

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOBALT, BAKIR, KROM VE PARABENLERİN ESER SEVİYEDE
TAYİNLERİNE YÖNELİK ANALİTİK YAKLAŞIMLARIN
GELİŞTİRİLMESİ

Tuğçe UNUTKAN GÖSTERİŞLİ

DOKTORA TEZİ

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimya Mühendisliği Programı

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Seyfullah KEYF

Eş Danışman

Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE

Mayıs, 2022

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOBALT, BAKIR, KROM VE PARABENLERİN ESER SEVİYEDE
TAYİNLERİNE YÖNELİK ANALİTİK YAKLAŞIMLARIN
GELİŞTİRİLMESİ

Tuğçe UNUTKAN GÖSTERİŞLİ tarafından hazırlanan tez çalışması 11.05.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Kimya Mühendisliği Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Seyfullah KEYF
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE
Yıldız Teknik Üniversitesi
Eş danışman

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Seyfullah KEYF, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Yavuz SALT, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Durişehvar ÖZER ÜNAL, Üye

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Doç. Dr. Fatma TURAK, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ, Üye

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Danışmanlarım Dr. Öğr. Üyesi Seyfullah KEYF ve Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE sorumluluğunda tarafımda hazırlanan Kobalt, Bakır, Krom ve Parabenlerin Eser Seviyede Tayinlerine Yönelik Analitik Yaklaşımların Geliştirilmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Tuğçe UNUTKAN GÖSTERİŞLİ

İmza

TEŞEKKÜR

Engin bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, bana zamanını ayırıp büyük bir ilgiyle elinden gelenin fazlasını sunan, bir sorun yaşadığımda yanına tereddüt etmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini her zaman hissettiğim kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Seyfullah KEYF'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bilgi ve donanımıyla bu yoldaki gelişimime ışığıyla yol açan, deneysel çalışmalarım için uygun ortam sağlayan, karşılaştığım zorluklar karşısında çözüm odaklı yaklaşımıyla beni cesaretlendiren, akademik hayattaki başarısıyla bize her zaman örnek olan kıymetli eş danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans ve doktora öğrenimimiz boyunca her zorluğa birlikte göğüs gerdiğimiz, iş arkadaşılığımızdan öte can dostum Elif Seda KOÇOĞLU'na tüm destekleri için çok teşekkür ederim.

Dostluğuyla her zaman yanımda olan, zorluklar karşısında beni teşvik eden, hayatım boyunca yanımda olacağına inandığım dostum Büşra Tışlı'ya teşekkür ederim.

Tez yazım sürecim boyunca her ihtiyacımda yanımda olan değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Ömer Faruk KARAASLAN ve Öğr. Gör. İlkey ŞENEL'e tüm destekleri ve değerli katkıları için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen, bu zorlu süreçte desteklerini her zaman hissettiğim Buse Tuğba ZAMAN, Tülay BORAHAN, İrem Zehra KUBLAY, Sude OFLU, Yağmur KILINÇ ve Bakırdere Research Group ailesine teşekkür ederim.

Bana bu zorlu süreçte her türlü sabrı ve fedakârlığı gösteren, her zaman her koşulda ve aldığım her kararda bana desteğini esirgemeyen ve beni her daim cesaretlendiren yol arkadaşım sevgili eşim Gökhan GÖSTERİŞLİ'ye çok teşekkür ederim.

Bugünün yaşanmasında en çok payı olan, hayatımın tüm evrelerinde olduğu gibi tez çalışmam boyunca da benden desteğini esirgemeyen, bana inanan, yanımda olduklarını her zaman hissettiğim canım ailem, babam Ali UNUTKAN, annem Aysel UNUTKAN ve can parçam biricik kardeşim Yağmur UNUTKAN'a sonsuz teşekkürler.

Tuğçe UNUTKAN GÖSTERİŞLİ

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xvii
ÖZET	xxi
ABSTRACT	xxiii
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	3
1.3 Hipotez.....	4
2 GENEL BİLGİLER	6
2.1 Organik/İnorganik Kirleticiler	6
2.1.1 Endokrin Bozucu Bileşikler	7
2.1.2 Parabenler	10
2.1.3 Ağır Metaller	19
2.2 Enstrümantal Analiz Yöntemleri	26
2.2.1 Kromatografik Yöntemler	26
2.2.2 Spektroskopik Yöntemler	39
2.2.3 Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometresi.....	41
2.2.4 Dijital Görüntü Tabanlı Kolorimetri	47
2.3 Numune Ön İşlemleri	49
2.3.1 Ekstraksiyon Teknikleri	51
2.3.2 Mikroekstraksiyon Teknikleri	52
2.3.3 Dağıtıcı Sıvı Sıvı Mikroekstraksiyon.....	53
2.3.4 Çift Şırınga Esaslı Basınçlı Sıvı Faz Mikroekstraksiyon	55
2.4 Metot Validasyonu.....	59
3 MALZEME VE YÖNTEMLER	61
3.1 Kobaltın Otomasyon Sistemi ile Çift Şırınga Esaslı Sıvı Faz Mikroekstraksiyonu Sonrası Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometresi ile Eser Seviyelerde Tayini	61
3.1.1 Kimyasallar	61
3.1.2 Cihazlar	63

3.1.3	Deneysel Prosedürler.....	64
3.2	Metalik Elek Bağlantılı Çift Şırınga Esaslı Sıvı Faz Mikro-Ekstraksiyon ile Bakırın Zeytin Yapraklarında Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometresi ile Tayini.....	68
3.2.1	Kimyasallar	68
3.2.2	Cihazlar	68
3.2.3	Deneysel Prosedürler.....	68
3.3	Beş Paraben'in Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon Yöntemi ile Ruj Örneklerinde Eser Seviyelerde Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Eşzamanlı Olarak Belirlenmesi	71
3.3.1	Kimyasallar	71
3.3.2	Cihazlar ve Kromatografik Şartlar	72
3.3.3	Deneysel Prosedürler.....	73
3.4	HPLC-UV ve Dijital Görüntü Tabanlı Kolorimetrik Tayin Yöntemi ile Cr(VI)'nın Belirlenmesi İçin Bir Çift Görüntüleme Yönteminin Geliştirilmesi.....	75
3.4.1	Kimyasallar	75
3.4.2	Cihazlar ve Kromatografik Şartlar	76
3.4.3	Deneysel Prosedürler.....	76
4	DENEYSEL ÇALIŞMALAR	79
4.1	Kobaltın Otomasyon Sistemi İle Çift Şırınga Esaslı Sıvı Faz Mikroekstraksiyonu Sonrası Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometresi ile Eser Seviyelerde Tayini.....	79
4.1.1	Optimizasyon Çalışmaları.....	79
4.1.2	Sistem Analitik Performansının Belirlenmesi	97
4.1.3	Geri Kazanım Çalışmaları	101
4.2	Metalik Elek Bağlantılı Çift Şırınga Esaslı Sıvı Faz Mikro-Ekstraksiyon ile Bakırın Zeytin Yapraklarında Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometresi İle Tayini.....	102
4.2.1	Optimizasyon Çalışmaları.....	102
4.2.2	Sistem Analitik Performansının Belirlenmesi	115
4.2.3	Geri Kazanım ve Gerçek Örnek Çalışmaları.....	118
4.3	Beş Paraben'in Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon Yöntemi ile Ruj Örneklerinde Eser Seviyelerde Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Eşzamanlı Olarak Belirlenmesi	119
4.3.1	Optimizasyon Çalışmaları.....	120
4.3.2	Sistem Analitik Performansının Belirlenmesi	129
4.3.3	Gerçek Örnek Çalışmaları	134

4.4	HPLC-UV ve Dijital Görüntü Tabanlı Kolorimetrik Tayin Yöntemi ile Metalik Elek Bağlantılı Çift Şırınga Sistemi Destekli Cr(VI)'nın Belirlenmesi İçin Bir Çift Görüntüleme Yönteminin Geliştirilmesi.....	135
4.4.1	Optimizasyon Çalışmaları.....	136
4.4.2	Sistem Analitik Performansı.....	142
4.4.3	Geri Kazanım Çalışmaları	147
5	SONUÇ VE ÖNERİLER	156
	KAYNAKÇA	159
	TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	186

SİMGE LİSTESİ

w	Ağırlık
Ka	Asit ayrışma sabiti
Cu	Bakır
$\pm$	Belirsizlik
dk	Dakika
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
dw	Desiwatt
D ₂	Döteryum
g	Gram
v	Hacim
K	Kelvin
kg	Kilogram
Co	Kobalt
R ²	Korelasyon Katsayısı
Cr	Krom
<	Küçüktür
L	Litre
M Ω	Megaohm
m	Metre
μ g	Mikrogram
μ M	Mikromolar
mA	Miliamper
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre

mM	Milimolar
M	Molar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
sa	Saat
°C	Santigrad derece
s	Saniye
cm	Santimetre
V	Volt
W	Watt
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

AAS	Atomik Absorpsiyon Spektrofotometrisi
AAAS	Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrofotometrisi
ACN	Asetonitril
ADI	Kabul Edilebilir Günlük Alım
AES	Atomik Emisyon Spektroskopisi
BeP	Benzilparaben
BSS	Bağıl Standart Sapma
BuP	Bütilparaben
CE	Kapiler Elektroforez
CMYK	Ciano, Macenta, Sarı ve Siyah
CV	Değişkenlik Katsayısı
CVG-AAS	Kimyasal Buhar Oluşturma Atomik Absorpsiyon Spektrometrisi
ÇŞE-BSFME	Çift Şırınga Esaslı Basınçlı Sıvı Faz Mikroekstraksiyon
DDT	Dikloro Difenil Trikloroetan
DIC	Dijital Görüntü Tabanlı Kolorimetri
DPC	Difenilkarbazid
DSSME	Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon
EDP	Tespit Gücünde İyileştirme
EDSP	Endokrin Bozucu Tarama Programı
ETAAS	Elektrotermal Atomizasyon Atomik Absorpsiyon Spektrometrisi
EtP	Etilparaben
FL	Atomik Floresan Spektrofotometrisi
GC	Gaz Kromatografisi
GC-FID	Gaz Kromatografi-Alev İyonizasyon Dedektörü

GFAA	Grafit Fırın Atomik Absorpsiyon
GL	Gözlenebilme Limiti
GRAS	Genel Olarak Güvenli Olarak Kabul Edilen
HELC	Yüksek Verimli Sıvı Kromatografisi
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
HP-SEC	Yüksek Performanslı Moleküler Eleme Kromatografisi
HSLC	Yüksek Hızlı Sıvı Kromatografisi
HSV	Ton, Doygunluk Ve Parlaklık
ICP-MS	Endüktif Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometrisi
ICP-OES	Endüktif Eşleştirilmiş Plazma-Optik Emisyon Spektroskopisi
IOM	Tıp Enstitüsü
KFE	Katı Faz Ekstraksiyonu
KFME	Katı Fazlı Mikro Ekstraksiyon
LC	Sıvı Kromatografisi
MEB	Metalik Elek Bağlantılı
MeP	Metilparaben
MRL	Maksimum Kalıntı Limitleri
MS	Kütle Spektrometresi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
OECD	Avrupa Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
OS	Otomasyon Sistemi
PF	Ön Deriştirme Faktörü
PHBA	P-Hidroksibenzoik Asit
PrP	Propilparaben
RGB	Kırmızı, Yeşil ve Mavi
RI	Kırılma İndeksi

SFME	Sıvı Fazlı Mikroekstraksiyon
SSE	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu
TL	Tayin Limiti
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
US EPA	Abd Çevre Koruma Ajansı
UV-Vis	Ultraviyole Görünür
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 HPLC sisteminin şematik diyagramı [197]	32
Şekil 2.2 Tipik bir HPLC cihazının ayrıntılı görünümü [199]	33
Şekil 2.3 AAS'nin Walsh tarafından yapılmış bir tasarımı [222]	40
Şekil 2.4 AAAS şematik diyagramı	42
Şekil 2.5 Oyuklu katot lambasına ait gösterim	43
Şekil 2.6 Nebulizatör şematik görünümü [232]	44
Şekil 2.7 DSSME'nin şematik gösterimi [301]	54
Şekil 2.8 Plastik filtre bağlantılı çift şırınga esaslı basınçlı sıvı faz mikroekstraksiyon sistemi [310]	57
Şekil 2.9 Metalik elek bağlantılı çift şırınga esaslı basınçlı sıvı faz mikroekstraksiyon sistemi [310]	57
Şekil 2.10 Otomasyon sistemi ile plastik elek bağlantılı OS-ÇŞE-BSFME sisteminin önden görünümü [306]	58
Şekil 2.11 Otomasyon sistemi ile plastik elek bağlantılı ÇŞE-BSFME sisteminin arkadan görünümü	58
Şekil 2.12 Otomasyon sistemi ile metalik elek bağlantılı OS-ÇŞE-BSFME sisteminin arkadan görünümü	59
Şekil 3.1 (Z)-3-bromo-5-(((4-hidroksifenil)imino)fenol kimyasal yapısı	64
Şekil 3.2 Co-OS-ÇŞE-BSFME prosedürünün şematik gösterimi	66
Şekil 3.3 [2 - (((E) -2 - (((E) -2-hydroxybenzylidene) amino) benzylidene) amino)] kimyasal yapısı [322]	69
Şekil 3.4 Metalik elek bağlantısı [315]	70
Şekil 3.5 DSSME-HPLC-UV sisteminin şematik gösterimi	73
Şekil 3.6 Dijital görüntülerin elde edilmesi için kullanılan sistemin şematik gösterimi	77

Şekil 4.1 Ligandlara ait pH 3.0, pH 7.0 ve pH 10'daki absorbands değerleri	82
Şekil 4.2 Tampon pH'ının absorbands sinyali üzerindeki etkisi	84
Şekil 4.3 Tampon miktarının absorbands sinyali üzerindeki etkisi	85
Şekil 4.4 Ligand derişiminin absorbands sinyali üzerindeki etkisi	87
Şekil 4.5 Ligand miktarının absorbands sinyali üzerindeki etkisi	88
Şekil 4.6 Kompleksleşme sonrası karıştırma süresinin absorbands sinyali üzerindeki etkisi.....	89
Şekil 4.7 Ekstraksiyon çözücü türünün absorbands sinyali üzerindeki etkisi	91
Şekil 4.8 Ekstraksiyon çözücü miktarının absorbands sinyali üzerindeki etkisi	92
Şekil 4.9 Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresinin absorbands sinyali üzerindeki etkisi.....	93
Şekil 4.10 Eluent türünün absorbands sinyali üzerindeki etkisi.....	95
Şekil 4.11 Eluent derişiminin absorbands sinyali üzerindeki etkisi	96
Şekil 4.12 Eluent miktarının absorbands sinyali üzerindeki etkisi	97
Şekil 4.13 Kobalt tayininde optimum koşullar altında AAAS kalibrasyon eğrisi....	99
Şekil 4.14 Kobalt tayininde optimum koşullar altında AAAS kalibrasyon doğrusu	99
Şekil 4.15 Kobalt tayininde optimum koşullar altında OS-ÇŞE-BSFME-AAAS kalibrasyon eğrisi	100
Şekil 4.16 Kobalt tayininde optimum koşullar altında OS-ÇŞE-BSFME-AAAS kalibrasyon doğrusu	100
Şekil 4.17 Tampon pH'ının absorbands sinyali üzerindeki etkisi	104
Şekil 4.18 Tampon miktarının absorbands sinyali üzerindeki etkisi	105
Şekil 4.19 Ligand miktarının absorbands sinyali üzerindeki etkisi.....	107
Şekil 4.20 Kompleksleşme sonrası karıştırma süresinin absorbands sinyali üzerindeki etkisi.....	108
Şekil 4.21 Ekstraksiyon çözücü türünün absorbands sinyali üzerindeki etkisi	109

Şekil 4.22 Ekstraksiyon çözücü miktarının absorbands sinyali üzerindeki etkisi..	111
Şekil 4.23 Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresinin absorbands sinyali üzerindeki etkisi.....	112
Şekil 4.24 Eluent derişiminin absorbands sinyali üzerindeki etkisi	114
Şekil 4.25 Eluent miktarının absorbands sinyali üzerindeki etkisi	115
Şekil 4.26 Bakır tayininde optimum koşullar altında AAAS kalibrasyon doğrusu	117
Şekil 4.27 Bakır tayininde optimum koşullar altında MEB-ÇŞE-BSFME-AAAS kalibrasyon doğrusu	118
Şekil 4.28 Mobil fazda tampon pH'ı değişimi ile elde edilen kromatogram (<i>Standart derişimi: 4.0 mg kg⁻¹, Mobil faz: %Amonyum format (50 mM) /ACN: %60/40, Akış hızı: 1.2 mL dk⁻¹, Enjeksiyon hacmi: 40 µL</i>).....	123
Şekil 4.29 Mobil fazda tampon derişiminin değişimi ile elde edilen kromatogram (<i>Standart derişimi: 4.0 mg kg⁻¹, Mobil faz: %Amonyum format (pH 4.0) /ACN: %60/40, Akış hızı: 1.2 mL dk⁻¹, Enjeksiyon hacmi: 40 µL</i>).....	124
Şekil 4.30 Mobil faz akış hızının değişimi ile elde edilen kromatogram (<i>Standart derişimi: 4.0 mg kg⁻¹, Mobil faz: %Amonyum format (50 mM, pH 4.0) /ACN: %60/40, Enjeksiyon hacmi: 40 µL</i>)	124
Şekil 4.31 Enjeksiyon hacmi değişimi ile elde edilen kromatogram (<i>Standart derişimi: 4.0 mg kg⁻¹, Mobil faz: %Amonyum format (50 mM, pH 4.0) /ACN: %60/40, Akış hızı: 1.2 mL dk⁻¹</i>).....	125
Şekil 4.32 Uygun kromatografik koşullar altında beş parabene ait elde edilen kromatogram.....	126
Şekil 4.33 Ekstraksiyon çözücü türü için elde edilen kromatogram (<i>Standart derişimi: 1.0 mg kg⁻¹, Ekstraksiyon çözücü miktarı: 300 µL, Dağıtıcı çözücü türü/miktarı: Etanol/2.0 mL</i>)	127
Şekil 4.34 Ekstraksiyon çözücü miktarı için elde edilen kromatogram (<i>Standart derişimi: 1.0 mg kg⁻¹, Ekstraksiyon çözücü türü: 1.2-dikloroetan, Dağıtıcı çözücü türü/miktarı: Etanol/2.0 mL</i>)	128

Şekil 4.35 Dağıtıcı çözücü türü için elde edilen kromatogram (<i>Standart derişimi: 1.0 mg kg⁻¹, Ekstraksiyon çözücü türü/miktarı: 1.2-dikloroetan/250 µL, Dağıtıcı çözücü miktarı: 2.0 mL</i>)	128
Şekil 4.36 Dağıtıcı çözücü miktarı için elde edilen kromatogram (<i>Standart derişimi: 1.0 mg kg⁻¹, Ekstraksiyon çözücü türü/miktarı: 1.2-dikloroetan/250 µL, Dağıtıcı çözücü türü: İzopropil alkol</i>).....	129
Şekil 4.37 Optimum koşullar altında 25, 50 ve 100 µg kg ⁻¹ derişimlerindeki parabenlere ait kromatogramlar	130
Şekil 4.38 MeP için optimum koşullar altında elde edilen kalibrasyon doğrusu..	132
Şekil 4.39 EtP için optimum koşullar altında elde edilen kalibrasyon doğrusu....	132
Şekil 4.40 PrP için optimum koşullar altında elde edilen kalibrasyon doğrusu ...	133
Şekil 4.41 BuP için optimum koşullar altında elde edilen kalibrasyon doğrusu ..	133
Şekil 4.42 BeP için optimum koşullar altında elde edilen kalibrasyon doğrusu...	134
Şekil 4.45 0.50, 2.0 ve 5.0 mg L ⁻¹ derişimlerinde hazırlanmış Cr (IV)-DPC kompleksine ait kromatogram	136
Şekil 4.46 Tampon pH'nın kompleks oluşumu üzerindeki etkisi	138
Şekil 4.47 Tampon miktarının pik alanı üzerindeki etkisi.....	139
Şekil 4.48 Ligand derişiminin pik alanı üzerindeki etkisi.....	140
Şekil 4.49 Ligand miktarının pik alanı üzerindeki etkisi.....	141
Şekil 4.50 Kompleksleşme sonrası karıştırma süresinin pik alanı üzerindeki etkisi	142
Şekil 4.51 Optimum koşullar altında 10-500 µg/L derişim aralığında Cr (VI)-DPC kompleksine ait kromatogram	143
Şekil 4.52 Cr (VI)-DPC kompleksi için optimum koşullar altında HPLC-UV sisteminde elde edilen kalibrasyon doğrusu	144
Şekil 4.53 Cr (VI)-DPC kompleksi için optimum koşullar altında HPLC-UV sisteminde elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	144
Şekil 4.54 Cr (VI)-DPC kompleksinin artan derişim ile birlikte renk değişimi.....	145

Şekil 4.55 Cr (VI)-DPC kompleksi için optimum koşullar altında DIC sisteminde elde edilen kalibrasyon doğrusu	146
Şekil 4.56 Cr (VI)-DPC kompleksi için optimum koşullar altında DIC sisteminde elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	146
Şekil 4.57 HPLC-UV sistemi ile elde edilen standart kalibrasyon doğrusu	150
Şekil 4.58 Musluk suyunda HPLC-UV sistemi ile elde edilen kalibrasyon doğrusu	150
Şekil 4.59 Nehir suyunda HPLC-UV sistemi ile elde edilen kalibrasyon doğrusu	151
Şekil 4.60 Atık suda HPLC-UV sistemi ile elde edilen kalibrasyon doğrusu	151
Şekil 4.61 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ derişiminde standart ve su örnekleri için elde edilen kromatogram.....	152
Şekil 4.62 DIC sistemi ile elde edilen standart kalibrasyon doğrusu	153
Şekil 4.63 Musluk suyunda DIC sistemi ile elde edilen kalibrasyon doğrusu	154
Şekil 4.64 Nehir suyunda DIC sistemi ile elde edilen kalibrasyon doğrusu.....	154
Şekil 4.65 Atık suda DIC sistemi ile elde edilen kalibrasyon doğrusu	155
Şekil 4.66 200, 500 ve 750 $\mu\text{g L}^{-1}$ derişimlerde tüm su örneklerinde oluşan renk gösterimi	155

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Parabenlerin kimyasal yapıları ve özellikleri [89].....	12
Tablo 2.2 Kozmetik ürünlerde kullanılmasına izin verilen koruyucuların listesi [112]	17
Tablo 2.3 Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması [173]	28
Tablo 2.4 Yaygın enstrümantal yöntemler ve analiz öncesi gerekli numune hazırlama adımları [276].....	50
Tablo 3.1 Kobalt tayini için çalışma boyunca kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçları.....	61
Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan tampon çözeltileri ve hazırlanışları.....	62
Tablo 3.3 Kobalt tayini için çalışma boyunca kullanılan laboratuvar alet ve cihazları	63
Tablo 3.4 Ayva örneklerine uygulanan mikrodalga çözünürleştirme işlemine ait sıcaklık programı	67
Tablo 3.5 Parabenlerin tayini için çalışma boyunca kullanılan laboratuvar alet ve cihazlar.....	72
Tablo 3.6 Çalışmada kullanılan tampon çözeltileri ve hazırlanışları.....	75
Tablo 4.1 Test edilen Schiff baz ligand kimyasal isimleri ve laboratuvar kodları	81
Tablo 4.2 Kompleks oluşumu için uygun ligandı seçme optimizasyonunda kullanılan başlangıç parametreleri.....	81
Tablo 4.3 Tampon pH'ını belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	83
Tablo 4.4 Tampon miktarını belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	84
Tablo 4.5 Ligand derişimini belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	86

Tablo 4.6	Ligand miktarını belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	87
Tablo 4.7	Kompleksleşme sonrası karıştırma süresini belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler	89
Tablo 4.8	Ekstraksiyon çözücü türünü belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	90
Tablo 4.9	Ekstraksiyon çözücü türünü miktarını optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	91
Tablo 4.10	Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresinin optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	93
Tablo 4.11	Eluent türü optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	94
Tablo 4.12	Eluent derişim optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	95
Tablo 4.13	Eluent miktar optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	96
Tablo 4.14	OS-ÇŞE-BSFME-AAAS metoduna ait optimum parametreler	98
Tablo 4.15	Optimum koşullar altında sistemlere ait analitik performans değerleri	98
Tablo 4.16	Ayva örneklerine spike edilmiş farklı kobalt derişimleri için hesaplanan yüzde geri kazanım sonuçları	101
Tablo 4.17	Tampon pH'ını belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	103
Tablo 4.18	Tampon miktarını belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	104
Tablo 4.19	Ligand miktarını belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	106
Tablo 4.20	Kompleksleşme sonrası karıştırma süresini belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	107
Tablo 4.21	Ekstraksiyon çözücü türünü belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	109

Tablo 4.22 Ekstraksiyon çözücü türünü miktarını optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	110
Tablo 4.23 Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresinin optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	111
Tablo 4.24 Eluent derişim optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	113
Tablo 4.25 Eluent miktar optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	114
Tablo 4.26 MEB-ÇŞE-BSFME-AAAS metoduna ait optimum parametreler	116
Tablo 4.27 Optimum koşullar altında sistemlere ait analitik performans değerleri	117
Tablo 4.28 MEB-ÇŞE-BSFME-AAAS yönteminin optimum koşulları altında belirlenen zeytin yaprağı örneklerindeki bakır için tespit edilen kantitatif sonuçlar	119
Tablo 4.29 Zeytin yaprağı ekstraktlarına spike edilmiş farklı bakır derişimleri için hesaplanan yüzde geri kazanım sonuçları.....	119
Tablo 4.30 HPLC sistemine ait başlangıç parametreleri	121
Tablo 4.31 Parabenler için DSSME-HPLC-UV metoduna ait optimum parametreler	130
Tablo 4.32 Optimum koşullar altında çalışılan parabenlere ait analitik performans değerleri	131
Tablo 4.33 Ruj örneklerinde parabenlerin kantitatif tayini.....	135
Tablo 4.34 Tampon pH'ını belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	137
Tablo 4.35 Tampon miktarını belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	138
Tablo 4.36 Ligand derişimini belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	139
Tablo 4.37 Ligand miktarını belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	140

Tablo 4.38	Kompleksleşme sonrası karıştırma süresini belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler.....	142
Tablo 4.39	Optimum koşullar altında Cr (VI)-DPC kompleksine ait analitik performans değerleri	143
Tablo 4.40	Standart eşleme yöntemi ile su örneklerinde spike edilmiş farklı Cr (VI)-DPC kompleks derişimleri için HPLC sisteminde hesaplanan yüzde geri kazanım sonuçları	148
Tablo 4.41	Dış kalibrasyon yöntemi ile su örneklerinde spike edilmiş farklı Cr (VI)-DPC kompleks derişimleri için HPLC sisteminde hesaplanan yüzde geri kazanım sonuçları	149
Tablo 4.42	Dış kalibrasyon yöntemi ile su örneklerinde spike edilmiş farklı Cr (VI)-DPC kompleks derişimleri için hesaplanan yüzde geri kazanım sonuçları	153

Kobalt, Bakır, Krom ve Parabenlerin Eser Seviyede Tayinlerine Yönelik Analitik Yaklaşımların Geliştirilmesi

Tuğçe UNUTKAN GÖSTERİŞLİ

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Seyfullah KEYF

Eş-Danışman: Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE

Bu tez kapsamında, organik/inorganik kirleticilerin eser seviyelerde tayinlerine yönelik yeni analitik stratejilerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Tezin ilk bölümünde, alevli atomik absorpsiyon spektrofotometri (AAAS) sistemi ile eser seviyelerde kobaltın doğru ve hassas bir şekilde tayin edilebilmesi için otomatik karıştırma sistemi kullanılarak plastik elek bağlantılı çift şırınga esaslı basınçlı sıvı faz mikroekstraksiyon (ÇŞE-BSFME) yöntemi geliştirilmiştir. Optimize edilmiş deneysel ve enstrümantal koşullar altında gözlenebilme limiti (GL) ve tayin limiti (TL) 1.8 ve 6.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Spike edilmiş ayva örnekleri için %91.0–98.7 aralığındaki geri kazanım sonuçları, önerilen yöntemin böyle karmaşık bir matrikste kobalt tayini için uygulanabilirliğini göstermiştir.

Tezin ikinci bölümünde, bakırın ekstraksiyonu ve zenginleştirilmesi için metalik elek bağlantılı (MEB) ÇŞE-BSFME olarak adlandırılan ve analitin eser seviyelerde tayini için AAAS ile birleştirilen yeni ve verimli bir yöntem önerilmiştir. GL/TL değerleri optimum şartlar altında 1.5/5.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Zeytin yaprağı örnekleri, yöntemin doğruluğunu ve gerçek örneklerle uygulanabilirliğini belirlemek

için analiz edilmiş ve ölçülen bakır miktarları 0.75-8.06 mg kg⁻¹ aralığında bulunmuştur.

Tezin nc bölümünde, yüksek başınlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile ruj örneklerinde parabenlerin belirlenmesi için verimli bir ekstraksiyon yöntemi olarak dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DSSME) kullanılmıştır. Analitler, 50 mM amonyum format zltisi (pH 4.0) ve asetonitrilden (60:40, v/v) oluşan izokratik bir mobil faz sistemi kullanılarak ayrılmıştır. MeP, EtP, PrP, BuP ve BeP için GL değerleri sırasıyla 0.78, 0.75, 0.34, 0.33 ve 0.75 µg kg⁻¹ olarak belirlenmiştir. Ruj rnekleri, yöntemin doğruluğunu ve uygulanabilirliğini belirlemek için gerçek örnek çalışmalarında kullanılmıştır.

Tezin dördüncü bölümünde, farklı su örneklerinde difenilkarbazid ile kompleks oluşturan Cr (VI)'nın tayini için çift görüntülemeli bir tespit sistemi geliştirilmiştir. Otomatik karıştırma sistemi ile MEB-şE-SFME yöntemi, HPLC-UV ve dijital görüntü tabanlı kolorimetri (DIC) sistemleri ile birleştirilmiştir. Her iki sistem için gözlenebilme limitleri sırasıyla 1.72 ve 17.1 µg L⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Atıksu, nehir ve musluk suyunda her iki sistem için yöntemin doğruluğunu/uygulanabilirliğini değerlendirmek amacıyla geri kazanım çalışmaları yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Endokrin bozucu bileşikler, alevli atomik absorpsiyon spektrofotometrisi, yüksek başınlı sıvı kromatografisi, dijital görüntü tabanlı kolorimetri, ift şırınga esaslı başınlı sıvı fazlı mikroekstraksiyon.

Development of Analytical Approaches for the Trace Determination of Cobalt, Copper, Chromium and Parabens

Tuğçe UNUTKAN GÖSTERİŞLİ

Department of Chemical Engineering

PhD. Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Seyfullah KEYF

Co-supervisor: Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE

In this thesis, it was aimed to develop new analytical strategies for the determination of organic/inorganic contaminants at trace levels. In the first part of the thesis, a plastic sieve conducted two syringe-based pressurized liquid-phase microextraction (SCTS-PLPME) method was established with automated mixing system for the accurate and sensitive determination of cobalt at trace levels by flame atomic absorption spectrophotometry (FAAS) system. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values under the optimized experimental and instrumental conditions were determined as 1.8 ve 6.0 $\mu\text{g L}^{-1}$. The recovery results between 91.0–98.7% for spiked quince samples indicated the applicability of the proposed method for cobalt determination in such a complex matrix.

In the second part of the thesis, a new and efficient method called as metallic sieve linked double syringe (MSLDS) LPME was proposed for the extraction and preconcentration of copper and combined with FAAS for the determination of analyte at trace levels. LOD/LOQ values under the optimum conditions were determined as 1.5/5.1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Olive leaf samples were analyzed to ascertain the

method's accuracy and applicability to real samples and the copper amounts were found in the range of 0.75-8.06 mg kg⁻¹.

In the third part of the thesis, dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) was employed as an efficient extraction method for the determination of parabens in lipstick samples by high pressure liquid chromatography (HPLC). The analytes were separated using an isocratic mobile phase system composed of 50 mM ammonium formate solution (pH 4.0) and acetonitrile (60:40, v/v). The respective LOD values of MeP, EtP, PrP, BuP and BeP were determined to be 0.78, 0.75, 0.34, 0.33 and 0.75 µg kg⁻¹, respectively. Real sample studies were performed to validate the accuracy and applicability of the method using lipstick samples.

In the fourth part of the thesis, double-monitoring detection system was developed to measure the Cr (VI) after complexation with diphenylcarbazide in different water samples. MSLDS-LPME method with automated mixing system was coupled to HPLC-UV and digital image based colorimetry (DIC) systems. The detection limits were calculated for both systems as 1.72 and 17.1 µg L⁻¹, respectively. Recovery studies were conducted to evaluate the accuracy/applicability of the method for both systems in wastewater, river and tap water samples.

Keywords: Endocrine disrupting compounds, flame atomic absorption spectrophotometry, high pressure liquid chromatography, digital image colorimetry, two syringe based pressurized liquid-phase microextraction.

1.1 Literatür Özeti

Endokrin bozucu bileşikler son yıllarda bilim camiasının dikkatini çekmektedir. İnsanlarda artan endokrin kaynaklı hastalıklar, yaban hayatında, balıklarda ve ekosistemlerde meydana gelen değişiklikler ve hayvanlar üzerinde yapılan laboratuvar deneyleri ile yaban hayatı ve insanlar üzerindeki olumsuz etkilerinin kanıtlanması zamanla daha da önem kazanmaktadır [1, 2]. Bu değişikliklerden bazıları; cinsiyet değişiklikleri [3], balıkların üremesinde anormalliklere neden olan feromon üretiminde azalma, kuşlarda cinsiyet değişimi [4], genital yol anormallikleri, doğurganlık kusurları [5], kansere yatkınlık, lösemi ve tümör oluşumu [6] ve insanlarda azalmış bağışıklık fonksiyonu [7] olarak özetlenebilmektedir.

Bu tez kapsamında farklı analit grupları ile çalışılmıştır. Bu analit gruplarından biri olan parabenler, p-hidroksibenzoik asidin esterleridir ve kozmetik formülasyonlarda yaygın bir şekilde koruyucu olarak kullanılmaktadır [8]. Metil paraben, etil paraben, propil paraben, bütül paraben ve benzil paraben yaygın olarak kullanılan parabenlerdir [9]. Şu an için parabenlerin gıda, kozmetik, kişisel bakım ürünleri, içecekler, ambalaj malzemeleri, sigaralar, hayvan yemi vb. dahil olmak üzere çok çeşitli maddelerde evrensel olarak mevcut olduğu kanıtlanmıştır. Parabenler, mikrobiyal kontaminasyonu ve aktif bileşenin bozulmasını önlemek için farmasötiklerde ekspanyanlar olarak kullanılmaktadır. Sadece kozmetiklerde parabenler en az 22.000 üründe bulunmaktadır [10]. Ticari ürünlerde yaygın olarak kullanılmaları nedeniyle atık sulara, çevresel katı numunelerde, ev tozunda, kanalizasyon çamurunda, toprakta, sulara ve havada parabenlerin varlığı çok sayıda çalışma ile belgelenmiştir [11-14]. Doğal olarak bu gerçek, çevreye sürekli paraben girmesine yol açan antropojenik faaliyetlerle doğrudan bağlantılıdır. Sonuç olarak parabenler, sindirim sistemi, solunum sistemi ve çeşitli ürünlerin dermal

uygulamasý gibi insan vücutuna birçok yoldan ve kaynaktan nüfuz edebilmektedir. Bu durum, birçok farklı insan biyolojik matrisinde parabenlerin varlığını gösteren çok sayıda çalışma ile kanıtlanmıştır [15]. İnsan tüketimine yönelik ürünlerde bu koruyucuların belirlenmesi hem kalite kontrol hem de tüketici menfaati ve korunması açısından önemlidir [16]. Spektrofotometri [17], gaz kromatografisi (GC) [18], yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) [19] ve kapiler elektroforez (CE) [20] dahil olmak üzere parabenlerin belirlenmesi için çeşitli analitik yöntemler literatürde geliştirilmiştir.

Ağır metaller, nispeten yüksek yoğunluğa sahip metalik elementler olarak bilinmektedir. Birçok çevresel ve küresel halk sağlığı sorunu, son zamanlarda bu metaller tarafından çevre kirliliğine atfedilmiştir. Metallerin imalat, çiftçilikte, evsel ve teknolojik uygulamalarda kullanımı katlanarak artmıştır. Ağır metaller, dünya yüzeyinde doğal olarak oluşan elementler olsa da, çevresel kontaminasyon ve insan maruziyetinin büyük bir kısmı madencilik ve eritme işlemleri, endüstriyel ürünler, evsel kullanım ve metal içeren tarımsal kullanım gibi antropojenik faaliyetlerden kaynaklanmaktadır [21]. Yer kabuğundaki ağır metallerin ve tuzların varlığını ortadan kaldırmak neredeyse imkansızdır. Yok edilemezler ancak insan vücudunda sadece küçük faydalı boyutlara indirgenebilirler [22]. Biyolojik döngülerin normal gelişimi için küçük miktarlarda birçok ağır metal gereklidir, ancak yüksek konsantrasyonlarda toksiktir. Çinko, demir, bakır, krom ve kobalt gibi eser elementler olarak adlandırılan bu metaller vücut için gereklidir ancak fizyolojik konsantrasyondan daha fazla miktarının toksik yan etkileri olduğu bilinmektedir [23]. Cr (III) ve Cr (VI), krom (Cr)'un ana formlarıdır [24]. Kromun toksisitesi, mevcut değerlik durumu ile ilgilidir. Araştırmalar, farklı değerlik durumlarına sahip kromun toksisitesinin büyük ölçüde değiştiğini göstermektedir [25]. Düşük konsantrasyonlarda üç değerlikli krom, lipid metabolizması gibi hayati işlevler için gerekli olduğundan insan organizması için gerekli kabul edilmektedir [26] ve Cr (VI)'dan daha az toksiktir [27]. Altı değerlikli krom toksiktir, Grup 1 kanserojendir ve insan sağlığına zararlıdır [26]. Arsenik, kurşun, kadmiyum ve cıva gibi insan ve diğer canlılar için eser düzeyde bile çok toksik olan başka bir ağır metal grubu daha vardır [23]. Toksik elementler, insan ve hayvan vücudunda kalıcı olma eğilimleri nedeniyle, uzun süre tüketildiğinde düşük konsantrasyonlarda bile oldukça tehlikeli olabilmektedir [28]. Toksisiteleri, büyüme ve gelişmede sinir sistemi gecikmesi,

kanser ve organ hasarları gibi önemli büyük sağlık sorunlarına neden olabilmekte ve sonunda ölüme yol açabilmektedir [29, 30]. Bu metallerin neden olduğu çevresel kirlilik, özellikle hamilelikte ve çocukluk döneminden sonra insan sağlığı ve sürdürülebilir kalkınma ve dolayısıyla genel olarak ekosistemin gelişimi için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır [29]. Ağır metal tayininde kullanılan teknikler, atomik floresan spektrofotometrisi (FL) [31], endüktif eşleşmiş plazma-optik emisyon spektroskopisi (ICP-OES) [32], endüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometrisi (ICP-MS) [33], atomik absorpsiyon spektrofotometrisi (AAS) [34], UV-Vis spektrofotometrisi [35] ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) [36] gibi analitik tekniklere dayanmaktadır [37]. Bununla birlikte, pahalı enstrümanlar her zaman mevcut değildir ve ölçümlerin genellikle doğrudan yerinde yapılması arzu edilmektedir. Bu nedenle basit, hızlı, ucuz, taşınabilir ve hassas yöntemler yoğun talep görmektedir. Son zamanlarda analitik kimyada hızlı ve basit tayinler için dijital görüntü tabanlı kolorimetri (DIC) olarak adlandırılan bir yöntem de kullanılmaya başlanmıştır [38].

Analitik tayin sistemlerinde numune hazırlama protokolü, matriks etkilerinin azaltılmasına yönelik tedbirler içerdiğinden çok önemli bir role sahiptir [15]. Analitik alandaki önemli teknolojik gelişmelere rağmen, çoğu cihaz henüz karmaşık numune matrikslerini doğrudan işleyememektedir. Sonuç olarak, genellikle analizden önce bir numune hazırlama adımı yer almaktadır [39]. Genel olarak, herhangi bir yöntemde, numune ön işleme en zorlu ve zaman alıcı adımdır. Ek olarak, karmaşık numunelerin ön işleme tabi tutulması, doğru ve tekrarlanabilir verilerin elde edilmesi için anahtardır [15]. Son çalışmalar, yeşil analitik kimya [40, 41] ile uyumlu olarak düşük miktarlarda organik çözücüler, adsorbanlar ve yeşil ekstraksiyon solventleri kullanan yeni analitik stratejiler geliştirmeye odaklanmıştır. Bu kapsamda organik ve inorganik analitlerin tayinine yönelik sıvı faz mikroekstraksiyon [42, 43] ve katı faz mikroekstraksiyon [44, 45] yöntemleri geliştirilmiştir.

1.2 Tezin Amacı

Bu tezin temel amacı, son derece doğru ve hassas analitik yöntemler geliştirerek gıda, çevre ve kozmetik matrikslerinde eser seviyelerde, seçilen organik ve inorganik kirleticileri belirlemektir. Bu amaçla, hedef analitlerin ön deriştirilmesi

için sıvı fazlı mikroekstraksiyon yönteminin farklı uygulamaları kullanılmış ve bu uygulamalar, enstrümanların analitler için yetersiz duyarlılık ve seçiciliğinin üstesinden gelmek için çeşitli enstrümantal sistemlere entegre edilmiştir. Geliştirilen yöntemlerin ana amacı, organik çözücü tüketimini azaltmak veya kullanımını tamamen ortadan kaldırmaktır. Aynı zamanda geliştirilen yöntemler, daha hassas ancak yüksek fiyatlı cihazlar kullanmak yerine, düşük maliyetli ve kullanımı kolay olan AAAS, HPLC, DIC gibi sistemlerle analitlerin doğru ve hassas bir şekilde ölçülmesini sağlamıştır. Önerilen yöntemlerin uygulanabilirliği ve geçerliliği çeşitli örneklerde geri kazanım çalışmaları yapılarak kontrol edilmiş ve yöntemler çok çeşitli gerçek örneklerde uygulanmıştır.

İlk alışma, kobalt için bir n deriştirme aracı olarak üzerinde 6 delik bulunan plastik bir elek bağlantısı kullanılarak otomatik karıştırma sistemi ile çift şınga esaslı basınçlı sıvı fazlı mikroekstraksiyon (ŞE-BSFME) olarak adlandırılan yeni bir sıvı fazlı mikroekstraksiyon yöntemi geliştirilmeyi ve sonrasında alevli atomik absorpsiyon spektrometri (AAAS) sistemi ile tayini amaçlanmıştır.

İkinci çalışmada, zeytin yaprağı örneklerinde bakır tayini için, şıngalar arasındaki ekstraksiyon verimini artırmayı sağlayan filtre geliştirilerek yüzlerce delikli bir filtreye sahip metalik elek kullanılmış ve ŞE-BSFME-AAAS olarak adlandırılan basit, verimli ve evre dostu bir ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiştir.

nc çalışma, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-ultraviyole dedektörü (HPLC-UV) ile metil paraben, etil paraben, propil paraben, bütilparaben ve benzil parabenin eser seviyelerde ruj örneklerinde tespiti için verimli, yeşil, hassas ve basit bir analitik prosedür olan DSSME yöntemini sunmaktadır.

Tez kapsamında yapılan son çalışmada ise, atıksu, nehir ve musluk suyu gibi çeşitli su örneklerinde Cr (VI) tayini, difenilkarbazid ile oluşturduğu kompleks sonrası HPLC-UV ve dijital görüntü tabanlı kolorimetri gibi çift görüntüleme sistemi ile belirlenmiştir.

1.3 Hipotez

Kobalt, bakır, krom ve parabenler de dahil olmak üzere organik ve inorganik kirleticiler, çok düşük derişimlerde bile tüm canlı organizmalar üzerinde zararlı etkileri olan çevresel kirleticilerdir. Bu bağlamda, ortaya çıkan bu kirleticilerin eser

seviyelerinin belirlenmesi, bunların sağlık üzerindeki etkileri ve çevresel kontaminasyonun önlenmesi açısından oldukça önemlidir.

Son yıllarda araştırmacılar, yeşil kimya kavramlarıyla uyumlu olarak, toksik organik çözücülerin tüketimini en aza indiren çevre dostu yöntemlere odaklanmışlardır. Tez çalışmaları boyunca, geleneksel SFME yöntemlerinde kullanılan çözücülerin dezavantajlarının üstesinden gelmek için bu çözücülerin hacmini azaltmak veya çözücü kullanımından kaçınmak gibi avantajlar oluşturan SFME yöntemleri geliştirilmiştir. Bu durum, sulu çözeltiden organik ve inorganik analitlerin ön deriştirilmesi için geliştirilmiş çift şırınga esaslı basınçlı sıvı fazlı mikroekstraksiyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. DSSME yönteminde, ekstraksiyon çözücülerini sulu çözeltilere etkili bir şekilde dağıtmak için bir dağıtıcı çözücü kullanılmakta, ancak ekstraksiyon çözücüsü, elek bağlantılı çift şırıngalı sıvı faz mikroekstraksiyon yöntemi kullanılarak bir dağıtıcı çözücü kullanılmadan sulu çözeltiye kolayca dağıtılabilmektedir. İki şırınga arasına yerleştirilen plastik veya metalik filtre, sulu çözeltide ekstraksiyon çözücüsünün dağıtım etkinliğini arttırmaktadır. Ekstraksiyon çözücüsünün dağılması, şırıngalardaki hava boşluklarının neden olduğu basınçla daha da arttırılmaktadır. Ayrıca önerilen yöntemin literatürde bulunan diğer yöntemlere göre düşük maliyeti, düşük kimyasal tüketimi, çevre dostu olması ve uygulama kolaylığı gibi avantajları vardır. Otomatik karıştırma işlemi, düşük standart sapma değerleri elde etmek için sistem üzerinde bulunan sabit basınçlı bir pompa yardımıyla manuel karıştırmanın neden olduğu hataları da ortadan kaldırmaktadır.

Diğer bir önemli gelişme olarak son birkaç yılda, analitlerin derişimini belirlemek için akıllı telefonların kullanımı artmaktadır. Günümüz akıllı telefonlarındaki yüksek çözünürlüklü dijital kameralar, etkileyici bilgi işlem yetenekleriyle birleştğinde, akıllı telefonu güçlü bir analitik araç haline getirmiştir [46]. Düşük maliyetli, taşınabilir olması ve kolay kullanımı nedeniyle akıllı telefonlardaki dijital görüntü kolorimetrisi ile dijital görüntüsünün renk değışiklikleri kullanılarak ağır metal tayini yapılmıştır. Akıllı telefondaki dijital görüntü kolorimetrisi, akıllı telefonun kamerasının ve uygulamaların hızlı gelişimi ile geliştirilecektir. Geliştirilen birleşik yöntemlerin, karmaşık örnek matrikslerinde farklı organik ve inorganik kirleticileri belirlemek için genişletilebileceğine inanılmaktadır.

2.1 Organik/İnorganik Kirleticiler

Tarım, sanayi, şehirleşme ve ulaşımdaki hızlı ve kontrolsüz gelişmenin bir sonucu olarak çevresel kaynakların binlerce antropojenik kimyasalla kirlenmesi ve doğada tüm ülkelerde değişen konsantrasyonlarda bulunması nedeniyle, kirleticiler küresel bir sorun haline gelmektedir [47]. Kirleticilerin insanları ve hayvanları olumsuz etkilediği, çok sayıda yapılan bilimsel çalışma ile belgelenmiştir [48-50]. Kirleticilerin oluşumunu ve akıbetini değerlendirmek için düşük konsantrasyonlarda miktarlarının belirlenmesi birincil öneme sahiptir. Kirleticiler çevreye birkaç yoldan girebilir, ancak çoğu durumda kaynağın doğrudan tanımlanması mümkün değildir [47].

Endokrin bozucu bileşikler de içeren kirleticiler, son yıllarda bilim camiasının dikkatini çekmiştir. Çalışmalar, endokrin sisteme müdahale ederek hem vahşi yaşamda hem de insanlarda büyüme ve üreme anormalliklerine, cinsel yönelim değişikliklerine neden olabildiklerini doğrulamıştır [1, 51].

Kirleticilerin çevrede varlığı ve birikimi, su ve kara yaşamı ile insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı önemli bir konu haline gelmiştir. Kirletici kalıntıların besin zinciri yoluyla potansiyel aktarımı nedeniyle, kirleticilerin bitkilerin yenilebilir kısımlarına alınması ve su hayvanlarındaki biyobirikim, insan sağlığı için bir başka husustur [47]. Kirleticilerin tespiti için önemli bir ilerleme kaydedilmiş olmasına rağmen, bu kirleticilerin etkileşimleri ve insan popülasyonu üzerindeki toksikolojik etkileri hakkındaki mevcut bilgiler sınırlıdır [47, 52]. Bu bilgi eksikliği, sınırlı finansal kaynaklara ve bunların ekosistemler ve insan sağlığı üzerindeki etkilerini tek başına veya karışım halinde tespit etmeye yönelik analitik tekniklerin eksikliğine bağlanabilmektedir. Kirleticilerin birbirleriyle veya çeşitli kirleticilerle nasıl etkileşime girdiği bilinmemektedir [52].

2.1.1 Endokrin Bozucu Bileşikler

Endokrin sistem, insan vücudu için bir iletişim aracı görevi görmekte olup bu sistemin işlevini değiştiren herhangi bir maddeye endokrin bozucu denmektedir [53]. Endokrin bozucu bileşikler, hormonal sisteme müdahale edebilen ve bir organizmanın sağlığı üzerinde olumsuz etkiler yaratan doğal veya sentetik eksojen bileşiklerdir [54].

Endokrin bozucu bileşikler, sağlık ve çevresel etkileri nedeniyle önemli bir çevresel kirletici sınıftır ve ABD Çevre Koruma Ajansı (U.S. EPA) tarafından; “homeostazın, üremenin, gelişimin ve/veya davranışın korunmasından sorumlu olan vücuttaki doğal hormonların sentezi, salgılanması, taşınması, bağlanması, eylemi veya eliminasyonuna müdahale eden eksojen bir ajan” olarak tanımlanmıştır [55, 56].

1970'leri ve 1980'leri takiben, atık suların ve boşaltılan su ortamlarının arıtma sürecinde öncelikle çeşitli insan hormonlarının ve farmasötiklerin varlığı rapor edilmiştir [57, 58]. Bildirilen birkaç vakaya rağmen, tespit edilen endokrin bozucu bileşiklerin eser düzeydeki konsantrasyonu ve toksisitedeki önemi hakkında bilgi eksikliği nedeniyle endokrin bozucu bileşikler fazla dikkat çekmemiştir. Ancak bazı araştırmacılar, tespit edilen ilaçları ve ilaç metabolitlerini çevresel kirleticiler olarak değerlendirmiştir [59, 60].

U.S. EPA, yaklaşık 87.000 bileşik için resmi tarama yöntemleri ve toksisite test stratejileri geliştirmek için Endokrin Bozucu Tarama Programını (EDSP) kurmaya çalışmıştır. Avrupa Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) de endokrin bozucu bileşiklerin önemini doğrulamak ve güvenilir bir yöntem geliştirmek için çaba sarf etmiştir [61] [59]. Ancak, önerilen yöntemler henüz bilimsel topluluklarda tam olarak kabul görmemiştir [62].

Endokrin bozucu bileşik olduğu kanıtlanmış veya endokrin bozucu bileşik olduğundan şüphelenilen çok sayıda madde vardır [63]. Endokrin bozucu bileşikler doğal olarak oluşabilmektedir, ancak çoğunluğu çevreye salınan yapay bileşiklerdir. Gıda ürünleri (soya fasulyesi, keten), pestisitler, ev kimyasalları (nonilfenol ve oktilfenol dahil deterjanlar), kişisel bakım ürünleri (kozmetikler), plastik şişeler (bisfenol A, ftalatlar) ve farmasötikler (doğum kontrol hapları) dahil endüstriyel kimyasallar gibi birçok günlük üründe bulunmuştur [53, 64]. Bu bileşikler, çevresel kirleticiler, gıda ambalaj malzemeleri ve doğal bitki bileşenleri yoluyla gıdalara

girebilmektedir. Bu nedenle, gıda ve çevrede bulunmaları için yetkililer tarafından maksimum kalıntı limitleri (MRL) belirlenmiştir [53]. 1970'lerden bu yana, çoğu ülke, geleneksel olarak güvenli kabul edilen dozlarda yan etkilerine dair tutarlı kanıtlar nedeniyle, çoğunluğunun üretimini, işlenmesini ve imha edilmesini yasaklamış veya ciddi şekilde kısıtlamıştır [65, 66].

Endokrin bozucular, farklı hastalık türlerine duyarlılığı artırabilecek doku ve organ gelişimi ve işlevine müdahale edebilmektedir [63]. Ayrıca, bir organizmanın sağlığı üzerinde olumsuz etkilere neden olarak hormon dengesinin bozulmasına yol açmaktadır [67, 68]. İnfertilite, değişen cinsel davranış ve azgelişmişlik, dikkat eksikliği ve hiperaktivite, tiroid veya adrenal kortikal fonksiyonun değişmesi, çocuklarda nörogelişimsel gecikmeler, doğum kusuru ve kanser gelişimi gibi hormon mekanizmasının bozulması sonucu çeşitli kusurlar ortaya çıkabilmektedir [67].

Endokrin bozucular, endüstriyel, tarımsal, kentsel vb. gibi çok çeşitli kaynaklardan insanlara ve diğer organizmalara salınabilmektedir. Ayrıca toprak, hava, atık su, yüzey suyu ve yeraltı sularında farklı konsantrasyonlarda tespit edilmişlerdir [69-72].

Endokrin bozucu bileşiklere maruz kalmanın ana özellikleri aşağıdaki gibidir:

- Güvenli bir endokrin bozucu bileşik dozu yoktur. Düşük konsantrasyonlarda ve endojen hormonlarla kombinasyon halinde hareket etmektedirler.
- Bireyin gelişiminin özel savunmasızlık dönemlerinde (hamilelik, emzirme, ergenlik) endokrin bozucu bileşiklere maruz kalma, yaşamları boyunca olumsuz etkilerle hasara neden olmaktadır.
- Endokrin bozucu bileşiklere maruz kalma dozlarını olumsuz etkilerle ilişkilendiren eğriler doğrusal değildir. Tepki her zaman maruz kalma dozu ile aynı oranda artmamaktadır.
- Genel anlamda, bireyler tek bir endokrin bozucu bileşik tipine değil, endokrin bozucu bileşiklerin bir karışımına maruz kalmaktadırlar. Bu nedenle, kimyasal kalıntılar (kokteyl etkisi) arasındaki olası sinerjistik, katkı maddesi veya antagonistik eylemler göz önüne alındığında, etkileri tahmin etmek zor olmaktadır.

- Maruziyetten sonra gözlenen etkiler uzun gecikme sürelerinden sonra ortaya çıkabileceğinden, nedensel bir ilişki kurmakta büyük zorluk vardır [66].

2.1.1.1 Endokrin Bozucu Türleri

1. Sınıflandırılmış Endokrin Bozucular: Endokrin aktif bileşikler hem doğal olarak oluşan maddeleri hem de insan yapımı kimyasalları içermekte olup kimyasal yapıları şaşırtıcı derecede çeşitlidir [73]. Sınıflandırılmış endokrin bozucular aşağıdaki gibidir [74]:

i. Östrojen (kadın cinsel gelişiminden sorumlu), progesteron ve testosteron (=androjenler: erkek cinsel gelişiminden sorumlu) içeren doğal hormonlar, fitoöstrojenler (vücut tarafından alındığında östrojen benzeri aktivite gösteren soya fasulyesi gibi bazı bitkilerde doğal olarak bulunan maddeler).

ii. Yapay maddeler

- Doğal hormonlarla aynı, sentetik olarak üretilmiş hormonlar. Örneğin; oral kontraseptifler, hormon replasman tedavisi, endokrin sisteme müdahale etmek ve modüle etmek için kasıtlı olarak tasarlanmıştır.
- Yapay kimyasallar. Bilinen en yaygın yapay endokrin bozucu kimyasallar aşağıda listelenmiştir:
 - Pestisitler (DDT, endosulfan, metoksiklor)
 - Yüksek Klorlu Bileşikler (Poliklorlu bifeniller, dioksin, furan)
 - Alkilfenoller (nonilfenol, oktilfenol)
 - Plastik Katkı Maddeleri (Bisfenol-A, ftalatlar)
 - Parabenler (bütilparaben, benzilparaben)
 - Ağır Metaller (kobalt, kurşun, krom).

2. Sınıflandırılmamış, Potansiyel Endokrin Bozucular: Endokrin sistemini bozma potansiyeline sahip birçok endüstriyel kimyasal vardır. Ancak bu kimyasalların endokrin bozucu olduğu henüz kanıtlanmamıştır. Sınıflandırılmamış endokrin bozucuların bazı kimyasal sınıfları, çeşitli fenolik bileşikler, naftoller, naftalinler, benzen ve türevlerini, anilinleri ve türevlerini ve sentetik boyaları içermektedir [74].

Pek çok doğal ve sentetik kimyasalın yaygın olarak endokrin bozucu bileşik olarak kabul edilmesine rağmen, çevrede bulunan çok sayıda kimyasal hala

tanımlanmamıştır ve potansiyel endokrin bozucu bileşikler olarak şüpheli kabul edilmektedir. Ayrıca, çeşitli endüstriyel sektörlerdeki ihtiyaçlar nedeniyle sürekli olarak birçok yeni kimyasal üretilmektedir. Ek olarak, tanımlanmış bazı endokrin bozucu bileşiklerin endokrin bozucu aktivitelerine dair kanıtlar genellikle bir dereceye kadar tartışmalıdır [59].

2.1.2 Parabenler

Parabenler, günlük tüketici ürünlerinde yaygın bir şekilde koruyucu olarak kullanılan bir kimyasallar grubudur [75]. 4-hidroksibenzoik asidin esterleri olan parabenler, nedeniyle gıda maddelerinde, farmasötiklerde ve kişisel bakım ürünlerinde koruyucu olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır [76]. Bu esterler arasında metil paraben (MeP), etil paraben (EtP), propil paraben (PrP), izopropil paraben (iPrP), bütıl paraben (BuP), izobütıl paraben (iBuP) ve benzil paraben (BeP) bulunmaktadır [77, 78]. Bu paraben türlerinden benzilparaben en akut toksik olarak görünmektedir [79]. Metil- ve etilparaben ise en az akut toksik olarak görünmektedir [80].

2000'den önce yapılan erken risk analizine dayanarak, parabenler insan kullanımı için güvenli kabul edilmiştir. Spesifik olarak, farelerde yapılan erken akut toksisite çalışmaları, bireysel olarak parabenlerin LD50'sinin (ortanca öldürücü doz) oral uygulamadan sonra 2100 ile 8000 mg kg⁻¹ arasında olduğunu göstermiştir [81]. Soni ve ark., 2000 yılından önce yayınlanan parabenlerin kısa süreli, subkronik ve kronik toksisitesi üzerine yapılan çalışmaları özetlemiş ve parabenlerin tüketici ürünlerinde bulunan konsantrasyonlarda insanlar üzerinde herhangi bir toksik etki göstermediği sonucuna varmıştır. Toksikolojik çalışmalara dayanarak, parabenler "genel olarak güvenli olarak kabul edilen" (GRAS) bileşikler olarak listelenmiştir [81] [82]. Ancak daha sonraki araştırmalar, parabenlerin endokrin sistemi modüle edebileceğini veya bozabileceğini ve bu nedenle insan sağlığı üzerinde zararlı etkileri olabileceğini göstermiştir [83]. Parabenler, vücuda alındıktan ve deriye uygulandıktan sonra ve ayrıca inhalasyon yoluyla emilmektedir [82]. Meme tümörleri [84] ve plasenta dokusu [85] gibi dokularda da bu kimyasallar tespit edilmiştir.

Parabenler üzerindeki alkil zincirinin uzunluğundaki bir artışın, parabenlerin suda çözünürlüğünü azaltmasına rağmen antimikrobiyal aktivitede bir artışa neden

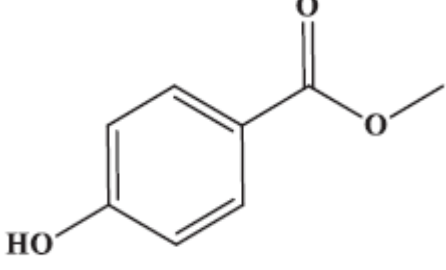
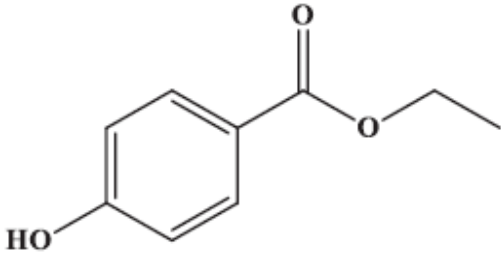
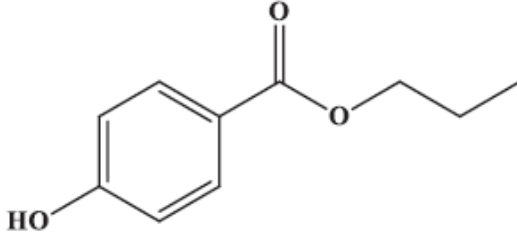
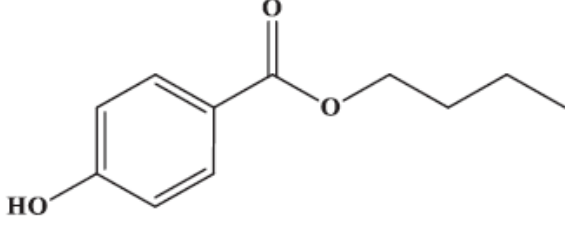
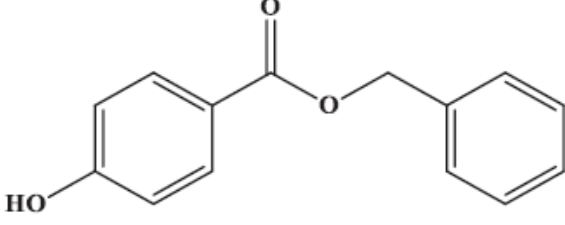
olduğu keşfedilmiştir [11]. Bununla birlikte, çok sayıda araştırma, parabenlerin endokrin sistemi olduğu kadar üreme sistemi üzerinde de olumsuz bir etkisi olabilecek, gelişmekte olan bir endokrin bozucu kimyasallar grubu olduğunu göstermiştir [86].

Çok sayıda araştırmacı parabenlerin idrar, ter, serum, plasenta, lipid dokusu ve meme tümörü dokusu dahil biyolojik matrislerde bulunabileceğini bildirmiştir [86, 87]. Bu bileşikler, dünya çapında insanın biyolojik matrislerinde yüksek konsantrasyonda gözlenmiştir [86]. Ayrıca parabenlerin, atık su ($20\text{--}30\ \mu\text{g L}^{-1}$), tatlı su ($21\text{--}80\ \text{ng L}^{-1}$) ve iç mekan tozu ($0.258\text{--}2.790\ \mu\text{g g}^{-1}$) gibi farklı çevresel ortamlarda da varlığı tespit edilmiştir [88].

2.1.2.1 Parabenlerin Kimyasal Yapısı ve Sınıflandırılması

Parabenler, p-hidroksibenzoik asidin (PHBA) alkil esterleridir. Alkol, eter ve asetonda kolayca çözünür ve inert, kokusuz, tatsız, renksiz, lipofiliktirler ve geniş bir çözelti pH aralığında stabil kristal veya kristal kimyasallardır [82, 89]. Parabenlerin tat, renk, koku ve pH üzerinde hiçbir değişikliğe neden olmamaları nedeniyle ürünlerin arzu edilen kalitesinde hiçbir anormallik ve bozulmaya neden olmaması da tercihlerini artırmaktadır. Ayrıca parabenler, ürünlerin güvenliğini sağlayan bir özellik olan mükemmel pH ve termal kararlılık sergilemektedir [15]. Çalışmada kullanılan parabenlerin kimyasal yapıları Tablo 2.1’de sıralanmıştır.

Tablo 2.1 Parabenlerin kimyasal yapıları ve özellikleri [89]

Bileşik İsmi	Kimyasal Yapısı	Molekül Formülü	Molekül Ağırlığı
Metilparaben		C ₈ H ₈ O ₃	152.15
Etilparaben		C ₉ H ₁₀ O ₃	166.17
Propilparaben		C ₁₀ H ₁₁ O ₃	180.20
Bütilparaben		C ₁₁ H ₁₄ O ₃	194.23
Benzilparaben		C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228.25

2.1.2.2 Parabenlerin Kullanım Alanları

Parabenlerin kozmetik ürünlerde ve kişisel bakım ürünlerindeki ana kullanımı antimikrobiyal özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Paraben türdeşlerinin karışımlarının kullanılmasının, her bir bileşiğin daha düşük seviyelerinin kullanılmasıyla koruyucu kapasitelerinin artmasına izin verdiği gösterilmiştir [66].

Parabenler gıda, kozmetik ve farmasötiklerde koruyucu olarak kullanılmaktadır [90]. Sebzeler, fırınlanmış ürünler, katı ve sıvı yağlar, çeşniler, kahve özleri, meyve suları, turşular, soslar, alkolsüz içecekler ve dondurulmuş süt ürünleri gibi işlenmiş ürünlerde 450 ile 2000 mg kg⁻¹ arasındaki konsantrasyonlarda antimikrobiyal koruyucular olarak geniş uygulama alanı bulmuşlardır. Parabenler, farmasötik ve kişisel bakım ürünlerinden olan güneş losyonları, deodorantlar, saç jöleleri, şampuanlar, kremler ve diş macunlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu parabenler, hücre zarını ve hücre içi proteinleri parçalama yetenekleri nedeniyle antibakteriyel ve antifungal aktiviteye sahiptir ve mikrobiyal hücrelerin enzimatik aktivitesinde bir değişikliğe neden olmaktadır [89]. İzobütilparaben ve fenilparabenin *Escherichia coli*'ye karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bilinirken [91], kağıt üretiminde antifungal özelliklerinden dolayı metilparaben ve propilparaben karışımı kullanılmıştır [92].

Yazar ve ark., çeşitli mağaza ve markalardan temin ettikleri şampuan, saç kremi, sıvı sabun, mendilleri içeren 204 kozmetik ürün serisinin bileşimini belirledikleri çalışmalarında, analiz edilen kozmetiklerin en az %44'ünün en az bir paraben türdeşi içerdiğini göstermişlerdir. En yüksek oranda bulunan paraben MeP (ürünlerin %41'i) olurken, bunu PrP (%25) izlemiştir [93].

Yapılan başka bir çalışmada, analiz edilen diş hijyeni ürünlerinin %40'ında ve diğer günlük hijyen ürünlerinin %60'ında parabenlerin tespit edildiği bildirilmiştir. BuP'den sonra MeP ve PrP en çok tespit edilen bileşikler olmuştur. MeP, EtP, PrP ve BuP'in en yüksek konsantrasyonlarının, ağırlıkça ürün başına yaklaşık %0.1-0.8'e karşılık gelen 1040 ile 8200 µg g⁻¹ arasında değiştiği görülmüştür [94].

2.1.2.3 Parabenlerin İnsan ve Çevre Sağlığı Üzerine Etkileri

Kişisel bakım ürünleri, sabunlarda, losyonlarda, diş macunlarında, kokularda ve güneş kremlerinde kullanılan çok çeşitli bir bileşik grubudur. Kişisel bakım

ürünlerinin birincil sınıfları arasında dezenfektanlar, kokular, böcek kovucular, koruyucular (parabenler) ve UV filtreleri bulunmaktadır. Dahili kullanıma yönelik farmasötiklerin aksine, kişisel bakım ürünleri insan vücudunda harici kullanıma yönelik ürünlerdir ve bu nedenle metabolik değişikliklere maruz kalmazlar; bu nedenle, büyük miktarlarda kişisel bakım ürünü, düzenli kullanım yoluyla çevreye değişmeden girmektedir [80]. Bu bileşiklerin birçoğu büyük miktarlarda kullanılmaktadır ve araştırmalar, birçoğunun çevresel olarak kalıcı, biyoaktif olduğunu ve biyobirikim potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir [95].

Parabenler, uzun süre zararsız olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte 20 yılı aşkın bir süredir, endokrin bozucu potansiyellerinden kaynaklanan ana endişe nedeniyle parabenlerin güvenliği konusunda tartışmalar devam etmektedir [96]. Yakın zamanlarda, parabenlerin endokrin bozulmasına sebep olduğu ve meme kanserinin olası bir nedeni olabileceği öne sürülmüştür [97, 98].

Parabenler ilk olarak 2004 yılında insan meme tümör dokusunda tespit edilmiştir [99]. Parabenlerin daha sonra PrP için 16.8 ng/g, MeP için 16.6 ng/g, BuP için 5.8 ng/g, EtP için 3.4 ng/g, iBuP için 2.1 ng/g ve toplam parabenler için 85.5 ng/g medyan konsantrasyonlarında insan göğsünün tüm bölgelerinde her yerde olduğu doğrulanmıştır [100]. Ayrıca parabenlere uzun süre maruz kalmanın meme kanseri hücre çoğalmasını ve göçünü arttırdığı gözlemlenmiştir [101]. Yakın tarihli yapılan bir çalışmada, 1 ve 5 µM konsantrasyonlarda PrP'in DNA hasarına neden olduğu bulunmuştur. Bu da parabenlere maruz kalmanın duyarlı kişilerde zararlı östrojenik etkilere neden olabileceğini düşündürmektedir [102]. In vivo deneylerde, BuP'in sıçanların üreme sistemi üzerinde olumsuz bir etkisi olduğu gözlenmiştir [103]. Ayrıca PrP ve BuP'in yüksek estradiol seviyelerinden sorumlu metabolik enzimlerde değişikliklere neden olduğu görülmüştür [82].

3 yaşın altındaki çocuklara yönelik kozmetiklerdeki parabenlerin içeriğine ilişkin Avrupa düzenlemesi mevcuttur. Ancak hamilelerde kullanımına ilişkin herhangi bir düzenleme bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalar, parabenlerin, çocuklar ve fetüslerle ilgili özel bir endişeye yol açan potansiyel bir endokrin bozucu etkisi olduğunu göstermiştir. Parabenlerin östrojenik etkisinin yenidoğanlarda çok düşük endojen östradiol düzeylerini aşabilmesinin yanı sıra, fetüs ve çocuktaki dokuların

metabolik kapasitesi tam olarak gelişmemiştir. Dolayısıyla paraben maruziyetinin bu nüfus grubu üzerindeki etkilerine ilişkin endişeleri artırmaktadır [75].

Farmasötik ve kişisel bakım ürünlerinin kullanımı artmakta ve özellikle insan vücudundan yıkanarak, paraben içerikli ürünlerin tuvalet, lavabo ve çöp kutularına yanlış şekilde atılması yoluyla çevremizdeki paraben konsantrasyonunu artmaktadır [104]. Dünyanın en önemli doğal kaynaklarından biri olan su, bu parabenler için hızla büyük bir rezervuar haline gelmektedir [89]. Deniz suyunda parabenlerin oluşumu su ortamında bir endişe kaynağıdır, çünkü bazı parabenler, özellikle BuP, çok düşük konsantrasyonlarda tam mercan ağartmasına neden olabilmektedir [105]. Öte yandan, parabenler yüzme havuzu suyunda ana bileşikler ve klorlu yan ürünler olarak bulunabilmektedir [106].

Propilparaben ve metilparabenin Çin nehirlerinde 3142 ve 1062 ng L⁻¹ ile en yüksek konsantrasyonlara sahip olduğu rapor edilirken [107], Hint sularında ağırlıklı olarak etilparaben gözlenmiştir [108]. Haman ve ark., incelemelerinde metilparabenlerin su sistemlerinde diğer parabenlere göre ağırlıklı olarak bulunduğunu ve klorlu parabenlerin suda diğer parabenlere göre daha kalıcı olduğunu bildirmişlerdir [10]. Afrika (Mısır), Asya, Amerika ve Avrupa'daki çevresel su örneklerinde bulunan en yüksek paraben konsantrasyonları; Afrika için 47.2 ng mL⁻¹ MeP, 15.7 ng mL⁻¹ PrP ve 22.6 ng mL⁻¹ BuP, Asya için 55.9 ng mL⁻¹ MeP, 2.83 ng mL⁻¹ EtP, 69.9 ng mL⁻¹ PrP ve 1.85 ng mL⁻¹ BuP, Amerika için 4.33 ng mL⁻¹ MeP, 1.49 ng mL⁻¹ EtP, 14.9 ng mL⁻¹ PrP ve 0.90 ng mL⁻¹ BuP ve Avrupa için 10.0 ng mL⁻¹ MeP, 21.4 ng mL⁻¹ EtP, 2.87 ng mL⁻¹ PrP ve 4.54 ng mL⁻¹ BuP olarak bulunmuştur [89].

Parabenler, parabenle kirlenmiş su ile etkileşimlerinin bir sonucu olarak sualtı yaşamında da bulunmuştur. Örneğin Filipinler'de Manila Körfezi'nde yetişkin balıklarda paraben seviyesi 4700 ng g⁻¹ iken genç balıklarda 2200 ng g⁻¹ olarak bildirilmiştir [109]. Tüm bunlar, parabenler vücutta biyolojik olarak birikebildiğinden, bu kirli balıklar gıda olarak tüketildiğinde, uzun vadede insan sağlığını kesinlikle olumsuz yönde etkileyebilecektir.

2.1.2.4 Türkiye ve Dünya'da Paraben Kullanımı

1920'lerden beri parabenlerin giderek kozmetik ve farmasötiklerde en bol bulunan katkı maddesi haline geldiği tahmin edilmektedir. 2006 yılında, 22.000'den fazla

kozmetik türü koruyucu olarak parabenler içermektedir ve parabenlerin 13.200 kozmetik üründe kullanıldığı 1981'den bu yana paraben kullanımı neredeyse iki katına çıkmıştır [82, 110]. 2018 yılına kadar dünya kozmetik pazarının değerinin 500 milyar avroya kadar çıktığı ve tüketicilerin uzun raf ömrüne sahip kozmetik ürünlere yönelik talepleri nedeniyle önümüzdeki yıllarda koruyucu madde miktarlarının daha da artmasının beklendiği tahmin edilmektedir [111].

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı verilerine göre, kozmetik ürünlerde kullanılan koruyucular Kozmetik Yönetmeliği Ek V'inde (Kozmetik Ürünlerde Kullanılmasına İzin Verilen Koruyucuların Listesi) belirli limit ve koşullarla kullanımı olan maddelerdir. Kozmetik ürünlerde kullanımı yasaklanmış parabenler, aşağıda sıralandığı gibidir [112]:

- İzopropil 4-hidroksibenzoat (İzopropilparaben)
- İzopropilparaben'in sodyum tuzu veya tuzları
- İzobütil 4-hidroksibenzoat (İzobütilparaben)
- İzobütilparaben'in sodyum tuzu veya tuzları
- Fenil 4-hidroksibenzoat (Fenilparaben)
- Benzil 4-hidroksibenzoat (Benzilparaben)
- Pentil 4-hidroksibenzoat (Pentilparaben)

Kozmetik ürünlerde bazı parabenlerin Tablo 2.2' de belirtilen limit ve koşullarda kullanımına izin verilmektedir.

Tablo 2.2 Kozmetik ürünlerde kullanılmasına izin verilen koruyucuların listesi [112]

Referans sayısı	Kimyasal ismi/INN	Ortak bileşenler sözlüğündeki İsmi	Kullanıma hazır ürünlerdeki maksimum konsantrasyon	Diğer koşullar	Etiket üzerinde belirtilmesi gereken kullanma talimatı ve tedbirler
12	4-Hidroksibenzoik asit ve onun Metil- ve Etil-esterleri, ve onların tuzları	4-hidroksibenzoik asit Metilparaben Potasyum etilparaben Potasyum paraben Sodyum metilparaben Sodyum etilparaben Etilparaben Sodyum paraben Potasyum metilparaben Kalsiyum paraben	Tek ester için % 0,4 (asit olarak) Ester karışımları için % 0,8 (asit olarak)		

Tablo 2.2 Kozmetik ürünlerde kullanılmasına izin verilen koruyucuların listesi [112] (devamı)

12a	Butil 4-hidroksi-benzoat ve tuzları Propil 4-hidroksi-benzoat ve tuzları	Bütilparaben Propilparaben Sodyum propilparaben Sodyum bütilparaben Potasyum bütilparaben Potasyum propilparaben	Tek başına konsantrasyonları toplamı için % 0,14 (asit olarak). Butil ve propilparabenin ve tuzlarının tek tek konsantrasyonlarının toplamı % 0,14'ü geçmeyecek şekilde, 12 ve 12a numaralı satırlarda belirtilen madde karışımları için % 0,8 (asit olarak)	Üç yaşın altındaki çocukların bez bölgesine uygulanmak üzere tasarlanmış durulanmayan ürünlerde kullanılmamalıdır.	Üç yaşından küçük çocuklar için tasarlanmış durulanmayan ürünler için: “Bebek bezi bölgesinde kullanılmamalıdır.”
-----	--	---	--	---	---

Parabenler, Avrupa, ABD ve Asya'da yüksek üretim hacimli kimyasallar olarak kabul edilmektedir [82]. 1990'larda, Çevre Koruma Ajansı tarafından ABD'de MeP için 5000 tona kadar çıkan yıllık üretim oranları rapor edilmiştir [113]. İskandinav ülkelerinde ürün kayıtlarına göre parabenlerin kullanımı 2006-2007 yılları arasında zirveye ulaşmış ve o zamandan beri muhtemelen katı kısıtlayıcı yasalar nedeniyle azalmıştır. Ancak Çin'de bireysel üreticilerin üretim verilerine göre, parabenlerin (MeP, EtP) üretim oranları ayda 500 ton kadar yüksektir. Ayrıca PrP üretim hızının >10.000 ton ay^{-1} olduğu bildirilmiştir. Bu durum şaşırtıcı değildir, çünkü Mart 2002'de MeP, EtP ve PrP Çin'de gıda katkı maddeleri olarak onaylanmış olup gıdalarda izin verilen maksimum MeP, EtP ve PrP konsantrasyonu $0,5$ g/kg'dır. Bu nedenlerle Çin'de paraben üretimi ve kullanımının artmaya devam etmesi makul görünmektedir [82].

Genel nüfusu korumak ve aşırı paraben alımını ortadan kaldırmak için birçok ülke, birlik ve yerel veya uluslararası kuruluşlar, çeşitli ürün kategorilerinde kabul edilebilir paraben içeriğini belirleyen belirli yasal sınırlar getirmiştir. Örneğin, Avrupa Birliği'nde, toplam içerik bir paraben için $\%0.4$ 'ü veya kozmetik ve ilaçlardaki bir paraben karışımı için $\%0.8$ 'i geçmemelidir. Bu limitler gıda ürünleri için de kayıt altına alınmıştır. Gıda ve İlaç Dairesi bu limitleri önermiş olsa da, Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'da hala katı mevzuat çerçeveleri yoktur. Japonya'da üst eşik $\%1$ 'dir. Danimarka, üç yaşından küçük çocuklara yönelik mallara daha da katı sınırlar getirmiştir. Zaman zaman çeşitli kuruluşlar ve komiteler, yeni ortaya çıkan bilimsel veriler doğrultusunda kabul edilebilir günlük alımın (ADI) azaltılmasının önemini ve gerekliliğini tavsiye etmektedir [15].

2.1.3 Ağır Metaller

Ağır metallerle çevre kirliliği küresel bir sorun haline gelmektedir. Metalik kirleticilerin insan sağlığı ve çevre üzerindeki potansiyel etkileriyle ilgili artan endişenin bir sonucu olarak, çevredeki eser metallerin temel, uygulamalı ve sağlık yönleri üzerine araştırmalar artmaktadır [114].

Ağır metal terimi genellikle önemli bir kirletici sınıfını oluşturan çeşitli elementleri kapsamak için kullanılmaktadır. Ağır metaller çevreye atmosferik partiküllerin birikmesi, metalle zenginleştirilmiş kanalizasyon çamurlarının ve kanalizasyon atıklarının bertarafı ve metal madenciliği işlemlerinden kaynaklanan yan ürünler

olmak üzere başlıca üç yoldan girmektedirler [115]. Bununla birlikte, esas olarak metal içeren partiküllerin atmosferik karışımı ve genel atmosferik metal havuzuna katkıda bulunan metallerin ve metal yayan kaynakların çeşitliliği nedeniyle atmosferik girdiyi doğru bir şekilde ölçmek zordur [114]. Sedimentlerin ağır metal içeriği, doğal kaynaklardan (kaya aşınması, toprak erozyonu, suda çözünür tuzların çözünmesi) ve belediye atıksu arıtma tesisleri, imalat sanayileri ve tarımsal faaliyetler gibi antropojenik kaynaklardan gelmektedir [116].

Ağır metaller, hızlı sanayileşme, ulaşım ve tarımsal faaliyetler sonucunda önde gelen çevre kirleticileri olarak değerlendirilmektedir. Havayı, suyu, toprağı, bitkileri ve çeşitli organizmaları etkilemektedirler. Toprak kirliliğinden sorumlu olan ağır metaller Bakır (Cu), Kadmiyum (Cd), Çinko (Zn), Nikel (Ni), Krom (Cr) ve özellikle en yaygın olanı Kurşun (Pb)'dur. Bitkiler ve toprak mikroorganizmaları bu metalleri metabolik aktiviteleri ile emmektedir. İnsan gıdalarının %90'ından fazlasının toprak tarafından karşılandığı düşünüldüğünde, bu ağır metaller bitkiler aracılığıyla insan vücuduna kolaylıkla ulaşmaktadır. Ayrıca ağır metaller topraklardan yeraltı sularına geçerek içme sularını doğrudan tehlikeye atmaktadır [117]. Balık ve kabuklu deniz ürünleri türleri de toprak ve sulardaki ağır metallerden ciddi şekilde etkilenmektedir ve bunların tüketimi ağır metalleri insan vücuduna almanın başka bir yoludur [118].

Ağır metaller genellikle zehirlidir, ancak ağır metallerin oksitlerinin tehlikesi çok daha düşüktür [119]. Nehirlerde ve göllerde ağır metal iyonlarının bulunması hayvanlar, bitkiler ve insanlar için çeşitli sağlık sorunlarına neden olabilmektedir. İnsan vücudu metalleri büyük oranda atamamakta ve bunun sonucunda çeşitli iç organlarda birikmektedirler. Büyük birikmeler ters reaksiyonlara ve vücutta ciddi hasara neden olabilmektedir [120]. Ağır metallerin organizmalardaki aşırı toksikliğinin nedeni, suda çözünebilir iyonlar veya bileşikler halinde olmaları ve doğada canlı organizmalar tarafından kolaylıkla emilebilmeleridir. Genellikle ağır metallerin toksik etkisi, organik bileşiklerle kompleks oluşturmalarından kaynaklanmaktadır. Bu metaller vücut tarafından emildikten sonra proteinler, enzimler ve nükleik asitler gibi hayati öneme sahip hücresel birimlere bağlanarak fonksiyonlarını inhibe etmektedir [121]. Bu metaller proteinlerin - SH gruplarıyla reaksiyona girmektedir. Belki bu olay kimyasal olarak basit görünebilir, ancak bu

metabolizmada önemlidir ve ölüme neden olabilmektedir. Hayvan vücudunda homeostatik mekanizmalar nedeniyle metal konsantrasyonu tolerans sınırını geçmezse veya ağır metaller uzun süre metabolizmayı etkilemiyorsa metabolizma kendini koruyabilmektedir. Metallerin toksisitesi en yaygın olarak beyin ve böbrekleri etkilemekte, ancak başka belirtiler de ortaya çıkabilmektedir [23].

2.1.3.1 Ağır Metallerin Sınıflandırılması

Metaller hem doğada bol miktarda bulunmalı hem de çözünür türler olarak kolaylıkla temin edilebilmelidir. Bunların bazıları, hidroksitlerinin düşük çözünürlüğü nedeniyle neredeyse mevcut değildir [122]. Çevre kirliliği açısından bakıldığında metaller üç kritere göre sınıflandırılabilir [123];

- i. Kritik olmayan (Na, Mg, Fe, K, Ca, Al, Sr, Li, Rb),
- ii. Toksik ancak çok çözünmez veya çok nadir (Ti, Hf, Zr, W, Ta, Ga, La, Os, Ir, Ru, Ba, Rh),
- iii. Çok toksik ve nispeten erişilebilir (Be, Co, Ni, Cu, Zn, Sn, Cr, As, Se, Te, Ag, Cd, Hg, Tl, Pb, Sb, Bi).

Kadmiyum (Cd), cıva (Hg), kurşun (Pb), bakır (Cu) ve çinko (Zn) gibi ağır metaller, çevresel kalıcılıkları, toksisiteleri ve besin zincirine dahil olma yetenekleri nedeniyle sucul ekosistemlerin ciddi kirleticileri olarak kabul edilmektedirler [122]. Aralarında; kadmiyum, kurşun ve cıva, vücut dokularında uzun süreler boyunca birikebildikleri için nispeten düşük konsantrasyonlarda oldukça toksiktir [124]. İnsan metabolizması için düşük konsantrasyonlarda bile olumsuz etkileri vardır ve daha fazla maruziyet olması durumunda öldürücü olabilmektedirler. Ayrıca ağır metallerin ve bunların bileşiklerinin çoğu mutasyonlara ve farklı kanser türlerine neden olma potansiyeline sahiptir [125]. Bir metalin toprak veya su ortamındaki akıbeti ve taşınması, önemli ölçüde metalin kimyasal formuna ve türüne bağlıdır [114].

2.1.3.2 Kobalt

Kobalt (Co), vücudumuzdaki hayati faaliyetlerde önemli bir rol oynayan ve aynı zamanda kan hücrelerinden biri olan eritrositlerin oluşumunda rol oynayan B12 vitamininin yapı taşıdır [40, 126]. İnsanlar kobalt içeren mineralleri

sentezleyemedikleri için gerekli olan kobalt, balık, istiridye, yumurta, süt ve yeşil sebzeler gibi besinler yoluyla insanlara sağlanmaktadır [127] [128].

İnsan beslenmesi için önerilen kobalt miktarı günde 8.0 μg 'dır [129]. İnsan vücudunda kobalt alımı büyük olasılıkla B12 vitaminleri ile meydana gelmektedir, bu nedenle B12 vitamini eksikliği ciddi sağlık sorunlarına yol açabilmektedir. B12 vitamini şeklinde kişi başına tüketilen ortalama kobalt miktarı, yemek başına yaklaşık 11 μg 'dır. Yetişkinler tarafından önerilen günlük B12 vitamini alımı miktarı 2.4 μg gün^{-1} 'dür [130, 131].

Yaygın oluşumu nedeniyle insanlar günlük yaşamda çeşitli Co bileşiklerine ortam havasının solunması ve Co bileşikleri içeren yiyecek ve içme suyunun yutulması yoluyla maruz kalmaktadır. Kobaltın sert metallerin üretimi, öğütme, madencilik ve boya gibi çok sayıda endüstriyel uygulaması olduğu için mesleki olarak kobalta maruz kalma nispeten sık görülen bir başka olaydır [132, 133].

Hem düşük hem de yüksek miktarda kobalt insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Vücuttaki Co eksikliği, "pernisyöz anemi" olarak adlandırılan anemi, karaciğer, pankreas ve sinir sistemi bozuklukları, büyüme geriliği, iştah kaybı ve kronik şişme gibi birçok soruna ve semptomlara neden olabilmektedir [40, 127, 129, 134, 135]. Ancak düşük konsantrasyonlarda ihtiyaç duyulan kobalt, uzun süreli maruziyette de vücut için istenmeyen hastalıklar oluşturmaktadır [40]. Co yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu gastrointestinal sistemde tahriş, mide bulantısı, ishal, akciğer ve kalp hastalıkları ve bazı enzim aktivitelerinin inhibisyonu gibi toksik etkilere neden olabilmektedir [129]. İçme suyunda izin verilen maksimum kobalt konsantrasyonu, Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı tarafından 100 μg L^{-1} olarak belirtilmiştir [40].

2.1.3.3 Bakır

Yerkabuğunda en bol bulunan 25. element bakırdır [136]. Bakır iyonu, insan vücudunda besin açısından en gerekli üçüncü eser elementtir. Aynı zamanda insan vücudundaki birçok temel fizyolojik süreçte önemli bir rol oynamaktadır. Bakır iyonuna bağlı enzimler, cildin pigmentasyonu için melanini dönüştüren ve kolajen ve elastinde çapraz bağların oluşumuna yardımcı olan katalizörler olarak işlev görmektedir. Bununla birlikte merkezi sinir sisteminin bu yapı ve işlevine ek olarak

hemosiyanin oluşumu, hemopoez, damar ve iskelet bütünlüğünün korunması gibi bir takım vücut fonksiyonlarının sağlanmasına yardımcı olmaktadır [137].

Bakır, doğal sulara madencilik, eritme, evsel ve endüstriyel atık sular, buharlı elektrik üretimi, yakma fırını emisyonları ve kanalizasyon çamurunun boşaltılması dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan gelmektedir [138].

Bakır eksikliği anemiye ve vücudun bakır emilimini etkileyen önemli bir hastalık olan menkes hastalığına (çelik saç hastalığı) neden olabilirken, aşırı bakır iyonu yüklemesi Wilson hastalığı, Parkinson, Alzheimer, prion hastalıkları, sarılık, karaciğer veya böbrek hasarı, gastrointestinal rahatsızlık ve şizofreniye neden olabilmektedir [137, 139, 140]. Öte yandan, çeşitli sulu çözeltilerde bulunan aşırı bakır iyonu seviyeleri, insanlar ve birçok sulu organizma için kronik bir zehirlenme ile sonuçlanan önemli bir çevresel tehlikeli kirletici olarak kabul edilmektedir [141]. Bu nedenle, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), güvenli ve maksimum günlük bakır alımını belirli limitler ile sınırlandırmıştır [137]. Tıp Enstitüsü (IOM), yetişkinler için gıdalardan ve takviyelerden tolere edilebilir bir üst alım seviyesi olarak günde 10 mg'ı tavsiye etmiştir [142]. Ancak endüstriyel atıkların ve belediye atıklarının doğrudan deşarjı, maden yıkamalarının bertarafı, enerji santrallerinden deşarjlar, rafineri atıklarının yanı sıra zehirli boyalardan ve basınçlı işlem görmüş rıhtımlardan sızıntı nedeniyle çevredeki bakır konsantrasyonlarının daha da artması beklenmektedir [143]. Bundan dolayı, çeşitli gıda maddelerine girerek kemik yapısının bozulmasına neden olmakta ve insanın tüm iskelet sistemlerinin tamamen çökmesine neden olmaktadır. Bununla birlikte çok yüksek bakır konsantrasyonu siroz ve cilt kanseri gibi ciddi hastalıklara neden olabilmektedir [137].

2.1.3.4 Krom

Krom, yeryüzünde en bol bulunan yedinci elementtir [144]. Çevrede Cr (II) ile Cr (VI) arasında değişen çeşitli oksidasyon durumlarında oluşmaktadır [145]. En yaygın olarak bulunan Cr formları üç değerlikli Cr (III) ve altı değerlikli Cr (VI)'dır ve her iki durum da hayvanlar, insanlar ve bitkiler için toksiktir [146].

Krom bileşikler Cr (III) formunda karardır ve doğada bu durumda ferrokromit gibi cevherlerde bulunmaktadır. Heksavalent Cr (VI) formu, ikinci en kararlı durumdur.

Elementel krom Cr (0) doğal olarak oluşmamaktadır. Krom, çok çeşitli doğal ve antropojenik kaynaklardan hava, su ve toprak gibi çeşitli çevresel matrislere girmekte ve en büyük salınımı endüstriyel kuruluşlardan gelmektedir. Cr (VI), insanlar için kanserojen olarak sınıflandırılan toksik bir endüstriyel kirleticidir [147]. Cr (VI)'nın toksik doğası, yüksek oksidasyon potansiyeline ve hücre zarlarına nüfuz etmelerini sağlayan nispeten küçük boyutuna bağlanmaktadır. Cr (III) indirgenmiş haliyle hareketsizdir ve suda çözünmezken, Cr (VI) oksitlenmiş halde suda yüksek oranda çözünür ve dolayısıyla hareketlidir. Öte yandan, Cr (III) büyük boyutu nedeniyle hücre duvarlarına nüfuz edememektedir [148] [149].

Cr (VI) içeren tüm bileşiklerin bir zamanlar insan yapımı olduğu düşünülmektedir, sadece Cr (III) havada, suda, toprakta ve biyolojik materyallerde doğal olarak her yerde bulunmaktaydı. Ancak son zamanlarda, doğal olarak oluşan Cr (VI), yeraltı ve yüzey sularında, Dünya Sağlık Örgütü'nün içme suyu için litre başına 50 µg Cr (VI) sınırını aşan değerlerde bulunmuştur [150]. Ticari olarak krom bileşikler krom kaplama, boyalar ve pigmentler, deri tabaklama ve ahşap korumada kullanılmaktadır. Krom ayrıca pişirme sistemlerinde ve kazanlarda antikorozyon olarak kullanılmaktadır [151]. Bu endüstriler, biyolojik ve ekolojik türler üzerinde olumsuz etkisi olan krom kirliliğinde önemli bir rol oynamaktadır [152]. Çok çeşitli endüstriyel ve tarımsal uygulamalar, çevredeki toksik seviyesini artırarak kromun neden olduğu kirlilik konusunda endişelere yol açmaktadır. Çevrenin krom, özellikle altı değerlikli krom tarafından kirlenmesi, son yıllarda en büyük endişe kaynağı olmuştur [153]. Ortamda fazla oksijen bulunması nedeniyle, Cr (III) son derece toksik ve suda yüksek oranda çözünür olan Cr (VI)'ya oksitlenmektedir [154]. Ağustos 1975'te Tokyo'da, Cr (VI) yağma kütleleri içeren yeraltı suyu, izin verilen krom sınırından 2.000 kat daha yüksek bir sınıra sahipti. Ayrıca Hindistan'da, yeraltı sularındaki krom seviyesinin 12 mg L⁻¹'den ve 550-1.500 ppm L⁻¹'den fazla olduğuna tanık olunmuştur [146]. Endüstriyel atıkların deşarjı ve yeraltı suyu kirliliği, topraktaki krom konsantrasyonunu büyük ölçüde artırmıştır [155].

Her yıl 300.000'den fazla işçinin işyerinde krom ve krom içeren bileşiklere maruz kaldığı tahmin edilmektedir. Mesleki olarak Cr (VI)'ya maruz kalan endüstriyel işçilerde Cr'nin neden olduğu hastalık riskinin yüksek olması nedeniyle mesleki maruziyet büyük bir endişe kaynağı olmuştur. Yılda toplam 33 ton kromun çevreye

salındığı tahmin edilmektedir. Mesleki olmayan maruziyet, krom içeren yiyecek ve suyun yutulması yoluyla meydana gelirken, mesleki maruziyet inhalasyon yoluyla gerçekleşmektedir [147]. Krom konsantrasyonları toprakta 1 ile 3000 mg kg⁻¹ arasında, deniz suyunda 5 ile 800 µg L⁻¹ arasında ve nehirlerde ve göllerde 26 µg L⁻¹ ile 5,2 mg L⁻¹ arasında değişmektedir [156]. Genel olarak, çoğu taze gıda tipik olarak <10 ila 1.300 µg kg⁻¹ arasında değişen krom seviyeleri içermektedir [157]. İnsanların kroma maruz kalmasının ana yolunun inhalasyon ve akciğer birincil hedef organ olsa da, kroma önemli ölçüde insan maruziyetinin deri yoluyla da gerçekleştiği bildirilmiştir [158, 159]. Örneğin, inşaat işçileri arasında fark edilen yaygın dermatit insidansı, onların çimentoda bulunan kroma maruz kalmalarına bağlanmaktadır [147].

Yüksek düzeyde Cr (VI) solumak burun zarında tahriş ve burun ülserlerine neden olabilmektedir. Cr (VI) bileşiklerinin yutulmasını takiben hayvanlarda görülen başlıca sağlık sorunları mide ve ince bağırsakta tahriş ve ülserler, anemi, sperm hasarı ve erkek üreme sistemi hasarıdır. Cr (III) bileşikleri çok daha az toksiktir ve bu sorunlara neden olduğu görülmemektedir. İçme suyunda Cr (VI)'ya maruz kalan insan ve hayvanlarda mide tümörlerinde artış gözlemlenmiştir. Kromun insanlarda ve karasal memelilerde kanserojen neden olduğuna dair kanıtlar güçlü görünse de kansere neden olan mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır [147]. Schröder ve ark. (1970), sigaraların 390 g kg⁻¹ Cr içerdiğini bildirmiştir, ancak sigara yoluyla solunan krom miktarı hakkında yayınlanmış önemli bir rapor bulunmamaktadır [146].

Kromun kararsız doğası nedeniyle, yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahip tekniklerin geliştirilmesi, üzerinde çalışılması gereken önemli bir zorluktur [148]. Literatür çalışmalarında, yüksek performanslı moleküler eleme kromatografisi (HP-SEC)-endüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometrisi (ICP-MS) [160], iyon kromatografisi-ICP-MS [161], alevli atomik absorpsiyon spektrofotometri (AAS) [162], kapiler elektroforez [163] ve endüktif eşleşmiş plazma-atomik emisyon spektrometresi (ICP AES) [164] kullanılarak her iki türün seçici tayini başarıyla gerçekleştirilmiştir. ICP-MS, kromatografik tekniklerle başarılı bir şekilde kullanılan umut verici bir tekniktir, ancak özellikle numunede veya eluentte C ve Cl gibi elementler mevcut olduğunda, spektral olmayan ve spektral etkileşimlerin ortaya çıkmasından dolayı genellikle büyük bir sınırlama ortaya çıkmaktadır. AAS tekniği yeterince güvenilir

ve hassastır, ancak zaman alıcıdır. ICP-AES ve kapiler elektroforez gibi diğer teknikler, enstrümantal fiyat nedeniyle sınırlamalar sunmaktadır ve çok karmaşıktır. HPLC, tek bir prosedürde farklı türlerin eser seviyelerine kadar ayrılmasını, tanımlanmasını ve nicelenmesini sağladığı için metal tayininin analitik gereksinimlerinin çoğunu karşılayan bir tekniktir [148].

2.2 Enstrümantal Analiz Yöntemleri

Yirminci yüzyılın başlarında bilim adamları tarafından iletkenlik, elektrot potansiyeli, ışık absorpsiyonu veya emisyonu, kütle-yük oranı ve floresan gibi analitin fiziksel özelliklerinin ölçümleri nicel analiz için kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca, yüksek verimli kromatografik ve elektroforetik teknikler, kalitatif veya kantitatif tayinlerinden önce kompleks karışımların bileşenlerinin ayrılması için damıtma, ekstraksiyon ve çöktürmenin yerini almaya başlamıştır. Kimyasal türleri ayırmaya ve belirlemeye yönelik yöntemler topluca enstrümantal analiz yöntemleri olarak bilinmektedir [165].

Modern analitik kimya, genellikle çeşitli enstrümanlarla çok düşük konsantrasyonlarda hassas analitik ölçümler gerektirmektedir. Bu nedenle, bugün kimyasal analizde kullanılan enstrümantasyon bilgisi, çeşitli bilimsel alanlarda gelecekteki ilerlemeyi sağlamak için büyük önem taşımaktadır. Analitik enstrümantasyon moleküler biyoloji, tıp, jeoloji, gıda bilimi, malzeme bilimi ve diğer birçok alanda araştırma yapmak için çok önemlidir [166, 167].

2.2.1 Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, geçen yüzyılın başlangıcından kısa bir süre sonra Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından icat edilmiştir. Bu tekniği, klorofiller ve ksantofiller gibi çeşitli bitki pigmentlerini, bu bileşiklerin çözeltilerini ince bölünmüş kalsiyum karbonatla dolu bir cam kolondan geçirerek ayırmak için kullanmıştır. Ayrılan türler, sütunda renkli bantlar oluşturmuş ve Yunanca chroma (renk) ve grafi (yazmak) anlamına gelen kelimelerin birleşiminden ilham alarak bu tekniği kromatografi olarak adlandırmıştır [168]. Kromatografi uygulamaları, son yarım yüzyılda, yalnızca birkaç yeni kromatografik tekniğin geliştirilmesinden değil, aynı zamanda bilim adamlarının karmaşık karışımları karakterize etmek için daha iyi

yöntemlere olan artan ihtiyacından dolayı dikkat çekici bir şekilde büyümüştür [165].

Kromatografi, yüzeye veya katı ve sıvı sabit faza (kararlı faz) uygulanan karışım halindeki moleküllerin hareketli bir faz yardımıyla hareket ederken birbirinden ayrılması esasına dayanmaktadır. Bu ayırma işleminde etkili olan faktörler, adsorpsiyon (sıvı-katı), ayrılma (sıvı-katı) ve afinite ile ilgili moleküler özellikleri veya moleküler ağırlıkları arasındaki farklılıkları içermektedir. Bu farklılıklar nedeniyle, karışımın bazı bileşenleri sabit fazda daha uzun süre kalıp kromatografi sisteminde yavaş hareket ederken, diğerleri hızlı bir şekilde mobil faza geçerek sistemden daha hızlı ayrılmaktadır [169].

Kromatografi, karmaşık matrislerde yakından ilişkili bileşenlerinin ayrılmasına, tanımlanmasına ve belirlenmesine olanak sağlayan çeşitli ve önemli bir yöntem grubunu kapsamaktadır. Tüm kromatografik ayırmalarda numune, gaz, sıvı veya süper kritik akışkan olabilen hareketli bir fazda çözülmemektedir [170].

Bu yaklaşıma dayalı olarak üç bileşen kromatografi tekniğinin temelini oluşturmaktadır.

- Sabit faz: Bu faz her zaman bir "katı" fazdan veya "yüzeyde katı bir destek üzerine adsorbe edilen bir sıvı tabakasından" oluşmaktadır.
- Mobil faz: Bu faz her zaman "sıvı" veya "gazlı bileşenden" oluşmaktadır.
- Ayrılmış moleküller: Sabit faz, hareketli faz ve karışımın içerdiği maddeler arasındaki etkileşim türü, moleküllerin birbirinden ayrılmasında etkili olan temel bileşendir [171].

Hareketli faz sıvı ise sıvı kromatografisi (LC), gaz ise gaz kromatografisi (GC) olarak adlandırılmaktadır. Gaz kromatografisi, gazlar ve uçucu sıvılar ile katı madde karışımları için uygulanmaktadır. Sıvı kromatografisi özellikle termal olarak kararsız ve uçucu olmayan numuneler için kullanılmaktadır [172].

2.2.1.1 Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Ayırma dışında bir nicel analiz yöntemi olarak kullanılan kromatografinin uygulanmasındaki amaç, uygun bir zaman aralığında tatmin edici bir ayırma elde etmektir. Bu amaçla çeşitli kromatografi yöntemleri geliştirilmiştir [171].

Kromatografi türleri, Tablo 2.3’ te gösterildiği gibi birden çok şekilde sınıflandırılabilir.

Tablo 2.3 Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması [173]

Sınıflandırma Türü	Kromatografi Türü
Ayrırma Mekanizmasına göre	Adsorbsiyon kromatografisi Dağılma kromatografisi İyon değişim kromatografisi Jel geçirgenlik (moleküler eleme) kromatografisi Afinite kromatografisi Kiral kromatografi
Hareketli faza göre	Sıvı kromatografisi (LC) Gaz kromatografisi (GC)
Uygulanan tekniğe göre	Kolon kromatografisi Düzlem kromatografisi - İnce Tabaka Kromatografisi - Kağıt kromatografisi
Kullanım amacına göre	Analitik kromatografi (Kalitatif-Kantitatif Kromatografi) Preparatif uygulamalar

Bu kromatografi yöntemlerinin dışında boya-ligand kromatografisi ve hidroforik etkileşim kromatografisi gibi kromatografi türleri de bulunmaktadır [174, 175].

❖ İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi, iyonik bileşiklerin ayrılması ve belirlenmesi için önemli bir analitik teknik olan iyon kromatografisinin bir parçasıdır. İyon değişimi, bugüne kadar iyon kromatografisinin baskın formu olmuştur. Bu kromatografi, farklı moleküler boyutlarda ve moleküler yapıda yüklü moleküller olan peptitlerin, proteinlerin, nükleik asitlerin ve ilgili biyopolimerlerin ayrılmasında kullanılan en önemli adsorpsiyon tekniklerinden biridir. Ayrırma, yüklü biyomolekül grupları ile zıt yükü taşıyan bir iyon değişim jeli/destek arasındaki iyonik bağların oluşumuna

dayanmaktadır. Biyomoleküller, değişen yük özelliklerinden dolayı yüklü kromatografi ortamı ile farklı derecelerde etkileşim göstermektedir [176].

❖ Jel-Geçirgenlik (Moleküler Eleme) Kromatografisi

Boyut dışlama olarak da bilinen jel geçirgenlik kromatografisinde durağan faz, moleküler boyutlarda çok sayıda gözenek içeren polimerik bir maddedir. Moleküler boyutu yeterince küçük olan çözünenler, gözeneklere difüze olmak için mobil fazı terk etmektedir. Gözeneklere sığmayacak büyük moleküller mobil fazda kalır ve tutulmazlar. Bu yöntem çoğunlukla, çözünen maddelerin moleküler boyutta önemli ölçüde değiştiği karışımların ayrılması için uygundur. Bu tipteki hareketli faz, sıvı veya gaz halinde olabilmektedir [177].

❖ Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, bir protein ile onun aynı kökenli ligandı arasındaki tersinir ve spesifik bağlanmaya dayanan sıvı kromatografisinin en seçici ve çok yönlü biçimidir. Etkileşimin bu özgülüğü, afinite kromatografisinde, "afinite ligandı" olarak adlandırılan etkileşimli ajanlardan birinin sabit bir faz desteği olarak kolon üzerinde hareketsiz hale getirilmesiyle kullanılmaktadır. Hedef protein, afinite ligandı üzerinde seçici absorpsiyon ile karmaşık bir karışımdan ayrıştırılmaktadır. Hedef protein içeren kompleks karışım, diğer bileşenler geçerken hedef proteinin afinite ligandı ile bağlanması için doğru bileşime ve pH'a sahip bir mobil fazda uygulanmaktadır. Tutulan hedef daha sonra kolondan ayrıştırılmaktadır [178].

❖ İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisi (TLC), yaygın olarak kullanılan bir laboratuvar tekniğidir ve kağıt kromatografisine benzemektedir. Bununla birlikte, sabit bir kağıt fazı kullanmak yerine, düz, inert bir substrat üzerinde silika jel, alümina veya selüloz gibi ince bir adsorban tabakasının sabit bir fazını içermektedir. Kağıda kıyasla, daha hızlı çalışma, daha iyi ayırma ve farklı adsorbanlar arasında seçim yapma avantajına sahiptir. İnce tabaka kromatografisi, organik kimyasal reaksiyonların ilerlemesini takip etmek ve fitokimya ve biyoteknolojide organik bileşiklerin saflığını test etmek için en faydalı araçlar arasındadır [179].

❖ Gaz Kromatografisi

Bu yöntemde sabit faz, cihaza yerleştirilen ve inert bir katının yüzeyine adsorbe edilen bir sıvı sabit faz içeren bir kolondur. Gaz kromatografisi bir "gaz-sıvı" kromatografisidir. Taşıyıcı fazı He veya N₂ gibi gazlardan oluşmaktadır. İnert bir gaz olan hareketli faz, yüksek basınç altında bir kolondan geçirilmektedir. Analiz edilecek numune buharlaştırılmaktadır ve gaz halinde hareketli faz fazına girmektedir. Numunede bulunan bileşenler, katı destek üzerinde hareketli faz ile sabit faz arasında dağılmaktadır. Gaz kromatografisi, çok küçük moleküllerin son derece mükemmel bir şekilde ayrılması için basit, çok yönlü, oldukça hassas ve hızla uygulanan bir tekniktir. Çok az miktarda analitin ayrılmasında kullanılmaktadır [169].

❖ Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, analitik kimyadaki en güçlü araçlardan biridir. Bir sıvı içinde çözülebilen herhangi bir numunede bulunan bileşikleri ayırma, tanımlama ve miktarını belirleme yeteneğine sahiptir [180]. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisinin ana avantajı, uçucu olmayan ve sıcaklığa duyarlı bileşiklerin de analiz edilebilmesidir [181].

"Yüksek performanslı sıvı kromatografisi" ifadesi, Horváth ve ark. tarafından 1967 yılında bulunmuştur [182]. Yale'deki laboratuvarında yüzeysel olarak gözenekli "pelliküler" malzemelerle deneyler yaparken, basınç ilk kez 1000 psi'nin üzerine çıkmış ve Horváth, "bu artık sıvı kromatografi değil, bu yüksek basınçlı sıvı kromatografi" demiştir. Başka bir Macar olan Halász'ın 35 yıl önce küçük partiküllerle yaptığı vizyoner çalışması, ince partiküllerle dolu kolonların temellerini ortaya koymuş ve 1974'te olduğu gibi, 60'larda 15 bileşiğin ayrılmasını mümkün kılmıştır [183].

Kağıt, ince tabaka, iyon değişimi ve jel geçirgenlik kromatografisi biçimindeki sıvı kromatografisi, esas olarak düşük verimler ve düşük mobil faz akış oranlarından kaynaklanan uzun analiz süreleri nedeniyle aynı başarıyı elde edememiştir. Bu 'yeni' sıvı kromatografisinin ana özelliklerini tanımlamak için çeşitli isimler kullanılmıştır: yüksek hızlı sıvı kromatografisi (HSLC), yüksek verimli sıvı kromatografisi (HELC) ve yüksek basınç veya yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC). Genel kabul görmüş ismi ise yüksek performanslı sıvı kromatografisidir (HPLC) [184].

Prensibi, numune çözeltisinin gözenekli bir malzeme kolonuna (sabit faz) enjekte edilmesi ve kolondan yüksek basınçta bir sıvının (hareketli faz) pompalanmasıdır. Numunenin ayrılması, numunenin sabit ve hareketli faz arasındaki farklı dağılımından kaynaklanan kolon boyunca göç oranlarındaki farklılıklara dayanmaktadır. Farklı bileşenlerin ayrılma davranışına bağlı olarak, farklı zamanlarda elüsyon gerçekleşmektedir [185]. Sabit faza daha fazla afinitesi olan örnek bileşik, daha hızlı ve daha uzun bir mesafe için seyahat eden ve daha az afiniteye sahip bileşiklere kıyasla daha yavaş ve daha kısa bir mesafede hareket edecektir [186].

Çok sayıda organik bileşik, önceden kimyasal modifikasyon yapılmadan gaz kromatografi tarafından işlenemeyecek kadar kararsızdır veya yeterince uçucu değildir ve bu tür bileşikler için sıvı kromatografisi ilk tercih olacaktır. Daha düşük sıcaklıklar kullanılabildiğinden ve gaz kromatografisinde bir faza (sabit faz) kıyasla iki rakip faz (hareketli ve sabit) olduğundan, sıvı kromatografisi sıklıkla gaz kromatografisi ile imkansız olan ayırmaları başarabilmektedir. Ayrıca, sıvı kromatografisinde kullanım için çoğu seçici olan geniş bir dedektör seçeneği mevcuttur. Bu nedenle kolon üzerinde tam bir ayırma yapılması gerekmemekte, ancak yalnızca ilgilenilen türleri izleyecek bir dedektör seçilebilmektedir. Ayrıca, sıvı kromatografisinde geri kazanım, gaz kromatografisinden daha kolay ve nicel olarak elde edilebilmektedir. Sıvı kromatografisindeki hareketli fazın distilasyon veya başka yollarla çıkarılması gerekmesine rağmen, hareketli faz ve numune arasındaki uçuculuktaki geniş fark nedeniyle bu genellikle herhangi bir zorluk oluşturmamaktadır [184].

HPLC'nin aşağıda sıralandığı gibi birçok avantajı vardır:

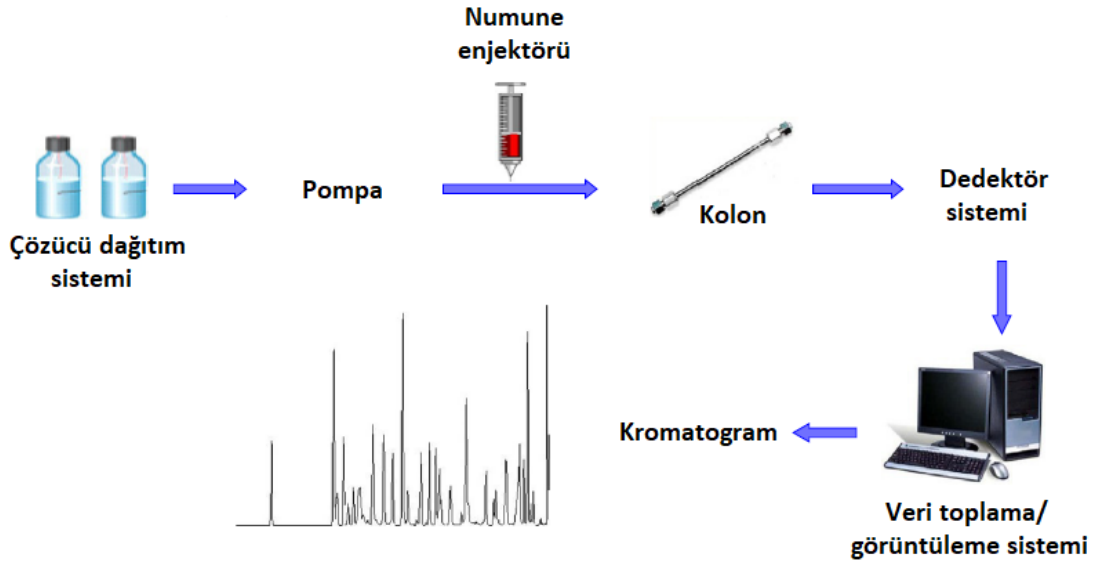
- Eşzamanlı analiz
- Yüksek çözünürlük
- Yüksek hassasiyet
- İyi tekrarlanabilirlik
- Küçük numune boyutu [187]

Bu kromatografi tekniğini kullanarak kısa sürede birçok molekülün yapısal ve fonksiyonel analizini yapmak ve saflaştırmak mümkündür. Bu teknik, ilaç etken maddelerinin [188], parabenlerin [189], pestisitlerin [190], amino asitlerin [191],

karbonhidratların [192], lipidlerin [193], nükleik asitlerin [194], proteinlerin [195], steroidlerin [196] ve diğer biyolojik olarak aktif moleküllerin ayrılmasında ve tanımlanmasında mükemmel sonuçlar vermektedir. HPLC'de hareketli faz, 10-400 atmosfer basıncında ve yüksek akış hızı ile kolonlardan geçmektedir. Bu teknikte küçük partiküllerin kullanılması ve çözücü akış hızına yüksek basınç uygulanması HPLC'nin ayırma gücünü arttırmakta ve analiz kısa sürede tamamlanmaktadır [169].

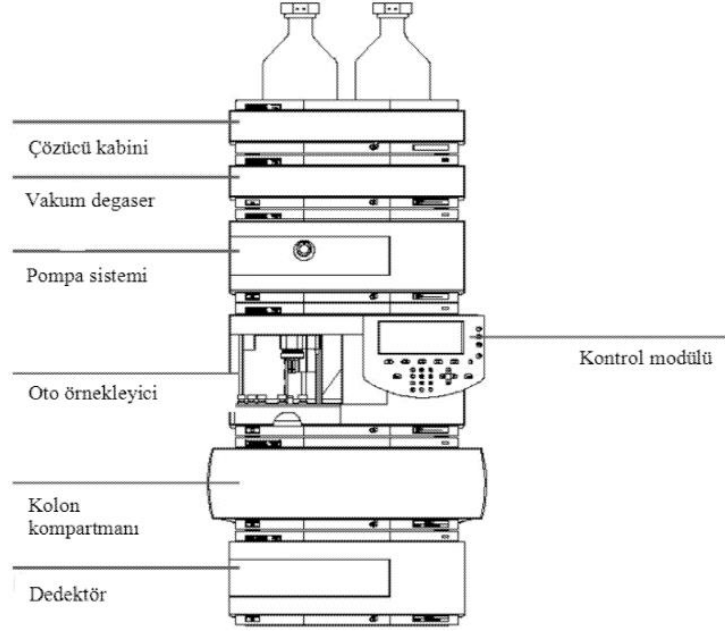
2.2.1.2 HPLC Cihazı Bileşenleri

Modern bir HPLC sistemi, bir çözücü dağıtım sistemi, pompa, numune enjektörü, kolon, dedektör sistemi ve veri toplama/görüntüleme sistemleri ile donatılmıştır. Şekil 2.1, bir HPLC sisteminin şematik diyagramını göstermektedir.



Şekil 2.1 HPLC sisteminin şematik diyagramı [197]

Mobil faz, bir hazneden akış hızını kontrol eden ve hareketli fazı kolondan geçirmek için yeterli basınç üreten bir pompadan çekilmektedir. Pompa akışını durdurmadan numuneyi kolona yerleştirmek için bir enjektör veya otomatik numune alıcı kullanılmaktadır. Ayırma, genellikle bir kolon fırınının içinde bulunan kolonda gerçekleşmektedir. Dedektör, çalışma sırasında analit konsantrasyonundaki değişikliklere yanıt vermektedir. Bir veri sistemi, dedektör çıktısını izlemekte ve verilerin hem grafik hem de tablo çıktısı için veri işlemlerini sağlamaktadır [198]. HPLC cihazının ayrıntılı görünümü, Şekil 2.2' de görüldüğü gibidir.



Şekil 2.2 Tipik bir HPLC cihazının ayrıntılı görünümü [199]

➤ Mobil Faz ve Hazneleri

Mobil fazın tipi ve bileşimi, bileşenlerin ayrılmasını etkilemektedir. Farklı HPLC türleri için farklı çözücüler kullanılmaktadır. Mobil fazı hazırlamak için kullanılan çözücülerin ve inorganik tuzların saflığı çok önemlidir. En uygunu, belirli uygulamaya bağlı olarak mevcut ve pratik olan en yüksek saflıktaki çözücüü kullanmaktır [200].

Çözücü hazneleriyle ilgili olarak, modern HPLC sistemleri, 200–2000 mL'lik bir veya daha fazla cam veya paslanmaz çelik hazneler ile donatılmıştır. Çözücüler genellikle bant yayılmasına neden olabilecek ve dedektörlerin performansına müdahale edebilecek çözünmüş gazlara ve toza sahiptir. Bu nedenle çözücü hazneleri, çözünen gazları ve tozu gideren gaz giderici ve filtre içermektedir. Sonuç olarak daha iyi çözünürlük elde etmek, pompa sisteminin çalışmasını iyileştirmek, kolonun ömrünü artırmak ve temel sinyalin arka planını azaltmak mümkündür [197]. Gaz gidericilerin ve filtrelerin HPLC sisteminin ayrılmaz parçaları olması gerekli değildir. Çözücülerini hazneye girmeden önce işlemenin uygun yollarından biri, onları vakum altında bir milipor filtreden süzmektir. Bu işlem, gazların yanı sıra askıdaki maddeleri de gidermektedir [165].

➤ Enjektörler

Enjektörün rolü, numuneyi içeren bir çözeltinin küçük, hassas bir şekilde ölçülmüş hacmini mobil faza (doğru ve tekrarlanabilir bir şekilde) yerleştirmektir. Geleneksel HPLC sistemleri, 1 µL ila 100 µL arasında numune çözeltisi enjekte edebilen enjektörlere sahiptir ve enjeksiyon için kullanılan tipik hacimler 1 µL ile 25 µL arasındadır. Daha büyük bir enjeksiyon hacmi, kromatografik kolona daha fazla analit yerleştirmekte, bu da duyarlılıkta bir artışa izin vermektedir. Ancak bazı durumlarda bu, kromatografik pikin şeklini etkilemektedir [201].

Sıvı kromatografisinde ölçümlerin doğruluğundaki sınırlayıcı faktör, numune enjeksiyonundaki tekrarlanabilirliktir. Temel sorun, pik deformasyonları ve hatta çift pik noktasıdır. Bu nedenle, küçük enjeksiyon hacmi ile çalışmak ve sistemin basıncını düşürmeden numuneyi vermek önemlidir. Numunelerin kolona enjeksiyonu manuel olarak veya otomatik enjeksiyon ile yapılabilir [197]. Sıvı kromatografisi için sıvı numuneler doğrudan enjekte edilebilmekte ve katı numunelerin sadece uygun çözücüde seyreltilmesi gerekmektedir [200].

➤ Pompalar

Genellikle solvent dağıtım sistemi olarak adlandırılan HPLC pompası, belirli bir bileşimin hareketli fazlarının kolona hassas bir şekilde akışını sağlamaktadır. Yüksek basınçlar altında (6000 psi veya 400 bar) HPLC kolonlarına ortak mobil fazların sabit akışını (0,1–10 mL dak⁻¹) sağlamaktadır. En yaygın HPLC solventleriyle uyumlu metallerden ve diğer malzemelerden veya polimerlerden oluşan bir akış yoluna sahiptir. Aynı zamanda izokratik veya gradyan işlemi için doğru bileşim kontrolü ile iki veya daha fazla çözücünün karıştırılmasına izin vermektedir. Diğer HPLC modülleriyle uyumlu boyutlar, çalıştırması ve bakımının kolay olması, gradyan gecikme sürelerini en aza indirmek için düşük bekleme hacimleri ve biyouyumluluk, bir HPLC pompasından istenen genel özelliklerdir [202].

İzokratik Elüsyon: Elüsyonun başlamasından sonra solvent oranı kromatografik çalışma boyunca sabit tutulmaktadır. Bu yöntemin en büyük dezavantajı, bu kromatografik koşullar altında, hareketli faza benzer bir polariteye sahip olan bileşen karışımının iyi ayrılmamasıdır. Ayrıca tüm bileşiklerin elüsyonu uzun zaman alabilmektedir.

Gradyanlı elüsyon: Çözücü oranı, lineer bir gradyan veya çok adımlı lineer gradyan takip edilerek çalışma boyunca değiştirilmektedir. Önemli ölçüde farklı polariteye sahip iki veya üç farklı çözücü kullanılmaktadır ve analitlerin daha kısa bir analiz süresinde ayrılmasını sağlamaktadır [197].

Sıvı kromatografik pompalar tarafından üretilen yüksek basınçlar, sıvılar çok sıkıştırılabilir olmadığından patlama tehlikesi oluşturmamaktadır. Bu nedenle, bir bileşenin bozulması yalnızca çözücü sızıntısına neden olmaktadır. Bununla birlikte, bu tür bir sızıntı, bazı çözücüler ile yangın veya çevresel tehlike oluşturabilmektedir [177].

➤ Kolonlar

Kolon veya sabit faz, herhangi bir kromatografik sistemin çekirdeğidir. Kolonlar farklı uzunluklarda, iç çaplarda ve dolgu malzemelerinde ticari olarak mevcuttur. Uygun mobil faz ile bağlantılı olarak doğru uzunluk ve dolgu malzemesi kombinasyonunun kullanılması, bir numune bileşiğinin en etkili şekilde ayrılmasına yardımcı olabilmektedir. Farklı ayırma türleri için farklı kolon boyutları, farklı dolgu malzemeleri ve akış hızları kullanılabilmektedir [203].

HPLC ayırmaları için en yaygın olarak kullanılan dolgu malzemeleri silika bazlıdır. En popüler malzeme, C18 kaplama içeren oktadesil-silikadır (ODS-silika), ancak C1, C2, C4, C6, C8 ve C22 kaplamalı malzemeler de mevcuttur. Kolon dolgu malzemeleri türleri arasında zirkonyum, polimer bazlı ve monolitik kolonlar bulunmaktadır.

Genel olarak, sıvı kromatografi kolonları, doğası gereği tahrip edici bir şekilde kullanılmadıkları sürece, uzun bir hizmet ömrü ile oldukça dayanıklıdır. Kolon bozulması kaçınılmazdır, ancak uygun bakım ile kolon ömrü uzatılabilmektedir. Numune çalışmalarını takiben yüksek elüsyon gücüne sahip mobil fazlı bir kolonun yıkanması esastır. Bir kolon kullanılmadığında, kurumasını önlemek için kapatılmalıdır. Partikül numunelerinin filtrelenmesi gerekmekte ve mümkün olduğunda bir koruma kolonu kullanılmalıdır. Sütun rejenerasyonu, bir sütuna bir miktar hayat aşılayabilir, ancak önleyici bakım, erken bozulmayı önlemenin anahtarıdır [200].

○ **Analitik Kolonlar**

Çoğu sıvı kromatografik kolon, 5 ila 25 cm uzunluğundadır. Analitik kolonların iç çapı genellikle 3-5 mm'dir; kolonların en yaygın parçacık boyutu 3 veya 5 µm'dir. En yaygın kolonlar 10 veya 15 cm uzunluğunda, 4,6 mm iç çapta ve 5 µm partiküllerle doludur [165].

○ **Emniyet Kolonları**

Emniyet kolonu, analitik kolona benzer bir sabit faz ile doldurulmuş kısa bir kolondur. Koruma kolonunun amacı, yüksek oranda tutulan bileşikler ve partikül gibi safsızlıkların analitik kolona ulaşmasını ve bu kolonu kirletmesini önlemektir. Koruma kolonu düzenli olarak değiştirilmelidir. Emniyet kolonları, analitik kolonun ömrünün uzatılmasına hizmet etmektedir [165].

➤ **Dedektörler**

Bir HPLC sisteminde dedektör, fiziksel veya kimyasal bir özelliği, konsantrasyon veya kimliğe karşılık gelen ölçülebilir bir sinyale dönüştürmekten sorumlu bileşendir. HPLC'nin ilk günlerinde, algılama genellikle fraksiyonlar toplanarak ve çevrimdışı olarak analiz edilerek gerçekleştirilmekteydi. HPLC için ilk çevrimiçi dedektörler 1940'lara ve 1950'lere kadar kullanılmıştır [204]. HPLC için daha hassas evrensel dedektörler arayışı, araştırmacıları HPLC'de kullanım için gaz kromatografi dedektörlerini uyarlamaya yöneltmiştir. Ancak HPLC mobil fazının kaldırılması, başlangıçta uygulanabilirliği sınırlamıştır. Bununla birlikte, 1960'larda HPLC için ilk ultraviyole dedektör tanıtılmış ve sonraki tasarım iyileştirmeleri daha iyi hassasiyete ve değişken dalga boyu ve diyot dizisi dedektörleri gibi çeşitli iyileştirmeler sağlamıştır. Gaz kromatografi-Alev iyonizasyon dedektörü (GC-FID) hassasiyet seviyelerine sahip gerçekten evrensel bir HPLC dedektörü hala zor olsa da, çok çeşitli genel veya özel HPLC uygulamaları için çok başarılı olan birçok farklı dedektör türü geliştirilmiştir [205].

Bir dedektör seçerken göz önünde bulundurulması gereken birçok özellik vardır. Hiçbir dedektör bu özelliklerin tümüne sahip olmadığı için, zaman içinde belirli bir zorluğa cevap vermek için çok sayıda dedektör tasarlanmış, üretilmiş ve satılmıştır. Kullanım kolaylığı, öngörülebilirlik ve tekrarlanabilirlik çok önemli özelliklerdir [206].

Bir dedektörden istenecek özellikler aşağıda sıralandığı gibidir [206]:

- Yüksek hassasiyet ve tekrarlanabilir, öngörülebilir yanıt
- Tüm çözünenlere yanıt verme
- Geniş doğrusal dinamik aralık; çözünen miktarı ile lineer olarak artan tepki
- Sıcaklık ve mobil faz akışındaki değişikliklerden etkilenmeyen yanıt
- Mobil fazdan bağımsız olarak verilen yanıt
- Ekstra kolon bant genişlemesine katkıda bulunmama
- Güvenilir ve rahat kullanım
- Tespit edilen pik noktası hakkında niteliksel ve niceliksel bilgi sağlama
- Hızlı cevap

HPLC'de kullanılan ana dedektör türleri kırılma indeksi (RI), ultraviyole (UV-Vis) ve floresandır. Ancak diyot dizisi, elektrokimyasal ve iletkenlik dedektörleri de kullanılmaktadır. Her dedektörün en etkili olduğu durumlar, sınırlamalar ve numune türleri vardır [207].

○ **Ultraviyole/Görünür Dedektörler:**

Bileşiklerin çoğunun UV veya görünür bölgede absorbe etmesinden dolayı en yaygın kullanılan HPLC dedektörleri UV dedektörleridir. Ayırıcı moleküllerin fonksiyonel grubuna bağlı olarak bileşiklerin sınıfına veya belirli bileşiklere spesifik yanıt vermektedirler. Optik dedektörler için çalışmanın temeli, dedektör akış hücresinden bir elektromanyetik radyasyon ışını geçtiğinde yoğunluktaki değişiktir [208]. Bu dedektörler üç farklı tiptedir: Sabit dalga boyu dedektörleri, değişken dalga boyu dedektörleri ve diyot dizisi dedektörleri [209].

○ **Sabit Dalga Boyu Dedektörleri:**

Bu tip dedektörler radyasyonun dalga boyunda değişikliğe izin vermemektedir. Çalışma dalga boyunun kısıtlı olması nedeniyle günümüzde bulunması zordur.

○ **Değişken Dalga Boyu Dedektörleri:**

Değişken dalga boyu dedektörleri, tam UV-görünür bölge üzerinde herhangi bir dalga boyunda çalışacak şekilde ayarlanabilmektedir.

- **Diyot Dizi Dedektörleri:**

Diyot dizi dedektöründe, numune, bir kerede lamba tarafından üretilen tüm dalga boylarındaki ışığa maruz bırakılmaktadır. Emisyon kaynağından gelen ışıklar, akromatik bir mercek sistemi tarafından hizalandığında, toplam ışık, dedektör hücrelerinden holografik bir ızgaraya geçmekte ve daha sonra yüzlerce diyot içeren bir diyot dizisine düşmektedir. Kromatogram, çalışmanın sonunda söz konusu diyot üzerine düşen UV dalga boyu kullanılarak üretilmektedir. Diyot dizi dedektörleri, analitin farklı dalga boylarındaki tepkisini tek seferde görmeye yardımcı olmakta, böylece zaman ve enerji tasarrufu sağlamaktadır [208].

- **Veri Toplama/Görüntüleme Sistemleri**

Dedektör sinyali elektronik olduğundan, modern veri toplama tekniklerinin kullanılması sinyal analizine yardımcı olabilmektedir. Çoğu HPLC sisteminin veri toplama sistemi bir bilgisayardır. Bilgisayar, dedektörün tepkisini her bir bileşene entegre etmekte ve bunu okunması ve yorumlanması kolay bir kromatografa yerleştirmektedir. Bu özellikler, bilgisayar kontrollü otomatik enjektörleri, çoklu pompa gradyan kontrolörlerini ve numune fraksiyon toplayıcılarını içermektedir [200].

2.2.1.3 HPLC Türleri

Literatürde bir dizi sıvı kromatografi türü vardır. Bu sınıflandırma, sadece ayrılmanın arkasındaki mekanizma değil, aynı zamanda sabit ve hareketli faz özellikleri ve çeşitli kriterler dikkate alınarak yapılmaktadır [181].

- ❖ **Ters Faz Kromatografisi**

Ters faz kromatografisi, sabit faz yüzeyinin hareketli fazdan daha az polar olduğu kolonlarda gerçekleştirilmektedir. Ters fazlı ayırmalar için en sık kullanılan kolon dolguları, mikro gözenekli silika parçacıklarına kimyasal olarak bağlı oktadesil (C-18), oktil (C-8), fenil veya siyano-propil gibi bir liganda sahiptir. Silika parçacıkları küresel veya düzensiz şekilli olabilmekte ve reaksiyona girmemiş silanol grupları içerebilmektedir. Tüm HPLC ayırımlarının %65'inden fazlasının (muhtemelen %90 kadar yüksek) ters faz modunda yürütüldüğü tahmin edilmektedir. Bunun gerekçesi, ters faz yönteminin basitliğini, çok yönlülüğünü ve kapsamını içermektedir. Hidrokarbon benzeri sabit fazlar, mobil faz bileşimindeki

değişikliklerle hızla dengelenir ve sonuç olarak, gradyanlı elüsyon ile kullanım için çok uygundur [210]. Analitin artan hidrofobikliği ile alıkonma süresi artmaktadır. İzokratik, kademeli gradyan veya sürekli gradyan modlarında çalıştırılabilmektedir [181].

❖ Normal Faz Kromatografisi

Normal faz kromatografisinde hareketli faz polar değildir ve sabit faz polardır. Bu nedenle, sabit faz polar analiti tutmaktadır. Çözünen moleküllerin polaritesindeki bir artış, artan elüsyon süresine yol açan adsorpsiyon kapasitesini arttırmaktadır. Sabit faz olarak bu kromatografide kimyasal olarak modifiye edilmiş silika (siyanopropil, aminopropil ve diol) kullanılmaktadır [211]. Örneğin, tipik bir kolonun iç çapı yaklaşık 4,6 mm ve uzunluğu 150 ila 250 mm arasındadır. Kolondan geçen karışımdaki polar bileşikler, polar olmayan bileşiklere göre polar silikaya daha uzun süre yapışacaktır. Bu nedenle, polar olmayanlar kolondan daha hızlı geçecektir [212].

2.2.1.4 Kromatografik Verimlilik Parametreleri

Kolonların kromatografik performansları, alıkonma faktörü, çözünürlük, teorik plaka sayısı ve teorik plaka yüksekliği gibi bazı parametreler aracılığıyla açıklanmaktadır. Analizler sonunda elde edilen kromatogramlar aracılığıyla monolitik kolonlara gönderilen analitlerin her biri için bu parametreler hesaplanmaktadır [181].

2.2.2 Spektroskopik Yöntemler

Spektroskopi, elektromanyetik radyasyonun madde ile etkileşiminden kaynaklanan spektrumların üretimi, ölçümü ve yorumlanması ile ilgilenmektedir. Çok çeşitli analitik problemleri çözmek için birçok farklı spektroskopik yöntem mevcuttur. Yöntemler, analiz edilecek türe (moleküler veya atomik spektroskopi gibi), izlenecek radyasyon-madde etkileşiminin tipine (absorpsiyon, emisyon veya kırınım gibi) ve analizde kullanılan elektromanyetik spektrumun bölgesine göre farklılık göstermektedir. Spektroskopik yöntemler çok bilgilendiricidir ve hem nicel hem de nitel analizler için yaygın olarak kullanılmaktadır [213].

Ultraviyole (UV), görünür (Vis), kızılötesi (IR) ve radyo (nükleer manyetik rezonans, NMR) frekans aralıklarında radyasyonun absorpsiyonuna veya emisyonuna dayanan spektroskopik yöntemler yaygın kullanım alanına sahiptir. Bu yöntemlerin her biri, farklı moleküler veya atomik geçiş türlerini izlemesi bakımından farklıdır [214].

2.2.2.1 Atomik Absorpsiyon Spektrometresi

Atomik absorpsiyon spektrometresi (AAS), analitik amaçlar için en yaygın kullanılan tekniklerden biridir [215]. Araştırma laboratuvarlarında ve ayrıca gıda, çevre, ilaç, petrol ve diğer sektörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır [216-220].

1955'te Avustralyalı bir bilim adamı olan Alan Walsh, modern atomik absorpsiyon spektrometrisini literatüre tanıtmıştır (Şekil 2.3). Mineraller, metaller ve alaşımlardaki elementlerin belirlenmesi çok önemli bir analitik konu olduğundan bu tekniğin tanıtılması, önemli bir hale gelmiştir. O günlerde, moleküler spektrumlar genellikle absorpsiyonda ve atomik spektrumlar emisyonda elde edilmiştir. Ayrıca, teknik birçok analitik kimyacı tarafından, genellikle numunelerin tamponlama, kompleksleştirme, ekstraksiyon ve diğer işlem adımları gibi bazı kimyasal ön işlemlerini gerektiren spektrofotometrik yöntemlere güçlü bir alternatif olarak memnuniyetle karşılanmıştır [221].



Şekil 2.3 AAS'nin Walsh tarafından yapılmış bir tasarımı [222]

Atomik absorpsiyon spektrometrisi, eser seviyelerde 70'e kadar elementin kalitatif ve kantitatif tayini için en popüler spektroskopi tekniklerinden biridir. Atomik absorpsiyon tekniği, bir atomizörde oluşturulan serbest atomlar tarafından ışığın seçici absorpsiyonunun ölçülmesine dayanmaktadır. Bu işlemle numune, atomizasyon olarak bilinen bir işlemle gaz halindeki serbest atomlara dönüştürülmekte ve serbest atomlar bir kaynaktan optik radyasyonu (ışık) emmektedir. Yüksek hassasiyet, düşük temel gürültü ve yüksek verimli numune girişi elde etmek için atomik absorpsiyon spektrometrisi tekniği, atomizasyon ve numune girişi prosedürlerine bağlı olarak birkaç kategoriye ayrılabilir [221]. Alevli atomik absorpsiyon spektrometrisi (AAAS) [223], elektrotermal atomizasyon atomik absorpsiyon spektrometrisi (ETAAS) [224] ve kimyasal buhar oluşturma atomik absorpsiyon spektrometrisi (CVG AAS) [225] olmak üzere üç farklı atomizasyon prosesi ile kullanılabilir.

2.2.3 Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometresi

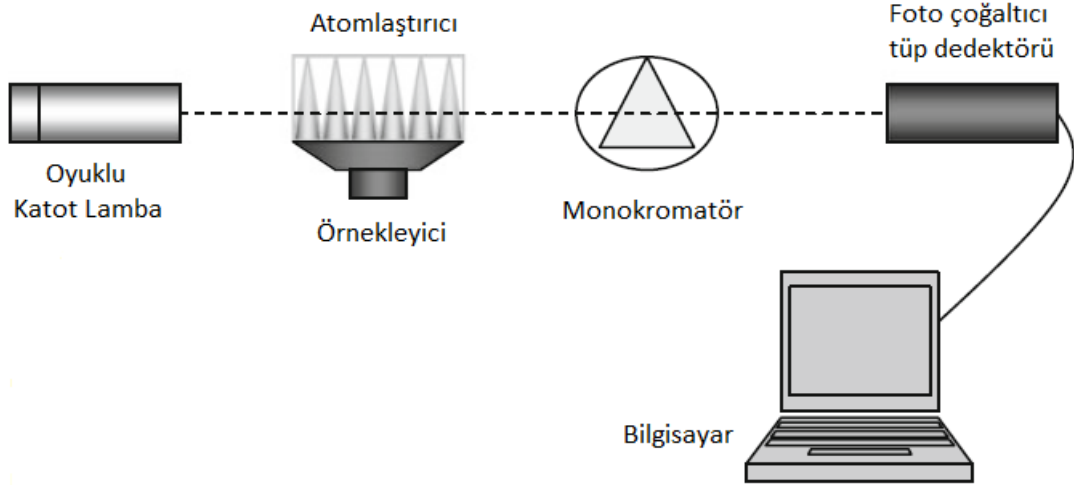
Alev, atomik absorpsiyon spektrometrisinde hala en sık kullanılan atomizördür [226]. Alevli atomik absorpsiyon spektrometresi (AAAS), sağlamlığı, basit, ucuz ve interferanssız çalışma özellikleri nedeniyle eser metal tayini için en yaygın kullanılan analitik tekniktir. Bu teknik, kısa analiz süresi ve çoğu metale duyarlılığı nedeniyle rutin analizler için tercih edilmektedir [227, 228]. Kullanılan alev sistemleri normalde hava-asetilen veya nitröz oksit-asetilendir [226]. Hava oksidan olduğunda, çeşitli yakıtlarda 1700 – 2400 °C sıcaklıklar meydana gelmektedir. Bu sıcaklıklarda, sadece kolayca ayrılan numuneler atomize edilmektedir. Bu nedenle atomize edilmesi daha zor numuneler (refrakter numuneler) için oksidan olarak oksijen veya nitröz oksit kullanılmalıdır. Bu oksidanlar, yaygın yakıtlarla 2500 °C ila 3100 °C arasında sıcaklıklar üretmektedir [165].

Geleneksel alevli atomik absorpsiyon spektrometrisinin duyarlılığı çeşitli faktörlerle sınırlıdır. Alevde oluşan analit atomları, numune aspirasyonu sırasında hızla ve sürekli olarak ölçüm bölgesinden geçmekte ve sadece atomların kararlı durum konsantrasyonu ölçülmektedir. Diğer bir sınırlama ise, nebulizatör/alev başlığı sisteminin zayıf verimliliğidir. Aspire edilen numune çözeltisinin maksimum %10'u aleve ulaşmaktadır.

AAAS olgun bir analitik tekniktir. Bununla birlikte, örnek çözelti girişinin verimliliğini artırarak yöntemin yeteneklerini genişletmek için sürekli iyileştirmeler yapılmakta ve geliştirilmektedir. Atomik buharın kaynak ışında daha uzun süre kalması için kısıtlanabilmesi ve ayrıca numunenin verimsiz bir nebulizasyon işlemi olmadan veya bir ön işlem olmaksızın sisteme verilebilmesi durumunda hassasiyetlerin iyileştirilebileceği görülmektedir. Bununla birlikte, çoğunlukla bazı elementler için duyarlılığı iyileştirmeyi ve interferans etkilerini en aza indirmeyi amaçlayan birçok çalışma yapılmıştır [226].

2.2.3.1 AAAS Cihazı Bileşenleri

Tipik bir atomik absorpsiyon spektrometresi, fotonları sağlamak için bir ışık kaynağından, numune girişinin sağlandığı örnekleyiciden, serbest analit atomları oluşturmak için bir atomlaştırıcıdan, ilgilenilen dalga boyunu izole etmek için bir monokromatörden ve bir foto çoğaltıcı tüp dedektöründen oluşmaktadır (Şekil 2.4) [229].

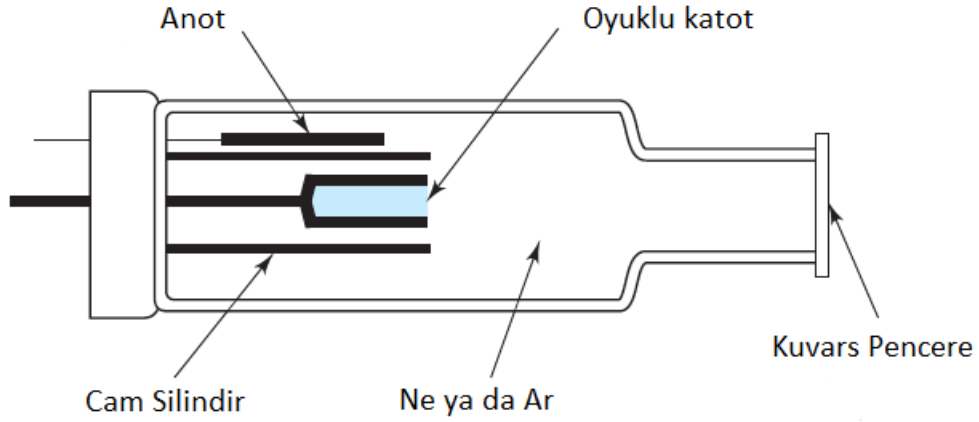


Şekil 2.4 AAAS şematik diyagramı

➤ Işık Kaynağı

Işık kaynağının temel gereksinimi, yüksek bir sinyal-gürültü oranının elde edilmesini sağlamak için yeterli yoğunluğa sahip, kararlı ve tekrarlanabilir bir veri elde etmektir [230]. Atomik absorpsiyon spektrometrelerinde oyuklu katot lamba ve elektrotsuz bir deşarj lambası olmak üzere iki temel ışık kaynağı türü

kullanılmaktadır. Daha yaygın olarak Şekil 2.5' te gösterildiği gibi oyuklu katot lamba kullanılmaktadır [214, 230].



Şekil 2.5 Oyuklu katot lambasına ait gösterim

Oyuklu katot lambaları, 1 ila 5 torr arasında bir basınçta argon veya neon ile doldurulmuş oyuklu bir tüp, tungstenden yapılmış bir anod ve ölçülen elementin metalik formundan yapılmış bir katottan oluşmaktadır [214]. Katot, spektrumu istenen veya o metalin bir katmanını desteklemeye yarayan metalden yapılmaktadır. Soy gazın iyonlaşması, elektrotlara 300 V düzeyinde bir potansiyel farkı uygulandığında meydana gelmektedir. Böylece, iyonlar ve elektronlar elektrotlara göç ederken yaklaşık 5 ila 15 mA'lık bir akım üretmektedir [165]. Neonun iyonlaşma potansiyeli argonunkinden daha yüksektir ve neon spektrumu da spektral çizgiler açısından daha az zengindir. Bu nedenle neon daha yaygın olarak kullanılmaktadır [231].

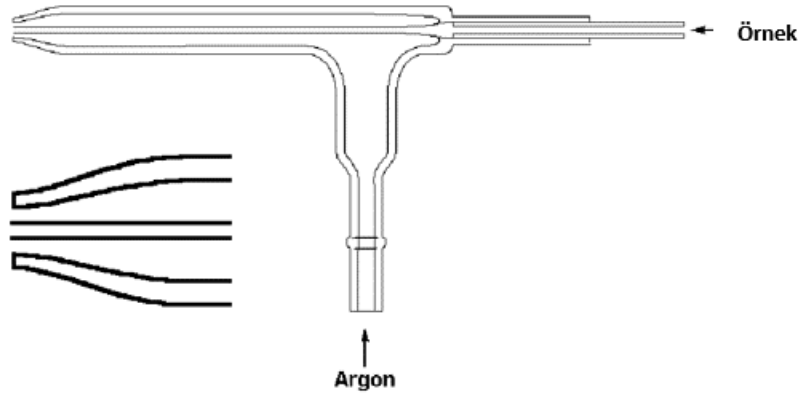
Her bir oyuk katot, katotta kullanılan metalin spektrumunu yaymaktadır. Bu nedenle belirlenecek her farklı element için farklı bir oyuklu katot lamba kullanılmalıdır. Birden fazla elementten bir katot oluşturmak mümkündür. Bunlara "çok elementli" oyuklu katot lambalar denir ve katottaki tüm elementlerin belirlenmesi için kullanılabilir [167].

Elektrotsuz deşarj lambaları, arsenik ve selenyum gibi analitler dışında oyuklu katot lambalardan daha az kullanılmaktadır. Bu lambalar, mikrodalga enerjisi veya radyo frekansı enerjisi kullanılarak uyarılabilir. Radyo frekansı ile uyarılan lambalar, mikrodalgayla uyarılan lambalardan daha az yoğundur, ancak yine de standart bir oyuklu katot lambadan 5-100 kat daha yoğundur. Arsenik ve selenyum

gibi analitler için bu lambalar, HCL'lerden daha iyi bir sinyal-gürültü oranı verir ve daha uzun bir kullanım ömrüne sahiptir [230].

➤ Örnekleyici

AAAS'de, etkili atomik buhar üretimi için numune çözeltisinin alev atomizörüne sıvı aerosol şeklinde verilmesi gerekmektedir. Bu amaçla bir nebulizatör ve sprej odası kullanılmaktadır. AAAS sisteminde kullanılan tipik bir nebulizatör Şekil 2.6' da gösterildiği gibidir.



Şekil 2.6 Nebulizatör şematik görünümü [232]

Bir püskürtücünün kullanılmasıyla, numune çözeltisi bir kılcal boru tarafından çekilmekte ve hızlı hareket eden yakıt ve oksitleyici gazlar tarafından kılcal borudan çıkarken bir aerosol oluşturmak üzere küçük sıvı damlacıklarına bölünmektedir. Oluşan sıvı damlacıkların boyutları farklıdır. Daha büyük damlacıklar, kuvars, seramik, cam veya teflondan yapılmış bir darbe boncuğu ile daha da küçük parçalara ayrılmaktadır. Aerosol daha sonra büyük damlacıkların tahliyeye gönderildiği ve küçük damlacıkların aleve taşınmasına izin verildiği sprej odasına geçmektedir [167, 228, 230]. Bu işlem sırasında numunenin sadece küçük bir kısmı (%1-10) aleve ulaşmakta ve bu numune kaybı sistemin hassasiyetini büyük ölçüde etkilemektedir [233].

➤ Atomizör

Atomizör, analitin atomize edildiği 'yer'dir. Görevi mümkün olduğu kadar temel halde serbest atomlar üretmek ve bunları absorpsiyon hacminde mümkün olduğu kadar uzun süre tutmaktır. Atomik absorpsiyon spektroskopisinin duyarlılığı, analit elementin atomizasyon derecesi ile doğru orantılıdır ve bu da atomizörün etkinliğine bağlıdır [234] [221].

Analit atomları genellikle numunede tuzlar, moleküler bileşikler veya kompleksler olarak bulunmaktadır. Atomizör, bu türleri indirgenmiş, serbest gaz fazlı atomik duruma dönüştürmelidir. Atomizör bunu genellikle termal enerji ve bazı kimyasal yollarla yapmaktadır [232].

AAS'de kullanılan yaygın atomizörler; alev, grafit fırın, alev tüplü, kuvars tüplü atomizör ve yarıklı kuvars tüplü atomizördür [221].

○ **Alev Atomizörleri**

AAAS'ta temel hal atomlarını elde etmek için alev atomizörleri kullanılmaktadır. AAAS'de en çok kullanılan alevler hava/asetilen ve nitröz oksit/asetilen alevleridir. Hava/asetilen alevi maksimum yaklaşık 2500 K sıcaklık sağlayabilirken nitröz oksit/asetilen alevi 3000 K'in üzerinde sıcaklık sağlayabilmektedir [235]. Alev, yakıt-oksidan oranında değişen üç bölgeye sahiptir.

Yakıt-oksidan oranının kimyasal süreçler üzerinde büyük etkileri olabilmekte ve bu da ölçüm hassasiyetinin azalmasına neden olabilmektedir [236]. Alev bölgeleri, birincil yanma bölgesi, ara bölge ve ikincil yanma bölgesidir. Birincil yanma bölgesi mavi bir renge sahiptir ve $C_2\cdot$, $CH\cdot$, $CHO\cdot$ gibi radikaller açısından zengindir. Yanma reaksiyonları daha çok bu bölgede gerçekleşmektedir. Analitler bu bölgede yüksek enerjili gaz molekülleri ile çarpışmalar sonucu atomize olurlar. Ara bölge, sabit bir sıcaklığa ve homojen bir bileşime sahiptir. Bu bölgede serbest analit atomları yaygındır ve radikallerin düşük mevcudiyeti nedeniyle girişim etkisi olasılığı düşüktür. İkincil yanma bölgesinde, karbon dioksit gibi yanma ürünlerinin yanında atomların kararlı metal oksitlere dönüşümü gerçekleşmektedir. Alevin ara bölgesinde serbest atomların yaygın olarak bulunması, bu bölgeyi absorpsiyon ölçümleri için uygun hale getirmektedir [165, 237, 238].

Alev atomizörü, bir nebulizatör ve bir alev başlığından oluşmaktadır. Alev başlığı, 5-10 cm uzunluğunda bir alev üretebilen uzun, dar bir yuvayı içermektedir. Bu, ölçümün hassasiyetini artıran uzun bir yol uzunluğu sağlamaktadır.

Alev özellikleri, oksitleyici/yakıt oranları ayarlanarak ve oksitleyici ve yakıt seçimiyle değiştirilebilmektedir. Üç tür alev vardır:

- Stokiyometrik alev, stokiyometrik miktarlarda oksidan ve yakıttan üretilmektedir. Böylece yakıt tamamen yanmakta ve oksidan tamamen tüketilmektedir.
- Yakıtça-zayıf alev, en sıcak alevdir ve berrak mavi bir görünüme sahiptir.
- Yakıtça-zengin alev, nispeten soğuk bir alevdir ve sarı bir renge sahiptir.

Alev atomizörleri, kararlı ve kullanımı kolay olma avantajına sahiptir. Bununla birlikte, numunenin çoğu aleve asla ulaşmadığından ve numunenin alev içinde kalma süresi kısa olduğundan duyarlılık nispeten düşüktür [214].

➤ **Monokromatör**

Monokromatör, yalnızca ilgilenilen analite özgü dalga boyundaki ışığın ölçülmesini sağlamak için kullanılan bir izolasyon cihazıdır [230]. Alev ile dedektör arasındaki optik yola yerleştirilmiştir [214]. Tüm dalga boylarındaki ışık, monokromatöre bir giriş yarığından girmekte ve daha sonra bir prizma veya daha yaygın olarak bir kırınım ızgarası kullanılarak belirli dalga boylarına bölünmektedir. Bu dağıtıcı elementin konumunu değiştirerek, sadece istenen dalga boyundaki ışık çıkış yarığından dedektöre geçmektedir. Atomik absorpsiyon yöntemi çok spesifik olduğundan, çok yüksek çözünürlüklü monokromatörler gerekli değildir. Bu nedenle, bir atomik absorpsiyon monokromatörünün odak uzaklığı genellikle 0,25 veya 0,5 m'dir. Bir monokromatör, herhangi bir anda yalnızca bir dalga boyunun ölçülmesini sağlamaktadır; bu da atomik absorpsiyon spektroskopisinin bir dezavantajıdır [230].

➤ **Dedektör**

Bir monokromatörün çıkış yarığından geçen ışığın yoğunluğu, bir dönüştürücü tarafından bir elektrik sinyaline dönüştürülmektedir. AAS tekniklerinde foto çoğaltıcı tüpler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir foto çoğaltıcı tüp, bir foto yayan katot, bir anot ve dinotlar içermektedir. Katot, fotonlardan etkilendiğinde elektron yayan bir element karışımı veya bir alkali metal ile kaplanmış bir metalden yapılmıştır. Elektronlar ilave dinotlarla çarpılır ve her bir dinodun ürettiği elektronlar ilk elektronlardan daha fazladır. Elektrik akımı yükseltildikten ve elektronikler tarafından işlendikten sonra bir sinyal üretilmektedir [167, 239, 240].

2.2.4 Dijital Görüntü Tabanlı Kolorimetri

Enstrümental cihazlar doğru ve kesin sonuçlar sağlayabilmekle birlikte gerekli enstrümantasyon özelliklerine, çok yönlülüğüne ve verimine bağlı olarak oldukça maliyetli olabilmektedir. Düşük ve orta gelirli ülkelerdeki laboratuvarlar tipik olarak bu pahalı aletleri karşılayamamakta, ekipmanın bakımı için gerekli bileşenlere, personele ve uzmanlığa erişimleri bulunmamakta ve/veya çalışır durumda tutmak için gerekli altyapıdan yoksun olmaktadır. Bu bakımdan geleneksel ekipmanlara basit, düşük maliyetli bir alternatif çözüm üretme gereği duyulmaktadır [241].

Günümüzde dijital renkli kameralar, dahili bellekler, cep telefonları ve tabletler gibi akıllı mobil cihazların hızlı büyümesiyle, teletıp için basit mobil cihaz tabanlı araçlar [242, 243], mikroskopi [244-246], floresan görüntüleme [247, 248] ve akıllı telefon tabanlı kolorimetrik tayin [249-251] gerçekleştirilebilmektedir [252].

Bir akıllı telefon, sonuçların görüntülenmesi, analizi ve iletilmesi için bir alternatif sunmaktadır. Dünya çapında 6 milyar abonelikte cep telefonları her yerde bulunur hale gelmektedir [251]. Akıllı telefonlar taşınabildirler, mükemmel bilgi işlem gücüne sahiptirler ve birçoğunun renk yoğunluğunu ölçebilen yüksek çözünürlüklü bir kamerası vardır. Diğer laboratuvar ekipmanlarıyla karşılaştırıldığında, akıllı telefon el cihazlarıyla ilişkili doğal bilgi işlem gücü, optikler ve ölçek ekonomisi, onları laboratuvar tanılamasında kullanılan mevcut analitik araçların çoğuyla karşılaştırılabilir bir platform haline getirmektedir. Hedef analitin varlığını ve konsantrasyonunu akıllı telefon kamerası tarafından ölçülebilen kolorimetrik değişikliklere dönüştürebilen bir eklenti gerekmektedir. Böyle bir arayüz ile bir akıllı telefon, çok çeşitli kolorimetrik analizler yapabilmelidir [253].

Kolorimetri, fiziksel ve analitik kimyada kullanılan ve renkli çözeltilerin konsantrasyonunu ölçmeyi amaçlayan önemli bir tekniktir [254]. Kolorimetreler, spektrofotometri ve Beer-Lambert yasasını [255] kullanarak absorban ölçümleri yoluyla konsantrasyonu ölçen araçlardır. Deneyin karmaşıklığına bağlı olarak hem laboratuvar da hem de sahada kullanılabilirler [256]. Akıllı telefon teknolojisindeki gelişmeler, çok çeşitli kimyasal ve biyolojik analitler için kolorimetrik ölçümlerin gerçekleştirilmesine yardımcı olmuştur [257].

Dijital görüntülerin kullanımı, kantitatif kimyasal analiz için hızlı ve düşük maliyetli kolorimetrik tespitler geliştirmek için mevcut fırsatlar içermektedir [258]. Son zamanlarda analitik kimyada “Dijital Görüntü Tabanlı Kolorimetri” (DIC) adı verilen hızlı ve basit bir tayin yöntemi kullanılmıştır [259, 260]. DIC, tarayıcılar [261], dijital kameralar [262, 263], web kameraları [260, 264, 265] veya akıllı telefonlar [249, 266] tarafından kaydedilen dijital görüntüleri kullanan yeni ve düşük maliyetli bir tekniktir. Akıllı telefonların yaygınlaşması, RGB (Kırmızı, Yeşil ve Mavi), CMYK (Ciano, Macenta, Sarı ve Siyah) ve HSV (Ton, Doygunluk ve Parlaklık) sistemleri gibi renk analizi için yazılımların geliştirilmesi ile gerçekleşmiştir [267]. En sık kullanılan renk modeli, her sensörün ışığın yoğunluğunu sırasıyla kırmızı (R), yeşil (G) veya mavi (B) spektrumunda yakaladığı RGB modelidir [262].

Dijital görüntülerin rengi ve yoğunluğu, R, G ve B ışıklarının geniş bir renk aralığını yeniden üretmek için çeşitli kombinasyonlarda birlikte eklendiği genellikle ek bir renk alanı oluşturan 24 bit veridir (8 bit R + 8 bit G + 8 bit B). R, G ve B yoğunluklarının kombinasyonu kullanılarak birçok renk görüntülenebilmektedir [258]. Her rengin yoğunluğunun 0'dan 255'e kadar olmak üzere 256 seviyesi vardır [264]. Bu renk şemasında 16.777.216 renk elde edilmektedir (256^3 veya 2^{24}). R = 0, G = 0, B = 0 değeri saf siyahı, R = 255, G = 255, B = 255 ise saf beyazı ifade etmektedir. Bu sistemle, milyonlarca farklı renk tonu, doygunluk ve parlaklık sağlayan benzersiz R, G ve B değerleri kombinasyonlarına izin verilmektedir [258, 268]. Görüntülerin bu kapsamlı dinamik renkleri, nicel analiz için veri tabanı sağlamaktadır [258].

Kullanıcıların artan ihtiyaçlarına cevap verebilmek için her gün yüzlerce yeni uygulama kullanıma sunulmaktadır [269]. Cep telefonlarıyla ilgili donanım ve yazılımlardan tam olarak yararlanılarak yeteneklerinden daha fazla yararlanılabilmektedir. Böylece onları değerli enstrümanlara dönüştürmek mümkündür [249]. Spesifik olarak, nesnenin rengini kabaca değerlendirmek için farklı mobil uygulamalar mevcuttur [252, 270].

Kolorimetrik analizler genellikle başarılı dijital görüntü işleme için sürekli aydınlatma altında küvetlerde, kağıtlarda veya diğer katı desteklerde gerçekleştirilmektedir [267]. Bununla birlikte, cep telefonları, üç temel zorluk nedeniyle kolorimetrik tespit için henüz popülerlik kazanmamıştır. İlk olarak, geleneksel bir cep telefonunun entegre renk dengeleme işlevleri, yüksek ortam

ışığında fotoğrafçılık için optimize edilmiştir ve doğru nicel ölçümlerin yapılması gerektiğinde görüntüler için uygun değildir. İkincisi, özellikle laboratuvar gibi kontrollü ortamların dışında, görüntüleme sırasındaki aydınlatma koşullarının kontrol edilmesi zor olabilmektedir. Üçüncüsü, özellikle küçük renk değişiklikleri mevcut olduğunda ve tek başına kırmızı, yeşil ve mavi (RGB) yoğunluk değerlerinin yeterli olmadığı durumlarda görüntülerin analizi zor olabilmektedir [251]. Bu sebeple, bir cep telefonu kamerasından, düzlemsel bir ışık kaynağından ve bir karton kutudan yapılmış kamera tabanlı bir kolorimetre ile bir taraftan mikro kuvvetlerdeki numuneleri aydınlatılmakta ve diğer tarafa iletilen ışığı ölçmek için kameranin RGB tabanlı görüntüleme sensörlerini kullanılmaktadır [241]. Mevcut akıllı telefon cihazlarının sorunu, görüntüleme ortamı değiştirilirse yeniden kalibrasyon gerektirmeleri ve dolayısıyla kesinlikle benzer testler arası görüntüleme koşulları gerektirmesidir [253, 271].

2.3 Numune Ön İşlemleri

Numune hazırlama metodolojisi, tüm analitik prosedürün darboğazı olarak kabul edilmektedir. Yöntemin analitik performansı bu adıma dayanmaktadır. Dikkatle özetlenen bir süreç, kullanılan analitik yöntemin yüksek seçiciliğini ve düşük hassasiyet sınırlarının yanı sıra doğruluk ve tekrarlanabilirlik gibi diğer parametrelerini de sağlayabilmektedir. Esas olarak bu aşama, yöntemin çevre dostu olma derecesini, toplam analiz süresini ve analit kaybı olasılığını belirlemektedir. Bu nedenle, uygun bir ön işlem ile elde edilen analitik veriler daha yüksek kalitededir [15, 272, 273].

Matris bileşenleri, farklı numunelerdeki analitlerin tayinini olumsuz etkileyebilmekte, bu durumda analitlerin ölçümden önce potansiyel interferanslardan ayrılması gerekebilmektedir. Analitlerin mevcut enstrümantal tekniklerin gözlem limitine çok yakın veya daha düşük konsantrasyonlarda mevcut olduğu durumlar da vardır. Ön deriştirme yöntemleri, cihaza sunulan çözeltideki analitin konsantrasyonunu artırarak, doğru niceleme sağlamaktadır. Orijinal analit konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için elde edilen zenginleştirme faktörünün bilinmesi gereklidir [229]. Analitik bir süreçteki numune hazırlama adımı, ilgili bileşenlerin bir numune matrisinden izole edilmesi ve zenginleştirilmesiyle sonuçlanan bir ekstraksiyon prosedüründen oluşmaktadır [274].

Çevre ve insan güvenliğine ilişkin olarak kirliliğin artmasından kaynaklanan artan endişe, “Yeşil Kimya” olarak adlandırılan çevre dostu uygulamaların ortaya çıkmasına yol açmıştır. Numune hazırlama, temel olarak hem insanlara hem de çevreye zararlı çözücülerin tüketilmesi nedeniyle analizin en kirlletici aşaması olarak kabul edilmektedir. Bu bağlamda en az üç “yeşil” seçenek mevcuttur:

- i. çözücüsüz veya neredeyse çözücüsüz ekstraksiyon,
- ii. daha az zararlı çözücülerin kullanılması ve
- iii. ekstraksiyon yardımcılarının kullanımı.

En yaygın hale gelen ilk seçenektir. Minyatürleştirme, analizin "yeşilliğini" geliştirmenin ötesinde, aynı zamanda maliyet açısından uygundur.

Minyatür numune hazırlama teknikleri, çözücü kullanımına dayalı ekstraksiyonlar ve sorbent kullanımına dayalı ekstraksiyonlar olmak üzere iki ana kategoride gruplandırılabilir. Sıvı fazlı mikroekstraksiyon (SFME) gibi minyatür teknikler minimum miktarda çözücü gerektirir ve bu nedenle “neredeyse çözücüsüz” olarak kabul edilebilirler [275].

Son zamanlarda dikkat çeken numune hazırlama teknikleri daha hızlı, daha yeşil ekstraksiyon yöntemleri ve mikro ekstraksiyon teknikleridir. Yaygın analitik enstrümantasyonlar ve bunlarla ilişkili numune hazırlamalar Tablo 2.4’ te listelenmiştir [276].

Tablo 2.4 Yaygın enstrümantal yöntemler ve analiz öncesi gerekli numune hazırlama adımları [276]

Analitler	Örnek Hazırlama	Enstrüman
Organikler	Ekstraksiyon, konsantrasyon, temizleme, türevlendirme	GC, HPLC, GC/MS, LC/MS
Uçucu Organikler	Buhar fazına geçiş, konsantrasyon	GC, GC-MS
Metaller	Ekstraksiyon, konsantrasyon, türleştirme	AA, GFAA, ICP, ICP/MS
Metaller	Ekstraksiyon, türevlendirme, konsantrasyon, türleştirme	UV-VIS moleküler absorpsiyon spektrofotometrisi, iyon kromatografisi

Tablo 2.4 Yaygın enstrümantal yöntemler ve analiz öncesi gerekli numune hazırlama adımları [276] (devamı)

İyonlar	Ekstraksiyon, konsantrasyon, türevlendirme	İyon kromatografisi, UV-VIS moleküler absorpsiyon spektrofotometrisi,
Aminoasitler, karbonhidratlar	yağlar, Ekstraksiyon, temizleme	GC, HPLC, elektroforez

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu (SSE) dahil olmak üzere geleneksel numune hazırlama yöntemlerinin kullanılması, önemli miktarda organik çözücünün tüketilmesi, büyük numune miktarı gereksinimleri ve uzun numune hazırlama süreleri gibi önemli dezavantajlara neden olabilmektedir [277, 278].

2.3.1 Ekstraksiyon Teknikleri

Katı, sıvı, süper kritik sıvı veya gaz olabilen bir ekstraktant kullanılarak ilgili analitin numune matrisinden geri çekilmesi veya ayrılması, ekstraksiyon işlemi olarak adlandırılmaktadır. Ekstraksiyon, analitleri çeşitli karmaşık numune matrislerinden ayırmak ve aynı zamanda daha düşük tespit limitleri elde etmek ve analitleri konsantre etmek için etkin bir şekilde kullanılan yaygın bir tekniktir [279, 280].

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu (SSE) ve katı faz ekstraksiyonu (KFE), geleneksel ekstraksiyon yöntemleridir ve modern ekstraksiyon yöntemlerinin geliştirilmesi için temel olmuştur. SSE, bir analitin iki karışmaz sıvı (sulu ve organik) arasında dağılmasını içermektedir ve dağılma, ekstraksiyon çözücüsünde analitin çözünürlüğünün derecesine bağlıdır. SSE, yarı uçucu ve uçucu olmayan organik bileşikler için uygundur [281] ve analitik kimyadaki en eski zenginleştirme ve matris izolasyon tekniklerinden biridir [274]. Bununla birlikte, emülsiyon oluşumu, büyük numune hacimlerinin ve toksik organik çözücülerin kullanılması ve dolayısıyla büyük miktarlarda kirletici oluşumu gibi bazı eksiklikler, SSE'yi pahalı, zaman alıcı ve çevreye zararlı yapmaktadır. Bu ekstraksiyon tekniğinin minyatürleştirilmesi, ekstraksiyon çözücüsü faz hacminin önemli ölçüde azaltılmasıyla sağlanabilmektedir [282]. KFE, bir sıvıdan analitin adsorpsiyon yoluyla sabit bir katı yüzey üzerine hapsedilmesi ve daha sonra uygun bir çözücü ile ayrıştırılması ilkesine sahiptir. Elüsyondan önce, ilgili analit için çok düşük çözünürlüğe sahip çözücüler ile bir yıkama prosedürü gerçekleştirilerek interferans

yapan bileşikler elimine edilebilmektedir. Kütle transferi, analitlerin toplu numune ortamından ekstraktanta genel hareketini ifade etmektedir [281]. KFE, SSE'den çok daha az çözücü kullanmakta, ancak nispeten pahalı olabilmektedir [274] [283].

2.3.2 Mikroekstraksiyon Teknikleri

Mikroekstraksiyon yöntemleri, SSE ve KFE'nin temel ilkelerine dayanmaktadır. Bu nedenle genel olarak sıvı fazlı mikro ekstraksiyon (SFME) ve katı fazlı mikro ekstraksiyon (KFME) olarak kategorize edilebilmektedirler [280]. Mikroekstraksiyon tekniklerinin, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve katı faz ekstraksiyonu ile karşılaştırıldığında hassasiyet ve tekrarlanabilirlik açısından benzer veya daha iyi sonuçlar sağladığı kanıtlanmıştır [284].

Yeşil analitik kimya daha önemli hale geldikçe, reaktiflerin ve organik çözücülerin azaltılması ve diğerlerinin yanı sıra analitik işlemlerin minyatürleştirilmesi ve otomasyonu önem kazanmaktadır [285]. SSE ve KFE, analitik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan tekniklerdir [286], ancak büyük çözücü hacimlerine ihtiyaç duymaktadırlar ve çok zahmetlidirler. Sonuç olarak, analitlerin ayırma ünitesine doğrudan enjeksiyonunu mümkün kılan, zenginleştiren, aynı zamanda daha az çözücü, zaman ve emek gerektiren yeni mikroekstraksiyon teknikleri geliştirilmektedir [284].

Mikroekstraksiyon gibi minyatür teknikler, analitik kimyada her yıl giderek daha fazla benimsenen trend bir konu olmuştur. İlk mikroekstraksiyon tekniği olarak katı faz mikroekstraksiyonu (KFME), 90'larda Pawliszyn ve çalışma arkadaşları tarafından çalışılmıştır [287]. Ancak KFME pahalıdır ve sınırlı bir ömre sahiptir. Jeannot ve Cantwell, sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi ile ilk çalışmaları literatüre sunmuşlardır [288]. He ve Lee, 1997'de sıvı fazlı mikroekstraksiyon ile bu gelişimlere katkı sağlamıştır [274, 289, 290].

2.3.2.1 Sıvı Faz Mikroekstraksiyon

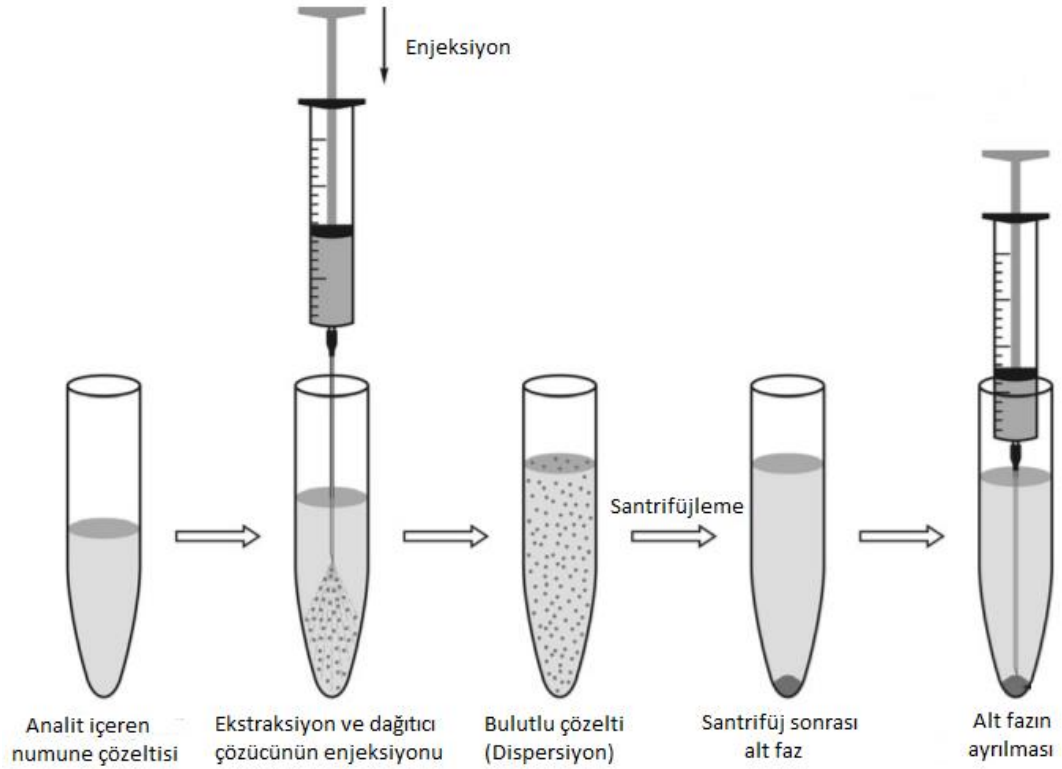
Sıvı faz mikroekstraksiyon, sıvı sıvı ekstraksiyonunun minyatürleştirilmiş bir şeklidir [275]. Çeşitli numunelerden çok çeşitli analitlerin ekstraksiyonu için yalnızca çok düşük miktarda (μL seviyesinde) alıcı faz olarak ekstraksiyon çözücüsü gerektiren bir numune ön işlem yöntemidir [291, 292].

SFME, enstrümanlar ve çeşitli karıştırma yöntemleri ile birleştirilebilen esnek bir ekstraksiyon tekniği olarak bilinmektedir. Mevcut yöntemler, yeşil kimyaya uygunluğunu ve ekstraksiyon verimliliğini artırmak için, yöntemin bu esnekliği kullanılarak değiştirilebilmektedir. Ayrıca analitlerin eser düzeylerinin belirlenmesine olanak tanımaktadır [281]. Basitlik, hassasiyet, düşük maliyet, otomasyon ve “enjekte etmeye hazır” modu gibi avantajları vardır. Öte yandan, temel olarak ekstraksiyon çözücüsünün sulu numune çözeltisi ile kısmi karışabilirliği nedeniyle istenmeyen bir azalma meydana gelebilmektedir. SFME'nin genellikle yüksek hassasiyeti, analitlerin eser seviyelerde tayinine olanak sağlamaktadır. Örneğin, atık sulardan antidepresan ilaç 25.000 kat ön deriştirme ile elde edilmiştir [275, 293].

Son on yılda araştırmalar, yeşil kimyaya uygun olarak SFME yöntemlerinde kullanılacak ekstraksiyon çözücüleri olarak alternatif çözücülerin geliştirilmesine odaklanmıştır [294]. En çok tercih edilen yöntemler; tek damla mikroekstraksiyon [295], dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DSSME) [296], katılaştırılmış yüzen organik damla mikroekstraksiyon [297], akıllı çözücü sıvı faz mikro ekstraksiyon [298], bulutlanma noktası mikroekstraksiyonu [299] olarak sıralanabilmektedir.

2.3.3 Dağıtıcı Sıvı Sıvı Mikroekstraksiyon

Rezaee ve çalışma arkadaşları, dağıtıcı sıvı sıvı mikroekstraksiyon (DSSME) tekniğini inceleyen ilk bilim adamlarıdır [274]. Bu teknik, yüksek yoğunluklu organik bir çözücü olan bir ekstraksiyon çözücüsünün kullanımına dayanmaktadır. Ekstraksiyon çözücüsü ve dağıtıcı çözücünün sulu faza birlikte enjeksiyonundan sonra, küçük damlacıkların oluşumu gözlenir ve damlacıkların sulu numune çözeltisi boyunca dağılması sırasında ekstraksiyon gerçekleşir [282, 300]. Damlacıklar sulu numune çözeltisine dağılırken bulutlu çözelti oluşur. Daha sonra bulanık çözelti santrifüj edilir ve konik tüpün dibinde elde edilen çökelti fazı uygun bir analitik yöntemle analiz etmek için kullanılır. DSSME'nin şematik gösterimi Şekil 2.7' de verilmiştir.



Şekil 2.7 DSSME'nin şematik gösterimi [301]

DSSME'nin avantajları başlıca şunlardır:

- i. düşük maliyet,
- ii. basitlik,
- iii. küçük bir numune hacmine ihtiyaç duyma (sadece mikrolitre hacimleri),
- iv. düşük çözücü tüketimi,
- v. yüksek geri kazanımlar
- vi. vericinin (sulu numune) ve alıcının (ekstraksiyon çözücüsü) yüksek faz oranına bağlı olarak yüksek zenginleştirme faktörü
- vii. denge durumuna hızlı bir şekilde ulaşılmasına bağlı olarak kısa ekstraksiyon süresi

Bununla birlikte, bu tekniğin ayrıca, ekstraksiyon ve dağıtıcı çözücülerle ilgili gereksinimlerden kaynaklanan belirli sınırlamaları da vardır;

- i. üç solvent kullanma ihtiyacı,
- ii. ekstraksiyon çözücüsü, hedef analitin iyi bir ekstraksiyon kabiliyetine, sulu fazda düşük bir çözünürlüğe ve sudan daha büyük bir yoğunluğa sahip olmalı
- iii. fazların ayrılması santrifüjleme ile yapılmalı

iv. dağıtıcı çözücü, hem ekstraksiyon çözücüsü hem de sulu faz ile karışabilir olmalıdır [113, 223].

Bu nedenle, ekstraksiyon çözücüsünün seçimi en kısıtlayıcı kısım haline gelir, çünkü az sayıda organik çözücü bu gereksinimleri karşılar. DSSME prosedüründe genellikle ekstraksiyon çözücüsü olarak tetraklorometan, kloroform, karbon disülfür, nitrobenzen, bromobenzen, klorobenzen, 1.2-diklorobenzen, 1.2-dikloroetan ve diklorometan gibi yüksek yoğunluklu organik çözücüler; dağıtıcı çözücü olarak ise metanol, etanol, asetonitril veya aseton gibi hem ekstraksiyon çözücüsü hem de sulu fazda yüksek karışabilirliğe sahip çözücüler kullanılmaktadır [282, 302]. Ek olarak, pH değeri ve tuz ilavesi gibi DSSME'yi etkileyen diğer parametreler, ekstraksiyon sonuçlarını önemli ölçüde etkileyebilir ve ayrıca optimize edilmelidir.

DSSME tekniği çoğu laboratuvar tarafından erişilebilirdir ve gaz kromatografisi [303], yüksek performanslı sıvı kromatografisi [304], elektrotermal atomik absorpsiyon spektrometrisi [224] ve alevli atomik absorpsiyon spektrometrisi [305] gibi çeşitli analitik tekniklerle uyumlu görünmektedir.

2.3.4 Çift Şırınga Esaslı Basınçlı Sıvı Faz Mikroekstraksiyon

Yeşil analitik kimya, minyatürleştirme, organik çözücülerin ortadan kaldırılması, işlemlerin tekrarlanabilirliğinin artırılması ve enerji tüketiminin ve üretilen atıkların azaltılmasına odaklanmaktadır. Bu nedenle, çeşitli organik/inorganik analitlerin ekstraksiyonu/hazırlanması için çeşitli yeşil analitik teknikler geliştirilmiştir [306-308]. Mikroekstraksiyon tekniklerinde dağıtıcı çözücülerin kullanımı, organik çözücülerin kullanımı açısından yeşil kimya gerekliliklerini karşılamamaktadır [309]. Bu nedenle, dağıtıcı çözücüler kullanılmadan yeni sıvı faz mikroekstraksiyon stratejileri, yalnızca tespit limitlerini düşürmek için değil, aynı zamanda dağıtıcı organik çözücülerin kullanımını ortadan kaldırmak için de çok önemlidir [306].

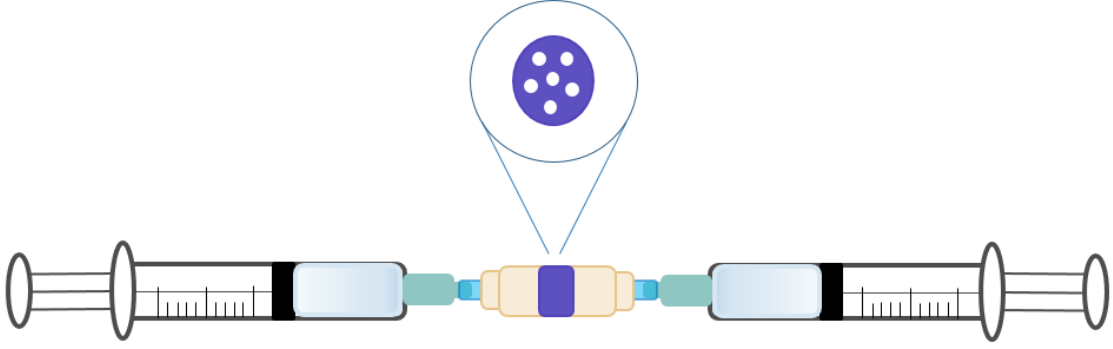
Dağıtıcı çözücü kullanımı, düşük ekstraksiyon verimliliğine yol açabilmektedir [310]. Bunun ışığında, dağıtıcı çözücü kullanımını tamamen ortadan kaldırmak ve sonuç olarak ekstraksiyon prosedüründe organik çözücülerin genel kullanımını

azaltmak için çeşitli sistemler geliştirilmiştir. Literatürde şırınga içi ekstraksiyon tekniği ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır [307].

Melwanki ve ark. (2008) [311], DSSME için alternatif bir ekstraksiyon ünitesi olarak bir şırınga kullanmıştır. Cruz-Vera ve diğerleri (2009) [312] ekstraksiyon ünitesi olarak 10 ml'lik bir plastik şırınga ile ekstraksiyon ve dağıtıcı çözücü karışımının enjeksiyonu için 1 ml'lik bir cam şırınga kullanarak şırınga içi DSSME'yi manuel olarak gerçekleştirmiştir. Tam otomatik şırınga içi DSSME, Maya ve ark. (2011) [313] tarafından benzo(a)pirenin ekstraksiyonu için çoklu şırınga akışlı enjeksiyon analizi tekniği uygulanmış ve ardından monolitik bir kolon üzerinde kromatografik olarak ayrımı gerçekleştirilmiştir.

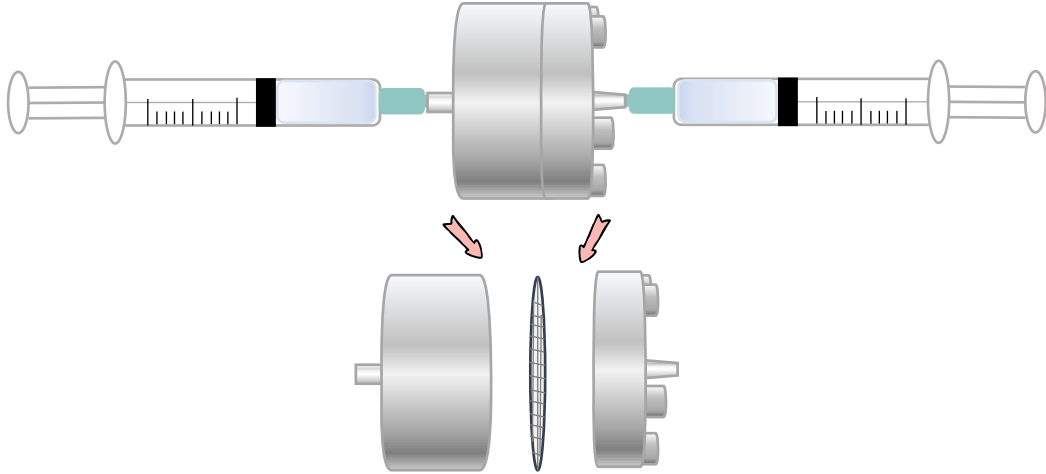
Çift şırınga esaslı basınçlı sıvı faz mikroekstraksiyon (ÇŞE-BSFME) yöntemi, dağıtıcı çözücü kullanımını tamamen ortadan kaldırmak ve sonuç olarak ekstraksiyon prosedüründe organik çözücülerin genel kullanımını azaltmak amacıyla geliştirilmiştir. Bu teknik, dağıtıcı çözücü kullanımından kaçınarak yeşil kimyaya katkıda bulunmakta ve ekstraksiyon işlemini çözücü uçuculuğundan kaynaklanan kayıpları önleyen kapalı bir sistem içinde gerçekleştirmektedir. Sistem, ortasında filtre bulunan bir aparat ile birbirine bağlı iki adet tek kullanımlık şırıngadan oluşmaktadır. İki şırınga arasına türbülanslı bir akış oluşturmak için farklı materyallerden yapılmış filtre yerleştirilmiştir. Filtre yüzeyinde bulunan delikler sayesinde ekstraksiyon çözücüsü ile sulu numune arasında geniş bir yüzey alanı sağlanmıştır. Şırınga pistonlarının ileri geri eşzamanlı hareketleri sayesinde iki şırınga arasında oluşturulan basınç, etkili bir dispersiyon oluşturmuş ve dağıtıcı çözücü ihtiyacını ortadan kaldırmıştır [310, 314].

Geliştirilen yöntemlerde, plastik ve metalik olmak üzere 2 farklı filtre kullanılmıştır. Plastik filtre sisteminde, iki şırınga birbirine plastik tübinglerle bağlanmış ve bu tübinglerin arasına, filtre görevi görmesi amacıyla üzerinde 6 adet deliğe sahip bir polimer parçası yerleştirilmiştir. Plastik filtre bağlantılı çift şırınga esaslı basınçlı sıvı faz mikroekstraksiyon sisteminin şematik gösterimi Şekil 2.8' de sunulmaktadır [310, 314].



Şekil 2.8 Plastik filtre bağlantılı çift şırınga esaslı basınçlı sıvı faz mikroekstraksiyon sistemi [310]

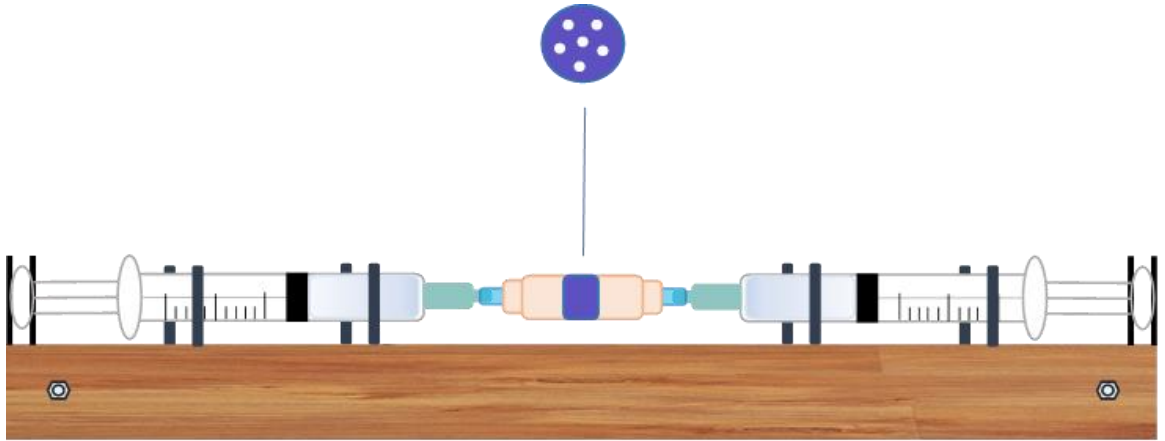
Metalik elek bağlantılı çift şırınga esaslı basınçlı sıvı faz mikroekstraksiyon sistemi (MEB-ÇŞE-BSFME)'nde ise iki şırınga metalik bir elek ile uçtan uca birbirine bağlanmıştır. Metalik filtre, 1.4 cm çapında 50 mesh'lik metalik elekten oluşan ve 5.0 cm çapında, 2.5 cm genişliğinde paslanmaz çelikten yapılmış bir metalik aparatır (Şekil 2.9). Yüzlerce delikli metalik filtre, şırıngaların takıldığı metalik plakaların arasına yerleştirilmiştir. İki şırınganın ileri geri hareketi, şırıngalar arasındaki hareketin oluşturduğu basıncın etkisiyle yüksek yüzey alanı etkileşimi oluşturmaktadır. Böylece, numune çözeltisi ile ekstraksiyon çözücüsü arasında plastik filtreye kıyasla daha iyi bir dağılım meydana gelmekte ve dağıtıcı çözücü ihtiyacını ortadan kaldırmaktadır [315].



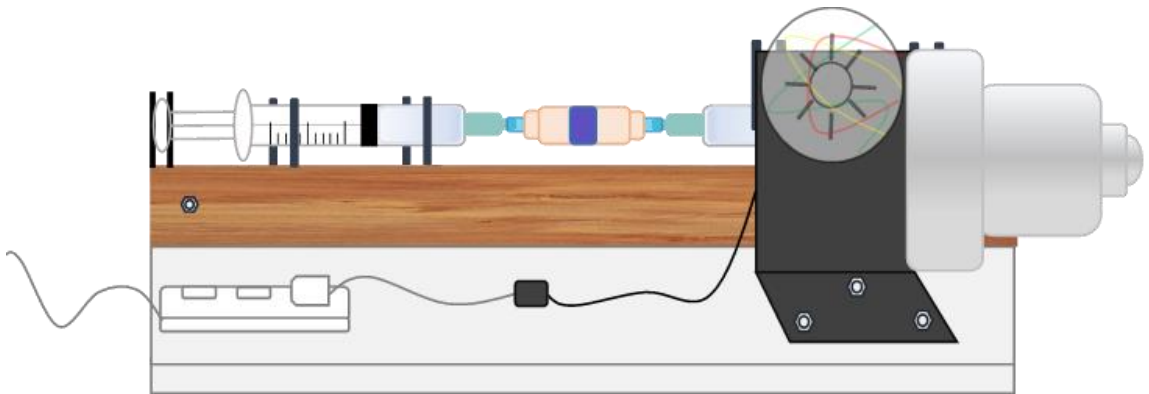
Şekil 2.9 Metalik elek bağlantılı çift şırınga esaslı basınçlı sıvı faz mikroekstraksiyon sistemi [310]

2.3.4.1 Otomasyon Sistemi ile Çift Şırınga Esaslı Basınçlı Sıvı Faz Mikroekstraksiyon

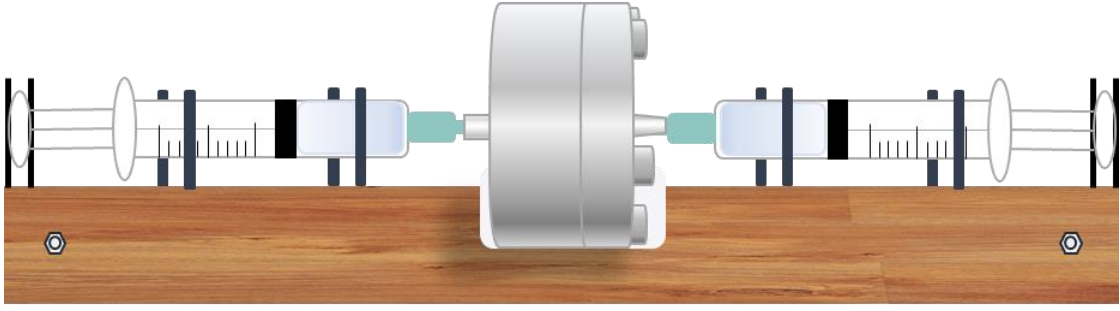
Otomasyon Sistemi ile Çift Şırınga Esaslı Basınçlı Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (OS-ÇŞE-BSFME) yönteminde, iki şırınga arasında basınçlı karıştırma işlemi için otomatik bir sistem geliştirilmiştir. Bu otomatik sistemde, şırınga pistonlarının ileri geri hareketini sağlamak için mekanik bir motor kullanılmıştır. Otomatik sistem, şırınga pistonlarının senkronize hareketini sağlamış ve bu sabit karıştırma hızı, ekstraksiyonların tekrarlanabilirliğini arttırmıştır. Aynı zamanda, sabit basınç pompası, şırıngaların eşzamanlı hareketini sağlayarak manuel karıştırmanın neden olduğu hataları ortadan kaldırmakta ve ekstraksiyonun tekrarlanabilirliğini artırarak algılama sınırının iyileştirilmesine yardımcı olmaktadır. Otomasyon sistemi ile plastik ve metalik elek filtre sistemlerine ait çift şırınga esaslı basınçlı sıvı faz ekstraksiyonunun şematik gösterimleri Şekil 2.10, Şekil 2.11 ve Şekil 2.12’ deki gibidir.



Şekil 2.10 Otomasyon sistemi ile plastik elek bağlantılı OS-ÇŞE-BSFME sisteminin önden görünümü [306]



Şekil 2.11 Otomasyon sistemi ile plastik elek bağlantılı ÇŞE-BSFME sisteminin arkadan görünümü



Şekil 2.12 Otomasyon sistemi ile metalik elek bağlantılı OS-ÇŞE-BSFME sisteminin arkadan görünümü

Geliştirilen otomasyon ile daha gelişmiş ve kolay bir sistem elde edilmiştir. Ayrıca metalik elek üzerinde yüzlerce delik bulunan metalik elek sayesinde ekstraksiyon çözücüsü ile sulu faz arasındaki etkileşim çok yüksek seviyede tutulmuştur. Artan yüzey alanı, ekstraksiyon verimliliğini büyük ölçüde artırmaktadır.

2.4 Metot Validasyonu

Metot validasyonu, analitik bir metodun amacına uygun olarak kabul edilebilir hale getirilmesi sürecidir [316]. Validasyonda kullanılan parametreler aşağıda açıklandığı gibidir;

- **Doğruluk:** Ölçülen bir değer gerçekteki veya kabul edilen değere yakınlığıdır. Doğruluk, bulunan ortalama değer ile gerçek değer arasındaki sapmayı göstermektedir. Bilinen miktarlarda analit eklenmiş numunelere yöntem uygulanarak belirlenir. Girişim olmadığından emin olmak için bunlar standart ve blank çözeltilere karşı analiz edilmelidir. Doğruluk daha sonra deney sonuçlarında geri kazanılan analitin yüzdesi olarak hesaplanmaktadır. Genellikle bilinen, eklenen miktarlarda analitin geri kazanımı olarak ifade edilebilir [317].
- **Kesinlik:** Rastgele hatanın bir ölçüsüdür ve yöntem homojen bir numuneden alınan farklı kısımlara tekrar tekrar uygulandığında deneysel sonuçlar arasındaki uyum olarak tanımlanmaktadır. Kesinlik, değişkenlik katsayısı (CV) veya Bağlı Standart Sapma (BSS) ile değerlendirilir. Kesinlik üç düzeyde düşünülebilir: tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrar üretilebilirlik. **Tekrarlanabilirlik**, aynı çalışma koşulları altında kısa bir zaman aralığı veya zaman içindeki kesinliği ifade etmektedir.

$$\%BSS = \left(\frac{\text{standart sapma}}{\text{ortalama}} \right) \times 100 \quad (2.1)$$

Ara kesinlik laboratuvar içi varyasyonları ifade etmektedir: farklı günler, farklı analitler, farklı ekipman vb. ve çalışmalar arası, günler arası veya deneyler arası kesinlik olarak adlandırılmaktadır. **Tekrar üretilebilirlik**, laboratuvarlar arası kesinliği ifade etmektedir [316].

Doğruluk ve kesinlik, aşağıdaki diyagramın gösterdiği gibi aynı değildir. Bir yöntem iyi bir kesinliğe sahip olabilir ve yine de doğru olmayabilir.

- **Doğrusallık:** Analitik prosedürün numunedeki analitin konsantrasyonu ile doğru orantılı bir yanıt elde etme yeteneğidir. Doğrusallık genellikle regresyon doğrusunun eğimi etrafındaki güven sınırı olarak ifade edilmektedir [212].
- **Gözlem ve Tayin Limiti:** Gözlem limiti (GL), bir numunedeki bir analitin nicelendirilemeyen, tespit edilebilen en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. GL, genellikle 3:1 olan belirli bir sinyal-gürültü oranındaki konsantrasyon olarak ifade edilmektedir.

Tayin limiti (TL), bir numunedeki bir analitin, yöntemin belirtilen çalışma koşulları altında kabul edilebilir kesinlik ve doğrulukla belirlenebilen en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. TL için, sinyal:gürültü oranı 10:1'dir. GL ve TL ayrıca aşağıdaki formüllere göre [315] GL'ye yaklaşan seviyelerde yanıtın standart sapması ve kalibrasyon eğrisinin/eğrilerinin eğimi temelinde de hesaplanabilmektedir [212, 318].

$$GL = 3 \times \left(\frac{\text{standart sapma}}{\text{eğim}} \right) \quad (2.2)$$

$$TL = 10 \times \left(\frac{\text{standart sapma}}{\text{eğim}} \right) \quad (2.3)$$

- **Seçicilik:** Bir yöntemin, bir numunedeki diğer bileşenlerin varlığında bir analiti ayırt etme ve nicelleştirme yeteneği olarak kabul edilmektedir [316].
- **Sağlamlık:** Bir analitik prosedürün sağlamlığı, yöntem parametrelerindeki küçük, ancak kasıtlı değişikliklerden etkilenmeme kapasitesinin bir ölçüsüdür ve normal kullanım sırasında güvenilirliğinin bir göstergesini sağlamaktadır [212].

MALZEME VE YÖNTEMLER

3.1 Kobaltın Otomasyon Sistemi İle Çift Şırınga Esaslı Sıvı Faz Mikroekstraksiyonu Sonrası Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometresi ile Eser Seviyelerde Tayini

3.1.1 Kimyasallar

Bu çalışma boyunca kullanılan tüm kimyasallar analitik saflık derecesine sahiptir. Çalışma ve kalibrasyon çözeltileri, %2.0 HNO₃ içinde 1000 mg L⁻¹'lik bir kobalt stok çözeltisinden (High Purity Standards, Kuzey Charleston, ABD) deiyonize su (18.2 MΩcm) ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Schiff bazı sentezinde kullanılan 5-bromosalisil aldehit, p-toluensülfonik asit ve p-aminofenol Merck (Darmstadt, Almanya)'ten temin edilmiştir. Ekstraksiyon işleminde kullanılan kimyasallar Tablo 3.1' de kullanım amaçlarına göre sıralanmıştır. Tampon çözeltileri, uygun miktarlarda Tablo 3.2' de listelenen şekilde hazırlanmıştır. Ligand çözeltisinin karanlık, serin ve kuru bir dolapta tutulmasıyla ligandın ışık veya güneş ışığı ile bozulması önlenmiştir. Tüm cam eşyalar ve diğer plastik malzemeler kullanım sonrası yıkanmış, %5.0 HNO₃ çözelti banyosunda 2.0 saat tutulmuş, deiyonize su ile durulanmış ve daha sonra deneysel prosedürde kullanılmadan önce iyice kurutulmuştur.

Tablo 3.1 Kobalt tayini için çalışma boyunca kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçları

Kimyasal İsmi	Marka	Kullanım Amaçları
Boraks	Riedel-de Haën, Almanya	Tampon hazırlanması
Etanol	Isolab, Almanya	Ligand sentezi, ligand çözeltisinin hazırlanması
Kloroform	Merck, Darmstadt, Almanya	Ekstraksiyon çalışmaları

Tablo 3.1 Kobalt tayini için çalışma boyunca kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçları (devamı)

1.2-dikloroetan	Merck, Darmstadt, Almanya	Ekstraksiyon çözücü türü optimizasyonu
Diklorometan	Merck, Darmstadt, Almanya	Ekstraksiyon çözücü türü optimizasyonu
Nitrik asit, %67 (HNO ₃)	Isolab, Almanya	Mikrodalga çözünürleştirme, ekstraksiyon çalışmaları
Hidrojen peroksit, %35 (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt, Almanya	Mikrodalga çözünürleştirme, eluent türü optimizasyonu
Hidroklorik asit, %37 (HCl)	Isolab, Almanya	Tampon hazırlanması, eluent türü optimizasyonu

Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan tampon çözeltileri ve hazırlanışları

Tampon Çözeltisi	Hazırlanışı
pH 3.0	0.10 M potasyum hidrojen fitalat + 0.10 M HCl
pH 4.0	0.10 M potasyum hidrojen fitalat + 0.10 M HCl
pH 5.0	0.10 M potasyum hidrojen fitalat + 0.10 M NaOH
pH 6.0	0.10 M potasyum dihidrojen fosfat + 0.10 M NaOH
pH 7.0	0.10 M potasyum dihidrojen fosfat + 0.10 M NaOH
pH 8.0	0.025 M boraks + 0.10 M HCl
pH 9.0	0.025 M boraks + 0.10 M HCl
pH 10.0	0.025 M boraks + 0.10 M NaOH
pH 11.0	0.050 M disodyum hidrojen fosfat + 0.10 M NaOH
pH 12.0	0.050 M disodyum hidrojen fosfat + 0.10 M NaOH
pH 13.0	0.20 M KCl + 0.20 M NaOH

3.1.2 Cihazlar

Kobalt miktar tayini için absorbans ölçümleri, ATI UNICAM 929 AA serisi atomik absorpsiyon spektrofotometri sistemi (Cambridge, UK) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sistemde, zemin sinyallerini düzeltmek için bir döteryum (D₂) lambası bulunmaktadır. Asetilen ve hava karışımı ile alev üretilerek atomizasyon gerçekleştirilmiş ve kobalt ölçümleri için 240.7 nm dalga boyunda çalışılmıştır. Işık kaynağı olarak bir Varian marka oyuklu katot lambası kullanılmıştır. Oyuklu katot lambasının çalışma akımı ve slit genişliği sırasıyla 10 mA ve 0.20 nm'ye ayarlanmıştır. Çalışma boyunca kullanılan diğer laboratuvar alet ve cihazları Tablo 3.3' te listelenmiştir.

Tablo 3.3 Kobalt tayini için çalışma boyunca kullanılan laboratuvar alet ve cihazları

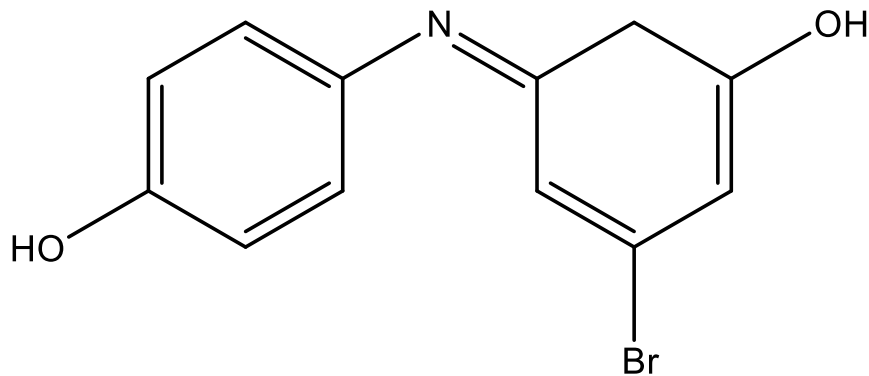
Cihazlar	Marka/Model
Su Arıtma Sistemi	ELGA Pure Flex 3
Isıtmalı Manyetik karıştırıcı	IKA RCT ST S000
Analitik Terazî	Ohaus Pioneer PA214C
Otomatik Pipet	Eppendorf
Etüv	Heraeus D-6450
Santrifüj	BIOBASE BKC-TL5II
pH Metre	Hanna HI2020
Ultrasonik Banyo	HAPA M-100
Mikrodalga Çözünürleştirme Cihazı	Milestone

3.1.3 Deneyisel Prosedürler

3.1.3.1 (Z)-3-bromo-5-(((4-hidroksifenil)imino)fenol Sentez Prosedürü

Schiff bazlarının çok önemli bir organik bileşik sınıfı olduğu ve moleküllerinde imin N atomunun varlığı nedeniyle Schiff baz metal kompleksleri oluşturmak için metal ile koordine olabildikleri bilinmektedir. Bu tür bileşikler, geçiş metali ve nadir toprak metal iyonları için şelatlama işlevine sahiptir ve bu nedenle Schiff baz metal kompleksleri, çok kararlı kompleksler grubudur. Schiff baz metal kompleksleri, birçok mükemmel özelliklerinden dolayı geniş uygulamalara sahiptir [319]. Bu çalışmada, kobalt iyonları ile kompleks oluşturmak üzere bir Schiff bazı ligandını sentezlemek için basit bir reaksiyon kullanılmıştır.

İlk olarak, 25 mL etanol içinde çözölmüş 5.0 mmol 5-bromosalisil aldehit önce 60 °C'ye ısıtılmış, daha sonra 0.01 mg p-toluen sülfonik asit ilave edilmiştir. Başka bir cam kapta, 10 mmol p-aminofenol, sonikasyon yardımıyla 5.0 dakika boyunca 15 mL etanol içinde çözölmüştür. Amin çözeltisi, 10 dakika boyunca damla damla reaksiyon şişesine ilave edilmiş ve ekleme başlar başlamaz çözeltide turuncu-kahverengi çökeltiler gözlenmiştir. Reaksiyon, sabit karıştırma ile dört saat daha sabit bir sıcaklıkta tutulmuştur. Reaksiyon sona erdikten sonra ürün, 11 µm filtre kağıdı kullanılarak süzölmüş ve safsızlıkları gidermek için etanol ile birkaç kez yıkanmıştır. Oluşan ürün daha sonra çözöcö ve nemi buharlaştırmak için 24 saat boyunca etüvde 55 °C'de tutulmuştur. Elde edilen ligandın kimyasal yapısı Şekil 3.1' de göröldüğü gibidir.



Şekil 3.1 (Z)-3-bromo-5-(((4-hidroksifenil)imino)fenol kimyasal yapısı

Sentezlenen ligandın karakterizasyonu FTIR spektroskopisi kullanılarak yapılmıştır. Başlangıç reaktiflerinden farklı olarak, aldehitte C=O gerilmesinin ve

birincil aminin N-H gerilmesinin olmaması ligand oluşumunun sağlandığını göstermiştir.

3.1.3.2 Ekstraksiyon Aparatı

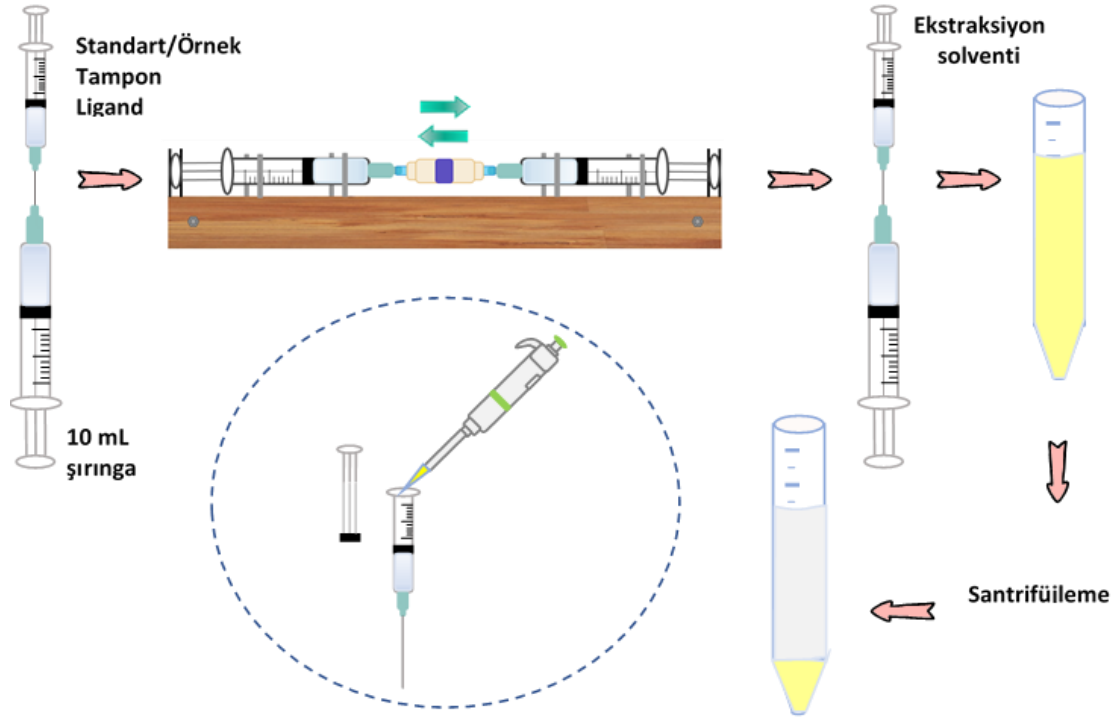
Ekstraksiyon işleminin gerçekleştirildiği sistem, ortasında filtre bulunan bir plastik aparat ile birbirine bağlanan iki adet tek kullanımlık şırıngadan oluşmaktadır. İki şırınga arasında türbülanslı bir akış oluşturmak için şırıngaları birbirine bağlayan plastik tübing arasına 6 deliğe sahip bir polimer parçası yerleştirilmiştir. Filtre, şırınga pistonları aynı anda hareket ettirildiğinden, ekstraksiyon çözücüsü ile sulu örnek arasında geniş bir yüzey alanı sağlamaktadır.

Karıştırma süresi boyunca şırıngalar arası dispersiyon verimini arttırmak ve manuel karıştırmadan kaynaklı olabilecek hataları elimine etmek amacıyla iki şırınga arasında oluşacak basınçlı karıştırma işlemi için otomatik bir karıştırma sistemi geliştirilmiştir. Bu otomatik sistemde, şırınga pistonlarının ileri geri hareketini sağlamak için mekanik bir araba sileceği motoru kullanılmıştır. Otomatik sistem, şırınga pistonlarının senkronize hareketini sağlamış ve bu sabit karıştırma hızı, tekrarlanabilirliği arttırmıştır. Bu çalışmada kullanılan otomatik sistemin şematik bir diyagramı bölüm “2.3.4 Çift Şırınga Esaslı Basınçlı Sıvı Faz Mikroekstraksiyon” Şekil 2.10 ve 2.11' de gösterilmektedir.

3.1.3.3 Co-OS-ÇŞE-BSFME Prosedürü

Ekstraksiyon işlemi için tek kullanımlık şırıngalar kullanılmıştır. Başlangıçta, 8.0 mL sulu standart/örnek çözeltisi, 10 mL'lik bir şırıngaya mikropipet yardımıyla yine bir 10 mL'lik şırınga vasıtasıyla aktarılmıştır. Daha sonra, hedef analitin kompleksleştirilmesi için 1.50 mL 0.025 M borat tampon çözeltisi (pH 9.0) ve 1.50 mL 0.08 g L⁻¹ etanol içinde çözülmüş Schiff baz ligand çözeltisi ilave edilmiştir. Kompleks oluşturma işlemi, 15 s boyunca basınçlı karıştırma ile hızlandırılmıştır. Daha sonra ligand-kobalt kompleks çözeltisine mikropipet yardımı ile 400 µL ekstraksiyon çözücüsü (kloroform) ilave edilmiş ve şırıngalar 15 s basınçlı karıştırma işlemi için otomatik sisteme yerleştirilmiştir. Karıştırma sonucunda oluşan bulanık çözelti, temiz bir santrifüj tüpüne dikkatlice aktarılarak, faz ayrılmasını hızlandırmak için 6000 rpm'de 2.0 dakika santrifüjlenmiştir. Konik santrifüj tüpünün tabanındaki organik faz başka bir temiz tüpe toplanmıştır.

Aktarılan faza 100 μL etanol eklenmiş ve organik fazın buharlaşması için 60 $^{\circ}\text{C}$ 'deki su banyosunda tutulmuştur. Böylece uçma işleminin aniden gerçekleşmesinin önüne geçilip kalıntının tüpün çeperlerine kalıcı bir şekilde yapışması önlenmiştir. Çözücü tamamen uzaklaştırıldıktan sonra tüpün dibinde kalan analitçe zengin kalıntının çözülmesi için 100 μL 6.0 M HNO_3 çözeltisi eklenmiş ve absorbans ölçümleri için AAAS sistemine gönderilmiştir. Ekstraksiyon prosedürünün şematik gösterimi Şekil 3.2' deki gibidir.



Şekil 3.2 Co-OS-ÇŞE-BSFME prosedürünün şematik gösterimi

3.1.3.4 Gerçek Örneklerin Hazırlanması

Geliştirilen yöntemin gerçek örneklerle uygulanabilirliğini test etmek amacıyla ayva örneği ile çalışılmıştır. Gıdalardaki kobalt derişimi, farklı coğrafi alanların toprak içeriğine bağlıdır. Birçok literatür çalışmasında ayva örneklerinde kobalt bulunduğu belgelenmiştir [320, 321]. Ülkemizde ayva ağaçlarının en çok bulunduğu bölge Marmara Bölgesidir. Bu sebeple kullanılmış olan ayva örneği, İstanbul/Türkiye'deki yerel bir marketten satın alınmış ve Tablo 3.4' teki sıcaklık programı kullanılarak mikrodalga çözünürleştirme işlemi uygulanmıştır.

Tablo 3.4 Ayva örneklerine uygulanan mikrodalga çözünürleştirme işlemine ait sıcaklık programı

Rampa, dk	Sıcaklık, °C	Güç, W
0-5	100	1200
5-10	100	1200
10-15	150	1200
15-20	150	1200
25-30	180	1200
30-40	180	1200

Çözünürleştirme işleminde, 0.50 g ayva tartılarak bir teflon kaba aktarılmış ve 8.0 mL $\text{HNO}_3\text{:H}_2\text{O}_2$ (3:1) karışımı ilave edilmiştir. Mikrodalga çözünürleştiricinin sıcaklığı, oda sıcaklığından 5.0 dakikada 100 °C'ye, ardından 5.0 dakikada 150 °C'ye ve son olarak 5.0 dakikada 180 °C'ye yükseltilmiştir. İlk iki sıcaklık rampası 5.0 dakika sabit tutulmuş, son rampa ise 10 dakika sabit tutulmuştur. Çözünürleştirme prosedürünün sonunda 15 dakika ventilasyon yapılmıştır. Çözünürleştirilmiş örnek çözeltisi bir behere boşaltılmış ve ekstraksiyon işlemi için uygun bir pH ortamı sağlamak amacıyla seyreltik NaOH çözeltisi ile pH değeri, standart çözeltinin pH'ına eşit olarak ayarlanmıştır. Son olarak örnek çözelti son hacimde 250 mL'ye seyreltilmiştir.

Örnekte kobalt olup olmadığını belirlemek amacıyla örnek çözeltisinin optimum koşullar altında ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve bir absorbens değeri elde edilmemiştir. Bu durum örnek çözeltisinde analit seviyesinin yöntemin gözlenebilme limitinin altında olduğunu veya örnekte analit bulunmadığını göstermiştir. Bu sebeple elde edilen örnek matriksi ile yöntemin doğrusal çalışma aralığında olmak üzere 15-100 µL derişim aralığında çözeltiler, standartlar matriksi seyreltmeyecek şekilde eklenerek hazırlanmıştır. Yöntemin optimum koşulları uygulanarak ekstraksiyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve geri kazanım yüzdeleri matriks eşleme yöntemi ile hesaplanmıştır.

3.2 Metalik Elek Bağlantılı Çift Şırınga Esaslı Sıvı Faz Mikro-Ekstraksiyon ile Bakırın Zeytin Yapraklarında Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometresi ile Tayini

3.2.1 Kimyasallar

Çalışmanın tüm aşamalarında analitik dereceli ve yüksek saflıkta kimyasallar kullanılmıştır. High Purity Standards'tan (North Charleston, ABD) satın alınan bakır stok standart çözeltisi (1000 mg L^{-1}), çalışma ve kalibrasyon standart çözeltilerini hazırlamak için deiyonize su ($18.2 \text{ M}\Omega\text{cm}$) ile seyreltilmiştir. Ligand sentezi sırasında kullanılan ftaldialdehit, 2-aminofenol ve p-toluensülfonik Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından satın alınmıştır. Nitrik asit (%65, HNO_3) Merck (Darmstadt, Almanya)'ten temin edilmiş olup deneylerde kullanılan diğer reaktifler ve kimyasalların tümü “3.1.1 Kimyasallar” bölümü Tablo 3.1’ de ve ekstraksiyon çalışmaları boyunca kullanılan tampon çözeltiler “3.1.1 Kimyasallar” bölümü Tablo 3.2’ de verilmiştir.

3.2.2 Cihazlar

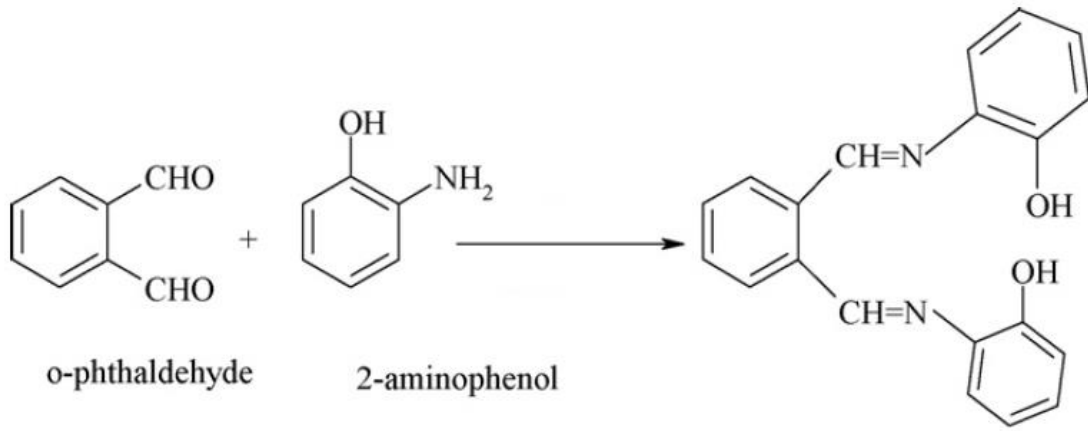
Çalışma boyunca bakır absorpsiyon değerlerini ölçmek için ATI UNICAM 929 AA model alevli atomik adsorpsiyon spektrometresi kullanılmıştır. Bakıra ait oyuk katot lambasının çalışma koşulları; 2.0 mA çalışma akımı, 232.0 nm analitik dalga boyu ve 0.5 nm slit genişliğidir. Sistemin alevi, yakıt gazı olarak asetilen ve oksitleyici olarak havanın karışımından oluşturulmuştur. Zemin sinyalleri, döteryum lambası kullanılarak düzeltilmiştir. Çalışmada kullanılan diğer alet ve cihazlar “3.1.2 Cihazlar” bölümü Tablo 3.3’ te sıralandığı gibidir.

3.2.3 Deneysel Prosedürler

3.2.3.1 [2 - (((E) -2 - (((E) -2-hydroxybenzylidene) amino) benzylidene) amino)] Sentez Prosedürü

Bu çalışmada B3 olarak kodlandırılmış olan [2 - ((E) -2 - (((E) -2-hidroksibenziliden) amino) benziliden) amino)] ligandı, ftaldialdehit ve 2-aminofenolün 1:4 molar oranında reaksiyonuyla sentezlenmiştir. Reaksiyon, susuz bir ortamda gerçekleştirilmiştir. İlk önce 5.0 mmol aldehit, 15 mL etanol içinde çözülmüştür.

0.01 mg p-toluensülfonik asit, katalizör olarak reaksiyon şişesine aktarılmış ve çözeltiden suyu çıkarmak için çözelti bir geri akış sisteminde 60 °C'ye ısıtılmıştır. Hazırlanan 20 mmol 2-aminofenol, sürekli karıştırılarak reaksiyon şişesine damla damla ilave edilmiştir. Reaksiyon şişesi, reaksiyonun tamamlanması için 60 °C'de 3 saat tutulmuş ve ışığa maruz bırakmadan gece boyunca bekletilmiştir. Hazırlanan ligand çözeltileri, oda koşullarında serin ve kuru bir dolapta saklanmış ve güneş ışığından veya ışığın olası etkilerinden korunmak için alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Bu Schiff bazının yapısı, IR ve ¹H NMR spektrumları ile de doğrulanmış ve kimyasal yapısı Şekil 3.3' te verilmiştir [322].



Şekil 3.3 [2 - (((E) -2 - (((E) -2-hydroxybenzylidene) amino) benzylidene) amino)] kimyasal yapısı [322]

3.2.3.2 Ekstraksiyon Aparatı

Bu çalışmada, “Bölüm 3.1”deki çalışmada kullanılan plastik elek yerine, aynı görevi gören fakat daha işlevli ve etkili olan metalik elek geliştirilmiştir. Filtre yüzeyinde bulunan delik sayısının imkanlar dahilinde artırılabilir olması, bununla birlikte dispersiyon veriminin de artacak olması ve plastik yüzeyinde kalan interferans yaratacak kimyasalların sonraki çalışmaları etkileyebilecek olması, sistemi geliştirme ihtiyacı doğurmuştur.

Şekil 3.4' te gösterilen metalik elek, metalik parçalar arasında 4.5 cm uzunluğunda ve 5.0 cm çapında 60 mesh paslanmaz bir metalik filtreye sahiptir. Sistem tasarımı, iki şırınga, aralarında metalik elekli filtre ile birbirine bağlanmış ve şırıngaların ileri geri hareketleri ile çözeltilerin manuel olarak karıştırılması sağlanmıştır. Yüzey alanı arttırılarak iki şırınga arasındaki hareketten oluşan basıncın da etkisiyle, ekstraksiyon çözücüsünün sulu çözeltide etkili bir şekilde

dispersiyonu sağlanarak dağıtım etkinliği arttırılmış ve organik çözücü kullanımı tamamen ortadan kaldırılmıştır.



Şekil 3.4 Metalik elek bağlantısı [315]

3.2.3.3 Cu-MEB-ÇŞE-BSFME Prosedürü

MEB-ÇŞE-BSFME sisteminin şematik bir diyagramı Bölüm “2.3.4 Çift Şırınga Esaslı Basınçlı Sıvı Faz Mikroekstraksiyon” Şekil 2.9’ da gösterilmektedir. İlk olarak, tek kullanımlık şırıngaya 8.0 mL bakır standart/örnek çözeltisi, 1.50 mL B3 ligand çözeltisi (%1.25, w/v) ve 1.0 mL pH 9.0 borat tampon çözeltisi ilave edilmiş ve ikinci bir şırıngaya metalik filtre ile bağlanmıştır. Metal-ligand kompleksinin oluşumu, metalik elek boyunca 20 saniye basınçlı karıştırma ile hızlandırılmıştır. Daha sonra kompleks çözeltiye 2.0 mL’lik bir şırınga yardımı ile 600 µL diklorometan eklenmiştir. Ekstraksiyon çözücüsünü sulu çözeltide etkili bir şekilde dağıtmak amacıyla 20 saniye daha basınçlı karıştırma gerçekleştirilmiş ve ortaya çıkan bulanık çözeltinin faz ayrılmasını kolaylaştırmak için 2.0 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Elde edilen yaklaşık 250 µL’lik organik alt faz, 15 mL’lik temiz bir santrifüj tüpüne aktarılmış ve çözücünün kaynama noktasını yükseltmek amacıyla 100 µL etanol eklenerek 70 °C’de bir su banyosunda buharlaştırılmıştır. Son olarak, kalıntıyı çözmek için 85 µL derişik nitrik asit kullanılmış ve AAAS sistemine gönderilmiştir.

3.2.3.4 Gerçek Örneklerin Hazırlanması

Yapraklar, zeytin değirmenlerine kayda değer miktarlarda, yani toplam zeytin ağırlığının yaklaşık %5'i kadar ulaştıklarından, kolayca temin edilebilen bir endüstriyel yan ürün olarak da kabul edilebilmektedirler [323]. Zeytin ağacı ürünleri insan beslenmesinde ve geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. Geleneksel tıpta zeytin yaprağı çayı, hipertansiyon ve hiperglisemi gibi çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılmıştır [324]. Tarım ve gıda endüstrilerinden gelen artıkların birikmesi, ekonomik ve çevresel açıdan ciddi bir sorun teşkil etmektedir [323]. Ülkemizin birçok bölgesinde çay olarak oldukça fazla tüketilen zeytin ağaçlarının yaprakları, bu çevresel sorunlardan etkilenmesi oldukça muhtemeldir.

İstanbul'un (Güngören ve Esenler) ve Bursa'nın (Osmangazi ve Gemlik) farklı semtlerinden dört farklı zeytin yaprağı toplanmış ve bir gece boyunca 100 °C'de etüvde kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan yapraklar havanda iyice öğütülerek homojen ince toz haline getirilmiştir. Her örnekten 25 g cam beherlere tartılarak 100 mL ultra saf deiyonize su ile 30 dk kaynatılmıştır. Demlenen örnekler Grade 1 Whatman kalitatif filtre kağıtlarından süzülerek 250 mL'lik balon jodelere aktarılmış ve deiyonize su ile hacimlerine tamamlanmıştır.

3.3 Beş Paraben'in Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon Yöntemi ile Ruj Örneklerinde Eser Seviyelerde Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Eşzamanlı Olarak Belirlenmesi

3.3.1 Kimyasallar

Tüm deneysel işlemler boyunca analitik dereceli kimyasallar ve çözeltiler kullanılmıştır. MeP, EtP, PrP, BuP ve BeP Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) satın alınmıştır. Tampon çözeltisi hazırlanmasında kullanılan asetonitril, formik asit ve amonyum hidroksit (%25), ekstraksiyon çözücüleri olarak kullanılan kloroform, 1,2-dikloroetan, diklorometan ve bunlara ek olarak etanol, metanol ve izopropil alkol gibi organik çözücüler Merck'ten (Darmstadt, Almanya) temin edilmiştir. Çalışma boyunca kullanılan deiyonize su, su arıtma sistemi'nden (ELGA PureLab Flex 3 Ultrapure, Londra, İngiltere) sağlanmıştır. Beş parabenden oluşan standart

karışımı (1000 mg kg⁻¹), metanol içinde gravimetrik olarak hazırlanmış, deiyonize su ile istenen derişimlere seyreltilmiş ve çalışma boyunca -4 °C'de tutulmuştur.

3.3.2 Cihazlar ve Kromatografik Şartlar

Bu çalışmada kullanılan HPLC sistemi (Shimadzu, Japonya), bir LC-20AT sıvı kromatografı, CTO-10AS VP kolon fırını, SPD-20A UV detektörü ve bir SIL-20A HT otomatik örnekleyiciyi içermektedir. Ekstraksiyon işleminde kullanılan sulu çözeltiler, deiyonize su ile hazırlanmıştır. Mobil faz hazırlanmasında pH metre ve manyetik karıştırıcı, ekstraksiyon süresince vorteks karıştırıcı ve santrifüj, gerçek örnek hazırlanmasında ise analitik terazi ve ultrasonik banyo kullanılmış olup bu alet ve cihazlara ait marka ve modeller Tablo 3.5' te listelendiği gibidir.

Tablo 3.5 Parabenlerin tayini için çalışma boyunca kullanılan laboratuvar alet ve cihazlar

Cihazlar	Marka/Model
Su Arıtma Sistemi	ELGA Pure Flex 3
Isıtmalı Manyetik karıştırıcı	IKA RCT ST S000
Vortex karıştırıcı	ISOLAB M1010002
Analitik Terazi	Ohaus Pioneer PA214C
Otomatik Pipet	Eppendorf
Santrifüj	BIOBASE BKC-TL5II
pH Metre	Hanna HI2020
Ultrasonik Banyo	HAPA M-100

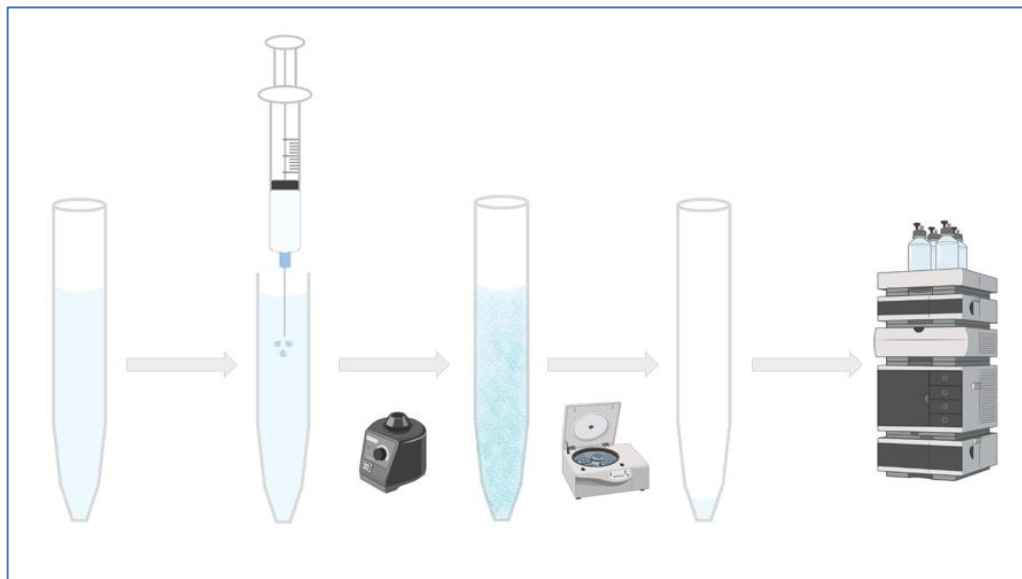
HPLC sistemine analitleri enjekte etmeden önce, sistemin dengelenmesi ve hatlarda bulunan havanın giderilmesi amacıyla hazırlanan hareketli faz bu hatlardan geçirilmiştir. Böylece kolon şartlandırılmış ve sistem basıncı uygun hale getirilmiştir. Geliştirilecek yöntem için en iyi ayırımın sağlanması amacıyla optimum kromatografik koşullar saptanmıştır. Tüm kromatografik ayırmalar, bir

Phenomenex-Aqua C18 (250 mm, 4.6 mm, 5 µm) kolonu ve mobil faz olarak amonyum format tamponu (50.0 mM, pH 4.0) : asetonitril (60:40, v/v) kullanılarak izokratik modda gerçekleştirilmiştir. Mobil faz akış hızı 1.2 mL dk⁻¹ ve enjeksiyon hacmi 30 µL'dir. UV dedektörünün dalga boyu 254 nm'de sabit tutulmuştur.

3.3.3 Deneysel Prosedürler

3.3.3.1 DSSME Prosedürü

15 mL'lik bir santrifüj tüpündeki 8.0 mL standart/örnek çözeltisine, 5.0 mL tek kullanımlık şırınga kullanarak 1.2-dikloroetan (250 µL) ve izopropil alkol (2.0 mL) karışımı enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan sonra oluşan bulanık çözelti, ekstraksiyon çözücüsü ile sulu faz arasındaki etkileşimi arttırmak için 15 s vorteks ile karıştırma işlemi uygulandıktan sonra analit açısından zengin organik fazı ayırmak için 4000 rpm'de 2.0 dakika santrifüjlenmiştir. Üst faz olarak elde edilen sulu çözelti dekante edilip 1.2-dikloroetan analitçe zengin alt fazı temiz bir santrifüj tüpüne otomatik pipet yardımıyla aktarılmış ve organik çözücünün buharlaşması için ortam koşulları altında 12 saat boyunca uçurulmaya bırakılmıştır. Analitlerin yapısındaki olası bozulma ihtimali nedeniyle termal buharlaştırma kullanılmamıştır. Buharlaştırma işleminden sonra, kalıntı 200 µL metanolde çözülerek HPLC-UV sistemine gönderilmek üzere viallere alınmıştır. DSSME-HPLC-UV sistemine ait şematik gösterim, Şekil 3.5' te verilmiştir.



Şekil 3.5 DSSME-HPLC-UV sisteminin şematik gösterimi

3.3.3.2 Gerçek Örneklerin Hazırlanması

Milyonlarca insan, dünya genelinde sürekli olarak kişisel yüz kozmetikleri ve bakım ürünleri kullanmaktadır. Bu ürünlerin uygulanması insan cildini belirli bileşenlere maruz bırakabilmektedir. Kozmetik ürünlerdeki doğal ve sentetik maddeler ciltte hassasiyet, tahriş ve alerjiye neden olabilmektedir [325]. Rujlar, nihai ürüne farklı özellikler, görünüm ve renkler veren yağlar, yumuşatıcılar, antioksidan maddeler, silika, titanyum dioksit, mika ve renklendiricilerden oluşmaktadır [326]. Bu sebeplerle farklı ülkelerden satın alınan tanınmış ve ucuz markalara ait altı adet ruj örneği analiz edilmiştir. Örnekler doğal saklama koşullarına göre oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Örnek hazırlama, kolona enjeksiyon için uygun, tekrarlanabilir ve homojen bir çözelti sağlamayı amaçlayan HPLC analizinin önemli bir parçasıdır. Örnek hazırlamanın amacı, nispeten interferans içermeyen, kolona zarar vermeyen ve amaçlanan HPLC yöntemiyle uyumlu, yani örnek çözücünün alıkonmayı ve rezolüsyonu etkilemeden mobil fazda çözülmesidir [212].

Her bir rujdan 0.20 g tartılıp 15 mL santrifüj tüpüne aktarılmış ve metanol ile yaklaşık 5.0 g'a tamamlanmıştır. Ardından 30 dk ultrasonik banyoda sonikasyona tabi tutulmuştur. Sonikasyona tabi tutulan örnekler, bir laboratuvar filtre kağıdından ve ardından 0.45 µm şırınga ile süzölmüştür. Rujlar gibi karmaşık matriksli örneklerin enstrümantasyonla uyumlu bir forma dönüştürülmesi gereklidir. Bu sebeple süzöntü, kompleks matriksin ekstraksiyon işlemi üzerindeki girişim etkisini en aza indirmek için distile su ile 20 kat seyreltilmiştir. Hedef analitleri içermeyen bir ruj örneği, matriks uyumlu kalibrasyon standartlarını hazırlamak amacıyla boş bir ekstrakt elde etmek için diğer ruj örnekleriyle aynı şekilde ekstrakte edilmiş ve seyreltilmiştir.

3.4 HPLC-UV ve Dijital Görüntü Tabanlı Kolorimetrik Tayin Yöntemi ile Metalik Elek Bağlantılı Çift Şırınga Sistemi Destekli Cr (VI)'nın Belirlenmesi İçin Bir Çift Görüntüleme Yönteminin Geliştirilmesi

3.4.1 Kimyasallar

ELGA PureLab Flex 3 Ultrapure (Londra, İngiltere) sisteminden elde edilen ultra saf su, tüm standart ve örnek çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılmıştır. Tampon çözeltisi hazırlanırken kullanılan asetonitril, formik asit ve amonyum hidroksit (%25) Merck'ten (Darmstadt, Almanya) satın alınmıştır. Ligand çözeltisinin hazırlamasında kullanılan etanol yüksek saflıkta olup Merck'ten (Almanya) temin edilmiştir. Difenilkarbazid (DPC) ligand (Merck, Darmstadt, Almanya) çözeltisi saf kimyasalından hazırlanmış ve hazırlanan kabı alüminyum folyo ile sarılarak ışığa maruz kaldığında hızlı bozunabilmesi nedeniyle karanlıkta tutulmuştur. High Purity Standards (Kuzey Charleston, ABD)'tan temin edilen 1000 mg L⁻¹ Cr (VI) stok çözeltisi seyreltilerek çalışma ve kalibrasyon standardı çözeltileri hazırlanmıştır. Cr (VI)-difenilkarbazid kompleks oluşum çalışmaları boyunca kullanılan tampon çözeltiler Tablo 3.6' da verilmiştir.

Tablo 3.6 Çalışmada kullanılan tampon çözeltileri ve hazırlanışları

Tampon Çözeltisi	Hazırlanışı
pH 1.5	0.20 M KCl + 0.20 M HCl
pH 2.2	0.10 M potasyum hidrojen fitalat + 0.10 M HCl
pH 2.4	0.10 M potasyum hidrojen fitalat + 0.1 M HCl
pH 2.8	0.10 M potasyum hidrojen fitalat + 0.10 M HCl
pH 3.2	0.10 M potasyum hidrojen fitalat + 0.10 M HCl
pH 3.6	0.10 M potasyum hidrojen fitalat + 0.10 M HCl
pH 4.0	0.10 M potasyum hidrojen fitalat + 0.10 M HCl

3.4.2 Cihazlar ve Kromatografik Şartlar

Kromatografik analizlerde bir SPD-20A ultraviyole görünür dedektörü, bir dağıtım pompası, bir SIL-20A HT otomatik örnek alıcısı ve bir CTO-10AS VP fırını ile donatılmış bir Shimadzu LC-20AT HPLC sistemi kullanılmıştır. Kromatografik elüsyon için bir Phenomenex-Aqua C18 (250 mm, 4.6 mm, 5 µm) kolonu, pH ölçümleri için Hanna HI 2211 pH/ORP metre kullanılmıştır. Kromatografik çalışmalar, izokratik bir elüsyon kullanılarak asetonitril ve amonyum format tamponu (50.0 mM, pH 4.0) (78:22, v/v) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan enjeksiyon hacmi 30 µL ve mobil fazın akış hızı 1.2 mL dk⁻¹'dir. Metal-ligand kompleksin tayininde 581 nm analitik dalga boyu kullanılmıştır. Toplam analiz süresi 8.0 dk'dır.

Dijital görüntüler, 12 megapiksel kamera, ikili kamera düzeneğinde 12mp F1.8 diyafram aralığı, 828x1792 px ekran çözünürlüğü ve 16 milyon ekran renk sayısına sahip bir Iphone 11 akıllı telefon ile çekilmiştir. Fotoğraf çekme adımıda telefon flaş ışığı inaktif edilmiştir. Akıllı telefon, ortam ışığından izole edilmiş karanlık bir ortam oluşturmak için dış katmanı siyah bir bantla kaplanmış 25 × 20 cm'lik taşınabilir strafor dikdörtgen bir kutunun önüne yerleştirilmiştir. Akıllı telefonun kamerasının yerleştirildiği kutunun önüne, iç kutunun kusursuz görüntülenmesini sağlamak için bir oyuk oluşturulmuştur. Kutunun üst iç tarafına 1.5 m'lik bir parlak LED şeridi (12 V) takılmış ve LED'lerin üzerine iki adet beyaz A4 kağıt yerleştirilmiştir. Kutunun taban kısmına başka bir beyaz A4 kağıdı yapıştırılmış ve standart/örnek çözeltisi kağıda yapıştırılan bir kuvars küvete yerleştirilmiştir. Görüntüler, Apple Store uygulamasında bulunan "Color Tool" uygulaması kullanılarak işlenmiştir.

3.4.3 Deneysel Prosedürler

3.4.3.1 Karıştırma Aparatı

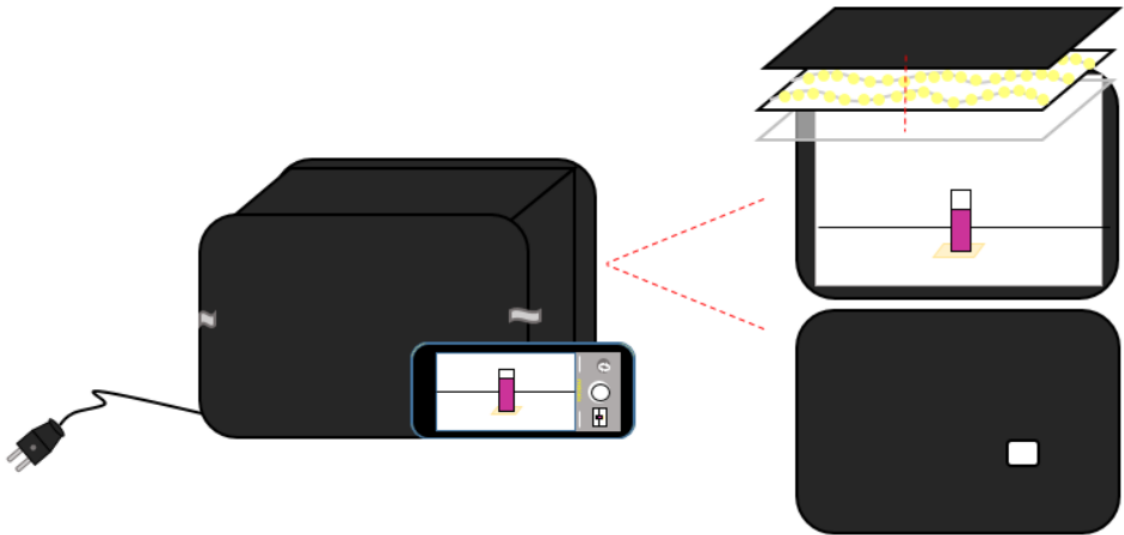
Çalışma boyunca karıştırma işlemleri için bölüm "2.3.4 Çift Şırınga Esaslı Basınçlı Sıvı Faz Mikroekstraksiyon" Şekil 2.12' de gösterilen otomasyon sistemi ile metalik elek bağlantısı kullanılmıştır. Metalik elek sayesinde yüzey alanının arttırılmasıyla kompleks oluşum sürecinde homojen bir karışım elde edilmiş olup aynı zamanda karıştırmanın manuel sistemden sabit basınçlı pompa yardımıyla gerçekleştirilen

sabit hızlı karıştırma ile tekrarlanabilirlik artırılmış ve böylece manuel karıştırmadan kaynaklanabilecek hatalar önlenerek yüksek standart sapma değerleri oluşmasının önüne geçilmiştir.

3.4.3.2 Cr (VI)-OS-MEB-ÇŞE-HPLC-UV/DIC Prosedürü

Prosedüre ilk olarak Cr (VI)-DPC kompleks oluşumu gerçekleştirilerek başlanmıştır. Bu sebeple 8.0 mL standart/örnek Cr (VI) çözeltisi ile birlikte 2.0 mL pH 1.5 tamponu ve 0.50 mL %0.10 (v/v) derişiminde DPC ligand çözeltisi 10 mL'lik şırınga içine aktarılarak metalik elek yardımıyla otomasyon sistemi ile 15 s karıştırılmıştır. Oluşan mor renkli homojen kompleks karışımı temiz bir 15 mL'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Nihai karışım, HPLC-UV ve kolorimetrik yöntemle eş zamanlı olarak ölçülmüştür.

Kolorimetrik ölçümlerde yakalanan görüntü alanı ve odak uzaklığı tüm deneylerde sabit tutulmuştur. Tüm ölçümler üç tekrarlı şekilde, her tekrar için üç görüntü ve her görüntüden beş farklı nokta alınarak oluşturulmuştur. Analitik yanıtları elde etmek için G hattı kullanılmıştır. Akıllı telefon kamerası kullanarak dijital görüntüleri yakalamak için kullanılan sistemin şematik bir diyagramı Şekil 3.6' da sunulmuştur. Kolorimetrik ölçümler için belirli miktarlarda standart/örnek hacmi kuvars küvete alınmış ve kalan miktarın bir kısmı ise viallere alınarak HPLC-UV sistemi ile analiz edilmiştir.



Şekil 3.6 Dijital görüntülerin elde edilmesi için kullanılan sistemin şematik gösterimi

3.4.3.3 Gerçek Örneklerin Hazırlanması

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu ve uygulanabilirliğini kontrol etmek amacıyla atıksu, nehir suyu ve musluk suyu örneklerde geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Atık su, İstanbul belediyesinden gelen atık su bir arıtma tesisinden, musluk suyu Sarıyer/İstanbul ve nehir suyu Antalya'dan temin edilmiş ve 4.0 °C'nin altında plastik kaplarda depolanmıştır. Analizden önce su matriksleri, önce normal bir filtre kağıdı (125 mm) ile daha sonra bir rejeneratif selüloz şırınga filtresi (0.45 µm) ile filtrelenmiş ve atık su için 10 kat, nehir suyu ve musluk suyu için ise 4 kat seyreltme işlemi uygulanmıştır. Seyreltilen her bir örneğe doğrusal kalibrasyon aralıklarında olacak şekilde HPLC-UV sistemi için 0.02, 0.05, 0.75, 1.0 mg kg⁻¹, DIC sistemi için ise 0.20, 0.50 ve 0.75 mg kg⁻¹ derişimlerinde standartlar spike edilmiş ve optimum şartlarda kompleks oluşumları gerçekleştirilmiştir.

4.1 Kobaltın Otomasyon Sistemi ile Çift Şırınga Esaslı Sıvı Faz Mikroekstraksiyonu Sonrası Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometresi ile Eser Seviyelerde Tayini

Tez kapsamında yapılan ilk çalışmada, kobalt analitinin otomasyon sistemi ile çift şırınga esaslı sıvı faz mikroekstraksiyonu ile önderiştirme işlemi sonrası AAAS ile eser seviyelerde tayininin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışma, 2021 yılının Kasım ayında “Food Chemistry” adlı dergide “A basic and effective liquid phase microextraction with a novel automated mixing system for the determination of cobalt in quince samples by flame atomic absorption spectrometry” başlığı altında yayınlanıp bilim dünyasına katkı sağlamıştır.

4.1.1 Optimizasyon Çalışmaları

Çalışmada sistem analitik performansının belirlenmesinden önce çalışmayı etkileyen tüm parametrelerin optimize edilmesi yöntem verimliliğini test etme açısından oldukça önemlidir. Cihaz parametrelerinin yanı sıra OS-ÇŞE-BSFME yönteminin parametreleri, ekstraksiyon verimliliğini en üst düzeye çıkarmak ve aynı zamanda analit için tayin limitini düşürmek için optimize edilmiştir. Optimizasyon adımları, bir parametre değiştirilip diğer parametreler sabit tutularak gerçekleştirilmiş ve optimizasyonu yapılan parametrenin analit sinyali üzerine olan etkisi incelenmiştir. Her optimizasyon adımında, her bir örnek için üç tekrarlı ekstraksiyonlar yapılmış ve optimum değerin seçilmesi için bu denemelerin ortalama ve standart sapma değerleri dikkate alınmıştır. Optimizasyon çalışmaları 1.0 mg L^{-1} kobalt standart çözeltisi ile gerçekleştirilmeye başlanmış olup sinyal artışına bağlı olarak doğrusal aralığın dışında kalmamak adına 0.25 mg L^{-1} kobalt standart derişimi ile çalışmalara devam edilmiştir.

4.1.1.1 AAAS Optimizasyonları

Ölçümlerden önce AAAS sistemine ait optimize edilecek enstrümental koşullar, asetilen akış hızı ve örnek akış hızıdır. Laboratuvarımızda yapılan önceki çalışmalar baz alınarak [302] kobalt analitinin stokiyometrik alev ile çalışılmasının en uygun olduğu görülmüş ve buna göre optimum asetilen akış hızı 15 L h^{-1} , hava akış hızı ise 32 L h^{-1} olarak belirlenmiştir. Örnek akış hızı ise cihazın ayarlanabildiği maksimum seviye olan 6.7 mL dk^{-1} 'ya ayarlanmıştır. Böylece birim zaman başına aleve ulaşacak olan standart/örnek hacmi artacak ve aynı hacimde daha yüksek absorpsiyon değeri elde edilecektir. Aynı zamanda analite ait tayin limitinde azalma meydana gelmiş olacaktır. Alev başlığı ise $27 \text{ cm}'$ de sabit tutulmuştur.

4.1.1.2 Kompleks Oluşum Optimizasyonları

Metal iyonlarının sıvı sıvı mikroekstraksiyon ile ayrılması, çökelmiş fazın küçük hacmine ekstrakte edilecek yeterli hidrofobikliğe sahip bir kompleksin önceden oluşturulmasını içermektedir. Böylece istenen ön deriştirme elde edilmektedir [327]. Genel olarak, sulu çözeltideki metal iyonları, suda çözünmeyen metal kompleksleri üretmek için kompleksleştirici maddeler ile kompleks haline getirilmektedir. Metaller, ligandlarla moleküler koordinasyon içinde bulunduklarında kolayca ekstrakte edilmektedirler [328]. Bu bağlamda, ekstraksiyon verimliliği, kompleksleşme reaksiyonunun verimliliğine güçlü bir şekilde bağlıdır. Maksimum kompleksleşme ve ekstraksiyon verimini elde etmek için, şelat oluşumunu etkileyen parametreler arasında analit ile etkili bir kompleks oluşturacak uygun ligandın belirlenmesi, tampon çözeltisinin pH/miktarı, ligand derişimi/miktarı ve kompleks oluşturma süresi bulunmaktadır.

➤ Kompleks Oluşumu İçin Uygun Ligandın Seçilmesi

Bir metal iyonunun sulu bir fazdan bir organik faza ekstraksiyonu, suda çözünmeyen veya az çözünür bileşiklerin üretilmesi için farklı komplekslerinin sentezlenmesine dayanmaktadır. Bu nedenle, uygun ligand seçmek amacıyla çalışmanın başında farklı reaktiflerden laboratuvarımızda üretilen farklı Schiff bazı ligandları test edilmiştir. Çalışılmış olan ligandlara ait kimyasal isimler ve bunlara ait laboratuvar kodlamaları Tablo 4.1'de görülmektedir.

Tablo 4.1 Test edilen Schiff baz ligand kimyasal isimleri ve laboratuvar kodları

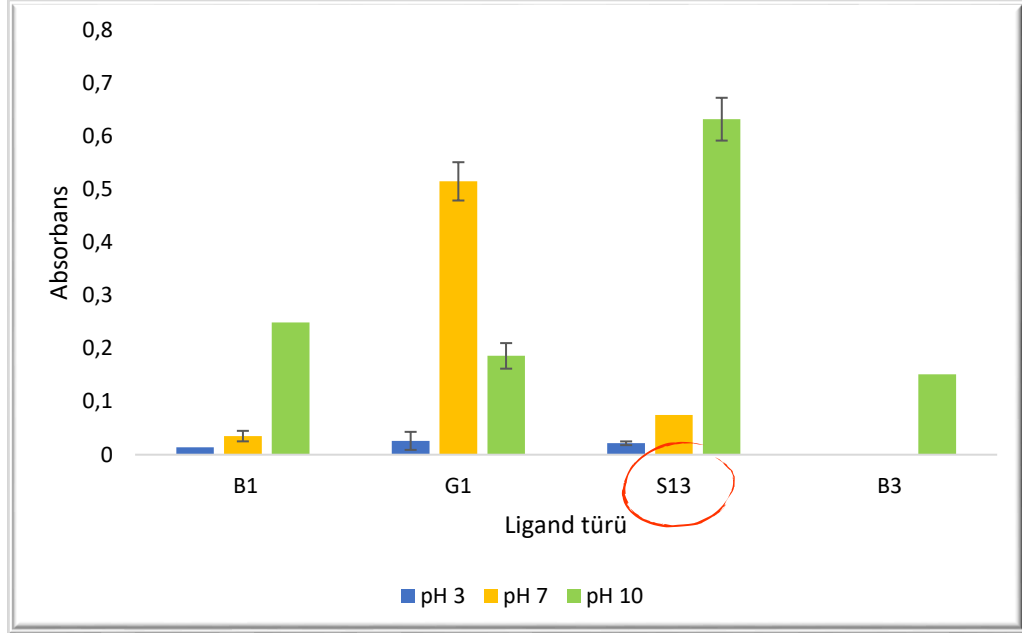
Ligand Kimyasal İsmi	Ligand Kodu
2-[(E)-(naphthalen-2-ylimino)methyl]phenol	B1
[2 - ((E) -2 - (((E) -2-hidroksibenziliden) amino) benziliden) amino)]	B3
(Z)-3-bromo-5-(((4-hidroksifenil)imino)fenol	S13
3-[(2-hydroxyphenyl)imino]methyl]-2-naphthalenol	G1

B1, B3, S13 ve G1 şeklinde kodlandırılan dört Schiff bazı ligandı, stabil kompleks oluşumu için uygun bir iyonik kuvvet seçmek amacıyla sulu kobalt çözeltisinin asidik ve bazik bölgelerinde (pH 3.0, pH 7.0 ve pH 10), 1.0 mg L⁻¹ standart kobalt çözeltisi kullanılarak test edilmiştir. Bu optimizasyon adımı boyunca kullanılan deneysel koşullar, Tablo 4.2’de verildiği gibidir. Çalışılan ligand derişimleri, her ligandın ilgili çözücüsündeki maksimum çözünürlüğüne göre seçilmiştir.

Tablo 4.2 Kompleks oluşumu için uygun ligandı seçme optimizasyonunda kullanılan başlangıç parametreleri

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	1.0 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı / miktarı	pH 3.0, 7.0, 10 / 1.0 mL
Ligand derişimi / miktarı	B1: 0.5 g L ⁻¹ (w/v) / 1.0 mL G1: 0.02 g L ⁻¹ (w/v) / 1.0 mL S13: 0.15 g L ⁻¹ (w/v) / 1.0 mL B3: 0.2 g L ⁻¹ (w/v) / 1.0 mL
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	15 s
Ekstraksiyon çözücü türü / miktarı	Kloroform / 400 µL
Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresi	15 s
Eluent türü / derişimi / miktarı	HNO ₃ / 15.6 M (%67) / 200 µL

Şekil 4.1’de de görüldüğü gibi, elde edilen sonuçlara göre en yüksek absorbands değeri (Z)-3-bromo-5-(((4-hidroksifenil) imino)metil)fenol, yani S13 kodlu ligand için pH 10’da elde edilmiş ve bu da etkili bir kompleksleşme ve yüksek ekstraksiyon verimini doğrulamıştır.



Şekil 4.1 Ligandlara ait pH 3.0, pH 7.0 ve pH 10’deki absorbands değerleri

B1 ligandı ile oluşan kompleks, S13 ligandına göre aynı derişimde daha düşük verim göstermiştir. G1 ligandı ile oluşan kompleks ise kararsızlığa atfedilebilecek kısmen daha yüksek bağıl hatalara sahiptir. B3 ligandı için pH 3 ve 7’de çökelme meydana gelmiş ve pH 10’da, diğer kompleks oluşumlarından daha düşük absorbands değeri elde edildiği görülmüştür. B3 ligandının kararsız kompleks oluşturma performansı nedeniyle bu ligandla da çalışmalara devam edilmemiştir. Bu nedenlerden dolayı S13 optimum şelatlama ajanı kullanılarak çalışmaya devam edilmiştir.

➤ **Tampon pH ve Miktarının Belirlenmesi**

İyonik durumdaki analitlerin organik çözücüye doğrudan ekstraksiyonu, analitin moleküler formda olmasını gerektirmektedir. Sulu çözeltinin pH değeri sadece mevcut analit formlarını ve yüzey özelliklerini etkilemekle kalmaz, aynı zamanda kompleksleşme reaksiyonunu da etkilemekte, böylece ekstraksiyon verimini değiştirebilmektedir [329]. Bu sebeple pH, metal-şelat oluşumu ve bunu takiben ekstraksiyon üzerinde etkin bir rol oynamaktadır.

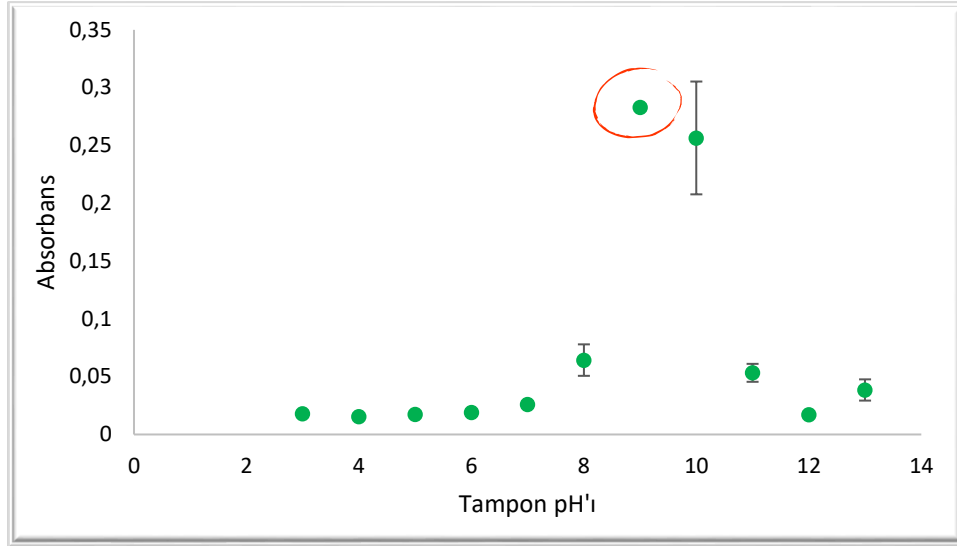
Sulu çözelti, 2 ile 13 arasındaki farklı pH değerlerinde tamponlanarak kompleks oluşumu için en uygun pH değerini belirlemek amaçlanmıştır. Bu adımda kullanılan sabit parametreler, Tablo 4.3' te görüldüğü gibidir.

Tablo 4.3 Tampon pH'ını belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	1.0 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon miktarı	1.0 mL
Ligand derişimi / miktarı	S13: 0.08 g L ⁻¹ (w/v) / 1.0 mL
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	15 s
Ekstraksiyon çözücü türü / miktarı	Kloroform / 400 µL
Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresi	15 s
Eluent türü / derişimi / miktarı	HNO ₃ / 15.6 M (%67) / 200 µL

pH 2.0-6.0 arasındaki asidik bölgede hiçbir analitik sinyal kaydedilmediği Şekil 4.2' de görülmektedir. Bu durum, kobaltın ligand ile kovalent kompleks oluşturmadan iyonik formda kaldığını veya bu pH değerlerinde ekstraksiyon verimlerinin çok düşük olduğunu göstermiştir. Düşük pH değerlerinde, ligand yüzeylerindeki hidroksil grupları protonlanmakta, bu da protonların (H⁺) rekabetine yol açmaktadır.

pH 7.0 yi takiben bazik bölgede absorbands sinyallerinde artış meydana geldiği ve en yüksek absorbands değeri ile birlikte en iyi tekrarlanabilirliğin pH 9.0 için elde edildiği görülmüştür. pH 10 'da yine yüksek bir sinyal elde edilmesine rağmen standart sapmada kararsız kompleks oluşumundan kaynaklanmış yüksek bir artış olduğu görülmüştür. pH 11-13 gibi daha yüksek pH değerlerinde ise gürültü seviyesinde sinyaller elde edilmiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, çalışmalara pH 9.0 tamponu ile devam edilmiştir.



Şekil 4.2 Tampon pH'ının absorbans sinyali üzerindeki etkisi

Tampon pH optimizasyonu sonucunda elde edilen yüksek absorbans değerleri dikkate alındığında, sonraki adımlardaki iyileştirmelerden kaynaklı sinyal artışı olabileceğinden doğrusal aralığın dışında çalışmaktan kaçınmak için çalışmalara 0.25 mg L^{-1} standart derişimi ile devam edilmiştir.

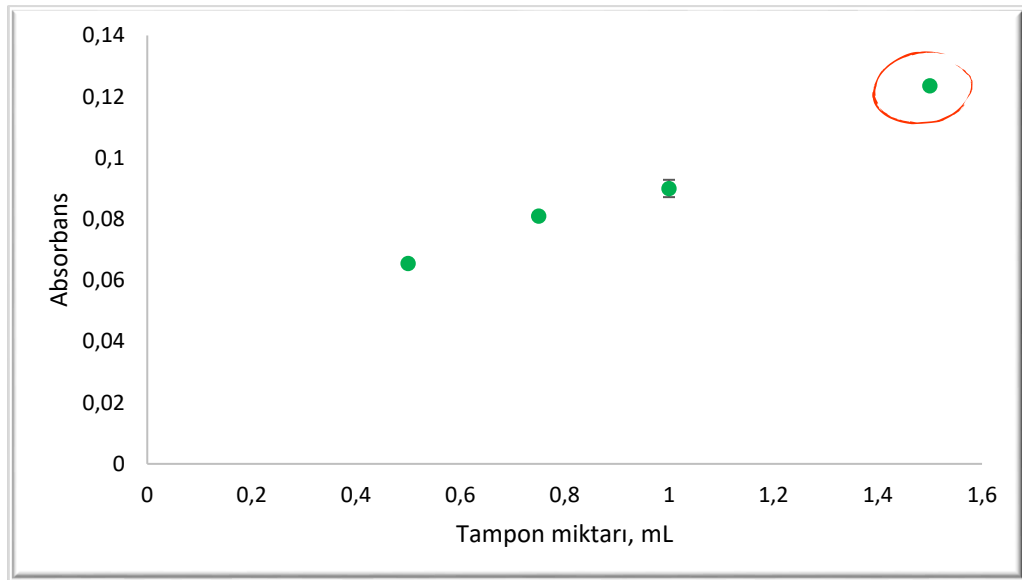
Sulu çözeltinin pH'ının ayarlanmasında kullanılan tampon çözeltisinin miktarı, kompleks stabilitesi için doğru tampon kapasitesini sağlanması açısından önemli diğer bir parametredir. Bu adımda kullanılan sabit parametreler, Tablo 4.4' te görüldüğü gibidir.

Tablo 4.4 Tampon miktarını belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	$0.25 \text{ mg L}^{-1} / 8.0 \text{ mL}$
Tampon pH'ı	pH 9.0
Ligand derişimi / miktarı	S13: $0.08 \text{ g L}^{-1} \text{ (w/v)} / 1.0 \text{ mL}$
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	15 s
Ekstraksiyon çözücü türü / miktarı	Kloroform / $400 \text{ } \mu\text{L}$
Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresi	15 s
Eluent türü / derişimi / miktarı	$\text{HNO}_3 / 15.6 \text{ M (}\%67\text{)} / 200 \text{ } \mu\text{L}$

Ekstraksiyon için optimum tampon miktarını belirlemek için 0.50, 0.75, 1.0 ve 1.5 mL borat tampon çözeltisi test edilmiş ve Şekil 4.3' te elde edilen sonuçlar, tampon çözeltisinin miktarının artmasıyla ekstraksiyon veriminde bir artış olduğunu göstermiştir. Buna bağlı olarak en yüksek absorbans değeri 1.5 mL tampon miktarı için elde edilmiştir. Bu nedenle sonraki çalışmalarda standart ve örnek çözeltilerin pH'ını ayarlamak için 1.5 mL borat tampon çözeltisi kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan şırınganın sınırlı hacminden dolayı daha yüksek miktarda tampon çözeltisi ile çalışılmamıştır. Daha yüksek hacme sahip şırınga kullanımı ise şırıngalar arasında oluşan basınç verimini düşüreceğinden kullanılan şırıngadan daha yüksek hacimli şırıngalar tercih edilmemiştir.



Şekil 4.3 Tampon miktarının absorbans sinyali üzerindeki etkisi

➤ **Ligand Derişim ve Miktarının Belirlenmesi**

Sulu ve organik faz arasındaki metal-ligand kompleksinin dağılım oranı ekstraksiyon verimliliğini doğrudan etkilediğinden, optimize edilmesi gereken bir diğer önemli parametre sulu çözeltideki kompleks oluşturucu maddenin derişimidir. Sulu çözeltinin sabit bir pH değerinde, şelat miktarındaki artış dağılım oranını arttırmakta, dolayısıyla ekstraksiyon verimini arttırmaktadır [330].

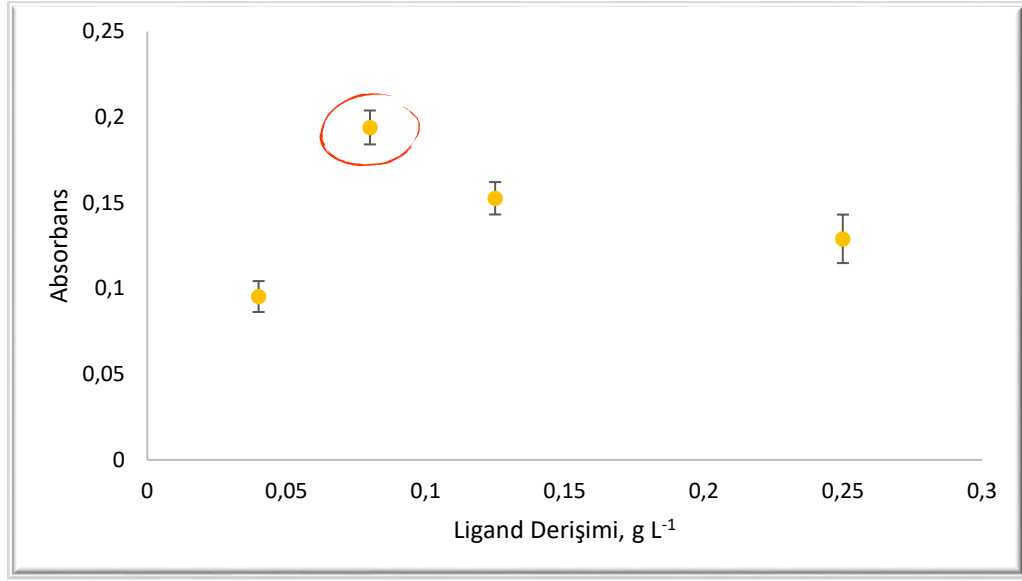
Ligand derişiminin etkisini incelemek ve yeterli hidrofobik özelliklere sahip metal kompleksleri elde etmek için, ligand çözeltileri 0.04, 0.08, 0.125 ve 0.25 g L⁻¹

derişimlerinde etanolde çözümlerek hazırlanmış ve eşit miktarlar eklenerek şelat oluşumu için kullanılmıştır.

Tablo 4.5 Ligand derişimini belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	0.25 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı / miktarı	pH 9.0 / 1.5 mL
Ligand miktarı	S13: 1.0 mL
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	15 s
Ekstraksiyon çözücü türü / miktarı	Kloroform / 400 µL
Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresi	15 s
Eluent türü / derişimi / miktarı	HNO ₃ / 15.6 M (%67) / 200 µL

Şekil 4.4' te gösterildiği gibi, 0.04'ten 0.08 g L⁻¹ ye metal şelat miktarının artmasıyla absorbans sinyalinde keskin bir artış meydana gelmiş ve daha yüksek derişimlerde doğrusal olarak azalmıştır. Bu sonuçlar 0.08 g L⁻¹ derişiminin kobalt iyonlarını kompleksleştirmek için yeterli olduğunu göstermiştir. Ligand çözeltisinin daha yüksek derişimleri, sulu çözeltide çökelmeye neden olmuş ve ekstraksiyon ile sulu faz arasında başka bir katı faz meydana gelmiştir. Bu durum, absorbans sinyallerinde azalmaya yol açmıştır. Bu nedenlerle 0.08 g L⁻¹ ligand derişiminin optimum koşul olduğu belirlenmiştir.



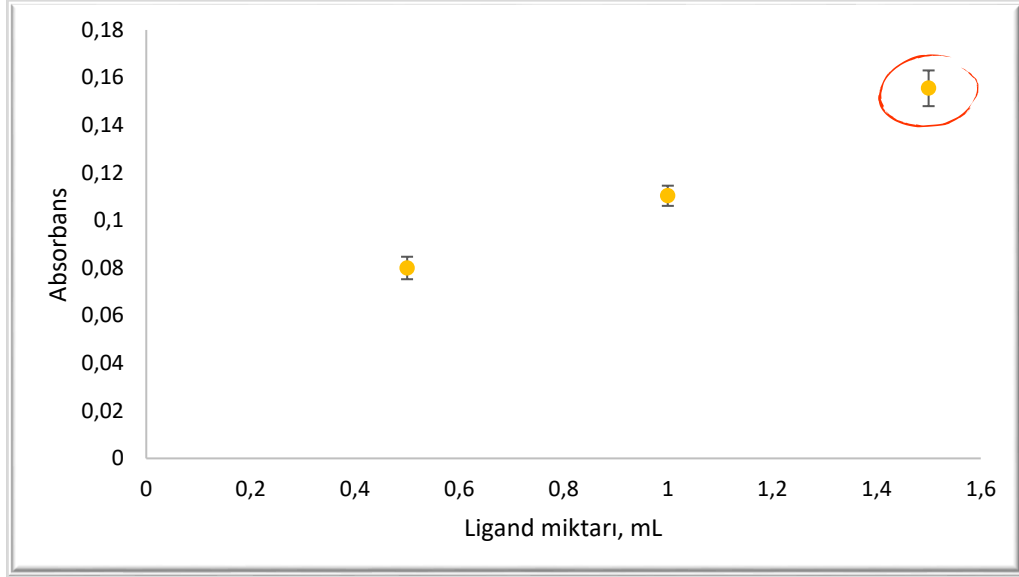
Şekil 4.4 Ligand derişiminin absorbans sinyali üzerindeki etkisi

Ligand çözeltisinin optimum derişiminin belirlenmesinden sonra, ligand çözeltisi miktarının etkisi, 0.50, 1.0 ve 1.5 mL değerlerinde 0.08 g L⁻¹ ligand çözeltisinin farklı miktarları kullanılarak değerlendirilmiştir. Ayrıca kobalt(II), hidroksit alkali koşullarda çöktüğü için ligandsız ekstraksiyon da ön deriştirme prosesi üzerindeki ligand etkisini ve metal hidroksit formunda olası çökelmeyi incelemek için çalışılmıştır.

Tablo 4.6 Ligand miktarını belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	0.25 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı / miktarı	pH 9.0 / 1.5 mL
Ligand derişimi	S13: 0.08 g L ⁻¹ (w/v)
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	15 s
Ekstraksiyon çözücü türü / miktarı	Kloroform / 400 µL
Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresi	15 s
Eluent türü / derişimi / miktarı	HNO ₃ / 15.6 M (%67) / 200 µL

Ligandsız ekstraksiyon ile hiçbir analitik sinyal kaydedilmemiş ve bu durum sulu çözeltiden kobalt ekstraksiyonu için kompleksleşmenin gerçekleştiğini doğrulamıştır. Şekil 4.5' te, artan ligand miktarıyla birlikte absorbans sinyallerinde de artış olduğu görülmüştür. Şırınga hacmindeki kısıtlama nedeniyle daha yüksek miktarlar denenmemiş olup 1.5 mL optimum ligand miktarı olarak seçilmiştir.



Şekil 4.5 Ligand miktarının absorbans sinyali üzerindeki etkisi

➤ **Kompleksleşme Sonrası Karıştırma Süresinin Belirlenmesi**

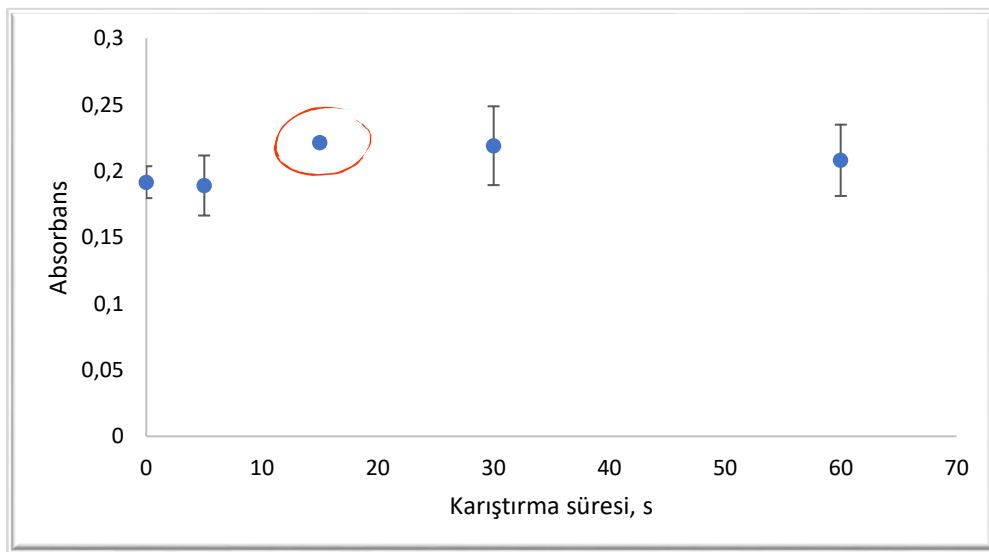
Karıştırma, ligand çözeltisinin sulu çözelti içinde homojen dağılımını sağladığı ve kompleksleşme oranını hızlandırdığı için kompleks oluşturma işlemindeki önemli adımlardan biridir. Karıştırma boyunca otomatik sistem üzerinde bulunan sabit hızlı pompa, şırıngalara ileri-geri hareket sağlayarak şırıngalar arası oluşacak basınçla sulu çözelti ile ligand çözeltisinin daha iyi karışmalarını sağlamaktadır. Bir karıştırma döngüsü (iki şırınganın ileri geri hareketi) yaklaşık 1 saniyedir.

Kompleks çözeltiler, 0-60 s aralığında otomatik karıştırma sistemi karıştırılarak kompleks oluşumu üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Tablo 4.7 Kompleksleşme sonrası karıştırma süresini belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	0.25 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı / miktarı	pH 9.0 / 1.5 mL
Ligand derişimi / miktarı	S13: 0.08 g L ⁻¹ (w/v) / 1.5 mL
Ekstraksiyon çözücü türü / miktarı	Kloroform / 400 µL
Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresi	15 s
Eluent türü / derişimi / miktarı	HNO ₃ / 15.6 M (%67) / 200 µL

Şekil 4.6' de gösterildiği gibi, karıştırma periyotlarının absorbands sinyali üzerinde önemli bir etkisi gözlenmemiştir. Karıştırmasız yapılan ekstraksiyon denemelerinin diğer karıştırma periyotlarına kıyasla absorbands değeri ve standart sapmasında çok büyük farklılık olmaması, sulu standart çözeltisi ve ligandın aynı anda şırınga aktarımı sırasında şırınga iğnesinin nebulizör görevi görüp kısmen karışma sağlamasından kaynaklıdır. Buna rağmen ligand çözeltisinin homojen dağılımının sağlandığından emin olmak için optimizasyonun bu noktası seçilmemiştir. 15 s'lik karıştırma periyodu, kısmen daha yüksek absorbands ve çok daha düşük standart sapma değerine sahip olduğundan dolayı optimum değer olarak seçilmiştir.



Şekil 4.6 Kompleksleşme sonrası karıştırma süresinin absorbands sinyali üzerindeki etkisi

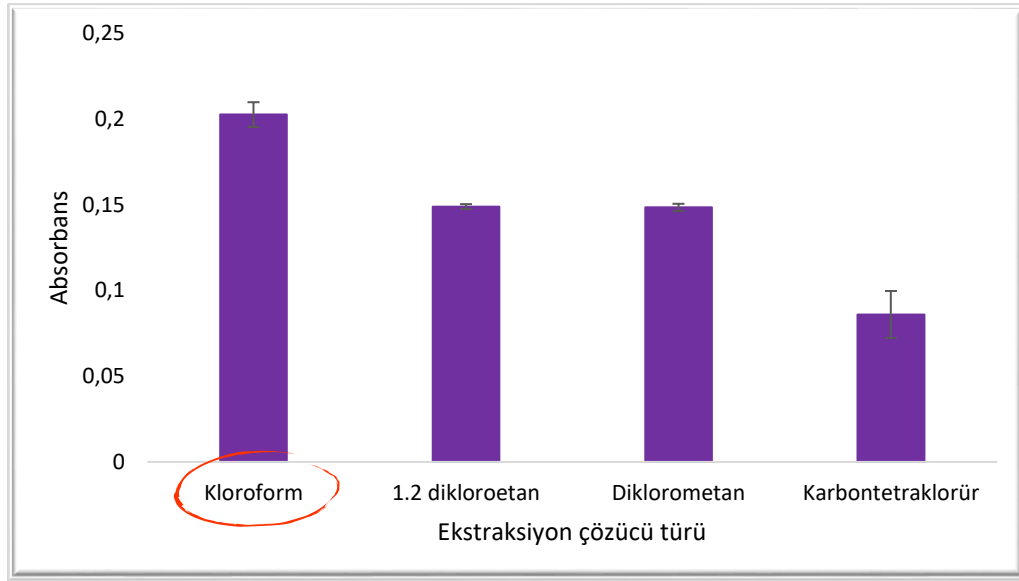
➤ Ekstraksiyon Çözücüsünün Türü ve Miktarının Belirlenmesi

Bir ekstraksiyon çözücüsü, ilgilenilen analit(ler)i çözmek için yüksek bir afiniteye ve suda düşük çözünürlüğe sahip olmalıdır. Ekstraksiyon prosedürlerinde karşılaşılan yaygın bir problem, ekstraksiyondan sonra ekstraksiyon çözücüsünün buharlaşmasıdır. Bu da çözücü miktarının azalmasına yol açmaktadır. Bu durum, yöntemin tam zenginleştirme faktörünün belirlenmesinde zorluklar ortaya çıkarmaktadır [331]. Ekstraksiyonda kullanılan tüplerin küçük hacimli ve dar yapısından dolayı, sudan daha yüksek yoğunluklu ekstraksiyon çözücülerini tüplerin dibine yerleştikleri için, santrifüjleme sonrası ayrılmayı ve organik fazın kolay ayrılmasını sağlamaktadır. Tüplerin dibine çöken son derece uçucu çözücüler de buharlaşma kayıplarına karşı duyarsız hale gelmektedir [332]. Ayrıca ekstraksiyon çözücüsünün polaritesindeki farklılık, sulu çözeltiden ayrılmayı mümkün kılmakta ve örnek hacmine göre düşük hacimlerin kullanılması analit zenginleşmesine yol açmaktadır. Bu sebepler göz önüne alındığında, en verimli ekstraksiyon çözücüsünü belirlemek amacıyla sıralanan özellikleri taşıyan 1,2-dikloroetan, diklorometan, kloroform ve karbon tetraklorür gibi klorlu organik çözücüler ile çalışılmıştır.

Tablo 4.8 Ekstraksiyon çözücü türünü belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	0.25 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı / miktarı	pH 9.0 / 1.5 mL
Ligand derişimi / miktarı	S13: 0.08 g L ⁻¹ (w/v) / 1.5 mL
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	15 s
Ekstraksiyon çözücü miktarı	400 µL
Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresi	15 s
Eluent türü / derişimi / miktarı	HNO ₃ / 15.6 M (%67) / 200 µL

Şekil 4.7' de gösterilen sonuçlara göre, en yüksek ekstraksiyon çıktısı sırasıyla diklorometan, 1,2-dikloroetan ve karbon tetraklorürden yaklaşık 1.4, 1.4 ve 2.4 kat daha yüksek olan kloroform ile kaydedilmiş ve optimum ekstraksiyon çözücüsü olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7 Ekstraksiyon çözücü türünün absorbans sinyali üzerindeki etkisi

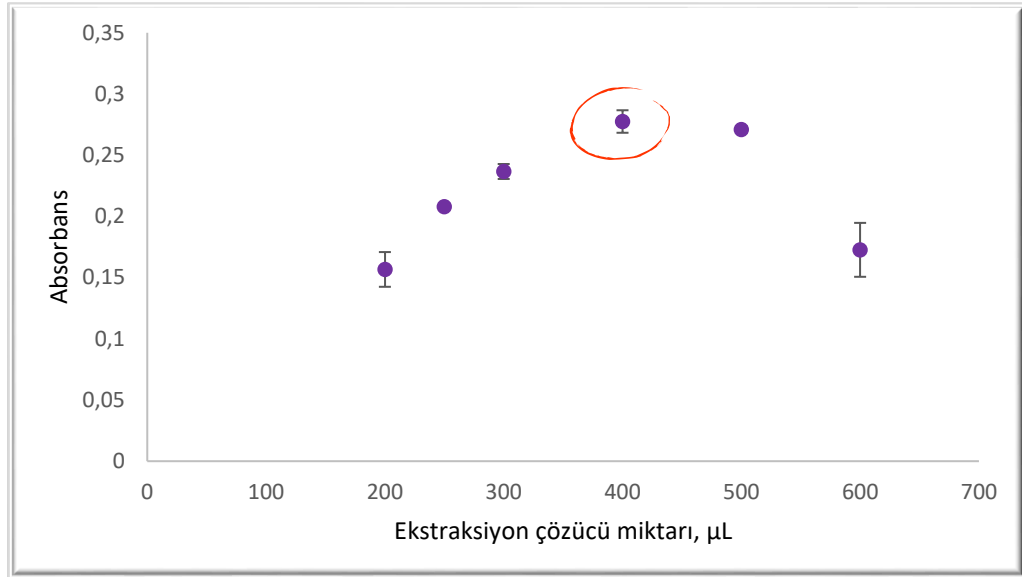
Ekstraksiyon çözücünün miktarı, ekstraksiyon geri kazanımını ve ön deriştirme faktörünü etkileyen bir diğer önemli parametredir. Fazla miktarda ekstraksiyon çözücüsü, hedef analit(ler)in seyrelmesine neden olarak absorbans değerlerinde bir azalmaya neden olabilmektedir. Yetersiz miktarda ekstraksiyon çözücüsü ise sulu çözeltiden tüm analit(ler)i toplayamayabilmektedir.

Kloroform çözücüsüne ait optimum miktar, 200, 250, 300, 400, 500 ve 600 μL 'lik miktarlarda eş koşullar altında test edilerek incelenmiştir.

Tablo 4.9 Ekstraksiyon çözücü türünü miktarını optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	0.25 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı / miktarı	pH 9.0 / 1.5 mL
Ligand derişimi / miktarı	S13: 0.08 g L ⁻¹ (w/v) / 1.5 mL
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	15 s
Ekstraksiyon çözücü türü	Kloroform
Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresi	15 s
Eluent türü / derişimi / miktarı	HNO ₃ / 15.6 M (%67) / 200 μL

Şekil 4.8’ deki sonuç grafiği, bir Gauss eğrisini göstermektedir. Elde edilen absorbans değerleri, 200 μL kloroformun kobalt-ligand kompleksini ekstrakte etmek için yeterli olmadığını, ancak kloroform miktarı arttıkça 400 μL ’ye kadar absorbans değerlerinde de artış olduğunu göstermiştir. Bu artış, çözücü miktarının artmasıyla sulu çözeltiden ekstrakte edilen kompleks miktarının da arttığını göstermektedir. 600 μL ’ye kadar arttırılan miktarlarda ise eş sürede yapılan basınçlı karıştırmanın etkisiyle düşük hacimlere göre dispersiyon verimi azalarak absorbans değerlerinde düşüşe sebebiyet vermiştir. 400 μL ve 500 μL ekstraksiyon çözücüsü için ortalama absorbans değerleri oldukça benzer olmasına rağmen, çözücü kullanımını azaltmak amacıyla 400 μL optimum miktar olarak seçilmiştir.



Şekil 4.8 Ekstraksiyon çözücü miktarının absorbans sinyali üzerindeki etkisi

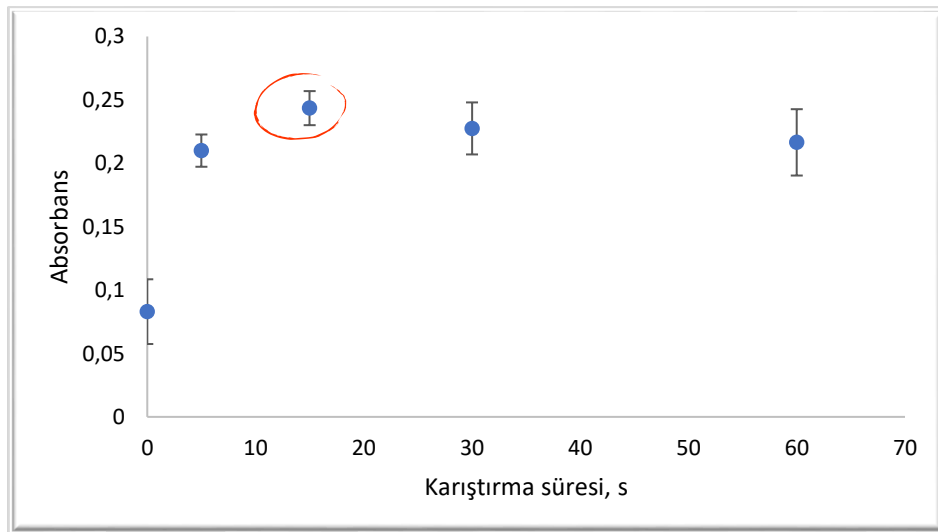
➤ Ekstraksiyon Sonrası Karıştırma Süresinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, standart/örnek çözeltisine ekstraksiyon çözeltisi ilave edildikten sonra basınçlı karıştırma sağlamak amacıyla çift şırınga kullanımına dayalı otomatik karıştırma sistemi kullanılmıştır. İki şırınganın bağlantı noktasına 6 delikli plastik bir elek yerleştirilmesi, pistonların sabit hareketi ile çok ince sıvı damlacıklarının oluşmasına yol açmaktadır. Şırıngalar arasında oluşan basıncın da etkisiyle karıştırma sağlanarak yüzey alanı ile birlikte ekstraksiyon çözücüsü ve metal-ligand kompleksi arasındaki etkileşim arttırılmıştır. Böylece, bir dağıtıcı çözücüye ihtiyaç kalmamış ve bu durum toplam organik çözücü kullanımını azaltmıştır.

Tablo 4.10 Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresinin optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	0.25 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı / miktarı	pH 9.0 / 1.5 mL
Ligand derişimi / miktarı	S13: 0.08 g L ⁻¹ (w/v) / 1.5 mL
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	15 s
Ekstraksiyon çözücü türü / miktarı	Kloroform / 400 µL
Eluent türü / derişimi / miktarı	HNO ₃ / 15.6 M (%67) / 200 µL

0, 5, 15, 30 ve 60 s'lik karıştırma süreleri değerlendirilmiş ve kobalt kompleksinin kütle transferini arttırmak için 15 s karıştırmanın yeterli olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9). 15 s'ye kadar olan sürelerde kompleksin yeterli sürede organik faza geçişi sağlanamamıştır. Karıştırma yapılmadan deneylerde ise karıştırmaya kıyasla absorbansta yarı yarıya bir azalma olduğu ve karışmanın homojen gerçekleşmemesi sebebiyle yüksek bir standart sapma değerine sahip olduğu görülmüştür. Daha uzun süreli karıştırmalarda ise absorbansta gözlenen azalma ve standart sapmadaki artış ise artan çalkalama süresi ile tersinir reaksiyonun daha belirgin hale gelmesinin bir sonucu olabilmektedir. 15 s karıştırma süresi bu nedenle diğer optimizasyon adımlarında kullanılmak üzere seçilmiştir.



Şekil 4.9 Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresinin absorban sinyali üzerindeki etkisi

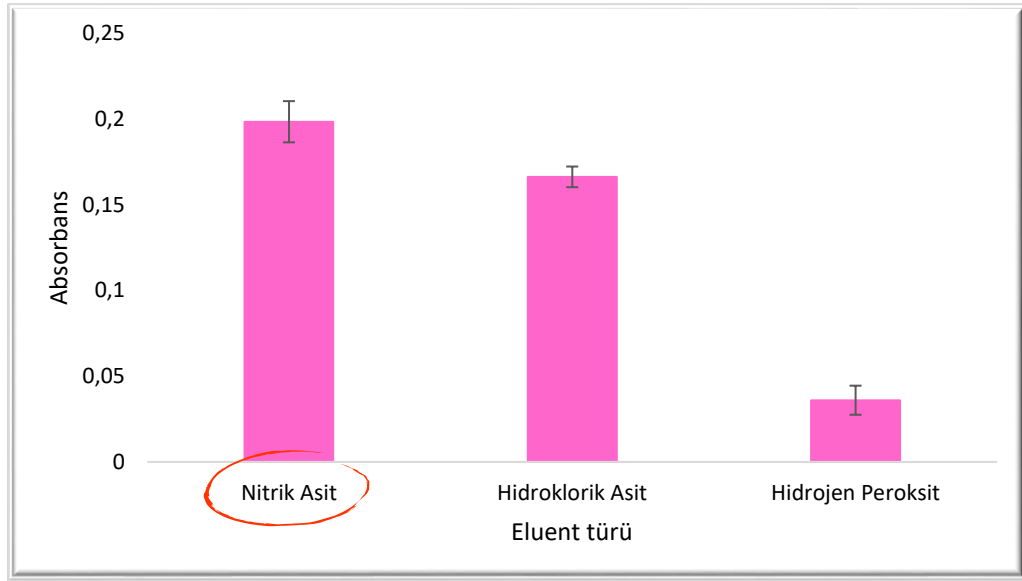
➤ **Eluent Türü, Derişimi ve Miktarının Belirlenmesi**

AAAS sistemi tarafından yapılan ölçümler sırasında alev kararsızlığından ve daha yüksek döteryum sinyal gürültüsünden kaçınmak için organik çözücünün tamamen buharlaştırılması ve kalıntının uygun eluentle çözülmesi gerekmektedir. Asitler, serbest kobalt iyonları üretmek için metal-ligand bağınyı parçalamaktadır. Bu sebeple, nitrik asit, hidroklorik asit ve hidrojen peroksit çözeltileri kullanılmıştır.

Tablo 4.11 Eluent türü optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	0.25 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı / miktarı	pH 9.0 / 1.5 mL
Ligand derişimi / miktarı	S13: 0.08 g L ⁻¹ (w/v) / 1.5 mL
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	15 s
Ekstraksiyon çözücü türü / miktarı	Kloroform / 400 µL
Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresi	15 s
Eluent derişimi / miktarı	15.6 M (%67) / 200 µL

Elde edilen sonuçlara göre nitrik asit için en yüksek absorbans değeri kaydedilmiş ve kobalt kompleksi için en uygun eluent olarak seçilmiştir. Bu durum, kalıntıyı etkili bir şekilde çözen ve kompleksten önemli miktarda kobalt miktarını serbest bırakan nitrik asidin güçlü oksitleyici doğasına bağlanabilmektedir. Hidroklorik asit ve hidrojen peroksit ile kobaltın tamamı eluente alınamamış, aynı zamanda daha düşük absorbans değerlerini açıklayıcı nitelikte olan tüpte gözle görülür ve temizlenemeyen kalıntıların oluşmasına sebebiyet vermiştir. Bu sebeple en uygun eluent türünün nitrik asit olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.10 Eluent türünün absorbans sinyali üzerindeki etkisi

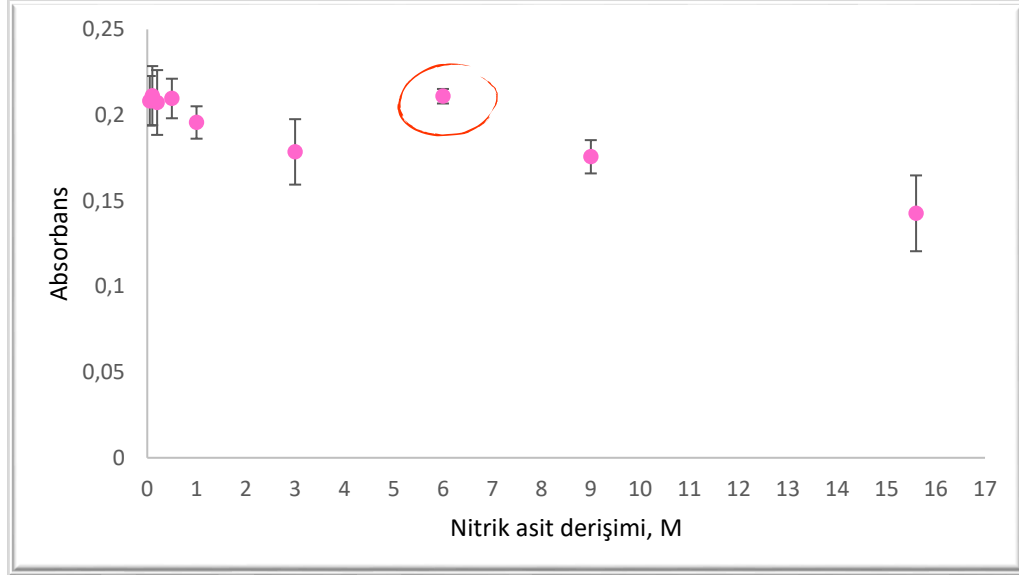
0.05 ile 15.6 M arasında hazırlanan farklı nitrik asit derişimleri, çözünme kapasitelerini belirlemek için eşdeğer kompleks kalıntılara eklenmiştir.

Tablo 4.12 Eluent derişim optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	0.25 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı / miktarı	pH 9.0 / 1.5 mL
Ligand derişimi / miktarı	S13: 0.08 g L ⁻¹ (w/v) / 1.5 mL
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	15 s
Ekstraksiyon çözücü türü / miktarı	Kloroform / 400 µL
Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresi	15 s
Eluent türü / miktarı	HNO ₃ / 200 µL

Sonuçlar birbirinden özellikle farklı olmasa da, daha fazla tekrarlanabilir sonuçlar vermesi ve elde edilen absorbans değerinin test edilen diğer derişimlerden kısmen yüksek olması nedeniyle 6.0 M optimum değer olarak seçilmiştir. Derişimle birlikte artan asit yoğunluğunun örnek akış hızını da düşürmesi, daha derişik asit derişimlerinde absorbans sinyallerinin azalmasına sebebiyet verebilmektedir. Seyreltik asit derişimleri ise kobalt iyonlarını asit çözeltisine tamamen almış

görünse de, tüpte kalıcı kalıntı hasarlarına sebebiyet vermiş olup yüksek standart sapma değerlerine sahiptir. Bu nedenle 6.0 M nitrik asit ile optimizasyon çalışmalarına devam edilmiştir.



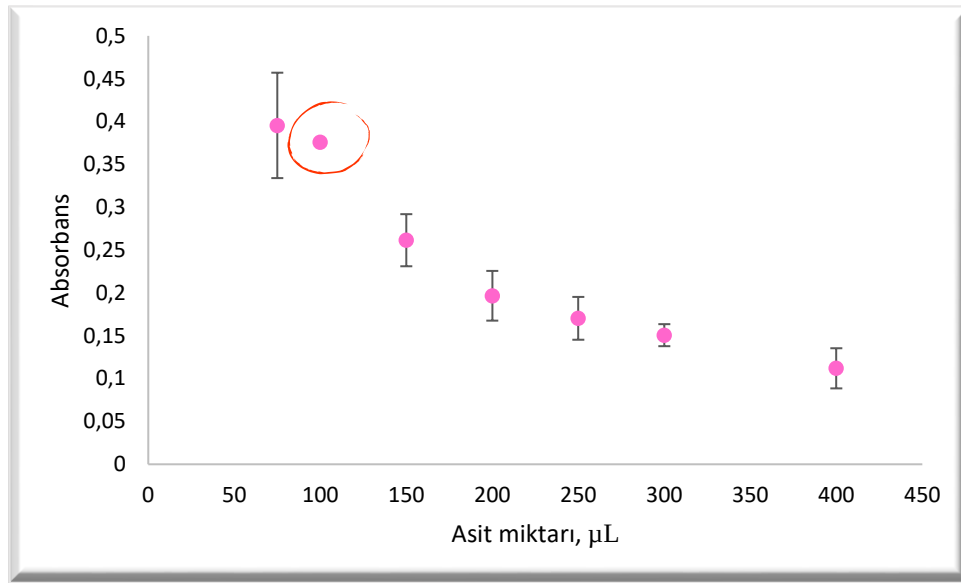
Şekil 4.11 Eluent derişiminin absorbans sinyali üzerindeki etkisi

Son olarak, farklı hacimlerde (75, 100, 150, 200, 250, 300 ve 400 μL) 6.0 M nitrik asit çözeltisi çözünme kapasitelerini ve nebulizasyon verimliliği üzerindeki etkisini kontrol etmek için test edilmiştir. Eluent miktarı, zenginleştirme faktörünü belirlemede analitin toplandığı son hacim olması sebebiyle en önemli optimizasyon adımlarından biridir.

Tablo 4.13 Eluent miktar optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	0.25 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı / miktarı	pH 9.0 / 1.5 mL
Ligand derişimi / miktarı	S13: 0.08 g L ⁻¹ (w/v) / 1.5 mL
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	15 s
Ekstraksiyon çözücü türü / miktarı	Kloroform / 400 μL
Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresi	15 s
Eluent türü / derişimi	HNO ₃ / 6.0 M

Artan seyreltici hacmi ile absorbans değerlerinin azalması, birim hacimdeki analit miktarının azalması ile açıklanabilmektedir. 75 µL'lik asit miktarı tüpün alt çeperlerinde çözücüsü uçurulmuş olan kobalt-ligand kalıntılarının tamamını çözmeye yetmemiş ve aynı zamanda AAAS sisteminde devamlı analitik bir sinyal elde edilememiştir. Bu sebeple en yüksek absorbans değeri 75 µL için elde edilmesine rağmen, yakın absorbans ve düşük standart sapma değeri ile daha tekrarlanabilir sonuçlar elde edilen 100 µL asit miktarı, optimum koşul olarak seçilmiştir.



Şekil 4.12 Eluent miktarının absorbans sinyali üzerindeki etkisi

4.1.2 Sistem Analitik Performansının Belirlenmesi

Yapılan çalışmada AAAS ve OS-ÇŞE-BSFME-AAAS sistemlerinin analitik değerleri, Tablo 4.14'de sunulan optimum koşullar altında kalibrasyon grafikleri elde edilerek değerlendirilmiştir. Her bir sistem için analitik performans, doğrusal aralık, yüzde bağıl standart sapma (%BSS), gözlenebilme limiti (GL), tayin limiti (TL) ve korelasyon katsayısına (R^2) göre belirlenmiştir. TL, GL ve R^2 değerleri, doğrusal aralıktaki en düşük derişimli kalibrasyon standardının altı tekrarlı ölçümü ile hesaplanmıştır.

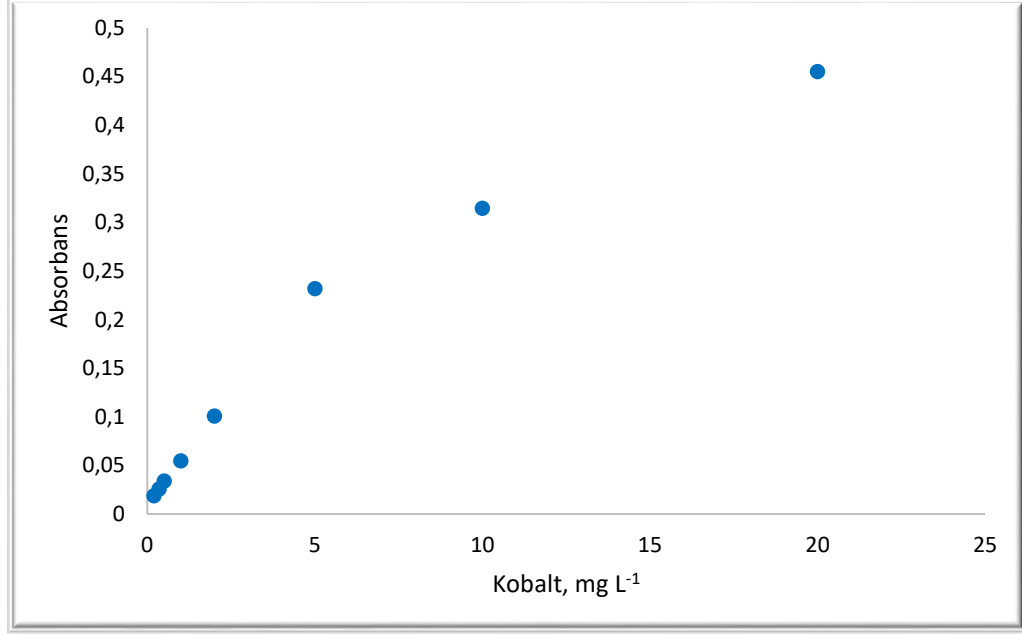
Tablo 4.14 OS-ÇŞE-BSFME-AAAS metoduna ait optimum parametreler

Parametre	Değer
Hava akış hızı	32 L h ⁻¹
Asetilen akış hızı	15 L h ⁻¹
Örnek akış hızı	6.7 mL dk ⁻¹
Alev başlığının yüksekliği	27 cm
Standart derişimi / miktarı	0.25 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı / miktarı	pH 9.0 / 1.5 mL
Ligand derişimi / miktarı	S13: 0.08 g L ⁻¹ (w/v) / 1.5 mL
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	15 s
Ekstraksiyon çözücü türü / miktarı	Kloroform / 400 µL
Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresi	15 s
Eluent türü / derişimi / miktarı	HNO ₃ / 6.0 M / 100 µL

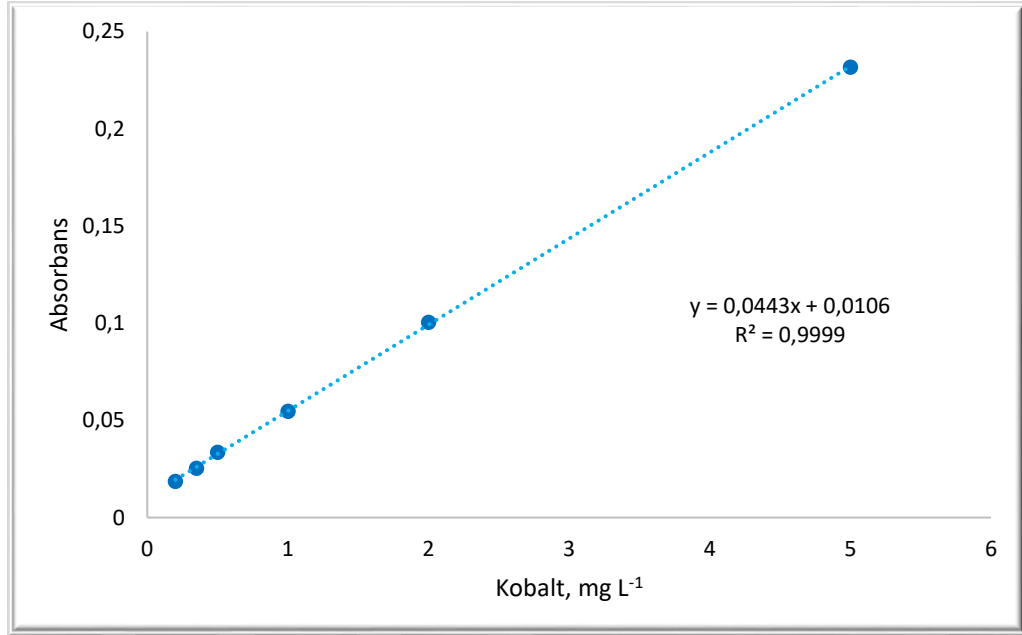
Tablo 4.15 Optimum koşullar altında sistemlere ait analitik performans değerleri

Yöntem	GL, µg L ⁻¹	TL, µg L ⁻¹	%BSS	Doğrusal Aralık, µg L ⁻¹	R ²
AAAS	60.6	200	4.8	200-5000	0.9999
OS-ÇŞE-BSFME-AAAS	1.8	6.0	3.7	5.0-100	0.9994

AAAS sisteminin kalibrasyon grafiği, 0.20 ve 20 mg L⁻¹ aralığında standart çözeltiler hazırlanarak oluşturulmuştur. Sisteme ait kalibrasyon eğrisi Şekil 4.13' te sunulmuştur. Kalibrasyon doğrusal aralığı, Şekil 4.14' te görüldüğü gibi 0.20 ile 5.0 mg L⁻¹ arasındadır. GL, TL, %BSS ve R² değeri ise sırasıyla 60.6 µg L⁻¹, 200 µg L⁻¹, %4.8 ve 0.9999 olarak hesaplanmıştır.

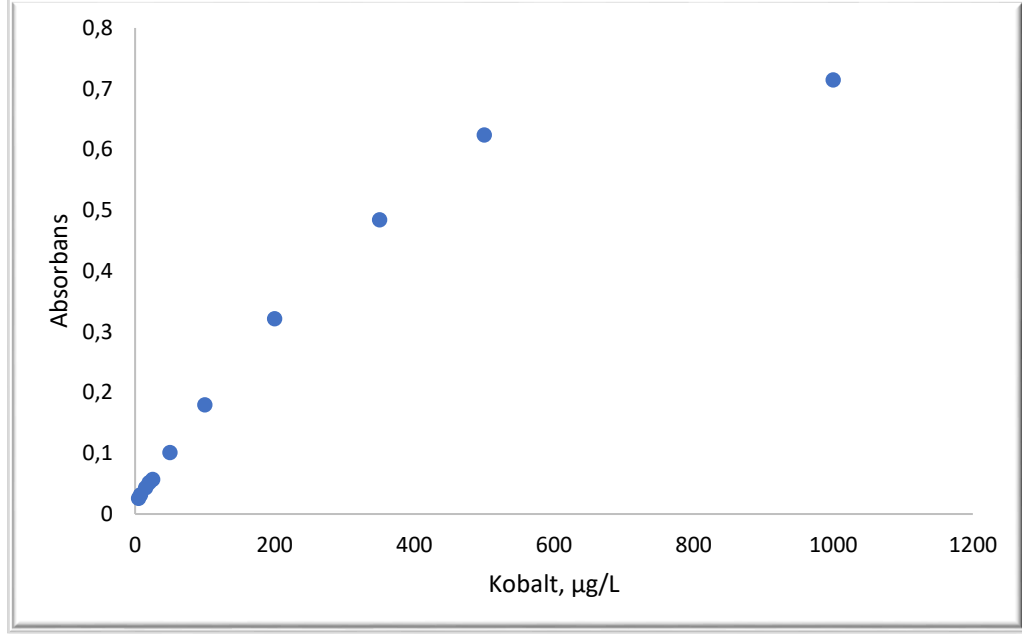


Şekil 4.13 Kobalt tayininde optimum koşullar altında AAAS kalibrasyon eğrisi

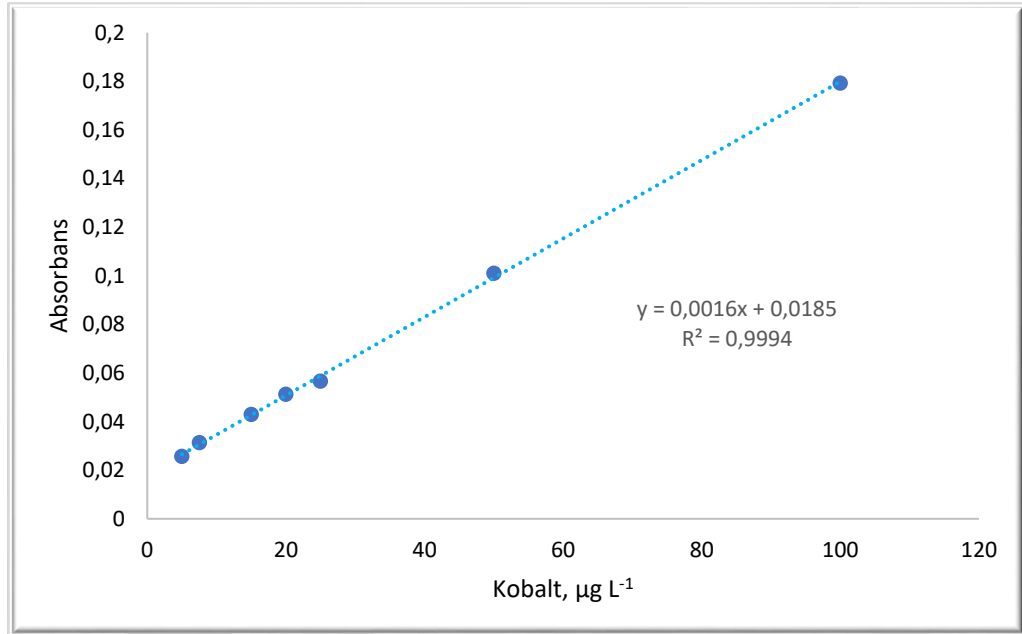


Şekil 4.14 Kobalt tayininde optimum koşullar altında AAAS kalibrasyon doğrusu

Geliştirilen yöntemde, $5.0-100 \mu\text{g L}^{-1}$ derişim aralığında ve 0.9994 R^2 değeriyle kobalt için doğrusal bir analitik yanıt elde edilmiş (Şekil 4.16) ve GL ve TL değerleri sırasıyla 1.8 ve $6.0 \mu\text{g L}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. En düşük derişimli kalibrasyon standardı için kaydedilen %BSS değeri ise 3.7 olarak elde edilmiş ve bu değer, geliştirilen yöntemin yüksek kesinliğe sahip olduğunu doğrulamıştır.



Şekil 4.15 Kobalt tayininde optimum koşullar altında OS-ÇŞE-BSFME-AAAS kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.16 Kobalt tayininde optimum koşullar altında OS-ÇŞE-BSFME-AAAS kalibrasyon doğrusu

4.1.3 Geri Kazanım Çalışmaları

Bazı örnek matrislerinin karmaşık yapısı nedeniyle, bir analitin belirlenmesi için geliştirilmiş bir analitik yöntem kolaylıkla uygulanamayabilmektedir. Bu nedenle, özel bir örnek matrisinde saptanabilen analitin miktarını belirlemek için geri kazanım çalışmalarının gerçekleştirilmesi önemlidir. İlk olarak ilgilenilen analitin örnekte mevcut olmadığından emin olmak için bir kör analiz gerçekleştirilmekte, ardından örneğe geri kazanım yüzdesinin tespit edildiği belirli bir derişimde standart eklenmektedir [332]. Ayva örnekleri, geliştirilen analitik yöntemin doğruluğunu ve uygulanabilirliğini kontrol etmek ve geri kazanım çalışmaları yapılarak matris etkilerinin olasılığını incelemek için gerçek örnek olarak seçilmiştir. Gerçekleştirilen kör örnek analizi, ayva örneğinin kobalt içermediğini veya mevcut miktarın geliştirilen yöntemin tespit limitinin altına düştüğünü göstermiştir. Doğrusal kalibrasyon aralığına karşılık gelen 15, 25, 50, 75 ve 100 µg L⁻¹ derişimlerde standart eklenerek hazırlanan örnekler için hesaplanan geri kazanım yüzdeleri, önerilen yöntemin doğruluğunu teyit ederek, %91.0 – 98.7 aralığında sonuçlar vermiştir. Farklı derişimler için hesaplanan geri kazanım sonuçları Tablo 4.16' da ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 4.16 Ayva örneklerine spike edilmiş farklı kobalt derişimleri için hesaplanan yüzde geri kazanım sonuçları

Spike Edilmiş Derişim, µg L⁻¹	% Geri Kazanım
15	98.7 ± 3.4
25	92.0 ± 5.7
50	91.0 ± 8.6
75	91.8 ± 7.0
100	91.3 ± 4.7

4.2 Metalik Elek Bağlantılı Çift Şırınga Esaslı Sıvı Faz Mikro-Ekstraksiyon ile Bakırın Zeytin Yapraklarında Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometresi İle Tayini

Tez kapsamındaki ikinci çalışma, bakırın eser miktarlarda tayini için basit, hassas ve düşük maliyetli bir analitik yöntemin geliştirilmesini içermektedir. Çalışmada, AAAS sistemi ile bakır tayini metalik elek bağlantılı çift şırıngalı sıvı fazlı mikroekstraksiyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma, “Development of a metal sieve-linked double syringe liquid phase microextraction method for the determination of copper in olive leaf extract samples by flame atomic absorption spectrometry” başlığı altında “Food Chemistry” adlı dergide Mayıs 2022’de yayınlanmıştır.

4.2.1 Optimizasyon Çalışmaları

Optimizasyon çalışmalarında, ekstraksiyon işlemini ve AAAS sistemini etkileyen tüm parametreler, cihazın algılama gücünü ve ekstraksiyon verimini artırmak için optimize edilmiştir. Optimizasyon işlemleri, 1.0 mg L^{-1} ve 0.25 mg L^{-1} bakır standart çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Her optimizasyon adımı için bir parametre değiştirilirken diğerleri sabit tutulmuştur. Her parametre için üç tekrarlı örnekler hazırlanmış ve optimum parametreler genellikle en düşük standart sapma ile en yüksek ortalama absorbansa sahip olan olan değere göre seçilmiştir.

4.2.1.1 AAAS Optimizasyonları

AAAS sisteminin parametreleri, sürekli sinyal izleme modu kullanılarak bakıra ait en yüksek absorbans değerini elde etmek üzere manuel olarak optimize edilmiştir. Hem örneğin hem de asetilenin akış hızları aleve ulaşan analit miktarını ve atomizasyon verimini etkilemektedir. Bu akış hızlarının optimizasyonu, absorbans değerlerinde artış sağlamaktadır. Nebulizatör ayar düğmesi üzerindeki farklı konumlar, nebulizasyon verimlilikleri açısından test edilmiş ve optimum örnek akış hızı 7.6 mL min^{-1} olarak belirlenmiştir. Yakıt gazlarının akış hızı, oksidan gazlar ile yakıt açısından zengin, stokiyometrik veya yakıt açısından zayıf alevler üretecek şekilde ayarlanmaktadır. Kullanılacak optimum alev sıcaklığı, her bir elementin iyonlaşma enerjisine bağlıdır ve bakır için 15 L h^{-1} ile stokiyometrik alevde en yüksek absorbans değeri elde edilmiştir. Alev başlığının yüksekliği, hem döteryum

lambasından hem de bakır oyuklu katot lambasından gelen ışıkların düzgün şekilde üst üste gelmesini sağlayacak şekilde 27 cm'ye ayarlanmıştır.

4.2.1.2 Kompleks Oluşum Optimizasyonları

➤ Tampon pH ve Miktarının Belirlenmesi

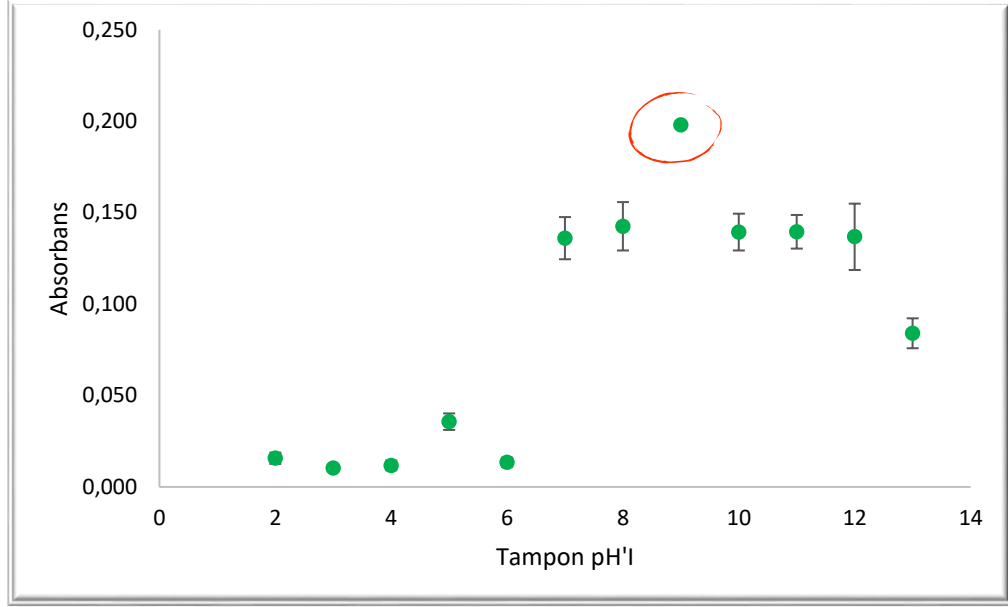
Çözeltinin pH'ı, kompleks oluşumu ve kompleks stabilitesi üzerindeki doğrudan etkisi nedeniyle kompleksleşme sürecinde çok önemli bir parametredir. Ligand ile kompleks oluşturmada önce sulu analit çözeltilerine tampon çözeltilerinin eklenmesi, yüksek verimlilikle tam kompleksleşmeyi sağlamak için sabit bir pH'ı koruduğu için önemlidir. Tampon çözeltisi, organik çözücüye ekstraksiyon için de yararlı olan bir iyonik denge sağlamaktadır. 2.0 ila 13 arasında değişen farklı pH değerlerine sahip tampon çözeltileri, bakırın ligand ile kompleksleşmesi üzerindeki etkilerini gözlemlemek için test edilmiştir. Optimizasyon adımıyla kullanılan başlangıç sabit parametreleri Tablo 4.17'deki gibidir.

Tablo 4.17 Tampon pH'ını belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	0.25 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon miktarı	1.0 mL
Ligand derişimi / miktarı	B3: %1.25 (w/v) / 1.50 mL
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	10 s
Ekstraksiyon çözücü türü / miktarı	Kloroform / 500 µL
Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresi	10 s
Eluent türü / derişimi / miktarı	HNO ₃ / 14.4 M (%65) / 200 µL

Şekil 4.17' de görüldüğü gibi, şelat oluşumu bazik ortamlarda nötr ve asidik ortamlara göre daha elverişli olmuştur. Asidik bölgede, analit ağırlıklı olarak iyoniktir ve sulu çözeltideki yüksek çözünürlüğü ile ekstraksiyon çözücüsü düşük ekstraksiyon verimliliği göstermiştir. Bunun nedeni, tüm -OH gruplarının protonlanarak metal kompleksleşmesini engellemesi, başka bir deyişle ligand ile reaksiyon için bakır ve hidrojen iyonları arasındaki rekabetten kaynaklanan zayıf

bir kompleksleşmeye bağlanabilmektedir. Nötr ve bazik bölgelerde, kararlı bakır kompleksleri, daha verimli ekstraksiyon performansı sergilemiştir. pH 9.0 borat tampon çözeltisi, çok düşük bir standart sapma ile en yüksek absorbans değerini verdiğinden dolayı sonraki tüm çalışmalar, pH 9.0 tamponu ile gerçekleştirilmiştir.



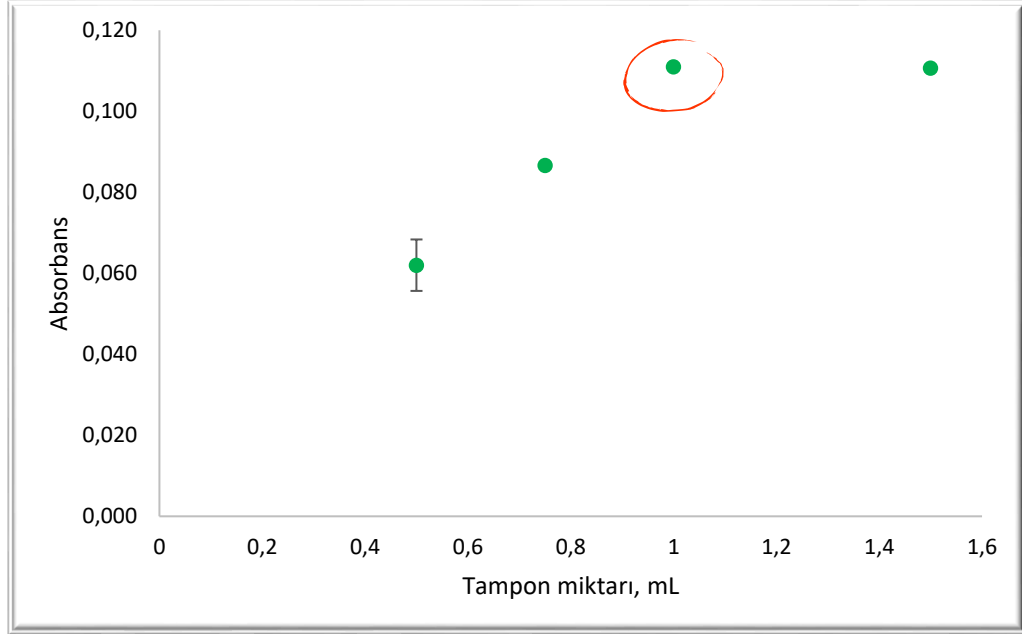
Şekil 4.17 Tampon pH'ının absorbans sinyali üzerindeki etkisi

Optimum stabiliteyi elde etmek için gereken pH 9.0 tampon çözeltisinin miktarı 0.50, 0.75, 1.0 ve 1.5 mL kullanılarak Tablo 4.18' deki sabit parametreler ile test edilmiştir.

Tablo 4.18 Tampon miktarını belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	0.25 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı	pH 9.0
Ligand derişimi / miktarı	B3: %1.25 (w/v) / 1.50 mL
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	10 s
Ekstraksiyon çözücü türü / miktarı	Kloroform / 500 µL
Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresi	10 s
Eluent türü / derişimi / miktarı	HNO ₃ / 14.4 M (%65) / 200 µL

Tampon kapasitesinin artması, oluşan kompleks verimliliğini de bir noktaya kadar artırmış olup 1.0 mL'den fazla miktarlarda absorbands sinyalinin sabit kaldığı görülmüştür. En yüksek ortalama absorbands değerleri Şekil 4.18' de de görüldüğü gibi 1.0 ve 1.5 mL tampon hacimleri için kaydedilmiş, ancak daha sonraki optimizasyonlar, daha az çözücü kullanımı gerekliliğinden dolayı 1.0 mL ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.18 Tampon miktarının absorbands sinyali üzerindeki etkisi

➤ **Ligand Miktarının Belirlenmesi**

İyonik durumdaki analitlerin organik çözücüye doğrudan ekstraksiyonu, analitin moleküler formda olmasını gerektirmektedir.

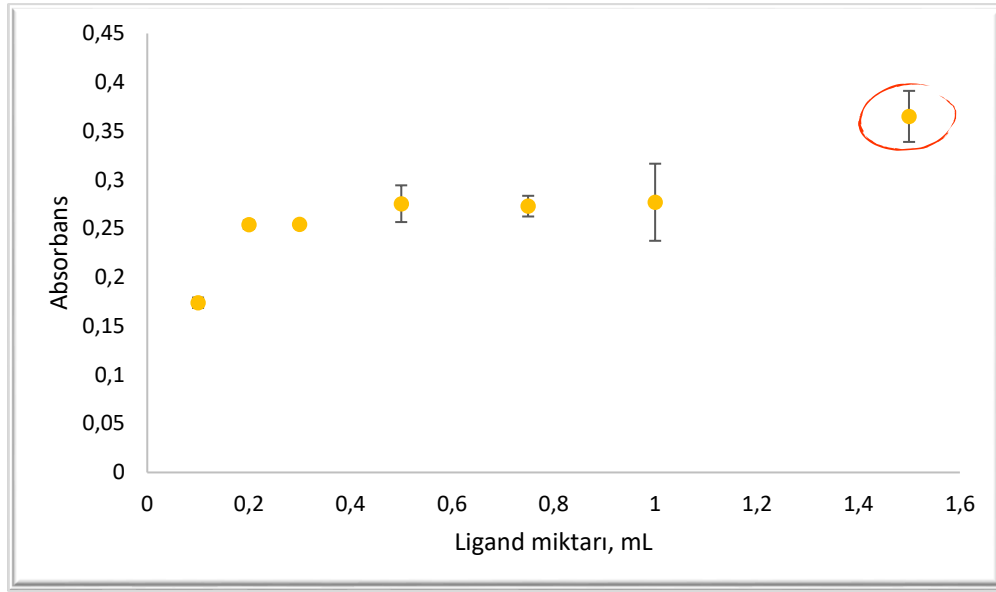
Ligand miktarının bu moleküler formu oluşturacak olan kompleksleşme üzerindeki etkisi 0.0, 0.10, 0.20, 0.30, 0.50, 0.75, 1.0 ve 1.5 mL dahil olmak üzere farklı miktarlar test edilerek incelenmiştir.

Tablo 4.19 Ligand miktarını belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	1.0 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı / miktarı	pH 9.0 / 1.0 mL
Ligand derişimi	B3: %1.25 (w/v)
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	10 s
Ekstraksiyon çözücü türü / miktarı	Kloroform / 500 µL
Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresi	10 s
Eluent türü / derişimi / miktarı	HNO ₃ / 14.4 M (%65) / 200 µL

En yüksek ortalama absorbans 1.5 mL ligand miktarı için kaydedilmiş ve sonraki deneyler için optimum miktar olarak seçilmiştir. 1.5 mL'den yüksek ligand miktarları, şırınganın toplam hacmini aşacağından test edilmemiştir. Ekstraksiyon prosedüründe metal-ligand kompleksi oluşumunu doğrulamak için bir ligand çözeltisi kullanılmadan optimizasyon denemeleri de yapılmış ve ligand çözeltisinin farklı miktarlarıyla karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, ligand çözeltisi olmadan metal şelat oluşumunu gösteren hiçbir sinyal gözlenmemiştir. Böylece ligand ile kompleksleşmenin ilişkisini doğrulanmıştır.

Bu adıma kadar yapılan çalışmalarda kullanılan %1.25 (w/v) ligand çözeltisinin derişimi, sentezlendikten sonraki derişimine (maksimum derişim) karşılık gelmektedir. Ligand miktarıyla orantılı olarak absorbans değerlerinin artması, ligandın daha düşük derişimlerinin denenmesine gerek olmadığını göstermiştir. Daha yüksek derişimler de denenemeyeceği için ligand derişim optimizasyonu yapılmamış ve %1.25'te sabit tutulmuştur.



Şekil 4.19 Ligand miktarının absorbans sinyali üzerindeki etkisi

➤ Kompleksleşme Sonrası Karıştırma Süresinin Belirlenmesi

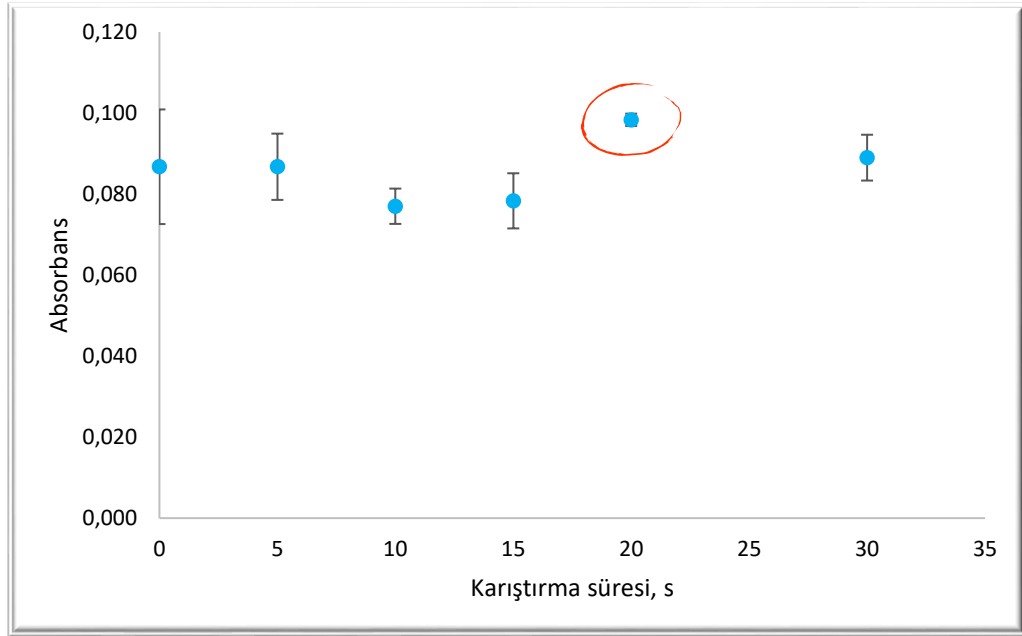
Karıştırma işlemi, analit iyonları ile etkileşimi arttırmak ve kompleks oluşturma etkinliğini hızlandırmak için çözeltide kompleks oluşturan ligandın homojen dağılımını sağlamaya yardımcı olmaktadır. Bu sebeple, karıştırma gerekli bir adım olarak kabul edilmektedir.

Tablo 4.20 Kompleksleşme sonrası karıştırma süresini belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	0.25 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı / miktarı	pH 9.0 / 1.0 mL
Ligand derişimi / miktarı	B3: %1.25 (w/v) / 1.5 mL
Ekstraksiyon çözücü türü / miktarı	Kloroform / 500 µL
Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresi	10 s
Eluent türü / derişimi / miktarı	HNO ₃ / 14.4 M (%65) / 200 µL

Kompleks oluşum optimizasyonlarının son parametresi olarak, 0.0, 5.0, 10, 15, 20 ve 30 s'lik denemelerden sonra etkin kompleksleşme için gereken optimum karıştırma süresi 20 s olarak belirlenmiştir. Karıştırma süreleri arasında çok büyük

absorbans farklılıkları olmamasına rağmen kısmen yüksek absorbans ve çok daha düşük standart sapma değeri, 20 s'lik karıştırma süresini optimum değer yapmıştır.



Şekil 4.20 Kompleksleşme sonrası karıştırma süresinin absorbans sinyali üzerindeki etkisi

➤ Ekstraksiyon Çözücüsünün Türü ve Miktarının Belirlenmesi

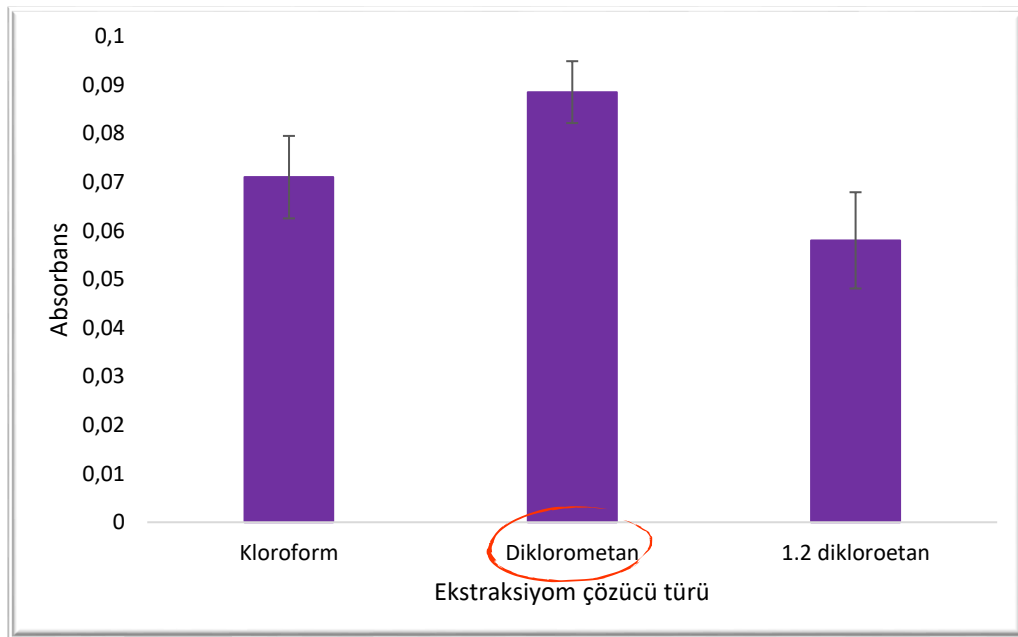
Uygun bir ekstraksiyon çözücünün seçimi, ekstraksiyon verimliliğini etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Yüksek ekstraksiyon verimi elde etmek için suda çözünürlüğü düşük ve analite afinitesi yüksek çözücüler seçilmelidir. Ayrıca ekstraksiyon çözücülerinin sudan daha yüksek veya daha düşük yoğunluğa sahip olması ve ayrı bir faz oluşturması gerekmektedir.

Çözücünün buharlaşma riski ve yüzey fazının toplanmasındaki zorluk nedeniyle bu çalışmada daha yüksek yoğunluklu çözücüler seçilmiştir. Bu amaçla, sulu çözeltiden bakır kompleksini çıkarmak için diklorometan, 1,2 dikloroetan ve kloroform kullanılmıştır.

Tablo 4.21 Ekstraksiyon çözücü türünü belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	0.25 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı / miktarı	pH 9.0 / 1.0 mL
Ligand derişimi / miktarı	B3: %1.25 (w/v) / 1.5 mL
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	20 s
Ekstraksiyon çözücü miktarı	500 µL
Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresi	10 s
Eluent türü / derişimi / miktarı	HNO ₃ / 14.4 M (%65) / 200 µL

Tüplerin dibinde çöken organik fazların hacimlerinin, kullanılan ilk hacimlerden daha düşük olduğu gözlenmiş ve çöken fazın hacmi, sudaki farklı çözünürlüklerine göre azalmıştır. Bu adıma kadar yapılan ekstraksiyon işlemlerinde kloroform kullanılmasına rağmen, çözücüler arasında en yüksek absorbans değerine diklorometan çözücüsünün sahip olduğu görülmüş ve bu nedenle optimum ekstraksiyon çözücüsü olarak seçilmiştir.



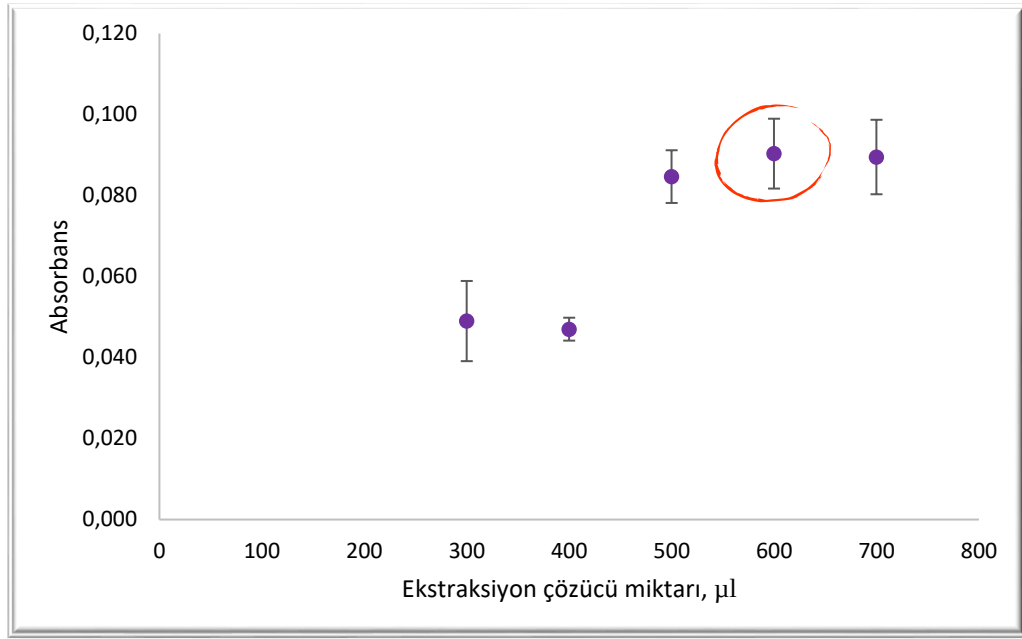
Şekil 4.21 Ekstraksiyon çözücü türünün absorbans sinyali üzerindeki etkisi

Ekstraksiyon çözücü miktarı, bir analitin ekstraksiyon verimi ve zenginleştirme faktörü üzerinde çok önemli bir etkiye sahiptir. Çözücü hacmi azaldıkça zenginleştirme faktörü artmaktadır. Bununla birlikte, sulu çözeltiden analitin önemli bir miktarını çıkarmak için daha düşük miktarlar yeterli olmayabilmektedir. 300, 400, 500, 600 ve 700 µL'lik diklorometan hacimleri, bakır-ligand kompleksi üzerinde ekstraksiyon etkinlikleri için test edilmiştir.

Tablo 4.22 Ekstraksiyon çözücü türünü miktarını optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	0.25 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı / miktarı	pH 9.0 / 1.0 mL
Ligand derişimi / miktarı	B3: %1.25 (w/v) / 1.5 mL
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	20 s
Ekstraksiyon çözücü türü	Diklorometan
Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresi	10 s
Eluent türü / derişimi / miktarı	HNO ₃ / 14.4 M (%65) / 200 µL

Şekil 4.22' de, absorbands değerlerinin artan organik çözücü miktarıyla 600 µL'ye kadar arttığı ve 700 µL'de sabit kaldığı görülmüştür. Bu da çözücü miktarının çözeltiden kayda değer miktarlarda Cu-B3 kompleksi çıkarmak için yeterli olduğunu göstermektedir. Daha düşük miktarlarda çözücü kullanmak adına sonraki çalışmalara 600 µL diklorometan ile devam edilmiştir.



Şekil 4.22 Ekstraksiyon çözücü miktarının absorbans sinyali üzerindeki etkisi

➤ Ekstraksiyon Sonrası Karıştırma Süresinin Belirlenmesi

Ekstraksiyon çözücüsü ve analitler arasındaki etkileşimler, bir karıştırma işlemi uygulanarak daha da geliştirilebilmektedir. Bu çalışmada kullanılan basınçlı karıştırma, ekstraksiyon verimliliği için kritik öneme sahiptir ve karıştırma süresi de aynı derecede önemlidir. Uzun karıştırma süreleri, sulu çözeltide ekstraksiyon çözücüsünün kaybına neden olabilmekte ve kısa karıştırma süreleri ise analitlerin bol miktarda toplanması için yeterli olmayabilmektedir.

Basınçlı karıştırma 5.0, 10, 15, 20 ve 30 saniye Tablo 4.23' te gösterilen sabit parametreler kullanılarak uygulanmış ve karıştırma yapılmadan elde edilen sonuçla karşılaştırılmıştır.

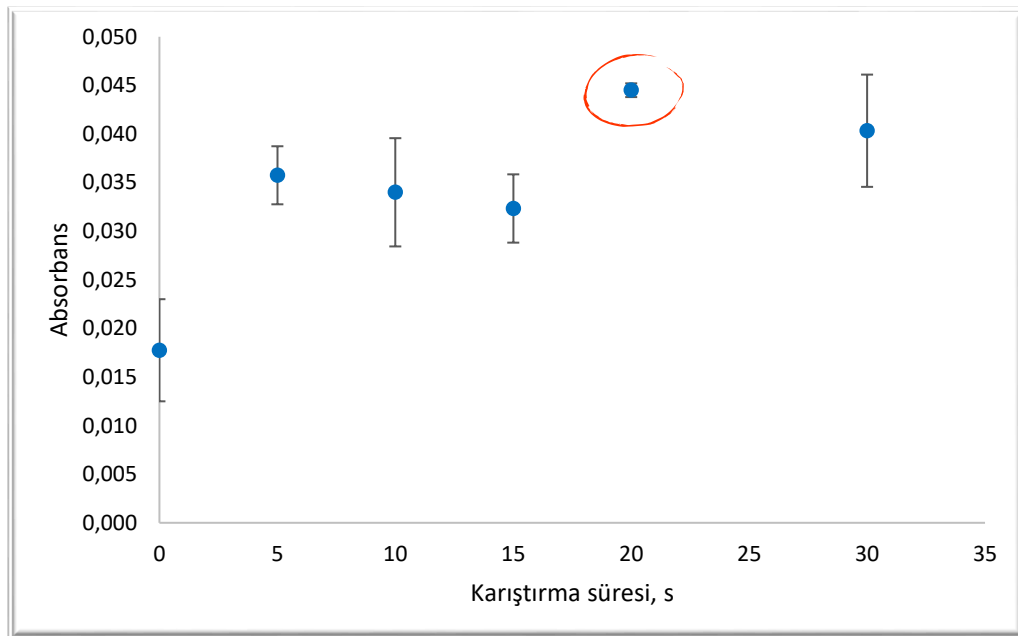
Tablo 4.23 Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresinin optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	0.25 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı / miktarı	pH 9.0 / 1.0 mL
Ligand derişimi / miktarı	B3: %1.25 (w/v) / 1.5 mL
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	20 s

Tablo 4.23 Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresinin optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler (devamı)

Ekstraksiyon çözücü türü / miktarı	Diklorometan / 600 µL
Eluent türü / derişimi / miktarı	HNO ₃ / 14.4 M (%65) / 200 µL

Standart çözeltisinden diklorometan fazına metal-ligand kompleksinin verimli bir şekilde toplanması için gerekli optimum süre, yüksek absorbans ve düşük standart sapma değerleri göz önünde bulundurulduğunda 20 s olarak belirlenmiştir. Şekil 4.23 'te görüldüğü gibi karıştırma yapılmadan elde edilen veriler daha düşük absorbans değerlerine sahip olmakla birlikte homojen dağılım olmadığını kanıtlar bir şekilde oldukça yüksek standart sapma değerine sahiptir.



Şekil 4.23 Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresinin absorbans sinyali üzerindeki etkisi

➤ Eluent Derişimi ve Miktarının Belirlenmesi

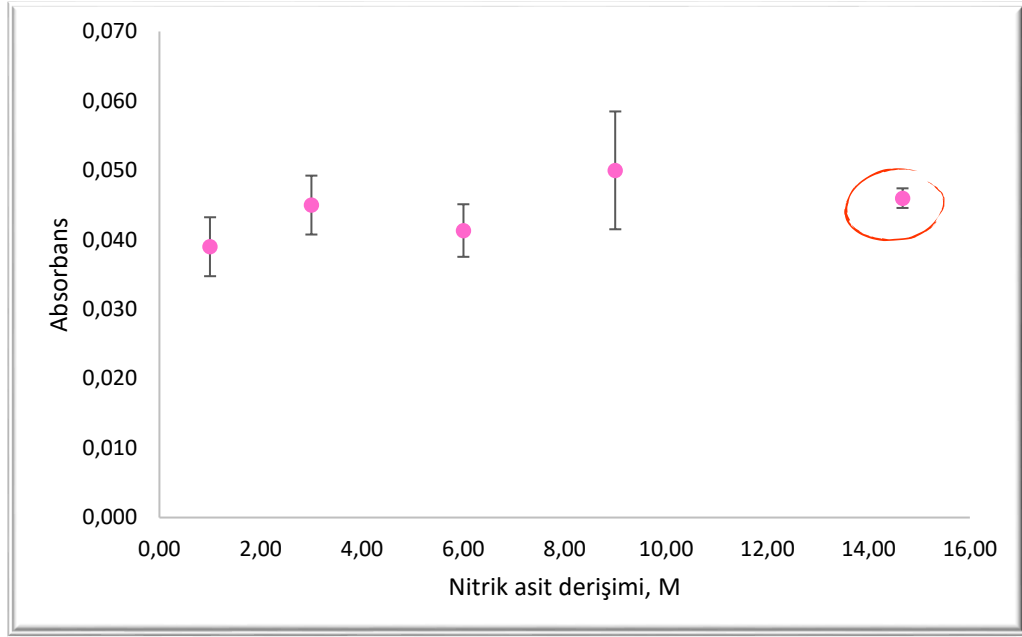
Organik çözücü sulu çözeltiden ayrıldıktan ve tamamen buharlaştıktan sonra, AAAS sistemine gönderilmeden önce analit açısından zengin kalıntıyı çözmek için nitrik asit eluent çözeltisi kullanılmıştır. Hidroklorik asit ve hidrojen peroksit, tez kapsamındaki ilk çalışmada da bahsedildiği gibi metal-ligand kompleksinden analitin eluent faza geçmesinde yeterli etkiyi gösterememesi ve bunun yanı sıra sarf malzemelerde sarfiyata yol açmasından dolayı eluent optimizasyonları nitrik asit çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir.

1.0, 3.0, 6.0 ve 9.0 M dahil olmak üzere farklı nitrik asit derişimleri asidin derişik formuyla (14.4 M) karşılaştırılarak optimum eluent derişimi çalışması gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.24 Eluent derişim optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	0.25 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı / miktarı	pH 9.0 / 1.0 mL
Ligand derişimi / miktarı	B3: %1.25 (w/v) / 1.5 mL
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	20 s
Ekstraksiyon çözücü türü / miktarı	Diklorometan / 600 µL
Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresi	20 s
Eluent türü / miktarı	HNO ₃ / 200 µL

Derişik asitin Şekil 4.24' te görüldüğü gibi en yüksek absorbands değerini kaydettiği gözlenmiştir. Azalan asit derişimlerinin ekstrakte edilen kompleks kalıntısını tamamen çözmediği hem tüp dibinde görülen kalıntının varlığından hem de bu derişimlerin neden olduğu azalan absorbands ve daha yüksek standart sapma değerlerinden anlaşılmaktadır. AAAS sisteminde bulunan nebulizörün aside dayanıklı yapısından dolayı derişik asit kullanımı enstrüman açısından problem yaratmamaktadır. Bu sebeple çalışmalara derişik nitrik asit çözeltisi ile devam edilmiştir.



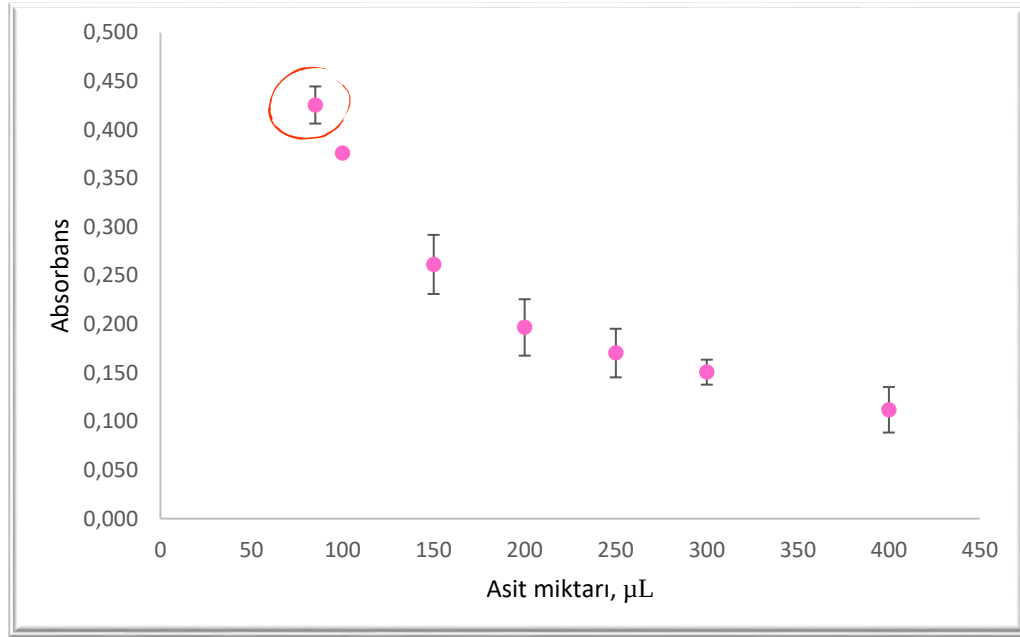
Şekil 4.24 Eluent derişiminin absorbans sinyali üzerindeki etkisi

Çalışmada yapılan son optimizasyon adımında, derişik asidin 75 ve 300 μL arasındaki farklı miktarları, kalıntının çözünmesinin etkilerini belirlemek ve analite ait sürekli bir sinyal elde edebilmek için eşdeğer standart çözeltiler ile test edilmiştir. Daha yüksek miktarlardaki eluent, analiti seyreltmesi nedeniyle daha az derişimde elde edilirken kalıntıdan kayda değer miktarda analitin çıkarılması için daha düşük miktarlar de yeterli olmayabilmektedir.

Tablo 4.25 Eluent miktar optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	0.25 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı / miktarı	pH 9.0 / 1.0 mL
Ligand derişimi / miktarı	B3: %1.25 (w/v) / 1.5 mL
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	20 s
Ekstraksiyon çözücü türü / miktarı	Diklorometan / 4600 μL
Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresi	20 s
Eluent türü / derişimi	HNO ₃ / 14.4 M (%65)

Şekil 4.25' te gösterildiği gibi, artan çözücü miktarı ile absorbands değerleri azalmış ve bu gözlem, zenginleştirme faktörü ile ekstraktın nihai miktarı arasında ters bir ilişki olduğunu öne süren ön deriştirme ilkesi ile desteklenmektedir [333]. 75 µL asit miktarı, kompleks kalıntısının tamamen çözünmesi için yeterli olmamıştır. En yüksek absorbands değeri ise 85 µL için kaydedilmiş ve yöntemin son optimum değeri olarak seçilmiştir.



Şekil 4.25 Eluent miktarının absorbands sinyali üzerindeki etkisi

4.2.2 Sistem Analitik Performansının Belirlenmesi

Optimize edilmiş MEB-ÇŞE-BSFME-AAAS yönteminin optimum parametreleri Tablo 4.26' da da görüleceği üzere 7.60 mL dk⁻¹ örnek akış hızı, 15 L h⁻¹ asetilen akış hızı, 1.0 mL pH 9.0 borat tampon çözeltisi, 1.5 mL %1.25 (w/v) ligand çözeltisi, 20 s kompleksleşme sonrası karıştırma süresi, ekstraksiyon çözücüsü olarak 600 µL diklorometan, 20 s ekstraksiyon sonrası karıştırma süresi ve 85 µL derişik nitrik asit (%65, w/w) çözeltisi olarak bulunmuştur. Bu optimum parametreler sulu standart çözeltilere uygulanmış ve standartların absorbands değerlerinden oluşturulan kalibrasyon grafikleri, Tablo 4.27' de verilen sistemin analitik performansına ait değerleri hesaplamak için kullanılmıştır.

Tablo 4.26 MEB-ÇŞE-BSFME-AAAS metoduna ait optimum parametreler

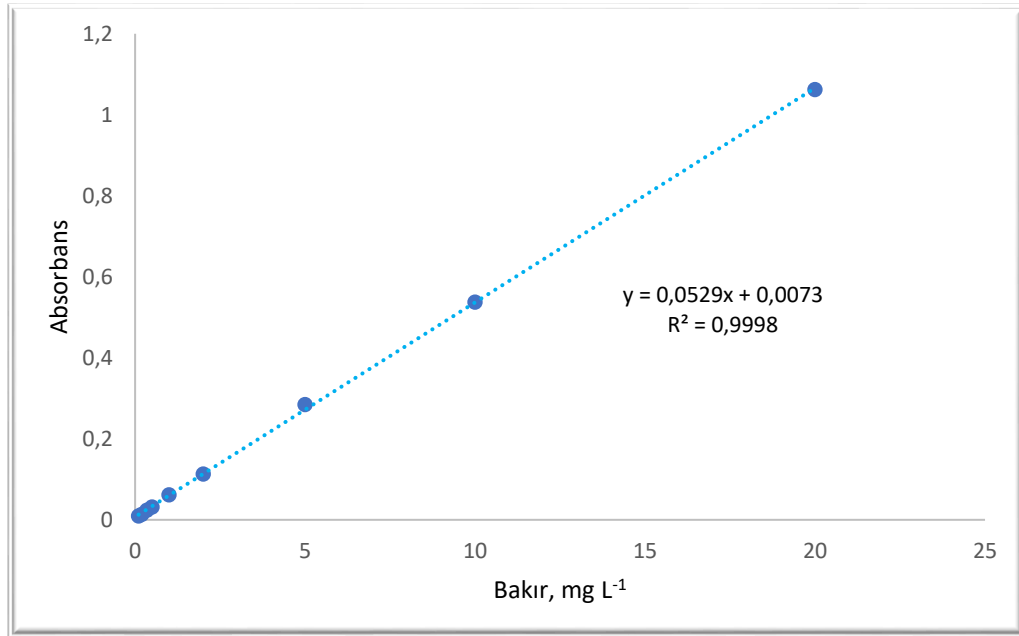
Parametre	Değer
Hava akış hızı	32 L h ⁻¹
Asetilen akış hızı	15 L h ⁻¹
Örnek akış hızı	7.6 mL dk ⁻¹
Alev başlığının yüksekliği	27 cm
Standart derişimi / miktarı	0.25 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı / miktarı	pH 9.0 / 1.0 mL
Ligand derişimi / miktarı	B3: %1.25 (w/v) / 1.5 mL
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	20 s
Ekstraksiyon çözücü türü / miktarı	Diklorometan / 600 µL
Ekstraksiyon sonrası karıştırma süresi	20 s
Eluent türü / derişimi / miktarı	HNO ₃ / 14.4 M (%67) / 85 µL

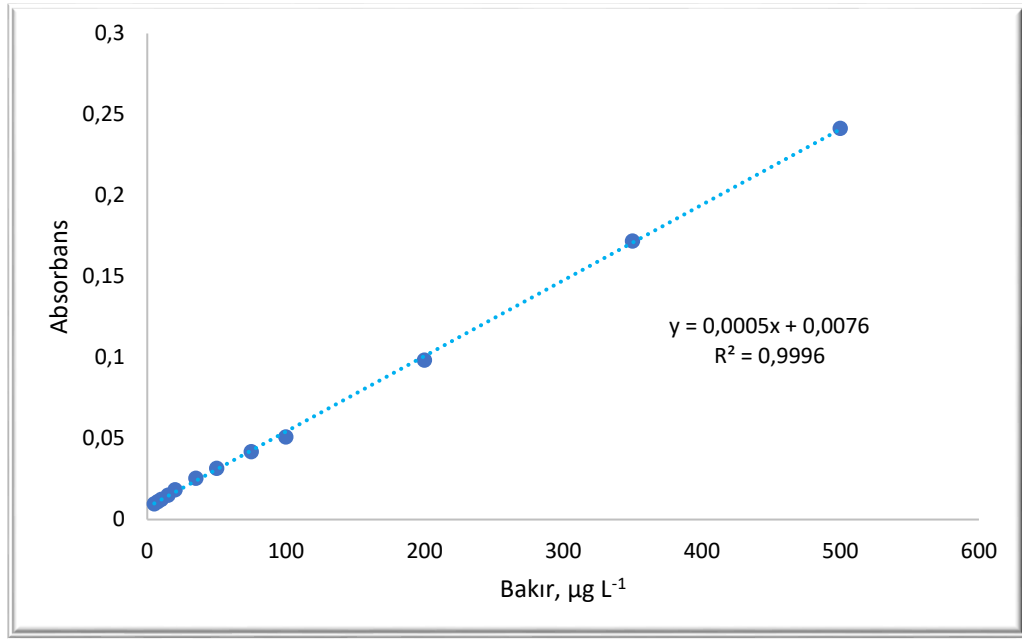
Geliştirilen yöntem, GL, TL, BSS, doğrusal çalışma aralığı, tespit gücünde iyileştirme (EDP) ve ön deriştirme faktörü (PF) gibi analitik parametreler kullanılarak doğrulanmıştır. Yöntemin optimum koşulları altında, 5.0-500 µg L⁻¹ doğrusal aralığının en düşük derişimi olan 5.0 µg L⁻¹ için altı tekrarlı analiz sonucunda elde edilen absorbans değerleri, GL ve TL değerlerinin hesaplanmasında kullanılmış olup bu değerler sırasıyla 1.5 ve 5.1 µg L⁻¹ olarak bulunmuştur. Yönteme ait %BSS ve R² değerleri sırasıyla 8.4 ve 0.9996 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen %BSS sonuçları, çalışılan sistemler için %10'dan daha düşük olması sebebiyle, hem ekstraksiyon işlemi hem de enstrümental ölçüm için yüksek hassasiyet (tekrarlanabilirlik) sağlamıştır.

Tablo 4.27 Optimum koşullar altında sistemlere ait analitik performans değerleri

Yöntem	GL, µg L ⁻¹	TL, µg L ⁻¹	%BSS	Doğrusal Aralık, µg L ⁻¹	R ²
AAAS	31.1	104	5.8	100-2000	0.9998
MEB-ÇŞE-BSFME-AAAS	1.5	5.1	8.4	5.0-500	0.9996

EDP değerlerinin hesaplanmasında geleneksel AAAS sisteminin GL değerinin geliştirilen sistemin GL'ne oranı kullanılmış ve 20 kat olarak belirlenmiştir. Çalışılan sistemlere ait doğrusal kalibrasyonlar aşağıdaki şekillerde verilmiştir.

**Şekil 4.26** Bakır tayininde optimum koşullar altında AAAS kalibrasyon doğrusu



Şekil 4.27 Bakır tayininde optimum koşullar altında MEB-ÇŞE-BSFME-AAAS kalibrasyon doğrusu

4.2.3 Geri Kazanım ve Gerçek Örnek Çalışmaları

Zeytin yaprağı ekstresi Türkiye'de en çok rahatlatıcı çay olarak tüketilmektedir. Bu nedenle, önerilen yöntemin gerçek örnek analizine uygunluğunu incelemek için bu matriks, test örneği olarak seçilmiştir. Tablo 4.26 'da verilen yöntemin optimum koşulları, elde edilen örneklerin ekstraktlarına uygulanmıştır. Zeytin yapraklarındaki bakır miktarını tayin edebilmek için gerekli kalibrasyon noktaları, yine aynı şekilde hazırlanmış ve kör analizinde bakır tespit edilmeyen zeytin yaprağı ekstresine 100, 200, 400, 1200 µg L⁻¹ final derişimlerinde standart spike edilerek hazırlanmıştır. Standart eklenmiş örnekler için kaydedilen absorbans değerleri, diğer örneklerdeki bakır miktarını ölçmek için kullanılan bir kalibrasyon grafiği geliştirmek için kullanılmıştır. Matriks eşleştirilmiş kalibrasyon, deiyonize suya göre zeytin yaprağı matriksinin karmaşık yapısı nedeniyle diğer örneklerde bakırın doğru bir şekilde ölçülmesi için oldukça önemlidir.

Hazırlanan üç adet örnekte ölçülen bakır miktarlarının Tablo 4.28' de verildiği gibi önemli ölçüde yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca 200 ve 400 µg L⁻¹ standart eklenmiş örnekler için sırasıyla %101.7 ± 8.8 ve %108.5 ± 10.1 olarak hesaplanan geri kazanım değerleri, geliştirilen yöntemle yüksek doğrulukta sonuçların elde edilebileceğini göstermektedir. Bu metalin insan vücuduna kontrolsüz alınması, ciddi sağlık etkilerine neden olabilmektedir. Sonuçlar, önerilen yöntemin zeytin

yaprağı ekstresi örneklerinde bakır tayini için uygun bir analitik yöntem olarak kabul edilebileceğini göstermiştir.

Tablo 4.28 MEB-ÇŞE-BSFME-AAAS yönteminin optimum koşulları altında belirlenen zeytin yaprağı örneklerindeki bakır için tespit edilen kantitatif sonuçlar

Zeytin Yaprağı	Bakır Miktarı, mg kg ⁻¹
Esenler – İstanbul	0.75 ± 0.04
Osmangazi – Bursa	3.41 ± 0.64
Gemlik – Bursa	8.06 ± 0.71

Tablo 4.29 Zeytin yaprağı ekstraktlarına spike edilmiş farklı bakır derişimleri için hesaplanan yüzde geri kazanım sonuçları

Spike Edilmiş Derişim, µg L ⁻¹	% Geri Kazanım
200	101.7 ± 8.8
400	108.5 ± 10.1

4.3 Beş Paraben'in Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon Yöntemi ile Ruj Örneklerinde Eser Seviyelerde Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Eşzamanlı Olarak Belirlenmesi

Parabenlerin endokrin bozucu potansiyeli ve kanserle ilişkileri ve etkileri, özellikle kozmetik ürünlerin analizlerinde insan sağlığı ve güvenliği açısından vazgeçilmez bir gereklilik haline gelmiştir. Tez kapsamında yapılan üçüncü çalışmada, ön deriştirme yöntemi olarak DSSME kullanılarak HPLC-UV sisteminde beş parabenin eş zamanlı tayini için hassas, seçici ve doğru bir analitik yöntem geliştirilmiştir. HPLC sisteminin performansını ve DSSME yönteminin verimliliğini etkileyen tüm parametreler optimize edilmiş ve her bir analit için sistemin (DSSME-HPLC-UV) analitik performansı değerlendirilmiştir. Optimize edilmiş yöntem, içerdikleri farklı parabenleri ölçmek için dört farklı marka ruja uygulanmıştır.

4.3.1 Optimizasyon Çalışmaları

Bu çalışmada, öncelikle optimum kromatografik koşulları belirlemek ve iyi ayrılmış pik noktalarına sahip kromatogramlar elde etmek için mobil faz, enjeksiyon hacmi ve akış hızı gibi enstrümental değişkenler optimize edilmiştir. HPLC sistem optimizasyonlarını takiben ekstraksiyon ve dağıtıcı çözücü türü ve miktarı gibi ekstraksiyon sürecini etkileyen faktörler, tüm analitler için sinyal-gürültü oranını ve ekstraksiyon verimliliklerini iyileştirmek için optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları boyunca bir parametreyi değiştirerek ve diğer parametreleri sabit tutarak tek değişkenli optimizasyon yaklaşımı kullanılmıştır.

4.3.1.1 Parabenlerin Kromatografik Ayrılması

Çalışmanın ilk aşamasında, MeP, EtP, PrP, BuP ve BeP'in ters faz sıvı kromatografisiyle ayırımında; kolon seçimi, hareketli fazın pH seçimi ve derişimi, hareketli faz organik çözücü (ACN) oranı ve hareketli fazın akış hızının etkileri incelenmiştir.

➤ Kolon Seçimi

Sabit faz/kolon seçimi metot geliştirmedeki ilk ve en önemli adımdır. Sağlam ve tekrarlanabilir bir yöntemin geliştirilmesi, kararlı, yüksek performanslı bir kolon bulunmadan imkansızdır. Metot geliştirme sırasında tekrarlanamayan örnek alıkonma problemlerinden kaçınmak için kolonların kararlı ve tekrarlanabilir olması önemlidir. Özel olarak saflaştırılmış, daha az asidik silikadan yapılmış ve özellikle bazik bileşiklerin ayrılması için tasarlanmış bir C8 veya C18 kolonu genellikle tüm örnekler için uygundur ve şiddetle tavsiye edilmektedir [334]. Silika bazlı kolonların kullanımı, çeşitli fiziksel özelliklerden dolayı mevcut HPLC kolonlarının çoğunda tercih edilmektedir [335]. Bu sebeple çalışmalar 250 mm uzunluğunda, 4.6 mm çapında ve 5 µm partikül büyüklüğüne sahip bir Phenomenex-Aqua C18 kolonu üzerinde gerçekleştirilmiştir.

➤ Hareketli Fazın Seçimi

Mobil faz, çözünürlüğü, seçiciliği ve verimliliği etkilemektedir. Mobil faz bileşimi (veya çözücü gücü), RP-HPLC ayırımında önemli bir rol oynamaktadır [212]. Yöntemin geliştirilmesi sürecinde hareketli fazın belirlenmesi aşamasında, hareketli faz bileşenlerinden olan tampon çözelti ve organik çözücünün belirlenmesinde bu çözeltinin iki bileşeninden biri olan tampon çözeltisinin ne olması gerektiği

düşünülmüş olarak başlanmıştır. Bu bağlamda ilk olarak belirlenmiş parabenler için geliştirilen bu analitik yöntemin spesifik olarak belirlenmiş dalga boyu olan 254 nm'ye yakın dalga boylarında vereceği absorpsiyon bakımından oldukça düşük etkiye sahip amonyum format tamponu (50 mM) ile çalışmalara başlanmıştır. Silika bazlı kolonlarda ters faz için tipik pH aralığı pH 2 ile 8'dir [212]. Dolayısıyla, kullanılacak amonyum format tamponu, asidik bölgede 2.8-4.8 pH aralığında etkin tamponlama özelliği gösterdiğinden pH 4.5 değerinin hareketli fazın bileşenlerinden biri olan tampon çözeltisinin nihai pH'ı olarak belirlenmesine ve bu şekilde ilerlenilmesine karar verilmiştir. İkinci aşama ise, ters faz tekniğine dayalı olan yöntemimizde hareketli fazın diğer bileşeni olarak kullanılabilecek organik solventin belirlenmesi olmuştur. Amonyum tuzları genellikle organik/su hareketli fazlarında daha fazla çözünmektedir [212]. İzopropanol, ters faz kromatografisi ile HPLC'de kullanıldığında yüksek viskozitesi ile asetonitril ve metanole göre yüksek geri basınç yaratacaktır. ACN, çok çeşitli çözünenleri çözme, düşük asitlik, minimum kimyasal reaktivite ve hepsinden önemlisi düşük UV cut-off gibi özellikleri nedeniyle sıvı kromatografisinde açık ara en çok kullanılan çözücüdür [336]. UV cut-off değeri, bir çözücünün UV görünürlüğünün maksimum kapsamını belirtmektedir. ACN'e ait UV-cut off değeri (195 nm), metanole ait UV cut-off değerinden (205 nm) düşüktür [337]. Bu sebeple asetonitril, tampon çözeltinin yanında kullanılacak organik çözücü olarak belirlenmiştir. Sisteme ait başlangıç parametreleri Tablo 4.30' da görüldüğü gibidir. Bu aşamadaki tüm HPLC analizleri, 4.0 mg kg⁻¹ derişiminde standart çözeltiyle gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.30 HPLC sistemine ait başlangıç parametreleri

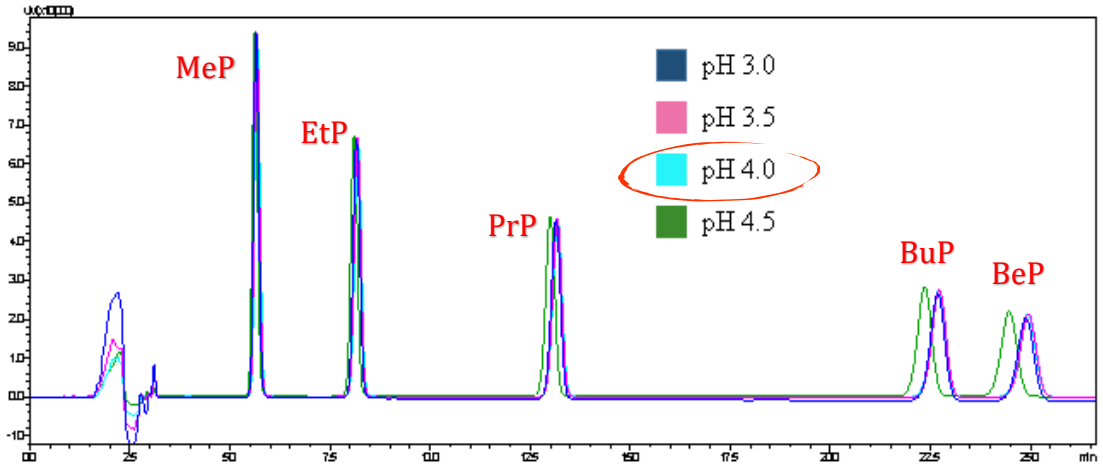
Parametre	Değer
Mobil faz	Amonyum format (50 mM, pH:4.5):asetonitril (50:50 v:v)
Mobil faz akış hızı	1.0 mL dk ⁻¹
Elüsyon	İzokratik mod
Dalgaboyu	254 nm
Enjeksiyon Hacmi	40 µL
Kolon sıcaklığı	25 °C

Bu şartlar altında etkili bir şekilde ayrılmamış olan bütül ve benzil paraben hariç tüm analitler için iyi bir ayırım elde edilmiştir. Böylece, ACN oranı 50'den 40'a düşürülmüş ve iki pik noktasının rezolüsyonunu geliştirmiştir.

➤ **Tamponun Uygun pH ve Derişiminin Belirlenmesi**

Mobil fazın pH değeri, analitleri ayırırken çok önemlidir. pH seviyesi, sabit fazın yüzeyinde asidik/bazik bileşiklerin ve serbest (artık) silanol gruplarının ayrışma derecesini etkilemektedir. Bu, pH değerinin bir analit ile sabit faz arasındaki etkileşim derecesini kontrol etmenin bir yolu olarak kullanılabileceği anlamına gelmektedir. Böylece pH, alıkonma süresini ve pik şeklini etkilemek için kullanılabilmektedir [338]. Genel bir kural olarak, silika bazlı kolonlar $2 < \text{pH} < 8$ aralığında çalıştırılmalıdır. $\text{pH} < 2$ 'de hidrolize bağlı faz kaybı meydana gelebilmekte ve pH 8'in üzerinde ise silika omurgası giderek daha fazla çözünür hale gelmektedir [339].

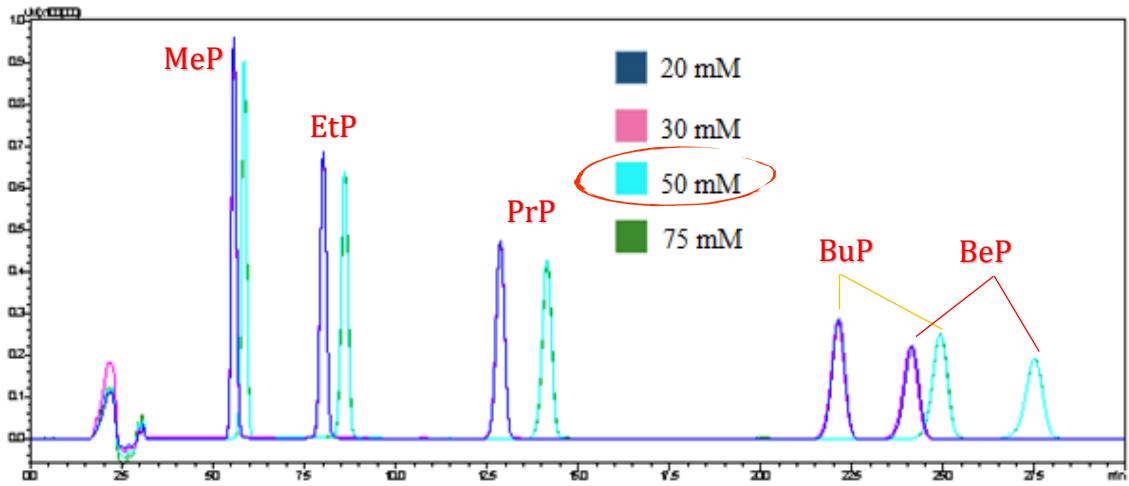
Amonyum format tamponu için tamponlama aralığı da göz önüne alındığında, tampon çözeltisi, analitlerin elüsyonu üzerindeki etkilerini belirlemek için 3.0, 3.5, 4.0 ve 4.5 gibi farklı pH değerlerine ayarlanmıştır. Daha düşük pH değerlerinde çalışmak ters faz kromatografisinde kolon içerisinde iyi tutunma yani verimli bir analiz anlamına gelmektedir. pH 4.5 tampon çözeltisi kullanıldığında bütül ve benzil paraben piklerinin alıkonma sürelerinin az da olsa azalması ile birlikte rezolüsyonunun azaldığı görülmüştür. Analitlerin tam olarak ayrılması, pH 3.0, 3.5 ve 4.0 tampon çözeltileri kullanılarak elde edilmiş ve kolon ömrünü daha uzun tutmak açısından sonraki deneyler için tampon çözeltisinin optimum pH değeri 4.0 olarak seçilmiştir.



Şekil 4.28 Mobil fazda tampon pH'ı değişimi ile elde edilen kromatogram
(Standart derişimi: 4.0 mg kg^{-1} , Mobil faz: %Amonyum format (50 mM) /ACN:
%60/40, Akış hızı: 1.2 mL dk^{-1} , Enjeksiyon hacmi: $40 \mu\text{L}$)

Mobil fazın tampon kapasitesi (tamponun sabit bir pH'ı koruma yeteneği), tampon derişimi ile orantılıdır. Bir ayırmada iyi tekrarlanabilirlik elde etmek için, kullanılan tamponların yeterli tampon kapasitesine sahip olması önemlidir. Yetersiz tamponlama, çözünen maddenin pKa değeri ile tampon pKa değeri ve mobil faz pH'ı arasındaki dengelerin değişmesine yol açabilmekte ve dolayısıyla pik şeklinin bozulmasına yol açmaktadır [338]. Genellikle, küçük moleküller için 10-50 mM'lik bir tampon konsantrasyonu yeterlidir [212]. Uygun tampon derişimini belirlemek amacıyla formik asit ile 20, 30, 50 ve 75 mM amonyum format tampon çözeltileri hazırlanmış ve ilgili pH değerine ayarlanmıştır.

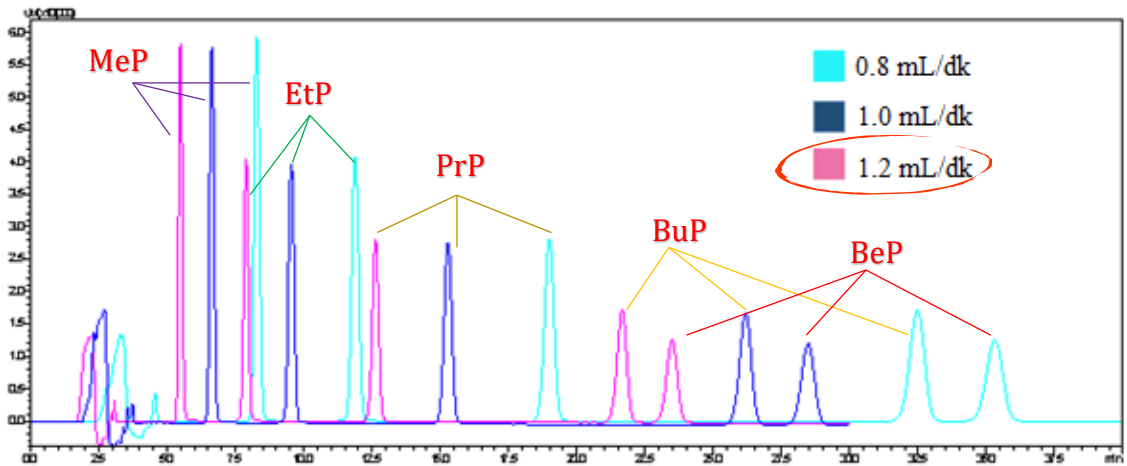
20 ve 30 mM tampon konsantrasyonlarında beş parabenin kısa alıkonma süreleri nedeniyle, bütılparaben ve benzılparaben piklerinin birbirine yaklaştığı görülmüştür. 50 ve 75 mM için ise bu ayırım daha iyi sağlanmıştır. Molaritenin artması pik simetrisini de olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Kullanılan kimyasal miktarını azaltmak amacıyla tampon derişimini minimumda tutmak, dolayısıyla meydana gelebilecek olumsuzluklardan kaçınmak için yöntemde kullanılacak tampon çözeltisinin derişimi 50 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.29 Mobil fazda tampon derişiminin değişimi ile elde edilen kromatogram (Standart derişimi: 4.0 mg kg^{-1} , Mobil faz: %Amonyum format (pH 4.0) /ACN: %60/40, Akış hızı: 1.2 mL dk^{-1} , Enjeksiyon hacmi: $40 \text{ }\mu\text{L}$)

➤ Mobil Faz Akış Hızının Belirlenmesi

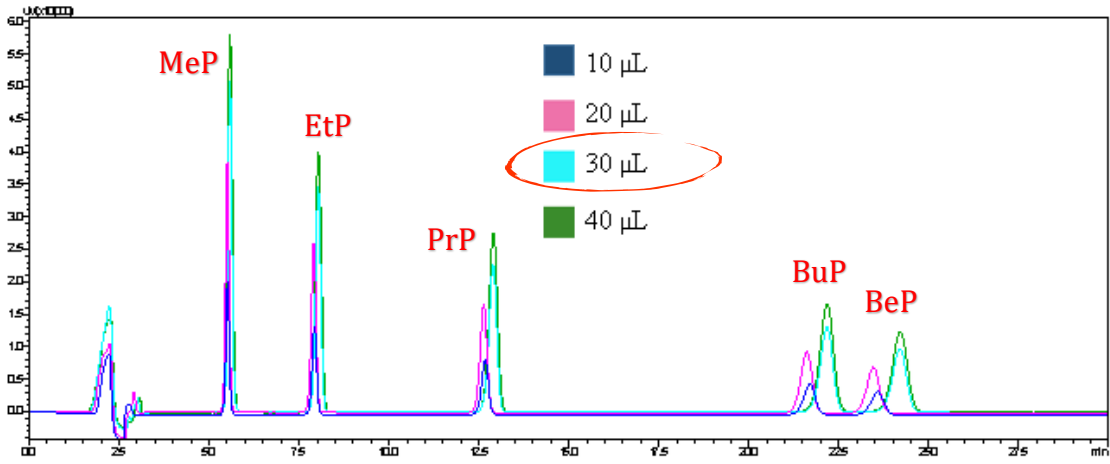
MeP, EtP, PrP, BuP ve BeP karışımlarının analizinde kullanılan mobil faz akış hızının ayırma etkisinin incelenmesi amacıyla, 0.80 , 1.0 ve 1.2 mL dk^{-1} akış hızlarında mobil faz HPLC sistemine verilmiştir. Daha yüksek akış hızları kolon verimini düşürmemek adına denenmemiştir. Mobil faz, HPLC sistemine 0.80 mL dk^{-1} akış hızı ile verildiğinde alıkonma sürelerinin oldukça uzun olduğu saptanmış ve piklerde genişleme meydana geldiği görülmüştür. 1.2 mL dk^{-1} akış hızı, toplam alıkonma süresini minimumda (25 dk) tutmuş ve aynı zamanda analitlerin kolondan ayrılma süreleriyle bağlantılı olarak piklerin daha keskin olmasını sağlamıştır. Bu şartlar göze alınarak optimum akış hızı 1.2 mL dk^{-1} olarak seçilmiştir.



Şekil 4.30 Mobil faz akış hızının değişimi ile elde edilen kromatogram (Standart derişimi: 4.0 mg kg^{-1} , Mobil faz: %Amonyum format (50 mM, pH 4.0) /ACN: %60/40, Enjeksiyon hacmi: $40 \text{ }\mu\text{L}$)

➤ Enjeksiyon Hacmi ve Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi

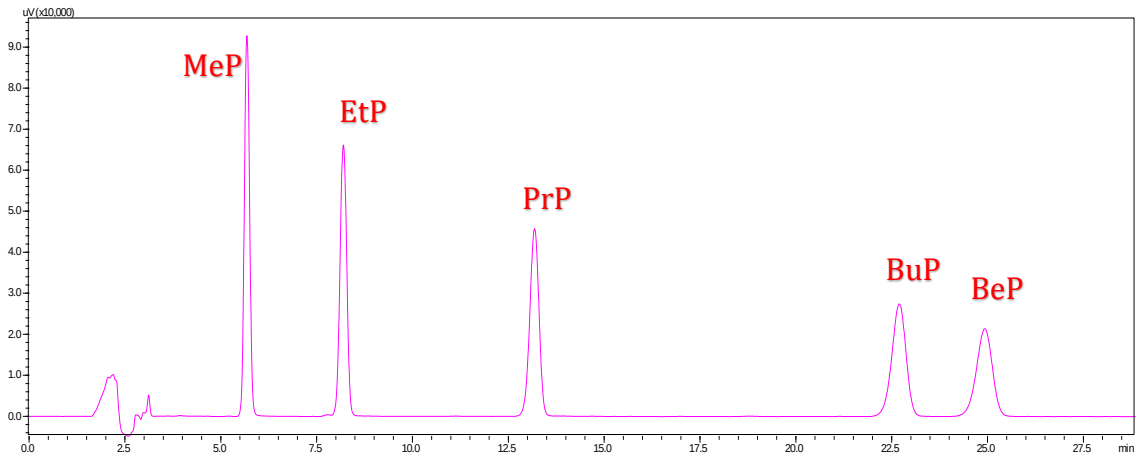
Son cihaz optimizasyonu olarak 10, 20, 30 ve 40 µL'lik enjeksiyon hacimleri test edilmiştir. Aşırı yükleme, teorik plaka sayısının azalmasına neden olmaktadır. Ayırma mekanizması ne kadar karmaşıkça, kolonun aşırı yüklenme tehlikesi de o kadar büyük olmaktadır [339]. Bu bakımdan daha yüksek miktarda enjeksiyon hacimleri seçilmemiştir. Şekil 4.31' de görüldüğü gibi, 30 ve 40 µL hacimler için en yüksek pik alanı değerleri kaydedilmiştir. 30 ve 40 µL'lik pik alan değerleri arasında anlamlı bir fark olmadığı için, çalışma için optimum enjeksiyon hacmi olarak 30 µL seçilmiştir.



Şekil 4.31 Enjeksiyon hacmi değişimi ile elde edilen kromatogram (*Standart derişimi: 4.0 mg kg⁻¹, Mobil faz: %Amonyum format (50 mM, pH 4.0) /ACN: %60/40, Akış hızı: 1.2 mL dk⁻¹*)

Genel olarak, sabit bir sıcaklık HPLC'de artan tekrarlanabilirliğe yol açmakta, 45-50 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, organik bir mobil faz ile artan bir gürültü seviyesi gözlenmektedir. 45-50 °C'lik sıcaklıklarda, dedektörde kabarcık oluşumu tehlikesi artmakta, bu da yalnızca daha yüksek bir gürültü seviyesiyle değil, aynı zamanda hayalet pikler ve negatif piklerin ortaya çıkmasıyla da sonuçlanmaktadır. 50 veya 60 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda silika jel giderek daha fazla çözülme ve kolon ömrü azalmaktadır [339]. Sadece sabit sıcaklıkta alıkonma süreleri sabittir ve sonuçlar karşılaştırılabilir. Bu sebeplerle çalışılan bileşiklerin belirlenen optimum koşulları ile 25 °C sabit oda sıcaklığında çalışılmıştır.

Toplam kromatografik çalışma süresi 30 dakika olmakla birlikte ve analitlerin alıkonma süreleri MeP için 5.40, EtP için 7.75, PrP için 12.40, BuP için 21.25 ve BeP için 23.0 dakika olarak belirlenmiştir. Uygun kromatografik koşullar altında 4.0 mg kg⁻¹ derişimde elde edilen kromatogram Şekil 4.32' de verilmiştir.



Şekil 4.32 Uygun kromatografik koşullar altında beş parabene ait elde edilen kromatogram

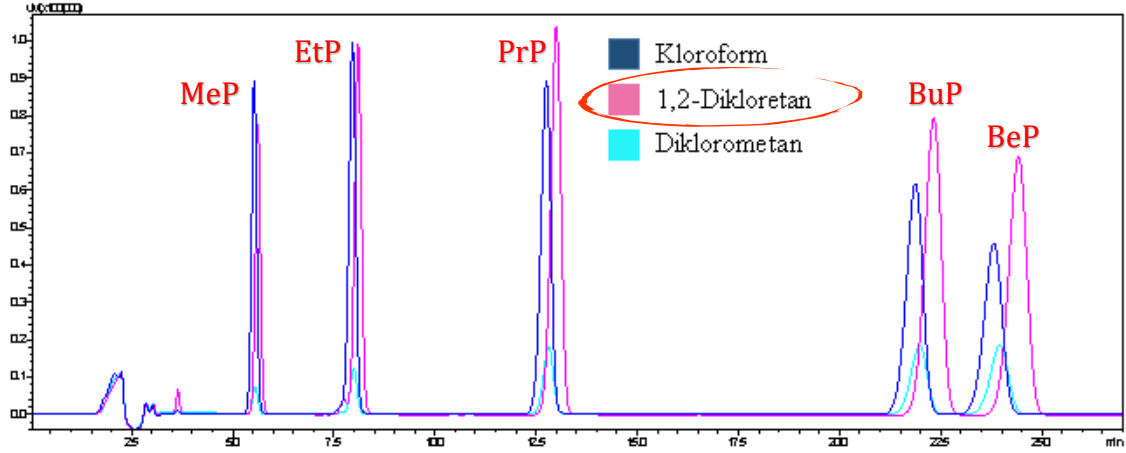
4.3.1.2 DSSME Optimizasyonları

DSSME yönteminin parametreleri, bir parametrenin farklı değerlerde değiştirildiği ve diğerlerinin bir değerde sabitlendiği adım adım yaklaşımıyla optimize edilmiştir. Bu parametreler, ekstraksiyon ve dağıtıcı çözücünün türünü ve miktarını içermektedir. Tüm optimizasyon deneyleri 1.0 mg kg⁻¹ standart çözeltisi kullanılarak 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

➤ Ekstraksiyon Çözücüsünün Türü ve Miktarının Belirlenmesi

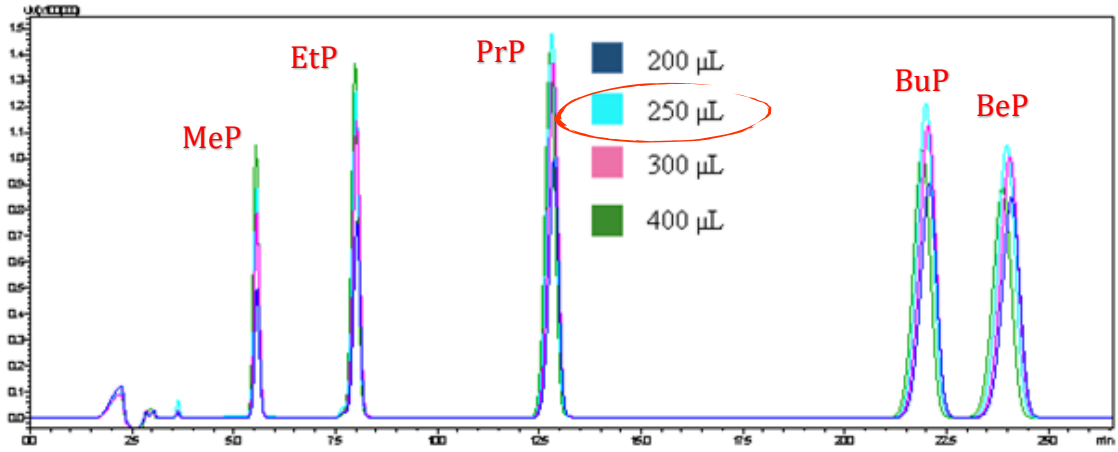
Dağılım katsayısı ve seçicilik, ekstraksiyon çözücü seçimini yöneten en önemli parametrelerdir. Seçicilik, çözücünün diğer bileşenlere kıyasla istenen bileşeni alma yeteneği anlamına gelmektedir. Genel olarak, ekstraksiyon çözücüsü analitleri iyi ekstrakte edebilmeli, sudaki çözünürlüğü ise düşük olmalıdır [333]. Ayrıca ideal bir ekstraksiyon çözücüsü, dağıtıcı çözücü ile karışabilir olmalı, sulu çözeltiden farklı bir yoğunluğa sahip olmalıdır. DSSME yönteminde hem düşük yoğunluklu hem de yüksek yoğunluklu organik çözücüler kullanılabilmekte, ancak sulu çözeltinin üstünde toplanan düşük yoğunluklu çözücüler buharlaşmaya maruz kalabilmektedir. Bu da prosedürün duyarlılığını ve tekrarlanabilirliğini etkileyebilmektedir [280]. Bu nedenle kloroform, 1.2-dikloroetan ve diklorometan gibi yüksek yoğunluklu çözücüler organik çözücülerin ekstraksiyon etkinlikleri için test edilmiştir. Bu optimizasyon adımında, her bir ekstraksiyon çözücüsünden 300 µL, dağıtıcı çözücü ile karıştırılmış ve eşdeğer standart çözeltilere enjekte edilmiştir. En verimli ekstraksiyon çözücüsünü seçmek için analitlerin sinyal-gürültü oranları ve pik alanları kullanılmıştır. Kloroform ve 1.2-dikloroetan için kaydedilen pik alanı

değerlerinin, Şekil 4.33' de gösterildiği gibi diklorometan için kaydedilen değerlerden oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Beş analitten üçü için en yüksek pik alanı değerleri elde edilen 1,2-dikloroetan, çalışmalar için en uygun ekstraksiyon çözücüsü olarak seçilmiştir.



Şekil 4.33 Ekstraksiyon çözücü türü için elde edilen kromatogram (*Standart derişimi: 1.0 mg kg⁻¹, Ekstraksiyon çözücü miktarı: 300 µL, Dağıtıcı çözücü türü/miktarı: Etanol/2.0 mL*)

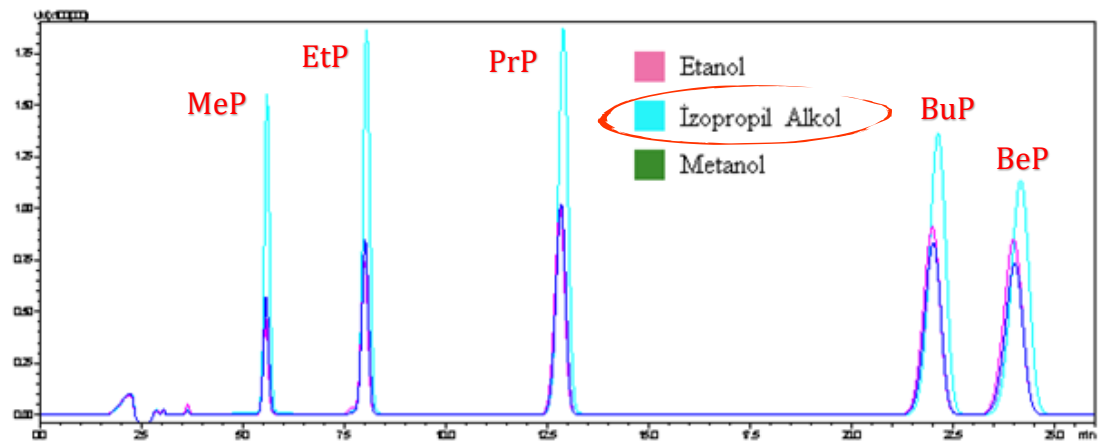
Ekstraksiyon çözücü miktarının zenginleştirme faktörü üzerinde büyük etkileri vardır. Ekstraksiyon çözücü miktarının artmasıyla, santrifüjleme ile elde edilen son organik faz artmakta, bu da organik fazdaki hedef analitin konsantrasyonunun azalmasına neden olmaktadır. Bu sebeple zenginleştirme faktörü azalmaktadır. Bu nedenle, optimum ekstraksiyon çözücü miktarı, hem yüksek zenginleştirme faktörünü hem de santrifüjlemeden sonraki alt fazın yeterli hacmini sağlamalıdır [333]. 200, 250, 300 ve 400 µL olmak üzere dört farklı miktarda 1,2-dikloroetanın ekstraksiyon verimi üzerindeki etkilerini değerlendirmek için test edilmiştir. 200 µL için faz ayrımını sağlayacak yeterli alt faz elde edilememiş, Şekil 4.34' de görüldüğü gibi 250 µL için maksimum verimlilikle hedef analitlerin ekstraksiyonunu sağlamış ve bu değer için en yüksek pik alanı değeri kaydedilmiş ve bu değer için en yüksek pik alanı değeri kaydedilmiştir.



Şekil 4.34 Ekstraksiyon çözücü miktarı için elde edilen kromatogram (*Standart derişimi: 1.0 mg kg⁻¹, Ekstraksiyon çözücü türü: 1.2-dikloroetan, Dağıtıcı çözücü türü/miktarı: Etanol/2.0 mL*)

➤ Dağıtıcı Çözücünün Türü ve Miktarının Belirlenmesi

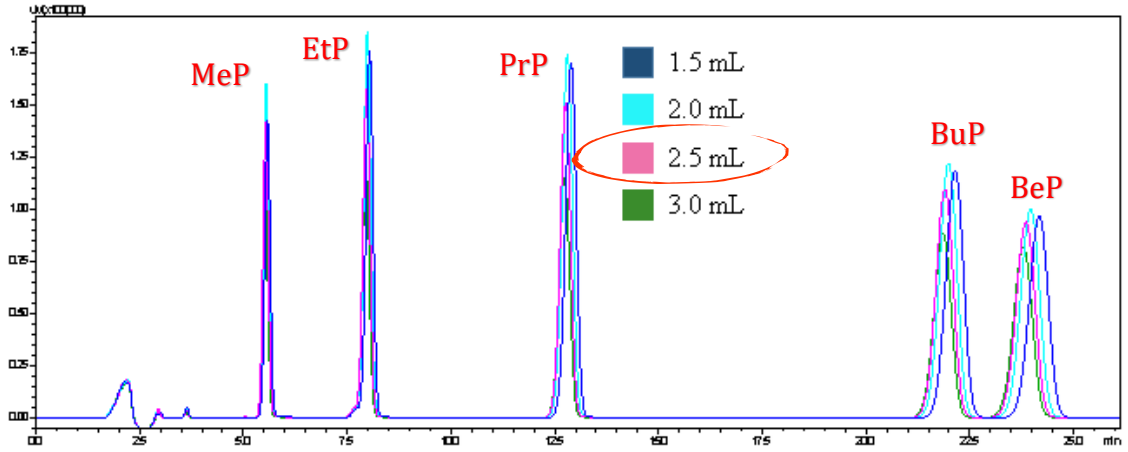
Dağıtıcı çözücü, hem su hem de ekstraksiyon çözücüsü ile yüksek oranda karışabilir olmalıdır. Dağıtıcı çözücünün hem organik hem de su içinde karışabilirliği, ekstraksiyon çözücüsünün emülsifikasyonu için ana seçim noktasıdır. Ara yüzey gerilimi yüksek olan ekstraksiyon çözücüleri, çalkalayarak küçük damlacıkların oluşumunu zorlaştırmakta ve ekstraksiyon verimini düşürmektedir. Bu nedenle, dağıtıcı çözücü, su ile ekstraksiyon çözücüsü arasındaki arayüzey gerilimini azaltmada önemli bir rol oynamakta ve böylece damlacık boyutunu küçültmektedir [280]. Bu nedenle çalışmada hem su hem de 1.2-dikloroetan ile karışabilen etanol, metanol ve izopropil alkolün dağılım etkinlikleri test edilmiştir. Beş analitin tümü için en yüksek pik alanı değerleri izopropil alkol için elde edilmiştir (Şekil 4.35).



Şekil 4.35 Dağıtıcı çözücü türü için elde edilen kromatogram (*Standart derişimi: 1.0 mg kg⁻¹, Ekstraksiyon çözücü türü/miktarı: 1.2-dikloroetan/250 µL, Dağıtıcı çözücü miktarı: 2.0 mL*)

Dağıtıcı çözücü miktarı, bulutlu çözeltinin oluşumunu, ekstraksiyon çözücüsünün sulu fazda dağılma derecesini ve ardından ekstraksiyon verimini doğrudan etkilemektedir. Düşük hacimli dağıtıcı çözücü, ekstraksiyon çözücüsünü düzgün bir şekilde dağıtamamakta ve bu nedenle, bulanık çözelti tamamen oluşturulamamaktadır. Yüksek hacimlerde ise, analitlerin sudaki çözünürlüğü, dağıtıcı çözücünün hacmini artırarak artmakta, bu nedenle ekstraksiyon işlemi tamamlanamamaktadır [333]. Dağıtıcı çözücü miktarı 1.5, 2.0, 2.5 ve 3.0 mL miktarları test edilerek optimize edilmiş ve Şekil 4.36' dan da anlaşılabacağı gibi optimum değer 2.0 mL olarak belirlenmiştir.

Birçok araştırmadan elde edilen sonuçlar, bulutlu çözelti oluşumundan sonra ekstraksiyon işleminin çok kısa sürede tamamlandığını ve hızlı bir şekilde denge durumuna ulaşıldığını göstermektedir [280]. Optimizasyon deneyleri boyunca, analitlerin homojen karışmasını ve kütle transferini arttırmak için enjeksiyon adımından sonra 15 s vorteks ile karıştırma uygulanmıştır.



Şekil 4.36 Dağıtıcı çözücü miktarı için elde edilen kromatogram (*Standart derişimi: 1.0 mg kg⁻¹, Ekstraksiyon çözücü türü/miktarı: 1.2-dikloroetan/250 µL, Dağıtıcı çözücü türü: İzopropil alkol*)

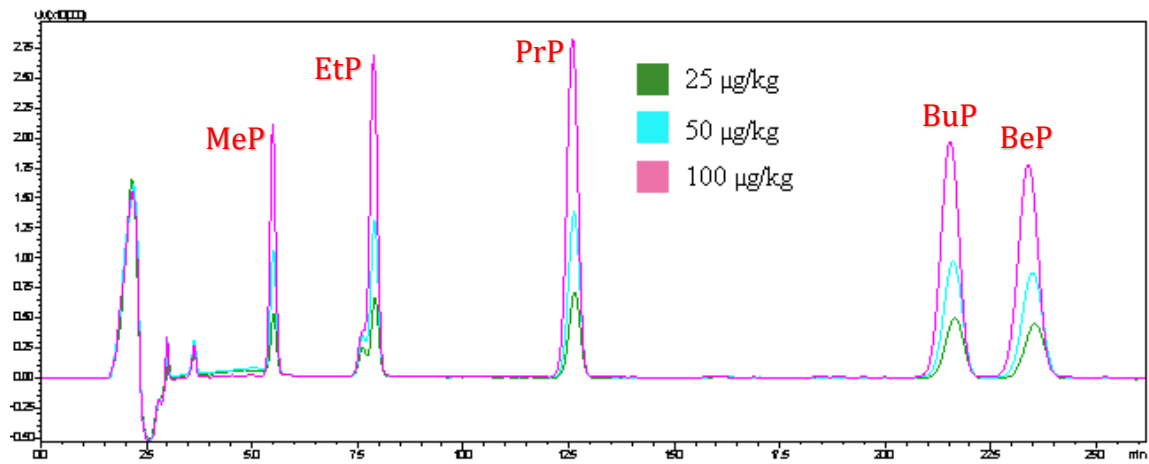
4.3.2 Sistem Analitik Performansının Belirlenmesi

HPLC-UV sisteminin ve DSSME yönteminin optimum parametreleri Tablo 4.31' de özetlenmiştir. MeP, EtP, PrP, BuP ve BeP için oluşturulan optimum şartlarda HPLC-UV yönteminin doğrusallığının tayini 1.0 – 500 µg kg⁻¹ derişim aralığında hazırlanan sulu standart çözeltiler ile gerçekleştirilmiş ve EtP dışında her bir paraben için elde edilen pik alanları, derişimin bir fonksiyonu olarak grafiğe geçilerek kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. EtP için ise düşük derişimlerde, analite yakın alıkonma

süresine sahip safsızlık piki olduğundan dolayı EtP için pik alanından ziyade pik yüksekliğinin değerlendirilmesinin daha uygun olduğu belirlenmiştir. Kalibrasyon doğrularının oluşturulmasında her bir paraben için üç enjeksiyon sonunda elde edilen piklerin pik alanı/yüksekliğinin ortalama değerleri kullanılmıştır. Şekil 4.37, analitlerin doğrusal kalibrasyon aralığındaki üç farklı derişimi için pik yoğunluğundaki orantılı artışı göstermektedir.

Tablo 4.31 Parabenler için DSSME-HPLC-UV metoduna ait optimum parametreler

Parametre	Değer
Mobil faz	Amonyum format (50 mM, pH:4.0):asetonitril (60:40 v:v)
Mobil faz akış hızı	1.2 mL dk ⁻¹
Elüsyon	İzokratik mod
Dalgaboyu	254 nm
Enjeksiyon Hacmi	30 µL
Kolon sıcaklığı	25 °C
Ekstraksiyon çözücü türü / miktarı	1.2-dikloroetan / 250 µL
Dağıtıcı çözücü türü / miktarı	İzopropil alkol / 2.0 mL
Karıştırma türü / süresi	Vorteks / 15 s

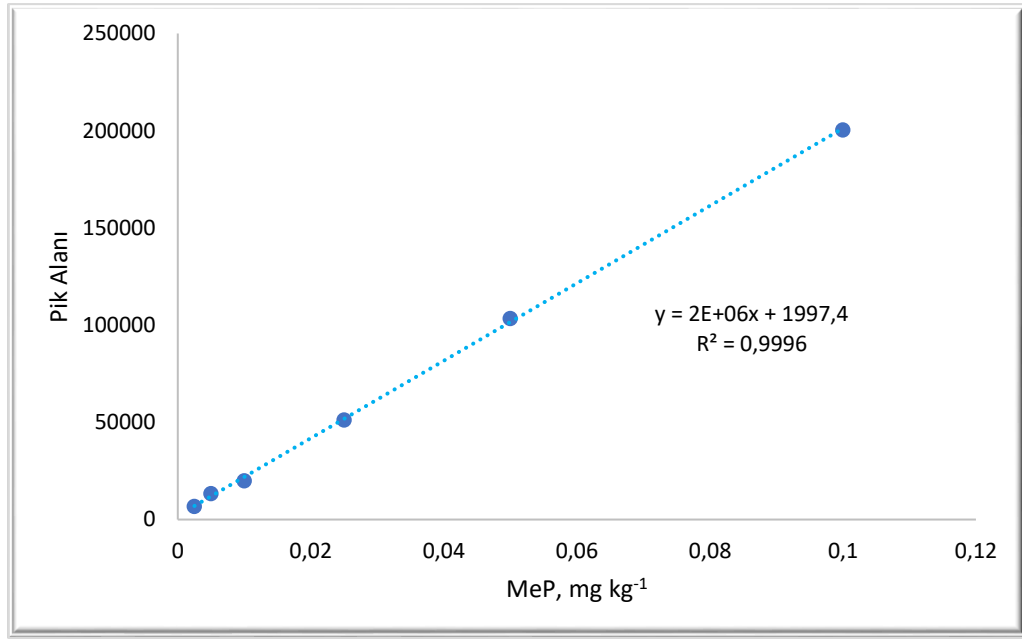


Şekil 4.37 Optimum koşullar altında 25, 50 ve 100 µg kg⁻¹ derişimlerdeki parabenlere ait kromatogramlar

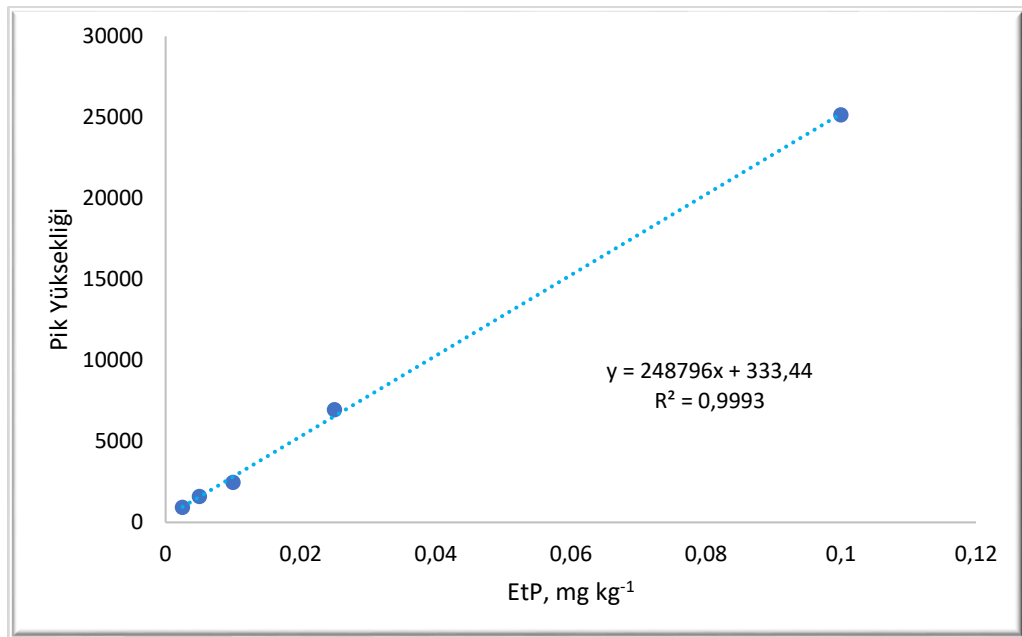
HPLC-UV yönteminin pik alanları/yüksekliği ve alıkonma zamanları bakımından tekrarlanabilirliğinin tayini her bir paraben için en düşük derişim değerin optimum şartlarda 6 kez sisteme enjekte edilmesi ile değerlendirilmiş ve her bir paraben için lineer aralık, GL, TL, R^2 ve %BSS değerleri Tablo 4.32' deki gibi hesaplanmıştır. Kalibrasyon grafiklerinin R^2 değerlerine bakılarak, seçilen çalışma aralığında HPLC-UV yöntemin doğrusallığının geniş bir konsantrasyon aralığında oldukça iyi olduğu görülmektedir. Analitler için hesaplanan GL ve TL değerleri sırasıyla 0.30 - 0.80 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ve 1.1 - 2.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ aralığındadır. En düşük kalibrasyon noktasında analitler için hesaplanan %BSS değerlerinin tamamı %7.6'nın altında olduğu görülmüştür. Parabenlere ait elde edilen kalibrasyon doğruları aşağıdaki şekillerde verilmiştir.

Tablo 4.32 Optimum koşullar altında çalışılan parabenlere ait analitik performans değerleri

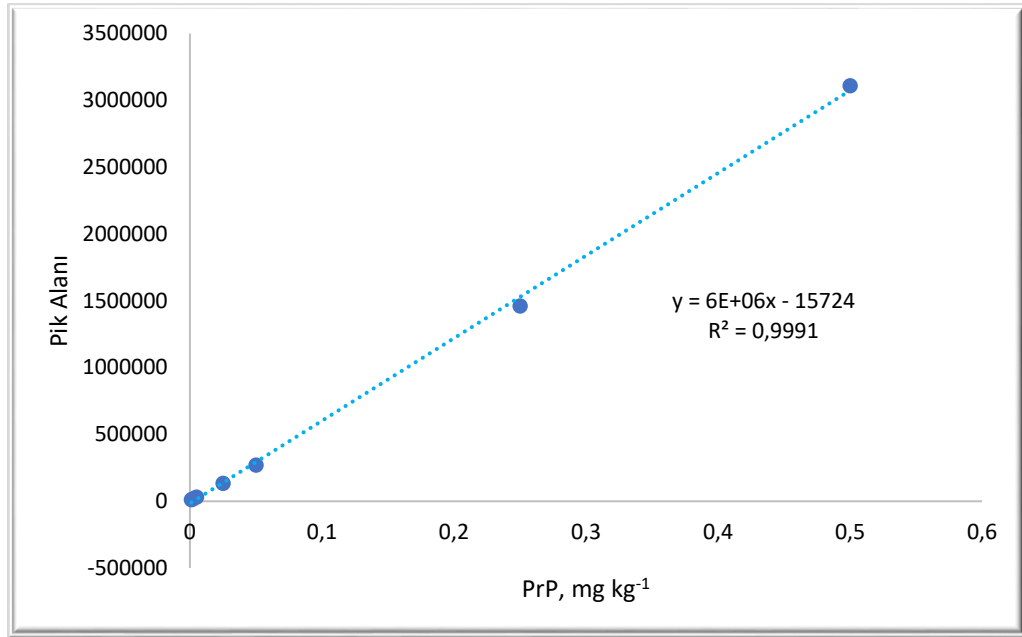
Analit	GL, $\mu\text{g kg}^{-1}$	TL, $\mu\text{g kg}^{-1}$	%BSS	Doğrusal Aralık, $\mu\text{g kg}^{-1}$	R^2
MeP	0.78	2.60	7.6	2.50 – 100	0.9996
EtP	0.75	2.51	6.7	2.50 – 100	0.9993
PrP	0.34	1.14	5.5	1.00 – 500	0.9991
BuP	0.33	1.09	5.4	1.00 – 500	0.9997
BeP	0.75	2.50	3.5	2.50 – 500	0.9999



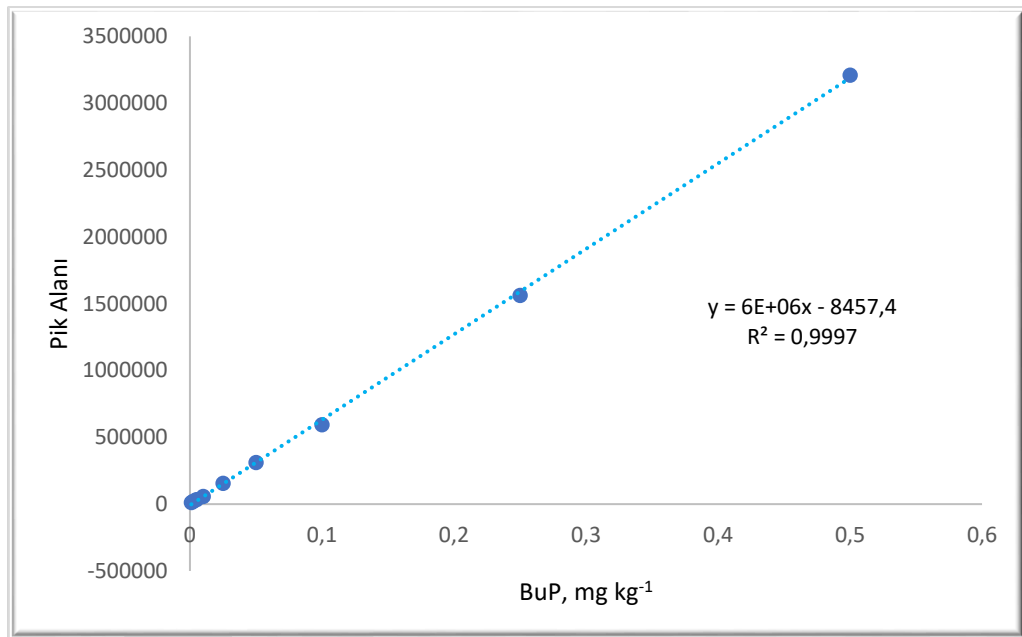
Şekil 4.38 MeP için optimum koşullar altında elde edilen kalibrasyon doğrusu



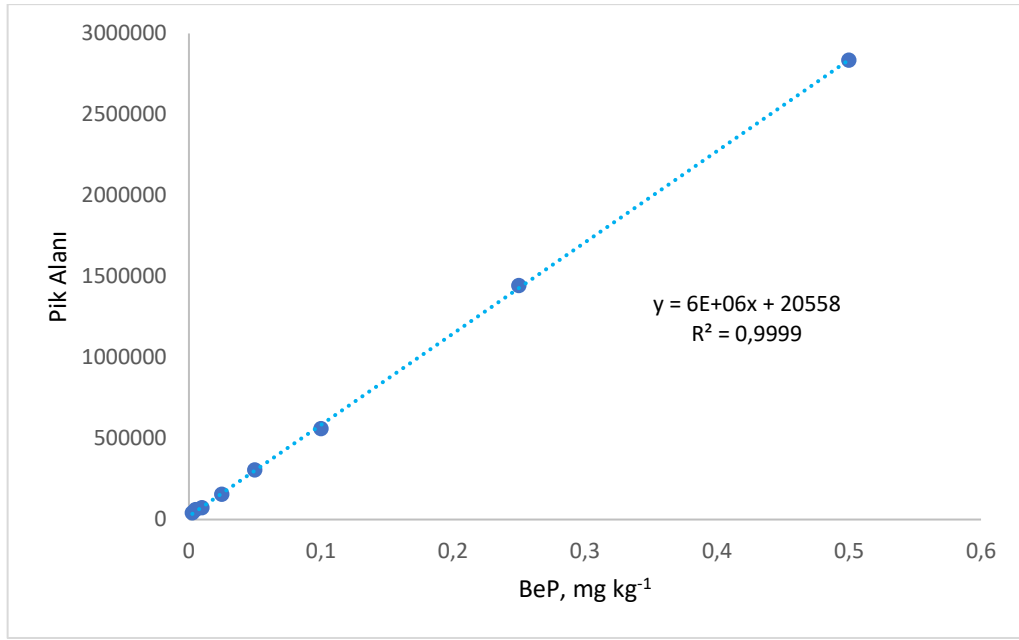
Şekil 4.39 EtP için optimum koşullar altında elde edilen kalibrasyon doğrusu



Şekil 4.40 PrP için optimum koşullar altında elde edilen kalibrasyon doğrusu



Şekil 4.41 BuP için optimum koşullar altında elde edilen kalibrasyon doğrusu



Şekil 4.42 BeP için optimum koşullar altında elde edilen kalibrasyon doğrusu

4.3.3 Gerçek Örnek Çalışmaları

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu ve gerçek örneklerle uygulanabilirliğini test etmek amacıyla dört farklı ruj örneği analiz edilmiştir. Hazırlanan ruj örnekleri, geliştirilen yöntemin optimum koşullarında analiz edilmiştir. Daha önce analiz edilen ve beş hedef analitin hiçbirini içermediği ya da gözlenebilme limitinin altında kaldığı tespit edilen farklı bir ruj numunesi, analitlerin matris uyumlu kalibrasyon standartlarını hazırlamak için blank ekstrakt olarak kullanılmıştır. Analitlerin matriks eşleştirilmiş kalibrasyon grafikleri, 0,9972 - 0,9996 aralığında R^2 değerlerini kaydetmiş ve bu da yöntem için iyi bir doğrusallık elde edildiğini doğrulamıştır. Matriksle eşleşen kalibrasyon grafikleri, yüzde derişim olarak ifade edilen dört ruj örneğindeki parabenleri ölçmek için kullanılmıştır.

Kromatogramlardan elde edilen sonuçlar, dört örneğin tamamının hedef parabenlerden en az birini içerdiğini göstermiştir. Örneklerde tespit edilen parabenlerin yüzde derişimi Tablo 4.33' te özetlenmiştir. En yüksek paraben derişimi 2 numaralı rujda %1,03 etilparaben ve 4 numaralı rujda %1,01 metilparaben olduğu görülmektedir. 3 numaralı ruj, %0,11 BeP içeriği ile en az miktarda paraben içeren örnek olmuştur. Tespit edilemeyen parabenler, ilgili parabenin ruj örneğinde bulunmadığını ya da çalışılan koşullarda gözlenebilme limitinin altında olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda analitlerin alıkonma

sürelerinin değişmemesi, matriks etkisinin geliştirilen yöntem üzerinde bir etkisinin olmadığını göstermiştir.

Tablo 4.33 Ruj örneklerinde parabenlerin kantitatif tayini

	MP, (%)	EP, (%)	PP, (%)	BuP, (%)	BeP, (%)
Ruj 1	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.31 ± 0.03
Ruj 2	T.E.	1.03 ± 0.06	T.E.	T.E.	T.E.
Ruj 3	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.11 ± 0.01
Ruj 5	1.01 ± 0.03	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.

T.E. Tespit Edilmedi

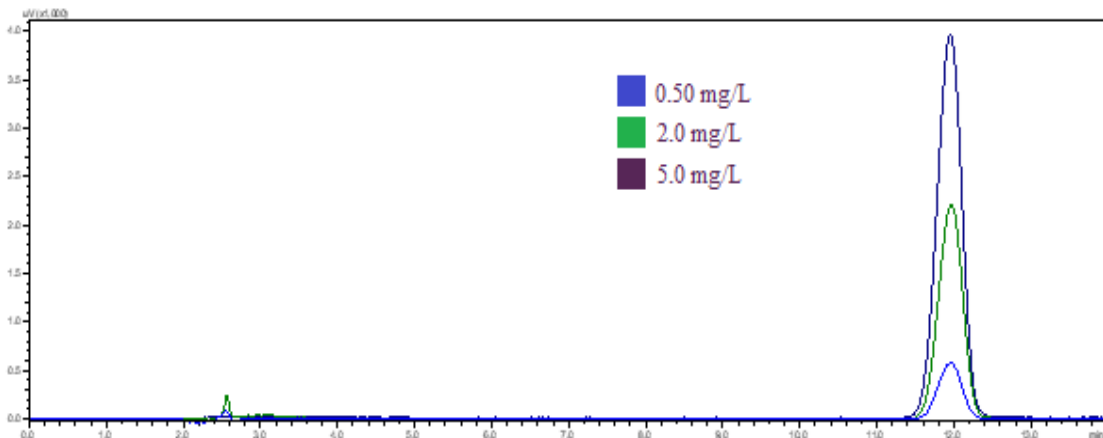
4.4 HPLC-UV ve Dijital Görüntü Tabanlı Kolorimetrik Tayin Yöntemi ile Metalik Elek Bağlantılı Çift Şırınga Sistemi Destekli Cr (VI)'nın Belirlenmesi İçin Bir Çift Görüntüleme Yönteminin Geliştirilmesi

Metal şelatların yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile analizi, yüksek duyarlılık ve tekrarlanabilirliğe sahip olmasından dolayı eser metal analizine başarıyla uygulanmakta ve kromatografi dışında özel bir teknik gerektirmemektedir. Aynı zamanda metal tayini için en yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında ICP-OES, ICP-MS gibi son derece seçici ve hassas laboratuvar temelli yöntemler olmasına rağmen pahalı bakım ve yüksek eğitimli personel gerektirmektedir. Bu nedenle, uygun maliyetli ve taşınabilir tayin yöntemlerine yönelik artan bir talep vardır. DIC, yerinde tayin uygulamaları için büyük potansiyele sahiptir. Bu sebepler göz önünde bulundurularak tez kapsamında yapılan son çalışmanın amacı, Cr (VI)'nın DPC ile kompleks oluşturmasına dayalı kromatografik ve kolorimetrik bir yöntem geliştirmektir. Kompleks oluşumunu etkileyen tüm parametreler optimize edilmiş ve HPLC-UV ile DIC sistemlerinde çift görüntüleme ile sistem analitik performansları belirlenmiştir. Kompleks oluşumları metalik elek bağlantılı çift şırınga sistemi ile gerçekleştirilmiş olup karıştırma işlemleri homojen kompleks çözeltileri elde etmek amacıyla otomasyon sistemi ile

gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda atıksu, nehir suyu ve musluk sularında geri kazanım çalışmaları yapılarak yöntemin gerçek örneklerle uygulanıp uygulanamayacağı test edilmiştir. Her bir ölçüm, üç tekrarlı gerçekleştirilmiş olup yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla %BSS değerleri hesaplanmıştır.

4.4.1 Optimizasyon Çalışmaları

Çalışmalara ilk olarak çalışılacak dalga boyunun belirlenmesi ile başlanmıştır. Bu amaçla Cr (VI)'nın DPC ile kompleksinin asidik ortamda oluştuğu belirlenmiş [340] ve 2.0 mg/L Cr (VI) çözeltisine 1.0 mL pH 2.2 tampon çözeltisi ve 1.0 mL %0.5 DPC ligandı eklenerek 15 s otomatik şırınga sistemi ile karıştırılmıştır. Oluşan mor renkli çözelti, kompleks oluşumunun bir göstergesi olmuş olup bu denemeye ait yapılan blank çalışmasında herhangi bir renk oluşumu gözlenmemiştir. Kompleks çözeltinin %0.50 DPC ile birlikte UV ölçümü alınmış ve DPC çözeltisine ait UV spektrumunda sinyal elde edilemezken kompleks çözeltide 581 nm'de en yüksek absorbands değeri elde edilmiştir. Bu aşamadan sonra amonyum format tamponu (50.0 mM, pH 4.0) ve ACN (78:22, v/v) mobil fazı, 1.2 mL dk⁻¹ akış hızı, 30 µL enjeksiyon hacmi ve 25 °C kolon sıcaklığında ve izokratik modda 0.50, 2.0 ve 5.0 mg L⁻¹ derişimlerinde kompleks çözeltiler hazırlanarak HPLC sistemine gönderilmiş ve Şekil 4.45' teki kromatogramlar elde edilmiştir. Derişimlerle birlikte orantılı olarak artan pik alanları, hem kompleks oluşumu kanıtlanmış hem de kullanılan kromatografik koşulların uygun olduğunu göstermiştir. Daha fazla kimyasal kullanımının önüne geçmek adına kullanılan kromatografik koşullar optimum olarak kabul edilmiş ve bir sonraki adım olan kompleks oluşum optimizasyonlarına geçilmiştir.



Şekil 4.43 0.50, 2.0 ve 5.0 mg L⁻¹ derişimlerinde hazırlanmış Cr (IV)-DPC kompleksine ait kromatogram

4.4.1.1 Kompleks Oluşum Optimizasyonları

HPLC-UV tekniği kullanılarak metallerin tayini prosesinde, bir metal-ligand kompleksinin oluşturulması gereklidir. Difenilkarbazid, altı değerlikli kromun tayini için yaygın olarak kullanılmaktadır [341]. Cr (VI) difenilkarbazid kompleksinin oluşumunu etkileyen faktörler optimize edilmiştir. Bu faktörler tampon çözeltisinin miktarı ve pH'ı, ligand derişimi ve miktarı ile karıştırma süresinden oluşmaktadır. Optimizasyon çalışmaları, üçlü ölçümlerle “tek seferde bir değişken” yaklaşımı kullanılarak yapılmış ve HPLC ile elde edilen pik alanlarının ortalaması dikkate alınmıştır.

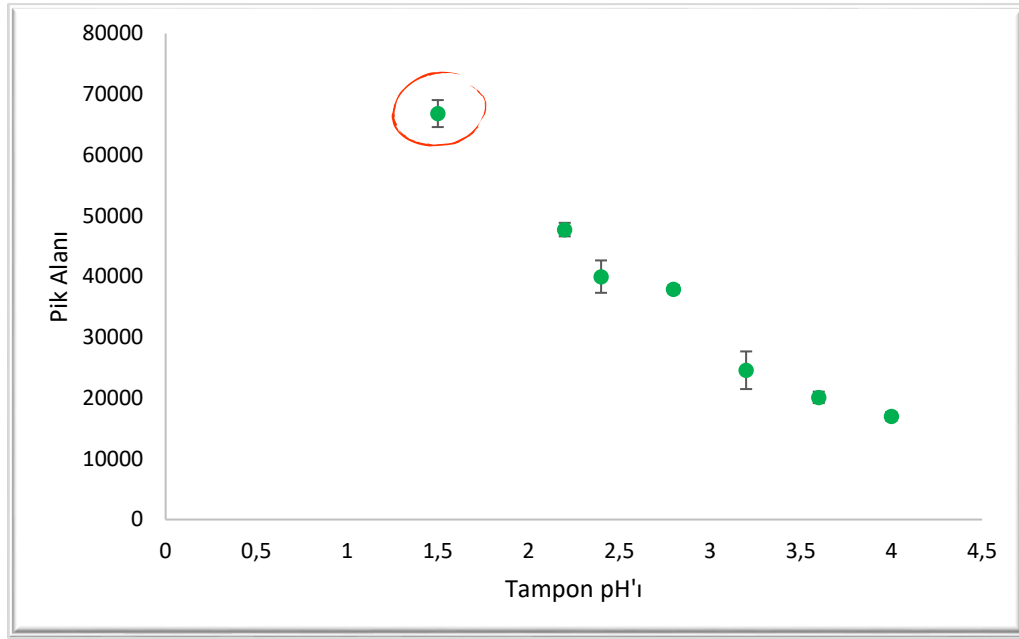
➤ Tampon pH ve Miktarının Belirlenmesi

Sulu çözeltinin pH'ı, verimli kompleks oluşumu elde etmek için optimize edilmiştir. Cr (VI), difenilkarbazid ile asidik ortamda kompleks oluşturduğundan dolayı pH 1.5, 2.2, 2.4, 2.8, 3.2, 3.6, ve 4.0 tamponu içeren çözeltiler ayrı ayrı ölçülmüştür. Bu optimizasyon adımı kullanılarak kullanılan sabit parametreler Tablo 4.34' teki gibidir.

Tablo 4.34 Tampon pH'ını belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	2.0 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon miktarı	1.0 mL
Ligand derişimi / miktarı	%0.50 (w/v) / 1.0 mL
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	15 s

pH'daki değişikliklerin etkilerine ilişkin yapılan bu çalışmada, Cr (VI)-DPC reaksiyonu için maksimum renk oluşumunun ve en yüksek pik alanı değerinin pH 1.5'te meydana geldiği Şekil 4.46' da görülmektedir. pH'ın artmasıyla çözeltilerde rengin açılmaya başladığı, pH 4.0'te ise daha belirgin bir şekilde kaybolmaya yakın olduğu görülmüştür. pH 1.5 ile çalışmanın başlangıç parametrelerine göre sinyallerde yaklaşık 1.5 kat artış elde edilmiş olup kolon deformasyonunu önlemek adına daha düşük tampon pH'ları denenmemiştir.



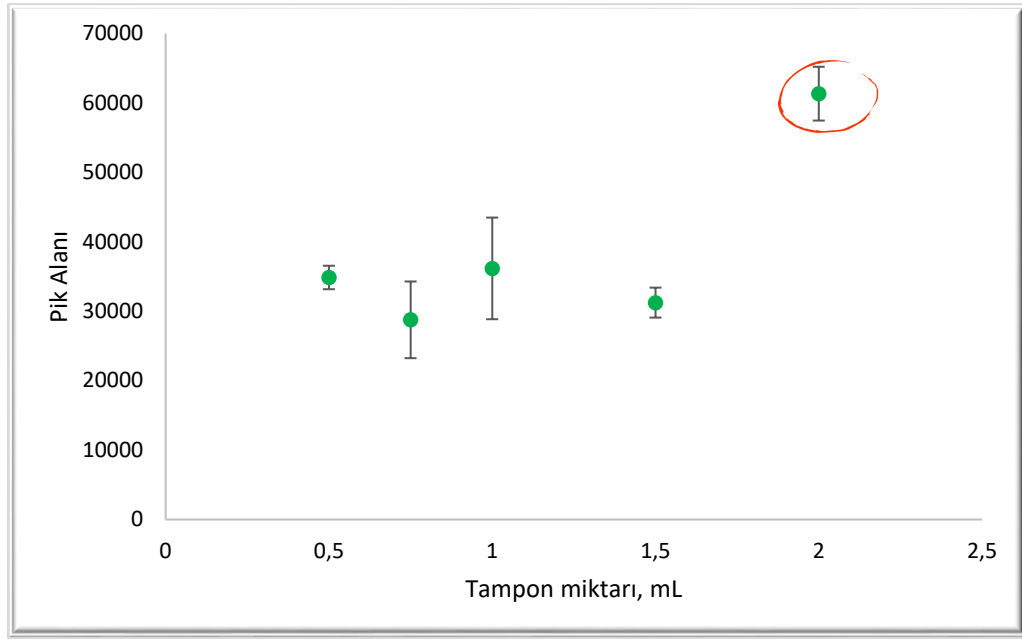
Şekil 4.44 Tampon pH'ının kompleks oluşumu üzerindeki etkisi

Optimum tampon çözelti miktarı da standart çözeltilere 0,50, 0,75, 1,0, 1,5 ve 2,0 mL tampon çözeltisi eklenerek incelenmiştir.

Tablo 4.35 Tampon miktarını belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	2.0 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı	pH 1.5
Ligand derişimi / miktarı	%0.50 (w/v) / 1.0 mL
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	15 s

2.0 mL dışında kullanılan farklı tampon çözelti miktarlarında kaydedilen pik alanları arasında önemli bir fark olmamakla birlikte tampon kapasitesi ile ilişkili olarak 2.0 mL için 2 kat daha yüksek pik alanları elde edilmiştir. Buna ek olarak farklı miktarda tampon eklenmiş kompleks çözeltiler arasında gözle görülür bir renk farklılığı görülmemiştir. Sonraki çalışmalar için 2.0 mL tampon miktarı optimum değer olarak seçilmiştir. Santrifüj tüpünün sınırlı hacminden dolayı daha yüksek miktarda tampon kullanımı gerçekleştirilmemiştir.



Şekil 4.45 Tampon miktarının pik alanı üzerindeki etkisi

➤ **Ligand Derişim ve Miktarının Belirlenmesi**

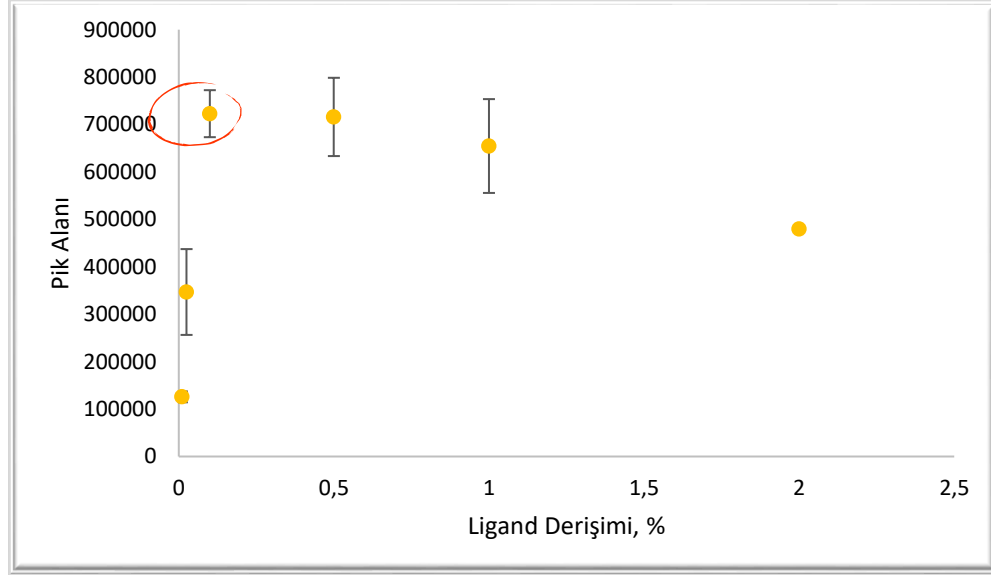
Optimize edilmesi gereken bir diğer önemli parametre, sulu ve organik faz arasındaki metal-ligand kompleksinin dağılım oranı nedeniyle sulu çözeltideki kompleksleştirici maddenin derişimidir. Bu optimizasyon adımı, ligand derişiminin pik alanı üzerindeki etkisi, eşit miktarlarda %0.010, %0.025, %0.10, %0.50, %1.0 ve %2.0 (w/v) derişimleri test edilerek değerlendirilmiştir.

Tablo 4.36 Ligand derişimini belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	2.0 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı / miktarı	pH 1.5 / 2.0 mL
Ligand miktarı	1.0 mL
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	15 s

Şekil 4.48'de gösterilen sonuçlardan görülebileceği gibi, %0.10 ligand derişimine kadar metal-kompleks miktarının artmasıyla dağılım oranının arttığı açıktır. Ligand çözeltisinin daha yüksek derişimlerinde (>%0.1), standart çözeltideki tüm Cr (VI)

iyonları kompleks haline geldikten sonra ortamda serbest halde artan miktarda bulunan DPC'nin 581 nm'de komplekse ait pik alanında azaltıcı etkiye yol açtığı görülmüştür. Bu nedenlerle %0.10 ligand derişiminin optimum koşul olduğu belirlenmiştir.



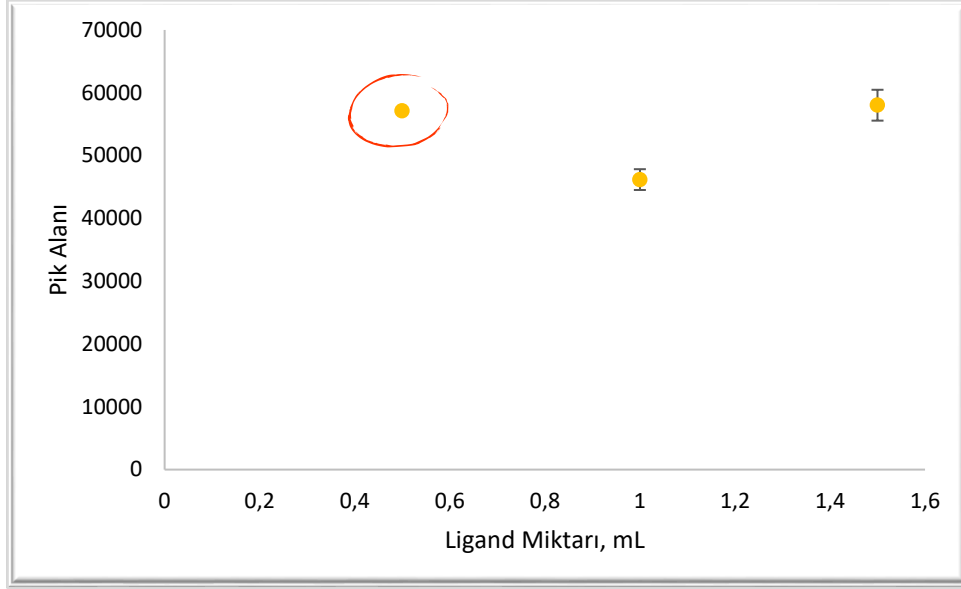
Şekil 4.46 Ligand derişiminin pik alanı üzerindeki etkisi

Geliştirilen yöntemde analitin kompleksleşmesi doğrudan bu parametreye bağlı olduğundan ligand çözeltisinin miktarı en kritik parametre olmuştur. Ligand miktarı, maksimum Cr (VI)-DPC kompleksi elde etmek için yeterli olmalıdır. Ligand çözeltisinin optimum derişiminin belirlenmesinden sonra, ligand çözeltisi miktarının etkisi, 0.50 mL ila 1.5 mL arasında değişen %0.10 (w/v) ligand çözeltisinin farklı miktarları kullanılarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4.37 Ligand miktarını belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişim / miktarı	2.0 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı / miktarı	pH 1.5 / 2.0 mL
Ligand derişimi	%0.10 (w/v)
Kompleksleşme sonrası karıştırma süresi	15 s

Elde edilen sonuçlara göre, en yüksek pik alanı değerleri ve en düşük standart sapmanın 0.50 mL ligand miktarı için elde edildiği Şekil 4.49' da görülmektedir. Çözeltiler arasında renkte görünür bir fark olmadığı görülmüştür. Daha düşük miktarda kimyasal kullanımı prensibi de göz önüne alınarak sonraki deneyler için optimum olarak 0.50 mL ligand miktarı seçilmiştir.



Şekil 4.47 Ligand miktarının pik alanı üzerindeki etkisi

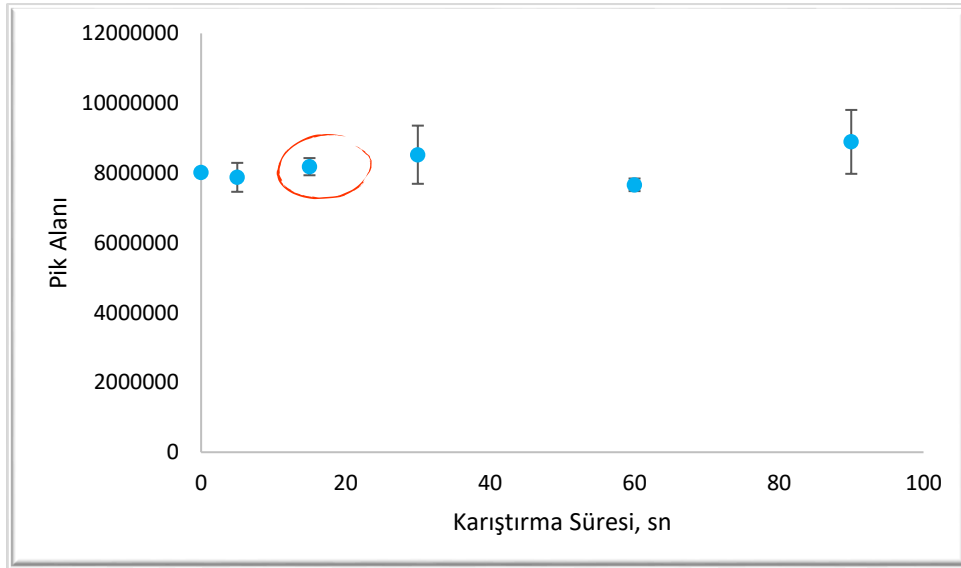
➤ **Kompleksleşme Sonrası Karıştırma Süresinin Belirlenmesi**

Karıştırma prosedürü ve süresi de analitin etkili kompleks oluşumunu sağlamak için oldukça önemli parametrelerdendir. Karıştırma adımında kullanılan yüzlerce deliğe sahip metalik elek, kompleks oluşumunun çözelti içinde homojen bir şekilde gerçekleşmesini sağlamakla birlikte otomasyon sisteminde kullanılan sabit hızlı pompa ile sağlanan karıştırma işlemi, hazırlanan tüm çözeltiler için tekrarlı sonuçlara katkı sağlamıştır. Karıştırmanın Cr (VI)-DPC'nin kompleksleşme verimliliğine etkisi, otomasyon sistemi kullanılarak metalik elek bağlantılı çift şırınga sistemi ile 0.0, 5.0, 15, 30, 60 ve 90 s'lik karıştırma periyotları gerçekleştirilerek incelenmiştir.

Tablo 4.38 Kompleksleşme sonrası karıştırma süresini belirleme optimizasyonunda kullanılan sabit parametreler

Parametre	Değer
Standart derişimi / miktarı	2.0 mg L ⁻¹ / 8.0 mL
Tampon pH'ı / miktarı	pH 1.5 / 2.0 mL
Ligand derişimi / miktarı	%0.10 (w/v) / 0.50 mL

Karıştırma işleminin kompleksleşme reaksiyonu üzerinde pik alanlarını arttırıcı bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Karıştırılmadan gerçekleştirilen kompleks reaksiyon için kaydedilen pik alanı değeri, diğer karıştırma periyotlarından önemli ölçüde farklı olmamasına rağmen kompleksin homojenliğinden emin olmak adına karıştırma işlemi uygulanmasına karar verilmiştir. 15 s karıştırma süresine ait pik alanları, 5 ve 10 s'lik periyotlara göre kısmen daha yüksek olduğu ve standart sapma değeri daha yüksek karıştırma sürelerinden çok daha düşük olduğu için optimum süre olarak kullanılmak üzere 15 s seçilmiştir.



Şekil 4.48 Kompleksleşme sonrası karıştırma süresinin pik alanı üzerindeki etkisi

4.4.2 Sistem Analitik Performansı

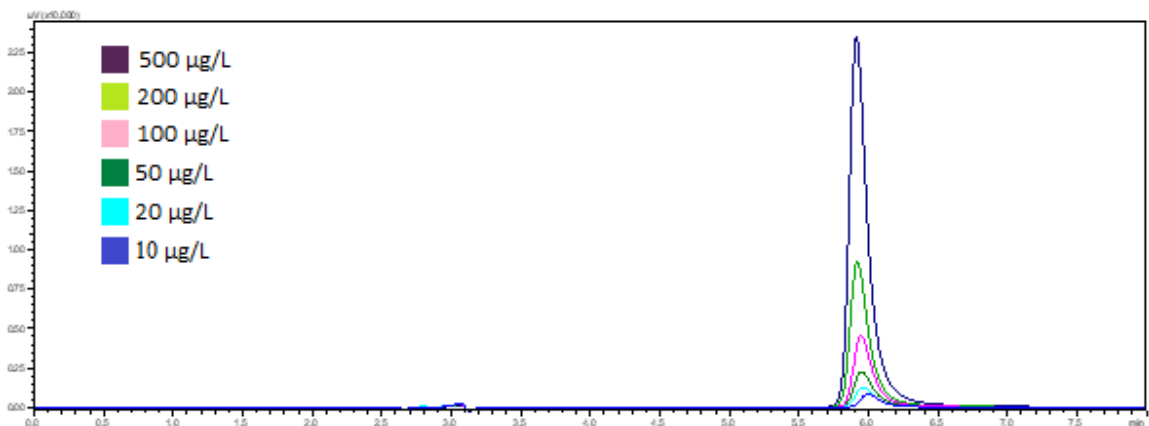
Geliştirilen yöntemin optimum koşullar altında HPLC-UV ve DIC sistemlerinin analitik performansı, Tablo 4.39' da görüldüğü doğrusallık, gözlenebilme ve tayin limiti ve bağıl standart sapma açısından değerlendirilmiştir.

Tablo 4.39 Optimum koşullar altında Cr (VI)-DPC kompleksine ait analitik performans değerleri

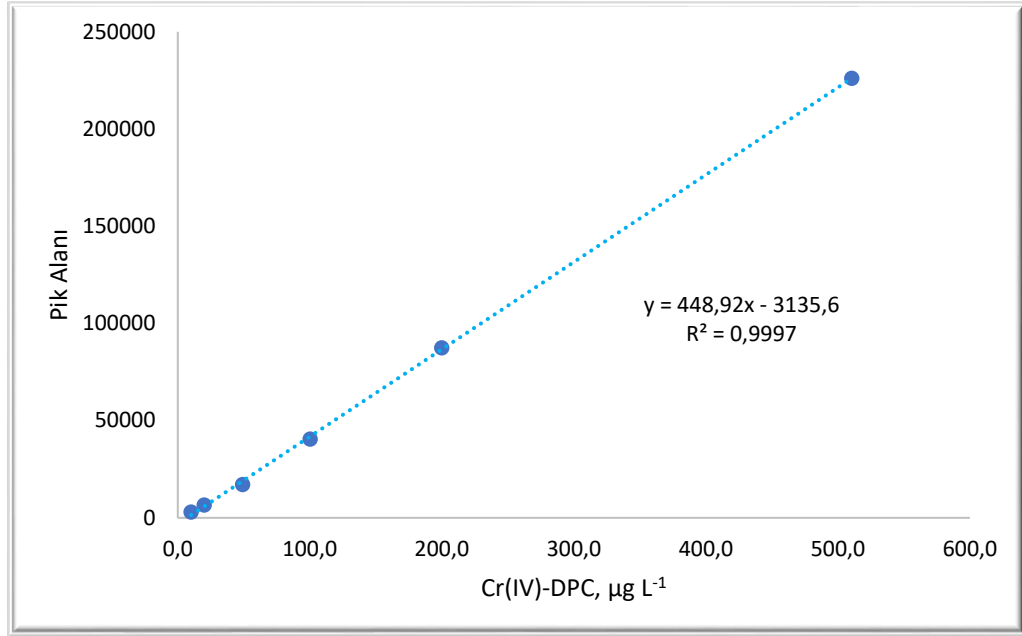
Analit	GL, $\mu\text{g L}^{-1}$	TL, $\mu\text{g L}^{-1}$	%BSS	Doğrusal Aralık, $\mu\text{g L}^{-1}$	R ²
HPLC-UV	1.72	5.72	9.0	10-500	0.9997
DIC (G)	17.1	56.9	0.3	100-1000	0.9960

4.4.2.1 HPLC-UV Sisteminin Analitik Performansının Belirlenmesi

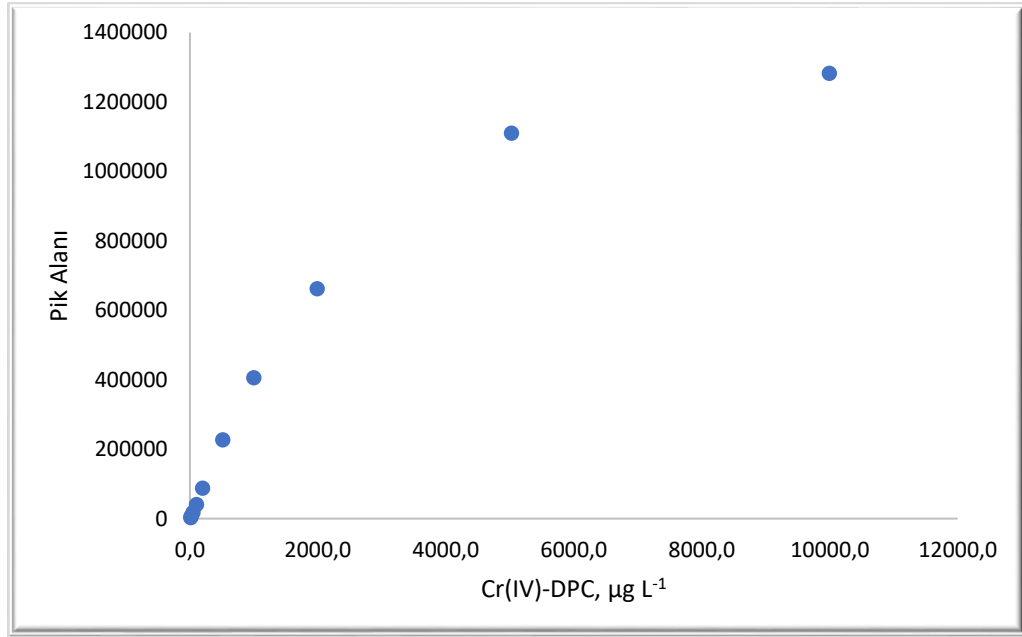
Sistem performansının belirlenmesinden önce analite ait alıkonma süresini kısaltmak amacıyla amonyum format tamponu (50.0 mM, pH 4.0) ve ACN mobil faz karışımı 40:60 oranından 22:78'e ayarlanarak analit alıkonma süresi 12.0 dk'dan 6.0 dk'ya kısalmıştır. Kalibrasyon grafikleri, standart çözeltiler için üçlü ölçümlerin ortalama pik alanı kullanılarak çizilmiştir. Yönteme ait blank çalışmasından elde edilen kromatogramda komplekse ait alıkonma süresinde liganda ait pik elde edilmesi, doğrusal aralığa ait en düşük derişim ile TL değeri arasındaki farklılığa sebep olmuştur. Standartlara ait tüm pik alanı ortalamalarından blank değeri çıkarılmış ve sistem parametreleri bu değerlere göre hesaplanmıştır. HPLC-UV sistemi, 0.9997 R² değeriyle 10–500 $\mu\text{g L}^{-1}$ derişim aralığında iyi bir doğrusallık sergilemiştir. GL ve TL değerleri sırasıyla 1.72 ve 5.72 $\mu\text{g L}^{-1}$ olarak bulunmuştur. En düşük derişimin %BSS değeri, önerilen yöntemin tekrarlanabilirliğinin iyi olduğunu göstermiş ve %9.0 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.49 Optimum koşullar altında 10-500 $\mu\text{g/L}$ derişim aralığında Cr (VI)-DPC kompleksine ait kromatogram



Şekil 4.50 Cr (VI)-DPC kompleksi için optimum koşullar altında HPLC-UV sisteminde elde edilen kalibrasyon doğrusu

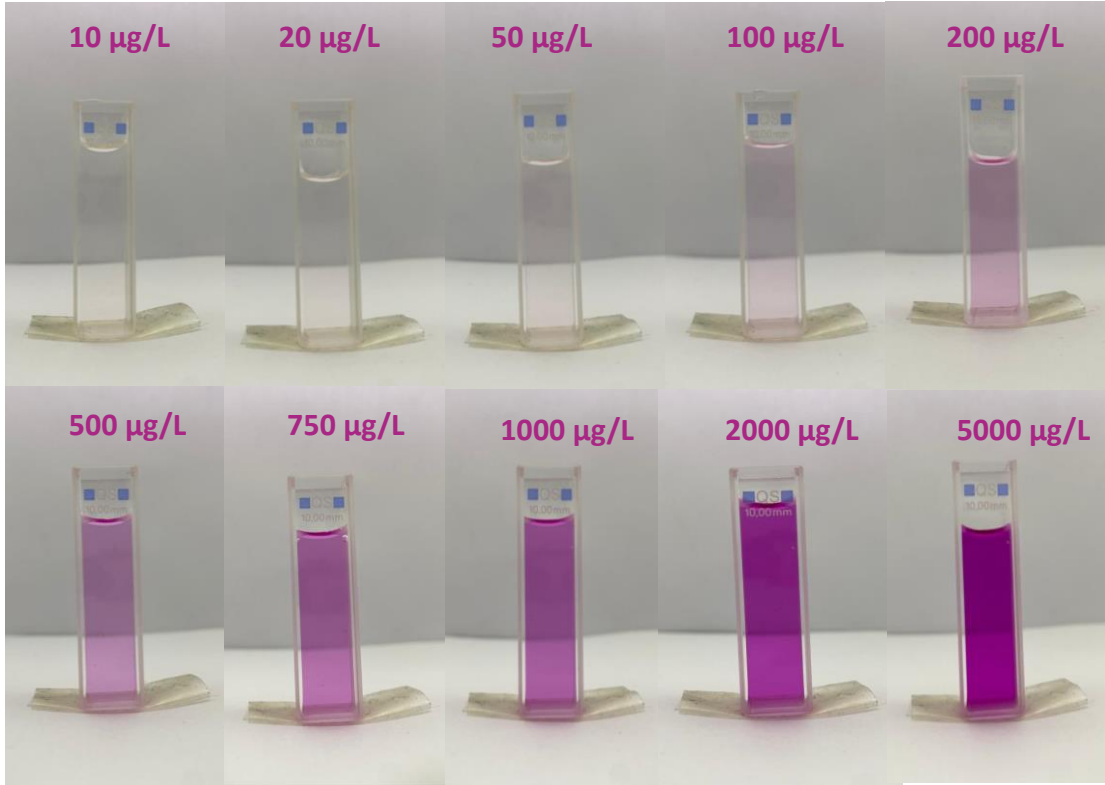


Şekil 4.51 Cr (VI)-DPC kompleksi için optimum koşullar altında HPLC-UV sisteminde elde edilen kalibrasyon eğrisi

4.4.2.2 DIC Sisteminin Analitik Performansının Belirlenmesi

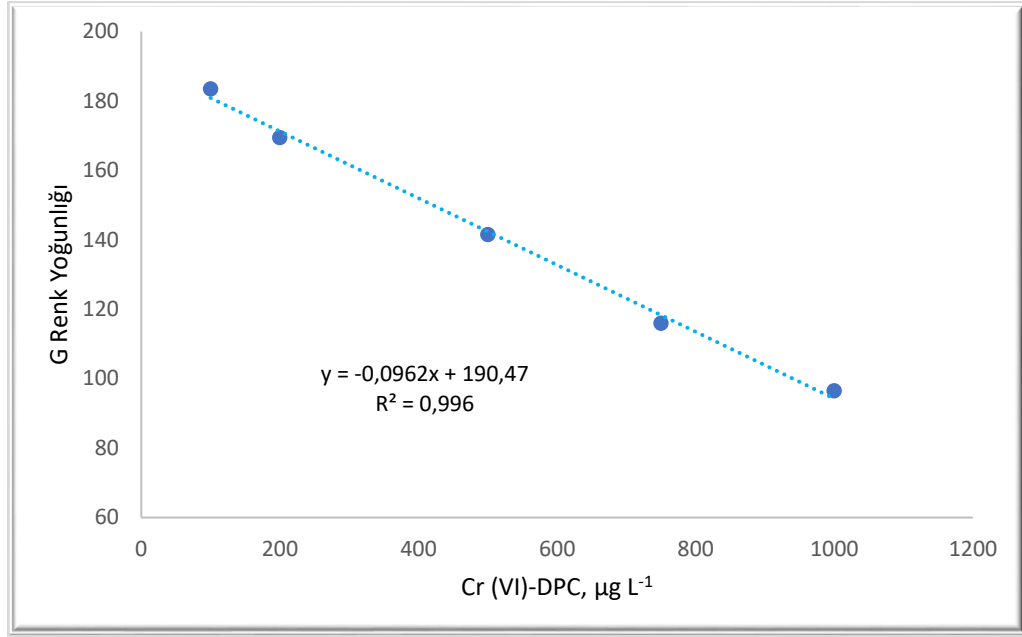
Cr (VI)-DPC kompleks standart çözeltileri için ölçümlerin ortalama G (Green) renk yoğunluğu kullanılarak kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Artan standart

derişimiyle birlikte Şekil 4.54' te gösterildiği gibi oluşan mor kompleks renginin de koyulaştığı görülmüştür.

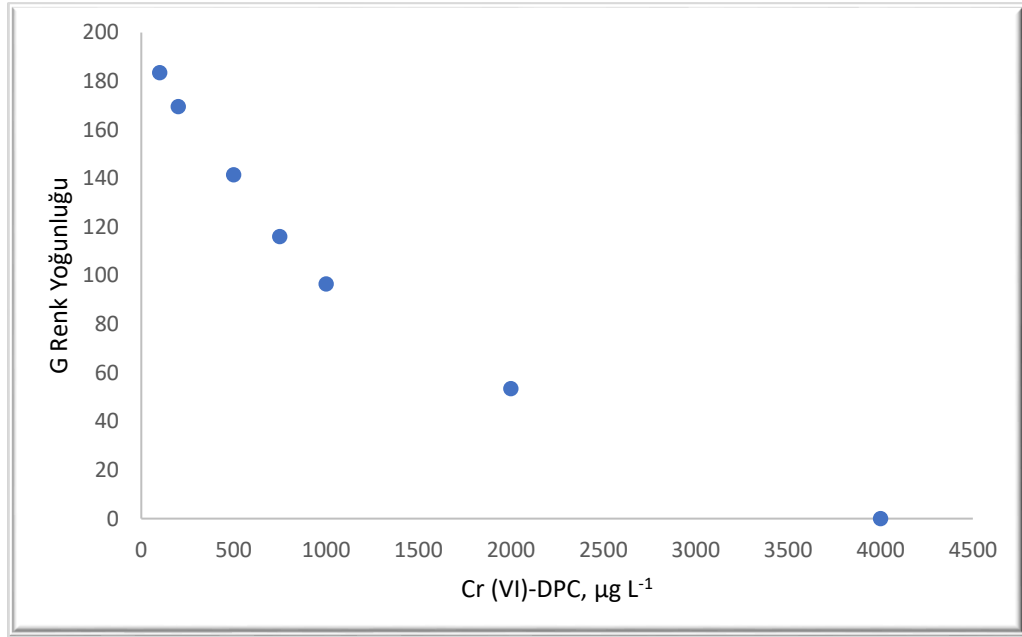


Şekil 4.52 Cr (VI)-DPC kompleksinin artan derişim ile birlikte renk değişimi

Her bir tekrarın üç kez görüntüsü alınmış ve her bir görüntü için seçilen beş noktanın ortalama yoğunlukları kaydedilmiştir. Kolorimetrik yöntemde, G renk yoğunluğu için R^2 değer 0.9960 olan 100–1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ 'lik bir doğrusal dinamik aralık sergilemiştir. Geliştirilen yöntem için GL ve TL değerleri sırasıyla 17.1 ve 56.9 $\mu\text{g L}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Kalibrasyon doğrusundaki en düşük derişim için elde edilen %BSS değer 0.3 olup m kemm l bir kesinlik göstermiştir. Elde edilen kalibrasyon doğruları ve eğrileri aşağıdaki şekillerde verilmiştir.



Şekil 4.53 Cr (VI)-DPC kompleksi için optimum koşullar altında DIC sisteminde elde edilen kalibrasyon doğrusu



Şekil 4.54 Cr (VI)-DPC kompleksi için optimum koşullar altında DIC sisteminde elde edilen kalibrasyon eğrisi

4.4.3 Geri Kazanım Çalışmaları

Bazı örnek matrislerinin karmaşık yapısı nedeniyle, bir analitin belirlenmesi için geliştirilmiş bir analitik yöntem kolaylıkla uygulanamayabilmektedir. Bu nedenle, özel bir örnek matrisinde saptanabilen analitin yüzdesini belirlemek için geri kazanım testinin gerçekleştirilmesi önemlidir. Önerilen yöntemin doğruluğunu ve uygulanabilirliğini değerlendirmek için atık su, nehir suyu ve musluk suyu için geri kazanım deneyleri yapılmıştır.

4.4.3.1 HPLC-UV Sisteminde Geri Kazanım Çalışmaları

İlk olarak örneklerde Cr (VI)'nın bulunmadığından emin olmak için bir blank çalışması gerçekleştirilerek HPLC-UV sisteminde optimum kompleks oluşum prosedürü uygulanan örnekler incelenmiş ve sonuçlar yöntemin gözlenebilme limitine göre su örneklerinde Cr (VI) bulunmadığını göstermiştir. HPLC-UV için 0.01, 0.02, 0.05, 0.10, 0.20 ve 0.50 mg L⁻¹ final derişimlerinde standartlar eklenen atık su, nehir suyu ve musluk suyu örnekleri için belirlenen geri kazanım yüzdeleri standart eşleme ve dış kalibrasyon yöntemleri ile hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 4.40 ve Tablo 4.41' de sunulmuştur. Sonuçlara göre, dış kalibrasyon yöntemi ile %10'dan daha düşük standart sapmalarla %81.5'ten %106.4'e geri kazanımlar elde edilmiştir. Dış kalibrasyon yönteminde, su örneklerinde hazırlanan kalibrasyon standartları ile Şekil 4.57' deki kalibrasyon grafiği oluşturulmuş ve hedef analit içerikleri belirlenmiştir. Elde edilen yüksek geri kazanım yüzdeleri, Cr (VI)'un, atık su, nehir suyu ve musluk suyunda mevcutsa, bu yöntemin tespit limiti dahilinde kolaylıkla tespit edilebileceğini göstermektedir.

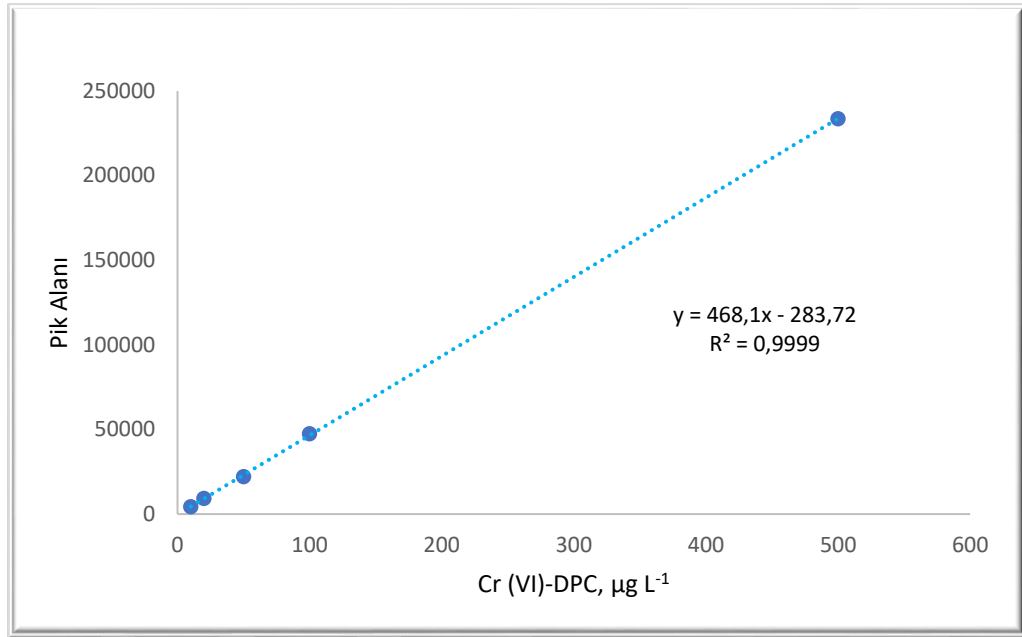
Ayrıca Şekil 4.58, Şekil 4.59 ve Şekil 4.60' ta verilen matris uyumlu kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Elde edilen kalibrasyon doğrularının oldukça iyi bir lineerlik gösterdiği görülmüş ve yöntemin matris eşleme yöntemine de oldukça uyumlu olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara ek olarak, Şekil 4.61' den de görüldüğü gibi örnek matrisleri için komplekse ait alıkonma süresinde matris etkisinden kaynaklı kayma olmadığı görülmüştür.

Tablo 4.40 Standart eşleme yöntemi ile su örneklerinde spike edilmiş farklı Cr (VI)-DPC kompleks derişimleri için HPLC sisteminde hesaplanan yüzde geri kazanım sonuçları

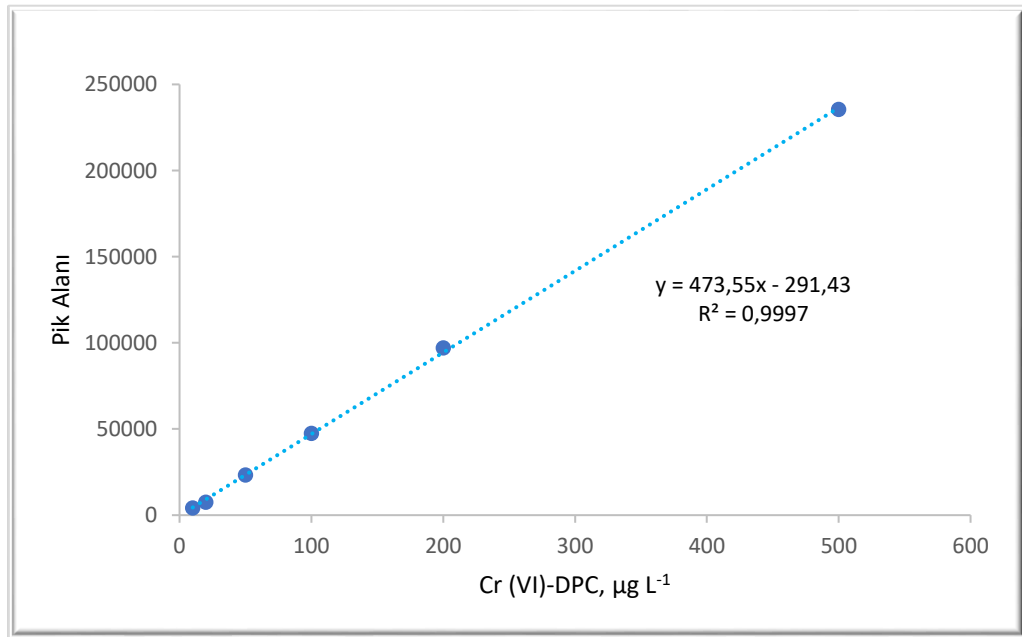
Su örnekleri	Spike Edilmiş Derişim, $\mu\text{g L}^{-1}$	% Geri Kazanım
Musluk Suyu	10	95.8 ± 0.9
	20	81.5 ± 5.2
	50	105.5 ± 0.6
	100	99.9 ± 1.0
	500	100.8 ± 0.6
Nehir suyu	10	102.9 ± 5.1
	20	99.7 ± 1.0
	50	106.4 ± 0.4
	100	101.5 ± 1.8
	500	99.9 ± 1.4
Atık su	10	101.9 ± 3.3
	20	95.8 ± 3.1
	50	100.3 ± 6.3
	100	99.4 ± 1.5
	500	102.8 ± 1.6

Tablo 4.41 Dış kalibrasyon yöntemi ile su örneklerinde spike edilmiş farklı Cr (VI)-DPC kompleks derişimleri için HPLC sisteminde hesaplanan yüzde geri kazanım sonuçları

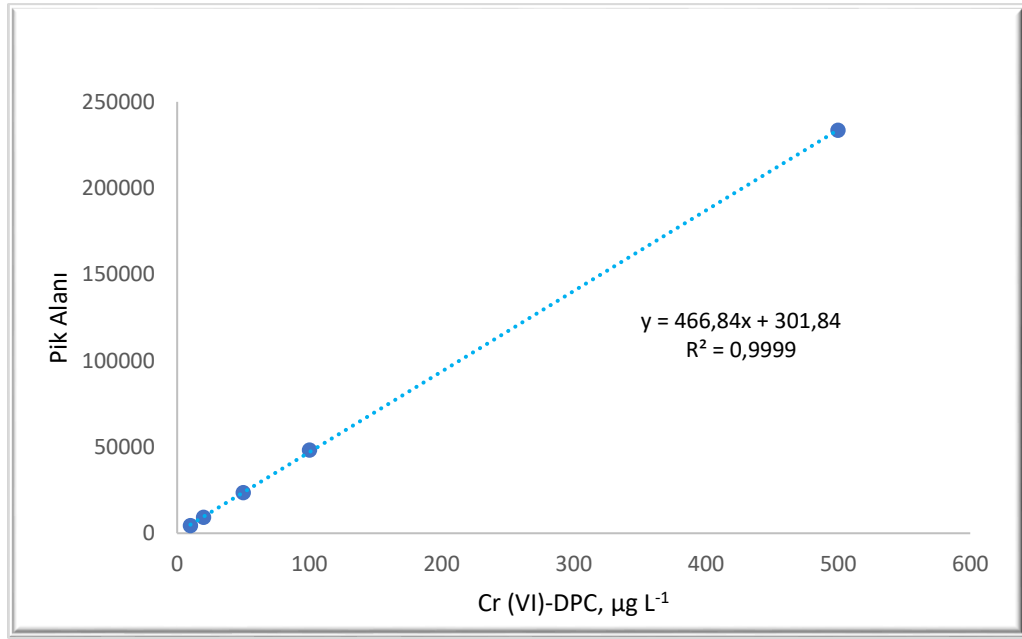
Su örnekleri	Spike Edilmiş Derişim, $\mu\text{g L}^{-1}$	% Geri Kazanım
Musluk suyu	20	83.7 ± 0.8
	50	100.9 ± 6.5
	100	102.0 ± 0.6
	200	104.0 ± 1.0
Nehir suyu	20	101.7 ± 1.0
	50	101.8 ± 0.3
	100	103.6 ± 1.8
	200	103.9 ± 0.8
Atık su	20	97.7 ± 3.2
	50	96.0 ± 6.0
	100	101.4 ± 1.5
	200	102.8 ± 2.0



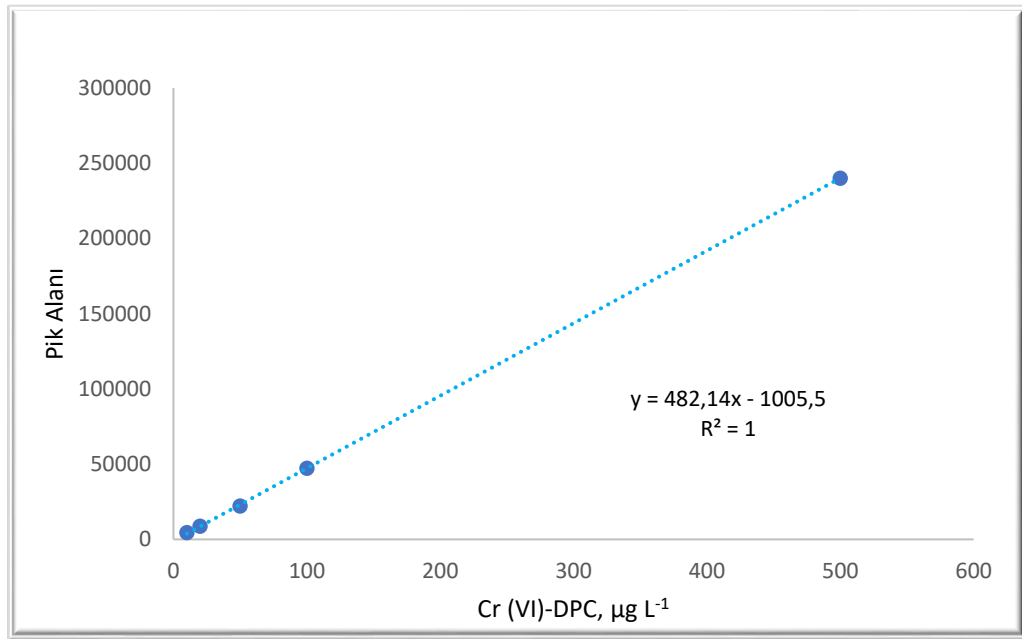
Şekil 4.55 HPLC-UV sistemi ile elde edilen standart kalibrasyon doğrusu



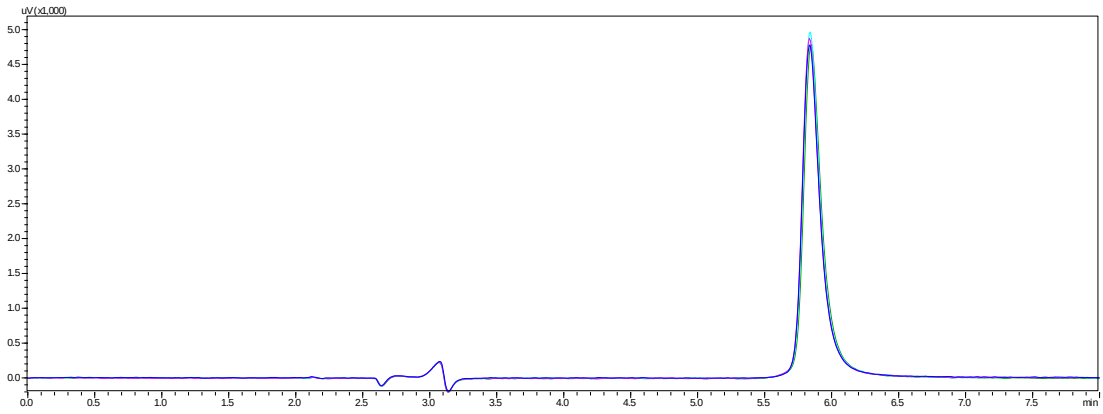
Şekil 4.56 Musluk suyunda HPLC-UV sistemi ile elde edilen kalibrasyon doğrusu



Şekil 4.57 Nehir suyunda HPLC-UV sistemi ile elde edilen kalibrasyon doğrusu



Şekil 4.58 Atık suda HPLC-UV sistemi ile elde edilen kalibrasyon doğrusu



Şekil 4.59 $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ derişiminde standart ve su örnekleri için elde edilen kromatogram

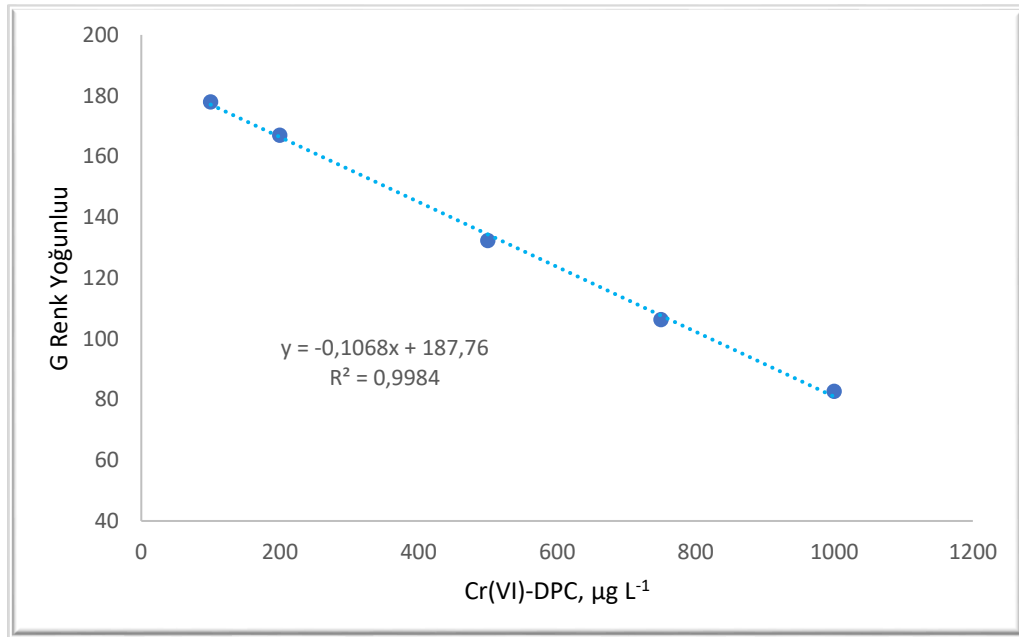
4.4.3.2 DIC Sisteminde Geri Kazanım Çalışmaları

Bilinen miktarlarda standart, seyreltilmiş su örneklerine 100, 200, 500, 750 ve 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ 'lik nihai derişimlerde eklenmiştir. Daha sonra standart eklenen su örnekleri, geliştirilen yöntemin optimum koşulları altında analiz edilmiş ve dış kalibrasyon yöntemi ile Tablo 4.42' deki geri kazanım yüzdeleri elde edilmiştir. Sonuçlar, bu yöntemle su örneklerinde Cr (VI)'nın yüksek doğrulukla belirlenebileceğini göstermektedir. Düşük bağıl standart sapma değerleri, yöntemin uygun kesinliğe sahip olduğunu doğrulamaktadır. Farklı derişimlerde tüm su örneklerinde oluşan renk farklarının eş derişimlerde aynı olduğu Şekil 4.66' da görülmektedir. Dış kalibrasyon yönteminde, geri kazanım değerlerinin hesaplanmasında kullanılan standart kalibrasyon grafiğı ise Şekil 4.62' de verilmektedir. HPLC-UV sisteminde olduğu gibi DIC yöntemi de matriks eşlemeye uyumlu sonuçlar vermiş kalibrasyon grafikleri Şekil 4.63, Şekil 4.64 ve Şekil 4.65' te verildiğı gibi oluşturulmuştur.

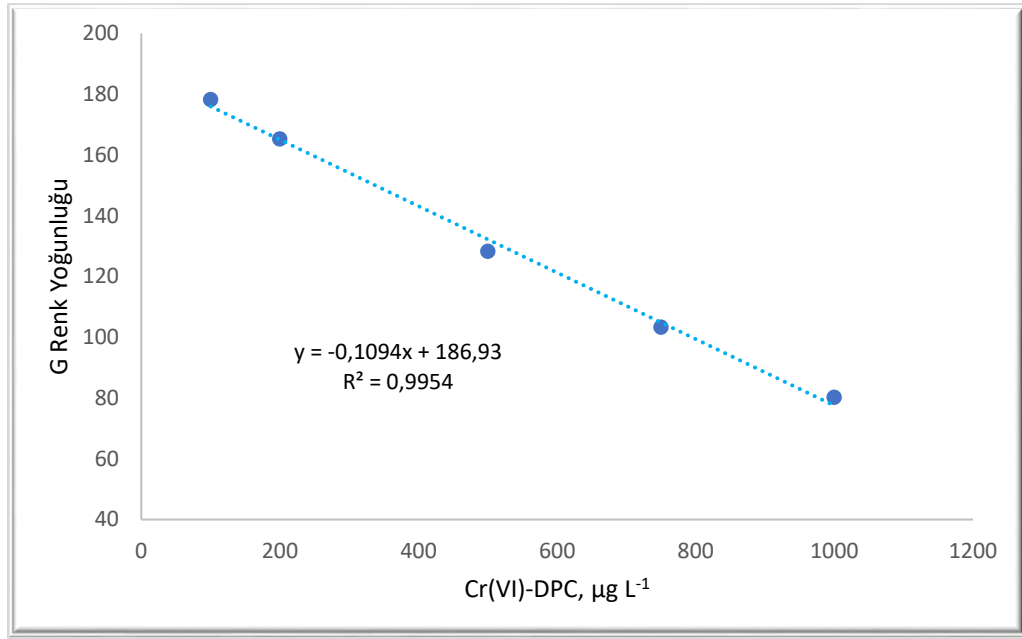
Bu çalışma, kaynakların sınırlı olduğu ortamlarda basit bir kolorimetrik yöntem ile kromun yüksek doğruluk ve duyarlılıkta kolayca tayin edilebileceğini ortaya koymaktadır.

Tablo 4.42 Dış kalibrasyon yöntemi ile su örneklerinde spike edilmiş farklı Cr (VI)-DPC kompleks derişimleri için hesaplanan yüzde geri kazanım sonuçları

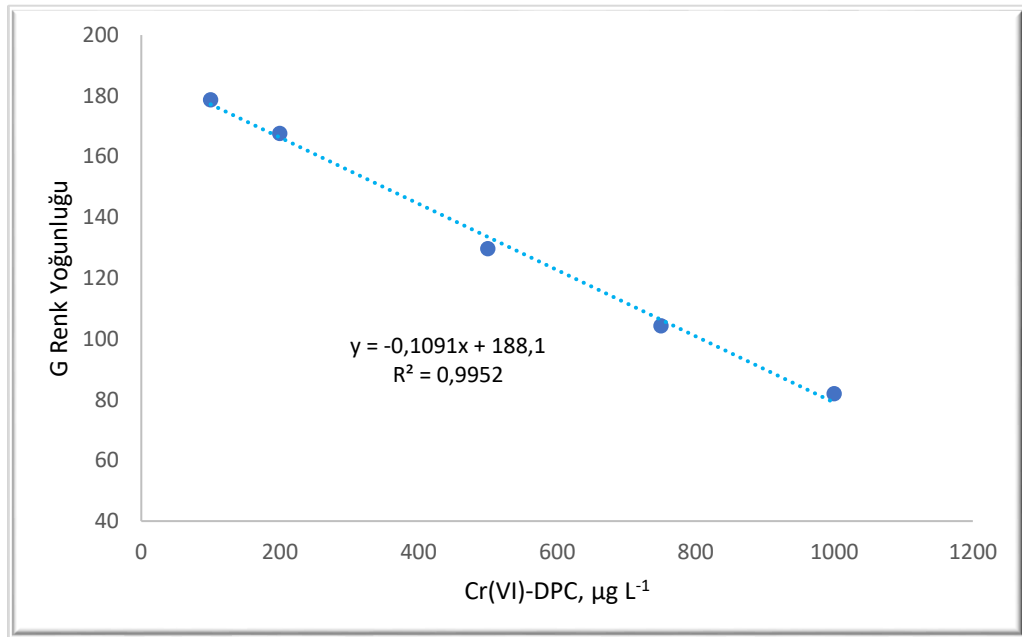
Su örnekleri	Spike Edilmiş Derişim, $\mu\text{g L}^{-1}$	% Geri Kazanım
Musluk suyu	200	104.7 ± 1.3
	500	111.1 ± 0.5
	750	105.3 ± 1.2
Nehir suyu	200	93.8 ± 0.3
	500	108.6 ± 0.5
	750	104.0 ± 1.2
Atık su	200	101.6 ± 1.1
	500	109.3 ± 0.5
	750	102.4 ± 1.5



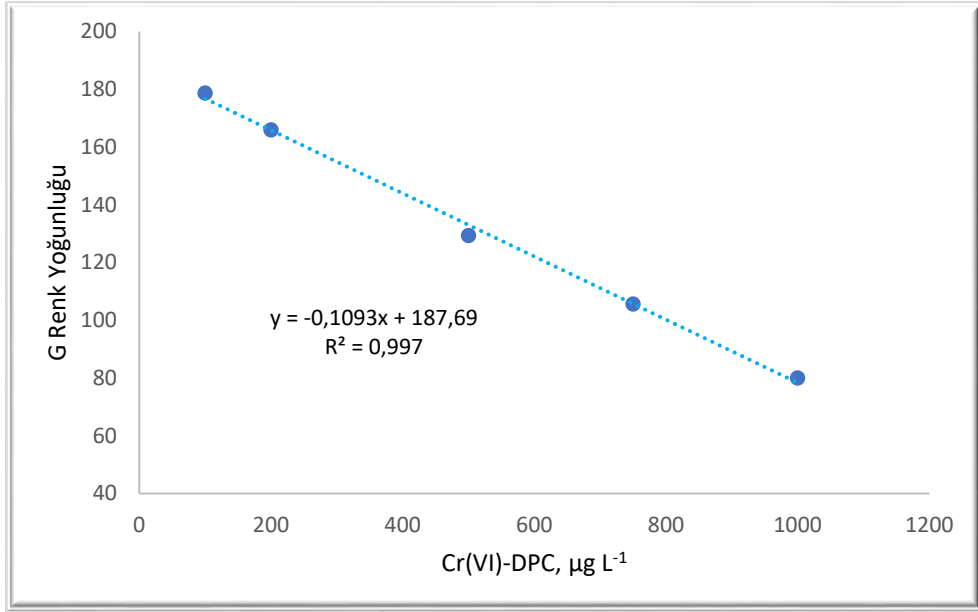
Şekil 4.60 DIC sistemi ile elde edilen standart kalibrasyon doğrusu



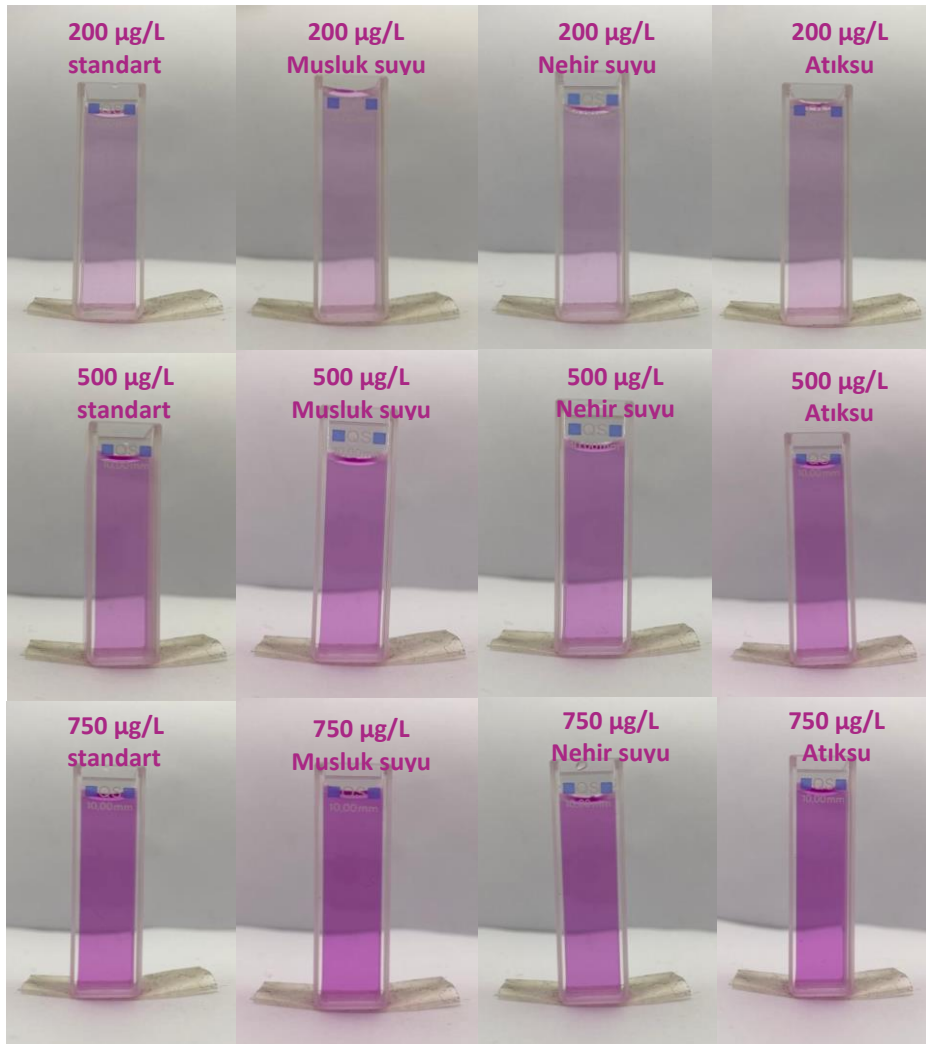
Şekil 4.61 Musluk suyunda DIC sistemi ile elde edilen kalibrasyon doğrusu



Şekil 4.62 Nehir suyunda DIC sistemi ile elde edilen kalibrasyon doğrusu



Şekil 4.63 Atık suda DIC sistemi ile elde edilen kalibrasyon doğrusu



Şekil 4.64 200, 500 ve 750 µg L⁻¹ derişimlerde tüm su örneklerinde oluşan renk gösterimi

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında, gıda, kozmetik ve çevresel örneklerden organik (parabenler) ve inorganik (Co, Cu, Cr (VI)) endokrin bozucu bileşiklerin ekstraksiyonu/ön deriştirilmesi ve ayrıca karmaşık matriks örneklerinde seçilmiş analitlerin eser düzeyde belirlenmelerini son derece hassas ancak pahalı cihazlara gerek kalmadan yapabilmek için farklı analitik stratejiler geliştirilmiştir.

Kobaltın eser düzeylerde belirlenmesi insan sağlığının korunması açısından önemlidir. Bu çalışmada, OS-ÇŞE-BSFME ile AAAS birleştirilerek ayva örneklerinde eser düzeyde kobalt tayini için doğru, ucuz ve hassas bir analitik yöntem geliştirilmiştir. Kobalt ile kompleks oluşturmak amacıyla laboratuvarında sentezlenmiş olan (Z)-3-bromo-5-((4-hidroksifenil)imino)fenol ligandı kullanılmıştır. Geliştirilen yöntem, bir dağıtıcı çözücü kullanmadan dispersiyon etkisi oluşturmak için özel bir yol sağlamıştır. Ekstraksiyon çözücüsünün verimli dağılımını sağlamak için yeni bir otomatik karıştırma sistemi tasarlanmıştır. Otomatik karıştırma sistemi, basit bir pompa ile sabit bir karıştırma hızı sağlamış olup manuel karıştırmadan kaynaklanan hataları ortadan kaldırarak daha düşük standart sapma değerleri elde edilmesini sağlamıştır. Tüm sistem parametreleri, sistematik olarak optimize edilerek $1.8 \mu\text{g L}^{-1}$ 'lik bir gözlenebilirlik limiti elde edilmiş ve geleneksel AAAS'a göre hassasiyette yaklaşık 33.7 kat artış sağlanmıştır. Kompleks oluşumundan absorbans ölçümüne kadar tüm sürecin kesinliği, en düşük derişimler için bağıl standart sapma değerleri ile doğrulanmıştır. Bu yöntemin doğruluğunu ve ayva örneklerine uygulanabilirliğini belirlemek için geri kazanım testleri kullanılmıştır. Elde edilen yüksek geri kazanım sonuçları (%91.0–98.7), kobaltın ayva matrisi gibi karmaşık matriksler üzerinde doğru bir şekilde miktar tayininin yüksek hassasiyetle yapılabileceğini göstermiştir.

Toksik özellikleri ve canlı organizmalar için tehlikeleri nedeniyle çevresel örneklerde eser miktarda bakırın belirlenmesi gereklidir. Tezin ikinci bölümünde sunulan MEB-ÇŞE-BSFME yöntemi, eser miktarda bakırın zenginleştirilmesi için

yeni, çevre dostu, hızlı, basit ve uygun maliyetli bir yaklaşımdır. Geliştirilen yöntem, dağıtıcı çözücüler gibi yardımcı çözücüler gerektirmemekle birlikte ön deriştirme prosedüründen sonra kolayca geri kazanılabilen çok düşük miktarda çözücü kullanmakta ve bu nedenle yeşil kimyaya katkıda bulunmaktadır. Tüm enstrümental ve ekstraksiyon parametreleri, ilgili analitin tespit limitlerini düşürmek amacıyla optimize edilmiştir. Geliştirilen sistemin geniş bir derişim aralığındaki gözlenebilme limitlerinin geleneksel AAAS ile karşılaştırılması temel alınarak yaklaşık 20 kat artış kaydedilmiştir. Yöntem, zeytin yaprağı ekstraktında bakır tayini için başarıyla uygulanmış ve elde edilen sonuçlar, geliştirilen yöntemin gıda matrislerinde bakır tayini için doğru ve kesin olduğunu doğrulamıştır.

Parabenlerin endokrin bozucu potansiyeli ve kanserle ilişkileri nedeniyle kozmetik ürünlerin analizleri özellikle insan sağlığı ve güvenliği açısından vazgeçilmez bir gerekliliktir. Bu çalışmada, HPLC ile eser miktarda beş parabenin (MeP, EtP, PrP, BuP, BeP) tayini için oldukça hassas bir DSSME yöntemi geliştirilmiştir. Enstrümental parametreler ve yöntemin tüm parametreleri, kısa bir alıkonma süresinde ayrılan keskin pikler elde etmek ve analitlerin ekstraksiyon verimliliğini artırmak için dikkatlice optimize edilmiştir. 50 mM amonyum format çözeltisi (pH 4.0) ve asetonitrilden (60:40, v/v) oluşan mobil faz, analitleri izokratik modda 1.2 mL dk⁻¹ akış hızında ayırtırmak için kullanılmıştır. Ayırtırılan analitler, 254 nm'lik dalga boyunda çalışan bir UV detektörü tarafından tespit edilmiştir. MeP, EtP, PrP, BuP, BeP için yöntemin analitik performansı belirlenmiş ve sırasıyla 0.78, 0.75, 0.34, 0.33 ve 0.75 µg kg⁻¹ gözlenebilme limit değerleri elde edilmiştir. Geliştirilen yöntemin optimum koşulları altında dört farklı ruj örneği analiz edilmiş ve matris uyumlu kalibrasyon standartları kullanılarak örneklerde ölçülen paraben miktarı %0.11 – %1.03 aralığında bulunmuştur.

Cr (VI) çok düşük konsantrasyonlarda bile insan sağlığı için zararlı ve kanserojendir. Bu sebeple eser seviyelerde tayin edilmesi oldukça önemlidir. Burada, DSSME yöntemi kullanılarak Cr (VI) ölçümü için bir çift görüntüleme yöntemi geliştirilmiştir. İlk görüntüleme HPLC-UV yöntemi kullanılarak, ikinci görüntüleme ise tüm akıllı cihazlar için erişilebilir bir uygulamaya dayalı, makul, hızlı ve taşınabilir bir algılama yöntemi olan DIC ile gerçekleştirilmiştir. İki sistem için analitik performans değerleri hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır. Dijital görüntü

tabanlı kolorimetrik sistemin kurulum ve işletme maliyeti, HPLC sisteminden oldukça düşük olmakla birlikte HPLC-UV sistemine ait gözlenebilme limiti daha düşük elde edilmiştir. DIC ise kolay erişilebilir imkanlarla yerinde analiz imkanı sunduğundan dolayı kolaylık açısından daha avantajlıdır. Ek olarak, her iki izleme sistemi için yüksek geri kazanım sonuçları, doğruluklarını ve gerçek örneklerle uygulanabilirliğini göstermiştir.

- [1] M. Muz, "Ozone Treatment of Excess Biological Sludge and Xenobiotics Removal," Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, 2012.
- [2] T. Damstra, S. Barlow, A. Bergman, R. Kavlock, and G. V. D. Kraak, "Global Assessment of the State of the Science of Endocrine Disruptors," WHO: IPCS-International Programme on Chemical Safety, 2002.
- [3] C. E. Purdom, P. A. Hardiman, V. V. J. Bye, N. C. Eno, C. R. Tyler, and J. P. Sumpter, "Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works," *Chemistry and Ecology*, vol. 8, pp. 275-285, 1994.
- [4] R. H. Waring and R. M. Harris, "Endocrine disruptors: a human risk?," *Mol Cell Endocrinol*, vol. 244, pp. 2-9, Dec 1 2005.
- [5] G. H. Degen and H. M. Bolt, "Endocrine disruptors: update on xenoestrogens," *International Archives of Occupational and Environmental Health*, vol. 73, pp. 433-441, 2000.
- [6] L. S. Birnbaum and S. E. Fenton, "Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors," *Environ Health Perspect*, vol. 111, pp. 389-94, Apr 2003.
- [7] N. Weisglas-Kuperus, H. J. Vreugdenhil, and P. G. Mulder, "Immunological effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch school children," *Toxicol Lett*, vol. 149, pp. 281-5, Apr 1 2004.
- [8] "Final Report on the Safety Assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, and Butylparaben," *Journal of the American College of Toxicology*, vol. 3, pp. 147-209, 2016.
- [9] C. Liao, L. Chen, and K. Kannan, "Occurrence of parabens in foodstuffs from China and its implications for human dietary exposure," *Environ Int*, vol. 57-58, pp. 68-74, Jul 2013.
- [10] C. Haman, X. Dauchy, C. Rosin, and J. F. Munoz, "Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: a review," *Water Res*, vol. 68, pp. 1-11, Jan 1 2015.
- [11] C. Piao, L. Chen, and Y. Wang, "A review of the extraction and chromatographic determination methods for the analysis of parabens," *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, vol. 969, pp. 139-48, Oct 15 2014.
- [12] P. Canosa, D. Perez-Palacios, A. Garrido-Lopez, M. T. Tena, I. Rodriguez, E. Rubi, *et al.*, "Pressurized liquid extraction with in-cell clean-up followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry for the selective determination of parabens and triclosan in indoor dust," *J Chromatogr A*, vol. 1161, pp. 105-12, Aug 17 2007.
- [13] A. Nieto, F. Borrull, R. M. Marce, and E. Pocurull, "Determination of personal care products in sewage sludge by pressurized liquid extraction and ultra

- high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *J Chromatogr A*, vol. 1216, pp. 5619-25, Jul 24 2009.
- [14] B. Albero, C. Sanchez-Brunete, E. Miguel, R. A. Perez, and J. L. Tadeo, "Determination of selected organic contaminants in soil by pressurized liquid extraction and gas chromatography tandem mass spectrometry with in situ derivatization," *J Chromatogr A*, vol. 1248, pp. 9-17, Jul 27 2012.
 - [15] V. Alampanos and V. Samanidou, "An overview of sample preparation approaches prior to liquid chromatography methods for the determination of parabens in biological matrices," *Microchemical Journal*, vol. 164, p. 105995, 2021.
 - [16] M. S. R. Dantas, A. S. Lourenço, A. C. Silva, K. M. Bichinho, and M. C. U. Araujo, "Simultaneous determination of methyl, ethyl, propyl, and butyl parabens in sweetener samples without any previous pretreatment using square wave voltammetry and multiway calibration," *Food Chemistry*, vol. 365, p. 130472, 2021/12/15/ 2021.
 - [17] E. Mani-López, E. Palou, and A. López-Malo, "Preservatives: Classifications and Analysis," *Encyclopedia of Food and Health*, 12/31 2016.
 - [18] R. Djatmika, C.-C. Hsieh, J.-M. Chen, and W.-H. Ding, "Determination of paraben preservatives in seafood using matrix solid-phase dispersion and on-line acetylation gas chromatography-mass spectrometry," *Journal of Chromatography B*, vol. 1036-1037, pp. 93-99, 2016/11/15/ 2016.
 - [19] Z. B. Khesina, S. D. Iartsev, A. I. Revelsky, and A. K. Buryak, "Microextraction by packed sorbent optimized by statistical design of experiment as an approach to increase the sensitivity and selectivity of HPLC-UV determination of parabens in cosmetics," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 195, p. 113843, 2021/02/20/ 2021.
 - [20] U. Alshana, N. Ertaş, and N. G. Göğür, "Determination of parabens in human milk and other food samples by capillary electrophoresis after dispersive liquid-liquid microextraction with back-extraction," *Food Chemistry*, vol. 181, pp. 1-8, 2015/08/15/ 2015.
 - [21] M. S. İbrahim, "Investigation of Some Biochemical Parameters of *Citrobacter Freundii* Exposed to Heavy Metal," Doktora Tezi, Firat Üniversitesi, 2021.
 - [22] H. J. Ahmed, "Determination of Heavy Metals in Water and Sediment Extract from Crude Oil in Northern of Iraq," Yüksek Lisans Tezi, Firat Üniversitesi, 2020.
 - [23] M. Jalilzadeh, "Designing of Ion-Imprinted Cryogels and Their Use for Heavy Metal Removal," Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, 2014.
 - [24] J. Pang, H. Chen, and X. Huang, "Magnetism-assisted in-tube solid phase microextraction for the on-line chromium speciation in environmental water and soil samples," *Microchemical Journal*, vol. 164, p. 105956, 2021.
 - [25] X. Wei, J.-J. Zhou, J.-H. Liu, M.-L. Chen, and J.-H. Wang, "Determination of Chromium Based on Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry," *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, vol. 49, pp. 432-439, 03/01 2021.

- [26] J. B. Vera, M. C. Bisinoti, C. D. B. Amaral, and M. H. Gonzalez, "ICP- quadrupole MS for accurate determination of chromium in environmental and food matrices," *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, vol. 15, p. 100421, 2021/05/01/ 2021.
- [27] A. Baral, R. Engelken, W. Stephens, J. Farris, and R. Hannigan, "Evaluation of aquatic toxicities of chromium and chromium-containing effluents in reference to chromium electroplating industries," *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 50, pp. 496-502, 2006.
- [28] A. R. Ali, "Kuzey Irak (Erbil) Bölgesinde İthal ve Yerli Kırmızı Etlerde Ağır Metal Miktarının ve Kalitenin Belirlenmesi," Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi, 2021.
- [29] M. Q. S. Saleh, "Detection of Heavy Metals in Parasitize Domestic Animals as Enviromental Bio Indicators," Yüksek Lisans Tezi, Siirt Üniversitesi, 2017.
- [30] O. Akpor, "Remediation of heavy metals in drinking water and wastewater treatment systems: Processes and applications," *International journal of physical sciences*, vol. 5, pp. 1807-1817, 11/04 2010.
- [31] F. Yarur, J.-R. Macairan, and R. Naccache, "Ratiometric detection of heavy metal ions using fluorescent carbon dots," *Environmental Science: Nano*, vol. 6, pp. 1121-1130, 2019.
- [32] A. M. Massadeh, A.-W. O. El-Rjoob, and S. A. Gharaibeh, "Analysis of Selected Heavy Metals in Tap Water by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry After Pre-Concentration Using Chelex-100 Ion Exchange Resin," *Water, Air, & Soil Pollution*, vol. 231, p. 243, 2020/05/12 2020.
- [33] S. Kılıç Altun, H. Dinç, N. Paksoy, F. Temamoğulları, and M. Savrunlu, "Analyses of Mineral Content and Heavy Metal of Honey Samples from South and East Region of Turkey by Using ICP-MS," *International Journal of Analytical Chemistry*, vol. 2017, pp. 1-6, 05/11 2017.
- [34] W.-S. Zhong, T. Ren, and L. Zhao, "Determination of Pb, Cd, Cr, Cu, and Ni in Chinese tea with high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry," *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 24, 07/01 2015.
- [35] M. Pourmohammad, M. Faraji, and S. Jafarinejad, "Extraction of chromium (VI) in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent and determination by UV-Vis spectrophotometry," *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, vol. 100, pp. 1146-1159, 2020.
- [36] M. Nozohour Yazdi and Y. Yamini, "Simultaneous speciation of inorganic chromium (III) and chromium (VI) by hollow - fiber - based liquid - phase microextraction coupled with HPLC-UV," *Journal of separation science*, vol. 40, pp. 919-926, 2017.
- [37] C. Jin Mei and S. Ainliah Alang Ahmad, "A review on the determination heavy metals ions using calixarene-based electrochemical sensors," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 14, p. 103303, 2021/09/01/ 2021.

- [38] L. Khoshmaram and M. Mohammadi, "Combination of a smart phone based low-cost portable colorimeter with air-assisted liquid-liquid microextraction for speciation and determination of chromium (III) and (VI)," *Microchemical Journal*, vol. 164, p. 105991, 2021.
- [39] H. Yan and H. Wang, "Recent development and applications of dispersive liquid-liquid microextraction," *J Chromatogr A*, vol. 1295, pp. 1-15, Jun 21 2013.
- [40] A. Elik, D. Bingöl, and N. Altunay, "Ionic hydrophobic deep eutectic solvents in developing air-assisted liquid-phase microextraction based on experimental design: Application to flame atomic absorption spectrometry determination of cobalt in liquid and solid samples," *Food Chemistry*, vol. 350, p. 129237, 2021/07/15/ 2021.
- [41] N. Reyes-Garcés, E. Gionfriddo, G. A. Gómez-Ríos, M. N. Alam, E. Boyacı, B. Bojko, *et al.*, "Advances in Solid Phase Microextraction and Perspective on Future Directions," *Analytical Chemistry*, vol. 90, pp. 302-360, 2018/01/02 2018.
- [42] S. Dowlatshah, M. Saraji, R. Fernández-Torres, and M. Ramos-Payán, "A microfluidic liquid phase microextraction method for drugs and parabens monitoring in human urine," *Microchemical Journal*, vol. 169, p. 106577, 2021/10/01/ 2021.
- [43] A. Habibiyan, M. Ezoddin, N. Lamei, K. Abdi, M. Amini, and M. Ghazi-khansari, "Ultrasonic assisted switchable solvent based on liquid phase microextraction combined with micro sample injection flame atomic absorption spectrometry for determination of some heavy metals in water, urine and tea infusion samples," *Journal of Molecular Liquids*, vol. 242, pp. 492-496, 2017/09/01/ 2017.
- [44] M. N. Yazdi, Y. Yamini, and H. Asiabi, "Fabrication of polypyrrole-silver nanocomposite for hollow fiber solid phase microextraction followed by HPLC/UV analysis for determination of parabens in water and beverages samples," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 74, pp. 18-26, 2018/12/01/ 2018.
- [45] W. A. Khan, M. B. Arain, and M. Soylak, "Nanomaterials-based solid phase extraction and solid phase microextraction for heavy metals food toxicity," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 145, p. 111704, 2020/11/01/ 2020.
- [46] M. L. Firdaus, E. Saputra, S. M. Ginting, S. Wyantuti, D. R. Eddy, L. Rahmidar, *et al.*, "Smartphone-based digital image colorimetry for non-enzymatic detection of glucose using gold nanoparticles," *Sensing and Bio-Sensing Research*, vol. 35, p. 100472, 2022/02/01/ 2022.
- [47] F. Ö. Sefiloğlu, "A Multiresidue Analytical Method for the Determination of Organic Contaminants in Agricultural Soil," Yüksek Lisans Tezi, Boğaziçi Üniversitesi, 2018.
- [48] G. Ankley, R. Johnson, G. Toth, L. Folmar, N. Detenbeck, and S. Bradbury, "Development of a Research Strategy for Assessing the Ecological Risk of Endocrine Disruptors," *Rev Toxicol*, vol. 1, 11/30 1996.

- [49] R. Kavlock, G. Daston, C. DeRosa, P. Fenner-Crisp, L. Gray Jr, S. Kaattari, *et al.*, "Research Needs for the Risk Assessment of Health and Environmental Effects of Endocrine Disruptors: A Report of the U.S. EPA-Sponsored Workshop," *Environmental health perspectives*, vol. 104 Suppl 4, pp. 715-40, 09/01 1996.
- [50] L. Wollenberger, B. Halling-Sørensen, and K. Kusk, "Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*," *Chemosphere*, vol. 40, pp. 723-30, 05/01 2000.
- [51] A. Lister and G. Kraak, "Endocrine Disruption: Why Is It So Complicated?," *Water Quality Research Journal of Canada*, vol. 36, pp. 175-188, 05/01 2001.
- [52] R. Naidu, V. A. Arias Espana, Y. Liu, and J. Jit, "Emerging contaminants in the environment: Risk-based analysis for better management," *Chemosphere*, vol. 154, pp. 350-357, 2016/07/01/ 2016.
- [53] İ. Aydın, "Preparation of the Spme Fibers by Electropolymerization and Its Application in Voltammetric and Chromatographic Determination of Endocrine Disruptor Pesticides," Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, 2016.
- [54] G. N. Odabaşı, "Investigating the Effects of Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Chemicals on the Gene Expression Profiles of *Saccharomyces Cerevisiae*," Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, 2021.
- [55] O. T. Komesli, "Removal of Endocrine Disrupter Compounds and Trace Organics in Membrane Bioreactors," Doktora Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, 2012.
- [56] R. T. Zoeller, T. R. Brown, L. L. Doan, A. C. Gore, N. E. Skakkebaek, A. M. Soto, *et al.*, "Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society," *Endocrinology*, vol. 153, pp. 4097-4110, 2012.
- [57] G. W. Aherne, J. English, and V. Marks, "The role of immunoassay in the analysis of microcontaminants in water samples," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 9, pp. 79-83, 1985/02/01/ 1985.
- [58] G. W. Aherne and R. D. Briggs, "The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 41, 1989.
- [59] H.-S. Chang, K.-H. Choo, B. Lee, and S.-J. Choi, "The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 172, pp. 1-12, 2009/12/15/ 2009.
- [60] C. Hignite and D. L. Azarnoff, "Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent," *Life Sci*, vol. 20, pp. 337-41, Jan 15 1977.
- [61] M. Hecker, H. Hollert, R. Cooper, A. Vinggaard, Y. Akahori, M. Murphy, *et al.*, "The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay: Phase 3. Final inter-laboratory validation study," *Environmental science and pollution research international*, vol. 18, pp. 503-15, 10/01 2010.

- [62] S. Snyder, P. Westerhoff, Y. Yoon, and D. Sedlak, "Pharmaceuticals, Personal Care Products, and Endocrine Disruptors in Water: Implications for the Water Industry," *Environmental Engineering Science*, vol. 20, 09/01 2003.
- [63] G. G. Hacıosmanoğlu, "Adsorption of Endocrine Disrupting Compounds by Magnetic Nanoparticles," Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi, 2019.
- [64] B. Demeneix and R. Slama, *Endocrine Disruptors: from Scientific Evidence to Human Health Protection*: Policy Department for Citizen's Rights and Constitutional Affairs, 2019.
- [65] M. Porta, E. Puigdomenech-Puig, F. Ballester, J. Selva, N. Ribas-Fitó, S. Llop, *et al.*, "Monitoring concentrations of persistent organic pollutants in the general population: The international experience," *Environment international*, vol. 34, pp. 546-61, 06/01 2008.
- [66] F. Peinado, L. Iribarne-Durán, O. Ocón, N. Olea, and F. Artacho-Cordón, "Endocrine Disrupting Chemicals in Cosmetics and Personal Care Products and Risk of Endometriosis," ed, 2020.
- [67] F. Caliman and M. Gavrilescu, "Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment – A Review," *CLEAN – Soil, Air, Water*, vol. 37, pp. 277-303, 04/01 2009.
- [68] J. A. Rogers, L. Metz, and V. W. Yong, "Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms," *Molecular Immunology*, vol. 53, pp. 421-430, 2013/04/01/ 2013.
- [69] B. Roig, A. Cadere, S. Bressieux, S. Biau, S. Faure, and P. de Santa Barbara, "Environmental concentration of nonylphenol alters the development of urogenital and visceral organs in avian model," *Environment international*, vol. 62C, pp. 78-85, 10/29 2013.
- [70] N. Krebs, "Endocrine Disrupting Compounds: Problems and Solutions," *DU Quark*, vol. 3, pp. 82-86, 2019.
- [71] Z. Kresinova, L. Linhartová, A. Filipová, M. Ezechiáš, P. Mašín, and T. Cajthaml, "Biodegradation of endocrine disruptors in urban wastewater using *Pleurotus ostreatus* bioreactor," *New Biotechnology*, vol. 43, 05/01 2017.
- [72] Z. Li, X. Xiang, M. Li, Y. Ma, J. Wang, and X. Liu, "Occurrence and risk assessment of pharmaceuticals and personal care products and endocrine disrupting chemicals in reclaimed water and receiving groundwater in China," *Ecotoxicol Environ Saf*, vol. 119, pp. 74-80, Sep 2015.
- [73] M. Metzler and E. Pfeiffer, "Chemistry of Natural and Anthropogenic Endocrine Active Compounds," ed, 2005, pp. 546-546.
- [74] I. Gültekin, "Destruction of Endocrine Disrupting Compounds in Water by Advanced Oxidation Processes: A Study with Ultrasound, Ozone and Various Combinations," Doktora Tezi, Boğaziçi Üniversitesi, 2008.
- [75] M. H. G. Andersen, G. Zuri, L. E. Knudsen, and L. Mathiesen, "Placental transport of parabens studied using an ex-vivo human perfusion model," *Placenta*, vol. 115, pp. 121-128, 2021/11/01/ 2021.

- [76] N. Valkova, F. Lépine, L. Valeanu, M. Dupont, L. Labrie, J. G. Bisaillon, *et al.*, "Hydrolysis of 4-hydroxybenzoic acid esters (parabens) and their aerobic transformation into phenol by the resistant *Enterobacter cloacae* strain EM," *Applied and environmental microbiology*, vol. 67, pp. 2404-2409, 2001.
- [77] K. Nowak, W. Ratajczak-Wrona, M. Górská, and E. Jabłońska, "Parabens and their effects on the endocrine system," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 474, pp. 238-251, 2018/10/15/ 2018.
- [78] D. Błędzka, J. Gromadzińska, and W. Wąsowicz, "Parabens. From environmental studies to human health," *Environ Int*, vol. 67, pp. 27-42, Jun 2014.
- [79] M. Terasaki, M. Makino, and N. Tatarazako, "Acute toxicity of parabens and their chlorinated by-products with *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* bioassays," *Journal of applied toxicology : JAT*, vol. 29, pp. 242-7, 04/01 2009.
- [80] M. Demirkurt, "Development of Novel Solid Phase Extraction (SPE) Sorbents and Solid Phase Microextraction (SPME) Fiber Coatings for Determination of Endocrine Disrupting Compounds (EDCs)," Doktora Tezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, 2017.
- [81] M. G. Soni, I. G. Carabin, and G. A. Burdock, "Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens)," *Food Chem Toxicol*, vol. 43, pp. 985-1015, Jul 2005.
- [82] F. Wei, M. Mortimer, H. Cheng, N. Sang, and L.-H. Guo, "Parabens as chemicals of emerging concern in the environment and humans: A review," *Science of The Total Environment*, vol. 778, p. 146150, 2021/07/15/ 2021.
- [83] R. Karthikraj, S. Borkar, S. Lee, and K. Kannan, "Parabens and Their Metabolites in Pet Food and Urine from New York State, United States," *Environ Sci Technol*, vol. 52, pp. 3727-3737, Mar 20 2018.
- [84] P. D. Darbre and P. W. Harvey, "Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: a review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status," *J Appl Toxicol*, vol. 34, pp. 925-38, Sep 2014.
- [85] F. Vela-Soria, I. Rodríguez, O. Ballesteros, A. Zafra Gomez, L. Ballesteros, R. Cela, *et al.*, "Simplified matrix solid phase dispersion procedure for the determination of parabens and benzophenone-ultraviolet filters in human placental tissue samples," *Journal of Chromatography A*, vol. 1371, pp. 39-47, 10/31 2014.
- [86] H. Arfaeinia, B. Ramavandi, S. Yousefzadeh, S. Dobaradaran, M. Ziaei, N. Rashidi, *et al.*, "Urinary level of un-metabolized parabens in women working in beauty salons," *Environmental Research*, vol. 200, p. 111771, 2021/09/01/ 2021.
- [87] Y. Yu, W. Li, S. Lu, S. Wu, F. Wang, L. A. Tse, *et al.*, "Urinary parabens in adults from South China: Implications for human exposure and health risks," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 182, p. 109419, 10/01 2019.

- [88] Y. Wei, X. Liu, Z. Wang, Y. Chi, T. Yue, Y. Dai, *et al.*, "Adsorption and catalytic degradation of preservative parabens by graphene-family nanomaterials," *Sci Total Environ*, vol. 806, p. 150520, Feb 1 2022.
- [89] N. B. Bolujoko, E. I. Unuabonah, M. O. Alfred, A. Ogunlaja, O. O. Ogunlaja, M. O. Omorogie, *et al.*, "Toxicity and removal of parabens from water: A critical review," *Science of The Total Environment*, vol. 792, p. 148092, 2021/10/20/ 2021.
- [90] J. A. Ocaña-González, M. Villar-Navarro, M. Ramos-Payán, R. Fernández-Torres, and M. A. Bello-López, "New developments in the extraction and determination of parabens in cosmetics and environmental samples. A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 858, pp. 1-15, 2015/02/09/ 2015.
- [91] S. Crovetto, E. Roldán, A. Dib, M. Espigares, and E. Espigares, "Bacterial Toxicity Testing and Antibacterial Activity of Parabens," *Toxicological & Environmental Chemistry*, vol. 99, pp. 01-17, 03/15 2017.
- [92] E. R. Neves, S. Schäfer, A. Phillips, J. Canejo, and M. F. Macedo, "Antifungal effect of different methyl and propyl paraben mixtures on the treatment of paper biodeterioration," *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 63, pp. 267-272, 2009/04/01/ 2009.
- [93] K. Yazar, S. Johnsson, M.-L. Lind, A. Boman, and C. Lidén, "Preservatives and fragrances in selected consumer-available cosmetics and detergents," *Contact dermatitis*, vol. 64, pp. 265-72, 12/01 2010.
- [94] Y. Guo, "A Survey of Phthalates and Parabens in Personal Care Products from the United States and Its Implications for Human Exposure," *Environmental science & technology*, vol. 47, 11/21 2013.
- [95] C. Juliano and G. Magrini, "Cosmetic Ingredients as Emerging Pollutants of Environmental and Health Concern. A Mini-Review," *Cosmetics*, vol. 4, p. 11, 04/05 2017.
- [96] Z. Petric and I. Žuntar, "The controversies of parabens – an overview nowadays," *Acta Pharmaceutica*, vol. 70, 04/01 2020.
- [97] J. Boberg, C. Taxvig, S. Christiansen, and U. Hass, "Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites," *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, vol. 30, pp. 301-12, 04/01 2010.
- [98] P. Darbre and P. Harvey, "Paraben esters: Review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks," *Journal of applied toxicology : JAT*, vol. 28, pp. 561-78, 07/01 2008.
- [99] P. Darbre, A. Aljarrah, W. Miller, N. Coldham, M. Sauer, and G. Pope, "Concentrations of Parabens in human breast tumours," *Journal of applied toxicology : JAT*, vol. 24, pp. 5-13, 01/01 2004.
- [100] L. Barr, G. Metaxas, C. Harbach, L. A. Savoy, and P. D. Darbre, "Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum," *Journal of applied toxicology : JAT*, vol. 32, pp. 219-32, 03/01 2012.

- [101] S. Khanna, P. Dash, and P. Darbre, "Exposure to parabens at the concentration of maximal proliferative response increases migratory and invasive activity of human breast cancer cells in vitro," *Journal of Applied Toxicology*, vol. 34, 09/01 2014.
- [102] P. D. Majhi, A. Sharma, A. L. Roberts, E. Daniele, A. R. Majewski, L. M. Chuong, *et al.*, "Effects of Benzophenone-3 and Propylparaben on Estrogen Receptor-Dependent R-Loops and DNA Damage in Breast Epithelial Cells and Mice," *Environ Health Perspect*, vol. 128, p. 17002, Jan 2020.
- [103] S. Oishi, "Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats," *Toxicology and industrial health*, vol. 17, pp. 31-9, 03/01 2001.
- [104] B. Kasprzyk-Hordern, R. M. Dinsdale, and A. J. Guwy, "The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK," *Water Research*, vol. 42, pp. 3498-3518, 2008/07/01/ 2008.
- [105] A.-L. María del Carmen, R. Lucena, S. Cárdenas, and M. Valcárcel, "Determination of parabens in waters by magnetically confined hydrophobic nanoparticle microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry," *Microchemical Journal*, vol. 110, pp. 643-648, 09/01 2013.
- [106] M. Terasaki and M. Makino, "Determination of chlorinated by-products of parabens in swimming pool water," *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, vol. 88, pp. 911-922, 2008/11/15 2008.
- [107] X. Peng, Y. Yu, C. Tang, J. Tan, Q. Huang, and Z. Wang, "Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China," *Science of The Total Environment*, vol. 397, pp. 158-166, 2008/07/01/ 2008.
- [108] B. Ramaswamy, G. Shanmugam, G. Velu, B. Rengarajan, and J. Larsson, "GC-MS analysis and ecotoxicological risk assessment of triclosan, carbamazepine and parabens in Indian rivers," *Journal of hazardous materials*, vol. 186, pp. 1586-93, 02/01 2011.
- [109] B. Ramaswamy, K. Joon-Woo, T. Isobe, K.-H. Chang, A. Amano, T. Miller, *et al.*, "Determination of preservative and antimicrobial compounds in fish from Manila Bay, Philippines using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, and assessment of human dietary exposure," *Journal of hazardous materials*, vol. 192, pp. 1739-45, 07/08 2011.
- [110] F. A. Andersen, "Final amended report on the safety assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in cosmetic products," *Int J Toxicol*, vol. 27 Suppl 4, pp. 1-82, 2008.
- [111] K. Nowak, E. Jabłońska, and W. Ratajczak-Wrona, "Controversy around parabens: Alternative strategies for preservative use in cosmetics and personal care products," *Environ Res*, vol. 198, p. 110488, Jul 2021.
- [112] *Kozmetik Yönetmeliği Ek V.* Available: <https://www.mevzuat.gov.tr/anasayfa/MevzuatFihristDetayIframe?MevzuatTur=7&MevzuatNo=8157&MevzuatTertip=5>. 02 Ocak 2022

- [113] C. Liao, S. Lee, H.-B. Moon, N. Yamashita, and K. Kannan, "Parabens in sediment and sewage sludge from the United States, Japan, and Korea: spatial distribution and temporal trends," *Environmental science & technology*, vol. 47, pp. 10895-10902, 2013.
- [114] S. Keleş, "Investigation of Contaminant Charges Into İzmir Inner Bay by Surface Waters," Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, 2010.
- [115] R. Shrivastav, "Atmospheric heavy metal pollution," *Resonance*, vol. 6, pp. 62-68, 04/01 2001.
- [116] D. E. Guven and G. Akinci, "Heavy metals partitioning in the sediments of Izmir Inner Bay," *Journal of Environmental Sciences*, vol. 20, pp. 413-418, 2008/01/01/ 2008.
- [117] A. F. Tumanyan, A. P. Seliverstova, and N. A. Zaitseva, "Correction to: Effect of Heavy Metals on Ecosystems," *Chemistry and Technology of Fuels and Oils*, vol. 56, pp. 729-729, 2020/09/01 2020.
- [118] M. Sall, A. Diaw, D. Gningue-Sall, S. Efremova Aaron, and J.-J. Aaron, "Toxic heavy metals: impact on the environment and human health, and treatment with conducting organic polymers, a review," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 27, 08/01 2020.
- [119] R. Singh, N. Gautam, A. Mishra, and R. Gupta, "Heavy metals and living systems: An overview," *Indian journal of pharmacology*, vol. 43, p. 246, 2011.
- [120] J.-F. Blais, Z. Djedidi, R. B. Cheikh, R. D. Tyagi, and G. Mercier, "Metals precipitation from effluents," *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, vol. 12, pp. 135-149, 2008.
- [121] O. Zitka, M. Ryvolova, J. Hubalek, T. Eckschlager, V. Adam, and R. Kizek, "From amino acids to proteins as targets for metal-based drugs," *Current drug metabolism*, vol. 13, pp. 306-320, 2012.
- [122] U. Förstner and G. T. Wittmann, *Metal pollution in the aquatic environment*: Springer Science & Business Media, 2012.
- [123] J. M. Wood, "Biological cycles for toxic elements in the environment," *Science*, vol. 183, pp. 1049-52, Mar 15 1974.
- [124] J. R. Garbarino, H. C. Hayes, D. A. Roth, R. C. Antweiler, T. I. Brinton, and H. E. Taylor, "Heavy metals in the Mississippi River," *US Geological Survey Circular*, vol. 1133, 1995.
- [125] T. Buğdaycı, "Synthesis of Urethane Functional Polymeric Resin and Investigation of Its Heavy Metal Sorption Properties," Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, 2021.
- [126] J. R. González-Montaña, F. Escalera-Valente, A. J. Alonso, J. M. Lomillos, R. Robles, and M. E. Alonso, "Relationship between Vitamin B12 and Cobalt Metabolism in Domestic Ruminant: An Update," *Animals (Basel)*, vol. 10, Oct 12 2020.
- [127] Z. Tekin, T. Unutkan, F. Erulaş, E. G. Bakırdere, and S. Bakırdere, "A green, accurate and sensitive analytical method based on vortex assisted deep eutectic solvent-liquid phase microextraction for the determination of cobalt

- by slotted quartz tube flame atomic absorption spectrometry," *Food Chemistry*, vol. 310, p. 125825, 2020/04/25/ 2020.
- [128] N. Khoddami and F. Shemirani, "A new magnetic ion-imprinted polymer as a highly selective sorbent for determination of cobalt in biological and environmental samples," *Talanta*, vol. 146, pp. 244-52, 2016.
 - [129] Z. Tekin, S. Erarpat, A. Şahin, D. Selali Chormey, and S. Bakırdere, "Determination of Vitamin B12 and cobalt in egg yolk using vortex assisted switchable solvent based liquid phase microextraction prior to slotted quartz tube flame atomic absorption spectrometry," *Food Chemistry*, vol. 286, pp. 500-505, 2019/07/15/ 2019.
 - [130] E. Yazıcı, M. Firat, D. Selali Chormey, E. G. Bakırdere, and S. Bakırdere, "An accurate determination method for cobalt in sage tea and cobalamin: Slotted quartz tube-flame atomic absorption spectrometry after preconcentration with switchable liquid-liquid microextraction using a Schiff base," *Food chemistry*, vol. 302, p. 125336, 2019.
 - [131] N. Sethi, P. Mullin, J. Torgovnick, and G. Capasso, "Nitrous oxide "Whippit" abuse presenting with cobalamin responsive psychosis," *Journal of medical toxicology : official journal of the American College of Medical Toxicology*, vol. 2, pp. 71-4, 07/01 2006.
 - [132] L. Leyssens, B. Vinck, C. Van Der Straeten, F. Wuyts, and L. Maes, "Cobalt toxicity in humans—A review of the potential sources and systemic health effects," *Toxicology*, vol. 387, pp. 43-56, 2017/07/15/ 2017.
 - [133] D. G. Barceloux and D. Barceloux, "Cobalt," *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, vol. 37, pp. 201-216, 1999/01/01 1999.
 - [134] A.-I. Stoica, M. Peltea, G.-E. Baiulescu, and M. Ionica, "Determination of cobalt in pharmaceutical products," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 36, pp. 653-6, 12/01 2004.
 - [135] C. Briani, C. Torre, V. Citton, R. Manara, S. Pompanin, G. Binotto, *et al.*, "Cobalamin Deficiency: Clinical Picture and Radiological Findings," *Nutrients*, vol. 5, pp. 4521-39, 11/01 2013.
 - [136] D. A. Kopsell, "Handbook of Plant Nutrition," *Plant Nutrition*, p. 293, 2016.
 - [137] S. B. Kharade, R. K. Chougale, U. B. Barache, K. R. Sanadi, K. C. Rathod, S. H. Gaikwad, *et al.*, "Design and optimization of sensitive analytical spectrophotometric method for micro determination of copper (II) from e-waste by using of novel chromogenic extractant," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 267, p. 120502, 2022.
 - [138] G. R. W. Denton, H. R. Wood, L. P. Concepcion, H. G. Siegrist, V. S. Eflin, D. K. Narcis, *et al.*, "Analysis of In-Place Contaminants in Marine Sediments from Four Harbor Locations on Guam: A Pilot Study," *Water & Energy Research Institute of the Western Pacific University of Guam* 81, 1997.
 - [139] S. Prasad and T. i. Halafihi, "Development and Validation of Catalytic Kinetic Spectrophotometric Method for Determination of Copper(II)," *Microchimica Acta*, vol. 142, pp. 237-244, 08/01 2003.

- [140] J. Y. Noh, G. J. Park, Y. J. Na, H. Y. Jo, S. A. Lee, and C. Kim, "A colorimetric "naked-eye" Cu(ii) chemosensor and pH indicator in 100% aqueous solution," *Dalton Transactions*, vol. 43, pp. 5652-5656, 2014.
- [141] K. Jayabalan, P. Naik, and N. Shetty, "A rapid extractive spectrophotometric determination of copper(II) in environmental samples, alloys, complexes and pharmaceutical samples using 4-N,N(dimethyl)amino]benzaldehyde thiosemicarbazone," *Environmental monitoring and assessment*, vol. 176, pp. 419-26, 05/01 2011.
- [142] M. Hassan, Z. Erbas, U. Alshana, and M. Soylak, "Ligandless reversed-phase switchable-hydrophilicity solvent liquid-liquid microextraction combined with flame-atomic absorption spectrometry for the determination of copper in oil samples," *Microchemical Journal*, vol. 156, p. 104868, 2020/07/01/ 2020.
- [143] M. R. Callahan, E. A. Kaltenbacher, and R. H. Byrne, "In-situ measurements of Cu in an estuarine environment using a portable spectrophotometric analysis system," *Environ Sci Technol*, vol. 38, pp. 587-93, Jan 15 2004.
- [144] M. Mohanty and H. Patra, "Effect of ionic and chelate assisted hexavalent chromium on mung bean seedlings (*Vigna radiata* L. wilczek. var k-851) during seedling growth," 07/30 2021.
- [145] M. Rodríguez, L. Barsanti, V. Passarelli, V. Evangelista, V. Conforti, and P. Gualtieri, "Effects of chromium on photosynthetic and photoreceptive apparatus of the alga *Chlamydomonas reinhardtii*," *Environmental research*, vol. 105, pp. 234-9, 11/01 2007.
- [146] M. Jaishankar, T. Tseten, N. Anbalagan, B. Mathew, and K. Beeregowda, "Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals," *Interdisciplinary toxicology*, vol. 7, pp. 60-72, 06/01 2014.
- [147] P. B. Tchounwou, C. G. Yedjou, A. K. Patlolla, and D. J. Sutton, "Heavy metal toxicity and the environment," *Experientia supplementum (2012)*, vol. 101, pp. 133-164, 2012.
- [148] V. Kaur and A. Malik, "Speciation of chromium metal ions by RP-HPLC," *Journal of chromatographic science*, vol. 47, pp. 238-42, 04/01 2009.
- [149] A. Wolińska, Z. Stepniewska, and R. Włosek, "The influence of old leather tannery district on chromium contamination of soils, water and plants," *Natural Science*, vol. 3, pp. 595-603, 01/01 2013.
- [150] V. Velma, S. S. Vutukuru, and P. Tchounwou, "Ecotoxicology of Hexavalent Chromium in Freshwater Fish: A Critical Review," *Reviews on environmental health*, vol. 24, pp. 129-45, 04/01 2009.
- [151] T. Norseth, "The carcinogenicity of chromium," *Environ Health Perspect*, vol. 40, pp. 121-30, Aug 1981.
- [152] A. G. Abdul Ghani, "Effect of chromium toxicity on growth, chlorophyll and some mineral nutrients of *brassica juncea* L," *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, H. Botany*, vol. 2, pp. 9-15, 2011.
- [153] A. Zayed and N. Terry, "Chromium in the Environment: Factors Affecting Biological Remediation," *Plant and Soil*, vol. 249, pp. 139-156, 02/01 2003.

- [154] C. Cervantes, C.-G. Jesús, S. Devars, J. Gutiérrez-Corona, H. Loza-Tavera, J. Torres, *et al.*, "Interactions of chromium with microorganisms and plants," *FEMS microbiology reviews*, vol. 25, pp. 335-47, 06/01 2001.
- [155] A. Bielicka, I. Bojanowska, and A. Wiśniewski, "Two Faces of Chromium - Pollutant and Bioelement," *Polish Journal of Environmental Studies*, vol. 14, pp. 5-10, 2005.
- [156] N. K. Arora and R. Chauhan, "Heavy metal toxicity and sustainable interventions for their decontamination," vol. 4, ed: Springer, 2021, pp. 1-3.
- [157] H. Abadin, M. Fay, L. Ingerman, B. Tencza, D. Yu, and S. B. Wilbur, "Toxicological profile for chromium," 2012.
- [158] M. Costa, "Toxicity and carcinogenicity of Cr(VI) in animal models and humans," *Crit Rev Toxicol*, vol. 27, pp. 431-42, Sep 1997.
- [159] S. R. Shelnutt, P. Goad, and D. V. Belsito, "Dermatological toxicity of hexavalent chromium," *Crit Rev Toxicol*, vol. 37, pp. 375-87, Jun 2007.
- [160] F. Laborda, M. Górriz, E. Bolea, and J. Castillo, "Mobilization and speciation of chromium in compost: A methodological approach," *The Science of the total environment*, vol. 373, pp. 383-90, 03/01 2007.
- [161] Z. Chen, M. Mallavarapu, and R. Naidu, "Speciation of chromium in waste water using ion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry," *Talanta*, vol. 72, pp. 394-400, 05/01 2007.
- [162] A. Anthemidis and S. Koussoroplis, "Determination of Chromium(VI) and Lead in Water Samples by On-line Sorption Preconcentration Coupled with Flame Atomic Absorption Spectrometry Using a PCTFE-beads Packed Column," *Talanta*, vol. 71, pp. 1728-33, 04/01 2007.
- [163] F. Priego-Capote and M. Castro, "Speciation of chromium by in-capillary derivatization and electrophoretically mediated microanalysis," *Journal of chromatography. A*, vol. 1113, pp. 244-50, 05/01 2006.
- [164] T. Sumida, T. Ikenoue, K. Hamada, A. Sabarudin, M. Oshima, and S. Motomizu, "On-line preconcentration using dual mini-columns for the speciation of chromium(III) and chromium(VI) and its application to water samples as studied by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry," *Talanta*, vol. 68, pp. 388-93, 01/01 2006.
- [165] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*: Cengage learning, 2017.
- [166] D. Barcelo and B. Petrovic, *Comprehensive Analytical Chemistry*: Boston, 2007.
- [167] J. W. Robinson, E. M. S. Frame, G. M. Frame, M. Eileen, and F. Skelly, "Undergraduate instrumental analysis," 2005.
- [168] D. T. Gjerde, L. Hoang, and D. Hornby, *RNA purification and analysis: sample preparation, extraction, chromatography*: John Wiley & Sons, 2009.
- [169] O. Coskun, "Separation techniques: chromatography," *Northern clinics of Istanbul*, vol. 3, p. 156, 2016.

- [170] M. Chavan, M. Sutar, and S. Deshmukh, "Significance of Various Chromatographic Techniques in Drug Discovery and Development," *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, vol. 3, 2013.
- [171] E. Ebere, B. Isiuku, and V. Wirnkor, "Applications of Column, Paper, Thin Layer and Ion Exchange Chromatography in Purifying Samples: Mini Review," 11/12 2019.
- [172] B. Balabanova and T. Stafilov, *Contaminant Levels and Ecological Effects: Understanding and Predicting with Chemometric Methods*: Springer Nature, 2021.
- [173] B. Beşergil, *Enstrümantal Analiz*: Gazi Kitabevi, 2015.
- [174] J. T. McCue, "Theory and use of hydrophobic interaction chromatography in protein purification applications," *Methods Enzymol*, vol. 463, pp. 405-14, 2009.
- [175] D. A. Cowan and R. M. Daniel, "Rapid purification of two thermophilic proteinases using dye-ligand chromatography," *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 32, pp. 1-6, 1996/04/01/ 1996.
- [176] Ö. B. Acikara, "Ion exchange chromatography and its applications," *Column chromatography*, vol. 10, p. 55744, 2013.
- [177] R. R. Kondeti, K. S. Mulpuri, and B. Meruga, "Advancements in column chromatography: A review," *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, pp. 1375-1383, 2014.
- [178] S. Arora, V. Saxena, and B. V. Ayyar, "Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification," *Methods*, vol. 116, pp. 84-94, 2017/03/01/ 2017.
- [179] S. Kumar, K. Jyotirmayee, and M. Sarangi, "Thin layer chromatography: a tool of biotechnology for isolation of bioactive compounds from medicinal plants," *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, vol. 18, pp. 126-132, 2013.
- [180] B. V. Rao, G. N. Sowjanya, A. Ajitha, and V. U. M. Rao, "Review on stability indicating hplc method development," *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, vol. 4, pp. 405-423, 2015.
- [181] S. D. Erkakan, "Preparation of Reactive-Polyacrylate Capillary Monoliths and Their Use As Stationary Media in Hydrophilic Interaction Chromatography," 2015.
- [182] C. G. Horvath, B. Preiss, and S. R. Lipsky, "Fast liquid chromatography. Investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers," *Analytical chemistry*, vol. 39, pp. 1422-1428, 1967.
- [183] S. Fekete, J. Fekete, I. Molnár, and K. Ganzler, "Rapid high performance liquid chromatography method development with high prediction accuracy, using 5cm long narrow bore columns packed with sub-2microm particles and Design Space computer modeling," *J Chromatogr A*, vol. 1216, pp. 7816-23, Nov 6 2009.

- [184] R. J. Hamilton and P. A. Sewell, "Introduction to high performance liquid chromatography," in *Introduction to high performance liquid chromatography*, ed: Springer, 1982, pp. 1-12.
- [185] H. Rajan, "Development and validation of HPLC method-A Review," *International Journal of current research in pharmacy*, vol. 1, pp. 55-68, 2015.
- [186] V. Kumar, R. Bharadwaj, G. Gupta, and S. Kumar, "An Overview on HPLC Method Development, Optimization and Validation process for drug analysis," vol. 2, pp. 30-40, 01/01 2015.
- [187] K. Sonia and D. M. Nappinnai, "Development and Validation of Hplc and Uv-Visible Spectrophotometric Method for the Pharmaceutical Dosage Form and Biological Fluid –Review," *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, vol. 3, pp. 382-391, 2016.
- [188] T. Unutkan, S. Bakirdere, and S. Keyf, "Development of an Analytical Method for the Determination of Amoxicillin in Commercial Drugs and Wastewater Samples, and Assessing its Stability in Simulated Gastric Digestion," *J Chromatogr Sci*, vol. 56, pp. 36-40, Jan 1 2018.
- [189] R. S. H. Mansour, Hamdan, II, M. S. H. Salem, E. A. Khalil, and A. A. Sallam, "HPLC method development/validation and skin diffusion study of caffeine, methyl paraben and butyl paraben as skin-diffusing model drugs," *PLoS One*, vol. 16, p. e0247879, 2021.
- [190] B. A. Alghamdi, E. S. Alshumrani, M. S. B. Saeed, G. M. Rawas, N. T. Alharthi, M. N. Baeshen, *et al.*, "Analysis of sugar composition and pesticides using HPLC and GC-MS techniques in honey samples collected from Saudi Arabian markets," *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 27, pp. 3720-3726, 2020/12/01/ 2020.
- [191] P. Schrynmackers-Pitance and S. Schoos-Barbette, "Determination of aromatic and neutral aminoacids by HPLC in blood specimens collected on filter paper," *Clinica Chimica Acta*, vol. 166, pp. 91-97, 1987/06/30/ 1987.
- [192] S. Zhang, C. Li, G. Zhou, G. Che, J. You, and Y. Suo, "Determination of the carbohydrates from *Notopterygium forbesii* Boiss by HPLC with fluorescence detection," *Carbohydrate Polymers*, vol. 97, pp. 794-799, 2013/09/12/ 2013.
- [193] M. R. Infantes-Garcia, S. H. E. Verkempinck, J. M. Guevara-Zambrano, M. E. Hendrickx, and T. Grauwet, "Development and validation of a rapid method to quantify neutral lipids by NP-HPLC-charged aerosol detector," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 102, p. 104022, 2021/09/01/ 2021.
- [194] B. Todd, J. Zhao, and G. Fleet, "HPLC measurement of guanine for the determination of nucleic acids (RNA) in yeasts," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 22, pp. 1-10, 1995/04/01/ 1995.
- [195] F. Ostertag, C. M. Schmidt, S. Berensmeier, and J. Hinrichs, "Development and validation of an RP-HPLC DAD method for the simultaneous quantification of minor and major whey proteins," *Food Chemistry*, vol. 342, p. 128176, 2021/04/16/ 2021.
- [196] F. Merlo, A. Speltini, F. Maraschi, M. Sturini, and A. Profumo, "HPLC-MS/MS multiclass determination of steroid hormones in environmental waters after

- preconcentration on the carbonaceous sorbent HA-C@silica," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 13, pp. 4673-4680, 2020/03/01/ 2020.
- [197] J. Lozano-Sánchez, I. Borrás-Linares, A. Sass-Kiss, and A. Segura-Carretero, "Chapter 13 - Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)," in *Modern Techniques for Food Authentication (Second Edition)*, D.-W. Sun, Ed., ed: Academic Press, 2018, pp. 459-526.
- [198] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, and J. W. Dolan, *Introduction to modern liquid chromatography*: John Wiley & Sons, 2011.
- [199] H. D. Çelik, "Amoksisilin'in İnsan Plazmasında HPLC ile Miktar Tayini Yöntemi ve Validasyonu," Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, 2007.
- [200] T. P. Kupiec, "Quality-control analytical methods: high-performance liquid chromatography," *Int J Pharm Compd*, vol. 8, pp. 223-7, May-Jun 2004.
- [201] S. C. Moldoveanu and V. David, *Selection of the HPLC method in chemical analysis*: Elsevier, 2016.
- [202] K. Shoykhet, K. Broeckhoven, and M. W. Dong, "Modern HPLC pumps: perspectives, principles, and practices," *LC GC North America*, vol. 37, p. 374, 2019.
- [203] Z. Civelek, "Antifungal Etkili Naftifin Hidroklorür'ün Spektrofotometrik ve HPLC Yöntemleriyle Kantitatif Analizi," Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, 2021.
- [204] Q. A. Acton, *Issues in Analysis, Measurement, Monitoring, Imaging, and Remote Sensing Technology: 2011 Edition*: ScholarlyEditions, 2012.
- [205] M. Swartz, "HPLC detectors: a brief review," *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 33, pp. 1130-1150, 2010.
- [206] A. Escarpa, M. C. González, and M. Á. López, *Agricultural and food electroanalysis*: John Wiley & Sons, 2015.
- [207] J. Anderson, A. Berthod, V. Pino, and A. M. Stalcup, *Analytical separation science, 5 volume set* vol. 5: John Wiley & Sons, 2016.
- [208] A. Sunil, G. Anju, and V. Rajat, "HPLC detectors, their types and use: a review," *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, vol. 6, pp. 143-146, 2018.
- [209] A. H. Beckett and J. B. Stenlake, *Practical Pharmaceutical Chemistry: Part II Fourth Edition* vol. 2: A&C Black, 1988.
- [210] S. Ahuja, "High-pressure liquid chromatography," *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. 47, pp. 485-559, 2006.
- [211] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, and J. L. Glajch, *Practical HPLC method development*: John Wiley & Sons, 2012.
- [212] Y. Vidushi and B. Meenakshi, "A review on HPLC method development and validation," *Res J Life Sci, Bioinform, Pharm Chem Sci*, vol. 2, p. 178, 2017.
- [213] M. H. Penner, "Basic principles of spectroscopy," in *Food analysis*, ed: Springer, 2017, pp. 79-88.
- [214] S. S. Nielsen, *Food analysis*: Springer, 1998.

- [215] S. L. C. Ferreira, M. A. Bezerra, A. S. Santos, W. N. L. dos Santos, C. G. Novaes, O. M. C. de Oliveira, *et al.*, "Atomic absorption spectrometry – A multi element technique," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 100, pp. 1-6, 2018/03/01/ 2018.
- [216] E. M. Kroukamp, T. Wondimu, and P. B. C. Forbes, "Metal and metalloid speciation in plants: Overview, instrumentation, approaches and commonly assessed elements," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 77, pp. 87-99, 2016/03/01/ 2016.
- [217] V. Balaram, "Recent advances in the determination of elemental impurities in pharmaceuticals – Status, challenges and moving frontiers," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 80, pp. 83-95, 2016/06/01/ 2016.
- [218] N. Mketo, P. N. Nomngongo, and J. C. Ngila, "An overview on analytical methods for quantitative determination of multi-element in coal samples," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 85, pp. 107-116, 2016/12/01/ 2016.
- [219] K. Leopold, A. Philippe, K. Wörle, and G. E. Schaumann, "Analytical strategies to the determination of metal-containing nanoparticles in environmental waters," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 84, pp. 107-120, 2016.
- [220] D. J. Butcher, "recent advances in optical analytical atomic spectrometry," *Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 48, pp. 261-328, 2013.
- [221] N. Njie, "Atom trapping vapor generation atomic absorption spectrometry for inorganic arsenic speciation analysis," Doktora Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, 2014.
- [222] N. E. Şimşek, "Determination Of Boron In Water Samples By Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry," Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, 2012.
- [223] J. S. Trindade, V. A. Lemos, U. M. F. Mata Cerqueira, C. G. Novaes, S. A. Araujo, and M. A. Bezerra, "Multivariate optimization of a dispersive liquid-liquid microextraction method for determination of copper and manganese in coconut water by FAAS," *Food Chemistry*, vol. 365, p. 130473, 2021/12/15/ 2021.
- [224] I. Machado and F. Tissot, "Dispersive liquid-liquid microextraction as a preconcentration alternative to increase ETAAS sensitivity in the analysis of molybdenum in bovine meat and pasture samples," *Talanta*, vol. 212, p. 120783, 2020/05/15/ 2020.
- [225] O. Çaylak, Ş. G. Elçi, A. Höl, A. Akdoğan, Ü. Divrikli, and L. Elçi, "Use of an aminated Amberlite XAD-4 column coupled to flow injection cold vapour generation atomic absorption spectrometry for mercury speciation in water and fish tissue samples," *Food Chemistry*, vol. 274, pp. 487-493, 2019/02/15/ 2019.
- [226] H. Matusiewicz, "Atom trapping and in situ preconcentration techniques for flame atomic absorption spectrometry," *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 52, pp. 1711-1736, 1997.
- [227] A. F. Erulaş, M. Şaylan, S. Topal, B. T. Zaman, E. G. Bakırdere, and S. Bakırdere, "A new microextraction method for trace nickel determination in green tea

- samples: Solventless dispersion based dispersive liquid-liquid microextraction combined with slotted quartz tube-flame atomic absorption spectrophotometry," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 94, p. 103623, 2020.
- [228] T. Borahan, "Development Of Novel Liquid And Solid Phase Microextraction Methods For The Determination Of Iron, Cobalt And Cadmium, And Their Applications To Real Samples," Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, 2021.
- [229] C. Davidson, "Methods for the Determination of Heavy Metals and Metalloids in Soils," ed, 2013, pp. 97-140.
- [230] S. J. Hill and A. S. Fisher, "Atomic Absorption, Methods and Instrumentation," ed, 2016, pp. 37-43.
- [231] L. Ebdon, A. S. Fisher, and S. Hill, *An introduction to analytical atomic spectrometry*: John Wiley & Sons, 1998.
- [232] J. W. Robinson, E. M. S. Frame, and G. M. Frame II, *Instrumental Analytical Chemistry: An Introduction*: CRC Press, 2021.
- [233] O. Y. Ataman, "Vapor generation and atom traps: atomic absorption spectrometry at the ng/L level," *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 63, pp. 825-834, 2008.
- [234] J. Dědina, "Atomization of volatile compounds for atomic absorption and atomic fluorescence spectrometry: On the way towards the ideal atomizer," *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 62, pp. 846-872, 2007/09/01/ 2007.
- [235] A. K. Gilmutdinov, "Atomic absorption, theory," *Spectrosc. Spectrom*, vol. 2, pp. 54-62, 1999.
- [236] M. A. Farrukh, *Atomic absorption spectroscopy*: BoD–Books on Demand, 2012.
- [237] Ç. Büyükpınar, "Farklı Elementlerin Duyarlılıklarının Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrofotometre Cihazında Arttırılmasına Yönelik Analitik Yöntemlerin Geliştirilmesi," Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, 2017.
- [238] Ö. Kenanoğlu, "Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometrisi Kullanılarak Su Örneklerinde Eser Miktarındaki Hg(II) İyonlarının Tayini İçin Katılaştırılmış Yüzen Organik Damla ile Ultrason-Destekli Emülsifikasyon Mikroekstraksiyonunun Uygulanması," Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, 2014.
- [239] B. Fernández García, L. Lobo Revilla, and M. R. Pereiro García, "Atomic absorpton spectrometry| fundamentals, instrumentation and capabilities," *Encyclopedia of analytical science*, 2019.
- [240] R. D. Beaty and J. D. Kerber, "Concepts, instrumentation and techniques in atomic absorption spectrophotometry," 1993.
- [241] D. C. Christodouleas, A. Nemiroski, A. A. Kumar, and G. M. Whitesides, "Broadly available imaging devices enable high-quality low-cost photometry," *Analytical chemistry*, vol. 87, pp. 9170-9178, 2015.

- [242] A. W. Martinez, S. T. Phillips, E. Carrilho, S. W. Thomas III, H. Sindi, and G. M. Whitesides, "Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis," *Analytical chemistry*, vol. 80, pp. 3699-3707, 2008.
- [243] P. Preechaburana, S. Macken, A. Suska, and D. Filippini, "Mobile phone analysis of NT-proBNP using high dynamic range (HDR) imaging," *Procedia Engineering*, vol. 5, pp. 584-587, 12/31 2010.
- [244] D. N. Breslauer, R. N. Maamari, N. A. Switz, W. A. Lam, and D. A. Fletcher, "Mobile phone based clinical microscopy for global health applications," *PloS one*, vol. 4, p. e6320, 2009.
- [245] D. Tseng, O. Mudanyali, C. Oztoprak, S. O. Isikman, I. Sencan, O. Yaglidere, *et al.*, "Lensfree microscopy on a cellphone," *Lab on a Chip*, vol. 10, pp. 1787-1792, 2010.
- [246] S. Sumriddetchkajorn, A. Somboonkaew, and S. Chanhorm, "Mobile device-based digital microscopy for education, healthcare, and agriculture," in *2012 9th International Conference on Electrical Engineering/Electronics, Computer, Telecommunications and Information Technology*, 2012, pp. 1-4.
- [247] D. Lee, W. P. Chou, S. H. Yeh, P. J. Chen, and P. H. Chen, "DNA detection using commercial mobile phones," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, pp. 4349-4354, 2011.
- [248] H. Zhu, S. Mavandadi, A. F. Coskun, O. Yaglidere, and A. Ozcan, "Optofluidic fluorescent imaging cytometry on a cell phone," *Analytical chemistry*, vol. 83, pp. 6641-6647, 2011.
- [249] A. García, M. Erenas, E. D. Marinetto, C. A. Abad, I. de Orbe-Paya, A. J. Palma, *et al.*, "Mobile phone platform as portable chemical analyzer," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 156, pp. 350-359, 2011.
- [250] Z. Iqbal and R. Bjorklund, "Colorimetric analysis of water and sand samples performed on a mobile phone," *Talanta*, vol. 84, pp. 1118-23, 05/30 2011.
- [251] L. Shen, J. Hagen, and I. Papautsky, "Point-of-care colorimetric detection with a smartphone," *Lab on a chip*, vol. 12, pp. 4240-3, 09/21 2012.
- [252] S. Sumriddetchkajorn, K. Chaitavon, and Y. Intaravanne, "Mobile device-based self-referencing colorimeter for monitoring chlorine concentration in water," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 182, pp. 592-597, 2013.
- [253] Y. Jung, J. Kim, O. Awofeso, H. Kim, F. Regnier, and E. Bae, "Smartphone-based colorimetric analysis for detection of saliva alcohol concentration," *Applied optics*, vol. 54, pp. 9183-9189, 2015.
- [254] L. F. Capitán-Vallvey, N. Lopez-Ruiz, A. Martinez-Olmos, M. M. Erenas, and A. J. Palma, "Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 899, pp. 23-56, 2015.
- [255] E. K. Grasse, M. H. Torcasio, and A. W. Smith, "Teaching UV-Vis Spectroscopy with a 3D-Printable Smartphone Spectrophotometer," *Journal of Chemical Education*, vol. 93, pp. 146-151, 2016/01/12 2016.

- [256] V. Kılıç, G. Alankus, N. Horzum, A. Y. Mutlu, A. Bayram, and M. E. Solmaz, "Single-image-referenced colorimetric water quality detection using a smartphone," *ACS omega*, vol. 3, pp. 5531-5536, 2018.
- [257] F. Li, Y. Bao, D. Wang, W. Wang, and L. Niu, "Smartphones for sensing," *Science bulletin*, vol. 61, pp. 190-201, 2016.
- [258] M. L. Firdaus, W. Alwi, F. Trinoveldi, I. Rahayu, L. Rahmidar, and K. Warsito, "Determination of chromium and iron using digital image-based colorimetry," *Procedia Environmental Sciences*, vol. 20, pp. 298-304, 2014.
- [259] R. Urapen and P. Masawat, "Novel method for the determination of tetracycline antibiotics in bovine milk based on digital-image-based colorimetry," *International Dairy Journal*, vol. 44, pp. 1-5, 2015.
- [260] N. Bang-iam, Y. Udnan, and P. Masawat, "Design and fabrication of artificial neural network-digital image-based colorimeter for protein assay in natural rubber latex and medical latex gloves," *Microchemical Journal*, vol. 106, pp. 270-275, 2013.
- [261] M. Kompany-Zareh, M. Mansourian, and F. Ravaee, "Simple method for colorimetric spot-test quantitative analysis of Fe (III) using a computer controlled hand-scanner," *Analytica Chimica Acta*, vol. 471, pp. 97-104, 2002.
- [262] K. Leon, D. Mery, F. Pedreschi, and J. Leon, "Color measurement in $L^* a^* b^*$ units from RGB digital images," *Food research international*, vol. 39, pp. 1084-1091, 2006.
- [263] H. Dan-Qun, G.-P. ZHANG, H. Chang-Jun, D. Jia-Le, Y.-C. ZHANG, L. Zhen, *et al.*, "A colorimetric sensor array for identification of natural amino acids," *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, vol. 38, pp. 1115-1120, 2010.
- [264] M. B. Lima, S. I. E. Andrade, I. S. Barreto, L. F. Almeida, and M. C. U. Araújo, "A digital image-based micro-flow-batch analyzer," *Microchemical journal*, vol. 106, pp. 238-243, 2013.
- [265] A. R. Tôrres, W. da Silva Lyra, S. I. E. de Andrade, R. A. N. Andrade, E. C. da Silva, M. C. U. Araújo, *et al.*, "A digital image-based method for determining of total acidity in red wines using acid-base titration without indicator," *Talanta*, vol. 84, pp. 601-606, 2011.
- [266] N. López-Ruiz, A. Martínez-Olmos, I. P. de Vargas-Sansalvador, M. Fernández-Ramos, M. Carvajal, L. Capitan-Vallvey, *et al.*, "Determination of O₂ using colour sensing from image processing with mobile devices," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 171, pp. 938-945, 2012.
- [267] M. J. Lima, C. F. Nascimento, and F. R. Rocha, "Feasible photometric measurements in liquid-liquid extraction by exploiting smartphone-based digital images," *Analytical Methods*, vol. 9, pp. 2220-2225, 2017.
- [268] H. Levkowitz and G. T. Herman, "GLHS: A generalized lightness, hue, and saturation color model," *CVGIP: Graphical Models and Image Processing*, vol. 55, pp. 271-285, 1993.
- [269] A. Roda, E. Michelini, L. Cevenini, D. Calabria, M. M. Calabretta, and P. Simoni, "Integrating biochemiluminescence detection on smartphones: mobile

- chemistry platform for point-of-need analysis," *Analytical chemistry*, vol. 86, pp. 7299-7304, 2014.
- [270] Y. Intaravanne and S. Sumriddetchkajorn, "Android-based rice leaf color analyzer for estimating the needed amount of nitrogen fertilizer," *Computers and Electronics in Agriculture*, vol. 116, pp. 228-233, 2015.
- [271] A. K. Yetisen, J. Martinez-Hurtado, A. Garcia-Melendrez, F. da Cruz Vasconcellos, and C. R. Lowe, "A smartphone algorithm with inter-phone repeatability for the analysis of colorimetric tests," *Sensors and actuators B: chemical*, vol. 196, pp. 156-160, 2014.
- [272] Z. Niu, W. Zhang, C. Yu, J. Zhang, and Y. Wen, "Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 102, pp. 123-146, 2018.
- [273] O. Filippou, D. Bitas, and V. Samanidou, "Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis," *Journal of Chromatography B*, vol. 1043, pp. 44-62, 2017.
- [274] M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R. M. Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, and S. Berijani, "Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction," *Journal of Chromatography A*, vol. 1116, pp. 1-9, 2006.
- [275] R. Costa, "Newly introduced sample preparation techniques: towards miniaturization," *Critical reviews in analytical chemistry*, vol. 44, pp. 299-310, 2014.
- [276] S. Mitra, *Sample preparation techniques in analytical chemistry*: John Wiley & Sons, 2004.
- [277] H. Kataoka, H. L. Lord, and J. Pawliszyn, "Applications of solid-phase microextraction in food analysis," *Journal of chromatography A*, vol. 880, pp. 35-62, 2000.
- [278] S. Risticevic, D. Vuckovic, H. L. Lord, and J. Pawliszyn, "2.21 - Solid-Phase Microextraction," in *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, J. Pawliszyn, Ed., ed Oxford: Academic Press, 2012, pp. 419-460.
- [279] M. Zeeb, M. R. Ganjali, P. Norouzi, and M. R. Kalaei, "Separation and preconcentration system based on microextraction with ionic liquid for determination of copper in water and food samples by stopped-flow injection spectrofluorimetry," *Food and chemical toxicology*, vol. 49, pp. 1086-1091, 2011.
- [280] D. S. Chormey and S. Bakirdere, "Principles and recent advancements in microextraction techniques," in *Comprehensive Analytical Chemistry*. vol. 81, ed: Elsevier, 2018, pp. 257-294.
- [281] D. S. Chormey, B. T. Zaman, N. A. Kasa, and S. Bakirdere, "Liquid phase microextraction strategies and their application in the determination of endocrine disruptive compounds in food samples," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 128, p. 115917, 2020.

- [282] F. Pena-Pereira, I. Lavilla, and C. Bendicho, "Miniaturized preconcentration methods based on liquid–liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review," *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 64, pp. 1-15, 2009.
- [283] G. Shen and H. K. Lee, "Hollow fiber-protected liquid-phase microextraction of triazine herbicides," *Analytical Chemistry*, vol. 74, pp. 648-654, 2002.
- [284] N. Lorenzo-Parodi, W. Kaziur, N. Stojanović, M. A. Jochmann, and T. C. Schmidt, "Solventless microextraction techniques for water analysis," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 113, pp. 321-331, 2019.
- [285] J. Płotka-Wasyłka, N. Szczepańska, M. de La Guardia, and J. Namieśnik, "Miniaturized solid-phase extraction techniques," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 73, pp. 19-38, 2015.
- [286] H. Piri-Moghadam, F. Ahmadi, and J. Pawliszyn, "A critical review of solid phase microextraction for analysis of water samples," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 85, pp. 133-143, 2016.
- [287] A. C. Paiva, J. Crucello, N. de Aguiar Porto, and L. W. Hantao, "Fundamentals of and recent advances in sorbent-based headspace extractions," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 139, p. 116252, 2021.
- [288] M. A. Jeannot and F. F. Cantwell, "Solvent microextraction into a single drop," *Analytical chemistry*, vol. 68, pp. 2236-2240, 1996.
- [289] Y. He and H. K. Lee, "Liquid-phase microextraction in a single drop of organic solvent by using a conventional microsyringe," *Analytical Chemistry*, vol. 69, pp. 4634-4640, 1997.
- [290] Y. Wang, Y. C. Kwok, Y. He, and H. K. Lee, "Application of dynamic liquid-phase microextraction to the analysis of chlorobenzenes in water by using a conventional microsyringe," *Analytical Chemistry*, vol. 70, pp. 4610-4614, 1998.
- [291] M. Rutkowska, J. Płotka-Wasyłka, M. Sajid, and V. Andruch, "Liquid–phase microextraction: A review of reviews," *Microchemical Journal*, vol. 149, p. 103989, 2019.
- [292] B. Hashemi, P. Zohrabi, K.-H. Kim, M. Shamsipur, A. Deep, and J. Hong, "Recent advances in liquid-phase microextraction techniques for the analysis of environmental pollutants," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 97, pp. 83-95, 2017.
- [293] T. S. Ho, T. Vasskog, T. Anderssen, E. Jensen, K. E. Rasmussen, and S. Pedersen-Bjergaard, "25,000-fold pre-concentration in a single step with liquid-phase microextraction," *Analytica chimica acta*, vol. 592, pp. 1-8, 2007.
- [294] S. Armenta, S. Garrigues, and M. de la Guardia, "The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 71, pp. 2-8, 2015.
- [295] M. M. Abolghasemi, M. Piryaee, and R. M. Imani, "Deep eutectic solvents as extraction phase in head-space single-drop microextraction for determination of pesticides in fruit juice and vegetable samples," *Microchemical Journal*, vol. 158, p. 105041, 2020/11/01/ 2020.

- [296] M. A. Farajzadeh, L. Kiavar, and S. Pezhhanfar, "Development of a method based on dispersive liquid-liquid microextraction followed by partial vaporization of the extract for ultra-preconcentration of some pesticide residues in fruit juices," *Journal of Chromatography A*, vol. 1653, p. 462427, 2021/09/13/ 2021.
- [297] S. Chen, J. Yan, Y. Liu, C. Wang, and D. Lu, "Determination of Mn(II) and Mn(VII) in beverage samples using magnetic dispersive micro-solid phase extraction coupled with solidified floating organic drop microextraction followed by graphite furnace atomic absorption spectrometry," *Food Chemistry*, vol. 359, p. 129958, 2021/10/15/ 2021.
- [298] B. T. Zaman, N. Bakaraki Turan, E. G. Bakirdere, S. Topal, O. Sağsöz, and S. Bakirdere, "Determination of trace manganese in soil samples by using eco-friendly switchable solvent based liquid phase microextraction-3 holes cut slotted quartz tube-flame atomic absorption spectrometry," *Microchemical Journal*, vol. 157, p. 104981, 2020/09/01/ 2020.
- [299] I. López-García, M. J. Muñoz-Sandoval, and M. Hernández-Córdoba, "Cloud point microextraction involving graphene oxide for the speciation of very low amounts of chromium in waters," *Talanta*, vol. 172, pp. 8-14, 2017/09/01/ 2017.
- [300] B. Dügencili, "Hydride Generation And Preconcentration Of Bismuth On A Single-Drop Followed By Determination Using Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry," Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, 2015.
- [301] A. Zgoła-Grześkowiak and T. Grześkowiak, "Dispersive liquid-liquid microextraction," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 30, pp. 1382-1399, 2011.
- [302] E. Öztürk Er, E. G. Bakirdere, T. Unutkan, and S. Bakirdere, "Trace determination of cobalt in biological fluids based on preconcentration with a new competitive ligand using dispersive liquid-liquid microextraction combined with slotted quartz tube-flame atomic absorption spectrophotometry," *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 49, pp. 13-18, 2018/09/01/ 2018.
- [303] R. Peñalver, A. Ortiz, N. Arroyo-Manzanares, N. Campillo, I. López-García, and P. Viñas, "Non-targeted analysis by DLLME-GC-MS for the monitoring of pollutants in the Mar Menor lagoon," *Chemosphere*, vol. 286, p. 131588, 2022/01/01/ 2022.
- [304] B. A. P. Agus, N. Hussain, and J. Selamat, "Quantification of PAH4 in roasted cocoa beans using QuEChERS and dispersive liquid-liquid micro-extraction (DLLME) coupled with HPLC-FLD," *Food Chemistry*, vol. 303, p. 125398, 2020/01/15/ 2020.
- [305] A. Sixto, A. Mollo, and M. Knochen, "Fast and simple method using DLLME and FAAS for the determination of trace cadmium in honey," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 82, p. 103229, 2019/09/01/ 2019.
- [306] T. U. Gösterişli, B. T. Zaman, E. G. Bakirdere, S. Keyf, and S. Bakirdere, "A basic and effective liquid phase microextraction with a novel automated mixing

- system for the determination of cobalt in quince samples by flame atomic absorption spectrometry," *Food Chemistry*, vol. 361, p. 130097, 2021/11/01/ 2021.
- [307] T. U. Gösterişli, İ. Z. Kublay, S. Oflu, Y. Kılınç, E. S. Koçoğlu, B. T. Zaman, *et al.*, "Development of a metal sieve-linked double syringe liquid phase microextraction method for the determination of copper in olive leaf extract samples by flame atomic absorption spectrometry," *Food Chemistry*, vol. 377, p. 132057, 2022/05/30/ 2022.
- [308] I. Pacheco-Fernández and V. Pino, "Green solvents in analytical chemistry," *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, vol. 18, pp. 42-50, 2019.
- [309] W.-C. Tsai and S.-D. Huang, "Dispersive liquid–liquid microextraction with little solvent consumption combined with gas chromatography–mass spectrometry for the pretreatment of organochlorine pesticides in aqueous samples," *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, pp. 5171-5175, 2009/07/03/ 2009.
- [310] T. Unutkan, T. Borahan, A. Girgin, and S. Bakırdere, "A sieve-conducted two-syringe-based pressurized liquid-phase microextraction for the determination of indium by slotted quartz tube-flame atomic absorption spectrometry," *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 192, p. 133, 2020/01/22 2020.
- [311] M. B. Melwanki and M.-R. Fuh, "Dispersive liquid–liquid microextraction combined with semi-automated in-syringe back extraction as a new approach for the sample preparation of ionizable organic compounds prior to liquid chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 1198, pp. 1-6, 2008.
- [312] M. Cruz-Vera, R. Lucena, S. Cárdenas, and M. Valcárcel, "One-step in-syringe ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction," *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, pp. 6459-6465, 2009.
- [313] F. Maya, J. M. Estela, and V. Cerdà, "Completely automated in-syringe dispersive liquid–liquid microextraction using solvents lighter than water," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 402, pp. 1383-1388, 2012.
- [314] T. U. Gösterişli, B. Cesur, E. Tezgit, E. G. Bakırdere, S. Keyf, and S. Bakırdere, "Determination of Palladium in Precious Metal Waste by Sieve Conducted Two Syringes Pressurized Liquid Phase Microextraction (SCTS-PLPME) and Slotted Quartz Tube Flame Atomic Absorption Spectrometry (SQT-FAAS)," *Analytical Letters*, vol. 55, pp. 175-185, 2022/01/22 2022.
- [315] R. Özcan, B. Cesur, E. Tezgit, T. Unutkan Gösterişli, and S. Bakırdere, "Determination of pyridaphenthion in soybean sprout samples by gas chromatography mass spectrometry with matrix matching calibration strategy after metal sieve linked double syringe based liquid-phase microextraction," *Food Chemistry*, vol. 342, p. 128294, 2021/04/16/ 2021.
- [316] C. Aftafa, "Validation of Liquid Chromatography Mass Spectrometry Method for Determination of Estrogenic Hormones in Waste Water," Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, 2014.

- [317] M. Taleuzzaman, M. M. Ahmed, and M. Chattopadhyay, "Particle size role, Importance and Strategy of HPLC Analysis-An update," *Int Arch BioMed Clin Res*, vol. 1, p. 3, 2016.
- [318] N. Chheta, S. Gandhi, and S. Rajput, "Development and Validation Of A Stabilityindicating High Performance Liquid Chromatographic (Hplc) Method for Atenolol and Hydrochlorthiazide In Bulk Drug And Tablet Formulation," *International Journal of ChemTech Research*, vol. 1, pp. 654-662, 2009.
- [319] B. Gao, D. Zhang, and Y. Li, "Synthesis and photoluminescence properties of novel Schiff base type polymer-rare earth complexes containing furfural-based bidentate Schiff base ligands," *Optical Materials*, vol. 77, pp. 77-86, 2018/03/01/ 2018.
- [320] G. Güven, "Aydın İlinde Tüketilen Sebze ve Meyvelerin Eser Element Derişimlerinin Tayini," *Gıda / The Journal Of Food*, pp. 301-308, 03/19 2019.
- [321] B. B. KAYA, "Erciyes Strato Volkanından Püsküren Ana Materyaller Üzerinde Oluşmuş Topraklarda Yetiştirilen Meyvelerin Ağır Metal İçeriklerinin Belirlenmesi," Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, 2010.
- [322] S. M. Abdallah, G. G. Mohamed, M. A. Zayed, and M. S. Abou El-Ela, "Spectroscopic study of molecular structures of novel Schiff base derived from o-phthaldehyde and 2-aminophenol and its coordination compounds together with their biological activity," *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 73, pp. 833-40, Sep 1 2009.
- [323] Á. Guinda, J. Castellano, T. Delgado-Hervás, P. Gutiérrez-Adánez, and M. Rada, "Determination of major bioactive compounds from olive leaf," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 64, 05/01 2015.
- [324] M. Ranieri, A. Di Mise, G. Difonzo, M. Centrone, M. Venneri, T. Pellegrino, *et al.*, "Green olive leaf extract (OLE) provides cytoprotection in renal cells exposed to low doses of cadmium," *PLoS One*, vol. 14, p. e0214159, 2019.
- [325] M. A. Nkansah, E. Owusu-Afriyie, and F. Opoku, "Determination of lead and cadmium contents in lipstick and their potential health risks to consumers," *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, vol. 13, pp. 367-373, 2018.
- [326] É. F. Batista, A. dos Santos Augusto, and E. R. Pereira-Filho, "Chemometric evaluation of Cd, Co, Cr, Cu, Ni (inductively coupled plasma optical emission spectrometry) and Pb (graphite furnace atomic absorption spectrometry) concentrations in lipstick samples intended to be used by adults and children," *Talanta*, vol. 150, pp. 206-212, 2016.
- [327] E. Z. Jahromi, A. Bidari, Y. Assadi, M. R. M. Hosseini, and M. R. Jamali, "Dispersive liquid-liquid microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry: Ultra trace determination of cadmium in water samples," *Analytica Chimica Acta*, vol. 585, pp. 305-311, 2007.
- [328] E. Akkaya, D. S. Chormey, and S. Bakırdere, "Sensitive determination of cadmium using solidified floating organic drop microextraction-slotted quartz tube-flame atomic absorption spectroscopy," *Environmental monitoring and assessment*, vol. 189, pp. 1-7, 2017.

- [329] M. Mei, J. Pang, X. Huang, and Q. Luo, "Magnetism-reinforced in-tube solid phase microextraction for the online determination of trace heavy metal ions in complex samples," *Anal Chim Acta*, vol. 1090, pp. 82-90, Dec 20 2019.
- [330] T. Borahan, B. T. Zaman, B. Arica Polat, G. Bakırdere, and S. Bakırdere, "An accurate and sensitive effervescence-assisted liquid phase microextraction method for the determination of cobalt after a Schiff base complexation by slotted quartz tube-flame atomic absorption spectrophotometry in urine samples," *Analytical Methods*, vol. 13, 01/22 2021.
- [331] D. Chormey, Ç. Büyükpınar, F. Turak, O. Komesli, and S. Bakırdere, "Simultaneous determination of selected hormones, endocrine disruptor compounds, and pesticides in water medium at trace levels by GC-MS after dispersive liquid-liquid microextraction," *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 189, 05/19 2017.
- [332] M. Firat, S. Bakırdere, M. S. Fındıkoğlu, E. B. Kafa, E. Yazıcı, M. Yolcu, *et al.*, "Determination of trace amount of cadmium using dispersive liquid-liquid microextraction-slotted quartz tube-flame atomic absorption spectrometry," *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 129, pp. 37-41, 2017/03/01/ 2017.
- [333] H. Al-Saidi and A. A. Emara, "The recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction for preconcentration and determination of inorganic analytes," *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 18, pp. 745-761, 2014.
- [334] M. Charde, A. Welankiwar, and J. Kumar, "Method development by liquid chromatography with validation," *International Journal of Pharmaceutical Chemistry*, vol. 4, pp. 57-61, 2014.
- [335] R. Singh, "HPLC method development and validation-an overview," *Journal of Pharmaceutical Education & Research*, vol. 4, 2013.
- [336] A. dos Santos Pereira, F. David, G. Vanhoenacker, and P. Sandra, "The acetonitrile shortage: is reversed HILIC with water an alternative for the analysis of highly polar ionizable solutes?," *Journal of separation science*, vol. 32, pp. 2001-2007, 2009.
- [337] M.-L. Riekkola, M. Jussila, S. P. Porras, and I. E. Valkó, "Non-aqueous capillary electrophoresis," *Journal of Chromatography A*, vol. 892, pp. 155-170, 2000.
- [338] P. K. Sahu and C. S. Patro, "Application of chemometric response surface methodology in development and optimization of a RP-HPLC method for the separation of metaxalone and its base hydrolytic impurities," *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 37, pp. 2444-2464, 2014.
- [339] S. Kromidas, *Practical problem solving in HPLC*: Wiley-VCH, 2000.
- [340] A. Lace, D. Ryan, M. Bowkett, and J. Cleary, "Chromium monitoring in water by colorimetry using optimised 1, 5-diphenylcarbazide method," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 16, p. 1803, 2019.
- [341] K. Wróbel, K. Wróbel, P. L. López-de-Alba, and L. López-Martínez, "Enhanced spectrophotometric determination of chromium (VI) with

diphenylcarbazide using internal standard and derivative spectrophotometry," *Talanta*, vol. 44, pp. 2129-2136, 1997.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Makaleler

1. T. U. Gösterişli, B. T. Zaman, E. G. Bakırdere, S. Keyf, and S. Bakırdere, " A basic and effective liquid phase microextraction with a novel automated mixing system for the determination of cobalt in quince samples by flame atomic absorption spectrometry" Food Chemistry, vol. 361, pp. 130097, 2021.

2. T. U. Gösterişli, İ. Z. Kublay, S. Oflu, Y. Kılınç, E. S. Koçoğlu, B. T. Zaman, S. Keyf, and S. Bakırdere, "Development of a metal sieve-linked double syringe liquid phase microextraction method for the determination of copper in olive leaf extract samples by flame atomic absorption spectrometry " Food Chemistry, vol. 377, pp. 132057, 2022.

Konferans Bildirileri

1. T. U. Gösterişli, B. T. Zaman, E. G. Bakırdere, S. Keyf, and S. Bakırdere, " A basic and effective liquid phase microextraction with a novel automated mixing system for the determination of cobalt in quince samples by flame atomic absorption spectrometry" 2nd International Congress on Analytical and Bioanalytical Chemistry, Antalya, Türkiye, 11-14 Mart 2020.