



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİLİRUBİNİN SİSLENME NOKTASI EKSTRAKSİYONU  
SONRASI FİBER OPTİK SPEKTROFOTOMETRİK  
TAYİNİ**

**Yük.Kimyager Derya GİRAY  
Kimya Anabilim Dalı  
Analitik Kimya Programı**

**Danışman  
Prof.Dr. Hayati FİLİK**

**Şubat, 2012**

**İSTANBUL**



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİLİRUBİNİN SİSLENME NOKTASI EKSTRAKSİYONU  
SONRASI FİBER OPTİK SPEKTROFOTOMETRİK  
TAYİNİ**

**Yük.Kimyager Derya GİRAY  
Kimya Anabilim Dalı  
Analitik Kimya Programı**

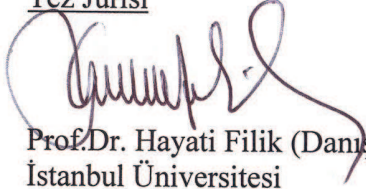
**Danışman  
Prof.Dr. Hayati FİLİK**

**Şubat, 2012**

**İSTANBUL**

2601080288 Öğrenci numaralı Derya GİRAY tarafından hazırlanan bu çalışma 16/02/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

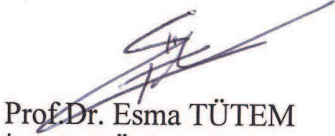
Tez Jürisi



Prof.Dr. Hayati Filik (Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Mühendislik Fakültesi



Prof.Dr. Reşat APAK  
İstanbul Üniversitesi  
Mühendislik Fakültesi



Prof.Dr. Esmâ TÜTEM  
İstanbul Üniversitesi  
Mühendislik Fakültesi



Prof.Dr. Birsen DEMİRATA  
ÖZTÜRK  
İstanbul Teknik Üniversitesi  
Fen-Edebiyat Fakültesi



Doç. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN  
İstanbul Üniversitesi  
Mühendislik Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 8144 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim süresince bütün çalışmalarında bana yol gösteren tüm sorunlarımla ilgilenerek çözümler üretmemi sağlayan çalışkanlığını ve azmini kendime örnek aldığım saygıdeğer danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Hayati FİLİK'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında bana destek ve yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma, bana güvenerek desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme gösterdikleri sabır ve özveriden ötürü sonsuz teşekkürler ederim.

Bu tezin gerçekleştirilmesinde kullanılan gerekli ekipman ve maddi desteği **“Kolorimetrik katı faz ekstraksiyonu-fiber optik reflektans spektroskopisiyle biyolojik sıvılarda yeni bir bilirubin ölçüm yönteminin geliştirilmesi”** başlıklı ve **109T856** numaralı proje kapsamında sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)' na teşekkür ederim.

Tezimle aynı ismi taşıyan 8144 sayılı projeme maddi destek sağlayan İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Şubat, 2012

Derya GİRAY

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİL LİSTESİ .....	iv
TABLO LİSTESİ .....	v
SEMBOL LİSTESİ .....	vi
ÖZET .....	vii
SUMMARY .....	ix
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL KISIMLAR .....	3
2.1. BİLİRUBİNİN KİMYASI .....	3
2.2. BİLİRUBİNİN FONKSİYONLARI .....	5
2.3. SİSLENME NOKTASI EKSTRAKSİYONU .....	7
2.4. YÜZEY AKTİF MADDELER VE MİSEL OLUŞUMUNUN ÖZELLİKLERİ .....	8
3. MALZEME VE YÖNTEM .....	14
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR .....	14
3.2. KİMYASAL MADDELER .....	14
3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması .....	14
3.3. UYGULANAN YÖNTEMLER .....	16
3.3.1. Çalışma Metodu .....	16
3.3.2. Absorbans Ölçümü .....	16
3.3.3. Sislenme Noktası Ekstraksiyonunun Optimizasyonu .....	17
3.3.3.1. . Sıcaklık Etkisi .....	17

3.3.3.2. HCl Konsantrasyonunun Etkisi .....	17
3.3.3.3. Triton X-114 Konsantrasyonunun Etkisi .....	17
3.3.3.4. NaIO <sub>4</sub> Etkisi.....	17
3.3.3.5. Sodyum Dodesil Sülfat Konsantrasyonunun Etkisi .....	17
3.3.3.6. Tuz Konsantrasyonunun Etkisi .....	18
3.3.3.7. Analitik Parametreler .....	18
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>19</b>
4.1. BİLİRUBİNİN ABSORPSİYON SPEKTRUMU .....	19
4.2. DEĞİŞKENLERİN ETKİSİ .....	20
4.2.1. Sıcaklık Etkisi.....	20
4.2.2. HCl Konsantrasyonunun Etkisi.....	21
4.2.3. TX-114 Konsantrasyonunun Etkisi.....	22
4.2.4. NaIO <sub>4</sub> Konsantrasyonunun Etkisi.....	23
4.2.5. Sodyum Dodesil Sülfat Konsantrasyonunun Etkisi.....	24
4.2.6. Tuz Konsantrasyonunun Etkisi .....	24
4.2.7. Analitik Parametreler .....	24
4.2.8. Çözücü Etkisi.....	25
4.3. GİRİŞİM YAPAN MADDELERİN ETKİSİ .....	26
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>27</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>29</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>34</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Hem'den bilirubin oluşum mekanizması .....	4
Şekil 2.2: Bilirubin 4Z,15Z ve 4E,15E izomerleri .....	5
Şekil 2.3: Misel yapının bir araya gelmesi (oluşumu).....	9
Şekil 2.4: Geleneksel CP-Ekstraksiyonun sistematik ifadesi.....	11
Şekil 2.5: Sulu çözeltideki Triton X-114 non-iyonik yüzey aktif maddenin faz diyagramı.....	11
Şekil 2.6: Monoeter glikol polioksietilen yüzey aktif maddeleri için faz diagramları....	12
Şekil 3.1: Absorbans ölçüm düzeneği.....	16
Şekil 4.1: Bilirubin ( $1.17 \text{ mg L}^{-1}$ ) sulu çözelti (a), CPE sonrası (b) ve asidik ortamda $\text{NaIO}_4$ varlığında CPE sonrası (c) absorpsiyon spektrumları.....	19
Şekil 4.2: Bilirubin CPE üzerine sıcaklık ve zaman etkisi grafiği.....	20
Şekil 4.3: Bilirubin CPE üzerine HCl etkisinin grafiği.....	21
Şekil 4.4: Bilirubin CPE üzerine TX-114 etkisinin grafiği.....	22
Şekil 4.5: Bilirubin CPE üzerine $\text{NaIO}_4$ etkisinin grafiği.....	23
Şekil 4.6: Optimum koşullar altında Bilirubin analizi için $0.29\text{-}2.92 \text{ mg L}^{-1}$ Bilirubin konsantrasyonları arasındaki lineerlik eğrisi.....	25
Şekil 5.1: Bilirubin Tiedemann & Gmelin tarafından önerilen reaksiyonları.....	27



## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2.1:</b> Yüzey aktif maddelerin sınıflandırılması ve karakteristikleri.....	<b>8</b>
<b>Tablo 4.1:</b> $1.17 \text{ mg L}^{-1}$ Bilirubin tayininde girişim yapan maddelerin etkileri (n=3)...	<b>26</b>

## SEMBOL LİSTESİ

<b>AA</b>	: Askorbik asit
<b>CPE</b>	: Sislenme noktası ekstraksiyonu
<b>CMC</b>	: Kritik misel konsantrasyonu
<b>CTAB</b>	: Setiltrimetilamonyumbromür
<b>FOS</b>	: Fiber Optik Spektrometre
<b>LLE</b>	: Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu
<b>LOD</b>	: Dedeksiyon limiti
<b><i>p</i>-DMABA</b>	: <i>p</i> -dimetilaminobenzaldehit
<b>RSD</b>	: Bağlı standart sapma
<b>SA</b>	: Salisilik asit
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat
<b>SPE</b>	: Katı Faz Ekstraksiyonu
<b>UDPGT</b>	: Uridildifosfatglukuronil transferaz
<b>LOD</b>	: Belirtme limiti

## ÖZET

### BİLİRUBİNİN SİSLENME NOKTASI EKSTRAKSİYONU SONRASI FİBER OPTİK SPEKTROFOTOMETRİK TAYİNİ

Bilirubin hemoglobin metabolizmasının bir ürünü olarak kanda bulunur. Serumda anormal bilirubin konsantrasyonları genellikle yeni doğan sarılığında enfeksiyöz hepatite kadar çeşitli karaciğer bozukluklarının varlığını gösterir. Bu yüzden bilirubin ölçümünün doğru olarak yapılması çok önemlidir. Kullanılan bilirubin ölçüm metotlarının pek çoğu bir hızlandırıcı varlığında diazolandırılmış bilirubinin kolorimetrik ölçümüne dayanır. Bilirubin ışığa duyarlıdır ve biyolojik materyalin transferi ciddi bir problemdir.

Örneklerde bulunan düşük konsantrasyondaki birçok analiti direkt olarak tayin etmek mümkün değildir. Bu yüzden az miktardaki örnekleri tayin etmek için analiz yöntemleri ayırma ve önderiştirme teknikleri ile birlikte uygulanmalıdır. Ayırma ve önderiştirme temeline dayanan sislenme noktası ekstraksiyonu (CPE), kullanılan yüzey aktif maddeler sebebiyle analitik kimyada önemli ve pratik bir uygulama haline gelmektedir. Sislenme noktası olgusu sulu çözeltide noniyonik yüzey aktif maddelerin kritik misel konsantrasyonlarının üzerinde, uygun maddelerin eklenmesi veya sıcaklığın değiştirilmesi üzerine bulanıklık meydana gelmesi olayıdır. Yüzey aktif maddece zengin fazın santrifüj ile ayrılmasıyla hidrofobik türler sulu çözeltiden uzaklaştırılır.

Geliştirilen bu yöntemde bilirubin asidik ortamda  $\text{NaIO}_4$  kullanarak yükseltgendi ve sulu fazdan uygun yüzey aktif maddelerle ekstrakte edildi. Oluşan yüzey aktif maddece zengin faz fiber optik spektrofotometrik olarak 693 nm'de ölçüldü. Deneyler, ışık kaynağı olarak tungsten halojen lamba ve absorban ölçümü için "Charge-coupled devices" (CCD) esaslı bir dedektör kullanan minyatürize bir fiber optik spektrometre kullanılarak yapıldı. Uygun reaksiyon ve ekstraksiyon koşulları ( asit konsantrasyonu, cevap süresi, yüzey aktif konsantrasyonu gibi ) saptandı. Uygun koşullarda bilirubin için çizilen kalibrasyon grafiği lineer çalışma aralığı  $5.0 \times 10^{-7}$ - $5.0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> (0.29-2.92 mg L<sup>-1</sup>) arasında ve belirtme limiti  $1 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> (5.8 µg L<sup>-1</sup>) 'dir. Bağıl standart sapma (RSD) değeri % 2 'den küçüktür. Sistemin önderiştirme faktörü 20 'dir.

## SUMMARY

### DETERMINATION OF BILIRUBIN BY FIBER OPTIC SPECTROPHOTOMETRY AFTER CLOUD POINT EXTRACTION

Bilirubin is present in the blood as a product of hemoglobin metabolism. Abnormal serum bilirubin concentrations usually indicate the presence of a variety of liver dysfunctions, ranging from neonatal jaundice to infectious hepatitis. So the accurate determination of bilirubin is clinically important. The most widely used bilirubin methods are based on colorimetric measurement after diazotization of bilirubin in the presence of an accelerator. Bilirubin is light sensitive and transfer of the biological material is a serious problem.

The low concentration of many analytes in samples makes direct measurement difficult. Therefore, the application of determination technique coupled with a separation/preconcentration technique is necessary for trace analysis. Separation and preconcentration based on cloud point extraction (CPE) are becoming important and practical applications of the using surfactants in analytical chemistry. Cloud point phenomenon occurs when aqueous solutions of non-ionic surfactants above the critical micelle concentration become turbid upon modification of temperature or introduction of a suitable additive. A surfactant-rich phase can then be separated by centrifugation, removing the hydrophobic species from the aqueous solution.

This method was developed bilirubin was oxidation using  $\text{NaIO}_4$  in acidic media and aqueous phases were extracted with suitable surface active agents. Rich phase which is consisting of surface-active substance was measured at 693.4 nm as fiber optic spectrophotometrically. Experiments was carried out using a miniature fiber optic based spectrometer which has a small tungsten halogen lamp as a light source and a Charge-coupled devices (CCD) based detector for absorbance measurements. Appropriate reaction and extraction conditions (acid concentration, response time, as the concentration of surfactant) were determined. Under appropriate conditions, linear range of the calibration graph is drawn for bilirubin between  $5.0 \times 10^{-7}$ - $5.0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> (0.29-2.92 mg L<sup>-1</sup>) and limit of detection is  $1 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> (5.8 µg L<sup>-1</sup>) Relative standard deviation (RSD) value is lower than 2%. Preconcentration factor of the system is 20.

## 1. GİRİŞ

Bilirubin; hemoglobin katabolizması (parçalanması) sonucu oluşan insan safrasının esas pigmentini oluşturan ve altın sarısı rengini veren bir üründür [1]. Bilirubin ışıkla parçalara ayrılır ve kanda iki formda bulunur:

1. Konjuge (direkt bilirubin)
2. Konjuge olmamış (indirekt bilirubin)

Konjuge bilirubin glikoronik aside bağlanabilir. Ayrıca boyar maddeler (diazo) kana eklendiğinde hızlı bir şekilde tepkimeye girer ve azobilirubini oluşturur. Buna karşılık konjuge olmamış bilirubin çözülebilir değildir ve yavaş reaksiyona girer yine azobilirubini oluşturur. Konjuge ve konjuge olmamış bilirubinlerin toplamı toplam bilirubindir.

Yeni doğan bebeklerde sık görülen bir hastalık olan konjuge olmamış hyperbilirubinamia beynin belli bölgelerinde bilirubin birikimine neden olur. Bunun sonucunda zeka geriliği ve anormal refleksler oluşur. Bu hastalığın yeni doğanlarda oluşmasının sebebi; kan beyin bariyerinin tam olarak gelişmemesi ve bilirubin kolayca beyindeki küçük boşluklara geçmesidir. Yetişkinlerde bu durum gerçekleşmez [2,3]. Bu nedenle kan ve idrar gibi biyolojik sıvılarda toplam, konjuge ve konjuge olmamış bilirubinlerin kantitatif olarak ayrı ayrı ölçümü, çeşitli tip sarılıkların erken tanısında ve tedavisinde oldukça önem kazanmaktadır [4].

Günümüzde kandaki bilirubin miktarının belirlenmesi deri test cihazları, fotometrik cihazlar ve laboratuvar analizleri ile yapılmaktadır. Bu cihazlar kandaki bilirubin miktarını dolaylı bir şekilde ölçer ve hatalı sonuçlar verebilir.

Bilirubin ölçümüyle ilgili olarak literatürde çeşitli metotlar mevcuttur. Kromatografik ve spektrofotometrik yöntemler bilirubin yapısını aydınlatmada ve miktar tayininde

kullanılmıştır. Önemli analitik metodlar arasında voltametri [5], polografi [6], kemiluminesans [7] ve spektrofotometri [8,9,10] yöntemleri yer alır. Bu metotlar [6,8] diazolama reaksiyonu [11] ile yapılan spektrofotometrik bilirubin tayin yöntemiyle kıyaslandığında, hassasiyet avantajlarının yanında selektiftirler.

1981 yılında ilk kez bilirubin tayini için redoks-enzimatik reaksiyonuyla selektif bir metot ortaya konulmuştur [12]. Bilirubinun redoks-enzimatik reaksiyonları üzerine araştırmalar, daha sonraki yıllarda da artarak devam etmiştir [13,14,15,16,17]. CPE ile ilgili literatürde yalnız bir çalışma mevcuttur [18].

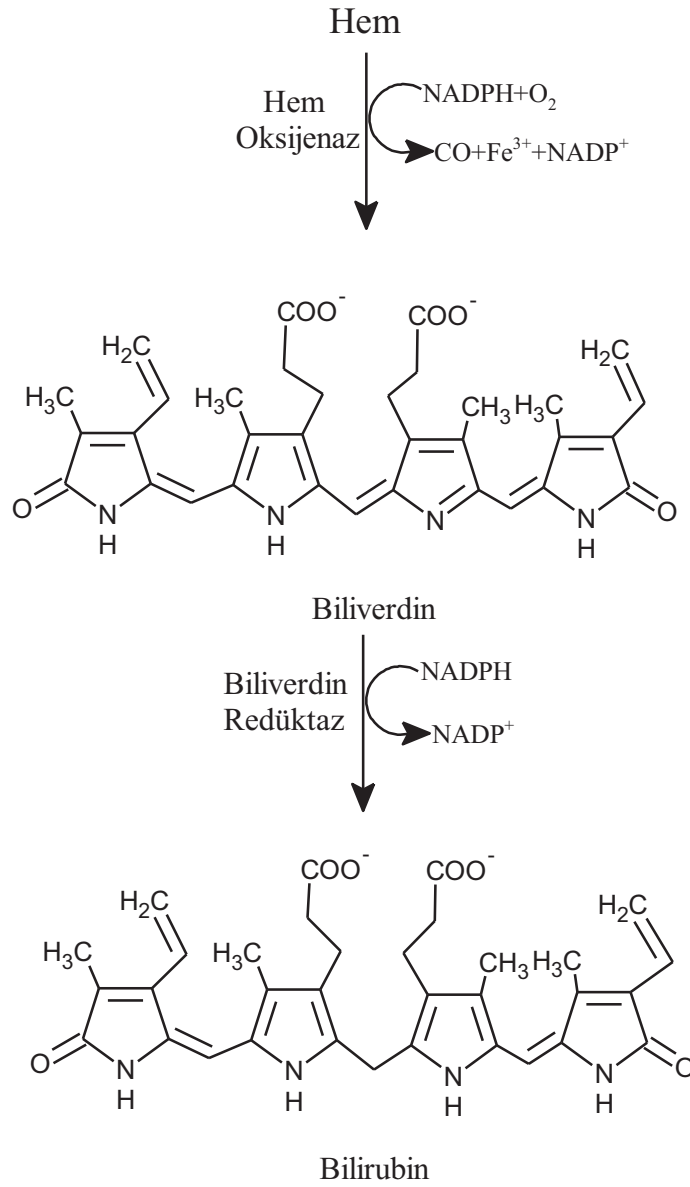
Yeni oluşturulacak bilirubin ölçüm yöntemleri halen yaşanmakta olan sorunlara çözüm olabilir. CPE gibi misel sistemlerin kullanımı 'green kimya' prensipleri ile uyduğu için son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Elde edilen küçük hacimli yüzey aktif maddece zengin faz ekstraksiyon stratejilerinin dizaynına izin veren yaklaşımı ile organik çözücülerin kullanıldığı ekstraksiyonlarla kıyaslandığında basit, ucuz ve etkili bir metottur. Taşınabilir cihazlarla ölçüm yapmak mümkündür. Kalifiye elemanlara ihtiyaç olmadan analizi yapmaya imkan sağlar.

Aromatik aldehitler reaktivitesi fazla olan bileşiklerdir ve çeşitli katılma (kondensasyon) reaksiyonları verirler. Bunlardan biri olan *p*-dimetilaminobenzaldehit (*p*-DMABA), kuvvetli hidroklorik asitli ortamda çeşitli biyolojik örneklerde bulunan bilirubin ölçümünde halen rutin olarak kullanılmaktadır. Bu bilgiden yararlanarak bu tez çalışmasında bilirubinun, kuvvetli asit (HCl) ve bir yükseltgen (KIO<sub>4</sub>) varlığında yüzey aktif maddece (TX-114) zengin fazda oluşan reaksiyon ürününün konsantrasyonunun taşınabilir minyatürize bir fiber optik spektrometresi (FOS) kullanarak ölçümü hedeflenmiştir.

## **2. GENEL KISIMLAR**

### **2.1.BİLİRUBİNİN KİMYASI**

Bilirubin, başlıca hemoglobin gibi hemoproteinlerin yıkımı sonucu meydana gelen bir üründür. Bilirubinün % 75'i dolaşımdaki eritrositlerin yıkımından, % 25'i ise yetersiz eritropoez ile myoglobin, sitokrom, katalaz, siklooksijenaz, guanilsiklaz, nitrik oksit sentaz ve peroksidaz gibi diğer hemoproteinlerin yıkımından meydana gelir. Retiküloendotelyal sistemde toplanan ve parçalanan eritrositlerden önce globin zincirleri ayrılır. Daha sonra hem oksijenaz enzimi aracılığıyla hem halkasındaki x-karbon atomu ayrılır ve karbonmonoksit (CO) olarak akciğerlerden atılır. Demir tekrar kullanıma girerken, hem önce biliverdine ve daha sonra biliverdin redüktaz enzimi aracılığıyla bilirubine dönüşür (Şekil 2.1).

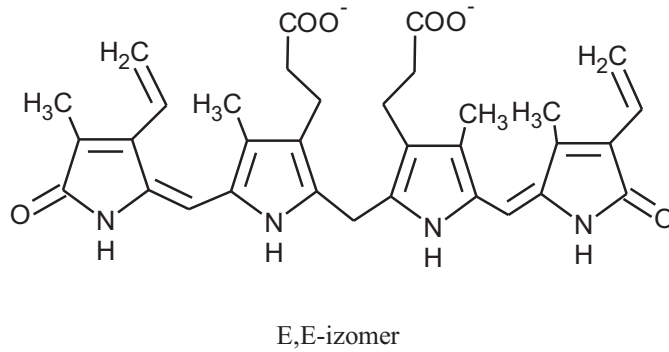
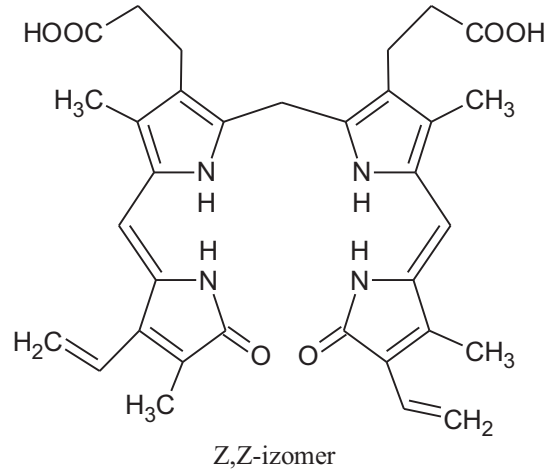


**Şekil.2.1.**Hem'den bilirubin oluşum mekanizması [21]

Bilirubin, üç tek karbon köprüsüyle birbirine bağlanmış dört pirol halkasından oluşur. Ortadaki karbon köprüsü, orta 2 pirol halkasına tek olarak bağlanır, yanlardaki 2 karbon köprüsü ise diğer iki pirol halkasına çift bağla bağlanır. Bu çift bağlarda 2 farklı konfigürasyon olabilir. Bunlardan birine Z (Almanca zusammen = beraber), diğerine E (Almanca entgegen = karşılıklı) denir. Ana molekül olan hemde bu çift bağlar Z konumunda olduğu için bilirubin de 4Z, 15Z bilirubin IX  $\alpha$  adını alır (Şekil 2.2). Bu molekülün üç boyutlu yapısında, bütün polar gruplar molekül içinde bulunduğu için hidrofobik bir özellik kazanır. Membranlardan geçişi kolaylaştıran bu lipofilik özellik



molekül içi hidrojen bağları sayesinde ortaya çıkar. Bilirubin molekülüne benzer moleküller bitkilerde de ışığı algılamak için kullanılmaktadır. Bilirubin de diğerleri gibi ışığa duyarlıdır ve bu nedenle de ışıkla bilirubin izomerize olur. Bu sayede ışık terapisi sarılık olan yeni doğmuş bebeklerin tedavisinde kullanılır. Işık tedavisi bilirubini izomerize edip çözünürlüğünü artırır [19].



**Şekil.2.2.**Bilirubinün 4Z,15Z ve 4E,15E izomerleri

## 2.2.BİLİRUBİNİN FONKSİYONLARI

Kan dolaşımında bulunan alyuvarlar (kırmızı kan hücreleri) yaklaşık 120 günlük bir süre sonunda ömrünü tamamlar ve çoğunluğu dalakta olmak üzere retiküloendotelyal sistem hücrelerinde parçalanır ve kırmızı renkli hemoglobin açığa çıkar. Retiküloendotelyal sistemde meydana gelen bilirubin albumine bağlanarak karaciğere taşınır. Her bir albumin molekülüne 2 bilirubin molekülü bağlanabilir [20]. Konjuge

bilirubin direkt bilirubin olarak ölçülürken, albumine bağlı ve serbest olan konjuge olmamış bilirubinin tamamı indirekt bilirubin olarak ölçülür.

Karaciğere gelen albumine bağlı bilirubin, karaciğer hücre yüzeyinde albuminden ayrılır ve membran reseptörlerine bağlanır. Karaciğerin temel işlevsel parenkim hücresi olan hepatosit içine geçen bilirubin sitozolde bulunan ligandin veya Y protein (glutasyon S-transferaz B) adı verilen reseptöre bağlanarak düz endoplazmik retikuluma taşınır. Hepatosit içindeki bir diğer reseptör olan Z proteininin (yağ asidi bağlayıcı protein) bilirubin afinitesi zayıftır. Bilirubinin bu sitozolik proteinlere bağlanması bilirubinin hücre dışına geri çıkışını önler. Bilirubinin safra içerisine salgılanması ve vücuttan atılımı için suda çözünür hale gelmesi gerekmektedir. Düz endoplazmik retikuluma gelen bilirubin IX  $\alpha$  (ZZ) 'uridildifosfat glukuronil transferaz (UDPGT) enzimi' yardımıyla suda çözünen iki glukuronil grubunun bilirubinin bir veya her iki propiyonik ucuna eklenmesi ile mono ve diglukuronid şekline dönüşür. Enzim eşliğinde meydana gelen bu glukuronidasyon vücuttaki en önemli detoksifikasyon mekanizmalarından biridir [21].

Glukuronidle konjugasyon, bilirubin atılımının % 90'ını oluşturur. Kalan bilirubin ise glukoz, ksiloz, taurin gibi başka maddelerle konjuge olarak veya oksidasyon, hidrosilasyon, veya indirgenme reaksiyonlarına girerek suda çözünür hale gelir ve atılır. Konjuge edilen bilirubin enerji harcayan bir taşıyıcı sistem aracılığıyla kanaliküler membrandan safra içine atılır. Safra kanalındaki bilirubin konsantrasyonu hepatosit içindekinin 100 katına kadar ulaşır.

Safra kanalı aracılığıyla bağırsağa geçen konjuge bilirubin tekrar emilemez ancak konjuge olmamış bilirubin safra, safra tuzları, fosfolipidler, kolesterol, tiroksin ve diğer bazı maddelerle birlikte enterohepatik dolaşıma geçer. Bilirubinin monoglukuronid ve diglukuronid formları stabil moleküller olmadığı için bağırsaktaki alkali ortamda nonenzimatik olarak, mukoza yüzeyindeki  $\beta$ -glukuronidaz ile de enzimatik olarak hemen konjuge olmamış bilirubin haline dönüşür. Bu bilirubin de enterohepatik dolaşım ile karaciğere geri döner.

Bağırsaktaki bilirubin en çok duodenum ve kolondan emilir. bağırsağa geçen bilirubinin yaklaşık % 25'inin geri emildiği düşünülmektedir. Yenidoğanda bağırsak florasının henüz gelişmemiş olması, bilirubinin ürobilinojene dönüşümünü azalttığı için bağırsaktaki bilirubin yükü artar [19]. Erişkinde ise bağırsağa gelen bilirubinin çoğu bakteriler tarafından bilirubinoidlere (sterkobilin, ürobilinojen) dönüşürler. Sterkobilin dışıyla, ürobilinojen idrarla atılır. Çok az bir bölüm ise hidroliz olarak indirekt bilirubine dönüştürülür ve enterohepatik dolaşım ile karaciğere geri döner [20].

### **2.3.SİSLENME NOKTASI EKSTRAKSİYONU**

Ayırma ve önderiştirme işlemleri analitik ve çevre kimyasında oldukça önemli bir yer teşkil etmektedir. Bu işlemler matriks etkisi ve kirleticilerin eliminasyonu ve minimize edilmesini, farklı teknikler ile bazı maddelerin dedeksiyon limit değerlerinin azalmasını, bazı maddeler için analizlenebilirliğinin artmasını olası kılarlar.

CPE işlemi birtakım işlemleri temel almaktadır. Bunlar; yüzey aktif maddeli sulu çözelti bulanıklaşmaya başlar ve eğer sıcaklık veya basınç değiştirilir ya da çözeltiye uygun bir madde eklenirse iki izotropik faza ayrılır. Yüzey aktif madde çözeltisinin bulanıklaşmaya başlamasının nedeni sislenme noktasına ulaşmasıdır. Bu noktada ayrılan iki fazdan yüzey aktif maddece zengin olup misel yapılar ile yakalanan analit içeren faz hacimce az olan, seyreltik sulu faz ise hacimce çok olandır [22].

CP-Ekstraksiyonun, solid- faz ekstraksiyonu (SPE) ve likid-likid ekstraksiyonu (LLE) gibi geleneksel işlemlere göre avantajı örneğin az miktarda alınan ilk hacminden yüksek önderiştirme faktörü elde edilebilmesidir.

CPE, küçük hacimli yüzey aktif madde fazında (0.2- 0.5ml) madde toplanabildiği için yüksek önderiştirme faktörleri ve nicel geri alımları yüksek kapasitede olabilir. İlave reekstraksiyon adımı olmaksızın diğer tekniklere benzer şekilde önderiştirme faktörleri sağlar.

Sistenme noktası ekstraksiyonu organik maddeler ve metal iyonlarının önderişimi ve ayrılması için kullanılabilir. Uygun koşullar altında reaksiyon sonrası elde edilen madde iyonik yapıda yada hidrofobik kelatlarla birlikte bulunabilir [23].

#### 2.4. YÜZEY AKTİF MADDELER VE MİSEL OLUŞUMUNUN ÖZELLİKLERİ

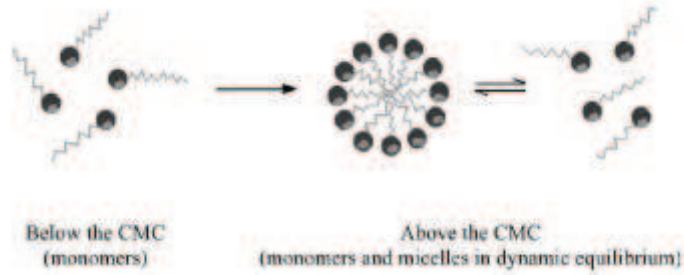
Yüzey aktif maddeler ampifilik maddelerdir. Uzun hidrofobik zincir ve küçük yüklü grup veya polar hidrofilik molekülere sahiptir. Tipik yüzey aktif madde R-X yapısındadır, burada R karbon zinciri ( $C_8 - C_{18}$ ), X ise polar veya iyonik baş gruptur. Yüzey aktif maddelerin en olağan kimyasal sınıflandırılması yapılarındaki hidrofilik grup temel alınarak yapılır. Yüzey aktif maddeler 4 grupta belirtilmiştir: non-iyonik, katyonik, anyonik, amfoterik (zwitter iyonik) [24]. Tablo 2.1'de bu 4 grubun her biri örneklenmiş ve karakteristikleri verilmiştir.

**Tablo 2.1.** Yüzey aktif maddelerin sınıflandırılması ve karakteristikleri

Sınıflandırma	Karakteristik Özellikleri	Örnek
Anyonik	Hidrofilik grup olarak karboksil ( $RCOO^-$ ), sülfonat ( $RSO_3^-$ ), sülfat ( $ROSO_3^-$ ) gibi negatif yüklü iyonlar taşırlar.	Sodyum dodesil sülfat (SDS) $CH_3(CH_2)_{11}SO_4^- Na^+$
Katyonik	Hidrofilik grup olarak pozitif yüklü iyonlar taşırlar. Örneğin Kuaterner amonyum klorür ( $R_4N^+Cl^-$ ).	Setil trimetil amonyum bromür (CTAB) $CH_3(CH_2)_{15}N^+(CH_3)_3Br^-$
Non-iyonik	Hidrofilik grupları yüksüzdür fakat suda çözünebilen yüksek polariteye sahip polioksietilen ( $-OCH_2CH_2-$ ) veya polihidrik alkol gibi gruplardan türeler.	Polioksietilen(23) dodekanol (Brij 35) $CH_3(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_{23}OH$
Amfoterik veya zwitter iyonik	Bu moleküller anyonik ve katyonik grupların ikisini birden içerebilir ve pH' a bağlı olarak anyonik, katyonik veya nötral türlere hakimdirler.	$CH_3(CH_2)_{11}N^+(CH_3)_2(CH_3)COO^-$ 4-(Dodesildimetil amonyum) butirat (DAB)

Aynı molekülde hidrofilik ve hidrofobik grupların kombinasyonu yüzey aktif maddeye su ve diğer çözücülerde çözünme özelliği sağlar.

Misel yüzey aktif madde molekülleri ile kolloidal boyutlarda çok moleküllü yapılar olarak düzenlenmişlerdir. Agregatlar kritik misel konsantrasyonu (CMC) elde edildiğinde agregat doğal yoldan sulu çözeltide bulunmaktadır. Yüzey aktif maddenin kritik misel konsantrasyonu bazı faktörlere bağlıdır. Moleküler yapısı ve iyonik kuvvet, zıt yüklü iyonlar gibi. Sıcaklık CMC'nin altında yüzey aktif madde birleşmemiş monomer yapısında iken, CMC'nin üzerinde monomerler ve misel denge halindedir (Şekil 2.3). Misel kararlı yapılar değildir. Miselin çözünmüş yüzey aktif madde monomerleri ile dinamik dengesi onun önemli bir karakteristikliğidir ki CMC'ye ulaşıldıktan sonra sabit konsantrasyonda kalır. Misel termodinamik olarak stabillerdir ve kolayca çoğalabilirler [25,26].



**Şekil 2.3.**Misel yapının bir araya gelmesi (aggregate)

Misel gibi düzenli yapının oluşumu sistemin entropisinde azalma anlamına gelmektedir. Serbest enerji miselin oluşumu sırasında tüketilecektir. Sulu çözeltide, su molekülleri hidrojen bağları ile kendilerini çekerler. Bu yüzden iyonik ve polar maddede çözülme hidrojen bağlarının kırılması için enerji gerektirir. Gerekli olan bu enerji çözünen türlerin hidrasyonu ile karşılanır. Buna rağmen yüzey aktif maddelerin alifatik zincirleri fark edilir oranda hidrate olmazlar. Van der Waals kuvvetleri birbirlerini karşılıklı çekmesi ile yüzey aktif madde molekülleri ile su arasındaki etkileşim alanı azalır. Yüzey aktif maddelerin hidrofilik baş grubu suda çözünebilme eğilimi gösterir. Yüzey aktif madde CMC'nin üzerinde sulu çözeltide çözüldüğü zaman hidrofobik yapı su likid yapısını değiştirir ve bu olayda serbest enerjinin yükselmesine neden olur.

Serbest enerjinin yükselmesi misel oluşumu için yüzey alanı yaratmaya gerekli işi karşılar [24].

Miselin kimyasal türlerde çözünebilme yeteneği vardır. Bu olay farklı polariteler ve boyutlar verebilir. Çözünürlük alanı yüzey aktif madde ve çözünmüş türün yapısı ile değişir. Çözünürlük alanları belirtilen şekillerde tanımlanabilir:

- a) misel yüzeyi
- b) hidrofilik baş gruplar arası
- c) (non-iyonik yüzey aktif maddeler için) poli oksitilen grupları arası
- d) çekirdek ve baş gruplar arasındaki arayüzey
- e) hidrofobik çekirdek

yüklü kimyasal türler (a) , (b) ve (c) alanlarında tutulur, (d) alanında amfifilik türler ve hidrofobik türler çekirdekte (e) ekstrakte olur [26].

Miseldeki bağlanma alanı olan hidrofobik çekirdek CP-Ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılır. Bu yüzden geliştirilmiş metodların çoğu için ana adım stabil kelat meydana getirilmesidir.

Non-iyonik veya amfoterik yüzey aktif maddeler kritik misel sıcaklıklarının üzerinde oldukları zaman sislenme noktası olayı meydana gelir. Uygun sıcaklıkta ısıtma işlemi orjinal çözeltinin iki faza ayrılmasına yardımcı olur. Diğer bir sislenme noktası yüksek asid konsantrasyonunda çalışıldığı zaman metal önderişimi ile alakalı anyonik yüzey aktif maddeler için olasıdır [27].

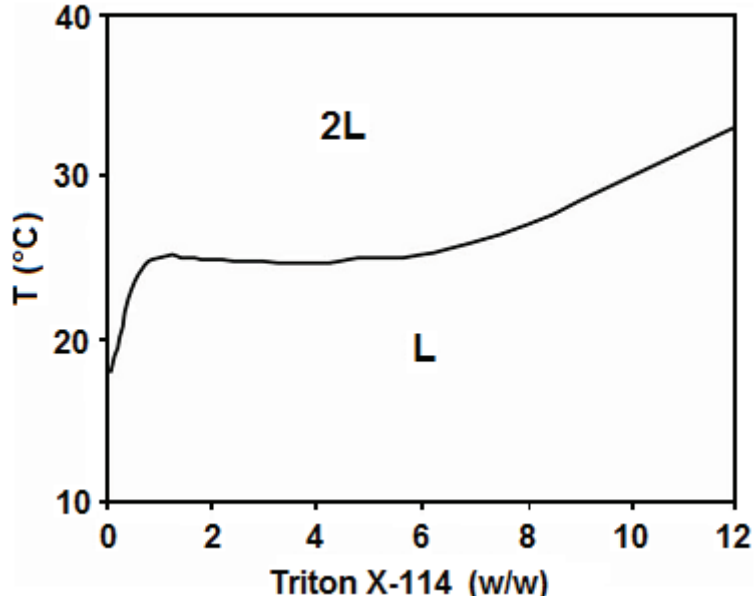
Sislenme noktasını temel alan ayırım ilk kez Watanabe ve arkadaşları [28] tarafından sulu çözeltiden çözünebilen metalik kelatların ekstrakte edilebilmesi için uygulanmıştır. CP-ekstraksiyonunda sulu çözeltiye yüzey aktif madde çözeltisi eklenir. Gerekli olduğu zaman yüzey aktif madde çözeltisi çözünürlüğüne bağlı olarak organik çözücü veya direk olarak suda çözülür. Bu çözelti sislenme noktası üzerine kadar ısıtılır ve faz ayrımı meydana gelir, santrifüjleme ile bu işlem hızlandırılabilir. Buz banyosundan faydalanarak misel fazın ayırımı sağlanarak hacimli sulu faz atılır.

Analiz işlemi öncesi, sulu faz atıldıktan sonra gerekli ise az miktarda çözme ajanı (alkol gibi) eklenebilir.



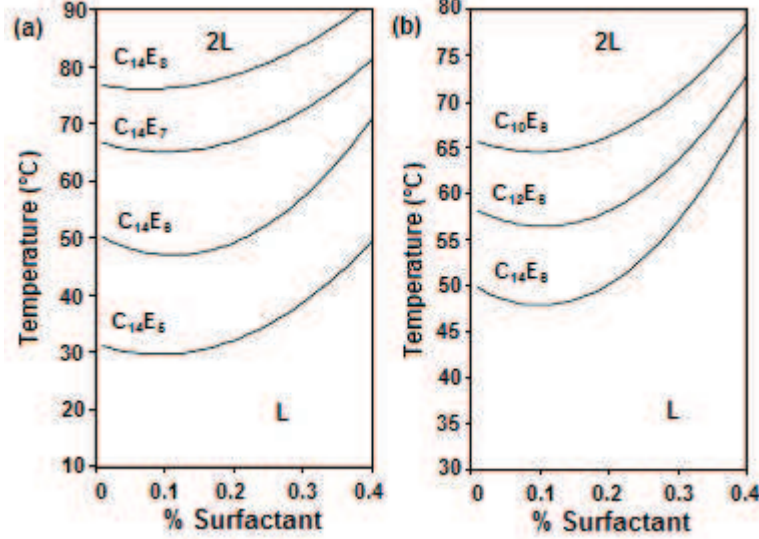
Şekil 2.4. Geleneksel CP-Ekstraksiyonun sistematik ifadesi.

Birçok denemede sislenme noktasına ulaşılmasında yaygın koşul sıcaklığın değiştirilmesidir. Faz ayrımının meydana geldiği sıcaklık yüzey aktif madde konsantrasyonunun bir fonksiyonu olup, sıcaklığın değişmesine bağlı olarak grafiği çizilebilir. Şekil 2.5' de sulu çözeltideki sislenme noktası ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılan Triton X-114' ün faz diyagramı görülmektedir.



Şekil 2.5. Sulu çözeltideki Triton X-114 non-iyonik yüzey aktif maddenin faz diyagramı.

Şekil 2.5 iki alana ayrılmıştır. L ile tanımlanan kısımda sulu çözelti tek izotropik faz sunarken 2L ile belirtilen alanda sulu fazdan misel faz ayrılır. Böylece anizotropik karışım oluşur ve daha sonra kendi arasında iki izotropik faza ayrılır. Yüzey aktif maddece fakir faz kritik misel konsantrasyonunun (CMC) altındadır.



Şekil 2.6. Monoeter glikol polioksietilen yüzey aktif maddeleri için faz diagramları.

- a-) serideki oksietilen birimlerinin etkisi: C<sub>14</sub>E<sub>5</sub>, C<sub>14</sub>E<sub>6</sub>, C<sub>14</sub>E<sub>7</sub>, C<sub>14</sub>E<sub>8</sub>  
b-) serideki karbon zinciri uzunluğunun etkisi: C<sub>10</sub>E<sub>6</sub>, C<sub>12</sub>E<sub>6</sub>, C<sub>14</sub>E<sub>6</sub>

Şekil 2.6'da oksietillenmiş non-iyonik yüzey aktif madde (C<sub>i</sub>E<sub>j</sub>) çözeltilerinin homolog serileri için faz diyagramları verilmiştir. Grafiklerde sislenme noktası sıcaklığının non-iyonik yüzey aktif madde yapısına bağlı olduğu görülmektedir. Bu yüzey aktif maddelerin homolog serileri için karbonik zincirin azaldığı veya oksietilen ünite numarasının artması ile sislenme noktası yükselir. Eğer oksietilen ünite numaraları değişmez ise karbonik zincir uzunluğunun artması ile sislenme noktası azalır [29].

Yapılan çalışmalarda yüzey aktif madde yapıları ile onların sislenme noktası arasında bazı deneysel ilişkiler bulunmuştur. Gu ve Sjobom, [30] sislenme noktası ve yüzey aktif maddenin oksietilen ünite numaralarının logaritması arasındaki lineer ilişkiye ek olarak sislenme noktası ve hidrofobik zincirdeki karbon numarası arasında da lineer bir ilişki olduğunu bulmuşlardır. Schott, [31] suda çözünebilen polioksietillenmiş non-iyonik yüzey aktif maddelerin sislenme noktası ile molekül başına oksietilen üniteleri ortalama



sayısının lineer ilişkide olduğunu bulmuştur. Poli dağıtıcı yüzey aktif maddelerin sislenme noktası hidrofilik ve lipofilik dengesi ile alakalı olabilir [32]. Huibers ve diğerleri [33] alkiletoksilat sınıfı saf non-iyonik yüzey aktif maddelerin sislenme noktasını değerlendirmek için deneysel çalışmalar yapmışlardır.

Kjellander ve arkadaşları non-iyonik yüzey aktif maddeler ve su ile biçimlenmiş sistemlerdeki fazların ayrımını açıklamak üzere bir model geliştirmişlerdir [34,35,36]. Kjellander ve diğerlerine göre daha düşük sıcaklıklarda her bir yüzey aktif maddenin molekülleri oldukça iyi düzenlenmiş su tabakası (hidrojen bağları ile polar baş grupları ve non-iyonik yüzey aktif maddelerin polioksietilen üniteleri ile düzenlenmiştir) tarafından geliştirilmiştir. Sıcaklık yükseldiği zaman, entropide yükselme meydana gelir bu da polioksietilen zincirlerinin dehidrasyonuna ve su molekülleri tabakasının hasar görmesine neden olur. Bu noktada, moleküller arasındaki zayıf Van der Waals kuvvetleri misel yığılımlarına önemli yardımlarda bulunurlar ve sonuç olarak faz ayrımı olayı meydana gelir.

Misel çözeltilerin sislenme noktası; tuz ilavesi, alkol varlığı, diğer yüzey aktif maddeler, polimerler ve bazı organik veya inorganik bileşikler ile düşürülebilir. Gu ve Galera-Gomez [37], Triton X-100'ün sulu çözeltilerinin sislenme noktasına polar organik sıvıların (alkoller, asitler, eterler, ketonlar, esterler vs) etkilerini çalışmışlardır. Sonuçta, suda kısmen çözünebilen polar organik sıvıların eklenmesi yüzey aktif maddenin sislenme noktasında düşmeye neden olurken, suda çok çözünen polar organik sıvıların eklenmesi ile yüzey aktif maddenin sislenme noktasını arttırdığını göstermişlerdir.

Diğer bir uygulama da Triton X-114'ün sislenme noktasına Triton X-100 (non-iyonik), SDS (anyonik), CTAB (katyonik) gibi yüzey aktif maddelerin eklenmesinin neden olduğu değişiklikler ve misel karışımının sislenme noktasına bazı elektrolitlerin etkisidir. Misel fazın hidrofilik karakterinin artması şu şekilde açıklanabilir ; eklenen iyonik yüzey aktif madde moleküllerinin non-iyonik misel ile birleşmesi yüzey yükünü değiştirir ve misel arasındaki itmeyi artırır, bu da onları daha hidrofilik yapar. Diğer taraftan ilave edilen diğer elektrolitler yüzey aktif madde sislenme noktasını azaltır veya artırır. Bu etkiler sırası ile 'salting-in' ve 'salting-out' olarak bilinir [38].

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Absorbans ölçümleri için kullanılan cihaz Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Ölçümler, piyasadan temin edilen, ışık kaynağı olarak tungsten lamba (Ocean Optics Inc.) ve absorbans ölçümleri için CCD temelli dedektöre sahip olan minyatür fiber optik spektrofotometre (Ocean Optics Inc., HR4000CG-UV-NIR) kullanılarak gerçekleştirildi.

Tartım için RADWAG AS 220/C/2 analitik terazi, pH ölçümleri için HANNA HI 221 Calibration Check Microprocessor pH metre, santrifüj işlemleri için Electromag M 4812P santrifüj cihazı, sıcaklık işlemleri için su banyosu, distile su üretimi için GFL distile su sistemi cihazı kullanıldı.

#### 3.2. KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler; Bilirubin ( $C_{33} H_{36} O_6 N_4$ ) (Sigma-Aldrich), Sodyum periyodat ( $NaIO_4$ ) (Merck), Triton X-114 (TX-114) (Sigma Aldrich), Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Merck), Hidroklorik asit (HCl) ( J. T. Baker ), Teknik alkol % 96, L-Askorbik asit (AA) (Merck), Salisilik asit (SA) (Merck), D-Tryptophan, minimum 98 % TLC (Triptofan) (Sigma-Aldrich), Indoxyl  $\beta$ -D-glucoside (İndican) (Sigma-Aldrich) , Sodyum klorür (NaCl) (Merck), Potasyum klorür (KCl) (Merck), Sodyum nitrat ( $NaNO_3$ ) (Merck), Sodyum hidroksit (NaOH) (Rield-de Haen).

##### 3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Bütün kimyasallar analitik saflıkta olup çözelti hazırlanmasında distile su kullanıldı.

Bilirubin suda ve asitlerde çözünmez alkali çözeltilerde çözünür. Bilirubinün kapalı formülü  $C_{33} H_{36} O_6 N_4$  ‘dir. Stok bilirubin çözeltisi ( $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ), 146 mg bilirubin tartım alınarak  $1.0 \text{ mL } 1.0 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$  ile çözüldü ve distile su ile 25 mL’ye

tamamlandı. Hazırlanan Bilirubin stok çözeltisi dayanıksızdır ve buzdolabında 2 gün saklanabilir. Seyreltik çözeltileri günlük olarak hazırlandı.

NaIO<sub>4</sub> çözeltisi (  $5.0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> ), 106.9 mg NaIO<sub>4</sub> tartım alınarak distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Triton X-114 çözeltisi (% 5.0 (v/v)), 5.0 mL derişik Triton X-114 distile su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

SDS çözeltisi (% 2.0 (w/v)), 2 g SDS tartım alınarak distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

HCl çözeltisi (  $\sim 6.0$  mol L<sup>-1</sup> ), 50 mL derişik HCl çözeltisi (  $\sim 12.0$  mol L<sup>-1</sup> ) distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

NaOH çözeltisi (  $1.0$  mol L<sup>-1</sup> ), 4 g NaOH tartım alınarak distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Stok Askorbik asit (AA) çözeltisi (  $1.0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> ), 44 mg AA tartım alınarak distile su ile 25 mL'ye tamamlandı. Çözelti günlük olarak hazırlandı.

Stok Salisilik asit (SA) çözeltisi (  $1.0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> ), 34.5 mg SA tartım alınarak 1.0 mL 1 mol L<sup>-1</sup> NaOH ile çözüldükten sonra distile su ile 25 mL'ye tamamlandı.

Stok Triptofan çözeltisi (  $1.0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> ), 51.1 mg Triptofan tartım alınarak 1 mL 1 mol L<sup>-1</sup> NaOH ile çözüldükten sonra distile su ile 25 mL'ye tamamlandı.

Stok İndican çözeltisi (  $1.0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> ), 73.8 mg İndican tartım alınarak 1 mL 1 mol L<sup>-1</sup> NaOH ile çözüldükten sonra distile su ile 25 mL'ye tamamlandı.

Çalışma çözeltileri stok çözeltilerden gerekli seyreltmeler yapılarak hazırlandı. Çözeltiler (Askorbik asit, Salisilik asit, Triptofan ve İndican) koyu renkli balon jode buzdolabında saklandı.

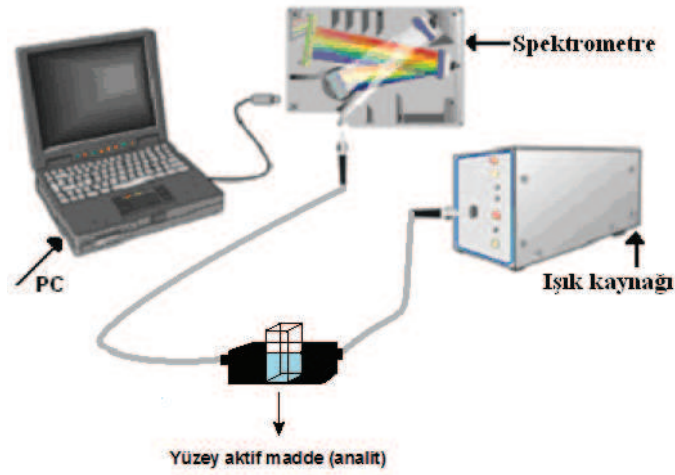
### 3.3. UYGULANAN YÖNTEMLER

#### 3.3.1. Çalışma Metodu

Santrifüj tüplerine 1 mL ( $5.0 \times 10^{-7}$  -  $6.0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) Bilirubin, 0.1 mL % 2 sodyum dodesil sülfat (SDS), 0.5 mL 6.0 mol L<sup>-1</sup> HCl ve  $5.0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> NaIO<sub>4</sub>'ten 1.5 mL ilave edilip 9.5 mL'ye seyreltildi. 50 °C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra ortama 0.5 mL %5 TX-114 (v/v) ilave edildi. Tüpler karıştırılıp 4000 devirde 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda dipteki viskoz mavi TX-114 fazının üzerinde kalan sulu faz dikkatlice bir pipet yardımıyla ayrıldı. Viskoz TX-114 fazı çözmek için son hacim 0.5 mL olacak şekilde etil alkol ile seyreltildi. Fiber optik spektrofotometresiyle çözeltinin absorbansı  $\lambda=693$  nm'de reaktif körüne karşı okundu.

#### 3.3.2. Absorbans Ölçümü

Absorbans ölçümleri ticari, minyatür fiber optik esaslı (Ocean Optics PC 4000) spektrometre ile gerçekleştirildi. Işık kaynağı olarak Tungsten halojen lamba (Ocean Optics) ve CCD (charge-coupled-device) esaslı dedektör kullanıldı. CP-Ekstraksiyonu sonrasında yüzey aktif maddece zengin fazın absorbansının ölçülmesi için dizayn edilen model Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Ölçümler kuvarz küvetlerde yapıldı.



Şekil 3.1. Absorbans ölçüm düzeneği

### 3.3.3. Sislenme Noktası Ekstraksiyonunun Optimizasyonu

Sıcaklığa bağlı reaksiyon süresi,  $\text{NaIO}_4$  ve tuz etkisi, HCl ve Triton X-114 konsantrasyonu gibi farklı değişkenlerin ekstraksiyon işlemi üzerindeki etkileri çalışıldı.

#### 3.3.3.1. Sıcaklık Etkisi

Ekstraksiyon işlemi üzerinde değişkenlerin etkilerinden biri sıcaklıktır. Sıcaklığa bağlı olarak reaksiyon süresi belirlendi. Sıcaklık etkisini belirlemek için 25 ile 60 °C aralığında çalışıldı. Uygun sıcaklık ve reaksiyon süresi belirlendi. Denemelerde kullanılan bilirubin konsantrasyonu 1.17 mg L<sup>-1</sup> olup  $\lambda=693$  nm'de absorbans değerleri okundu.

#### 3.3.3.2. HCl Konsantrasyonunun Etkisi

Reaksiyonun önemli değişkenlerinden biri olan HCl konsantrasyonunu belirlemek için 0-0.9 mol L<sup>-1</sup> konsantrasyonları arasında çalışıldı. Denemelerde kullanılan bilirubin konsantrasyonu 1.17 mg L<sup>-1</sup> olup  $\lambda=693$  nm'de absorbans değerleri okunarak en uygun HCl konsantrasyonu seçildi.

#### 3.3.3.3. Triton X-114 Konsantrasyonunun Etkisi

Çalışmalarda farklı miktarlarda (% 0.05 - % 1 (v/v)) Triton X-114 kullanılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Denemelerde kullanılan bilirubin konsantrasyonu 1.17 mg L<sup>-1</sup> olup  $\lambda=693$  nm'de absorbans değerleri okunarak en uygun Triton X-114 konsantrasyonu seçildi.

#### 3.3.3.4. $\text{NaIO}_4$ etkisi

Bilirubinün yükseltgenmesi için çeşitli yükseltgen maddeler denendi ve en uygun madde olarak  $\text{NaIO}_4$  seçildi.  $5.0 \times 10^{-6}$ - $5.0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> konsantrasyonları arasında çalışıldı. Denemelerde kullanılan bilirubin konsantrasyonu 1.17 mg L<sup>-1</sup> olup  $\lambda=693$  nm'de absorbans değerleri okunarak en uygun  $\text{NaIO}_4$  konsantrasyonu belirlendi.

#### 3.3.3.5. Sodyum Dodesil Sülfat Konsantrasyonunun Etkisi

Yapılan çalışmalarda Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)'ın CP-Ekstraksiyon sistemi üzerine etkisine test edildi Denemelerde kullanılan bilirubin konsantrasyonu 1.17 mg L<sup>-1</sup> olup  $\lambda=693$  nm'de absorbans değerleri okunarak SDS etkisi incelendi.

### 3.3.3.6. *Tuz Konsantrasyonunun Etkisi*

Yapılan çalışmalarda çeşitli inert tuzlar denenerek tuzun CP-Ekstraksiyon sistemi üzerine etkisi araştırıldı. Denemelerde kullanılan bilirubin konsantrasyonu  $1.17 \text{ mg L}^{-1}$  olup  $\lambda=693 \text{ nm}$ 'de absorbans değerleri okunarak tuz etkisi incelendi.

### 3.3.3.7. *Analitik parametreler*

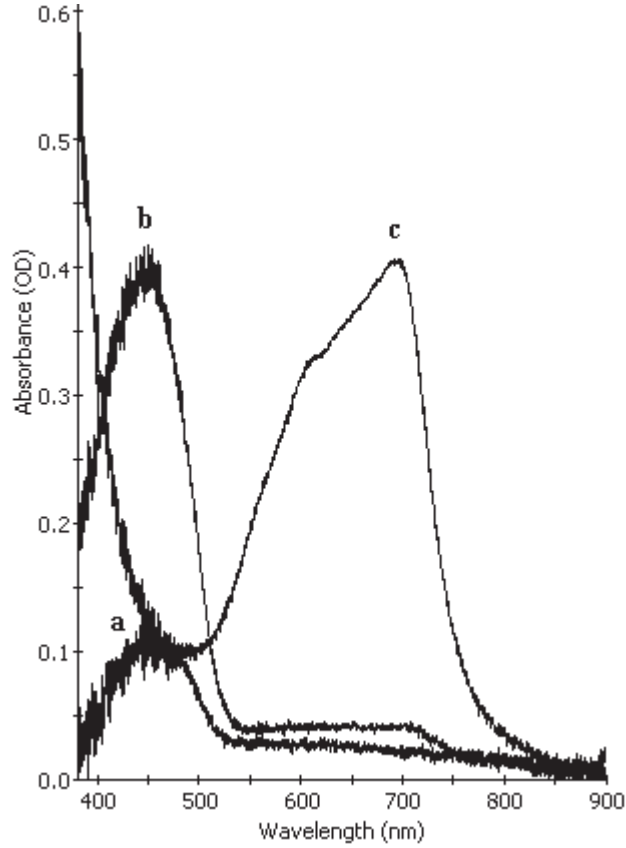
CP-Ekstraksiyon sistemi optimize edildikten sonra metodun analitik parametreleri değerlendirildi. Kalibrasyon grafiği farklı konsantrasyonlardaki bilirubin çözeltileri ile elde edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. BİLİRUBİNİN ABSORPSİYON SPEKTRUMU

CP-Ekstraksiyon sonrası ve ekstrakte etmeden bilirubinun absorpsiyon spektrumları incelendi. Ortamda  $\text{NaIO}_4$  varlığında renk sarıdan önce yeşile sonra maviye dönmektedir. Maksimum absorpsiyon spektrumu  $\lambda=693 \text{ nm}$ 'de verdi.

Bilirubin ( $1.17 \text{ mg L}^{-1}$ ) sulu çözelti (a), CPE sonrası (b) ve asidik ortamda  $\text{NaIO}_4$  varlığında CPE sonrası (c) absorpsiyon spektrumları Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



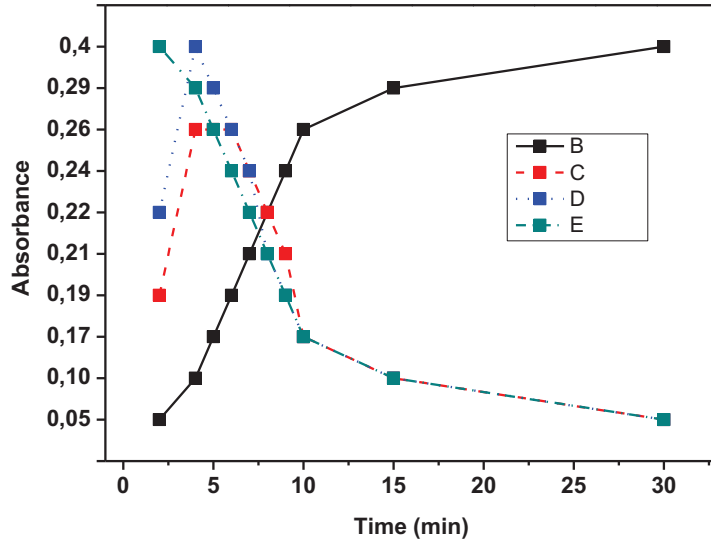
**Şekil 4.1.**  $1.17 \text{ mg L}^{-1}$  Bilirubin (a), Bilirubinun CPE sonrası ( $\text{NaIO}_4$  ilavesiz) (b) ve  $\text{NaIO}_4$  varlığında CPE sonrası (c) absorpsiyon spektrumları.

Ekstraksiyon şartları:  $1.17 \text{ mg L}^{-1}$  Bilirubin , % 0.02 SDS (w/v), %0.25 TX-114,  $7.5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$   $\text{NaIO}_4$ ,  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$  HCl.

## 4.2. DEĞİŞKENLERİN ETKİSİ

### 4.2.1. Sıcaklık Etkisi

CP-Ekstraksiyon metodunda çözeltinin inkübasyon zamanı ve inkübasyon sıcaklığı ekstraksiyon işleminin başarısı açısından önemli bir analitik parametredir. İnkübasyon sıcaklığının düşük, süresinin kısa olması ve bunlara bağlı olarak etkin ayırma arzulanan bir durumdur. İnkübasyon zamanındaki artış ortamda bulunan türlerin etkileşim süresini artırmaktadır ve bu durum CPE işleminin başarısına pozitif bir katkı sağlamaktadır. Bundan dolayı inkübasyon zamanı ve inkübasyon sıcaklığı araştırıldı. İnkübasyon sıcaklığı 25 ile 60 °C arasında araştırıldı. Etkin inkübasyon sıcaklığının 50 °C olduğu bulundu. İnkübasyon zamanı 5-30 dakika arasında araştırıldı. Oda sıcaklığında (25 °C) maksimum absorbansa 30 dakika sonunda ulaşıldığı Şekil 4.2.1’de gösterilmiştir. Bu reaksiyon süresinin sıcaklığa bağlı olarak azaldığı ve 50 °C’de 2 dakikada maksimum absorbansa ulaşıldığı gözlemlendi. Grafikte B-25 °C, C-40°C, D-50°C, E-60°C’yi göstermektedir.



Şekil 4.2. Bilirubinün CPE üzerine sıcaklık ve zaman etkisi grafiği

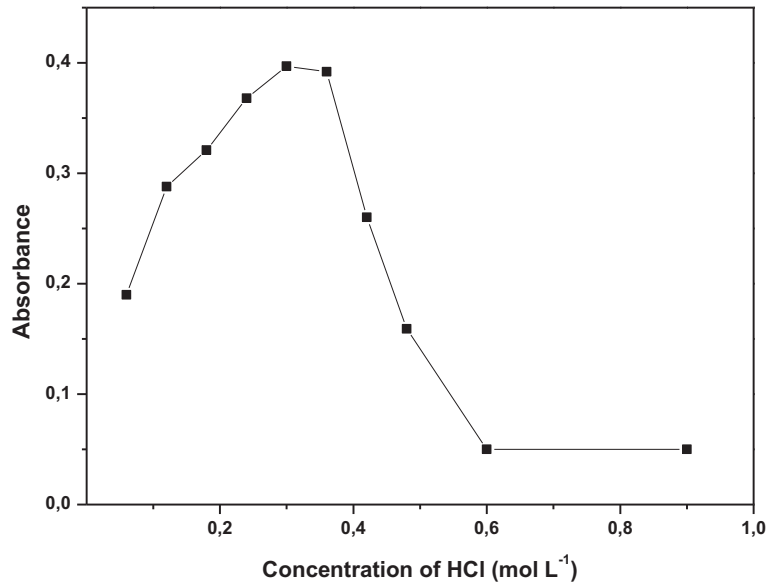
Ekstraksiyon şartları: 1.17 mg L<sup>-1</sup> Bilirubin , % 0.02 SDS (w/v), %0.25 TX-114, 7.5x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> NaIO<sub>4</sub>, 0.3 mol L<sup>-1</sup> HCl.



#### 4.2.2. HCl Konsantrasyonunun Etkisi

Organik ve inorganik maddelerin misel ortam içerisine çekilerek uygun verime ulaşabilmesi için ortamın pH'ı önemli bir parametredir. Çalışma ortamı asidik bölgeye kaydıkça ortamdaki (+) yüklü iyon miktarı artmakta ve bu durum yüzey aktif maddenin hidrofilik baş kısmının çözelti ortamı içerisinde aktivitesini engelleyici etki göstermektedir. Ancak bu etki yüzey aktif maddeye göre değişiklik göstermektedir.

HCl konsantrasyonunun Bilirubin ( $1.17 \text{ mg L}^{-1}$ ) CP-Ekstraksiyonu üzerine etkisi araştırıldı. Deneylerde  $0-0.9 \text{ mol L}^{-1}$  HCl çözeltileri kullanılıp sonuçlar Şekil 4.3'de gösterildi. Bilirubin oksidasyonu asit konsantrasyonuna bağlıdır. Şekil 4.2.2'de de görüldüğü gibi HCl konsantrasyonunun artmasıyla absorbans artmış ve  $0.25 - 0.35 \text{ mol L}^{-1}$  HCl konsantrasyonu aralığında sabit kalmıştır. Daha yüksek HCl konsantrasyonlarında ise absorbans kademeli olarak azalmıştır. Bu çalışmada  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$  HCl konsantrasyonu seçildi ve bundan sonraki deneysel çalışmalarda  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$  HCl konsantrasyonu kullanıldı.

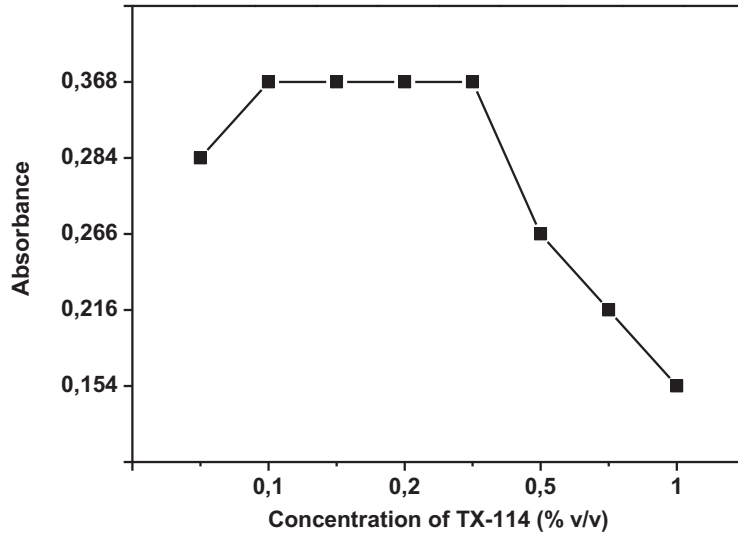


Şekil 4.3. Bilirubin CPE üzerine HCl etkisinin grafiği

Ekstraksiyon şartları:  $1.17 \text{ mg L}^{-1}$  Bilirubin, % 0.02 SDS (w/v), %0.25 TX-114,  $7.5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  NaIO<sub>4</sub>.

#### 4.2.3. TX-114 Konsantrasyonunun Etkisi

Yüzey aktif madde konsantrasyonu CP-Ekstraksiyonunu etkileyen önemli parametrelerden biridir. Yapılacak ayırma işlemleri için en verimli yüzey aktif madde konsantrasyonu değeri genellikle dar bir aralıkta gözlenir. Yüzey aktif madde konsantrasyonu önderiştirme faktörü ile yakından ilişkilidir. Yüzey aktif madde hacmi ve önderiştirme faktörü yüzey aktif maddenin yapısına ve konsantrasyonuna bağlıdır. Artan önderiştirme faktörü; işlemin uygulanabilirliğini, tekrarlanabilirliğini ve verimliliğini ters yönde etkilemektedir. Önderiştirme faktörü artışına bağlı olarak tekrarlanabilirlik azalmaktadır. Bilirubin CP-Ekstraksiyonu üzerine non-iyonik yüzey aktif TX-114 etkisi araştırıldı. TX-114 konsantrasyonu 0.05-1 % (v/v) aralığında denendi. Maksimum absorbans değerine % 0.1 TX-114 konsantrasyonunda ulaşıldı. Absorbansın % 0.1-0.25 TX-114 konsantrasyon aralığında sabit olduğu ve daha yüksek TX-114 konsantrasyonlarında yüzey aktif maddece zengin fazın hacminin arttığı buna bağlı olarak absorbansın kademeli olarak düştüğü gözlemlendi. Bu çalışmada önderiştirme faktörünün büyük olması için % 0.1 TX-114 (v/v) seçildi.

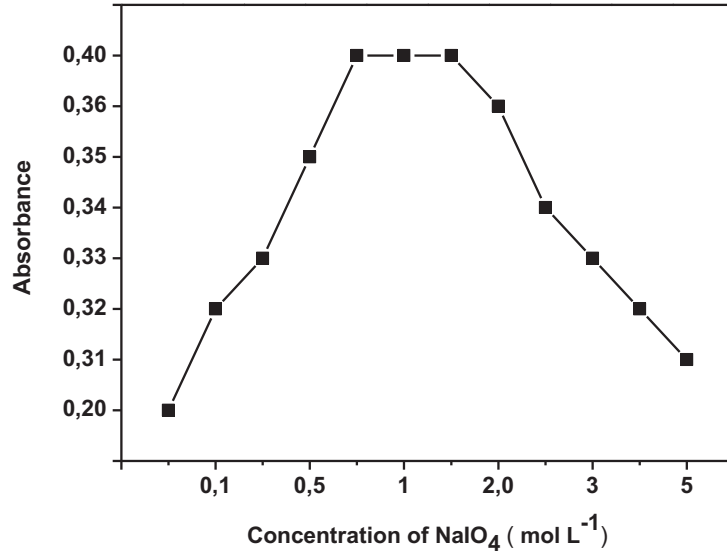


Şekil 4.4. Bilirubin CPE üzerine TX-114 etkisinin grafiği

Ekstraksiyon şartları:  $1.17 \text{ mg L}^{-1}$  Bilirubin , % 0.02 SDS (w/v),  $7.5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  NaIO<sub>4</sub>,  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$  HCl.

#### 4.2.4. NaIO<sub>4</sub> Konsantrasyonunun Etkisi

Bilirubin havayla temas ettiğinde havanın oksijeni ile kendiliğinden yükseltgenir. Ancak bu yükseltgenme hızı yavaştır ve tamamen yükseltgenmesi için hava oksijeni yeterli değildir. Bu çalışmada Bilirubinün yükseltgenmesi için çeşitli yükseltgen maddeler örneğin Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve NaIO<sub>4</sub> denendi. Bu yükseltgenler arasında bilirubinün ekstraksiyonu için maksimum performansı NaIO<sub>4</sub> 'ın verdiği gözlemlendi. Bundan dolayı bu çalışmada yükseltgen olarak NaIO<sub>4</sub> çözeltisi kullanıldı. NaIO<sub>4</sub> etkisi  $5.0 \times 10^{-6}$ - $5.0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> konsantrasyon aralığında çalışıldı. Elde edilen deneysel sonuçlar Şekil.4'de gösterildi. Şekil.4'de görüldüğü gibi NaIO<sub>4</sub> konsantrasyonunun artmasıyla birlikte absorbans değerinin arttığı ve  $7.5 \times 10^{-4}$ - $1.5 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> konsantrasyon aralığında sabit kaldığı ve daha yüksek NaIO<sub>4</sub> konsantrasyonlarında absorbans değerlerinin kademeli olarak azaldığı gözlemlendi. Bu çalışmada  $7.5 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> NaIO<sub>4</sub> optimum olarak bulundu ve bundan sonraki deneysel çalışmalarda da bu konsantrasyon kullanıldı.



Şekil 4.5. Bilirubinün CPE üzerine NaIO<sub>4</sub> etkisinin grafiği

Ekstraksiyon şartları: 1.17 mg L<sup>-1</sup> Bilirubin , % 0.02 SDS (w/v), 0.3 mol L<sup>-1</sup> HCl, %0.25 TX-114.

#### 4.2.5. Sodyum Dodesil Sülfat Konsantrasyonunun Etkisi

CP-Ekstraksiyonu özel amaçlı uygulamaları için yüzey aktif madde karışımları (noniyonik, katyonik, anyonik v.s) ya da ortama kimyasal madde ilavesi yapılarak yeni modifiye çözelti sistemleri oluşturulabilir. Bu işlem sonucunda CPE sıcaklığı ve CPE verimi üzerinde oynamalar yapılarak ekstraksiyonun verimi artırılabilir. Bu çalışmada bilirubinun maksimum verimle ekstraksiyonu için sodyum dodesil sülfat kullanıldı. Tuz ilavesiz ve SDS varlığında CPE sıcaklığı artarken az miktarda tuz varlığında CPE sıcaklığı düşer. Bu deneyde % 2.0 (w/v) SDS nin 1 mL'si maksimum ekstraksiyon için yeterli oldu.

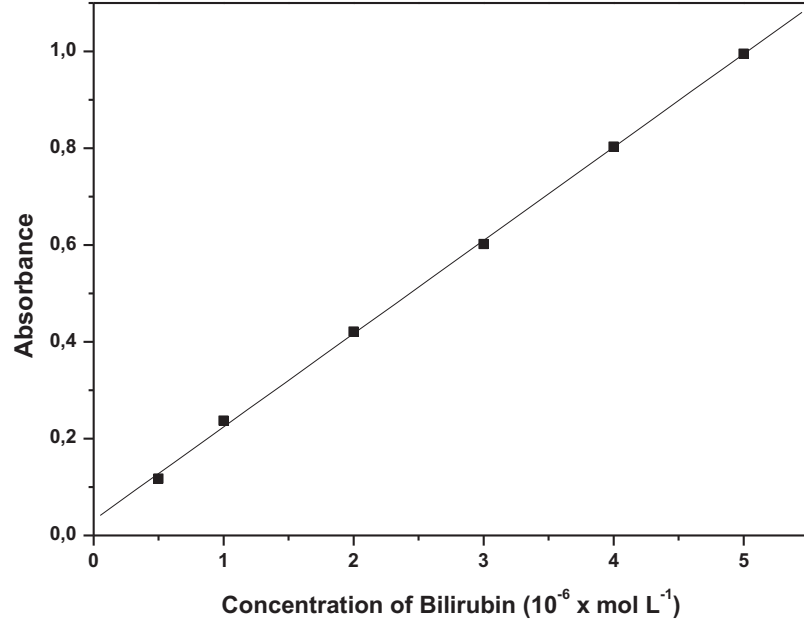
#### 4.2.6. Tuz Konsantrasyonunun Etkisi

Yüzey aktif madde içeren bir çözelti ortamına elektrolit tuz ilavesi sonucu faz ayırma işleminin kolaylaştığı tespit edilmiştir. Ortama tuz ilave edildiği zaman veya tuz konsantrasyonu artırıldığı zaman misel boyutu ve toplanma katsayısı artmaktadır. Bundan dolayı bu çalışmada çeşitli inert tuzların CPE üzerine etkisi araştırıldı. NaCl, KCl ve NaNO<sub>3</sub> gibi tuzların iyonik şiddetleri aynıdır. Bundan dolayı tuz olarak NaCl seçildi ve CPE üzerine etkisi % 0-2 (w/v) NaCl arasında araştırıldı. Yapılan deneysel çalışmalarda tuz konsantrasyonunun CPE üzerine etkisi olmadığı gözlemlendi. Dolayısıyla bundan sonraki çalışmalarda tuz ilavesiz çalışıldı.

#### 4.2.7. Analitik Parametreler

CP-Ekstraksiyon sistemi optimize edildikten sonra metodun değerlendirilen analitik parametrelerine göre sistemin kalibrasyon doğrusu 10 mL standart çözeltiler kullanılarak optimum reaksiyon koşullarında elde edildi. Çalışma aralığı  $5.0 \times 10^{-7}$ - $6.0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> olarak seçilen bilirubinun doğru denklemi  $A=0,193C + 0,032$  ve korrelasyon katsayısı  $r=0,9994$  olarak bulundu. Metodun relatif standart sapması (RSD)  $2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> ve  $8 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> bilirubin kullanılarak ve ölçüm 5 kez tekrarlanarak sırasıyla % 1,78 ve % 0.78 olarak bulundu. Metodun belirtme sınırı  $C_L:3S_B/m$  ifadesinden hesaplandı ve  $1.0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> bulundu (Bu denklemde  $C_L$ =tayin sınırı,  $S_B$ =Blankın standart sapması,  $m$ =doğru denkleminin kayım değeri).

Sistemin önderiştirme faktörü  $PF=V_{yaf}/V_{sf}$  denkleminde hesaplandı, 20 bulundu. (Burada  $V_{yaf}$ =yüzey aktif madde son hacmi,  $V_{sf}$ =sulu faz hacmi).



**Şekil 4.6.** Optimum koşullar altında Bilirubin analizi için  $0.29\text{-}2.92 \text{ mg L}^{-1}$  Bilirubin konsantrasyonları arasındaki lineerlik eğrisi

#### 4.2.8.Çözücü Etkisi

Viskoz yüzey aktif maddece zengin TX-114 fazını çözerek absorban ölçümüne hazır hale getirmek için Asetonitril, Tetrahidrofuran (THF), Aseton, Metanol, Etanol gibi çeşitli çözücüler denenmiştir. En uygun çözücü etanol olarak seçilmiştir.

### 4.3. GİRİŞİM YAPAN MADDELERİN ETKİSİ

Optimum koşullar altında  $1.17 \text{ mg L}^{-1}$  Bilirubin analizinde girişim yapan maddelerin etkileri ayrı ayrı incelendi. Sonuçlar Tablo 4.1’de gösterildi.

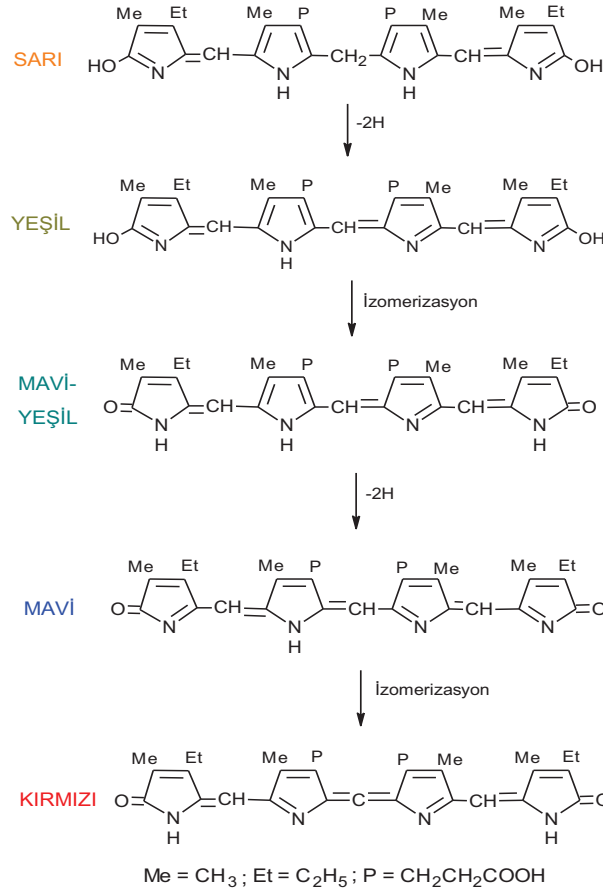
**Tablo 4.1.**  $1.17 \text{ mg L}^{-1}$  Bilirubin tayininde girişim yapan maddelerin etkileri (n=3)

<b>Girişim yapan maddeler</b>	<b>Girişim yapan maddelerin konsantrasyonu (<math>\text{mg L}^{-1}</math>)</b>	<b>(Girişim yapan madde/Analit)* Kütle oranı</b>	<b>Hata (%)</b>
Askorbik Asit	7.04	0.6	-1
İndican	59.1	5	-5
Salisilik Asit	27.6	2.5	-4
Triptofan	40.8	4	-1

\*Bilirubin başlangıç konsantrasyonu  $11.7 \text{ mg L}^{-1}$ , son konsantrasyonu  $1.17 \text{ mg L}^{-1}$

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Serum ve idrarda en çok kullanılan Bilirubin tayin yöntemi kuvvetli asidik ortamda Bilirubinün *p*-dimetilaminobenzaldehid (*p*-DMABA) ile vermiş olduğu Ehrlich aldehid reaksiyonudur [39]. Literatürde bilirubin tayini ile ilgili çeşitli spektrofotometrik analitik yöntemler mevcuttur. Bilirubinün spektrofotometrik tayin yöntemleri genellikle kuvvetli asidik ortamda diazo-coupling diazo boyar maddesi reaksiyonu üzerine kurulmuş olan yöntemler olup reaktif olarak diazolanmış sülfanilik asit [40], 2,5-diklorobenzendiazonyum [41], 3-nitroanilin ve 2,4-diklorofenildiazonyum (2,4-DCPD) [42] gibi reaktifler kullanılır. Diazo-coupling reaksiyonu üzerine kurulmuş olan bu yöntemler zahmetli ve zaman alıcı yöntemlerdir.



Şekil 5.1. Bilirubinün Tiedemann & Gmelin tarafından önerilen reaksiyonları [43]

Bu çalışmada bilirubin daha basit bir yöntemle spektrofotometrik olarak tayin edildi. Bu tez çalışmasında kuvvetli asidik ortamda ( $0.6 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ ) kuvvetli bir yükseltgen ( $\text{NaIO}_4$ ) varlığında Bilirubinin yükseltgenmesiyle oluşan mavi renkli ürünün sislenme noktası ekstraksiyonu (CPE) sonrası fiber optik spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanan bir yöntem geliştirildi. Bilirubinin sislenme noktası ekstraksiyonu Tiedemann & Gmelin [43] tarafından önerilen reaksiyon baz alınarak gerçekleştirildi. Yöntem serum ve idrar örneklerine kolaylıkla uygulanabilecek bir yöntemdir. İdrar örneklerinde bulunabilecek bilirubinin önderiştirme sonrası tayini mümkün olacaktır. Reaksiyonun yürüyüşü Şekil 5.1’de gösterildiği gibidir. Bilirubinin yükseltgenme ürünü sulu ortamda kararlı olmamasına karşılık yüzey aktif madde fazında son derece stabildir.



## KAYNAKLAR

1. SAĞLAM, S., 2010, *Bilirubin Biyosensör Tasarımı ve Üretimi*, Yüksek Lisans, Başkent Üniversitesi.
2. ROLINSKI B, KUSTER H, UGELE B, GRUBER R, HORN K, 1997, Total bilirubin measurement by photometry on a blood gas analyzer: potential for use in neonatal testing at the point of care, *Clin. Chem.*, 47 (10): 1845–7,1997.
3. GROHMANN K, ROSER M, ROLINSKI B, KADOW I, MULER C, GOERLACH-GRAW A, NAUCK M, VE KUSTER H, 2006, Bilirubin Measurement for Neonates: Comparison of 9 Frequently Used Methods, *Pediatrics*, 117 (4), 1174 – 1183.
4. FEVERY J., 2008, Bilirubin in clinical practice: a review, *Liver International* ,8 (5), 592-605
5. DOUMAS B. T., SASSE, F. B. W., STRAUMFORD JR., E. A., 1973, Standardization in Bilirubin Assays: Evaluation of Selected Methods and Stability of Bilirubin Solutions, *Clin. Chem.*, 19 (8), 984–993
6. WANG J., LUO D.B., FARIAS, P. A. M., J., 1985, Determination of bilirubin by adsorptive stripping voltammetry , *Electroanal. Chem.*, 185 (1), 61–71.
7. LU C., LIN J. -M., HUIE C. W., 2004, Determination of total bilirubin in human serum by chemiluminescence from the reaction of bilirubin and peroxyxynitrite , *Talanta*, 63 (2), 333–337.
8. KOCH T. R., OAKINGBE O., 1981, Feasibility of Measuring Free and Total Bilirubin Electrochemically in Serum, *Clin. Chem.*, 27, 1295–1298.

9. WU N., HORVATH W. J., HUIE C. W., 1992, Light emission from bilirubin using the peroxyoxalate chemiluminescence reaction, *Anal. Chim. Acta*, 269 (1), 99–107.
10. KOHASHI K., DATE Y., MORITA M., TSURUTA T., 1998, Fluorescence reaction of bilirubin with zinc ion in dimethyl sulfoxide and its application to assay of total bilirubin in serum, *Anal Chim. Acta*, 365 (1), 177–182.
11. BERGMAYER H. U., 1985, *Methods of Enzymatic Analysis, Methods of Enzymatic Analysis: Volume 8: Metabolites 3: Lipids, Amino Acids and Related Compounds*, VCH, U.S.A., 352726048X
12. MURAO S., TANAKA N., 1981, A new Enzyme “Bilirubin Oxidase” produced by *Myrothecium verrucaria* MT-1, *Agric. Biol. Chem.*, 45 (10), 2383–2389.
13. PALILIS L.P., CALOKERINOS A. C., GREKAS, N., 1996, Chemiluminescence arising from the oxidation of bilirubin in aqueous media, *Anal. Chim. Acta*, 333 (3), 267–275.
14. VIDAL M. M., DELGADILLO I., GIL, M. H., ALON, J. C., 1996, Study of an enzyme coupled system for the development of fibre optical bilirubin sensors, *Biosens. Bioelectron.*, 11 (4), 347–354.
15. MULLON C. J. P., LANGER R. C., 1987, Determination of conjugated and total bilirubin in serum of neonates, with use of bilirubin oxidase, *Clin. Chem.*, 33 (1), 1822–1825.
16. KUROSAKA K., SENBA S., TSUBOTA H., KONDO H., 1998, A new enzymatic assay for selectively measuring conjugated bilirubin concentration in serum with use of bilirubin oxidase, *Clin. Chim. Acta*, 269 (2), 125–136.
17. GUO Y. Z., DONG S. J., 1997, Organic Phase Enzyme Electrodes Based on Organohydrogel, *Anal. Chem.*, 69 (10), 1904–1908.

18. LU C., SONG G., LIN J-M., HUIE C. W., 2007, Enhancement in sample preconcentration by the on-line incorporation of cloud point extraction to flow injection analysis inside the chemiluminescence cell and the determination of total serum bilirubin, *Anal. Chim. Acta*, 590 (2), 159–165.
19. DAĞOĞLU T, OVALI F., 2008, *Neonatoloji*, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 9789754205558.
20. ÇOBAN A., 2002, *Yenidoğan patolojik sarılıklarına yaklaşım ve tedavi:Pediatridir. 3. baskı*, İçinde: Neyzi O, Ertuğrul T, editörler., Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
21. DEMİRSOY, U., 2008, *İndirekt hiperbilirubinemi nedeniyle Fototerapi alan term yenidoğanlarda İntravenöz sıvı desteğinin bilirubin seviyesi üzerine etkisi*, Uzmanlık, T.C.Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi
22. HINZE, W.L., PRAMAURO, E., 1993, A critical review of surfactant-mediated phase separations (cloud point extractions)—Theory and applications, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 24 (2), 133–177.
23. STALIKAS, C.D., 2002, Micelle mediated extraction as a tool for separation and preconcentration in metal analysis, *Trends Anal. Chem.*, 21 (5), 343–355.
24. MYERS, D., 1991, *Surfaces, Interfaces and Colloids*; VCH: New York, 1-56081-033-5.
25. MANIASSO, N., 2001, Ambientes micellares em química analítica, *Quim. Nova.*, 24 (1), 87–93.
26. PELIZZETTI, E., PRAMAURO, E., 1985, Analytical applications of organized molecular assemblies, *Anal. Chim. Acta.*, 169 (1), 1–29.

27. CASERO, I., SICILIA, D., RUBIO, S., PEREZ-BENDITO, D., 1999, An acid-induced phase cloud point separation approach using anionic surfactants for the extraction and pre-concentration of organic compounds, *Anal. Chem.*, 71 (20), 4519–4526.
28. WATANABE, H., TANAKA, H., 1978, A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid extraction of zinc(II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol, *Talanta*, 25 (10), 585–589.
29. INOUE, T., OHMURA, H., MURATA, D., 2003, Cloud point temperature of polyoxyethylene-type nonionic surfactants and their mixtures, *J. Coll. and Interf. Sci.*, 258 (2), 374–382.
30. GU, T.R., SJOBLUM, J., 1992, Surfactant structure and its relation to the krafft point, cloud point and micellization—Some empirical relationships, *Coll. and Surf. A.*, 64 (1), 39–46.
31. SCHOTT, H., 2003, A linear relation between the cloud point and the number of oxyethylene units of water-soluble nonionic surfactants valid for the entire range of ethoxylation, *J. Coll. and Interf. Sci.*, 260 (1), 219–224.
32. MATERNA, K., COTE, G., SZYMANOWSKI, J., 2004, Cloud point of aqueous solutions containing oxyethylated methyl dodecanoates: Effects of surfactant hydrophilicity, nature of added electrolyte, and water activity, *J. Coll. and Interf. Sci.*, 269 (2), 466–471.
33. HUIBERS, P.D.T., SHAH, D.O., KATRITZKY, A.R., 1997, Predicting surfactant cloud point from molecular structure, *J. Coll. Interf. Sci.*, 193 (1), 132–136.
34. INOUE, T., OHMURA, H., MURATA, D., 2003, Cloud point temperature of polyoxyethylene-type nonionic surfactants and their mixtures, *J. Coll. and Interf. Sci.*, 258 (2), 374–382.

35. SILVA, M.A.M., FRESCURA, V.L.A., AGUILERA, F.J.N., CURTIUS, A.J., 1998, Determination of Ag and Au in geological samples by flame atomic absorption spectrometry after cloud point extraction, *J. Anal. At. Spectrom.*, 13 (12), 1369–1373.
36. QIAO, L., EASTEAL, A.J., 1998, The interaction between triton X series surfactants and poly (ethylene glycol) in aqueous solutions, *Coll. Polym. Sci.*, 276 (4), 313–320.
37. GU, T.R., GALERA-GOMEZ, P.A., 1999, The effect of different alcohols and other polar organic additives on the cloud point of Triton X-100 in water, *Coll. and Surf. A.*, 147 (3), 365–370.
38. GU, T.R., GALERA-GOMES, P.A., 1995, Clouding of Triton X-114: The effect of added electrolytes on the cloud point of Triton X-114 in presence of ionic surfactants, *Coll. and Surf. A.*, 104 (2–3), 307–312.
39. SUZUKI Y., 1998, Spectrophotometric of Urine Bilirubin by Dimethylaminobenzaldehyde, *Anal. Sci.*, 14 (3), 602-612.
40. PONHONG K., TESHIMA N., GRUDPAN K., MOTOMIZU S., SAKAI T., 2011, Simultaneous injection effective mixing analysis system for the determination of direct bilirubin in urinary samples, *Talanta*, 87, 113-117.
41. PARVIAINEN M. T., 1997, A modification of the acid diazo coupling method (Malloy-Evelyn) for the determination of serum total bilirubin, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 57 (3) 275–280.
42. MCPHAUL L, KERSHAW M, TILQUE D, ECKFELDT JH., 1985, A 2,4-dichlorophenyl diazonium-based method for total bilirubin without interference from indican in uremic sera., *Clin. Chem.*, 31 (7), 1229-31.
43. GRAY, C. H., 1953, *The Bile Pigments*, John Wiley & Sons, Inc., New. York, ..

## ÖZGEÇMİŞ

09.02.1984 tarihinde Mersin'de doğdum. 1990 yılında başladığım ilköğretimimi Mersin İleri İlkokulu'nda tamamladım. Mersin Orta Okulu'ndaki ortaöğretimim ardından başladığım Cemile-Hamdi Ogun Y.D.A Lisesi'nden 2002 yılında mezun oldum. 2004 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandım. 2006 yılı yaz döneminde Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarında, 2007 yılı yaz döneminde Coca-Cola Mersin fabrikasında üretim departmanında kalite ve kontrol laboratuvarında stajımı yaptım. 2008 yılında lisans eğitimimi tamamlayarak İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı'nda yüksek lisans öğrenimine hak kazandım. Ekim 2010-Aralık 2011 tarihleri arasında "Kolorimetrik katı faz ekstraksiyonu-fiber optik reflektans spektroskopisiyle biyolojik sıvılarda yeni bir bilirubin ölçüm yönteminin geliştirilmesi" başlıklı TÜBİTAK projesinde proje asistanı olarak çalıştım.