

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEŞİTLİ GIDA ÖRNEKLERİNDEKİ  
ZEARALENONUN İYONİK SIVI BAZLI  
DİSPERSİF SIVI-SIVI MİKROEKSTRAKSİYONU  
İLE ZENGİNLEŞTİRİLEREK HPLC İLE TAYİNİ**

**Gözde IŞIK**

**Ağustos, 2015**

**İZMİR**

**ÇEŞİTLİ GIDA ÖRNEKLERİNDEKİ  
ZEARALENONUN İYONİK SIVI BAZLI  
DİSPERSİF SIVI-SIVI MİKROEKSTRAKSİYONU  
İLE ZENGİNLEŞTİRİLEREK HPLC İLE TAYİNİ**

**Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Gözde IŞIK**

**Ağustos, 2015**

**İZMİR**

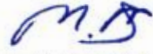
## YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

**GÖZDE IŞIK**, tarafından **DOÇ. DR. SERAP SEYHAN BOZKURT** yönetiminde hazırlanan **“ÇEŞİTLİ GIDA ÖRNEKLERİNDEKİ ZEARALENONUN İYONİK SIVI BAZLI DİSPERSİF SIVI-SIVI MİKROEKSTRAKSİYONU İLE ZENGİNLEŞTİRİLEREK HPLC İLE TAYİNİ”** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Serap SEYHAN BOZKURT

Yönetici




Prof. Dr. Melih Merdim

Jüri Üyesi



Doç. Dr. Merve ARDA

Jüri Üyesi



Prof. Dr. Ayşe OKUR

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmamın her aşamasında bana bilgi birikimini sunan, yardımlarını esirgemeyen başta tez danışman hocam Doç. Dr. Serap SEYHAN BOZKURT'a,

Çalışmalarım sırasında, ihtiyaç duyduğumda destek veren hocam Araş. Gör. Dr. Mine ANTEP'e,

Yüksek Lisans sırasında 2013 KB FEN 014 nolu proje ile çalışmamı destekleyen DEÜ Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi'ne,

Tez çalışmalarımda bana destek veren çalıştığım kurum DEPPO Özel Kontrol Laboratuvar'ına

Hayatımın her evresinde bana destek olan değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gözde IŞIK

# ÇEŞİTLİ GIDA ÖRNEKLERİNDEKİ ZEARALENONUN İYONİK SIVI BAZLI DISPERSİF SIVI-SIVI MİKROEKSTRAKSİYONU İLE ZENGINLEŞTİRİLEREK HPLC İLE TAYİNİ

## ÖZ

Çalışmada zearalenonun yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayin öncesi zenginleştirilmesi için basit, hızlı ve etkili olan iyonik sıvı bazlı dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi geliştirilmiştir. Yöntemde, 1-butil-3-metilimidazolyum bis(triflorometansülfonil) imid ve 1-metil-3-oktilimidazolyum bis(triflorometansülfonil) imid iyonik sıvıları ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılmıştır. Her iki iyonik sıvı ile, örnek pH'ı, dispersif çözücü çeşidi ve hacmi, iyonik sıvı hacmi, ekstraksiyon ve santrifüj süresi, tuz etkisi gibi ekstraksiyon verimliliğini etkileyen parametreler optimize edilmiştir. 1-butil-3-metilimidazolyum bis(triflorometansülfonil) imid ile daha yüksek ekstraksiyon verimliliği elde edilmiştir. Optimum koşullar altında, zearalenon tayini için yöntemin 1-750 ppb aralığında doğrusal olduğu ve gözlenebilirlik sınırının 0,25 ppb olduğu gözlenmiştir. Gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirlik, yüzde bağıl standart sapma cinsinden % 1,36 ve % 3,02 olarak elde edilmiştir. Geliştirilen yöntem bira ve tahıl örneklerine (mısır ve buğday) başarıyla uygulanmıştır. Yöntemin doğruluğu için örneklerle standart zearalenon çözeltisi ilave edilmiş ve %80-100 oranında geri kazanım elde edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Zearalenone, iyonik sıvı, dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu, zenginleştirme, yüksek performans sıvı kromatografisi

# PRECONCENTRATION OF ZEARALENONE IN VARIOUS FOODS WITH IONIC LIQUID BASED DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION AND HPLC DETERMINATION

## ABSTRACT

In this study, a simple, fast and efficient ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction was developed for the preconcentration of zearalenone before its analysis with high performance liquid chromatography. 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethanesulfonyl) imide and 1-methyl-3-octylimidazolium bis(trifluoromethanesulfonyl) imide were used as extraction solvent in the method. The parameters affecting the extraction efficiency such as sample pH, type and volume of dispersive solvent, volume of ionic liquid, time of extraction and centrifugation, salting effect were optimized with both ionic liquids. The higher extraction efficiency was obtained with 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethanesulfonyl) imide. Under the optimum conditions, the method for zearalenone determination was linear in the range of 1-750 ppb and the limit of detection was 0.25 ppb for zearalenone. The inter-day and intra-day precision was in the range of 1.36-3.02 percentage as percentage relative standard deviation. The developed method was successfully applied to beer and cereal (wheat and corn) samples. The recovery percentages of zearalenone for spiked samples were between 80.0 and 100.0 percentage.

**Keywords:** Zearalenone, ionic liquid, dispersive liquid-liquid microextraction, preconcentration, high performance liquid chromatography

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZ .....	iv
ABSTRACT .....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	viii
TABLolar LİSTESİ .....	x

## **BÖLÜM BİR - GİRİŞ .....** 1

1.1 Mikotoksinler .....	1
1.1.1 Mikotoksinlerin Sınıflandırılması .....	1
1.1.1.1 Aflatoksinler .....	3
1.1.1.2 Okratoksinler.....	3
1.1.1.3 Fumonisinler .....	3
1.1.1.4 Trikotesenler .....	3
1.1.1.5 Patulin .....	4
1.1.1.6 Zearalenon.....	4
1.1.2 Mikotoksinlerin Tayin Yöntemleri .....	6
1.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) .....	6
1.3 Ekstraksiyon Yöntemleri .....	7
1.3.1 Katı Faz Mikroekstraksiyonu .....	7
1.3.2 Katı Faz Ekstraksiyonu .....	8
1.3.3 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu.....	9
1.3.4 Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon .....	10
1.4 İyonik Sıvılar .....	12
1.5 Literatür Özeti .....	13
1.6 Çalışmanın Amacı .....	15

## **BÖLÜM İKİ – MATERYAL VE YÖNTEM..... 16**

2.1 Kullanılan Kimyasallar.....	16
2.2 Kullanılan Cihazlar.....	16
2.3 İyonik Sıvıların Sentezi .....	17
2.3.1 1-butil-3-metilimidazolyum bis (triflorometansülfonil) imid ([C <sub>4</sub> mim][TFSI]) Sentezi.....	17
2.3.2 1-metil-3-oktilimidazolyum bis(triflorometansülfonil) imid ([C <sub>8</sub> mim][TFSI]) Sentezi.....	17
2.4 HPLC Koşulları .....	18
2.5 İyonik Sıvı Bazlı DSSME .....	19
2.6 Gerçek Örneklerin Analize Hazırlanması .....	19
2.6.1 Bira Örnekleri.....	19
2.6.2 Tahıl Örnekleri .....	20

## **BÖLÜM ÜÇ – SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME..... 21**

3.1 İyonik Sıvıların Karakterizasyonu.....	21
3.1.1 [C <sub>4</sub> mim][TFSI] ve [C <sub>8</sub> mim][TFSI]'in FTIR Spektrumu .....	21
3.1.2 [C <sub>4</sub> mim][TFSI] ve [C <sub>8</sub> mim][TFSI]'in Termal Analiz Sonuçları .....	23
3.2 İyonik Sıvı Bazlı DSSME Yönteminin Optimizasyonu.....	24
3.2.1 Dispersif Çözücü Çeşidi ve Hacminin Optimizasyonu.....	24
3.2.2 pH Optimizasyonu .....	25
3.2.3 İyonik Sıvı Hacmi Optimizasyonu.....	26
3.2.4 Tuz Etkisi .....	27
3.2.5 Ekstraksiyon Süresinin Optimizasyonu .....	28
3.2.6 Santrifüj Süresinin Optimizasyonu .....	29
3.3 İyonik Sıvıların Ekstraksiyon Etkinliğinin Karşılaştırılması .....	30
3.4 Analitik Performans .....	31
3.5 Geliştirilen Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması .....	32
3.6 Değerlendirme .....	36

## **KAYNAKLAR ..... 37**



## ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Zearalenone ve türevlerinin kimyasal yapıları .....	5
Şekil 1.2 Katı faz ekstraksiyon basamakları .....	9
Şekil 1.3 Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon sistemi .....	10
Şekil 2.1 1-butil-3-metilimidazolyum bis(triflorometansülfonil) imid hazırlanışı .....	17
Şekil 2.2 1-metil-3-oktilimidazolyum bis(triflorometansülfonil) imid hazırlanışı .....	18
Şekil 2.3 ZEN için standart kalibrasyon grafiği ve denklemi .....	19
Şekil 3.1 [C <sub>4</sub> mim][TFSI]'in FTIR spektrumu .....	22
Şekil 3.2 [C <sub>8</sub> mim][TFSI]'in FTIR spektrumu .....	22
Şekil 3.3 [C <sub>4</sub> mim][TFSI]'in TG/DTG eğrisi .....	23
Şekil 3.4 [C <sub>8</sub> mim][TFSI]'in TG/DTG eğrisi .....	23
Şekil 3.5 İyonik sıvı bazlı DSSME yöntemine dispersif çözücü etkisi. Deney koşulları: 5 mL 0,2 ppm test çözeltisi, pH 5, dispersif çözücü hacmi 500 µL, iyonik sıvı hacmi 100 µL, ekstraksiyon süresi 1 dak., santrifüj süresi 5 dak., tuz ilavesiz .....	24
Şekil 3.6 İyonik sıvı bazlı DSSMME yöntemine pH etkisi. Deney koşulları: 5 mL 0,2 ppm test çözeltisi, pH 5, metanol hacmi 250 µL ([C <sub>4</sub> mim][TFSI]'de) ve 500 µL ([C <sub>8</sub> mim][TFSI]'de), iyonik sıvı hacmi 100 µL, ekstraksiyon süresi 1 dak., santrifüj süresi 5 dak., tuz ilavesiz .....	25
Şekil 3.7 İyonik sıvı bazlı DSSME yöntemine iyonik sıvı hacminin etkisi. Deney koşulları: 5 mL 0,2ppm test çözeltisi, pH 5, metanol hacmi 250 µL ([C <sub>4</sub> mim][TFSI]'de) ve 500 µL ([C <sub>8</sub> mim][TFSI]'de),ekstraksiyon süresi 1 dak., santrifüj süresi 5 dak., tuz ilavesiz .....	27
Şekil 3.8 İyonik sıvı bazlı DSSME yöntemine ekstraksiyon süresinin etkisi. Deney koşulları: 5 mL 0,2 ppm test çözeltisi, pH 5, metanol hacmi 250 µL ([C <sub>4</sub> mim][TFSI]'de) ve 500 µL ([C <sub>8</sub> mim][TFSI]'de), iyonik sıvı hacmi 200µL ([C <sub>4</sub> mim][TFSI]) ve 250 µL ([C <sub>8</sub> mim][TFSI]), santrifüj süresi 5 dak., tuz ilavesiz .....	28

Şekil 3.9 İyonik sıvı bazlı DSSME yöntemine santrifüj süresinin etkisi. Deney koşulları: 5 mL 0,2 ppm test çözeltisi, pH 5, metanol hacmi 250 µL ([C<sub>4</sub>mim][TFSI]'de) ve 500 µL ([C<sub>8</sub>mim][TFSI]'de), İyonik sıvı hacmi 200µL ([C<sub>4</sub>mim][TFSI]) ve 250 µL ([C<sub>8</sub>mim][TFSI]), ekstraksiyon süresi 1 dak., tuz ilavesiz.....29

Şekil 3.10 Kromatogramlar: a) metanolde 0,05 ppm standart ZEN çözeltisi b) geliştirilen yöntem sonrası 2 numaralı bira örneği c) geliştirilen yöntem sonrası 0,05 ppm ZEN eklenmiş 2 numaralı bira örneği.....34



## TABLULAR LİSTESİ

	<b>Sayfa</b>
Tablo.1.1 Başlıca mikotoksin üreten küfler ve ürettikleri mikotoksinler .....	2
Tablo 1.2 Önemli mikotoksinler ve başlıca bulunduğu gıdalar .....	2
Tablo 1.3 İyonik sıvılarda kullanılan anyon ve katyon grupları .....	13
Tablo 3.1 İyonik sıvıların FTIR spektrum verileri.....	21
Tablo 3.2 Geliştirilen iyonik sıvı bazlı DSSME yönteminde elde edilen ekstraksiyon sonuçları .....	30
Tablo 3.3 Geliştirilen iyonik sıvı bazlı DSSM yönteminde elde edilen analitik parametreler .....	32
Tablo 3.4 Bira ve tahıl örneklerinin analiz sonuçları (n=3).....	33
Tablo 3.5 ZEN için geliştirilen iyonik sıvı bazlı DSSME yönteminin literatürdeki diğer yöntemlerle karşılaştırılması.....	35

# BÖLÜM BİR

## GİRİŞ

### 1.1 Mikotoksinler

Mikotoksinler, yem ve gıda maddelerinde fungus türleri tarafından sentezlenen metabolizma ürünleridir. Toksik mantarların metabolitleri olan mikotoksinler, yem ve insan gıdası olarak tüketilen bitkisel ürünlerin üretimi, işlenmesi ve depolanması sırasında oluşabilmektedir. Tüketildiklerinde insan ve hayvan sağlığı açısından ciddi tehlikeler oluşturmaktadırlar. Bu toksinler günümüzde insan sağlığını tehdit etmenin yanısıra ekonomide de ciddi kayıplara neden olmaktadır(Zollner ve Mayer-Helm, 2006). Bitkisel ürünlerde bulunan mantarlar; tarlada, hasat sırasında yada depolama aşamalarında mikotoksinleri üretirler. Bunların insan ve hayvan gıdalarıyla kontamine olması ve bunların tüketilmesi durumunda çeşitli etkilere neden olurlar.

Mikotoksinler; *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* başta olmak üzere bazı mantarların belirli nem ve ısı koşullarında oluşturdukları fungal sekonder metabolitlerdir (Logrieco, Mule, Maretti ve Giancarlo, 2003).Mikotoksinlerin kimyasal yapılarına bakıldığında bir çoğunun aromatik yapıda olduğu görülür. Genelde yüksek sıcaklıklara dirençlidirler, mikotoksinler çeşitlerine ve sıcaklık derecelerine göre farklı kararlılık gösterirler. Tarım ürünü veya gıdanın nem içeriği, atmosferin bağıl neminden etkilendiği için, sıcaklıkla birlikte bağıl nem de toksin oluşumunu etkileyen önemli faktörlerdendir. Bağıl nem arttıkça gıda üzerindeki su buhar basıncı arttığında su aktivitesi artar ve buna bağlı olarak toksin oluşumu da artar (Tunail, 2000).

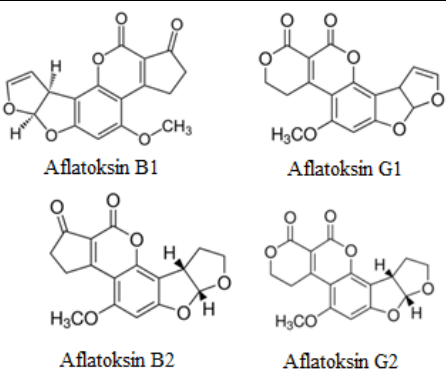
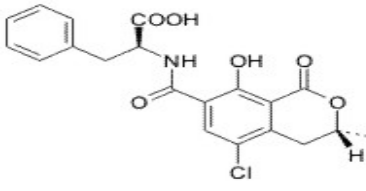
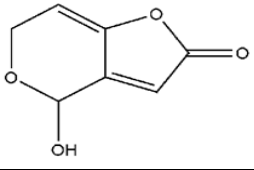
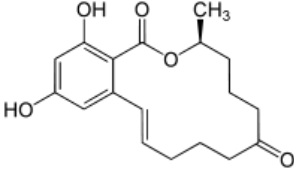
#### 1.1.1 Mikotoksinlerin Sınıflandırılması

Küfler tarafından üretilen birçok mikotoksin olmasına rağmen, sadece birkaçı geniş çaplı olarak araştırılmış ve çok azı uygun analiz yöntemleriyle saptanabilmiştir. Mikotoksin üreten bazı küfler ve bunların ürettikleri mikotoksinler Tablo 1.1’de ve mikotoksinlerin başlıca bulunduğu gıdalar Tablo 1.2’de verilmiştir.

Tablo 1.1 Başlıca mikotoksin üreten küfler ve ürettikleri mikotoksinler (Weidenborner,2001)

Aspergillus Cinsi	Penicillium Cinsi	Fusarium Cinsi
Aflatoksinler (B <sub>1</sub> ,B <sub>2</sub> ,G <sub>1</sub> ,G <sub>2</sub> )	Sitrinin	Zearalenon
Aspertoksin	Okratoksin A	Trikotesenler
Sitrinin	Patulin	Deoksinivalenol
Patulin	Emadin	T-2 Toksin
Okratoksin A	Rugulasin	Fumanisin
Penisilikasit	Rubratoksin	Nivalenol

Tablo 1.2 Önemli mikotoksinler ve başlıca bulunduğu gıdalar( Suttajit, 2000)

Mikotoksin	Kimyasal yapı	Bulunduğu gıda
Aflatoksinler	 <p>Aflatoxin B1</p> <p>Aflatoxin G1</p> <p>Aflatoxin B2</p> <p>Aflatoxin G2</p>	Yerfıstığı, antep fıstığı, fındık, soya, mısır ve ürünleri, süt ve ürünleri, yemler
Okratoksin A		Mısır, arpa, buğday, yerfıstığı, kahve, kakao, soya, peynir
Patulin		Meyve suları ve peynirler
Zearalenon		Mısır ve çeşitli tahıllar

#### 1.1.1.1 Aflatoksinler

Aflatoksinler, başlıca *Aspergillus* türleri tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir. AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub> ve AFM<sub>2</sub> türevleri olup en toksin olanı AFB<sub>1</sub> olarak belirlenmiştir. Bu toksinin ultraviyole ışınları altında gösterdiği floresans özelliğine göre, mavi floresans veren aflatoksin B<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub> ile yeşil floresans veren aflatoksin G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub> gibi dört temel türevinin yanısıra hayvanların sütlerinden çıkan aflatoksin M<sub>1</sub> ve M<sub>2</sub> bulunmaktadır (Girgin, 2001).

#### 1.1.1.2 Okratoksinler

Okratoksinler, *Aspergillus ochraceus, melleus, alliaceus, ostianus, sclerotium, albertensis, wentii, auricomus* ve *Penicillium viridicatum, cyclopium, frequentans* ve *expansum* fungusları tarafından üretilen mikotoksinlerdir. Özellikle okratoksin A (OTA) kuvvetli bir toksik etkiye sahiptir. OTA; mısır, kuru fasulye, kuru üzüm, kakao çekirdeği, kahve çekirdeği, soya fasulyesi, arpa, yulaf, turunçgil meyveler gibi birçok besinde küflerin gelişmesi sonucu oluşmaktadır (Girgin, 2001).

#### 1.1.1.3 Fumonisinler

Fumonisinler, *Fusarium* türleri tarafından üretilen çeşitli türlerdeki hastalıklardan sorumlu kanserojen toksinlerdir. Fumonisin grubunun başlıca toksinleri FB<sub>1</sub> ve FB<sub>2</sub> 'dir. Fumonisinlere özellikle mısır ürünlerinde sıklıkla rastlanılmaktadır. Fumonisinlerin hepsi kanserojen etkiye sahiptir (Sabuncuoğlu, 2008).

#### 1.1.1.4 Trikotesenler

Trikotesenleri *Fusarium, Trichoderma, Myrothecium* ve *Stachybotris* türleri oluşturur. Trikotesenler "12,13-epoksitrikotes-9-en halkası" temel alınarak kimyasal yapılarına göre sınıflandırılırlar. T-2 ve HT-2 toksinler, deoksinivalenol (DON), nivalenol (NIV) bu grupta yer alan önemli mikotoksinlerdir. DON gıda ürünlerinde en sık rastlanan mikotoksindir (Ayaz ve Yurttagül, 2008). DON, epoksiseskiterpenoid yapısında olan mikotoksindir. İştahsızlık ve bulantıya neden olur. Bu toksinler, renksiz, kristal, suda eriyen ve optikli aktif moleküllerdir. Saklama süresince bozulmazlar. Bu toksinler mısır ürünleri gibi tahıllarda yer almaktadır.

Protein ve DNA sentezini inhibe ederler. Ayrıca bazıları antibakteriyel etkiye sahiptirler.

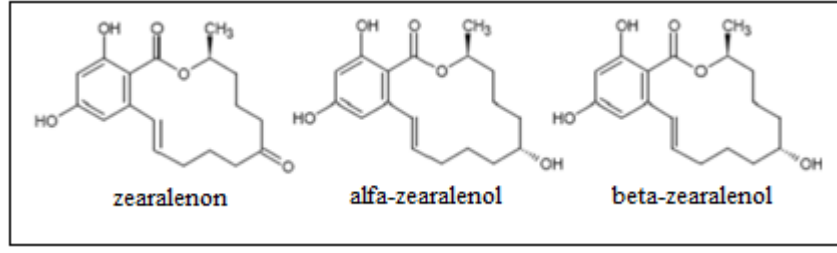
#### 1.1.1.5 Patulin

Patulin, *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerinin çoğu türleri tarafından üretilen bir mikotoksindir. 4-hidroksi-4H-furol [3,2-c] piran-2(6H)-on yapısındadır. Birçok organik çözücü ve suda çözünebilirler (Girgin, 2001).

Patulin pek çok canlı için toksik bir madde olup afinitesi ile bazı enzimleri inhibe etmektedir. Patulin en çok; elma suları, küflü ekme ve diğer meyve sularında bu küflerin çoğalması sonucu oluşmaktadır. Patulinin, antibiyotik özelliklerinin yanında kanserojen, mutajen ve teratojen özelliklerinin olduğu saptanmıştır. Patulin asidik ortamlarda kararlı olup bu pH değerlerinde ısıya karşı dirençlidir. Bu nedenle meyve suyu gibi gıdalarda önem taşımaktadır (Artık, Velioğlu ve Sağlam, 1991).

#### 1.1.1.6 Zearalenon

Zearalenon (ZEN), çeşitli *Fusarium* türleri tarafından farklı şartlarda üretilen metabolik bir toksindir. *Fusarium* doğada en yaygın olarak bulunan küf türüdür. *Fusarium* mantarları tarafından üretilen ZEN'a, soğuk ve nemli mevsimlerde yetiştirilen tahıllarda rastlanır. Birçok çalışmada, insan ve hayvan beslenmesinde yoğun olarak kullanılan mısır, soya, buğday, arpa, yulaf, sorgum ve kuru otlarda sağlığı tehdit edici boyutlarda ZEN saptandığı belirlenmiştir (Van Egmand, 1993). Ayrıca tüm canlıların beslenmelerinde ZEN'nun ana kaynağının tahıllar ve tahıl ürünlerinin olduğu bilinmektedir. Sıcaklığa dayanıklı olan ZEN' nun, tahılların uzun süreli depolanmalarında kullanılan organik asitlerden de etkilenmediği görülmüştür. Zearalenon direk bir toksin olmaktan çok hormon benzeri kimyasal bir yapı gösterir (Ergün, 1992). Kimyasal ismi; 6-(10-hidroksi-6-oxo-trans-1 undecenyl)- $\beta$  rezorsiklik asit laktondur. Kapalı formülü  $C_8H_{22}O_5$  olup saf halde beyaz kristaller halinde bulunmaktadır. Şekil 1.1'de ZEN'nun türevleri ve kimyasal yapıları verilmektedir.



Şekil.1.1 Zearalenone ve türevlerinin kimyasal yapıları (Zinedine ve diğer., 2006)

ZEN'nun, asetonitril, metilen klorür, metanol, etanol ve aseton gibi çözücülerdeki çözünürlüğü yüksektir. Yapısındaki konjuge bağ sisteminden dolayı floresans özelliği bulunmaktadır. Metanolde hazırlanmış çözeltisi, 236 nm'de absorbans verirken, etanol içerisindeki çözeltisi 314 nm'de uyarılarak 450 nm'de floresans vermektedir.

ZEN, östrojen benzeri anabolik bir etkiye sahiptir. Zearalenonun fizyolojik aktivitesi Cytosolic reseptör proteini ile bağlanıp nükleus içinde östrojen reseptör kompleksinintranslokasyonunu sağlayarak steroid hormonlarının aktivitesine benzer etki göstermesiyle ortaya çıkmıştır. Vücutta hızla absorbe edilmektedir.

ZEN'nun insan sağlığına etkileri;

- Karaciğer kanserine ve gen yapısında değişikliklere yol açar,
- Vücudun hormonal dengesini bozar,
- Vücudun koruyucu sistemini zayıflatır,
- Kısırlığa neden olur,
- Gıda emilimini azaltır ve kemikleri zayıflatır,
- Vücut direncini düşürerek hastalıklara açık hale getirmektedir (Fink-Gremmels., 1999).

ZEN'nun çeşitli gıdalardaki maksimum kalıntı limitleri Avrupa Komisyonu tarafınca belirlenmiştir. ZEN için tahıl ürünlerindeki maksimum kalıntı limitlerinin gençler için 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  ve yetişkinler için 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  olduğu ifade edilmiştir (Avrupa Konseyi, 2007).



### ***1.1.2 Mikotoksinlerin Tayin Yöntemleri***

Mikotoksin analizleri için çoğu prosedür örnekleme, homojenizasyon, ekstraksiyon, temizleme ve zenginleştirme aşamalarını içerir. Kaynaklarda yaygın olarak çalışılan mikotoksinlerin varlığını tespit etmek için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi analiz cihazları kullanılmaktadır. Bununla birlikte eser miktarda olanların tespiti için daha hassas (sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi/kütle spektroskopisi (LC-MS/MS) gibi daha pahalı cihazlar gerekmektedir. Gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS) metotları polar bileşiklerin analizinden önce türevlendirmeye ihtiyaç duyar. Bununla beraber trikotesenler ve ZEN mikotoksinlerinin kantitatif analizinde GC-MS başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Tanaka ve diğer., 1988). Mikotoksinlerin analizinde, ince tabaka kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, gaz kromatografisigibi yöntemler kullanılmaktadır.

Analizi yapılacak olan örnekler analizi yapılacak madde dışında birçok bileşenin yer aldığı kompleks matrislerdir. Bu nedenle analiz öncesi örnek hazırlama amacıyla kullanılan ekstraksiyon, temizleme ve analitlerin zenginleştirilme işlemleri çok önemlidir.

Son yıllarda matris örneklerden nitel ve nicel tayinlerde hassas, doğru ve hızlı yöntemlerin geliştirilmesi önemli bir konu haline gelmiştir. Yüksek hassasiyetli analitik cihazların gelişmesine rağmen, matris ortamında tayinlerde başarısız olunmaktadır. Bundan dolayı matris ortamından örneği alma, deriştirme (zenginleştirme) için genellikle ön işlem (temizleme) uygulanması gerekmektedir (Girgin, 2001).

### **1.2 Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)**

HPLC, sabit faz olarak bilinen kolon içerisindeki sorbentten, ters polaritedeki uygun hareketli faz olarak bilinen çözücülerin yüksek basınçta geçirilmelerine dayanır. Degazer, pompa, örnekleyici, kolon-kolon fırını ve dedektörden oluşur. Hareketli fazın yüksek basınçta HPLC sistemi içinde hareket etmesi pompa

yardımıyla sağlanır. HPLC’de izokratik ve gradient olmak üzere iki yöntem bulunur. İzokratik yöntemde, hareketli faz karışımı, tek kanaldan geçecek şekilde karıştırılarak hazırlanır. Gradient yöntemde ise, farklı hareketli faz çözeltiler vardır ve bunlar farklı oranlarda ve zamanlarda karıştırılır. Analiti içeren numunenin kolon ve dedektöre gönderilmesi örnekleyici yardımıyla sağlanır. Kolon-kolon fırını sayesinde, kolondaki maddeler fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak birbirlerinden ayrılır. Analit miktarı dedektör tarafından belirlenir. Bu amaçla HPLC’de, analiz edilen analitin kimyasal yapısına bağlı olarak fotodiyot (DAD), floresans (FLD) ve ultraviyole (UV) dedektörler kullanılabilir (Yashin, Y. ve Yashin, A., 2012).

### **1.3 Ekstraksiyon Yöntemleri**

Karmaşık bir örnekteki maddeler HPLC veya GC gibi kromatografik yöntemlerle analiz edilmek istendiğinde, bu maddelerin miktarlarının cihazın tayin sınırlarının üzerine getirilmeleri (zenginleştirme) veya matriksten mümkün olduğu kadar arındırılmaları (saflaştırma) gerekir. Bu saflaştırma ve zenginleştirme işlemleri çeşitli ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilir (Demirci ve Özçimder,2008). Bu amaçla kullanılan ekstraksiyon çeşitleri şöyle sıralanabilir:

- \* Sıvı-sıvı ekstraksiyonu
- \* Bulutlanma noktası ekstraksiyonu
- \* Katı-sıvı ekstraksiyonu
- \* Katı faz ekstraksiyonu
- \* Katı faz mikroekstraksiyonu
- \* Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu

#### **1.3.1 Katı Faz Mikroekstraksiyonu**

Katı faz mikroekstraksiyon (KFME) yöntemi ilk olarak Arthur ve Pawliszyn tarafından 1990 yılında geliştirilmiştir (Arthur ve Pawliszyn, 1990). Bu yöntem, analitlerin fiber üzerindeki sorbent kaplamaya ekstrakte edilmesine dayanan basit ve organik çözücüden bağımsız ekstraksiyon yöntemidir (Frozey, Barkley ve Sievers, 1998). Fiber üretimi için polidimetilsiloksan (PDMS), divinilbenzen (DVB),

poliakrilat (PA) kullanılabilir (Olariu, Viane, Gimberg ve Arsene, 2010). Daldırmalı ve tepe boşluklu çeşidi olan KFME yönteminde, analitler fiber üzerindeki sorbent ile örnek matrisi arasında (daldırmalı) ve örneğin üzerindeki tepe boşluğu (tepe boşluklu) arasında denge kurar (Malik, Kour ve Verno, 2006). KFME’unda maddenin miktarı ekstraksiyon fazının hacmi ile doğru orantılı olduğundan ekstraksiyon fazının hacmi artırılarak metodun hassasiyeti artırılabilir (Dietzs, Sanz ve C’amara, 2006).

Klasik örnek hazırlama yöntemleri ile karşılaştırıldığında KFME’nun önemli avantajları vardır. Örnek matris ortamından uzaklaştırılırken aynı zamanda zenginleştirilir. Hızlı ve basit olmasının yanı sıra çözücü kullanılmamasından dolayı yaygın ekstraksiyon tekniklerine alternatif bir yöntemdir. Geniş bir alanda madde derişimi için doğrusal sonuçlar verir (Kumar, Gourov, Malik, Tewary ve Singh, 2008).

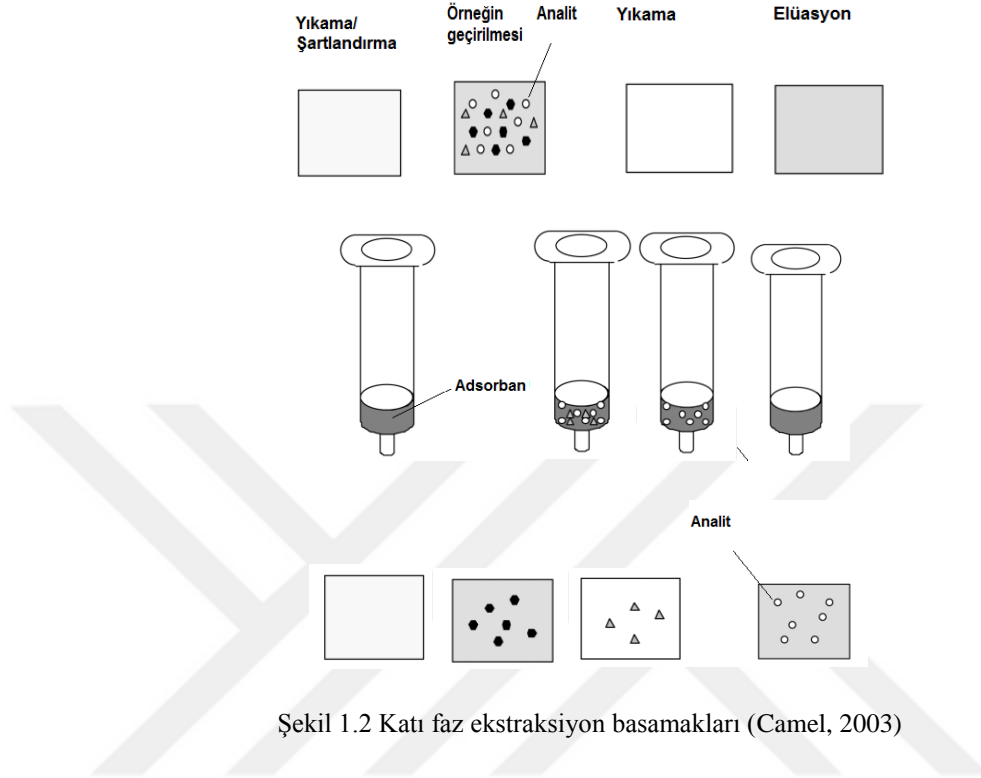
### ***1.3.2 Katı Faz Ekstraksiyonu***

Katı faz ekstraksiyon (KFE) yöntemi ilk olarak organik mikrokirleticilerin zenginleştirilmesi için sıvı-sıvı ekstraksiyonuna alternatif olarak ortaya çıkmıştır (Liska, 2000).

KFE yöntemi, sıvı faz içerisinde bulunan analitin katı bir faz üzerinde toplanması esasına dayanır. Yöntem; basit, hızlı, ucuz olması, organik çözücünün çok küçük miktarda kullanılması ve yüksek zenginleştirme faktörü elde edilebilmesi gibi birçok avantaja sahiptir (Lemos, Baliza, Lago de Carvalho, Oliveira, Teixeira ve Bezerra, 2008). KFE yöntemi Şekil 1.2’de gösterildiği gibi 4 basamaktan oluşur.

İlk basamakta katı sorbent uygun çözücü ile şartlandırılır. Kolonun şartlandırılmasında ve örneğin geçirilmesinde sorbentin kuru kalmamasına dikkat edilir. İkinci basamak örnek çözeltisinin kolondan geçirilmesidir. Bu süreçte analitler sorbent üzerinde birikir (Camel, 2003). Üçüncü basamakta matris bileşenlerini elimine etmek için analiti etkilemeyen çözücü ile yıkama işlemi yapılır. Son basamakta ise sorbente tutunan analit sadece analitle etkileşime giren çözücü ile elüe edilir. İnorganik bazlı sorbent olarak silika jel, TiO<sub>2</sub> ve C<sub>18</sub> bağlı silikajel vb. gibi sorbentler kullanılabilir. Organik bazlı sorbent olarak ise genellikle çeşitli reçineler

kullanılır. Ayrıca KFE 'da inorganik ve organik sorbentler kullanıldığı gibi bakteri, alg gibi mikroorganizmalarda sorbent olarak kullanılabilir (Wang ve Chen, 2009).



### 1.3.3 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu

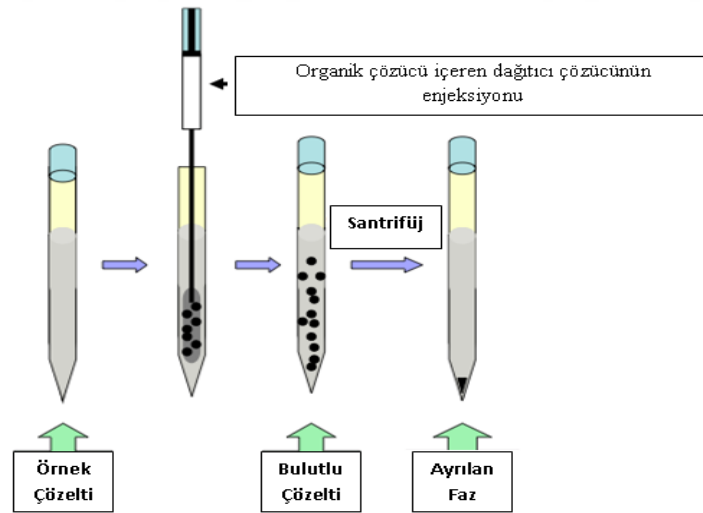
Bulutlanma noktası ekstraksiyon (BNE) yöntemi, ilk olarak Hiroto Watanabe ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuştur (Hinze ve Pramauro, 1993). Yöntem, basit ve düşük maliyetli olmasının yanı sıra çevre dostu bir yöntemdir (Ohashi, Ito, Kanai, Imura ve Ohashi, 2004). Hem metal iyonlarının hem de moleküllerin zenginleştirilmesi için uygulanan bir yöntemdir. Yöntemde, analiti içeren çözelti ortamına yüzey aktif maddenin çözeltisi ilave edilir. Ayrımı yapılacak maddeye bağlı olarak ayarlanan şartların (pH, sıcaklık gibi) ardından yüzey aktif maddenin yapısına göre bulutlanma noktası değerine kadar çözelti ısıtılır. Bulutlanma noktasına ulaşıldığında, çözelti santrifüjlenerek biri yüzey aktif maddece zengin olan, diğeri ise sulu faz olan iki faza ayrılır. Daha sonra bir buz banyosu veya buzdolabında soğutulularak fazlar arasındaki viskozluk farkı büyür ve fazların ayrılması kolaylaştırılmış olur. Bu sayede hedef analit ortamdan ayrılarak ilk başta bulunduğu

çözelti hacmine göre daha küçük bir hacim içerisinde zenginleştirilmiş olur (Quina, ve Hinze, 1999).

#### 1.3.4 Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon

Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DSSME) yöntemi ilk olarak 2006 yılında Rezaee ve arkadaşları tarafından geliştirilen mikro düzeyde dispersif çözücü ve ekstraksiyon çözücüsünün kullanıldığı bir ekstraksiyon yöntemidir (Rezaee ve diğer., 2006). Bu yöntem homojen sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve bulutlanma noktası ekstraksiyonuna benzer bir üçlü çözücü sistemine dayanmaktadır (Leang ve Hwang, 2008).

DSSME yöntemi, hedef maddeleri içeren sulu örnek içerisine dispersif ve ekstraksiyon çözücü karışımının hızlı bir şekilde enjeksiyonuna dayanır (Şekil 1.3). Örnek çözeltilisine hızlı bir şekilde yapılan enjeksiyon, örnek içerisinde ekstraksiyon çözücüsünün küçük damlacıkların oluşmasına neden olur. Böylece çözeltide bulutlanma oluşur.



Şekil 1.3 Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon sistemi (Rezaee ve diğer., 2006)

DSSME’unda ekstraksiyon karışımının %97-99’unu oluşturulan sulu çözelti içinde, ekstraksiyon çözücüsünün iyi damlacıklar oluşturmasında dispersif çözücü anahtar rol oynar. Ekstraksiyon çözücüsü ile sulu örnek arasında büyük yüzey alanı

oluştduğundan dengeye çok hızlı ulaşır. Böylece ekstraksiyon zamandan bağımsız olur. Hidrofobik maddeler toplam sulu çözelti içerisinde dağılan ekstraksiyon çözeltisinde zenginleştirilir. Karışım santrifüjlendiğinde küçük damlacıklar tüpün dibinde toplanır. Dibe toplanan alt fazdaki ekstraksiyon çözücüsü, mikro enjektörle alınarak uygun enstrümantal yöntemler ile tayin edilir (Sarafraz-Yazdi ve Amiri, 2010).

Ekstraksiyon çözücüsü olarak yoğunluğu sudan ağır ve su ile karışmayan klorobenzen, karbon tetraklorür ve tetrakloroetilen gibi çözücüler kullanılırken; dispersif çözücü olarak aseton, etanol, metanol ve asetonitril gibi su ile karışan polar çözücüler kullanılır (Dodfornio, ve Shabani, 2010).

DSSME’de zenginleştirme faktörü (ZF), örnekteki analitin santrifüj sonrasında oluşan fazdaki derişiminin başlangıç derişimine oranı olarak ifade edilir.

$$ZF = \frac{C_{sed}}{C_0} \quad (1.1)$$

$C_{sed}$ ; santrifüj sonrası oluşan sediment fazdaki analit derişimi,  $C_0$ ; başlangıçtaki analit derişimi

Ekstraksiyon geri kazanımı (% geri kazanım) santrifüj sonrası oluşan fazın, toplam analit miktarına yüzdesi olarak ifade edilir.

$$\% \text{ geri kazanım} = \frac{C_{sed} V_{sed}}{C_0 V_{sıvı}} \times 100 = ZF \times \frac{V_{sed}}{V_{sıvı}} \times 100 \quad (1.2)$$

$V_{sed}$ ; santrifüj sonrası altta toplan sediment fazın hacmi,  $V_{sıvı}$ ; sulu örnek çözeltisinin hacmi

Bu yöntemin başlıca avantajları; basit, düşük maliyetli, hızlı olması, düşük örnek hacmi, yüksek geri kazanım ve yüksek zenginleştirme faktörleri elde edilebilmesidir (Sarafraz-Yazdi ve Amiri, 2010). Son zamanlarda, DSSME yönteminde ekstraksiyon çözücüsü olarak organik çözücülerin yerine çevre dostu iyonik sıvılar kullanılmaya başlanmıştır.

## 1.4 İyonik Sıvılar

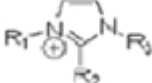
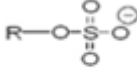
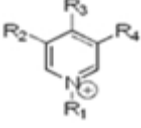
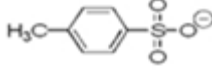
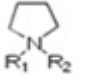
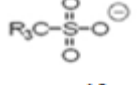
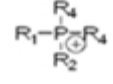

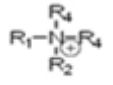

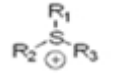

İyonik sıvılar inorganik yapılara alternatif olarak anyonu ya da katyonu veya her ikisi de organik yapıda iyonlardan oluşan tuzlardır. Genellikle oda sıcaklığında sıvı halde bulunurlar ve yüksek kaynama noktasına sahiptirler (Welton, 1999). İyonik sıvılar bilinen organik çözücülere kıyasla birçok avantaja sahiptir.

Bu avantajlar,

- \* Buhar basınçları çok düşüktür. Bu nedenle atmosfere karışamazlar ve yeşil kimya olarak kullanılabilirler.
- \* Birçok organik, organometalik, inorganik, ve polimerik bileşiği çözebildiğinden çok iyi çözücüdürler.
- \* Yüksek sıcaklıklarda kararlıdır.
- \* Birçok organik çözücülerle karışmazlar ve bu bileşiklerin iki fazlı sistemlerde kullanılabilmesini sağlar.
- \* Yüksek viskoziteye sahiptirler.
- \* Elektrik iletkenliği yüksektir.
- \* Düşük uçuculuğa sahiptirler.
- \* Düşük alev alma özellikleri bulunmaktadır.
- \* Düşük toksisiteye sahiptirler.

İyonik sıvılar yapı itibarıyla anyonik ve katyonik gruplar içerir. Halojen grubu anyonlar ve tetrafloroborat gibi anyon yapıları iyonik sıvının sudaki çözünürlüğünü arttırırken, yapıda heksaflorofosfat, triflorosülfonil imid gibi anyonik yapıların bulunması iyonik sıvının lipofilik karakter kazanmasını sağlar. Katyonik gruplar olarak ise imidazolyum, fosfonyum, pridinyum, amonyum gibi gruplar kullanılır (Tablo 1.3). Farklı uzunluktaki alkil zinciri, katyon ve anyon seçilerek farklı özelliklerde iyonik sıvılar elde edilebilir.

Tablo 1.3 İyonik sıvılarda kullanılan anyon ve katyon grupları (Seddon, Stark ve Torres, 2000)

	Katyonlar	Anyonlar
Organik	 imidazolyum	 alkil sülfat
	 piridinyum	 tosilat
	 pirrolidinyum	 metansülfonat
İnorganik	 fosfonyum	 hekzaflorofosfat
	 amonyum	 tetrafloroborat
	 sülfonyum	 halojenür

## 1.5 Literatür Özeti

ZEN'in çeşitli örneklerde tayin öncesi zenginleştirilmesine yönelik DSSME ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur. Aşağıda bu çalışmalardan bahsedilmiştir. Bu çalışmaların hepsinde ekstraksiyon çözücüsü olarak çeşitli organik çözücüler kullanılmıştır.

Emídio ve diğer., (2015)'de, su örneklerinde ZEN ve türevlerini tayin etmeden önce bunları DSSME yöntemi ile zenginleştirmişlerdir. Çalışmada ekstraksiyon



çözücüsü olarak bromosikloheksan kullanmışlardır. Geliştirdikleri yöntemin doğruluğunu göstermek için su örneklerine analitlerin standart çözeltilerinden eklemeler yapmışlar ve %81-118 aralığında geri kazanım elde etmişlerdir (Emidio, da Silva ve de Marchi, 2015).

Hashemi ve diğer., (2014)' de, tahıl ürünlerinde ZEN'nu spektrofotometrik olarak tayin etmeden önce DSSME-KFE yöntemleri ile zenginleştirmişlerdir. DSSME basamağında ekstraksiyon çözücüsü olarak 1-heptanol kullanmışlardır. Bu ekstraktant fazını ortamdan hidrofobik magnetik nano partiküller ile ayırmışlardır. Daha sonra ZEN'nu magnetik ano partiküllerden 1 mL asetonitril ile geri sıyırmışlardır. ZEN için optimum koşullar altında 0,51-300 mg L<sup>-1</sup> derişim aralığında çalışma aralığı elde etmişlerdir. % 93,-102,1 aralığında geri kazanım sağlamışlardır (Hashemi, Taherimaslak, Parvizi ve Torkejokar, 2014).

Arroyo-Manzanares ve diğer., (2013)'te yaptıkları çalışmada, ZEN'u da içeren 15 tane mikotoksini DSSME yöntemi ile zenginleştirerek ultra performans sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (UHPLC-MS/MS) ile tayin etmişlerdir. Ekstraksiyonda ekstraksiyon çözücüsü olarak kloroform kullanmışlardır (Arroyo-Manzanares, Garcia-Campana ve Gamiz-Gracia, 2013).

Antep ve diğer., (2012) yılına ait çalışmalarında ZEN'nu floresans dedektörlü HPLC ile tayin etmeden önce DSSME yöntemi ile zenginleştirmişlerdir. Çalışmada ekstraksiyon çözücüsü olarak kloroform kullanmışlardır. Optimum koşullarda ZEN için zenginleştirme katsayısını 43,3 ve geri kazanımı 83 olarak elde etmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemi 11 farklı bira örneğine uygulamışlar ve spike yaptıkları örneklerden %71-108 aralığında geri kazanım sağlamışlardır(Antep ve Merdivan, 2012).

## 1.6 Çalışmanın Amacı

Çalışmada, ZEN'nun floresans dedektörlü HPLC ile tayini öncesi zenginleştirilmesi için iyonik sıvı bazlı DSSME yöntemi geliştirilmiştir. Çalışmada iki farklı iyonik sıvı ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılmış ve her iki iyonik sıvı ile ekstraksiyon parametreleri optimize edilmiştir. Çalışmanın basamakları aşağıda verilmiştir.

1. 1-butil-3-metilimidazolyum bis(triflorometansülfonil) imid ve 1-metil-3-oktilimidazolyum bis(triflorometansülfonil) imid iyonik sıvılarının sentezi ve karakterizasyonu
2. ZEN için HPLC optimizasyonu
3. Her iki iyonik sıvı ile DSSME yönteminin optimizasyonu (dispersif çözücü seçimi ve hacmi, örnek pH'sı, iyonik sıvı hacmi, ekstraksiyon süresi, santrifüj süresi ve tuz etkisi)
4. Analitik performans (lineer aralık, bağıl standart sapma, gözlenebilme sınırı, tayin sınırı, gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik)
5. Geliştirilen yöntemin bira ve tahıl örneklerine (mısır ve buğday) uygulanması

## BÖLÜM İKİ

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### 2.1 Kullanılan Kimyasallar

İyonik sıvıların sentezi için gerekli olan 1-metilimidazol (%99), 1-bromobütan (%99), 1-bromooktan (%99), lityum bis(triflorometan)sülfonimid analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich marka temin edilmiştir. Kullanılan tüm çözücüler Merck marka olup HPLC saflıktadır. ZEN analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich marka satın alınmıştır. Ultra saf su Milli-Q (Millipore) su saflaştırma sisteminden elde edilmiştir. Kullanılan diğer bütün reaktifler analitik saflıktadır. ZEN'nun stok çözeltisi 1000 ppm olarak asetonitril içerisinde hazırlanmış ve 4 °C'de buzdolabında saklanmıştır. Günlük çalışma çözeltileri ara stok çözeltilerinin saf su ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

#### 2.2 Kullanılan Cihazlar

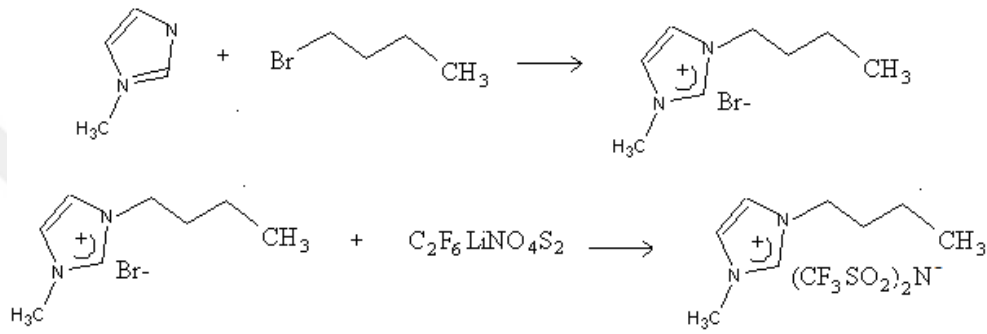
İyonik sıvı sentezi için Buchi marka Rotary evaporatör, karakterizasyon için Perkin Elmer marka Spectrum 100 model Fourier Transfer İnfrared Spektrometresi (FTIR) ve termal kararlılık için Perkin Elmer marka Diamond model Termal Gravimetrik Analiz/Diferansiyel Termal Analiz (TG/DTG) cihazı kullanılmıştır. Kromatografik analizler Thermo Dionex Ultimate 3000 model yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. pH çalışmaları için WTW 720 model pH metre kullanılmıştır. Ekstraksiyon sırasında santrifüjleme işlemleri Nuve NF 400R model santrifüj cihazı ile sağlanmıştır.

#### 2.3 İyonik Sıvıların Sentezi

##### 2.3.1 *1-butil-3-metilimidazolyum bis(triflorometansülfonil) imid ([C<sub>4</sub>mim][TFSI]) Sentezi*

Eşit mol sayılarında 1-metilimidazol ve 1-bromobütan yuvarlak dipli bir balonda karıştırılmış ve karışıma toluen ilave edilerek 60-70 °C'de soğutucu altında~ 2-3 saat ısıtılmıştır. Bu sürenin sonunda alt fazda oluşan 1-butil-3-metilimidazolyum

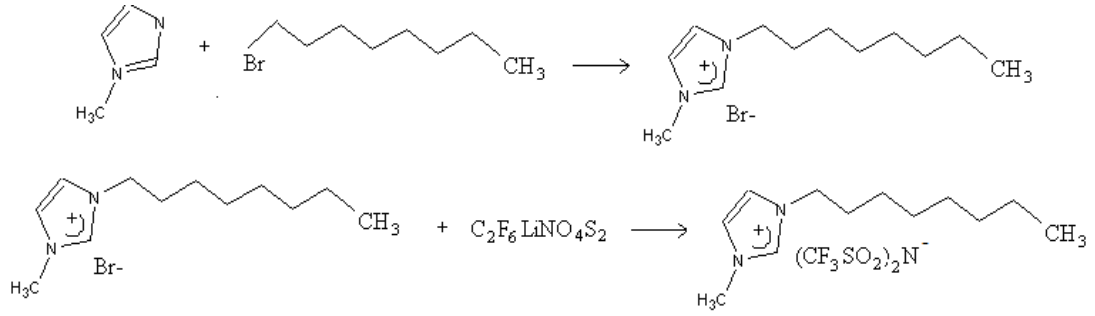
bromür([C<sub>4</sub>mim][Br]) alınmış ve diklorometan içerisindeki çözeltisine eşit mol sayıda lityum bis(triflorometan)sülfonimid tuzu ilave edilmiştir. Karışım 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra süzülerek lityum bromür tuzu ayrılmıştır. Kalan çözelti üzerine gümüş nitrat çözeltisi ilave edilerek ortamdaki fazla bromür iyonlarının AgBr'ün su fazına geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra evaporatörde diklorometanın uzaklaştırılmasıyla ([C<sub>4</sub>mim][TFSI]) elde edilmiştir (Şekil 2.1) (Zafer, Ocakoğlu, Özsoy ve İçli, 2009; Özdemir, Varlıklı, Öner, Ocakoğlu ve İçli, 2010).



Şekil 2.11-butil-3-metilimidazolyum bis(triflorometansülfonil) imid hazırlanışı

### 2.3.21-metil-3-oktilimidazolyum bis(triflorometansülfonil) imid ([C<sub>8</sub>mim][TFSI]) Sentezi

Yuvarlak dipli bir balona eşit mol sayılarında 1-metilimidazol ve 1-bromooktan ilave edilerek toluen içerisinde edilerek 60-70 °C' degeri soğutucu altında ~ 2-3 saat ısıtılmıştır. Alt fazda oluşan 1-metil-3-oktilimidazolyum bromürün([C<sub>8</sub>mim][Br]) diklorometan içerisinde çözeltisi hazırlanmış ve bu çözelti eşit mol sayısında lityum bis(triflorometan)sülfonimid tuzu ile karıştırılmıştır. Oluşan karışım oda sıcaklığında 24 saat karıştırılmıştır. Daha sonra lityum bromür tuzu süzülerek ayrılmış ve kalan çözeltiye gümüş nitrat ilave edilerek fazla bromür iyonlarının AgBr'ün su fazına geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra çözeltideki diklorometan evaporatörde uzaklaştırılarak ([C<sub>8</sub>mim][TFSI]) iyonik sıvısı elde edilmiştir (Şekil 2.2) (Zafer ve diğer., 2009; Özdemir ve diğer., 2010).

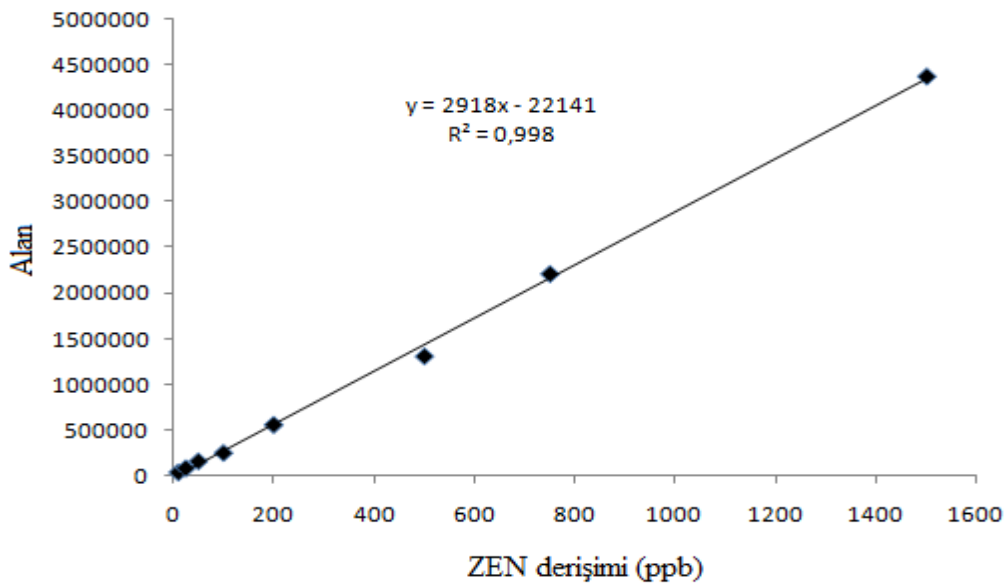


Şekil 2.21-metil-3-oktilimidazolyum bis(triflorometansülfonil) imid hazırlanışı

## 2.4 HPLC Koşulları

ZEN'nun floresans özellik göstermesinden dolayı HPLC ile analizinde floresans dedektör kullanılmıştır. Uyarma dalga boyu olarak 235 nm, emisyon dalga boyu olarak 440 nm alınmıştır. Kolon olarak Eclipse Plus C<sub>18</sub> (5 µm, partikül boyutlu, 150 mm x 4,6 mm) kullanılmıştır. ZEN için izokratik elüsyon kullanılmış olup mobil faz su:asetonitril (48:52, v/v), akış hızı 1 mL dak<sup>-1</sup> ve kolon sıcaklığı 40°C olarak seçilmiştir (Antep ve Merdivan, 2012). Bu koşullar altında ZEN için analiz süresi 5,9 dakika olarak belirlenmiştir.

ZEN'nun HPLC ile nicel analizi için farklı derişimlerde (10-1500 µg/ L) standart çözeltiler, elüsyon çözeltileri ile hazırlanarak HPLC'de analiz edilmiş ve kalibrasyon denklemi oluşturulmuştur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 ZEN için standart kalibrasyon grafiği ve denklemi

## 2.5 İyonik Sıvı Bazlı DSSME

pH'sı 5 olan 5 mL 0,2 mg/L standart ZEN çözeltisi içeren 10 mL'lik santrifüj tüpünün içerisine 200 µL ekstraksiyon çözücüsü ([C<sub>4</sub>mim][TFSI]) ve 250 µL dispersif çözücü (metanol) karışımı hızlı bir şekilde ilave edilmiştir. Karışım elde 1 dakika çalkalanmış ve oluşan bulutsu görünümdeki çözelti 3500 rpm'de 2 dakika santrifüjlenmiştir. Daha sonra santrifüj tüpünün üst fazı pastör pipetiyle uzaklaştırılmış ve alt fazdaki sediment faz ( $\sim 50 \pm 3$  µL) 1 mL metanolde çözümlenerek HPLC'ye enjekte edilmiştir.

## 2.6 Gerçek Örneklerin Analize Hazırlanması

### 2.6.1 Bira Örnekleri

Üç farklı markadaki bira örneği İzmir'deki marketten satın alınarak 4°C'de buzdolabında saklanmıştır. Analiz öncesi, bira örnekleri 45 dakika ultrasonik banyoda degase edilmiş ve daha sonra 0,45 µm'lik filtrelerden geçirilmişlerdir (Antep ve Merdivan, 2012). Bu işlemten sonra, örneklerin pH'ı 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisi ile pH 5'e ayarlanarak 2.5'te verilen iyonik sıvı bazlı DSSME yöntemi uygulanmıştır.

Yöntemin doğruluğu için, bira örneklerine 0,05, 0,10 ve 0,20 mg/L derişimlerinde standart ZEN çözeltileri ilave edilerek 1 dakika karıştırılmış ve pH 5'e ayarlanarak örneğe optimize edilen iyonik sıvı bazlı DSSME yöntemi uygulanmıştır.

### 2.6.2 Tahıl Örnekleri

Mısır ve tahıl örnekleri paket içerisinde İzmir'deki marketten satın alınmıştır. Örnekler laboratuvarında, öğütücü ile toz haline getirilmiş ve daha sonra 20 mL metanol ile ekstrakte edilmiştir (Campone, Piccinelli, Celano ve Rastrelli, 2012; Mashhadizadeh, Amoli-Diva ve Pourghazi, 2013). Daha sonra bu ekstrattan 1 mL alınarak 5 mL saf su ile seyreltilmiştir. Çözelti 0,45 µm'lik filtrelerde süzölmüş ve 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisi ile örneklerin pH'sı 5'e ayarlanarak iyonik sıvı bazlı DSSME yöntemi uygulanmıştır.

Yöntemin doğruluğu için, mısır ve buğday örneklerine 0,05, 0,10 ve 0,20 mg/L derişimlerinde standart ZEN çözeltileri ilave edilmiş ve 1 dakika karıştırıldıktan sonra pH 5'e ayarlanmış ve optimize edilen DSSME yöntemi uygulanmıştır.



## BÖLÜM ÜÇ

### SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME

#### 3.1 İyonik Sıvıların Karakterizasyonu

ZEN için geliştirilen DSSME yönteminde ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılmak üzere sentezlenen iyonik sıvıların yapıları FTIR spektrumları ile karakterize edilmiştir. Termal kararlılıkları TG/DTG eğrisi ile incelenmiştir.

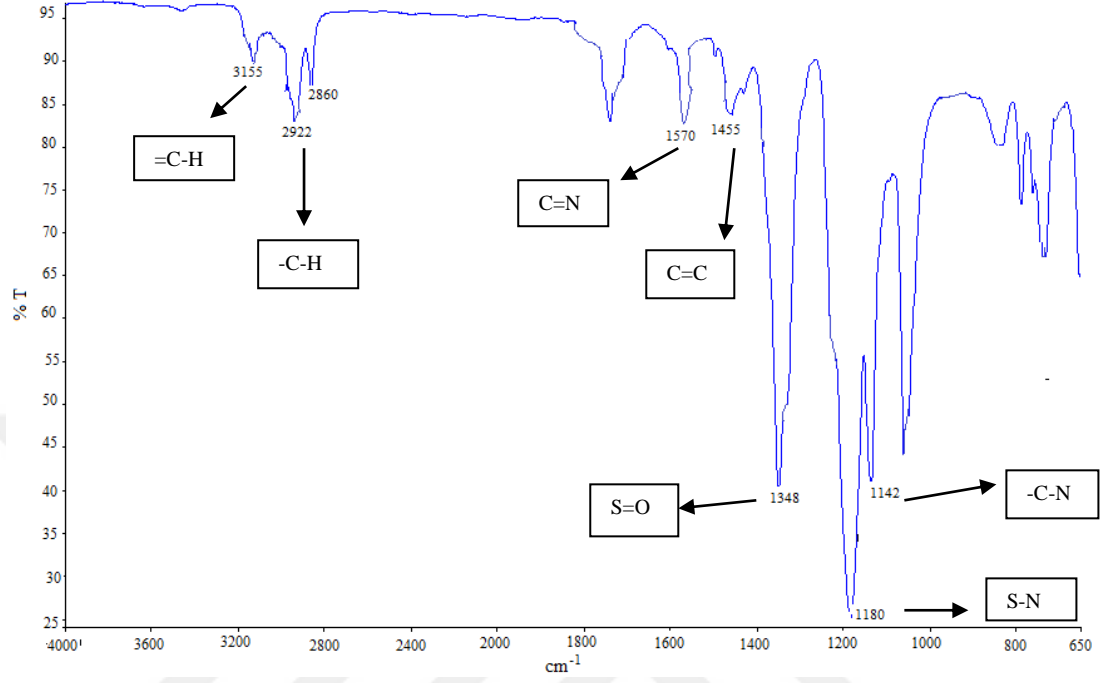
##### 3.1.1 [C<sub>4</sub>mim][TFSI] ve [C<sub>8</sub>mim][TFSI]'in FTIR Spektrumu

Sentezlenen iyonik sıvıların FTIR spektrumları ATR probu ile yaklaşık 0,1 mL örnek kullanılarak alınmıştır. [C<sub>4</sub>mim][TFSI] ve [C<sub>8</sub>mim][TFSI]'in FTIR spektrumları ara ürünlerin ([C<sub>4</sub>mim][Br] ve [C<sub>8</sub>mim][Br]) FTIR spektrumları ile karşılaştırılmıştır. [C<sub>4</sub>mim][TFSI] ve [C<sub>8</sub>mim][TFSI]'de farklı olarak aromatik S=O ve alifatik S-N gerilme titreşimlerinin gözlenmesi ara ürünlerden bu iyonik sıvıların sentezlendiğini göstermektedir. Tüm iyonik sıvılardaki karakteristik pikler Tablo 3.1'de özetlenmiştir. Şekil 3.1'de [C<sub>4</sub>mim][TFSI]'in ve Şekil 3.2'de [C<sub>8</sub>mim][TFSI]'in FTIR spektrumları verilmiştir.

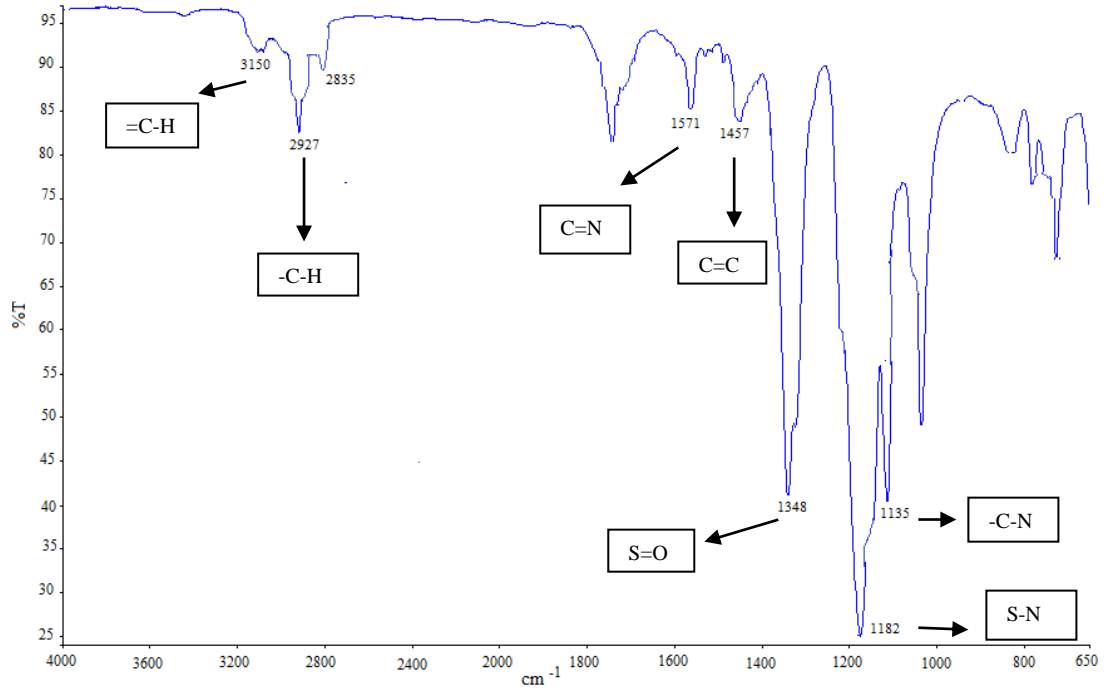
Tablo 3.1 İyonik sıvıların FTIR spektrum verileri

İyonik sıvı	Dalga sayısı cm <sup>-1</sup>						
	=C-H	-C-H	C=N	C=C	-C-N	S=O	S-N
[C <sub>4</sub> mim][Br]	3055	2950- 2864	1570	1452	1160	-	-
[C <sub>8</sub> mim][Br]	3035	2922- 2860	1564	1452	1156	-	-
[C <sub>4</sub> mim][TFSI]	3155	2925- 2852	1570	1455	1142	1348	1180
[C <sub>8</sub> mim][TFSI]	3150	2927- 2835	1571	1457	1135	1348	1182





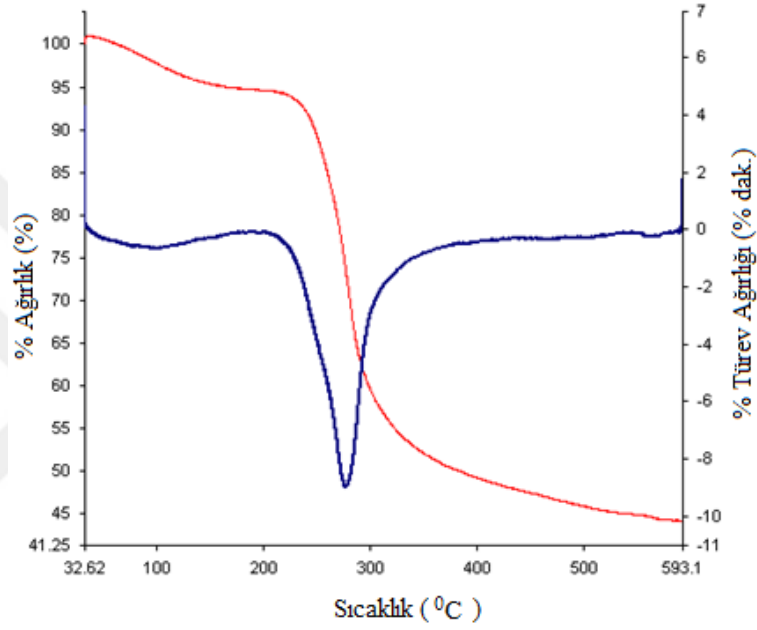
Şekil 3.1  $[C_4mim][TFSI]$ 'in FTIR spektrumu



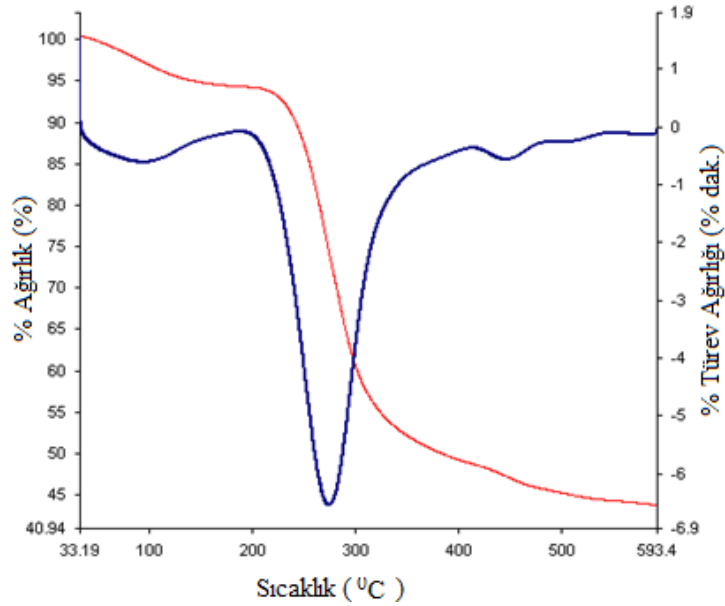
Şekil 3.2  $[C_8mim][TFSI]$ 'in FTIR spektrumu

### 3.1.2[C<sub>4</sub>mim][TFSI]ve [C<sub>8</sub>mim][TFSI]'in Termal Analiz Sonuçları

İyonik sıvıların termal analizi alüminyum kap kullanılarak azot atmosferinde 25-500 °C aralığında (sıcaklık artışı 15 °C/dak) analiz edilmiştir. Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de verilen TG/DTG eğrilerinde görüldüğü gibi [C<sub>4</sub>mim][TFSI] ve [C<sub>8</sub>mim][TFSI]'in termal olarak iki kademede (~95 ve 280 °C) bozunduğu gözlenmiştir. Her iki iyonik sıvı oda sıcaklığında kararlıdır.



Şekil 3.3[C<sub>4</sub>mim][TFSI]'in TG/DTG eğrisi



Şekil 3.4[C<sub>8</sub>mim][TFSI]'in TG/DTG eğrisi

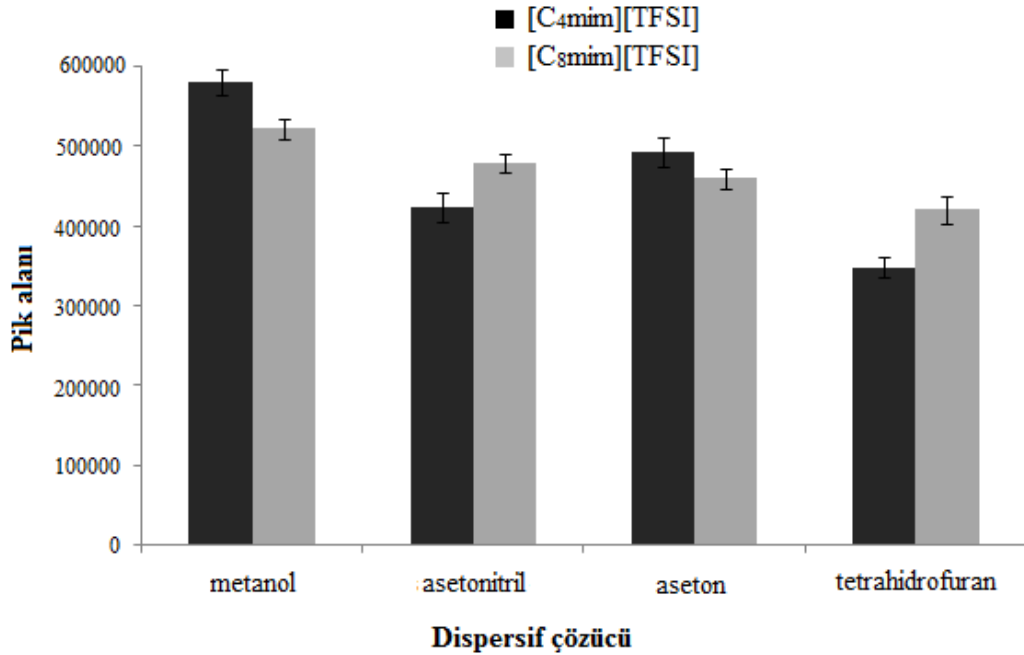
### 3.2 İyonik Sıvı Bazlı DSSME Yönteminin Optimizasyonu

ZEN'nun HPLC ile analizinden önce iyonik sıvı bazlı DSSME yöntemi ile zenginleştirilmesi için şu parametreler optimize edilmiştir:dispersif çözücü çeşidi ve hacmi, örnek çözelti pH'ı, iyonik sıvı hacmi, tuz etkisi, ekstraksiyon süresi, santrifüj süresi.

Tüm parametreler, ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan [C<sub>4</sub>mim][TFSI] ve [C<sub>8</sub>mim][TFSI] iyonik sıvılarının her ikisi ile de gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2.1 Dispersif Çözücü Çeşidi ve Hacminin Optimizasyonu

DSSME yönteminde, ekstraksiyonun verimli olabilmesi için kullanılan dispersif çözücüsünün hem ekstraksiyon çözücüsü ile hem de sulu örnek çözeltisi ile karışabilir özellikte olması gerekmektedir (Rezaee, Assadi, Hosseini, Aghae, Ahmadi ve Berijani, 2006; Campone, Piccinelli ve Rastrelli, 2011). Bu amaçla çalışmada metanol, aseton, asetonitril, tetrahidrofuran gibi çözücüler dispersif çözücü olarak kullanılmıştır. Her iki iyonik sıvı ile de gerçekleştirilen ekstraksiyonda en yüksek ekstraksiyon verimliliği metanol ile elde edilmiştir (Şekil 3.5).

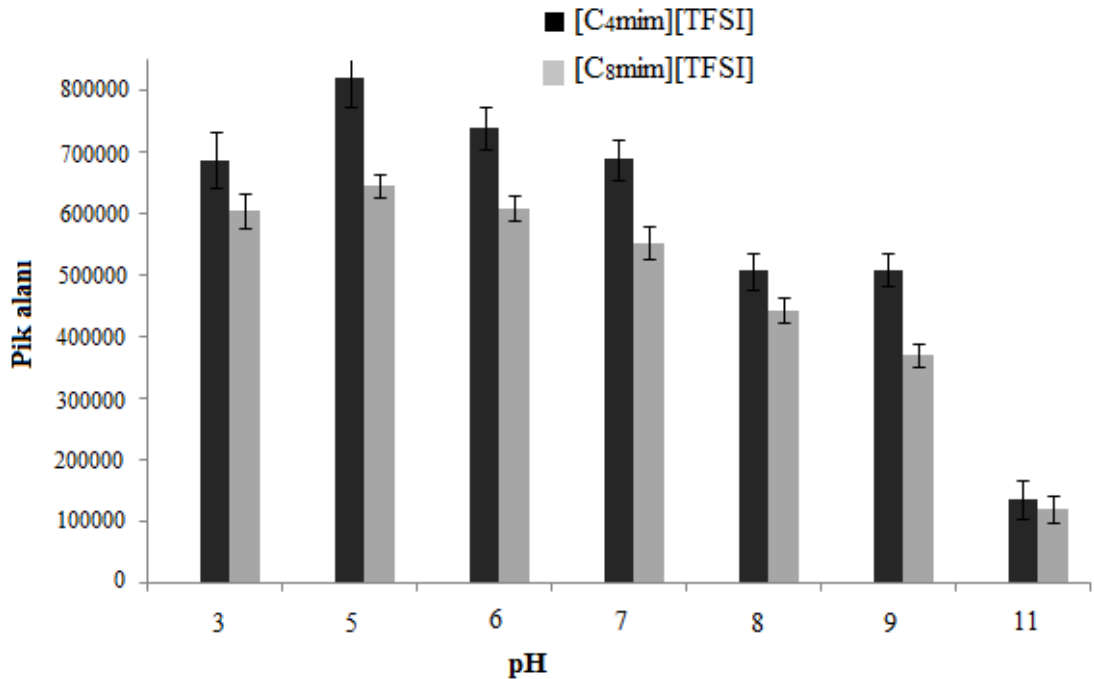


Şekil 3.5 İyonik sıvı bazlı DSSME yöntemine dispersif çözücü etkisi. Deney koşulları: 5 mL 0,2 mg/L test çözeltisi, pH 5, dispersif çözücü hacmi 500 µL, iyonik sıvı hacmi 100 µL, ekstraksiyon süresi 1 dak., santrifüj süresi 5 dak., tuz ilavesiz.

DSSME yönteminde, dispersif çözücü hacmi, ekstraksiyon çözücüsünün sulu örnek çözeltisindeki çözünürlüğünde büyük etkiye sahip olduğu için, bu hacmin optimize edilmesi gerekmektedir. Bu yüzden  $[C_4mim][TFSI]$  ve  $[C_8mim][TFSI]$  ile gerçekleştirilen DSSME’unda 50, 100, 250, 500, 750 ve 1000  $\mu L$  metanol çözeltileri ile çalışılmıştır.  $[C_4mim][TFSI]$  ile gerçekleştirilen DSSME yönteminde metanolün 250  $\mu L$ ’si ile,  $[C_8mim][TFSI]$  ile gerçekleştirilen DSSME yönteminde ise metanolün 500  $\mu L$ ’si ile en yüksek ekstraksiyon verimliliği elde edilmiştir. Bu yüzden daha sonraki çalışmalar, butil grubuna sahip iyonik sıvı için 250  $\mu L$  metanol ve oktil grubuna sahip iyonik sıvı için 500  $\mu L$  metanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.2 pH Optimizasyonu

ZEN çözeltisinin pH’sını optimize etmek için, çözelti pH’sı 0,1 M sodyum hidroksit ve hidroklorik asit çözeltileri ile pH 3, 5, 6, 7, 8, 9, ve 11’e ayarlanmıştır. Her iki iyonik sıvı ile gerçekleştirilen DSSME yönteminde en yüksek ekstraksiyon verimliliği pH 5’de elde edilmiştir (Şekil 3.6).



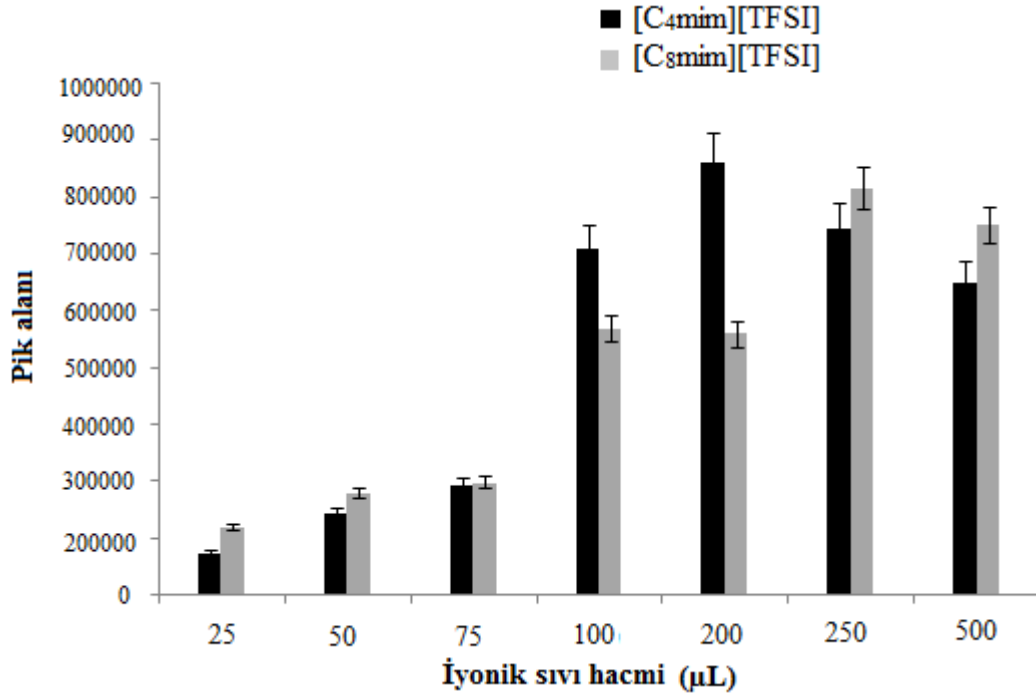
Şekil 3.6 İyonik sıvı bazlı DSSMME yöntemine pH etkisi. Deney koşulları: 5 mL 0,2 mg/L test çözeltisi, pH 5, metanol hacmi 250  $\mu L$  ( $[C_4mim][TFSI]$ ’de) ve 500  $\mu L$  ( $[C_8mim][TFSI]$ ’de), iyonik sıvı hacmi 100  $\mu L$ , ekstraksiyon süresi 1 dak., santrifüj süresi 5 dak., tuz ilavesiz.

ZEN'nun  $pK_a$  değeri 7,6'dır. Buna göre pH 3'de ZEN iyonlaşmamış durumdadır. Bu yüzden bu pH değerinde, iyonik sıvılarla yeteri kadar etkileşemediği için ekstraksiyon verimliliği düşüktür. pH 7'de ise, ZEN sulu çözeltide fenolik anyon içermektedir ve pH 9'da da anyonik formdadır (Emidio, da Silva ve de Marchi, 2015). Bu pH değerlerinde de ekstraksiyon verimliliği pH 5'e göre daha düşük olduğu için, bu durum başlıca etkileşim türünün elektrostatik olmadığını göstermektedir. pH 5 değerinde ZEN'nun moleküler arası etkileşimlerle (hidrojen bağı, dipol-dipol etkileşimi gibi) iyonik sıvı fazına geçtiği düşünülmektedir. Daha sonraki çalışmalar pH 5'de gerçekleştirilmiştir.

### ***3.2.3 İyonik Sıvı Hacminin Optimizasyonu***

DSSME yönteminde kullanılan ekstraksiyon çözücüsü, sudan daha yoğun özellikte olmalı, su ile karışmamalı ve analit için iyi bir çözücü özelliği göstermelidir (Gure, Lara, Garcia-Campana, Megersa ve del Olmo-Iruela, 2015; Ji, Du, Zhang ve Zhang, 2014). Optimum iyonik sıvı hacminin belirlenmesi için  $[C_4mim][TF SI]$  ve  $[C_8mim][TF SI]$  iyonik sıvılarının 25, 50, 75, 100, 200, 250 v 500  $\mu L$ 'si ile ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir.

$[C_4mim][TF SI]$ 'in 200  $\mu L$ 'si ile ve  $[C_8mim][TF SI]$ 'in 250  $\mu L$ 'si ile daha yüksek ekstraksiyon verimliliği elde edildiği gözlenmiştir (Şekil 3.7). Bu yüzden daha sonraki çalışmalar bu iyonik sıvı hacimleriyle gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.7 İyonik sıvı bazlı DSSME yöntemine iyonik sıvı hacminin etkisi. Deney koşulları: 5 mL 0,2 mg/L test çözeltisi, pH 5, metanol hacmi 250 µL ([C<sub>4</sub>mim][TFSI]'de) ve 500 µL ([C<sub>8</sub>mim][TFSI]'de), ekstraksiyon süresi 1 dak., santrifüj süresi 5 dak., tuz ilavesiz.

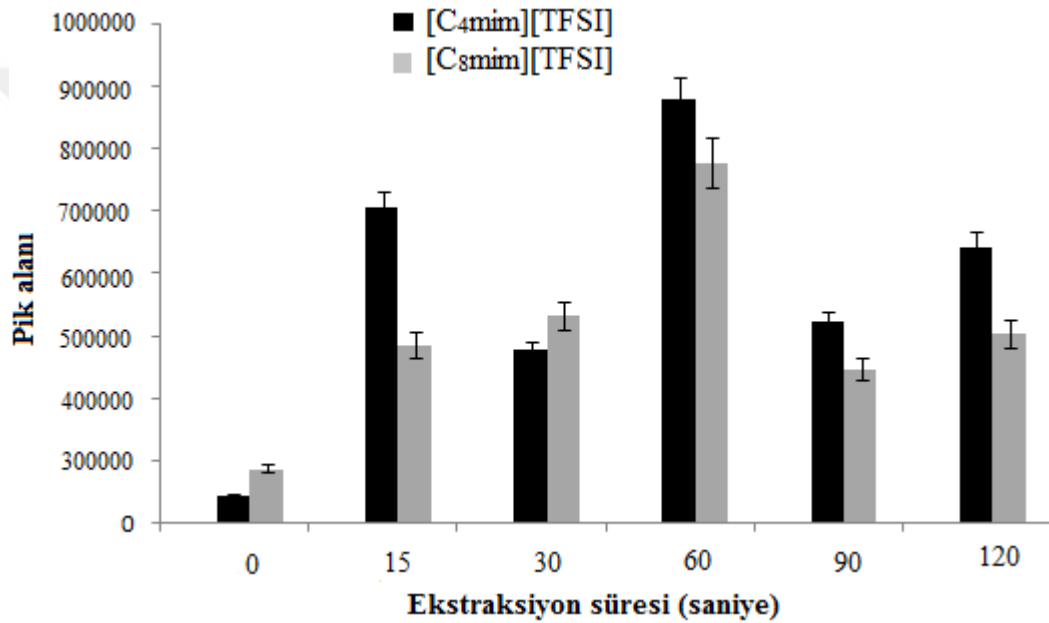
### 3.2.4 Tuz Etkisi

İyonik sıvı bazlı DSSME yönteminde iyonik şiddetin etkisini incelemek için, örnek çözeltisinin içerisine %0-20 (w/v) oranlarında sodyum klorür çözeltileri ilave edilmiştir. Her iki iyonik sıvı ile gerçekleşen DSSME'nunda ilave edilen sodyum klorür çözeltisinin derişiminin artmasıyla ekstraksiyon verimliliğinin azaldığı gözlenmiştir. Bu durumun, ortamda sodyum klorür miktarının artmasıyla iyonik sıvıların anyonlarının klorür iyonuyla yer değıştirmesi ve oluşan 1-butil-3-metylimidazolyum klorür ve 1-metil-3-oktilimidazolyum klorürün suda çözünmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Zhao, Wang, Li, Wang, Zhang ve Cheng, 2011). Bu yüzden daha sonraki çalışmalar tuz ilavesi olmadan gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.5 Ekstraksiyon Süresinin Optimizasyonu

DSSME yönteminde ekstraksiyon süresi, dispersif çözücü ve ekstraksiyon çözücü karışımının sulu örnek ile karıştırılması ve santrifüjleme işlemi arasında kalan süre

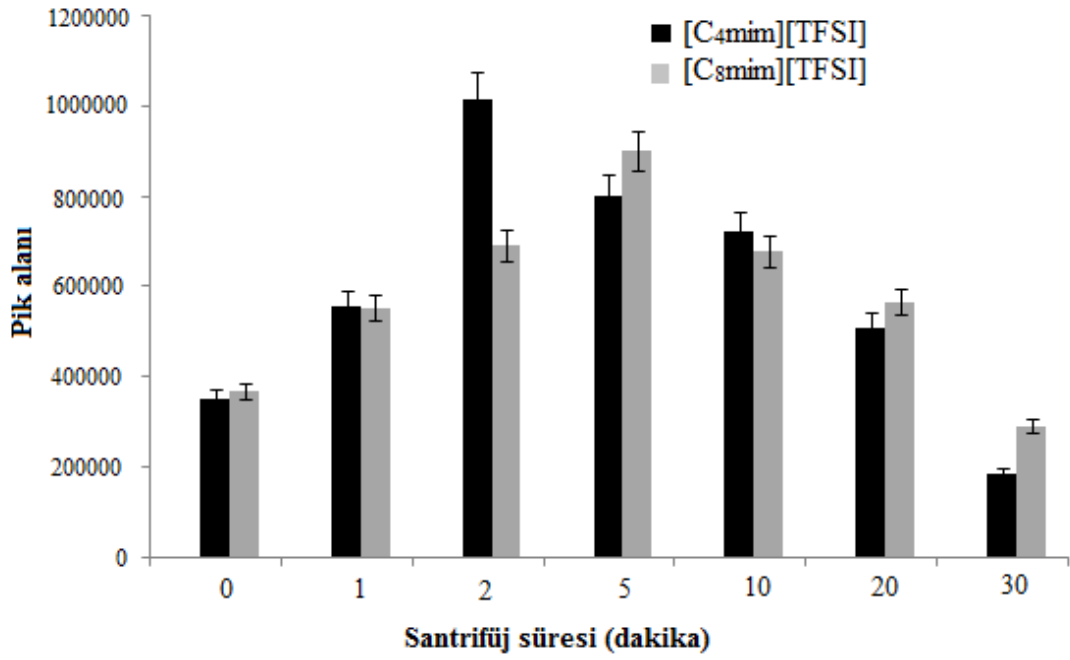
olarak tanımlanabilir (Niazi, Khorshidive Ghaemmaghami, 2015). Optimum ekstraksiyon süresinin belirlenmesi için ekstraksiyon her iki iyonik sıvıyla 0, 15, 30, 60, 90 ve 120 saniyelerde gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.8’de görüldüğü gibi her iki iyonik sıvı için de en iyi ekstraksiyon süresi 60 saniye olarak belirlenmiştir. Bu da ZEN ile ekstraksiyon çözücüsü arasındaki etkileşimin oldukça kısa olduğunu göstermektedir. Ayrıca ekstraksiyon süresinin kısa olması geliştirilen yöntem için iyi bir avantaj oluşturmaktadır.



Şekil 3.8 İyonik sıvı bazlı DSSME yöntemine ekstraksiyon süresinin etkisi. Deney koşulları: 5 mL 0,2 mg/L test çözeltisi, pH 5, metanol hacmi 250  $\mu$ L ([C<sub>4</sub>mim][TFSI]’de) ve 500  $\mu$ L ([C<sub>8</sub>mim][TFSI]’de), iyonik sıvı hacmi 200  $\mu$ L ([C<sub>4</sub>mim][TFSI]) ve 250  $\mu$ L ([C<sub>8</sub>mim][TFSI]), santrifüj süresi 5 dak., tuz ilavesiz.

### 3.2.6 Santrifüj Süresinin Optimizasyonu

Optimum santrifüj süresini belirlemek için DSSME’nu 3500 rpm’de 0, 1, 2, 5, 10, 20 ve 30 dakikada gerçekleştirilmiştir. [C<sub>4</sub>mim][TFSI] ile gerçekleştirilen DSSME yönteminde optimum santrifüj süresi 2 dakika, ve [C<sub>8</sub>mim][TFSI] ile gerçekleştirilen DSSME yönteminde ise optimum santrifüj süresi 5 dakika olarak belirlenmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 İyonik sıvı bazlı DSSME yöntemine santrifüj süresinin etkisi. Deney koşulları: 5 mL 0,2 mg/L test çözeltisi, pH 5, metanol hacmi 250 µL ([C<sub>4</sub>mim][TFSI]'de) ve 500 µL ([C<sub>8</sub>mim][TFSI]'de), iyonik sıvı hacmi 200 µL ([C<sub>4</sub>mim][TFSI]) ve 250 µL ([C<sub>8</sub>mim][TFSI]), ekstraksiyon süresi 1 dak., tuz ilavesiz.

### 3.3 İyonik Sıvıların Ekstraksiyon Etkinliğinin Karşılaştırılması

Geliştirilen DSSME yönteminde tüm optimum parametrelerin belirlenmesinde ekstraksiyon çözücüsü olarak hem [C<sub>4</sub>mim][TFSI] hem de [C<sub>8</sub>mim][TFSI] kullanılmıştır. Optimum pH, dispersif çözücü, ekstraksiyon zamanı ve tuz etkisi her iki iyonik sıvıda benzer sonuçları vermiştir. Fakat optimum dispersif çözücü hacmi, iyonik sıvı hacmi ve santrifüj zamanı iyonik sıvılarda farklı değerlerde elde edilmiştir (Tablo 3.2). Ayrıca [C<sub>4</sub>mim][TFSI] ile gerçekleştirilen DSSME yönteminde, santrifüj sonrası oluşan sediment fazın hacmi ~50 µL iken [C<sub>8</sub>mim][TFSI] ile gerçekleştirilen ekstraksiyonda ise bu hacim ~150 µL olarak bulunmuştur. Her iki iyonik sıvı için elde edilen optimum koşullarda ZEN'nun zenginleştirme katsayısı hesaplanmış ve [C<sub>4</sub>mim][TFSI] ile gerçekleştirilen ekstraksiyonda daha yüksek zenginleştirme katsayısı elde edilmiştir.



Tablo 3.2 Geliştirilen iyonik sıvı bazlı DSSME yönteminde elde edilen ekstraksiyon sonuçları

	[C <sub>4</sub> mim][TFSI]	[C <sub>8</sub> mim][TFSI]
Optimum pH	5	5
Optimum dispersif çözücü	metanol	metanol
Optimum dispersif çözücü hacmi (µL)	250	500
Optimum iyonik sıvı hacmi (µL)	200	250
Optimum ekstraksiyon süresi (s)	60	60
Optimum santrifüj süresi (dak.)	2	5
Tuz miktarı (% w/v)	-	-
Ekstraksiyon sonrası sediment faz <sup>1</sup> (µL)	50±3	150±2
Geri kazanım <sup>2</sup> (%)	93,29±0,58	83,94±0,65
Zenginleştirme katsayısı	93±1	29±0,25

<sup>1</sup>n = 3<sup>2</sup>ZEN = 0,2ppm, 5 mL

### 3.4 Analitik Performans

İki iyonik sıvıyla gerçekleştirilen DSSME yönteminde [C<sub>4</sub>mim][TFSI] ile daha iyi ekstraksiyon sonuçları elde edildiği için yöntemin doğrusal aralığı, kesinliği, gözlenebilme sınırı, tayin sınırı gibi analitik performansı belirleyen parametreler bu iyonik sıvı ile kullanılarak belirlenmiştir.

Geliştirilen yöntem ZEN'nun 1-750 µg/L derişim aralığında  $y=11088x+21386$  (y, pik alanı; x, µg/L cinsinden ZEN derişimi) kalibrasyon denklemi ile doğrusallık göstermiştir. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ), yöntemin kalibrasyon eşitliğindeki en küçük derişimdeki ZEN'nun 10 paralel okutulması ve elde edilen yanıtın standart sapmasına (SD) ve kalibrasyon doğrusunun eğimine (S) dayanarak elde edilmiştir. LOD için  $3(SD/S)$  ve LOQ için  $10(SD/S)$  formülü kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.3'de verilmiştir.

Yöntemin kesinliği, 10 µg/L ZEN derişimi ile 3 paralel olarak aynı gün ve farklı günlerde çalışılmasıyla belirlenmiştir. Gün- içi ve günler-arası tekrarlanabilirlik, % bağıl standart sapma (%BSS) cinsinden %1,36 ve %3,02 olarak bulunmuştur.

Yöntemde % geri kazanım ve zenginleştirme katsayısının belirlenmesi için aşağıdaki eşitlikler kullanılmıştır ve sonuçlar Tablo 3.3'de özetlenmiştir.

$$\text{Zenginleştirme katsayısı} = \frac{C_{\text{sed}}}{C_0} \quad (3.1)$$

$C_{\text{sed}}$ : Sediment fazdaki analit derişimi;  $C_0$ : Sulu çözültideki analit derişimi

$$\% \text{ Geri kazanım} = \frac{C_{\text{sed}} \times V_{\text{sed}}}{C_0 \times V_{\text{sulu faz}}} \times 100 \quad (3.2)$$

$V_{\text{sed}}$ : Sediment fazın hacmi;  $V_{\text{sulu faz}}$ : Sulu örnek çözültisinin hacmi

Tablo 3.3 Geliştirilen iyonik sıvı bazlı DSSM yönteminde elde edilen analitik parametreler

Parametreler	Veriler
Lineer aralık (µg/L)	1-750
Korrelasyon katsayısı ( $R^2$ )	0,9960
LOD (µg/L)	0,25
LOQ (µg/L)	0,83
%BSS (günler-arası, n=5)	3,02 <sup>a</sup>
%BSS (gün-içi, n=5)	1,36 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>10 ppb ZEN için.

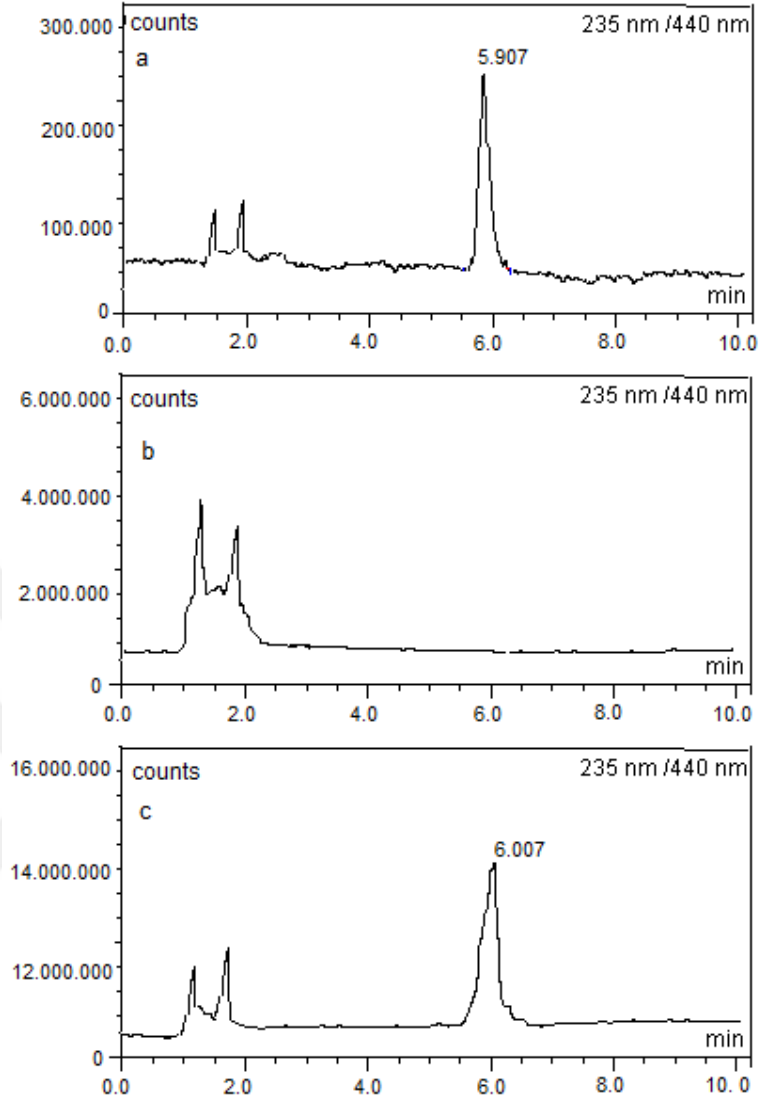
### 3.5 Geliştirilen Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması

Geliştirilen iyonik sıvı bazlı DSSME yöntemi bira ve tahıl örneklerine (mısır ve buğday) uygulanmıştır. Yöntemde ekstraksiyon çözücüsü olarak [C<sub>4</sub>mim][TFSI] kullanılmıştır. Bira ve tahıl örneklerine 0,05, 0,10 ve 0,20 mg/L standart ZEN çözeltisi ilave edilmiş ve %80-100 aralığında geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Tablo 3.4'de görüldüğü gibi gerçek örneklerde ZEN kalıntısına rastlanmamıştır. Şekil 3.10'da 2 numaralı bira örneğinin spike yapılmış ve spike yapılmamış hallerinin, iyonik sıvı bazlı DSSME sonrası elde edilen kromatogramları verilmiştir.

ZEN'nun zenginleştirilmesi için geliştirilen iyonik sıvı bazlı DSSME yöntemi, literatürlerde ZEN için kullanılan diğer zenginleştirme yöntemleri ile Tablo 3.5'de karşılaştırılmıştır. Tabloda da görüldüğü gibi geliştirilen yöntem, yüksek zenginleştirme katsayısına, yüksek geri kazanıma ve düşük gözlenebilme sınırına sahiptir.

Tablo 3.4 Bira ve tahıl örneklerinin analiz sonuçları (n=3)

Örnekler	Eklenen (mg/L)	Bulunan (mg/L)	Geri kazanım (%)
Bira örneği 1	-	-	-
	0,05	0,05±0,01	100,0
	0,10	0,09±0,01	90,0
	0,20	0,19±0,02	95,0
Bira örneği 2	-	-	-
	0,05	0,04±0,01	80,0
	0,10	0,09±0,01	90,0
	0,20	0,20±0,02	100,0
Bira örneği 3	-	-	-
	0,05	0,05±0,01	100,0
	0,10	0,09±0,02	90,0
	0,20	0,18±0,02	90,0
Buğday tahılı	-	-	-
	0,05	0,04±0,01	80,0
	0,10	0,08±0,02	80,0
	0,20	0,18±0,02	90,0
Mısır tahılı	-	-	-
	0,05	0,05±0,01	100,0
	0,10	0,09±0,01	90,0
	0,20	0,19±0,02	95,0



Şekil 3.10 Kromatogramlar: a) metanolde 0,05 mg/L standart ZEN çözeltisi b) geliştirilen yöntem sonrası 2 numaralı bira örneği c) geliştirilen yöntem sonrası 0,05 mg/L ZEN eklenmiş 2 numaralı bira örneği

Tablo 3.5 ZEN için geliştirilen iyonik sıvı bazlı DSSME yönteminin literatürdeki diğer yöntemlerle karşılaştırılması

Zenginleştirme yöntemi	Tayin yöntemi	Lineer aralık (µg/L)	Zenginleştirme katsayısı	LOD (µg/L)	Geri kazanım (%)	Referans
KFE	HPLC	20-8800	-	-	82-87	Lucci, Derrien, Alix, Pérollier ve Bayoudh, 2010
DSSME-KFE	Spektro-florimetri	0,51–300,0	58,5	0,25	93,2-102,1	Hashemi, Taherimaslak, Parvizi, Torkejokar, 2014
KFE	HPLC	-	20	-	89,5	Pasinli ve Henden, 2013
KFE	HPLC	6-500	-	1,7-2,4	86-97	Urraca, Marazuela ve Moreno-Bondi, 2006
DSSME	HPLC	0,4-120	43,3	0,12	71-108	Antep ve Merdivan, 2012
İyonik sıvı bazlı DSSME	HPLC	1-750	93	0,25	80-100	Bu çalışma

KFE: Katı faz ekstraksiyonu

### 3.6 Değerlendirme

Çalışmada ZEN'nun HPLC ile tayin öncesi zenginleştirilmesi için iyonik sıvı bazlı DSSME yöntemi geliştirilmiş ve optimize edilen yöntem bira ve tahıl örneklerine (mısır ve buğday) başarıyla uygulanmıştır.

Çalışmada öncelikle ekstraksiyon çözücü olarak kullanılması için iki tane iyonik sıvı ( $[C_4mim][TFSI]$  ve  $[C_8mim][TFSI]$ ) sentezlenmiş, DSSME yöntemi bu iki iyonik sıvı kullanılarak optimize edilmiştir. İyonik sıvıların DSSME yöntemi için ekstraksiyon etkinlikleri karşılaştırıldığında ZEN'nun zenginleştirilmesinde  $[C_4mim][TFSI]$ 'in etkili olduğu gözlenmiştir. Bu durum, iyonik sıvıların alkil gruplarının uzunluğu ile açıklanabilir. Alkil zinciri uzadıķça steril engelden dolayı ZEN'nun iyonik sıvı ile etkileşmesi zorlaşmakta bu da ekstraksiyon verimliliğini düşürmektedir. Bu çalışmada da ZEN ve  $[C_4mim][TFSI]$  arasında etkileşim daha fazla olduğu için yöntemin gerçek örneklere uygulanması ve yöntemin analitik performansı  $[C_4mim][TFSI]$  ile gerçekteştirilmiştir.

Geliştirilen yöntemin doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, tayin sınırı, gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirliği belirlenmiştir. Bira, mısır ve tahıl örneklerinde ZEN kalıntısına rastlanmamıştır. Yöntemin doğrulunu göstermek için belli derişimlerde ZEN standardı örneklere eklenmiş ve %80-100 aralığında geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Antep, H.M. ve Merdivan, M. (2012). Development of new dispersive liquid–liquid microextraction technique for the identification of zearalenone in beer, *Analytical Methods*, 4, 4129-4134.
- Arroyo-Manzanares, N., Garcia-Campana, A.M. ve Gamiz-Gracia, L. (2013). Multiclass mycotoxin analysis in *Silybum marianum* by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a procedure based on QuEChERS and dispersive liquid–liquid microextraction, *Journal of Chromatography A*, 1282, 11-19.
- Arthur, C.L. ve Pawliszyn, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Analytical Chemistry*, 62, 2145-2148.
- Artık, N., Velioğlu, S. ve Sağlam, N. (1991). Mikotoksinler: Patulinin oluşumu ve meyve sularındaki önemi. *Araştırma* 3 (33), 13-17.
- Avrupa Konseyi, (2007). Düzenleme No. 1126/2007. Amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as Regards *Fusarium* toxins in maize and maize products, *Official Journal of the European Union*, L 255, 14-17.
- Ayaz, A. ve Yurttagül, M., (2008). *Besinlerdeki Toksik Öğeler- I*, Hacettepe Üniversitesi - Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 727.
- Camel, V. (2003). Solid phase extraction of trace elements, *Spectrochimica Acta Part B*, 58, 1177–1233.



- Campone, L., Piccinelli, A.L., Celano, R. ve Rastrelli, L. (2012). pH-controlled DLLME for the analysis of ionisable compounds in complex matrices: Case study of ochratoxin A in cereals, *Analytica Chimica Acta*, 754, 61-66.
- Campone, L., Piccinelli, A.L. ve Rastrelli, L. (2011). Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the identification and the accurate quantification by isotope dilution assay of Ochratoxin A in wine samples, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399 (3), 1279-1286.
- Demirci, A. ve Özçimder, M. (2008). *Kimyada ayırma yöntemleri*, Ankara :Kurban Matbaacılık Yayıncılık
- Dietzs, C., Sanz, J. ve C'amara, C. (2006). Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques, *Journal Chromatography A*, 1103,183-192.
- Dodfornio, S. ve Shabani, A.M.H. (2010). Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals. A review *Analytica Chimica Acta*, 658,107-119.
- Emidio, E.S., da Silva, C.P. ve de Marchi, M.R.R. (2015). Determination of estrogenic mycotoxins in environmental water samples by low-toxicity dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1391, 1-8.
- Ergün, Ö.(1992). Ülkemizde tüketilen biraların enzim immunolojik test çubukları metodu ile zearalenon ve aflatoksin B<sub>1</sub> kalıntıları yönünden incelenmesi, *Gıda Teknoloji Derneği*, 17(6), 409-412.

- Frozey, P.A., Barkley, R.M. ve Sievers, R.E. (1998). Solid phase microextraction with temperature programmed desorption for the analysis of iodinated disinfection by products, *Analytical Chemistry*, 70, 638-644.
- Fink-Gremmels, J., (1999). Mycotoxins: Their implications for human and animal health. *Veterinary Quartely*, 21(4)
- Girgin, G. (2001). Dünyada ve Türkiye’de İnsan Sağlığını Tehdit Eden Mikotoksinler, Mycotoxins in Turkey and the World, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyolojisi Dergisi*, 58 (3), 97-118
- Gure, A., Lara, F.J., Garcia-Campana, A.M., Megersa, N. ve del Olmo-Iruela W. (2015). Vortex-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of sulfonylurea herbicides in wine samples by capillary high-performance liquid chromatography, *Food Chemistry*, 170, 348–353.
- Hashemi, M., Taherimaslak, Z., Parvizi, S. ve Torkejokar, M. (2014). Spectrofluorimetric determination of zearalenone using dispersive liquid–liquid microextraction coupled to micro-solid phase extraction onto magnetic nanoparticles, *RSC Advances*, 4, 450565-45073.
- Hinze, W.L. ve Pramauro E. (1993). A critical review of surfactant–mediated phase separations (cloud-point extractions): Theory and applications, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 24 (2), 133-177.
- Ji, Y., Du, Z., Zhang, H. ve Zhang, Y. (2014). Rapid analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in tap water and drinks by ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled to ultra-high performance supercritical fluid chromatography. *Analytical Methods*, 6 (18), 7294-7304.

- Kumar, A., Gourov, Malik, A.K., Tewary, D.K. ve Singh, B. (2008). A review on development of solid phase microextraction fibers by sol-gel methods and their applications, *Analytica Chimica Acta*, 610, 1-14.
- Leang, M.I. ve Hwang, S.D. (2008). Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electrone-capture or mass spectrometry detection. *Journal Chromatography A*, 1211, 8-12.
- Lemos, V.A., Baliza, P.X., Lago de Carvalho, A., Oliveira, R.V., Teixeira, L.S.G. ve Bezerra, M.A. (2008). Development of a new sequential injection in-line cloud point extraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of manganese in food samples, *Talanta*, 77,388-393.
- Liska, I. (2000). Fifty years of solid-phase extraction in water analysis-historical development and overview, *Journal of Chromatography A*, 885, 3-16.
- Logrieco, A., Mule G., Maretti A. ve Giancarlo, P. (2003). Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 645-667.
- Lucci,P., Derrien, D., Alix, F., Pérollier, C.ve Bayoudh, S. (2010). Molecularly Imprinted polymer solid-phase extraction for detection of zearalenone in cereal sample extracts, *Analytica Chimica Acta*, 672, 15-19.
- Malik, A.K., Kour, V. ve Verno, N. (2006). A review on solid phase microextraction high performance liquid chromatography as a novel tool for the analysis of toxic metal ions, *Talanta*, 68, 842-849.
- Mashhadizadeh, M.H., Amoli-Diva, M. ve Pourghazi, K. (2013). Magnetic nanoparticles solid phase extraction for determination of ochratoxin A in cereals

- using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography A*, 1320, 17-26.
- Niazi, A., Khorshidi, N. ve Ghaemmaghami, P. (2015). Microwave-assisted of dispersive liquid-liquid microextraction and spectrophotometric determination of uranium after optimization based on Box-Behnken design and chemometrics methods. *Spectrochim Acta A*, 135, 69–75.
- Ohashi, A., Ito, H., Kanai, C., Imura, H. ve Ohashi, K.(2004). Cloud point extraction of iron (III) and vanadium (v) using 8-quinolinol derivatives and triton X-100 and determination of  $10^{-7}$  mol.dm<sup>-3</sup> level iron (III) in riverine water reference by a graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Talanta* 5, 1-6.
- Olariu, R.I., Viane, D., Gimberg, N. ve Arsene, C. (2010). Sample preparation for trace analysis by chromatographic methods. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33,1174-1207.
- Özdemir, S., Varlıkl, C., Öner, İ., Ocakoğlu, K. ve İçli, S. (2010). The synthesis of 1,8-naphthalimid groups containing imidazolium salts/ionic liquids using I<sup>+</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, TFSI<sup>-</sup> anions and their photophysical, electrochemical and thermal properties, *Dyes and Pigments*, 86, 206-216.
- Pasinli, T. ve Henden, E. (2013). Solid Phase Extraction of Zearalenone (ZEN) from Beer samples using natural zeolite clinoptilolite and organo-zeolites prior to HPLC determination, *Ekoloji* 22 (89), 57-66.
- Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseini, M.R.M., Aghaee, E., Ahmadi, F. ve Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *Journal of Chromatography A*, 1116 (1-2), 1–9.

- Sabuncuoğlu, S.A. (2008). Mikotoksinler: Toksik etkileri, degradasyonları, oluşumlarının önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması, *Hacattepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 28 (1), 6392.
- Sarafraz-Yazdi, A. ve Amiri, A. (2010). Liquid phase microextraction, *Trends in Analytical Chemistry*, 29 (1), 1-14.
- Seddon, K. R., Stark, A. ve Torres, M. J. (2000), Influence of chloride, water, andorganic solvents on the physical properties of ionic liquids, *Pure Applied Chemistry*, 72 (12), 2275–2287.
- Suttajit, M. (2000). Prevention and Control of Mycotoxins. *FAO Document Catalogue Accession No: 329418*.
- Tanaka, T., Hasegawa, A., Yamamoto, S., Li, U.-S., Sugiura, Y. ve Ueno, Y., (1988). World wide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol andzearalenone. 1. *Survey of 19 countries. J. Agricultural Food Chemistry*,36, 979–983.
- Tunail, N. (2000). *Funguslar ve mikotoksinler, Gıda Mikrobiyolojisi ve uygulamaları*, (Genişletilmiş 2. Baskı); Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Sim Matbaası, Ankara
- Quina, F. H. ve Hinze, W. L. (1999). Surfactant-mediated cloud point extractions: an environmentally benign alternative separation approach, *Industrial &Engineering Chemistry Research*, 38 (11), 4150-4168.
- Urraca, J.L., Marazuela, M. D. ve Moreno-Bondi, M.C. (2006). Molecularly imprinted polymers applied to the clean-up of zearalenone and alpha-zearalenol from cereal and swine feed sample extracts, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385 (7), 1155–1161.

- Van Egmond, H.P. (1993). Rationale for regulatory programmes for mycotoxins in human foods and animal feeds. *Food Additive Contaminants* 10 (1) 29-36.
- Wang, J. ve Chen, C., (2009). Biosorbent for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, 27, 195-226.
- Weidenbörner, M. (2001). *Encyclopaedia of food mycotoxins*. Berlin: Springer-Verlag.
- Welton, T. (1999). Room-temperature ionic liquids. solvents for synthesis and catalysis, *Chemical Reviews*, 99, 2071-2083.
- Yashin, Y.I. ve Yashin, A.Y. (2012). Y. Pico, (Ed.), *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications* (1. Baskı) (285-304). Amerika: Elsevier Inc.
- Zafer, C., Ocakoğlu, K., Özsoy, C. ve İçli, S. (2009). Dicationic bis-imidazolium molten salts for efficient dye sensitized solar cells: Synthesis and photovoltaic properties, *Electrochimica Acta*, 54, 5709-5714.
- Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debegnach, F., Angelini, S. ve diğer. (2006). Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco, *Food Control*, 17, 868-874.
- Zhao, R., Wang, X., Li, F., Wang, S., Zhang, L. ve Cheng, C. (2011). Ionic liquid/ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction, *Journal of Separation Science*, 34 (7), 830-836.
- Zollner, P. ve Mayer-Helm, B. (2006). Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1136, 123-169.