



T.C

**SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEŞİTLİ İÇECEK ve GIDA ÖRNEKLERİNDE PONCEAU  
4R'NİN BELİRLENMESİ İÇİN YENİ BİR ANALİTİK  
YÖNTEMİN GELİŞTİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Serhan MERAL**

**20169209002**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Adil ELİK**

**SIVAS**

**KASIM 2019**

**Serhan MERAL'in** hazırladığı ve “**ÇEŞİTLİ İÇECEK ve GIDA ÖRNEKLERİNDE PONCEAU 4R’NİN BELİRLENMESİ İÇİN YENİ BİR ANALİTİK YÖNTEMİN GELİŞTİRİLMESİ**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANA BİLİMDALI’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Adil ELİK** .....

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

**Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Demirhan ÇITAK** .....

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

**Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Nail ALTUNAY** .....

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

**Prof. Dr. ÖZLEM PELİN CAN**

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.



*Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından **F-586** Nolu proje kapsamında desteklenmiştir.*



Bütün hakları saklıdır.

Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Serhan MERAL, 2019

*Hayatıma her yönü ile güzellikler katan eşim ve çocuklarıma...*

## ETİK

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

22.11.2019

Serhan MERAL

## KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanlığımı üstlenen, bilgi ve deneyimlerinden her zaman yararlandığım, çalışmamın her aşamasında yol gösterici ve destekleyici olan, emeğini hiçbir şekilde esirgemeyen, anlayışlı tavrıyla kendime örnek aldığım değerli hocam Doç. Dr. Adil ELİK' e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenimim süresince bilgi ve deneyimleriyle bana destek olup yol gösteren hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Nail ALTUNAY'a çok teşekkür ederim.

Bu çalışmayı F-586 kod numarası ile finansal olarak destekleyen Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Komisyon Başkanlığı'na ve tüm öğrenim hayatım boyunca yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

# ÇEŞİTLİ İÇECEK ve GIDA ÖRNEKLERİNDE PONCEAU 4R'NİN BELİRLENMESİ İÇİN YENİ BİR ANALİTİK YÖNTEMİN GELİŞTİRİLMESİ

Serhan MERAL

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Adil ELİK

2019, 41+ xiv sayfa

Bu tez çalışmasında, bazı gıda ve içecek örneklerinde (pasta ürünleri, meyve suları, süt ürünleri ve şekerli ürünler) renk vermek için kullanılan sentetik gıda boyası Ponceau 4R'nin, ultrasonik destekli-bulutlanma noktası ekstraksiyonu (UA-CPE) yardımıyla zenginleştirilmesi sonrası spektrofotometre ile belirlenmesi için, basit, ucuz, duyarlı ve seçiciliği yüksek çevre dostu analitik yöntemi geliştirildi. Ponceau 4R, pH 6.0'da Cu(II) varlığında ekstraksiyon çözücüsü olarak polietilen glikol mono-p-nonilfenil eter (PONPE 7.5) kullanılarak sulu çözeltiden özütlenmiştir. pH, metal türü ve miktarı, sıcaklık, ultrasonik etki, solvent tipi, nanyonik yüzey aktif madde türü ve konsantrasyonu gibi değişkenler en uygun şekilde optimize edilmiştir. Optimum koşullar altında, yöntemin analitik özellikleri aşağıdaki gibidir; doğrusal çalışma aralığı  $20-750 \mu\text{g L}^{-1}$ ; gözlenebilme sınırı,  $6.5 \mu\text{g L}^{-1}$ ; ve ön deriştirme faktörü, 200. Ponceau 4R'nin  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  konsantrasyonu (n: 5) için elde edilen bağıl standart sapma (% BSS) % 2.8 idi. İki farklı konsantrasyon seviyesi için geri kazanım değerleri % 94.3- 104.2 arasındaydı. Yöntemin doğruluğu ve kesinliği, gün içi ve günler arası çalışmalarla değerlendirildi. Son olarak, yöntem çeşitli gıdalarda Ponceau 4R tayinine başarıyla uygulanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Ponceau 4R, Ultrasonik destekli bulutlanma noktası ekstraksiyonu, Spektrofotometri, Gıda boyası, Gıda örnekleri



## ABSTRACT

# DEVELOPING A NEW ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINING PONCEAU 4R IN VARIOUS BEVERAGES AND FOOD SAMPLES

Serhan MERAL

Master of Science Thesis Department of Chemistry

Supervisor: Doç. Dr. Adil ELİK

2019, 41+xiv pages

In this thesis, it was aimed to develop a simple, inexpensive, sensitive and highly selective environment friendly a new analytical method for spectrophotometric determination of the synthetic food coloring Ponceau 4R, which is used to give color in some food and beverage samples (pastry products, fruit juices, milk products and sugary products) after the enrichment by ultrasonic assisted cloud point extraction (UA-CPE). Ponceau 4R was extracted from the aqueous solution by using polyethylene glycol mono-p-nonylphenyl ether (PONPE 7.5) as extraction solvent at the presence of Cu (II) at pH 6.0. Variables such as pH, metal type and amount, temperature, ultrasonic effect, solvent type, type of nanionic surfactant and concentration were optimized. Under optimum conditions, the analytical properties of the method were as follows; linear operating range 20-750  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; detection limit, 6.5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; and the pre-concentration factor, 200. The obtained relative standard deviation (RSD) for the 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  concentration of Ponceau 4R (n: 5) was 2.8%. The recovery values for the two different concentration levels were ranged from 94.3% to 104.2%. Accuracy and precision of the method were evaluated by intra day and inter-day studies. Finally, the method was successfully applied for the determination of Ponceau 4R in various foods.

**Key words:** Ponceau 4R, Ultrasonic assisted cloud point extraction, Spectrophotometry, Food coloring, Food samples

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xiii
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xiv
<b>1.GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Genel İçerik.....	1
1.2.Ponceau 4R (E 124 ) ve Kimyasal Özellikleri .....	2
1.3. Ayırma ve Zenginleştirme Yöntemleri .....	4
1.4. Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu (CPE).....	5
1.4.1. CPE avantajları.....	5
1.4.2. CPE dezavantajları .....	6
1.4.3. CPE etkilyen faktörler.....	6
1.4.3.1. Ortamın pH'ının etkisi .....	6
1.4.3.2. Ligand seçimi .....	7
1.4.3.3. Sürfaktan derişiminin etkisi .....	7
1.5. Önderiştirme .....	7
1.6. Ultrasonik Ekstraksiyon .....	8
1.6.1. Ultrasonik dalga .....	8
1.6.2. Kavitasyon oluşumu.....	9
1.6.3. Ultrasonik destekli ekstraksiyon.. .....	9
1.7. Analitik Yöntemlerin Performans Kriterleri .....	11
1.8. Amaç ve Kapsam .....	13
<b>2. MATERYAL VE METOD</b> .....	14
2.1 Kullanılan Cihazlar .....	14
2.2 Kimyasallar ve Reaktifler .....	14
2.3 Örnek Toplama ve Analize Hazırlama.....	15
2.4 Önerilen UA-CPE Yöntemi .....	16
2.5. İstatistiksel Analiz.....	17
<b>3. BULGULAR</b> .....	18
3.1 Çalışma Dalga Boyunun Seçimi .....	18
3.2 Deneysel Değişkenlerin Optimizasyonu .....	19
3.2.1 pH etkisi .....	19
3.2.2 Metal türünün ve miktarının etkisi.....	21
3.2.3 Ekstraksiyon çözücüsünün türü ve hacminin etkisi .....	22
3.2.4 Ultrasonik koşulların optimizasyonu .....	24
3.2.5 Santrifüjleme hızı ve süresinin etkisi .....	26
3.2.6 Seyreltici ajan türünün etkisi.....	26
3.2.7 Örnek hacminin etkisi .....	26
3.3 Yöntemin Analitik Parametreleri .....	27
3.4 Seçicilik Çalışması .....	28
3.5 Validasyon Çalışmaları .....	29

3.6 Yöntemin Uygulaması .....	30
3.7 Yöntem Karşılaştırılması .....	32
<b>4. SONUÇLAR .....</b>	<b>33</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>36</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>41</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 Ponceau 4R'nin kimyasal yapısı.....	3
Şekil 1.2 Ultra ses spektrumu .....	9
Şekil 1.3 Ultra ses destekli analitiksel işlem basamakları .....	10
Şekil 2.1 Önerilen yöntemin deneysel basamakları.....	17
Şekil 3.1 Optimum koşullarda elde edilen spektrumlar.....	19
Şekil 3.2 pH etkisi.....	20
Şekil 3.3 Tampon hacminin etkisi. ....	21
Şekil 3.4 Metal türlerinin etkisi. ....	21
Şekil 3.5 Cu(II) miktarının etkisi .....	22
Şekil 3.6 Ekstraksiyon çözücü türünün etkisi .....	23
Şekil 3.7 PONPE 7.5 miktarının etkisi .....	24
Şekil 3.8 Sıcaklığın etkisi .....	25
Şekil 3.9 Ultrasonik zamanın etkisi .....	25
Şekil 3.10 Seyreltici ajan türünün etkisi .....	26
Şekil 3.11 Örnek hacminin etkisi .....	27

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Çizelge 1.1.</b> Ponceau 4R'nin bazı kimyasal özellikleri .....	2
<b>Çizelge 3.1.</b> Önerilen yöntemin analitik özellikleri .....	28
<b>Çizelge 3.2.</b> Girişim türlerinin optimize edilmiş koşullar altında analitin geri kazanımı üzerindeki etkileri .....	29
<b>Çizelge 3.3.</b> Önerilen yöntem için doğruluk ve kesinlik çalışmaları .....	30
<b>Çizelge 3.4.</b> Önerilen yöntemin gerçek gıda örneklerine uygulama sonuçları .....	31
<b>Çizelge 3.5.</b> Önerilen yöntemle yayınlanan bazı yöntemlerin karşılaştırılması .....	32



## KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AAS:</b>	Atomik Absorpsiyon Spektrometrisi
<b>FAO:</b>	Gıda ve Tarım Örgütü
<b>WHO:</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>ADI:</b>	Günlük Alım Miktarı
<b>MSS:</b>	Mutlak Standart Sapma
<b>BSS:</b>	Bağıl Standart Sapma
<b>VK:</b>	Varvasyon Katsayısı
<b>SERS:</b>	Yüzeyle Geliştirilmiş Raman Saçılması
<b>CPT:</b>	Bulutlanma Noktası Sıcaklığı
<b>DAD:</b>	Diyot Dizisi Dedektörü
<b>FAAS:</b>	Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometresi
<b>CP:</b>	Bulutlanma Noktası
<b>GS:</b>	Gözlenebilme Sınırı
<b>CPE:</b>	Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu
<b>HPLC:</b>	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>ESI-MS:</b>	Elektrosprey Kütle Spektrometresi
<b>FIA:</b>	Akış Enjeksiyonu Analizi
<b>LLME:</b>	Sıvı-Sıvı Mikro Ekstraksiyon
<b>PONPE 7.5:</b>	Polietilen glikol mono-p-nonilfenil eter
<b>SCFE:</b>	Süper Kritik Akışkan Ekstraksiyonu
<b>SPE:</b>	Katı Faz Ekstraksiyonu
<b>SRM:</b>	Standart Referans Madde
<b>UA-CPE:</b>	Ultrasonik Destekli-Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu

# 1.GİRİŞ

## 1.1. Genel İçerik

Günümüzün en önemli konularının başında gıda güvenliğinin sağlanması gelmektedir. Gıda güvenliği, insanlara, yeterli ve dengeli beslenmelerini sağlayacak çeşitlilikte, sağlıklı ve ekonomik olarak erişilebilir gıda arzı olarak tanımlanabilmektedir [1]. Gıdaların lezzetinin ve kalitesinin değerlendirilmesinde ilk duyuşal parametre renktir [2]. Bununla birlikte gıdanın aroması ve kalitesi de renkle ilişkilidir. Tüketiciler belirli renkteki gıdalara koşullanmışlardır ve kendi beklentilerinden herhangi bir sapmayı reddetmektedirler. Renklendiricilerin, gıdaları estetik ve psikolojik bakımdan cazibeli yapmak için kullanıldığı yüzyıllardır bilinmektedir [3]. Gıdaların renklendirilmesi belirli ürünlerin istenilen estetik kalitesine izin verdiğiinden dolayı gıda endüstrisi için önemlidir. Çünkü tazelik, olgunluk ve lezzet gibi özelliklerin hepsi gıdanın rengi ile ilişkilidir. Gıda renklendiricilerine ihtiyaç duyulmasının bir nedeni de tüketiciler tarafından gıdanın daha kolay kabul edilmesini sağlamasıdır. Diğer olası nedenler, teknolojik işlemler sonrası renk kayıpları veya farklı renkli ham maddelerin kullanılmasıdır [2].

Yapılan çalışmalar gıda boyaalarının kötüye kullanımının istenmeyen etkilere yol açabileceğini kanıtılsa da, ekonomik kaygılar, yüksek etkinlik ve etkin stabilite nedeniyle pek çok gıda boyası hala yaygın olarak kullanılmaktadır [4]. Gıda boyaaları ulusal ve uluslararası çerçevede kullanımı kontrol altında olan maddelerdendir. Ayrıca yapılan çalışmalarda bazı gıda boyaalarının toksik ya da karsinojenik etkileri olduğu vurgulanmaktadır. Bu nedenle gıda boyaalarının denetlenmesi, kullanım miktarlarının belirlenmesi ve kalite kontrolünün yapılması oldukça önem arz etmektedir. Tartrazine (E-102), SunsetYellow F.C.F. (E-110), Carmoisine (Azorubin, E-122), Ponceau 4R (E-124) gibi bazı sentetik azo boyaaları ile QuinolineYellow (E-104) ve İndigotin (İndigoCarmine, E-132) gibi sentetik boyaalar; içecekler, şekerler, şaraplar, şuruplar, alkolsüz içecekler, jelatin şekerlemeler, balık yumurtaları, yoğurtlar, jeller, kekler ve dondurmalar gibi pek çok gıda maddesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [5].

Azo boyaaları endüstrinin her yerinde de yaygın olarak bulunur ve toplam boya üretiminin %70'inden fazlasını oluşturur. Bir veya çeşitli azo (-N=N-) grupları sunarlar ve genellikle sülfonatlıazo boyaalarında olduğu gibi fizikokimyasal atak ve

biyo/fotodegradasyona karşı büyük stabilite kazandıran ve böylece su akımlarında kalıcı hale gelen karmaşık yapılar gösterirler [6]. Tekstilde azo boyalarına büyük dikkat gösterilmesine rağmen, gıda katkı maddesi olarak kullanılan sentetik azo renkler günümüze kadar çok daha az araştırılmıştır.

Bunlar arasında, düşük maliyeti, yüksek çözünürlük, iyi stabilite ve etkili renklendirme avantajlarına sahip olan Ponceau 4R (AcidRed 18, Yeni Coccine veya katkı maddesi E-124), tüketicilere daha çekici hale getirmek için yaygın olarak alkollü içecekler ve alkolsüz içecekler, şekerler, unlu mamuller, şuruplar, vişne reçeli, domates sosu ve yoğurt gibi çeşitli gıda maddelerine kırmızı renk vermek için gıda endüstrisinde kullanılan bir sülfonatlı azo boyasıdır [7].

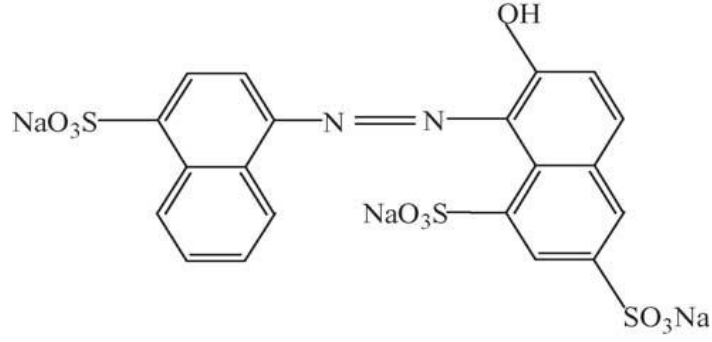
## 1.2. Ponceau 4R ve Kimyasal Özellikleri

Ponceau 4R olarak bilinen (4-sülfo-1-naftilazo)-1-hidroksi-2 naftalen-6,8-disülfonik asit trisodyum tuzu (CI 16255) sentetik bir organik azo grubu gıda renklendiricidir. Ponceau 4R'nin bazı kimyasal özellikleri çizelge 1.1. ve kimyasal yapısı şekil 1.1'de verilmiştir.

**Çizelge 1.1.** Ponceau 4R'nin bazı kimyasal özellikleri

Diğer Adları	Acidred No 18 (CI)
Sınıf	Monoazo
Renk İndeks No	16255
Formülü	$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$
Molekül Kütle	604.48 g / mol
Kimyasal Adı	Trisodyum 2- hidroksi - 1 – (4- sülfonato-1- naftilazo ) naftalen 6,8-disolfonat
Tanımlama	Kırmızımsı toz veya granüler
Maks. Dalga Boyu	Sulu çözeltide 505 nm'dir





**Şekil 1.1** Ponceau 4R'nin kimyasal yapısı

Ponceau 4R, Tartrazin ve SunsetYellow gibi izin verilen renklendiriciler düşük düzeyde alınsa bile farklı bireylerde alerjik reaksiyonlara neden olmaktadır [7]. Alerjik etkiler, ürtikerden deri iltihabına kadar değişmekle birlikte, anjio ödem ve astımlı hastaların kötüleşmesi olarak karşımıza çıkmaktadır [8]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, Ponceau 4R alımının çocukların davranışlarını etkilediğinden, tahammülsüzlük ve artan hiperaktivite prevelansından bahsetmektedir [9]. Bu durum endişeye sebep olmaktadır. Ayrıca araştırmalarda Ponceau 4R'nin aşırı miktarda tüketilmesinin üreme toksitesi, mutajenik etki, nöro-davranışsal etkiler ve potansiyel kanserojenite gibi olumsuz sağlık etkilerine neden olabileceği vurgulanmaktadır [10]. Yüksek düzeylerde Ponceau 4R içeren belirli ürünlerin de çocuklarda dil iltihabı semptomları sergilediği rapor edilmektedir [10]. Bununla birlikte yıllardır süregelen epidemiyolojik çalışmalarda gıda boya endüstrisinde kullanılan aromatik aminlere uzun süre maruz kalan çalışanlarda kanser gelişme riskinin yükseldiği belirtilmektedir.

Ponceau 4R kullanımı kesinlikle kanun ve yönetmeliklerle kontrol edilmektedir. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tavsiyelerine göre kabul edilebilir günlük alım miktarı (ADI) 0-4.0 mg/kg vücut ağırlığıdır [11].

Ponceau 4R, günümüzde Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Norveç ve Finlandiya dahil olmak üzere bazı ülkeler tarafından yasaklı bir madde olarak listelenmektedir [12].

Tüm bu nedenlerden dolayı çeşitli gıda örneklerinde kalite kontrolü, kalite güvencesi ve en önemlisi tüketicilerin güvenliğini garanti altına almak için, gıdalarda sentetik renklendirici olarak kullanılan Ponceau 4R'nin belirlenmesi için yeni, ucuz ve

ulaşılabilir analitik yöntemin geliştirilmesi gıda güvenliği ve bu türün gıdalarda izlenmesi için önemli bir analitik konudur.

Literatürde Ponceau 4R'nin belirlenmesi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlara örnek verilecek olursa; değişik modifiye edilmiş elektrotlarla yapılan çalışmalara [13], diyot dizisi detektörü ile yapılan çalışmalara (DAD) [14], yüzeyle geliştirilmiş raman saçılması (SERS) [15], elektroforez ile yapılan çalışmalara [16], polarografi [17], spektrofotometri ile yapılan çalışmalara [18, 19], yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC)-diyot dizilimi saptama (DAD)-elektrosprey kütle spektrometresi (ESI-MS) [20] ve diferansiyel puls polarografisi [21] gibi birçok kromatografik, elektroanalitik ve spektrometrik teknik farklı gıda örneklerinde gıda boyalarının belirlenmesi için kullanılmaktadır. Genellikle bu türlerin liçingle geçen miktarı çok küçük olduğundan dolayı (birkaç  $\mu\text{g mL}^{-1}$  mertebesinde), doğru, duyarlı ve güvenilir sonuçlar için tayin öncesi farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılmıştır. Analizi öncesi on-line katı faz ekstraksiyonu [22], iyonik sıvı dağılımlı sıvı faz mikro ekstraksiyon [23], katı faz ekstraksiyonu [24], bulutlanma noktası ekstraksiyonu [25], yeni karbon nanotüp/polipirolkompozitler [26] gibi ayırma zenginleştirme teknikleri uygulanmıştır.

### **1.3. Ayırma ve Zenginleştirme Yöntemleri**

Son yıllarda fizik, kimya, biyoloji, farmakoloji, çevre, tekstil, gıda, boya, metalurji, biyokimya, tıp ve teknolojik alanlarda elementlerin eser düzeydeki miktarlarının önemi artmaktadır. Bu durum eser düzeydeki elementlerin nitel ve nicel tayinlerine olan ihtiyacı da artırmaktadır. Eser elementlerin tayininde kirlenme, aletsel problemler, saf madde ihtiyacı gibi pek çok güçlükler de vardır. Bu problemler sebebiyle, eser element ve kimyasal türlerin analizinde tayin öncesi bir ayırma ve zenginleştirme basamağının uygulanması mecburi hale gelmiştir. Bu amaçla katı faz ekstraksiyonu (SPE) [27], birlikte çöktürme [28], sıvı-sıvı mikro ekstraksiyonu (LLME) [29], mikrodalga destekli ekstraksiyonu (ME) [30, 31], ultrasonic destekli bulutlanma noktası ekstraksiyonu (UA-CPE) [32, 33], derin ötektik çözücü destekli mikro ekstraksiyon [34, 35], iyonik sıvı destekli ekstraksiyon [36, 37], ve iyon değiştirme yöntemleri kullanılmaktadır. Eser elementin içinde bulunduğu ortamın tayin tekniğine uygun olmaması, yani ortamın bozucu etki göstermesi ve bu ortamda

eser element derişiminin aletin tayin sınırının altında olması halinde zenginleştirme işlemleri kaçınılmazdır.

#### **1.4. Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu (CPE)**

Bulutlanma noktası ekstraksiyonu (CPE) ilk olarak bilim adamı H. Watanabe tarafından rapor edilmiştir [38]. 1976 tarihinde yapılmış olan çalışma ile yeni bir ekstraksiyon tekniğı ileri sürülmüş oldu [39].

Son yıllarda CPE tekniğı; hormonların, enzimlerin vitaminlerin ve proteinlerin ayrılması ve tayini için biyolojik örneklere, metallerin ve organik kirleticilerin önderiştirilmesi, ayrılması ve tayini için çevresel örneklere uygulanmıştır. CPE, sıvı-sıvı ekstraksiyonunda kullanılan organik çözücülere nazaran daha az toksik, diğer yöntemlere göre daha basit, ucuz maliyetli, kısa süreli, pratik ve oldukça da etkili bir önderiştirme ve ayırma yöntemidir.

CPE, bir çözeltili ortamına ilave edilen yüzey aktif madde, ortamdaki ayrılması istenen madde ile hidrofobik ve hidrofilik uç özelliklerini kullanarak misel yapı oluşturur. Bu misel ilk başta çözeltili ortamında tek fazlı görünümündedir. Bir surfaktan çözeltilisi belirli bir sıcaklığa kadar ısıtıldığında, kısmi çözümlenme nedeniyle bulanıklaşacaktır. Bulanıklığın gözlemlendiğı bu sıcaklığa bulutlanma noktası sıcaklığı denir. Isıtma işlemi ile beraber küçük hacimli surfaktan fazı ve sulu faz olmak üzere iki ayrı faz oluşumu sağlanır. Bu iki fazın birbirinden ayrılması ile bir ayırma ve önderiştirme yöntemi gerçekleştirilmiş olur. Bu sistem geri dönüşümlü olarak elde edilebilir, çözeltili bulutlanma noktasına kadar ısıtıldığında iki ayrı faz oluşturmasına rağmen, sistem soğutulurken tekrar tek fazlı sistem elde edilebilir [40].

##### **1.4.1. CPE avantajları**

- 1-) İşlemin uygulanışı kolaylık ve basitlik sağlamaktadır.
- 2-) CPE yöntemi uygulandığı çalışmalarda yüksek verim elde edilmesini sağlamaktadır.
- 3-) CPE yöntemi ile elde edilen fazlarda tespit yapabilmek için birçok spektroskopik yöntemin kullanılabilirdiğı görülmüştür.
- 4-) Küçük örneklerle düşük derişimlerde analizin doğrudan yapılmasına imkan sağlamaktadır.
- 5-) Yöntem uygulanırken zamandan tasarruf edilir.

6-) CPE yönteminde birkaç mililitre surfaktan ilavesi ile çalışılırken, klasik sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminde yüksek miktarda hacimlerde çalışılır.

7-) Klasik sıvı-sıvı ekstraksiyon metoduna, organik yapıların ayrılması ve tayini için alternatif bir yöntem olmaktadır.

8-) Sonuçların güvenilirliği ve ekstraksiyon işleminin daha ekonomik olması bu yöntemin kullanılmasını sağlayan bir diğer avantajdır.

#### **1.4.2. CPE dezavantajları**

1-) Deney basamaklarında yapılacak muhtemel santrifüj işlemi sırasında en iyi şartlar çerçevesinde ulaşılan sıcaklık değerinde düşme olmakta ve bu durum ekstraksiyon verimi üzerinde olumsuz bir etkiye neden olmaktadır. Bu yüzden ayrılacak yapı için uygun surfaktan seçimi sırasında bulutlanma noktası değeri göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca muhtemel verim kayıplarını engellemek için düşük bulutlanma noktası (CP) değerine sahip olan yüzey aktif maddeler kullanılmalıdır.

2-) Bu yöntem birçok parametreye bağlı olarak gerçekleşen çok hassas bir yöntem olduğu için yapılacak olan çalışmada en uygun şartlar geniş kapsamlı olarak araştırılmadan bir işlem uygulamasına gidilecek olursa verim olarak istenilen başarı sağlanamayabilir.

3-) Yüksek sıcaklık değerlerine ulaşılması en iyi şartlar için gerekli olursa bu gibi durumlarda ligandlar için dayanıklılık sorunu ortaya çıkmaktadır. Bu durumda değişik ligandlar için geniş tabanlı araştırmalar yapmak gerekebilmektedir.

4-) CPE yönteminde faz ayrımının ardından viskozitesi yüksek olan surfaktanca zengin olan fazın ölçümü başka bir sorun oluşturmaktadır.

#### **1.4.3. CPE etkileyen faktörler**

##### **1.4.3.1. Ortamın pH'ının etkisi**

CPE yönteminde ortamın pH'ı hem metalin ligand ile kompleksleşme dengesi hem de oluşan kompleksin surfaktan (miseller) faza geçişini etkilemektedir. Etkin bir ekstraksiyon için metal-ligand kompleksinin oluşacağı en uygun pH değerinde çalışılması önemlidir.

### **1.4.3.2. Ligand seçimi**

Ligand yapıları hidrofobik olmalı, hızlı ve kararlı şelat biçiminde kompleks yapılar oluşturmalarıdır [38]. CPE yönteminde ayrılmak istenilen madde türüne bağlı olarak en uygun ligandın seçilmesi gerekmektedir. Her ligandın kendine özgü bir karakteristik özelliği bulunmaktadır. Ligandların hedef maddeye etkisi; ortamın sıcaklığına, ortamın pH değerine, madde türüne ve kendisi ile ayrımı yapılacak olan maddenin konsantrasyon oranına bağlı olarak değişebilmektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı CPE yönteminden yüksek verim elde edilmesi için titiz bir çalışma sonucu işleme kullanılacak uygun ligand seçilmelidir [39].

### **1.4.3.3. Sürfaktan derişiminin etkisi**

CPE yöntemini etkileyen önemli parametrelerden biri de surfaktan derişimidir. Yapılacak olan ayırma işlemleri için verimli surfaktan konsantrasyonu dar bir aralıkta gözlemlenir. Bu bağlamda surfaktan derişiminin olması gereken değerden daha düşük olması, yeteri kadar misel oluşumu gerçekleşmesine engel olur ve elde edilecek verim değerini düşürür [40].

Nitekim, surfaktan derişimi fazla olursa, bu sefer de yüzey aktif maddece zengin fazın hacmi artacağından zenginleştirme faktöründe azalma olur [40]. Bu nedenle, uygun surfaktan derişimini seçerken, geniş konsantrasyon aralığı içerisinde denemeler yapılmalıdır.

## **1.5. Önderiştirme**

Analizi yapılacak örneklerde, analitiksel yöntemle tayin edilemeyecek kadar küçük derişimlerde bulunan elementleri analitiksel yöntemle ölçülebilecek seviyeye getirmek için kullanılan yöntemle önderiştirme denir.

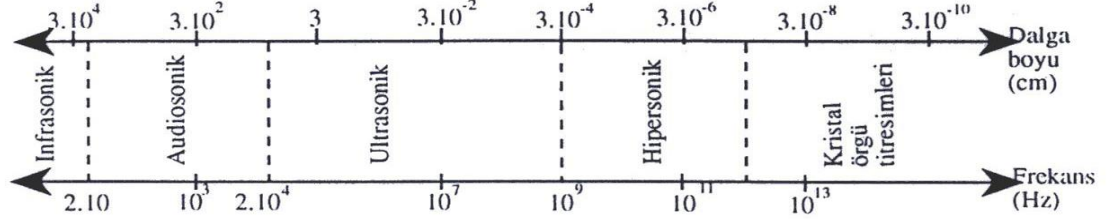
Önderiştirme, eser elementlerin konsantrasyonunun matriks konsantrasyonuna oranını arttıran metottur. Analizi yapılacak metal ya da elementin içinde bulunduğu maddeye matriks denir. Ayırma ve önderiştirme için aynı metotlar kullanılır. Ayırma ve önderiştirme yöntemleri arasında; birlikte çöktürme, buharlaştırma, bulutlanma noktası ekstraksiyonu, katı faz ekstraksiyonu, sıvı-sıvı ekstraksiyonu gibi yöntemler vardır [28, 35, 36].

Çalışmamızda ilgili analitlerin zenginleştirilmesi için ultrasonik destekli bulutlanma noktası ekstraksiyonu (UA-CPE) kullanılacaktır. Bu zenginleştirme yönteminde kullanılacak surfaktanların misel oluşturması için ana parametreler bulutlanma noktası sıcaklığı ve kritik misel derişimidir. Bir surfaktan çözeltisi belirli bir sıcaklığa kadar ısıtıldığında, kısmi çözünürleşme nedeniyle bulanıklaşacaktır. Bulanıklığın gözleendiği bu sıcaklığa bulutlanma noktası sıcaklığı denir. Bulutlanma noktası sıcaklığının üzerinde ve surfaktan derişiminin kritik misel derişimine yakın olduğu yerde küçük hacimli surfaktanca zengin faz ve seyreltik sulu faz santrifüjleme ile birbirinden ayrılır. UA-CPE, çevre dostu (kirletici olmayan) ve organik çözücü içermeyen bir yöntemdir. Bu yöntem, karmaşık matris yapıları çevresel ve biyolojik örneklerin ayrılmasında başarı ile uygulanmaktadır [41, 42]. UA-CPE, moleküler spektroskopisi ile birleştirildiğinde daha etkili bir analitik teknik olabilir.

## **1.6. Ultrasonik Ekstraksiyon**

### **1.6.1. Ultrasonik dalga**

Ses dalgaları katıların, sıvıların ya da gazların içinden geçebilen mekanik titreşimlerdir. İnsanların duyamayacağı aralıktan (1-16 kHz) daha yüksek bir frekans aralığına sahip olan ultrasonik ses dalgalarının en küçük ultrasonik frekansı normalde 20 kHz civarında, en yüksek frekans ise sinyali oluşturabilme yeteneğiyle sınırlıdır. Uygulamaların bazılarında frekanslar GHz olarak kullanılmaktadır. Aslında ses dalgaları ile elektromanyetik dalgalar birbirinden farklıdır. Radyo dalgaları, infrared, görünür ya da UV ışınları, gama ışınları, X ışınları vakumdan geçebilirler. Ses dalgaları ise madde içinden hareket etmek durumundadır. Sıkıştırma ve genişleme hareketleriyle ortamdan geçerler [43]. Oldukça yüksek şiddetli ultra ses, yayılma ortamlarında bazı kimyasal, fiziksel ve biyolojik olaylara neden olmaktadır [44]. Bu olayların en önemlileri; bileşimin bozulması, oksitlenme, tepkimenin hızlanması, homojenizasyon, kristallenme, kaynama noktası sıcaklığının değişimi görülebilir. Ultra ses, kimyasal bağları ve moleküller arası bağları etkiler. Molekül zincirleri de ultra seste parçalanabilir. Ultrases spektrumu Şekil 1.2’de verilmiştir.



Şekil 1.2 Ultra ses spektrumu

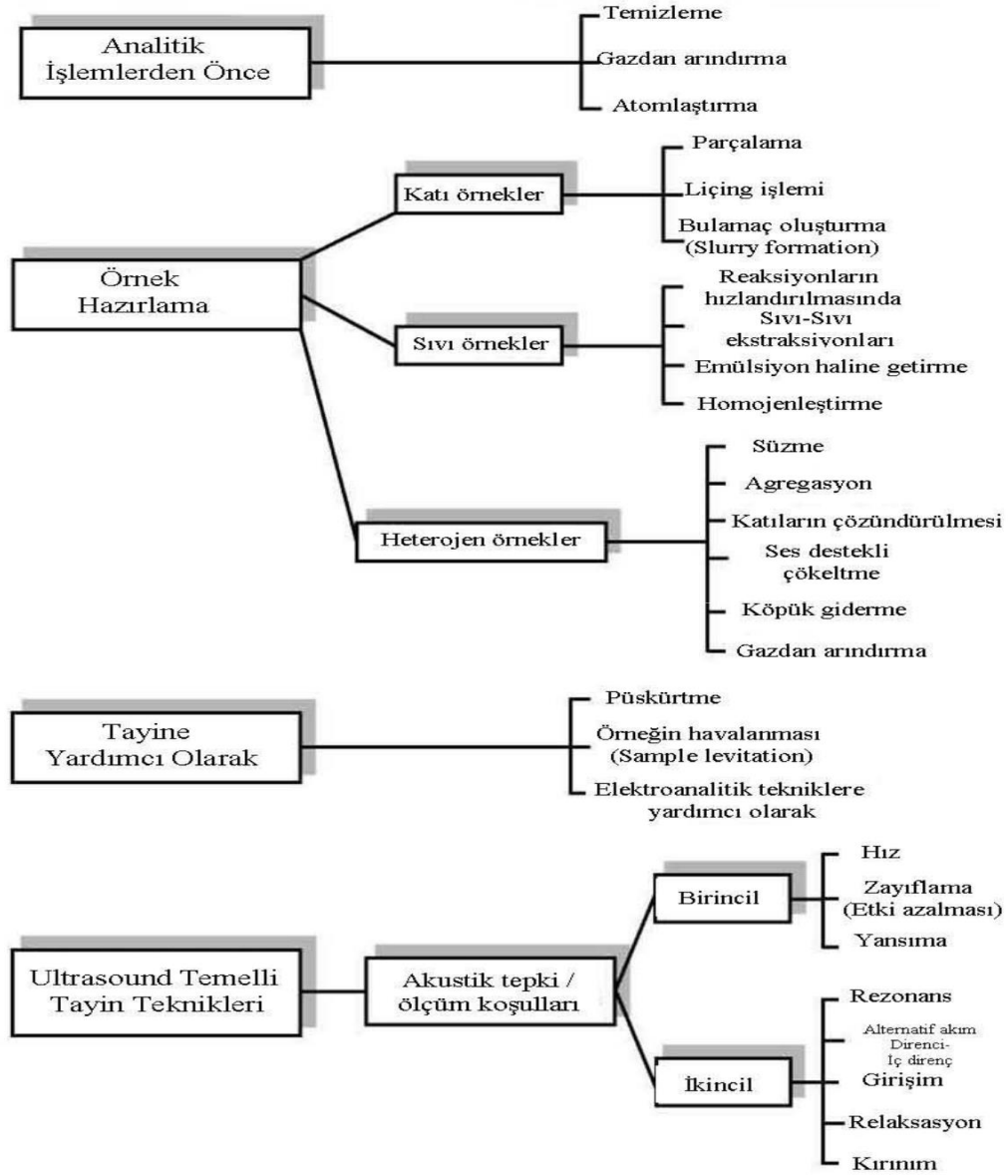
### 1.6.2. Kaviteasyon oluşumu

Sıvı içindeki genişleme döngüsü negatif basınca sebep olmaktadır. Yeteri kadar güçlü ultrasonik, genişleme döngüsü sıvıda kabarcık veya oyuklar meydana getirebilmektedir. Ancak, böylesi bir durum negatif basınç, sıvının yapısı ve sıvının saflığına bağlı olarak değişen bölgesel gerilim kuvvetini aştığı zaman gerçekleşir. *Kaviteasyon*; buhar kabarcıklarının oluştuğu, büyüyerek içe doğru patlamasıyla oluşan proses olarak tanımlanır. Tüm proses yaklaşık 400  $\mu$ s' de gerçekleşmekte ve etkin yerel basınç ve enerjiler ise sırasıyla yaklaşık 10<sup>5</sup>atm ve 1 eV'tur [45]. Aslında kaviteasyon, asılı madde tanecikleri içinde veya eski kaviteasyon anlarından kalan geçici mikro kabarcıklardaki gaz dolu oyuklar gibi sıvının önceden var olan zayıf noktalarında oluşan çekirdek yapıları bir prosesidir.

Kısaca ultrasonik kimyasal etkinin ilk sebebi, kabarcıklaşmanın geçici yüksek enerji ortamı oluşturmasıdır. Bu konudaki araştırmaların anlaşma noktalarından birisi ve en önemlisi, ultrasonik uyarıyla kimyasal etkiler yaratabilmek için sıvı faza kabarcıklaşma yaratacak ölçüde enerji aktarma gereğidir. Yüksek basınç bölgelerince kabarcıkların söndürülmesi, dağılma, katı erozyonu ve temizleme gibi çok yaygın olarak bilinen ultrasonik etkilerden sorumlu, yüksek güçte şoklar üretir [44, 46].

### 1.6.3. Ultrasonik destekli ekstraksiyon

Elementel analiz için tüm analiz aşamaları içinde örnek toplama dışında en çok zaman alan basamak örnek hazırlama prosedürüdür. Bu nedenle örnek hazırlama prosedürünün işlem süresini azaltmak amacıyla başka stratejiler denenmeye başlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda örneklerin hazırlanmasını hızlandırmak ve daha basite indirgemek için etkili tekniklerden biri ultrasonik ekstraksiyondur [45, 47, 48, 49]. Ultra ses destekli analitiksel işlemler Şekil 1.3'te özetlenmiştir.



**Şekil 1.3** Ultra ses destekli analitiksel işlem basamakları [50]

Çözme konusunda ultrasonik uyardıktan da geleneksel çözme yöntemleri, asit bombası yöntemi ve mikrodalga yöntemi gibi etkiler beklemeyi gerektiren bulgular vardır. Ultrasonik destekli liçing birçok analitik durumlarda, geleneksel özütleme tekniklerine ve bazı durumlarda süper kritik akışkan ve mikrodalga destekli liçing yöntemlerine göre hızlı, etkin ve ekonomiktir. Biyolojik materyallerden (sebzeler, akasya, çam, meşe, midye ve liken) [51, 52], cadde toz örneklerinden [46], sedimentlerden [53], değişik çözücüler kullanılarak metallerin liçingine ultrasonik



uyarının zaman ve verim açısından önemli katkılarda bulunduğu, zaman-verim-analizci sağlığı ve ekonomi açısından daha avantajlı olduğu rapor edilmiştir.

Ultrasonik enerjinin inorganik ve organik bileşiklerin özütlenmesi [53, 54], homojenleştirme, gaz giderme, sıvı-sıvı ekstraksiyonu, reaksiyon hızlandırılması ve diğer uygulamalar gibi analitik kimyanın birçok farklı uygulamalarında performans geliştirici etkili bir yol oluşturduğu bulunmuştur.

### **1.7. Analitik Yöntemlerin Performans Kriterleri**

Deneysel çalışmalarda elde edilen sonuçlar, yöntemin doğruluğunu ve güvenilirliğini belirtecek şekilde sunulmalıdır. Gerekli olan önemli analitik parametreler ve tanımlar aşağıda verilmektedir.

**Kesinlik:** Aynı yolla elde edilen ölçüm sonuçlarının birbirlerine yakınlığı olarak ifade edilir. Kesinlik aynı zamanda belirsiz hataların bir ölçüsüdür. Kesinlik için ölçütler mutlak standart sapma (MSS), bağıl standart sapma (BSS), varyasyon katsayısı (VK) ve varyans olarak sayılabilir.

**Doğruluk:** Ölçülen değer doğru ya da doğru kabul edilen değere yakınlığını gösterir. Uluslararası bağımsız laboratuvarlar tarafından tayin edilmiş değerleri doğru değer olarak kabul edilen Standart Referans Maddelerin (SRM) tayininden elde edilen sonuç ile aynı maddenin kullanılan yöntemle elde edilen sonuçları karşılaştırılır veya bağımsız ve farklı analitik metodların uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak belirlenir. Doğruluk için sayısal ölçütler mutlak ve bağıl hata olarak sayılabilir.

**Seçicilik:** Analiti örnekte varlığı tespit edilmiş girişim yapabilmeyen diğer bileşenlerden farklı olarak ölçme yeteneğidir. Örnek matriksinde bulunması gereken bileşenlerin yanında analiz edilecek maddelerin doğru ve özgün belirlenebilmesi, analitik yöntemlerin seçiciliğini belirler. Seçicilik için sayısal ölçüt seçicilik faktörü (katsayısı) kullanılmaktadır.

**Duyarlık:** En düşük analit derişimini algılayabilme kabiliyetidir. Duyarlık için analitik ölçütler kalibrasyon duyarlılığı ve analitik duyarlık olarak sayılabilir. Analitik duyarlık, tayin edilen elementin cinsine, cihaza ve tayindeki bazı fiziksel ve kimyasal etkenlere bağlıdır. Atomik absorpsiyonda duyarlık özel olarak analiz elementinin net

%1' lik absorpsiyonuna veya 0.0044' lük absorbans değerine karşılık gelen derişim olarak tanımlanmıştır.

**Gözlenebilme Sınırı (GS):** Bir analitik yöntemin performansı genellikle gözlenebilme sınırı ile ölçülür. Gözlenebilme sınırı teorik olarak %95 güven düzeyinde minimum anlamlı sinyal veren derişimi olarak tanımlanır ve  $x = x + 3s_{boş}$  ile bulunan derişimdir. Bu denklemde,  $x$  boş çözeltinin ortalama sinyali ve  $s_{boş}$  boş çözeltilerinin standart sapmasıdır, bulunan  $x$  absorbans biriminde olup, kalibrasyon doğrusundan karşılık gelen derişim bulunur. Bulunan bu derişim değerine "gözlenebilme sınırı" denir.

**Tayin sınırı:** Gözlenebilme sınırında tekrarlanabilirlik çok düşük olduğundan, gerçek tayinler için sınır GS değerinin genellikle üç katı olarak alınır ki, bu değere "tayin sınırı" adı verilir. Bu sınır için önemli bir ölçüt, kabul edilebilir bağıl standart sapma değerine sahip olmasıdır.

**Geri kazanım:** Bileşimi bilinen bir maddenin analizi sonucunda elde edilen değer başlangıç değerine oranı olarak tanımlanır. Geri kazanım verimi, yöntemin optimizasyonu için incelenen faktörlerin değerlendirilmesinde ölçüt olarak kullanılır. Geri kazanım verimi aşağıdaki şekilde formüle edilebilir.

$$\%Geri\ Kazanım = \frac{Tayin\ ile\ bulunan\ derişim}{Teorik\ olarak\ bulunan\ derişim} \times 100$$

**Sinyal/Gürültü Oranı:** Yapılan ölçümlerin tekrarlanabilirliği ve doğruluğu Sinyal/Gürültü (S/N) oranının yüksek olmasına bağlıdır. S/N oranı azalırsa bağıl standart sapma artar ve tekrarlanabilirlik azalır. Bu oran, cihazın kalitesine ve örneklemedeki performansın niteliğine bağlıdır.

**Doğrusal aralık:** Tayin sınırı ile doğrusallığın saptmaya başladığı aralık olarak kabul edilir. Ayrıca nicel analiz için elverişli, yüksek kesinlik ve doğrulukta sonuçlar veren derişim aralığı olarak tanımlanabilir.

## 1.8. Amaç ve Kapsam

Gerçek örneklerde (pasta ürünleri, meyve suları, süt ürünleri, şekeri ürünleri vb.) eser düzeylerde bulunabilecek Ponceau 4R'nın UA-CPE yardımıyla zenginleştirilmesi sonrası spektrofotometre ile belirlenmesi için, basit, ucuz, duyarlı ve seçiciliği yüksek çevre dostu analitik yöntemin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. UV-Görünür bölge spektrofotometrinin UA-CPE gibi ayırma ve zenginleştirme yöntemi ile birleştirilmesi bu konuda elverişli bir seçenek oluşturabilir. Ponceau 4R için katyonik ve noniyonik surfaktan varlığında kararlı metal-şelatı üzerinden duyarlı kararlı bozunma ürününün oluşturulması amaçlanmaktadır. HPLC, FIA, voltametri ve iyon kromatografisi gibi daha pahalı, işletme harcamaları yüksek ve zaman alıcı tekniklerle karşılaştırıldığında eser miktarlarda Ponceau 4R belirlenmesi için misel etkiye dayanan spektrofotometrik yöntemin ulaşılabilirlik ve maliyet açısından çekicilikleri vardır. Ayrıca spektrofotometre kullanılarak Ponceau 4R'nın gıdalarda tayinleriyle ilgili çalışmalar mevcuttur. Fakat, bunların seçme sınırları ve kalibrasyon aralıkları yeteri kadar iyi değildir. Daha düşük seçme sınırları ve geniş kalibrasyon aralıklarında çalışmaya olanak sağlayan yöntemin geliştirilmesiyle bu eksikliğin ortadan kaldırılması planlanmaktadır. Özellikle gerçek örneklerin analize hazırlanması aşamasında ultrasonik etkiden faydalanılacaktır. Burada ultrasonik etki ile daha düşük miktarlarda asit ya da asit karışımı ile örnek hazırlama aşamasının daha kısa sürede gerçekleşmesi ve örnek matrisi ilgili analitin çözelti fazına hızlı ve kolayca çekilmesi planlanmaktadır. Buna ek olarak, ultrasonik çözünürleştirme yöntemi diğer yaş çözme yöntemlerine göre daha çevrecidir ve bunun da yöntemimizi daha cazip hale getireceği açıktır. Ayrıca misel destekli ekstraksiyon ile matris etkisinin giderileceği ve zenginleştirme ile yöntemin seçme sınırının daha da düşük düzeylere çekileceği düşünülürse geliştirilecek olan yöntemin literatüre önemli katkılar getireceği açıktır [23, 24, 37].

## 2. MATERYAL VE METOD

Tez çalışmasında, bazı gıda ve içecek örneklerinde gıda boyası olarak kullanılan Ponceau 4R (E-124) tayini için yeni bir ultrasonik destekli bulutlanma noktası ekstraksiyon (UA-CPE) yöntemi geliştirilmiştir.

### 2.1. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmaları boyunca kullanılan cihazlar aşağıda özetlenmiştir.

Ponceau 4R (E-124)'nin tayini UV-1800 model (Shimadzu, Japonya) UV-VİS spektrofotometre aracılığıyla gerçekleştirildi. Deney boyunca kullanılan deiyonize su labcanco ultra-saf su sisteminden elde edilmiştir. Çözeltilerin pH'sını ayarlamak için Selecta pH-2005 model dijital pH metre kullanıldı. Sürfaktanların bulutlanmasını sağlamak ve örneklerin analize hazırlanması için Jeitech marka UCS-10 model ultrasonik banyo (Güney kore) kullanıldı. Analit içeren fazı sulu fazdan ayırmak için, Hettich Universal-320 model santrifüj cihazı kullanıldı. Deney boyunca kullanılan tüm çözeltiler ve analiz edilen örnekler Arçelik marka buzdolabında yaklaşık 4 °C de saklanmıştır.

### 2.2. Kimyasallar ve Reaktifler

Deneyleerde kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup, Sigma (St. Louis, MO, ABD) ve Merck (E. Merck, Darmstadt, Almanya) şirketlerinden satın alındı.

*Standart Ponceau 4R çözeltisi, 1000 mg L<sup>-1</sup>*: Analitik saflıktaki Ponceau 4R (Sigma) uygun miktarda tartıldı ve saf suda çözüldükten sonra hacmi 1.0 L'ye tamamlanmıştır.

*Standart Cu(II) Çözeltisi, 1000 mg L<sup>-1</sup>*: Analitik saflıktaki CuCl<sub>2</sub>'den (Sigma) uygun miktarda tartıldı ve bir miktar saf suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 1.0 L'ye tamamlanmıştır.

*0.1 mol L<sup>-1</sup> pH 6.0 Sitrat Tamponu*: 82 mL 0.1 mol L<sup>-1</sup> sitrik asik (Merck) ve 18 mL 0.1 mol L<sup>-1</sup> sodyum sitrat (Merck) çözeltileri karıştırıldıktan sonra hacmi 1.0 L tamamlanmıştır.

*Polietilen glikol mono-p-nonilfenil eter (PONPE 7.5) çözeltisi, % 5.0'lik (a/h)*: Analitik saflıktaki PONPE 7.5'ten (Sigma) 5.0 g erlene alındıktan sonra 20 mL etanol ve 30 mL saf su ile çözülp hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Seyreltici ajan olarak aseton, metanol, ethanol, tetrahidrofuran (THF), oktanol ve asetonitril kullanıldı. Yöntemin seçiciliği için kullanılan tüm anyonlar, katyonlar ve diğer kimyasallar 1000 mg L<sup>-1</sup>'lik standart çözeltilerinden hazırlanmıştır. Gerektiğinde ardışık seyreltmeyle istenilen derişimlerde çalışma çözeltileri hazırlanmıştır.

Erlen, beher, balon joje, cam ve plastik saklama kapları, santrifüj tüpleri, cam tüpler, baget gibi deneysel çalışmalarda kullanılan malzemelerden gelebilecek kimyasal kirlenmeleri ve analit kayıplarını önlemek amacıyla deneylerden önce temizlik işlemi yapılmıştır. Temizlik işleminde, temizlenecek malzemeler 24 saat boyunca % 10 (h/h) HNO<sub>3</sub> içinde tutuldu ve ardından beş kez ultra saf su ile yıkandı.

### **2.3. Örnek Toplama ve Analize Hazırlama**

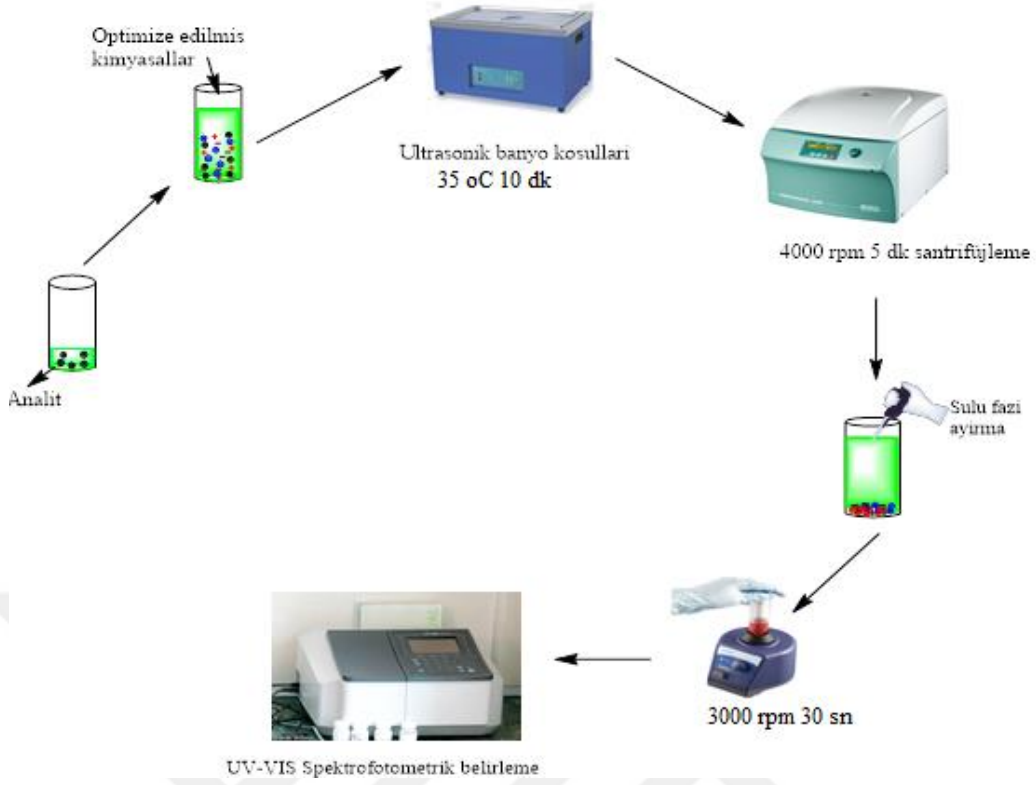
Önerilen yöntemle, gerçek örneklerdeki Ponceau 4R tayini için iki farklı (sıvı ve katı) örnek grup kullanılmıştır. Tüm örnekler Sivas'taki yerel marketlerden temin edilmiştir.

*İçecek örneklerin (meyve suyu çeşitleri) analize hazırlanması:* İçecek örneklerin 20 mL'si 50 mL'lik hacimli şişeye aktarıldı ve deiyonize su ile 50 mL hacme seyreltildi. Ardından ultrasonik banyoda oda sıcaklığında 15 dakika sonike edildi. Son olarak, membran filtreden süzülerek önerilen yöntemin uygulanması için hazır hale getirildi [55].

*Gıda örneklerinin analize hazırlanması:* Gıda örneklerinden 1.0 g tartılarak 50 mL'lik behere alındı. Gıda boyalarını çözeltiliye alabilmek için üzerine aseton/su (3:1, h/h) karışımından 10 mL ilave edildi. Ardından ultrasonik banyoya yerleştirilen beherlere oda sıcaklığında 10 dakika sonike edildi. Ardından, ultrasonik banyonun sıcaklığı 70 °C'ye yükseltildi ve çözeltilerin üzerine 0.5 g poliamid adsorban eklendi. Çözeltideki tüm renklendiricileri adsorbe etmek için 10 dakika sonikasyon uygulandı. Ardından, karışım süzüldü ve adsorban, üç kez 70 °C'de 10 mL sitrik asit çözeltisi (% 20 h/h, pH = 4.5) ile yıkandı [55].

#### 2.4. Önerilen UA-CPE Yöntemi

Optimal koşullar altında, Ponceau 4R'nin ekstraksiyonu için geliştirilen ultrasonik destekli bulutlanma noktası ekstraksiyon (UA-CPE) yönteminin deneysel basamakları şöyledir. Öncelikle, 50 mL'lik santrifüj tüpüne analize hazırlanmış örneklerden 3.0 mL eklendi. Daha sonra örnek çözeltisinin pH'sını 6.0'ya ayarlamak için 2.5 mL sitrat tampon çözeltisi ilave edildi. Ponceau 4R içeren kompleks elde etmek için ortama  $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cu(II)}$  çözeltisinden 1.5 mL ilave edildi ve ardından oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi. Oluşan kompleksin sulu fazdan ekstraksiyonunu sağlamak için ortama ekstraksiyon çözücüsü olarak %5.0 (a/h) PONPE 7.5'den 2.0 mL ilave edilip son hacim deiyonize suyla 50 mL ye tamamlandı. Elde edilen Cu-Ponceau 4R kompleksine ekstraksiyon çözücüsünün hidrofobik merkezlerine tutulmasını sağlamak için  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  10 dakika sonikasyon uygulandı. Sonikasyon adım sırasında, analiti içeren kompleks, ekstraksiyon çözücüsünün ince damlacıklarına ekstre edildi. Bu işlemde sonra ekstraksiyon çözücüsünü sulu fazdan ayırmak için 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjleme yapıldı. Santrifüjleme sonrası, analit içeren faz tüpün alt kısmında toplandı ve üsteki sulu faz dekantasyon ile ayrıldı. Analit içeren faz düşük hacimli ve oldukça viskoz olduğu için spektrofotometrede analiz için uygun değildi. Bu nedenle, viskozitesini azaltmak ve analize uygun hale getirmek için geri kalan fazın son hacmi aseton ile  $500 \text{ } \mu\text{L}$ 'ye tamamlandı, ardından 2500 rpm'de 30 saniye vortekslendi. Tüm ölçümler  $510 \text{ nm}$ 'de yapıldı. Kullanılan reaktiflerin analitik sinyale etkisini belirlemek için reaktif boşuna paralel aynı işlemler uygulanmıştır. Önerilen yöntemin deneysel basamakları Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1 Önerilen yöntemin deneysel basamakları

## 2.5. İstatistiksel Analiz

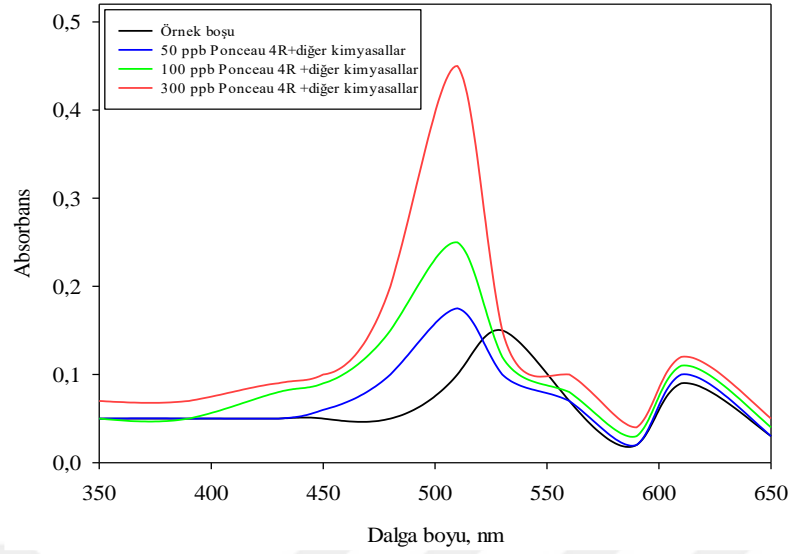
Deneysel çalışmalarda optimizasyon adımları üç tekrarlı gerçekleştirildi ve sonuçlar ortalama  $\pm$  SD (standart sapma) olarak ifade edildi. Veriler ve istatistiksel analiz için Microsoft Excel 2016 programı kullanılmıştır (ortalama değer ve % geri kazanım).

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Çalışma Dalga Boyunun Seçimi

Spektrofotometre ile yapılan çalışmalarda çalışma dalga boyu belirlenmelidir. Çalışma dalga boyunu belirlerken aşağıdaki analitik özellikleri göz önünde bulundurmak gerekir. (1) seçilen dalga boyunun analite özgü olması, (2) analit derişimi ile maksimum absorpsiyon dalga boyu ( $\lambda_{max}$ ) arasında doğrusal bir ilişki elde edilmeli, (3) tekrarlanabilir ve kararlı bir absorbans elde edilmelidir. Bu nedenle, ölçüm dalga boyunu belirlemek için 350 nm ile 650 nm arasında değişen dalga boyu aralıklarında çalışmalar yapılmıştır. İlk olarak, pH 6.0'da örnek boşu için spektral tarama yapıldı. Ardından, yine aynı pH'da ekstraksiyon çözücüsü ve Cu(II) varlığında, üç farklı (50, 100 ve 300  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) Ponceau 4R derişimi için aynı spektral tarama yenilendi. Ön deneylerden, Ponceau 4R ve Cu(II) arasında pH 6.0'da sitrat tamponu varlığında kompleks oluşumuyla, 20 nm'lik maviye kaymayla (530 nm'den 510 nm'ye) birlikte artan Ponceau 4R derişimiyle doğrusal olarak absorpsiyon piki gözlenmiştir. Ayrıca, bu dalga boyunda artan Ponceau 4R derişimlerine paralel olarak absorbansın arttığı görülmüştür. 510 nm'de derişime bağlı absorbans artışının bir sonucu olarak ortaya çıkan bu bulgular, aynı zamanda, glutatyon (GSH) ve L-sistein gibi tiol içeren nükleofillerin varlığında Ponceau 4R absorpsiyon dalga boylarının literatürdeki diğer çalışmaların sonuçları ile de desteklenmektedir [56,57]. Bu nedenle, yüksek hassasiyet, iyi tekrarlanabilir ve kararlı sonuçlar elde etmek için 510 nm çalışma dalga boyu olarak kabul edilmiştir. Detaylı sonuçlar Şekil 3.1 'de gösterildi.





**Şekil 3.1** Optimum koşullarda elde edilen spektrumlar

### 3.2. Deneysel Değişkenlerin Optimizasyonu

Ponceau 4R 'nin kolay ekstraksiyonu ve nicel geri kazanımı için, bazı deneysel değişkenler (pH, metal türü ve miktarı, ekstraksiyon çözücü türü ve miktarı, ultrasonik koşullar, girdap süresi, örnek hacmi ve girişim etkisi) optimize edilmelidir. Bu parametreleri optimize etmek için, tek değişkenli bir optimizasyon prosedürü uygulandı. Yani, bir parametre araştırılırken, diğer parametreler sabit tutuldu. Optimizasyon çalışmalarında referans olarak % geri kazanım değerleri dikkate alındı. Ponceau 4R'nin % geri kazanımı, aşağıdaki bağlantıya göre hesaplandı.

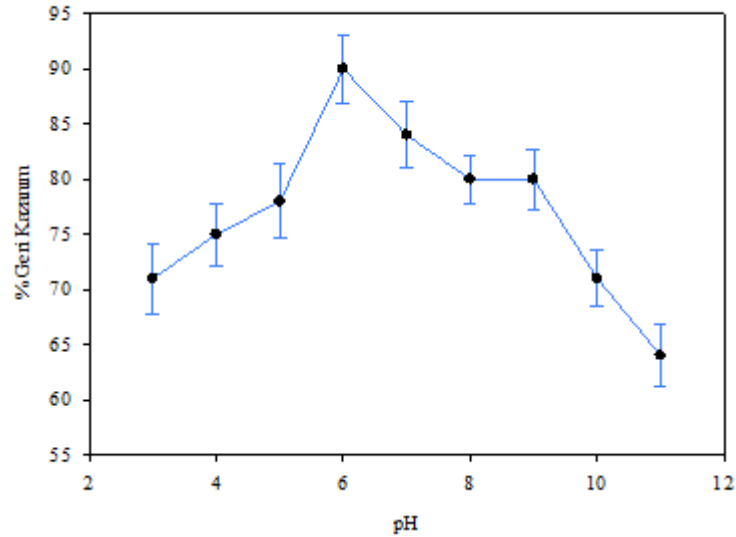
$$\% \text{ Geri kazanım} = \frac{(C_x) - (C_y)}{(C_x)}$$

Buradaki  $C_x$  ve  $C_y$ , sırasıyla UA-CPE prosedüründen önce ve sonra sulu fazdaki Ponceau 4R miktarıdır. Tüm değişkenlerin optimizasyonu üç tekrarlı yapıldı.

#### 3.2.1. pH etkisi

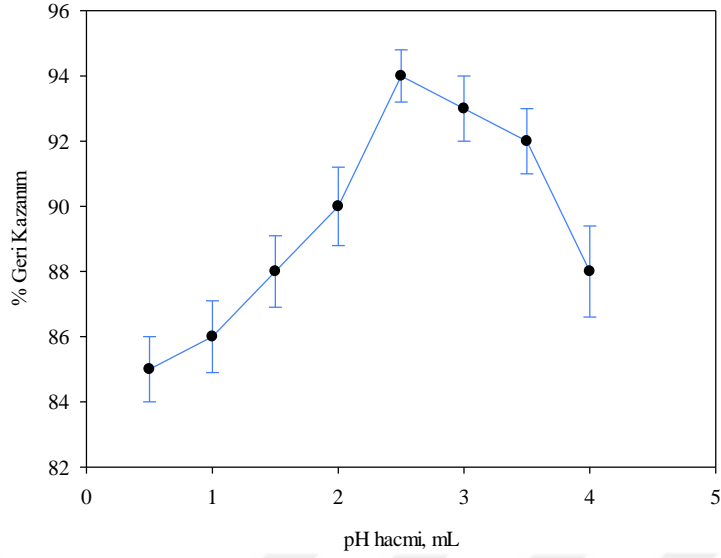
Çalışmamızın ana amacı Ponceau 4R derişimine bağlı olarak ekstrakte edilebilir bir kompleks elde etmektir. Kompleks oluşum reaksiyonlarında en önemli faktörlerden biri örnek çözeltinin pH'sıdır. pH, kimyasal türlerin yapısını doğrudan etkiler. Bu nedenle, ortamın pH'sına bağlı olarak kompleksleşme artabilir veya azalabilir. Eğer ekstrakte edilebilir stabil kompleks elde edilemezse, bu, tüm deneysel adımları etkileyebilir. Bütün bu nedenlerden dolayı, pH'nın kompleks oluşumu ve analitin geri

kazanımı üzerindeki etkisi, farklı tampon çözeltiler (sitrata, ftalat, borata ve Tris tamponları) kullanılarak pH 3-11 aralığında incelenmiştir. Şekil 3.2'den görülebileceği gibi, düşük pH değerlerinde geri kazanım çok düşüktü, bunun asıl nedeni, Ponceau 4R'ın asidik bölgede (<pH 5.0) daha fazla protonlanmasıdır. Ayrıca Cu(II) iyonları ve lakton yapıdaki protonlu fonksiyonel donör grupları arasındaki elektrostatik itmeler sonucu kompleks oluşumunda azalma gerçekleşmektedir. Ek olarak, bazı bölgelerde (>pH 9.0) geri kazanım azalmıştır, çünkü Cu(II) iyonu hidroksitleri halinde çökmeye başladığından Cu(II) arasındaki kompleksin oluşumu azalmaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı optimum pH değeri sitrata tamponuyla pH 6.0'a ayarlandı ve bu değer optimum olarak seçilmiştir.



Şekil 3.2 pH etkisi.

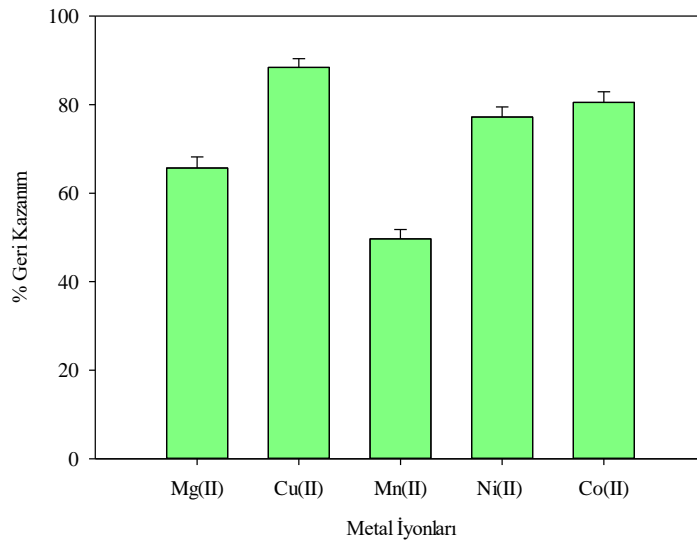
Tampon çözeltinin pH'sı belirlendikten sonra, seçilen tampon çözelti için hacim optimizasyonu çalışması yapılmıştır. Bu amaçla 0.1 mol L<sup>-1</sup> pH 6.0 sitrata tamponunun hacmi 0.5–4.0 mL arasında araştırılmıştır. Şekil 3.3'te görüldüğü gibi en iyi geri kazanım 2.5 mL kullanıldığında elde edilmiştir. Bundan dolayı optimum değer 2.5 mL olarak seçilmiştir.



**Şekil 3.3** Tampon hacminin etkisi.

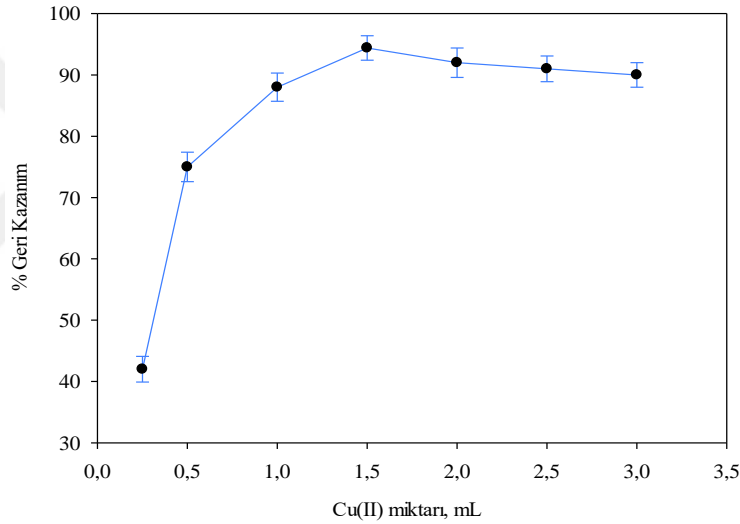
### 3.2.2. Metal türünün ve miktarının etkisi

Ponceau 4R, elektron verme kabiliyetinden dolayı, metallerle pH'a bağlı kararlı şelat kompleksleri oluşturabilen kimyasal bir türdür. Bu düşünceye dayanarak, duyarlılık ve seçicilik açısından uygun bir metalle stabil bir Ponceau 4R kompleksi oluşturmayı hedefledik. Bu amaca ulaşmak için öncelikle Mg(II), Cu(II), Mn(II), Ni(II) ve Co(II) gibi bazı metallerle ön deneyler yapıldı. Şekil 3.4'den görüldüğü gibi iyi geri kazanım Cu(II) varlığında elde edildi.



**Şekil 3.4** Metal türlerinin etkisi

Metal türüne karar verdikten sonra, bu metal iyonu miktarının analitin geri kazanımı üzerindeki etkisi, Cu(II)'nin 10 mg L<sup>-1</sup> sabit derişim kullanılarak 0.2-3 mL aralığında araştırılmıştır. Nicel geri kazanım, 1.0 mL den düşük Cu(II) hacimlerde elde edilemedi, çünkü kompleksleşme için Cu(II) miktarı yetersizdi. Şekil 3.5'de görüldüğü gibi en iyi geri kazanım 10 mg L<sup>-1</sup> Cu(II) çözeltisinden 1.5 mL kullanıldığında elde edilmiştir. Bu değerden sonra analitik sinyaldeki azalmanın nedeni Cu(II) iyonlarının hidrolize uğraması sonucu Cu(OH)<sup>+</sup> ve Cu(OH)<sub>2</sub> türlerine dönüşmesi veya Cu(II) iyonlarının bir Lewis asidi olarak Ponceau 4R yapısında bulunan hetero -N, -O ve -S atomlarından elektron alarak farklı kompleks oluşturmasından kaynaklanmış olabilir [58]. Bu nedenlerden dolayı 10 mg L<sup>-1</sup> Cu(II) için 1.5 mL optimum değer olarak seçilmiştir.

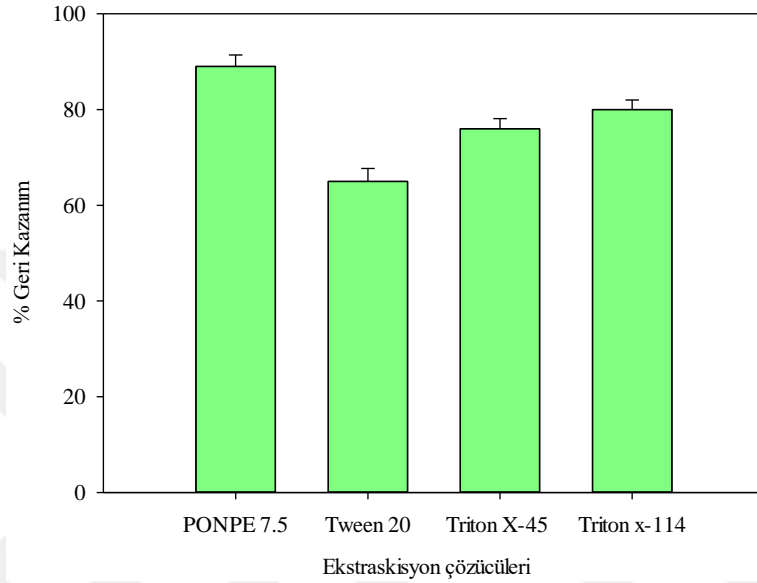


Şekil 3.5 Cu(II) miktarının etkisi

### 3.2.3. Ekstraksiyon çözücüsünün türü ve hacminin etkisi

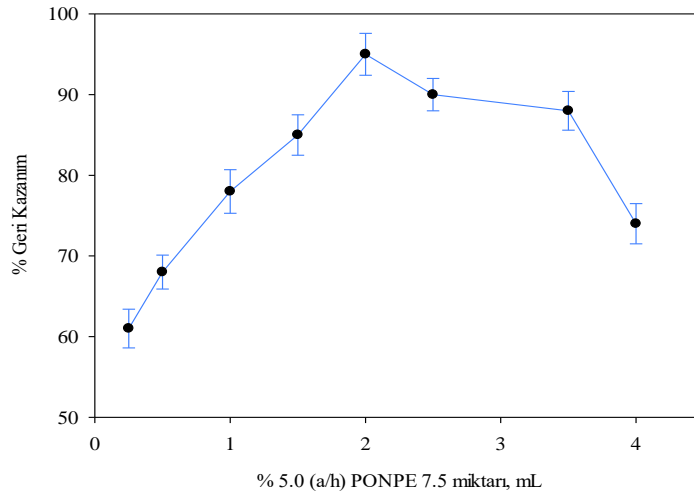
Ponceau 4R-Cu(II) şelat kompleksi oluşumundan sonra, bu kompleksi örnek çözeltisinden ayırmak ve zenginleştirmek için uygun bir ekstraksiyon çözücüsü seçilmelidir. Bu bağlamda, dört farklı ekstraksiyon çözücüsü (PONPE 7.5, Tween 20, Triton X-45 ve Triton x-114) ile yapılan ön deneylerde, PONPE 7.5'in diğer ekstraksiyon çözücülerinden daha etkili bir ayırma gösterdiği gözlenmiştir. Bu ekstraksiyon çözücüler için yapılan çalışmanın sonuçları Şekil 3.6'da verilmiştir. Genel olarak, PONPE 7.5 metal-ligand komplekslerini organik çözücüler kullanmadan çıkarmak için etkili bir şekilde kullanılmıştır. Çünkü, PONPE 7.5'in

misel adı verilen agregalar oluşturduğu bilinmektedir ve bunlar faz ayrılmaya neden olan kompleksleri çok verimli bir şekilde hapseder. Organik çözücülerle karşılaştırıldığında, PONPE 7.5 ticari olarak temin edilebilirlik, yüksek saflık dereceli, kararlı, uçucu olmayan, nispeten toksik olmayan ve çevre dostu reaktiflerdir.



**Şekil 3.6** Ekstraksiyon çözücü türünün etkisi

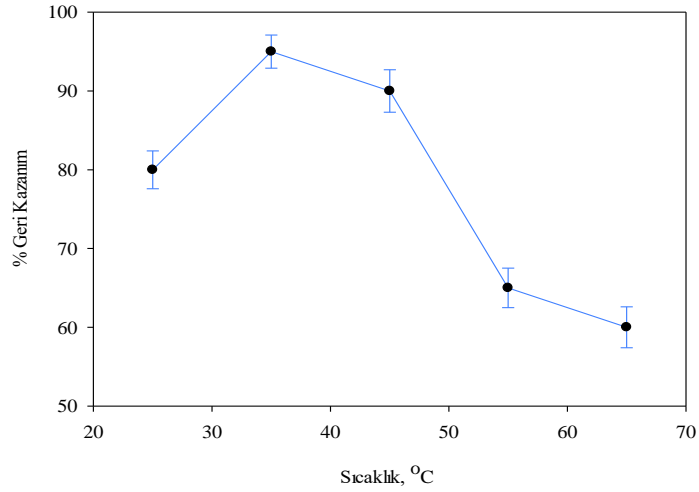
Ayrıca, UA-CPE'de kullanılan PONPE 7.5 derişimi faz ayrımının sağlanması için kritik bir faktördür. PONPE 7.5 kritik misel derişimine (CMC) ulaştığı zaman miselleşme sağlanır ve faz ayrımı için hem hidrofobik hem de hidrofilik merkezler oluşur. Bu nedenle, nicel geri kazanım elde edilmesi için, % 5.0 (a/h) PONPE 7.5'in 0.25-4.0 mL hacim aralığında geri kazanımı üzerine etkisi araştırılmıştır. Şekil 3.7'den anlaşıldığı gibi en iyi geri kazanım %5.0 (a/h) PONPE 7.5'den 2.0 mL kullanıldığında elde edilmiştir. Daha yüksek hacimlerde geri kazanımdaki azalmanın nedeni, final hacimde PONPE 7.5 miktarı arttığı için vizkozite artmıştır. Bu nedenle, daha fazla seyreltici ajan kullanmak gerekmektedir. PONPE 7.5 hacminin düşük olduğu durumda ise, misel oluşumu yeterince gerçekleşmez veya oluşan kompleksin tamamı sulu fazdan ayrılamaz, dolayısıyla geri kazanım değerinde düşme gözlemlendi.



Şekil 3.7 PONPE 7.5 miktarının etkisi

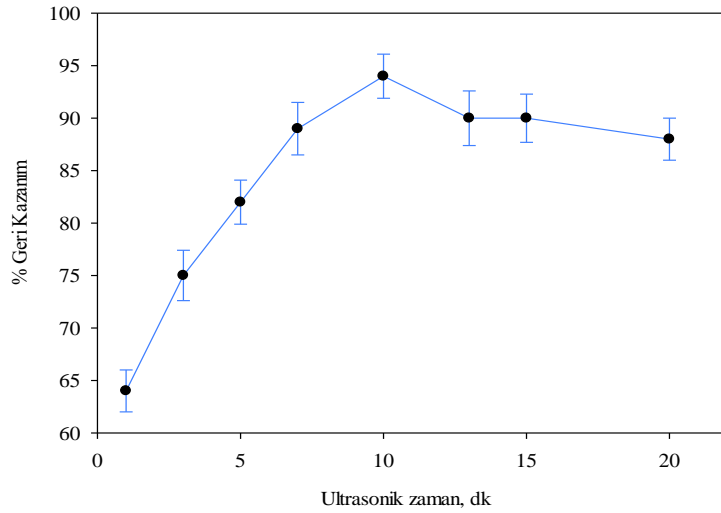
#### 3.2.4. Ultrasonik koşulların optimizasyonu

Kimyasal reaktiflerin optimizasyonunu tamamladıktan sonra, ultrasonik banyoda sıcaklık ve sonikasyon süresi çalışmaları yapıldı. Çözelti ortamının sıcaklığı kompleksin surfaktan fazına kütle transferini hızlandırabilir. Bu nedenle, ultrasonik güç altında denge sıcaklığının geri kazanım üzerine etkisi 25-65 °C aralığında incelenmiştir. Şekil 3.8 incelendiğinde, çözelti ortamının sıcaklığının artırılmasının, 35 °C'ye kadar hafif bir düşüşle kompleksin geri kazanılmasını önemli ölçüde etkilemediğini, ancak 35 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda geri kazanımda önemli bir düşüş olduğunu göstermektedir. Daha yüksek sıcaklıklar elde edilen kompleksin tersinir olarak çözeltiliye dağılmasına bağlı olarak geri kazanım azalmıştır.



**Şekil 3.8** Sıcaklığın etkisi

Genellikle, PONPE 7.5'in kullanıldığı ekstraksiyon yöntemlerinde, ultrasonik etki PONPE 7.5'in hızlı bir şekilde bulutlanmasını sağlar ve sonuç olarak faz ayrımı kolaylaştırılır. Bu nedenle, sonikasyon zamanının kompleksin geri kazanımı üzerindeki etkisi 1 dakika ile 20 dakika arasında araştırılmıştır. Şekil 3.9'daki sonuçlardan kompleksin geri kazanılmasının, 10 dakikalık bir sonikasyon süresine kadar arttığı ve daha uzun zaman dilimlerinde hafif bir azalma ile minimuma eriştiği görülmüştür. Bu nedenle, sonraki çalışmalarda kantitatif geri kazanım için 10 dakikalık bir sonikasyon süresi yeterli bulunmuştur.



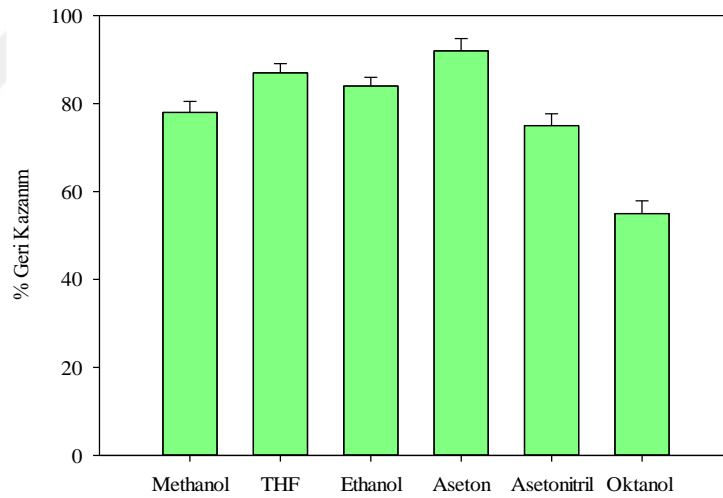
**Şekil 3.9** Ultrasonik zamanın etkisi

### 3.2.5. Santrifüjleme hızı ve süresinin etkisi

Santrifüjleme hızı ve süresi, faz ayrımını etkileyen parametrelerden biridir. Bu nedenle optimum koşullar altında aynı miktarda Ponceau 4R içeren çözeltilerin bulutlanma noktası gözlemlendikten sonra 500 ile 4000 rpm arasında farklı hızlarda santrifüjlenme işlemi yapılmıştır. Etkin bir faz ayrımı için 4000 rpm'de 5 dakikalık bir santrifüjlemenin yeterli olduğu görülmüştür.

### 3.2.6. Seyreltici ajan türünün etkisi

Santrifüjleme ve faz ayrımı sonrası analiti içeren fazın hacmi oldukça düşük ve viskozdu. Bu haliyle analiz edilemeyeceğinden dolayı farklı seyreltici ajanlar kullanıldı. Yapılan çalışmada final hacim 0.5 mL'ye tamamlandı ve ardından spektrofotometrede analizleri yapıldı. Bu çalışmada altı farklı seyreltici ajan kullanıldı. Şekil 3.10'dan anlaşılacağı gibi en iyi geri kazanım aseton varlığında elde edildi. Bu nedenle aseton seyreltici ajan olarak seçildi.



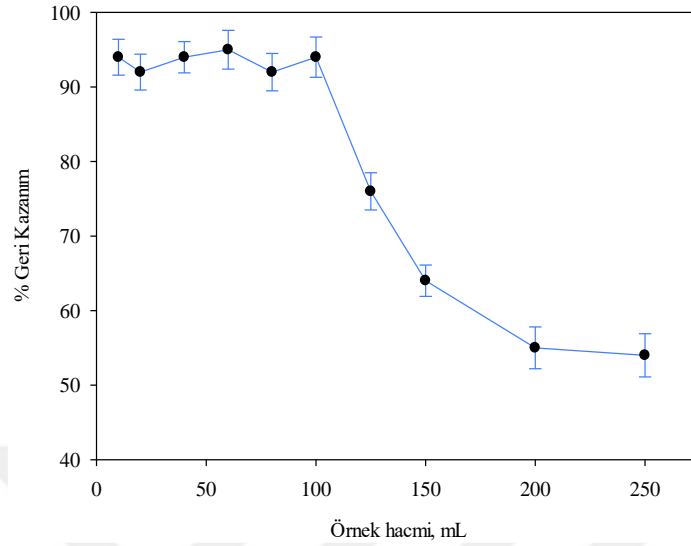
Şekil 3.10 Seyreltici ajan türünün etkisi

### 3.2.7. Örnek hacminin etkisi

Ön deriştirme faktörü (PF) doğrudan örnek hacmi ile ilgilidir. Çünkü PF, örnek hacminin final faz hacmine oranı olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle, örnek hacminin kompleksin geri kazanımı üzerindeki etkisi optimum koşullar altında 10 mL ila 250 mL arasında incelenmiştir. Şekil 3.11'de görüldüğü gibi, yüksek örnek hacimlerinde (>~100 mL), geri kazanımda keskin bir düşüş



gerçekleşmiştir. Bu sonuçlardan, PF örnek hacminin (100 mL) final hacme (0.5 mL) olan oranına dayanarak 200 olarak hesaplandı.



Şekil 3.11 Örnek hacminin etkisi

### 3.3. Yöntemin Analitik Parametreleri

Önerilen yöntemin analitik parametreleri, optimum deneysel koşullar altında matris uyumlu kalibrasyon çözeltileri ve sulu standart çözeltiler için ayrı ayrı belirlenmiştir. Bu kritik faktörler, regresyon denklemi, çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ), duyarlılık iyileştirme faktörü (EF), bağıl standart sapma (BSS) ve geri kazanımı içerir. Matris uyumlu kalibrasyon çözeltileri, numune çözeltilere farklı miktarlarda standart Ponceau 4R çözeltisi ilave edilerek elde edildi. Yöntemin analitik özellikleri, gerçek örnekler üzerinde yapılan çalışmalar ile elde edildiğinden, girişim etkileri de önerilen yönteme dahil edilmiştir. Matris uyumlu çözeltiler için yöntemin çalışma aralığı 0.9981 korelasyon katsayısı ile 20-750  $\mu\text{g L}^{-1}$  arasında bulunmuştur. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 6.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  ve 20.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Bağıl standart sapmalar (% BSS, n: 5), 50, 150 ve 450  $\mu\text{g L}^{-1}$  Ponceau 4R'nin tekrarlanan ölçümleri için ortalama % 2.8 olarak belirlenmiştir; bu değer düşük konsantrasyonlarda bile çok tekrarlanabilir ve kararlı bir sinyal verdiğini gösterir. Önerilen UA-CPE yöntemi uygulamadan önce ve sonra oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin eğimlerinin oranı olarak hesaplanan duyarlılık iyileştirme faktörü (EF) 126 olarak bulundu. Ayrıntılı sonuçlar Çizelge 3.1'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1. Önerilen yöntemin analitik özellikleri**

Analitik Parametreler	Matris uyumlu kalibrasyon eğrisi için	Doğrudan sulu standartlara dayalı kalibrasyon eğrisi için
Regresyon denklemi ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Abs.= $(4.28\pm 0.74)\times 10^{-3}$ C+ 0.0172 $\pm$ 0.0045	Abs.= $(3.95\pm 0.53)\times 10^{-3}$ C+ 0.0227 $\pm$ 0.00741
Regresyon katsayısı ( $r^2$ )	0.9981	0.9972
Doğrusal çalışma aralığı ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	20-750	25-650
Ortalama % geri kazanım (n: 5, 50, 150 and 450 $\mu\text{g L}^{-1}$ )	95.1	96.7
Ortalama % BSS (n: 5, 50, 150 ve 450 $\mu\text{g L}^{-1}$ )	2.8	2.5
LOD ( $3\times S_{\text{boş}}/m$ , n: 10, $\mu\text{g L}^{-1}$ )	6.5	7.4
LOQ ( $10\times S_{\text{boş}}/m$ , n: 10, $\mu\text{g L}^{-1}$ )	20	25
EF	126	-
PF	200	-
Ölçüm dalga boyu, $\lambda_{\text{max}}$ (nm)	510	500
*Matriks etkisi (%)	8.4	-

\*İki kalibrasyon eğrisinin eğim farklarının doğrudan sulu standartlara dayalı kalibrasyon eğrilerinin eğimine oranının hesaplanmasına dayanarak, matris etkisi% =  $(m_m - m_s)/m_s \times 100$

### 3.4. Seçicilik Çalışması

Bir analitik yöntemin seçiciliği, analiti, numune matrisindeki diğer türlerden etkilenmeden belirleme yeteneğidir. Dolayısıyla, yöntem seçiciliği, analitin tespit hassasiyetini ve sonuçların güvenilirliğini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Bir yöntemin seçiciliğini arttırmak için analite özgü yumuşak örnek hazırlama ve ekstraksiyon adımlarının uygulanması çok önemlidir. Önerilen yöntem, model çözeltiler kullanılarak geliştirildiği için, gerçek numunelerde bulunabilecek farklı kimyasal türler analitin belirlenmesini etkileyebilir. Bu nedenlerden dolayı Ponceau 4R için yöntemin seçiciliği girişim çalışması ile test edilmiştir. Bu çalışma şu şekilde gerçekleştirilmiştir. 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  Ponceau 4R içeren model çözeltilere farklı miktarlarda girişim iyonları (düşükten yükseğe) eklendi ve her bir iyon için tolerans limitini ve geri kazanım değerleri bulundu. Ayrıca, bu çalışmada daha çok Ponceau 4R benzeri kimyasal türler seçildi. Tolerans limiti, girişimci türlerin miktarının, kompleksin analitik sinyalinde  $\pm\%$  5.0'dan fazla değişikliğe neden olan Ponceau 4R miktarına oranı olarak tanımlanmaktadır. Çizelge 3.2'deki sonuçlar incelendiğinde, girişim iyonlarının Ponceau 4R'nin geri kazanımı üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı söylenebilir. Yüksek seçicilik, Cu(II) ile stabil bir şelat kompleksi vermenin ve bozulmaya karşı kullanılan tampondaki sitrik asitin stabilizatörü gibi

davranmasının bir sonucu olarak elde edilen optimal ekstraksiyon koşullarından kaynaklanmaktadır.

**Çizelge 3.2.** Girişim türlerinin optimize edilmiş koşullar altında analitin geri kazanımı üzerindeki etkileri (n: 3)

Girişimci tür	Tolerans limiti [Girişimci tür]/[analit]	<sup>a</sup> Bağlı Hata (%)	BSS (%)
Sn(II)	1500	1.7	2.1
Mn(II)	1500	1.5	2.4
Na(I)	1500	1.8	2.5
Ca(II)	1500	-1.3	1.8
Oksalik asit	1000	2.1	2.5
Fe(III)	1000	2.4	2.9
Mg(II)	1000	-1.9	1.7
K(I)	1000	-2.5	1.9
Ni(II)	1000	-2.7	3.1
Cd(II)	1000	1.9	3.4
Pb(II)	500	2.3	3.0
Ag(I)	500	2.4	3.2
Co(II)	500	2.7	3.7
Al(III)	500	-3.0	2.8
Zn(II)	500	-3.4	2.8
Patent Blue V	250	-3.5	2.9
Amarant	250	3.7	3.1
Tartrazin	250	3.8	3.2
Riboflavin	250	3.9	3.4
Sudan III	250	-4.1	3.5
Morin	100	-4.5	3.7
Karmin	100	-4.7	3.0
Alura Kırmızısı	100	3.8	3.5
Sunsetyellow FCF	100	3.9	3.7
CochinealRed A	100	4.8	3.3

<sup>a</sup> % Bağlı hata= % Geri Kazanım-100

### 3.5. Validasyon Çalışmaları

Ponceau 4R içeren sertifikalı referans materyali olmadığından, önerilen yöntemin doğruluğunu ve kesinliğini test etmek için iki farklı çalışma yapılmıştır. Yöntemin kesinliği % BSS olarak değerlendirildi. % BSS değerleri gün içi (aynı gün içinde n: 5) ve günler arası (ardışık dört günde n: 4 x 5) çalışmalar için ayrı ayrı bulundu. Ayrıca, yöntemin doğruluğu 50, 150 ve 450 µg L<sup>-1</sup> standart eklenmiş numunelerin

geri kazanımıyla test edildi. Bu çalışmada, doğruluk ve kesinlik sırasıyla bağıl hata (% BH) ve bağıl standart sapma (% BSS) olarak tanımlandı. Detaylı sonuçlar Çizelge 3.3'de verilmiştir. Sonuçlar, % BH ve %BSS'nin sırasıyla % -4.8-4.7 ve % 1.0-3.6 aralığında olduğunu gösterdi.

**Çizelge 3.3. Önerilen yöntem için doğruluk ve kesinlik çalışmaları**

	Gün içi				Günler arası (n: 4×5)
	1.gün (n: 5)	2.gün (n: 5)	3. gün (n: 5)	4.gün (n: 5)	
50 µg L <sup>-1</sup>					
X <sub>ort.</sub>	48.5	47.9	48.1	48.3	47.4
SS	1.2	1.3	1.3	1.4	1.7
%BSS	2.5	2.7	2.7	2.9	3.6
% BH	-1.5	-2.1	-1.9	-1.7	-2.6
150 µg L <sup>-1</sup>					
X <sub>ort.</sub>	152.7	153.5	147.9	153.2	154.7
SS	3.4	3.8	3.6	3.3	3.9
%BSS	2.2	2.5	2.4	2.2	2.5
% BH	2.7	3.5	-2.1	3.2	4.7
450 µg L <sup>-1</sup>					
X <sub>ort.</sub>	454.0	453.8	453.9	446.4	445.2
SS	4.4	4.3	4.2	4.4	5.1
%BSS	1.0	1.0	1.0	1.1	1.2
%BH	4.0	3.8	3.9	-3.6	-4.8

X<sub>ort.</sub>: Ortalama Ponceau 4R miktarı; SS: standart sapma, BSS: bağıl standart sapma, BH: bağıl hata

Bu çalışmalara ek olarak, yöntemin doğruluğunu test etmek için, “örnek hazırlama bölümünde” açıklandığı gibi analiz edilecek tüm örneklere iki farklı Ponceau 4R derişimi eklenmiş ve bu örneklerden geri kazanım değerleri bulunmuştur. Çalışmanın sonuçları Çizelge 3.4'te verilmiştir. Tüm örneklerde en düşük ve en yüksek geri kazanım değerleri sırasıyla % 94.3 ve % 104.2'dir. Bu sonuçlar açıkça güvenilir geri kazanım değerlerinin elde edildiğini göstermektedir. Bu nedenle, önerilen yöntem gıda örneklerinde Ponceau 4R seviyelerini analiz etmek için uygundur.

### 3.6. Yöntemin Uygulanması

Önerilen UA-CPE prosedürünün uygulanabilirliğini araştırmak için, standart ekleme metodu ile bazı gıda ve içeceklerde Ponceau 4R tayini için uygulanmıştır. Matris etkisini en aza indirmek ve analit miktarını lineer çalışma aralığına düşürmek için numuneler 10-500 kat arasında seyreltildi. Analiz yapılan örneklerde Ponceau 4R miktarı, mikro hacimli UV-VIS spektrofotometrisi ile tekrarlanan beş ölçüm için 54.4-220.4µg L<sup>-1</sup> aralığında hesaplandı. Ek olarak, standart ekleme kalibrasyon

eğrilerinin eğimleri ve olası matris etkisi için matris uyumlu kalibrasyon eğrileri de çalışmada

**Çizelge 3.4.** Önerilen yöntemin gerçek gıda örneklerine uygulama sonuçları

Örnekler	Eklenen ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Doğrudan sulu standartlara dayalı kalibrasyon eğrisi için (n:5)			Matris uyumlu kalibrasyon eğrisi için (n:5)			*t- deney sel
		Bulunan ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	BSS (%)	GK (%)	Bulunan ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	BSS (%)	GK (%)	
Meyve	-	85.7	3.9	-	84.5	4.2	-	1.04
suyu	50	134.6	3.4	97.7	133.1	3.7	97.1	-
(çilekli)	100	184.2	3.2	98.5	182.5	3.5	98.0	-
Meyve	-	175.6	4.1	-	174.5	4.6	-	1.15
suyu	50	224.1	3.5	96.9	222.7	4.2	96.4	-
(vişneli)	100	272.8	3.7	97.2	271.9	4.0	97.4	-
Meyve	-	55.2	3.1	-	54.4	3.9	-	0.89
suyu	50	104.6	2.6	98.2	103.2	3.6	97.5	-
(elmalı)	100	154.0	2.5	98.8	152.6	3.5	98.2	-
Çikolatal	-	214.3	4.4	-	213.8	5.2	-	1.65
ı drajeler	50	262.0	4.1	95.4	264.3	4.5	94.9	-
(vişneli)	100	311.4	3.5	97.1	309.4	4.3	95.6	-
Çikolatal	-	165.8	4.2	-	162.7	5.1	-	1.20
ı drajeler	50	214.4	4.0	97.2	211.0	4.5	96.6	-
(çilekli)	100	264.2	3.7	98.4	260.0	4.0	97.3	-
Çikolatal	-	96.1	3.4	-	94.5	3.8	-	0.75
ı drajeler	50	147.5	3.2	102.7	146.4	3.6	103.7	-
(böğürtle nli)	100	197.5	3.0	101.4	196.8	3.2	102.3	-
	-	220.4	4.4	-	217.6	4.8	-	0.83
Vişne	50	249.2	4.1	97.5	266.2	4.5	97.1	-
Jölesi	100	318.4	3.7	98.0	315.5	4.1	97.9	-
	-	75.6	3.2	-	73.9	3.6	-	0.98
Meyveli	50	127.1	2.7	103.0	125.8	3.3	103.8	-
Çay	100	177.3	2.4	101.7	176.2	2.9	102.3	-
	-	109.5	3.8	-	108.7	4.1	-	1.15
Vişne	50	160.9	3.5	102.8	160.8	3.7	104.2	-
reçeli	100	211.0	3.2	101.5	211.6	3.5	102.9	-
	-	148.8	4.5	-	146.0	4.9	-	1.34
Çilek	50	198.1	4.1	98.5	194.8	4.5	97.9	-
reçeli	100	247.8	4.0	99.0	244.6	4.3	98.6	-
	-	65.5	2.9	-	64.1	3.5	-	1.25
Bisküvi	50	114.2	2.7	97.4	112.3	3.3	96.4	-
	100	163.7	2.5	98.2	162.0	2.8	97.9	-
	-	89.2	3.3	-	87.8	3.7	-	0.93
Bisküvi	50	137.2	3.0	95.9	135.0	3.4	94.3	-
	100	186.9	2.8	97.7	183.8	3.0	96.0	-

GK: Geri Kazanım, \*Çizelgedeki t değerinin % 95 güven düzeyinde 8 serbestlik derecesi için  $t_{kritik}$  2.31 olduğu iki kalibrasyon yaklaşımı ile elde edilen iki ortalama değer in istatistiksel karşılaştırmasına dayanarak.

birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Her iki kalibrasyon eğrisinin eğimleri arasında, birleştirilmiş standart sapmalara dayanan varyans analizi ile anlamlı bir fark olmadığı ( $t_{kritik} = 2.31 > t_{deneysel} = 0.75-1.65$ ,  $p > 0.05$ , serbestlik derecesi:8) görülmüştür. Ayrıca, standart ekleme öncesi ve sonrasında bulunan Ponceau 4R için geri kazanımları ve % BSS değerleri Çizelge 3.4'te ayrıntılı şekilde verilmiştir.

### 3.7. Yöntem Karşılaştırılması

Yöntem karşılaştırma, literatürde önerilen yöntemin etkinliğini ve yerini belirleme açısından çok önemlidir. Önerilen yöntemin analitik özellikleri, farklı örneklerde Ponceau 4R analizi için spektroskopik, elektroanalitik ve kromatografik tekniklerin kullanıldığı bazı yöntemlerle karşılaştırılması Çizelge 3.5'te verilmektedir. Yöntemin avantajları aşağıdaki gibi özetlenebilir: (i) Basit ve hızlı. (ii) Yüksek seçiciliği ve düşük LOD'si vardır. (iii) Pahalı ekipman ve fazla kimyasallar kullanmaya gerek yoktur. (iv) Yöntem, kısa ekstraksiyon süresi ve geniş doğrusal çalışma aralığı sergiler. (v) Metod düşük reaktif tüketimine ve asgari atık üretimine sahiptir. Ek olarak, belirleme aşaması, hemen hemen her araştırma laboratuvarında bulunabilen basit, ucuz ve kullanımı kolay olan spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 3.5.** Önerilen yöntemle yayınlanan bazı yöntemlerin karşılaştırılması

Örnek	Yöntem	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Çalışma aralığı ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	BSS (%)	GK (%)	Kaynak.
Gıdalar	Spektrofotometre	40	100-5200	2.79	94.0	[2]
Meyve suları	Elektrokimyasal sensor/HPLC	0.8 nM	1 to 100 nM	4.7	-	[14]
Tatlılar	SPE/DPV	42	-	5.7	96	[18]
Gıdalar	HPLC-DAD- ESI-MS	0.01	0.01-40.5	6.4	93.2	[58]
Gıdalar	UA-CPE spektrofotometre	25	50-1700	2.4	94.5	[59]
Gıdalar	VA-DES- DLLME/HPLC	0.1	0.5-500	<6	90.1	[60]
Gıdalar	UA-CPE spektrofotometre	6.5	20-750	2.8	95.1	Mevcut Yöntem

VA-DES-DLLME: girdap destekli derin ötektik çözücü dispersive sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu; HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi; SPE: Katı-faz ekstraksiyonu; DPV: Diferansiyel Puls Polarografisi; HPLC-DAD-ESI-MS: yüksek performanslı sıvı kromatografisi - diyot dizisi tespiti - elektrosprey kütle spektrometrisi

#### 4. SONUÇLAR

Bu tez kapsamında gıda boyası olarak kullanılan Ponceau 4R (E-124)'in gerçek örneklerde tayini öncesi ultrasonik etkiye dayalı bulutlanma noktası ekstraksiyonu (UA-CPE) yöntemi geliştirilmiştir. Ponceau 4R'e UV-VIS spektrofotometre ile 510 nm de tayin edilmiştir. Ponceau 4R'nin, Cu(II) ile kompleksi oluşturmuş ve bu kompleksin sulu fazdan mikrolitre hacmindeki PONPE 7.5 fazına ekstrakte edilebilmesi için yöntemin bazı değişkenler için optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Bu bağlamda, kolay özütlenmenin sağlanması ve yüksek geri kazanım değerlerine ulaşmak için pH, metal türü ve miktarı, ekstraksiyon çözücü türü ve miktarı, ultrasonik zaman, sıcaklık, örnek hacmi, seyreltici ajanın tür ve santrifüj koşulları gibi deneysel koşullar ayrıntılı olarak optimize edilmiştir.

Özellikler UA-CPE yönteminde ortamın pH değeri optimize edilmesi gereken en önemli parametredir. Çünkü, analitin hidrofobik kompleksinin oluşturulması için kullanılan kimyasal türler arasında uygun kimyasal etkileşimlerin olması gereklidir. Bu etkileşimde pH'ya bağlı olarak azalabilir ya da artabilir. Bu bağlamda, analit için örnek çözelti pH'ının geri kazanım üzerine etkisi farklı pH aralığında araştırıldı. Nicel geri kazanım pH 6.0 sitrat tamponu varlığında elde edilmiştir. Sonraki çalışmalarda pH değeri 6 olarak alınmıştır. Sonuçlar Şekil 3.2'de verilmiştir.

Ponceau 4R'nin geri kazanımına metal türü ve miktarının etkisini incelemek için sürdürülen çalışmada model çözeltilere bilinen miktarda Ponceau 4R eklendikten sonra pH 6'ya ayarlandı. Ardından her bir metal iyonları için yapılan çalışmada en iyi geri kazanım Cu(II) varlığında elde edilmiştir. Ardından metal miktarının analitin geri kazanımı üzerine etkisi aynı deneysel prosedür ile incelenmiş ve nicel geri kazanım derişim  $1.5 \text{ mL } 10 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cu(II)}$  kullanıldığında elde edilmiştir. Her iki çalışmanın sonuçları Şekil 3.4 ve 3.5'te verilmiştir.

Bakır varlığında analit içeren kompleks oluşturulduktan sonra, bu kompleksin sulu fazdan ayrılması için uygun ekstraksiyon çözücüsünün seçimi nicel geri kazanımların elde edilmesi için önemlidir. Bu bağlamda, PONPE 7.5, Tween 20, Triton X-45 ve Triton X-114 gibi farklı surfaktanların analitin geri kazanım üzerine etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışmada en iyi geri kazanım sırasıyla  $\text{PONPE 7.5} > \text{Triton X-114} > \text{Triton X-45} > \text{Tween 20}$  idi. Bu nedenle, ekstraksiyon çözücüsü olarak PONPE 7.5 seçilmiştir. Ardından bu ekstraksiyon çözücüsünün miktarının analitin

geri kazanımı üzerine etkisi farklı miktarlarda araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucu 2.0 mL % 5.0 (a/h) PONPE 7.5 varlığında elde edilmiştir. Her iki çalışmanın sonuçları Şekil 3.6 ve 3.7’de verilmiştir.

Surfaktanların kullanıldığı ekstraksiyon çalışmalarında ekstraksiyon çözücüsünün misel oluşturması gereklidir. Misel oluşumuna etki eden iki önemli parametre vardır. Bunlar ortamın sıcaklığı ve kullanılan surfaktanın derişimidir. Eğer surfaktanlar misel oluşturmak için gerekli sıcaklığa ulaşırsa bulutsu bir görünüm ortaya çıkar ve bu da oluşan kompleksin faz ayrımını kolaylaştırır. Bu bağlamda, analitin geri kazanımı üzerine etkisi farklı sıcaklık aralığında araştırılmıştır. Şekil 3.8’deki sonuçlardan da anlaşıldığı gibi nicel geri kazanım 35 °C’de elde edilmiştir.

UA-CPE ile zenginleştirmede, ultrasonik zamanın analitin geri kazanımına etkisi incelenmiştir. Su fazında bulunan Ponceau 4R-Cu(II) kompleksinin ekstraksiyon fazına taşınmasını hızlandırmak için 35 °C de farklı sürelerde ultrasonik etki uygulanmıştır. Şekil 3.9’da anlaşılabacağı gibi 10 dakikalık sonikasyonun kantitatif geri kazanım için yeterli olduğu görülmektedir. Ekstraksiyon fazının su fazından ayrılması için, santrifüj koşulları (hızı ve süresi) optimize edildi. Bu bağlamda, 4000 rpm’de 5 dakikalık bir santrifüjlemenin yeterli olduğu görülmüştür.

Santrifüjleme sonrası ekstraksiyon çözücüsü tüpün dip kısmında toplandı ve üsteki sulu kısım dekantasyon ile boşaltıldı. Kalan ve analiti içeren faz düşük hacimli ve vizkoz olduğu için analize uygun değildi. Bu nedenle farklı seyreltik ajanlar kullanarak final hacim 0.5 mL’ye tamamlandı. Şekil 3.10’daki sonuçlar incelendiğinde en iyi geri kazanım aseton varlığında elde edilmiştir. Sonraki çalışmalarda aseton seyreltici ajan olarak kullanıldı.

Yüksek önderiştirme faktörü elde edebilmek için en önemli faktörlerden birisi örnek hacmidir. Bunu sağlamak için çalışılan örnek hacminin yüksek olması gerekmektedir. Optimize edilmiş şartlarda hazırlanan ve hacmi 10-250 mL arasında değişen model çözeltilere geliştirilen yöntem uygulanmıştır. Şekil 3.11’deki sonuçlar incelediğinde, 100 mL örnek hacmine kadar geri kazanım değerlerinin nicel olduğu daha yüksek hacimlerde geri kazanım azalmıştır.

Optimum deney koşulları model çözeltiler kullanarak geliştirildiği için, gerçek örneklerin yapısında bulunan farklı kimyasal türler analitin geri kazanımını etkileyebilir. Bu bağlamda model çözeltiler üzerine farklı miktarlarda kimyasal türler eklenerek yöntem için seçicilik çalışması yapıldı. Çalışmada daha çok analit ile



benzer kimyasal özelliklere sahip ve gıda boyası olarak kullanılan türler seçilmiştir. Yapılan çalışmanın sonuçları Çizelge 3.2’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde analit geri kazanımı için önemli bir girişim etkisinin olmadığı görülmektedir. Bu sonuçlar seçilen kimyasal ortamın analit için yüksek seçiciliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Gerçek örneklerin analizinden önce önerilen yöntemin validasyon çalışması yapıldı. Elimizde Ponceau 4R’e içeren sertifikalı referans materyal olmadığı için, yöntemin kesinliği gün içi ve günler arası çalışmasıyla, doğruluğu ise standart ekleme sonrası geri kazanım değerleriyle test edildi. Yapılan çalışmanın sonuçları Çizelge 3.4’de ayrıntılı olarak verilmiştir. Nicel geri kazanımlar ve düşük %BSS değerleri elde edildiği görülmektedir.

Validasyon çalışmasının ardından, önerilen yöntem çeşitli gıda örneklerinde bulunabilecek Ponceau 4R’nin ekstraksiyonu ve analizi için uygulandı. Bu çalışmada yöntemin doğruluğunu test etmek için hem doğrudan sulu standartlara dayalı kalibrasyon eğrisi hem de matris uyumlu kalibrasyon eğrisi kullanarak örnekler analizlendi. Yapılan çalışmanın sonuçları Çizelge 3.4’de verilmiştir.

Önerilen yöntemlerin literatürdeki yöntemlerle karşılaştırılması Çizelge 3.5’de verilmiştir. Önerilen yönteminin seçme sınırının, çalışma aralığı ve % BBS karşılaştırıldığında yöntemlerden daha düşük ya da karşılaştırılabilir olduğu görülmektedir. Bunlara ek olarak, yöntemimizin cazip yönlerinden bir diğeri ise kimyasal sayısının az ve maliyeti düşük cihazların kullanılmasıdır.

## KAYNAKLAR

- [1] Fogg, A.G., Summan, A.M. (1983). Differential-pulse polarographic monitoring of permitted synthetic food colouring matters and ascorbic acid in accelerated light degradation studies and the spectrophotometric determination of the ammonia and simpler amines formed. *Analyst*, 108, 691-700.
- [2] Altınöz, S., Toptan, S. (2003). Simultaneous determination of indigotin and Ponceau-4R in food samples by using Vierordt's method, ratio spectra first order derivative and derivative UV spectrophotometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 517–530.
- [3] JECFA. (1983). Joint FAO/ WHO expert committee on food additives, evaluation of certain food additives and contaminants (twenty-seventh report of the joint fao/who expert committee on food additives). WHO Technical Report Series, No. 696.
- [4] Wu, D., Sun, D.W. (2014). Colour measurements by computer vision for food quality control – a review. *Trends Food SCI Tech*, 29, 5-20.
- [5] Yentür, G., Yaman, M., Bayhan, A. (1998). Bazı gıda maddelerine katılan sentetik boya miktarlarının araştırılması. *Gıda*, 23, 195-199
- [6] Konstantinou, I.K., Albanis, T.A. (2004). TiO<sub>2</sub>-assisted photocatalytic degradation of azo dyes in aqueous solution: kinetic and mechanistic investigations. *Appl. Catal. B: Environ*, 49, 1.
- [7] Yiğit, H., İnanç, A.L. (2017). Açıkta ve ambalajlı olarak satışa sunulan kırmızı biberlerde sentetik boya varlığı. *Akademik Gıda*, 15 (3), 261-268
- [8] Yentür, G., Erdoğan, Ş., Er, B., Demirhan, B., Öktem, A.B. (2010). Ankara bölgesinde tüketime sunulan bazı gıda maddelerinde sentetik boya düzeylerinin araştırılması. *Gıda Dergisi*, 35(1), 43-46.
- [9] McCann, D., Barrett, A., Cooper, C., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., Kitchin, E., Lok, K., Porteous, L., Prince, E., Sonuga-Barke, E., O'Warner, J., Stevenson, J. (2007). Food additives and hyperactive behavior in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: A randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*, 370 1560.
- [10] Tanaka, T. (2006). Reproductive and neurobehavioural toxicity study of Ponceau 4R administered to mice in the diet. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1651–1658.
- [11] EFSA, (2009). Scientific opinion on the re-evaluation of Ponceau 4R (E 124) as a food additive, *EFSA J.* 7 1328.
- [12] Wang, Z.F., Zhang, H., Wang, Z.P., Zhang, J., Duan, X.M., Xu, J.K., Wen, Y.P. (2015). Trace analysis of Ponceau 4R in soft drinks using differential pulse stripping voltammetry at SWCNTs composite electrodes based on PEDOT: PSS derivatives. *Food Chemistry*, 180, 186–193.

- [13] **Zhang, Y.Y., Hu, L.T., Liu, X., Liu, B.F., Wu, K.B.** (2015). Highly sensitive and rapid detection of Ponceau 4R and tartrazine in drinks using alumina microfibersbased electrochemical sensor. *Food Chemistry*, 166, 352–357.
- [14] **Minioti, K.S., Sakellariou, C.F., Thomaidis, N.S.** (2007). Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase highperformance liquid chromatography coupled with diode-array detector. *Analytica Chimica Acta*, 583, 103–110.
- [15] **Xie, Y., Li, Y., Sun, Y., Wang, H., Qian, H., Yao, W.** (2012). Theoretical calculation (DFT), raman and surface-enhanced Raman scattering (SERS) study of Ponceau 4R. *Spectrochimica Acta Part A*, 96, 600–604.
- [16] **Markéta, R., Petr, T., Patrik, V., Pavel, K., Jan, P.** (2007). Sensitive determination of erythrosine and other red food colorants using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1141, 206–211.
- [17] **Chanlon, S., Joly-Pottuz, L., Chatelut, M., Vittori, O., Cretier, J.L.** (2005). Determination of carmoisine, allura red and Ponceau 4R in sweets and soft drinks by differential pulse polarography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 503–515.
- [18] **Berzas, N., Guiberteau, J.J., Cabanillas, C., Salcedo, C.** (1995). Simultaneous spectrophotometric determination of three food dyes by using the first derivative of ratio spectra. *Talanta*, 42, 2043–2051.
- [19] **Capitan-Vallvey, L.F., Naws, N., De Orbe, P., Ignacio, A., Castenada, R.** (1997). Simultaneous determination of tartrazine and sunset yellow in cosmetic products by first derivative spectrophotometry. *Microbiological Chimica Acta*, 126, 153–157.
- [20] **Li, X.Q., Zhang, Q.H., Ma, K., Li, H.M., Guo, Z.** (2015). Identification and determination of 34 water-soluble synthetic dyes in foodstuff by high performance liquid chromatography-diode array detection-ion trap time-offlight tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 182, 316–326.
- [21] **Becerro, F., Gonzales, D.H., Mandes, J.** (1990). Determination of sunset yellow and tartrazine by differential pulse polarography. *Talanta*, 37, 55–658.
- [22] **Capitan-Vallvey, L.F., Valencia, M.C., Nicolas, E.A.** (2002). Flow injection analysis with on-line solid phase extraction for spectrophotometric determination of Ponceau 4R and its subsidiary unsulfonated dye in sweets and cosmetic products. *Microchimica Acta*, 138 (1-2), 69-76.
- [23] **Altunay, N., Elik, A., Gürkan, R.** (2018). Extraction and reliable determination of acrylamide from thermally processed foods using ionic liquid-based ultrasound-assisted selective microextraction combined with spectrophotometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(2), 222-232.

- [24] **Soylak, M., Unsal, Y.E., Tuzen, M.** (2011). Spectrophotometric determination of trace levels of allura red in water samples after separation and preconcentration. *Food and chemical toxicology*, 49(5), 1183-1187.
- [25] **Pourreza, N., Rastegarzadeh, S., Larki, A.** (2011). Determination of allura red in food samples after cloud point extraction using mixed micelles. *Food Chemistry*, 126 (3), 1465-1469
- [26] **Wang, M., Gao, Y., Sun, Q., Zhao, J.** (2015). Ultrasensitive and simultaneous determination of the isomers of amaranth and Ponceau 4R in foods based on new carbon nanotube/polypyrrole composites. *Food chemistry*, 172, 873-879.
- [27] **Tuzen, M., Karaman, I., Citak, D., Soyлак, M.** (2009). Mercury (II) and methyl mercury determinations in water and fish samples by using solid phase extraction and cold vapour atomic absorption spectrometry combination. *Food and Chemical Toxicology*, 47(7), 1648-1652.
- [28] **Citak, D., Tuzen, M., Soyлак, M.** (2010). Speciation of Mn (II), Mn (VII) and total manganese in water and food samples by coprecipitation–atomic absorption spectrometry combination. *Journal of hazardous materials*, 173(1-3), 773-777.
- [29] **Tuzen, M., Kazi, T.G., Citak, D., Soyлак, M.** (2013). Pressure-assisted ionic liquid dispersive microextraction of vanadium coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 28(9), 1441-1445.
- [30] **Bakircioglu, D., Kurtulus, Y.B., Ucar, G.** (2011). Determination of some traces metal levels in cheese samples packaged in plastic and tin containers by ICP-OES after dry, wet and microwave digestion. *Food and Chemical Toxicology*, 49(1), 202-207.
- [31] **Bakircioglu, D., Topraksever, N., Yurtsever, S., Kizildere, M., Kurtulus, Y.B.** (2018). Investigation of macro, micro and toxic element concentrations of milk and fermented milks products by using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer, to improve food safety in Turkey. *Microchemical Journal*, 136, 133-138.
- [32] **Elik, A.** (2019). Interference-free determination of carmine in food samples using ultrasonic assisted cloud point extraction coupled with spectrophotometry. *Cumhuriyet Science Journal*, 40(2), 305-316.
- [33] **Altunay, N.** (2019). A simple and cheap ultrasound-assisted microextraction procedure for extraction of tartrazine in soft drinks and foodstuff. *Cumhuriyet Science Journal*, 40(2), 275-284.
- [34] **Elik, A., Demirbas, A., Altunay, N.** (2019). Developing a new and simple natural deep eutectic solvent based ultrasonic-assisted microextraction procedure for determination and preconcentration of As and Se from rice samples. *Analytical Methods*, 11, 3429-3438

- [35] **Elik, A., Unal, Y., Altunay, N.** (2019). Development of a chemometric-assisted deep eutectic solvent-based microextraction procedure for extraction of caffeine in foods and beverages. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 1-12.
- [36] **Altunay, N., Elik, A., Gürkan, R.** (2019). Vortex assisted-ionic liquid based dispersive liquid liquid microextraction of low levels of nickel and cobalt in chocolate-based samples and their determination by FAAS. *Microchemical Journal*, 147, 277-285.
- [37] **Elik, A., Altunay, N., Gürkan, R.** (2019). Ultrasound-assisted low-density solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction coupled to spectrophotometry for the determination of low levels of histamine in fish and meat products. *Food Analytical Methods*, 12(2), 489-502
- [38] **Evangelos, K., Dimosthenis L.G., Miltiades, K.I.** (2005). Micellemediated separation and cloud-point extraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 24, 426-436.
- [39] **Zorida, S. F., Carolina, P. S., Cristina, M. S., Jose, J.S.R.** (2004). The use of micellar systems in the extraction and pre-concentration of organic pollutants in environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 479-489.
- [40] **Moghadam, M.R., Dadfarnia S., Shabani, A.M.H.** (2011). Speciation and determination of ultra trace amounts of chromium by solidified floating organic drop microextraction (SFODME) and graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal Hazardous Materials*, 186, 169-74.
- [41] **Elik, A., Altunay, N., Gürkan, R.** (2017). Microextraction and preconcentration of Mn and Cd from vegetables, grains and nuts prior to their determination by flame atomic absorption spectrometry using room temperature ionic liquid. *Journal of Molecular Liquids*, 247, 262-268.
- [42] **Güngör, H., Elik, A.** (2007). Comparison of ultrasound assisted leaching with conventional and acid bomb digestion of metals in sediment samples. *Microchemical Journal*, 86, 65-70.
- [43] **Berlan, J., Mason, T.J.** (1992). Sonochemistry:from research laboratories to industrial plants. *Ultrasonics*, 30(4), 203-212.
- [44] **Ashley, K., Andrews, R.N., Cavazos, L., Demange, M.** (2001). Ultrasonic extraction as a sample preparation technique for elemental analysis by atomic spectrometry. *J. Anal. At Spectrom*, 16, 1147-1153.
- [45] **Luque-Garcia, L., Castro, M.D.** (2003). Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*, 22(1), 41-47.
- [46] **Elik, A.** (2005). Ultrasound assisted pseudo-digestion of street dust samples prior to determination by atomic absorption spectrometry, *Talanta*, 66 (4), 882-888.
- [47] **Elik, A., Akçay, M., Savaşçı, Ş.** (1991). Alevli atomik absorpsiyon spektrometrik ve manganimetrik yöntemlerle belirlenmek üzere sediment ve filizlerden majör, minör ve eser düzeydeki bazı metallerin ultrasonik etki altında çözeltiye alınması. *Turkish Journal of Chemistry*, 15, 130-139.
- [48] **Elik, A., Akçay, M., Sökmen, M.** (2000). Ultrasonic leaching of bio-collectors for heavy metal analysis. *Intern. J. Environ. Anal. Chem*, 77(2), 133-145.

- [49] **Güngör, H., Elik, A.** (2007). Comparison of ultrasound assisted leaching with conventional and acid bomb digestion of metals in sediment samples. *Microchemical Journal*, 86, 65-70.
- [50] **Montana, A.M., Grima, P., Jun, M.** (2000). Effective, safe and inexpensive microscale ultrasonic setup for teaching and research laboratories. *Journal of Chemical Education*, 77(6), 754.
- [51] **Filgueiras, A.V., Capelo, J.V., Lavilla, I., Bendicho, C.** (2000). Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 53, 433-441.
- [52] **Çınar, T., Elik, A.** (2002). Determination of heavy metals in bio-collectors as indicator of environmental pollution. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 82(5), 321-329.
- [53] **Elik, A., Akçay, M.** (2001). Sequential ultrasonic leaching of strontium from sediment. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 80(4), 257-267.
- [54] **Güney, M., Elik, A.** (2017). Comparison of probe with bath ultrasonic leaching procedures for preparation to heavy metal analysis of bio-collectors prior to atomic absorption spectrometry. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 48(11), 1741-1752.
- [55] **Hajimahmoodi, M., Oveisi, M.R., Sadeghi, N., Jannat, B., Nilfroush, E.** (2008). Simultaneous determination of carmoisine and Ponceau 4R. *Food Analytical Methods*, 1(3), 214-219.
- [56] **Bevziuk, K., Chebotarev, A., Snigur, D., Bazel, Y., Fizer, M., Sidey, V.** (2017). Spectrophotometric and theoretical studies of the protonation of allura red ac and Ponceau 4R. *Journal of Molecular Structure*, 1144, 216-224.
- [57] **Ni, Y., Qi, M., Kokot, S.** (2001). Simultaneous spectrophotometric determination of ternary mixtures of tartrazine, sunset yellow, and Ponceau 4R by h-point standard addition method. *Analytical letters*, 34(14), 2585-2596
- [58] **Ryvolová, M., Táborský, P., Vrábel, P., Krásenský, P., Preisler, J.** (2007). Sensitive determination of erythrosine and other red food colorants using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of chromatography A*, 1141(2), 206-211.
- [59] **Thani, M.Z., Al-Ameri, S.A., Sultan, M.S.** (2018). Spectrophotometric determination of Ponceau 4R in the several beverages using mixed micelles after cloud point extraction. *Journal of Al-Nahrain University-Science*, 21(1), 8-13.
- [60] **Faraji, M.** (2019). Determination of some red dyes in food samples using a hydrophobic deep eutectic solvent-based vortex assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1591, 15-23.



## **ÖZGEÇMİŞ**

### **Kişisel Bilgiler**

Adı Soyadı: Serhan MERAL  
Doğum Yeri ve Tarihi: Kangal / 25.03.1981  
Medeni Hali: Evli  
Yabancı Dil: İngilizce  
İletişim Adresi: Mehmet paşa Mah. İbnisina cad. AydınAp No:3  
E-posta Adresi: [serhanmeral58@gmail.com](mailto:serhanmeral58@gmail.com)

### **Eğitim ve Akademik Durumu**

Lise: Atatürk Lisesi, 1998  
Lisans: Cumhuriyet Üniversitesi, 2006  
İletişim: 0535256 64 14

### **Kongreler**

- 1- Uluslararası eser analiz kongresi Sivas (Haziran 2018)
- 2- Avrasya 5. uluslararası uygulamalı bilimler kongresi Sivas (Haziran 2019)
- 3- 8. UMTEB uluslararası mesleki ve teknik bilimler kongresi Sivas (Ekim 2019)

### **Bildiriler**

- 1- Development of a new analytical method for the determination of ponceau 4R in various drink and food samples, Elik Adil, Meral Serhan, Avrasya 5. uluslararası uygulamalı bilimler kongresi Sivas (Haziran 2019)
- 2- Ultrasound-assisted extraction of nickel and cobalt from food samples and their determination by flame-AAS, Elik Adil, Meral Serhan, Gürkan Ramazan, Altunay Nail, Yayın Yeri: International Trace Analysis Congress