

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ESER DÜZEYDEKİ B1 ve B2 VİTAMİNLERİNİN BULUTLANMA
NOKTASI EKSTRAKSİYONU SONRASI KROMATOĞRAFİK
TAYİNLERİ**

DOKTORA TEZİ

Songül ULUSOY
(2010FED011)

Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet AKÇAY

SİVAS
ŞUBAT 2015

SONGÜL ULUSOY'un hazırladığı ve “**Eser Düzeydeki B1 ve B2 Vitaminlerinin Bulutlanma Noktası Eksraksiyonu Sonrası Kromatografik Tayinleri**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANA BİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Mehmet AKÇAY**

Cumhuriyet Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Ramazan GÜRKAN**

Cumhuriyet Üniversitesi

Doç. Dr. Selim ERDOĞAN

İnönü Üniversitesi

Yrd.Doç. Dr. Adil ELİK

Cumhuriyet Üniversitesi

Yrd. Doç.Dr. Cemalettin UYAN

Cumhuriyet Üniversitesi

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

Prof. Dr. Mustafa DEĞİRMENCİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, 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, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından **F-412** Nolu proje kapsamında desteklenmiştir.*

Bütün hakları saklıdır.

Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Songül ULUSOY, 2015

Kızlarım Elif İpek ve Ezgi'ye...

ETİK

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, Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

09 /02/2015

Songül ULUSOY

KATKI BELİRTME ve TEŞEKKÜR

Bilgi ve deneyimlerinden sürekli yararlandığım, tezin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Mehmet AKÇAY'a,

Her zaman desteklerini üzerimde hissettiğim, hiçbir özveriden kaçınmayan sevgili anne ve babama,

Bu günlere gelmemi sağlayan, lisans ve orta öğretim hayatımdaki tüm değerli hocalarıma,

Bu çalışmayı F-412 kod numarası ile finansal olarak destekleyen Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Komisyon Başkanlığı'na,

Deneysel çalışmalar sırasında, bana laboratuvar imkanlarını sonuna kadar açan Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı'na,

Lisans üstü eğitimim süresince gösterdikleri kolaylık ve anlayış için Fen Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Ve tabi ki, hayatın her anında, içine düştüğüm her sıkıntıda, yanımda olup beni motive eden sevgili eşim, hayat arkadaşım Halil İbrahim ULUSOY'a

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.....

ÖZET

ESER DÜZEYDEKİ B1 VE B2 VİTAMİNLERİNİN BULUTLANMA NOKTASI EKSTRASKİYONU SONRASI KROMATOĞRAFİK TAYİNLERİ

SONGÜL ULUSOY

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet AKÇAY

2015, 87+xv sayfa

Bu tez çalışmasında eser miktardaki B1 (Tiyamin) ve B2 (Riboflavin) vitaminlerinin bulutlanma noktası ekstraksiyonu ve HPLC analizlerini kapsayan bir zenginleştirme ve tayin yöntemi geliştirilmiştir. Önerilen yöntemde, vitamin türleri Ag(I) iyonu ile pH 9.0 fosfat tamponu varlığında kararlı kompleksler oluşturmakta ve sonra oluşan kompleks Genapol/Tergitol surfaktanlarının noniyonik fazına çekilmektedir. Etkin bir faz ayırımı için örnekler santrifüjlendikten sonra surfaktanca zengin faz ayrılmış ve %50 metanolde hazırlanmış 0.1 M HCl çözeltisiyle seyreltilmiştir. Daha sonra 0.45 µm gözenekli filtreden süzülen örnekler HPLC viallerine aktarılmış ve 20 µL si cihaza enjekte edilmiştir.

Örneklerin analizi C18 kolonu kullanılarak, metanol ve pH 3.0 fosfat tamponundan oluşan yürütücü faz ile yapılmıştır. Tiyamin ve Riboflavin için sırasıyla; 244 ve 267 nm dalga boylarındaki absorbanlar diyot serisi (DAD) dedektör kullanılarak izlenmiştir. Optimize edilmiş koşullar altında elde edilen doğrusal aralık tiyamin için 4-400 ng mL⁻¹, Riboflavin için ise 1-500 ng mL⁻¹ dir. Yöntemin tayin sınırları sırasıyla 1.33 ng mL⁻¹ ve 0.35 ng mL⁻¹ dir. 100 ng mL⁻¹ derişimli çözeltilerle 5 tekrarlı yapılan ölçümlerden elde edilen bağıl standart sapmalar (BSS) sırasıyla % 2.90 ve % 2.20 dir. Geliştirilen yöntemin validasyonu için üç farklı sertifikalı referans gıda örneği (NIST-3280, BCR-485 ve ERM-BD6000) ile geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Son olarak, geliştirilen yöntem bebek maması, süt ve tahıl örneklerindeki B1 ve B2 vitaminlerinin analizine başarıyla uygulanmıştır.

Anahtar kelimeler: B1 vitamini, B2 vitamini, HPLC, bulutlanma noktası ekstraksiyonu, gıda örnekleri

ABSTRACT
CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF VITAMIN B1 AND B2 AT
TRACE LEVELS AFTER CLOUD POINT EXTRACTION

Songül ULUSOY

Doctorate Thesis, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet AKÇAY

2015, 87+xv pages

A pre-concentration and determination method was developed for Vitamin B1 (Thiamin) and B2 (Riboflavin) at trace amounts based on cloud point extraction (CPE) and HPLC analysis. In the presented method, vitamin species form stable complexes with Ag (I) ions in the presence of pH 9.0 buffer. Then, the formed complexes were extracted to nonionic surfactant phase consisting of Genapol and Tergitol. A centrifugation procedure was applied to samples in order to make an efficient phase separation. Surfactant rich phase (SRP) was separated by decantation and then surfactant-rich phase was diluted with 0.1 M HCl in 50 % methanol. The samples were filtered via 0.45 μm membrane and 20 μL of samples were injected to HPLC system.

Analysis of samples were carried out on C18 column with isocratic elution procedure by using methanol and pH 3.0 phosphate buffer including sodium hexane sulfonate. Absorbance signals were monitorized by using a diode array dedector (DAD) for thiamine and riboflavin as 244 nm and 267 nm, respectively. Under the optimized conditions, linear calibration curves were obtained in the range of 4-400 ng mL^{-1} for Thiamin and 1-500 ng mL^{-1} for Riboflavin. The detection limits of method were calculated as 1.33 ng mL^{-1} and 0.35 ng mL^{-1} , respectively. The relative standard deviations were 2.90 and 2.20 % for 5 replicate measurements at 100 ng mL^{-1} concentration level. The method was validated by the analysis of three certified reference materials (NIST 3280, BCR-485 ve ERM-BD6000) and recovery test. Finally, the method was applied to the determination of vitamin B1 and B2 in real samples including baby foods, milk and creals.

Key Words: Vitamin B1, Vitamin B2, HPLC, cloud point extraction, food samples

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	viii
ABSTRACT.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
GENEL BİLGİLER	1
1.1 Vitaminler.....	1
1.1.2 Tiyamin (B1 vitamini)	2
1.1.3 Riboflavin (B2 Vitamini).....	3
1.1.4 B1 ve B2 Vitaminlerinin kimyasal ve spektral özellikleri	5
1.1.5 Tiyaminin ve riboflavinin kararlılıkları	6
1.1.6 Vitamin analizlerinde yaygın kullanılan yöntemler	7
1.1.7 B1 ve B2 vitamini tayini için kullanılan yöntemler	8
1.1.8 Vitamin analizlerinde karşılaşılan temel sorunlar	11
1.2 Kromatografik Ayırma Yöntemleri	12
1.2.1 Kromatografide kullanılan bazı temel kavramlar	13
1.2.2 Yüksek performanslı (Başarım) sıvı kromatografisi (HPLC)	16
1.2.3 Sıvı kromatografisi türleri.....	17
1.2.4 HPLC Cihazları.....	22
1.2.5 Kromatografik analiz için örnek hazırlama.....	27
1.3 Zenginleştirme Yöntemleri	27
1.3.1 Sıvı-Sıvı ekstraksiyon yöntemi	28
1.3.2 Katı-Faz ekstraksiyonu.....	28
1.3.3 Elektrolitik biriktirme ile zenginleştirme	29
1.3.4 İyon değiştirme ile zenginleştirme	29
1.3.5 Birlikte çöktürme yöntemi	29
1.3.6 Uçuculaştırma yöntemi	30
1.3.7 Dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon.....	30
1.3.8 Bulutlanma noktası ekstraksiyonu (Cloud Point Extraction, CPE).....	31
1.3.9 CPE'nin deneysel aşamaları.....	34
1.3.10 CPE Yönteminin uygulama alanları	40

1.3.11 CPE yönteminin genel değerlendirilmesi	41
1.4 Çalışmanın Amacı	42
MATERYAL VE YÖNTEM	43
2.1 Kullanılan Reaktifler	43
2.2 Kullanılan Cihazlar	44
2.3 Tiyamin ve Riboflavin İçin Doğrudan Tayin Koşulları	45
2.4 Önerilen Yöntem	47
2.5 Gıda Örneklerinin Analize Hazırlanması	49
2.6 Sertifikalı Vitamin Örnekleri	49
DENEYSEL ÇALIŞMALAR ve TARTIŞMA	52
3.1 Deneysel Çalışmaların Temel Yaklaşımı	52
3.2 Geliştirilen Yöntemin Optimizasyonu.....	54
3.2.1 pH etkisi.....	54
3.2.2 Kompleksleştirici derişiminin etkisi	56
3.2.3 İyonik surfaktan derişiminin etkisi	57
3.2.4 Noniyonik surfaktan derişiminin etkisi.....	58
3.2.5 Elektrolit Etkisi.....	63
3.2.6 İnkübasyon sıcaklığı ve süresinin etkisi	64
3.2.7 Santrifüjleme hızı ve süresi	65
3.2.8 Surfaktanca zengin fazın analize hazırlanması	66
3.3 Önerilen Yönteme Girişimci Türlerin Etkisi	69
3.4 Yöntemin Analitik Performans Ölçütleri	70
3.5 Geliştirilen Yöntemin Validasyon Çalışmaları.....	71
3.6 Gerçek örneklerin analizi.....	71
DEĞERLENDİRME	76
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	86

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
-	
Şekil 1.1 Tiyaminin açık kimyasal yapısı.....	5
Şekil 1.2 Riboflavinin (B2 Vitamini) açık kimyasal formülü.....	6
Şekil 1.3 Örnek bir kromatogram.....	13
Şekil 1.4 Dolgulu kolonda bileşenlerin ayrımı.....	17
Şekil 1.5 HPLC cihazının temel bileşenleri.....	23
Şekil 1.6 DLLME yöntemi şeması.....	30
Şekil 1.7 Misel oluşumunun gösterimi.....	32
Şekil 1.8 Farklı yapıda oluşan miseller.....	33
Şekil 1.9 CPE işleminin şematik gösterimi.....	35
Şekil 1.10 CPE işleminin temel basamakları.....	36
Şekil 1.11 Tergitol (a) ve Genapol (b) surfaktanlarının molekül yapıları.....	37
Şekil 2.3 % 50 Metanol/pH 3.0 P koşullarında elde edilen ilk kromatogram.....	45
Şekil 2.4 Doğrudan Tiyamin ve Riboflavin tayinleri için elde edilen kromatogram...47	47
Şekil 2.3 Önerilen yöntemin şematik gösterimi.....	48
Şekil 3.1 B1 ve B2 vitaminlerinin zenginleştirilmesine çeşitli iyonların etkileri.....	53
Şekil 3.2 Önerilen yöntem üzerine pH Etkisi.....	55
Şekil 3.3 Önerilen yöntem üzerine tampon çözelti hacminin etkisi.....	55
Şekil 3.4 Önerilen Yöntem üzerine gümüş iyonları derişiminin etkisi.....	56
Şekil 3.5 Tiyaminin zenginleştirme sinyaline iyonik surfaktan derişimi etkisi.....	57
Şekil 3.6 Riboflavinin zenginleştirme sinyaline iyonik surfaktan derişimi etkisi.....	58
Şekil 3.7 Tiyamin sinyallerine noniyonik surfaktan derişimi etkisi.....	59
Şekil 3.8 Riboflavin sinyallerine noniyonik surfaktan derişimi etkisi.....	60
Şekil 3.9 Noniyonik surfaktan derişiminin Tiyamin sinyaline etkisinin çubuk gösterimi.....	61
Şekil 3.10 Noniyonik surfaktan derişiminin Riboflavin sinyaline etkisinin çubuk gösterimi.....	61
Şekil 3.11 Tergitol ve Genapol surfaktanlarının birlikte kullanımı.....	62
Şekil 3.12 Önerilen yöntem üzerine elektrolit etkisi.....	63

Şekil 3.13	Önerilen yöntem üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi.....	64
Şekil 3.14	Önerilen Yöntem üzerine inkübasyon süresinin etkisi.....	65
Şekil 3.15	Önerilen yöntem üzerine santrifüj hızı etkisi.....	66
Şekil 3.16	SRP için kullanılan çözücüler.....	67
Şekil 3.17	SRP için kullanılan çözücü hacmi optimizasyonu.....	68
Şekil 3.18	Optimum koşullar altında elde edilen kalibrasyon doğrusu.....	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 Tiyamin ve Riboflavin için günlük diyetle alınması tavsiye edilen miktarlar.....	4
Çizelge 1.2 Yaygın kullanılan HPLC Dedektörleri.....	26
Çizelge 2.1 HPLC çalışma koşulları.....	46
Çizelge 2.2 HPLC ile doğrudan tayin sonuçları.....	47
Çizelge 2.3 NIST 3280 Multivitamin tablet sertifikalı değerler.....	49
Çizelge 2.4 BCR-485 Mixed vegetables sertifikalı değerler.....	50
Çizelge 2.5 ERM-BD6000 Whole milk powder sertifikalı değerler.....	50
Çizelge 3.2 Girişimci iyonların tolerans sınırları.....	69
Çizelge 3.3 Önerilen yöntemin analitik parametreleri.....	72
Çizelge 3.3 Önerilen yöntemin geçerliğinin teyidi için sertifikalı referans gıda örneklerine uygulaması.....	73
Çizelge 3.4 Önerilen yöntemle çeşitli gıda örneklerinde B1 ve B2 vitaminlerinin analizi.....	74
Çizelge 3.5 Geliştirilen yöntemin literatürdeki benzer yöntemlerle kıyaslanması.....	75

KISALTMALAR DİZİNİ

CPE	: Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu
CP	: Bulutlanma Noktası
CPC	: Setil Piridinyum Klorür
CTAB	: Setil Trimetil Amonyum Bromür
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
CMC	: Kritik Misel Derişimi
AAS	: Atomik Absorpsiyon Spektrometrisi
DLLME	: Dispersif sıvı-sıvı mikro ekstraksiyon
SPE	: Katı faz Ekstraksiyonu
ME	: Membran Ekstraksiyonu
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
DAD	: Diyot Serisi Dedektör
ICP-OES	: İndiktüf Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektrometrisi
ICP-AES	: İndiktüf Eşleşmiş Plazma Atomik Emisyon Spektrometrisi
LOD	: Seçme sınırı
LOQ	: Nicelleştirme sınırı
BH	: Bağlı hata
BSS	: Bağlı standart sapma
SRP	: Surfaktanca Zengin Faz
FAD	: Flavin adenin dinukleotit
FMN	: Flavin mono nükleotit

GENEL BİLGİLER

1.1 Vitaminler

Vitaminler vücudun sağlıklı gelişimi, sindirim fonksiyonlarının düzeni, enfeksiyonlara karşı bağışıklık kazanması açısından oldukça gerekli olan, eser düzeydeki organik bileşiklerdir. Ayrıca vücudumuzun karbonhidratı, yağı ve proteini kullanmasına yardımcı olurlar. Vitaminler vücutta yakılmadığından, doğrudan enerji (kalori) kaynağı olarak değerlendirilmezler.

Vitaminler; A, D, E, K vitaminlerini kapsayan yağda çözünen ve tiyamin (B1 vitamini), riboflavin (B2 vitamini), pantotenik asit, folat (folik asit), B12 vitamini (siyanokobalamin), biotin, B6 vitamini, niasin ve C vitaminini (askorbik asit) kapsayan suda çözünen vitaminler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Bu sınıflandırma vitaminlerin olası kaynakları hakkında bilgi vermesi açısından da faydalıdır. Gıdalardan vitaminlerin ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri ile alınması; ışığa, oksijene, ısıya ve pH'ya duyarlı olmaları nedeniyle zordur. Vitaminlerin dayanıksız olmasından ve matrislerin karmaşıklığından dolayı vitamin ölçümünde doğru ve etkili analitik yöntemler üzerine yoğun araştırmalar yapılmaktadır (Moreno ve Salvadó, 2000; Ötleş ve Karabrahimoğlu, 2005).

Suda çözünen vitaminlerin fazlası vücut sıvıları ile atılırken, yağda çözünen vitaminlerin fazlası ise yağ dokusunda depolanır. Depolandıkları için yağda çözünen vitaminlerin aşırı dozu zararlı olabilir. Özellikle A ve D vitaminlerinin tüketiminde dikkatli olmak gerekir. Vitaminler bütün hücrelerde oldukça az miktarlarda depolanabildiği gibi, daha çok karaciğerde depolanırlar. Örneğin karaciğerde depolanan A vitamini, hiç vitamin almayan bir kişiye 5-10 ay kadar yetebilir ve karaciğerdeki D vitamini deposu ise genellikle 2-4 ay kadar yeterlidir (Wikipedia; Ivanovic vd.,1999; Ciulua vd., 2011).

Suda çözünen vitaminlerin vücutta depolanma oranı nispeten düşüktür. Bu, özellikle B vitaminlerinin birçoğu için geçerlidir. B vitaminleri eksikliği olan bir kişide belirtileri bazen birkaç günde ortaya çıkabilir. B12 vitamini ise bunun dışındadır, çünkü B12'nin karaciğerdeki deposu kişiye bir yıl veya daha uzun süre yetebilir. Suda çözünen bir başka

vitamin olan C vitamininin yokluğunda ise birkaç haftada bu belirtiler ortaya çıkar. C vitamini eksikliğinden kaynaklanan iskorbüt hastalığı 20-30 hafta içinde ölüme sonuçlanabilir. Vücut fonksiyonları açısından vitaminlerin hayati öneme sahip olması nedeniyle vitamin alımının kontrol ve takibi açısından hem bir çok gıda örneğinde hem de vücut sıvılarındaki miktarlarının izlenmesi önemlidir (Eitenmiller vd., 2008).

1.1.2 Tiyamin (B1 vitamini)

B1 vitamini olarak bilinen Tiyamin, ilk kez 1926'da tanımlandıktan sonra, 1927'de İngiliz Medikal Araştırma Konseyi tarafından suda çözünen vitaminlerin ilki olarak kaydedilmiştir. 19.yüzyılın başlarında Tiyamin eksikliğinin bir sonucu olarak beriberi hastalığı teşhis edilmiştir ve o yıllarda kabuğu soyulmuş hububat ürünlerinin aşırı tüketiminin buna neden olduğu gösterilmiştir. Beriberi hastalığı, kalp kası rahatsızlığı, düşük tansiyon, sodyum depolanması, taşikardi ve akciğer ödeme neden olan kuru beriberi ve ödem oluşumu, iştahsızlık, kaslar da zayıflık ve koordinasyon bozukluğuna neden olan yaş beriberi olmak üzere iki şekilde sınıflandırılmaktadır (Food and Nutrition Board, 2000; Machlin ve Huni, 1994). Ani ölümlere sebep olan çocuk beriberisi ise kusma, kasılma, karın şişliği ve iştahsızlıkla kendini gösterir. Ayrıca kalp yetmezliğine de neden olabilir. Tiyamin eksikliği öncelikle beriberi hastalığı olarak kendini göstermesine karşın daha uç durumlarda Wernicke-Korsakoff sendromu olarak da bilinen bir hastalığa yol açar ve temel belirtileri yorgunluk, huzursuzluk ve konsantrasyon eksikliğinin yanında halüsinasyonlar, çeşitli mental bozukluklar ve komayı da içeren daha şiddetli belirtiler de gözlenir. Bu sendrom uzun süreli alkol alımında ve aşırı sigara tüketiminin de kendini gösterir (Tang vd., 2006; Eitenmiller vd., 2008).

Dengesiz beslenme ve aşırı tüketilen etanolün bağırsakta tiyamin absorpsiyonunu inhibe etmesi sonucu alkoliklerde yukarıdaki belirtiler sıkça görülmektedir. Ayrıca kronik kusma, anoreksi, gastrointestinal hastalıklar ve parenteral beslenme durumlarında ve yaşlılıkta bu belirtilere daha sık rastlanmaktadır. Düşük depolama zamanına bağlı olarak tiyamin yetersizliği 10 gün içinde, eğer alım durmuşsa daha şiddetli eksikliği 21 gün içinde gözlenmektedir (Lynch ve Young, 2000).

Tiyamin(B1 vitamini) içeren önemli gıda kaynakları zenginleştirilmiş kahvaltılık gevrekleri, işlenmemiş tahıllar, zenginleştirilmiş tahıl ürünleri, baklagiller, kuruyemişler ve ayrıca bazı hayvansal gıdalarda bulunur (Solfrizzo vd., 2010).

Tiyaminin günlük diyetle alımının dört temel kaynağı vardır ve bunların toplam dağılımı; tahıl gevrekleri (%50), sebzeler(%20), et(%10) ve süt ürünleri(%10) olarak verilebilir. Pirinç, şeker, alkol, yağ ve diğer işlenmiş gıdalar tiyamince fakir kaynaklardır (Gibson , 1990).

Yiyeceklerin pişirilmesi var olan tiyaminin azalmasına neden olabilir. Ayrancı ve Kaya tarafından yapılan bir çalışmada, makarnanın pişirilmesi sırasında % 50 ye kadar tiyamin kaybının gerçekleştiğini ve bunun kısmen termal bozunma yüzünden olduğu ancak daha çok pişirme işleminde vitaminin suya geçmesinden kaynaklandığı ortaya çıkarılmıştır (Ayrancı ve Kaya, 1993). Pişirme kayıpları daha çok pirinç ve yeşil sebzelerde gözlenir. Örneğin ıspanakta, özellikle de yüksek pH'da ve klorür varlığında tiyamin kaybı %90 lara kadar çıkabilmektedir (Kimura vd., 1990).

1.1.3 Riboflavin (B2 Vitamini)

B2 vitamini olarak bilinen Riboflavin; ilk kez 1932'de hücre solunumunda rolü olduğu düşünülen sarı renkli bir enzim olarak Brewer mayasından izole edildi. 1933 de yapısı aydınlatıldı ve 1935'de ilk kez laboratuvar ortamında sentezlendi. Riboflavin yetmezliği tek başına nadir görülür. Genellikle suda çözünen vitaminlerin genel eksikliğinin bir sonucu olarak meydana gelir. Riboflavin enerji, protein ve lipid metabolizmasında önemli görevler üstlenir. Riboflavin eksikliğinin en karakteristik belirtisi ağız içi ve ağız kenarındaki yaralardır. Diğer belirtileri ise ciltte döküntü, ağız kenarında kızarıklık ve çatlaklar olarak sayılabilir(Powers, 2003). Riboflavin eksikliğinin tanısı biyokimyasal testlerle yapılır. Klinik olarak izlenmesi Flavanin Adenin Dinükleotide (FAD) kofaktör olarak gereksinim duyan eritrosit glutathionin redüktaz (EGR) enziminin izlenmesiyle yapılır. Günlük diyetdeki riboflavin kaynakları çoğunlukla hayvansal ürünlerdir. Süt ve diğer süt ürünleri riboflavin için mükemmel doğal kaynaklardır. Tahılların riboflavin içeriği düşük olmasına rağmen devamlı alındıklarında iyi kaynaklardan biri olabilir. Yeşil sebzelerin riboflavin içeriği meyvelere kıyasla daha yüksektir (Ruiz vd., 2013). İşlenmiş ürünlerde hem pişirme hem de depolama sırasında riboflavin miktarında azalma olur (Boyacı vd., 2012).

Her iki vitamin türü için de farklı yaş gruplarına göre günlük alınması tavsiye edilen miktarlar Çizelge 1.1'de görülmektedir.

Çizelge 1.1 Tiyamin ve Riboflavin için günlük diyetle alınması tavsiye edilen miktarlar (Etienmiller vd., 2008)

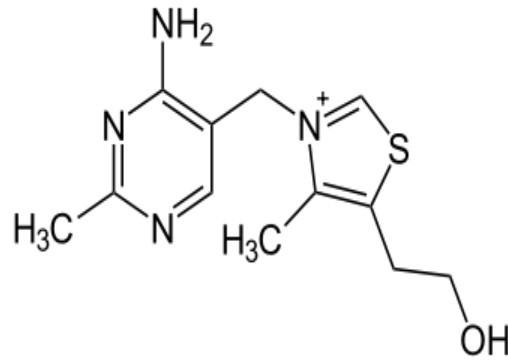
Yaş Grubu	Günlük Diyetle Alınması Tavsiye Edilen Miktar (mg/Gün)	
	Tiyamin	Riboflavin
<i>Yeni Doğan</i>		
0-6 Ay	0.2	0.3
7-12 Ay	0.3	0.4
<i>Çocuk</i>		
1-3	0.5	0.5
4-8	0.6	0.6
<i>Erkekler</i>		
9-13	0.9	0.9
14-18	1.2	1.3
19-30	1.2	1.3
31-50	1.2	1.3
51-70	1.2	1.3
<i>Kadınlar</i>		
9-13	0.9	0.9
14-18	1.0	1.0
19-30	1.1	1.1
31-50	1.1	1.1
51-70	1.1	1.1
<i>Hamilelik Dönemi</i>		
≤ 18	1.4	1.4
19-30	1.4	1.4
31-50	1.4	1.4
<i>Emzirme Dönemi</i>		
≤ 18	1.4	1.6
19-30	1.4	1.6
31-50	1.4	1.6

1.1.4 B1 ve B2 Vitaminlerinin kimyasal ve spektral özellikleri

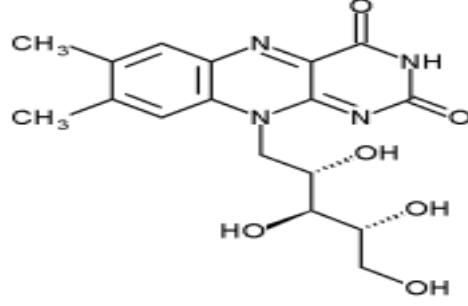
Tiyamin doğal olarak serbest tiyamin ve tiyamin mono fosfat (TMP), tiyamin di fosfat (TDP) ve tiyamin tri fosfat (TTP) formlarında bulunur. Hayvan ve bitki dokularında tüm formlar bulunmasına rağmen, bitki dokularındaki serbest tiyamin miktarı hayvan dokularına nazaran daha fazladır(Moore ve Dalan, 2003). Tiyaminin (B1 vitamini) açık formülü Şekil 1.1’de verilmiştir.

Kimyasal yapısında bir pirimidin halkası, süstitüe olmuş thiazolün 3.konumundaki azota bir metilen köprüsü ile bağlanır. B1 vitamini olarak bilinen tiyaminin tam adı: 3-((4'-amino-2'-metil-5'-pirimidinil) metil)-5-(2-hidroksietil)-4-metil thiyozol dır. Tiyaminin farklı yapıları arasında tiyamin hidro klorür Birleşik Devletler Farmakoloji Birliği tarafından referans standart olarak kabul edilir. Diğer formu olan tiyamin mono hidrat suda çok daha az çözüldüğü için endüstriyel alanlarda ve araştırma çalışmalarında çok fazla kullanılmaz. Tiyamin hidro klorür ortam pH’na bağlı olarak 200-300 nm arasında soğurum yapar. pH 2.9’da 246 nm’de tek soğurma maksimumuna sahipken 5<pH<7 bölgesinde 234-264 nm’de primidin ve tiyoazol halkalarından kaynaklanan iki maksimuma sahiptir (Blake 2007; Kondyli vd., 2007).

B2 vitamini olarak bilinen riboflavinin açık adı ise 7,8-dimetil-10(1'-D- ribitil) isoalloksazindir. İzoalloksazin halkası yaygın olarak flavin halkası olarak da bilinir. Riboflavinin açık yapısı Şekil 1.2’de görülmektedir.



Şekil 1.1 Tiyaminin açık kimyasal yapısı



Şekil 1.2 Riboflavinin (B2 Vitamini) açık kimyasal formülü

Riboflavin sarı yeşil renkte ince kristaller halinde floresans aktif bir bileşiktir. Riboflavinin karakteristik özellikleri incelenecek olursa sulu çözeltilerinde 223, 266, 373 ve 445 nm’de absorpsiyon pikleri verdiği görülür. UV-VIS spektral özellikleri çok belirgin olmasına rağmen daha duyarlı ölçümler için bileşiğin floresans özelliği de kullanılabilir (Portocarrero vd., 2011; Eitenmiller vd., 2008).

1.1.5 Tiyaminin ve riboflavinin kararlılıkları

Ortam pH’ı nötrale yaklaştığı zaman tiyamin, suda çözünen vitaminler arasında en kararsızlarından biridir. Tiyaminin maksimum kararlılığı pH 2 ila 4 arasındadır. Bu yüzden asiditliği düşük olan yiyeceklerde ısıtma işlemlerindeki kayıplara karşı oldukça duyarlıdır. Tiyamin bazik pH’larda oldukça kararsızdır. Kararlılığı, gıdanın yapısına ve uygulanan ısıtma işlemine bağlıdır. Ayrıca Tiyamin (B1 vitamini) suda çözünen vitaminler içerisinde, radyasyona en az dayanıklı olanıdır. Calenberg ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada mikro dalga yoluyla ısıtılan tavuk örneklerinde %28 ila %31 arasında tiyamin kaybı olduğu gösterilmiştir (Calenberg vd., 1999).

Riboflavin eğer ışıktan korunursa ısı ve oksidasyona karşı kararlıdır. Birçok gıda üretim işlemi riboflavin içeriğinde çok az değişmeye neden olur. Aşırı miktarda fiziksel kayıplar liçing etkisi ile olurken kimyasal bozunma nadiren olur (Vinas vd., 2004). Asitlik arttıkça kararlılığı artarken, ısıl bozunmaya karşı max. kararlılık pH 2-5 arasındadır. 420-560 nm arasındaki UV-VIS ışın riboflavin bozunmasına neden olan en büyük etkidir. Ayrıca çözeltilinin pH’ı bozunmanın yönünü tayin eder. Asidik ve nötral çözeltilerde ribitol zinciri koparak lümikrom oluşurken bazik çözeltilerde UV ışığın da etkisiyle lümiiflavin oluşur (Eitenmiller vd., 2008). Riboflavin yapısı asit hidrolizine karşı dayanıklı iken FMN

(Flavin mono nükleotit)ve FAD (flavin adenin di nükleotit) pH<5'in altında kolayca riboflavine dönüşür

1.1.6 Vitamin analizlerinde yaygın kullanılan yöntemler

Vitamin analizlerinde elektroanalitik, spektroskopik ve kromatografik temelli yöntemlerin kullanıldığı pek çok çalışma mevcuttur. Klinik laboratuvarlar ve fazla duyarlılık gerektirmeyen çalışmalarda genelde spektroskopik yöntemlerden yararlanılırken, seçicilik ve duyarlılığa ihtiyaç duyulan eser düzeydeki analizlerinde çoğunlukla kromatografik yöntemler tercih edilmektedir. Yüksek başarılı (performanslı) sıvı kromatografisi (HPLC), yüksek seçiciliği ve kullanılan detektör sistemine göre sağladığı etkin duyarlılığı nedeniyle vitamin analizlerinde oldukça sık kullanılır. Ayrıca yağda çözünen vitaminlerin uçucu türevlerinin hazırlanması durumunda gaz kromatografisi de etkin bir şekilde tayinler için kullanılabilir.

Gerçek örneklerde vitamin analizlerinde karşılaşılan iki temel sorun vardır. Bunlardan ilki; ilgilenilen türün örneklerde oldukça düşük düzeylerde bulunması, ikincisi ise her türlü girişim etkileridir. Eğer örneklerdeki vitamin düzeyi kromatografik olarak doğrudan tayin edilebilecek seviyede ise HPLC'nin sağladığı seçicilik çoğu durumda doğrudan tayinleri mümkün kılmaktadır. Ancak ilgilenilen tür, cihazın tayin sınırlarına yakın bir derişime sahip ise bu durumda tayin öncesi ayırma ve zenginleştirme yöntemlerine başvurulması gerekir. Uygulanacak bu ön işlem ile hem analizi bozabilecek majör düzeydeki girişimci türler uzaklaştırılırken hem de analiz türlerinin cihazla doğrudan tayin edilebilecek düzeylere kadar zenginleştirilmesi sağlanmış olur.

Vitaminler gibi vücutta önemli fonksiyonları olan gıda bileşenlerinin günlük diyetle alınan miktarlarının takibi açısından güvenilir, hızlı, doğruluğu ve kesinliği yüksek, kolay uygulanabilir, düşük maliyetli yöntemler geliştirmenin gerekliliği ve önemi açıktır. B1 ve B2 vitaminlerin tayini için 2003 te yayınlanan Avrupa standartları mevcuttur (European Standard, 2003a, 2003b). Bu yöntemlerin temelinde tiyamin türleri öncelikle tiyaminmonofosfat (TMP), tiyamindifosfat (TDP) ve tiyamintrifosfat'a (TTP) dönüştürülürken riboflavin ise flavinmononükleotid (FMN) ve flavin adenin dinükleotid (FAD) gibi fosforlanmış türevlerine dönüştürülmekte ve kromatografik yöntemlerle tayin edilmektedir.

1.1.7 B1 ve B2 vitamini tayini için kullanılan yöntemler

Tiyaminin basit bir kimyasal reaksiyonla, floresans aktif bir tür olan tiyokroma dönüştürülebilmesi (AOAC 1984), riboflavinin ise kendisinin doğrudan floresans aktif bir madde olması nedeniyle bu vitaminlerin kromatografik tayinlerinde rutin uygulamalarda genelde floresans dedektörün kullanıldığı görülür. Kolondan ayrılan ürünlerin absorbanslarının izlendiği UV-VIS dedektör veya çok kanallı diyot serisi (DAD) dedektörün kullanıldığı araştırma çalışmaları da mevcuttur. Birçok araştırma laboratuvarında HPLC cihazları için seçilen dedektör sistemi tercihen absorbans temellidir. Çünkü floresans dedektöre göre oldukça geniş bir uygulama alanına sahiptir. Ayrıca ortalama olarak bir UV dedektör 5000 \$, DAD dedektörü 8000 \$ iken floresans dedektörün yaklaşık maliyeti 16000 \$ seviyelerindedir. Hem maliyetindeki belirgin fazlalık hem de uygulama alanının sınırlılığı nedeniyle floresans dedektörleri absorbans dedektörleri kadar yaygın kullanılmamaktadır.

Literatürde B grubu vitaminlerin analizi için mikrobiyolojik yöntemler, klasik gravimetrik ve titrasyon yöntemleri, spektrofotometri, spektroflorometri, kemilüminesans, seçici membran elektrotları, potansiyometri, kapiler elektroforez, immünolojik yöntemler (ELISA), kromatografi (ince tabaka kromatografisi, gaz kromatografisi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) ile hibrid kromatografik ve spektrometrik yöntemler gibi (HPLC-MS, GC-MS vb.) çeşitli teknikler vardır. Bu yöntemlerden kiminin seçiciliği yetersiz, kiminin duyarlılığı düşük ve zahmetli, kimi ise yüksek kurulum ve işletim maliyeti gerektirir. Bunların arasında gravimetrik ve volumetrik yöntemler nispeten yüksek konsantrasyondaki bazı B grubu vitaminlerin tespiti için uygundur. B grubu vitaminlerin ölçümünde ince tabaka kromatografisi, gaz kromatografisi ve kapiler elektroforez yöntemlerinin uygulamaları azdır. Günümüzde bu amaçla en çok kullanılan yöntemler HPLC, florometri ve spektrofotometridir (Ötleş ve Karaibrahimoglu, 2005; Aktaş, 2011).

Mikrobiyolojik yöntemler özgül ve duyarlı yöntemlerdir fakat fiziko kimyasal yöntemlerle karşılaştırıldığında zaman alıcıdır; ayrıca farklılık yaratmamak için analitik yönergeye kesinlikle uyulmalıdır (Ötleş, 2008). Florometrik yöntemler özellikle tıbbi amaçlı vitamin preparatlarının analizleri için uygundur fakat bu yöntemlerin seçiciliği

düşüktür. Birçok bileşenin floresan özelliğinin olmaması floresan türevlerin oluşmasına yardımcı reaktiflerin geliştirilmesine yol açmıştır (Ötleş ve Karaibrahimoğlu, 2005).

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), biyokimya ve analitik kimyada sıkça kullanılmaktadır. HPLC ile UV-Vis dedektör kombinasyonu, gıdalardaki yağda ve/veya suda çözünen vitaminlerin tespit edilmesinde en çok kullanılan yöntemlerdendir. Vitamin analizi için, ters faz (RP-HPLC), normal faz (NP-HPLC), iyon değişim (IEC), iyon çifti (IPC) kromatografileri ile farklı kolonlar (C18, NH₂) ve dedektörler (UV, floresans) ile kombine edilen farklı HPLC yöntemleri vardır. Yöntemlerin çoğunda tamponlanmış mobil faz kullanılmaktadır. Çeşitli kolon dolgu maddeleri geliştirilmiştir. Tek ya da değişen dalga boylarında UV-Vis absorbans, fotodiyot serisi, florometrik veya elektrokimyasal yöntemler uygulanabilmektedir (Ötleş, 2008; Aktaş, 2011).

Vitaminlerin karmaşık örnek matrislerinden ayrılarak, nitel ve nicel analizleri için geliştirilen kimyasal ve enstrümental yöntemler gıda ve ilaç sanayi başta olmak üzere pek çok akademik çalışma ortamında insan sağlığı, gıdaların besin değeri ve etiket bilgileri açısından çok önemlidir.

Vitaminlerin ortam koşullarına dayanıksız olmasından ve matrislerin karmaşıklığından dolayı vitamin ölçümünde doğru ve etkili analitik yöntemler üzerine araştırmalar yoğun bir şekilde yapılmaktadır (Aktaş,2011; Moreno ve Salvadó, 2000; Ötleş ve Karaibrahimoğlu, 2005).

Eser miktarda bulunan, vitaminlerin gıda matrislerinden ekstraksiyonu oldukça zordur. Bazı araştırmacılar vitamin ekstraksiyonu için kimyasal yöntemleri önerirken, diğerleri bu işlemlerin asit fosfataz, takadiastaz veya α -glikozidaz gibi parçalayıcı enzimlerle birlikte uygulanmasını tercih etmektedir. Bazı durumlarda enzim işlemi mineral asit hidrolizinden önce uygulanmaktadır. Gıda örneği katı ise analizin ilk aşamada kuvvetli asit, alkali veya çözücü ile ısıtma işlemi birlikte uygulanarak, vitaminin gıda örneğinden ekstraksiyonu gerekmektedir. Ardından, gıda matrisindeki proteinlere veya diğer bileşenlere bağlı olan suda çözünür vitaminlerin serbest hale geçmesini sağlamak için enzim uygulaması yapılmaktadır (Ötleş ve Karaibrahimoğlu, 2005).

Tiyamin geleneksel olarak floresansa duyarlı bir bileşen olan tiyokroma oksidasyonu sonrası florometri ile mikrobiyolojik yöntemle veya günümüzde HPLC kullanılarak analiz edilmektedir (Ottaway, 1993).

Mikrobiyolojik olarak yapılan bir tayinde ise tiyamin gıda örneğinden genellikle asit ile eritişinden sonra enzim uygulaması ile ekstrakte edilmektedir. Daha sonra *Lactobacillus fermentum* ve *L. viridescens* gibi tiyamin varlığında gelişen mikroorganizmalar ekstrakte edilmektedir. İnkübasyon sonrası bulanıklık ölçümüne göre tiyamin tespiti yapılmaktadır (Kim, 2009).

HPLC yöntemleri, ilaçlarda ve biyolojik materyallerde, tiyaminin ve fosforlanmış formlarının hızlı, hassas ve spesifik olarak analiz edilmesi için son yıllarda oldukça geliştirilmiştir. Ters faz HPLC gıda örneklerinde tiyamin analizi için en yaygın kullanılan yöntemdir. UV veya floresan detektör kullanılarak tiyamin analizi yapılabilmektedir. UV dedektör, duyarlılığı ve seçiciliğindeki düşüklüğe rağmen yaygın kullanım alanına sahiptir. Tiyamin doğrudan floresans özelliğe sahip olmadığından, kolon öncesi veya sonrası alkali oksidasyon için reaktifler kullanılarak tiyokroma dönüştürülmelidir. Tiyokromun maksimum floresans verdiği uyarma dalga boyu 365–375 nm, emisyon dalga boyu 425–435 nm'dir. Tiyokromun floresans şiddeti pH'ya bağlıdır ve pH 8'in üstünde kararlı durumdadır, dolayısıyla mobil fazın pH'sı 8'in üstünde olmalıdır (Kim, 2009).

Riboflavin gıdada serbest riboflavin ve proteine bağlı FAD ve FMN olarak bulunmaktadır. Besin içeriklerinde FAD, FMN ve riboflavin toplamı olarak tanımlanan, toplam riboflavin içeriğini belirlemek gerekmektedir (Ball, 1994). Toplam riboflavin analizi için mevcut teknikler; mikrobiyolojik tayin, florometrik yöntemler ve HPLC'dir.

Riboflavinin proteine bağlı formlarının ekstraksiyonu seyreltik asit ile yapılmaktadır. Bu işlem, FAD'nin çoğunu FMN'ye hidroliz etmektedir. Eğer serbest riboflavin analizi yapılacaksa, FMN takadiastaz gibi ticari enzim preparatları kullanılarak enzimatik olarak hidroliz edilmelidir. Bu enzim preparatları amilaza ek olarak fosfataz da içermektedir, dolayısıyla FMN'nin riboflavine defosforilasyonu gerçekleşmektedir. Eğer karbonhidratça zengin bir gıda analiz ediliyorsa, amilazın nişastayı hidroliz etmesi gibi bir avantajı vardır. Riboflavin ışığa çok hassas olduğundan analiz süresince ekstraktların ve standartların gün ışığından ve güçlü suni ışıktan korunması gerekmektedir (Ottaway, 1993).

Toplam riboflavin analizi için ekstraksiyon işlemleri asit ve enzim hidrolizini içermektedir. Kromatografik yöntemler FMN ve serbest riboflavini ayırabilmektedir.

HPLC ile belirlenen FMN ve serbest riboflavin konsantrasyonları toplanarak toplam riboflavin konsantrasyonu elde edilmekte ve bu durumda enzim hidroliz aşamasına gerek kalmamaktadır (Kim, 2009).

1.1.8 Vitamin analizlerinde karşılaşılan temel sorunlar

Pestisitler, vitaminler, ilaç etken maddeleri ve biyoaktif moleküller gibi organik moleküllerin eser düzeydeki miktarlarını biyolojik sıvılar, çevresel örnekler, gıda örnekleri gibi pek çok karmaşık matrikste tayini analitik kimyacılar için üstesinden gelinmesi gereken sorunlardan biridir. Bu amaçla gerçek örneklerin enstrümental yöntemlerle analizi öncesinde genelde uygun bir ayırma ve zenginleştirme yöntemi kullanılır. Farklı tekniklere kombine edilmiş ekstraksiyon ve zenginleştirme yöntemlerinin geliştirilmesi mevcut yöntemlere duyarlılık, seçicilik, analiz maliyeti ve hız gibi önemli özellikler kazandırır. Uygulanacak örnek hazırlama işleminin boyutu hem örnek matriksine hem de hedef türün örnek içindeki derişimine (seviyesine) bağlıdır. Gerçek örneklerle çalışırken uygulanacak örnek hazırlama işleminin temel basamakları tipik olarak; homojenizasyon, ekstraksiyon, girişimcilerin giderilmesi ve zenginleştirme olarak sıralanabilir.

Bir analitin ekstraksiyonunu etkileyen parametreler çözünürlüğü, yapısal özellikleri ve matriks etkileridir. Sıvı örnekler; genelde doğrudan sıvı-sıvı ekstraksiyonuna benzer yöntemlerle tayine hazırlanabilirken, katı örneklerle çalışırken genellikle ilk aşamalar; kurutma, öğütme, eleme gibi örneğin homojenizasyonu amaçlayan basamaklardır. Ekstraksiyon işlemlerinden sonra sulu ya da organik fazda elde edilen analit türleri eğer tayin edilebilecek düzeyde ise doğrudan uygun bir enstrümental yöntemle analize hazırdır. Birçok örnekte ise tayin öncesi analit türlerin cihazın tayin sınırlarının üzerine kadar zenginleştirilmesi gerekir. Geleneksel zenginleştirme (ekstraksiyon) yöntemleri, düşük ayırma etkinlikleri, zaman ve emek kaybı, toksik çözücülerin yüksek miktarda tüketimi ve oluşan fazla miktardaki atık sorunu gibi problemlere yol açar. Son zamanlarda, özellikle 2000 yılından itibaren, bulutlanma noktası ekstraksiyonu(CPE) birçok farklı örnek türünün, ayırma ve zenginleştirme işlemlerinde çok yaygın olarak kullanılmaya başlandı. Klasik zenginleştirme yöntemleri ile kıyaslandığında CPE'yi öne çıkaran özellikler; (1) kullanılan çok küçük miktarda surfaktanın uçuculuk, toksidite ve alevlenebilirlik gibi olumsuz özellikleri olmayışı; (2) yüksek zenginleştirme etkinliği; (3)

düşük maliyeti; (4) farklı tip ve doğaya sahip örneklere uygulamaya uygun oluşu; (5) zenginleştirme sonrası elde edilen fazın hem spektroskopik hemde kromatografik yöntemlere uygun oluşu ve (6) işlemler sırasında analit kaybının asgari düzeyde olması olarak sıralanabilir(Andres vd., 2011).

Etkin bir zenginleştirme yöntemi olarak CPE; polisiklik aromatik hidrokarbonların(PAHs) (Hung vd., 2007), östrojenin (Wang vd., 2006), biyolojik materyallerin (Ortega ve ark., 2011; Zhu ve ark., 2006) ve de metal iyonlarının(Ulusoy et al. 2012) zenginleştirilme ve tayininde başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Ayrıca, HPLC ve GC gibi kromatografik tekniklere birleşik olarak hem bu cihazlarla tayin edilebilen analit miktarları önemli derecede düşmüş hem de ayırma etkinliğinin artması ile daha girişimsiz tayinler başarılmıştır. CPE yöntemi ile yapılan yayınlanmış çalışmalar daha çok metalik türlerin bir ligant yardımıyla zenginleştirilmesi ve spektroskopik yöntemlerle tayini üzerine yoğunlaşmıştır. Son zamanlarda, organik moleküllerin zenginleştirilme sonrası kromatografik yöntemlerle tayini için yapılan çalışma sayılarında ciddi artış gözlenmektedir.

1.2 Kromatografik Ayırma Yöntemleri

Kromatografi, bir örnek içindeki maddelerin, biri hareketli ve diğeri sabit olmak üzere iki faz arasında dağılımlarına bağlı olarak, ayırma ortamını farklı zamanlarda terk etmelerini esas alan kalitatif ve kantitatif analiz yapılmasına olanak sağlayan yöntemler bütünüdür.

Bugün onlarca temel kromatografik yöntemlere ilaveten hemen her gün yeni katılımlarla kromatografik yöntem sayısı artmaktadır. Bu nedenle tek bir sınıflandırma ile kromatografik yöntemleri sıralamak gerçekçi olmayacaktır. Kromatografik yöntemler çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırmalar:

- a) Kromatografik ortamın fiziksel şekline göre,
- b) Örneğin kromatografik ortama verilmiş biçimine göre,
- c) Kromatografik ayırma mekanizmasına göre,
- d) İki fazın polarlık durumlarına göre,

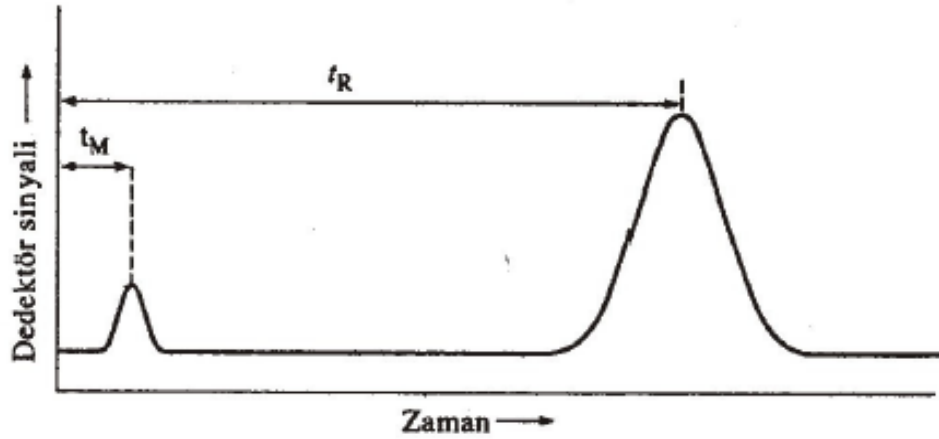
e) İki fazın fiziksel haline göre, yapılabilir

Yukarıdaki sınıflandırmaların ötesinde pratikte kromatografik yöntemler denilince akla klasik olarak şu yöntemler ve sınıflandırma gelir (Alver, 2011; Demirci ve Özcimder, 2009) .

1. Kâğıt kromatografi,
2. İnce tabaka kromatografi,
3. Kolon kromatografi,
4. Gaz-sıvı kromatografi,
5. Yüksek basınç sıvı kromatografi
6. Süperkritik akışkan kromatografi

1.2.1 Kromatografide kullanılan bazı temel kavramlar

Bir kolonda ayrılan bileşenler kromatografik dedektöre ulaşır bir elektriksel sinyal oluştururlar. Bu sinyal zamana ya da elüsyon hacmine karşı grafiğe geçirilirse kromatogram denilen eğriler elde edilir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3 Örnek bir kromatogram

Dağılma Sabitleri; Bir kolonun A ve B türlerini ayırma gücü onların kolonda hareket edebilme hızlarının oranına bağlıdır. Bu hızlar türlerin, hareketli ve sabit fazlar arasında meydana getirdikleri denge sabitinden hesaplanabilir. Bunun için bir türün hareketli ve sabit fazdaki dağılma oranlarına bakılır. Buna göre, bir A türü için hareketli ve sabit fazlar arasında,

$$A (\text{hareketli}) \Leftrightarrow A (\text{sabit})$$

şeklinde bir denge kurulur. Bu dengenin sabiti, K'ya dağılma sabiti veya dağılma oranı denir ve

$$K = \frac{C_S}{C_M} \quad (2.1)$$

şeklinde gösterilir. Buradaki C_S , A türünün sabit fazdaki, C_M da A türünün hareketli fazdaki analitik derişimidir. Genel olarak bu türün iki faz arasındaki dağılma sabiti geniş bir derişim aralığında sabittir. Buna göre sabit fazdaki C_S derişimi, doğrudan hareketli fazdaki C_M derişimine bağlıdır.

Alıkonma Zamanı; Şekil 1.3'de tek bir analit içeren numune için tipik bir kromatogram görülmektedir. Numune enjeksiyonundan sonra, analit pikinin detektöre ulaşması için geçen zamana alıkonma zamanı denir ve t_R ile gösterilir. Soldaki küçük pik kolonda tutulamayan bir türe ait olup, bu pike ait olan zamana ölü zaman adı verilir ve t_M ile gösterilir (Skoog, vd., 2006). Tutulamayan türün ortalama göç hızı, hareketli faz moleküllerinin ortalama hareket hızına esittir.

Alıkonma Faktörü (Kapasite Faktörü); Alıkonma faktörü sabit fazdaki madde miktarının hareketli fazdaki madde miktarına oranıdır ve k' ile gösterilir. Bir A maddesinin alıkonma faktörü;

$$k'_A = K_A \cdot \frac{V_S}{V_M} \quad (2.2)$$

ile tanımlanmıştır. Burada K_A , A maddesinin iki faz arasındaki dağılma katsayısıdır. Buna göre alıkonma faktörü, dağılma oranının faz hacimlerinin oranıyla çarpımıdır. k'_A ile t_R arasında aşağıdaki eşitlik vardır.

$$k'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (2.3)$$

Seçicilik Faktörü (α): Bir kromatogramda birden fazla madde ayrılıyorsa, bu türlerin birbirinden ne kadar iyi ayrıldığıнын bir ölçüsüdür. A ve B gibi iki madde için;

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M} \quad (2.4)$$

olarak tanımlanır. Genel kural olarak geç çıkanın verileri erken çıkanın verilerine oranlanır. Bu nedenle bu faktör daima 1 den büyüktür.

Bant Genişleme Teorisi; Çoğu kromatografi kolonunda verimlilik aşağıdaki bağıntı ile yaklaşık olarak bulunabilir.

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (2.5)$$

Eşitlik “Van Deemter eşitliği” olarak bilinir. Burada H, santimetre olarak teorik plaka yüksekliği ve u ise saniye başına santimetre olarak hareketli fazın doğrusal hızıdır. A, B ve C sıra ile çoklu akış yolları, boyuna difüzyon ve fazlar arasında kütle aktarım olayları ile ilgili katsayılarıdır.

Eddy Difüzyonu (A) ; bant genişlemesinin nedenlerinden biri, moleküllerin (veya iyon) dolgulu bir kolonda farklı yollar izleyerek ilerlemesidir. Bu yolların uzunluğu önemli ölçüde birbirinden farklı olabilir. Böylece aynı türün moleküllerinin kolondan çıkış süreleri de farklıdır. Çözünen madde molekülleri kolon çıkışında, belirli bir zaman aralığında ulaştıkları için bant genişlemesi olur. Bu etkiye Eddy Difüzyonu adı verilir. Eddy difüzyonu kolon dolgusunu oluşturan taneciklerin çapı ile doğru orantılıdır.

Boyuna Difüzyon Terimi (B/u) ; kolon kromatografisinde boyuna difüzyon, çözünen maddenin daha derişik olan bant merkezinden daha seyreltik olan ilerisine veya gerisine doğru (yani hareketli faz akış yönünde veya ters yönde) difüzlenmesi bant genişlemesine neden olur. Boyuna difüzyon terimi birim derişim farkı bulunan durumlarda göç hızına eşit bir sabit olan hareketli faz difüzyon katsayısı (D_M) ile doğru orantılıdır.

Boyuna difüzyon etkisi hareketli faz hızı ile ters orantılıdır. Akış hızı yüksek olduğunda, analit kolonda daha kısa süre kalacağı için, bu ters orantı şaşırtıcı değildir. Böylece bant merkezinden uçlara difüzyon için daha az süre vardır. Sıvıların difüzyon katsayıları

gazlarınkine göre birkaç mertebe küçük olduğundan, boyuna difüzyon etkisi sıvı kromatografide daha azdır.

Durgun Faz Kütle Aktarım Terimi (C.u) ; Durgun faz bağlı bir sıvı ise, kütle aktarım katsayısı, destek parçacıklarının üzerindeki film kalınlığının karesi ile doğrudan, çözünenin bu film içindeki difüzyon katsayısı DS ile ters orantılıdır. Bu etkenlerden ikisi de analit moleküllerinin, hareketli faza aktarımının yer alabileceği ara yüzeye ortalama varış hızını azaltmaktadır. Film kalın ise, moleküller ortalama olarak yüzeye ulaşmak için daha uzun yol almak zorundadır; difüzyon katsayıları küçük ise, hareketleri daha yavaş olacaktır. Bunun sonucunda kütle aktarım hızı daha yavaş olur ve tabaka yüksekliği artar (Skoog, vd., 2006).

1.2.2 Yüksek performanslı (Başarımlı) sıvı kromatografisi (HPLC)

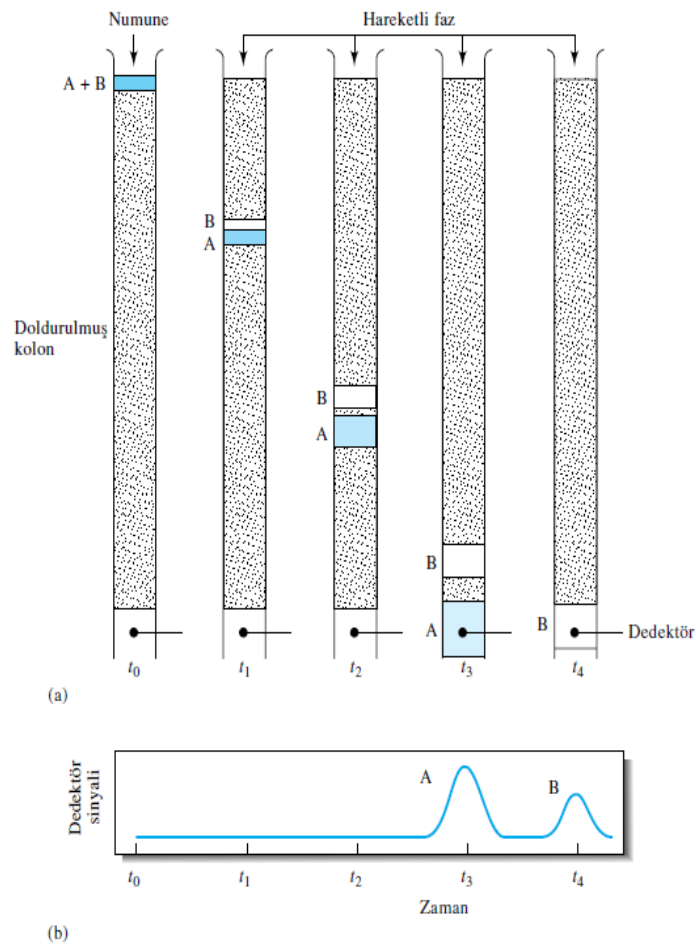
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), en yaygın kullanım alanına sahip elüsyon (yürütücüsü sıvı olan) kromatografisi tipidir. Bu yöntem, çeşitli organik, anorganik ve biyolojik numunelerdeki türleri ayırmak ve tayin etmek için birçok farklı alanda sıklıkla kullanılır. Sıvı kromatografide, hareketli faz, çeşitli türlerin karışımından oluşmuş numuneyi taşıyan sıvıdır. Yüksek performanslı kromatografisi, genellikle ayırma mekanizmasına veya durgun fazın tipine göre sınıflandırılır. Bunlar arasında,

- (1) adsorpsiyon veya sıvı-katı kromatografisi;
- (2) dağılma veya sıvı-sıvı kromatografisi;
- (3) İyon çifti kromatografisi;
- (4) iyon-değişimi veya iyon kromatografisi;
- (5) boyut ayırıcı kromatografisi ;
- (6) afinite kromatografisi ve
- (7) kiral kromatografisi sayabilir (Gündüz , 2002).

1.2.3 Sıvı kromatografisi türleri

1.2.3.1 Adsorpsiyon kromatografisi

Adsorpsiyon kromatografisi adsorpsiyon olayı üzerine kurulmuş olup ilk keşfedilen kromatografi çeşididir. 1906 yılında botanikçi Tswett tarafından keşfedilmiştir. Tswett yeşil yaprakları kıyarak petrol eteriyle muamele etmiş, elde ettiği renkli çözeltiyi (ekstraktı), toz halindeki kalsiyum karbonatla doldurduğu bir kolondan geçirerek yaprakta bulunan renkli maddeleri kolonun çeşitli yerlerinde bantlar halinde toplamayı başarmıştır (Şekil 1.4).



Şekil 1.4 Dolgulu kolonda bileşenlerin ayrımı (Skoog vd., 2004)

- a) Bileşenlerin kolonda hareketi
- b) Elde edilen dedektör sinyali, kromatogram

Bundan sonra 1934 yılına kadar bu yöntem üzerinde pek durulmamıştır. Ancak bu tarihte Kuhn ve Tederer'in aynı yöntemle karotenleri birbirlerinden ayırması konuyu birden gündeme getirmiş ve yöntem hızla gelişmeye başlamıştır (Skoog vd., 2006; Gündüz, 2002; Holler, 2007).

Bu yöntemde genel olarak sabit faz olarak ince öğütülmüş kalsiyum karbonat, alüminyum oksit, talk, silikajel gibi maddeler, hareketli faz olarak da, su, alkol, aseton, kloroform, nitrobenzen, tolüen, benzen gibi çözücüler kullanılabilir. Gerek hareketli, gerekse sabit fazların seçimi oldukça ampiriktir. Hangi hareketli fazla hangi sabit fazın iyi sonuç vereceği ancak denenerek bulunur.

Bilindiği üzere çeşitli maddelerin adsorplayıcı tabaka veya sabit tabaka üzerinde adsorplanma dereceleri farklı olduğundan, kromatogram esnasında maddeler yukarıdan aşağıya farklı yerlerde toplanır. Maddeler farklı renklerdeyse yerleri kolaylıkla tespit edilir. Renkli değılseler, ultraviyole ışınlarla tutulup yerleri ve sayıları tespit edilir. İyi bir ayırma elde edilememişse, çözücü değıştirilir. Maddeler birbirinden iyice ayrıldıktan sonra, bunların kolon ve adsorplayıcıdan ayrılması sağlanır.

Adsorpsiyon kromatografisi, basit olması yanında etkin bir ayırma yöntemidir. Bu yöntem sayesinde izomerler, hidrokarbonlar, rasemik karışımlar, hormonlar ve antibiyotikler kolaylıkla ayrılabilir.

Adsorpsiyon kromatografisi, daha çok mol kütleleri 5000 den daha az, nispeten apolar ve suda çözünmeyen organik maddelerin ayırmalarında kullanılmaktadır. Adsorpsiyon kromatografisinin diğer tekniklerde bulunmayan en önemli özelliği, meta ve para süstitüe benzen türevleri gibi izomerik karışımları ayrabilmesidir.

1.2.3.2 Dağılma kromatografisi

Dağılma kromatografisinde kullanılan başlıca sabit faz silikajeldir. Bunun nedeni, silikajelin suyu şiddetle adsorbe etmesi ve yüzeyinde sabit bir sıvı faz meydana getirmesidir. Silikajel üzerine sudan başka (sıvı faz olarak) alkoller, glikoller, nitro metan gibi sıvılar da adsorbe ettirilebilir. Silikajelden başka alümina, diatomeli topraklar, talk sellüloz nişasta gibi maddeler de sabit faz olarak kullanılabilir.

Hareketli faz olarak, tek veya karışım halindeki çözücüler kullanılır. İster tek, ister karışım halinde olsun, hareketli fazdaki çözücüler sabit fazdakilerle karışmamalı veya birbirlerinin içinde büyük ölçüde çözünmemelidir. Hareketli faz denemeyle seçilir.

Dağılma kromatografisinden çıkan çözeltilerdeki maddeleri teşhis etmek için, çeşitli yöntemler kullanılır. Bunların başlıcaları; elüe edilen ve farklı tüplerde toplanan çözeltilerin sık aralıklarla kırma indisine, absorpsiyonuna veya iletkenliğine bakılır. Ancak, en iyisi çözeltilerin bir detektöre gönderilerek numunenin toplam kromatogramının alınmasıdır.

Dağılma kromatografisinde, durgun faz, sıvı hareketli faz ile karışmayan ikinci bir sıvıdır. Bu teknik sıvı-sıvı kromatografi ve sıvı bağlı faz kromatografi olmak üzere ikiye ayrılır. İki teknik arasındaki fark, katı taneciklerin yüzeyine durgun fazın tutturulmasındaki yöntem farkından kaynaklanır. Sıvı-sıvı tekniğinde durgun faz katı yüzeyine fiziksel adsorpsiyonla; bağlı faz tekniğinde ise, kovalent bağlarla tutturulur. Daha kararlı özelliğinden dolayı daha çok bağlı faz dağılma kromatografi kullanılmaktadır.

Bağlı faz dolgu maddelerinin çoğu, bir organoklorosilanın, sıcak seyreltik hidroklorik asit çözeltilisinde hidrolizlenerek yüzeyine -OH grubu bağlanmış silisyum dioksit ile reaksiyona sokulmasıyla hazırlanır. Bu reaksiyon sonucunda oluşan ürün bir organosiloksandır. Yüzeye fiziksel olarak tutturulmuş dolgular, zamanla hareketli fazda çözünerek sürüklendikleri için sık sık yeniden kaplanmaları gerekir. Ayrıca, bu dolgularda, hareketli fazdaki çözünme problemiyle, gradiyent elüsyon tekniğini uygulamak pratik değildir. Bağlı faz dolgularının başlıca sakıncası, biraz sınırlı numune kapasitesine sahip olmalarıdır.

Normal-Faz ve Ters-Faz Dolgu Maddeleri

Durgun faz ile hareketli fazın bağlı polaritelerine göre iki tip dağılma kromatografiden söz edilir. Sıvı kromatografi ile yapılan ilk çalışmalarda, durgun faz olarak daha çok trietilen glikol ve su gibi polaritesi yüksek maddeler kullanılırdı. Hareketli faz ise, daha çok hekzan veya i-propil eter gibi nispeten apolar çözücülerdi. Tarihsel nedenlerden dolayı, bu tip kromatografiye şimdi normal- faz kromatografi adı verilmektedir. Ters-faz kromatografide ise, durgun faz apolar bir hidrokarbon; hareketli faz ise nispeten polar olan bir çözücüdür (su, metanol, asetonitril veya tetrahidrofuran gibi).

Normal - faz kromatografide, polarlığı en az olan bileşen kolondan ilk önce çıkar; hareketli fazın polarlığı arttıkça elüsyon zamanı azalır. Ters – faz tekniğinde ise, aksine, polarlığı en çok olan bileşen kolondan ilk önce çıkar ve hareketli fazın polarlığı arttıkça elüsyon zamanı artar.

HPLC ile yapılan bütün ayırma işlemlerinin dörtte üçünden daha fazlasının oktil- veya oktildesil siloksan bağlı dolgu maddesi bulunduran ters-faz kromatografisi ile yapıldığı söylenebilir. Bu tür dolgu maddelerinde uzun zincirli hidrokarbon böylelikle, apolar hidrokarbon bir yüzey elde edilmiş olur. Bu dolgu maddeleri ile kullanılan hareketli faz ise, genellikle çeşitli derişimlerde metanol, asetonitril veya tetrahidrofuran gibi çözücüleri içeren sulu çözeltilerdir (Skoog, vd., 2006; Gündüz, 2002; Holler, 2007).

1.2.3.3 İyon çifti kromatografisi

Ters faz kromatografisinin bir alt sınıfı olup, bu teknikte, kolay iyonlaşabilir türler ters faz ilkesine göre işleyen kolonlarda ayrılır. Bu tip kromatografide, hareketli faza kuarterner amonyum katyonu veya alkil sülfonat anyonu gibi çok büyük boyutlu karşı iyonlar içeren bir organik tuz eklenerek, analitin bir iyon çifti oluşturması sağlanır. Buradaki ayrılma süreci için iki mekanizma önerilmiştir. Birincide, kullanılan karşı iyon, hareketli fazdaki zıt yüklü analit iyonu ile yüksüz bir iyon çifti oluşturur. Sonra bu iyon çifti, apolar durgun faz ile polar hareketli faz arasında dağılır ve iyon çiftinin her iki faza bağlı ilgilerine göre değişen bir alıkonma özelliğine göre ayrılmış olur. Diğer mekanizmada ise, karşıt iyon, normal nötral durgun fazda kuvvetle tutularak bu fazın yüklü hale geçmesini sağlar. Daha sonra, hareketli fazdaki zıt yüklü iyonlarla tersinir iyon çifti kompleksleri oluşur ve durgun fazla en sağlam kompleksi veren analitin en uzun süre alıkonması esasına göre bir ayrılma olur.

1.2.3.4 İyon değiştirme kromatografisi

İyon değiştirme kromatografisi, bir katı maddenin yapısında bulunan iyonları, temasta bulunduğu çözelti içindeki aynı cinsten yüklü başka iyonlarla bir dengeye göre değiştirmesi özelliğine dayanır. Bu amaçla kullanılan katı maddeler, çözelti ortamında hiç çözünmeyen büyük moleküllü doğal ve yapma maddelerdir. Bunlar inorganik ve organik diye ikiye ayrılır. İnorganik olanlar killer ve zeolitlerdir. Organik olanlar ise doğal ve sentetik polimerlerdir.

Günümüzde, bastırıcı-temelli ve tek-kolonlu iyon kromatografi tipleri kullanılır. Bu iki yöntem, analitin iletkenliğinin ölçümüne bozucu etki yapan elüent elektrolitlerinin iletkenliğini önlemede kullanılan yöntemler yönünden birbirinden farklıdır.

1.2.3.5 Boyut ayırıcı kromatografi

Boyut ayırıcı veya jel kromatografi, sıvı kromatografi tekniklerinin en yenisidir. Özellikle, yüksek mol kütleli türlere uygulanan çok etkili bir tekniktir.

Boyut ayırıcı kromatografide dolgular, küçük boyutlu (~10µm) silis veya polimer taneciklerdir. Bu dolgular ile çözünen madde ve çözücü moleküllerinin difüzlenebileceği düzgün gözenekli bir ağ oluşturulur. Bu gözeneklerde moleküller, hareketli fazın akışı sırasında etkin bir şekilde tutulur ve sonra bırakılır. Analit moleküllerinin ortalama alıkonma süresi, molekülün etkin boyutuna bağlıdır. Ortalama gözenek büyüklüğünden önemli ölçüde daha büyük moleküller, dolgu maddesi tarafından tutulmazlar ve bu moleküller için alıkonma süresinden bahsedilemez. Böylece, bu moleküller kolondan hareketli fazla aynı hızda geçerler. Ortalama gözenek büyüklüğünden önemli ölçüde daha küçük moleküller ise, dolgu maddesinin gözeneklerine girerek en uzun bir süre için alıkonulur; bunlar en son elüe edilirler. Bu iki uç durum arasında, ara boyuttaki moleküllerin, dolgu maddesinin gözeneklerine girmesi ve tutulması çap büyüklüklerine bağlıdır. Bu gruptaki moleküllerin birbirinden ayrılması, molekül boyutlarına ve bir dereceye kadar da molekül şekline bağlıdır.

Piyasada çok sayıda boyut-ayırıcı dolgu maddesi bulunmaktadır. Bunların bazıları hidrofiliktir ve sulu hareketli fazlarla kullanılabilir. Hidrofobik olanları ise, apolar organik çözücülerle kullanılır. Hidrofilik dolgu maddelerinin kullanıldığı kromatografiye jel süzme kromatografi; hidrofobiklerin kullanıldığı kromatografiye ise jel geçirgenlik kromatografi adı verilmektedir (Skoog vd., 2006; Gündüz, 2002; Holler, 2007).

1.2.3.6 Afinite kromatografi

Afinite kromatografide, afinite ligandı adı verilen bir reaktif, katı bir destek yüzeyine kovalent olarak bağlanır. Tipik afinite ligantları arasında, antikorlar, enzim inhibitörleri veya numunedeki analit moleküllerine tersinir ve seçici olarak bağlanan başka moleküller sayılabilir.

Afinite kromatografide durgun faz, agaroz veya yüzeyine afinite ligandı tutulmuş gözenekli cam bilyacıklardır. Bu yöntemde, hareketli fazların iki ayrı rolünden söz edilir.

Birincisi, analit moleküllerinin liganda sağlam bir şekilde bağlanmasını sağlamalıdır. İkincisi ise, istenmeyen türler uzaklaştırıldıktan sonra, analit ile ligant arasındaki etkileşimi tamamen kaldırmalı veya zayıflatmalı ve böylece, analit elüe edilebilmelidir.

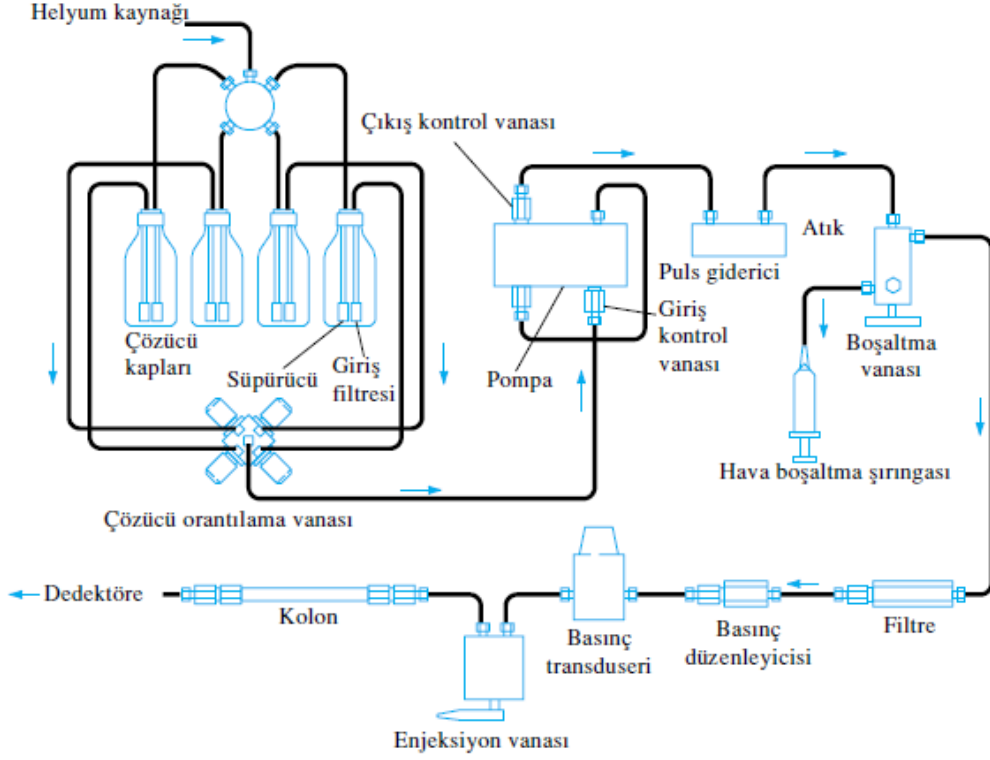
Afinite kromatografinin başlıca üstünlüğü, olağanüstü seçiciliğidir. Başlıca kullanım alanı ise, preparatif çalışmalarda biyomoleküllerin hızlı izolasyonudur.

1.2.3.7 Kiral kromatografi

Birbirinin üst üste çakışmaz ayna görüntüleri olan kiral bileşiklerin ayrılması alanında, son yıllarda çok önemli gelişmeler olmuştur. Böyle ayna görüntülerine, enantiyomerler denir. Bu ayrımalarda ya hareketli faza kiral bir madde katılır; ya da durgun faz olarak bir katı seçilir. Ayırıcı kiral madde (durgun faz) ile ayrılacak izomerlerden biri arasında seçimli kompleks oluşumu, enantiyomerlerin ayrılmasının esasını oluşturur. Ayırıcı maddenin kiral olması özellikle gereklidir; çünkü ayrılacak izomerlerin kiral özellikleri arasında ayırım, ancak bu şekilde mümkündür (Skoog, 2006; Gündüz, 2002; Holler, 2007).

1.2.4 HPLC Cihazları

Yaygın olarak kullanılan HPLC cihazının temel bileşenleri Şekil 1.5’de görülmektedir.



Şekil 1.5 HPLC cihazının temel bileşenleri (Skoog vd., 2006)

Modern cihazlarda normal bir akış hızı elde etmek için, 3-10 μm 'lik dolgu maddeleriyle doldurulmuş kolonlarda birkaç yüz atmosferlik basınç uygulamaları yapılır. Bu yüksek basınç uygulaması nedeniyle, yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazları, diğer kromatografi cihazlarına göre daha pahalı ve daha karmaşıktır.

1.2.4.1 Hareketli faz ve çözücü muamele sistemleri

Modern bir HPLC cihazında bir veya daha çok cam veya paslanmaz çelik kaplar bulunur. Bunların her biri 500 mL' den daha fazla çözücü alacak kapasiteye sahiptir. Çözücü sıvılarda bulunabilecek tozları ve çözünmüş gazları gidermek için de önlemler alınır. Çözünmüş gazlar, kolonlarda kabarcıklar oluşturarak pik genişlemesine yol açar. Ayrıca, gerek gaz kabarcıkları gerekse tozlar, dedektörlerle girişim yaparak bunların performansını azaltır. Gaz gidericilerde bir vakum pompa sistemi, bir damıtma sistemi, ısıtıcı ve karıştırıcı cihaz veya çözünmüş gazı hareketli fazda çözünmeyen bir gaz yardımıyla sürükleyerek giden bir süpürme sistemi bulunur.

Sabit bileşimli tek bir çözücü ile yapılan elüsyon izokratik elüsyon olarak adlandırılır. Polarlıkları birbirinden farklı iki (veya bazen daha fazla) çözücü sistemlerinin kullanıldığı tekniğe gradiyent elüsyon denir. Bu teknikte iki çözücünün oranı, önceden programlanmış olarak, bazen de kademeli bir şekilde değiştirilir.

1.2.4.2 Pompa sistemleri

Sıvı kromatografide kullanılan pompalarda şu özellikler bulunmalıdır: (1) 6000 psi' ye kadar basınçlar oluşturabilmeli, (2) pulssuz sıvı çıkışı bulunmalı, (3) akış hızı 0,1'den 10 mL/dakika'ya kadar ayarlanabilmeli, (4) sıvı akış hızlarının tekrarlanabilirliği % 0,5 veya daha iyi olmalı ve (5) çok sayıda çözücünün korozyon etkisine karşı dayanıklı olmalıdır.

Üç tüp mekanik pompa kullanılır. Bunlar vidalı şırınga tipi pompalar, pistonlu pompalar ve pnömatik veya sabit basınçlı pompalardır. Şırınga tipi pompalar, akış hızı kolayca kontrol edilebilen pulssuz bir sıvı çıkışı oluşturur. Ancak hem kapasiteleri sınırlıdır (~250 mL); hem de değişik çözücü sistemlerinin kullanılmasına uygun değildir. Daha yaygın olarak kullanılan pistonlu pompalarda, genellikle küçük bir silindirik bölme bulunur ve bu bölme bir pistonun ileri-geri hareketiyle doldurulur ve boşaltılır. Bu pompalama hareketi sonucunda, pulslu bir akış meydana gelir. Bu pulslu akış, daha sonra düzeltilerek sürekli bir akışa dönüştürülür. Pistonlu pompaların iç hacminin küçüklüğü, yüksek çıkış basıncı (10000 psi'ye kadar), gradiyent elüsyon tekniğine kolay ayarlanabilme ve sabit akış hızı gibi üstünlükleri vardır. Ayrıca, kolon geri basıncından ve çözücü viskozitesinden önemli ölçüde etkilenmez. En modern ticari kromatografi cihazlarında pistonlu pompalar kullanılır.

Bazı cihazlarda ise, pnömatik pompalar bulunur. Bu pompaların en basitinde, sıkıştırılmış bir gazla basınç uygulanabilen büyük bir kabın içerisine yerleştirilmiş kırılabilir çözücü kabı vardır ve bu tür pompalar ucuz, basit olup pulssuz çıktıya uygundur. Ancak, kapasiteleri ve basınçları sınırlıdır. Ayrıca, pompalama hızı çözücü viskozitesinden etkilenir. Üstelik de, gradiyent elüsyon tekniğine uygun değildir (Skoog, 2006).

1.2.4.3 Kolonlar

Sıvı kromatografi kolonları, genellikle paslanmaz çelik borulardan imal edilir. Düşük basınçlı (~600 psi) sistemlerde ise, kalın cidarlı olan cam borular da kullanılabilir. Kolonların uzunluğu 10-30 cm ve iç çapı 2-5mm civarındadır. Kolon dolgu maddelerinin tanecik boyutu 3-10 µm kadardır. Bu tip kolonların 1 metresinde 40000-60000 kadar

tabaka bulunur. Son yıllarda uzunluğu 3-7.5 cm ve iç çapı 1-4.6 mm olan yüksek performanslı mikrokolonlar da imal edilmeye başlanmıştır. Bu kolonların dolgu maddelerinin tanecik boyutları 3-5 µm ve tabaka sayısı 100000 tabaka/m 'ye kadar çıkmaktadır. Bu mikrokolonlar ile çok az çözücü ile hızlı bir şekilde ayırma yapılabilmektedir. Sıvı kromatografi için gerekli yüksek saflıktaki çözücüler, pahalı olduğu ve çözücüler kullanıldıktan sonra atıldığı için, mikrokolon kullanımı çok önemli bir üstünlüktür.

Sıvı kromatografide kullanılan en yaygın kolon dolgu maddeleri, silisyum dioksittir. Mikrondan daha küçük boyutlardaki silisyum dioksit taneciklerinin biraraya getirilmesiyle daha büyük ve yaklaşık aynı boyutlarda tanecikler elde edilir. Hazırlanan taneciklerin yüzeyi, genellikle bu yüzeye fiziksel veya kimyasal bağlarla bağlanmış ince bir organik filmle kaplanır. Alüminyum oksit tanecikleri, gözenekli polimer tanecikleri ve iyon değiştirici reçineler de dolgu maddesi olarak kullanılabilir.

Koruyucu kolonlar, analitik kolonun giriş kısmına takılarak çözücülerden gelebilecek toz ve kirlilikleri tutmak suretiyle kolonun ömrünü uzatırlar. Bunun yanında koruyucu kolonlar yardımıyla durgun faz, hareketli faz ile doyurularak sıvı-sıvı kromatografide durgun fazın sürüklenme ile kaybı minimuma indirilir. Koruyucu kolonunun dolgusunun bileşimi analitik kolonunkine benzer olmalıdır. Ancak, basınç düşmelerini azaltmak için, koruyucu kolonun dolgu maddesinin tanecik boyutu, analitik kolonunkinden genellikle daha büyüktür.

1.2.4.4 Kolon fırınları

Birçok çalışmada, kolon sıcaklığının hassas bir şekilde kontrol edilmesine ihtiyaç duyulmaz ve oda sıcaklığında çalışılır. Bazı durumlarda ise, kolon sıcaklığı derecesinin onda biri mertebesinde sabit tutulduğu zaman, daha iyi kromatogramlar elde edilir. Modern cihazların birçoğunda, kolon sıcaklığını oda sıcaklığından 150 °C'a kadar onda bir derece mertebesinde kontrol etmek için ısıtıcı sistemleri bulunur. Kolonlar, hassas sıcaklık kontrollü sabit sıcaklık banyosundan beslenen su ceketleriyle de donatılabilir.

1.2.4.5 Dedektörler

HPLC için dedektörler, kolon bant genişlemesini en aza indirmek için düşük ölü hacme sahip olmalıdır. Dedektör, küçük ve sıvı akışı ile uyumlu olmalıdır. Yüksek performanslı sıvı kromatografide, gaz kromatografideki gibi çok duyarlı ve amaçlı dedektörler

bulunmaz. Bu nedenle, kullanılacak dedektör sistemi, analizi yapılacak numunenin cinsine uygun olmalıdır. En yaygın kullanılan HPLC dedektörleri kullanım yoğunluğuna göre sıralanarak Çizelge 1.2’de verilmiştir.

Sıvı kromatografide en çok kullanılan dedektörler, ultraviyole veya görünür ışığın absorpsiyonuna dayanırlar. Birçok organik madde, ultraviyole bölgesinde absorpsiyon gösteren fonksiyonlu gruplar bulundurduğu için, fotometrelerde 254 nm ve 280 nm dalga boyunda ışın veren cıva lambaları kullanılır. Girişim filtreleri ile birlikte kullanılan döteryum veya tungsten lambaları ile absorpsiyon yapan maddenin türü kolay bir şekilde seçilebilir. Spektrofotometrik dedektörler, fotometrik detektörlere göre yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazlarında daha yaygın olarak kullanılırlar.

Modern cihazlarda diyot-serili dedektörler kullanılır ve analit kolondan çıkarken tüm spektrum görüntülenebilir. Geniş kullanım alanı bulan diğer bir dedektör de çözücünün kırma indisinin analit molekülleri tarafından değiştirilmesine dayanır.

Çizelge 1.2 Yaygın kullanılan HPLC Dedektörleri (Skoog, 2007).

HPLC Dedektörü	Ticari Bulunabilirliği	Tayin Edebileceği En Küçük Kütle
Absorbans	var	10 pg
Floresans	var	10 fg
Elektrokimyasal	var	100 pg
Kırma İndisi	var	1 ng
İletkenlik	var	100 pg-1 ng
Kütle Spektrometri	var	< 1 pg
FTIR	var	1 µg
Işın Saçılması	var	1 µg
Optikçe Aktiflik	yok	1 ng
Tür Seçici	yok	1 ng
Fotoiyonlaşma	yok	< 1 pg

Çizelge 1.2’de verilen diğer bütün dedektörlerin aksine, kırma indisi dedektörleri hemen hemen bütün maddelere cevap veren genel amaçlı detektörlerdir. Bu dedektörlerin tek sakıncası, duyarlılığının biraz düşük olmasıdır. Potansiyometrik, kondüktometrik ve voltametrik ölçümlere dayanan çeşitli elektrokimyasal dedektörler de kullanılmaktadır.

1.2.5 Kromatografik analiz için örnek hazırlama

Son yıllarda yapısı karışık örneklerin nitel ve nicel analizleri için, hassas, doğru ve hızlı yöntemlerin geliştirilmesi önemli bir konu haline gelmiştir. Ancak biyolojik, çevresel, gıda ve farmakolojik ürünlerinin tayinlerinde yüksek hassasiyetli analitik cihazların gelişmesine rağmen, analitik cihaz çoğunlukla örnek ortamında tayinde başarısız olmaktadır. Bundan dolayı matriks ortamdan örneği alma, deriştirme (zenginleştirme) için genellikle ön işlem (clean-up) uygulanması gerekmektedir (Sarafraz-Yazdi vd., 2010)

Karmaşık bir örnekteki madde veya maddeler, HPLC veya GC gibi kromatografik yöntemlerle analiz edilmek istenildiğinde, bu maddelerin miktarlarının cihazın tayin sınırlarının üzerlerine getirilmeleri (zenginleştirme) ve/veya karmaşık ortamdan mümkün olduğu kadar arındırılmaları (saflaştırma) gerekmektedir. Bu saflaştırma ve zenginleştirme işlemleri genelde distilasyon (damıtma), bir katı yüzeyine adsorbsiyon ve ekstraksiyon gibi işlemler yapılarak gerçekleşir (Alver, 2011).

1.3 Zenginleştirme Yöntemleri

Günümüzde fizik, kimya, biyoloji, farmakoloji, çevre ve teknolojik alanlardaki türlerin çok küçük miktarlarının tayininin önemi giderek artmaktadır. Eser türlerin tayininde örnekleme sırasında kirlenme, aletsel problemler, örnek matriksindeki girişimciler, standart madde ihtiyacı gibi önemli sınırlamalarla karşılaşılır. Bu problemler sebebiyle, eser tür analizinde tayin öncesi bir ayırma-zenginleştirme basamağının uygulanması zorunlu hale gelir. Eser türün içinde bulunduğu ortamın tayin tekniğine uygun olmaması, yani ortamın bozucu etki göstermesi ve bu ortamda eser tür derişiminin aletin tayin sınırının altında olması halinde zenginleştirme işlemi kaçınılmazdır.

Ayırma ve zenginleştirme işlemleri analitik kimyada önemli yer tutar. Bu yöntemler sadece matriks etkisini en aza indirmekle kalmayıp, aynı zamanda tayin sınırı ve diğer analitik özellikleri de iyileştirirler. Gerçek örnek analizlerinde, yöntemin tayin sınırı altındaki analit derişimlerinin belirlenebilmesi için analitin matriks etkilerinden

arındırılması ve yöntemin ölçülebileceği düzeylere kadar değiştirilmesi gerekir. Bu amaçla kullanılan klasik ayırma ve zenginleştirme yöntemleri, fazla miktarda toksik çözücü kullanımı, analiz süresinin uzun oluşu, düşük zenginleştirme faktörü gibi sakıncalara sahiptir. Bu sakıncalar nedeniyle, daha hızlı ve kullanışlı, çevre dostu, daha duyarlı yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır (Ulusoy, 2011).

1.3.1 Sıvı-Sıvı ekstraksiyon yöntemi

Sıvı-sıvı ekstraksiyon (özütleme) yöntemi basit ve hızlı bir yöntem olması nedeniyle ön deriştirme ve ayırma işlemlerinde yaygın bir kullanım alanına sahip olmuştur. Bu yöntemde, sulu fazda bulunan eser türler şelatları ya da iyon çifti komplekslerine çevrilerek organik faza alınır.

Bu yöntem iki ayrı uygulama ile yapılır. Birincisinde ana bileşen organik faza alınırken eser türler sulu fazda kalır. İkinci yöntemde ise eser türler şelatları ya da değişik kompleksleri halinde organik faza alınır. Genellikle daha çok ikinci yol tercih edilir. Organik faza alınan eser türlerin analiz edilmeden önce yeniden sulu faza alınmaları gerekir ve bu işleme geri özütleme denir. Bu yöntem de seçimlilik; pH, ligant, çözücü türü ve sıcaklık gibi değişkenlerle sağlanır (El-Shahawi vd., 2007; Ghiasvand vd., 2005).

1.3.2 Katı-Faz ekstraksiyonu

Katı faz özütleme yöntemi, sıvı faz içerisinde bulunan analitin katı bir faz üzerinde toplanmasını esas alır. Çeşitli zenginleştirme yöntemleri arasında katı faz özütleme yöntemi, basit, hızlı, ucuz ve yüksek zenginleştirme faktörü elde edilebilmesinden dolayı, en etkili zenginleştirme yöntemlerinden biridir. Bu teknik, katı bir adsorban madde ile çözelti içindeki analitin saflaştırılmasını ve deriştirilmesini mümkün kılmaktadır. Bu yöntem için esas yaklaşım sıvı halde bulunan analiti tutan adsorban madde içeren bir kolon, bir kartuş veya disk içinden geçirilmesidir. Tüm numune sorbent içinden geçtikten sonra, tutulmuş olan analit uygun bir çözücü ile elüe edilir ve tayini yapılır (Altundağ, 2007).

Katı faz özütlemenin ilk uygulamaları elli yıl önce yapılmıştır. Günümüzde de etkili bir örnek hazırlama yöntemi olarak birçok laboratuvarında kullanılmaktadır. Katı faz özütleme yöntemi sadece sıvı örneklerle sınırlı olmayıp, gaz örneklere de uygulanabilmektedir (Camel, 2003; Aydın, 2008).

1.3.3 Elektrolitik biriktirme ile zenginleştirme

Eser türlerin elektrolizle bir elektrot üzerinde toplanıp, daha sonra küçük hacimler içine sıyrılarak alınması ile yapılan zenginleştirme yöntemidir. Uygun şartlar sağlanılarak eser türlerin çalışma elektrodu üzerinde birikmeleri sağlanır. Hedef türlerinin, elektrolitik biriktirilmelerine elektrodun türü ve şekli, elektroliz hücresi ve şekli, örneğin bileşimi etki eder. Çalışma elektrodu olarak civa elektrodu, platin elektrodu kullanılabilirdiği gibi, platin alaşımları karbon çubuk elektrotlarda kullanılmaktadır. Eser türlerin zenginleştirilmesinde çok kullanılan potansiyel kontrollü elektrolizin yanı sıra anodik sıyırma yöntemleri de yaygın olarak kullanılır (Çetin, 2014).

1.3.4 İyon değiştirme ile zenginleştirme

İyon değiştirme ile yapılan zenginleştirmede, katı maddenin yapısında bulunan iyonlar, çözelti içindeki aynı cinsten yüklü başka iyonlarla yer değiştirirler. İyon değiştirme tekniği ile büyük hacimli çözeltiler daha küçük hacimden geçirilirken, eser türlerin seçimli olarak tutunmaları sağlanır. Tutulan eser türler küçük hacimli bir elüent ile ikinci bir faza alınarak zenginleştirilir. İyon değiştirme tekniği kullanılarak yapılan zenginleştirme işleminde genelde iyon değiştirici reçine kolona yerleştirilir. Eser türleri içeren çözelti kolondan geçirilerek, hedef türlerin kolonda tutunması sağlanır. Çözelti içinde bulunan iyonlar temas ettikleri katı maddenin yapısında bulunan aynı yüklü iyonlarla yer değiştirir. Reçinedeki türler elüe edilerek eser türler tayin edilir. İyon değiştirici seçiminde fonksiyonel grupların seçimliliği, değiştirme kapasitesi, değiştirme hızı, iyon değiştiricinin rejenerasyonu ve uygun elüent kullanılması dikkat edilecek hususlardır. (Çetin, 2014).

1.3.5 Birlikte çöktürme yöntemi

Birlikte çöktürme yönteminin esası, organik veya inorganik karakterli, büyük yüzey alanına sahip çökelek oluşturulup, çökelek üzerinde analitin adsorplanmasıdır. Genellikle kullanılan inorganik çökelekler şelat kompleksleridir (Baytak ve Türker, 2005).

Örnek çözeltilisine santrifüjle ya da süzme ile kolaylıkla ayrılacak miktarda çökelek oluşmasını sağlamak için yeterli oranda çöktürücü reaktiften eklenmesi gerekir. Çöktürücü reaktif olarak daha çok suda zor çözünen metal şelatları oluşturan organik karakterli çöktürücüler kullanılmaktadır.

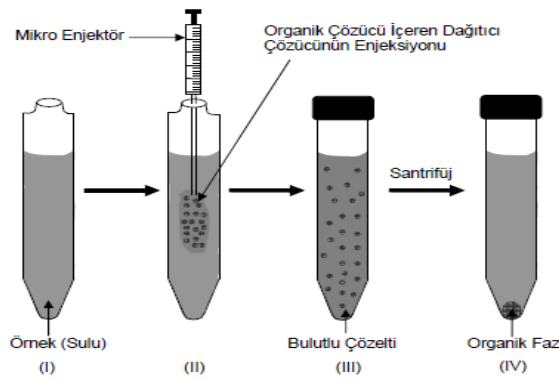
1.3.6 Uçuculaştırma yöntemi

Bilinen en eski analitik zenginleştirme yöntemlerinden birisidir. Bu yöntemin uygulanabilir olması için matriksle eser tür arasında uçuculuk farkının büyük olması gerekir. Yöntem ya matriksin uçuculaştırılması ya da eser türün uçuculaştırılmasıyla gerçekleştirilir. Prensip olarak hangisinin uçuculuğu fazla ise o uçuculaştırılır. Genelde metalik özellik göstermeyen türlere ve yüksek buhar basıncı gösteren tür veya halojenin, hidrojen ve oksijenle yapmış oldukları komplekslere uygulanır. Ana bileşenin uçuculaştırılması yönteminde eser türlerin deriştirilmesi için fazla kimyasal reaktife ihtiyaç duyulmaz. (Mihaljevi vd., 2004).

1.3.7 Dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon

Eser düzeydeki bileşenlerin zenginleştirilmesi için Raze ve ark. tarafından geliştirilen bir yöntem olan dağıtıcı (dispersif) sıvı-sıvı ekstraksiyonu (DLLME) methodunda, birkaç mL dağıtıcı çözücü ile birlikte mikro hacimde ekstraksiyon çözücüsünün kullanıldığı yeni bir yaklaşım gerçekleştirilmiştir (Raze vd., 2006). Dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DLLME) yöntemi, homojen sıvı-sıvı ekstraksiyonu (HLE) ve bulutlanma noktası ekstraksiyonu (CPE) yöntemlerine benzer bir üçlü çözücü sistemine dayanmaktadır (Pena-Pereira vd., 2009).

Şekil 1.6'da dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DLLME) sistemi görülmektedir.



Şekil 1.6 DLLME yöntemi şeması (Alver, 2011)

Yöntem hedef maddeleri içeren sulu örnek (I) içersine dağıtıcı (dispersive) ve ekstraksiyon çözelti karışımının hızlı bir şekilde enjeksiyonuna (II) dayanır. Ekstraksiyon çözücüsü toplam çözelti hacminin % 1–3'ünü oluşturur. (III) Bu adımda çözeltide bulutlanma oluşur. DLLME'de ekstraksiyon karışımının % 95–97'sini oluşturan sulu çözelti içinde ekstraksiyon çözücüsünün iyi damlacıklar oluşturmasında dağıtıcı (dispersive) çözücü anahtar rol oynar. Ekstraksiyon çözücüsü ile sulu örnek arasında büyük yüzey alanı olduğundan dengeye çok hızlı ulaşır. Böylece ekstraksiyon zamandan bağımsız olur. Hidrofobik maddeler toplam sulu çözelti içerisinde dağılan ekstraksiyon çözeltisinde zenginleştirilir. Karışım santrifüjlendiğinde küçük damlacıklar konik tüpün dibinde toplanır (IV). Dibe toplanan alt fazdaki ekstraksiyon çözücüsü, mikro enjektörle alınarak uygun enstrümental yöntemler ile tayin edilir (Sarafraz-Yazdi vd., 2010).

Ekstraksiyon çözücüsü olarak yoğunluğu sudan ağır ve su ile karışmayan klorobenzen, karbon tetraklorür ve tetrakloroetilen gibi çözücüler kullanılırken dispersive çözücü olarak aseton, etanol, metanol ve asetonitril gibi su ile karışan polar çözücüler kullanılır.

DLLME'nin başlıca avantajları; basitliği, düşük maliyeti, hızlılığı, düşük örnek hacmi, yüksek geri alınabilirlik ve zenginleştirme faktörleri elde edilebilmesidir. Yöntemin seçiciliği kötü olduğu için karmaşık örneklerden ekstraksiyonlarda tercih edilmezler. Üç farklı çözücünün gerekli olması, ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan bileşiklerin yoğunluğunun sudan ağır olması gerektiğinden çözücü seçiminin sınırlı olması ve santrifüj gerektirmesi yöntemin dezavantajları olarak sayılabilir.

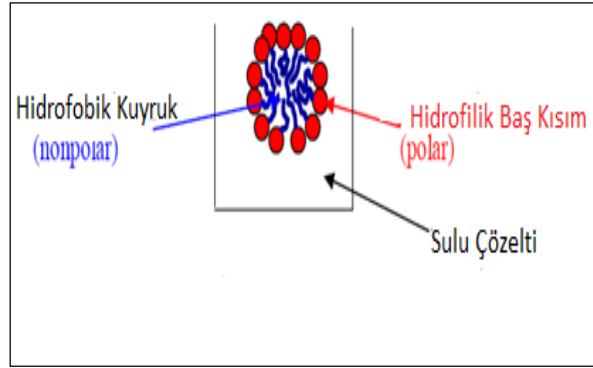
1.3.8 Bulutlanma noktası ekstraksiyonu (Cloud Point Extraction, CPE)

Bulutlanma noktası ekstraksiyonu özellikle 1990'lı yıllardan sonra ayırma ve zenginleştirme amacıyla analitik kimyacılar tarafından sıkça kullanılmaya başlanmıştır. CPE yöntemi ilk defa 1978 yılında Watanabe ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır (Watanabe vd., 1978). Sonraki yıllarda farklı organik ve inorganik türlerin ayırma ve zenginleştirilmesinde bu yöntemin kullanımı giderek yaygınlaşmıştır. Özellikle 2000'li yıllarda bu alandaki çalışmalar giderek artmıştır (Ulusoy, 2010).

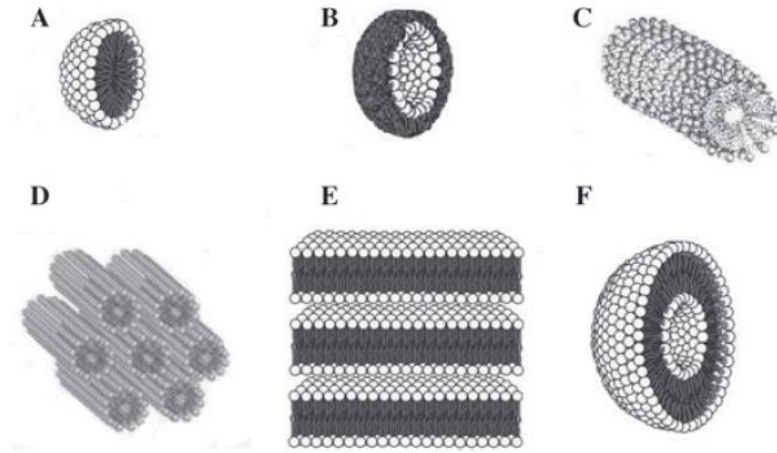
CPE yönteminin en belirgin özellikleri; uygulama basitliği, çevreci bir yöntem oluşu, düşük maliyeti, yüksek zenginleştirme faktörü ve çoğu tayin yöntemine uyumlu olması olarak sıralanabilir.

Yöntem, analit iyonlarının uygun bir ligantla kompleksleştirip bir surfaktan ortamına çekilmesi ve daha sonra bulutlanma noktası sıcaklığı adı verilen bir sıcaklıkta ayrılan surfaktan fazın metal içeriğinin uygun bir yöntemle tayin edilmesine dayanır. Bu amaçla kullanılan surfaktanlar hidrofilik polar baş grupları ve hidrofobik hidrokarbon kuyruk kısmından oluşan, baş kısmının yüküne göre iyonik ya da noniyonik olarak sınıflandırılan büyük organik moleküllerdir. Ampifilik özelliklerinden dolayı hem suda hem de organik çözücülerde çözünebilirler. Polar uçları su molekülleriyle hidrojen bağı yaparken apolar hidrokarbon zincirleri kümelenmeler oluşturma eğilimindedirler. Surfaktanlar sulu çözeltilerde polar kısımları dışarıda hidrokarbon kuyruk kısımları içeride kalacak Şekil 1.7’de görülen misel adı verilen küresel bir yapı oluştururlar.

Oluşan miseller küresel olduğu gibi silindirik, çift tabakalı ve elipsoidik şekilde olabilir. Şekil 1.8’de genel yapıları görülen misellerin boyutları ve şekilleri; surfaktan moleküllerinin geometrisine, surfaktan derişimine, sıcaklık, pH, iyonik şiddet gibi ortam koşullarına bağlıdır.



Şekil 1.7 Misel oluşumunun gösterimi



Şekil 1.8 Farklı yapıda oluşan miseller (Moradi ve Yamini, 2012).

A)Normal misel B) Terz Faz misel C) Silindirik misel D) Ters silindirik misel E) Tabakalı Misel F) Çift tabakalı oyun küresel misel

1.3.8.1 CPE yönteminin uygulanışı

Noniyonik surfaktan çözeltisi bulutlanma noktası (CP) adı verilen kritik bir sıcaklığın üzerinde ısıtıldığında çözelti kendiliğinden iki ayrı faza ayrılır. Fazlardan birincisi hacmi küçük olan surfaktanca zengin faz diğeri ise surfaktan derişiminin hemen hemen kritik misel derişimine (CMC) eşit olduğu büyük hacimdeki sulu fazdır. Bu ayırma işleminin mekanizması surfaktan misellerinin bulutlanma noktası olarak tanımlanan bir sıcaklığa kadar ısıtıldığında çözeltinin bulanıklaşmasına dayanır (Stalikas, 2002). Uygun bir hidrofobik ligant ya da organik bileşikler ile bir araya gelen metal iyonları misellerin hidrofobik kısımlarıyla etkileşim halindedir. Bu sayede bulutlanma noktasında hidrofobik özellikteki metal-ligant bileşiği küçük hacimdeki surfaktanca zengin fazda toplanır. Aslında bütün işlem geleneksel sıvı-sıvı ekstraksiyonuna benzer fakat tek fark burada organik faz, homojen bir çözeltinin daha sonra heterojen bir karışıma çevrilmesiyle sulu fazın içinde üretilir.

Misel oluşumu termodinamik özellikleri kullanılarak da anlaşılabilir. Miseller entropi ve entalpi arasındaki bir denge ile eş anlı olarak oluşabilir. Suda, surfaktan moleküllerinin bir araya gelmesi entropiyi düşürmesine rağmen misel oluşumu için yürütücü kuvvet hidrofobik etkilerdir. Kritik misel derişiminin üstünde surfaktan moleküllerinin bir araya gelmesiyle oluşan entropi artışı su moleküllerinden fazladır. Ayrıca surfaktanların yüklü kısımları arasında olan elektrostatik etkileşimler entalpik özellikleri değiştirir. Misel

oluşumuyla bu termodinamik parametreler noniyonik surfaktanlar için geçerlidir. Sulu çözeltilerdeki misel oluşum entalpisi çok küçük ya da negatif olabilir. Misel oluşumuna götüren temel kuvvet surfaktan moleküllerinin hidrokarbon kuyruk kısımlarındaki hidrofobik etkileşimlerden kaynaklanan entropi değişimidir. Bu etkileşim sayesinde miseller bir araya gelerek daha az enerjili hale gelirler (Ulusoy, 2011).

1.3.8.2 CPE işleminde kullanılan surfaktanlar

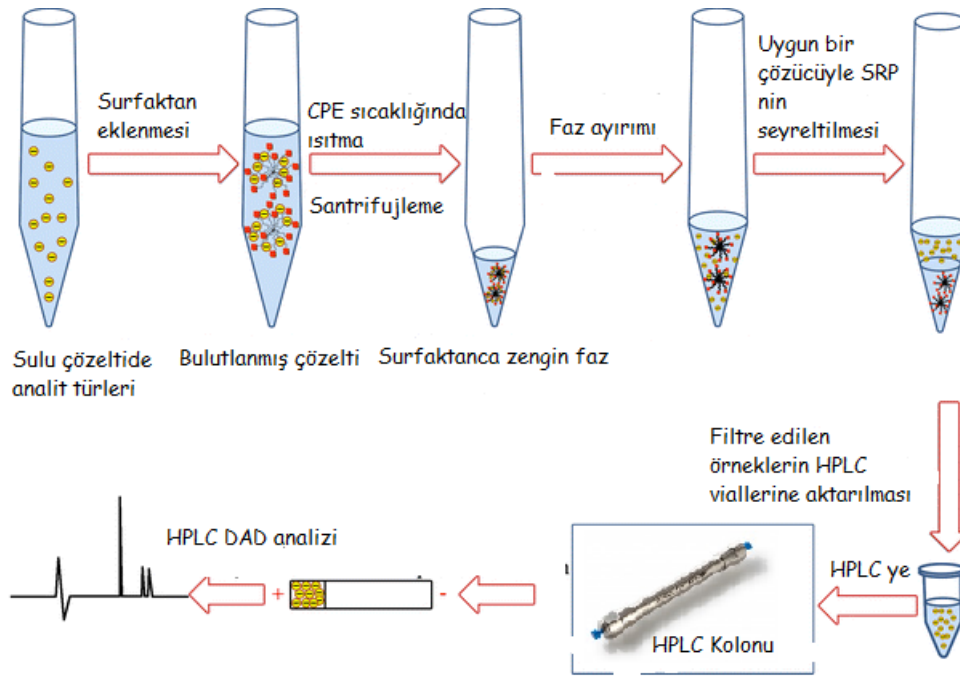
CPE deneylerinde kullanılan surfaktanlar çoğunlukla noniyoniktir. Çünkü iyonik surfaktanların bulutlanma noktası sıcaklıkları genellikle 100 °C nin üstünde ve oldukça yüksektir. Yüksek bulutlanma noktası sıcaklığı hem deneysel şartları zorlaştırmakta hem de oluşan komplekslerinin tekrar bozunmasına yol açmaktadır. Literatürde bu amaçla kullanılan surfaktanlar incelendiğinde en çok Triton X-45, Triton X-100, Triton X-114 ve Ponpe 7.5 surfaktanlarının kullanıldığı görülür. Bu surfaktanların gözlenen bulutlanma noktası sıcaklıkları sırasıyla, 35 °C, 65 °C, 45 °C ve 45 °C dir. Bazı bulutlanma noktası ekstraksiyonu deneylerinde karışık surfaktan sistemleri kullanılır. Kullanılan surfaktan sistemi genellikle bir noniyonik surfaktanın baskın olduğu ortama ikinci bir iyonik surfaktanın eklenmesiyle oluşturulur. Burada ikinci surfaktanın işlevi şöyle açıklanabilir: İlk aşamada oluşan kompleksler her zaman noniyonik karakterde olmaz. Kullanılan ligantın etkin yüküne göre bazı durumlarda iyonik kompleksler oluşur. Örneğin oluşan metal-ligant kompleksi anyonik bir kompleks ise, bu anyonik kompleksin noniyonik surfaktan fazına geçmesini kolaylaştırmak için bir katyonik surfaktan ile iyon çifti kompleksi oluşturulur. Daha sonra bu kompleksin noniyonik surfaktan fazına geçmesi çok daha yüksek verimde ve kolay olur. Burada dikkat edilmesi gereken önemli parametrelerden biri, kullanılacak iyonik surfaktan miktarını sınırlı tutmaktadır. Aksi halde oluşan surfaktan karışımının bulutlanma noktası sıcaklığı noniyonik surfaktana göre daha yüksek olacağından tam bir faz ayrımı gözlenmez. Çünkü iyonik surfaktanların bulutlanma noktası sıcaklıkları noniyonik surfaktanlara göre daha yüksektir.

1.3.9 CPE'nin deneysel aşamaları

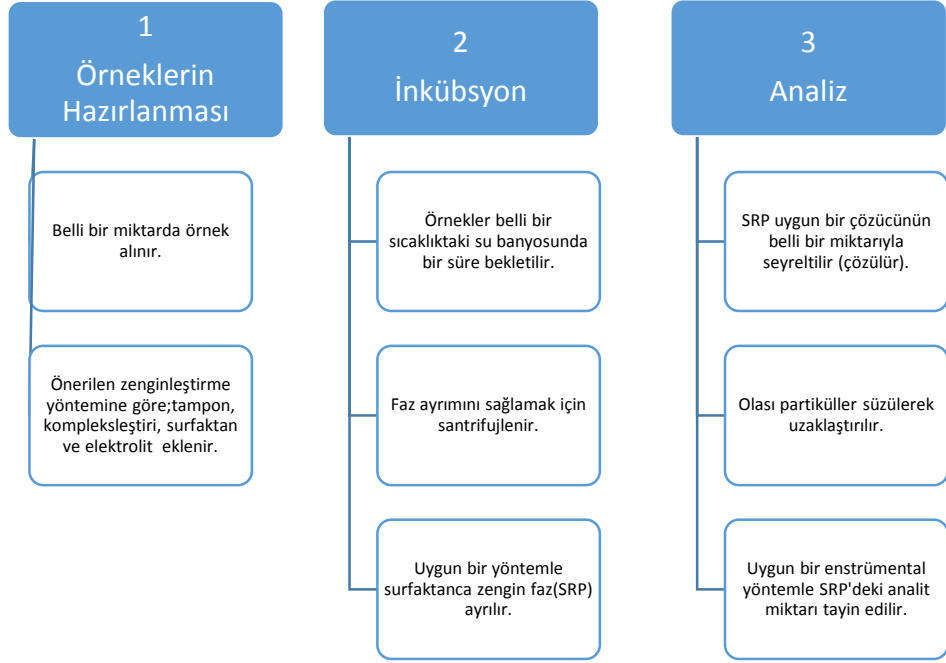
Bulutlanma noktası ekstraksiyonu, kritik misel derişiminin üstündeki noniyonik bir surfaktan çözeltilisinin belli bir sıcaklığa kadar sadece çözeltilinin bulanması, bulutlanma sıcaklığında iki farklı faza ayrılmasıyla gerçekleşir.

Bu faz ayrılması anyonik surfaktanlarda ise yüksek asidik derişimlerde olur (Hinze vd., 1993). Bir bulutlanma noktası ekstraksiyonu deneyinin temel basamakları Şekil 1.9'de görülmektedir.

Ekstraksiyon işleminin ilk basamağında hedef türlerin uygun bir reaktif ile tercihen hidrofobik kompleksleri oluşturulur. Bu aşamada seçilecek reaktifin analite karşı seçici olması ve kararlı kompleks oluşturması önemlidir. Kompleksin yüksek verimde oluşabilmesi ve kontrollü bir biçimde oluşabilmesi için, ortam pH'ı iyi kontrol edilmelidir. Kompleks oluştuktan sonra ortama surfaktan eklenir. Bu aşamada eğer gerekiyorsa ortama ikinci bir surfaktan ve faz ayrımını kolaylaştırmak için elektrolit eklenebilir. Daha sonra bir su banyosu yardımıyla örneklerin sıcaklığı bulutlanma noktası sıcaklığına yükseltilir. Bulutlanma gerçekleştikten sonra, santrifüj yardımıyla fazlar birbirinden ayrılır.



Şekil 1.9 CPE işleminin şematik gösterimi (Wen vd., 2013)



Şekil 1.10 CPE işleminin temel basamakları

Faz ayrımını kolaylaştırmak için örnek çözeltiler bir müddet buzdolabında bekletilir. Soğukta surfaktanların viskozitesi artacağından surfaktanca zengin fazın ayrılması kolaylaşır. Buzdolabından çıkarılan örneklerdeki surfaktanca zengin faz basit dekantasyon işlemi ile ayrılabilir. Elde edilen surfaktanca zengin faz birçok enstrümental yöntemle doğrudan sunmaya uygun değildir ve genelde hacmi de yetersizdir.

Surfaktanca zengin fazın viskozitesini azaltmak ve yeterli hacimde örnek elde etmek amacıyla surfaktanca zengin faz uygun bir çözücü ile seyreltilir. Bu basamaklar topluca Şekil 1.10'da görülebilir.

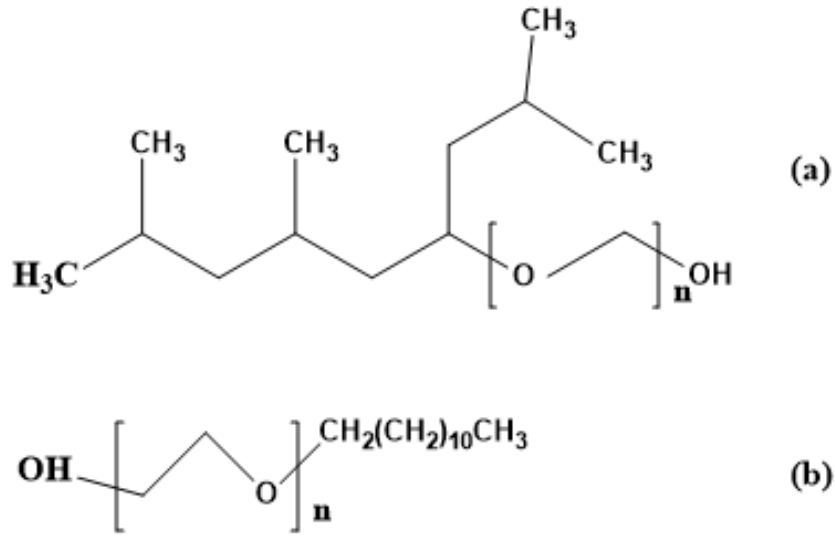
1.3.9.1 Surfaktan seçimi

Literatürde CPE yönteminde çoğunlukla polioksi etilen alkil fenol türevlerinden oluşan Triton ve Ponpe serisi noniyonik surfaktanlar kullanılmıştır. Bu surfaktanların hepsi, yüksek analitik saflıkta elde edilebilir, ucuz, uçucu olmayan, toksik özellik göstermeyen çevre dostu kimyasallardır.

Ekstraksiyon etkinliği, belli bir değere kadar surfaktan derişimi ile artar ve genellikle bu değerde maksimum nicel geri kazanım gözlenir. Surfaktan derişimi hem ekstraksiyon

etkinliğini hem de zenginleştirme faktörünü etkiler. Maksimum zenginleştirme faktörü elde edebilmek için sulu faz/surfaktanca zengin faz hacmi oranı olabildiğince büyük olmalıdır. Bu nedenle surfaktan hacmi minimum değerde tutulmalıdır. Ancak surfaktan derişimi bir eşik değerinden daha az olursa, kiritik misel derişimine ulaşamayacağı için faz ayırımı gözlenmez. Bu nedenle iyi kontrol edilip optimize edilmelidir.

Bu çalışmada kullanılan noniyonik surfaktanlar, Tergitol ve Genapol aşağıda Şekil 1.11’de verilen açık formüllere sahiptirler.



Şekil 1.11 Tergitol (a) ve Genapol (b) surfaktanlarının molekül yapıları

1.3.9.2 pH etkisi

İzlenmesi gereken önemli parametrelerden biri de pH tır. Çünkü hem analitin ligantla kompleksleşme dengesi hem de oluşan kompleksin surfaktan faza geçişi ortam pH'sına doğrudan bağlıdır. Etkin bir ekstraksiyon için kompleksin oluşacağı en uygun pH değerinde çalışılması son derece önemlidir. Ayrıca bazı analitlerin kullanılan tampona göre duyarlı ve seçici olduğu bilinmektedir. Örneğin, hepsinde de pH 8.0 koşulu sağlanmasına rağmen aynı analitin, amonyak, borat ve fosfat tamponlarındaki sinyalleri farklı olabilir.

Ayrıca ligantsız ekstraksiyon deneylerinde de analitin surfaktan faza geçişi doğrudan ortam pH sı ile kontrol edilebilir. Çünkü ortam pH sı doğrudan analitin ve surfaktanların yükünü tayin etmektedir.

1.3.9.3 Yardımcı reaktifler (kompleksleştiriciler, surfaktanlar)

CPE deneylerinde temel varsayımlarından biri analit türlerin surfaktanca zengin faza nicel olarak geçmesidir. Çoğunlukla noniyonik karakterdeki surfaktanca zengin faza analit türlerin etkin bir şekilde çekilebilmesi için benzer kimyasal yapıya sahip olmaları gerekir. CPE deneylerinin en çok uygulama alanı bulduğu eser düzeyde metal analizlerinde, bu işlem metalle kararlı kompleksler oluşturacak ve hidrofobik yapısı sayesinde kolayca surfaktanca zengin faza geçebilecek ligantların ortama katılmasıyla sağlanır.

Bizim çalışmamızda olduğu gibi organik karakterli moleküllerin tayininde ise kimi durumda bu türler kendiliğinden oldukça etkin bir şekilde surfaktanca zengin faza geçebildiği gibi bazen de analit türlerin hidrofobik karakterini daha da artırmak için ortama başka türler de ilave edilebilir. CPE deneylerinde kullanılan yardımcı reaktifler, analit ile kararlı kompleks oluşturabilen analite karşı seçici davranan hidrofobik karakterli kimyasal reaktiflerdir. Seçilen reaktifin analite özgünlüğü arttıkça CPE yöntemi daha duyarlı hale gelir. Uygun yardımcı reaktif seçildikten sonra derişiminin optimize edilmesi gerekir.

Bu çalışmada her iki vitamin türü ile de kararlı kompleksler oluşturularak onların surfaktanca zengin faza geçme verimlerini artıran tür Ag(I) iyonları olmuştur. Deneysel çalışmalar kısmında Ag(I) iyonlarının analitik sinyaller üzerine etkisi daha detaylı olarak tartışılmıştır.

1.3.9.4 Denge sıcaklığı ve süresi

CPE işleminde en iyi zenginleştirme faktörü denge sıcaklığı bulutlanma noktası sıcaklığının üstünde olduğu durumlarda elde edilir. % 1 lik bir surfaktan çözeltisiyle çalışıldığında, sıcaklık 25 °C'den 90 °C'ye artırıldığında surfaktanca zengin fazın hacminin 5 kat azaldığı görülmüştür (Willie vd., 1993). Noniyonik surfaktanlar ile yapılan ekstraksiyon çalışmalarında genellikle 5-15 dk'lık bir süre 40-60 °C'lik bir sıcaklığın yeterli olduğu görülmüştür.

Sıcaklığın kontrol edilmesi son derece önemlidir. Çünkü ortam sıcaklığı yeterince yüksek değilse bulutlanma noktası ve faz ayırımı gözlenmez. Sıcaklık çok fazla olduğunda ise faz ayırımı gözlenmez de bu kadar sıcaklıkta koordinasyon bağlarının kopması nedeniyle analit-ligant kompleksinin bozunma ihtimali vardır.

1.3.9.5 Faz ayırımı kolaylaştırıcı katkı maddeleri

Çoğu durumda ekstraksiyon ortamına bir organik çözücü ya da inorganik tuz eklenmesiyle ekstraksiyon etkinliği artar. Surfaktan ortama etanol eklendiğinde bulutlanma noktası sıcaklığını artırdığı, daha yüksek zenginleştirme faktörü sağladığı bilinmektedir (Ojeda vd., 2011).

Surfaktan ortama inorganik tuzlar eklendiğinde ise, polioksietilen grupların dehidratasyonu yüzünden bulutlanma noktası sıcaklığı düşmektedir. Ayrıca inorganik tuzlar, surfaktan kümeleri ve analit iyonları arasındaki hidrofobik etkileşimleri artırmakta ve bu sayede analitik özellikleri iyileştirmektedir.

1.3.9.6 Fazların ayrılması

Surfaktanca zengin fazı sulu fazdan ayırmak için farklı yöntemler uygulanmıştır. En sık kullanılanı; santrifüjleme işleminden sonra surfaktanca zengin fazın viskozitesini artırmak için deney tüplerinin - 4° C de soğutulup ve surfaktanca zengin fazın jelimsi bir katı halinde ayrılmasıdır. Daha sonra basit bir dekantasyon işlemiyle sulu faz kolayca ayrılır. Surfaktanca zengin fazı soğutmak için, buzdolabında bekletmek, buz banyosu, tuz-buz-aseton karışımı gibi farklı yöntemler kullanılabilir (Nascentes vd., 2003). Az uygulanmasına rağmen diğer bir yol da, tüpleri bir su banyosunda 100 °C ye kadar ısıtıp sulu fazın buharlaştırılması yoludur. Bu sayede zenginleştirme faktörü 4 kat daha artmaktadır (Paleologos vd.,2000). Fakat zaman alıcı oluşu ve uçucu analitlere uygulanamaması kullanımını sınırlamaktadır.

1.3.9.7 Surfaktanca zengin fazın analize hazırlanması

Surfaktanca zengin faz, ayrıldıktan sonra artık analize hazır haldedir. CPE yöntemi pek çok farklı analitik teknikle uyumlu bir şekilde çalışabilir. Tayin işlemine geçmeden önce surfaktanca zengin faz çoğunlukla uygun bir çözücü ile seyreltilir. Yapılan seyreltme işlemi hem örneğin tayin cihazına verilmesini kolaylaştırır hem de homojenliğini sağlar.

Tayinlerin HPLC ile yapılacağı yöntemlerde kullanılacak çözücünün kromatografik sistemin yürütücü fazına uygun olması beklenir. Çalışmamıza vitamin tayinlerinin yapıldığı yürütücü faz bileşimi metanol ve pH:3 fosfat tamponunda olduğu için, bu amaç için çözücü seçerken bu bileşime yakın olmasına dikkat edildi. Surfaktanca zengin fazı çözmek ve dolayısıyla oluşan kompleksi parçalayıp analize hazırlamak için, uygun çözücü seçildikten sonra bu fazın ne kadar çözücü ile seyreltileceği belirlenmelidir. En yüksek zenginleştirme faktörünü elde etmek için bu hacim asgari düzeyde tutulmalıdır. Bu hacmin belirlenmesinde sınırlayıcı faktör kullanılacak tayin yönteminin gerektirdiği minimum örnek hacmidir. Örneğin FAAS için en az 1 mL, HPLC analizleri için mikro viallere konulabilecek kadar yaklaşık 200 µL örnek çözeltisi gereklidir.

1.3.9.8 Tayin basamağı

Surfaktanca zengin faz ayrıldıktan sonra tayin basamağında; UV-VIS absorpsiyon spektroskopisi, alevli atomik absorpsiyon spektroskopisi (FAAS), grafit fırınlı atomik absorpsiyon spektroskopisi (GFAAS), hidrür oluşturmali atomik absorpsiyon spektroskopisi (HGAAS), indüktif eşleşmiş plazma-optik emisyon spektroskopisi (ICP-OES), sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC) gibi yöntemlerden biri ile tayin yapılır.

1.3.10 CPE Yönteminin uygulama alanları

Bulutlanma noktası ekstraksiyonu yöntemi, özellikle 1990'lı yılların sonlarından itibaren eser düzeydeki metal iyonların ayırma ve zenginleştirilmesinde başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Literatürde bu konu ile oldukça çok sayıda çalışma vardır. Ayrıca son zamanlarda CPE yöntemi; vitaminlerin, hormonların, enzimlerin ve proteinlerin ayrılması ve tayini için biyolojik örneklere, organik kirleticilerin ve metallerin ön deriştirilmesi ve tayini için çevresel örneklere uygulanmıştır (Shemirani vd., 2005). Ayrıca CPE yönteminin son zamanlarda önemli bir alanı da organik kirleticilerin ayrılması ve tayinidir (Tan vd., 2012; Deng vd., 2012; Ren vd., 2014).

1.3.11 CPE yönteminin genel değerlendirilmesi

- Bulutlanma noktası ekstraksiyonu yöntemi diğer zenginleştirme yöntemleriyle kıyaslanabilecek ölçüde yüksek verim sağlamaktadır.
- Küçük örnek hacimlerinde (<50 mL) bile yüksek zenginleştirme faktörü elde edilir.
- Toksik kimyasalların kullanımı asgari düzeyde olduğundan çevre dostudur.
- Çok sayıda örnek ve bazı durumlarda da birden fazla analit, eş zamanlı çalışılabilir.
- Kullanılan donanım, her laboratuvarında bulunabilecek basit aletlerdir.
- Klasik sıvı – sıvı ekstraksiyon yönteminde yüksek miktarda toksik organik çözücü kullanılırken, CPE’de birkaç mL surfaktan ilavesi ile çalışılmaktadır.
- CPE yöntemi ile elde edilen surfaktanca zengin fazın analizi birçok farklı teknikle yapılabilir.
- Yöntem basit ve kullanışlıdır.
- CPE yöntemi; aynı zamanda katı örneklerde bulunan organik yapıların özütlenmesini de sağlar. Bu uygulamada ilk olarak katı örnek sulu noniyonik surfaktan içeren çözelti ile muamele edilir. Isıtma ile birlikte organik yapının, katı yüzeyinden desorbsiyonu ve misel ortamı içinde çözünmesi sağlanır. Daha sonra çözelti, katının ayrılması için süzülür. Bunun ardından klasik bulutlanma noktası özütleme yöntemi basamakları uygulanır (Tang vd., 2005).
- Biyolojik ve çevresel numunelere rahatlıkla uygulanabilir oluşu kullanım alanını genişletmektedir.
- CPE sırasında, santrifüjleme yaparken optimum sıcaklık değeri az da olsa düşer ve bu durum ekstraksiyon verimini azaltır. Bu nedenle surfaktan seçimi esnasında bulutlanma noktası değeri göz önünde bulundurulmalı ve muhtemel verim kayıplarını engelleme adına düşük bulutlanma noktası değerine sahip olan surfaktanlar tercih edilmelidir.
- Yüksek sıcaklık değerlerine ulaşılması en iyi şartlar için gerekli olursa bu gibi durumlarda kompleksleştirici maddeler için dayanıklılık sorunu ortaya çıkmaktadır. Bu durumda değişik kompleksleştiriciler için kapsamlı araştırma yapmak gerekebilir (Tang vd., 2005).

- Elde edilen surfaktanca zengin faz oldukça viskoz olduğunda çoğu tayin yöntemi öncesinde seyreltilmesi gerekir. Bu nedenle zenginleştirme faktörü kısmen düşer.

1.4 Çalışmanın Amacı

Tez çalışmasında önerilen yöntemin temel amacı, gerçek örneklerde eser düzeyde bulunan B1 (Tiyamin) ve B2 (Riboflavin) vitamini türleri için uygulaması kolay, duyarlı, seçici, tekrarlanabilir bir zenginleştirme ve tayin yöntemi geliştirmektir. Bu amaçla model çözeltiler yardımıyla başlanacak deneysel çalışmalarda, her iki vitamin türünü de eşanlı zenginleştirip tayin edebilecek bir yöntem geliştirme üzerine durulacaktır.

Literatür taraması yapıldığında, B1 ve B2 vitamini türleri için zenginleştirme sonrası kromotografik analizlerinin yapıldığı bir çalışmaya teze başlandığı an itibariyle rastlanmamıştır. Literatürdeki çalışmalar genellikle vitamin içeriğinin yüksek olduğu gıda örneklerinde doğrudan tayinler üzerine yoğunlaşmaktadır. Ancak pek çok gıda örneği bu cihazların doğrudan tayin edemeyeceği miktarlarda vitamin içermektedir. Bu nedenlerden dolayı gerçek örneklerdeki eser düzeyde vitamin analizleri için yeni yöntemler geliştirmek önemlidir. Ayrıca vitamin türleri gerçek örneklerde pek çok benzer moleküler yapıya sahip bileşikle beraber bulunmaktadır. Bu nedenle geliştirilecek yöntemlerin seçici olması ve düşük düzeylerde tayinlere elverişli olmasının önemi açıktır.

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Kullanılan Reaktifler

Deneyler sırasında kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup, Sigma veya Merck firmalarından satın alındı. Kullanılan tüm çözeltiler ELGA Pure Lab Flex III cihazından elde edilen 18.2 MΩ dirence sahip ultrasaf su ile hazırlandı.

- *pH 1.0-11.0 Fosfat Tamponu*: Her biri 0.05 M derişimde olan H_3PO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 ve Na_3PO_4 çözeltileri kullanılarak yapılan asitlik sabitlerine göre uygun pH aralıklarında istenen tampon çözelti hazırlanıp pH'ları bir pH metre yardımıyla kontrol edildikten sonra ışıktan ve ısıdan korunacak şekilde saklandı. Geliştirilen yöntemde kullanılan pH 9.0 fosfat tampon çözeltisi 8 mL 0.05 M NaH_2PO_4 ve 492 mL 0.05 M Na_2HPO_4 ' ün karıştırılmasıyla hazırlandı.
- *Tiyamin (B1 Vitamini) Stok Çözeltisi, 1000 mg L⁻¹*: Analitik saflıktaki Tiyamin Hidroklorür (Sigma Aldrich)'den 0.100 g tartılarak su ile çözülüp 100 mL'ye tamamlandı ve koyu renkli cam şişeye aktararak, +4 °C'de muhafaza edildi.
- *Riboflavin (B2 Vitamini) Stok Çözeltisi, 1000 mg L⁻¹*: Analitik saflıktaki Riboflavin (Sigma Aldrich) 'den 0.102 g tartıldıktan sonra, 10 mL 0.1 M NaOH'de çözülüp hemen üzerine 50 mL 0.1 M HCl eklendi ve su ile 100 mL'ye tamamlandı. Daha sonra koyu renkli cam şişeye aktararak, +4 °C'de muhafaza edildi.
- *Gümüş Çözeltisi, 1000 ppm (mg L⁻¹)*: Analitik saflıktaki $AgNO_3$ katısından 0.183 g tartıldıktan sonra, su ile çözülüp 100 mL'ye tamamlandı ve koyu renkli şişede saklandı.
- *Setil Piridinyum Klorür (CPC) Çözeltisi, 3.0×10^{-3} M*: Analitik saflıktaki Setil Piridinyum Klorür'den 0.107 g tartıldıktan sonra, sıcak suda çözülüp 100 mL'ye tamamlandı.
- *Sodyum dodesil sulfat (SDS) Çözeltisi, 3.0×10^{-3} M*: Analitik saflıktaki Sodyum Dodesil Sulfat'tan 0.107 g tartıldıktan sonra, sıcak suda çözülüp 100 mL'ye tamamlandı.

- *Setil trimetil Amonyum Bromür (CTAB), 3.0×10^{-3} M*: Analitik saflıktaki Setil trimetil Amonyum Bromür'den 0.107 g tartıldıktan sonra, sıcak suda çözülüp 100 mL'ye tamamlandı.
- *Triton X-114 Çözeltisi, % 20'lik (a/h)*: 20.0 g analitik saflıktaki Triton X-114, ılık suda kuvvetlice karıştırılarak çözüldükten sonra hacmi 100 mL ye tamamlandı.
- *Triton X-100 Çözeltisi, % 20'lik (a/h)*: 20.0 g analitik saflıktaki Triton X-100, ılık suda kuvvetlice karıştırılarak çözüldükten sonra hacmi 100 mL ye tamamlandı.
- *Triton X-45 Çözeltisi, % 20'lik (a/h)*: 20.0 g analitik saflıktaki Triton X-45, soğuk suda kuvvetlice karıştırılarak çözüldükten sonra hacmi 100 mL ye tamamlandı.
- *Tergitol Çözeltisi, % 20'lik (a/h)*: 20.0 g analitik saflıktaki Tergitol, suda kuvvetlice karıştırılarak çözüldükten sonra hacmi 100 mL ye tamamlandı.
- *Genipol Çözeltisi, % 20'lik (a/h)*: 20.0 g analitik saflıktaki Genapol, suda kuvvetlice karıştırılarak çözüldükten sonra hacmi 100 mL ye tamamlandı.
- *Ponpe 7.5 Çözeltisi, % 20'lik (h/h)*: 20.0 g analitik saflıktaki Ponpe 7.5, ılık suda kuvvetlice karıştırılarak çözüldükten sonra hacmi 100 mL ye tamamlandı.
- *KNO₃ Çözeltisi, %20'lik (a/h)*: Analitik saflıktaki 20.0 g KNO₃ çözüldükten sonra 100 mL'ye tamamlandı.
- Girişim çalışmalarında kullanılan 1000 mg L⁻¹'lik standart katyon, anyon ve vitamin çözeltileri analitik saflıktaki maddelerden uygun miktarlarda alınarak hazırlandı.

2.2 Kullanılan Cihazlar

- Tüm Kromatografik ölçümlerde Shimadzu (Prominence) HPLC (Kyoto, Japan) cihazı kullanıldı. Kullanılan HPLC cihazı; LC 20 AD kuaterner pompa, SPD-M20 A PDA dedektör, DGU-20A vakum gaz giderici,ve CTO-10 AS VP kolon firmı donanımlarına sahiptir. Tüm ayırma ve tayinler ters faz C18 kolonu (Inertsil ODS-3, 250 mm × 4.6 mm × 5 µm) üzerinde yapıldı. Kromotogramların değerlendirmesi LC Solution 2.0 yazılımı üzerinden yapıldı.
- pH metre (pH-2005, JP Selecta, Barcelona, Spain)
- UV-VIS Spektrofometre; (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan)

- Santifuj (Universal-320, Hettich Centrifuges, DJB Labcare Ltd., Newport Pagnell, Buckinghamshire, England).
- Su Banyosu (EPC 4420, Termal, Istanbul, Turkey)
- Vortex (Jeotech, Korea)
- Ultrasonik Su Banyosu
- Mikrodalga Çözünürleştirme Sistemi (CEM, Mars X6)

2.3 Tiyamin ve Riboflavin İçin Doğrudan Tayin Koşulları

Zenginleştirme deneylerine geçmeden önce her iki vitamin türü için HPLC ile doğrudan tayin parametreleri optimize edildi. Bu amaçla literatür bilgilerinden de yola çıkarak ODS-3 C-18 kolonu sabit faz olarak seçildi ve iki vitaminin eş anlı tayinlerini mümkün kılacak ideal yürütücü faz bileşimi araştırılmıştır.

Metanol, etanol ve asetonitril gibi organik karakterli yürütücü fazların farklı pH lardaki tamponları içeren sulu çözeltileri ile farklı yürütücü faz bileşimleri izokiritik ve gradient elüsyon modlarında birçok deneme yapıldı. Her iki vitamin için de ayrı ayrı belirgin pikler elde edilinceye kadar deneylere devam edilmiştir.

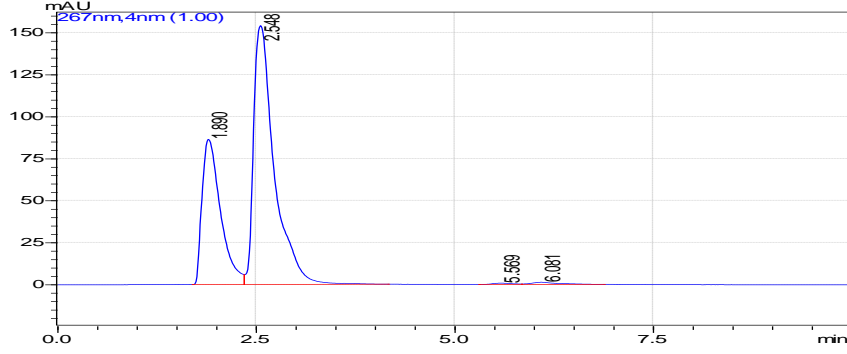
Yapılan deneyler sonucunda en ideal yürütme koşulları metanol ve pH 3.0 fosfat tamponu ile edildi. Ancak her iki türün birbirinden ayrılması başarılmış olsa da yine de etkin bir ayırma sağlanamadı. Şekil 2.1’de % 50 metanol; pH.3.0 fosfat tamponu ile elde edilen kromatogram görülmektedir.

Daha sonra ayırma koşullarını daha da iyileştirme amacıyla literatür bilgilerinden ışığında yürütücü faza iyon çifti ajanları katılarak çeşitli denemeler yapıldı. Bu amaçla kullanılan kimyasallar genelde katyonik ve anyonik formlarda bulunabilen iyonik surfaktanlardır.

Hazırlanan pH 3.0 tampon çözeltisinin içerisine 3 farklı derişimde (1×10^{-3} , 2×10^{-3} ve 3×10^{-3}) sodyum hekzan sülfonat, tetra etil amonyum bromür, sodyum dodesil sulfat ve setil pridinyum klorür eklenerek daha önceden optimize edilmiş koşullar altında her iki vitamini de eşit derişimde içeren standart çözeltiler yürütüldü. Yapılan çalışmada en ideal pik ayrımı ve analit sinyallerinin 1×10^{-3} M sodyum hekzan sülfonat ile elde edildiği görüldü.

Optimizasyon sonrasında elde edilen ideal HPLC çalışma koşulları Çizelge 2.1 de verilmiştir. Ayrıca doğrudan tayin yöntemi ile ilgili koşullar belirlendikten sonra her iki

vitamini de içeren 1-50 ppm arası standartlar ile kalibrasyon grafiği hazırlandı. Kalibrasyon parametreleri Çizelge 2.2’de; standartların yürütülmesi ile elde edilen ve her iki vitamininde birbirinden ayrılmış ideal piklerini gösteren kromatogram da Şekil 2.2’de görülmektedir.



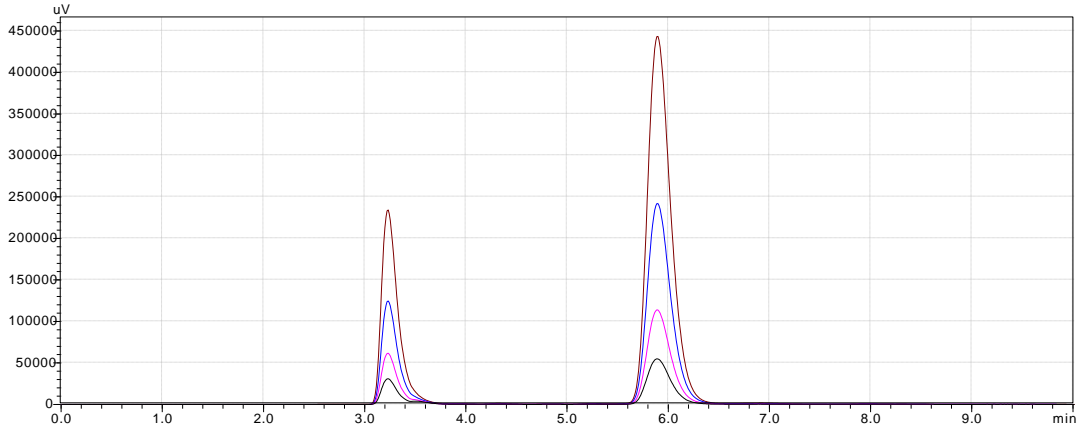
Şekil 2.1 % 50 Metanol/pH 3.0 P koşullarında elde edilen ilk kromatogram

Çizelge 2.1 HPLC çalışma koşulları

Parametre	Değer
HPLC Modu	İzokritik
Eluent	0.001 M Na Hekzan Sulfonat içeren pH:3.0 Fosfat tamponu ve Metanolün (1:1) oranında karışımı
Eluent Akış Hızı	0.8 mL/dk
Yürütme Süresi	12 dk
Kolon	C18- Inertsil ODS-3 (250 mm×4.6×5.0 µm)
Kolon Sıcaklığı	30 °C
Enjeksiyon Hacmi	30 µL
Sistem Basıncı (yaklaşık)	130 bar

Çizelge 2.2 HPLC ile doğrudan tayin sonuçları

Parametre	Tiyamin	Riboflavin
Alıkonma Süresi, dk	3.54	6.55
Maksimum Soğurum λ 'ları	244 nm	267 nm
Kalibrasyon Aralığı	1-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Tayin Sınırları	0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.30 $\mu\text{g mL}^{-1}$
% BSS	1.56	2.14
r^2	0.9995	0.9924
Tekrar sayısı	3	3

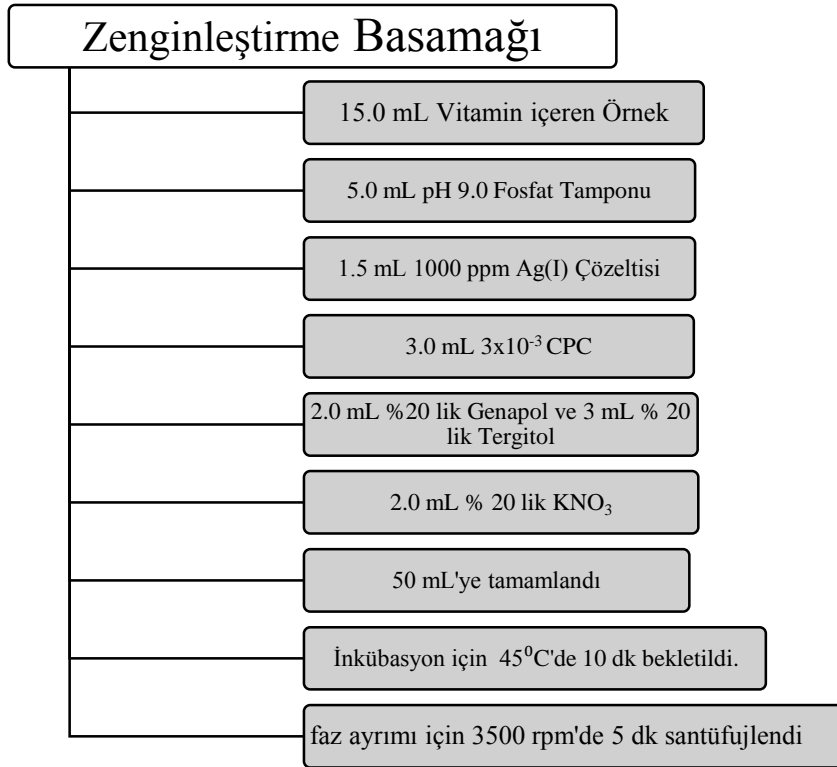


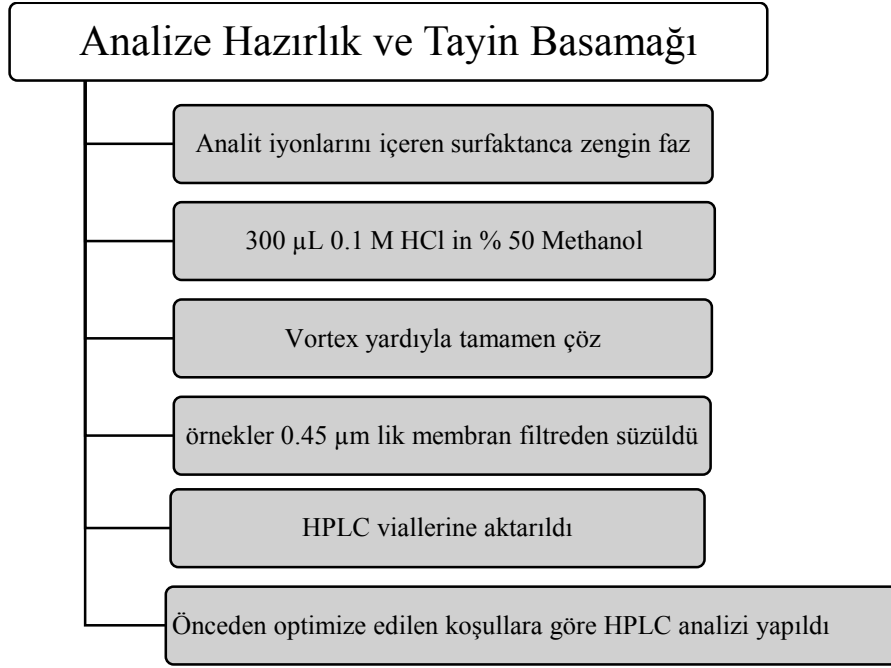
Şekil 2.2 Doğrudan Tiyamin ve Riboflavin tayinleri için elde edilen kromatogram

2.4 Önerilen Yöntem

Bulutlanma noktası ekstraksiyonu temelli zenginleştirme deneylerinde, pH, analit derişimleri, kompleksleştirici ve surfaktan miktarı, sıcaklık ve ekstraksiyon süresi gibi parametreler optimize edilmiştir. Optimum koşullar altında; 4.0 - 400 ng mL⁻¹ arasında B1 ve 1.0-500 ng mL⁻¹ B2 vitaminleri içeren çözeltilere, 5.0 mL pH: 9.00 fosfat tamponu, 1.5 mL 1000 mg L⁻¹ Ag(I) çözeltisi, 3.0 mL 3.0×10⁻³ M CPC, 2.0 mL % 20 (a/h) KNO₃, 2 mL % 20'lik Tergitol ve 3 mL %20 lik Genapol surfaktanları eklendikten sonra karıştırılıp su ile 50.0 mL ye tamamlanmış ve su banyosunda inkübasyona alınmıştır.

Çözeltiler, 45 °C’ de termostatik su banyosunda 10 dakika bekletildikten sonra, 4000 rpm’de 5 dk santrifüjlenerek surfaktanca zengin faz ve sulu faz birbirinden ayrılmıştır. Surfaktanca zengin faz ile sulu fazın ayrılmasını kolaylaştırmak için örnek tüpleri 20 dk buzdolabında bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda yoğunluğu daha fazla olan surfaktan faz tüpün alt kısmında toplanmış, üst kısımda yer alan sulu faz ise dekantasyon ve bir enjektör yardımıyla ayrılmıştır. Surfaktanca zengin faz, 300 µL 0.1 M HCl in % 50 metanoldeki çözeltisiyle seyreltilerek bir vorteks yardımıyla tamamen homojenize edilmiştir. Daha sonra 0.45 µm lik enjektör ucu filtre ile süzülen örnekler HPLC viallerine aktarıldı. Zenginleştirilmiş örneklerin B1 ve B2 vitamini içerikleri HPLC cihazı ile tayin edildi. Önerilen Yöntemin temel basamakları Şekil 2.3’de görülmektedir.





Şekil 2.3 Önerilen yöntemin şematik gösterimi

2.5 Gıda Örneklerinin Analize Hazırlanması

Gıda örneklerinin ve sertifikalı referans vitamin örneklerinin analize hazırlanmasında kullanılan yöntem için literatür bilgisinden yararlanıldı. Rokoyya ve arkadaşları tarafından gıda örneklerinde multi vitamin analizi için uygulanan yöntem küçük düzenlemelerle kullanıldı (Rokoyya, 2014).

2 gram katı ya da 10 mL sıvı örnek üzerine 25 mL 0.05 M H₂SO₄ eklendi ve örnekler 90 °C de 30 dk bekletildi. Daha sonra soğutulan örneklere 2.5 M sodyum asetat ekleyerek her bir örneğin pH'sı 4.0-4.5 civarına ayarlandı. Bir manyetik karıştırıcı üzerinde 45-50 °C hem ısıtılıp hemde karıştırılan örneklere 50 mg *clara-diastaze* enzimi eklendi ve 2 saat bu şekilde karıştırıldı. Daha sonra örnekler 0.45 µm lik bir membran filtradan süzüldü. Süzütünün hacmi HPLC sisteminde kullanılan yürütücü faz ile 50 mL ye tamamlandı. Elde edilen örneklere geliştirilen CPE-HPLC deneyi uygulandı.

2.6 Sertifikalı Vitamin Örnekleri

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu teyit etmek amacıyla 3 farklı sertifikalı referans malzeme (SRM) kullanıldı. Seçilen SRM örnekleri, NIST, BCR ve ERM referans firmalarından temin edilen sırasıyla multivitamin ilaç tableti, kurutulmuş sebze örneği ve süt tozu örneğidir. Çalışılan vitaminlere uygun olması açısından bu SRM ler tercih edildi. Sertifikalı örneklerin içerikleri Çizelge 2.3, 2.4 ve 2.5'de verilmiştir.

Çizelge 2.3 NIST 3280 Multivitamin tablet sertifikalı değerler

Vitamin	Miktar	Tür	Miktar
Folik Asit	394±22 µg/g	B	0.141±0.007 mg/g
Biyotin	23.4±3.2 µg/g	Ca	110.7±5.3 mg/g
Ergocalciferol	9.13±0.71 µg/g	Cl	53.0±2.3 mg/g
Phylloquinone	22.8±2.2 µg/g	Cr	0.0937±0.0027 mg/g
Trans β- carotene	420±100 µg/g	Cu	1.40±0.17 mg/g
Toplam β- carotene	514±87 µg/g	I	0.1327±0.0066 mg/g
α-Tocopherol	21.4±3.5 mg/g	Fe	12.35±0.95 mg/g
Ascorbic Acid	42.7±3.7 mg/g	Mg	67.8±4.0 mg/g
<u>Thiamine Hydrochloride</u>	<u>1.06±0.12 mg/g</u>	Mn	1.44±0.11 mg/g
<u>Riboflavine</u>	<u>1.32±0.17 mg/g</u>	Mo	0.0707±0.0045 mg/g
Niacinamide	14.10±0.23 mg/g	P	75.7±3.2 mg/g
Pantothenic Acid	7.30±0.96 mg/g	K	53.11±7.0 mg/g
Pyrodoxine Hydrochloride	1.81±0.17 mg/g	Zn	10.15±0.81 mg/g

Çizelge 2.4 ERM-BD6000 Whole milk powder sertifikalı değerler

Tür	Miktar (mg/Kg)
<u>B1 (Thiamin)</u>	<u>4.50±0.60</u>
<u>B2 (Riboflavin)</u>	<u>16.7±1.4</u>
A(all-trans-retinol)	3.8±0.6
B12	0.32±0.07
C (Total Acorbate)	74±11
E (Tocopherol)	86±15

Çizelge 2.5 BCR-485 Mixed vegetables sertifikalı değerler

Tür	Miktar (mg/Kg)
<u>B1 (Thiamin)</u>	<u>3.07±0.34</u>
<u>B2 (Riboflavin)</u>	<u>4.20±0.94</u>
B6 (Total Pyrodoxine)	4.8±0.8
B12	10.40±1.25
C (Total Acorbate)	349.0±18.3
D3 (Cholacalciferol)	251.0±10.6
E (Tocopherol)	325.0±16.5
Folat (Total)	3.15±0.28
Niacine	252.0±8.7
Trans α - carotene	10.5±0.6
Trans β - carotene	23.7±1.45
Total α - carotene	9.8±0.7
Total β - carotene	25.6±1.2
Lutein	12.5±0.8

DENEYSEL ÇALIŞMALAR ve TARTIŞMA

3.1 Deneysel Çalışmaların Temel Yaklaşımı

Bu çalışmada; gerçek örneklerin çoğunda eser düzeyde bulunan ve hem miktarlarının azlığı hem de matriks bileşenlerin etkisiyle tayinleri zorlaşan iki temel vitamin türü olan Tiyamin ve Riboflavin türlerinin tayini için, bulutlanma noktası ekstraksiyonu temelli bir zenginleştirmeyi takiben HPLC-DAD sistemi ile bu türlerin tayinlerini yapabilecek bir yöntem geliştirilmiştir.

Deneysel çalışmalara başlarken ilgili vitamin türlerinin surfaktanca zengin faza nicel olarak geçişini sağlayacak çok sayıda ön denemeler yapılmıştır. Bu amaçla deneysel çalışmalara öncelikle tiyamin ve riboflavin türlerinin doğrudan zenginleştirilebilmesi için klasik bulutlanma noktası ekstraksiyonu deneyleri ile başlanmıştır.

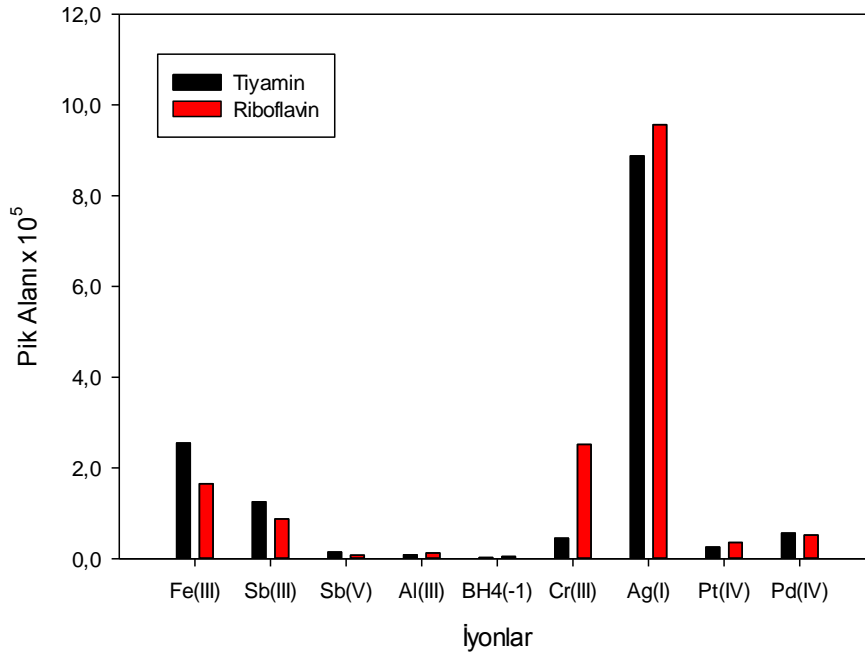
Temel bilgiler kısmında da detaylı olarak anlatıldığı gibi bulutlanma noktası ekstraksiyonu deneylerinde temel hedef öncelikle analit türlerinin noniyonik surfaktan faza olabildiğince yüksek verimle geçişini sağlayacak ideal deneysel koşulları oluşturmaktır. Bu tarz deneylerde kullanılan surfaktanların genelde hidrofobik karakterde oluşu bu faza çekilmek istenen türlerin de bu karakterde olmasını gerektirir.

Tiyamin ve riboflavin türleri ortam pH'sına bağlı olarak yüklü ve yüksüz olabilmektedirler. Hem farklı pH'larda hemde farklı surfaktan çözeltileri ile birçok ön deneme yapılarak deneysel çalışmalar için başlangıç olabilecek bir nokta belirlenmeye çalışılmıştır.

Klasik yaklaşımla yapılan CPE deneylerinde belli derişimlerde vitaminleri içeren çözeltilerin farklı pH larda farklı surfaktan fazlara geçişleri izlenmiş, ancak yapılan çalışmalarda tatminkâr anlamda yüksek zenginleştirme sağlanmadığı gibi elde edilen sinyaller de oldukça zayıf bulunmuştur.

Elde edilen ilk sonuçların olumsuz oluşu nedeniyle deneysel basamakları yeniden gözden geçirerek farklı arayışlara yönelinmiştir. Çalışma pH'sına bağlı olarak ilgili vitamin türlerinin ortamda iyonik formlarının bulunabileceği ve bundan dolayı bu fazların noniyonik surfaktan faza geçişlerinin az olduğu varsayımından yola çıkılarak, bu türlerle yüksüz kompleksler oluşturabilecek türlerin bulunduğu ortamlarda deneysel çalışmalar yoğunlaştırıldı.

Her iki vitaminin de kimyasal yapılarında metallallerle bağlanmaya uygun fonksiyonel gruplar bulunmaktadır. Bu nedenle bir dizi metal katyonu ile çeşitli deneyler yapıldı. Belli derişimlerde tiyamin ve riboflavin içeren ortama eşit miktarda metaller eklendi ve zenginleştirme sonrası elde edilen sinyaller grafiğe geçirildi. Şekilde 3.1’de görüldüğü gibi en yüksek sinyaller her iki vitamin türü içinde Ag(I) iyonu varlığında elde edildi. Tiyamin ve riboflavinin moleküler yapıları dikkatlice incelendiğinde bu iyileşmenin nedeni de daha iyi anlaşılacaktır. Ag(I) iyonu yük/yarıçap oranının düşük olması nedeniyle yumuşak asit gibi davranıp riboflavini azot ve oksijen grupları üzerinden; sülfür grupları ile oluşturduğu kararlı kompleksler nedeniyle de tiyamine kükürt üzerinden bağlanarak kararlı ve yüksüz kompleksler oluşturmakta ve bu komplekslerin surfaktanca zengin faza geçişleri artmaktadır. Bu nedenle bundan sonraki çalışmalara ortamda gümüş iyonunun bulunduğu deneylerle devam edildi.



Şekil 3.1 B1 ve B2 vitaminlerinin zenginleştirilmesine çeşitli iyonların etkileri

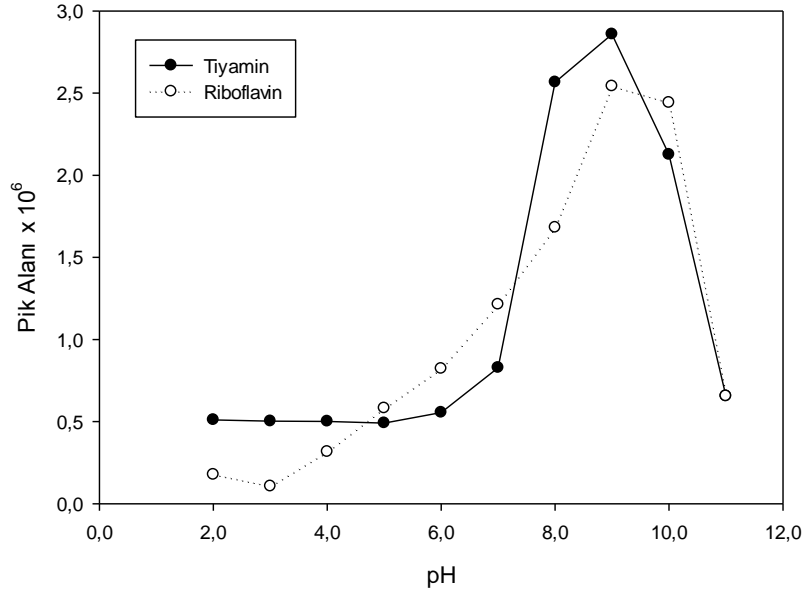
3.2 Geliştirilen Yöntemin Optimizasyonu

3.2.1 pH etkisi

Ortam pH'sı, hem analitler ve diğer türler arasındaki tepkimeler hem de sonraki basamakta yapılacak olan zenginleştirme işlemini etkilediğinden çok önemlidir. Ortamın pH değeri asidik bölgeye kaydıkça ortamdaki pozitif yüklü iyon miktarı artar ve bu durum surfaktanın hidrofilik baş kısmının çözelti ortamı içerisinde aktivitesini düşürür. Ancak bu etki surfaktanın türüne göre değişim göstermektedir.

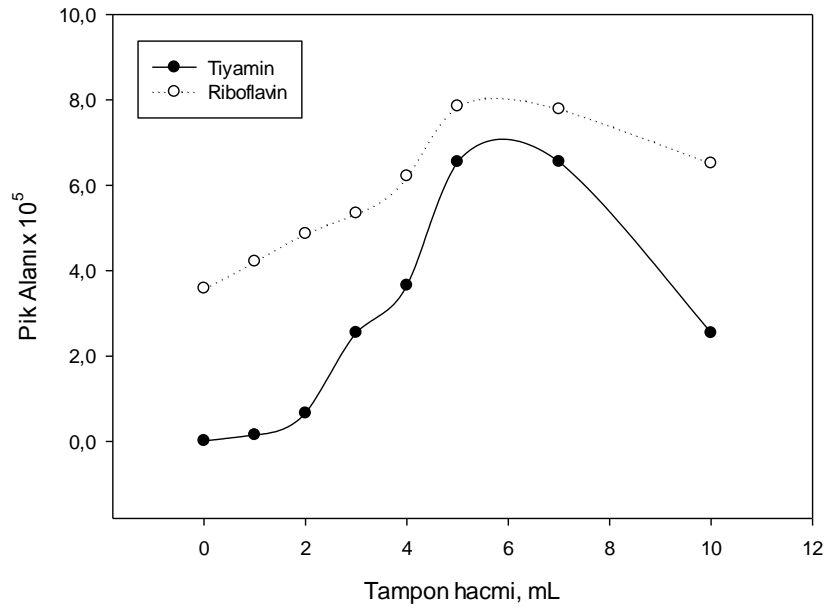
Bu amaçla, noniyonik surfaktan olarak kullanılan Triton X-100 varlığından, pH değeri 1-11 arasında olan bir dizi örnek çözeltiye zenginleştirme işlemi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.2'de görülmektedir. Buna göre zenginleştirme işlemi için en uygun pH değerinin pH: 9.0 olduğu görülmektedir. pH çalışması yapılırken, farklı tampon sistemleri ile denemeler yapılmıştır. Kullanılan, borat, fosfat ve amonyak tamponlarından en uygun sinyalin fosfat tamponu ile elde edildiği görülmüştür. Bu nedenle daha sonraki çalışmalarda pH: 9.00 fosfat tampon sistemi kullanılmıştır.

Çalışma pH sı ve tampon seçildikten sonra, kullanılacak tampon çözelti hacmi için optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bu amaçla 50.0 mL final hacimdeki optimum pH: 9.00 fosfat tamponu hacmi 0-10.0 mL arasında taranmıştır. Şekil 3.3'de görüldüğü en yüksek sinyal değeri 5.0 mL hacmi ile elde edilmiştir.



Şekil 3.2 Önerilen yöntem üzerine pH etkisi

[DeneySEL koşullar: 200 µg L⁻¹ B1 ve B2 vitamini, 2.0 mL fosfat tamponu, 1.0 mL 1000 mg L⁻¹ Ag(I) ve 2 mL % 20'lik Triton X-100]

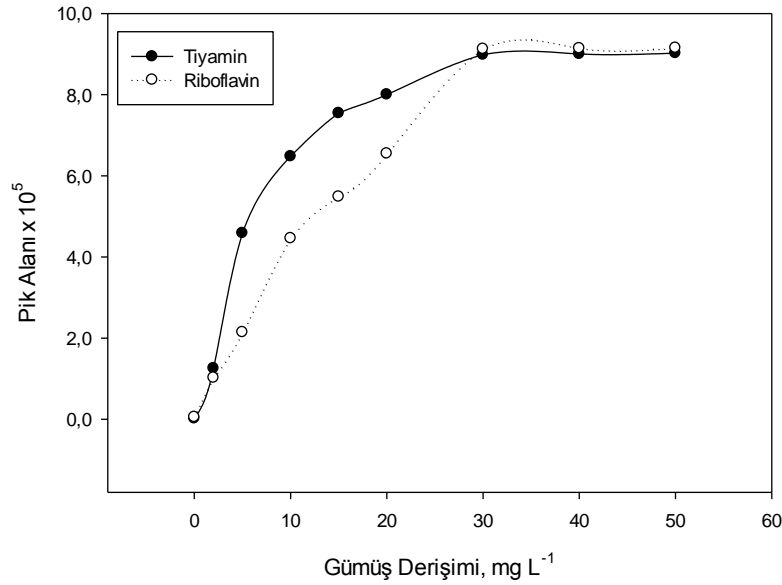


Şekil 3.3 Önerilen yöntem üzerine tampon çözelti hacminin etkisi

[DeneySEL koşullar: 100 µg L⁻¹ B1 ve B2 vitamini, pH 9 fosfat tamponu, 1.0 mL 1000 mg L⁻¹ Ag(I) ve 2 mL % 20'lik Triton X-100]

3.2.2 Kompleksleştirici derişiminin etkisi

Kesim 3.1’de anlatıldığı gibi aslında vitamin türlerinin surfaktanca zengin faza doğrudan geçişi de olmakta ancak bu geçiş az olduğundan zayıf sinyallere ve dolayısıyla düşük zenginleştirme faktörüne neden olmaktadır. Bu durumu iyileştirmek için farklı metal iyonları ile denemeler yapılmış ve en iyi sinyaller Ag(I) iyonu ile elde edilmişti (Şekil 3.1). İyi sinyal alınabilen kompleksleştirici türü olarak Ag(I) belirledikten sonra bunun derişimi optimize edilmiştir. Bu amaçla zenginleştirme işlemleri son hacimde 0-50 mg L⁻¹ gümüş içeren ortamlarda tekrarlanmış ve Şekil 3.4’de verilen sonuçlar elde edilmiştir. 50 mg L⁻¹ nün üzerinde ortama Ag(I) ilave edilse bile artık ölçülen vitamin derişimlerinde herhangi bir artış gözlenmemektedir. Bu nedenle ideal olarak bundan sonraki çalışmalarda son hacimde 30 mg L⁻¹ Ag(I) olacak şekilde deneylere devam edildi.



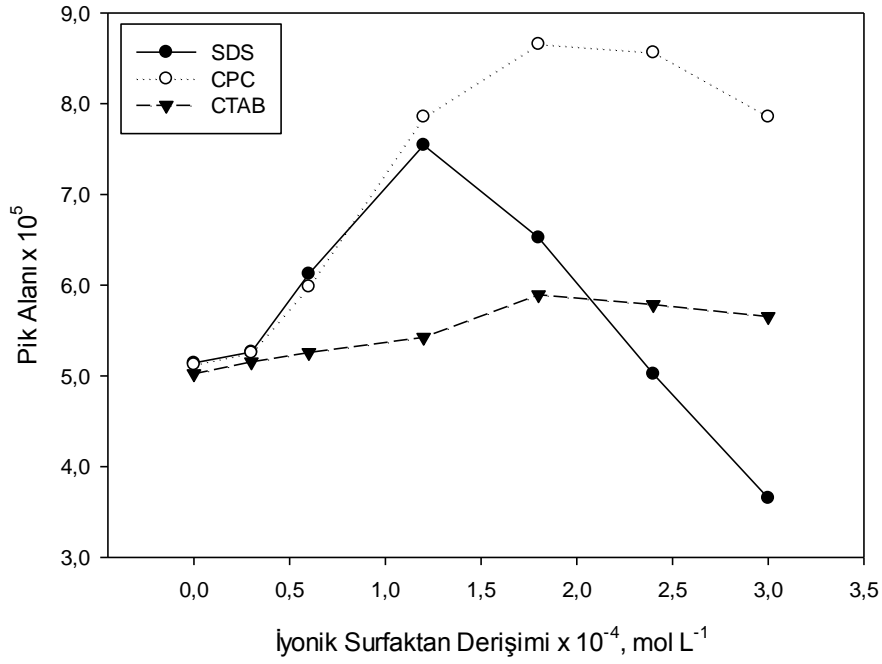
Şekil 3.4 Önerilen Yöntem üzerine gümüş iyonları derişiminin etkisi

[Deneyel koşullar: 100 µg L⁻¹ B1 ve B2 vitamini, 5.0 mL pH 9 fosfat tamponu,

2 mL % 20’lik Triton X-100]

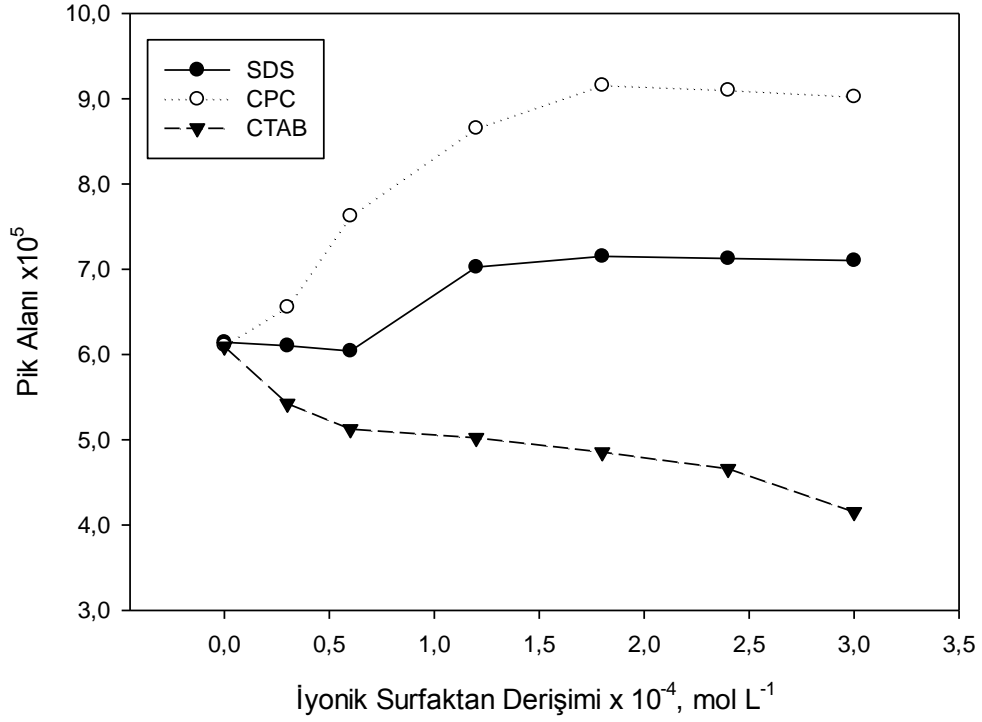
3.2.3 İyonik surfaktan derişiminin etkisi

Bulutlanma noktası ekstraksiyonu deneylerinde, ortamda ikinci bir surfaktan kullanımının ayırma verimini artırdığı literatürde bildirilmiştir. CPE deneylerinde kullanılan surfaktanların büyük bir çoğunluğu Triton X-100, Triton X-114, Triton X-45 ve Ponpe 7.5 gibi noniyonik surfaktanlardır. Ortamda bulunabilecek iyonik bir surfaktan, oluşan kompleksin yüküne bağlı olarak ikincil bir ligant gibi davranır. Eğer ortamdaki türler anyonik ise ortamda bulunan katyonik surfaktan ile iyon çifti kompleksi oluşturduktan sonra yüksüz olarak noniyonik surfaktan fazına geçer. Katyonik türler varlığında ise aynı şekilde yük dağılımını dengeleyerek noniyonik surfaktan faza geçme verimini artırır. Tiyamin ve riboflavin türlerinin surfaktanca zengin faza geçiş verimini artırmak amacıyla iki katyonik bir anyonik surfaktanın etkileri incelendi.



Şekil 3.5 Tiyaminin zenginleştirme sinyaline iyonik surfaktan derişimi etkisi

[Deneysel koşullar: 100 µg L⁻¹ B1 ve B2 vitamini, 5.0 mL pH 9.0 tamponu, 1.5 mL 1000 mg L⁻¹ Ag(I) ve 2 mL % 20'lik Triton X-100]



Şekil 3.6 Riboflavinin zenginleştirme sinyaline iyonik surfaktan derişimi etkisi

[Deneysel koşullar: 100 µg L⁻¹ B1 ve B2 vitamini, 5.0 mL pH 9 fosfat tamponu, 1.5 mL 1000 mg L⁻¹ Ag(I) ve 2 mL % 20'lik Triton X-100]

Cethyl pyridinum Chloride (CPC), cethyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) ve sodium dodecyl sulfate (SDS) ile yapılan deneylerde en iyi sinyallerin her iki vitamin için de CPC surfaktanı ile elde edildiği gözlenmiştir. Ayrıca Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'de incelendiğinde yine her iki tür için ideal CPC derişiminin 1.8×10^{-4} M olduğu görülebilir. Bu nedenle bundan sonraki deneylerde ortama iyonik surfaktan olarak CPC eklenmiş ve ideal derişiminin son hacimde 1.8×10^{-4} M olarak sağlanması için 3.0×10^{-3} M lık stok çözeltisinden tüplere 3.0 mL eklenmesi gerektiği anlaşılmıştır

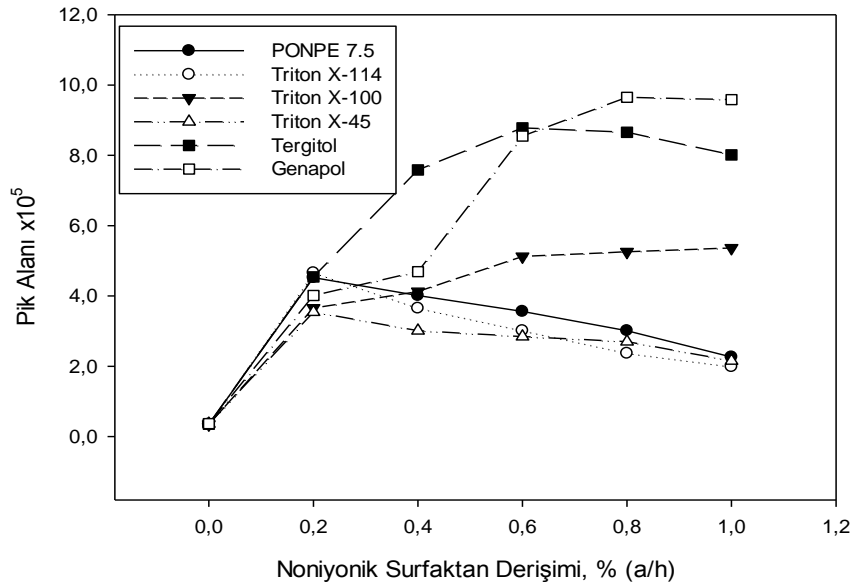
3.2.4 Noniyonik surfaktan derişiminin etkisi

Surfaktan derişimi, bulutlanma noktası ekstraksiyonu verimini etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Çünkü surfaktan derişiminin küçük olması durumunda misel oluşumu yeterince gerçekleşmez veya oluşan kompleksin tamamı surfaktan fazına geçemez, dolayısıyla ekstraksiyon veriminde düşme gözlenir. Surfaktan derişiminin yüksek olması durumunda ise surfaktanca zengin fazın hacmi artacağından derişirme

faktörü düşer. Yapılacak ayırma işlemleri için en uygun surfaktan derişimi dar bir aralıkta gözlemlenir.

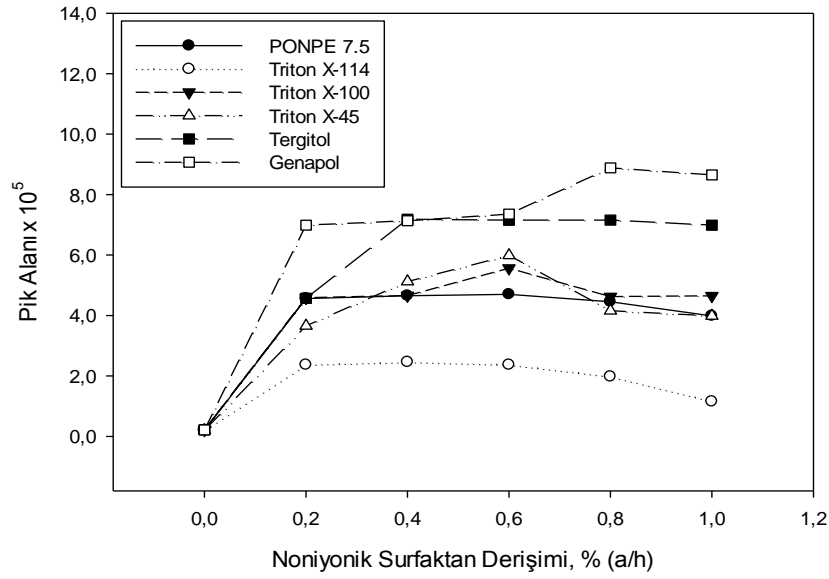
Kesim 1.3’de anlatıldığı gibi önerilen zenginleştirme işleminin en iyi koşullarda olabilmesi için birçok noniyonik surfaktan ile deneyler tekralanmıştır. Bu amaçla kullanılan noniyonik surfaktanlar; Triton X-100, Triton X-114, Triton X-45, Ponpe 7.5, Tergitol ve Genapol dür. Görüldüğü gibi literatürdeki CPE deneylerinde kullanılan surfaktanların büyük çoğunluğu denenmiştir. Her bir surfaktanın % 20’lik (a/h) çözeltileri dikkatlice hazırlandı. Çözeltilerin hazırlanmasında, (h/h) yüzdesi değil (a/h) yüzdesi tercih edildi. Çünkü oldukça viskoz olan surfaktanlarda çözelti hazırlarken her seferinde tekrarlanabilir hacimler almak oldukça güçtür. Bu nedenle tartım işlemleri ile daha tekrarlanır ve doğru çözelti hazırlama işlemleri yapılmıştır.

Belli miktarda tiyamin ve riboflavin içeren çözeltiler %20 (a/h) derişimdeki surfaktan çözeltilerinden eklenerek son derişimi % (a/h) 0-0.2-0.4-0.6-0.8-1.0 olacak şekilde seri deneyler hazırlanıp zenginleştirme işlemine tabi tutulmuştur. Tiyamin ve riboflavin için elde edilen sonuçları ayrı ayrı Şekil 3.7 ve Şekil 3.8’de görmek mümkündür.



Şekil 3.7 Tiyamin sinyallerine noniyonik surfaktan derişimi etkisi

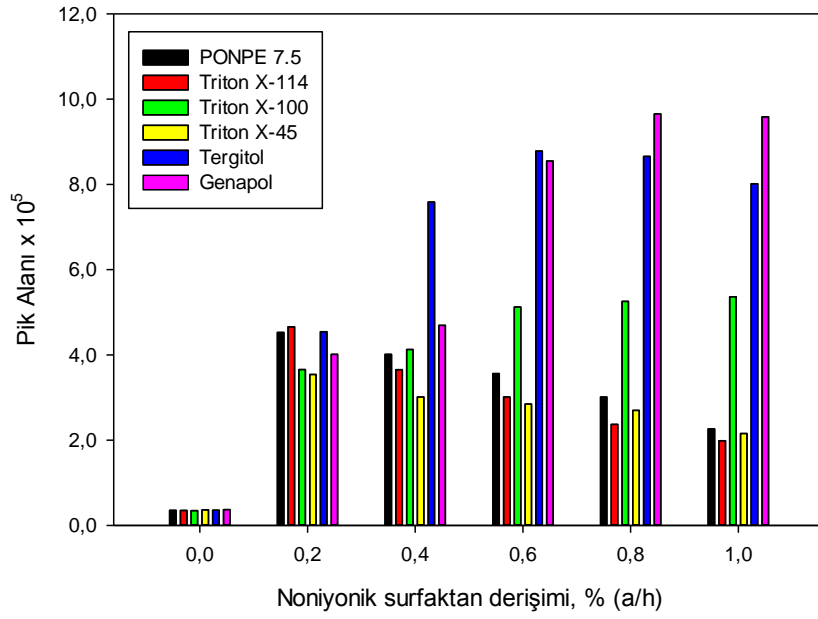
[Deneysel koşullar: 100 µg L⁻¹ B1 ve B2 vitamini, 5.0 mL pH 9.0 fosfat tamponu, 1.5 mL 1000 mg L⁻¹ Ag(I) ve 3.0 mL 3×10⁻³ M CPC]



Şekil 3.8 Riboflavin sinyallerine noniyonik surfaktan derişimi etkisi

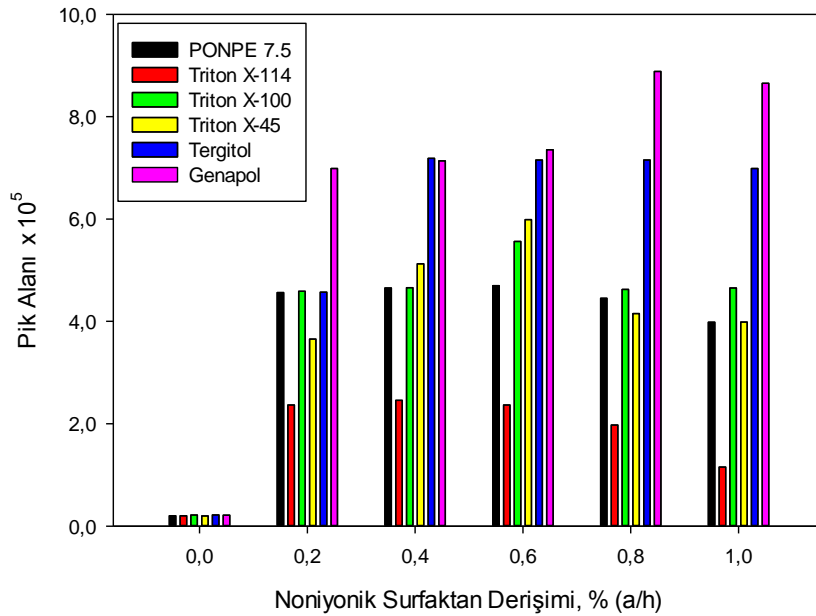
[**Deneysel koşullar:** 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ B1 ve B2 vitamini, 5.0 mL pH 9.0 fosfat tamponu, 1.5 mL 1000 mg L^{-1} Ag(I) ve 3.0 mL 3×10^{-3} M CPC]

Ayrıca her iki vitamin türü için yapılan noniyonik surfaktan optimizasyonunu, çubuk grafiği şeklinde göstermek de mümkündür. Böylece çalışılan surfaktanların etkisi daha iyi anlaşılabilir. Şekil 3.9 ve 3.10'dan anlaşılacağı gibi klasik CPE deneylerinde kullanılan surfaktanlarla da iyi sayılabilecek sinyaller elde edilmiştir. Ancak Tergitol ve Genapol surfaktanları ile elde edilen sinyaller diğerlerine göre oldukça iyidir. Bu nedenle deneysel çalışmalar bu iki surfaktan türü üzerinde yoğunlaştırılmıştır.



Şekil 3.9 Noniyonik surfaktan derişiminin Tiyamin sinyaline etkisinin çubuk gösterimi

[Deneysel koşullar: 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ B1 ve B2 vitamini, 5.0 mL Fosfat 9.0 tamponu, 1.5 mL 1000 mg L^{-1} Ag(I) ve 3.0 mL 3×10^{-3} M CPC]



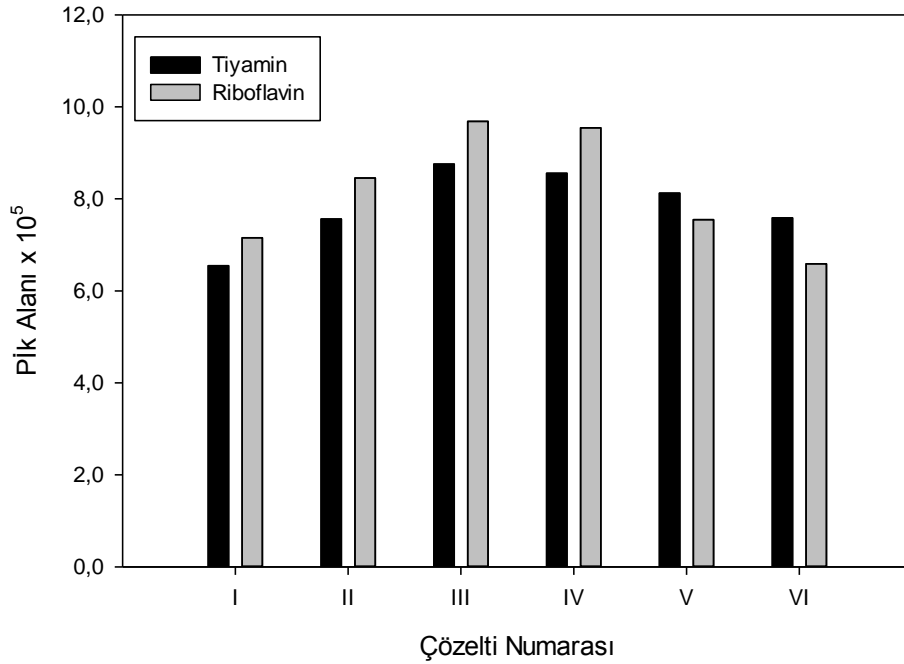
Şekil 3.10 Noniyonik surfaktan derişiminin Riboflavin sinyaline etkisinin çubuk gösterimi

[Deneysel koşullar: 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ B1 ve B2 vitamini, 5.0 mL Fosfat 9.0 tamponu, 1.5 mL 1000 mg L^{-1} Ag(I) ve 3.0 mL 3×10^{-3} M CPC]

Noniyonik surfaktan optimizasyonu sırasında hem Tergitol hem de Genapol ile yüksek sinyaller elde edilmesi, bu iki surfaktanın karışımının kullanılabilceğini düşündürmüştür. Bu nedenle Tergitol ve Genapol surfaktanlarının aşağıda verilen oranlarda karışımlarını içeren 5'er mL lik çözeltilerle deneyler tekrar edilmiştir.

Şekil 3.11'de görüldüğü gibi en iyi sinyallerin 50 mL lik son hacimli tüplere; 2 mL %20'lik Tergitol ve 3 mL % 20'lik Genapol çözeltilerinin karıştırılmasıyla elde edildiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle bundan sonraki deneyler bu surfaktanların karışımı ile sürdürülmüştür.

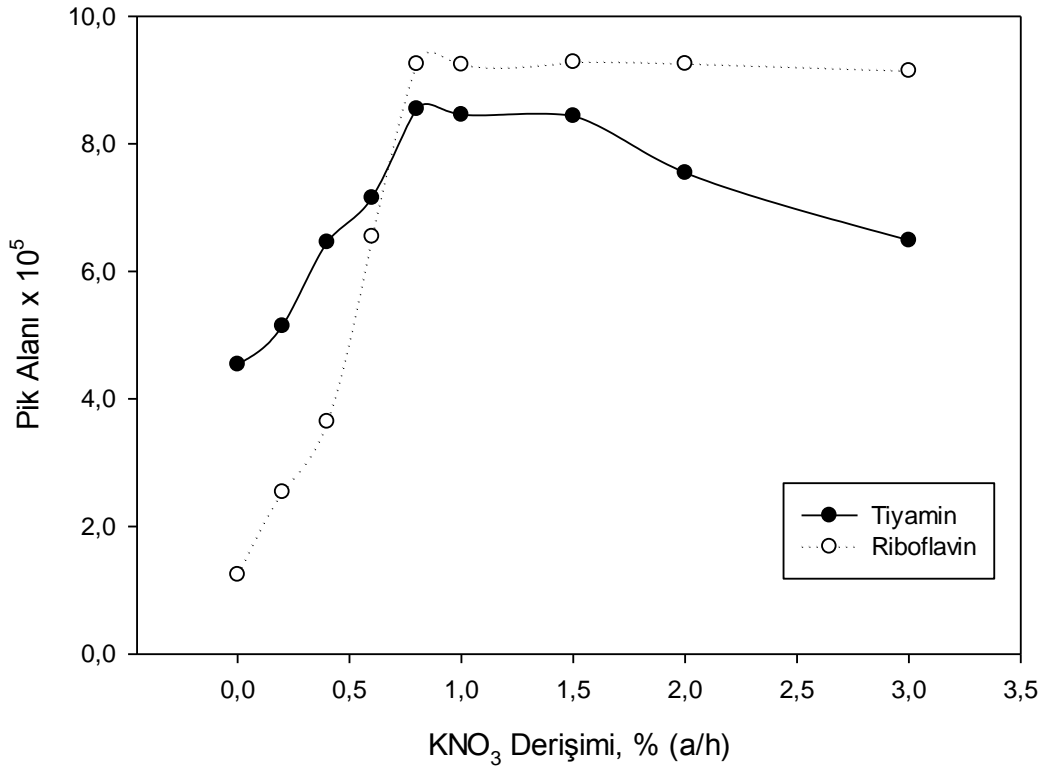
Çözelti No	I	II	III	IV	V	VI
%20 Tergitol	0	1	2	3	4	5
%20 Genapol	5	4	3	2	1	0



Şekil 3.11 Tergitol ve Genapol surfaktanlarının birlikte kullanımı

3.2.5 Elektrolit Etkisi

Surfaktanlar belli bir derişim ve sıcaklığın üstünde misel oluşturan yüksek moleköl kütleli makro moleküllerdir. Aynen proteinlerde olduğu gibi surfaktanların da tuz etkisi nedeniyle çözünürlükleri düşer. Salting-out etkisi olarak bilinen bu etkiyle surfaktan moleküllerinin sulu fazdan ayrılması kolaylaşır. Literatürde de bu amaçla genelde NaCl, KCl, KNO₃ veya NaNO₃ gibi kuvetli elektrolitler kullanılır. Bu çalışmada fazların ayrılmasını kolaylaştırmak için, kütlece %20 lik (a/h) KNO₃ kullanılarak son hacimde çözeltilerinin final derişimleri kütlece % 0.00- 3.00 arasında olacak şekilde elektrolit eklenmiş ve en iyi sinyalin Şekil 3.12’de görüldüğü gibi % 0.80 KNO₃ ile elde edildiği gözlenmiştir.

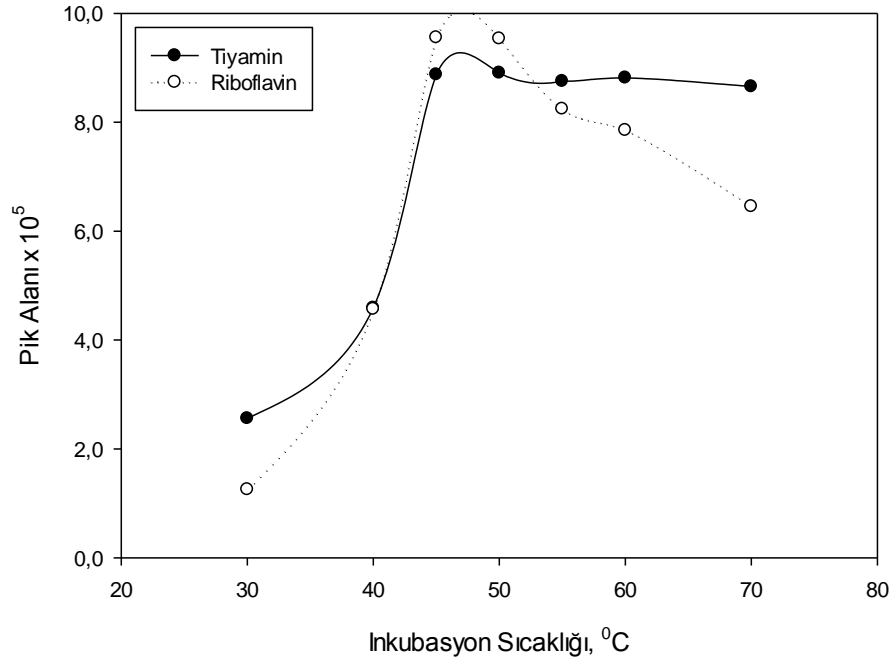


Şekil 3.12 Önerilen yöntem üzerine elektrolit etkisi

[Deneysel koşullar: 100 µg L⁻¹ B1 ve B2 vitamini, 5.0 mL pH 9.0 fosfat tamponu, 1.5 mL 1000 mg L⁻¹ Ag(I) ve 3.0 mL 3×10⁻³ M CPC, 2 mL %20 Tergitol ve 3 mL % 20 Genapol]

3.2.6 İnkübasyon sıcaklığı ve süresinin etkisi

Diğer parametrelerin optimizasyonu tamamlandıktan sonra, bulutlanma noktası ekstraksiyonu yönteminde inkübasyon sıcaklığı ve zamanının optimizasyonu yapılmıştır. Bulutlanma noktası ekstraksiyonunda sıcaklık, misel oluşumunda önemli bir parametredir. Vitamin türlerinin bulutlanma noktası ekstraksiyonuna inkübasyon sıcaklığının etkisini belirlemek amacıyla, 30°C–70°C arasında 5 °C farklarla taranmıştır. Şekil 3.13’den görüldüğü gibi en yüksek sinyale 45 °C de ulaşılmıştır. Daha yüksek sıcaklıklarda kompleksin surfaktan faza geçme oranı düştüğünden sinyal azalmaktadır. Düşük sıcaklıklarda ise bulutlanma olmadığından faz ayırımı gözlenmemiştir. Sonraki deneylere en yüksek sinyalin gözleendiği 45 °C de devam edilmiştir. Ekstraksiyonun etkinliği için önemli noktalardan biri de örnek çözeltilerin inkübasyonda (su banyosunda) kalma süresidir. Bu amaçla 45 °C sabit sıcaklıkta örnekler farklı sürelerde tutularak süre optimizasyonu yapılmıştır.



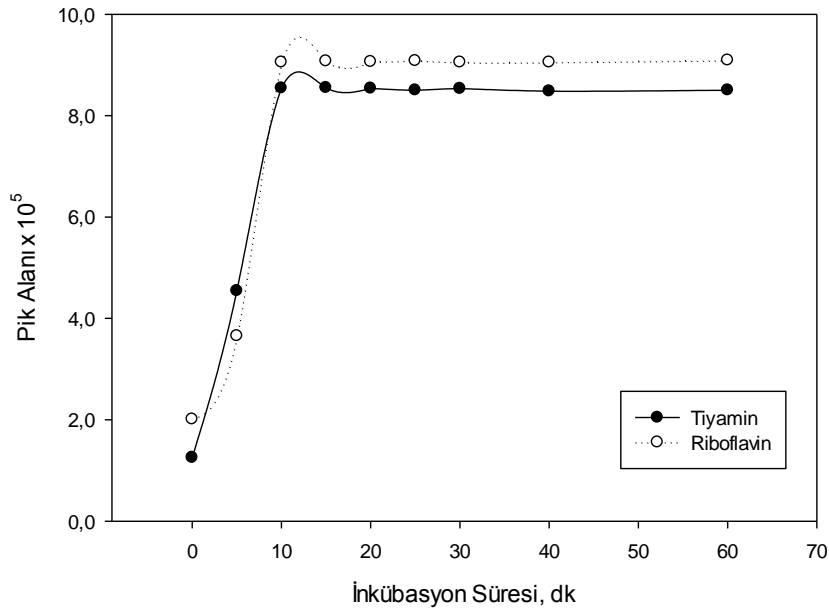
Şekil 3.13 Önerilen yöntem üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi

[Deneysel koşullar: 100 µg L⁻¹ B1 ve B2 vitamini, 5.0 mL pH 9.0 fosfat tamponu, 1.5 mL 1000 mg L⁻¹ Ag(I) ve 3.0 mL 3×10⁻³ M CPC, 2 mL %20 Tergitol ve 3 mL % 20 Genapol, 2 mL % 20 KNO₃]

Şekil 3.14'den anlaşıldığı üzere, 0 ile 60 dk arasında yapılan deneylerde, 10 dk'lık bir bekleme süresinin deney için harcanan toplam süreyi de dikkate alarak uygun olduğu görülmüştür. 10 dk'dan daha uzun sürelerde sinyalde kayda değer bir artış gözlenmemektedir.

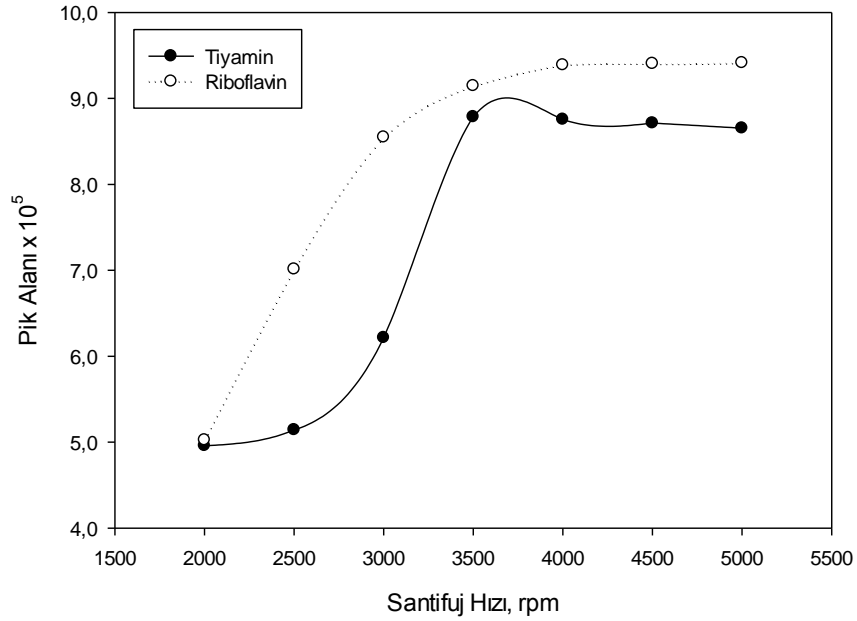
3.2.7 Santrifüjleme hızı ve süresi

Santrifüjleme hızı, faz ayırımını etkileyen parametrelerden biridir. Bu nedenle optimum koşullar altında aynı miktarda belli miktarlarda vitamin içeren çözeltiler bulutlanma noktası ekstraksiyonu sonrası 2000 ile 5000 rpm arasında farklı hızlarda santrifüjlenmiştir. Etkin bir faz ayırımı için 3500 rpm lik bir santrifüjleme hızının yeterli olduğu görülmüştür. Daha yüksek hızlarda santrifüj tüpleri zarar görmekte ve surfaktan fazı dağılmaktadır. Şekil 3.15'den görüldüğü gibi en iyi sinyalin elde edildiği 3500 rpm değeri sonraki çalışmalarda optimum değer olarak alınmıştır.



Şekil 3.14 Önerilen Yöntem üzerine inkübasyon süresinin etkisi

[Deneyel koşullar: 100 µg L⁻¹ B1 ve B2 vitamini, 5,0 mL Fosfat 9,0 tamponu, 1,5 mL 1000 mg L⁻¹ Ag(I) ve 3,0 mL 3×10⁻³ M CPC, 2 mL %20 Tergitol ve 3 mL % 20 Genapol, 2 mL % 20 KNO₃]

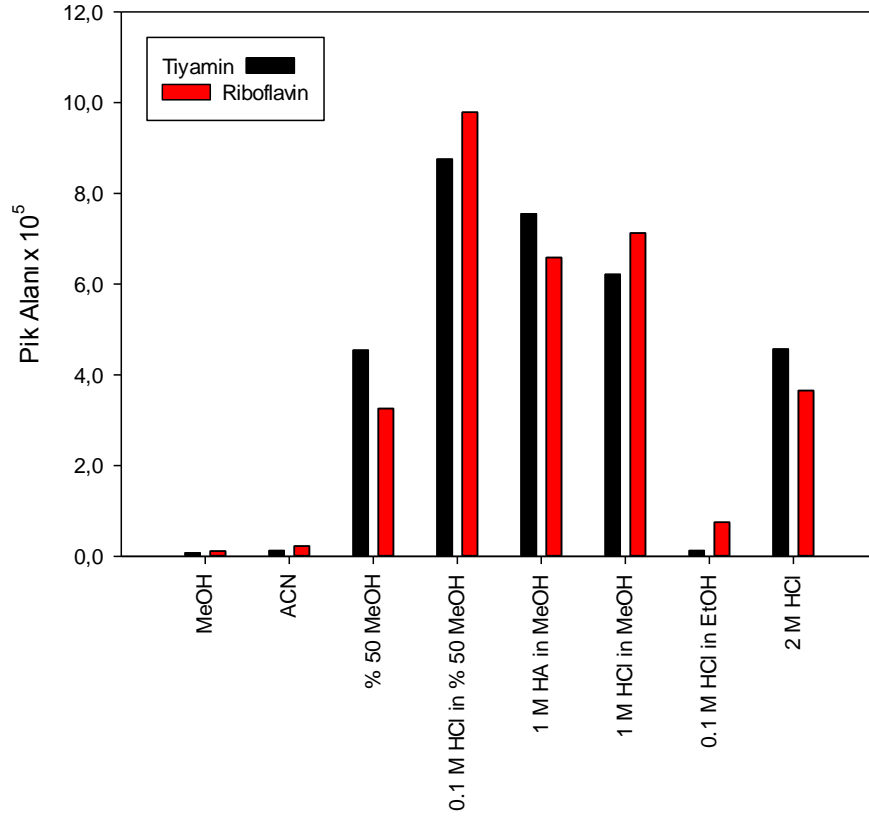


Şekil 3.15 Önerilen yöntem üzerine santrifüj hızı etkisi

[Deneysel koşullar: 100 µg L⁻¹ B1 ve B2 vitamini, 5.0 mL Fosfat 9.0 tamponu, 1.5 mL 1000 mg L⁻¹ Ag(I) ve 3.0 mL 3×10⁻³ M CPC, 2 mL %20 Tergitol ve 3 mL % 20 Genapol, 2 mL % 20 KNO₃]

3.2.8 Surfaktanca zengin fazın analize hazırlanması

Santrifüjleme işleminden sonra surfaktanca zengin faz tüpün dip kısmında toplanır. Surfaktanca zengin fazın (SRP) ayrılmasını kolaylaştırmak için örnek çözeltiler buzdolabında yaklaşık 20 dk bekletilerek, surfaktanca zengin fazın viskozitesi artırılır. Bu süre sonunda üstteki sulu faz basit bir dekantasyon işlemi ile kolayca ayrılabilir. Sulu fazın son kalıntıları ise bir damlalık yardımıyla uzaklaştırılır. Üstteki sulu faz ayrıldıktan sonra surfaktanca zengin fazın cihaza verilmeden önce, uygun bir çözücüyle seyreltilmesi gerekir. Çünkü viskozitesi yüksek olan faz, hem bu haliyle enjeksiyona uygun değildir hem de cihazda sinyal almaya yetecek miktarda değildir. Bu amaçla analiz öncesinde surfaktanca zengin fazın çözünmesi amacıyla farklı çözücüler denenmiştir. Seçilen çözücünün hem surfaktanca zengin fazı tamamen çözmesi hem de tayin edilecek cihaza zarar vermeyecek şekilde olması gerekir.



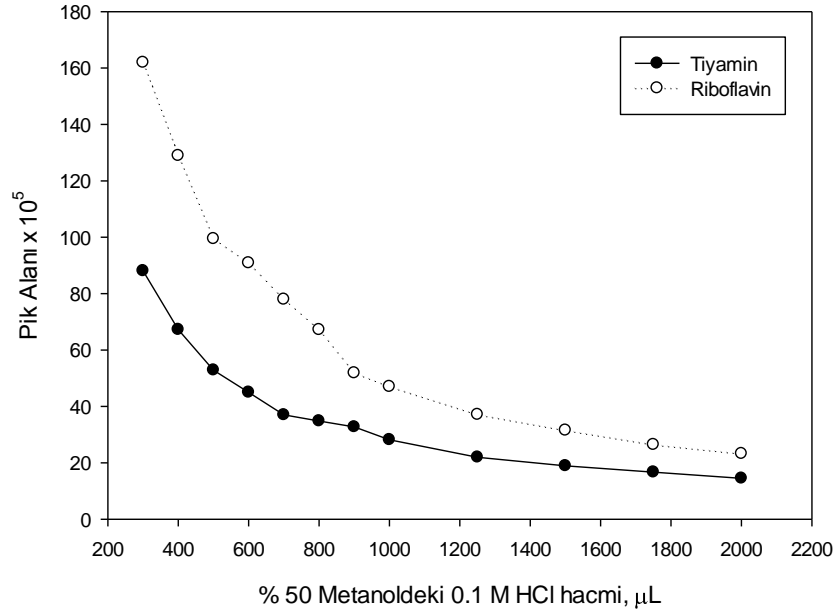
Şekil 3.16 SRP için kullanılan çözücüler

[**Deneysel koşullar:** 100 µg L⁻¹ B1 ve B2 vitamini, 5.0 mL Fosfat tamponu, 1.5 mL 1000 mg L⁻¹ Ag(I) ve 3.0 mL 3×10⁻³ M CPC, 2 mL %20 Tergitol ve 3 mL % 20 Genapol, 2mL % 20 KNO₃]

Bu amaçla kullanılacak çözücüler seçilirken HPLC sistemin yürütücü fazına uygun olması ve SRP'yi kantitatif bir şekilde çözecek kadar kuvvetli olması açısından bazı alkollerin asidik çözeltileri özellikle denendi. Zenginleştirme sonrası 1'er mL eklenen çözücülerden alınan sonuçlar Şekil 3.16' da görülmektedir.

Şekil 3.16'den anlaşıldığı gibi en yüksek sinyaller 0.1 M HCl'nin % 50 metanoldeki çözeltisiyle elde edilmiştir. Bu yüzden daha sonraki çalışmalarda surfaktanca zengin faz bu çözücüyle çözülmüştür. Surfaktanca zengin fazın çözünmesi için kullanılan çözücü miktarı zenginleştirme faktörünü doğrudan etkileyeceğinden hangi hacimde alınacağı önemlidir. Olabildiğince yüksek bir zenginleştirme katsayısı elde edebilmek için çözücü hacminin minimum bir değerde olması gerekir. Bu hacim arttıkça zenginleştirme

katsayısı düşer. Aslında HPLC'nin mikro viallerine 100 µL örnek konulabilmektedir. Ancak bu kadar düşük miktarda çözücü ile surfaktanca zengin fazın çözünmesi tam olmadığı gibi viallere koymadan önce süzme işlemi de yapılamamaktadır. 100 µL ile 2000 µL arası çözücü eklenerek hacim optimizasyonu yapılmış ve Şekil 3.17'de görüldüğü ve de beklendiği gibi çözücü hacmi arttıkça sinyaller düşmektedir. Maksimum sinyalleri elde etmek adına, surfaktanca zengin fazın etkin bir şekilde çözülebildiği ve süzülebildiği hacim olan 300 µL ideal değer olarak belirlenmiş ve sonraki çalışmalarda bu değer kullanılmıştır.



Şekil 3.17 SRP için kullanılan çözücü hacmi optimizasyonu

[DeneySEL koşullar: 100 µg L⁻¹ B1 ve B2 vitamini, 5.0 mL Fosfat tamponu, 1.5 mL 1000 mg L⁻¹ Ag(I) ve 3.0 mL 3×10⁻³ M CPC, 2 mL %20 Tergitol ve 3 mL % 20 Genapol, 2mL % 20 KNO₃]

3.3 Önerilen Yönteme Girişimci Türlerin Etkisi

Gerçek örneklerle çalışırken karşılaşılan en büyük sorunlardan biri ortamda bulunabilecek diğer türlerin girişim etkisidir. Kromatografik ölçümlerde kolon vasıtasıyla sağlanan etkin ayırma ve çalışılan dalga boyu nedeniyle sağlanan seçicilik birçok girişim kaynağını etkisiz veya önemsiz hale gelmesini sağlar.

Yeni geliştirilen bir yöntemle olası girişimci türlerin etkisini gözlemlemek için yapılan deneylerde seçilecek girişimci türler; yöntemin uygulanacağı örnek türüne bağlı olarak seçilir. Geliştirilen yöntemin uygulanması, bazı gıda örneklerinde B1 ve B2 vitaminlerinin tayini üzerine yapılacaktır. Bu nedenle girişimci çalışması gıda örneklerinde bulunabilecek bazı iyonik türler ve diğer vitamin türleri ile yapılmıştır.

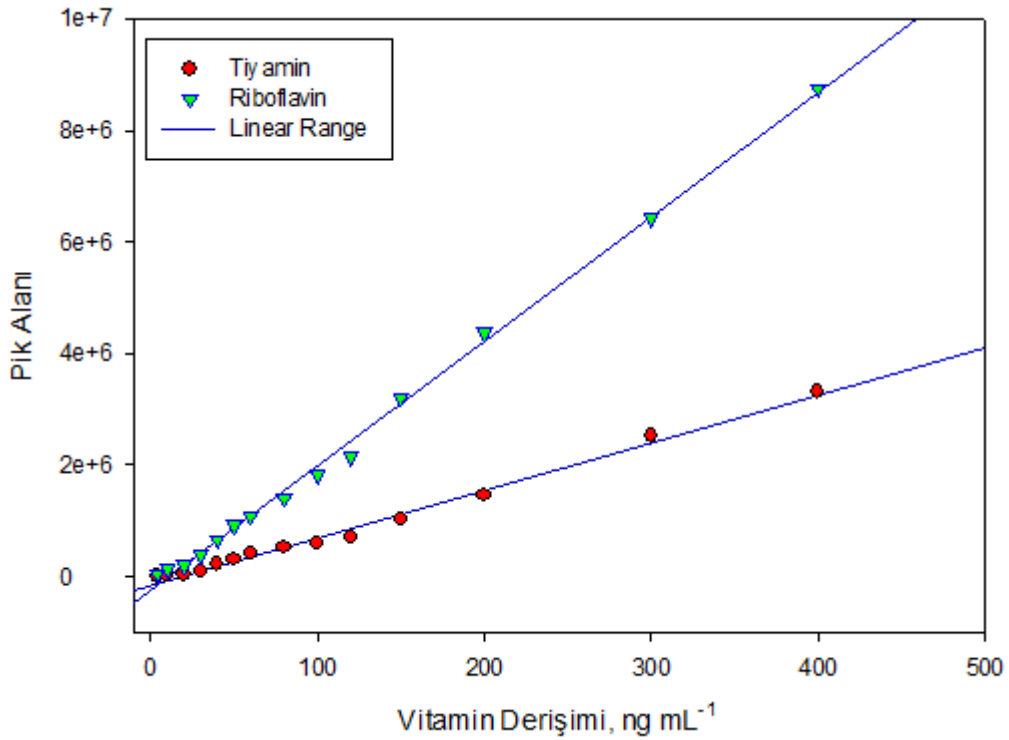
Olası girişim etkilerinin daha çok zenginleştirme basamağı ile ilgili olması beklenir. Zenginleştirme işleminde, analit-ligant kompleksinin oluşumunu engelleyici veya bu kompleksin surfaktan faza geçişini kısıtlayıcı türler girişime neden olurlar. $100.0 \mu\text{g L}^{-1}$ B1 ve B2 vitaminlerinin tayini üzerine farklı türlerin girişim etkileri incelenirken, sinyalde $\pm\%5$ lik bir farka sebep olan girişimci derişiminin analit derişimine oranı tolerans sınırı olarak alınmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.1’de görülmektedir.

Çizelge 3.1 $100 \mu\text{g L}^{-1}$ B1 ve B2 vitaminlerinin tayini için girişimci türlerin tolerans sınırları

Girişimci Türler	Tolerans Sınırı
K^+ , Na^+ ve NH_4^+	1000
Cl^- , SO_4^{2-} , Mg^{2+} , Ca^{2+}	750
NO_2^- , NO_3^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} , HCO_3^- ve CO_3^{2-}	500
Cu^{2+} , Zn^{2+} ,	350
B3 vitamini, Fe^{3+}	300
B12 ve B6 vitamini	200
B9 vitamini	100

3.4 Yöntemin Analitik Performans Ölçütleri

Bulutlanma noktası ekstraksiyonu için en uygun deneysel koşulların belirlenmesinin ardından, doğrusal çalışma aralığını belirlemek amacıyla, farklı derişimlerdeki Tiyamin ve Riboflavin çözeltileri ile zenginleştirme deneyleri uygulanmış ve ölçülen sinyallerin tiyamin için 4-400 ng mL⁻¹, Riboflavin için ise 1-500 ng mL⁻¹ aralığında doğrusal olarak değiştii gözlenmiştir. Bu çözeltilere geliştirdiğimiz yöntemin uygulanmasıyla elde edilen kalibrasyon doğrusu Şekil 3.18’de verilmiştir. Optimum koşullar altında, önerilen yöntemin analitik performans özellikleri Çizelge 3.2’de verildiği gibidir.



Şekil 3.18 Optimum koşullar altında elde edilen kalibrasyon doğrusu

3.5 Geliştirilen Yöntemin Validasyon Çalışmaları

Eser düzeydeki tiyamin ve riboflavinin bulutlanma noktası ekstraksiyonu sonrası kromatografik analizlerine dayalı olarak geliştirilen yöntemin validasyonu (geçerlemesi) üç farklı sertifikalı referans madde (SRM) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için vitamin türlerinin en çok analizlerinin yapıldığı ilaç ve gıda SRM leri tercih edilmiştir. SRM lerin içerikleri Çizelge 2.3, 2.4 ve 2.5’de verilmiştir. Kesim 2.5’ de açıklandığı gibi analize hazırlanan örneklerden elde edilen ekstraktların 10 mL’sini kullanarak geliştirilen CPE yöntemiyle tiyamin ve riboflavin içerikleri tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, her üç SRM türü için de Çizelge 3.3’de verilmiş olup bulunan sonuçlar, sertifikalı değerlerle student’s t ve F testlerini kullanarak kıyaslanmıştır. Hesaplama kullanılan istatistiki değerler yine aynı çizelgede sunulmuştur.

3.6 Gerçek örneklerin analizi

Geliştirilen yöntemin uygulama alanı olarak farklı gıda örneklerinde B1 ve B2 vitaminlerinin analizi yapılmıştır. Bu amaçla seçilen örnekler; bebek maması, süt, mısır unu, madımak bitkisi ve vitamin şurubudur. Her bir örnek, Kesim 2.5’ de anlatılan örnek hazırlama işlemlerine göre hazırlanmış ve geliştirilen zenginleştirme sonrası tayin yöntemi ile analiz edilmiştir. Ayrıca yöntemin doğruluğunu saptamak için, her bir örneğe 100 ve 250 ng mL⁻¹ miktarlarında standartlar ekleyip geri kazanım değerleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 3.4’de sunulmuştur.

Çizelge 3.2 Önerilen yöntemin analitik parametreleri

Parametre	Tiyamin		Riboflavin	
	CPE Öncesi	CPE Sonrası	CPE Öncesi	CPE Sonrası
Doğrusal aralık	1-50 µg mL ⁻¹	4-400 ng mL ⁻¹	1-50 µg mL ⁻¹	1-500 ng mL ⁻¹
Seçme sınırı ^a	0.35 µg mL ⁻¹	1.33 ng mL ⁻¹	0.35 µg mL ⁻¹	0.35 ng mL ⁻¹
Nicelleştirme sınırı ^b	1.01 µg mL ⁻¹	3.98 ng mL ⁻¹	1.01 µg mL ⁻¹	0.95 ng mL ⁻¹
BSS (%) (250 ng mL ⁻¹ için)	5.13	2.90	4.02	2.20
Kalibrasyon Duyarlılığı	86.14	8394	182.40	22319
Korelasyon Katsayısı (r ²)	0.9924	0.9962	0.9972	0.9970
Zenginleştirme Faktörü ^c	-	166.70	-	166.70
İyileştirme Faktörü ^d	-	97.44	-	122.36

^{a,b} Seçme sınırı boş deneme sinyallerinden elde edilen standart sapmanın 3 katı kullanılarak, nicelleştirme sınırı da 10 katı kullanılarak hesaplandı.

^c Zenginleştirme faktörü; başlangıçtaki sulu faz hacminin (50 mL) , zenginleştirme sonrası elde edilen hacme (0.3 mL) oranı alınarak hesaplandı.

^d CPE sonrası elde edilen kalibrasyon duyarlılığının CPE öncesi kalibrasyon duyarlılığına oranı

Çizelge 3.3 Önerilen yöntemin geçerliğinin teyidi için sertifikalı referans gıda örneklerine uygulaması

Örnek	Sertifikalı değer, mg kg ⁻¹		Bulunan ^a mg kg ⁻¹		% BSS		% Geri Kazanım		t _{deneyse} değerleri ^b	F _{deneyse} değerleri ^c
	Tiyamin	Riboflavin	Tiyamin	Riboflavin	Tiyamin	Riboflavin	Tiyamin	Riboflavin		
NIST 3280	1060±120	1320±170	1015±105	1385±145	10.3	10.4	95.8	104.9	1.13 (B1)	1.30 (B1)
									1.19 (B2)	1.37 (B2)
BCR-483	3.07±0.34	4.20±0.54	2.96±0.19	4.08±0.36	6.4	8.8	96.4	97.1	1.53 (B1)	3.20 (B1)
									0.88 (B2)	2.25 (B2)
ERM- BD6000	4.50±0.60	16.7±1.4	4.68±0.45	15.8±1.6	9.61	10.1	104	94.6	1.05 (B1)	1.78 (B1)
									1.48 (B2)	1.31 (B2)

^a % 95 güven düzeyinde yedi tekrarlı ölçüm için bulunan ortalama değer±standart sapma

^b % 95 güven düzeyi ve SD=6 için t_{kritik} değeri 2.45 dir.

^c % 95 güven düzeyi ve SD_{pay} ve payda=6 için f_{kritik} değeri 4.28 dir.

NIST 3280 : Multi Vitamin Tablet Standartı (100 kat seyreltilerek analizlendi)

BCR-483 : Kurutulmuş Sebze Standartı

ERM-BD6000 : Süt Tozu B1 : Tiyamin ve B2: Riboflavin

Çizelge 3.4 Önerilen yöntemle çeşitli gıda örneklerinde B1 ve B2 vitaminlerinin analizi

Örnek	Eklenen miktar ng mL ⁻¹		Bulunan ^{a,b} ng mL ⁻¹		% BSS		% Geri Kazanım	
	Tiyamin	Riboflavin	Tiyamin	Riboflavin	Tiyamin	Riboflavin	Tiyamin	Riboflavin
Bebek maması	-	-	45.24±1.64	102.34±2.24	3.62	2.19	-	-
	100.00	100.00	148.54±3.58	198.74±3.18	2.41	1.60	102.2	98.2
	250.00	250.00	302.14±4.56	362.04±5.15	1.50	1.42	102.3	102.7
Süt	-	-	Tayin edilemedi	Tayin edilemedi	-	-	-	-
	100.00	100.00	103.65±2.55	96.14±2.14	2.46	2.22	103.7	96.1
	250.00	250.00	242.35±4.87	241.04±5.44	2.09	2.25	96.7	96.4
Mısır unu	-	-	65.48±3.28	25.02±1.54	5.01	6.15	-	-
	100.00	100.00	175.34±4.25	117.55±3.67	2.42	3.09	105.1	94.7
	250.00	250.00	325.44±6.47	272.08±6.37	1.99	2.34	103.1	98.9
Madımak bitkisi	-	-	Tayin edilemedi	Tayin edilemedi	-	-	-	-
	100.00	100.00	98.54±2.18	105.32±2.11	2.21	2.00	98.5	105.3
	250.00	250.00	261.35±7.87	259.31±8.81	3.01	3.39	104.5	103.7
Vitamin Şurubu	-	-	185.30±10.25	205.10±10.22	5.53	4.98	-	-
	100.00	100.00	294.04±12.45	320.54±15.48	4.23	4.82	103.1	104.9
	250.00	250.00	442.24±14.10	438.14±18.56	3.19	4.24	101.6	96.3

^a % 95 güven düzeyinde, yedi tekrarlı ölçüm için bulunan ortalama değer±standart sapma

^b Örnek hazırlama işlemleri sonrası elde edilen 50 mL lik çözeltideki derişimler

Çizelge 3.5 Geliştirilen yöntemin literatürdeki benzer yöntemlerle kıyaslanması

Analit Türler	Zenginleştirme Yöntemi	Tayin Yöntemi	%BSS	Tayin Sınırı	Dinamik Aralık	Uygulanan Örnekler	Kaynak
Tiyamin	DLLME	Spektroflorimetri	3.0	0.06 ng mL ⁻¹	0.2–100 ng mL ⁻¹	Farmakolojik Örnekler, İdrar	(Zeeb vd., 2010)
Tiyamin	Doğrudan elektrot üzerinde zenginleştirme	Anodik Sıyırma Voltametri	1.6	-	0.34–3.4 µg mL ⁻¹	İlaç Örnekleri	(Alarfaj, N.A., 2009)
Suda çözünen vitaminler	İyon Çifti-CPE	HPLC	6.2	0.5 µg mL ⁻¹ 0.5 µg mL ⁻¹	1-50 µg mL (B1) 0.5–20 µg mL(B2)	Plasma / Urine	(Heydari ve Elyasi, 2014)
Vitamin K3 1,4-naphthoquinone	CPE	Spektrofotometri	3.4	0.05 µg mL ⁻¹	0.35–20.00 µg mL ⁻¹ 0.25–10.00 µg mL ⁻¹	Farmakolik Örnekler	(Abdollahi ve Bagheri, 2004)
A Vitamini E Vitamini	CPE	HPLC	< 5.0	belirtilmemiş	1-10 ng mL ⁻¹ 10-75 ng mL ⁻¹	Serum Örnekleri	(Sirimanne vd., 1998)
Tiyamin	CPE	Spektroflorimetri	2.4	0.78 ng mL ⁻¹	2.5-1000 ng mL ⁻¹	İdrar Örnekleri	(Tabrizi, A.B., 2006)
Tiyamin Riboflavin	CPE	HPLC	2.9 2.2	1.33 ng mL ⁻¹ 0.35 ng mL ⁻¹	4-400 ng mL ⁻¹ 1-500 ng mL ⁻¹	Gıda örnekleri	Geliştirilen Yöntem

DLLME: Dispersif Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu; CPE: Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu

DEĞERLENDİRME

Bulutlanma noktası ekstraksiyonu (CPE), son 20 yılda özellikle de inorganik türlerin ayırma ve zenginleştirilmesi için oldukça yoğun bir şekilde kullanılan ve giderek yaygınlaşan bir yöntemdir. Literatürde bu alanda her yıl yüzlerce çalışma yayınlanmakta ve pek çok farklı tür ve örnek tipi için geniş uygulama alanları bulunmaktadır.

Bu konuda şimdiye kadar yapılan çalışmaların yaklaşık % 80 i inorganik türlerin, özellikle de metalik iyonların zenginleştirilmesi üzerine olsa da, son yıllarda organik türlerin de zenginleştirilmesi ve daha sonra uygun bir yöntemle tayini için de yaygın bir şekilde uygulanmaya başlanmıştır. Yöntemin bu kadar çok uygulama alanı bulmasındaki temel faktörler; basitliği, çevreci oluşu, düşük maliyeti ve hemen her laboratuvarında temel donanımla uygulanabilirliği olarak sıralanabilir.

Bulutlanma noktası ekstraksiyonu deneylerinde temel amaç; daha büyük sulu faz hacmindeki analit türleri, daha küçük bir hacimdeki surfaktan fazına alarak zenginleştirme sağlamaktır. Yöntemin uygulanmasında karşılabilecek temel sorunlar; analit türlerin surfaktan faza yüksek verimde geçemeyişi ve elde edilen surfaktanca zengin fazın tayin basamağında sunulacak cihaza uyumlu bir şekilde aktarılamayışı olarak sıralanabilir. Yöntemin optimizasyon çalışmaları, bu sorunları olabildiğince gidermek veya olumsuz etkilerini en aza indirmek amacıyla yapılır.

Her zenginleştirme deneyi gibi bulutlanma noktası ekstraksiyonu da doğrudan tayin edilemeyecek düzeydeki analit türlerini, tayin cihazının ölçebileceği seviyelere kadar deriştirmeyi amaçlar. Sunulan tez çalışmasında bu kapsamda bir zenginleştirme ve tayin yöntemi geliştirilmiştir.

Seçilen türler, gerçek örneklerin birçoğunda miktarları yaygın kullanılan cihazlarla doğrudan tayin edilemeyecek seviyede olan B1 ve B2 vitaminleridir. Analizleri çoğunlukla kromatografik yapılan bu vitamin türleri için, HPLC sistemi ile (absorbans dedektörü kullanılarak) tayin edilebilecek minimum derişim 1 ppm in altına inememektedir. Bu soruna bir çözüm üretebilmek adına; uygulaması kolay, doğruluğu ve kesinliği iyi, maliyeti fazla olmayan bir zenginleştirme yöntemi geliştirilmiştir.

Zenginleştirme işlemine geçmeden önce, her iki vitamin türü içinde doğrudan tayin koşulları optimize edildi. Bu amaçla; literatür bilgileri ışığında, C18 kolonu ile, bir çok farklı yürütücü faz bileşimi, kolon sıcaklığı, örnekleme hacmi, yürütücü faz akış hızı denenerek en ideal tayin koşulları belirlenmiş ve elde edilen en ideal parametreler Çizelge 2.1 ve 2.2’de sunulmuştur.

Zenginleştirme deneylerine Bölüm 3.1’de açıklandığı gibi her iki vitamin türünün doğrudan surfaktanca zengin faza ekstrakte edilmesi ile ilgili çalışmalarla başlanmıştır. Ancak birçok farklı surfaktan türü ile yapılan denemelerde etkili bir geri kazanım ve de zenginleştirme elde edilememiştir. Bu yüzden ortama vitamin türlerinin yüksüz kompleksler halinde surfaktan faza geçişini artırma etkisini sağlayacak farklı iyonlar eklenmiş ve yapılan denemelerde Ag(I) ile oldukça iyi sinyaller elde edilmiştir. Eklenen gümüş iyonları sayesinde her iki vitamin türünün de surfaktanca zengin faza geçen miktarları önemli derecede iyileşmiş olup daha sonra diğer optimizasyon işlemlerine geçilmiştir. Tezin 3. bölümü boyunca anlatılan deneysel çalışmalar ile geliştirilen yöntem üzerine etkisi olabilecek bütün parametreler tek tek optimize edilmiştir. Zenginleştirme işlemi için; ortam pH’sı, gümüş iyonları derişimi, noniyonik surfaktanların türü ve derişimi, iyonik surfaktanların türü ve derişimi, elektrolit etkisi, inkübasyon sıcaklığı ve süresi, santrifujleme hızı ve süresi, surfaktanca zengin faz için uygun çözücü seçimi gibi yöntem değişkenleri için en etkin zenginleştirme koşulları belirlenmiştir.

Yöntemin optimizasyonu tamamlandıktan sonra analitik parametreleri belirlenmiştir. Optimize edilmiş koşullar altında, doğrusal çalışma aralığı tiyamin için 4-400 ng mL⁻¹, riboflavin için ise 1-500 ng mL⁻¹ aralığında elde edilmiştir. 20 adet tanık çözelti ile yapılan deneylerde ise her iki vitamin türü için de tayin ve nicelleştirme sınırları belirlenmiştir. Tiyamin için bulunan tayin sınırı 1.33 ng mL⁻¹ ve nicelleştirme sınırı 3.98 ng mL⁻¹ iken riboflavin için aynı değerler sırasıyla 0.35 ng mL⁻¹ ve 0.95 ng mL⁻¹ dir. Yöntemin analitik performans ölçütleri topluca Çizelge 3.2’de sunulmuştur. Yine her iki vitamin türü için de iyileştirme ve zenginleştirme faktörleri, literatürde en sık ifade edilen şekliyle hesaplanmış ve çizelge’ye eklenmiştir. 50 mL lik sulu çözeltilerle başlanan zenginleştirme çalışmalarında son hacim yaklaşık 300 µL olduğu için, zenginleştirme faktörü fazların oranından 166.7 olarak bulunmuştur. İyileştirme faktörü olarak ise zenginleştirme öncesi ve sonrası kalibrasyon duyarlılıklarının oranı ile yapılan hesaplamada iyileştirme faktörü tiyamin için, 97.44, ribofalvin için ise 122.36 olarak

bulunmuştur. Elde edilen bu faktörler literatürdeki benzer moleküller için olan çalışmalara kıyasla oldukça yüksektir.

Geliştirilen yöntemin validasyonu sağlamak amacıyla üç farklı sertifikalı referans gıda örneğinin Kesim 2.5’de anlatılan yönteme göre hazırlanmış ve önerilen zenginleştirme yöntemine göre yedi tekrarlı olarak analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.3’te sunulmuştur. Analiz sonuçları ile sertifikalı değerlerin kıyaslanması Student’s t ve F testleri kullanılarak istatistiksel olarak yapılmıştır. % 95 güven düzeyinde yapılan değerlendirmede sonuçlar arasında anlamlı farklar olmadığı ve sonuçların belirli hata içermediği kanısına varılmıştır.

Yeni geliştirilen bir yöntemin optimizasyonu tamamlanıp analitik parametreleri belirlendikten sonra birkaç farklı gıda örneğine uygulaması yapılmıştır. Seçilen örnekler ilgili vitamin türlerinin farklı miktarlarda bulunabildiği ve olası girişimci türlerini içeren gıdalardan oluşmaktadır. Kesim 2.5’de verilen yönteme göre hazırlanan örnekler daha sonra geliştirilen zenginleştirme yöntemi kullanılarak analiz edilmiş ve sonuçlar Çizelge 3.4’de verilmiştir. Ayrıca yöntemin doğruluğunu sınımanın bir ölçüsü olarak gerçek örnekler üzerinden geri kazanım çalışmaları da yapılmış ve bulunan değerler çizelgeye eklenmiştir. Çizelge 3.4’de görüldüğü gibi geri kazanım değerleri % 96.4 ile 105.1 arasında olup kantitatifdir.

Son olarak, geliştirilen yöntemin literatürdeki benzer yaklaşımlarla mukayese edilmesi önemi ve özgünlüğü açısından bir fikir vermesi için Çizelge 3.5’de sunulmuştur. Tezin yazıldığı tarih itibarıyla B1 ve B2 vitaminlerinin CPE yaklaşımı ile zenginleştirme sonrası tayinlerini içeren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu konuyla ilgili olarak literatürde ancak Çizelge 3.5’de özetlenen birkaç çalışmaya rastlanılmıştır. 2014 yılında Heydari ve Elyasi tarafından, iyon çifti CPE temelli yapılan bir çalışma sunulmuş olup, tayin sınırı ve çalışma aralığı incelendiğinde, zaten HPLC ile doğrudan tayin edilebilecek düzeyde sonuçlar verildiği görülmektedir. Bu anlamda, bizim yöntemimizle kıyaslanabilecek durumda değildir. Tebrizi ve Zeeb tarafından sunulan iki ayrı çalışma ise sadece Tiyamin türleri için bir zenginleştirme sunmaktadır. Spektroflorimetrik ölçümlerin daha duyarlı olmasından kaynaklanan bir üstünlüğe sahip olmalarına rağmen, geliştirilen yöntemlerle elde edilen sonuçlar tiyamin için kıyaslanabilir durumdadır. Tiyamin için elektroanalitik temelli bir çalışma da literatürde mevcut olup, kıyaslama yapılabilir fazla veri

içermemektedir. Yağda çözünen iki vitamin türü olan A ve E vitaminlerin zenginleştirme sonrası tayinlerini içeren iki çalışma (Abdollahi ve Sirimaane tarafından yapılan); sadece uygulanan yaklaşımın benzer oluşundan ötürü tabloya yerleştirilmiş ve fikir vermesi açısından verileri sunulmuştur. Her iki yöntemde de elde edilen zenginleştirme faktörleri hakkında bilgi verilmemiş olup tayin sınırları ve çalışma aralıkları açısından elde edilen sonuçlar benzerdir.

Literatür taramasında doğrudan bu iki vitamin türü için zenginleştirme temelli bir çalışma olmayışı ve yaklaşım açısından benzer çalışmalara göre oldukça iyi sayılabilecek analitik parametreler elde edilmesi çalışmanın özgünlüğü ve önemini ortaya çıkarmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abdollahi, H., Bagheri, L.** (2004). Simultaneous spectrophotometric determination of Vitamin K3 and 1,4-naphthoquinone after cloud point extraction by using genetic algorithm based wavelength selection-partial least squares regression, *Analytica Chimica Acta*, 514, 211–218.
- Aktaş, E.** (2011). Zenginleştirilmiş unlardan farklı koşullarda üretilen bisküvilerin bazı B vitamin içeriklerinin incelenmesi. *Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı* (yüksek lisans tezi), Ankara,
- Alarfaj, N.A.** (2009). Adsorptive stripping anodic voltammetric determination of thioctic acid in bulk and pharmaceutical formulations, *International journal of Biomedical science*, 5 (1), 54-58.
- Altundağ, H.** (2007). Katı faz ekstraksiyon tekniği ile talyum türlendirme çalışması. *Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü*, (Doktora tezi), Sakarya.
- Alver, E.** (2011). Sigara izmarit zifirinde PAH'ların HPLC/UV sistemde tayini, *Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü* (Doktora tezi), Kırıkkale.
- Andrés M.P.S., Otero J., Vera S.** (2011). High performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of a-, c- and d-tocopherol in vegetable oils in presence of hexadecyltrimethylammonium bromide/n-propanol in mobile phase. *Food Chemistry*, 126, 1470-1474.
- AOAC.** (1984). Tiyamin (vitamin B1) in foods. Fluorometric Method. *Final Action*, 836–837.
- Aydın, F. A.** (2008). Birlikte çöktürme ve katı faz özütlemesi ile bazı ağır metal iyonlarının zenginleştirilmeleri. *Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya bölümü* (Doktora Tezi), Kayseri.
- Ayrancı, G., Kaya, S.** (1993). Kinetic analysis of the loss of some B-vitamins during the cooking of macaroni. *Nahrung*, 37, 153-160.
- Ball, G.F.M.** (1994). Chemical and biological nature of the water-soluble vitamins, In water-soluble vitamin assays in human nutrition. *Chapman and Hall, New York*.
- Baytak, S., Türker, A.R.** (2005). The use of *Agrobacterium tumefaciens* immobilized on Amberlite XAD-4 as a new biosorbent for the column preconcentration of iron(III), cobalt(II), manganese(II) and chromium(III). *Talanta*, 65(4), 938-945.
- Blake, C.J.** (2007). Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements: a review. *Anal Bioanal Chem.*, 389, 63–76.

- Boyaci, B.B., Han, J.H., Masatcioglu, M.T., Yalcin, E., Celik, S., Ryu, G.H., Koxsel, H.** (2012). Effects of cold extrusion process on thiamine and riboflavin contents of fortified corn extrudates. *Food Chemistry*, 132, 2165–2170.
- Calenberg, S., Philips, B., Mondelaers, W., Cleemput, Oswald, H. A.** (1999). Effect of Irradiation, Packaging, and Postirradiation Cooking on the Thiamin Content of Chicken Meat. *Journal of Food Protection*, 62(11), 1303-1307.
- Camel, V.** (2003). Solid phase extraction of trace türs. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 58, 1177-1233.
- Campa, M.R.F., Garcia, E.S., Valdez-Hevia, M.C., and Temprano, B.** (1995). Effects of organised media on the generation of volatile species for atomic spectrometry. *Spectrochim. Acta B*, 50(4–7), 377–391.
- Ciulua, M., Solinasa, S., Floris, I., Panzanellia, A., Pilo, M.I., Piua,P.C., Spanoa, N., Sannaa, G.** (2011). RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta*, 83, 924–929.
- Çetin, T.** (2014). Çeşitli örneklerde FI-AAS ile zenginleştirme sonrası bakır, gümüş ve palladyum'un tayinleri. Erciyes Üniversitesi *Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü* (Doktora tezi), Kayseri.
- Demirci, A., Özcimder, M.** (2004). Gaz ve Sıvı Kromatografileri. *Bilim Yayıncılık*, Ankara.
- Demirci, A., Özcimder, M.** (2009). Kromatografik Yöntemler. *Kuban Matbaacılık Yayıncılık*, Ankara.
- Deng, F., Liang, X., Yang, L., Liu, Q., Liu, H.** (2013). Analysis of Mogroside V in *Siraitia grosvenorii* with Micelle-mediated Cloud-Point Extraction. *Phytochem. Anal.* 24, 381–385.
- Eitenmiller, R.R., Ye, L., Landen, W.O.** (2008). Vitamin Analysis For The Health and Food Sciences, *CRC Press, Boca Raton*, 240-300pp.
- Eitenmiller, R.R., Ye, L., Landen, W.O.** (2008). Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences. *CRC Press, Boca Raton*, 240-300pp.
- El-Shahawi, M.S., Bashammakh, A.S., Bahaffi, S.O.** (2007). Chemical speciation and recovery of gold(I, III) from wastewater and silver by liquid–liquid extraction with the ion-pair reagent amiloride mono hydrochloride and AAS determination. *Talanta*, 72(4), 1494-1499.
- European Standard** (2003b). Foodstuffs-determination of vitamin B2 by HPLC. EN14152. Rue de Stassart
- European Standard.** (2003a). Foodstuffs-determination of vitamin B1 by HPLC. EN14122. Rue de Stassart 36, B-1050 Brussels: European Committee for Standardization.
- Food and Nutrition Board.** (2000). Dietary reference intakes for thiamine, riboflavin, niacin, vitamin B6, *National academy of sciences press, Washington DC*.

- Ghiasvand, A.R., Shadabi, S., Mohagheghzadeh, E., Hashemi, P.** (2005). Homogeneous liquid–liquid extraction method for the selective separation and preconcentration of ultra-trace molybdenum. *Talanta*, 66(4), 912-916.
- Gündüz, T.** (2002). Enstrümental Analiz, 6.Baskı, *Gazi Kitabevi*, Ankara.
- Heydari, R., Elyasi, N.S.** (2014). Ion-pair cloud-point extraction: A new method for the determination of water-soluble vitamins in plasma and urine, *J. Sep. Sci.*, 37, 2724–2731.
- Hinze, W.L. and Pramauro, E.** (1993). A critical review of surfactant-mediated phase separation (cloud point extraction): theory and applications. *Crit. Rev. Anal Chem.*, 24, 133-140.
- Hung, K.C., Chen, B.H., Yu, Y.L.** (2006). Cloud-point extraction of selected polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants. *Sep. Purif. Technol.*, 57, 1–10.
- Ivanovic, D., Popovic, A., Radulovic, D., Medenica, M.** (1999). Reversed-phase ion-pair HPLC determination of some water-soluble vitamins in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18, 999–1004.
- Kim, Y.N.** (2009). Vitamins. Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis, Leo M.L. Nollet, F.T. (Ed.) *CRC Press, Florida, USA*.
- Kimura, Y., Itokawa, M., Fujiwara, J.** (1990). Cooking Losses of minerals and iys nutritional significance. *Nutr. Sci. Vitaminol*, 36, 17-35.
- Kondyli, E., Katsiari, M.C., Voutsinas, L.P.** (2007). Variations of vitamin and mineral contents in raw goat milk of the indigenous Greek breed during lactation. *Food Chemistry*, 100, 226–230.
- Lynch, P.L.M., Young, I.S.** (2000). Determination of thiamine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 881, 267-284.
- Machlin, L.J. ve Huni, J.E.S.** (1994). Vitamins Basics, *Basel*
- Mihaljevi , M., Sivr, L., Etlar, V., Tebek, O., Prusa, J.** (2004). Oxidation of As-bearing gold ore—a comparison of batch and column experiments. *Journal of Geochemical Exploration*, 81, 59-70.
- Mondragon-Portocarrero, A.C., Vazquez-Oderiz, L., Romero-Rodriguez, M.** (2011). Development and Validation of an HPLC Method for the Determination of Thiamine and Riboflavin in Green Leafy Vegetables Using Clara-Diastase, *Journal of Food Science*, 76 (4), 639-642.
- Moore, J.C., Dalan, K.D.** (2003). Optimization of oxidation steps used in fluorometric determination of thiamine in soft wheat flour. *Cereal chemistry*, 80,238-245.
- Moradi, M., Yamini, Y.** (2012) Surfactant roles in modern sample preparation techniques: A review. *J. Sep. Sci.*, 35, 2319–2340.

- Moreno, P., Salvadó, V.** (2000). Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 870, 207-215.
- Nascentes, C.C. and Arruda, M.A.Z.** (2003). Cloud point formation based on mixed micelles in the presence of electrolytes for cobalt extraction and preconcentration. *Talanta*, 61(6), 759–768.
- Ojeda, C.B., Rojas F.S.** (2011). Separation and preconcentration by cloud point extraction procedures for determination of ions: recent trends and applications. *Microchim Acta*, (baskıda).
- Ojeda, C.B., Rojas, F.S.** (2009). Separation and preconcentration by a cloud point extraction procedure for determination of metals: an overview, *Anal Bioanal Chem*, 394, 759–782.
- Ortega, A.C., Cristina da Silva, D., Visentainer, J.V., Evelazio de Souza, N., Almeida, V.C., Oliveira, C.C.** (2011). Determination of vitamins A and E exploiting cloud point extraction and micellar liquid chromatography. *Analytical Letters*, 44, 778–786.
- Ottaway, P.B.** (1993). *The Technology of Vitamins in Foods*, Aspen Publishers Inc., Maryland.
- Ötleş, S.** (2008). Vitamin analysis in fortified foods and supplements. Food fortification and supplementation: Technological, safety and regulatory aspects, *Ottaway, P.B. (Ed.) Woodhead Publishing, USA*, 129-152pp.
- Ötleş, S., Karaibrahimoglu, Y.** (2005). Analysis of Vitamins for the Health, Pharmaceutical, and Food Sciences. *Methods of Analysis of Food Components and Additives. CRC Press, Florida*, 159-178pp.
- Paleologos, E. K., Stalikas, C. D., Tzouwara-Karayanni, S. M., Pilidis, G.A. and Kayarannis, M.I.** (2000). Micelle-mediated methodology for speciation of chromium by flame atomic absorption spectrometry. *J. Ana. At Spectrom*, 15, 287-296.
- Pena-Pereira, F., Lavilla, I., Bendicho, C.** (2009) Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review. *Spectrochim. Acta, Part B* 64: 1–15.
- Powers, H.J.** (2003). Riboflavin and Health, *Am.J.Clin. Nutr*, 77, 1352-1360pp.
- Ren, G., Huang, Q., Wu, J., Yuan, J., Yang, G., Yan, Z., Yao, S.** (2014). Cloud point extraction–HPLC method for the determination and pharmacokinetic study of aristolochic acids in rat plasma after oral administration of *Aristolochia Fructus*. *Journal of Chromatography B*, 953–954, 73–79.

- Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseinia, M.R.M., Aghae, E., Ahmadi, F., Berijani, S.** (2006) Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J. Chromatogr. A* 1116: 1–9.
- Rokayya, S., Li, Y., Qi, B., Wang, S., Zhang, Q., Han, F., Ma, Y., Jing, J., Jiang, L.** (2014). HPLC Analysis of Water-Soluble Vitamins (B2, B3, B6, B12, and C) and Fat-Soluble Vitamins (E, K, D, A, and β -Carotene) of Okra (*Abelmoschus esculentus*). *Journal of Chemistry*, 1155, 1-6.
- Sarafraz-Yazdi, A., Amiri, A.** (2010). Liquid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*. 29 (1): 1–14.
- Shemirani, F., Baghdadia, M., Ramezanib M.** (2005). Preconcentration and determination of ultra-trace amounts of arsenic(III) and arsenic(V) in tap water and total arsenic in biological samples by cloud point extraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 65(4), 882-887.
- Sirimanne, S.R., Patterson, D.G., Ma, L., Justice, J.B.** (1998). Application of cloud-point extraction–reversed-phase highperformance liquid chromatography A preliminary study of the extraction and quantification of vitamins A and E in human serum and whole blood, *Journal of Chromatography B*, 716, 129–137.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R.** (2007). Principles of instrumental analysis, sixth edition. *Belmont, USA*.
- Skoog, D.A., Leary, J.J.** (1996). Instrumental Analysis, Sounders college publishing, *New York*.
- Skoog, D.A, West, D.M, Holler, F.J., Crouch S.R.** (2004). Analitik Kimya Temel İlkeler. *Bilim Yayıncılık Çeviri: Kılıç, E., Yılmaz, H.*), 1 ve 2. Cilt, Ankara.
- Solfrizzo, M., Girolamo, A.D., Visconti, A.** (2001). Determination of fumonisins B1 and B2 in cornflakes by high performance liquid chromatography and immunoaffinity clean-up. *Food Additives and Contaminants*, 18(3), 227- 235.
- Stalikas, C.D.** (2002). Micelle-mediated extraction as a tool for separation and preconcentration in metal analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 21(1), 343-350.
- Tabrizi, A.B.** (2006). A cloud point extraction-spectrofluorimetric method for determination of thiamine in urine, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 27 (10), 1604-1608.
- Tan, J.H., Jin, S.F., Yang, A.** (2012). Cloud Point Extraction Approach Developed for Analyzing Pesticides Prometryne and Isoproturon from Multi-media. *Clean – Soil, Air, Water*, 41(5), 510–516.
- Tang, A., Ding, G., Yan, X.**(2005). Cloud point extraction for the determination of As(III) in water samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 67(5), 942-946.

- Tang, X., Cronin, D.A., Brunton, N.P.A.** (2006). Simplified approach to the determination of thiamine and riboflavin in meats using reverse phase HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 831–837.
- Ulusoy, H.İ.** (2011). Eser düzeydeki inorganik arsenik türlerinin tayini için bulutlanma noktası ekstraksiyonu/AAS yöntemi geliştirilmesi. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü* (Doktora tezi), Sivas.
- Ulusoy, S.** (2010). Bulutlanma noktası ekstraksiyonu/FAAS ile çevresel örneklerde kalay türlerinin tayini. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü* (Yüksek lisans tezi), Sivas.
- Vinas, P., Balsalobre, N., Lopez-Erroz, C., Hernandez-Cordoba, M.** (2004). Liquid chromatographic analysis of riboflavin vitamers in foods using florescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1789–1794.
- Wang, L., Cai, Y.Q., He, B., Yuan, C.G., Shen, D.Z., Shao, J., Jiang, G.B.** (2006). Determination of estrogens in water by HPLC-UV using cloud point extraction. *Talanta*, 70, 47–51.
- Watanabe, H. and Tanaka, H.** (1978). A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid extraction of zinc(II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphtol. *Talanta*, 25 (10), 585–589.
- Wen, Y., Li, J., Liu, J., Lu W., Ma, J., Chen, L.** (2013) Dual cloud point extraction coupled with hydrodynamic-electrokinetic two-step injection followed by micellar electrokinetic chromatography for simultaneous determination of trace phenolic estrogens in water samples, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 5843-5852.
- Willie, L.H., Pramauro, E.** (1993) A Critical Review of Surfactant – Mediated Phase Separations (Cloud-Point Extractions): Theory and Applications", *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 24(2), 133 -177.
- Zeeb, M., Ganjali, M.R., Norouzi, P.** (2010) Dispersive liquid-liquid microextraction followed by spectrofluorimetry as a simple and accurate technique for determination of thiamine (vitamin B1), *Microchim Acta*, 168, 317–324.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Songül ULUSOY
Doğum Yeri ve Tarihi	Arguvan, 25.06.1982
Medeni Hali	Evli
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Kimya Bölümü 58140 Sivas
E-posta Adresi	sonulusoy@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Org.Eşref Bitlis Lisesi, 1998
Lisans	İnönü Üniversitesi, 2004
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2010

Yayınlar

1. H.İ. Ulusoy, M. Akçay, **S. Ulusoy**, R. Gürkan “Determination of ultra trace arsenic species in water samples by hydride generation atomic absorption spectrometry after cloud point extraction” *Analytica Chimica Acta*, **703(2)**, 137-144, 2011.
2. H.İ. Ulusoy, R. Gürkan, Ö. Demir, **S. Ulusoy** “Micelle-Mediated Extraction and Flame Atomic Absorption Spectrometric Method for Determination of Trace Cobalt Ions in Beverage Samples” *Food Analytical Methods*, **5**, 454-463, 2012.
3. H.İ. Ulusoy, R. Gürkan, **S. Ulusoy**, Cloud point extraction and spectrophotometric determination of mercury species at trace levels in environmental samples, *Talanta*, **88**, 516-523, 2012.

4. **S. Ulusoy**, H.İ. Ulusoy, M. Akçay, R. Gürkan “Inexpensive and Versatile Method for Trace Sn(II) and Sn(IV) Ions in Food Samples by CPE/FAAS” Food Chemistry, **134**, 419–426, 2012.
5. **S.Ulusoy**, H.İ. Ulusoy, “Preconcentration and determination of Safranin T in environmental water samples”, Environmental Engineering and Management Journal, baskıda (2014)

Kongreler

1. 23.Ulusal Kimya Kongresi, 21-25 Haziran 2009, Sivas
2. 5.Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 21-25 Haziran 2010, Erzurum
3. 12. Ulusal Spektroskopi Kongresi, 18-22 Mayıs 2011, Antalya
4. 2.Eser Analiz Çalıştayı, 21-24 Haziran 2012, Trabzon

Bildiriler

- C1.** **S. Ulusoy**, H.İ. Ulusoy, M. Akçay, “Bazı gıda örneklerindeki kalay türlerinin[Sn(II) ve Sn(IV)] zenginleştirilmesi ve türlenmesi için yeni bir bulutlanma noktası ekstraksiyonu yöntemi”, 5.Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Erzurum, 2010.
- C2.** R. Gürkan, H.İ. Ulusoy, B. Sevinç, **S. Ulusoy**, “Bulutlanma noktası ekstraksiyonu ile ayırma ve zenginleştirme sonra bazı çevresel su örneklerinde spektrofotometrik Hg(II) belirlenmesi”, 12.Ulusal Spektroskopi Kongresi, Antalya, 2011.
- C3.** H.İ. Ulusoy, Ö. Yılmaz, R. Gürkan, **S. Ulusoy**, “Eser düzeydeki Se(IV) iyonlarının belirlenmesi için CPE/FAAS yöntemi”, 12.Ulusal Spektroskopi Kongresi, Antalya, 2011.
- C4.** **S. Ulusoy**, H.İ. Ulusoy, R. Gürkan, M. Akçay, “Bulutlanma noktası ekstraksiyonu yönteminin Safranin T zenginleştirilmesi ve tayinine uygulanması”, II.Eser Analiz Çalıştayı, Trabzon, 2012.
- C5.** **S. Ulusoy**, R. Gürkan, H.İ. Ulusoy, S. Dağdeviren, “Bazı içecek ve meyve sularında toplam kalayın belirlenmesi için surfaktan duyarlı spektrofotometrik yöntem geliştirilmesi”, II.Eser Analiz Çalıştayı, Trabzon, 2012.
- C6.** H.İ. Ulusoy, **S.Ulusoy**, N.T. Eriksen, “Bazı amino asitlerin α -hidroksi asit türevlerini izokrotik HPLC kullanılarak eser düzeyde tayini”, II.Eser Analiz Çalıştayı, Trabzon, 2012.