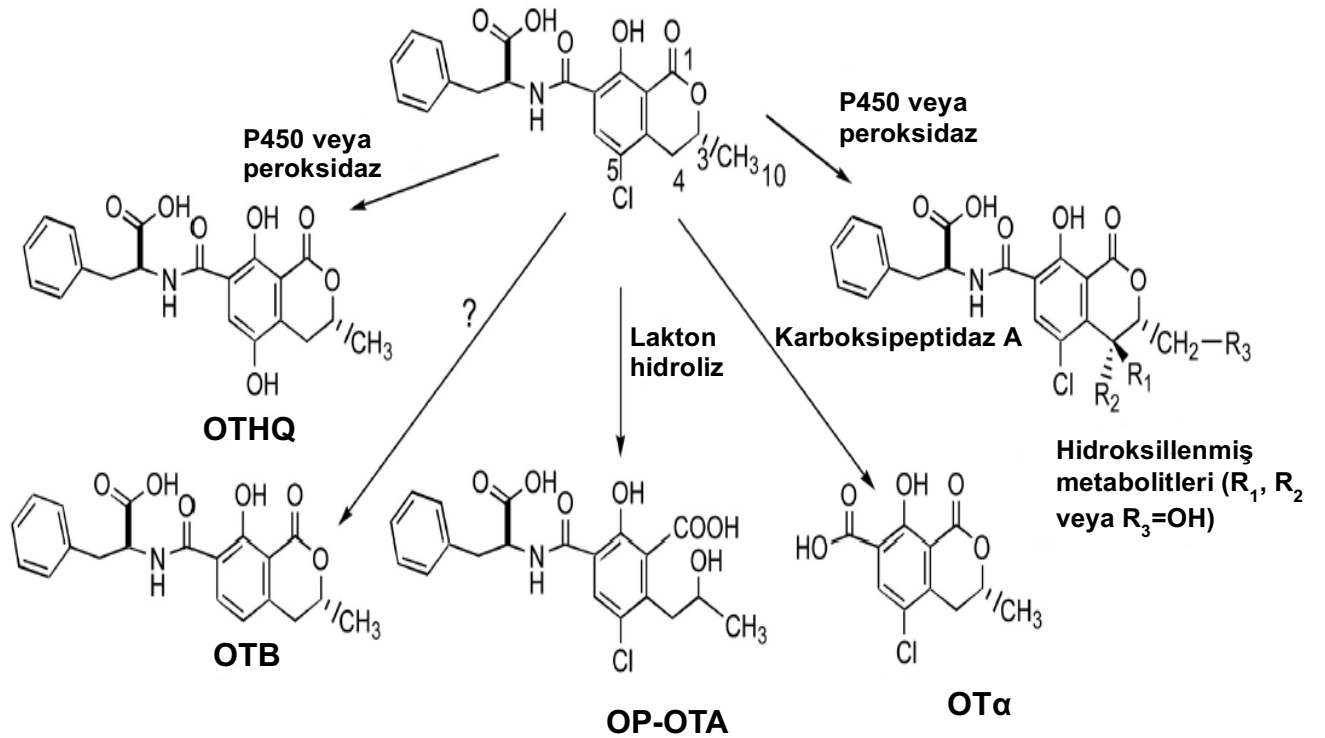
2.2.2. OTA'nın İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri

Okratoksin A, insanlarda Balkan Endemik Nefropati (BEN; kronik böbrek hastalığı) hastalığına yol açmakta ve ayrıca böbrek tümörlerinin oluşmasına neden olmaktadır [34, 35]. OTA, hızlı emilim gösteren ve yavaş yavaş yok olan kümülatif bir zehir gibi davranır. İnsanlarda, OTA 30 günden fazla bir yarı ömür ile çok yavaş bir şekilde metabolize edilir. Plazma proteinlerine neredeyse tamamen bağlanır, böbrek ve karaciğer dokusunda birikir [36, 37]. OTA, ilerleyen renal fibroz ve proksimal tubül epitelyumun dejenerasyonu gibi renal lezyonlar ve mesane, renal pelvis kanseri ve idrar yolu tümörleri ile karakterize edilir [38, 39]. OTA'nın genotoksik karsinojen olduğu, oksidatif DNA lezyonlarının başlamasına yol açması

nedeniyle kanıtlanmıştır [40, 41]. Ayrıca, OTA organlar ve dokular üzerine, protein sentez inhibisyonu, oksidatif stres, transkripsiyon faktörlerinin modülasyonu, spesifik hücre sinyal yollarının bozukluğu (kalsiyum homeostazı) gibi farklı etkileşim mekanizmalarına etkileri vardır [41, 42].

2.2.3. OTA'nın metabolitleri

Hidroliz, hidroksilasyon, lakton hidroliz ve konjugasyon önemli metabolik yollardır. OTA'nın ana metabolitleri NADPH varlığında hidroksile edilmiş türevleri olan 4(R)-, 4(S)-, 10-hidroksiokratoksin A (10-OHOTA) ve karbosipeptidaz A tarafından peptid bağının kopmasıyla oluşan Okratoksin α (OT α)'dır. OT α toksik olmayan bir metabolittir. OTA'nın lakton hidroliz ürünü olan OP-OTA ise oldukça toksiktir. OTA'nın C-5 üzerinde bulunan Cl atomunun sitokrom P450 aracılığı ile kaybolması ile Okratoksin B (OTB) oluşur. OTB, OTA'dan daha az toksiktir. OTA'nın tüm metabolitlerinin kendisinden daha az toksik olduğu düşünülmektedir. Şekil 2.4'de OTA'nın metabolitleri özetlenmiştir [24, 25, 31, 40, 43, 44].



Şekil 2.4. OTA'nın metabolitleri [40].

2.2.4. OTA'nın Gıda Maddelerindeki Güncel Limitleri

Okratoksin A, hayvan ve insan sağlığını ciddi derece tehdit eden önemli bir mikotoksindir. Sağlık problemlerinin yanı sıra gıda maddelerinin üretimi, işlenmesi, taşınması ve ağırlıklı olarak da depolanma evresinde kirlenmesinin engellenememesine, OTA ile kontamine edilmiş bitkisel ürünleri veya bu besinler ile beslenmiş olan besi hayvanlarından üretilen gıda maddelerinin tüketiminin engellenememesine ve besi hayvanlarının ölümlerine neden olmaktadır. Bu bağlamda da OTA'nın gıdalardaki varlığı, öncelikle sağlık olmak üzere ekonomik anlamda da hem ülke içi hem de ülkeler arası piyasayı olumsuz etkilemektedir. Olumsuz etkileri en az düzeye indirmek için bütün gıda maddeleri üretim aşamalarında ve son tüketiciye ulaşmadan önce gıda maddelerindeki OTA içeriğinin belirlenmesi için analiz edilmelidir. Bugün dünyada hemen hemen bütün ülkeler, ihraç ettikleri ürünlerin geri dönüşünü azaltmak ve iç pazara gönderilen ürünlerin ülke sağlığını olumsuz etkilememesi için gıdalarda bulunabilecek OTA düzeyleri için sınır değerler belirlemektedirler. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından belirlenen ve Resmi Gazete'nin 29 Aralık 2011 tarihli (28157 3. mükerrer) sayısı ile yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği Türkiye için gıdalarda bulunabilecek OTA üst sınır değerlerini belirlemektedir. Çizelge 2.4'de, ilgili yönetmelikte belirlenmiş olan değerler verilmektedir.

Çizelge 2.4. Gıdalarda izin verilen okratoksin A üst sınır değerleri (Türkiye) [45].

| GIDA MADDESİ | Üst Sınır (µg/kg) | | |
|---|-------------------|-------|----|
| | Okratoksin A | | |
| İşlenmemiş tahıllar | 5 | | |
| İşlenmemiş tahıllardan elde edilen tüm ürünler ¹ | 3 | | |
| Kurutulmuş asma meyveleri (kuş üzümü, kuru üzüm ve çekirdeksiz üzüm) | 10 | | |
| Kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahve | 5 | | |
| Kahve özütü, çözünebilir kahve özütü veya çözünebilir kahve | 10 | | |
| Şarap ve meyve şarapları (Köpüklü şarap/şampanya dahil, likör şarapları ve hacmen alkol miktarı en az %15 olan şaraplar hariç) | 2 | | |
| Aromatize şarap, aromatize şarap bazlı içki ve aromatize şarap kokteyli | 2 | | |
| Üzüm suyu, konsantreden üretilen üzüm suyu, üzüm nektarı, üzüm şırası ve konsantreden üretilen üzüm şırası | 2 | | |
| Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları | 0,5 | | |
| Bebek için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar | 0,5 | | |
| Kırmızıbiber Karabiber Hintceviz Zencefil Zerdeçal | 01.07.2012 | önce | 30 |
| | | sonra | 15 |
| Meyan kökü | 20 | | |
| Meyan kökü özütü ² | 80 | | |

¹: Doğrudan insan tüketimine sunulan tahıllar ve işlenmiş tahıl ürünleri dahil.

²: Maksimum limit; 3-4 kg meyan kökünden üretilen 1 kg saf ve seyreltilmemiş özütlere uygulanır.

2.2.5. OTA Analiz Yöntemleri

Gıda maddelerinde üreyebilen, bu yolla günlük yaşantıda çok sık temasın söz konusu olabildiği OTA analizi, özütlenme, yıkama, ön deriştirme, ayırma ve bu özütlerin uygun bir teknik ile analizini içermektedir. OTA'nın özütlenmesi için sıvı-sıvı özütleme (LLE-liquid-liquid extraction) veya katı faz özütleme yöntemi (SPE-Solid Phase Extraction) kullanılabilir. OTA özütünün SPE tekniğine uygulanmadan önce homojen hale getirilmesi ve sıvı-sıvı özütleme işlemine tabi tutulması gerekir. Katı faz özütleme yöntemi çoğunlukla C18, florisil, fenil gibi farklı grupları içeren kolon kromatografisinden oluşabileceği gibi immünoafinite kromatografisi (IAC) yöntemi ile de olmaktadır [46-49]. İmmünoafinite kromatografisi, OTA'ya özgü antikorların katı destek malzemesine kovalent olarak bağlanmasıyla yüksek hassasiyet, seçicilik, doğruluk ve uygulamada kolaylık sağlamaktadır. İmmünoafinite kromatografisi, uygulamadaki avantajları sayesinde temiz OTA özütlerinin elde edilmesini sağlamaktadır [50].

OTA'nın özütlenmesi aşamasından sonra enzim bağlı immün test (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay-ELISA), ince tabaka kromatografisi (Thin Layer Chromatography-TLC), kapiler elektroforez (Capillary Electrophoresis-CE), floresan dedektörlü yüksek performans sıvı kromatografisi (FD-HPLC), kütle spektroskopisi (MS) ve biyosensör teknolojilerinden de faydalanılmaktadır [51-54]. ELISA yöntemi düşük derişimlerde beklenen analit-antikor özgün etkileşimleri yerine yan etkileşimlerin artması nedeniyle kabul edilebilir hassasiyette güvenilirliğini yitirmektedir. TLC yöntemi gıdalarda OTA analizinde kesinlik ve doğruluk açısından yeterli değildir. Biyosensör teknoloji ise OTA'nın hızlı bir şekilde gıdalarda belirlenmesini sağlar; ancak ekipmanların pahalı ve yeni olması biyosensörlerin yaygın olarak kullanılmamasına neden olmaktadır. LC-MS, yine düşük derişimlerde iyon şiddetlerinin düşmesi ve artan girişim nedeni ile güvenilir sonuçlar vermemektedir. Okratoksin A belirlemede yaygın olarak, ilk önce immünoafinite kolon (IAK) kullanılmakta ve OTA'nın özütlenmesi gerçekleştirildikten sonrada floresan dedektörlü yüksek performans sıvı kromatografisi (FD-HPLC) sistemi kullanılmaktadır. HPLC sisteminde floresan dedektör kullanıldığında düşük ölçüm limiti (LOQ)'ne sahip yüksek hassasiyette doğru analizler yapılmaktadır [50, 55, 56]. İmmünoafinite kolonlarının kısa raf ömürleri ve tek kullanımlık olmaları bu yöntemin en önemli dezavantajlarıdır [57].

Kromatografik ayırmanın veriminin artırılması için ise; iki-boyutlu kromatografik ayırma yeni bir alternatif olarak değerlendirilmektedir. İki-boyutlu HPLC uygulamaları, özellikle gıda kontrol ve tarama programlarında toksik metabolitlerin kantitatif analizleri için performansı önemli düzeyde arttırdığı literatürde belirtilmektedir.

2.3. Monolitler

Monolitler partikül şeklindeki destek malzemelerinin yerine tek bir parçadan oluşan oldukça gözenekli destek malzemeleridir. Monolitik kolonda çok sayıda birbiriyle bağlantılı gözenekler ve kanallar bulunmaktadır. Hareketli faz, iletim yolu ile bu kanallar arasından taşınır. Bunun sonucunda da difüzyon sınırlamasının üstesinden gelinerek, hareketli faz ile sabit faz arasındaki kütle transferi çok hızlı gerçekleşmektedir. Bundan dolayı monolitler, DNA ve protein gibi oldukça büyük biyomoleküllerin çok kısa sürede ayrılmasını sağlamaktadır [58]. Monolitler, kimyasal ve hazırlanma bakımından birbirinden farklı biçimlerde hazırlanabilirler. Sentetik (polimetakrilat, poliakrilamid, polistren) ve doğal polimerlerden (agaroz ve selüloz) ve aynı zamanda inorganik (silika) malzemelerden üretilmektedirler [59]. Hazırlanma bakımından ise monolitler disk, çubuk veya tüp şeklinde üretilmektedir [60, 61].

2.3.1. Monolitik Malzemelerin Tarihsel Geçmişi

HPLC için günümüzde piyasada bulunan makro-gözenekli, katı formdaki polimerik monolitik sabit fazlar ilk olarak 1992'de Svec ve Frechet tarafından literatüre tanıtılmıştır [62]. HPLC için silika temelli monolitler ise daha sonra Tanaka ve arkadaşları tarafından bulunmuştur [63-67]. Bu gibi malzemelerin ayırma biliminde uygulamasına ilişkin teorik temellerin yarım yüzyılı aşkın süredir tartışıldığının hatırlanması oldukça önemlidir; çünkü gözenekli jel yapıların kromatografik uygulamalar için önemi ilk olarak 1950'li yılların başında kaydedilmiştir [68]. Nobel Ödüllü Robert Synge, 1950'lerde monolitlere benzeyen ilk yapıları önermiştir. Fakat o zamanlarda üretilen yumuşak malzemelerin hidrostatik basınç altında çöktüğünü fark etmiştir [69]. Ancak, sıvı kromatografisi için sürekli makrogözenekli fazların sentezinde başlangıç noktası 1960'lı yıllara kadar dayanmaktadır. Kubin ve arkadaşları boyut dışlama kromatografisi için metakrilat temelli hidrojel üretmişlerdir [70]. 1970'lerde polimerik süngerlerin uygulamaları [71, 72], 1980'lerde sıkıştırılmış yataklar ve 1990'da sert makro-gözenekli organik polimerler ve silika çubuklar ortaya çıkmıştır [62-67, 73]. Son zamanlarda, organik-

inorganik hibrid monolitik malzemeler olarak adlandırılan yapılar rapor edilmiş ve bunlar sıklıkla silika monolitik bir destek üzerine polimerik fonksiyonel yüzeyler ile birleştirilmiştir [74-77]. Bu uzun süren gelişim sürecinde, polimerik diskler ve açık tüpler gibi alternatif monolitik formatlar (çubuklar dışında) ortaya çıkmıştır [78, 79].

Monolitik malzemeler ayırma bilimi ve biyoanalitik uygulamalar için son 20 yılda detaylı bir şekilde gözden geçirilmiştir [80-82]. Svec, 1996 yılında monolitik fazların oluşum süreçleri konusundaki ilk araştırmalardan birini yapmıştır [83]. Daha sonra 1999 yılında Peters ve arkadaşları, polimerik monolitik çubuk kolonların uygulamaları, akış özellikleri ve oluşumu üzerine çalışmalar yaparak, monolitik yapıların gelişmelerini rapor etmişlerdir [84]. Aynı yıl Svec ve Frechet, çeşitli faktörlerin (porojenik çözücü derişimi gibi) monolitlerin morfolojisi ve gözenekliliğine etkisini detaylı bir şekilde anlatan çalışmalarını yayınlamışlardır [85].

Monolitik kolonların yüzey kimyalarının çeşitliliği nedeniyle birçok uygulama mevcuttur. Afinite kromatografisinin monolitik kolonlara uygun bir teknik olduğunu Mallik ve arkadaşları 2006 yılında rapor etmişlerdir [86].

Silika monolitik kolonların polimerik monolitik kolonlara göre yüzey alanlarının arttığı görülmüştür [87-89]. Sonuç olarak, silika monolitik kolonlar küçük moleküllerin ayırımında (örneğin, iyon kromatografisi) daha başarılı sonuçlar vermiştir.

Svec, proteomik ve peptid haritalama [90], mikro-SPE (SPE) ve ön deriştirme [91], GC [92] ve son olarak immobilize enzimlerin yer aldığı mikro-reaktörlerin [93] geliştirilmesinde monolitik kolonların kullanılmasını içeren, monolitik kolonların olağanüstü uygulamalarını rapor etmiştir.

Kolon şeklindeki monolitik malzemelerden yola çıkarak, polipropilen uçlarda monolitik malzemelerin kullanılmasını gerektiren özütleme tekniklerini Blomberg 2009 yılında rapor etmiştir [94]. Monolitik malzemeler disk formatında da kullanılabilir. Tennikova ve arkadaşları, membrandan monolitik disk kromatografisine geçişi, diğer dolgulu kolonlarla (örn., gözeneksiz küreler) karşılaştırarak rapor etmişlerdir [95]. Monolitik kolonların diğer bir popüler formatı mikro-akışkan çip sistemidir. Bu formattaki ayırma ortamları membranlardan monolitik malzemelere kadar ayrıntılı olarak 2005 yılında Peterson tarafından açıklanmıştır [96].

Günümüzde monolitler sentetik, doğal polimerler ve aynı zamanda inorganik malzemelerden üretilmektedir. Organik polimer esaslı monolitler protein ve polinükleotit gibi büyük moleküllerin ve aynı zamanda virüs gibi büyük partiküllerin ayrımını sağlamaktadır. Agaroz temelli monolitlerde aynı amaçlar için kullanılsa da, onların kimyasal ve mekaniksel özellikleri HPLC uygulamalarına daha az uygundur [59].

2.3.2. Yeni Nesil Kolon Dolgu Malzemesi Olarak Monolitler

Monolitler, 1990'lı yılların başlarında biyomoleküllerin hızlı ayrımı için yeni kolon teknolojisi olarak tanıtılmıştır. Bu malzemelerin en önemli özelliği, düzgün akış kanallarına, büyük gözeneklere sahip olması ve bu sayede de düşük geri basınçta yüksek akış hızlarının kullanımına izin vermesidir [61, 97, 98]. Tek parçalı gözenekli malzemeler olan monolitler ölü hacim içermemektedir. Monolitler ile partiküller arası hacim ve yavaş kütle aktarımı problemleri ortadan kalkmaktadır. Geleneksel dolgulu kolonlarda kütle aktarımı difüzyon ile sağlandığı için gözeneklerden kısmen yararlanır ve kütle aktarımında sınırlı gerçekleşmektedir. Monolitlerde ise kütle aktarımı taşınımı gerçekleştiği için toplam gözenek hacminden yararlanılmaktadır [59, 99].

Monolitler kolay hazırlanabilirlikleri, mükemmel akış özellikleri, daha düşük kütle aktarım direnci ve basınç düşmesi gibi hidrodinamik özellikleriyle biyomoleküllerin ayrımında tercih edilmektedirler [100].

2.3.3. Monolitlerin Gözenek Yapısı ve Gözenek Özelliklerinin Kontrolü

Kromatografide gözenekli malzemelerin kullanımı yüzey ile içice bir temasa dayanmaktadır. Büyük yüzey alanı sağlamak için çok sayıda küçük gözenek polimerin içine dahil edilmesi gerekmektedir. Toplam yüzey alanına en önemli katkısı olan gözenekler 2 nm'den küçük gözenek boyutları ile mikrogözenekler ve 2 ile 50 nm arasında değişen boyutlara sahip olan mezogözeneklerdir. 50 nm'den büyük boyutlardaki makrogözenekler ise toplam yüzey alanına önemsiz bir katkı sağlamaktadır [87, 101]. Yüzey alanını oluşturmada önem teşkil etmeyen makrogözenekler monolitlerin esas gözenek yapısını oluşturmaktadır. Makrogözenekler hareketli fazın uygun bir basınçta akışını ve sabit faz ile çözelti arasında etkili bir etkileşim sağlar [87, 100]. Hareketli faz büyük gözenekli makrogözeneklerden akmakta bundan dolayı da iletim ile kütle aktarımı

gerçekleşmektedir. Geleneksel dolgulu kolonlarda ise kütle aktarımı difüzyonla sağlanmaktadır. Monolitlerdeki makrogözenekler sayesinde kütle aktarımı hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir. Sonuç olarak monolitlerde analitler difüzyonla değil akışın sebep olduğu aktarımla taşınır [102]. Monolitlerin gözenek yapısı sıcaklık, gözenek yapıcı çözücü karışımının bileşimine, çapraz bağlayıcı monomerinin içeriğine bağlıdır [60, 87, 103].

2.3.4. Monolitlerin Avantajları

Gözenekli polimerik monolitler son yirmi yılda birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Geleneksel dolgulu kolonlar ile kıyaslandığında monolitler;

- ✓ İletime dayalı taşınım,
- ✓ Oldukça gözenekli yapısı,
- ✓ Mükemmel akış özellikleri,
- ✓ Düşük kütle aktarım direnci ve basınç düşmesi,
- ✓ Kolay hazırlanabilme,
- ✓ Kolon doldurmasının kolay olması,

gibi avantajlarından dolayı biyomoleküllerin saflaştırılmalarında yeni nesil kolon dolgu malzemesi olarak kullanılmaktadır [58, 100].

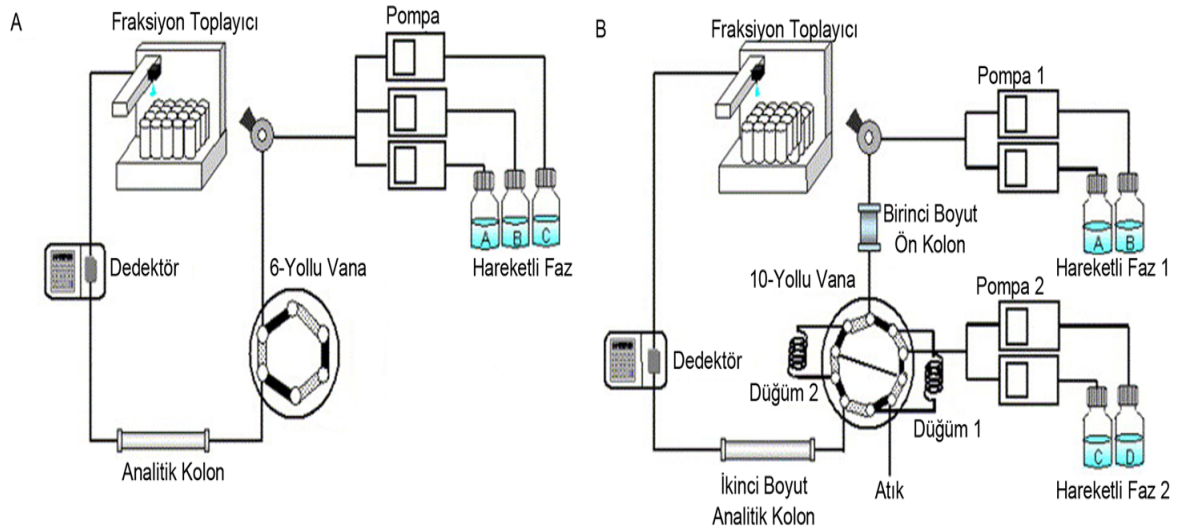
2.4. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC)

Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) çözümler molekülünün analizi için en önemli tekniklerden birisidir. Farklı ayırma temellerinden dolayı, aynı cihaz ile yüksek seçicilikte ve hassasiyette, diğer ayırma tekniklerinin ulaşamayacağı birçok analitik problemin üstesinden gelebilir. Ancak, HPLC'deki çözünürlük ve pik kapasitesi, tabaka sayısından yoksundur; bu da çok bileşenli karışımlarda yetersiz ayırma gücüne yol açmaktadır.

Pik kapasitesi (PC), ayırma kabiliyetini gösterir, kromatografik sistemde birbirini takip eden iki pik arasında kaç tane çözücünün ayrılabilceğinin göstergesidir. Ultrayüksek-basınçlı sıvı kromatografisinde (UHPLC) ve süper kritik akış kromatografisinde (SFC) PC değeri 1 saatte 300 iken, geleneksel HPLC sistemlerde PC değeri 1 saatte 100-200 değerindedir. Daha geniş PC elde etmek için çok-boyutlu ayırma sistemleri geleneksel HPLC sistemlerinde dahil edilmelidir [104, 105].

2.4.1. İki-boyutlu Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (2D-HPLC)

İki-boyutlu yüksek performans sıvı kromatografisi (2D-HPLC), örnek analizinde iki bağımsız sıvı faz ayırma sisteminin uygulandığı tekniktir. 2D-HPLC hem sadece ilk boyutta ilgilenilen maddeyi valfin dönmesiyle daha iyi ayrılması için ikinci boyuta transfer eder, hem de ilk boyuttaki atıkların tamamını birçok küçük parçalar halinde sırasıyla ikinci boyuta transferini gerçekleştirir, bundan dolayı kapsamlı 2D kromatografi olarak bilinir (Şekil 2.5). Farklı ayırma mekanizmalarına sahip iki kolonu birleştirir. Analitik açıdan, ikinci kolonun son derece verimli olduğu düşünülür ve ilk kolonun ayırımı için kimyasal olarak seçici detektör ile ilişkilendirilir.



Şekil 2.5. (A) Tek-boyutlu ve (B) İki-boyutlu HPLC sistemlerine ait çizimler [106].

Çok-boyutlu sıvı kromatografisinin teorik ve uygulamalı gelişim tarihini ilk olarak Schure incelemiştir. “Çevrimiçi” kapsamlı 2D-HPLC ilk olarak Erni ve Frei tarafından çalışılmıştır. 1990 yılında Jorgenson ve Bushey kapsamlı 2D-HPLC tekniğini protein ayırımında kullanmış ve ayırma 6 saat sürmüştür. Bu yüzyılın başlarında çok çeşitli 2D sıvı faz ayırma metodu proteomik araştırmalara dayanak oluşturmuştur. 2006 yılında Stoll ve arkadaşları 30 dakikada protein ayırımını gerçekleştirmiştir. Yüksek ayırma gücünden dolayı, son yıllarda 2D-HPLC, özellikle kompleks karışımlar ile çalışan kişiler tarafından fazlaca ilgi görmüştür [107, 108].

2.4.1.1. 2D-HPLC İçin nemli Performans Parametreleri

Uygun n işlem yaklaşımının seçimi, gerçek örneklerden bileşiklerin başarılı bir şekilde ayrılmasında önemli rol oynar. nk n işlem; zaman alıcı, yoğun iş gücü gerektiren, kirliliğe yol açan, daha fazla organik üzücü gerektiren, sonuç olarak analitik hataları artıran bir işlemdir. Geleneksel olarak, gerçek örneklerde bulunan eser miktardaki bileşikler, sıvı kromatografisinde özütleme işlemleri ile belirlenmiştir. Bu nedenle, özütleme, n deriştirme ve temizleme, "evrimdişi" olarak adlandırılan bir dizi işlemden uygulanan ön işlem yaklaşımları olarak bilinmektedir. 2D kromatografik ayırma, bu sorunları ortadan kaldırmak için yeni bir alternatif teknik olarak ortaya çıkmıştır. 2D-HPLC tekniği, "evrimii" olarak adlandırılan bir adımda tüm bu basamakları sağlamak için giderek popüler bir teknik haline gelmiştir. Çevrimiçi mod, evrimdişi moda kıyasla, özel ekipman ve teknik beceri gerektirir. Elüe edilen kısmın birinci boyuttan ikinci boyuta transfer edilmesi valf, numune döngüsü ve katı faz ara yüzü gibi özel bir ekipman ile gerçekleştirilir [109]. Yüksek saflaştırma potansiyeli, tekrarlanabilirlik, kararlılık, yüksek verimlilik ve işlem kolaylığı gibi eşişsiz zellikler, 2D-HPLC'yi umut verici bir teknik yapmaktadır. Bu tekniğin en önemli avantajlarından birinin ön işlem süreçlerinde kişişel hatalarının önlenmesi olduğuna dikkat edilmelidir. 2D-HPLC'nin en etkileyici özelliği, istenilen maddenin n deriştirme ve ztlemesini sağlayan analitik kolon ve katı faz ztleme (SPE) kolonlarının kombinasyonu ile oluşturulmasıdır ve ilgili bileşiklerin belirlenmesi için alternatif evrimii yöntem sağlamaktadır. Bu yöntem preparatif ve analitik kolonların otomasyonunu içerir, önce gerçek numunelerden analitlerin ön işlem süresini azaltarak ön işlem adımları arasındaki örnek manipülasyonunu önler, böylece numune kaybını ve yabancı madde bulaşma riskini azaltırken, doğruluk ve tekrarlanabilirliği arttırmaktadır [110]. 2D-HPLC, yüksek znrlk, kolon seçiciliği, diklik ve pik kapasitesi gibi benzersiz özelliklerinden dolayı karmaşık karışımların ayırımı için çok dikkat çekmiştir [111-119].

2.4.1.1.1. Pik Kapasitesi

2D-HPLC, numune karışımına eşişzamanlı olarak etki eden çeşitli ayırma mekanizması nedeniyle geleneksel ayırma tekniklerinden daha üstündür; bu da önemli lde pik kapasitesinin artmasını sağlar [120]. Pik kapasitesi (PC) farklı zeltilere ait kromatografik pikleri, bitişik pikler arasında başarı ile ayırabilen

kromatografik ayırımların potansiyel bir yeteneğidir. PC değerleri, geleneksel HPLC için 1 saatte 100-200 olarak bulunabilir, bu da çok bileşenli karışımlar için yetersiz ayırma gücünü gösterir. Bu sıkıntının, ikinci boyutun ortaya çıkması ile üstesinden gelinebilir [105]. 2D-HPLC, çok-boyutlu ayırma sistemlerinin pik kapasitesini artıran iki kromatografik sistemin kombinasyonu sayesinde 1 saatte PC değerini 500 üzerinde verir [104]. Pik kapasitesinin yüksek olması çok-boyutlu ayırım için oldukça önemlidir. PC, alıkonma alanına yapabilecek maksimum pik sayısıdır [121].

Pik kapasitesi, belirli bir zaman aralığında (t_i ile t_s) sabit ayırıcılık (çözünürlük, R) ile elüe edilen piklerin miktarı olarak tanımlanabilir [122]. Ayrıca, pik genişlik birimlerinde ölçülen alıkonma süresi olarak da tanımlanabilir [123].

Bir kavram olarak, pik kapasitesi (N_c) ilk olarak Giddings tarafından tanımlanmıştır ve izokratik uygulamalarla sınırlı olduğu için ayırma kalitesinin teorik plaka sayısından (veya verimlilikten) çok daha önemli olduğunu ileri sürmektedir [124].

Giddings'in denklemi şu şekilde ifade edilebilir (R = 1 olduğu varsayılır).

$$n_c = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \left(\frac{t_s}{t_i} \right) \quad (2.1) [108]$$

Burada N ; teorik plaka sayısını, t_i ve t_s sırasıyla ilk ve son elüe edilen bileşiklerin alıkonma zamanını ifade etmektedir.

Yukarıdaki açıklamalardan anlaşılacağı üzere, pik kapasitesi tanımı, ayırmanın izokratik mi gradiyent mi olduğuna yani ayırma türüne bağlıdır. Horvath ve Lipsky, Giddings'in sıcaklığa göre programlanmış elüsyon (Gaz Kromatografi-GC) ve çözücü gradiyent elüsyonuna (Sıvı Kromatografi-LC) ilişkin tanımını genişletmiş ve pik kapasitesi için ifadeleri, tüm pik genişliklerinin aynı olduğu ve R = 1 olduğu varsayımına dayanmaktadır.

$$n_c = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \times \left[\left(\frac{t_s}{t_i} \right) - 1 \right] \quad (2.2) [108]$$

Burada N ; teorik plaka sayısını, t_i ve t_s sırasıyla ilk ve son elüe edilen bileşiklerin alıkonma zamanını ifade etmektedir.

Eşitlik 2.1, logaritmik bir bağımlılığa sahiptir, çünkü izokratik türde devam eden bu ayırma, tabi ki gradiyent koşullarla elde edilen pik kapasitelerinden önemli ölçüde

daha düşük olan pik kapasitesine sahiptir, analiz zamanı her iki koşul için de aynıdır.

Bu nedenle, çözücü gradiyent elüsyon programları genellikle yüksek pik kapasitelerine ihtiyaç duyulduğunda uygulanır.

Genel olarak, n_c tüm kromatogram süresi boyunca tutunan ve tutunmayan pikler için kullanılan bir ifadedir. Örnek pik kapasitesi, n_c^{**} ; ilgili birinci pikin alıkonma zamanından (t_i) ilgili son pikin alıkonma zamanı (t_s) arasındaki fark olarak tanımlanır [122, 125]:

$$n_c^{**} = \frac{(t_s - t_i)}{\bar{w}} \quad (2.3)$$

Kolaylıkla görülebilir ki, 1D-LC için pek çok yaklaşım vardır, bu durum 2D-LC için de yaygındır.

Pik kapasitesi, n_{2D} , birinci boyutun pik kapasitesiyle ikinci boyutun pik kapasitesinin çarpımı ile hesaplanabilir [112].

$$n_{2D} = n_{1D} \times n_{2D} \quad (2.4)$$

2.4.1.1.2. Ortogonalite

Ortogonalite, bağımsız ve aynı anda çalışan iki etkin ayırma mekanizmasını tanımlamaktadır [126]. Bu tanımlamayı LC-LC'ye uygularsak, ortogonalite farklı seçicilik sağlayan iki ayırma mekanizmasıdır [124, 126].

Eşitlik 2.4'de belirtildiği gibi, 2D-LC, kromatografik performans parametreleri ile çok güçlüdür, ancak bu potansiyeli gerçekleştirmek için, iki ayırma boyutunun alıkonma mekanizmalarının birbiriyle ilişkilendirilmemesi şarttır. Maksimum pik kapasitesi elde etmek için, 2D'de kullanılan kolonların seçiciliklerinin farklı olması gerekir. Hareketli faz bileşimleri, akış hızı, sıcaklık seviyeleri (sadece bazı durumlarda) optimizasyon sırasında dikkatlice ayarlanmalıdır [108].

Ortogonalite ayırma sistemlerinin "seçicilik kabiliyeti" olarak da bilinir. Birinci boyut, ilk kolondan piklerin çıkarılmasına izin verir ve oluşan ortogonal ayırma tüm örnek piklerini tamamen ayırır [127].

2D-RP-HPLC/RP-HPLC'nin ortogonalite özelliği, benzer ayırma mekanizması nedeniyle sınırlıdır. Bu sorunu çözmek için, RP kromatografisi ile birleşmiş bir

hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC)'nin birçok doğal kaynağın ayrılmasında çok yararlı olduğu kanıtlanmıştır [128].

2.4.1.1.3. Ayırıcılık

Bir ayırma işleminin kalitesi ayırıcılık (R) ile ifade edilmekte ve ayırıcılık iki ardışık kromatografik pikin ayrılması olarak tanımlanmaktadır. Tek-boyutlu kromatografide ayırıcılık (R_s) matematiksel ifadesi;

$$R_s = 2 \frac{t_{i+1} - t_i}{w_{i+1} + w_i} = \frac{\Delta t}{\bar{w}} \quad (2.5)$$

Burada, t_i ve t_{i+1} , iki ardışık pikin alınma zamanıdır, w_{i+1} ve w_i pik genişlikleri, \bar{w} ise her ikisinin ortalama genişliğidir [127].

2D sistemi için, R_{SD1} ve R_{SD2} , her boyutta birbirini izleyen iki pik arasındaki ayırıcılıktır, genel ayırıcılık, R_s aşağıdaki denklem ile hesaplanmaktadır [112];

$$R_s = \sqrt{(R_{SD1}^2 + R_{SD2}^2)} \quad (2.6)$$

2.4.1.1.4. Örnekleme hızı/ sıklığı

Heart-Cutting 2D ayırımında örnekleme sıklığı kapsamlı 2D ayırımında olduğu gibi önemli değildir. Birinci boyut ayırıcılığının sağlanması, kapsamlı 2D ayırımında izlenmesi gereken önemli bir kuraldır. Pik başına yeterli sayıda örnekleme bu amaca ulaşmada yardımcı olabilir [112]. Aslında, 2. boyuttaki tüm analiz zamanı uygun örnekleme sayısını sağlamak için yeterince hızlı olmalıdır. Gradyent programın optimizasyonu ve akış hızı düşürülerek yeterli örnekleme hızına ulaşılabılır [112].

2.4.1.2. Yöntem Geliştirme

2D-HPLC, boyut dışlama kromatografisi (SEC), hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC), hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi (HILIC) ve afinite kolonları gibi farklı ayırma yöntemleri sayesinde iki farklı kromatografik kolonu birleştiren bir sıvı kromatografisi tekniğidir. Birbirinden bağımsız ayırma teknikleri yüksek pik kapasitesi, ayırıcılık ve seçicilik sağlar. Bu yaklaşım, örnek kaybına neden olan preparatif basamağı ortadan kaldırır ve büyük bir kromatografik kombinasyon seçeneği ile çok yönlü olmasını sağlar [109]. Çok sayıda bileşiklerin hassas bir şekilde ayrılmasını sağlamak için 2D-HPLC sisteminde iyon değişimi [129], ters faz [130, 131], hidrofobik etkileşim [132], hidrofilik etkileşim ve boyut dışlama [133-

135] yöntemlerini içeren birbirinden farklı kolon türleri kullanılmıştır [104]. Ayrıca, ilgilenilen bileşikler için önemli derecede ortogonal seçicilik sağlayan kolaylaştırıcı 2D-HPLC için farklı boyut ve uzunlukta monolitik kolonlar ve partikül dolgu kolonlar kullanılmıştır [104].

En önemli basamak; örneklerin karakteristik özelliklerine göre kromatografik kolonların seçimidir. Ters faz kromatografi kolonu ve hidrofilik kromatografik kolon genellikle polar olmayan moleküller için kullanılır [136, 137]. Buna karşın, biyolojik makromolekül örneklerinde en yaygın kullanılan iyon değişim kromatografi kolonudur. Ayrıca, karbonhidratlar için hidrofobik etkileşim kolonları gereklidir ve inorganik iyonlar için iyon kromatografi kolonları önerilir. Buna ek olarak, jel kromatografik kolonlar sentetik polimerler için çok uygundur. Stereoizomer için siklodekstrin sabit faz olarak kullanılırken, kiral kromatografik kolonlar rasemler için uygundur [137].

1B, kompleks örneklerin analizi ve preparatif saflaştırılması için sıklıkla kullanılır ve sahip olması gereken bazı özellikler vardır:

- a) tersinmez adsorpsiyon,
- b) ham özütleri işleme kabiliyeti,
- c) yüksek yükleme kapasitesi,
- d) düşük çözücü tüketimi,
- e) ortogonalite.

Ne yazık ki, 1D'nin ayırma etkinliği ve pik kapasitesi, örnek karmaşıklığı ile sınırlıdır. Bu sınırlama da araştırmacıları çok-boyutlu veya 2D sistemleri geliştirmek için teşvik etmiştir. Heart-cutting temeline dayanan ilk yaklaşımda, 1B'nin seçilen kısımları ikinci boyuta transfer edilir bu da 1D ayrımıyla karşılaştırıldığında daha yüksek çözünürlük sağlar. 2D ayırım, çoklu LC pompaları, otomatik bir valf, dedektörler ve fraksiyon toplayıcılarının kullanılmasını gerektirmiştir [138].

Preparatif HPLC (prep-HPLC), kompleks örneklerden bileşiklerin saflaştırılması ve ayrımı için yaygın olarak kullanılırken, analitik HPLC (ana-HPLC) sadece yüksek çözünürlüklü ayırma etkinliğini arttırmakla kalmaz; aynı zamanda kompleks örneklerde hedef moleküllerin tayini ve miktarının belirlenmesini sağlar. Bununla

birlikte, matrisin karmaşıklığı nedeniyle, örnekteki bileşenlerin içeriği yapısal ve kimyasal olarak benzer özelliklere sahiptir. Geleneksel HPLC sistemi, kompleks ve çok bileşenli ürünlerin pik kapasitesi ve ayırıcılığının sınırlandırılması nedeniyle tek bir basamakta analiz ve ayırma ihtiyaçlarını karşılayamamaktadır. HPLC, farklı ayırma mekanizması veya farklı ayırma yöntemlerini bir valf kontrolü veya çevrimdışı yöntem ile birleştirerek kromatografik teknikler oluşturmuştur [137]. Bu sadece kromatografik sistemin pik kapasitesini ve ortogonalite özelliğini geliştirmez; aynı zamanda kromatografik pikler arasındaki çakışmayı azaltır. Farklı içerikteki örnekleri veya benzer özellikteki örnekleri ayırmayı mümkün kılar. 2D-HPLC'de seçicilik ayırımı kolon tipi, sorbent gözenek boyutu, sıcaklık ve valf değiştirme gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Bu faktörlerin hepsi ayrılmaların etkinliğini değiştirmek için kullanılmıştır [129].

Ayırıcılık kaybı olmaksızın yüksek geçirgenlik ve akış hızlarından dolayı, monolitik kolonlar çok sayıda bileşiğin kapsamlı bir şekilde ayrılmasına imkan sağlayan ikinci boyutta uygulanmıştır [112, 132, 139]. Ikegami ve arkadaşları ters faz sıvı kromatografisi (RPLC) ile birleştirilen C18 silika monolitik kolonları kullanarak ikinci boyutun analiz hızını arttırmaya odaklanmışlardır. İzokratik uygulamalarda aromatik bileşikler için ayırma süresi, 2D'de 45 ile 60 saniye aralığında gerçekleştirilmiş ve toplam pik kapasitesi, 60 dakika içinde 900'e kadar ulaşmıştır [104]. Ayrıca, küçük gözeneksiz silika doldurulmuş kolonlar (14x4.6 mm I.D.) yüksek çözünürlüklü hızlı ayırma için kullanılmıştır. Bu tip sistem 10 girişli iki konumlu valfleri ile iyon değiştirme/ters faz 2D-HPLC'den oluşan tam otomatik sistemdir ve altı standart protein analizi için kullanılmıştır. Toplam pik kapasitesi 600 gibi yüksek bir değer olarak hesaplanmış ve toplam analiz süresi 20 dakikada gerçekleştirilmiştir [140].

İkinci boyutun analizini hızlandırmanın bir başka yaklaşımı ise 100°C üzerindeki sıcaklığın artmasıyla ortaya atılmıştır. Stoll ve arkadaşları yüksek çizgisel hız (>3 cm/s) ile yüksek ortam sıcaklığını (110°C) uygulamış ve bunu 21 saniyede yapmışlardır. Tüm analiz 25 dakika içinde gerçekleştirilmiş ve toplam pik kapasitesi 900 olarak bulunmuştur [141, 142]. Yüksek sıcaklık, hareketli fazın viskozitesini düşürür, bu da yüksek akış oranları ve düşük basınç düşüşleri sağlar, dolayısıyla kütle transferini artırır.

İkinci boyut analizinin yüksek hızından dolayı dedektör sistemi, her veri noktasından kaynaklanan ayırıcılık kaybını önlemek için çok hızlı olmalıdır [112, 143]. Tüm 2D-LC sistemi ultraviyole (UV) [144], foto diyot dizilimi (PDA) [145] ve evaporatif ışık saçılımı (ELSD) da dahil olmak üzere çeşitli algılama teknikleriyle kolayca birleştirilmiş [146] ve böylece örnek bileşenlerinin kimyasal bileşiminin yüksek hassasiyette tayini sağlanmıştır.

Ayrıca, çeşitli LC kolonlarının seçilmesi, alıkonma zamanını elde etmek ve belirli ayırma problemlerini çözmek için kritik bir noktadır. Etkili ve iyi bir ayırım LC kolonlarının boyut, polarite, şekil, asitlik/bazlık ve hidrofobiklik gibi özellikleri içeren fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlıdır.

Simpkins ve arkadaşları, zayıf katyon değişimi, karbon kaplı zirkonya (C/ZrO₂) ve örnek matrislerinden hidrokarbon bileşikleri için geleneksel bir C18 kolonu dahil olmak üzere üç fonksiyonelli ters faz kolon kullanan üç-boyutlu HPLC sistemini ortaya çıkarmıştır. UV ve MS/MS yöntemleri, yöntem kantitasyon limitleri 0.4 ppt olan kompleks örneklerde çok düşük miktarda bileşik için mükemmel ayrımlar sağlamıştır [147].

Dijkman ve arkadaşları suda asidik herbisitlerin eş zamanlı olarak belirlenmesi ve nicelleştirilmesi için bir elektrosprey (ESI) ve atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) ile donatılmış Triple Quadrupole kütle spektrometrik (MS-MS) algılama sistemi kullanılarak çeşitli RP-LC yöntemlerini önermişlerdir. ESI- veya APCI-MS-MS yöntemi ile 10 dakikadan daha kısa bir sürede 0.1 µg/L seviyesinde asidik pestisitlerin miktarının güvenilir bir şekilde ölçülmesini sağlamıştır [148].

2D-HPLC yöntemini geliştirmek için uygulanan çeşitli girişimler vardır. Teorik hesaplamalar, Jiang ve arkadaşları, Wang ve arkadaşları, ve Schoenmakers ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır [125, 134, 146]. Analiz süresi Adler ve Kliz tarafından oldukça kısa sürelerle düşürülmüştür [149]. Popovici, SEC kolonunda optimum kolon uzunluğu ve bant genişlemesini araştırmıştır [150]. Reingruber ve arkadaşları, yöntemin optimizasyonu için iyileştirme etkilerini araştırmışlardır [151]. Yüksek sıcaklığın, viskoziteyi düşüren ve analitlerin difüzyonunu arttıran bir etki olduğunu göstermişlerdir [152]. Berek ve arkadaşları 2D-HPLC ile en iyi sonucu elde etmek için gözenek boyutu, kolon dolgu malzemesi ve çözücü kombinasyonunu incelemişlerdir [153].

2.4.2. Çevrimdışı 2D-HPLC

Bileşiklerin analizi için en sık kullanılan teknikler, yüksek basınçlı sıvı kromatografisidir (HPLC). Floresan dedektörü (FD), UV-DAD ile karşılaştırıldığında düşük algılama limiti duyarlılıkları sağladığı için çoğunlukla tercih edilmiştir. Diğer yöntem, bileşik ve elemental bileşimin molekül kütlesi izlenerek yapısal bilgiyi sağlayan sıvı kromatografi-kütle spektroskopisi (LC-MS)'dir. Bu teknikler, yüksek hassasiyet, ayırma verimliliği, pik kapasitesi ve bileşik tanımlama sayısı gibi birçok avantaja sahiptir. Geleneksel HPLC sistemlerinde çevrimdışı yaklaşım yapılır ve ilk kolondan toplanan ana fraksiyonlar daha ileri analiz için aynı veya farklı HPLC kolonuna manuel olarak yeniden enjekte edilir. Çevrimdışı modda, geniş bir solvent seçimi, düşük enstrüman gereksinimi ve yüksek pik kapasitesi elde edilebilir; ancak zaman alıcı ve yoğun iş gücü gerektiren, analitik hatalara neden olan, numune kaybına ve kirlenmeye yol açma gibi bazı dezavantajlara sahiptir [112, 124, 143].

2.4.3. Çevrimiçi 2D-HPLC

"Çevrimiçi" yöntem olarak bilinen ikinci yaklaşım, analitik kolon ile birleştirilmiş preparatif kolonun otomasyonunu sağlamaktadır. Böylece birinci boyuttan elde edilen fraksiyonları otomatik bir valf aracılığıyla ikinci boyuta transfer eder [143]. Çevrimdışı yöntem genellikle analitlerin kompleks matristen özütlenmesi için ilgili fraksiyonların elle tekrar enjeksiyonu sırasında kirlenme riskini artıran ve düşük örnek geri kazanımına neden olan çok sayıda kromatografik basamağa ihtiyaç duyar. Analit kaybını ve kirlenme riskini azaltmak için "çevrimiçi" 2D-HPLC geliştirilmiş ve tekrarlanabilirlik sağlanmıştır. Çevrimiçi HPLC'nin en büyük faydası, pik kapasitesinin geliştirilmesidir ve bu durum, çevrimdışı HPLC'de sınırlandırılmış olan doğal ürünlerin saflaştırılması ve etkili bir şekilde ayrılması olarak ifade edilmektedir [146]. Ayrıca, tüm sürecin otomasyonu sayesinde, ön deriştirme ve analiz aşaması arasındaki insan hatalarını önleyebilir. Böylece örneklerin ön işlem süresi önemli ölçüde kısaltılabilir. Bugünlerde, 2D-LC'deki heart-cutting ve kapsamlı 2D ayırma modunun her ikisinde çok sayıda bileşiğin karakterizasyonu ve ayırımı için oldukça faydalı olduğunu göstermiştir [154].

2.4.3.1. Heart-cutting Modu

Heart-cutting 2D-HPLC, belirli bir bölgedeki fraksiyonları birinci kolondan ikinci kolona transfer eder ve eser miktardaki analizler için popülerdir. Heart-cutting yaklaşımı, ham doğal bitki özütlerindeki ilgili fraksiyonlarla ilgilenen, umut vadeden yöntemlerden biridir. İlgilenilen fraksiyon birinci boyuttan elüe edilir ve daha sonra doğrudan ikinci boyuta aktarılır, böylece 1D ayırımında iki pikin çakışma olasılığına rağmen pik ayırıcılığını düzeltir [155]. Birinci kolondaki ilgilenilen fraksiyon değiştirilmiş ve aynı anda ikinci kolona çevrimiçi olarak eklenerek ayırma verimliliğini büyük ölçüde artırmıştır [155]. 2D-HPLC, örnek hazırlama süresini azaltarak biyolojik matrislerin doğrudan enjekte edilmesine izin verir. Üstelik, bu konfigürasyon, birden fazla bileşiğin aynı anda analiz edilmesini sağlar. Heart-cutting 2D-HPLC, birinci (ön-işlem) kolondaki seçilen numunede sadece ilgilenilen fraksiyonu bir valf aracılığıyla ikinci (analitik) kolona transfer eden etkili yöntemlerden biri olabilir. Bu yöntem, yabancı maddelerin hassas analizini engelleme riskini ve analitik kolonu kirletme riskini azaltır [110].

2.4.3.2. Kapsamlı Mod

1970'de Erni ve Frei tarafından başlatılan kapsamlı mod 2D-HPLC [156], tüm örnekleri ilk kolondan ikinci kolona transfer eder. Bu yaklaşım proteomik, doğal ürünler ve polimerler gibi yüksek sayıdaki bileşenler için oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Birçok biyolojik ve tıbbi alanlarda ayırım için uygulanmış ve yapısal olarak benzer bileşikler için bile iyi ayırma sonuçları sağlamıştır. Farklı özelliklere dayanan, oldukça seçici bir ayırma teknolojisidir. Kapsamlı mod, gelişmiş pik kapasitesi ve seçicilik sayesinde heart-cutting moduna mükemmel bir alternatif olma potansiyeli ile farklı miktarlarda karmaşık karışımlarda bulunan çeşitli bileşikler için uygundur [157]. Benzer yapıya sahip tüm bileşenleri ve doğal ürünlerde bulunan çoğunlukla farklı polaritelerdeki tüm bileşenleri ayırmak nispeten güçtür [158]. Son gelişmeler, araştırmacılara bileşiklerin karmaşık örneklerden ayrılması ve tanımlanması için yeni stratejiler sağlamıştır. Kapsamlı yaklaşım, heart-cutting moduna göre iki avantaj ile farklılık gösterir: Bunlardan biri, heart-cutting modunda iken her iki boyutta ayırma tabi tutulur, çok sayıda çok bileşenli fraksiyonlar ikinci kolona transfer edilir, bu da örnek taşıma kayıplarını ortadan kaldırır [159]. İkincisi, gerçek numunelerde bulunan daha karmaşık

karışımlar söz konusu olduğunda gelişmiş pik kapasitesi ve daha yüksek ayırıcılık ile daha iyi ortogonalite özelliği sunar [160].

2.4.4. 2D-HPLC Uygulamaları

2D-HPLC ilk kez 1978'de ortaya atılmış ve özellikle son 20 yılda proteomik, doğal ürünler, biyolojik numuneler, polimerler, farmasötik ve çevresel analizler için geleneksel tekniklere alternatif olarak uygulanmaktadır. Özütleme, ön deriştirme, temizleme ve tayin ile ilgili tüm otomasyonlar eser miktardaki bileşiklerin analizini gerçekleştirmede önemli bir rol oynamaktadır. Bu yöntemin en önemli avantajı, büyük miktarlardaki organik çözücülerin kullanılmasını önleyen ön işlem süreçlerinin dezavantajı için bir çözüm sunmaktır. Ayrıca, çevrimiçi yöntem yüksek akış hızlarıyla çalışmaya izin verir. Bu şekilde, proteinler gibi makromoleküllerin daha kısa sürede ayırımı mümkündür. Düşük geri basınç, aktarım yoluyla kütle transferi ve daha kısa difüzyon yolu gibi benzersiz avantajlar, onları yeni alternatif bir teknik haline getirir.

2.4.4.1. Çevresel Uygulamalar

Eser miktardaki organik kirleticiler, insan sağlığına zarar verebilecek şekilde mutajenik, toksik ve kanserojen etkilere sahip en ciddi bileşenlerden biridir. Havada, suda, topraklarda ve besinlerde biriken çevre kirleticileridir ve böylece düşük derişimlerde bile insanlarda sağlık riskleri oluştururlar. Dokulardaki yüksek derişim akciğer, karaciğer, mesane ve cilt dahil olmak üzere birçok kanser türüne neden olmaktadır. Bu bileşiklerin tanımlanması ve tayini, tehlikeli karakteristik özellikleri nedeniyle büyük ilgi uyandırmaktadır. Bu amaçla, eser miktardaki bileşiklerin tayini için birçok pratik ve hassas 2D-HPLC işlemleri geliştirilmiştir. Murahashi ve arkadaşları, otomobil egzozundaki kanserojen 1-nitropiren tespitinde C18 ve pentabromobenzil kolonundan oluşan 2D-HPLC sistemini kullanmışlardır. Nitropirenin dizel ve benzindeki tayin aralığı 0.01 ve 3.0 ng/mL olarak belirlenmiş ve analizi 40 dakikada gerçekleştirilmiştir. Önceki çalışmaya benzer şekilde, aynı grup 12 ters faz HPLC kolonu kullanarak alkanlar, alkilbenzenler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH)'ları ikinci boyutta 0.1 dakika içinde tamamen ayırmışlardır [161]. Tanaka ve arkadaşları PAH'ların ve benzen türevlerinin analizi için kapsamlı 2D-HPLC'yi kullanmışlardır. İlk boyutta floralkilsilil bağlı (FR) silika parçacıklarla doldurulmuş ters faz kolonu ve ikinci boyutta iki oktadesilsilillenmiş

(C18) veya farklı fazlar (pentabromobenziloksi) ve propilsilil bağı (PBB) monolitik silika kolon kullanarak ayrımı gerçekleştirmiştir. Pik kapasitesi 60 dakikada 1000 olarak bulunmuştur [162].

Atmosferik aerosollerden yayılan organik asitlerin analizi için yeni bir yöntem Pol ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Kapsamlı 2D-HPLC, birinci boyutta güçlü katyon-dışlama (SCE) kolonu, ikinci boyutta ise C18 dolgulu kolonu kullanılan ESI-TOF-MS'e bağı LC-LC sistemi ile oluşturulmuştur. Pik alanlarının göreceli standart sapması (RSD) % 8 ve standart karışımların bileşikleri için teşhis sınırı (LOD) değerleri 0.01 ng ile 1.14 ng arasında belirlenmiştir [163].

2.4.4.2. Biyolojik Örneklerdeki Uygulamalar

İnsan genom projesinin tamamlanmasını bekleyen bilim dünyası, projenin sonunda elde edilmesi beklenen cevaplara ulaşılamadığı için hayal kırıklığına uğramıştır. Ancak, GENOM projesi, bilimsel toplum için Omiks Çağı olarak bilinen yeni bir devri başlatmıştır. Omiks araştırmalarına olan ilgi kanser, AIDS, parkinson, Alzheimer ve otoimmün hastalıklar gibi epidemik hastalıklar ve genetik bozukluklara çare bulmayı hedeflediğinden her geçen gün katlanarak artmıştır. Bu ilgi sadece hastalıkların kökeninin belirlenmesi değil aynı zamanda hastalığın seyrini izlemek, tedavi ve hastalık metabolizmasını belirlemektir. Omiks çalışmalarında metal ve/veya metaloprotein profillemesini içeren metallomik, metabolit profili içeren metabolomik, glikoprotein profillemesini içeren glisiklik, protein profili ve dağılımı da dahil olmak üzere proteomik'in dahil olduğu geniş bir çalışma alanı çeşitli araştırma grupları tarafından araştırılmıştır. Her omiks alanın kendi yaklaşımları olsa da kromatografik ayırım/ön deriştirme bu analizler için basit bir yöntemdir.

Omiks araştırmalarında biyolojik ortamların karmaşık yapısı kromatografik ayırım işlemini oldukça seçici olarak zorlar. Literatürde, iki-boyutlu HPLC uygulamalarının özellikle proteinlerin ayrılması ve kantitatif analizi için performansı arttırdığı bildirilmiştir.

Proteinler için yeni tekniklerin gelişimi ve insan hastalık mekanizmalarına yeni bakış açısı sağlayan peptid analizi için artan bir ilgi vardır. Bununla birlikte, en çok kullanılan ayırma sistemi, protein haritalaması için 2D-poliakrilamid jel elektroforezidir (2D-PAGE) ve molekül ağırlığı 15 kDa'dan yüksek proteinler için

düşük özütleme verimliliği ve düşük çözünürlük gibi bazı sınırlamalara sahiptir. Ayrıca, bu teknik karmaşık, zaman alıcı, otomasyonu zor, yoğun iş gücü ve hiçbir şekilde spektroskopik belirleme ile birleşmemiştir. Bu sınırlamaları gidermek için, protein ve peptitlerin ayırım verimliliğini ve seçiciliğini arttırmak için farklı ayırma mekanizmalarına sahip çeşitli kromatografik modlardan oluşan 2D-HPLC ayırımları kullanılmıştır [164].

HPLC ile kütle spektrometrisinin kombinasyonu, diğer yaklaşımlara kıyasla, oligosakkaritler de dahil olmak üzere biyopolimerlerin yüksek hassasiyet ve seçicilik ile ayrılmasını geliştirmiştir.

Williams ve arkadaşları, monoklonal antikörlerin (mAb) karakterizasyonu için UV-dedektörü ile bağlı 12 pozisyonlu valf sistemini kullanmışlardır. Birinci boyut ayırımı, protein A afinite kromatografisi (ProA) vasıtasıyla, ikinci boyut ayırımı ise boyut dışlama kromatografisiyle sağlanmıştır. Otomatikleştirilmiş bir ProA-SEC 2D-HPLC yöntemini, diğer yaklaşımlardan farklı kılan iki kolon arasında fraksiyon toplama cihazı sağlamak üzere tasarlanmıştır. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.016 mg/mL ve 0.052 mg/mL olarak belirlenmiştir [165].

Wang ve arkadaşları metabolom tasarımı ve optimizasyonu ve ayrıca lipidom ayırımı için farklı LC ayırım sistemlerine fraksiyonların çevrimiçi olarak transfer edilmesiyle yeni bir 2D-LC sistemini sunmuşlardır. 2D-LC yöntemini MS sistemi ile birleştirmiş ve 4 pozisyonda çalıştırılan 3lü valf konfigürasyonu ile çalışan bu sistemi, 17 karakteristik standardı kullanarak valide etmişlerdir. BEH C8 kolonu, metabolomu lipidomdan ayırmak için kullanılmış, lipidomik analiz için HSS T3 kolonu piyasaya sürülmüş ve LOD değerleri pg/mL olarak verilmiştir [136].

2.4.4.3. Gıdalardaki Uygulamalar

Gıda maddelerinin karmaşık yapısı daha seçici kromatografik ayırımların olmasını gerektirmektedir. Bu bağlamda, ayırımın sağlanması için özellikle farklı sıvı kromatografik modlar gerçekleştirilmiştir. Literatürde özellikle gıda kontrolünde ve tarama programlarında bulunan gıda metabolitlerinin niceliksel analizi için iki-boyutlu HPLC uygulamalarının performansı arttırdığı bildirilmiştir.

Mondello ve arkadaşları, triaçilgliserollerin (TAG'ler) ayrılması için atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon kütle spektrometresi (APCI-MS) algılama sistemi kullanılarak gümüş iyonu ters faz (Ag-RP-HPLC) ile geliştirilen kapsamlı LC'yi

(LC/LC) tanıtmışlardır. Sistem ikinci boyutta 90 saniyede gradiyent elüsyonunu etkili bir biçimde gerçekleştirmiş ve 120 dakika içinde 4 TAG (POP, OOP, OOO ve POS) karışımı içeren pirinç yağı ayırımını tamamlamıştır [139].

Kogus ve arkadaşları çemenotu tohumlarında C-glikosil flavonlarının belirlenmesi için başka bir yaklaşım bildirilmişlerdir. 2D-HPLC sistemini birinci boyut olarak fenil-RP18 kolonu ve ikinci boyut olarak iki RP-18 kolonunu kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Yöntem, on sekiz C-glikozil flavon bileşiğinin yüksek ayırıcılık ile belirlenmesini HPLC-DAD-MS sistemi kullanarak sağlamıştır [166]. Kalili ve arkadaşları, çevrimdışı 2D-HPLC sistemi ile elma ve kakao özütlerinden prosiyanidinleri tayin etmişlerdir. Önce prosiyanidinler birinci boyutta HILIC yöntemi ile ayrılmış ve ikinci boyut olarak da RP kolonlarına transfer edilmiştir, UV ve ESI-MS sistemleri kullanılarak da belirlenmişlerdir. HILIC ve RP-LC-MS kombinasyonu, kakao ve elma örnekleri için pik kapasitelerini sırasıyla 3137 ve 2334 olarak sağlamıştır [167]. Aynı grup, yeşil çaydan fenolik bileşiklerin ayrılmasını benzer bir yaklaşım ile 3556 pik kapasitesi elde ederek sağlamışlardır [168].

Leitneret ve arkadaşları tarafından et ürünlerine eklenebilecek soya fasulyesi proteininin analizi rapor edilmiştir. Çevrimdışı 2D-LC-MS/MS sistemi, yüksek seçicilik ve yüksek hassasiyet ile bütün et örneklerinden G4 peptidlerini tespit etmeyi başarıyla gerçekleştirmişlerdir [169]. Castro-Rubio ve arkadaşları ise domates meyvesinden (*Lycopersicon esculentum*) N-bağlı oligosakkaritlerin saptanması için MALDI-TOF-MS ile birleştirilmiş HPLC sistemini kullanmışlardır [170].

Jakobsen ve arkadaşları, D3 vitamini ve 25-hidroksivitamin D3'ün belirlenmesi için bir yöntem geliştirmişler ve bu yöntemi gıda bileşim tablolarına katkıda bulunmak için domuz eti, yağsız et ve domuz yağı analizlerinde uygulamışlardır. Bu yaklaşımda, vitaminler önce alkalın hidroliz, katı faz özütleme (SPE), silika ve amino kolonları olan yarı hazırlayıcı HPLC kullanılarak ön ayırımı gerçekleştirilmiş, ardından da RP-HPLC (C18 column) kolonu ile tayin edilmiştir. D vitamini kesinliği sırasıyla yağsız et ve domuz yağında % 9.1 ve % 7.1 olarak bulunmuş, geri kazanım değerleri ise D3 vitamini için yaklaşık % 94.7, 25-hidroksivitamin D3 için ise % 99 olarak belirlenmiştir [171].

McSheehy ve arkadaşları, doğal selenyumlu topraklarda hasat edilen sarımsakta selenyum saflaştırma ve izolasyonu için 2D-HPLC ayrımlarının kullanımını belirtmişlerdir. SEC yöntemi, sarımsak özütlerinden ilgili fraksiyonların izolasyonu için birinci boyut olarak kullanılmıştır. Birinci boyuttan toplanan fraksiyonlar RP-HPLC kolonuna aktarılmış ve ICP-MS ile tayini gerçekleştirilmiştir [172].

2.4.4.4. İlaçlardaki Uygulamalar

Zhang ve arkadaşları, 2D-HPLC sisteminde yeni bir konfigürasyon olan çok yönlü heart-cutting yaklaşımını kullanmışlardır. Bu yaklaşım ile altı pozisyonlu valf sistemli ve detektör sistemi olarak UV-yüklü aerosol MS (UV-CAD-MS) kullanılmıştır. Küçük farmasotik bileşikler, safsızlık ve bozunma ürünleri için pik kapasitesini ve diklik özelliğini arttırmak için RP-HILIC ve RP-RP sisteminin otomasyonu sağlanmıştır [121]. Yang ve arkadaşları, GNE1 farmasotik maddesinin ve izomerlerin saf olmayan standartlarının analizi için heart-cutting 2D-LC yaklaşımını üzerinde durmuşlardır. Ana bileşiğin ve safsızlıkların seçici olarak ayrılması için Zorbax Eclipse XDB C-18 ve Xselect CSH fenil-heksil kolonlarını kombine etmişlerdir. İzomerler için LOD değeri 0.1 g/mL, LOQ değeri ise % 4.1 göreceli standart sapma ile 0.25 g/mL olarak bulunmuştur [154]. Lee ve arkadaşları, farmasotik bileşiklerin analizinde PDA ve MS'e alternatif heart-cutting yöntemi sunmuşlardır. Yeni bir ilacın (bileşik A) 2D ayrımı, UV detektör sistemi kullanılarak gradient koşulları altında ACE Fenil kolonu ile kombine RP18 kolonları ile gerçekleştirilmiş, kiral ayırım ise bileşik A'nın dört izomerinin hepsinin ayrılması için izokratik modda CHIRALPAK AD-H kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir [173]. Stol ve arkadaşları, aktif farmasötik malzemelerin içindeki safsızlıkların ve bozunma ürünlerinin LC-LC ayırımının tespit hassasiyetini göstermişlerdir. Karmaşık matrislerde çok düşük derişimde bulunan naproksen ve onun fotodegradasyon ürünlerinin ayrılması için DAD dedektör sistemi kullanarak RP-RP sistemi geliştirmişlerdir. Tek-boyutlu ayrımı kısa kolon (5 cm x 2.1 mm i.d., RP) kullanarak 8 dakika gibi kısa bir sürede, iki boyutlu ayrımı ise 3.5 dakika içinde gerçekleştirmişlerdir [174]. Burns ve arkadaşları, ilaç keşfinde 2D-HPLC'nin rolünü anlamış ve daha sonra bu sistemi doğal bir üründen farmasötik maddenin ortaya çıkarılması için kullanmışlardır. Bu yeni yaklaşımı haşhaş sapından morfinin ayırımında kolon seçiminin optimizasyonu için kullanmışlardır. Bu çalışmada, bitkinin ham özütünden morfinin çok-boyutlu analizi için LC/MSD TOF sistemi ile

birleştirilmiş aromatik ve hidrofobik durgun fazların on altı farklı kombinasyonu kullanılmıştır [175]. Stevensen ve arkadaşlarının sunduğu benzer bir yaklaşımda, on yedi çeşit difenil-C18 kolon kombinasyonu ile morfinin ayırımı için LC/TOF-MS kullanılmıştır [120].

2.4.4.5. Sentetik Polimerlerdeki Uygulamalar

Sentetik polimerlerin ayırımı için polimerlerin kimyasal bileşimine göre uç grup işlevselliğini farklı polaritelerle ele alan çeşitli yaklaşımlar yapılmıştır. Snauko ve Berek, LC-SEC kolonlarını refraktif indeks (RI) dedektörü ve çok açılı ışık saçılımı (MALS) dedektörü ile birleştirilmiş bir sistemde kullandıklarını rapor etmişlerdir. Neredeyse aynı molar kütlelere sahip polistiren (PS) ve poli(metil metakrilat)'ı (PMMA), küçük bir LC-LCD kolonu kullanılarak dört dakika içinde analiz etmişlerdir [176]. Cuong ve arkadaşları, PEG ve metil eterlerinin tayininde RI dedektör ile birleştirilmiş ters faz kolonu kullanmışlardır. Düşük molekül ağırlığındaki oligomerlerin aseton-su içerisinde çözündüğü, daha yüksek molekül ağırlığındaki oligomerlerin ise metanol-su içerisinde çözündüğünü belirtmişlerdir [177]. Cho ve arkadaşları, farklı molekül ağırlığında sentezledikleri siklik polistirenlerin karakterizasyonları için SEC ve etkileşim kromatografisi (IC) türlerini kullanmışlardır [178].

3. MALZEME VE YÖNTEMLER

3.1. Kimyasal Malzemeler

P(HEMAPA) monolitik kolonların hazırlanmasında temel bileşen 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ve fonksiyonel monomerin sentezinde kullanılan L-fenilalanin, metakriloil klorür Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından sağlanmıştır. Ayrıca hareketli fazların hazırlanmasında kullanılan asetik asit de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, ABD) firmasından temin edilmiştir. Potasyum persülfat (KPS), metanol (HPLC için uygun saflıkta) ve asetonitril (HPLC için uygun saflıkta) Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır. Standart olan Ochrastandart ve karşılaştırma amacıyla kullanılan Ochraprep® immünoafinite kolonu, R-Biopharm Rhone (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Deneyler sırasında kullanılan su; Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® ters ozmoz üniteli selüloz asetat membranlı (Barnstead D2731) ve Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırıcılı, iyon değişimli ultra saf su cihazından sağlanmıştır. Kullanılan cam malzemeler gece boyu % 5'lik nitrik asit çözeltisinde tutulmuş ve kullanılmadan önce deiyonize su ile durularak tozsuz bir ortamda kurutulmuştur.

3.2. Deneysel Yöntemler

3.2.1. N-Metakriloil-L-Fenilalanin (MAPA) Monomerinin Sentezlenmesi

N-Metakriloil-L-fenilalanin (MAPA) monomeri literatüre uygun şekilde sentezlenmiştir [179]. Uygulanan yöntem kısaca şöyledir: 5.52 mmol, (0.91 g) L-fenilalanin, 1 M NaOH sulu çözeltisinde deney tüpü içinde çözülmüştür. MA-Bt (5.52 mmol) çözeltisi içeren 1,4-dioksan (25 mL) yavaşça aminoasit çözeltisi içine eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında 10-20 dakika karıştırılmış ve reaksiyonun tamamlanmasına izin verilmiştir. Reaksiyon bittiğinde vakum altında 1,4-dioksan buharlaştırılarak uzaklaştırılmıştır. Çökelti su ile seyreltilmiş ve reaksiyon sonucu oluşan 1H-benzotriazol, etil asetat (3 x 50 mL) ile çekilmiştir. Toplanan sulu monomer çözeltisi % 10'luk HCl çözeltisi kullanılarak pH 6.0-7.0 (metakriloil grubunun asidik ortamda olası polimerleşmesini engellemek için pH 6.0-7.0 civarında tutulmalıdır) olacak şekilde nötrleştirilmiştir. Döner buharlaştırıcı ile su yapıdan uzaklaştırılarak reaksiyon ürünü MAPA monomeri (açık kahverengi renkli çökelek) elde edilmiştir. Elde edilen MAPA monomeri, Fourier dönüşümlü toplam yansıması azaltılmış infrared spektroskopisi (FTIR-ATR) ile karakterize edilmiştir.

3.2.2. P(HEMA) ve P(HEMA) Monolitik HPLC Kolonlarının Hazırlanması

P(HEMA) monolit, paslanmaz çelik HPLC kolonlarında N-metakriloil-L-fenilalanin (MAPA), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve potasyum persülfat başlatıcı varlığında yığın polimerizasyonu ile hazırlanmıştır. Gözenek oluşturucu olarak toluen, çapraz bağlayıcı olarak da etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) kullanılmıştır. Şekil 3.1'de monolitik kolonun hazırlanmasında kullanılan sistem gösterilmiştir. Çizelge 3.1'de monolitik kolonların hazırlanma reçetesi ve polimerizasyon koşulları verilmiştir. Polimerizasyon sonucunda reaksiyona girmeyen monomerler ve diğer bileşenler monolitik kolonun su ve etanol ile yıkanmasıyla yapıdan uzaklaştırılmıştır.

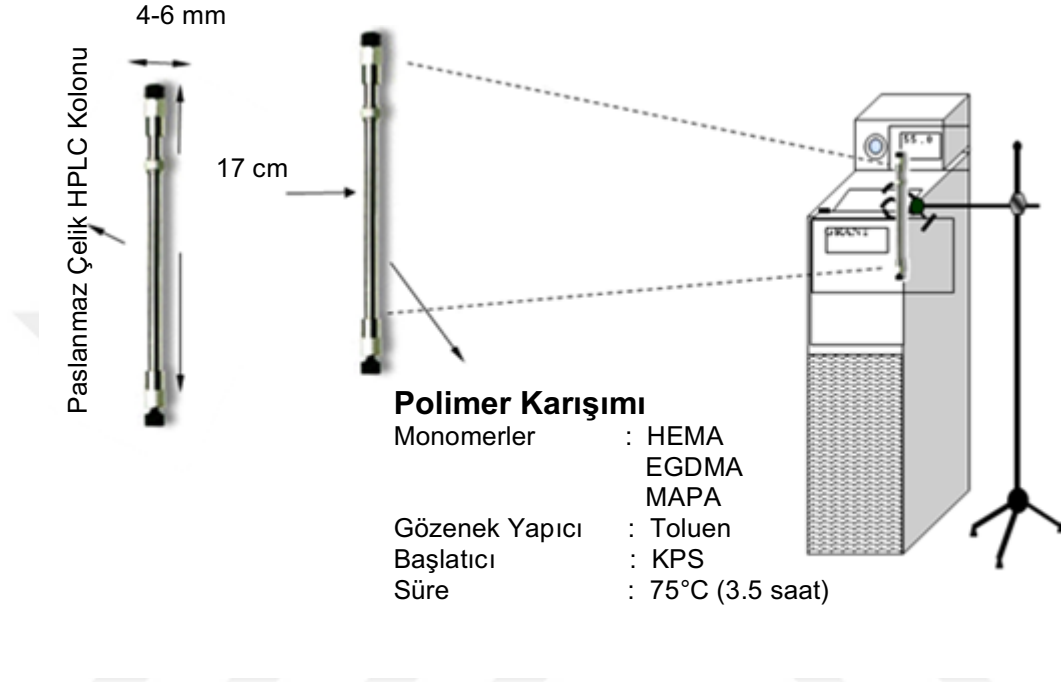
Çizelge 3.1. Monolitik kolonların reçetesi ve polimerizasyon koşulları.

| Polimer karışımı | Polimerizasyon Koşulları |
|--------------------------|-----------------------------------|
| 0 - 250 µmol MAPA | Kolon hacmi: 1.6 mL |
| 1 mL HEMA | Sıcaklık ve zaman: 3.5 saat 75°C. |
| 0.25 mL EGDMA | |
| 0.5 mL Toluene | |
| 0.5 mL HEPES (% 0,9'luk) | |
| 17 mg KPS | |

Farklı miktarlarda MAPA monomeri içeren 4 ayrı monolitik kolon sentezlenmiş ve sentezlenen monolitik kolonların kodları ve yapılarındaki MAPA miktarları şöyledir: P(HEMA): 0 µmol, P(HEMA)-1: 62.5 µmol, P(HEMA)-2: 125 µmol, P(HEMA)-3: 187.5 µmol ve P(HEMA)-4: 250 µmol.

Monolitik kolonlar paslanmaz çelik HPLC kolonlarında hazırlanmıştır. Potasyum persülfat (17 mg), monomer karışımı (HEMA: 1 mL ve EGDMA: 0.25 mL) ve gözenek oluşturucu (toluen: 0.5 mL) içerisinde çözünmüştür. MAPA monomeri HEPES (0.5 mL) içerisinde çözünmüştür. Bu monomer karışımı oda sıcaklığında karıştırılmış ve karışım 15 dakika azot atmosferinde bekletildikten sonra 17 cm yükseklik; 5 mm iç çaplı çelik kolon içerisine aktarılmıştır. Polimerizasyon çelik kolon içerisinde 75°C'lik su banyosunda 3.5 saatte tamamlanmıştır.

Polimerizasyon reaksiyonu tamamlandıktan sonra çözünür bileşenler ve reaksiyona girmemiş monomerler polimerin su ve etanol ile yıkanmasıyla yapıdan uzaklaştırılmıştır. P(HEMA) monolitik kolonlar MAPA olmaksızın aynı yöntem ile hazırlanmıştır.



Şekil 3.1. Monolitik kolonun hazırlanmasının şematik gösterimi.

3.2.3. P(HEMA) ve P(HEMAPA) Monolitik Kolonların Karakterizasyonu

3.2.3.1. FTIR-ATR ile Yapı Analizi

P(HEMA) ve P(HEMAPA) monolitlerin yığın yapısı Fourier dönüşümlü toplam yansıması azaltılmış infrared spektroskopisi (FTIR-ATR) (Spectrum One™, Perkin Elmer, Massachusetts, ABD) ile incelenmiştir. Analizden önce monolit, vakum altında (50 mbar) liyofilizatörde (Christ Freeze Dryer-Alpha 1-2 LD, Marilend, Amerika) 24 saat kurutulmuştur. FTIR-ATR spektrumlarının elde edilmesi amacıyla kurutulmuş monolit örnekleri toz haline getirilmiştir. Monolit örneklerinin 4000-600 cm^{-1} dalga sayısı aralığında spektrumu FTIR-ATR cihazında alınmıştır.

3.2.3.2. Raman ile Yapı Analizi

P(HEMAPA) monolitik kolonların yapısına giren MAPA monomerinin fonksiyonel grupları RAMAN Spektroskopisi (DXR™ Raman microscope, Thermo Scientific,

Waltham, MA, ABD) kullanılarak elde edilmiştir. Analizden önce monolit, vakum altında (50 mbar) liyofilizatörde (Christ Freeze Dryer-Alpha 1-2 LD, Marilend, Amerika) 24 saat kurutulmuştur. RAMAN spektrumlarının elde edilmesi amacıyla kurutulan monolit örnekleri toz haline getirilmiştir. Monolit örneklerinin 3300-200 cm^{-1} dalga sayısı aralığında spektrumu RAMAN cihazında alınmıştır.

3.2.3.3. Geri Basınç-Akış Hızı İlişkisinin İncelenmesi

Sentezlenen P(HEMA) ve P(HEMAPA) monolitik kolonlarda geri basınç-akış hızı ilişkisi de incelenmiştir. Monolitik kolonlarda su kullanılarak akış hızı 0.1-1.5 mL/dk aralığında değiştirilerek her bir akış hızı değerinde sistem basıncı değerleri okunmuş ve elde edilen veriler incelenmiştir.

3.2.3.4. Yüzey Morfolojisi

P(HEMA) ve P(HEMAPA) monolitlerin yüzey ve yığın yapısı yüksek büyütme sağlaması nedeniyle taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Bu amaçla ilk basamakta monolit kesitleri iletken bir yapıştırıcıyla SEM örnek plakası üzerine tutturulmuştur. Daha sonra örnek yüzeyi vakum altında 200 Å kalınlığında metalik altın ile kaplanarak yüzey iletken hale getirilmiştir. Hazırlanan örnekler SEM örnek yuvasına yerleştirilerek çeşitli büyütme oranlarında fotoğrafları çekilmiştir (JEOL, JEM 1200EX, Tokyo, Japonya).

3.2.3.5. Elementel Analiz

Sentezlenen hidrofobik ligand içeren ve içermeyen monolitlerin elementel analizleri gerçekleştirilerek, monolitin yapısına katılan MAPA miktarının belirlenmesi amaçlanmıştır. 1 mg kuru monolit örneği elementel analiz cihazının (Thermo Scientific FLASH 2000 Serisi CHNS/O Analyzer, Cambridge, UK) kalay kapsül örnek hücrelerine yerleştirilerek ± 0.0001 g duyarlılıkla tartılmıştır. Polimerik örnek cihaza konularak yakma işlemi sonucunda örneğin % azot (N), karbon (C) ve hidrojen (H) analizi yapılmıştır.

3.2.4. P(HEMAPA) Monolitik Kolonların Tek-Boyutlu Kullanımı için Optimizasyonu

Sulu çözeltilerden Okratoksin A'nın kromatografik ayırımı yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC) sistemi ile analiz edilmiştir (Shimadzu Corp., Kyoto, Japonya). Kullanılan sistemde CBM-20A Lite model sistem kontrol ünitesi, LPGE ünitesi içeren LC-20AT model pompa, FCV-20AH2 model çok yönlü vana, SIL-

20AHT model otomatik enjeksiyon ünitesi, CTO-10ASVP model kolon fırını, RF-20A model floresan dedektör sistemi bulunmaktadır. MAPA monomeri içeren P(HEMAPA) ve P(HEMA) monolitik kolonların, Okratoksin A tayini için performansı incelenmiştir. HPLC'nin A ve B hareketli fazları sırasıyla asetronitril (ACN) ve %2 Asetik asit içeren su ile hazırlanmıştır. % 100'lük B hareketli fazı ile 7 dakikalık başlangıç periyodunun ardından, A hareketli fazının miktarı % 0'dan % 51'e kadar 50 saniye içerisinde doğrusal gradiyentli olarak artırılmıştır. % 51 A-% 49'lük B hareketli fazı 17 dakika süreyle uygulandıktan sonra B hareketli fazının miktarı % 49'dan % 100'e kadar 50 saniye içerisinde doğrusal gradientli olarak artırılmıştır. Daha sonra kolonun bir sonraki analize uygun hale getirilmesi için kolondan 10 dakika boyunca % 100'lük B hareketli fazı geçirilmiştir. Tüm tamponlar ve karışımlar kullanılmadan önce 0.45 µm'lik filtrelerle süzölmüştür. Akış hızı, 0.5 mL/dk; kolon sıcaklığı, 40°C; örnek yükleme hacmi 100 µL ve dedektör dalga boyları ise 333 nm (uyarılma) ve 443 nm (yayılma) olarak uygulanmıştır. Deneylerde kullanılan OTA toplam standart çözeltileri, ana stok çözeltilerinin (1000 ng/mL) seyreltilmesi (metanol: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); 25:75) ile hazırlanmıştır. P(HEMAPA) monolitik kolonlarda başlangıç OTA derişiminin (0.5-20 ng/mL), hareketli fazın [ACN:H₂O (% 2 HAc içeren) (40:60-45:55-51:49-55:45-60:40)], sıcaklığın (25°C-40°C), enjeksiyon hacminin (10-100 µL) ve akış hızının (0.25-1.5 mL/dk) OTA adsorpsiyonuna etkisi incelenmiştir. Yöntemin ayrıntıları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Tek-boyutlu HPLC parametreleri.

| Tek-Boyutlu HPLC Parametreleri | |
|---------------------------------------|--|
| Hareketli Faz A | Asetonitril |
| Hareketli Faz B | Su (hacimce % 2 Asetik asit içeren) |
| Kolon | P(HEMAPA) monolitik kolon |
| Enjeksiyon Hacmi | 100 µL |
| Akış Hızı | 0.5 mL/dk |
| Çözücü Gradyent Programı | 7.00 dk % 100B, 7.00 dk→7.50 dk, % 100B→% 49B, 17 dk % 49B'de sabit, 24.50 dk→25.00 dk, % 100B, 10 dk % 100B 'de sabit |
| Dedektör | Kazanım: 4x Hassasiyet: Yüksek |
| Kolon Fırını Sıcaklığı | 40°C |

3.2.5. P(HEMAPA) Monolitik Kolonların İki-Boyutlu HPLC Sisteminde Kullanımı

Sulu çözeltilerden Okratoksin A'nın analizlerinde tek-boyutlu HPLC sisteminde elde edilen verimleri üst seviyelere çıkarmak için iki-boyutlu HPLC sistemi kullanılmıştır. Bu kapsamda hidrofobik özelliğe sahip fonksiyonel bir monomer ile hazırlanan P(HEMAPA) kolonu birinci boyut olarak kullanılmıştır. İkinci boyut olarak da ters faz kromatografik C18 kolonu tercih edilmiştir.

Tek-boyutlu HPLC sisteminde elde edilen sıcaklık, akış hızı, enjeksiyon hacmi gibi optimizasyon koşulları iki-boyutlu HPLC sisteminin nasıl gerçekleştirilmesi hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca iki-boyutlu HPLC sisteminde ikinci pompanın özellikleri 6 yollu vana yardımı ile denenmiş ve elüsyon tamponlarının etkisi incelenmiştir. Yöntemin ayrıntıları Çizelge 3.3'de verilmiştir.

İki-boyutlu HPLC sistemini kullanmanın nedenlerinden en önemlileri; tek-boyut analizlerinde elde edilen verimleri, pik kapasitesini artırarak oldukça üst seviyelere çıkarmak ve gıda örneklerinde eser miktarda bulunan OTA'nın analizinde özütleme gibi ön işlemlerin kullanımının gerekmesidir.

Çizelge 3.3. İki-Boyutlu HPLC parametreleri.

| İki-Boyutlu HPLC Parametreleri | |
|---------------------------------------|---|
| İlk Kolon | P(HEMAPA) monolitik kolon |
| İkinci Kolon | Inertsil ODS-3 150X4.6mm, 5µm (Ters faz C18 kolonu) |
| Pompa A | |
| Hareketli Faz A | Su (hacimce % 2 Asetik asit içeren) |
| Hareketli Faz B | %100 Asetonitril |
| Pompa B | |
| Hareketli Faz A | Asetonitril:Su (hacimce % 2 Asetik asit içeren); 25:75 |
| Hareketli Faz B | Asetonitril:Su (hacimce % 2 Asetik asit içeren); 30:70 |
| Hareketli Faz C | Asetonitril:Su (hacimce % 2 Asetik asit içeren); 60:40 |
| Enjeksiyon Hacmi | 100 µL |
| Akış Hızı | 0.5 mL/dk |
| Çözücü Gradyent Programı | 5.00→ Pompa B (A kanalı) 5.01→ Pompa B (B kanalı) 7.99→ Akış hızı (0.3 mL/dk) 8.00→ İki-boyut (2D) için valf döner 8.00→ Akış hızı (1 mL/dk) 15.00→ Pompa B (B kanalı) 15.01→ Pompa B (C kanalı) 22.00→ Tek-boyut (1D) için valf döner 22.00→ Akış hızı (1 mL/dk) 22.01→ Akış hızı (0.3 mL/dk) 29.00→ Pompa B (C kanalı) 29.01→ Pompa B (A kanalı) 35.00→ Program biter |
| Dedektör | Kazanım: 4x Hassasiyet: Yüksek |
| Kolon Fırını Sıcaklığı | 40°C |

3.2.6. İmmünoafinite-Katı Faz Özütleme İşleminin Uygulanabilirliği

Gerçek örneklerden OTA özütleme çalışmasına geçmeden önce immünoafinite-katı faz özütleme işleminin Ochraprep® kolonları ile uygulanabilirliğine bakılmıştır. Bu amaç doğrultusunda iki farklı derişimdeki OTA örneği hazırlanmış, Ochraprep kolondan geçirilmiş ve ardından OTA örnekleri Ochraprep kolondan elüe edilmiştir. R-Biopharm Rhone® tarafından tavsiye edilen HPLC methodu ile ters faz C18 kolonu kullanılarak elüe edilen OTA örneklerinin analizleri gerçekleştirilmiştir. İmmünoafinite-katı faz özütleme işleminin ne kadar verimli olduğunu görebilmek için aynı derişimde hazırlanan OTA örnekleri Ochraprep kolonu kullanmadan doğrudan ters faz C18 kolonuna verilmiştir. HPLC parametreleri Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Ters faz C18 kolonu HPLC parametreleri.

| HPLC Parametreleri | |
|------------------------|---|
| Hareketli Faz | Asetonitril: Su: Asetik Asit (51:47:2 v/v/v) |
| Kolon | Inertsil ODS-3 150 X 4.6mm, 5µm (Ters faz C18 kolonu) |
| Enjeksiyon Hacmi | 100 µL |
| Akış Hızı | 1.0 mL/dk |
| Çözücü Programı | İzokratik |
| Dedektör | Kazanım: 4x Hassasiyet: Yüksek |
| Kolon Fırını Sıcaklığı | 40°C |

3.2.7. Gerçek Örneklerden OTA Özütlemesi





Gerçek örneklerden OTA özütleme çalışmaları dört farklı numune kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, piyasadan rastgele satın alınan bira, şarap, mısır, kahve numuneleri kullanılmıştır. Bira ve şarap numunesi doğrudan kullanılmış, mısır numunesi mutfak tipi bir doğrayıcı kullanılarak küçük parçalara ayrılıp havanda öğütülmüş ve kahve numunesi de el blenderı yardımı ile homojenizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen homojenizat, süzme kağıdı (Whatman No: 4) içine bir miktar cam pamuk koyularak süzülmüştür. Bu aşamada

numunelerin OTA içerip içermediği, immünoafinite-katı faz özütleme işlemi Ochraprep® (R-Biopharm Rhone®, Şekil 3.2) kolonları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ochraprep® kolonları ile özütleme işlemi her numune için farklı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Gıda örnekleri için Ochraprep® özütleme aşamalarının ayrıntıları Çizelge 3.5’de anlatılmıştır.



Şekil 3.2. Ticari Olarak Satılan Ochraprep® kolonlar.

Çizelge 3.5. Gıda örnekleri için Ochraprep® özütlemeye aşamaları.

| Kahve ve Tahıl Örnekleri | | |
|---|---|--|
| <p>Kahve;</p> <p>50 g kahve + 100 mL % 1'lik sodyum bikarbonat</p> <p>↓</p> <p>2 dk blender</p> <p>↓</p> <p>Filtrasyon (Whatman 4)</p> <p>↓</p> <p>5 mL süzüntü+5 mL % 0.1'lik Tween 20 pH 7.4</p> <p>↓</p> <p>Ochraprep kolon aşaması</p> <p>↓</p> <p>20 mL % 0.1'lik Tween 20 içeren pH 7.4 tampon (kolon yıkama)</p> <p>↓</p> <p>1.5 mL metanol:asetik asit (98:2)'i 3 defa kolondan geçirme</p> <p>↓</p> <p>1.5 mL saf su kolondan geçirerek toplamda 3 mL toksin alma</p> <p>↓</p> <p>100 µL enjeksiyon</p> | <p>Özütleme</p>  <p>Karıştırıcı Filtrasyon/Seyreltme</p>  <p>Adsorpsiyon/Elüsyon</p>  <p>İmmünoafinite Kolon</p> | <p>Mısır;</p> <p>50 g mısır + 200 mL ACN:Su (60:40,v/v)</p> <p>↓</p> <p>2 dk blender</p> <p>↓</p> <p>Filtrasyon (Whatman 4)</p> <p>↓</p> <p>2 mL süzüntü+22 mL pH 7.4</p> <p>↓</p> <p>Ochraprep kolon aşaması</p> <p>↓</p> <p>20 mL pH 7.4 tampon (kolon yıkama)</p> <p>↓</p> <p>1.5 mL metanol:asetik asit (98:2)'i 3 defa kolondan geçirme</p> <p>↓</p> <p>1.5 mL saf su kolondan geçirerek toplamda 3 mL toksin alma</p> <p>↓</p> <p>100 µL enjeksiyon</p> |
| Bira ve Şarap Örnekleri | | |
| <p>Bira 30 dk gazından arındırma (Şarap için gerek yok)</p> <p>↓</p> <p>pH 7.2'ye ayarla (2 M NaOH ile)</p> <p>↓</p> <p>20 mL bira/şarap</p> <p>↓</p> <p>Ochraprep kolon aşaması</p> |  <p>İmmünoafinite Kolon</p> | <p>20 mL pH 7.4 tampon (kolon yıkama)</p> <p>↓</p> <p>1.5 mL metanol:asetik asit (98:2)'i 3 defa kolondan geçirme</p> <p>↓</p> <p>1.5 mL saf su kolondan geçirerek toplamda 3 mL toksin alma</p> <p>↓</p> <p>100 µL enjeksiyon</p> |

Öncelikle 2-8°C sıcaklıktaki immünoafinite kolonlar oda sıcaklığına getirilmiş, ardından Ochraprep® kolonun önündeki ve arkasındaki tıkaçlar çıkarılmış ve homojenize edilip süzölmüş numune örnekleri kendileri için uygun olan yöntemler ile hazırlanıp akış hızı 2-3 mL/dk olacak şekilde Ochraprep® kolonlarından geçirilmiştir. Bu işlemlerin ardından yıkama basamağına geçilmiştir. Yıkama işlemi 20 mL fosfat tamponu, pH 7.4 çözeltisi (kahve numunesi için 20 mL % 0.1'lik Tween 20 içeren pH 7.4 tampon) ile gerçekleştirilmiş ve OTA 1.5 mL metanol:asetik asit (98:2) çözeltisi ile kolondan 3 kez geçirilerek elüe edilmiştir. Ardından Ochraprep® kolonları 1.5 mL su ile yıkanmış ve elde edilen 3 mL elüat çözeltisi, HPLC hareketli fazı ile (metanol: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); 25:75,v/v) seyreltilmiş ve iki-boyutlu HPLC sistemi ile 100 µL enjeksiyon edilerek analiz edilmiştir. OTA içermediği kesinleşen numunelere, P(HEMAPA) monolitik kolona uygulanmadan hemen önce OTA standart karışımı eklenerek, OTA derişimleri bilinen gıda numuneleri elde edilmiştir. Daha sonra, elde edilen çözeltiler, P(HEMAPA) monolitik kolon ile ve ticari Ochraprep® kolonları ile etkileştirilmiştir. Elde edilen veriler P(HEMAPA) monolitik kolonun etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

3.2.8. P(HEMAPA) Monolitik Kolonların Tek ve İki-Boyutlu HPLC Sisteminde Tekrar Kullanılabilirliği

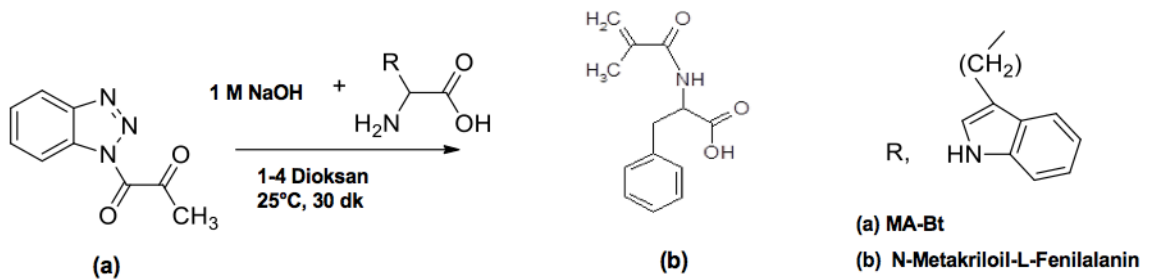
P(HEMAPA) monolitik kolonların tek-boyutlu ve iki-boyutlu HPLC sisteminde tekrar kullanılabilirliklerini belirlemek amacıyla gün içi ve günler arası tekrar kullanılabilirlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Her iki çalışma için de düşük ve yüksek derişimde (0.5 ve 4 ng/mL) olmak üzere iki farklı OTA çözeltisi hazırlanmıştır. Gün içi tekrar kullanılabilirlik için hazırlanan OTA çözeltileri aynı monolitik kolonlar ile ardı ardına 10 kez tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon işlemine tabi tutulmuştur. Günler arası tekrar kullanılabilirlik çalışması ise aynı monolitik kolonlar ile ardı ardına 10 ayrı haftada, taze OTA çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Piyasadaki Okratoksin A kolonlarına alternatif kolonlar oluşturmak için sunulan tez çalışması 4 ana başlık altında toplanmıştır: (i) L-fenilalanin molekülünün polimerleşebilen türevi olan MAPA monomeri ile afinite etkileşimleri temeline dayalı hidrofobik P(HEMA) monolitik HPLC kolonları hazırlanmış ve karakterize edilmiş; (ii) hazırlanan P(HEMA) monolitik kolonları ile okratoksin A analiz koşullarının optimizasyonu tek-boyutlu HPLC sisteminde belirlenmiştir; (iii) L-fenilalanin molekülünden polimerleştirilen P(HEMA) monolitik kolon 1. Kolon olarak, 2. Kolon olarak da ters faz C18 kolonları HPLC sistemine bağlanmış iki-boyutlu HPLC uygulamalarında Okratoksin A analizi incelenmiş ve gıda maddelerindeki (bira, şarap, mısır ve kahve) Okratoksin A eş zamanlı olarak tespit edilmiştir; (iv) son aşamada ise P(HEMA) monolitik kolonlarının iki-boyutlu sistemdeki kullanımının etkinliğinin belirlenmesi için piyasada ticari olarak satılan standart okratoksin A kolonları Ochraprep® de kullanılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar başlıklar halinde tartışılarak açıklanmaya çalışılmıştır.

4.1. N-Metakriloil-L-Fenilalanin (MAPA) Monomerin Karakterizasyonu

Fonksiyonel monomer MAPA, L-fenilalanin ve metakriloil grubu taşıyıcısı MA-Bt'nin tepkimesi ile literatüre uygun olarak sentezlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. MAPA monomerinin sentez reaksiyonu.

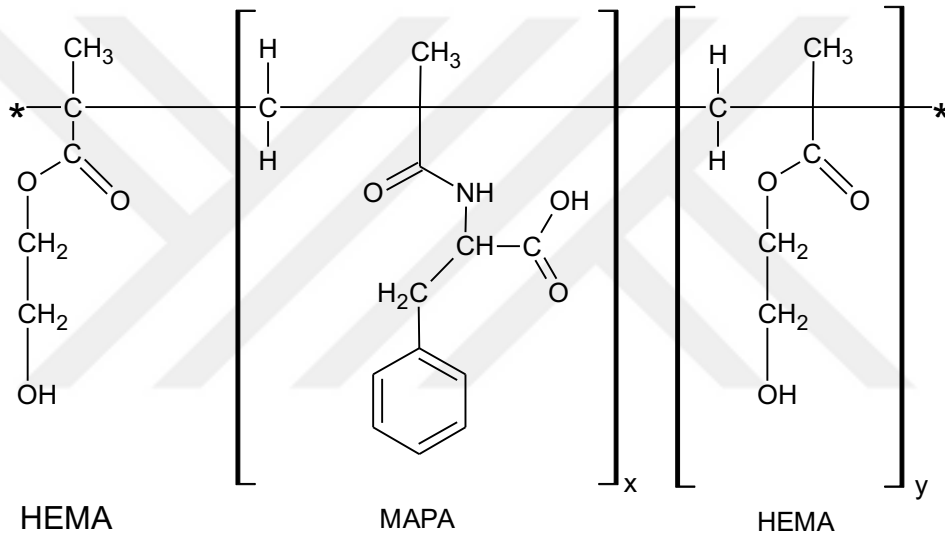
Sentezlenen MAPA monomerinin kimyasal yapısının belirlenmesinde kullanılan yöntem FTIR-ATR tekniğidir. FTIR-ATR spektrumunda 3368 cm^{-1} civarında $-\text{OH}$ bandı; 2976 cm^{-1} de alifatik ve 3064 cm^{-1} ve 3031 cm^{-1} de aromatik CH gerilme bandları belirlenmiştir. 1733 cm^{-1} de 1660 cm^{-1} ve 1622 cm^{-1} de ise sırasıyla karbonil ($\text{C}=\text{O}$) ve amit I ve amit II bandları belirlenmiştir. Aromatik $\text{C}=\text{C}$ eğilme bandları 1527 cm^{-1} civarında görülmüştür. FTIR-ATR spektrumundan elde edilen

veriler ışığında MAPA monomerinin literatüre uygun şekilde başarıyla sentezlendiği görülmektedir.

4.2. P(HEMA) ve P(HEMAPA) Monolitik Kolonların Karakterizasyonu

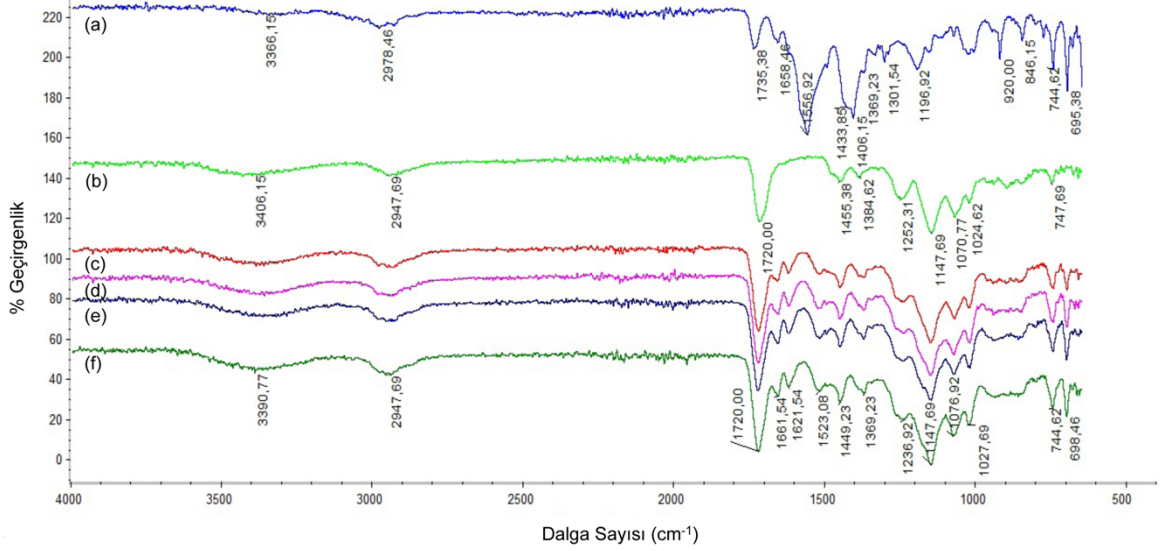
4.2.1. FTIR-ATR ile Yapı Analizi

P(HEMAPA) monolitik kolonların sentezlenmesi için HEMA ve N-Metakriloil-L-fenilalanin (MAPA) monomerlerinin yığın polimerizasyonu uygulanmıştır. Farklı miktarlarda MAPA içeren P(HEMAPA) monolitik kolonların her biri FTIR-ATR spektroskopisi ile incelenmiş ve farklı miktarlardaki MAPA oranının polimerik yapıda oluşturmuş olduğu farklılık gözlenmiştir. Şekil 4.2'de P(HEMAPA) monolitik kolonların olası kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 4.2. P(HEMAPA) monolitik kolonların olası kimyasal yapısı.

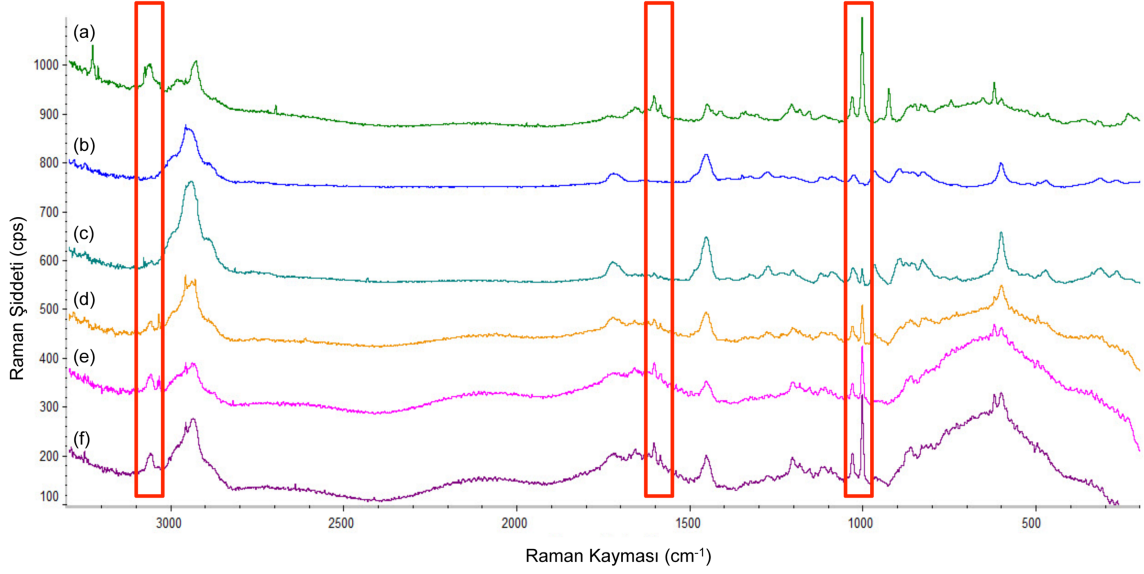
Şekil 4.3'de görüldüğü gibi MAPA monomeri, P(HEMA) ve farklı miktarlarda MAPA içeren P(HEMAPA) monolitik kolonların -OH gruplarının gerilme titreşimleri 3360-3410 cm⁻¹ aralığında ve alifatik -CH gerilme bandı yaklaşık 2950 cm⁻¹'de görülmektedir. C-N simetrik ve C-N asimetric bandları sırasıyla yaklaşık 1070 cm⁻¹ ve 1450 cm⁻¹'de görülmektedir. P(HEMAPA) monolitik kolonlarda amid I ve amid II bandlarını 1661 cm ve 1621 cm⁻¹ civarında görülmektedir. Ayrıca 695 cm⁻¹ ve 744 cm⁻¹ civarındaki piklerin şiddetinde artışlar görülmektedir. Bu bandların şiddetindeki artış, MAPA monomerinin yapısında bulunan aromatik halkadan kaynaklanmaktadır. Bu FTIR-ATR spektrum sonuçları, MAPA monomerinin polimer yapıya başarılı bir şekilde girdiğini ve polimerizasyona eklenen MAPA miktarının polimerik yapıdaki MAPA oranıyla doğrusal olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.3. MAPA monomeri, P(HEMA) ve farklı miktarlarda MAPA monomeri içeren P(HEMA) monolitik kolonlara ait FTIR-ATR spektrumları. (a) MAPA monomeri; (b) P(HEMA); (c) P(HEMA)-1; (d) P(HEMA)-2; (e) P(HEMA)-3; (f) P(HEMA)-4.

4.2.2. Raman ile Yapı Analizi

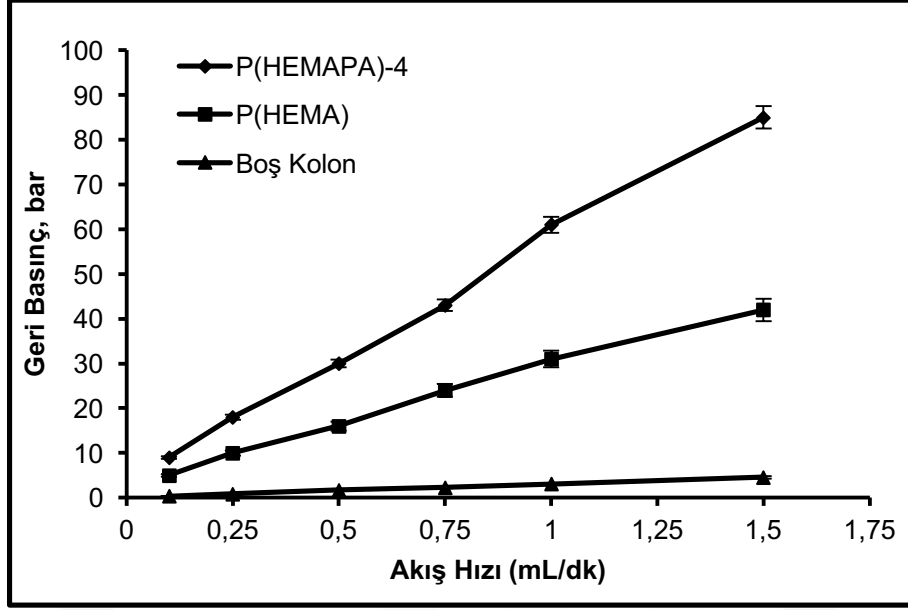
P(HEMA) monolitlerin kimyasal yapı analizi için RAMAN spektroskopisi yöntemi uygulanmıştır (Şekil 4.4). Polimerik yapı içerisinde MAPA monomerinin girdiğini göstermek amacıyla P(HEMA), P(HEMA) monolitik kolonlarının ve MAPA monomerinin RAMAN spektrumları alınmıştır. MAPA monomerine ait spektruma bakıldığında 3060 cm^{-1} , 1604 cm^{-1} , 1585 cm^{-1} ve 1005 cm^{-1} civarlarında görülen $-\text{CH}=\text{CH}$, amid bandı, aromatik/hetero halka ve aromatik halka görülmektedir. P(HEMA) monolitik kolonlarında bu bandlara rastlanmazken, farklı MAPA miktarlarına sahip P(HEMA) monolitik kolonlarda söz edilen bandlar açıkça görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi P(HEMA) monolitik kolonlarda MAPA miktarının artması ile birlikte 3060 cm^{-1} , 1604 cm^{-1} , 1585 cm^{-1} ve 1005 cm^{-1} civarlarında görülen bandların şiddetlerindeki artış değerleri yükselmektedir. Bu sonuçlar polimerik yapıya MAPA monomerinin girdiğini ve polimerizasyona eklenen MAPA miktarının polimerik yapıdaki MAPA oranıyla doğrusal olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.4. MAPA monomeri, P(HEMA) ve farklı miktarlarda MAPA monomeri içeren P(HEMAPA) monolitik kolonlara ait RAMAN spektrumları. (a) MAPA monomeri; (b) P(HEMA); (c) P(HEMAPA)-1; (d) P(HEMAPA)-2; (e) P(HEMAPA)-3; (f) P(HEMAPA)-4.

4.2.3. Geri Basınç-Akış Hızı İlişkisinin İncelenmesi

P(HEMAPA)-4, P(HEMA) ve boş kolonlarda su kullanılarak akış hızı 0.1-1.5 mL/dk aralığında değiştirilerek geri basınç-akış hızı ilişkisi incelenmiştir. Şekil 4.5'de görüldüğü gibi tüm kolonlarda geri basınç değerleri artan akış hızı ile birlikte doğrusal bir değişim göstermektedir. P(HEMAPA)-4 monolitik kolondan su geçirilirken elde edilen geri basınç değerleri P(HEMA) kolonuna göre daha yüksektir. Değerlerden de görüldüğü üzere hidrofobik özelliğe sahip olan fonksiyonel MAPA monomerinin P(HEMAPA)-4 kolonun yapısına girdiği görülmüştür. Ayrıca hazırlanan monolitik kolonların yüksek akış hızlarında bile HPLC pompalarının tolere edebileceği düzeyde geri basınç göstermektedirler.



Şekil 4.5. P(HEMAPA)-4, P(HEMA) ve boş kolonlarda geri basınç-akış hızı ilişkisinin incelenmesi. Akış hızı: 0.1-1.5 mL/dk.

4.2.4. Elementel Analiz

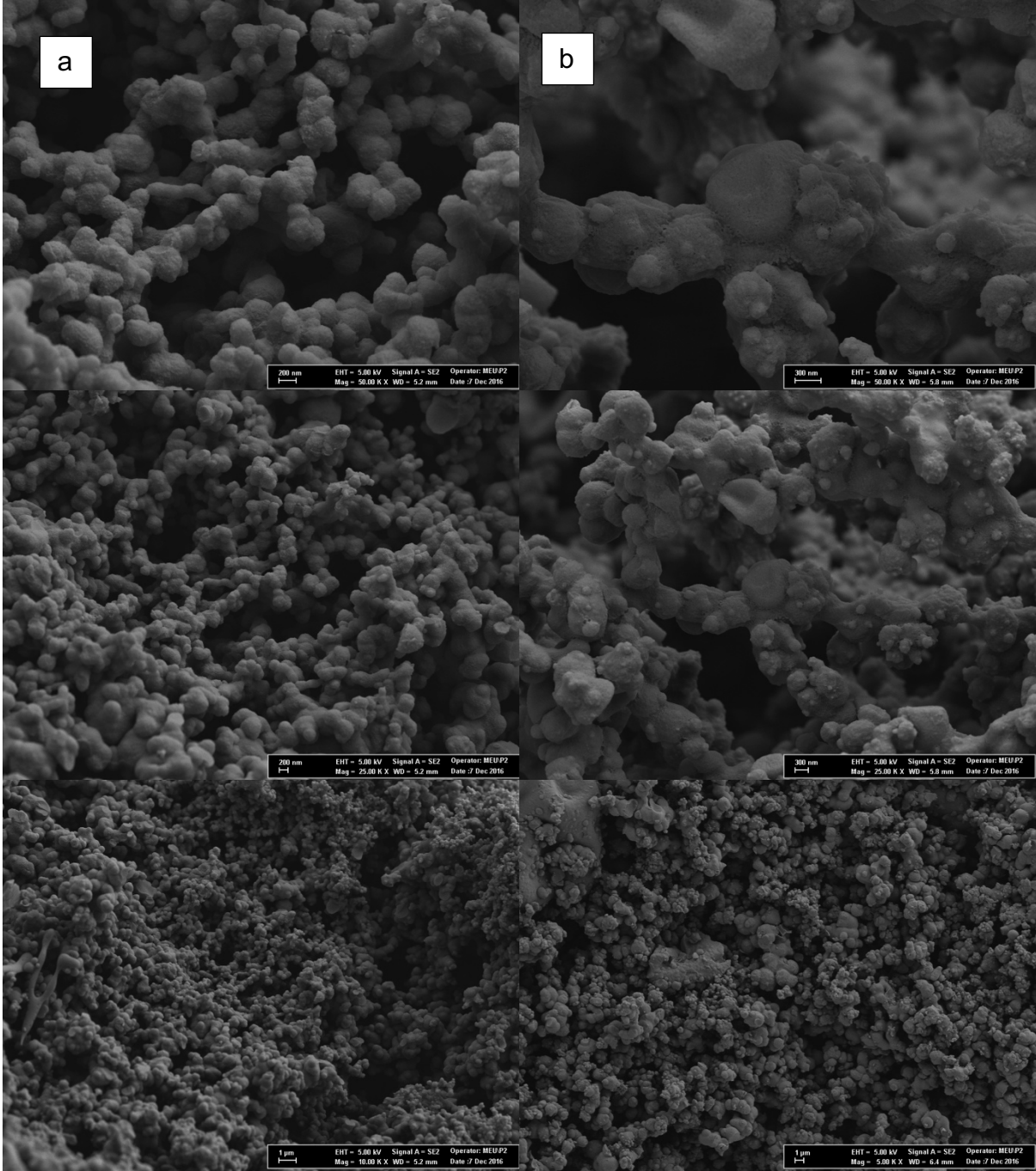
P(HEMAPA) monolitik kolonların yapısına ilave edilen MAPA miktarını belirlemek üzere elementel analiz ölçümleri yapılmıştır. Elementel analiz sonuçları monolitik kolonların yapısındaki % olarak azot (N), karbon (C) ve hidrojen (H) miktarlarını vermektedir. Yapıya giren MAPA miktarının belirlenebilmesi için P(HEMAPA) monolitik kolonlar elementel analize tabi tutulmuş ve MAPA miktarı azot sitokiyometrisinden faydalanılarak bulunmuştur. Çizelge 4.1'de P(HEMAPA) monolitik kolonların elementel analiz sonuçları özetlenmiştir. P(HEMAPA) monolitik kolonun sentezlenmesinde kullanılan HEMA monomerinin yapısında azot bulunmadığından dolayı P(HEMAPA) monolitik kolonun yapısına ilave edilen azotun kaynağı sadece MAPA'dır. Elementel analiz sonucundan görüldüğü gibi P(HEMAPA) monolitik kolonlarda yer alan MAPA miktarına bağlı olarak, elementel analiz sonuçlarından hesaplanan ve polimer yapısına giren MAPA miktarının da arttığı gözlenmiştir. Ayrıca P(HEMAPA) monolitik kolonların yapısına ilave edilen MAPA monomerinin ortalama % 97.37 oranında dönüşüm yaptığı hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1. P(HEMA) monolitik kolonların elementel analiz sonuçları.

| Monolitik kolonlar | MAPA miktarı, $\mu\text{mol/g}$ monolit |
|--------------------|---|
| P(HEMA)-1 | 70.8 |
| P(HEMA)-2 | 111.6 |
| P(HEMA)-3 | 167.8 |
| P(HEMA)-4 | 243.6 |

4.2.5. Yüzey Morfolojisi

P(HEMA) ve P(HEMA) monolitik kolonların yüzey morfolojisi ve iç yapısı, taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Monolitik kolonların SEM fotoğrafları Şekil 4.6'da verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi monolitik kolonların gözenek boyutları 0.2-1.0 μm arasında değişmektedir. Yığın polimerizasyonu ile hazırlanan monolitik kolonlar oldukça pürüzlü ve farklı boyutta gözenek yapılarına sahiptirler. Gözeneklilik nedeniyle de oldukça büyük yüzey alanına sahiptirler. Monolitik kolonların ana gözenek yapısı makrogözenekler tarafından oluşmaktadır. Makrogözenekler, monolitik kolonlar ile OTA'nın arasında etkili bir etkileşim sağlamaktadır. Monolitik kolonlar birbiriyle bağlantılı geniş akış kanallarına ve makrogözeneklere sahip olduğu için OTA özütlerinin hareketli faz ile kolayca akışına olanak sağlamakta, böylece iletimle kütle transferi gerçekleşmektedir. Ayrıca, bu yapısal özellik sayesinde difüzyonel kütle transfer direnci azalmaktadır. Sonuç olarak, OTA özütleri sadece difüzyonel kütle transferi ile değil aynı zamanda iletimli kütle transferi ile monolitik kolonlarda taşınmakta ve böylece OTA adsorpsiyon kapasitesinin artmasına neden olmaktadır.



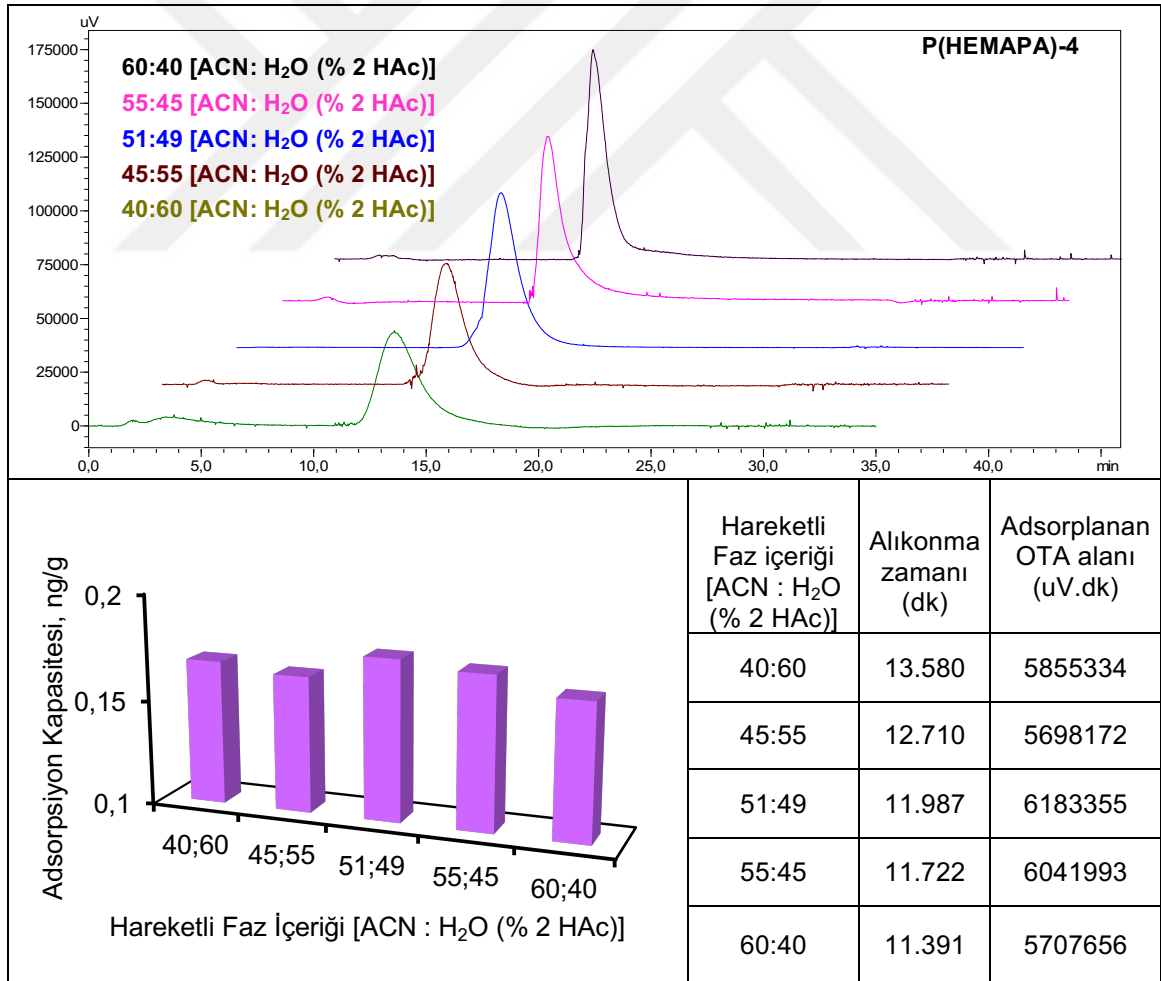
Şekil 4.6. Monolitik kolonların SEM fotoğrafları. (a) P(HEMA), (b) P(HEMA)-4.

4.3. P(HEMA) Monolitik Kolonun Tek-Boyutlu Kullanımı İçin Adsorpsiyon Koşullarının Optimizasyonu

4.3.1. Hareketli Faz Etkisinin İncelenmesi

P(HEMA)-4 monolitik kolonda OTA adsorpsiyon çalışmaları farklı hareketli faz içeriklerinde incelenmiştir. Kullanılan hareketli faz içerikleri farklı oranlardaki ACN: H₂O (% 2 HAc içeren) (40:60; 45:55; 51:49; 55:45; 60:40) ile hazırlanmıştır. Hareketli fazın etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan deneyler, 40°C sabit

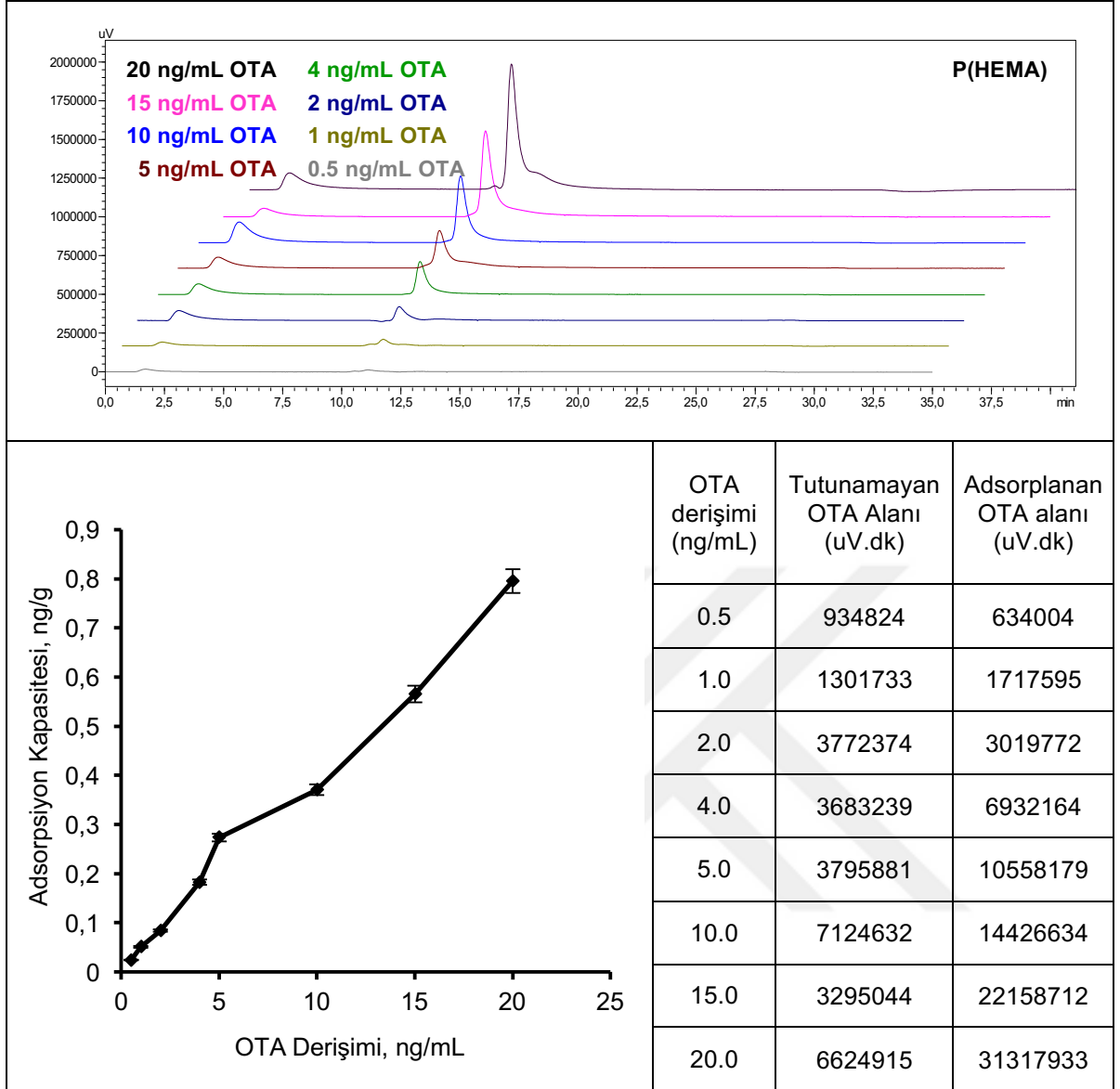
sıcaklıkta, 2.0 ng/mL OTA derişiminde, 0.5 mL/dk akış hızında ve 100 µL enjeksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. P(HEMA)PA-4 monolitik kolon ile farklı hareketli faz içeriklerinde elde edilen OTA molekülüne ait kromatogramlar ve kromatografik parametreler Şekil 4.7'de verilmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi P(HEMA)PA-4 monolitik kolon ile farklı hareketli faz içeriklerinde OTA adsorpsiyon kapasitelerine bakıldığında OTA adsorpsiyon kapasitelerinde çok önemli bir fark olmadığı gözlenmiştir. Ancak hareketli faz içeriğindeki ACN miktarı artınca alıkonma zamanı kısalır. OTA zayıf bir asit olduğu için, kolona spesifik olmayan adsorpsiyonu azaltmak ve güçlü pik kuyruklanmasının önüne geçmek için kullanılan hareketli fazın asidik olması gerekmektedir [53]. Bu yüzden seyreltik asetik asit ile asetonitril karışımı kullanılmaktadır [37, 180]. Pik şekilleri ve alıkonma zamanları dikkate alındığında en uygun hareketli faz içeriğinin 51:49 [ACN: H₂O (% 2 HAc)] olduğu görülmüştür.



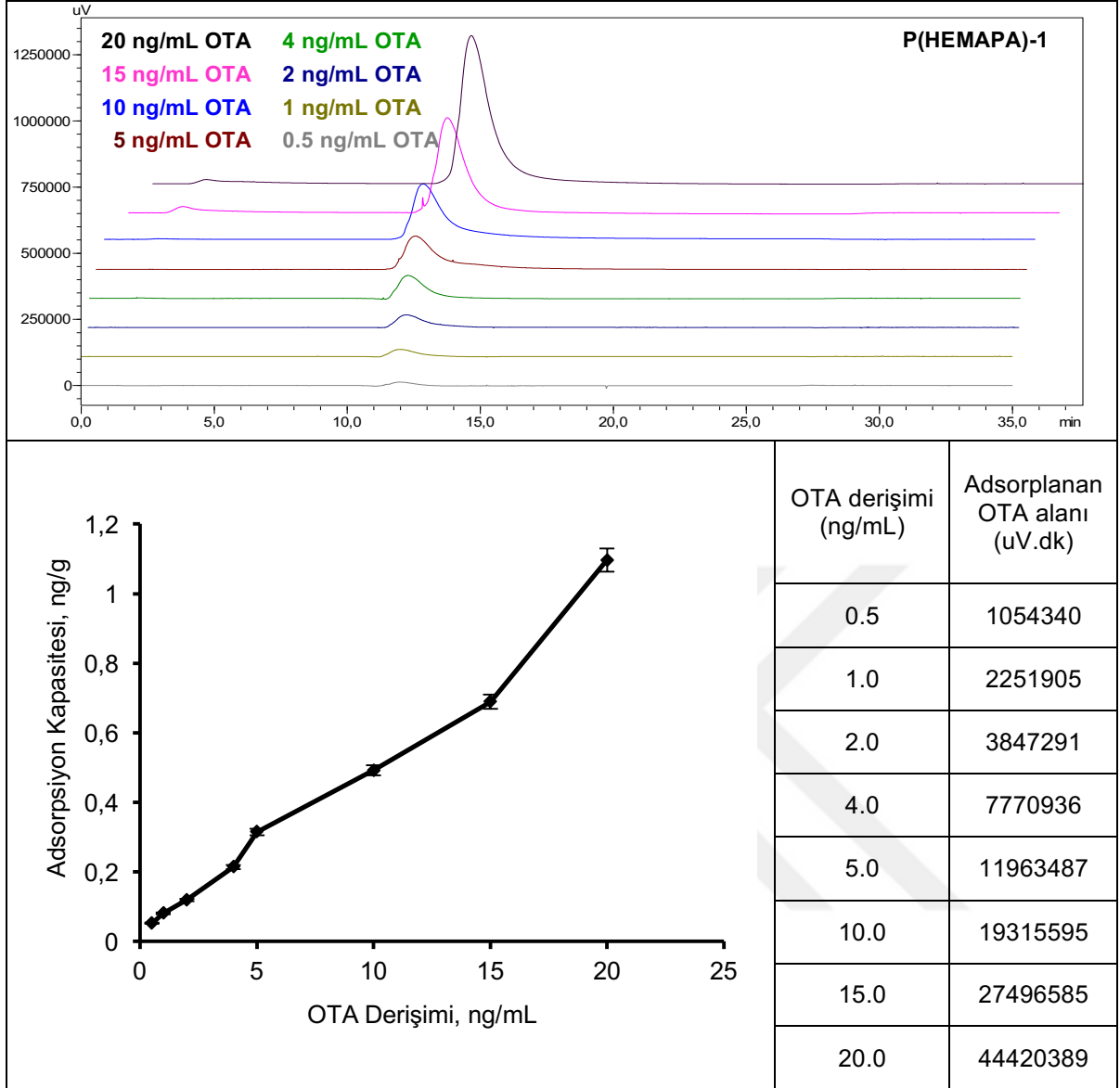
Şekil 4.7. P(HEMA)PA-4 monolitik kolonda OTA adsorpsiyonuna hareketli faz etkisi. OTA derişimi: 2.0 ng/mL; Sıcaklık: 40°C; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL; Akış hızı: 0.5 mL/dk.

4.3.2. OTA Derişim Etkisinin İncelenmesi

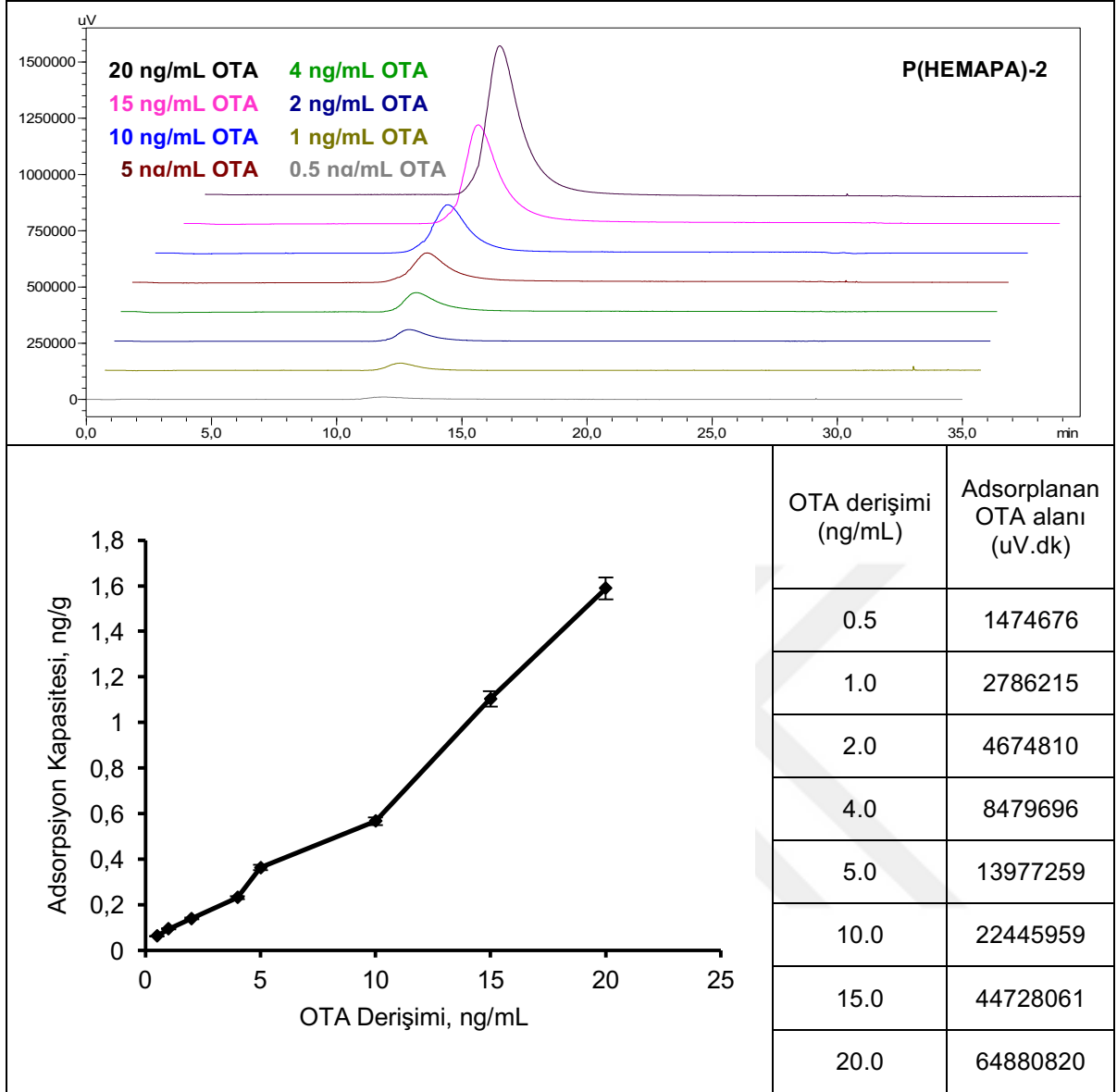
P(HEMA), P(HEMAPA)-1, P(HEMAPA)-2, P(HEMAPA)-3 ve P(HEMAPA)-4 monolitik kolonlarda OTA başlangıç derişiminin adsorpsiyona olan etkisi incelenmiş ve Şekil 4.8-4.13'de ilgili adsorpsiyon grafiği ve kromatogramlar verilmektedir. OTA başlangıç derişimi 0.5-20 ng/mL aralığında değiştirilmiştir. P(HEMA), P(HEMAPA)-1, P(HEMAPA)-2, P(HEMAPA)-3 ve P(HEMAPA)-4 monolitik kolonlarda birim monolit kütlesi başına adsorplanan OTA miktarları Şekil 4.13'de gösterilmektedir. Şekillerden görüldüğü gibi OTA derişimi arttıkça yüzeye difüzlenen OTA miktarı ve adsorpsiyon için sürücü kuvvet olan derişim farkı (ΔC) arttığı için adsorpsiyon kapasitesinde derişime bağlı olarak bir artış söz konusudur. 20 ng/mL OTA derişiminde maksimum adsorpsiyon miktarları; P(HEMA) için; 0.79 ng/g; P(HEMAPA)-1 için 1.09 ng/g; P(HEMAPA)-2 için 1.58 ng/g; P(HEMAPA)-3 için 2.25 ng/g ve P(HEMAPA)-4 için 2.82 ng/g olarak belirlenmiştir. Adsorpsiyon kapasitelerinden de görüldüğü gibi P(HEMAPA) monolitik kolonların adsorpsiyon kapasitesi P(HEMA) monolitik kolona göre yüksektir. Bunun nedeni ise OTA adsorpsiyonunun P(HEMA) monolitik kolonlarda seçici olmayan zayıf etkileşimlerden ve monolitik kolonlarının gözenekleri içine OTA difüzyonundan kaynaklanmaktadır. P(HEMAPA) monolitik kolonlarında kolonların yapısında bulunan MAPA monomerinin fonksiyonel grubu ile OTA molekülü arasındaki hidrofobik etkileşimler olduğunu hatırlatmakta fayda vardır.



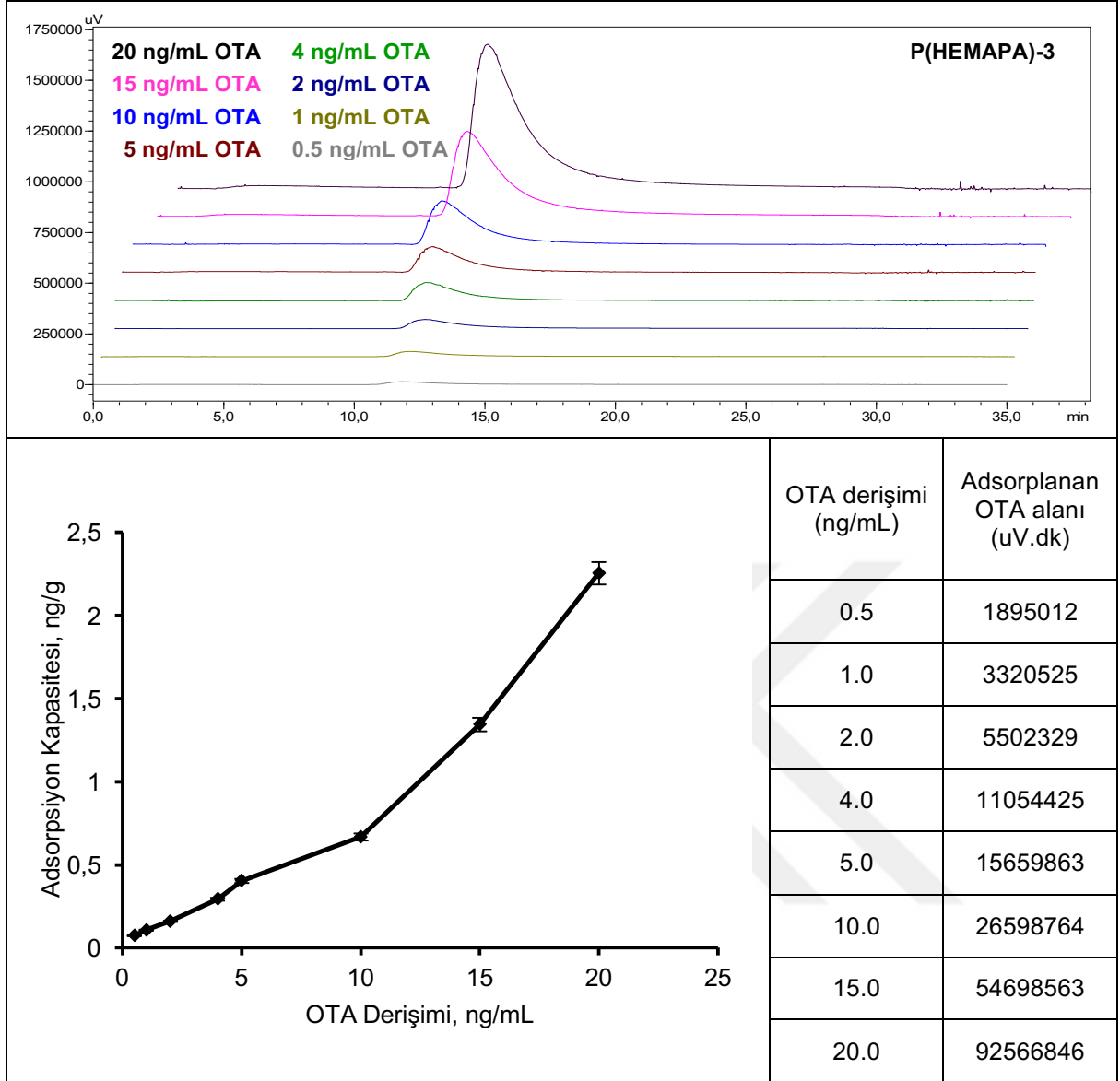
Şekil 4.8. P(HEMA) monolitik kolonda OTA adsorpsiyonuna OTA başlangıç derişimin etkisi. Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Sıcaklık: 40°C; Akış hızı: 0.5 mL/dk.



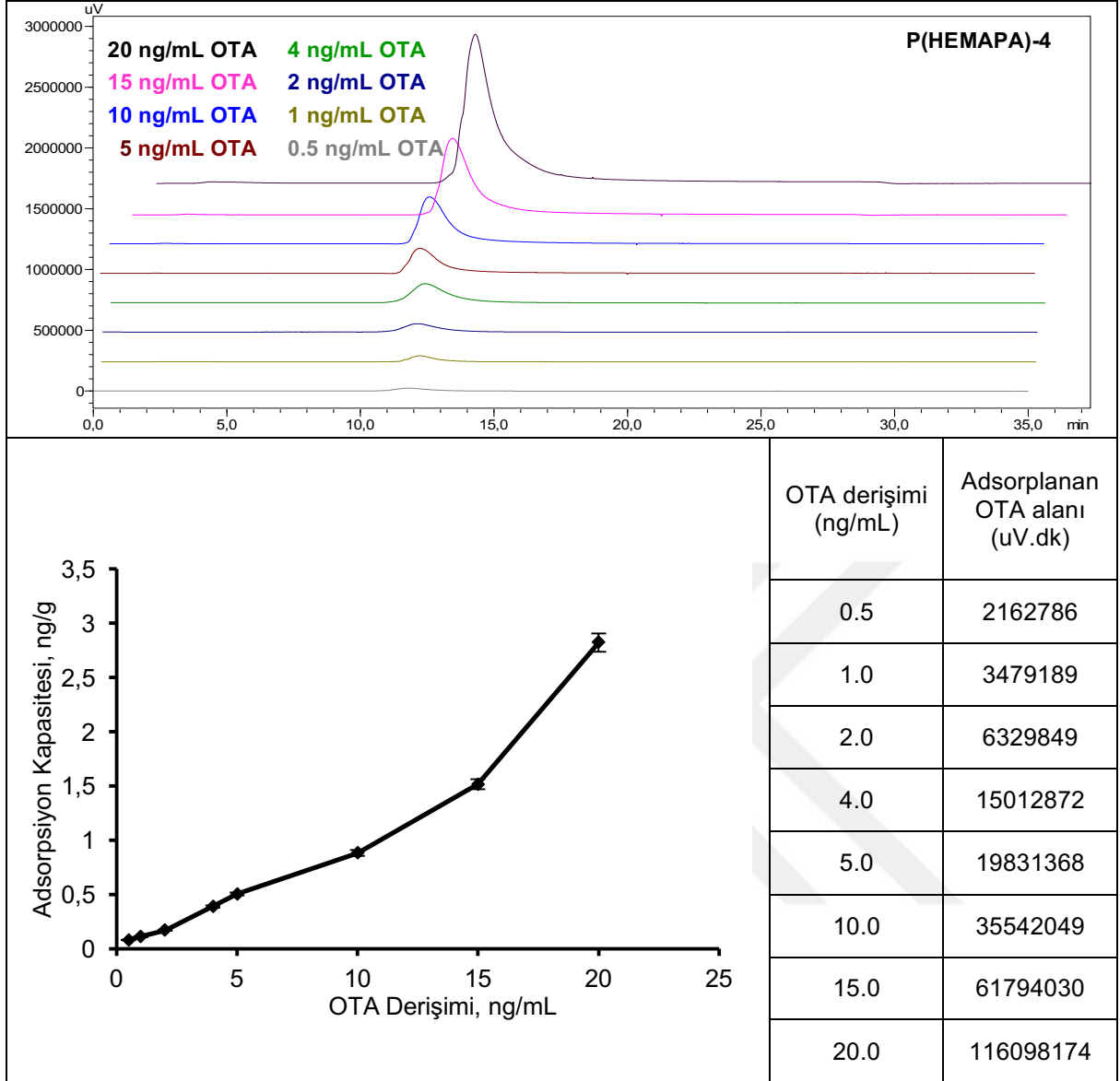
Şekil 4.9. P(HEMA)-1 monolitik kolonda OTA adsorpsiyonuna OTA başlangıç derişimin etkisi. Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Sıcaklık: 40°C; Akış hızı: 0.5 mL/dk.



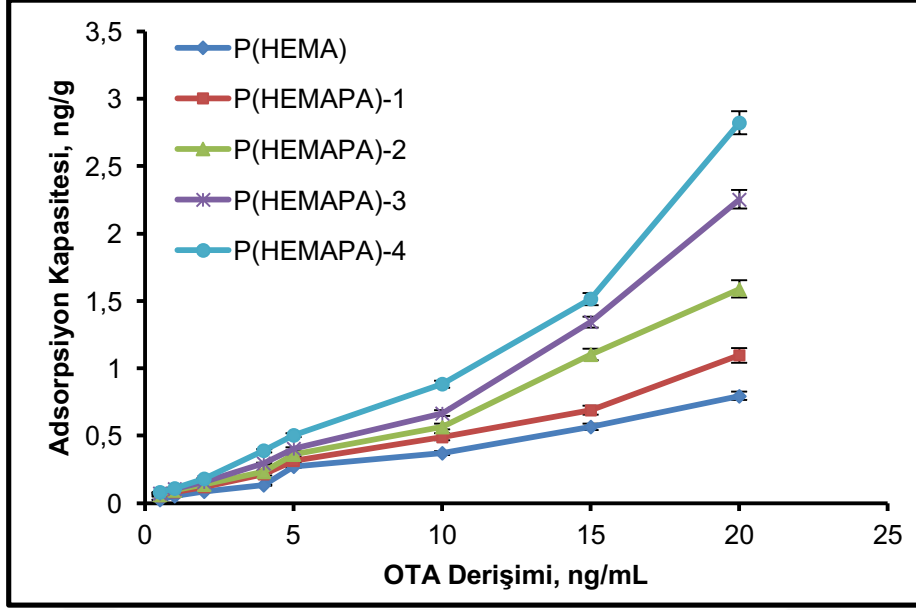
Şekil 4.10. P(HEMA)PA-2 monolitik kolonda OTA adsorpsiyonuna OTA başlangıç derişimin etkisi. Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Sıcaklık: 40°C; Akış hızı: 0.5 mL/dk.



Şekil 4.11. P(HEMA)PA-3 monolitik kolonda OTA adsorpsiyonuna OTA başlangıç derişimin etkisi. Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Sıcaklık: 40°C; Akış hızı: 0.5 mL/dk.



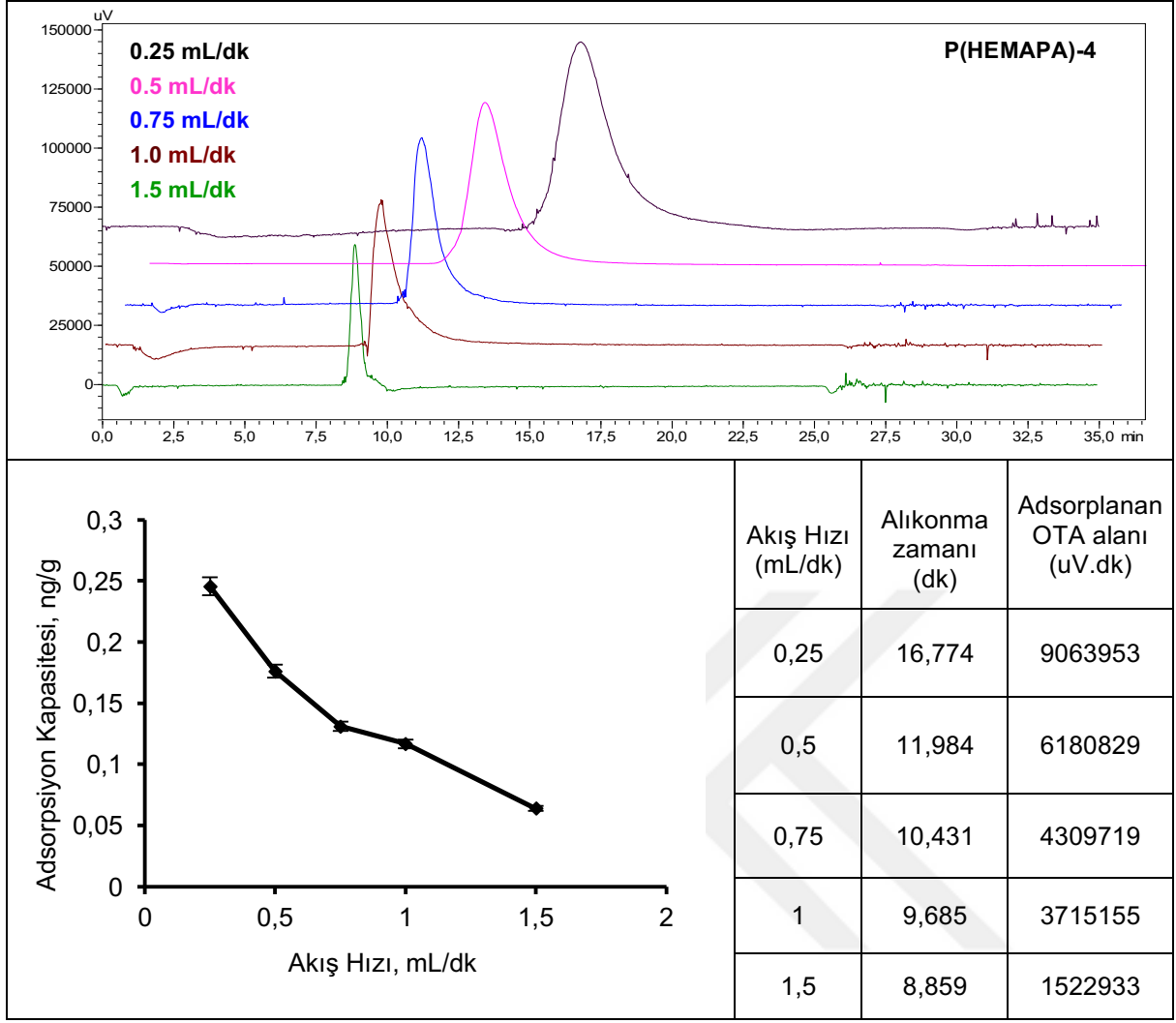
Şekil 4.12. P(HEMA)PAA-4 monolitik kolonda OTA adsorpsiyonuna OTA başlangıç derişimin etkisi. Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Sıcaklık: 40°C; Akış hızı: 0.5 mL/dk.



Şekil 4.13. P(HEMA), P(HEMAPA)-1, P(HEMAPA)-2, P(HEMAPA)-3 ve P(HEMAPA)-4 monolitik kolonlarda OTA adsorpsiyonuna OTA başlangıç derişiminin etkisi. Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Sıcaklık: 40°C; Akış hızı: 0.5 mL/dk.

4.3.3. Akış Hızı Etkisinin İncelenmesi

Akış hızının OTA adsorpsiyonuna etkisini belirlemek için 2 ng/mL derişimindeki OTA çözeltisi P(HEMAPA)-4 monolitik kolonda akış hızı 0.25 mL/dk-1.5 mL/dk aralığında değiştirilmiştir. P(HEMAPA)-4 monolitik kolon ile farklı akış hızlarında yapılan analizlere ait kromatogramlar ve OTA adsorpsiyon kapasiteleri Şekil 4.14'de verilmektedir. Kromatogramlara ait pik simetrisi, alıkonma zamanları ve OTA adsorpsiyon alan değerleri karşılaştırıldığında, akış hızının artması ile birlikte OTA adsorpsiyon kapasitesi önemli miktarda azalmaktadır. Pik simetrisi, alıkonma zamanı, OTA adsorpsiyon alanı ve analiz sırasında harcanan hareketli fazın miktarı dikkate alındığında 0.5 mL/dk'lık akış hızının optimum olduğu sonucuna varılmıştır. OTA adsorpsiyon kapasitesi 0.25 mL/dk akış hızında 0.24 ng/g değerinden 1.5 mL/dk akış hızında 0.06 ng/g değerine azalmaktadır. Akış hızının artması ile OTA moleküllerinin P(HEMAPA)-4 monolitik kolonla etkileşebileceği zaman azalacağından OTA adsorpsiyon miktarı önemli ölçüde azalmaktadır. Ayrıca alıkonma zamanı da akış hızının artması ile azalmaktadır.

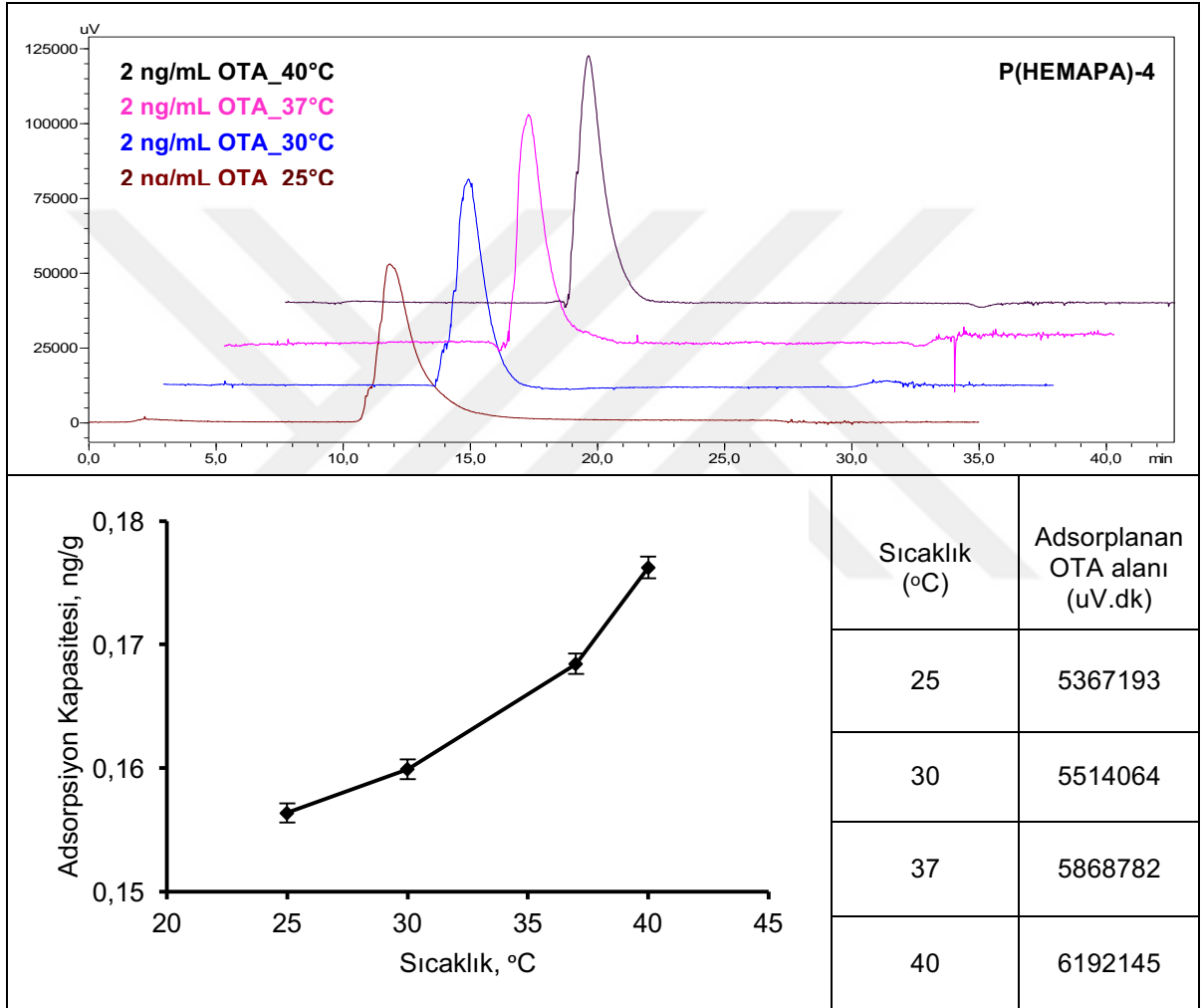


Şekil 4.14. P(HEMA)PA-4 monolitik kolonda OTA adsorpsiyonuna akış hızı etkisi. OTA derişimi: 2.0 ng/mL; Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Enjeksiyon Hacmi: 100 µL; Sıcaklık: 40°C.

4.3.4. Sıcaklık Etkisinin İncelenmesi

P(HEMA)PA-4 monolitik kolonda OTA adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla HPLC kolon fırını sıcaklığı 25°C-40°C aralığında değiştirilmiştir. Şekil 4.15'de ilgili adsorpsiyon grafiği ve kromatogramlarda görüldüğü gibi artan sıcaklıkla birlikte P(HEMA)PA-4 monolitik kolonların OTA adsorpsiyon kapasitesi önemli oranlarda artmaktadır. 25°C'de adsorplanan OTA miktarı 0.16 ng/g iken 40°C'de bu değer 0.18 ng/g olarak bulunmuştur. Adsorpsiyon kapasitesi % 12.82 oranında artmıştır. Bu sonuçlar ışığında P(HEMA)PA-4 monolitik kolonu ile OTA molekülleri arasındaki etkileşimin spesifik olduğunu ve hidrofobik etkileşimle gerçekleştiğinin kanıtıdır ve sıcaklık artışı ile analitlerin etkileşim kinetiği artmaktadır. P(HEMA)PA-4 monolitik kolonun

hazırlanmasında kullanılan MAPA fonksiyonel monomeri hidrofobik bir aminoasit olan fenilalaninden yola çıkılarak sentezlenmiştir. Fonksiyonel monomer olarak fenilalanin seçilmesinin sebebi de tayin edilmek istenilen OTA molekülünün hidrofobik özellikte olmasıdır. Hidrofobik etkileşimler entropi artışıyla yürüyen etkileşimlerdir; sıcaklık artışı da bu etkileşimleri artırma yönünde etkilemektedir [181, 182]. Farklı sıcaklıklarda elde edilen sonuçlardan da görüldüğü gibi artan sıcaklıkla birlikte OTA adsorpsiyon kapasitesi önemli miktarda artmaktadır.

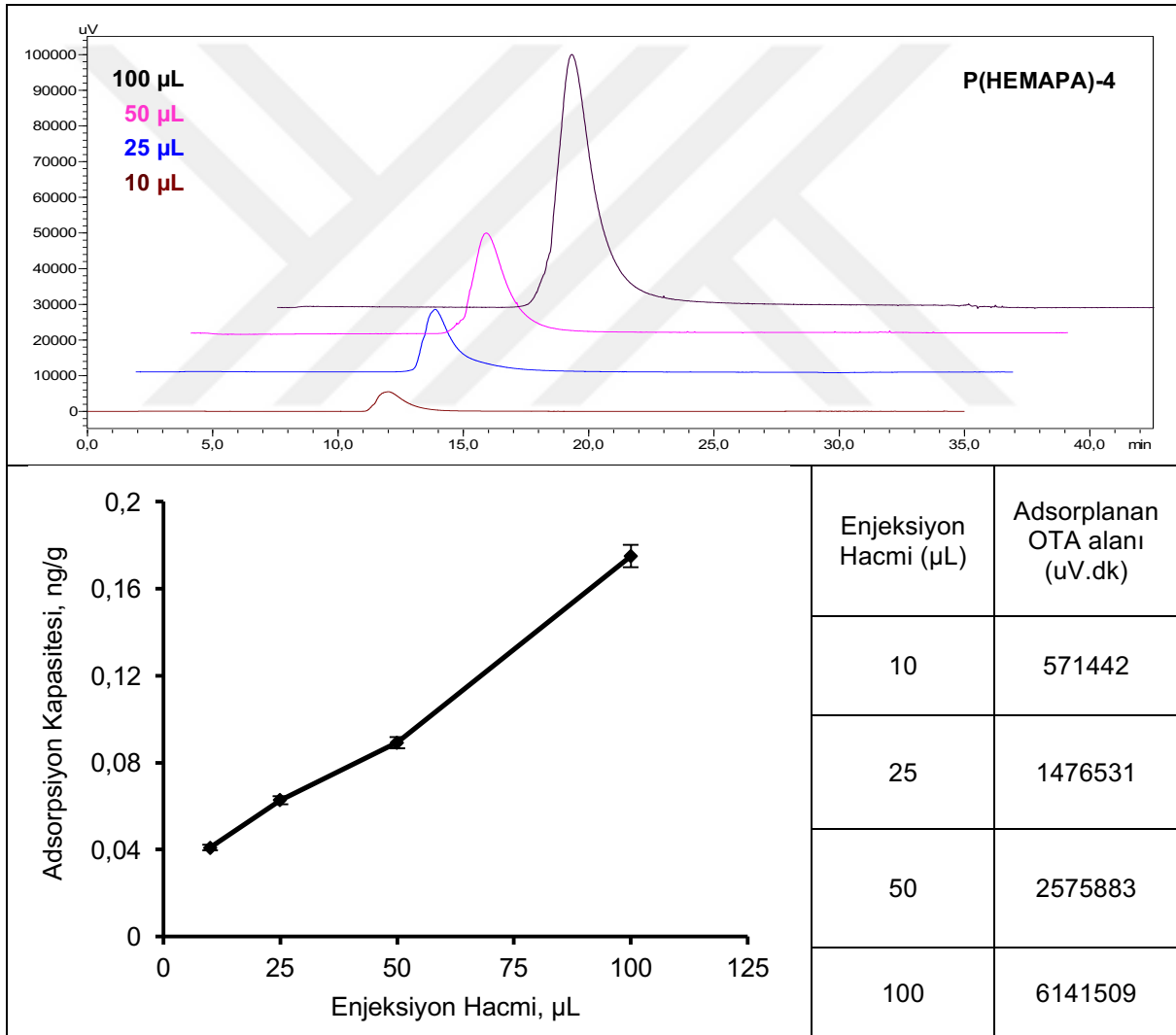


Şekil 4.15. P(HEMAPA)-4 monolitik kolonda OTA adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi. OTA derişimi: 2.0 ng/mL; Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAC içeren); Enjeksiyon Hacmi: 100 µL; Akış hızı: 0.5 mL/dk.

4.3.5. Enjeksiyon Hacmi Etkisinin İncelenmesi

P(HEMAPA)-4 monolitik kolonda OTA adsorpsiyonuna enjeksiyon hacminin etkisini belirlemek amacıyla örnek enjeksiyon hacmi 10 µL-100 µL aralığında değiştirilmiştir. Farklı enjeksiyon hacimlerinde yapılan analizlere ait kroma-

togramlar ve OTA adsorpsiyon kapasiteleri Şekil 4.16'da verilmektedir. Kromatogramlardan görüldüğü gibi 100 µL enjeksiyon hacminde adsorplanan OTA alanı 10 µL enjeksiyon hacmi verildiğinde elde edilen OTA alanının yaklaşık 10 katı kadardır. Bilindiği gibi yüksek enjeksiyon hacmi, düşük kromatografi etkinliğine ve pik genişlemesine neden olmaktadır. Ancak OTA miktarının gıda örneklerinde çok az seviyede bulunmasından dolayı pik genişlemesi ve düşük kromatografi etkinliği gibi olumsuzluklar oluşmamaktadır. Enjeksiyon hacminin artması hassasiyeti arttırmaktadır [183]. Gıda örneklerinde OTA miktarının çok az olduğu göz önüne alınarak enjeksiyon hacminin 100 µL olması gerektiği sonucuna varılmıştır.

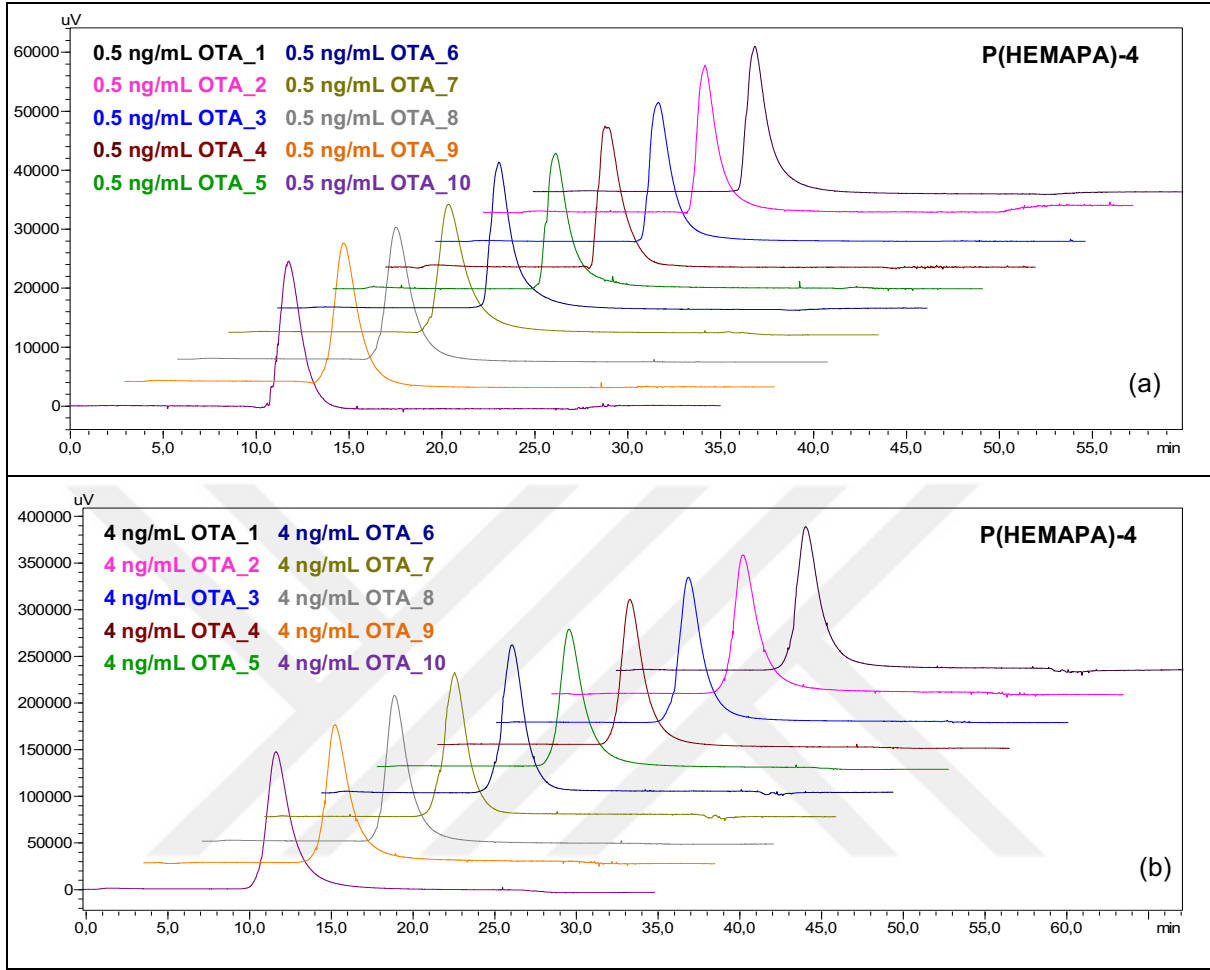


Şekil 4.16. P(HEMA)PA-4 monolitik kolonda OTA adsorpsiyonuna enjeksiyon hacmi etkisi. OTA derişimi: 2.0 ng/mL; Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Sıcaklık: 40°C, Akış hızı: 0.5 mL/dk.

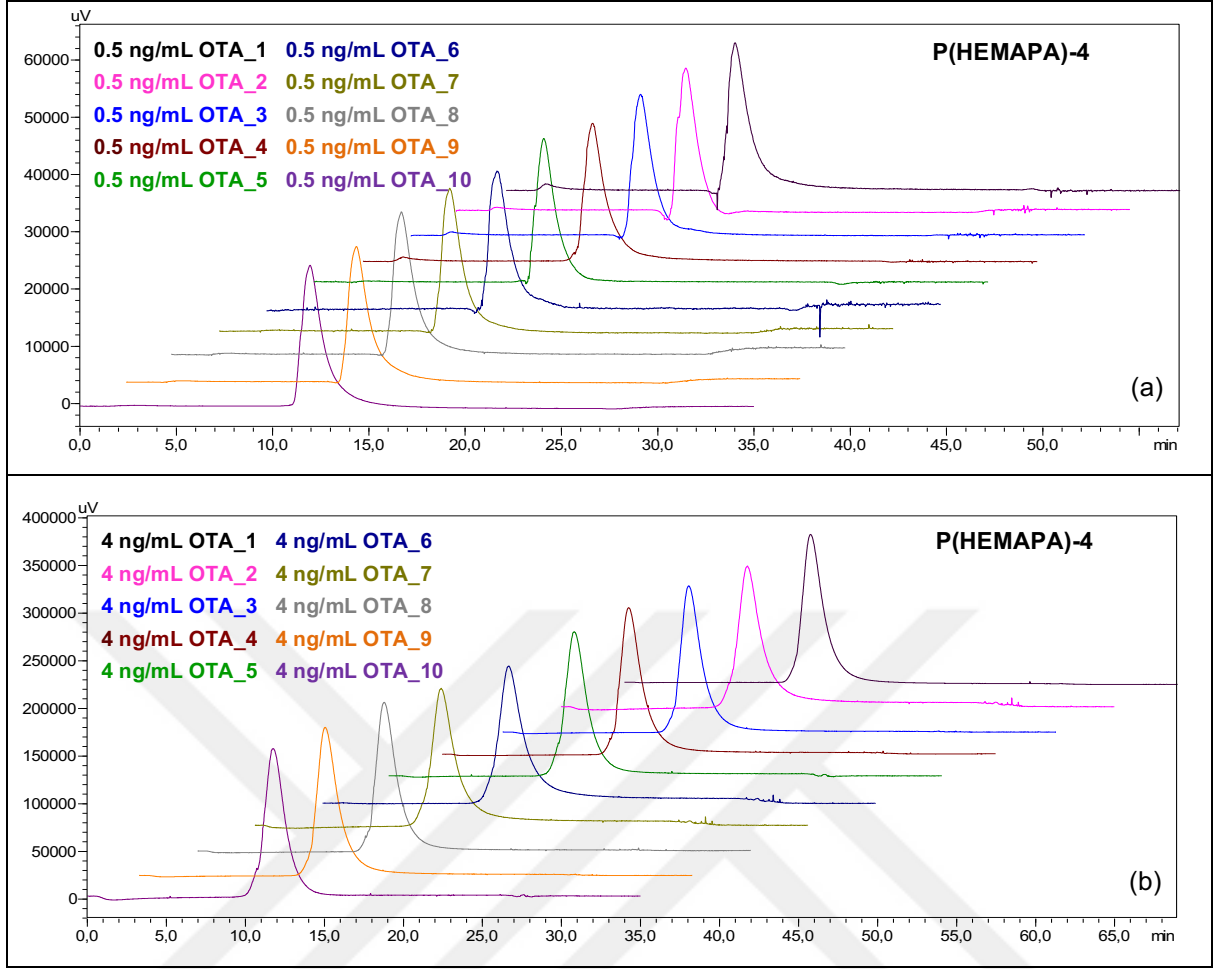
4.3.6. P(HEMAPA) Monolitik Kolonların Tek-Boyutlu HPLC Sisteminde Tekrar Kullanılabilirliği

Hazırlanan monolitik kolonların en önemli özelliklerinden biri defalarca kullanabilmeye olanak vermesidir. Bu amaç doğrultusunda hazırlanan P(HEMAPA)-4 monolitik kolonu ile gün içi ve günler arası tekrar kullanılabilirlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Her iki çalışma için de düşük ve yüksek derişimde (0.5 ve 4 ng/mL) olmak üzere iki farklı OTA çözeltisi hazırlanmıştır. Gün içi tekrar kullanılabilirlik için hazırlanan OTA çözeltileri aynı P(HEMAPA)-4 monolitik kolonu ile ardı ardına 10 kez tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon işlemine tabi tutulmuştur. Günler arası tekrar kullanılabilirlik çalışması ise aynı P(HEMAPA)-4 monolitik kolonu ile ardı ardına 10 ayrı haftada, taze OTA çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. P(HEMAPA)-4 monolitik kolonun gün içi ve günler arası tekrar kullanılabilirliği yüzde göreceli standart sapma (% RSD) ve geri kazanım değerleri üzerinden kontrol edilmiştir [184]. Şekil 4.17-4.20'de ilgili adsorpsiyon grafiği ve kromatogramlarda görüldüğü gibi on döngünün ardından kolon kapasitesinde önemli bir miktarda azalma gözlenmemiştir. Adsorpsiyon grafiklerinden de görüldüğü gibi OTA adsorpsiyon kapasitesi, gün içi tekrar kullanılabilirliğin onuncu döngüsü sonunda 0.5 ng/mL OTA çözeltisi için 0.077 ng/g'dan 0.076 ng/g değerine, 4 ng/mL OTA çözeltisi için 0.395 ng/g'dan 0.392 ng/g değerine düşmüştür. OTA adsorpsiyon kapasitesi, günler arası tekrar kullanılabilirliğin onuncu döngüsü sonunda ise 0.5 ng/mL OTA çözeltisi için 0.077 ng/g'dan 0.075 ng/g değerine, 4 ng/mL OTA çözeltisi için 0.389 ng/g'dan 0.386 ng/g değerine düşmüştür. 0.5 ng/mL ve 4 ng/mL OTA çözeltileri için gün içi tekrar kullanılabilirlik kromatogramlarından elde edilen alan tekrarlanabilirliği % RSD değerleri sırasıyla % 2.57, % 1.53 ve % geri kazanım değerleri sırasıyla % 95.22 ve % 97.54 olarak bulunmuştur. 0.5 ng/mL ve 4 ng/mL OTA çözeltileri için günler arası tekrar kullanılabilirlik kromatogramlarından elde edilen alan tekrarlanabilirliği % RSD değerleri sırasıyla % 2.87, % 1.92 ve % geri kazanım değerleri sırasıyla % 100.57 ve % 96.65 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2). Ayrıca P(HEMAPA)-4 monolitik kolonu ile 1D- ve 2D-HPLC çalışmaları kapsamında 1000'in üzerinde analiz yapılmış ve OTA adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma olmadığı gözlenmiştir. Gıda örneklerinde eser miktarda bulunan OTA'nın analizinde immünoafinite kolonları kullanılmakta ve bu kolonlar tek kullanımlık olmaları nedeniyle yüksek maliyetlidirler. Hazırlanan monolitik kolonun tekrar kulla-

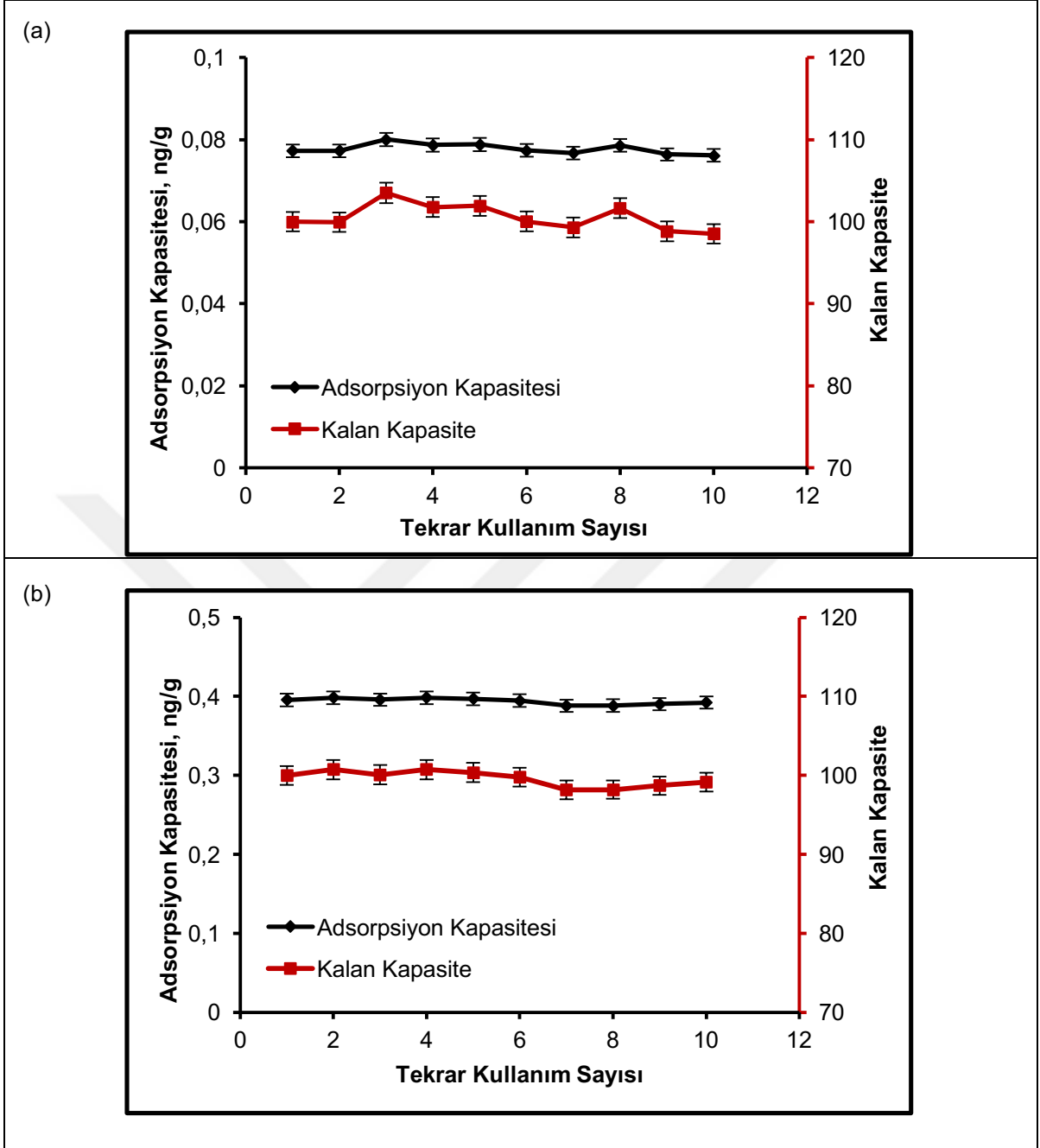
nılabirliğinin iyi olması OTA tayin işleminin maliyetini önemli ölçüde azaltan bir etmendirdir.



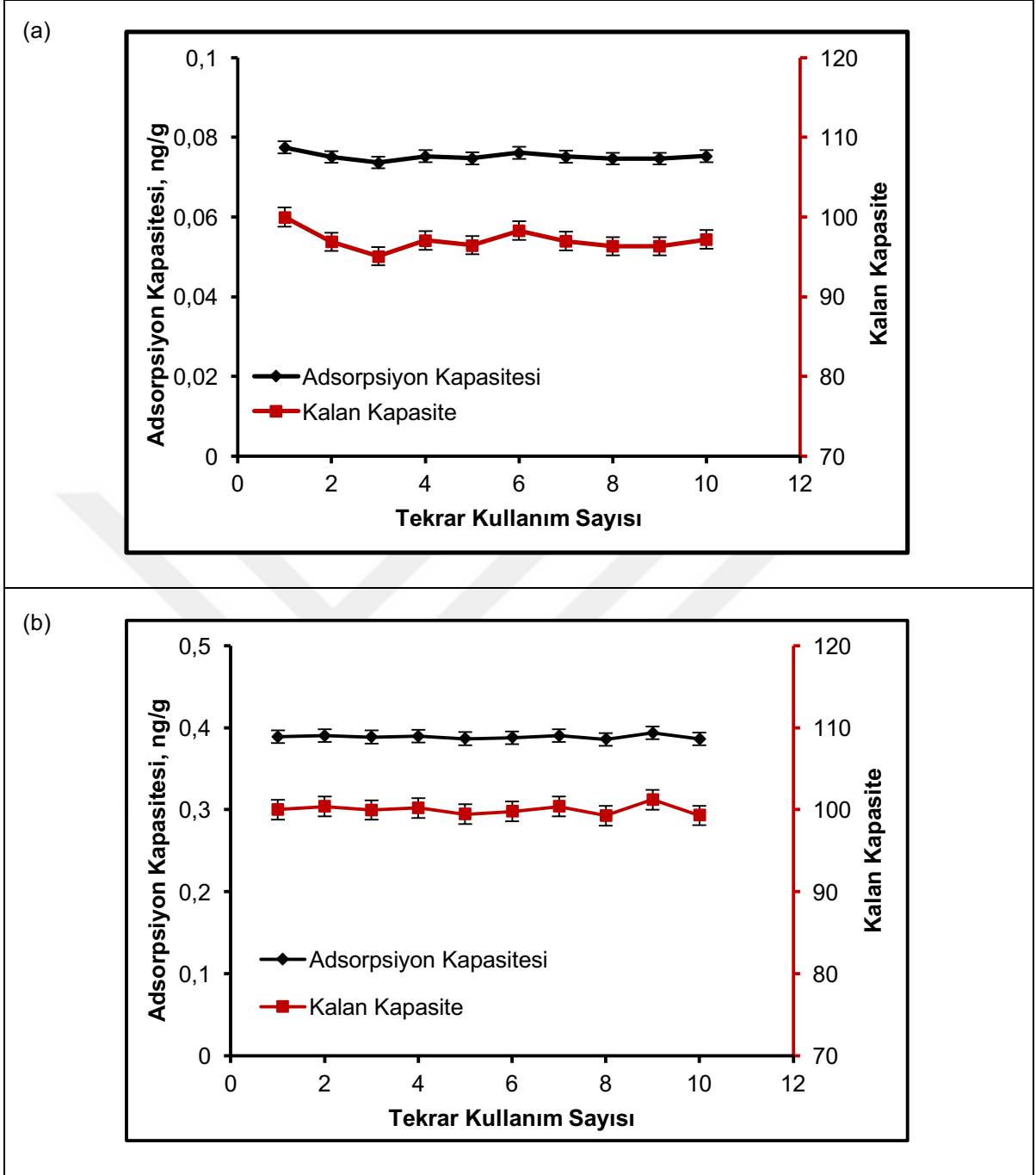
Şekil 4.17. P(HEMA)PA-4 monolitik kolonla gün içi tekrar kullanım. (a) OTA derişimi: 0.5 ng/mL; (b) OTA derişimi: 4 ng/mL; Sıcaklık: 40°C; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL; Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Akış hızı: 0.5 mL/dk.



Şekil 4.18. P(HEMAPA)-4 monolitik kolonla günler arası tekrar kullanım. (a) OTA derişimi: 0.5 ng/mL; (b) OTA derişimi: 4 ng/mL; Sıcaklık: 40°C; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL; Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Akış hızı: 0.5 mL/dk.



Şekil 4.19. P(HEMAPA)-4 monolitik kolonla gün içi tekrar kullanım, adsorpsiyon kapasitesi ve % kalan kapasite. (a) OTA derişimi: 0.5 ng/mL; (b) OTA derişimi: 4 ng/mL; Sıcaklık: 40°C; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL; Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Akış hızı: 0.5 mL/dk.



Şekil 4.20. P(HEMA)-4 monolitik kolonla günler arası tekrar kullanım, adsorpsiyon kapasitesi ve % kalan kapasite. (a) OTA derişimi: 0.5 ng/mL; (b) OTA derişimi: 4 ng/mL; Sıcaklık: 40°C; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL; Hareketli Faz: % 51 ACN - % 49 H₂O (% 2 HAc içeren); Akış hızı: 0.5 mL/dk.

Çizelge 4.2. P(HEMAPA)-4 monolitik kolonun gün içi ve günler arası tekrar kullanılabilirliğinin RSD ve geri kazanım değerleri.

| Teorik Derişim (ng/mL) | Gün içi tekrar kullanılabilirlik (n=10) | | | Günler arası tekrar kullanılabilirlik (10 farklı haftada 10 farklı gün) | | |
|------------------------|---|------------------|---------|---|------------------|---------|
| | Belirlenen Derişim (ng/mL) | Geri Kazanım (%) | RSD (%) | Belirlenen Derişim (ng/mL) | Geri Kazanım (%) | RSD (%) |
| 0.5 | 0.48 | 95.22 | 2.57 | 0.50 | 100.57 | 2.87 |
| 4 | 3.90 | 97.54 | 1.53 | 3.87 | 96.65 | 1.92 |

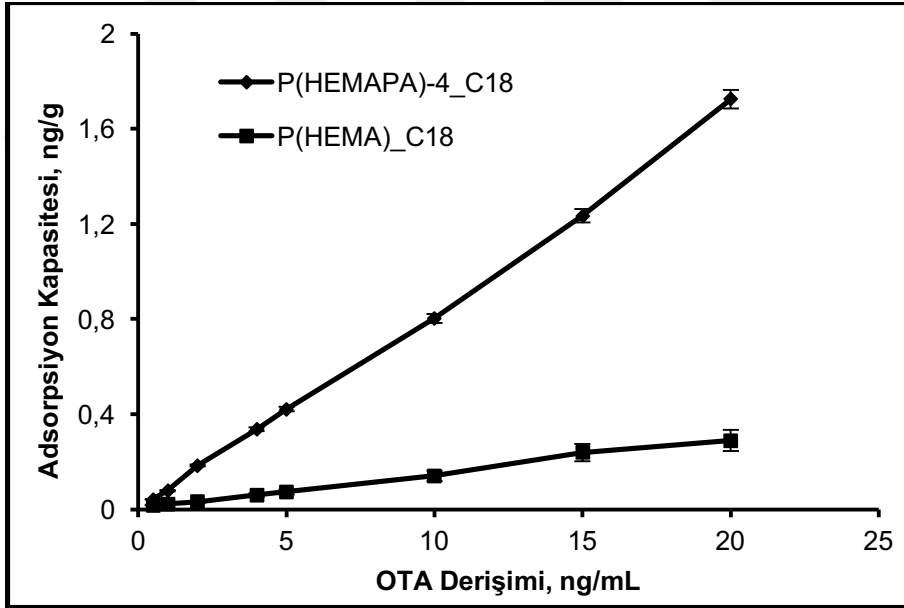
4.4. P(HEMAPA)-4 Monolitik Kolonların İki-Boyutlu HPLC Sisteminde Kullanımı

Hazırlanan P(HEMA) ve P(HEMAPA)-4 monolitik kolonlar iki-boyutlu HPLC analizleri için birinci boyutta ön kolon olarak kullanılmış, ikinci boyut olarak da analizde ticari ters faz C18 kolonu kullanılmıştır.

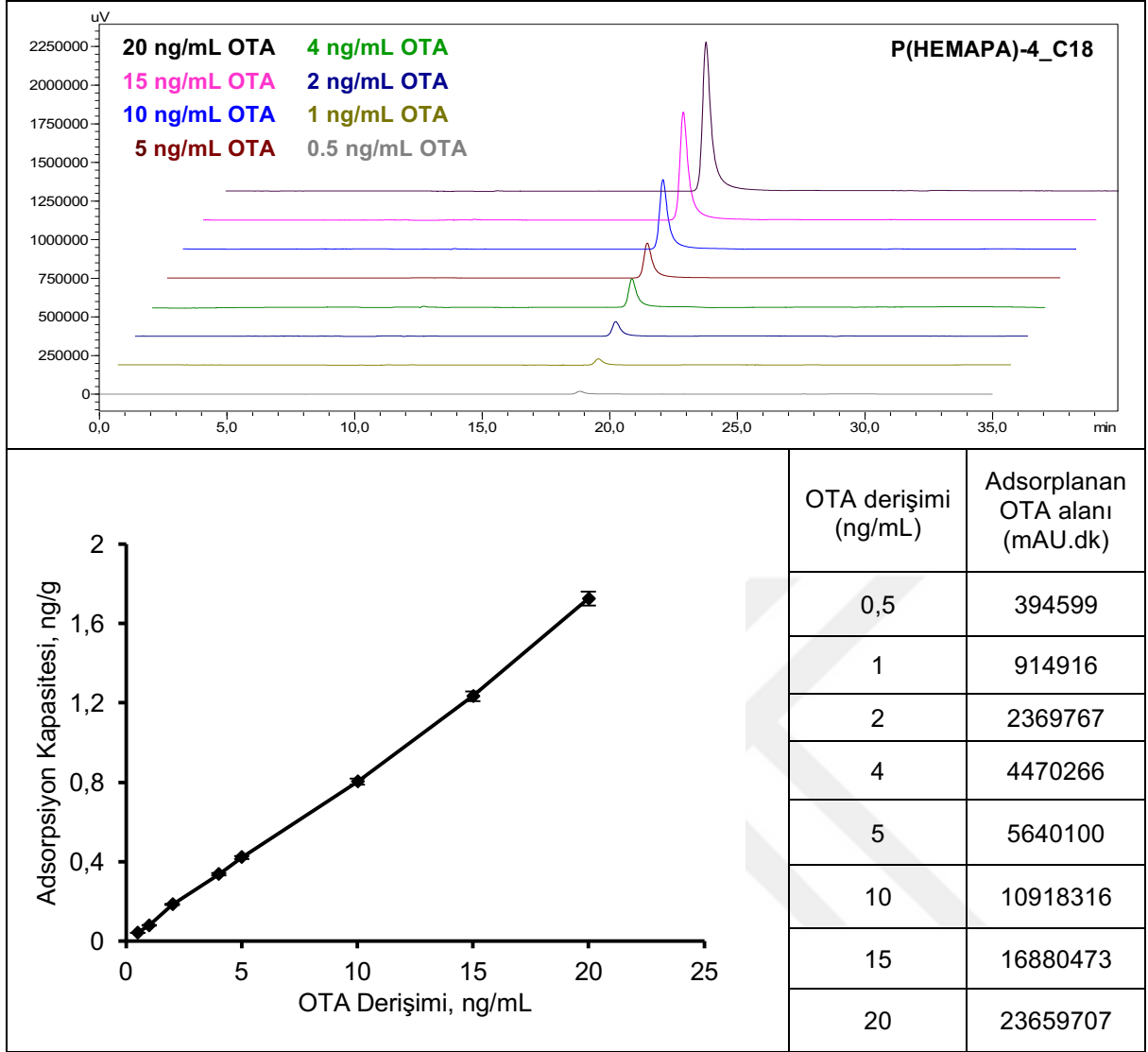
4.4.1. İki-Boyutlu HPLC Sisteminde OTA Derişim Etkisinin İncelenmesi

OTA başlangıç derişiminin adsorpsiyona olan etkisini incelemek için ön kolon olarak P(HEMA) ve P(HEMAPA)-4 monolitik kolonlar, ikinci boyut olarak da ters faz C18 kolonu kullanılmıştır. OTA molekülüne ait adsorpsiyon grafiği, kromatogramlar ve kromatografik parametreler Şekil 4.21-4.23'de verilmektedir. Analizlerde HPLC sisteminde uygulanan parametreler Bölüm 3.2.5 Çizelge 3.3'de özetlenmiştir. OTA başlangıç derişimi 0.5-20 ng/mL aralığında değiştirilmiştir. İki-boyutlu HPLC sisteminde hazırlanan monolitik kolonlar OTA molekülünü adsorbe etmekte ve desorpsiyon ajanı kolondan geçmediği sürece OTA molekülü monolitik kolonu terk etmemektedir. Adsorbe olan OTA molekülünü elüe etme işlemi ise C18 kolonu ile gerçekleştirilmiştir. OTA molekülüne ait pik, yaklaşık olarak 18-19 dk aralığında görülmektedir. Tek-boyutlu ve iki-boyutlu sistem kullanılarak yapılan OTA başlangıç derişimlerinin adsorpsiyona etkisi karşılaştırıldığında, iki-boyutlu analizlerde OTA molekülüne ait piklerin oldukça keskin olduğu görülmüştür. Tek-boyutlu HPLC sistemde olduğu gibi OTA derişimi arttıkça adsorpsiyon için sürücü kuvvet olan derişim farkı (ΔC) arttığı için adsorpsiyon kapasitesinde derişime bağlı olarak bir artış söz konusudur. P(HEMAPA)-4 ve P(HEMA) monolitik kolonlarının ön kolon olarak kullanıldığı iki-boyutlu HPLC sisteminde OTA molekülüne göre maksimum adsorpsiyon miktarları 20 ng/mL OTA derişiminde 1.72 ve 0.29 ng/g

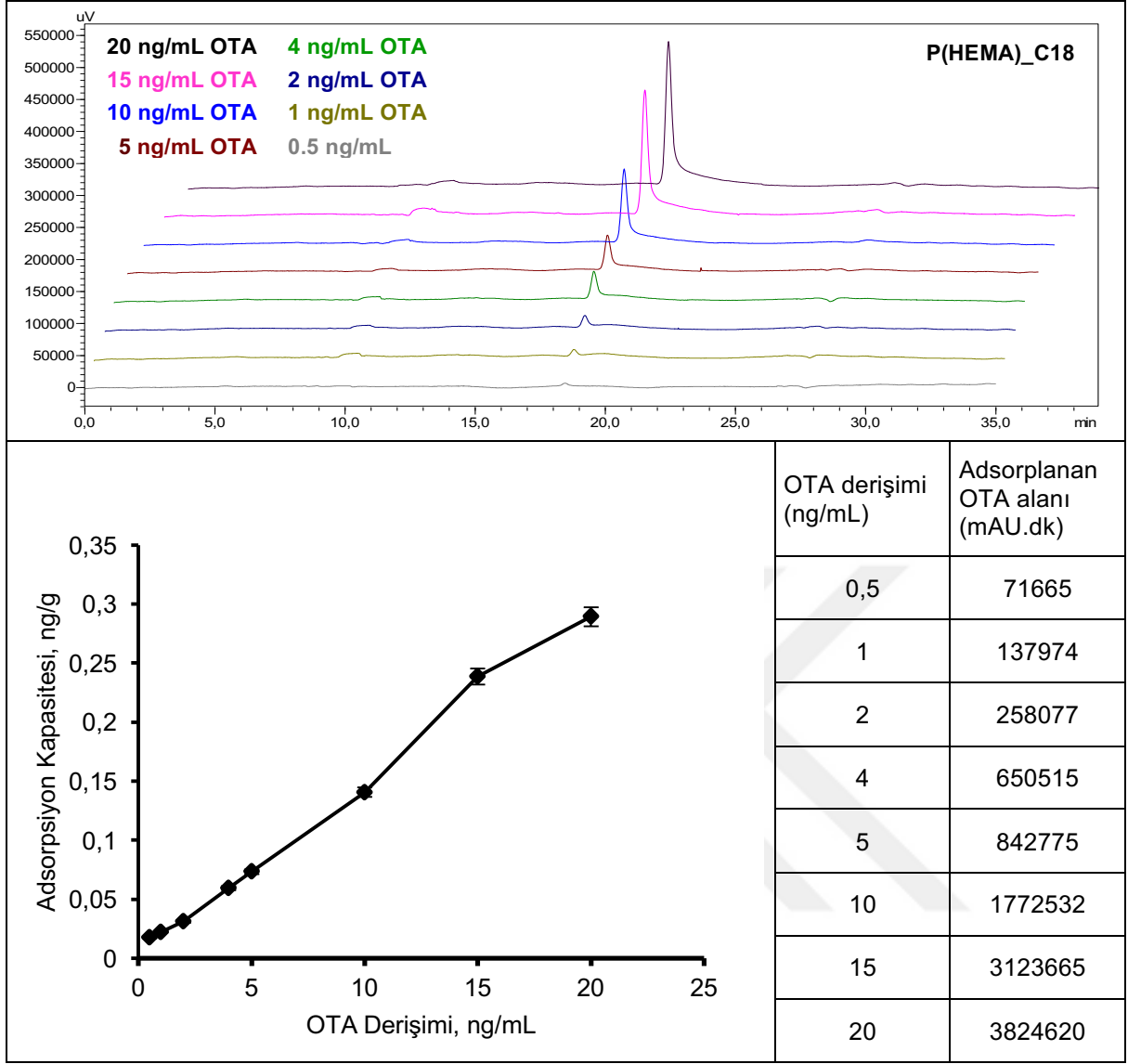
olarak bulunmuştur. Adsorpsiyon kapasitelerinden de görüldüğü gibi P(HEMA)-4 monolitik kolonların adsorpsiyon kapasitesi P(HEMA) monolitik kolona göre yüksektir. P(HEMA)-4 monolitik kolonun yapısında MAPA monomerinin bulunmasından dolayı OTA molekülü ile P(HEMA)-4 monolitik kolonu arasında hidrofobik etkileşim kaynaklı spesifik bir etkileşim görülmektedir. İki-boyutlu HPLC sisteminde OTA'nın P(HEMA)-4 monolitik kolonu ile miktar tayininin yapılabileceği en düşük derişim (LOQ-Limit of Quantitation) ve teşhis edilebilecek sınır değeri (LOD-Limit of Detection) sırasıyla 0.0643 ng/mL ve 0.0212 ng/mL olarak hesaplanmıştır. İki-boyutlu sistemin kullanılmasının önemli bir nedeni piyasada Okratoksin A analizi için kullanılan multi-toksin immünoafinite kolonları yerine hazırlanan P(HEMA)-4 monolitik kolonlarının kullanılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda hazırlanan P(HEMA)-4 monolitik kolonlarının OTA molekülünü analiz etmek için kullanılabilirdiği ve C18 kolonu ile birleştirilerek de OTA analiz veriminin oldukça üst seviyeye çıktığı görülmüştür.



Şekil 4.21. P(HEMA)-4_C18 ve P(HEMA)_C18 iki-boyutlu HPLC sisteminde OTA adsorpsiyonuna OTA başlangıç derişimin etkisi. Enjeksiyon Hacmi: 100 µL; Sıcaklık: 40°C.



Şekil 4.22. Birinci kolon: P(HEMAPA)-4 monolitik kolon. İkinci Kolon: C18. Sıcaklık: 40°C; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL.

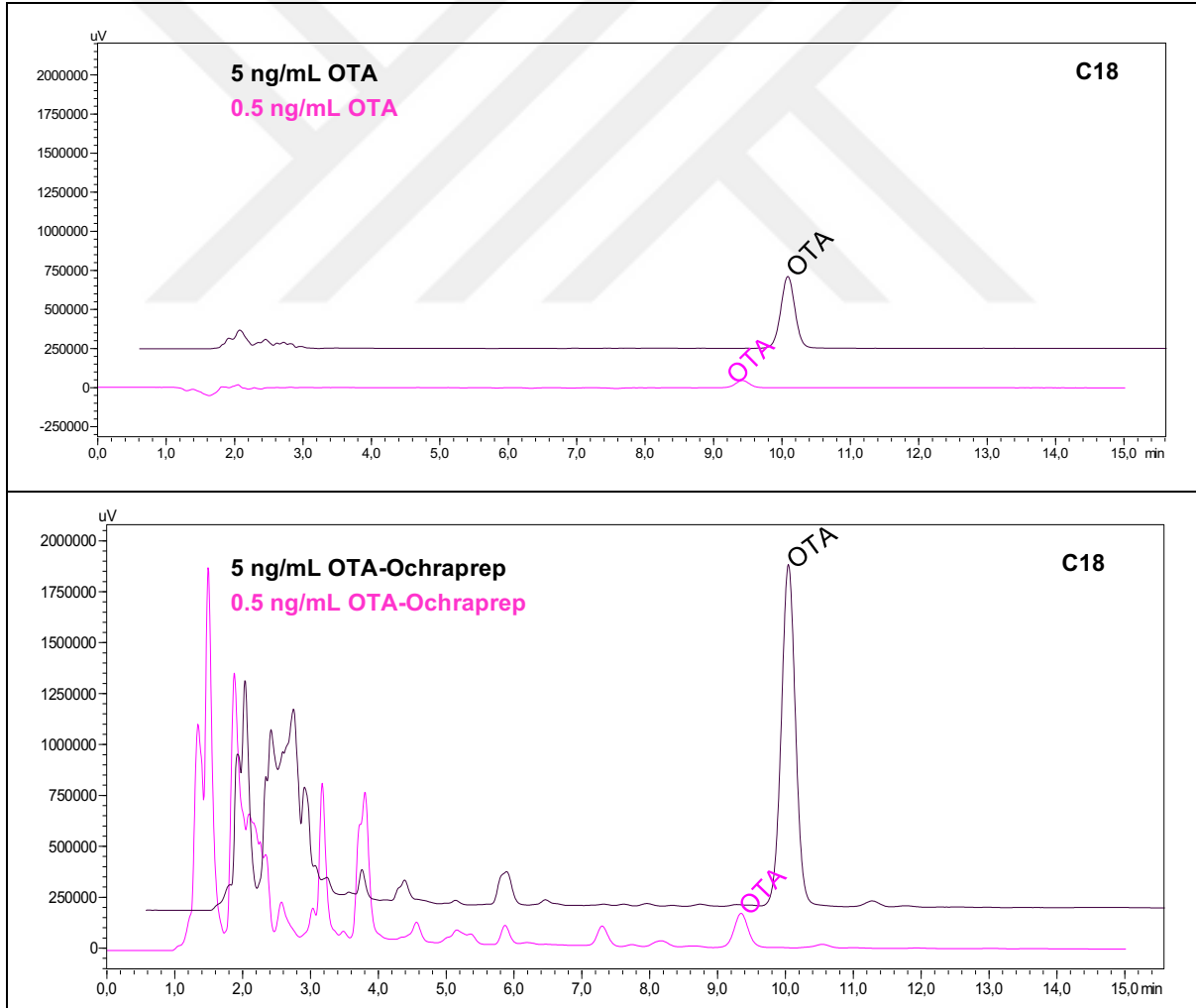


Şekil 4.23. Birinci kolon: P(HEMA) monolitik kolon. İkinci Kolon: C18. Sıcaklık: 40°C; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL.

4.4.2. İmmünoafinite-Katı Faz Özütleme İşleminin Uygulanabilirliği

Gerçek örneklerden OTA özütleme çalışmasına geçmeden önce immünoafinite-katı faz özütleme işleminin Ochraprep kolonları ile uygulanabilirliğine bakılmıştır. Bu amaç doğrultusunda 0.5 ng/mL ve 5 ng/mL derişimindeki OTA örnekleri 10 mL pH 7.4 (10 mM) tamponu içerisinde hazırlanmıştır. Oda sıcaklığına getirilen Ochraprep kolonlarına, OTA örnekleri Çizelge 3.5'de anlatıldığı şekilde uygulanmıştır. Çizelge 3.5'de anlatıldığı gibi Ochraprep kolonları tarafından tutunan OTA örneği 1.5 mL metanol:asetik asit (98:2) çözeltisi ile elüe edilmiş ve ardından aynı Ochraprep kolonu 1.5 mL su ile yıkanmıştır. Bundan dolayı toplam elüat çözeltisi 3 mL olmuştur. Ochraprep kolonlarına uygulanan OTA örnek

hacminin 10 mL ve desorpsiyon hacminin de 3 mL olmasından dolayı OTA örnekleri 3.3 kat deriştirilerek kolondan geri kazanılmıştır. Ochraprep kolonundan geçirilip elüe edilen ve Ochraprep kolonundan geçirilmeyen OTA örneklerine ait kromatogramlar Şekil 4.24'de verilmektedir. 0.5 ng/mL ve 5 ng/mL derişimindeki OTA örnekleri için ayrı ayrı yüzde geri kazanım değerleri OTA molekülüne ait kromatogramlardan elde edilen alanlara bakılıp deriştirme kat sayısı dikkate alınarak hesaplanmıştır. 0.5 ng/mL OTA örneği için yüzde geri kazanım değeri % 96.96, 5 ng/mL OTA örneği için ise yüzde geri kazanım değeri % 96.7 olarak bulunmuştur. Sonuçlar dikkate alındığında küçük derişimde de büyük derişimde de yüzde geri kazanım değerleri birbirine çok yakındır. Yüzde geri kazanım değerlerinden de görüldüğü gibi immünoafinite-katı faz özütleme işlemi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmektedir.

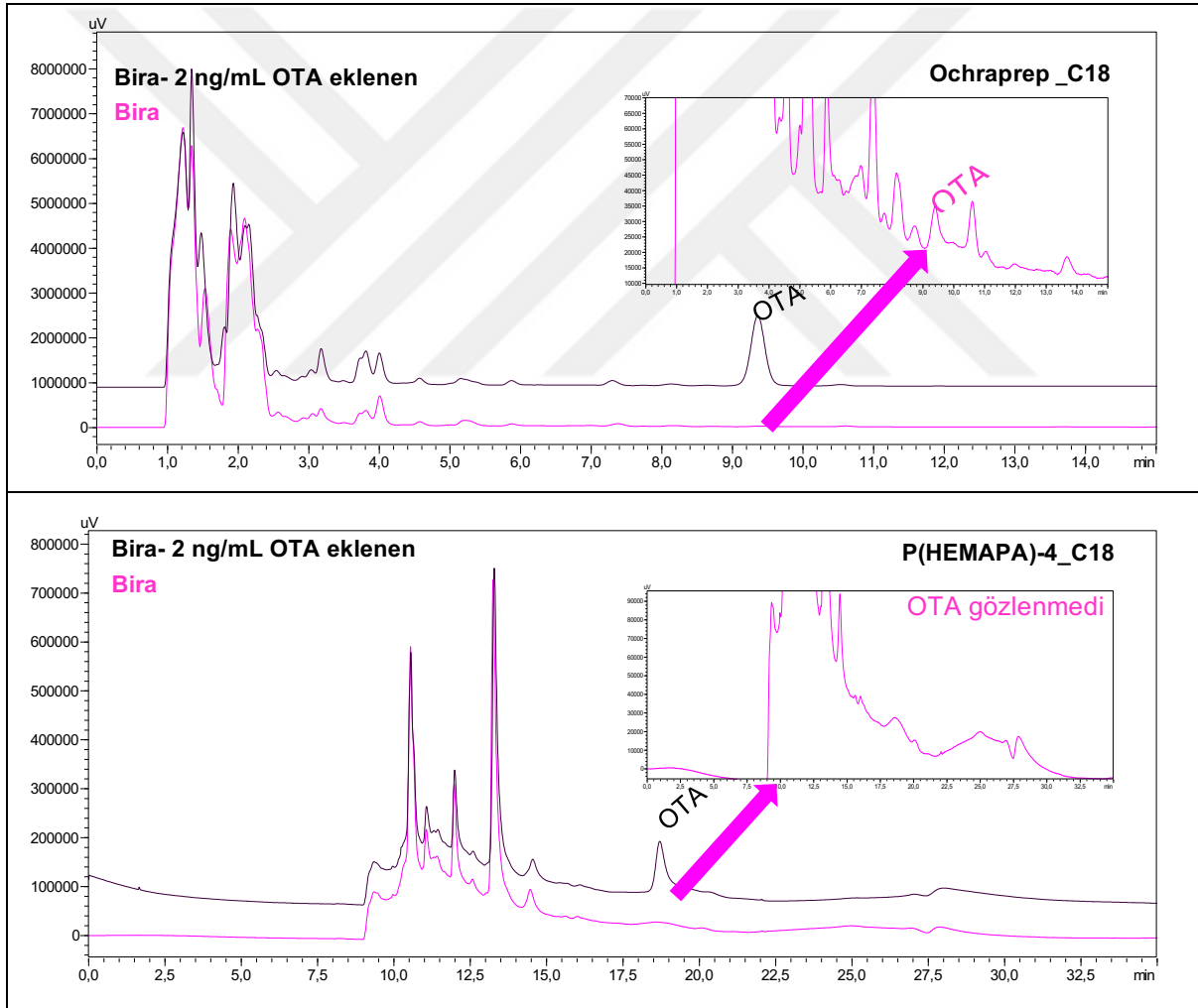


Şekil 4.24. Ochraprep kolonundan geçirilip elüe edilen ve Ochraprep kolonu kullanılmayan OTA örneklerinin ticari C18 kolonu kullanılarak analiz edilmesi. OTA derişimi: 0.5 ng/mL ve 5.0 ng/mL; Sıcaklık: 40°C; Akış Hızı: 1.0 mL/dk; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL.

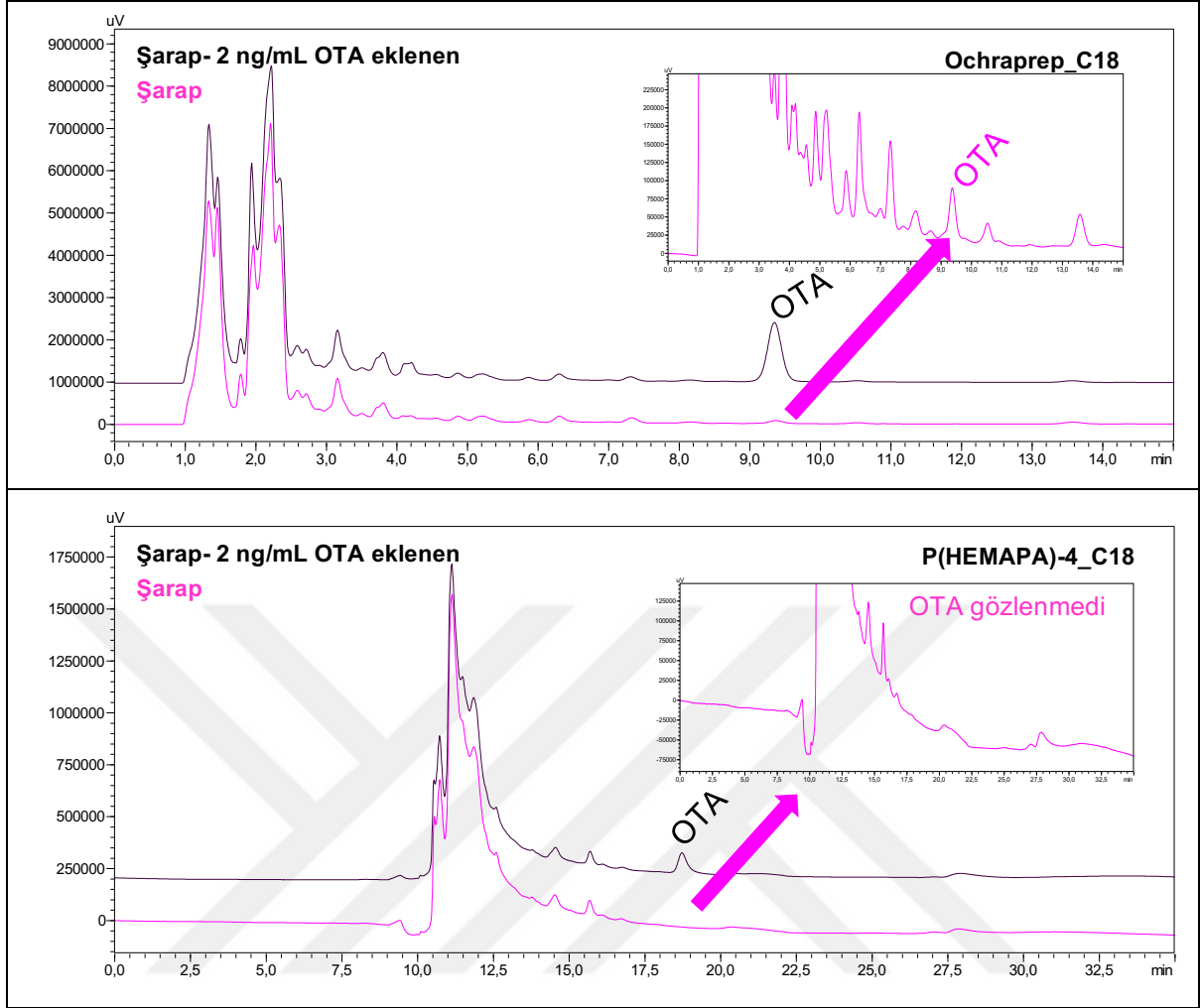
4.4.3. Gerçek Örneklerden OTA Özütlemesi

Gerçek örneklerden OTA özütleme çalışmaları dört farklı numune (bira, şarap, mısır ve kahve) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Farklı derişimlerde OTA standartları eklenen ve OTA standartı eklenmeyen doğal örnekler hem P(HEMAPA)-4 hem de standart immünoafinite-katı faz özütleme (Ochraprep) kolonları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bölüm 2.2.4'de Çizelge 2.4'deki Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliğinin gıdalarda izin verilen OTA üst sınır değerleri dikkate alınarak dört farklı numuneye farklı derişimlerde (bira için 2 ng/mL; şarap için 2 ng/mL; mısır için 5 ng/mL ve kahve için 10 ng/mL) OTA eklenerek oluşturulan örnekler için elde edilen kromatogramlar Şekil 4.25, 4.26, 4.27 ve 4.28'de verilmektedir. Kromatogramlardan da görüldüğü gibi OTA standartı eklenmeyen doğal örnekler, P(HEMAPA)-4 birinci kolonundan geçirilip ticari C18 kolonuna verildiğinde OTA analiz edilememiştir. Ochraprep kolonu ile OTA özütlemesi yapıldıktan sonra elde edilen elüat çözeltisi C18 kolonuna verildiğinde OTA analizi gerçekleştirilebilmiştir. Ancak Ochraprep kolonunda OTA özütlemesi yüksek örnek hacminde ve yüksek hacimde desorpsiyon ile gerçekleştirilir. P(HEMAPA)-4 kolonuna uygulanan örnek hacmi 100 µL iken Ochraprep kolonuna uygulanan örnek hacimleri her örnek için farklıdır (Kahve için: 10 mL; şarap ve bira için: 20 mL ve mısır için: 24 mL). Ochraprep kolonları ile yapılan analizlerde birada 0,024 ng/mL; şarapda 0,093 ng/mL; kahvede 0,092 ng/mL; mısırdaki ise 0,011 ng/mL olarak bulunmuştur. Bölüm 4.4.1'de P(HEMAPA)-4 kolonu ile iki-boyutlu HPLC Sisteminde OTA derişim etkisi incelendiğinde de görüldüğü gibi en düşük OTA analizinin yapıldığı derişim 0,5 ng/mL'dir. Gıda örneklerindeki OTA derişimlerinde bu değer çok altında olduğu için P(HEMAPA)-4 kolonu ile OTA analizi görülememiştir. Ochraprep kolonlarında ise OTA'nın analiz edilebilmesinin en önemli nedenleri örnek hacminin ve desorpsiyon hacminin yüksek olmasıdır. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliğindeki gıdalarda izin verilen OTA üst sınır değerleri gıda örneklerine eklenip OTA analizi yapıldığında ise hem P(HEMAPA)-4 kolonu ile hemde Ochraprep kolonu ile OTA analizi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.3'de geri kazanılan OTA derişimleri ve adsorpsiyon kapasiteleri özetlenmiştir. Sonuçlardanda görüldüğü gibi OTA eklenen gıda örneklerinde yapılan analizlerdeki geri kazanılan OTA derişimleri P(HEMAPA)-4 kolonu ve Ochraprep kolonunda birbirine oldukça yakın çıkmıştır.

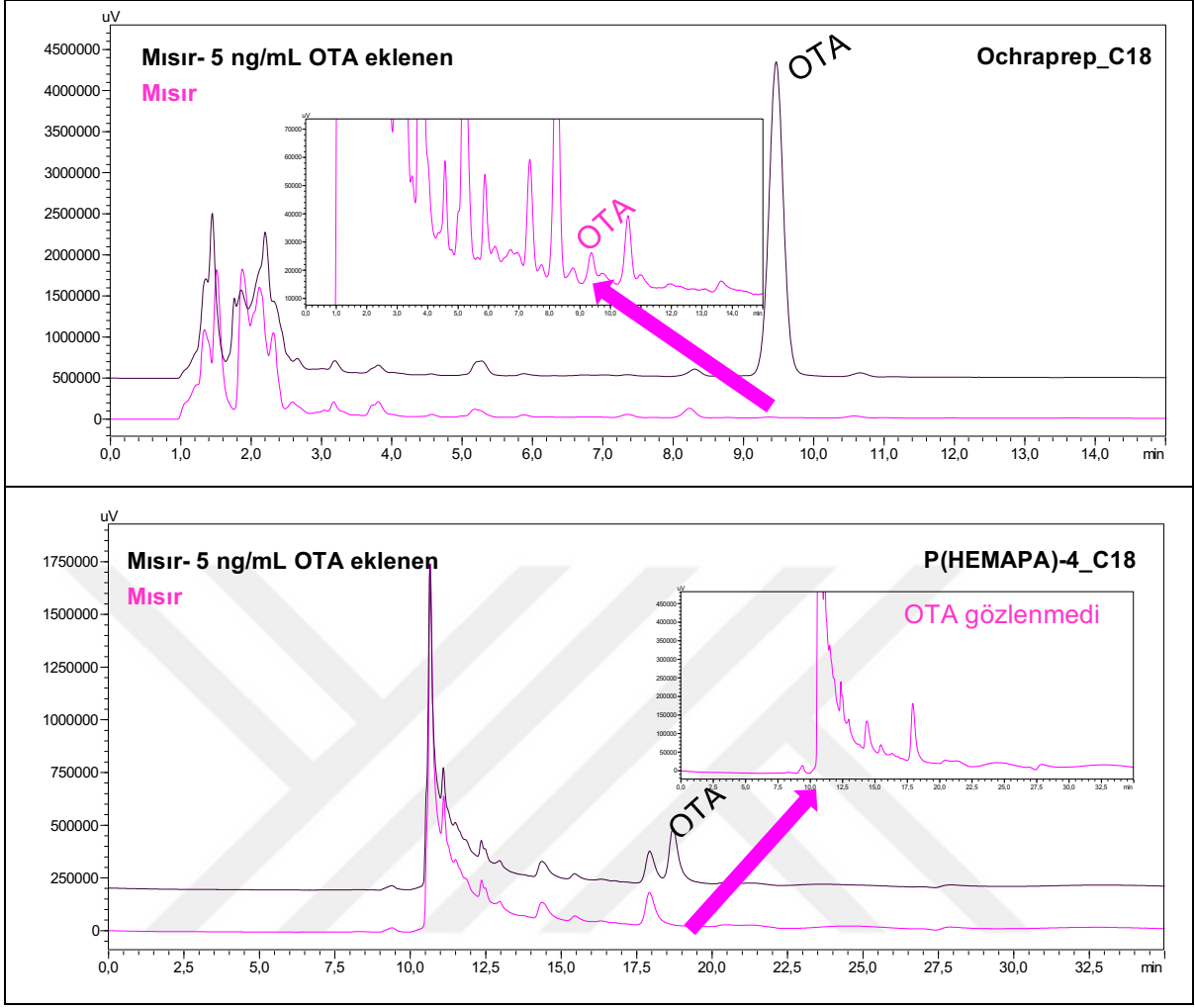
P(HEMAPA)-4 ile ticari Ochraprep kolonu arasında paralellik olması, hazırlanan monolitik kolonların mevcut ticari kolonlara potansiyel alternatif olabileceğini göstermektedir. Adsorpsiyon kapasiteleri dikkate alındığında ise hazırlanan P(HEMAPA)-4 kolonunun Ochraprep kolonundan daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Burada dikkate alınması gereken en önemli nokta 1D- ve 2D-HPLC çalışmaları kapsamında yapılan tüm çalışmaların aynı P(HEMAPA)-4 kolonu ile gerçekleştirilmiş olmasıdır. Daha öncede belirtildiği gibi ticari Ochraprep kolonları tek kullanımlık olmaları nedeniyle yüksek maliyetlidirler. Hazırlanan monolitik kolonun düşük maliyet ve tekrar kullanılabilirliğinin iyi olması OTA tayin işleminin maliyetini önemli ölçüde azaltan bir etmendir.



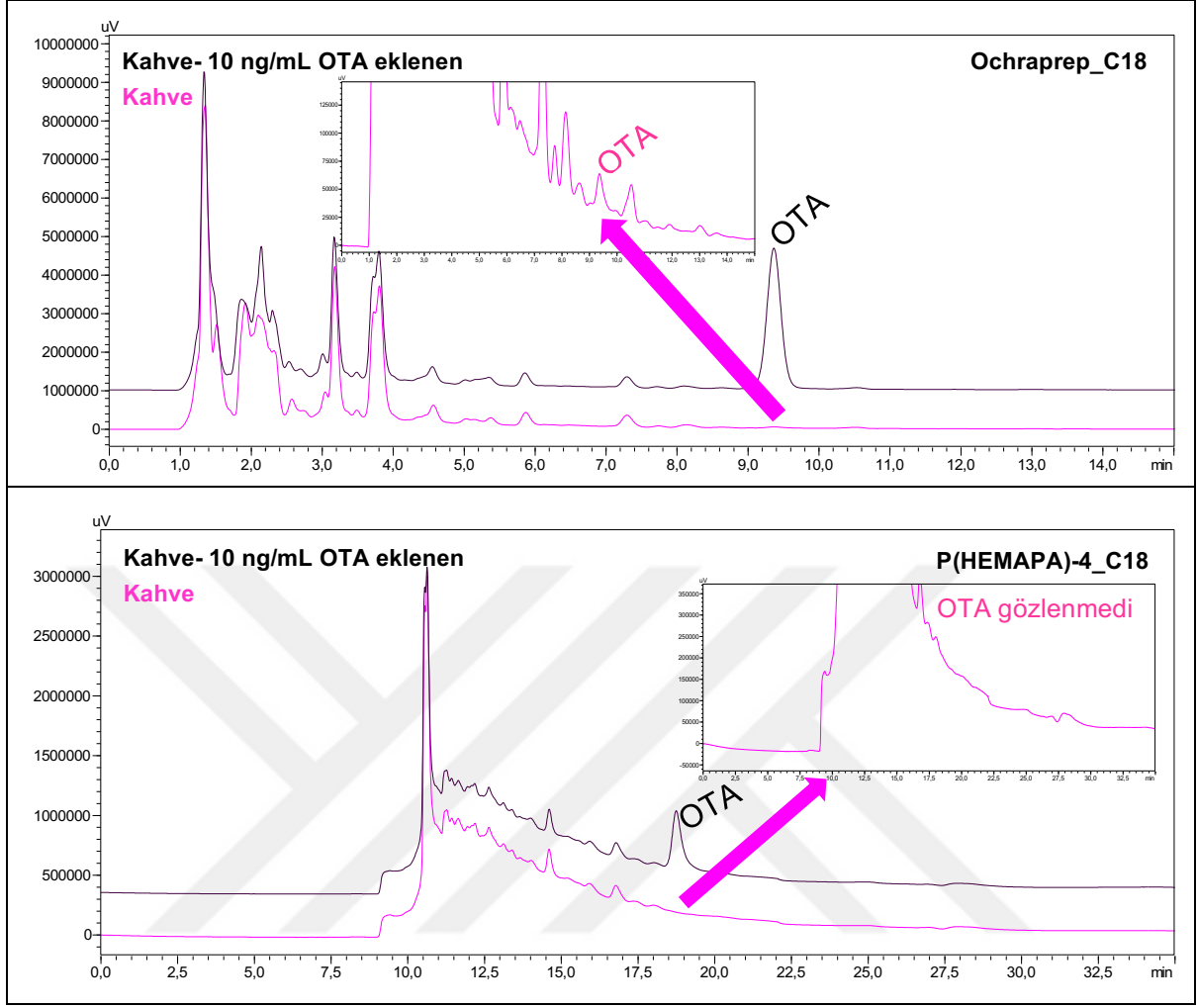
Şekil 4.25. 2 ng/mL derişiminde OTA standartı eklenen ve OTA standartı eklenmeyen bira numunesinden P(HEMAPA)-4_C18 ve Ochraprep_C18 kolonları ile OTA özütlenmesi.



Şekil 4.26. 2 ng/mL derişiminde OTA standardı eklenen ve Ota standardı eklenmeyen şarap numunesinden P(HEMA)PA-4_C18 ve Ochrprep_C18 kolonları ile OTA özütlenmesi.



Şekil 4.27. 5 ng/mL derişiminde OTA standardı eklenen ve Ota standardı eklenmeyen mısır numunesinden P(HEMAPA)-4_C18 ve Ochraprep_C18 kolonları ile OTA özütlenmesi.



Şekil 4.28. 10 ng/mL derişiminde OTA standardı eklenen ve Ota standardı eklenmeyen kahve numunesinden P(HEMA)PA-4_C18 ve Ochrapprep_C18 kolonları ile OTA özütlenmesi.

Çizelge 4.3. Geri kazanılan OTA derişimleri ve OTA adsorpsiyon kapasiteleri.

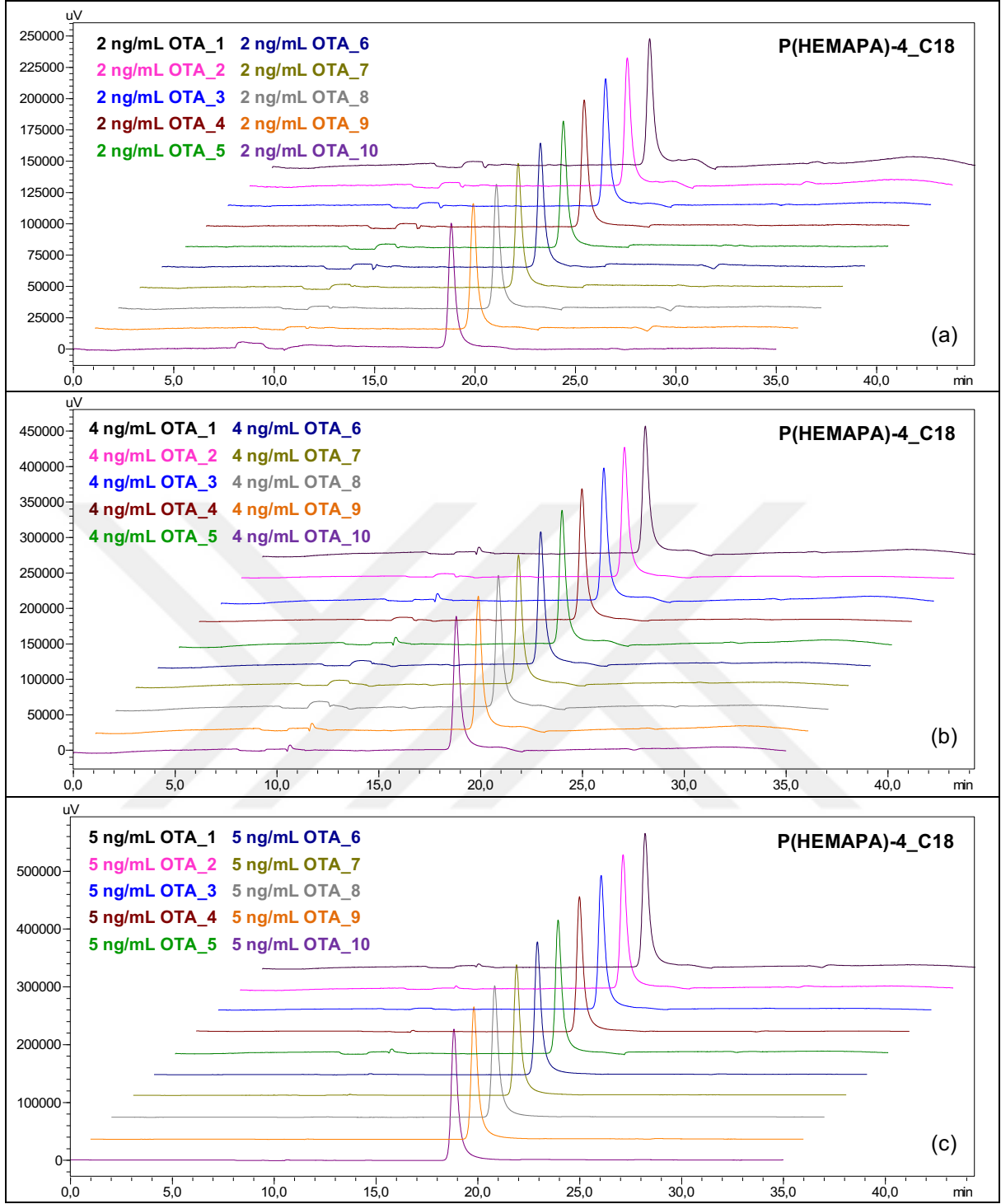
| Örnekler | Geri Kazanılan OTA derişimleri (ng/mL) | | Adsorpsiyon Kapasitesi (ng/g) | |
|-----------------------------|--|-----------------|-------------------------------|-----------------|
| | Ochrapprep_C18 | P(HEMA)PA-4_C18 | Ochrapprep_C18 | P(HEMA)PA-4_C18 |
| Bira | 0.024 | - | 0.001 | - |
| Bira (2 ng/mL OTA eklenen) | 2.190 | 2.280 | 0.076 | 0.207 |
| Şarap | 0.093 | - | 0.004 | - |
| Şarap (2 ng/mL OTA eklenen) | 2.030 | 2.040 | 0.071 | 0.163 |
| Mısır | 0.011 | - | 0.001 | - |
| Mısır (5 ng/mL OTA eklenen) | 5.200 | 5.110 | 0.136 | 0.368 |
| Kahve | 0.092 | - | 0.008 | - |
| Kahve (10ng/mL OTA eklenen) | 10.280 | 9.920 | 0.720 | 0.774 |

4.4.4. İki-Boyutlu HPLC Sisteminde Tekrar Kullanılabilirlik

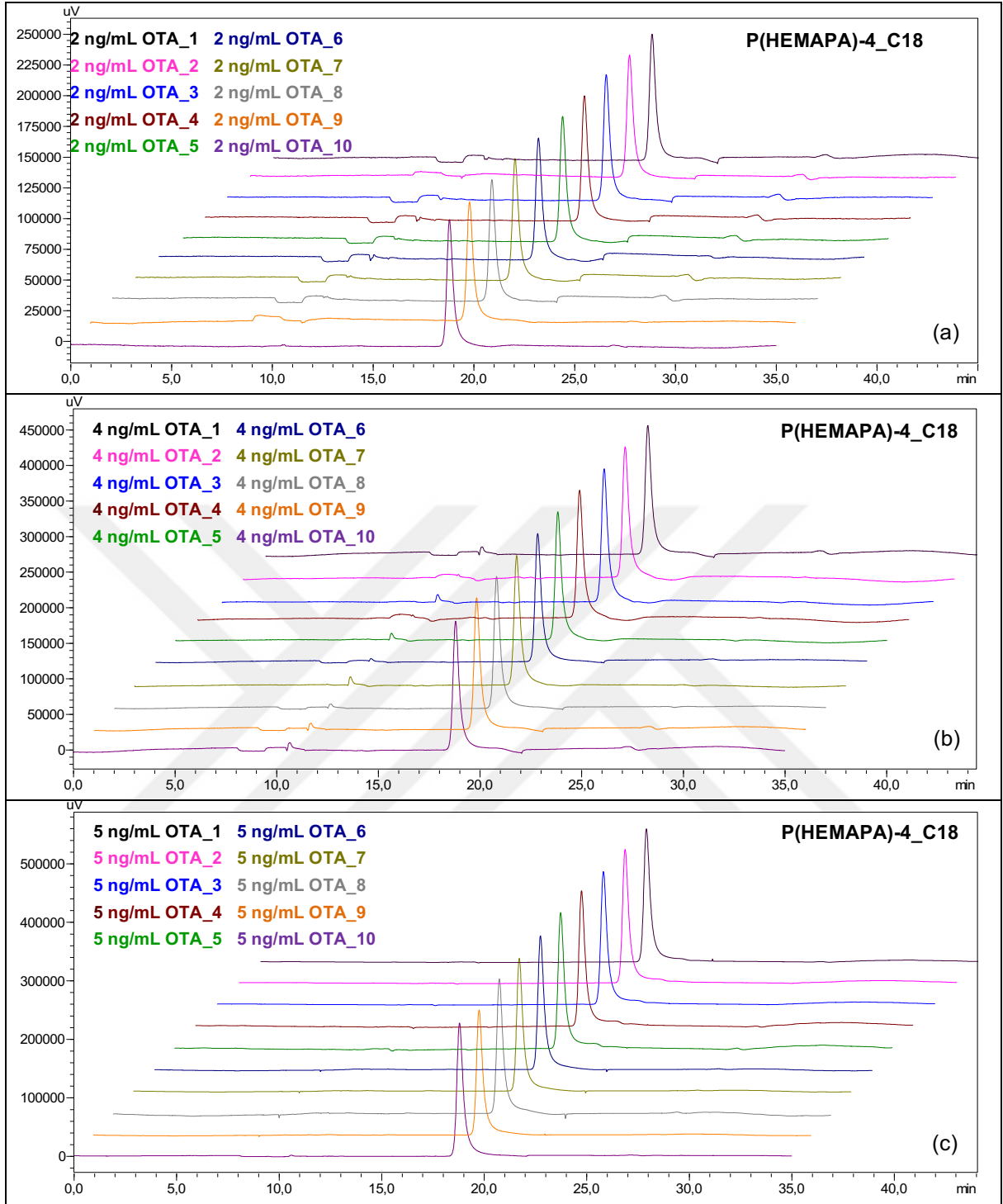
Okratoksin A analizi için piyasada kullanılan multi-toksin immünoafinite kolonlarının tek kullanımlık olması Okratoksin A analiz maliyetini oldukça arttırmaktadır. Tek kullanımlık multi-toksin immünoafinite kolonlarına alternatif olarak tek kullanımlık olmayan defalarca kullanılabilen monolitik kolonlar hazırlanmıştır. Ayrıca multi-toksin immünoafinite kolonları kullanılarak saflaştırılan OTA molekülü OTA analizi yapılmak için HPLC sistemine bir ara eleman aracılığı ile verilmektedir. Hazırlanan monolitik kolonlar ile bu dezavantajların üstesinden gelinmektedir. P(HEMAPA)-4 monolitik kolonun ve ters faz C18 kolonunun bir arada kullanıldığı iki-boyutlu HPLC sisteminde gün içi ve günler arası tekrar kullanılabilirlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Her iki çalışma için de 3 farklı derişimde (2, 4 ve 5 ng/mL) olmak üzere üç farklı OTA çözeltisi hazırlanmıştır. Gün içi tekrar kullanılabilirlik için hazırlanan OTA çözeltileri aynı P(HEMAPA)-4 monolitik kolonu ile ardı ardına 10 kez tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon işlemine tabi tutulmuştur. Günler arası tekrar kullanılabilirlik çalışması ise aynı P(HEMAPA)-4 monolitik kolonu ile ardı ardına 10 ayrı haftada, taze OTA çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. P(HEMAPA)-4 monolitik kolonun gün içi ve günler arası tekrar kullanılabilirliği yüzde göreceli standart sapma (% RSD) ve geri kazanım değerleri üzerinden kontrol edilmiştir [184]. Şekil 4.29-4.32'de ilgili adsorpsiyon grafiği ve kromatogramlarda görüldüğü gibi on döngünün ardından kolon kapasitesinde önemli bir miktarda azalma gözlenmemiştir. Adsorpsiyon grafiklerinden de görüldüğü gibi OTA adsorpsiyon kapasitesi, gün içi tekrar kullanılabilirliğin onuncu döngüsü sonunda 2 ng/mL OTA çözeltisi için 0.184 ng/g'dan 0.182 ng/g değerine, 4 ng/mL OTA çözeltisi için 0.335 ng/g'dan 0.331 ng/g değerine, 5 ng/mL OTA çözeltisi için 0.420 ng/g'dan 0.418 ng/g değerine düşmüştür. OTA adsorpsiyon kapasitesi, günler arası tekrar kullanılabilirliğin onuncu döngüsü sonunda ise 2 ng/mL OTA çözeltisi için 0.184 ng/g'dan 0.182 ng/g değerine, 4 ng/mL OTA çözeltisi için 0.336 ng/g'dan 0.331 ng/g değerine, 5 ng/mL OTA çözeltisi için 0.421 ng/g'dan 0.417 ng/g değerine düşmüştür. 2 ng/mL, 4 ng/mL ve 5 ng/mL OTA çözeltileri için gün içi tekrar kullanılabilirlik kromatogramlarından elde edilen alan tekrarlanabilirliği % RSD değerleri sırasıyla % 0.41, % 0.49, % 0.21 ve % geri kazanım değerleri sırasıyla % 104.45, % 104.44, % 107.33 olarak bulunmuştur. 2 ng/mL, 4 ng/mL ve 5 ng/mL OTA

çözeltileri için günler arası tekrar kullanılabilirlik kromatogramlarından elde edilen alan tekrarlanabilirliği % RSD değerleri sırasıyla % 1.31, % 0.88, % 0.44 ve % geri kazanım değerleri sırasıyla % 105.26, % 104.34, % 107.03 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4). Kolonların OTA adsorpsiyon veriminde önemli bir azalma olmadan defalarca kullanılabilir olması ve ara eleman ihtiyacını ortadan kaldırarak iki-boyutlu HPLC sisteminde OTA analizlerini yüksek verimde elde etmesi, piyasada kullanılan ticari multi-toksin immünoafinite kolonlarına alternatif olmasını sağlamıştır.

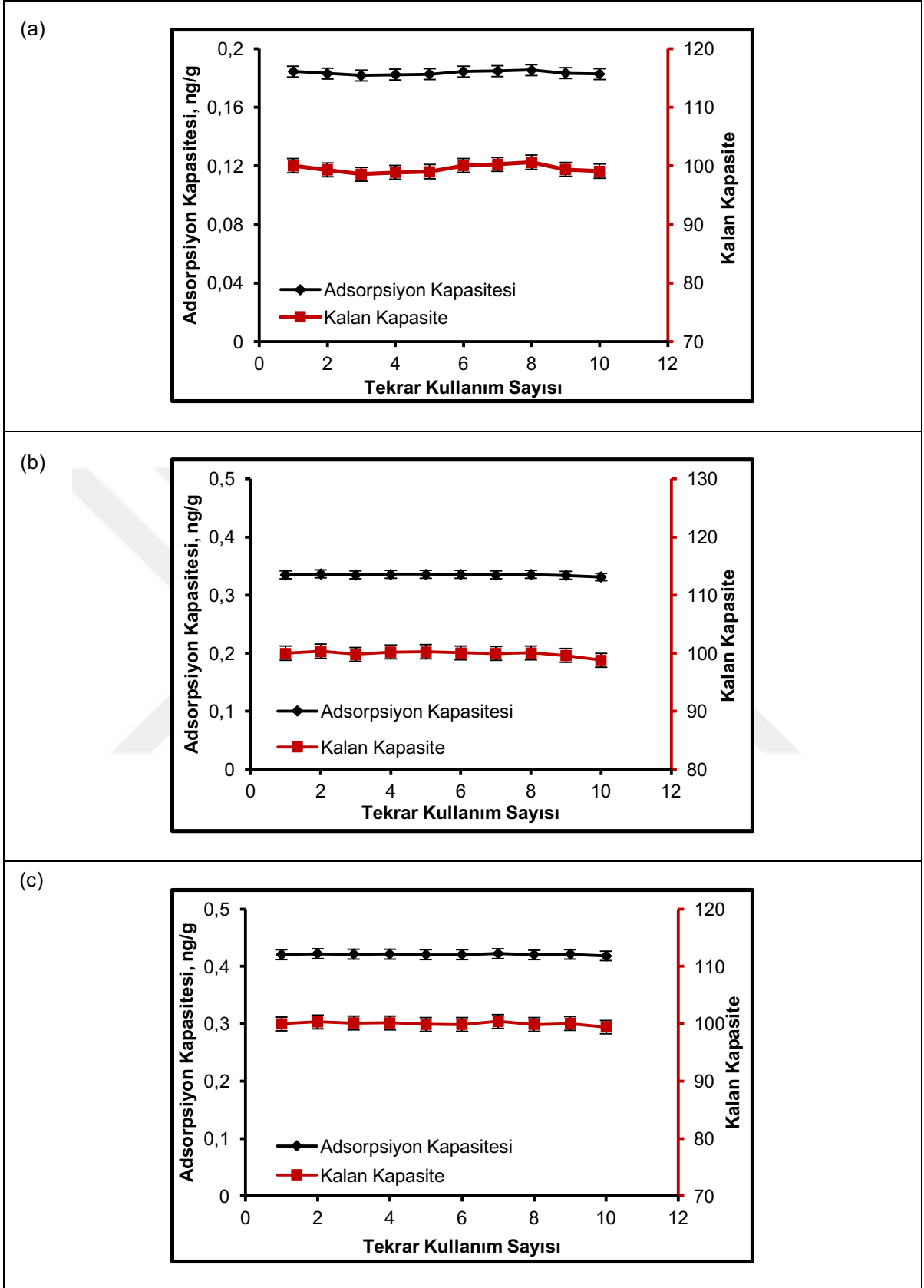




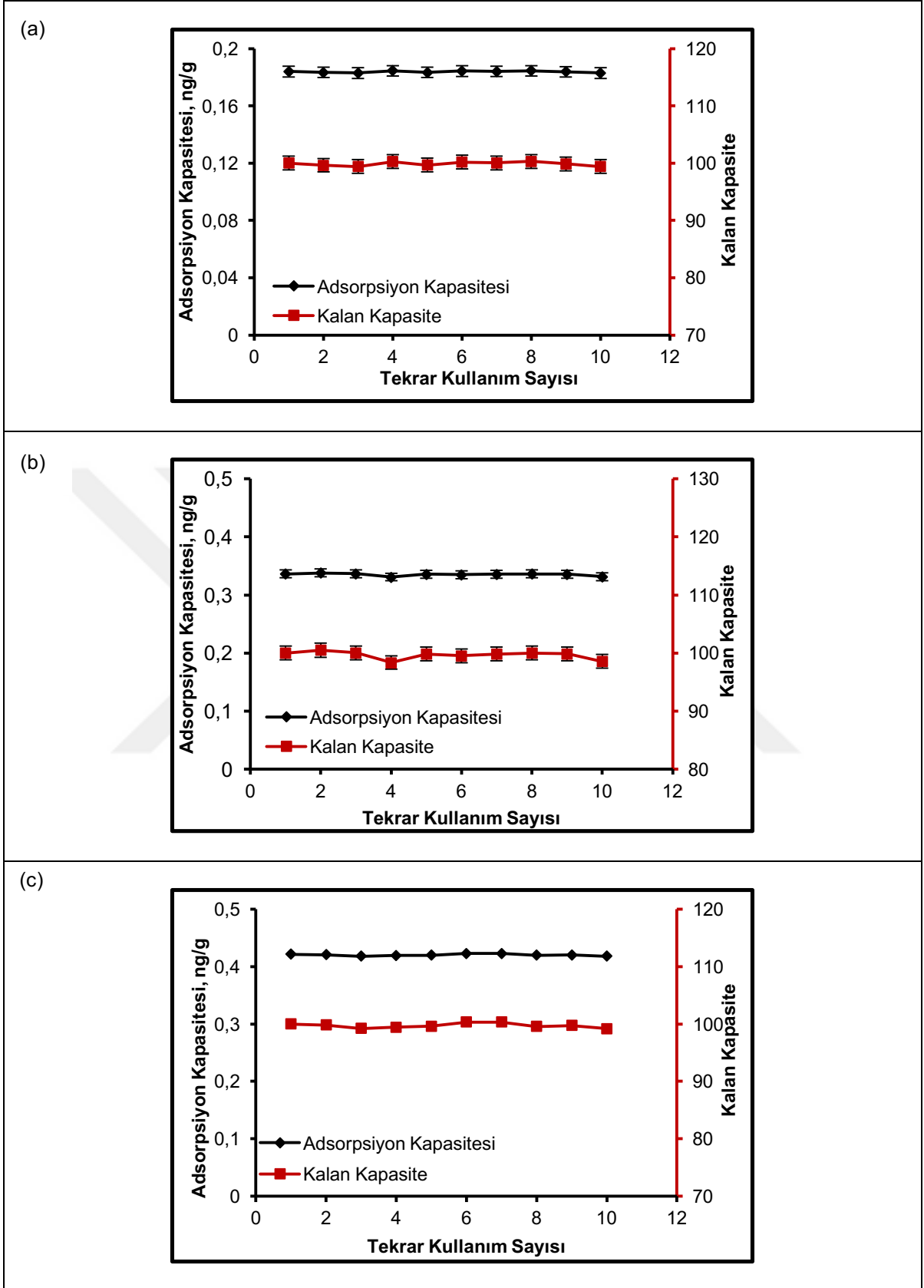
Şekil 4.29. P(HEMAPA)-4_C18 monolitik kolonlarla iki-boyutlu HPLC sisteminde gün içi tekrar kullanım. (a) OTA derişimi: 2 ng/mL; (b) OTA derişimi: 4 ng/mL; (c) OTA derişimi: 5 ng/mL; Sıcaklık: 40°C; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL.



Şekil 4.30. P(HEMA)PA-4_C18 monolitik kolonlarla iki-boyutlu HPLC sisteminde günler arası tekrar kullanım. (a) OTA derişimi: 2 ng/mL; (b) OTA derişimi: 4 ng/mL; (c) OTA derişimi: 5 ng/mL; Sıcaklık: 40°C; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL.



Şekil 4.31. P(HEMAPA)-4_C18 monolitik kolonlarla iki-boyutlu HPLC sisteminde gün içi tekrar kullanım, adsorpsiyon kapasitesi ve % kalan kapasite. (a) OTA derişimi: 2 ng/mL; (b) OTA derişimi: 4 ng/mL; (c) OTA derişimi: 5 ng/mL; Sıcaklık: 40°C; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL.



Şekil 4.32. P(HEMA)-4_C18 monolitik kolonlarla iki-boyutlu HPLC sisteminde günler arası tekrar kullanım, adsorpsiyon kapasitesi ve % kalan kapasite. (a) OTA derişimi: 2 ng/mL; (b) OTA derişimi: 4 ng/mL; (c) OTA derişimi: 5 ng/mL; Sıcaklık: 40°C; Enjeksiyon Hacmi: 100 µL.

Çizelge 4.4. P(HEMAPA)-4_C18 monolitik kolonların gün içi ve günler arası tekrar kullanılabilirliğinin RSD ve geri kazanım değerleri.

| Teorik Derişim (ng/mL) | Gün içi tekrar kullanılabilirlik (n=10) | | | Günler arası tekrar kullanılabilirlik (10 farklı haftada 10 farklı gün) | | |
|------------------------|---|------------------|---------|---|------------------|---------|
| | Belirlenen Derişim (ng/mL) | Geri Kazanım (%) | RSD (%) | Belirlenen Derişim (ng/mL) | Geri Kazanım (%) | RSD (%) |
| 2 | 2.09 | 104.45 | 0.41 | 2.11 | 105.26 | 1.31 |
| 4 | 4.18 | 104.44 | 0.49 | 4.17 | 104.34 | 0.88 |
| 5 | 5.36 | 107.33 | 0.21 | 5.35 | 107.03 | 0.44 |

4.4.5. Literatür Karşılaştırması

Okratoksin A analizi için piyasada kullanılan örnek hazırlama ve analitik tayin yöntemlerinden bazıları Çizelge 4.5’de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Çizelge 4.5’de görüldüğü gibi OTA’nın özütlenmesi ve ön deriştirilmesi için kullanılan mevcut yöntemlerin çoğu immünoafinite kolonları veya katı faz özütleme adımlarını içermektedir. Kullanılan bu yöntemlerin hepsi “çevrimdışı” olarak adlandırılan bir dizi işlemde uygulanan, ara bir elemana ihtiyaç duyan, zaman alıcı, kirlenmeye yol açan, daha fazla organik çözücü gerektiren, sonuç olarak birçok hataları (toplam hatanın yaklaşık % 60) da beraberinde getiren yöntemlerdir. Sunulan tez kapsamında OTA tayinine yönelik hazırlanan monolitik afinite kolonları ile 2D-HPLC sisteminde “çevrimiçi” olarak adlandırılan tek adımda tüm bu basamakları sağlamak mümkün hale gelmiştir. Literatür değerlendirmesi yapılırken dikkate alınan çalışmalarda doğrusal aralık, LOD, LOQ, RSD ve geri kazanım sonuçları karşılaştırılmıştır. Oldukça düşük değerlerdeki OTA derişiminde analiz yapılabildiği gibi, yüksek derişimlerde OTA analizi yapmak da mümkündür. 2D-HPLC sisteminde OTA’nın P(HEMAPA)-4 monolitik kolonu ile LOQ ve LOD değerleri sırasıyla 0.0643 ng/mL ve 0.0212 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Diğer çalışmalarda kıyaslandığında hemen hemen hepsinden daha düşük miktar tayininin yapılabileceği ve teşhis edilebilecek daha düşük sınır değerlerine inilebildiği açıkça görülmektedir. Karşılaştırma yapılan tüm çalışmalar arasında % RSD değerleri incelendiğinde, en iyi sonuçların 2D-HPLC sisteminde kullanılan P(HEMAPA)-4 monolitik kolonu ile elde edildiği ayrıca belirtilmelidir. Elde edilen sonuçların ışığında tez kapsamında kullanılan P(HEMAPA)-4 monolitik kolonların piyasada

OTA'nın analizinde kullanılan IAC ve SPE kolonlarına alternatif olabileceği kanıtlanmıştır.

Çizelge 4.5. Literatür karşılaştırması.

| Örnek Hazırlama | Ayırma/Tayin | Doğrusal aralık (µg/L) | LOD (µg/L) | LOQ (µg/L) | RSD (%) | Geri Kazanım (%) | Kaynaklar |
|--|--------------|------------------------|------------|------------|-----------|------------------|---------------|
| RP-18 SPE | LC-MS/MS | 0.15-10 | 0.05 | 0.15 | | 100.5 | [185] |
| IAC | LC-FD | 0.04-3.0 | 0.01 | 0.04 | 2.90 | 91.8 | [183] |
| C18 | LC-FD | 0.04-3.0 | 0.09 | 0.3 | 3.50 | 93.2 | [183] |
| SPE | UPLC-MS | 0.5-100 | 0.02 | 0.07 | 9.0-14.2 | 78.2-104.7 | [186] |
| IAC | LC-ESI-MS/MS | 1-200 | 0.3 | 0.8 | 4.5 | 89.3-99.1 | [187] |
| Nano-γ-Fe ₂ O ₃ -aptamer | HPLC-FD | 2-500 | 0.3 | 1.0 | 1.96-7.76 | 67.2-90.4 | [188] |
| IAC | HPLC-FD | 0.9-50 | 0.3 | 0.9 | 2.3-4.4 | 88.6-99.5 | [189] |
| IAC | HPLC-FD | 0.8-30 | 0.25 | 0.8 | 4.24 | 93.6-97.3 | [190] |
| MISPE | HPLC-FD | 0.1-5 | 0.075 | 0.225 | | | [191] |
| IAC | HPLC-FD | 1.0-100 | 0.2 | 0.5 | 6.2-11.8 | 75.0-102.0 | [192] |
| IAC | LC-MS/MS | | 0.01 | 0.08 | 1.08-2.10 | | [193] |
| SPE | HPLC-FD | 0.02-3.0 | 0.08 | 0.25 | 3.8-7.6 | 88.0 | [194] |
| SPE | HPLC-FD | 0.5-100 | 0.01 | 0.03 | 2.0-3.0 | 95.6-99.2 | [195] |
| 2D-HPLC | 2D-HPLC | 0.5-20.0 | 0.0212 | 0.0643 | 0.21-1.31 | 104.34 | Sunulan tezde |

5. YORUM

- Tez çalışmasının çıkış noktası, piyasada bulunan Okratoksin A'nın analizinde kullanılan multi-toksin immünoafinite kolonlarına alternatif olabilecek yeni nesil monolitik HPLC kolonlar hazırlamaktır.
- Bu amaç doğrultusunda ilk olarak hidrofobik ligand olarak kullanılan L-fenilalanin molekülünün polimerleşebilen türevi olan N-metakriloil-L-fenilalanin (MAPA) monomeri sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir.
- Tez çalışmasının birinci özgün değeri, MAPA monomeri ile afinite etkileşimleri temeline dayalı hidrofobik monolitik HPLC kolonları yığın polimerizasyonu ile HPLC çelik kolonlar içerisinde hazırlanmıştır.
- Sentezlenen hidrofobik monolitik kolonları ile okratoksin A analiz koşullarının optimizasyonu tek-boyutlu HPLC sisteminde belirlenmiştir.
- Tez çalışmasının ikinci özgün değeri, OTA optimizasyon koşullarından sonra, ön kolon olarak sentezlenen hidrofobik monolitik kolon, ikinci kolon olarak da ters faz C18 kolonları HPLC sistemine bağlanmış, iki-boyutlu HPLC uygulamalarında OTA analizi incelenmiş ve gıda maddelerindeki (bira, şarap, mısır ve kahve) OTA eş zamanlı olarak tespit edilmiştir.
- Diğer bir özgün değeri ise piyasadaki OTA analizi için multi-toksin immünoafinite kolonları kullanılırken özütleme gibi ön işlem basamaklarının kullanımı gerekmekte ve saflaştırılan OTA örnekleri HPLC sistemine bir ara eleman aracılığı ile verilmektedir. Bundan dolayı insan kaynaklı hata payları çalışma esnasında olabilmektedir. Bu hata paylarını en aza indirmek ve birden fazla basamağın önüne geçilerek daha hızlı OTA analizi gerçekleştirebilmek için iki-boyutlu HPLC sistemleri kullanılmıştır. Bu şekilde OTA analiz/zaman oranı iyileştirilmiş ve OTA analizinde elde edilen verim oldukça üst seviyeye çıkarılmıştır.

- Piyasada ticari olarak satılan multi-toksin immünoafinite kolonlarının tek kullanımlık olması OTA analiz maliyetini oldukça arttırmaktadır. Sentezlenen hidrofobik monolitik kolonlarının düşük maliyet ve tekrar kullanılabilirliğinin iyi olması OTA tayin işleminin maliyetini önemli ölçüde azaltan bir etmendir.
- Sentezlenen hidrofobik monolitik kolonlarının OTA adsorpsiyon veriminde önemli bir azalma olmadan defalarca kullanılabilir olması ve ara eleman ihtiyacını ortadan kaldırarak iki-boyutlu HPLC sisteminde OTA analizlerini yüksek verimde elde etmesi, piyasada kullanılan ticari multi-toksin immünoafinite kolonlarına potansiyel alternatif olabileceğini göstermektedir.



KAYNAKLAR

- [1] Motarjemi, Y., Encyclopedia of food safety, *Academic Press*, **2013**.
- [2] Trucksess, M., Diaz-Amigo, C., Mycotoxins in foods, *Encyclopedia of Environmental Health*, 888-897, **2011**.
- [3] Turner, N.W., Subrahmanyam, S., Piletsky, S.A., Analytical methods for determination of mycotoxins: a review, *Analytica Chimica Acta*, 632, 168-180, **2009**.
- [4] da Rocha, M.E.B., Freire, F.d.C.O., Maia, F.E.F., Guedes, M.I.F., Rondina, D., Mycotoxins and their effects on human and animal health, *Food Control*, 36, 159-165, **2014**.
- [5] Ali, W.H., Derrien, D., Alix, F., Pérollier, C., Lépine, O., Bayouth, S., Chapuis-Hugon, F., Pichon, V., Solid-phase extraction using molecularly imprinted polymers for selective extraction of a mycotoxin in cereals, *Journal of Chromatography A*, 1217, 6668-6673, **2010**.
- [6] Brera, C., Caputi, R., Miraglia, M., Iavicoli, I., Salerno, A., Carelli, G., Exposure assessment to mycotoxins in workplaces: aflatoxins and ochratoxin A occurrence in airborne dusts and human sera, *Microchemical Journal*, 73, 167-173, **2002**.
- [7] Bryden, W.L., Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security, *Animal Feed Science and Technology*, 173, 134-158, **2012**.
- [8] Calleri, E., Marrubini, G., Brusotti, G., Massolini, G., Caccialanza, G., Development and integration of an immunoaffinity monolithic disk for the on-line solid-phase extraction and HPLC determination with fluorescence detection of aflatoxin B1 in aqueous solutions, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44, 396-403, **2007**.
- [9] Cattaneo, T.M., Marinoni, L., Barzaghi, S., Cremonesi, K., Monti, L., Testing the suitability of different high-performance liquid chromatographic methods to determine aflatoxin M1 in a soft fresh Italian cheese, *Journal of Chromatography A*, 1218, 4738-4745, **2011**.
- [10] Clarke, R., Connolly, L., Frizzell, C., Elliott, C.T., Cytotoxic assessment of the regulated, co-existing mycotoxins aflatoxin B1, fumonisin B1 and ochratoxin, in single, binary and tertiary mixtures, *Toxicon*, 90, 70-81, **2014**.
- [11] Rodríguez, M.C., Sánchez, G.H., Sobrero, M.S., Schenone, A.V., Marsili, N.R., Determination of mycotoxins (aflatoxins and ochratoxin A) using fluorescence emission-excitation matrices and multivariate calibration, *Microchemical Journal*, 110, 480-484, **2013**.
- [12] Van Alfen, N.K., *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems: 5-Volume Set*, Elsevier, **2014**.
- [13] Vidal, J.C., Bonel, L., Ezquerro, A., Hernández, S., Bertolín, J.R., Cubel, C., Castillo, J.R., Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review, *Biosensors and Bioelectronics*, 49, 146-158, **2013**.
- [14] Bryden, W., *Mycotoxins: Natural Food Chain Contaminants and Human Health*, **2011**.

- [15] Marin, S., Ramos, A., Cano-Sancho, G., Sanchis, V., Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment, *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218-237, **2013**.
- [16] Barkai-Golan, R., Paster, N., *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*, Academic Press, **2011**.
- [17] Frizzell, C., Verhaegen, S., Ropstad, E., Elliott, C., Connolly, L., Endocrine disrupting effects of ochratoxin A at the level of nuclear receptor activation and steroidogenesis, *Toxicology Letters*, 217, 243-250, **2013**.
- [18] Jalili, M., Jinap, S., Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in commercial dried chili, *Food Control*, 24, 160-164, **2012**.
- [19] Marroquín-Cardona, A., Johnson, N., Phillips, T., Hayes, A., Mycotoxins in a changing global environment—A review, *Food and Chemical Toxicology*, 69, 220-230, **2014**.
- [20] Richard, J.L., Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview, *International Journal of Food Microbiology*, 119, 3-10, **2007**.
- [21] Duarte, S., Pena, A., Lino, C., A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products, *Food Microbiology*, 27, 187-198, **2010**.
- [22] Amézqueta, S., González-Peñas, E., Murillo-Arbizu, M., de Cerain, A.L., Ochratoxin A decontamination: A review, *Food Control*, 20, 326-333, **2009**.
- [23] Anli, E., Alkis, İ.M., Ochratoxin A and brewing technology: a review, *Journal of the Institute of Brewing*, 116, 23-32, **2010**.
- [24] Vettorazzi, A., González-Peñas, E., de Cerain, A.L., Ochratoxin A kinetics: A review of analytical methods and studies in rat model, *Food and Chemical Toxicology*, 72, 273-288, **2014**.
- [25] Wu, Q., Dohnal, V., Huang, L., Kuca, K., Wang, X., Chen, G., Yuan, Z., Metabolic pathways of ochratoxin A, *Current Drug Metabolism*, 12, 1-10, **2011**.
- [26] Zain, M.E., Impact of mycotoxins on humans and animals, *Journal of Saudi Chemical Society*, 15, 129-144, **2011**.
- [27] Duarte, S., Pena, A., Lino, C., Ochratoxin A non-conventional exposure sources—A review, *Microchemical Journal*, 93, 115-120, **2009**.
- [28] Péteri, Z., Téren, J., Vágvölgyi, C., Varga, J., Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts, *Food Microbiology*, 24, 205-210, **2007**.
- [29] Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O., Dutler, H., Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents, *Toxicology Letters*, 122, 179-188, **2001**.
- [30] Quintela, S., Villarán, M.C., de Armentia, I.L., Elejalde, E., Ochratoxin A removal in wine: a review, *Food Control*, 30, 439-445, **2013**.
- [31] Duarte, S.C., Pena, A., Lino, C.M., Human ochratoxin A biomarkers—from exposure to effect, *Critical Reviews in Toxicology*, 41, 187-212, **2011**.

- [32] Frisvad, J.C., Samson, R.A., Neopetromyces gen. nov. and an overview of teleomorphs of Aspergillus subgenus Circumdati, *Studies in Mycology*, 201-208, **2000**.
- [33] El Khoury, A., Atoui, A., Ochratoxin A: general overview and actual molecular status, *Toxins*, 2, 461-493, **2010**.
- [34] Afsah-Hejri, L., Jinap, S., Mirhosseini, H., Ochratoxin A quantification: newly developed HPLC conditions, *Food Control*, 23, 113-119, **2012**.
- [35] Garcia-Villanova, R.J., Cerdón, C., González Paramás, A.M., Aparicio, P., Garcia Rosales, M.E., Simultaneous immunoaffinity column cleanup and HPLC analysis of aflatoxins and ochratoxin A in Spanish bee pollen, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7235-7239, **2004**.
- [36] Běláková, S., Benešová, K., Mikulíková, R., Svoboda, Z., Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Food Chemistry*, 126, 321-325, **2011**.
- [37] Leitner, A., Zöllner, P., Paolillo, A., Stroka, J., Papadopoulou-Bouraoui, A., Jaborek, S., Anklam, E., Lindner, W., Comparison of methods for the determination of ochratoxin A in wine, *Analytica Chimica Acta*, 453, 33-41, **2002**.
- [38] Ceci, E., Bozzo, G., Bonerba, E., Di Pinto, A., Tantillo, M., Ochratoxin A detection by HPLC in target tissues of swine and cytological and histological analysis, *Food Chemistry*, 105, 364-368, **2007**.
- [39] Mally, A., Ochratoxin A and mitotic disruption: mode of action analysis of renal tumor formation by ochratoxin A, *Toxicological Sciences*, 127, 315-330, **2012**.
- [40] Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville, R.A., Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans, *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 61-99, **2007**.
- [41] Vettorazzi, A., van Delft, J., de Cerain, A.L., A review on ochratoxin A transcriptomic studies, *Food and Chemical Toxicology*, 59, 766-783, **2013**.
- [42] Marin-Kuan, M., Cavin, C., Delatour, T., Schilter, B., Ochratoxin A carcinogenicity involves a complex network of epigenetic mechanisms, *Toxicon*, 52, 195-202, **2008**.
- [43] Clark, H.A., Snedeker, S.M., Ochratoxin A: its cancer risk and potential for exposure, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, 9, 265-296, **2006**.
- [44] Coronel, M., Sanchis, V., Ramos, A., Marin, S., Review. Ochratoxin A: presence in human plasma and intake estimation, *Food Science and Technology International*, **2010**.
- [45] Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, EK1: Gıdalardaki bulaşanların maksimum limitleri, 28157 (3.Mükerrer), **2011**.
- [46] Karima, H.-K., Ridha, G., Zied, A., Chekib, M., Salem, M., Abderrazek, H., Estimation of Ochratoxin A in human blood of healthy Tunisian population, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62, 539-542, **2010**.

- [47] Pascale, M., Visconti, A., Rapid method for the determination of ochratoxin A in urine by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography, *Mycopathologia*, 152, 91-95, **2001**.
- [48] Reinsch, M., Töpfer, A., Lehmann, A., Nehls, I., Determination of ochratoxin A in wine by liquid chromatography tandem mass spectrometry after combined anion-exchange/reversed-phase clean-up, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, 1592-1595, **2005**.
- [49] Vatinno, R., Vuckovic, D., Zambonin, C., Pawliszyn, J., Automated high-throughput method using solid-phase microextraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of ochratoxin A in human urine, *Journal of Chromatography A*, 1201, 215-221, **2008**.
- [50] Stojanovska-Dimzoska, B., Hajrulai-Musliu, Z., Dimitrieska-Stojković, E., Uzunov, R., Sekulovski, P., Occurrence of aflatoxins in peanuts and peanut products determined by liquid chromatography with fluorescence detection, *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, 27-35, **2013**.
- [51] Adányi, N., Levkovets, I., Rodriguez-Gil, S., Ronald, A., Váradi, M., Szendrő, I., Development of immunosensor based on OWLS technique for determining Aflatoxin B1 and Ochratoxin A, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 797-802, **2007**.
- [52] Hernández, M.J., García-Moreno, M.V., Durán, E., Guillén, D., Barroso, C.G., Validation of two analytical methods for the determination of ochratoxin A by reversed-phased high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection in musts and sweet wines from Andalusia, *Analytica Chimica Acta*, 566, 117-121, **2006**.
- [53] Lee, T.P., Saad, B., Khayoon, W.S., Salleh, B., Molecularly imprinted polymer as sorbent in micro-solid phase extraction of ochratoxin A in coffee, grape juice and urine, *Talanta*, 88, 129-135, **2012**.
- [54] Zhang, A., Ma, Y., Feng, L., Wang, Y., He, C., Wang, X., Zhang, H., Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China, *Food Control*, 22, 1723-1728, **2011**.
- [55] Visconti, A., De Girolamo, A., Fitness for purpose–Ochratoxin A analytical developments, *Food Additives and Contaminants*, 22, 37-44, **2005**.
- [56] Frenette, C., Paugh, R.J., Tozlovanu, M., Juzio, M., Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville, R.A., Structure–activity relationships for the fluorescence of ochratoxin A: Insight for detection of ochratoxin A metabolites, *Analytica Chimica Acta*, 617, 153-161, **2008**.
- [57] Bazin, I., Andreotti, N., Hassine, A.I.H., De Waard, M., Sabatier, J.-M., Gonzalez, C., Peptide binding to ochratoxin A mycotoxin: a new approach in conception of biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 40, 240-246, **2013**.

- [58] Podgornik, A., Jančar, J., Merhar, M., Kozamernik, S., Glover, D., Čuček, K., Barut, M., Štrancar, A., Large-scale methacrylate monolithic columns: design and properties, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 60, 179-189, **2004**.
- [59] Vlakh, E.G., Tennikova, T.B., Preparation of methacrylate monoliths, *Journal of Separation Science*, 30, 2801-2813, **2007**.
- [60] Josic, D., Buchacher, A., Jungbauer, A., Monoliths as stationary phases for separation of proteins and polynucleotides and enzymatic conversion, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 752, 191-205, **2001**.
- [61] Arrua, R.D., Talebi, M., Causon, T.J., Hilder, E.F., Review of recent advances in the preparation of organic polymer monoliths for liquid chromatography of large molecules, *Analytica Chimica Acta*, 738, 1-12, **2012**.
- [62] Svec, F., Fréchet, J.M., Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media, *Analytical Chemistry*, 64, 820-822, **1992**.
- [63] Minakuchi, H., Ishizuka, N., Nakanishi, K., Soga, N., Tanaka, N., Performance of an octadecylsilylated continuous porous silica column in polypeptide separations, *Journal of Chromatography A*, 828, 83-90, **1998**.
- [64] Minakuchi, H., Nakanishi, K., Soga, N., Ishizuka, N., Tanaka, N., Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed-phase liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, 68, 3498-3501, **1996**.
- [65] Minakuchi, H., Nakanishi, K., Soga, N., Ishizuka, N., Tanaka, N., Effect of skeleton size on the performance of octadecylsilylated continuous porous silica columns in reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 762, 135-146, **1997**.
- [66] Minakuchi, H., Nakanishi, K., Soga, N., Ishizuka, N., Tanaka, N., Effect of domain size on the performance of octadecylsilylated continuous porous silica columns in reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 797, 121-131, **1998**.
- [67] Nakanishi, K., Minakuchi, H., Soga, N., Tanaka, N., Double pore silica gel monolith applied to liquid chromatography, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 8, 547-552, **1997**.
- [68] Mould, D., Synge, R., Electrokinetic ultrafiltration analysis of polysaccharides. A new approach to the chromatography of large molecules, *Analyst*, 77, 964-969, **1952**.
- [69] Mould, D., Synge, R., Separations of polysaccharides related to starch by electrokinetic ultrafiltration in collodion membranes, *Biochemical Journal*, 58, 571, **1954**.
- [70] Kubin, M., Špaček, P., Chromeček, R., Gel permeation chromatography on porous poly (ethylene glycol methacrylate), *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 32, 3881-3887, **1967**.

- [71] Ross, W.D., Jefferson, R.T., In Situ—Formed Open-Pore Polyurethane as Chromatography Supports, *Journal of Chromatographic Science*, 8, 386-389, **1970**.
- [72] Schnecko, H., Bieber, O., Foam filled columns in gas chromatography, *Chromatographia*, 4, 109-112, **1971**.
- [73] Nakanishi, K., Soga, N., Phase separation in gelling silica–organic polymer solution: systems containing poly (sodium styrenesulfonate), *Journal of the American Ceramic Society*, 74, 2518-2530, **1991**.
- [74] Bai, L., Liu, H., Liu, Y., Zhang, X., Yang, G., Ma, Z., Preparation of a novel hybrid organic–inorganic monolith for the separation of lysozyme by high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1218, 100-106, **2011**.
- [75] Moreira, S.D., Silva, C.J., Prado, L.A., Costa, M.F., Boev, V.I., Martín-Sánchez, J., Gomes, M., Development of new high transparent hybrid organic–inorganic monoliths with surface engraved diffraction pattern, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 50, 492-499, **2012**.
- [76] Wu, M., Wu, R.a., Wang, F., Ren, L., Dong, J., Liu, Z., Zou, H., “One-pot” process for fabrication of organic-silica hybrid monolithic capillary columns using organic monomer and alkoxy silane, *Analytical Chemistry*, 81, 3529-3536, **2009**.
- [77] Zheng, M.-M., Ruan, G.-D., Feng, Y.-Q., Hybrid organic–inorganic silica monolith with hydrophobic/strong cation-exchange functional groups as a sorbent for micro-solid phase extraction, *Journal of Chromatography A*, 1216, 7739-7746, **2009**.
- [78] Podgornik, A., Barut, M., Štrancar, A., Josić, D., Koloini, T., Construction of large-volume monolithic columns, *Analytical Chemistry*, 72, 5693-5699, **2000**.
- [79] Tennikova, T., Svec, F., Belenkii, B., High-performance membrane chromatography. A novel method of protein separation, *Journal of Liquid Chromatography*, 13, 63-70, **1990**.
- [80] Svec, F., Tennikova, T.B., Deyl, Z., *Monolithic materials: preparation, properties and applications*, Elsevier, **2003**.
- [81] Unger, K.K., Tanaka, N., Machtejevas, E., *Monolithic silicas in separation science: concepts, syntheses, characterization, modeling and applications*, John Wiley & Sons, **2010**.
- [82] Wang, P.G., *Monolithic chromatography and its modern applications*, ILM publications, **2010**.
- [83] Svec, F., Frechet, J.M., New designs of macroporous polymers and supports: from separation to biocatalysis, *Science*, 205-210, **1996**.
- [84] Peters, E.C., Svec, F., Frechet, J.M., Rigid macroporous polymer monoliths, *Advanced Materials*, 11, 1169-1181, **1999**.

- [85] Svec, F., Frechet, J.M., Molded rigid monolithic porous polymers: an inexpensive, efficient, and versatile alternative to beads for the design of materials for numerous applications, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 38, 34-48, **1999**.
- [86] Mallik, R., Hage, D.S., Affinity monolith chromatography, *Journal of Separation Science*, 29, 1686-1704, **2006**.
- [87] Svec, F., Porous polymer monoliths: amazingly wide variety of techniques enabling their preparation, *Journal of Chromatography A*, 1217, 902-924, **2010**.
- [88] Urban, J., Svec, F., Fréchet, J.M., Efficient separation of small molecules using a large surface area hypercrosslinked monolithic polymer capillary column, *Analytical Chemistry*, 82, 1621-1623, **2010**.
- [89] Viklund, C., Svec, F., Fréchet, J.M., Irgum, K., Monolithic, "molded", porous materials with high flow characteristics for separations, catalysis, or solid-phase chemistry: control of porous properties during polymerization, *Chemistry of Materials*, 8, 744-750, **1996**.
- [90] Svec, F., Less common applications of monoliths: I. Microscale protein mapping with proteolytic enzymes immobilized on monolithic supports, *Electrophoresis*, 27, 947-961, **2006**.
- [91] Svec, F., Less common applications of monoliths: Preconcentration and solid-phase extraction, *Journal of Chromatography B*, 841, 52-64, **2006**.
- [92] Svec, F., Kurganov, A.A., Less common applications of monoliths: III. Gas chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1184, 281-295, **2008**.
- [93] Krenkova, J., Svec, F., Less common applications of monoliths: IV. Recent developments in immobilized enzyme reactors for proteomics and biotechnology, *Journal of Separation Science*, 32, 706-718, **2009**.
- [94] Blomberg, L.G., Two new techniques for sample preparation in bioanalysis: microextraction in packed sorbent (MEPS) and use of a bonded monolith as sorbent for sample preparation in polypropylene tips for 96-well plates, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393, 797-807, **2009**.
- [95] Tennikova, T.B., Freitag, R., An introduction to monolithic disks as stationary phases for high performance biochromatography, *Journal of High Resolution Chromatography*, 23, 27-38, **2000**.
- [96] Peterson, D.S., Solid supports for micro analytical systems, *Lab on a Chip*, 5, 132-139, **2005**.
- [97] Li, Y., Lee, M.L., Biocompatible polymeric monoliths for protein and peptide separations, *Journal of Separation Science*, 32, 3369-3378, **2009**.
- [98] Namera, A., Nakamoto, A., Saito, T., Miyazaki, S., Monolith as a new sample preparation material: Recent devices and applications, *Journal of Separation Science*, 34, 901-924, **2011**.
- [99] Vlakh, E., Tennikova, T., Applications of polymethacrylate-based monoliths in high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1216, 2637-2650, **2009**.

- [100] Uzun, L., Yavuz, H., Say, R., Ersöz, A., Denizli, A., Poly (ethylene dimethacrylate-glycidyl methacrylate) monolith as a stationary phase in dye-affinity chromatography, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 43, 6507-6513, **2004**.
- [101] Ciesla, U., Schüth, F., Ordered mesoporous materials, *Microporous and Mesoporous Materials*, 27, 131-149, **1999**.
- [102] Liapis, A., Meyers, J., Crosser, O., Modeling and simulation of the dynamic behavior of monoliths: Effects of pore structure from pore network model analysis and comparison with columns packed with porous spherical particles, *Journal of Chromatography A*, 865, 13-25, **1999**.
- [103] Buchmeiser, M.R., Polymeric monolithic materials: syntheses, properties, functionalization and applications, *Polymer*, 48, 2187-2198, **2007**.
- [104] Ikegami, T., Hara, T., Kimura, H., Kobayashi, H., Hosoya, K., Cabrera, K., Tanaka, N., Two-dimensional reversed-phase liquid chromatography using two monolithic silica C18 columns and different mobile phase modifiers in the two dimensions, *Journal of Chromatography A*, 1106, 112-117, **2006**.
- [105] Köhne, A.P., Welsch, T., Coupling of a microbore column with a column packed with non-porous particles for fast comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 845, 463-469, **1999**.
- [106] Hata, K., Morisaka, H., Hara, K., Mima, J., Yumoto, N., Tatsu, Y., Furuno, M., Ishizuka, N., Ueda, M., Two-dimensional HPLC on-line analysis of phosphopeptides using titania and monolithic columns, *Analytical Biochemistry*, 350, 292-297, **2006**.
- [107] Kivilompolo, M., Hyötyläinen, T., Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids, *Journal of Chromatography A*, 1145, 155-164, **2007**.
- [108] Stoll, D.R., Li, X., Wang, X., Carr, P.W., Porter, S.E., Rutan, S.C., Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1168, 3-43, **2007**.
- [109] Marlot, L., Faure, K., Preparative two dimensional separations involving liquid-liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1494, 1-17, **2017**.
- [110] Mikuma, T., Uchida, R., Kajiya, M., Hiruta, Y., Kanazawa, H., The use of a temperature-responsive column for the direct analysis of drugs in serum by two-dimensional heart-cutting liquid chromatography, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409, 1059-1065, **2017**.
- [111] Dixon, S.P., Pitfield, I.D., Perrett, D., Comprehensive multi-dimensional liquid chromatographic separation in biomedical and pharmaceutical analysis: a review, *Biomedical Chromatography*, 20, 508-529, **2006**.
- [112] Dugo, P., Cacciola, F., Kumm, T., Dugo, G., Mondello, L., Comprehensive multidimensional liquid chromatography: theory and applications, *Journal of Chromatography A*, 1184, 353-368, **2008**.

- [113] Guttman, A., Varoglu, M., Khandurina, J., Multidimensional separations in the pharmaceutical arena, *Drug Discovery Today*, 9, 136-144, **2004**.
- [114] Jandera, P., Column selectivity for two-dimensional liquid chromatography, *Journal of Separation Science*, 29, 1763-1783, **2006**.
- [115] Liu, Z., Lee, M.L., Comprehensive two-dimensional separations using microcolumns, *Journal of Microcolumn Separations*, 12, 241-254, **2000**.
- [116] Shalliker, R.A., Gray, M.J., Concepts and practice of multidimensional high-performance liquid chromatography, *Advances In Chromatography*, New York, 44, 177, **2006**.
- [117] Shellie, R.A., Haddad, P.R., Comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 405-415, **2006**.
- [118] Stoll, D.R., Recent progress in online, comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography for non-proteomic applications, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 979-986, **2010**.
- [119] Tranchida, P.Q., Donato, P., Dugo, G., Mondello, L., Dugo, P., Comprehensive chromatographic methods for the analysis of lipids, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26, 191-205, **2007**.
- [120] Stevenson, P.G., Burns, N.K., Purcell, S.D., Francis, P.S., Barnett, N.W., Fry, F., Conlan, X.A., Application of 2D-HPLC coupled with principal component analysis to study an industrial opiate processing stream, *Talanta*, 166, 119-125, **2017**.
- [121] Zhang, K., Li, Y., Tsang, M., Chetwyn, N.P., Analysis of pharmaceutical impurities using multi-heartcutting 2D LC coupled with UV-charged aerosol MS detection, *Journal of Separation Science*, 36, 2986-2992, **2013**.
- [122] Neue, U.D., Peak capacity in unidimensional chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1184, 107-130, **2008**.
- [123] Neue, U.D., Theory of peak capacity in gradient elution, *Journal of Chromatography A*, 1079, 153-161, **2005**.
- [124] François, I., Sandra, K., Sandra, P., Comprehensive liquid chromatography: fundamental aspects and practical considerations—a review, *Analytica Chimica Acta*, 641, 14-31, **2009**.
- [125] Wang, X., Stoll, D.R., Schellinger, A.P., Carr, P.W., Peak capacity optimization of peptide separations in reversed-phase gradient elution chromatography: fixed column format, *Analytical Chemistry*, 78, 3406-3416, **2006**.
- [126] Liu, Z., Patterson Jr, D.G., Lee, M.L., Geometric approach to factor analysis for the estimation of orthogonality and practical peak capacity in comprehensive two-dimensional separations, *Analytical Chemistry*, 67, 3840-3845, **1995**.
- [127] Nowik, W., Bonose, M., Héron, S., Nowik, M., Tchaplá, A., Assessment of two-dimensional separative systems using the nearest neighbor distances approach. Part 2: separation quality aspects, *Analytical Chemistry*, 85, 9459-9468, **2013**.

- [128] Cui, Y., Shen, N., Yuan, X., Dang, J., Shao, Y., Mei, L., Tao, Y., Wang, Q., Liu, Z., Two-dimensional chromatography based on on-line HPLC-DPPH bioactivity-guided assay for the preparative isolation of analogue antioxidant compound from *Arenaria kansuensis*, *Journal of Chromatography B*, 1046, 81-86, **2017**.
- [129] Gilar, M., Olivova, P., Daly, A.E., Gebler, J.C., Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions, *Journal of Separation Science*, 28, 1694-1703, **2005**.
- [130] Gray, M.J., Sweeney, A.P., Dennis, G.R., Slonecker, P.J., Shalliker, R.A., Comprehensive coupled reversed-phase reversed-phase separations of a complex isomeric mixture, *Analyst*, 128, 598-604, **2003**.
- [131] Watson, N.E., Davis, J.M., Synovec, R.E., Observations on "orthogonality" in comprehensive two-dimensional separations, *Analytical Chemistry*, 79, 7924-7927, **2007**.
- [132] François, I., De Villiers, A., Sandra, P., Considerations on the possibilities and limitations of comprehensive normal phase-reversed phase liquid chromatography (NPLC× RPLC), *Journal of Separation Science*, 29, 492-498, **2006**.
- [133] Bedani, F., Kok, W.T., Janssen, H.-G., A theoretical basis for parameter selection and instrument design in comprehensive size-exclusion chromatography× liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1133, 126-134, **2006**.
- [134] Schoenmakers, P.J., Vivó-Truyols, G., Decrop, W.M., A protocol for designing comprehensive two-dimensional liquid chromatography separation systems, *Journal of Chromatography A*, 1120, 282-290, **2006**.
- [135] Wilson, S.R., Jankowski, M., Pepaj, M., Mihailova, A., Boix, F., Truyols, G.V., Lundanes, E., Greibrokk, T., 2D LC separation and determination of bradykinin in rat muscle tissue dialysate with on-line SPE-HILIC-SPE-RP-MS, *Chromatographia*, 66, 469-474, **2007**.
- [136] Wang, S., Zhou, L., Wang, Z., Shi, X., Xu, G., Simultaneous metabolomics and lipidomics analysis based on novel heart-cutting two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 966, 34-40, **2017**.
- [137] Xiu-Man, X., Wan-Yang, S., Huang, J.-Y., Polachi, N., Ling, T., Guo-Xiang, S., Preparative High Performance Liquid Chromatography-based Multidimensional Chromatography and Its Application in Traditional Chinese Medicine, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 44, 1140-1147, **2016**.
- [138] Englert, M., Brown, L., Vetter, W., Heart-cut two-dimensional countercurrent chromatography with a single instrument, *Analytical Chemistry*, 87, 10172-10177, **2015**.
- [139] Mondello, L., Tranchida, P., Stanek, V., Jandera, P., Dugo, G., Dugo, P., Silver-ion reversed-phase comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in lipidic food analysis, *Journal of Chromatography A*, 1086, 91-98, **2005**.

- [140] Wagner, K., Racaityte, K., Unger, K., Miliotis, T., Edholm, L., Bischoff, R., Marko-Varga, G., Protein mapping by two-dimensional high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 893, 293-305, **2000**.
- [141] Stoll, D.R., Carr, P.W., Fast, comprehensive two-dimensional HPLC separation of tryptic peptides based on high-temperature HPLC, *Journal of the American Chemical Society*, 127, 5034-5035, **2005**.
- [142] Stoll, D.R., Cohen, J.D., Carr, P.W., Fast, comprehensive online two-dimensional high performance liquid chromatography through the use of high temperature ultra-fast gradient elution reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1122, 123-137, **2006**.
- [143] Baumgaertel, A., Altuntaş, E., Schubert, U.S., Recent developments in the detailed characterization of polymers by multidimensional chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1240, 1-20, **2012**.
- [144] van der Horst, A., Schoenmakers, P.J., Comprehensive two-dimensional liquid chromatography of polymers, *Journal of Chromatography A*, 1000, 693-709, **2003**.
- [145] Dugo, P., Favoino, O., Luppino, R., Dugo, G., Mondello, L., Comprehensive two-dimensional normal-phase (adsorption)-reversed-phase liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, 76, 2525-2530, **2004**.
- [146] Jiang, X., van der Horst, A., Lima, V., Schoenmakers, P.J., Comprehensive two-dimensional liquid chromatography for the characterization of functional acrylate polymers, *Journal of Chromatography A*, 1076, 51-61, **2005**.
- [147] Simpkins, S.W., Bedard, J.W., Groskreutz, S.R., Swenson, M.M., Liskutin, T.E., Stoll, D.R., Targeted three-dimensional liquid chromatography: A versatile tool for quantitative trace analysis in complex matrices, *Journal of Chromatography A*, 1217, 7648-7660, **2010**.
- [148] Dijkman, E., Mooibroek, D., Hoogerbrugge, R., Hogendoorn, E., Sancho, J.-V., Pozo, O., Hernández, F., Study of matrix effects on the direct trace analysis of acidic pesticides in water using various liquid chromatographic modes coupled to tandem mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A*, 926, 113-125, **2001**.
- [149] Kilz, P., Adler, M., 2D Polymer LC as a High-Speed, High-Throughput Application, *LC/GC Europe*, 19, 552-556, **2006**.
- [150] Popovici, S.T., van der Horst, A., Schoenmakers, P.J., Two-dimensional chromatography as a tool for studying band broadening in size-exclusion chromatography, *Journal of Separation Science*, 28, 1457-1466, **2005**.
- [151] Reingruber, E., Jansen, J.J., Buchberger, W., Schoenmakers, P., Transfer-volume effects in two-dimensional chromatography: Adsorption-phenomena in second-dimension size-exclusion chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1218, 1147-1152, **2011**.
- [152] Im, K., Park, H.-w., Lee, S., Chang, T., Two-dimensional liquid chromatography analysis of synthetic polymers using fast size exclusion chromatography at high column temperature, *Journal of Chromatography A*, 1216, 4606-4610, **2009**.

- [153] Berek, D., Two-dimensional liquid chromatography of synthetic polymers, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 421-441, **2010**.
- [154] Yang, S.H., Wang, J., Zhang, K., Validation of a two-dimensional liquid chromatography method for quality control testing of pharmaceutical materials, *Journal of Chromatography A*, 1492, 89-97, **2017**.
- [155] Hu, R., Dai, X., Xu, X., Sun, C., Pan, Y., Two-dimensional counter-current chromatography: 1st Traditional counter-current chromatography, 2nd acid–base elution counter-current chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1218, 6085-6091, **2011**.
- [156] Erni, F., Frei, R., Two-dimensional column liquid chromatographic technique for resolution of complex mixtures, *Journal of Chromatography A*, 149, 561-569, **1978**.
- [157] Zeng, J., Zhang, X., Guo, Z., Feng, J., Zeng, J., Xue, X., Liang, X., Separation and identification of flavonoids from complex samples using off-line two-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1220, 50-56, **2012**.
- [158] Su, W., Liu, Q., Yang, Q., Yu, J., Chen, X., Separation and purification of four compounds from *Desmodium styracifolium* using off-line two-dimensional high-speed counter-current chromatography, *Journal of Separation Science*, 36, 3338-3344, **2013**.
- [159] Opiteck, G.J., Jorgenson, J.W., Anderegg, R.J., Two-dimensional SEC/RPLC coupled to mass spectrometry for the analysis of peptides, *Analytical Chemistry*, 69, 2283-2291, **1997**.
- [160] Opiteck, G.J., Ramirez, S.M., Jorgenson, J.W., Moseley, M.A., Comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography for the isolation of overexpressed proteins and proteome mapping, *Analytical Biochemistry*, 258, 349-361, **1998**.
- [161] Murahashi, T., Comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography for the separation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Analyst*, 128, 611-615, **2003**.
- [162] Tanaka, N., Kimura, H., Tokuda, D., Hosoya, K., Ikegami, T., Ishizuka, N., Minakuchi, H., Nakanishi, K., Shintani, Y., Furuno, M., Simple and comprehensive two-dimensional reversed-phase HPLC using monolithic silica columns, *Analytical Chemistry*, 76, 1273-1281, **2004**.
- [163] Pól, J., Hohnová, B., Jussila, M., Hyötyläinen, T., Comprehensive two-dimensional liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry in the analysis of acidic compounds in atmospheric aerosols, *Journal of Chromatography A*, 1130, 64-71, **2006**.
- [164] Wagner, K., Miliotis, T., Marko-Varga, G., Bischoff, R., Unger, K.K., An automated on-line multidimensional HPLC system for protein and peptide mapping with integrated sample preparation, *Analytical Chemistry*, 74, 809-820, **2002**.

- [165] Williams, A., Read, E.K., Agarabi, C.D., Lute, S., Brorson, K.A., Automated 2D-HPLC method for characterization of protein aggregation with in-line fraction collection device, *Journal of Chromatography B*, 1046, 122-130, **2017**.
- [166] Król-Kogus, B., Glód, D., Krauze-Baranowska, M., Matławska, I., Application of one-and two-dimensional high-performance liquid chromatography methodologies for the analysis of C-glycosylflavones from fenugreek seeds, *Journal of Chromatography A*, 1367, 48-56, **2014**.
- [167] Kalili, K.M., de Villiers, A., Off-line comprehensive 2-dimensional hydrophilic interaction \times reversed phase liquid chromatography analysis of procyanidins, *Journal of Chromatography A*, 1216, 6274-6284, **2009**.
- [168] Kalili, K.M., de Villiers, A., Off-line comprehensive two-dimensional hydrophilic interaction \times reversed phase liquid chromatographic analysis of green tea phenolics, *Journal of Separation Science*, 33, 853-863, **2010**.
- [169] Leitner, A., Castro-Rubio, F., Marina, M.L., Lindner, W., Identification of Marker Proteins for the Adulteration of Meat Products with Soybean Proteins by Multidimensional Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Proteome Research*, 5, 2424-2430, **2006**.
- [170] Zeleny, R., Altmann, F., Praznik, W., Structural characterization of the N-linked oligosaccharides from tomato fruit, *Phytochemistry*, 51, 199-210, **1999**.
- [171] Jakobsen, J., Clausen, I., Leth, T., Ovesen, L., A new method for the determination of vitamin D 3 and 25-hydroxyvitamin D 3 in meat, *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 777-787, **2004**.
- [172] McSheehy, S., Yang, W., Pannier, F., Szpunar, J., Łobiński, R., Auger, J., Potin-Gautier, M., Speciation analysis of selenium in garlic by two-dimensional high-performance liquid chromatography with parallel inductively coupled plasma mass spectrometric and electrospray tandem mass spectrometric detection, *Analytica Chimica Acta*, 421, 147-153, **2000**.
- [173] Lee, J., Lee, J., Watts, W.L., Barendt, J., Yan, T.Q., Huang, Y., Riley, F., Hardink, M., Bradow, J., Franco, P., On the method development of immobilized polysaccharide chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography using an extended range of modifiers, *Journal of Chromatography A*, 1374, 238-246, **2014**.
- [174] Stoll, D.R., Talus, E.S., Harmes, D.C., Zhang, K., Evaluation of detection sensitivity in comprehensive two-dimensional liquid chromatography separations of an active pharmaceutical ingredient and its degradants, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 265-277, **2015**.
- [175] Burns, N.K., Andrighetto, L.M., Conlan, X.A., Purcell, S.D., Barnett, N.W., Denning, J., Francis, P.S., Stevenson, P.G., Blind column selection protocol for two-dimensional high performance liquid chromatography, *Talanta*, 154, 85-91, **2016**.
- [176] Šnauko, M., Berek, D., Liquid Chromatography of Polymers under Limiting Conditions of Desorption, 3, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 206, 938-944, **2005**.

- [177] Cuong, N.V., Trathnigg, B., Adsorption interaction parameter of polyethers in ternary mobile phases: The critical adsorption line, *Journal of Separation Science*, 33, 1064-1071, **2010**.
- [178] Cho, D., Masuoka, K., Koguchi, K., Asari, T., Kawaguchi, D., Takano, A., Matsushita, Y., Preparation and characterization of cyclic polystyrenes, *Polymer Journal*, 37, 506-511, **2005**.
- [179] Hur, D., Ekti, S.F., Say, R., N-Acylbenzotriazole mediated synthesis of some methacrylamido amino acids, *Letters in Organic Chemistry*, 4, 585-587, **2007**.
- [180] Aresta, A., Vatinno, R., Palmisano, F., Zambonin, C.G., Determination of Ochratoxin A in wine at sub ng/mL levels by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography A*, 1115, 196-201, **2006**.
- [181] Öncel, Ş., Uzun, L., Garipcan, B., Denizli, A., Synthesis of phenylalanine-containing hydrophobic beads for lysozyme adsorption, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 44, 7049-7056, **2005**.
- [182] Widom, B., Bhimalapuram, P., Koga, K., The hydrophobic effect, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 5, 3085-3093, 2003.
- [183] Tessini, C., Mardones, C., von Baer, D., Vega, M., Herlitz, E., Saelzer, R., Silva, J., Torres, O., Alternatives for sample pre-treatment and HPLC determination of ochratoxin A in red wine using fluorescence detection, *Analytica Chimica Acta*, 660, 119-126, **2010**.
- [184] Geiser, L., Eeltink, S., Svec, F., Fréchet, J.M., Stability and repeatability of capillary columns based on porous monoliths of poly (butyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate), *Journal of Chromatography A*, 1140, 140-146, **2007**.
- [185] Zöllner, P., Leitner, A., Lubda, D., Cabrera, K., Lidner, W., Application of a chromolith SpeedROD RP-18e HPLC column: Determination of ochratoxin A in different wines by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Chromatographia*, 52, 818-820, **2000**.
- [186] Romero-González, R., Martínez Vidal, J.L., Aguilera-Luiz, M., Garrido Frenich, A., Application of conventional solid-phase extraction for multimycotoxin analysis in beers by ultrahigh-performance liquid chromatography– tandem mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 9385-9392, **2009**.
- [187] Yang, L., Wang, L., Pan, J., Xiang, L., Yang, M., Logrieco, A.F., Determination of ochratoxin A in traditional Chinese medicinal plants by HPLC–FLD, *Food Additives and Contaminants*, 27, 989-997, **2010**.
- [188] Wu, X., Hu, J., Zhu, B., Lu, L., Huang, X., Pang, D., Aptamer-targeted magnetic nanospheres as a solid-phase extraction sorbent for determination of ochratoxin A in food samples, *Journal of Chromatography A*, 1218, 7341-7346, **2011**.

- [189] Wen, J., Kong, W., Wang, J., Yang, M., Simultaneous determination of four aflatoxins and ochratoxin A in ginger and related products by HPLC with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and postcolumn photochemical derivatization, *Journal of Separation Science*, 36, 3709-3716, **2013**.
- [190] Kong, W.-J., Liu, S.-Y., Qiu, F., Xiao, X.-H., Yang, M.-H., Simultaneous multi-mycotoxin determination in nutmeg by ultrasound-assisted solid-liquid extraction and immunoaffinity column clean-up coupled with liquid chromatography and on-line post-column photochemical derivatization-fluorescence detection, *Analyst*, 138, 2729-2739, **2013**.
- [191] Giovannoli, C., Passini, C., Di Nardo, F., Anfossi, L., Baggiani, C., Determination of ochratoxin A in Italian red wines by molecularly imprinted solid phase extraction and HPLC analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 5220-5225, **2014**.
- [192] Zhao, X., Yuan, Y., Zhang, X., Yue, T., Identification of ochratoxin A in Chinese spices using HPLC fluorescent detectors with immunoaffinity column cleanup, *Food Control*, 46, 332-337, **2014**.
- [193] Ahn, S., Lee, S., Lee, J., Kim, B., Accurate determination of ochratoxin A in Korean fermented soybean paste by isotope dilution-liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Food Chemistry*, 190, 368-373, **2016**.
- [194] Savastano, M.L., Losito, I., Pati, S., Rapid and automatable determination of ochratoxin A in wine based on microextraction by packed sorbent followed by HPLC-FLD, *Food Control*, 68, 391-398, **2016**.
- [195] Sun, X., Niu, Y., Ma, T., Xu, P., Huang, W., Zhan, J., Determination, content analysis and removal efficiency of fining agents on ochratoxin A in Chinese wines, *Food Control*, 73, 382-392, **2017**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Ad Soyadı : Canan Armutcu Çorman
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 04.02.1985
Medeni Hali : Evli
E-posta : cananarmutcu@hacettepe.edu.tr
Adresi : Simon Bolivar caddesi, Duyu sokak, 22/7 Çankaya/Ankara

Eğitim

Lise : Çankaya Lisesi
Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
Ankara
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Kimya/Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara
Doktora : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Kimya/Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : İyi düzeyde

İş Deneyimi

2011- 2017 : Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri
Enstitüsü, Kimya Bölümü
2017-..... : Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi,
Kimya Bölümü, Biyokimya A.B.D.

Deneyim Alanları

Polimer, kriyojeller, moleküler baskılama, afinite kromatografisi, monolitler, HPLC

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Okratoksin A Tayini İçin Monolitik Afinite Kolonlarının Hazırlanması ve İki-Boyutlu Hplc Sisteminde Çevrimiçi Analizlerin İncelenmesi, 114 Z 708, TÜBİTAK, Yürütücü, 30000TL, 2016.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Canan Armutcu, Lokman Uzun, Adil Denizli, Automated 2D-HPLC method for the determination of Ochratoxin A in foodstuffs, Food Chemistry, 2017 (Gönderildi.)

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

1. Preparation and Characterization of Monolithic Affinity Columns for Ochratoxin A Detection (Poster), 9th National Affinity Techniques Symposium, 6-12 Eylül 2015, Köyceğiz, Muğla.
2. L-Phenylalanine incorporated monolithic columns for affinity ochratoxin A determination (Poster), AFFINITY 2017, 25-29 Haziran 2017, Paris, Fransa.
3. Separation and Determination of Ochratoxin A in Food Using Affinity Monolithic Column Coupled with Two-Dimensional HPLC System (Poster), 31st EFFoST International Conference, Food Science and Technology Challenges for the 21st Century, 13-16 Kasım 2017, Sitges, İspanya.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 28/11/2017

Tez Başlığı / Konusu: **Okratoksin A Tayini için Monolitik Afinite Kolonlarının Hazırlanması ve İki-boyutlu HPLC Sisteminde Çevrimiçi Analizlerin İncelenmesi**


Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 108 sayfalık kısmına ilişkin, 28/11/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 7 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.


28.11.2017
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Canan Armutcu Çorman
Öğrenci No: N11249956
Anabilim Dalı: Kimya
Programı: Doktora
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.



(Prof. Dr. Adil Denizli)