

39990

T.C. YÜREKLÜK VE KONTROL
DOKÜMANTASYON MÜDÜRLÜĞÜ

**NİKOTİN VE BAZI FARMASÖTİK TÜREVLERİNİN İNDİREKT ATOMİK
ABSORBSİYON SPEKTROMETRİK VE KOLORİMETRİK YOLLA
ANALİZLERİ İÇİN YENİ YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

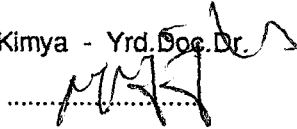
CEMALETTİN UYAN

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bora ERGENOĞLU

Kimya - Yrd. Doç. Dr.



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu çalışma, jürimiz tarafından, Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :

Üye :

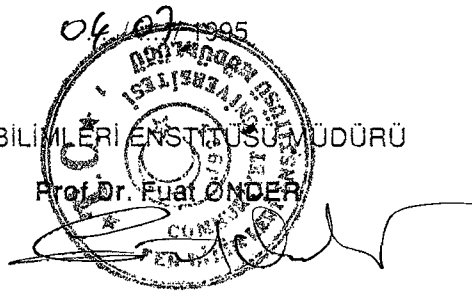
Üye :


ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Prof. Dr. Fuat ÖNDER





Bu tez, Cumhuriyet üniversitesi Senatosunun 05.01.1984 tarihli toplantısında kabul edilen ve daha sonra 30.12.1993 tarihinde C.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne hazırlanan ve yayınlanan "Yüksek Lisans ve Doktora Tez Yazım Kılavuzu" adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

Bu tezi Anadolu'nun iki çilekeş insanı olan rahmetli annem ve rahmetli babamın aziz hatıralarına ithaf ediyorum.

C. Uyan



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	IV
SUMMARY	V
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. ORGANİK BİLEŞİKLERİN AAS YOLUYLA İNDİREKT OLARAK TAYİN EDİLMELERİ	1
1.1.1. Tarihçe	1
1.1.2. Genel ilke	2
1.1.3. Uygulanan örnek türleri	2
1.1.4. Geliştirilen yöntemlerin genel değerlendirilmeleri	2
1.1.5. Metal reaktifleriyle oluşturulan ürünlerin genel tiplemesi	3
1.1.6. İndirekt AAS tayin yöntemlerinin sınıflandırılması	6
1.1.6.1. Çöktürme yöntemi	6
1.1.6.2. Ekstraksiyon yöntemi	7
1.1.6.3. Kimyasal zenginleştirme yöntemi	8
1.1.6.4. Redoks yöntemi	8
1.1.6.5. Direkt ölçüm yöntemi	9
1.1.6.6. Alevde girişim yöntemi	9
1.2. ANALİZ YÖNTEMİ GELİŞTİRİLEN İLGİLİ BİLEŞİKLER HAKKINDA BİLGİLER	10
1.2.1. Ticari ve farmasötik önemleri	10
1.2.1.1. Nikotin	10
1.2.1.2. Nikotinic asit	12
1.2.1.3. Nikotinamid	12
1.2.1.4. Niketamid	13
1.2.2. İlgili bileşiklerin bilinen AOAC ve diğer analiz yöntemleri	13
1.2.2.1. Nikotin tayin yöntemleri	13
1.2.2.2. Nikotinic asit ve Nikotinamid tayin yöntemleri	16
1.2.2.3. Niketamid tayin yöntemleri	17
1.3. AMAÇ	17

	Sayfa No
2. YÖNTEM VE TEKNİKLER	18
Yer ve Tarih	18
2.1. OPTİMİZASYON	18
2.1.1. Analiz Yöntemi İçin İlke Belirlenmesi / Ön Denemeler	18
2.1.1.1. <i>Nikotin, Nikotinamid ve niketamid için ilke belirlenmesi</i>	18
2.1.1.2. <i>Nikotinik asit için ilke belirlenmesi</i>	19
2.1.2. Ürünü Ayırma Yolu	20
2.1.3. Ürün Oluşturmada Reaktif ve Örnek Hacimleri	21
2.1.4. Reaktif Ekleme Sırası	21
2.1.5. Çökelek İçin Çözücü	22
2.1.6. Asitlik (PMA ile çöktürme yönteminde)	22
2.1.7. NA'lı Ürününün Çökmesine pH Etkisi	23
2.1.8. Cu (AC) ₂ Derişimi (NA analiz yöntemi için)	25
2.1.9. Final Hacim	26
2.1.10. Tütüne Uygulanmasında Örnek Hazırlama Yolu	27
2.2. NİKOTİN, NİKOTİNAMİD VE NİKETAMİD'İN İNDİREKT AAS VE KOLORİMETRİK YOLLA ANALİZLERİ İÇİN GELİŞTİRİLEN YÖNTEMLER	28
2.2.1. Yöntemin ilkesi	28
2.2.2. Araç ve gereçler	28
2.2.3. Reaktifler	29
2.2.4. Analiz yöntemi / işlemler	30
2.2.5. Nikotin tayini için tütün örneğine uygulanması	31
2.3. NİKOTİNİK ASİTİN İNDİREKT AAS VE KOLORİMETRİK YOLLA ANALİZİ İÇİN GELİŞTİRİLEN YÖNTEMLER	33
2.3.1. Yöntemin ilkesi	33
2.3.2. Araç ve gereçler	33
2.3.3. Reaktifler	33
2.3.4. Analiz yöntemi / işlemler	33
3. BULGULAR	36
3.1. Ayar Eğrileri	36
3.2. Geliştirilen Yöntemlerin Analitik Gösterge Değerleri	45
3.2.1. Duyarlık Tayini	45
3.2.2. Kesinlik Tayini	46
3.2.3. Doğruluk Tayini	47

3.3. Girişimler	48
3.4. İlgili Yöntemlerin Tütünde Nikotin Tayini İçin Sınanması	50
3.5. Renk Kararlılığı	50
3.6. Bileşiklerin Metal Eşdeğerleri / Stokiyometri	51
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	55
4.1. Duyarlılık	55
4.2. Kesinlik / Güvenirlilik	56
4.3. Doğruluk	57
4.4. Uygulanabilirlik / Seçicilik	58
4.5. Kararlılık	60
4.6. Madde Külfeti	61
GENEL SONUÇ	63
KAYNAKLAR	64

ÖZET
Doktora Tezi

**NİKOTİN VE BAZI FARMASÖTİK TÜREVLERİNİN İNDİREKT ATOMİK
ABSORBSİYON SPEKTROMETRİK VE KOLORİMETRİK YOLLA
ANALİZLERİ İÇİN YENİ YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

CEMALETTİN UYAN

Cumhuriyet Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç.Dr. Bora ERGENOĞLU

Bu tezde nikotin (Nic), nikotinamid (ND), niketamid (Nket) ve nikotinic asit (NA) bileşikleri için indirekt atomik absorbsiyon spektrometrik (AAS) ve kolorimetrik (kol) yolla ilkeleri kısmen ortak beş analiz yöntemi geliştirildi. Geliştirilen bu yöntemlerin iki ayrı orijinal yönü vardır, biri Nic dışında bu üç bileşik için ilk kez bir indirekt AAS yöntemi geliştirilmesi, diğeri ise Nic, ND ve Nket için fosfomolibdik asit (PMA)'nın, NA için ise bakır - II-asetat'ın ilk kez nicel amaçla çöktürücü reaktif olarak kullanılmalarıdır.

Geliştirilen bu yöntemlerde her bir bileşiğin kendi çöktürücüsüyle ayrı ayrı oluşturulan çökme ürünleri santrifüjlenerek ayrıldı ve (bozunarak) çözüldü. AAS yöntemlerinde, çözültide her bileşiğin kendi eşdeğeri metal, Mo veya Cu'nun absorbans (Abs) ları AAS'de okundu. Geliştirilen kolorimetrik yöntemlerde ise her iki çökme reaktifleriyle oluşturulan çökme ürünleri çözüldükten sonra farklı reaktifler eklenerek Mo mavisine oluşturuldu. PMA çöktürücüsünün kullanıldığı Nic, ND ve Nket ile ilgili çökme sonrası oluşturulan çözültiye sülfonik asit indirgeme reaktifleri eklenerek eşdeğer PMA, Mo mavisine indirgendir. Cu-NA çökme ürününü çözme sonrası çözültiye KCN ve PMA eklendi. NA eşdeğeri olan Cu'nun eşdeğeri PMA, Mo mavisine indirgendir. Her iki yolla oluşturulan Mo mavisine ait abs.lar 725 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu. NA için ayrıca bunun eşdeğeri Cu'nun NH₃ ile kompleksleşmesine dayalı bir yöntem daha oluşturuldu. Her bir bileşiğin ideal örneklerinde, geliştirilen bu yöntemlerin optimizasyonu, kullanılabilir aralığı (KA), duyarlılığı, kesinliği (standart sapma olarak), doğruluğu (yüzde hatâ olarak) ve birkaç yabancı madde için girişimi çalışıldı. Ayrıca Nic tayini için tütüne uygulanması ele alındı.

Anahtar Kelimeler: Nic ve Türevleri , İnd. AAS, İnd. Kol. Yöntem, Mo mavisine

SUMMARY
PhD Thesis
A NEW METHOD DEVELOPED FOR ANALYSING THE NICOTINE AND ITS
SOME PHARMACEUTICAL DERIVATIVES BY INDIRECT ATOMIC
ABSORPTION SPEKTROMETRIC AND COLOUROMETRIC METHODS
Cemalettin UYAN

Cumhuriyet University Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assistant Professor Bora ERGENOĞLU

In this work, although they all have some common principles in partial, five different methods have been developed for analysing the compounds the nicotine (Nic), the nicotinamide (ND), the niketamide (Nket) and nicotinic acid (NA) by indirect atomic absorbtion spectrometric (AAS) and colourometric methods. These developed methods have two originalities. The first is that an indirect atomic absorption spectrometric method has been developed for the first time to analyse all the compounds, except the nicotine, mentioned above. The second originality is as follows: The use of, as precipitant reactives, copper-II-acetate for the nicotinic acid and of phosphomolybdic acid (PMA) for the remaining three compounds with a quantitative purpose in the mind for the first time in the literature.

In these methods developed, precipitate products that have been formed separately for each compound have been separated by centrifuge and have been solved. In AAS methods, the absorbances of equivalent metals (Mo or Cu) for each compound have been measured by AAS. In the colourometric methods developed, having solved two types precipitant products Molybdenium blue has been obtained by following different ways for each type. By adding sulphonic acid reductive reagent into the solution that was obtained for Nic, ND and Nket for all of which the PMA precipitate is used equivalent PMA was reduced to the Molybdenium blue. After solving Cu-NA precipitate product KCN and PMA have been added into the solution. PMA which is equivalent of Cu, which is equivalent of NA was reduced of the Molybdenium blue. The absorbances for Molybdenium blue which was formed by two different ways mentioned above were measured by spectrophotometer at the wavelength 725 nm. Furthermore for NA a new method has been developed based on the complexitation of NH_3 with Cu, which is equivalent of NA. By employing ideal samples of these compounds, the optimisation of the methods developed, the linear calibration interval sensitivity, the precision (as standard deviation), the accuracy (as percentage error) and the interference for a number of foreign substances have been worked. Additionally two of these methods were applied to the tobacco for nicotine determination.

Key Words : Nicotine and its derivatives, indirect AAS, indirect colourometry, Molibdenium blue.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez, ortaya konulanın hacmine bakılarak tahmin edilen sürenin çok misli bedeliyle ortaya kondu. Buna neden, tez içerisinde yer almayan olumsuzlukla sonuçlanan denemelerin daha fazla zaman alması idi. Zaman kaybı gibi görülen bu durum karşısındaki tesellim, bir bilim adamının yetişmesinde bunların da katkı sağlayacağıdır. Henüz doktora tez başlangıcında olanlara şu düşüncemi iletmek isterim: Bir eserin ortaya konulabileceğine dair tek gösterge zamanla olan yarışı kazanma başarısı değildir.

Çalışmalarım sırasında AAS'ye çok gereksinim olmuştu. Üniversite sıralarından arkadaşım kimyager Salim Karakaya ait olduğu Atom Araştırma Kurumunun imkanlarından faydalanmam için bana çok yardım ve fedakarlıkta bulunmuştu. Şimdi hayatta olmayan bu arkadaşımı rahmet ve şükranla anarım.

Bana, tek başıma bağımsız araştırma yapma becerisini kazanmamda gerekli anlayışı gösteren danışmanım Yrd. Doç.Dr. Bora Ergenoğlu'na, bilgilerinden sıkça faydalandığım Doç.Dr. Mehmet Akçay'a, UV-VIS okumalarını yapan Arş.Gör. Ali Boztuğ'a, AAS gereksiniminde Divriği Demir ve Çelik İşletmelerinden faydalanmam için bana gerekli izni ve kolaylığı sağlayan Kimya Yük. Müh. Gürkan Tok'a, AAS'de Mo okumalarının tamamını yapan Kimya Müh. Nurgül Yanardağ'a, özetin ingilizce'sini yazmamda yardımcı olan Nihat Yıldız'a, tezin yazma işini yapan Bilim Grafik Dizgi bürosu çalışanlarına, tezdaki imla yanlışlıklarını düzeltmede yardımcı olan Arş. Gör. Hacı Bayram Zengin'e ve ayrıca adını belirtmediğim, teze tüm emeği geçenlere içten teşekkür etmeyi borç sayarım.

Cemalettin UYAN

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1 : Ortam asitliğinin çökmeye etkisi (PMA'lı çöktürmeli yöntemde)	23
Şekil 2 : Cu (AC) ₂ ve CuSO ₄ çözeltilerinin pH'larının derişimlerine bağılılığı	24
Şekil 3 : Cu(AC) ₂ derişiminin NA çökmesine etkisi	25
Şekil 4 : Nikotinin indirekt AAS yoluyla tayini için ayar eğrisi	26
Şekil 5 : Nikotinamid'in indirekt AAS yoluyla tayini için ayar eğrisi	36
Şekil 6 : Niketamid'in indirekt AAS yoluyla tayini için ayar eğrisi	37
Şekil 7 : Niketamid'in indirekt AAS yoluyla tayini için KH ₂ PO ₄ + Na ₂ MoO ₄ seçeneğıyle oluşturulan ayar eğrisi	37
Şekil 8 : Nikotinin indirekt kolorimetrik yolla analizi için ayar eğrisi	38
Şekil 9 : Nikotinamid'in indirekt kolorimetrik yolla analizi için ayar eğrisi	38
Şekil 10 : Niketamid'in indirekt kolorimetrik yolla analizi için ayar eğrisi	39
Şekil 11 : Nikotidik asitin indirekt AAS yoluyla tayini için ayar eğrisi	39
Şekil 12 : Nikotidik asitin Mo mavisini oluşturma yoluyla indirekt kolorimetrik tayini için ayar eğrisi (küçük final hacime göre)	40
Şekil 13 : Nikotidik asitin Şekil 12'deki koşullarda daha büyük final hacime göre final eğrisi	40
Şekil 14 : Nikotidik asitin amonyakla kompleksleşmeyi içine alan indirekt kolorimetrik yolla tayini için ayar eğrisi	41
Şekil 15 : Şekil 4 koşullarında Mo ayar eğrisi	41
Şekil 16 : Şekil 5 koşullarında Mo ayar eğrisi	42
Şekil 17 : Şekil 6 koşullarında Mo ayar eğrisi	42
Şekil 18 : Şekil 12 koşullarında Cu ayar eğrisi	42
Şekil 19 : PMA ile çöktürme yönteminde oluşturulan Mo mavisine ait spektrumlar	43
Şekil 20 : NA analizi için Cu ve KCN yoluyla oluşturulan Mo mavisine ait spektrumlar	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1 : İndirekt AAS organik analizde ürün tiplmeleri için bir genelleme	4
Çizelge 2 : Doğrudan kompleksleşmeyip başka bileşiğe dönüştürülerek indirekt AAS yoluyla tayin edilenler	5
Çizelge 3 : Tütün yapraklarının bileşimi	11
Çizelge 4 : Nikotin alkaloidleri (Başlıcaları)	11
Çizelge 5 : Reaktiflerin çöktürmede uygun eklenme sırası (soldan sağa) ve uygun hacimleri (ml olarak)	21
Çizelge 6 : NA'nın çöktürülmesinde Cu(AC) ₂ derişimleri ile harcanmamış Cu'ya ait absorbands değerleri	26
Çizelge 7 : Geliştirilen AAS yöntemlerine ait duyarlık ile ilgili bilgiler	45
Çizelge 8 : Geliştirilen kolorimetrik yöntemlere ait duyarlıkla ilgili bilgiler	45
Çizelge 9 : Bileşiklerin KA'daki eğimleri ile eşdeğer metal mol sayıları arasındaki ilişki	45
Çizelge 10 : Nic ve NA'nın spektrofotometrik analiz yöntemlerine ait bazı bilgiler	46
Çizelge 11 : Geliştirilen AAS yöntemlerinin kesinliği ile ilgili bilgiler	46
Çizelge 12 : Geliştirilen kolorimetrik yöntemlerin kesinliği ile ilgili bilgiler	47
Çizelge 13 : Geliştirilen AAS yöntemlerine göre yüzde geri kazanım ve hatanın belirlenmesi	47
Çizelge 14 : Geliştirilen kolorimetrik yöntemlere göre yüzde geri kazanım ve hatanın belirlenmesi	48
Çizelge 15 : UV spektrofotometrik ve geliştirilen ilgili yöntemlerin nikotin tayini için tütüne uygulanması	50
Çizelge 16 : İlgili bileşiklerin Mo ve PMA eşdeğerleri	53
Çizelge 17 : Nikotinic asitin Cu eşdeğeri	53
Çizelge 18 : İlgili bileşiklerin oluşturduğu çökme ürünleri için önerilen formüller	54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAS	: Atomik Absorbsiyon Spektrometresi
Abs	: Absorbans
Ac	: Asetat
AE	: Ayar Eğrisi
AOAC	: Association Of Analytical Chemists
bkz	: Bakınız
BSS	: Bağlı Standart Sapma
dk	: Dakika
Fin	: Final
FK	: Formül Kütlesi
GC	: Gaz Kromatografisi
KA	: Kullanılır Aralık
kol	: Kolorimetri (k)
M	: Metal
NA	: Nikotinic asit
NiA	: Nikotinat
Nic	: Nikotin
ND	: Nikotinamid
Nket	: Niketamid
NÖS	: Nicel Ölçüm Sınırı
PMA	: Fosfomolibdik asit
Org	: Organik
Spek	: Spektro(foto)metrik
s	: Standart Sapma
sf	: Sayfa
st	: Standart
UV	: Ultraviole
VIS	: Visible

1. GİRİŞ

Bu tezdeki geliştirilen yöntemler indirekt AAS ve kolorimetriye dayanıyor. Kolorimetri bilinen ve yaygın bir analiz tekniğidir. Rutin analizlerin çoğu bunu da içine alan fotometrik yolla olanlardır. Ancak kolorimetri ile ilgili iki farklı durum akla gelebilmektedir. Biri tayin edilen türe direkt veya dolaylı olarak dayalı olan bir rengin şiddetini çıplak gözle karşılaştırma yoluyla renk şiddeti-derişim arasındaki nicel ilişki kurulmasına dayanır. Diğeri ise tayin edilen türün direkt veya indirekt olarak neden olduğu görünür alandaki belirli bir dalga boyundaki absorbansın spektrofotometrede okunarak absorbans-derişim arasında nicel ilişki kurulmasına dayanır. Spektrofotometrelerin henüz analiz laboratuvarlarında pek görülmediği dönemlerde ilk tekniğin akla gelmesi doğaldır. Bazı rutin analizlerde hala bu tekniğe başvuruluyor ise de sonuçta önemini yitirmiştir ve kolorimetrik analiz denilince yukarıda bahsedilen ikinci teknik akla gelmelidir. Bu nedenle bu tezdeki ilgili kavram içinde ikinci tekniğin (VIS-spektrofotometrik yol) kastedildiği açıktır.

İndirekt AAS yolla analiz ise rutin analizlerde pek yer almayan, literatürdeki başlangıcı otuz yıl bile geriye gitmeyen farklılık ve yeniliğe sahip olduğu için bu alan hakkında bilgi verme gereği görüldü. Bazı indirekt AAS yöntemleri bir metalle kompleksleşmeyi içine alan bazı indirekt spektrofotometrik yöntemlere dayanır. Böyle olanlarda AAS'de abs. okunmasından ibaret final adımı dışında işlemler hemen hemen ortaktır. Fakat her AAS yöntemi böyle değildir. İleride 1.1.6'daki bilgiler daha yeni olan bu alanın yöntem çeşitliliğinde öbüründen daha fazla zenginliğe sahip olabileceği fikrini verecektir. 1.1.'deki bilgiler için daha çok Clark ve Ark (1984)'a ve Gargica ve Ark. (1983)'a ait organik bileşiklerin AAS yoluyla indirekt tayinleri ile ilgili makaleler esas alınmıştır.

1.1. ORGANİK BİLEŞİKLERİN AAS YOLUYLA İNDİREKT OLARAK TAYİN EDİLMELERİ

1.1.1. Tarihçe

"İlk olarak 1968'de Christion ve Feldman tarafından organik bileşiklerin ve inorganik anyonların AAS ile tayin edilebileceklerine işaret edildi. 1973'te Kirkbright ve Johnson tarafından bir inceleme makalesinde o ana kadarki durum özetlendi ve şu iki duruma dikkat çekildiği : 1) AAS'nin uygulama alanının genişletilmesi, 2) AAS'nin duyarlılık avantajından faydalanmak için indirekt AAS yöntemlerinin geliştirilmesi. Bundan sonra AAS yoluyla indirekt analizle ilgili daha fazla yayın görüldü. Bunlar arasında far-

masötiklere karşı özel bir dikkat ve ilgi vardı". Clark ve Ark (1984).

1984'te Clark ve Ark (1983) tarafından 1973-1983 arasındaki organik bileşiklerin indirekt AAS yoluyla analizi alanındaki çalışmaların bir eleştirel incelemesi yapıldı. Garcia ve Ark (1983) tarafından organik hemde inorganik türler için aynı amaçlı ve daha kapsamlı bir makale yayınlandı. Bundan sonra bu tür (eleştirel-inceleme) makale literatürde bir daha görülmedi. Bu alanda analiz yöntem çalışmalarını içine alan yayınlar yine senede 5-10 tane olacak şekilde sürdü. Peryodik dergi Analytical Chemistry'de bazı yıl ve sayılarında çeşitli zaman aralıklarında indirekt AAS yolla analiz (organik ve inorganik) ile ilgili çalışmaların (kendisi ve kendisi dışındaki dergilerde yer alan) listesi verilmiştir. (An. Chem. 1988; No: 5, 285 R 1984; No: 5, 133R 1986; No: 12, 237 R 1988; No: 12, 178R 1990; No: 12, 58R 1992). 1992'den sonra ise bu dergide ilgili yayın listesi-ne henüz rastlanmadı.

1.1.2. Genel İlke

Örnek hazırlandıktan sonra tayin edilecek organik bileşik ile bir metal reaktif arasında bir ürün oluşturulup , bu ürün çöktürme veya ekstraksiyon gibi uygun yolla ayrılır. Ayrılan kısımdaki metalin absorbansı AAS'de okunarak, ayar eğrisi (AE) derişim (org) - abs (M) oluşturulur.

1.1.3. Uygulanan örnek türleri

Farmasötik örneklere sıkça rastlanır. Bunun yanında bitkisel örnekler (özellikle bitkisel drogların etken maddesini tayin etmede), su örnekleri (atık, içme, endüstri ve deniz suları), kan, idrar, dışkı, serum, gübre ve hava örneklerine de rastlanır.

1.1.4. Geliştirilen yöntemlerin genel değerlendirilmeleri

Bu alanda geliştirilen yöntemlerin çoğu, araştırmacılar tarafından hızlı, duyarlı, kesin ve doğru olarak kabul edilmiştir. Doğruluk, geri kazanım olarak %95-105 arasında yoğunlaşır. Kesinlik bağıl standart sapma olarak %5'i pek geçmemektedir. Bu yöntemlerin çoğu, analiz sonuçları üzerinde rutin yöntemlerle uzlaşma üzerindedirler. Bazen üstünlük de sağlayabilirler, örneğin seçenek yöntem için gerekli bir donanım parçasını satın alma yükünü ortadan kaldırabilir veya diğerlerinin işleminden daha çabuk ve ucuz olabilir. Grafit fırınlı AAS metaller için daha düşük gözlenebilme sınırına veya yüksek duyarlığa sahiptir.

Bu üstünlüklerine rağmen indirekt AAS tayinlerinden sayılı birkaçı rutin analiz

olmuştur. Bunlardan biri antibiyotik olan kloramfenikol'ün Cd indirgeme yöntemiyle tayin edilmesidir. Bir diğeri idrar ve bitkisel örneklerde oksalik asitin CaC_2O_4 halinde çöktürmeye dayalı olarak tayinidir. Üçüncüsü gübrelerde biuret'in kuvvetli alkali ortamda Cu ile kompleksleşip harcanmayan Cu'nun $\text{Cu}(\text{OH})_2$ halinde çöktürülerek ayrılmasına dayanır. Az sayıda yöntemin rutin analizlerde yer alma nedeni bu yöntemlerin özgül olmayışlarıdır. Örnekteki birbirinden ayıramayan bileşiklerin aynı sınıfa ait olanlarının toplamını tayin eder. Muhtemel girişimler örnek bileşiminin bilinmesini zorunlu kılar. Yine bir kısmına ait sonuçlar rutin analiz sonuçlarıyla uzlaşmaz. Bu nedenle bunların bir kısmının uygulanabilirliği ideal örneklerle sınırlı kalmıştır.

Bunlara rağmen indirekt AAS yöntemlerinin çok daha başka yönleriyle dikkate değer olduğu söylenebilir. Organik iz analizin inorganik iz analize göre daha çok zorluklara sahip olduğu belirtilmiştir.

Ayırma işlemlerine yaygın olarak başvurma zorunluluğu ortaya çıkar. Bunun için kromatografik teknikler en tercih edilenidir. Ayırmayı spesifik olan final adımı izler. AAS'nın gaz kromatografisi (GC) de bir dedektör olarak kullanılması bu alanın dışındadır.

1.1.5. Metal reaktifleriyle oluşturulan ürünlerin genel tiplmesi

Bunun için şu genellemeler yapılabilir. Tayin edilen bileşik ait olduğu sınıfa göre ürün içinde iyonlaşmış olarak bazen de nötral ligant olarak yer alır. Bazılar bazik N atomuyla protonlanarak pozitif, asitler ise negatif iyonlaşır. Amfoterler ise en çok karboksil ucundan negatif olarak iyonlaşır bazik N atomu koordinasyona katılır. Bazı bileşikler ise doğrudan kompleks oluşturamaz veya oluşturamaz. Bunlar uygun kompleks oluşturabilecek, başka ürüne dönüştürülürler. Bu durum aynı sınıftan alt sınıfları farklı bileşiklerin, bir alt sınıfın özgül reaksiyonuyla birbirleri yanında indirekt AAS yoluyla tayin edebilme yolunu açabilir ki buna örnek sekonder aminlerin dietilditiyokarbamata dönüştürülerek öbür sınıf aminlerin yanında tayin edilebilmesidir. Cu ve Ni ile aminler karışım kompleksleştirilir. İlgili ürüne ait kompleks öbür komplekslerden ekstraksiyon veya çöktürme ile ayrılır. Oysa aminlerin doğrudan oluşturdukları komplekslerin alt sınıfları birbirinden ayrılmazlar.

Çizelge 1. İndirekt AAS organik analizde ürün tiplerini için bir genelleme (M: Metal, L: Ligant (Asitlerde ve fenollerde nötral) Fnt: Fenontrölin, Nkp: Neoküprain)

Genel Bileşik Sınıfı	Metal Reaktifi	Oluşan Metalli Ürün Tipi
Bazlar (B) Alkaloidler, aminler katyonik sürfaktanlar	ML_n^{m-} $Co(SCN)_4^{2-}$, $Zn(SCN)_4^{2-}$ $NH_4Cr(NH_3)(SCN)_4$ BiI_4^- , $PMo_{12}O_{40}^{3-}$ $Ni(SCN)_4^{2-}$	$(BHR)_m (ML_n)_r$ r bazik (N) atomu sayısı
Asitler (H_nA) Yağ asitleri Dikarboksilli asitler Hidroksi asitler Anyonik deterjanlar	M^{n+} , ML_n^{m+} Co^{2+} $Cu(Nkp)^+$ $Fe(Fnt)_3^{2+}$	MA_n veya MLA_2 CoA_2 $Cu(Nkp)_2A$ $[Fe(Fnt)_3]A_2$
Fenoller $Ph(OH)_n$	M^{n+} ML^{m+} (L nötral ligant) Co^{2+} , Cu^{2+} $Fe(Fnt)_3^{2+}$	$M(PhO)_n$ $ML_n(PhO)_n$ $Co(PhO)_3$ $[Fe(Fnt)_3](PhO)_2$
Amfoterler (Amf) Aminoasitler (AA) 8-Hidroksikinolin (HQ) EDTA (H_4Y), NTA	M^{2+} Cu^{2+} Cu^{2+} Cu^{2+} , N^{2+}	$M(Amf)_2$ $Cu(AA)_2$ $Cu(Q)_2$ MYL ?
Nötral Fenilasetilen Diğerleri	Değişik $AgNO_3$ Çizelge 2'de	Değişik $Ph - C = CAg$ Çizelge 2'de

Çizelge 2: Doğrudan ürün vermeyen başka bileşiğe dönüştürülerek indirekt AAS yoluyla tayin edilebilenler (BF: Batofenantrolin, Y.Ü: Yükseltgenme Ürünü)

Genel bileşik sınıfı	Reaksiyon veya dönüştürme	Metalli Ürün
di ve poli alkoller, şeker aldehyitler ve ketonlar	Yükseltgeme HIO ₄ Tollens (Ag) Fehling (Cu) belirteçleri	AgI ₃ , Cu ₂ O Ag, Cu ₂ O
Nitro Bileşikleri	Zn metali ile indirgenme ve ürünü Tollens belirteciyle yükseltgeme	Ag
Esterler ve asit anhidritleri	Hidroksamik aside dönüştürme (HIA)	Fe(HIA) ₃
Biasetil	Dimetilglikosim (H ₂ Y)'e dönüştürme	Ni(NY) ₂
Primer aminler (1), Histidin, metionin(1)	Shiff Bazları'na dönüştürme (SB)	Cu (SB) ₂ X ₂ ?
Sekonder aminler(1)	Dietilditiyokarbamat'a dönüştürme (DTK)	Ni(DTK) ₂ Cu (DTK) ₂
CS ₂	DTK'a dönüştürme	Cu(DTK) ₂
Folik asit (B ₉ vitamin)	MnO ₄ ⁻ ile yükseltgeme	[Ni (BF) ₂] (Y.Ü.) ₂

(1) Bunlar için doğrudan kompleksleşme yoluyla da indirekt AAS tayin yolu mevcuttur (Çizelge 1).

Çizelge 1'de gösterilen bileşikler, ürün tiplmesi için yapılan genellemeye kolay uyabilen temel sınıflardır. Daha karmaşık yapıya sahip, özellikle farmasötik bileşikler bu genellenenin dışına çıkabilirler. Örneğin amfoter bir bileşik olan benzil penisilin (BP), Çizelge 1'deki iki dişli ligant gibi davranan amfoterler gibi değilde asitlerin oluşturduğu tipte ürün oluşturur, Cd(Fnt)₂²⁺ ile [Cd (Fnt)₂] (BP)₂ oluşturur. (Gösterilen üründe BP'nin daha basit yapıları amfoterlerin aksine ligant olmadığı tahmin edilebilir. Fnt 2 dişli Cd²⁺ 4 koordinasyonludur).

1.1.6. İndirekt AAS Tayin Yöntemlerinin Sınıflandırılması

Yöntem sınıflaması şu esasa dayanır. Her tür işlemin de olabileceği bir yöntemde AAS'de absorbansı okunan metal okuma öncesi hangi işlemle doğrudan ilişkili ise bu işlemin adı yöntem sınıfının adını oluşturur. Bu yöntemler altı farklı sınıfa ayrılır: 1) Çöktürme 2) Ekstraksiyon 3) Zenginleştirme 4) Redoks 5) Direkt ölçümler 6) Alevde girişim yöntemi

1.1.6.1. Çöktürme Yöntemi

AAS'de okunan metal ilgili bileşik ile çözünmeyen bir ürünü oluşturduğu ve bunun süzme veya santrifüjleme ile ayrılabilirdiği durumlar bu ayırma yöntemini oluşturur. Ayrılan çökelek uygun bir çözücüde çözülüp eşdeğer metalin veya süzüntedeki harcanmayan metalin absorbansı AAS'de okunur. İnorganik anyonlarla ilgili $BaSO_4$ gibi bazı çökelekler alevde refraktör oluşturur ve metal atomlaşmaz. Bu durumda süzmeye gerek kalmayıp karışım aleve doğrudan verilebilir. Organik türler için ise bu tür basitleştirme işleminin söz konusu edildiği görülmez.

Uygulamalarda, ürün tipleri ile uygulanan ayırma yolu (çöktürme ve ekstraksiyon) arasında bir ilişki kurulabilir mi? Ürün oluşumunda $AgIO_3$ gibi bir inorganik çökme ürünü oluşuyorsa, bu durumlarda çöktürmeyle ayırma görülür. Oluşan ürün eğer kompleks ise (nötral veya iyonik) ve çökelek oluştursa da hemen bunun çöktürmeyle ayrıldığı söylenemez. Buna örnek aynı tipteki $Cu(DTK)_2$ ve $Ni(DTK)_2$ gibi nötral kompleksler gösterebilir; ilki ekstraksiyonla, diğeri çöktürmeyle ayrılır. Bu konudaki yol ayrımı, kompleksin suda çözünürlüğü ve ilgili organik çözücü(ler)de çözünmesine dayanır. Kompleksler için çoğunlukla ekstraksiyonla ayırma yöntemi uygulandığı görülür.

Çöktürme işleminin olduğu fakat çökenin oluşturulan kompleks olmadığı ilginç bir ayırma yöntemi daha vardır. Bu yöntemde kompleks değil, harcanmayan fazla metal çözünmeyen bir tuzu halinde çöktürülerek birbirinden ayrılıyor. Amino asitlerin ve biüre'nin Cu ile kompleksleşerek tayininde, harcanmayan Cu ilkinde fosfatı halinde diğerinde hidroksiti halinde çöktürülerek kompleksten ayrılır.

Çöktürme yöntemi için en sık kullanılan metal iyonları Ag, Cu ve Ni'dir. Ne varki, özellikle Ag'nin kullanıldığı yükseltgenme ve indirgenme işlemlerinin uygulandığı türler için bu yol özgül değildir. Cu ve Ni'in kullanıldığı kompleksleşmelerde de gerçek

örneklerden girişim gelebilir.

Yine içinde çöktürmenin yanısıra adsorbsiyonun olduğu farklı bir yöntemle de rastlanmıştır. İyonik olmayan yüzey aktif bileşiklerin Ba-molibdofosfat'ın üzerinde adsorbanlanması sonucu çökelekteki eşdeğer Mo absorbansı AAS'de okunarak tayin ediliyor. Bu yöntem çökeleğin stokiometrik olmayan ve çok bileşenli sisteme sahip olduğu için, her bir set için bir deneysel etken tayin edilme gereği duyulması karmaşıklığa neden olur.

1.1.6.2. Ekstraksiyon yolu

Oluşturulan ürün $[ML_n]$ veya $[ML_nX]$ tiplerinde yüksüz kompleks veya $[ML_2]X_m$ veya $(BH_u)_m [ML_n]_u$ tiplerinde iyonik (ion-association) kompleksi ise genellikle uygulanan ayırma yolu uygun bir organik çözücüyle ekstraksiyon yoludur. Çöktürme yolunun uygulandığı ürünler arasında bu tip ürünlere rastlansa da bu tipler için akla gelen ilk ayırma yöntemi ekstraksiyon yoludur. Ekstrakte edilen ürün içinde metalin absorbansı ekstrakt AAS'ye verilerek okunur. Seçenek olarak sulu faz içinde kalan etkileşmemiş metalin absorbansı yardımıyla organik tür tayin edilir.

Bu yöntemde, ilgili organik türün oluşturduğu ürün ekstrakte edilmektedir. Bu genellemenin dışına çıkan ekstraksiyon yöntemine de rastlanmıştır. Bunda ilgili organik tür başka bir metal kompleksinin ekstraksiyonunda maskeleyme girişimi yapar. Ekstrakte edilen metale ait AAS'deki absorbans azalması, sulu fazdaki organik analitin derişimiyle doğru orantılıdır. Buna örnek, EDTA'nın Cu-Oksinat kompleksinin MIBK fazına ekstraksiyonunu maskeleyme etkisiyle tayin edilmesidir.

Kullanılan metaller ve metal kompleks reaktifleri Çizelge 1'de verilmiştir.

Ekstraksiyon için organik çözücü olarak ketonlar, esterler, alkoller, eterler, alifatik ve aromatik hidrokarbonlar ve nitro bileşikleri kullanılabilirler. Bazı çözücüler toksik ürün vermeleri nedeniyle alevli AAS'de sınırlı kullanılabilirler. Böyle durumlarda elektrotermal atomizasyon prosesli AAS'ler üstünlük sağlar, çünkü çok küçük miktarlar kullanıldığından kolay uzaklaştırılır. Clark ve Ark (1984) tarafından alevli AAS'de organik çözücü kullanılması halinde metal tayinlerinin, buradan da organik bileşiklerin tayinlerinin duyarlılığını artırdığı ifade edilmiştir (buradaki duyarlılık doğru eğimi olmalıdır). Bu durum, Mo gibi atomizasyonu güç metallerin absorbansı okunurken veya kompleks içinde me-

tal/ (organik tür) mol oranının düşük olduğu durumlarda daha faydalıdır. Fakat organik çözücünde alevli AAS ile metal absorbanı okunurken, pek değinilmeyen bir sorun vardır, enstrüman koşulları sulu faz koşulları ile aynı olduğunda absorbansta aşırı derecede sapmalar görülür. Bu durum, enstrümanın parametrelerinin absorban kararlılığı için optimize edilmesiyle giderilebilir. Ancak bunu yapabilmek bilgi ve deneyim gerektirir ve çok zor bir iştir.

Bu ayırma yolunu içine alan yöntemlerin çoğu hızlı ve duyarlıdır, fakat çoğu kez özgül değildirler. Çoğu hallerde kromotografi veya iyon-değıştirme yoluyla bileşenlerin ayırımı salık verilir.

1.1.6.3. Kimyasal Zenginleştirme Yöntemi

Bu yöntemler gerçekte çöktürme ve kompleksleşme yöntemlerinin bir alt sınıfıdır. Bu tayin yöntemi ilgili türün, metal/tür mol oranı yüksek bir bileşige dönüştürülmesine dayanır. Heteropoli asitler bu amaç için kullanılır. Fosfomolibdik asit bir heteropoli asit olarak strikinin, brusin ve kinolin gibi bazı alkaloid ve bazların tayininde kullanılmıştır. Kinolin (B) tayininde oluşturulan ürün (BH₃) [PMo₁₂O₄₀] olup. Mo/B mol oranı 4/1'dir. Mo, eğer burada da öbür komplekslerde genellikle görülen 1/1, 1/2 oranlarında olsaydı zor atomlaşması nedeniyle tayin yapılamazdı veya duyarsız olurdu. İlgili oranın yüksek olması bu dezavantajı giderir.

1.1.6.4. Redoks Yöntemi

Bu yöntemde AAS'de absorbanı okunan metal, ilgili türle doğrudan veya dolaylı olarak yükseltgen veya indirgen olarak etkileşir. Bu yöntemde bir (bazen iki) redoks olayı vardır. Fakat redoks olayının olduğu her analiz, bu yöntem sınıfına dahil edilmez. Örneğin, çöktürme yönteminde verilen örnekte polialkollerin tayininde yükseltgen, AAS'de absorbanı okunan Ag değil, HIO₄ olduğundan bu yöntem sınıfında gösterilmez.

Redoks yöntemi için verilen genel bir örnek, bir antibiyotik olan kloromfenikol ve esterlerinin farmasötik örneklerde Cd metaliyle indirgeme yoluyla tayin edilmesidir, yükseltgenme ürünü Cd²⁺'nin AAS'de absorbanı okunur. Aynı bileşigin redoks yöntemiyle daha karışık bir seçenek tayin yöntemi vardır; bileşikteki nitro grubu Zn metaliyle indirgenerek sübstitue hidroksilamin verir, bu da Tollens belirteciyle etkileştirilerek Ag

indirgenir. Ayrılan metalik Ag nitrik asitte çözümlü AAS'de absorbanı okunur. Daha üstün olduğu ileri sürülen Cd yöntemi öbür AOAC yöntemlerle tutarlılık göstermekte olup AOAC yöntem olarak da kabullenilmiştir.

1.1.2.5. Doğrudan Ölçüm Yöntemi

Bazı organik türler metal içerirler ve bu nedenle AAS ile doğrudan tayin edilebilirler.

Siyanokobalamin (Vlt B₁₂) tayini bu yöntemle bir örnektir. Öteki uygulamalardan farklı olarak ayar eğrisi metale Co'ya göre oluşturulup, elektrotermal atomizasyonlu AAS'de 0-3 ng/ml aralığında türetilmiştir.

Bir diğer örnek bitkisel yağlarda sabunlaşma sayısı tayinidir. 3-1000 ppm arası Na-oleat'a göre ayar eğrisi oluşturulmuştur.

Dimetilselenik asit (deniz suyunda), trimetilselenyum iyonu, organometalik Hg, Sn ve Sb bileşiklerinin tayinleri de bu yöntemle yapılabilmektedir.

Bu yöntemlerde en büyük hata kaynağı ilgili bileşik dışında, bir diğer metal kaynağı olmasından ileri gelir.

1.1.2.6. Alevde kimyasal girişimler yöntemi

Bu yöntemde sıvı fazda bir ürün veya etkileşme söz konusu değildir. AAS alevinde ilgili tür ile metal arasında etkileşme, metalin absorbsiyon sinyalini bastırma veya artırmaya neden olan kimyasal etkileşmelerdir. Fakat bu kimyasal etkileşmelerin ne olduğunu da mutlaka bilmek gerekmez, çünkü analiz yöntemi ilgili türün derişimi ile derişimi sabit metalin AAS'deki absorbanının farkına dayanır.

Bir örnek, glikoz oksidaz ve ribonükleaz gibi proteinlerin kütlece yüzde 2.5×10^{-4} 'ten daha düşük derişimlerde 4.6×10^{-4} M derişiminde Ca ile tayin edilmesidir. Protein derişimiyle absorbanı sinyali azalır. Etkileşme mekanizması çok karışıktır.

Bir diğer örnek bazı azotlu bileşiklerin Zr sinyalini artırmasına dayalı tayin yöntemidir. Alifatik ve aromatik aminler ve amino asitler bu yolla tayin edilebilmiştir. Sinyaldeki artışın nispeten kolay uçucu Zr-N bağları içeren ve kolayca atomlaşan bileşiklerin oluşumuna bağlanabileceği ifade edilmiştir.

1.2. ANALİZ YÖNTEMİ GELİŞTİRİLEN İLGİLİ BİLEŞİKLER HAKKINDA BİLGİLER

1.2.1. Ticari ve Farmasötik Önemleri

1.2.1.1. Nikotin

Nikotin Çizelge 3'te gösterilen kendi adıyla anılan alkaloid ailesinin bir üyesi olup tütün yapraklarında major alkaloid olarak ve sitrat ve oksalat tuzları veya kompleksleri halinde bulunur. Nikotin renksiz, kaynama noktası 248 °C olan, kıvamlı, çok zehirli bir sıvıdır. Hava ve güneş ışığından etkilenir. Tıpta sinir sistemi uyarıcı (Stumulant) felce karşı (Paralizant) kullanılır, ayrıca nikotin sülfat dış parazitlere karşı da kullanılmıştır. Sentezi yapılabilmiş olsa da bu yolun ticari bir önemi yoktur. Nikotinin tütündeki oranı tütün veya sigara kalitesini belirleyen önemli bir etken olarak bilinir. Fakat tütünün değerlendirilmesi için üzerinde çok durulmaya değer bir konu vardır. Nikotinic asit (NA)in farmasötik türevlerine Chemical Abstract'da onlarca rastlanır. NA ise %85'e kadar varan yüksek verimlerde nikotin'in yükseltgenmesiyle elde edilebilir. Nikotin tütünde bazı türlerinde üretim açısından yüksek denebilecek %5'e kadar varan bir oranda bulunur. Bu nedenlerle tütün, farmasötik madde üretiminde iyi bir hammadde olur. Rusya ve Hindistan tütünü nikotin sülfat üretimi için değerlendirmektedir. Ticari olarak nikotinic asit Dünyada genellikle kinolin ve β substitue piridinlerin yükseltgenmesi yoluyla elde edilmektedir.

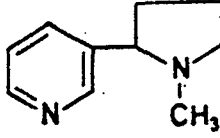
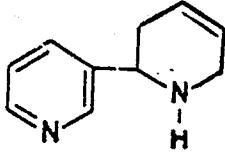
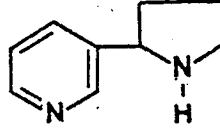
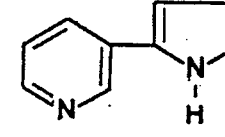
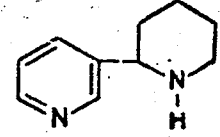
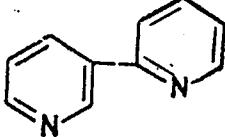
Türkiye'de tütün ihtiyacın çok üzerinde üretilmektedir. Hükümetler, yerine yeni iş olanakları sağlayamadıkları için katı bir caydırıcılıkla tütün üretimini kontrol altına alamamakta ve üreticiden alınan tütünün önemli bir kısmı yakılarak imha edilmektedir. Bu da bütçeyi büyük zarara sokup, emek kaybına yol açmaktadır. Tütünü nikotinden başka ticari amaçla değerlendirmeye yarayacak başka bileşikler de vardır. Bunlar, malik asit (%3-3.5), sitrik asit (%0.6-5); oksalik asit (%2-3) ve proteinler (%12-17) dir. Ayrıca %0.1-0.9 oranında bulunan izoproneoid bir alkol olan ve farmasotik amaçla değerlendirilen solanesol adında bir bileşik daha vardır. Nikotini alınmış tütün iyi bir protein kaynağıdır veya hayvan yemi (küspe) üretiminde de kullanılabilir. Bütün bunlar göz önüne alınırsa şu rahatça ileri sürülebilir: Dünyada, tütünü farmasötik ve başka amaçla bileşik üretimi için değerlendirilmesi gereken ilk ülke Türkiye'dir. Farmasötik madde üretimi için işlendiğinde tütünün, dolayısıyla nikotin analizlerinin önemi daha da artacaktır.

Çizelge 3: Tütün yapraklarının ortalama bileşimi (S.Aksu, 1967).

Bileşikler	Kuru madde üzerinden (%)
Kül (inorganikler)	12.0 - 14.0
Kaba lifler	10.0 - 9.5
Pektinler	2.0 - 3.0
Uçucu yağlar, vaks ve parafinler	7.5 - 7.0
Polifenoller, fenolik asitler ve türevleri, tanenler	2.0 - 2.5
Oksalik, sitrik ve malik asitler	13.0 - 13.0
Proteinler	12.2 - 17.3
Suda çözünen N bileşikleri, (Alkaloidler, NH_4^+ , NO_3^- , aminoasitler, amidler)	3.3 - 6.7
Dinamik karbonhidratlar, (şekerler nişasta ve dekstrin)	23.0 - 3.0
Tanınmamış bileşikler	8.0 - 17.0

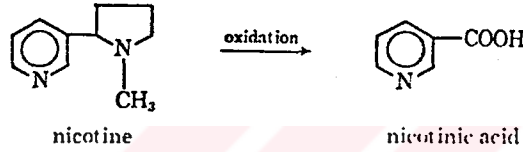
Çizelge 4: Nikotin alkaloidleri (başlıcaları)

(Tütündeki oranlar genellikle yukarıdan aşağıya düşer)

Adı	Yapı Formülü	Adı	Yapı Formülü
Nikotin		Anatabin	
Nornikotin		Miosmin	
Anabasin		2,3'-Dipiridil	

1.2.1.2. Nikotinik Asit (Niacin)

Nikotinik asit (3- piridinkarboksilik asit) beyaz renkte, iğne veya toz kristalleri halinde, suda oda sıcaklığında yaklaşık %1.5 (w/V) oranında çözünen bir bileşiktir. Alkolde biraz daha az olmak üzere çözünür, eterde ise çözünmez. 235-237°C'de bozunmadan sublimasyon yoluyla erir. Bitkilerdeki oranı genellikle önemsizdir. Maya ve bazı hayvan karaciğerlerinde 40 mg/100 g'a kadar varan yüksek oranlarda bulunur. İlk defa Huber adlı Alman kimyacı tarafından 1867'de nikotin'in $K_2Cr_2O_7$ ile yükseltgenmesi yoluyla sentezlenmiştir:



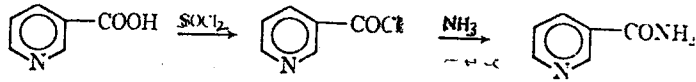
Bunun bir vitamin olduğu ise 70 yıl sonra anlaşılmış ve ondan sonra buna niacin denmiştir. Sentezi yapılan ilk vitamindir. Vücutta NA, ND'ye dönüşebildiğinden ND yerine NA'da alınabilir.

NA, PP faktörü (pellagra önleyici) olarak Akotin, Niconacid, Niconipca, Nicyl gibi çeşitli ticari isimlerle bilinir. NA ve ND vitamin B₃ olarakta NAD ve NADP sentezlerinde önemli rol oynar. Günlük NA ihtiyacı 12-25 mg'dır. NA klinik amaçlı olarak kolesterol düşürücü, diş tedavisinde (antiadenojik), spazm önleyici (spazmolitik) ve damar genişletici (vazodilatör) olarak da kullanılmıştır. Endüstride korozyon önleyici olarak ve çinko kaplamada da iyi sonuçlar elde edilmiştir (Kırk ve Othmer 1970a).

NA ve türevleri geniş kapsamlı olarak klinik araştırmalarda kullanılmaktadır.

1.2.1.3. Nikotinamid (niacinamid)

Bu bileşik NA'nın bir amidi olup ticari olarak aşağıdaki şekilde sentezlenir:



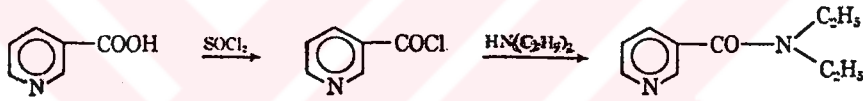
Beyaz kristalin bir tozdur, suda çok çözünür (1 g/1ml), alkolde (1 g/1.5 ml) ve diğer org çözücülerin çoğunda çözünür. 131-132°C'te erir. ND veya niacinamid vücutta çok kolay emilir. Vücutta hücrelerde riboz ve fosforik asidiyle bağlanarak nükleotid oluş-

turur ve bunun da adenilik asitle bağlanmasıyla, hidrojen aktarıcı enzimlerin koenzimleri NAD ve NADP'yi meydana getirir. Bu nedenle NA gibi B₃ vitamini olarak isimlendirilir.

Pallegra hastalığına tutulmuş insanlarda ND'nin eksikliği kesin olarak saptanmıştır. Bağırsakta bakteriler tarafından bir miktar nikotin amid yapılmaktadır. Bazı bitkisel ve hayvansal gıdalarda oldukça vardır. ND ayrıca pantotenik asit ve resorsinal ile karışık olarak tüberküloz tedavisinde ve kafa derisi enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmıştır (Kırk ve Othmer 1970b ve H. Keskin, 1981).

1.2.1.4. Niketamid

Niketamid (N,N-dietilnikotinamid veya niacin dietilamid) oda koşullarında viskoz bir sıvıdır, soğukta kristalleşir. Su ve organik çözücülerle karışır. Ticari adı coramine'dir. NA'nın dietilaminle amidasyonu ile sentezlenir.



Merkezi ve sinir sistemi üzerine uyarıcı etkilere sahip sentetik bir ilaçtır. Şizofrenide şok tedavisinde morfin ve barbituratların aşırı dozuna karşı kullanımı faydalıdır. Kullanılan doz oral olarak veya kas içine veya damara verilmek üzere %25'lik çözeltisinden 1-5 ml'dir. Nket tıpta başka etkileri için de kullanılır (Kırk ve Othmer 1970c).

1.2.2. İlgili Bileşiklerin Bilenen AOAC ve Diğer Analiz Yöntemleri

1.2.2.1. Nikotin tayini yöntemleri

Tütünde nikotinin nicel tayini, araştırmacılar için büyük ilgi odağı olmuştur. Bunun nedeni 1.2.1.1.'de değinilen nikotin'in önemi ile ilgilidir. Nikotin tayini için geliştirilen yöntemler yaklaşık 100 yıl önceden başlamıştır. Bu ilgi zamanımıza kadar sürmüştür. 1976-1981 arası beş yılda bu konuda yirmiye yakın makale yayınlanmış olup bu sayı 1882-1975 arası doksanüç yıldakine neredeyse yakındır. Yüksek performanslı kromatografiler gibi geliştirilmiş enstrümanların analitik kimya araştırmalarında yer almasıyla bu ilginin yoğunluk kazandığı söylenebilir.

Nikotinle ilgili geliştirilen gravimetrik yöntemlerden bir kısmı nikotinin organik türevlendirilmesine dayalı veya nikotin yapısında yer alan kısımların tayinidir. Bunlardan ilki 1929'da Chattaway ve Ark. tarafından nikotin tetrakloriyodür'e dönüştürme yöntemi

midir. Diğeri, 1934'de Wenisch tarafından klorodinitrobenzenle etkileşimi yoluyla piridinli grupların, p-dimetilaminabenzaldehit ile etkileşimi yoluyla pirol kısmının ve kinonla etkileşimi yoluyla iminometil gruplarının tayinidir (Ayad ve Ark 1985).

Nikotin alkaloidlerini çözünmeyen tuzları halinde çöktürmeye dayalı iki gravimetrik yöntem vardır. İki 1909'da Bertrand ve Ark. tarafından geliştirilen ve bunun 1911'de Chapin'e ait bir modifikasyonu silikotungstik asit yöntemidir. Bu yöntem 24-48 saat zaman alır ve amonyak veya amonyum tuzları pozitif hatalara neden olur (Willits ve Ark 1950). Bu yöntem Association of Analytical Chemists (AOAC) yöntemleri içinde yer almaktadır (AOAC 1990a). Diğere gravimetrik yöntem 1927'de Pfyl ve Ark tarafından geliştirilen dipikrat yöntemidir. Bu yöntem de çok zaman alır ve pikrat tuzunun çözünürlüğü nedeniyle negatif hata içermektedir (Willits ve Ark 1950).

İlk titrimetrik yöntemler 1882'de Kissling ve Ark, 1901'de Toth ve 1934'te Garner ve Ark tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemler destilasyon, ekstraksiyon veya bu işlemlerin kombinasyonuyla ayrılan nikotinin titrasyonuna dayanır. Fakat nikotin farkedilemez, ortamdaki mevcut bütün bazların toplamı tayin edilmiş olur (Willits ve Ark 1950). AOAC yöntemler arasına giren bir titrasyon yöntemi 1955'te Cundiff ve Markunas tarafından geliştirilen perklorik asit ile susuz ortam titrasyonudur. Titrant (HClO_4) ortamı asetik asit, analit (Nic) ortamı ise benzen - kloroform ekstraktından oluşur. Kristal violet indikatörünün kullanıldığı bu yöntemde toplam alkaloid nikotin olarak, tersiyer alkaloid yine nikotin olarak, sekonder alkaloid nornikotin olarak hesaplanarak belirlenir (AOAC 1990b).

1939'da Markwood tarafından bir kolorimetrik yöntem geliştirildi, nikotin 2-naftilamin-siyanogen bromür ile kompleks oluşturmaya dayalı bu yöntem, nisbeten çabuk olmasına rağmen özgül olmadığından çok sayıda diğere bileşik pozitif girişime neden olur. Bir diğere kolorimetrik yöntem 1939'de Hoffman tarafından silikomolibdik asitle çöktürmeye ve ürünü indirgemeye dayalı renk karşılaştırma yoluyla geliştirildi (Thomas ve Ark 1980a).

Tütünde nikotin tayini için analiz süresini kısaltan adımlar atılmış bunun için 1939'da Avens ve Ark tarafından mikro, 1948'de Griffith ve Ark tarafından yarı mikro da-

mıtma teknikleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler örnekleme, köpürme ve kullanılan düzektenden gelen değişik kaynaklı hataları içerir (Willits ve Ark 1950).

Willits ve Ark (1950) tarafından ilk UV spektrofotometrik yöntem geliştirildi. Bu yöntem ilk spektroskopik yöntem olması yönüyle farklıdır ve AOAC nikotin yöntemleri içinde ve etkinliği en fazla olan spektrofotometrik yöntem buna dayanır (AOAC, 1990a). Ancak bu yöntemde özgül değildir ve toplam alkaloid nikotin cinsinden verilir. Bu yöntemde nomikotin'in molar soğurganlık katsayısındaki yüzde on fazlalığın ihmali ve ortamdaki diğer bileşiklerden gelen pozitif girişimler nedeniyle az da olsa pozitif hata içerir.

Nikolin ve Ark (1969) tarafından bir IR yöntemi geliştirildi. Bu yöntemde N-CH₃ bağının titreşimine ait absorbans ölçülür. Bu bağın olduğu yerde N-H bağına sahip olan nomikotin absorpsiyon yapmaz, yöntem nikotin için yine de özgül değildir.

İndirekt spektrofotometrik yolla başka yöntemler de geliştirildi. Mahmoud ve Ark (1975) tarafından asitli tütün ekstraktında nikotinin metiloranj ile kenetlenme ürünü-nün kloroform fazına ekstraktlanmasına dayanan bir yöntem geliştirildi. 1982'de Matsuoka ve Ark tarafından Tropaeolin OO veya calcon ile kompleksleştirmeye dayalı yukarıdakine benzer bir yöntem geliştirildi (Chemical Abstract 1982).

M. Atkinson ve Ark (1984) tarafından kırılma indisi ölçümüne dayalı bir spektropolarimetrik yöntem geliştirildi. 1976'da Pastor ve Ark. tarafından bir potansiyometrik, 1980'de Moskatore ve Ark. tarafından polarografik bir yöntem geliştirdi (Ayad 1985).

Literatürde yer alan tek indirekt AAS yöntemi M.Ayad ve Ark (1985) tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemde nikotin, Cu, Zn, Pb ve Hg gibi metallerle ML₂ şeklinde bir kompleks oluşturularak çöktürülür. Santrifüj sonrası çözölen çökelekteki metalin veya süzöntüde harcanmamış metalin absorbansı AAS'de okunur. Bu yöntem %98-99 geri kazanıma ve 1-10 mg tayin aralığına sahiptir. Tütünde toplam alkaloid nikotin cinsinden verilir.

Görölüyor ki geliştirilen bu yöntemlerin hiçbirisi nikotin için özgül değildir, hemen hepsinde toplam alkaloid nikotin olarak verilir. Nikotini ayırdeden kromotografik yöntemler çok daha yenidir. Ayad ve Ark (1985) tarafından bu alanın ilkleri olarak refere edilen nikotin analizleri 1975'de TLC, 1980'de biyolojik sıvılarda nikotinin GC yoluyla

tahmini, 1981'de HPLC yöntemleridir. AOAC yöntemleri arasında kromatografik tekniklerle nikotin tayinine tütün örneği için rastlanmamıştır. GC yoluyla nikotin tayinine, filtrelili sigara ağızlığı (AOAC, 1990c) ve çevresel sigara dumanı (AOAC, 1990 d) örneklerinde rastlanmıştır.

Bu bahsedilenlerin dışında literatürde görülenler bunlardan bir kısmının modifikasyonudur. Vries ve Ark (1976) tarafından geliştirilen UV spektrofotometrik tam otomatik tayin yöntemi bu türdendir. Tütünün dışındaki örneklerde, tütün dumanında (sigara ve çevresel) nikotin tayini UV-spektrofotometrik (Anders ve Ark, 1958) ve GC yöntemine (AOAC 1990d) dayanır. Diğer tür örnek bazı sebze ve meyvelerde ise UV spektrofotometrik yöntemine dayanır (AOAC 1990e) . Tütün dumanına ait örnek hazırlanması özel aygıt gerektiren farklı işlemleri içine alır (Anders ve Ark 1958).

1.2.2.2. *Nikotinic asit ve Nikotinamid tayin yöntemleri*

NA ve ND tayinleri, vitamin preparatları, ilaçlar, bazı tahıl ve besin gibi örneklerde görülür. NA ve ND tayini yöntemleri nikotininki gibi zenginlikte değildir. Bunlar için özgül yöntemlere pek rastlanmaz. Çoğu kez ikisinin toplamı tayin edilir, sonuç NA cinsinden ifade edilir. NA+ND için ilk görülen yöntemlerden biri 1944'de görülen mikrobiyolojik yöntemdir, bu yöntem duyarlı olmasına rağmen çok zaman alır ve doğrusal olmayan bir ilişki verir (Bellion 1968). Bu yöntem AOAC yöntemleri arasında da yer alan bu yöntemde titrimetrik ve kolorimetrik yöntemler kombine olmuştur (AOAC, 1990ı) NA+ND için 262 nm'de absorbans ölçümüne dayalı bir UV spektrofotometrik yol mevcutsa da bunda 240-290 nm arası absorpsiyon yapan protein ve nükleik asitlerin ortamda olmaması gerekir, ayrıca bu yöntem pH değişimine karşı çok duyarlıdır.

NA+ND tayini için etkinliği en fazla olan bir yöntemin esası Konik reaksiyonuna dayanır, bunda CNBr ile pridin halkası etkileşerek renkli reaksiyon ürünleri verir. Ortam pH'ına da bağlı olarak bazı dalga boylarında absorpsiyon yapar. Mueller ve Ark. ait 1947'de görülen bir yöntem buna dayanır (Bellion 1968). Bellion (1968) tarafından farklı pH'un kullanıldığı bunun bir modifikasyonu geliştirildi. Bunlara dayalı AOAC yöntemlerinde ilaç ve besin örneklerinde $Ca(OH)_2$ ile otoklavda yüksek sıcaklıkta hidroliz sonucu ND, NA'ya dönüştürülür, her ikisinin toplamı tayin edilir, sonuç NA olarak verilir (AOAC,

1990 j). Aynı temele dayalı iki otomatik yöntemle biri tahıllarda (AOAC, 1990 k) diğeri ilaç ve besinlerde (AOAC 1990 l) NA+ ND tayin edilir.

ND'yi multivitamin preparatlarında, kendisininin üç katı derişimdeki NA yanında tayin edilebilen bir yöntem vardır. Bu yöntemde de Konik reaksiyonuna dayanır. Vitamin örneği %3'lük KH_2PO_4 ile pH 4.5'ta ekstraktlanır ve ekstrakt CNBr ve barbitürük asit ile etkileştirilip 550 nm'de abs. ölçülür (AOAC 1990m).

1.2.2.3. Niketamid tayin yöntemleri

Niketamid yalnızca sentetik bir ilaçtır. Bunun tayini kalite kontrol amacıyla ilaç örneklerinde görülür. Nket için geliştirilmiş özgül bir yöntem yoktur. AOAC yöntemleri arasında, %25'lik farmasötik preparatlarında GC yoluyla tayin yöntemine rastlanmıştır (AOAC 1990n).

1.3. AMAÇ

Bu tezde nikotin ve bunun farmasotik türevlerinden nikotinic asit, nikotinamid ve niketamid için yeni analiz yöntemi geliştirilmesi ele alındı. Literatürde nikotin analizi için Ayad ve Ark. (1981) tarafından geliştirilen Cu, Zn, Hg, Pb ölçümüne dayalı yalnızca bir indirekt AAS yöntemi mevcuttur. Diğeri üç bileşik için ise geliştirilmiş herhangi bir indirekt AAS yöntemi literatürde mevcut değildir.

Burada bu dört bileşik için öncelikle bir indirekt AAS yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bunun için PMA reaktifi denenecektir. PMA bazı alkaloidlerin tanınmasında kullanılan bir reaktiftir. Bu reaktif literatürde indirekt AAS tayin alanında yalnızca şu iki çalışmada kullanılmıştır. Bunlardan ilki Simon ve Ark. (1975) tarafından geliştirilen birusin, sitrikinin ve kinolin gibi alkaloid ve bazların indirekt AAS tayin yöntemi, diğeri Bazzi ve Ark. (1985) tarafından geliştirilen kafein'in indirekt AAS tayin yöntemidir. Burada PMA ilgili bileşiklere denenecek, uygun olmayanlar için uygun başka bir metal reaktifi belirlenip yeni indirekt AAS tayin yöntemleri oluşturulacaktır.

Bu bileşikler için bir de aynı metal reaktiflerinin kullanılmasına dayalı kolorimetrik yöntem geliştirilmesi amaçlandı. Böylece ürün oluşturma işlemleri indirekt AAS ile aynı olacaktır.

2. YÖNTEM VE TEKNİKLER

Yer ve Tarih:

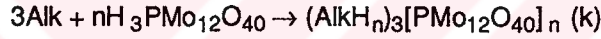
Bu tez kapsamındaki tüm deneyler Cumhuriyet Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Analitik Araştırma laboratuvarında 1992-1994 yılları arasında yapılmıştır. UV-VIS okumaları aynı fakültenin Merkezi Araştırma Laboratuvarında, AAS okumaları ise T.C. Demir Çelik İşl. Divriği Fabrikası Kimya Laboratuvarı ve C.Ü. Müh. Fak. MİPJAL'de yapılmıştır.

2.1. OPTİMİZASYON

2.1.1 Yöntem Geliştirme İçin İlke Bellirlenmesi / Ön Denemeler

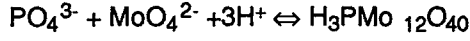
2.1.1.1. Nic, ND ve Nket İçin İlke Bellirlenmesi

Fosfomolibdik asit (PMA) alkaloidlerin tanınma testlerinin birinde kullanılan bir reaktiftir. Bu teste göre asitlendirilmiş örneğe PMA çözeltisi damlatılırsa alkaloid varsa sarı çökelek oluşur (Melentyeve Antonova, 1985). Reaksiyonun aşağıdaki gibi olması gerekir:



Burada n Alkaloiddeki protonlanacak bazik azot atomu sayısıdır. Nikotine bu test uygulandığında, duyarlı bir sonuç verdiği gözlemlendi. Alkaloid olmayan diğerleri yapılarında nikotin gibi piridin halkası taşırlar. Bunlardan amid grubu da taşıyan ve birer baz olan ND ve Nket'inde bu test ile pozitif ve duyarlı sonuç verdiği gözlemlendi. Diğer bileşik NA'nın ise karboksil grubu taşıması, amfoter olması gibi ayrıcalıklı bir yönü vardır. Bunun bu testle duyarlı bir sonuç vermesi beklenemez. Bu nedenle NA'nın analizi için başka bir ilke araştırılmış buna bağlı olarak başka yöntem geliştirilmiştir.

PMA ile çökme ürününü ayırıp çözüp Mo absorbansını okumaya dayalı AAS yolu kolaylıkla öngörüldü. Kolorimetrik yol için ürünü çözme sonrası eşdeğer PMA'nın indirgenerek Mo mavisi oluşturmasına dayalı bir yöntem düşünüldü. İndirgen reaktif olarak fosfa göre daha geniş kullanılabilir aralık sağladığı belirtilen, ayrıca dayanıklılık açısından öbür seçenekler arasında en uzun ömürlü olan sülfonik asit indirgeme reaktifini tercihle kolorimetrik yolla fosfatın standart tayin yöntemindeki renk oluşturma işlemleri (APHA, 1968) aynen uygulandı. Beklenen renk ancak ilgili bileşiklerin nisbeten derişik olanlarında görüldü. Buna neden muhtemelen, aşağıdaki tepkimenin tamamlanamamasıdır. Ortamdaki PO_4^{3-} ve MoO_4^{2-} nın çok az ve stokiyometrik oranda olmaları nedeniyle aşağıdaki reaksiyon tam olamıyor:



Dengeyi tamamen sağa kaydırmak için ortama %4'lük $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden 1'er ml eklendiğinde en düşük derişimli bileşikler dahil hepsinde renk gözlemlendi ve bu son işlem geliştirilecek kolorimetrik yöntemde zorunlu olarak yer alacaktır. Böylece Nic, ND ve Nket için bir kolorimetrik yöntem ilkesi kesinleşmiş oldu.

2.1.1.2. Nikotlinik asit için ilke bellirlenmesi

CuSO_4 NA'nın nitel tanıma testlerinden birinde kullanılan bir reaktiftir. Bu teste göre nötral yapılmış örneğe %10'luk CuSO_4 çözeltisi eklenirse NA varsa Cu-NA kompleks ürününden mavi bir çökelek oluşur (Kirk ve Othmer, 1970). İlk olarak bu reaktifle ise başlandı. Bu test NA'nın mikro miktarları için çok duyarsız bir sonuç verdi, çökelek ya hiç ya da az oluştu. Bu testin pozitif sonuç vermesi NA'nın örnekte mikro sınırları aşacak düzeyden daha fazla olması demektir.

Ortamın pH'ı biraz yükseltildiğinde $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 'in Cu-NA kompleksinden önce çöktüğü gözlemlendi. Biraz daha yüksek pH'ta ikisi birden çöktürölüp organik çözücülerle bunları ayırılmasına çalışıldı, mümkün olmadı.

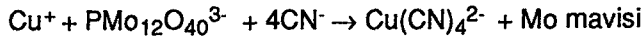
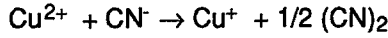
$\text{Cu}(\text{OH})_2$ çökmesini engellemek için ortama sitrat ve tartarat gibi kompleksleştiriciler eklendiğinde hiçbir çökme görülmedi.

Cu-NA kompleksi çökmediğine göre bu çözeltide kalıp, harcanmayan fazla baki fosfatı halinde çöktürme yolu denendi. Çözelti seyreltilip Cu absorbansı ölçüldüğünde absorbans değerleri, NA'nın eklenen miktarlarına karşı düşük ve hep aynı kaldığı görüldü. Bu durum Cu-NA kompleks oluşum dengesinin Cu-fosfat çökme dengesiyle yarışamayacak kadar çok zayıf olduğunu gösteriyordu. Sonuçta, mikro düzeyde NA analizi için CuSO_4 uygun değildi.

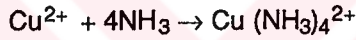
Son olarak $\text{Cu}(\text{AC})_2$ (Bakır II Asetat) çözeltisi ile denemeler yapıldı. Mikro miktarlarda NA içeren nötral çözeltilere seyreltik $\text{Cu}(\text{AC})_2$ eklendiğinde derhal çökelek oluştu. Çökeleğin CuSO_4 ile olana göre çok belirgin ve fazla olduğu görüldü.

Burada da öncekine benzer olarak bir AAS yöntemi ilkesi kolaylıkla öngörüldü. Kolorimetrik yol için ise çökelek ayrılıp çözüldükten sonra NA'nın eşdeğeri Cu'yu kompleksleştirme yolu düşünüldü. Ekstraksiyon gibi bir ikinci ayırmayı gerektirecek bir kompleksleştirici geliştirilecek, yöntemde kolaylık ve çabukluk açısından dezavantaj getirece-

ğinden molar absorblama katsayısı yüksek de olsa tercih edilmedi. Molar absorblaması yüksek ve oluşturulacak ürünün çözeltide kalacağı ve bir kolorimetrik yol için Tobia ve Ark (1967) tarafından geliştirilen Mo mavisi oluşumuna dayalı Cu tayinindeki yol izlendi. Çözülmüş çökme ürününe KCN ve PMA eklendiğinde mavi renk gözlemlendi, renk oluşumu CN⁻ tarafından indirgenmiş Cu'nun oluşturduğu Cu (I)'in de PMA'yı Mo mavisine indirgemesi yoluyla olmalıdır. Reaksiyon hakkında bilgi edinilememiş olmakla beraber aşağıdaki gibi olduğu tahmin edilebilir (Mo mavisinin net formülü bilinmiyor):



Ayrıca bir de kompleksleştirici olarak NH₃ kullanarak 620 nm'de VIS absorpsiyonunun okunmasına dayalı bir yöntem ilkesi daha belirlendi.



2.1.2 Ürünü Ayırma Yolu

Oluşturulan Org-PMA ürününü ortamdan ayırmak için 1- Ekstraksiyon, 2-Çöktürme yolları denendi.

Ekstraksiyon yolu; Nikotinli ürün üzerinde MIBK (Metilizobütil keton) ile maskeleyen reaktif Na-sitratlı ortamda denenmiş bunun için ekstraksiyon süresi, faz oranı (org/sulu) ve faz sayısının optimal değerleri sırayla 1 dk, 1/3 ve 1 olarak belirlenmiştir. Org. fazda AAS ile Mo absorpsiyonu çok yüksek sapmalar gösterdiğinden bu yolla güvenilir bir analiz yöntemi oluşturulamamıştır. Organik faza ekstraktlanmış Mo'nun bazik tamponda sulu faza geri ekstraktlanması kolaylık ve çabukluk açısından dezavantajlı olduğundan bu yol denenmemiştir.

Süzme tekniği ile ürünü ayırma yolu yine nikotinli ürün üzerinde denenmiş, çok zaman alması ve süzgeç kağıdının çözeltiyi veya harcanmamış Mo'yu fazla adsorblaması gibi nedenlerle iyi sonuç vermediği gözlemlenmiştir. Daha sonra santrifüjleme yolu denendi, bunda oluşan çökeleğin tamamını çöktürebilmek için frekansın belli bir değerin altında olmaması gerektiği ve bu değerin 4500 devir/dk olduğu belirlendi. Uygulamada kullanılan santrifüjün 5900 devir/dk olan maksimum frekansında çalışıldı.

NA'nın Cu ile oluşturduğu ürün hiçbir organik faza ekstraktlanmadı. Oluşan ürünün süzme yoluyla ayrılması iyi sonuç vermedi. Süzme ve santrifüjleme yoluyla elde

edilen süzütüdeki harcanmamış Cu'nun absorbanısı AAS'de okunduğunda tutarsız sonuçlar gözlemlendi. Son olarak santrifüjleme yoluyla oluşturulan ürün ayrılıp çözülerek eş değer metal AAS'de okundu, sonuçlar tutarlı çıktı.

Sonuç olarak santrifüjleme tekniğinin her iki analiz ilkesi için amaca uygun en iyi yol olduğu belirlendi.

2.1.3. Ürün Oluşturmada Reaktif ve Örnek Hacimleri

10 ml'lik tüpte uygun reaksiyon hacmi 6.0 ml olarak kararlaştırıldı. Örnekteki ilgili türün nicel belirleme sınır derişimini mümkün olduğu kadar aşağıya çekebilmek için ki bileşiğın düşük oranda olduğu örnekler için bu önemlidir, reaktif hacimlerinin küçük, örnek hacimlerinin ise büyük alınması düşünöldü. Reaktif hacimlerinin 1.0'er ml olması en uygundur. Bu durumda örnek hacmi 6.0 ile o reaksiyondaki diğer reaktiflerin sayısı arasındaki fark olarak alınır. Geliştirilen yöntemlerde alınan reaktif ve örnek hacimleri bu düşünce veya bağıntıdan çıkarıldı. Yalnızca Nic, örneği, H₂SO₄ ile reaksiyon ortamının asitliğini karşılayacak şekilde asitlendirilirse ki yöntemin tütüne uygulanmasında bu işlem nasıl olsa yapılıyor, tüpe eklenen reaktif sayısı bir eksilir. ND ve Nket için bu kesinlikle yapılmaz. Çünkü bekletilmeyle oluşan hidroliz az da olsa, örnek derişimine etki edebilir. Aşağıda Çizelge 5'de örnek ve reaktiflerin uygun hacimleri (ml olarak) ve ekleme sıraları (soldan sağa) gösterilmiştir.

2.1.4. Reaktif Ekleme Sırası

Çökme ürününün oluşumuna bu sıranın herhangi bir etkisi yoktur. Ancak karışması daha zor ve zaman alıcı olacağından, ayrıca tüpün üstteki boş kısmının iç çeperlerinde yapışmış kısım kalabileceğinden örnek ekleme sırası sonuncu ve birinci olmayıp orta sırada olması uygundur.

Reaktif ekleme sırasının önemli olduğu bir yer, NA ile ilgili kolorimetrik yöntemde PMA ve HCl reaktifleri eklenirken HCl asiti en son eklenmelidir. Aksi halde asitli çözeltiliye KCN ve PMA eklenirse renk oluşmuyor (Bakırın Mo mavisiyle tayin yönteminin ilk görüldüğü Tobia ve Ark (1967)'a ait makalede bu önemli hususa değinilmeyip verilen sıralama gözden geçirilmeden HCl önce verilmiştir. Sıralama seçeneklerinin tek tek denenmesiyle bu önemli durum burada farkedildi).

Çizelge 5. Çöktürmede reaktiflerin uygun ekleme sırası (soldan sağa) ve hacimleri (ml olarak)

Tayın Edilen Bileşik	H ₂ SO ₄	Örnek	PMA	Toplam
Nikotin (H ₂ SO ₄ 'lü)	0	5	1	6
Nikotinamid veya Niketamid	1	4	1	6
Nikotinic Asit	-	5	(Cu II Asetat) 1	6

2.1.5. Çökelek için Çözücü

Org-PMA çökeleğini herhangi bir baz PO₄³⁻ ve MoO₄²⁻ a dönüştürerek çözer:



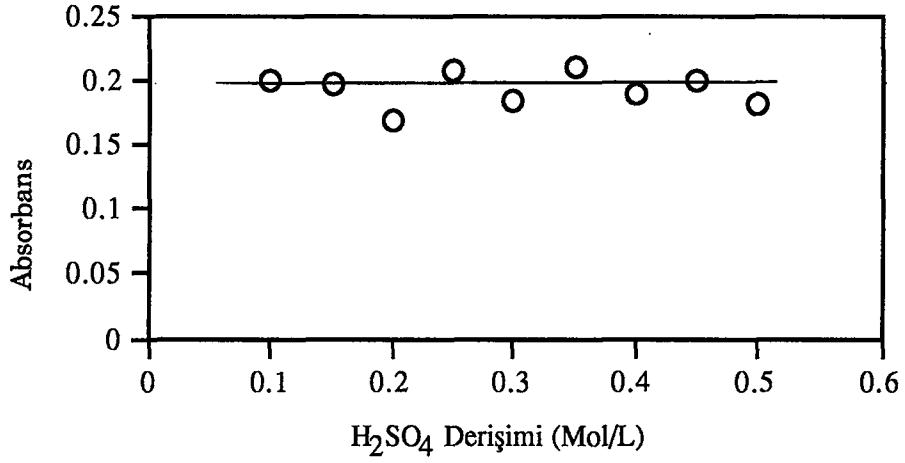
Bu tipteki çökeleği çözmeye 0.05 M NaOH kullanılması, Bazzi ve Ark (1988) tarafından doğrusal olmayan ve hatalı sonuçlar verdiği ve bu nedenle uygun olmadığı ifade edilmiştir. Bu konuda Simon ve Ark (1975) ve Bazzi ve Ark (1988) izlenerek çökelek pH'ı 9 olan NH₃ / NH₄Cl tamponunda çözülmüştür.

Cu-NA çökme ürünü, kompleks içinde yer alan nikotinat'ın asitlerle protonlanması sonucu bozularak çözünür. Çökme ürünü 3 M NH₃ ile Cu'yu kompleksleştirme yoluyla da çözülebilir. Fakat AAS yöntemi için doğrudan uygunluk sağlayacağı, kolorimetrik yöntemler içinde gerekli ortam sonradan kolay sağlanacağı için seyreltik HCl ile çözülmesi uygun bulundu.

2.1.6 Asitlik (PMA ile çöktürme yönteminde)

Uygun asitlik, reaksiyon ortamında diğer derişim veya etkenlerin aynı kalarak H₂SO₄'in farklı derişimleri alınarak, elde edilen absorbanlar arasındaki ilişkiye bakılarak bulundu. Bu ilişkiyi belirlemek için aşağıdaki deneme yapıldı.

Bir dizi santrifüj tüpü alınıp bunların herbirine eşit miktarlarda Nic, 0.5 ml (mg) ve 1.0 ml %5'lik PMA eklendi. 3M H₂SO₄'ten sırayla 0.1 ml'den başlayarak 0.05 ml farkla 0.5 ml'ye kadar eklendi. Damıtık suyla hacimler 6.0 ml olacak şekilde eşitlendi. Gerisi için AAS yöntemine göre olan işlemler takip edildi. Elde edilen absorbanlar, H₂SO₄ derişimine karşı grafiğe geçirildiğinde Şekil 1 elde edildi.

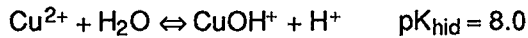
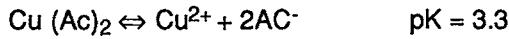


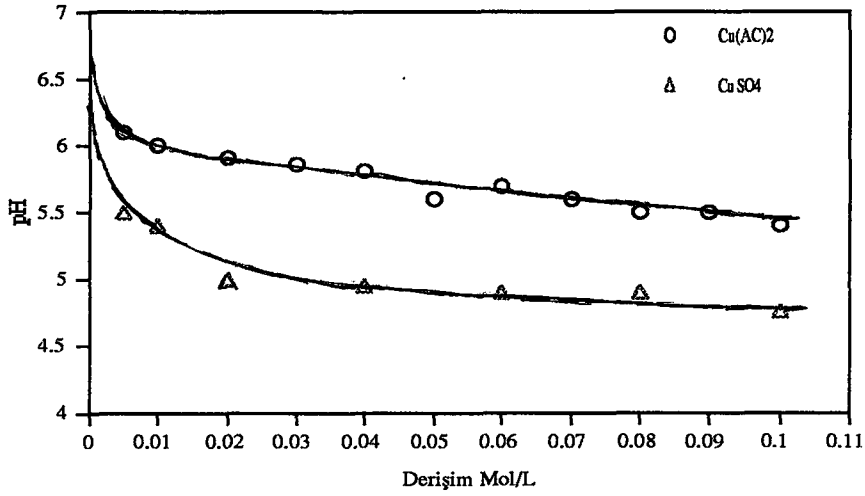
Şekil 1: Ortam asitliğinin çökmeye etkisi

Grafikten, asitin bu derişim aralığında absorbans değerlerinin belli bir yönde ve önemli bir değişme göstermedikleri görülmüyor. ND ve Nket için de durumun farklı olmayacağı düşünülerek hepsi için uygun asitlik 0.25 M olarak alındı.

2.1. 7. NA'lı Ürünün Çökmesine pH Etkisi

İlke belirlenmesinde değinildiği gibi CuSO₄ yerine Cu(Ac)₂'nin kullanılması duyarlılığı çok fazla artırdı. Bunun nedeni Cu (Ac)₂'nin CuSO₄'e göre sahip olduğu biraz yüksek pH ile ilgilidir. Şekil 2'de görüldüğü gibi aynı derişimde Cu(Ac)₂'nin pH'ı CuSO₄'inkinden yüksek veya nötrale daha yakındır. Cu(Ac)₂'nin bu çok işe yarayan biraz fazla pH'ı sağlama nedeni, koordinasyon bileşici olmasına dayanır. Cu²⁺ ve Ac⁻ iyonlarına çok az oranda ayrışır. Böylece bu iyonların hidrolizlerinin pH'ı etkilemeleri, özellikle Cu²⁺ iyonunun asidik hidrolizinin pH'ı düşürme etkisi önemsizdir. Bir iyonik tuz olan CuSO₄'ün çözeltisinde, ise bu etki tersine fazladır. Bu durum, eşit derişimlerde Cu(Ac)₂'nin pH'ının CuSO₄'ünkünden fazla olmasına neden olur.





Şekil 2: Cu (AC)₂ (O) ve CuSO₄ (Δ) çözeltilerinin pH'larının derişime bağılılığı.

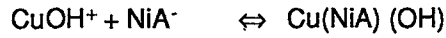
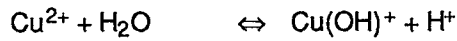
Asidik hidroliz dengesi CuSO₄'te çok daha etkili olduğundan pH'ı aynı derişimdeki Cu(Ac)₂'tan düşük olacağı, Şekil 2'yi oluşturan pH ölçümleriyle de gösterilmiştir. (Bu asidik hidroliz olmasaydı hiçbir Cu tuzu, Cu(OH)₂'e dönüştüğü için suda çözünmeyecekti)

Bu biraz yüksek pH neden çökmeyi artırıyor? Bunun nedeni, aşağıdaki denge-leri doğrudan veya dolaylı olarak pH'ın artmasıyla (H⁺ derişiminin azalmasıyla) sağa kayması olabilir:



(NA)

(NiA)



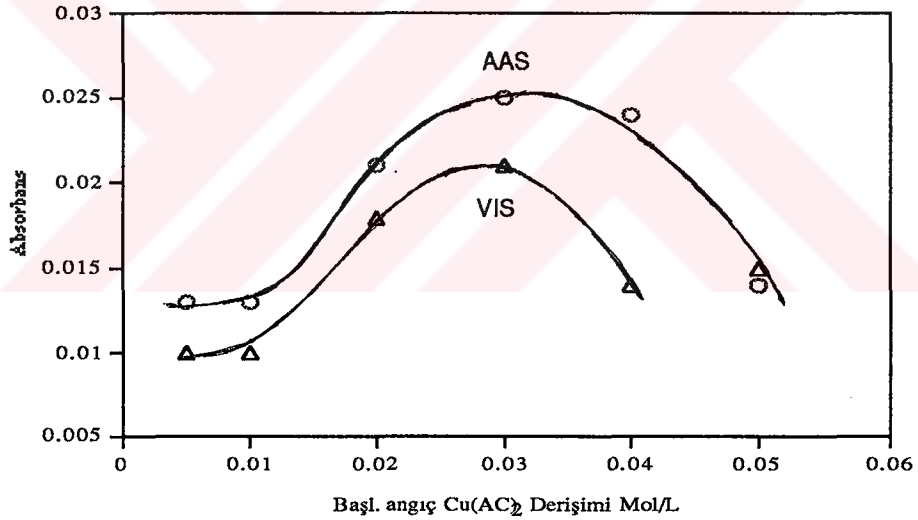
NA için uygun çöktürme pH'ının ne olacağına gelince, Cu(AC)₂'nin pH'ı az bir miktar, 0.5 gibi artırılmaya kalkılırsa derhal bulanıklık olur, Cu(OH)₂ çöker. Bu durumda daha fazla NA'yı çöktürecek pH biraz daha fazla olsa bile reaksiyon ortamının pH'ını de-ğiştirmeye kalkmak 6.0 ml'lik reaksiyon ortamında ek güçlükler yarattığı gibi Cu(OH)₂ girişimine de neden olur. pH'ı 7 Borik asit/boraks tamponuyla boş deney yapıldığında ise çökme görüldü. Nötralleşmiş NA çözeltisi ile uygun derişimde Cu(Ac)₂ karışımının göstereceği pH uygun pH olarak kabullenilecektir. Bu pH, belirtilen karışımında NA yerine

damıtık su olduğunda veya boş deney yapıldığında bu karışımın pH'ından daha yüksek olmadığından $\text{Cu}(\text{OH})_2$ girişimi söz konusu olmaz.

2.1.8 $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ Derişimi (NA analiz yöntemi için)

Uygun $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ derişimi olarak reaksiyon ortamına aynı miktar ve aynı koşullarda eklenmiş NA'yı en fazla çöktüren $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ 'ın derişimi olarak kabul edildi. Bunu belirlemek için aşağıdaki deney yapıldı.

Bir dizi santrifüj tüpü alınarak bunlara çeşitli derişimlerdeki $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ 'tan 5.0'er ml eklendi. Bunlara nötral ve 5 mg/ml derişime sahip NA'dan 0.1 ml eklendi, santrifüjlenip yıkanan çökelekler 3 M NH_3 'te çözülüp hacim 50 ml yapıldı. Bunun 620 nm'de VIS absorbansı okundu. Aynı çözelti damıtık suyla 10 kat seyreltilip AAS'de Cu absorbansı okundu. Sonuçlar aşağıda ve Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ derişiminin NA çökmesine etkisi.

Grafiğe göre absorbansı maksimum yapan derişim 0.03 M'dir. İşlemleri kısmen aynı olan seçenек bir yol, bu sonucu doğruladı. Önceki denemede ilk santrifüj sonrası çökeleklerinden ayrılmış harcanmamış Cu'ya ait süzüntülerden alınan 1.0'er ml, 3M NH_3 ile 50 kat seyreltilip 620 nm'de absorbanslar okundu. Bunun paralelinde her derişime karşılık gelen, birer baş deneme yapılip aynı işlemler izlendi. Burada uygun derişim

çözeltide Cu'nun en fazla harcandığı derişim olup, boş deneye göre en fazla absorbens düşmesine neden olur. İlgili absorbenslar aşağıda gösterilmiştir.

Çizelge 6: Cu (Ac)₂ derişimleri ile harcanmamış Cu'ya ait absorbens değerleri

Cu(Ac) ₂ Başlangıç Derişimi (mol/l)	Boş deney Absorbansı	Harcanmamış Cu Abs.ı	Absorbans Düşmesi
0.005	0.010	0.010	0.000
0.01	0.020	0.020	0.000
0.02	0.040	0.035	0.005
0.03	0.060	0.050	0.010
0.04	0.070	0.070	0.000
0.05	0.090	0.090	0.000

Her iki yola göre uygun Cu(Ac)₂ başlangıç derişimi 0.03 M'dir. 5.1 ml'lik reaksiyon ortamında ise bu değer:

$$0.03 \times 5.0 / 5.1 = 0.0294 \text{ M olur.}$$

Reaksiyon hacmi 6.0 ml, Cu reaktif hacmi ise 1.0 ml olduğunda uygun reaktif derişimi (ekleme öncesi)

$$0.0294 \times 6/1 = 0.18 \sim 0.2 \text{ M}$$

olur. Formül kütle (FK) si 199.65 g/mol olan Cu(Ac)₂H₂O için bu y üzdeye çevrilirse

$$0.2 \text{ mol/L} \times 199.65 \text{ g/mol} \times 100 \text{ ml} \times 1\text{L} / 1000 \text{ ml} = 3.993 \text{ g/100 ml}$$

Bu, pratikçe %4 (W/V) olarak alındı.

2.1.9. Final Hacim

AAS yönteminde uygun final hacim, metal derişimin kullanılan AAS'ye ait kato-logdan elde edilen KA'na düşecek şekilde alınması öngörüldü. Mo için bu aralık 60 mg/ml'ye kadar, Cu için 5 µg/ml'e kadardır.

Nic, ND ve Nket analizi için, yukarıdaki öngörü doğrultusunda final hacim 50 ml tahmin edilerek bununla ayar eğrisi oluşturuldu (Şekil 4,5,6,7).

NA için başlangıçta 250 ml alındı, fakat bu hacimde Cu'ya göre KA üst sınırı (5 µg/ml) nin sınırdan değil arada kaldığı, eşdeğer Cu'ın belirlenmesinden sonra ortaya çıktı. Buna rağmen NA'ya ait ayar eğrisinde bir bükülme yok. Bunun nedeni muhtemelen

şudur: NA derişimi arttıkça oluşan çökeleğin yüzeyi ve buna bağılı olarak adsorblanan Cu artar. Çökelek yıkansa da yine gelecek pozitif bükülme, yukarda sözü edilen negatif bükülmeyi karşılayarak nötralize eder. Bu nedenle beklenenden daha geniş bir KA oluşur. Bu durumda 250 ml final hacim alınması isabetli olmuştur (Şekil 11). Uygulamada bu, kolaylık, pratiklik ve az çözücü harcanma üstünlüğü sağlayan şu yolla yapılmıştır: Çökelek 25 ml hacimde çözülüp bundan 1.0 veya 2.5 ml alınıp 10 kat seyreltilmiştir.

Nic, ND ve Nket için geliştirilen kolorimetrik yöntemde ise, S.A. indirgeme reaktifinin kullanıldığı Mo mavisini oluşturulması yoluyla fosfat tayinindeki P'ye ait KA (0.013 - 4,000 $\mu\text{g/ml}$) dikkate alındı. Nic, ND ve Nket'in P eşdeğerleri çok düşük tahmin edildiğinden, bunların ayar eğrisi 25 ml final hacime göre oluşturuldu. Şekil 8,9 ve 10'dan görüldüğü gibi KA değerleri (μg olarak) AAS'ninkilere çok yakın bulundu.

Final hacmin 50 ml alınmasıyla bu aralığın (μg olarak) değişmeyeceği tahmin edilebilir. Ayrıca renk oluşturulduktan sonra hemen absorbans okuma imkanının o an için olmayıp uygun okuma anını kaçırmak gibi şansızlıklara karşı, boşa giden işlemleri en baştan tekrarlamak yerine, yalnızca en son renk oluşturma adımını tekrarlama imkanı veren, çökeleği 25 ml hacim içinde çözüp, bundan 3-4 ml gibi az bir miktar alıp renk oluşturan reaktiflerle bunu iki kat seyreltme yoluyla final hacmin 50 ml'ye eşdeğer alınmasının daha faydalı olacağı düşünülebilir. Ancak eşdeğer P, nicel ölçüm sınırının altına düşer ve bu da yöntemin duyarlılığını azaltır kaygısıyla final hacmin yüksek alınmasından kaçınıldı ve Nic, ND ve Nket için final hacim 25 ml ile ayar eğrisi oluşturuldu (Şekil 8,9,10).

NA kolorimetrik yöntem için 31.25 ve 75 ml olmak üzere iki final hacme göre Şekil 12 ve 13 oluşturuldu. Şekil 12'de dışlanan yüksek derişime sahip bazı noktalar Şekil 13'de KA içine girdiği belirlendi. Daha geniş KA veren Şekil 13'i oluşturan 75 ml final hacim uygun bulundu.

2.1.10. Tütüne Uygulanmasında Örnek Hazırlama Yolu

Ekstraksiyon yolunda, öbüründe (damıtma yolunda) olmayan, organik faza ekstraktlanmada fazladan organik çözücü sarfiyatı olduğundan bu yolda madde tüketimi daha fazladır. Fakat bu yolun da daha az zaman alma üstünlüğü vardır. Öbüründe damıtma çok zaman alır. Fakat bu yöntemin de az madde sarfiyatı üstünlüğü vardır. Han-

gisinin uygun olacağını yöntem uygulanacağı sıradaki madde ve zaman koşulları belirler. Tütün araştırma laboratuvarında bu amaç için su buharı damıtma ilkeleriyle çalışan, buhar kaybının söz konusu olmadığı özel geliştirilmiş aygıtlar kullanılmaktadır. Su buharı damıtma bayağı bir sistemle yapılamaz, buhar kaybı olabilir ki, bu alkaloid kaybı veya negatif hata demektir. Ayrıca damıtma süresince fazla bekletilmeleri ve ışığa maruz kabilimleri alkolooidlerin bozunma ihtimalini de güçlendirir. Bu nedenlerle yukarıda sözü edilen özel aygıtlar yoksa ekstraksiyon yolunun seçilmesi yerinde olur.

2.2. NİKOTİN, NİKOTİNAMİD VE NİKETAMİD'İN İNDİREKT AAS VE KOLORİMETRİK YOLLA ANALİZİ İÇİN GELİŞTİRİLEN YÖNTEM

2.2.1. Yöntemin İlkesi

Bu bileşiklerden örnekte bulunanı PMA ile çöktürülerek ürün ayrılır. Bundan sonrası AAS yolunda çökelek $\text{NH}_3 / \text{NH}_4\text{Cl}$ tamponuyla çözülüp çözeltideki Mo absorpsiyonu AAS de okunur. Kolorimetrik yolda ise çökelek çözülüp eşdeğer PMA, sulfonik asit indirgeme reaktifıyla indirgenerek Mo mavisine dönüştürülür, spektrofotometrede 725 nm'de absorpsiyon okunur.

2.2.2. Araç ve gereçler

- 1) AAS, Perkin Elmer marka ve 603 model
- 2) Mo Hallow katod lamba, Perkin Elmer marka
- 3) UV-VIS çift ışıklı spektrofotometre, Shimadzu marka 160A model
- 4) Santrifuj, Hettich Universal marka, D-7200 model

AAS için enstrüman koşulları

AAS marka ve modeli= Perkin Elmer, 603

Gaz yakıt sistemi= $\text{N}_2\text{O} / \text{C}_2\text{H}_2$

Lamba = UV Hallow katod Mo lambası

Dalga Boyu= 313.3 nm

Slit = 4 nm

Lamba akımı = 35 mA

Yakıcı gaz (N_2O) basıncı = 2.1 kg/cm²

Yakıt (C_2H_2) basıncı= 0.86 kg/cm²

2.2.3 Reaktifler

1) *Standart Nikotin, Nikotinamid ve Niketamid çözeltileri*, 1000 µg/ml. 100'er ml'lik balonlara Sigma ürünü standartlardan hesaplanmış miktarlarda tartılarak hazırlanır. Renkli şişelerde muhafaza edilir. (Reaktiflerin günlük hazırlanmasının veya birkaç günü geçen çözeltilerin kullanılmamasının uygun olduğu bu çalışmalarda gözlenmiştir).

2) *Fosfomolibdik asit çözeltisi* %5 (w/V) 5.0 g $H_3PMo_{12}O_{40} \cdot H_2O$ (Molibdofosforik asit hidrat) tartılıp damıtık suda çözülüp 100 ml'lik balon jodede hacim ayar çizgisine tamamlanıp renkli şişede muhafaza edilir.

3) *Sülfürik asit çözeltisi* 2.0 M. 11.1 ml derişik stok çözeltisi alınıp 100 ml lik bir balon içinde damıtık suya yavaşça aktarılıp hacim suyla tamamlanır.

4) *Sülfürik asit çözeltisi* 1.5 M. 8.3 ml derişik stok çözeltisi 100 ml'lik balon içindeki suya yavaşça aktarılıp damıtık suyla hacim tamamlanır.

5) *Sülfürik asit çözeltisi* 0.5 M. 27.8 ml derişik stok çözelti alınıp yarısında damıtık su bulunduran 1 L balon jodaye yavaşça aktarılıp hacim tamamlanır.

6) *Amonyak-amonyum klorür tamponu* (pH'ı 9 olan), 13.375 g NH_4Cl (susuz) litrelik balon joje içinde bir miktar damıtık suda çözülüp üzerine 35 ml derişik amonyak stok çözeltisi eklenir, litreye seyreltilir, polietilen şişeye aktarılır.

7) *NaOH çözeltisi*, 0.1 M. Hesaplanan kadar NaOH (Merck) katışıyla hazırlanmış 1.0 M NaOH çözeltisinin seyreltilmesiyle hazırlanır. Polietilen şişede bulundurulur.

8) *Aminonaftolsülfonik asit indirgeme reaktifi*, 0.5 g 1-amino-2-naftol-4 sülfonik asit (ANSA) (Merck), 21 g susuz Na_2SO_3 , 35 g $Na_2S_2O_5$ (Na-metabisulfit veya Napirosülfite) alınır. ANSA'nın hepsi az bir $Na_2S_2O_3$ kısmı ile havanda ezilerek karıştırılır. Diğer kalan tuzlar yarısında damıtık su bulunan 500 ml'lik balon jodede çözülür. Bunun üzerine havadaki karışım aktararak çözülür. Hacim 500'e tamamlanır. Çözelti renkli şişeye aktarılır. 30°C'ı geçmeyen sıcaklıkta bulundurulur. İyi korunursa 4 ay kadar dayanabilir. Fakat en iyisi 15 günde bir yenilenmelidir (APHA 1965).

9) *$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ çözeltisi*, %4 (w/V). Hesaplanmış miktarda bu tuzundan (Merck) hazırlanır.

10) *Molibden standart çözeltisi*, 1000 µg/ml 0.2522 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ tuzu

(Merck) 100 ml'lik bir balon içinde çözülür. Hacim damıtık suyla çizgiye tamamlanır. Buradan alınan hesaplanmış miktarlarda çözelti alınarak içlerine 5.0 er ml tampon (reaktif 4) konulmuş 25'er ml'lik balon jodelere aktarılarak 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 µg/ml derişimlerde Mo st çözeltisi hazırlamak üzere damıtık suyla seyreltilir.

11) KH_2PO_4 , 0.006 M, 0.0817 g KH_2PO_4 (susuz) tuzu (Merck) alınıp çözülerek 100 ml'ye tamamlanır (1).

12) $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, %12 (w/V) reaktif 9'daki gibi hazırlanır (1).

(1) Reaktif 11 ve 12, %5 PMA (Reaktif 2)'ye bir seçenek olarak hazırlanır.

2.2.4 Analiz Yöntemi / İşlemler

İlgili bileşiğin ayar eğrisini oluşturmak için hepsi için 1000 µg/ml olan kendi standartından 0.05-1.20 ml arasında 0.1 farkla hacimler alınır (ml.çöz.≡ mg.Bil.) (Bu aralık çizelge 5 ve 6'daki KA değerlerine göre bileşiğe göre uygun şekilde daraltılabilir). Örneğe uygulanacağı zaman, hazırlanmış örnek çözeltisinden 4.0'er ml, 5-10 kısım alınır. Uygun asitlikte ise Nlc 5.0 ml alınabilir, o zaman örnek konulan tüplere ayrıca H_2SO_4 konulmaz. Her iki tür için aşağıdaki işlemler aynen uygulanır. Yöntem aşağıdaki adımların izlenmesinden oluşur:

I) *Org-PMA çökeleğinin oluşturulması:* 10 ml'lik bir dizi polipropilen santrifuj tüpü alınır. Herbirine 1.0 er ml 1.5 M H_2SO_4 ve yukarıda belirtildiği tarzda ilgili bileşiğe ait standart ve örnekler eklenir. Daha sonra 1.0 er ml %5 PMA eklenir. Standart eklenen tüplerde toplam sıvı hacmi 6.0 ml olması için aradaki farklar hesaplanıp, damıtık su eklenerek eşitlenir. Bu ekleme, tüp hafif eğik vaziyette eksen etrafında döndürülürken damıtık su biraz yukardan tüpün ağzına yakın iç çeperlerine damlatılarak yapılır. Böylece tüm reaktif kalıntıları aşağıda yer almış olur. Tüpler hafif sarsılarak karıştırılması sağlanır. (Baget kullanılmaz).

II) *Çökeleğin ayrılması:* Reaktiflerin eklenmesi tamamlandıktan sonra fazla beklemeden (ilk yarım saat içinde) 6000 dev/dk frekansta 10 dk süreyle santrifüjlenir. Süzüntü atılır. Tüplerin ağzları süzgeç kağıdıyla hafifçe silinir. 5 ml, 0.5 M H_2SO_4 yukardaki gibi damlatılarak çökelek yıkanır. Aynı koşullarda tekrar santrifüjlenip yıkama çözeltisi atılır.

III) *Çökeleğin çözülmesi ve abs. okunması:* Bundan sonraki işlemler uygula-

nacak analiz yöntemine göre değişmektedir.

1) *AAS Yöntemi*: Tüplere 8.0'er ml tampon eklenip bagetle karıştırılır. 50 ml'lik beher aracılığıyla 50 ml'lik balon jodelere aktarılır. Tüplere 3.0 ml, daha tampon ve 5 ml damıtık su konulup karıştırılır, beherle balona aktarılır. Tüpler ve baget behere dökülecek şekilde pisetle durulanır. En son beher de yıkanıp, yıkama suları balona aktarılıp hacim ayar çizgisine kadar (50 ml olacak şekilde) damıtık suyla tamamlanıp ağzı kapatılıp karıştırılır. Bundan bir miktar temiz ve kuru tüplere aktarılarak bununla nitroz oksitasetilen alevli AAS de 2.1.2.'deki parametrelerde Mo absorbansı okunur.

2) *Kolorimetrik yöntem*: Tüplere 5.0 ml 0.1 M NaOH eklenip bagetle karıştırılarak çözülür. Beher aracılığıyla 25.0 ml'lik balon jodelere önceki tarzda aktarılır (Çözeltinin balon içinde yaklaşık 20 ml'yi geçmemesine dikkat edilir). Balonlara 1.0'er ml 2 M H₂SO₄ ve %4'lük Na₂MoO₄·2H₂O, 2.0 ml indirgeme çözeltisi eklenip hacim 25.0 ml'ye damıtık suyla tamamlanır. Mavi-yeşil arası renk oluşumu 15 dakikada tamamlanır. Renk oluşumu standart ve örnekler için aynı anda veya çok az zaman farkıyla oluşur. Renk 15 dk sonra VIS spektrofotometrede 725 nm dalga boyunda absorbans ölçülür.

Her bir bileşik ve yöntem için µg (st) / ml (Final Hacim) oranları tek tek hesaplanıp okunmuş absorbanslarla ayar eğrisi oluşturulur. Örnekler için gelen absorbansların ortalaması alınıp, buna karşılık gelen derişim grafikten okunarak örnek analizi tamamlanır.

2.2.5. Nikotin tayini için tütün örneğine uygulanması

Tütün örneğini analize hazırlamak için aşağıda gösterilen iki yol izlenebilir:

1) *Ekstraksiyon yolu*: Bu yol, alkaloidleri tütün-alkali karışımından bir organik faza, buradan da asitle sulu faza çekme esasına dayanır. Aşağıdaki yol, Nikolin ve Ark (1969) tarafından geliştirilen Nikotin tayini yönteminden alınmış olup, buna asit ekstraksiyonu ve katı örneğin sabit tartıma getirme işlemleri gibi küçük ilaveler yapılarak geliştirilen analiz yöntemi için uygun hale getirilmiştir.

İşlem: Önceden yıkanmış kurutulmuş ve öğütülmüş katı tütün yapraklarından oluşan örnek 40°C'deki etüvde 24 saat bekletilerek sabit tartıma getirilir. İyice karıştırılarak bundan 0.2000-2.0000 g arasında (beklenen Nic oranına göre) hassas tartımla miktar alınır. Bu, 35 ml %25 NaOH ile bir 100 ml'lik ayırma hunisine konup arasına 1 sa-

at çalkalanır. Bu karışım 10 ml CCl₄ veya CHCl₃ ile ekstraktlanır. Ayrılan organik faz, içinde 25 ml 1 M H₂SO₄ bulunan ikinci bir ayırma hunisine alınıp bir de burdaki ekstraksiyonla alkaloidler sulu faza çekilir. Bundan sonra aynı organik faz tekrar ilk ayırma hunisine aktarılıp aynı işlemler 5 defa daha tekrarlanır. Sulu fazlar 250 ml'lik balon jöjeye aktarılıp damıtık suyla ayar çizgisine seyreltilir. Bundan 5-10 ml alınıp 0.3 M H₂SO₄ ile on kat seyreltilir. (Bu oran beklenen alkaloid oranına göre değiştirilebilir). Nikotinle ilgili çözeltiler ışıktan korunarak serin yerde ve ağzı kapalı olarak saklanır. Seyrelmiş çözeltilerden 5.0'er ml 5-10 kısım alınarak üzerinden burda geliştirilen Nikotin ile ilgili AAS ve kôlorimetrik tayin yöntemi uygulanır.

2) *Su buharı damıtması yolu:* Tütün alkali karışımına buhar püskürtülerek alkaloidlerin su buharı damıtma yoluyla ayrılmasına dayanır. Aşağıdaki yol AOAC yöntemlerinde yer alan tütünde nikotin tayininden alınmış (AOAC, 1990a) ve uygun değişikliklerle burda geliştirilen AAS ve kôlorimetrik yöntemeye uyarlanmıştır.

Bu yolda, hassas tartım sonuna kadar öncekiyle aynı işlemler uygulanır. Tartılan örnek bir su buharı damıtma sisteminin buhar püskürtülen balonuna konup yanına NaCl ile doyurulmuş %30'luk NaOH'tan 5 ml eklenir. 250 ml'lik destilatı toplamak için bir balon jöjeye 10 ml 1 M H₂SO₄ konulup bu, damıtma süresince ışıktan yalıtık olarak tuz-buz karışımı içinde sisteme bağlanır. En az 3-4 saat damıtma yapılır. Toplanan destilat 250 ml hacme damıtık suyla seyreltilir. Bundan 5-10 ml alınıp 0.3 M H₂SO₄ ile on kat seyreltilir. Bu çözeltiye tayin yöntemi uygulanır. Nikotin alkaloidleri toplamı nikotin cinsinden, deneydeki parametrelere göre oluşturulmuş aşağıdaki eşitlikten hesaplanır:

$$\%Alk = 0.05 C_{fin} \cdot V_{fin} / g$$

V_{fin} : Final hacim (AAS yönteminde 50, kol. yöntemde 25 ml)

C_{fin} : Final hacimdeki $\mu\text{g/ml}$ cinsinden Nlc derişimi

g : Örnek miktarı, gram olarak

Yukarıdaki eşitlikler AAS ve kol. yöntemlerde aşağıdaki hali alır:

$$\% Alk = 2.50 \cdot C_{fin} / g \quad (\text{AAS'de})$$

$$\% Alk = 1.25 \cdot C_{fin} / g \quad (\text{Kol.'de})$$

2.3. NİKOTİNİK ASİTİN İNDİREKT AAS VE KOLORİMETRİK YOLLA ANALİZİ İÇİN GELİŞTİRİLEN YÖNTEMLER

2.3.1. Yöntemin İlkesi

Nötral örnekteki NA, CullAsetat ile çöktürülüp ürün ayrılarak seyreltik HCl ile çözülür. Bu çözelti ikisi kolorimetrik üç farklı yöntem için kullanılır. Çözeltideki Cu eşdeğeri, AAS'de Cu absorbansı okunarak AAS yöntemi, KCN+PMA eklenerek NA'ya eşdeğer olan ile Cu'ya eşdeğer PMA'nın indirgenmesiyle Molibden mavisi oluşturulup 725 nm'de absorbans okunarak kolorimetrik bir yöntem, Cu'nun NH₃'lü ortamda 620 nm'de absorbansı okunarak başka bir kolorimetrik yöntem ile NA tayin edilir.

2.3.2. Araç ve gereçler

- 1) AAS, Perkin Elmer marka, 2380 model
- 2) Cu Hallow katod lamba, Cathdon marka
- 3) pH metre, Bilmar marka, 101 model
- 4) Spektrofotometre ve Santrifüj 2.1.2.'deki aynı marka ve model

AAS enstrüman koşulları:

Dalga boyu = 324.8 nm

Slit = 0.7 nm

Lamba Akımı = 10 mA (max)

Gaz Yakıt = Hava /Asetilen sistemi

İç Basınç = 90 k Pascal (= 13 Psi)

Dış Basınç = 500 k Pascal (=80 Psi)

2.3.3. Reaktifler

1) *Cu (CH₃COO)₂H₂O*, %4 (w/V): 2.0 g katı (Merck) damıtık suda çözülüp hacme tamamlanır. Bu çözelti günlük ve ihtiyaç kadar hazırlanmalıdır. Bir günü geçtikten sonra bu çözeltide bileşimi muhtemelen Cu(Ac) (OH) (k) olan bir bulanma gözlemlendi.

2) *Nikotinik Asit Standardı*, 1000 µg/ml NA katısı (Sigma) doğrudan hassas terazide tartılıp bir beher içinde damıtık suda çözülür. 1.0 ve 0.1 M derişimlerde NaOH ve HCl çözeltileri damlatılarak pH metre ile pH'ı 7.0±0.1 (Nötral) yapılır. 250 ml'lik balon jolye aktarılıp hacim deiyonize suyla 250.0 ml'ye tamamlanır.

3) *KCN*, %1 (w/V), KCN (Merck) katısından hazırlanır.

4) PMA, %1 (w/V) Fosfomolibdik asit (Merck) katısından hazırlanıp renkli şişede korunur (4 hafta kadar dayanıklıdır).

5) HCl, 1.0 M, 8.3 ml der HCl (d= 1.19 % 37'lik) 50 ml suya aktarılıp karıştırılır ve hacim 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanır.

6) HCl, 0.1 M: Reaktif 5'ten seyreltilerek hazırlanır.

7) NaOH, 0.1 M Katı NaOH (Merck)'un hassas tartımıyla hazırlanıp, polietilen şişeye aktarılır.

8) NH_3 , çözeltisi 6 M veya 1:1, 50 ml derişik amonyak aynı hacimde damıtık su ile karıştırılıp polietilen şişeye aktarılır.

2.3.4 Analiz Yöntemi /İşlemler

Yöntem aşağıdaki adımların izlenmesinde oluşur. Ayar eğrisi için standart miktarları aşağıdaki gibi alınır. Örnek analizi için en az beş adet 5.0 ml örnek alınıp her ikisi için aynı adımlar izlenir. St ve örnek nötral olacak şekilde hazırlanır.

I) *Çökme ürününün oluşturulması:* Nötral ve 1000 µg/ml derişime sahip (ml çöz = mg NA) NA standartı 0.5'ten 3.0 ml'ye kadar 0.25 ml farkla alınıp tüplere aktarılır. Tüplere 1.0'er ml Cu (Ac)₂ reaktifi eklenip tüpler hafifçe sarsılarak karıştırılır. Toplam sıvı hacmi 6.0 ml olacak şekilde her tüpe kendi gerektirdiği miktarda damıtık su (önceki yöntemdeki, 2.1.4'deki gibi) eklenir. Yarım saat beklenir.

II) *Çökeleğin ayrılması:* Çökelek önceki yöntemdeki yolla ayrıntılarına aynen uygulanarak ayrılır. Yalnızca çökelek damıtık suyla yıkanır.

III) *Çökeleğin çözülmesi:* Tüplere 5.0 ml 0.1 M HCl aktarılmak suretiyle çökelektan çözülür. Çözeltiler 2.1.4'deki ayrıntılara uyarak 25.0 ml'lik balon jöjelere aktarılır. Hacimleri ayar çizgisinde ayarlanıp kapatılır ve karıştırılır.

IV) *Renk oluşumu / absorbands ölçümü:* Bir önceki adım sonunda elde edilen çözelti, her üç yöntem için de kullanılmak üzere bundan sonraki işlemler uygulanacak yönteme göre izlenir.

1) *AAS yöntemi:* 1.0 veya 2.5 ml çözelti alınıp damıtık suyla 10 kat seyreltilir. AAS'de 324.8 nm'de Cu absorbandsı okunur.

2) *Kolorimetrik yöntem (Mo mavisi oluşturma):* 3.0 ml çözelti alınıp 0.6 ml, 0.1 M NaOH, 1.0'er ml %1 KCN, %1 PMA ve 1.0 M HCl eklenip hacim damıtık suyla 9.0

ml'ye tamamlanır. 15 dakika sonra spektrofotometrede 725 nm'de absorbands ölçülür.

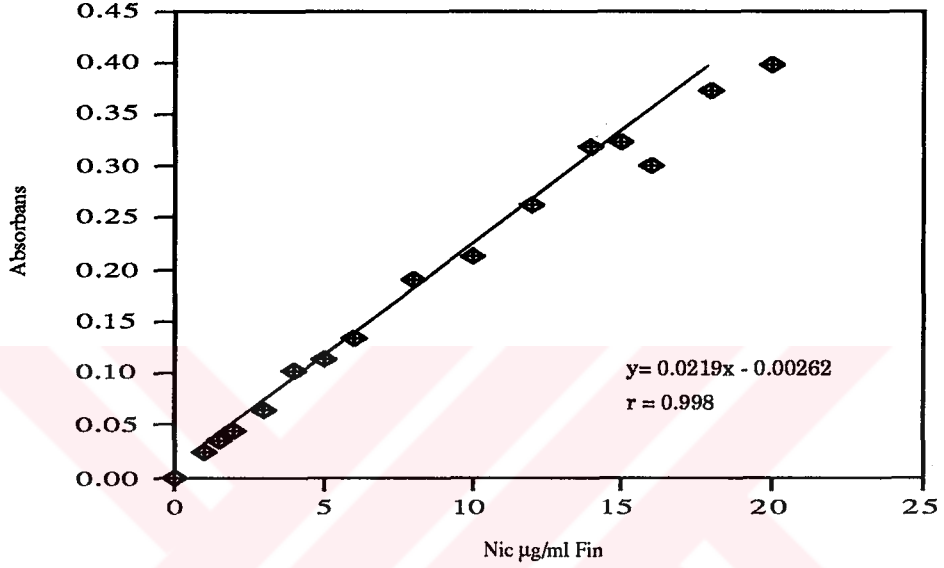
3) *Kolorimetrik yöntem (bakır-amonyak kompleksi oluşturma)*: 5.0 ml çözelti alınıp 10 ml'lik balon jøjeye aktarılır, bunun üzerine 6.0 M NH_3 eklenerek hacim tamamlanır. Spektrofotometrede 620 nm'de absorbands okunur.

Alınan NA miktarlarına karşılık gelen $\mu\text{gNA/ml}$ (Final) değerleri hesaplanıp bu ve bunlara karşılık gelen absorbands değerleri ile her üç yöntemde göre ayar eğrileri hazırlanır.

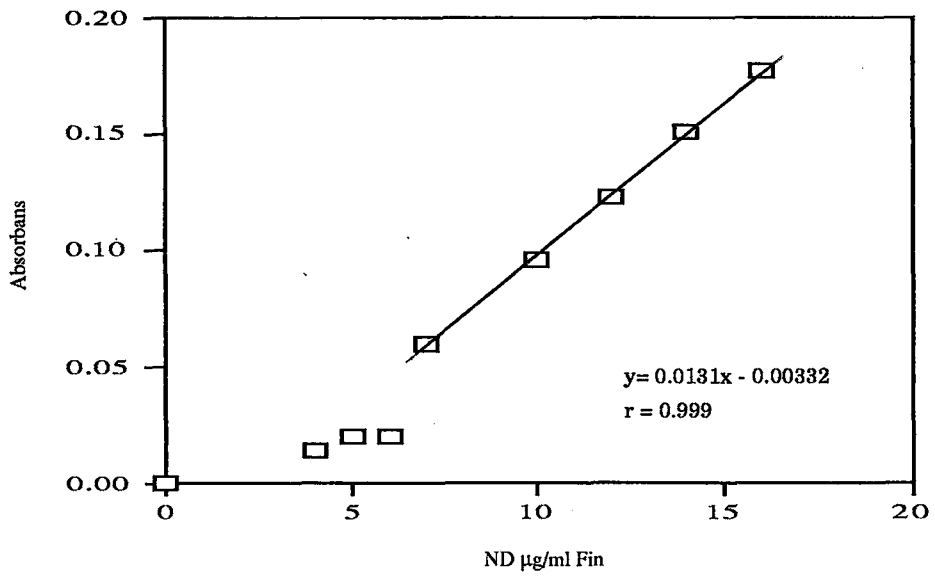


3. BULGULAR

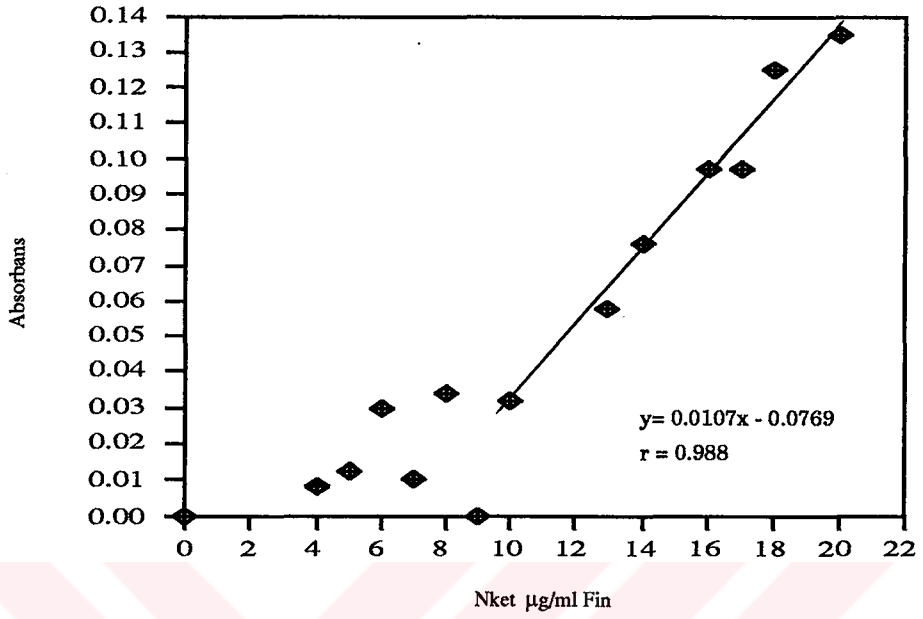
3.1. Ayar Eğrileri



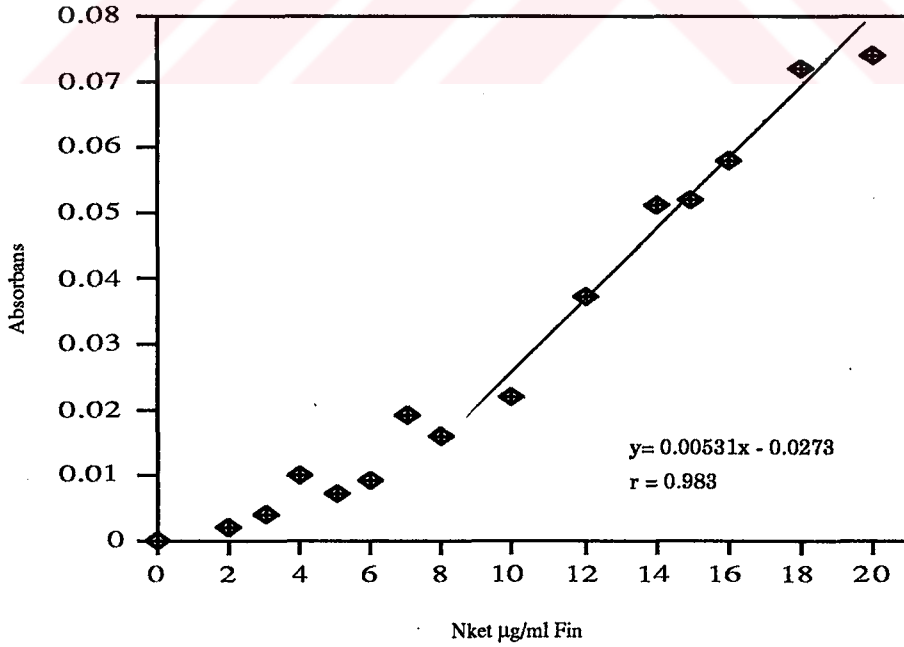
Şekil 4: Nikotin'in indirekt AAS yoluyla analizi için ayar eğrisi



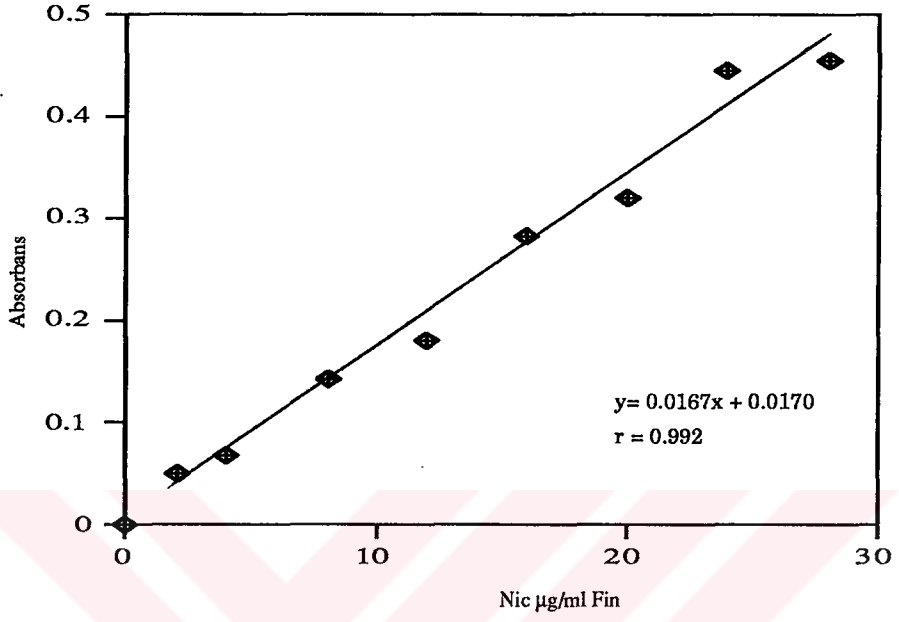
Şekil 5 : Nikotinamid'in indirekt AAS yoluyla analizi için ayar eğrisi



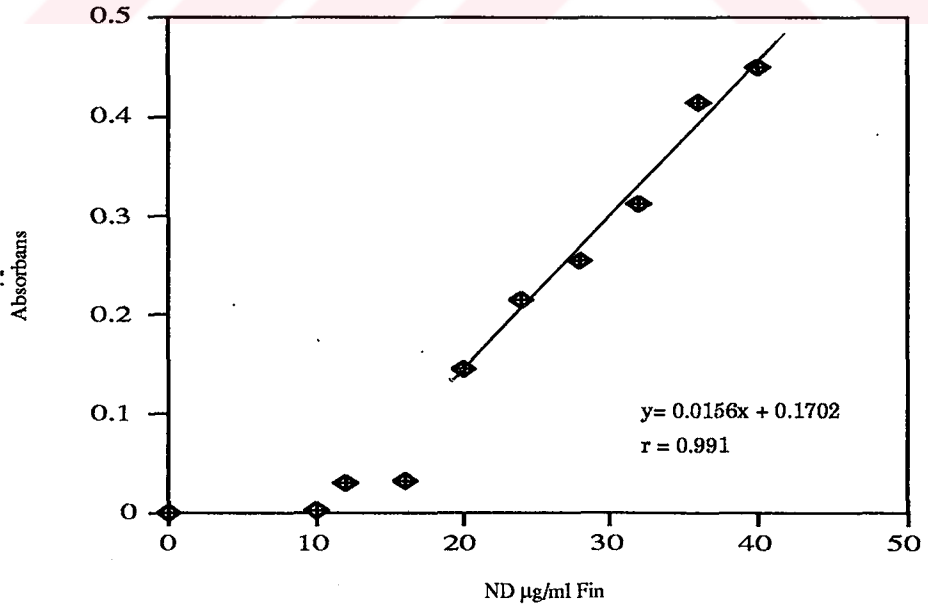
Şekil 6: Nicketamid'in indirekt AAS yoluyla tayini için ayar eğrisi



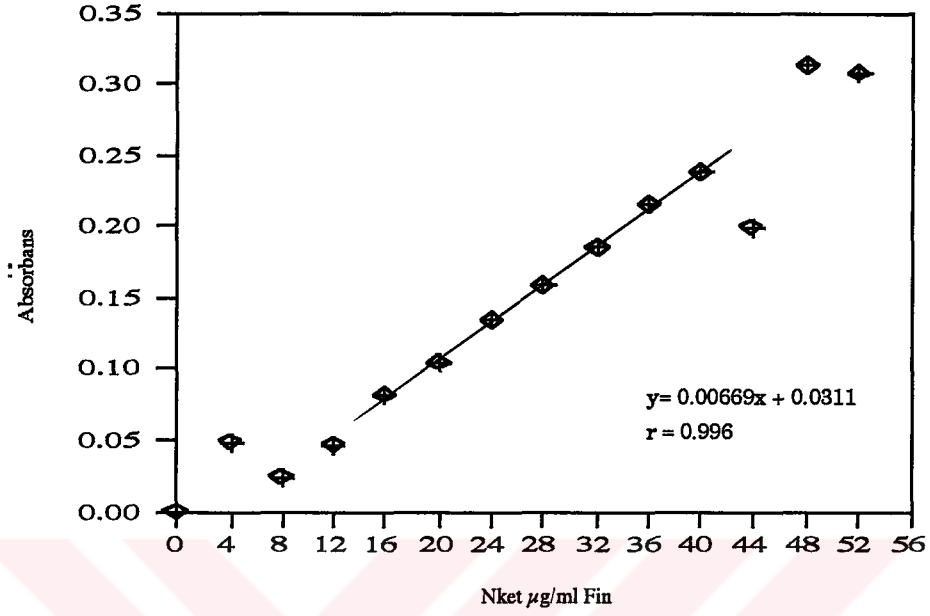
Şekil 7: Nicketamid'in indirekt AAS yoluyla analizi için $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4$ seçeneği kullanılarak oluşturulan ayar eğrisi



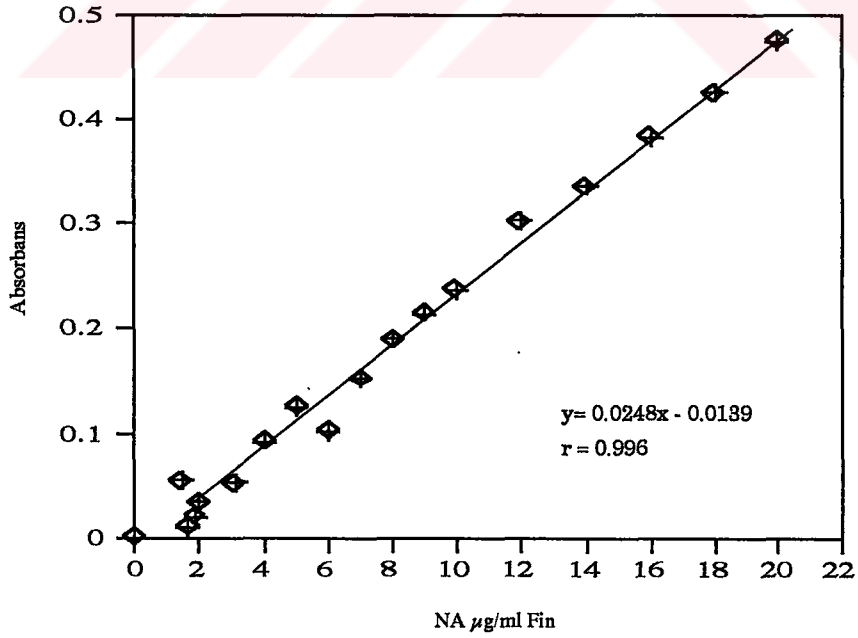
Şekil 8: Nikotin'in indirekt kolorimetrik tayini için ayar eğrisi



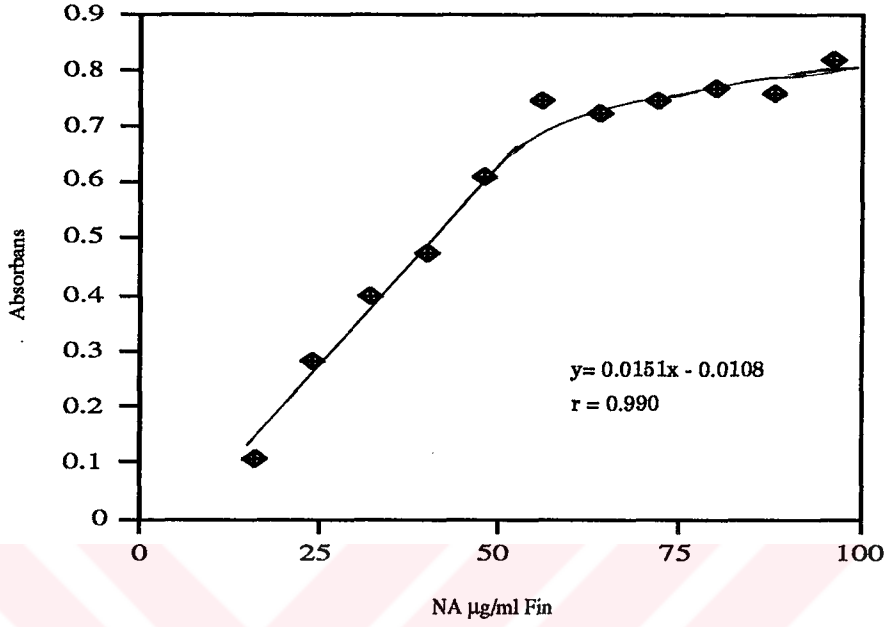
Şekil 9: Nikotinamid'in indirekt kolorimetrik tayini için ayar eğrisi



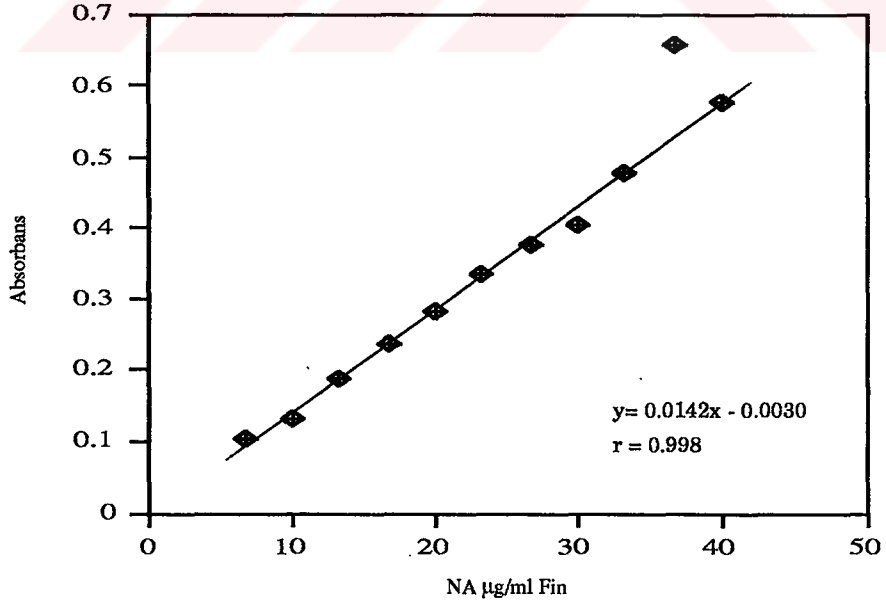
Şekil 10: Nicketamid'in indirekt kolorimetrik tayini için ayar eğrisi



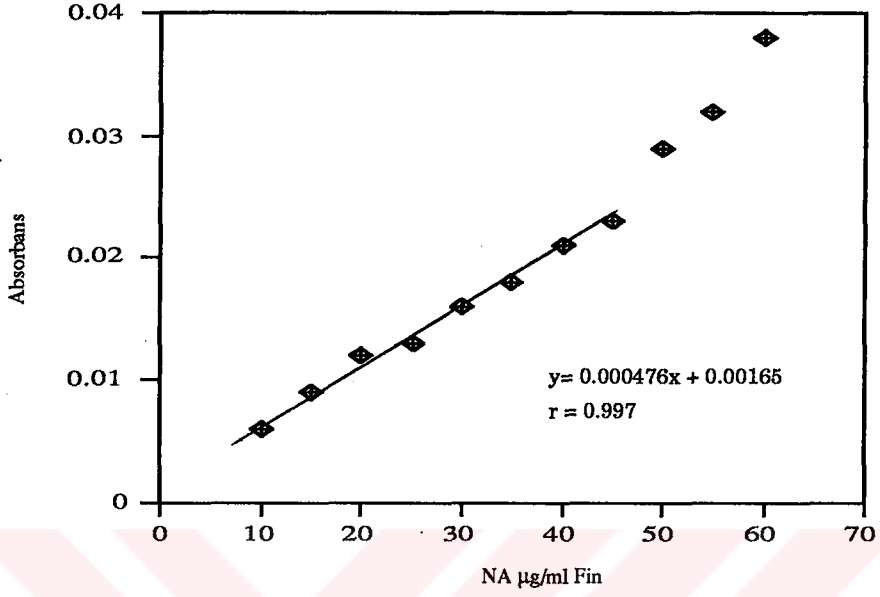
Şekil 11: Nikotinik asidin indirekt AAS yoluyla tayini için ayar eğrisi



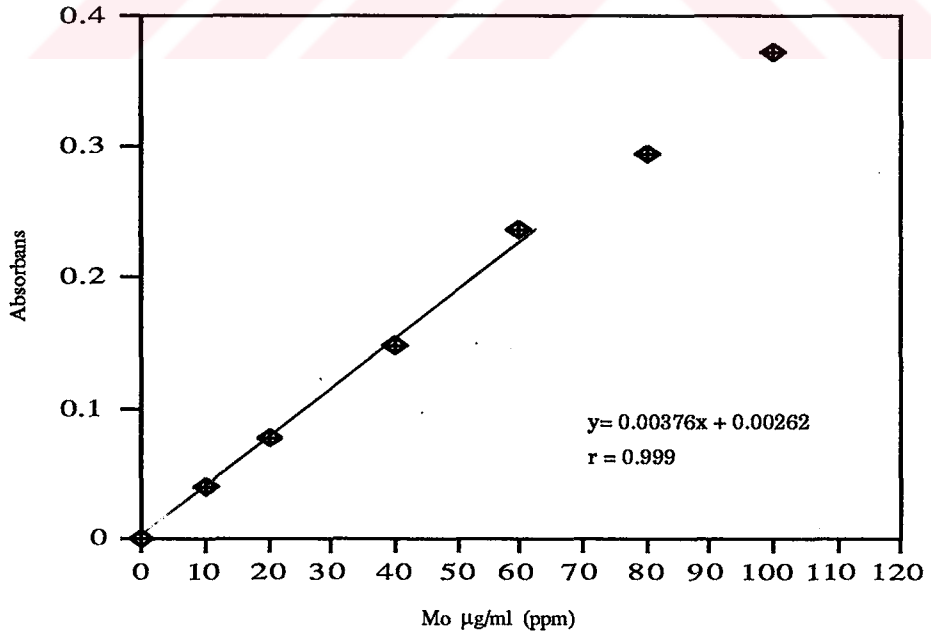
Şekil 12: Nikotinic asidin Mo mavisi oluşturma yoluyla indirekt kolorimetrik tayini için ayar eğrisi (küçük final hacime göre)



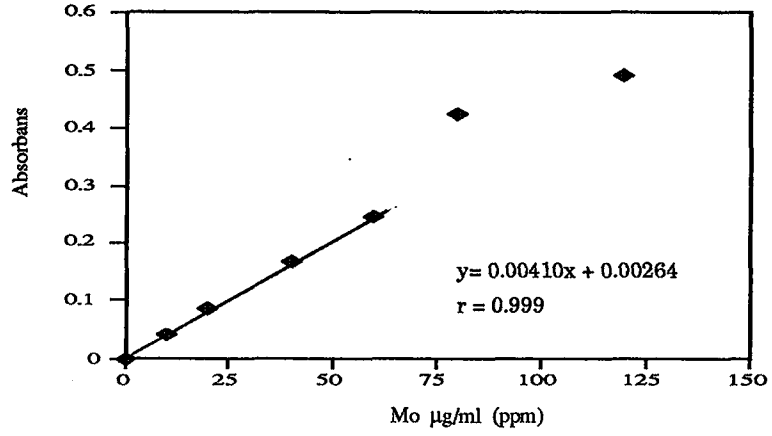
Şekil 13 : Nikotinic asidin Şekil 12 koşullarında daha büyük final hacime göre ayar eğrisi



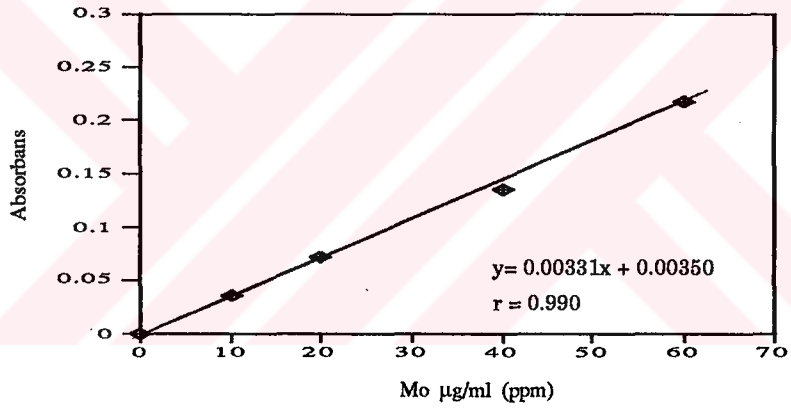
Şekil 14: Nikotik asidin amonyakla kompleksleşmeye dayanan indirekt kolorimetrik yolla analizi için ayar eğrisi



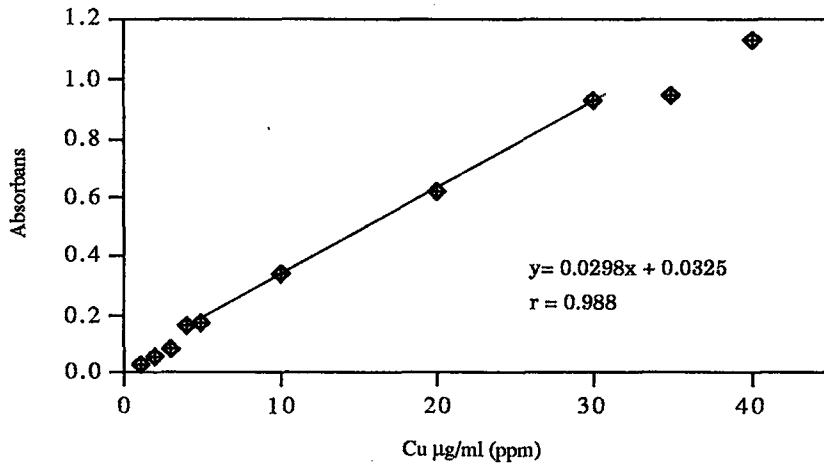
Şekil 15: Şekil 4 koşullarında Mo ayar eğrisi



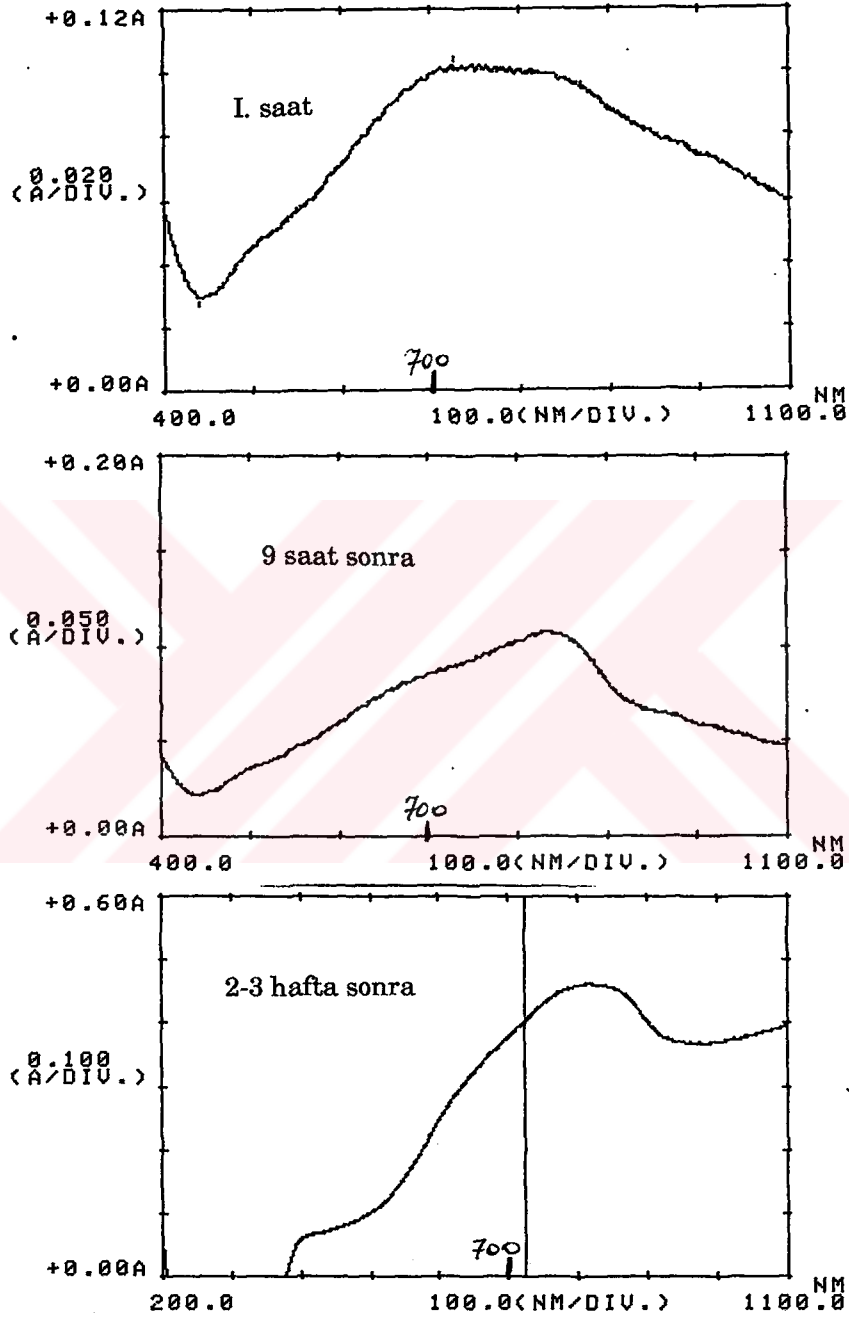
Şekil 16: Şekil 5 koşullarında Mo ayar eğrisi



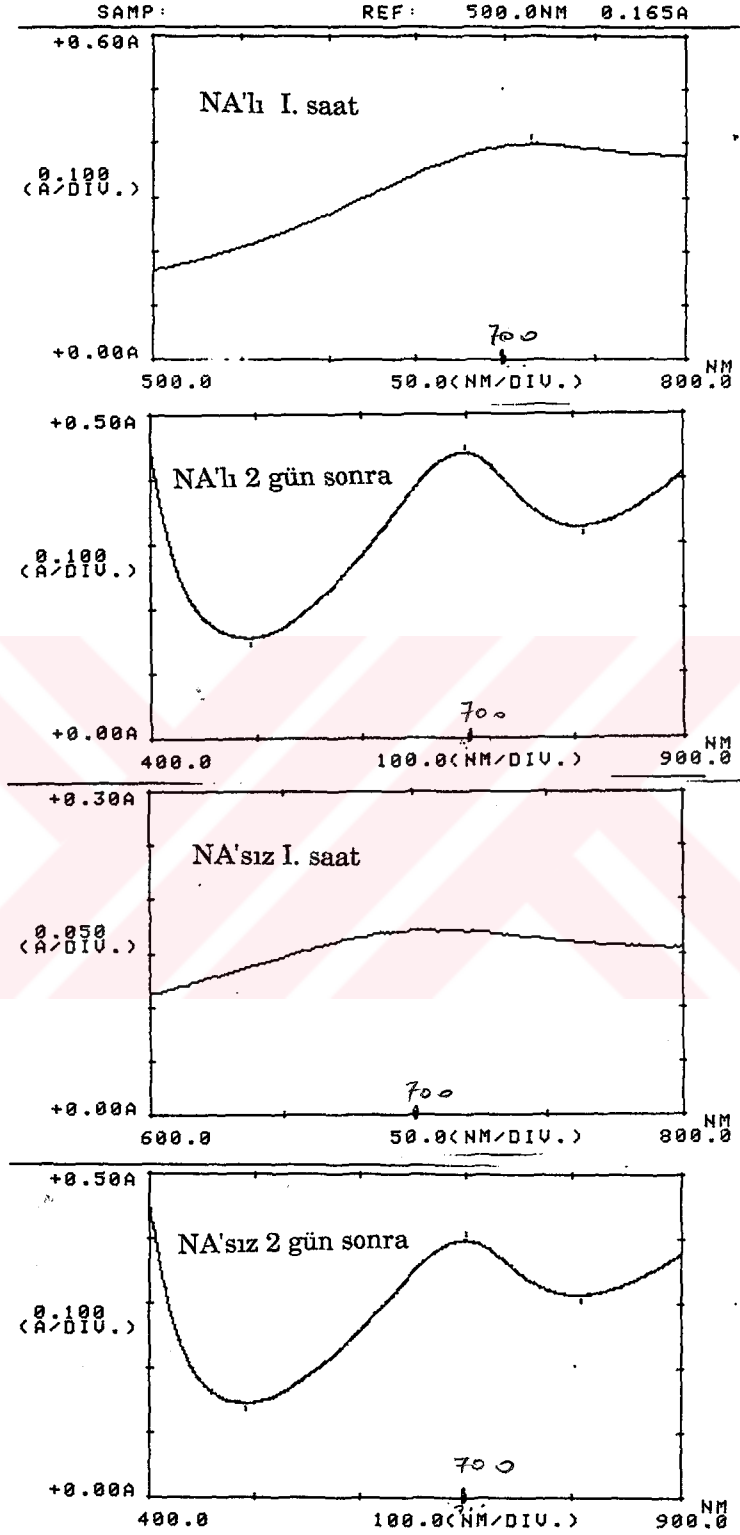
Şekil 17: Şekil 6 koşullarında Mo ayar eğrisi



Şekil 18: Şekil 12 koşullarında Cu ayar eğrisi



Şekil 19: PMA ile çöktürme yönteminde oluşturulan Mo mavisine ait spektrumlar.



Şekil 20: NA analizi için Cu ve KCN yoluyla oluşturulan Mo mavisine ait spektrumlar.

3.2. Geliştirilen Yöntemlerin analitik Gösterge Değerleri

3.2.1. Duyarlık Tayini

Ayar eğrilerinden duyarlıkla ilgili aşağıdaki çizelgeler oluşturuldu.

Çizelge 7: Geliştirilen AAS yöntemlerine ait duyarlık ile ilgili bilgiler

Belirlenen Bileşik	Örnek Hacmi (ml)	Final Hacim (ml)	Kullanılır Aralık (KA) ($\mu\text{g/ml}$ final)	Nisel Ölçüm Sınırı (NÖS) (mg)	Sulu örnekte Nisel ölçüm Sınırı (NÖS) ($\mu\text{g/ml}$ ör.)	Ayar Duyarlığı dA/dc (abs/ppm)	Analitik Duyarlık (dA/dC)/s
Nikotin	5	50	1-18	0.05	10	0.0219	7.3
Nikotinamid	4	50	7-16	0.35	88	0.0131	3.3
Niketamid	4	50	8-20	0.40	125	0.0107	5.4
Nikotinic As.	5	250	2-20	0.50	100	0.0248	8.3

Çizelge 8: Geliştirilen kolorimetrik yöntemlere ait duyarlılıkla ilgili bilgiler

Belirlenen Bileşik	Örnek Hacmi (ml)	Final Hacim (ml)	Kullanılır Aralık (KA) ($\mu\text{g/ml}$ final)	Nisel Ölçüm Sınırı (NÖS) (mg)	Sulu örnekte Nisel Ölçüm Sınırı (NÖS) ($\mu\text{g/ml}$ ör.)	Ayar Duyarlığı dA/dc (abs/ppm)	Analitik Duyarlık (dA/dC)/s
Nikotin	5	25	2-28	0.05	10	0.0167	0.64
Nikotinamid	4	25	14-40	0.35	125	0.014	1.3
Niketamid	4	25	16-40	0.40	100	0.007	1.4
Nikotinic As. (Mo mavisi)	5	75	7-40	0.50	100	0.015	1.4
Nikotinic asit (NH ₃ ile komp)	5	50	10-45	0.50	100	0.0006	0.083

Çizelge 9. Bileşiklerin 3.6'da belirlenen eşdeğer metal atomu sayıları ile KA'daki eğimleri arasındaki ilişki

Bileşik	M/Org (mol/mol)	Ayar Duyarlığı (dA/dc)	
		İnd. AAS	İnd. Kol.
Nikotin	8/1	0.0219	0.0167
Nikotinamid	4/1	0.0131	0.0156
Niketamid	4/1	0.0107	0.0067
Nikotikasit	1/1	0.0248	0.0142 (Mo mav.) 0.0005 (NH ₃ ile komp.)

Çizelge 10. Nic'in UV spektrofotometrik (Willits ve Ark 1950) ve NA'nın VIS spektrofotometrik (Bellion 1968) analiz yöntemlerine ait bazı bilgiler

Bileşik	LKA µg/ml	dA/dC abs/ppm	BSS (%)	Yöntem
Nikotin	1-30	0.0343	2	UV Spekt.
Nikotinic asit	0.05-40	0.045	1	VIS-Spekt.

3.2.2. Kesinlik Tayini

Geliştirilen yöntemlerin kesinliğini belirlemek için, ilgili bileşiğin derişimi hepsinde eşit olan çok sayıda ideal örneklere, diğer tüm etkenlerin aynı kaldığı bir ortamda geliştirilen yöntem uygulandı. Bu işlem, ilgili her bileşik ve geliştirilen her yöntem için tekrarlandı.

Kesinliğin ifadesi için, bu yolla elde edilen absorbanların birbirine yakınlığı standart sapma (s) ve bağıl standart sapma (BSS) olarak hesaplanmıştır. Bunlar için aşağıdaki eşitlikler kullanıldı.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A_i - \bar{A})^2}{n-1}}$$

$$BSS = \frac{s}{\bar{A}} \times 100$$

s : Standart sapma

n : Deneme veya ölçüm sayısı

\bar{A} : Ortalama absorban

A_i : Herhangi bir i.nci denemedeki absorban değeri

BSS : Bağıl standart sapma, yüzde olarak

Çizelge 11: Geliştirilen AAS yönteminde elde edilen kesinlikle ilgili bilgiler

Bileşik	n	\bar{A}	s	BSS %
Nikotin	7	0.213	0.003	1.4
Nikotinamid	8	0.096	0.004	4.8
Niketamid	7	0.047	0.002	5.3
Nikotinic Asit	11	0.189	0.003	1.8

Çizelge 12: Geliştirilen Kolorimetrik yöntemlerde elde edilen kesinlikle ilgili bilgiler

Bileşik	n	\bar{A}	s	BSS %
Nikotin	6	0.330	0.026	8.0
Nikotinamid	6	0.143	0.012	8.8
Niketamid	7	0.157	0.005	3.5
Nikotinic Asit (Mo mavis)	8	0.366	0.010	2.9
Nikotinic Asit (NH ₃ ile komp)	10	0.021	0.006	2.6

3.2.3. Doğruluk Tayini

Doğruluk, literatürde analiz yöntemi geliştirme çalışmalarının bazılarında da görülen ve ideal örneklere mahsus bir tarza göre belirlenmiştir. Bu tarza göre organik standardın bilinen bir miktarı (doğru kabul edilen) alınıp ilgili yöntemle analizlenir. Bulunanın bilinene göre yüzde geri kazanım ve yüzde hatası belirlenerek doğruluk ifade edilir. Bu tarzla bulunan değerler çizelge 13 ve 14'de gösterilmiştir.

Çizelge 13. Geliştirilen AAS yöntemlerine göre yüzde geri kazanım ve hatanın belirlenmesi

Bileşik	Ölçüm sayısı (n)	Eklene (mg)	Bulunan (mg)	% Geri kazanım	% Hata
Nikotin	7	0.500	0.500	100.0	0.0
Nikotinamid	8	0.500	0.503	100.6	+0.6
Niketamid	7	0.750	0.744	99.2	-0.8
Nikotinic Asit	11	2.000	2.016	100.8	+0.8

Çizelge 14. Geliştirilen kolorimetrik yöntemlere göre yüzde geri kazanım ve hatanın belirlenmesi

Bileşik	Ölçüm sayısı (n)	Eklene (mg)	Bulunan (mg)	% Geri kazanım	% Hata
Nikotin	6	0.500	0.516	103.2	+3.2
Nikotinamid	6	0.500	0.506	101.2	+1.2
Niketamid	7	0.700	0.680	98.0	-2.0
Nikotinic Asit (Mo mavisi)	8	2.000	1.930	96.5	-3.5
Nikotinic Asit (NH ₃ komp)	10	2.000	1.909	95.4	-4.5

3.3. Girişimler

Girişim yapanları çökeleğin ayrılmasından sonraki ortamlarda öncelikle ele almak gereksizdir. Çünkü santrifüjleme ve yıkama işlemleriyle örnekteki diğer bileşenler ayrılmış olurlar. Bundan sonra örnek ve standartların ortam bileşimi aynı olur. Bu nedenle AAS için standart ekleme yöntemine veya başka bir zemin düzeltme işlemine gerek kalmaz. Oluşturulan Org-PMA çökeleği bekledildiğinde üzerinde mavi lekeler oluşabiliyor. Yıkandıktan sonra bekletilirse bu lekeler girişime neden olmaz, çünkü çökelek bazla çözülürken mavi renkteki değişime uğramış kısım, değişmemiş haliyle yine aynı eşdeğerde PO³⁻₄ ve MoO²⁻₄ oluşturularak çözünür.

Esas girişim sorunu örnekteki ortam maddelerinin çöktürücü reaktiflerle etkileşmesine dayanır. Bu etkileşme iki yolla olur:

- 1) Çöktürücü reaktifin indirgenmesi yoluyla
- 2) Çöktürücü reaktifle (ürün oluşumu benzeri) çökelek oluşturması yoluyla

Birinci yola göre kendileri de bir yükseltgen olan PMA ve Cu (II) indirgendiklerinde ilki Mo mavisi, diğeri Cu(I) oluştururlar. Mo mavisinin oluşumuna neden olan indirgenin miktarı örnek içinde fazla değilse çökeleğin ayrılması ve yıkanması sırasında kendisi veya oluşturduğu Mo mavisi ortamdan uzaklaşacağından girişimi önemsizdir. Fakat aynı miktar indirgen Cu(AC)₂ için söz konusu olduğunda aynı şey söylenemez. Çünkü çözünürlüğü düşük olan CuCl (K_{çç}= 1.72.10⁻⁷) ve indirgenin biraz fazlasıyla

NA'nın çökmeye ortamında çok az çözünen $\text{Cu}_2\text{O}(k)$ oluşur ki bu durumda pozitif girişime neden olur. Aşağıda girişim açısından ele alınan bileşikler NA ve ND örneklerinde bulunabilenlerdir. Özellikle vitamin preparatlarında en fazla rastlanabilecek indirgen askorbik asittir (vit. C). Bununla ilgili şu denemeler yapıldı. İlgili yöntem şartlarında PMA yanına askorbik asit çözeltisi eklendiğinde mavileşme görüldü. Yine NA ile ilgili yöntem şartlarında $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ yanına eklendiğinde beyaz bulanıklık (CuCl), biraz fazlasıyla kahverengi çökelek (Cu_2O) oluştuğu gözlemlendi. Bu girişim nedeniyle askorbik asit çöktürme ortamında olmamalıdır. Örnekte olduğunda NA ve ND'den ayırmak gerekir.

Diğer bir indirgen sınıf olan karbonhidratlardan sakkaroz ile aynı tarzda şu denemeler yapıldı: Sakkaroz çözeltisi yukardaki gibi PMA'lı ortama eklendiğinden ancak birgün sonra mavileşme oldu. İlgili koşullarda $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ yanına eklendiğinde bir değişiklik görülmedi. Bu gözlemlerden sakkarozun girişim yapmadığı belirlenmiş oldu.

Yüksek mol kütleli ve azotlu bazlar PMA ile çökmeye oluşturabileceklerinden PMA ile çöktürmeli yöntemde girişime neden olurlar. Özellikle piridin halkalı heteroksiklik baz ve amfoter bileşikler de $\text{Cu}(\text{II})$ ile kompleksleşerek çökmelere neden olabilirler. Tiamin (Vitamin B₁), riboflavin (Vitamin B₂), piridoksin (Vitamin B₆), folik asit (Vitamin B₁₀) NA ve ND ile ilgili geliştirilen yöntemlerde girişim yaparlar.

Biyolojik örneklerde rastlanabilen amino asitler (AA) girişim yapmazlar. Oluşan $\text{Cu}(\text{AA})_2$ kompleksi suda çözünür.

Yine vitamin preparatlarında veya başka tür örneklerde rastlanabilen eser elementler Cu, Fe, Mn, Mo, Ca, Mg, I, P bu düzeyde girişim yapmazlar. Cu, Mo, P dışındakilerin eser düzeyde olup olmaması, önemli değildir. Cu, Mo ve P kendisiyle ilgili yöntemlerde bu (eser) düzey üzerinde sorun çıkarabilir. Fosfatın çözücü ve reaktiflerde az oranda olması (Mo mavisi için MoO_4^{2-} eklendiği yöntem açısından) önemli değildir, çünkü örnek ve standartların hepsi için eşit miktarlarda reaktif kullanılacaktır.

NA belirlenirken ortamda ND'nin olması $\text{Cu}(\text{ND})_2^{2+}$ kompleksinin çökmemesi nedeniyle girişime neden olmaz.

NA'nın öbürleri belirlenirken ortamda olmasının girişim yapıp yapmadığına gelince; bu konuda şu deneme yapıldı. Ortamdaki NA derişimi ND'e ait KA'nın üst sınırını geçmediği sürece PMA ile çökmeye gözlemlendi. Belirtilen bu koşullarda NA girişim yapmaz.

3.4. İlgili Yöntemin Tütünde Nikotin Tayini İçin Sınanması

Nikotinle ilgili burda geliştirilen yöntemlerle UV spektrofotometrik yöntemin aynı tütün örneğine uygulaması yapıldı. Analiz değil yalnızca karşılaştırılması amaçlandığı için herhangi bir tütün örneğinden yalnızca bir katı örnek alınması yeterli görüldü. Ekstraksiyon yöntemine göre örnek hazırlanıp bununla her yöntem için yedi deneme yapıldı. Sonuçlar aşağıda Çizelge 15'de verilmiştir.

Çizelge 15. UV spektrofotometrik ve geliştirilen ilgili yöntemlerin Nic. tayini için tütüne uygulanması.

Yöntem	% Alkaloid	UV Spek.e göre % fark	Örnek hazırlama yolu
UV spektrofotometrik	1.10	Kendisi	Ekst.
İndirekt AAS	1.09	0.01	Ekst.
İndirekt kolometrik	1.09	0.01	Ekst.

Bu sonuçların yorumu 4.3'te ele alınmıştır.

3.5. Renk Kararlılığı

Aynı yöntemde organik bileşik farkının Mo mavisine ait spektruma bir etkisi olmadığı gözlenmiştir (Şekil 20). Mo mavisi spektrumu buradaki farklı yollarla oluşturulduğunda görünüş ve zamanla değişimi farklıdır (Şekil 19 ve 20).

Nic, ND ve Nket ile ilgili Org-PMA ürününden çıkarak buna dayalı kolorimetrik yöntemde göre Mo mavisi oluşturuldu. Bunun çeşitli zamanlarda spektrumu alındı. Başlangıçta 700-725 nm'deki pik, çok geçmeden alçalarak 832 nm civarına kayarak burada yükseliyor (Şekil 19). NA ile ilgili yöntemde göre oluşturulan Mo mavisi için durum biraz farklıdır. Öbürünün tersine 725 nm'deki pikin görünüşü, yayvanlığı azalacak şekilde değişir (Şekil 20). Fakat hepsi için uygun absorbans okunması açısından aynı genellemeler yapılabilir: renk oluşumu 15 dakikada tamamlanıyor. Standart ve örneklere ait renk oluşturulması aynı anda (çok az zaman farkıyla) olmalı ve gecikmeden ilk birkaç saat

içinde okunmalıdır.

Oluşturulan ayar eğrileri (Mo mavisıyla ilgili) 24 saate kadar kısmen korur. Sapmalar özellikle yüksek derişime ait noktalardan başlıyor ve gittikçe KA daralıyor. 24 saatten sonra doğrusallıktan söz etmek pek mümkün olmuyor.

3.6. Bileşiklerin Metal Eşdeğerleri/Stokiyometri

Bunun için element analizinin yerinin yaklaşık olarak alabileceğ aşığıdaki basit hesaplama yöntemi geliştirildi. Bir organik bileşiğin bir metalle oluşturduğu çökme ürününün bileşiminde metalin org. bileşiğe oranı (mol veya kütle olarak) sabittir ve şu şekilde ifade edilebilir, M metalin, org. organik bileşiğin miktarları olmak üzere:

$$\frac{M}{\text{org}} = \frac{\Delta(M)}{\Delta(\text{org})} = \frac{d(M)}{d(\text{org})} \quad (1)$$

Bu çökelek herhangi bir V hacminde çözülürse M ve org.un derişimleri (c) oranı ile çökelekteki miktar oranları arasında şu bağıntı yazılabilir:

$$\frac{M}{\text{org}} = \frac{d(M)}{d(\text{org})} = \frac{d(M) / V}{d(\text{org}) / V} = \frac{dc(M)}{dc(\text{org})} \quad (2)$$

Absorbansların birlikte (aynı koşullarda) okunmasıyla oluşturulan metale ait derişim-abs. kalibrasyon grafiği ile geliştirilen yöntemin org. bileşik derişimi-abs. ayar eğrisinin eğimleri arasında her ikisinin kullanılabilir aralıkları boyunca

$$\frac{dc(M)}{dc(\text{org})} = \frac{dc(M) / dA}{dc(\text{org}) / dA} = \frac{(dA / dc)_{\text{org}}}{(dA / dc)_M} \quad (3)$$

yazılabilir. Derişime (c) birimi $\mu\text{g/ml}$ veya ppm olarak alınırsa,

$$\frac{\text{ppm}(M)}{\text{ppm}(\text{org})} = \frac{(dA / dc)_{\text{org}}}{(dA / dc)_M} \quad (4)$$

elde edilir. Organik bileşiğin mol olarak metal eşdeğeri ise;

$$\frac{\text{mol (M)}}{\text{mol (org)}} = \frac{\text{FK (M) (dA/dc) org}}{\text{FK (org) (dA / dc) M}} \quad (5)$$

olur.

Bu eşitlikler geliştirilen biri PMA'lı diğer Cu'lu yöntemlerde yerine konursa aşağıdaki durumları alır.

M'nin Mo olduğu, org.un Nic, ND ve Nket olduğu yöntemde (4) denklemi

$$\frac{\text{ppm (Mo)}}{\text{ppm (org)}} = \frac{(\text{dA/dc})_{\text{org}}}{(\text{dA/dc})_{\text{Mo}}} \quad (6)$$

olur. Org.un mol olarak PMA eşdeğeri için Mo'nun PMA eşdeğeri (12 Mo=PMA) (5)'te yerine konulursa

$$\frac{\text{mol (PMA)}}{\text{mol (org)}} = \frac{\text{FK (org) . (dA/dc) org}}{12 \text{ FK (Mo) . (dA/dc) Mo}} \quad (7)$$

elde edilir. FK (Mo) = 95.94 olarak yerine konursa

$$\frac{\text{mol (PMA)}}{\text{mol (org)}} = \frac{8.6.10^{-4} \text{ FK (org) (dA/dc) org}}{(\text{dA/dc})_{\text{Mo}}} \quad (8)$$

olur.

NA için geliştirilen yöntemde göre (4) eşitliği

$$\frac{\text{ppm (Cu)}}{\text{ppm (NA)}} = \frac{(\text{dA/dc})_{\text{NA}}}{(\text{dA/dc})_{\text{Cu}}} \quad (9)$$

halini alır. NA'nın mol olarak Cu eşdeğeri için ise:

$$\frac{\text{mol (Cu)}}{\text{mol (NA)}} = \frac{\text{FK(NA) (dA/dc) NA}}{\text{FK (Cu) (dA/dc) Cu}} \quad (10)$$

yazılabilir. FK'lar Cu için 63.54, NA için 123.1 olarak yerine konursa,

$$\frac{\text{mol (Cu)}}{\text{mol (NA)}} = \frac{1.9 (\text{dA/dc})_{\text{NA}}}{(\text{dA/dc})_{\text{Cu}}} \quad (11)$$

halini alır.

Bu eşitliklere ayar eğrileri eğimleriyle ilgili değerler konulursa aşağıdaki çizelge 16 ve 17 elde edilir.

Çizelge 16: ilgili bileşiklerin Mo ve PMA eşdeğerleri

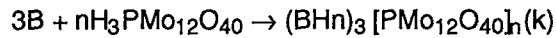
Org. Bileşik	(dA/dc) _{org}	(dA/dc) _{Mo}	Mo/org ppm/ppm	PMA/org mol/mol	En yakın basit mol oranı (mol/mol)
Nikotin	0.0219	0.00376	5.8	2.5 / 3	2/3
Nikotinamid	0.0131	0.00410	3.2	1.1 / 3	1/3
Niketamid	0.0107	0.00370	2.9	1.3 / 3	1/3

Çizelge 17: NA'nın Cu eşdeğeri

Bileşik	(dA/dc) _{NA}	(dA/dc) _{Cu} ppm/ppm	Cu/NA ppm/ppm	Cu/Na mol /mol	En yakın basit mol oranı (mol/mol)
Nikotinik Asit	0.0142	0.0267	0.532/1	1.01/1	1/1

PMA/Org ve Cu/NA mol oranları, beklenen en yakın basit orandan hepse pozitif yönde sapma gösteriyor ki bu beklenmedik bir durum değildir. Çünkü çökelek üzerinde adsorblanan fazla metal reaktifi buna sebep olur.

Buraya kadar elde edilen bilgilerin ışığında ürün formülleri önerilebilir. PMA ile çökme reaksiyonu B ilgili bileşik olmak üzere genel olarak şöyle gösterilebilir:



n protonlanan azot atomu sayısı olup değerleri Nic için 2, ND ve Nket için 1'dir.

NA'lı çökme ürünü formülüne gelince, 3.7'de tahmin edilen reaksiyon adımları dizisi Cu(NiA) (OH) ürünüyle sonlandırılmıştı. Reaksiyonda tahmin edilen Cu-NA 1:1 ilişkisi deneyle de kabaca doğrulandı. Fakat çökme ürünü bir koordinasyon bileşiği olduğuna göre kompleks yapısı, merkez atomun koordinasyon sayısı ligantlarla tamamlanacak şekilde oluşmalıdır. Bu durumda NA ile ilgili üründe Cu²⁺ (d⁹) sistemi için bu sayı 4 ve 6'dır. Farklı ligantlarla oluşan bir Cu kompleksinde genellikle 6 koordinasyona rastlanır. Bu nedenle ürün formülü önerilirken bu sayı alınmıştır Bu durumda çökme ürünü aşağıdaki gösterilen formülde olmalıdır:



Her iki tipteki ürünlere ait önerilen formüller çizelge 18'de gösterilmiştir.

Çizelge 18. İlgili bileşiklerin oluşturduğu çökme ürünleri için önerilen formüller

Bileşik	Önerilen Ürün Formülü
Nikotin	$(\text{NicH}_2)_3 [\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$
Nikotinamid	$(\text{NDH})_3 [\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$
Niketamid	$(\text{NketH})_3 [\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$
Nikotikasit	$[\text{Cu}(\text{NiA}) (\text{OH}) (\text{H}_2\text{O})_4]$

Şu da varki bu kısımda belirlenen bu bilgiler geliştirilen analiz yöntemlerinin hiçbir yerinde kullanılması gerekmiyor. Bu belirlemeler daha çok stokiyometri konusunda uyanacak bir merakı tatmin için yapıldı.

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

4.1. Duyarlık

Çizelge 7 ve 8'den görüldüğü gibi her bileşiğin belirtilen yöntemde belli bir ni-
cel ölçüm sınırı (NÖS) değeri vardır. Bu sınırın altında yöntem geçersizdir. Bu sınır ne-
den daha aşağıda değildir? Bu durumdan geliştirilen yöntemlere adını veren final adım-
ları değil, oluşturulan çökme ürünlerinin az da olsa suda çözünmeleri sorumludur. Mikro
tayin sınırlarının 1-10 mg arasında olduğu hatırlanırsa, geliştirilen bu yöntemlere ait ni-
cel belirleme sınırları 0.05-0.50 mg arasında olup 1 mg'ın altındadır. Bu miktarlar ultra-
mikro düzeye düşmekte, bu da yeterince yüksek duyarlık ifade etmektedir.

Bir bileşik için NÖS geliştirilen her yöntemde aynı kalmaktadır. Üst sınırdan
ise farklılık ortaya çıkıyor. Bu, uçlarda sapmanın fazla olmasından ileri gelebilir. En yük-
sek duyarlık nikotininle ilgili olup NÖS 50 µg'dır. Bu değer tütünde nikotin tayini için gelişt-
tirilen spektroskopik yöntemlerin çoğununkinden düşüktür veya duyarlık çoğununkinden
yüksektir. Örneğin Ayad ve ark (1985) tarafından tütünde nikotinin aynı alanda indirekt
AAS tayini için geliştirdikleri yöntem 1 mg NÖS değerine sahiptir. Diğer bir örnek Nikolin
ve Ark (1969) tarafından geliştirilen nikotin için IR tayin yöntemi ise 400 µg NÖS değe-
rine sahiptir. Ancak NÖS'e bağlı duyarlık hepsi için AOAC UV spektrofotometrik tayin
yöntemlerininkinden daha yüksek değildir. Fakat tayin aralıklarına bakılırsa NA'ninkiler
dışında yöntemlerin hepsi birer ultramikro tayin yöntemidir.

Duyarlığın genel göstergesi olan, ayar duyarlığı veya doğrunun eğimi dA/dC
değerlerine çizelge 7 ve 8'de bakılırsa geliştirilen AAS yönteminde kolorimetrik yöntem-
lerden daha yüksektir. dA/dC değerlerinin artışlarına göre bileşiklerin sıralanışları her iki
yöntemde aynıdır. dA/dC değerlerinin artış yönünün, eşdeğer metal mol sayılarının artış
yönünde olması beklenir veya M/org molar oranı arttıkça duyarlık artar. Çizelge 9'a ba-
kılırsa NA dışındakiler bu düşünceyi doğrular. Eşdeğer Mo veya PMA'nın en yüksek ol-
duğu Nic'in oluşturduğu eğimde en yüksektir. Mo mol eşdeğerleri aynı olan ND ve
Nket.inkilerdeki farklılık, FK'larındaki farkla ilgilidir.

ND ve NA'nın FK'ları sırayla 122.1 ve 123.1 olup birbirine çok yakındır. ND'nin
eşdeğer Mo mol sayısı NA'nın eşdeğeri Cu'nun üç katıdır. ND'nin eğimi daha fazla bek-
lenirken tersine NA'nınki çok yüksektir. Bu şaşırtıcı durumun nedeni Mo'nun AAS'de

atomlaşmasının Cu'ya göre çok zor olmasıdır. Cu için kullanılan hava/asetilen yakıt sistemi yerine ondan daha yüksek sıcaklık vererek atomlaşma oranını artıran nitröz oksit /asetilen yakıt sistemi kullanılmasına rağmen atomlaşma kesri Cu'ya göre yine çok düşüktür. Eşdeğer Mo atom sayısı Cu gibi olsaydı ilgili üç bileşiğe ait eğimler Cu'ya göre çok düşük olacaktı. Öyleyse, kolorimetrik yöntemde NA'nın eğimi niçin yine yüksektir? Oysa burada Cu'nun yüksek atomlaşma kesriyle ilgili etken bulunmamaktadır. Bunun nedeni şu olabilir: NA'ya eşdeğer Cu'nun da eşdeğeri indirgenen PMA'daki Mo'nun mol sayısının öbürleri gibi yüksek olmasıdır. Mo mavisinin molar soğurganlık katsayısı en yüksekler arasında yer alır; $250000 \text{ abs cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (Gawargious 1975).

Geliştirilen yöntemler içinde NA için bakırın amonyakla kompleksleşmesini içine alan kolorimetrik yöntemin KA eğimi diğerlerine nispetle çok düşüktür. Bu durum $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{+2}$ kompleksine ait molar absorblama sabitinin çok düşük ($120 \text{ abs cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) olmasından ileri geliyor. Bu yöntemin kesinlik ve doğruluk gibi öbür yönleri olumlu bir yerde olmasına rağmen şu soru akla gelebilir: Amonyak yerine neden molar soğurganlık katsayısı yüksek kompleksleştiriciler seçilmedi? Bu sorunun cevabı 4.6. 'da ele alınmıştır.

4.2. Kesinlik

Geliştirilen yöntemlerin kesinliği hakkında bir fikir edinebilmek için Çizelge 11 ve 12'ye bakmak gerekir. AAS yöntemlerine ait standart sapmalar (s) kolorimetrik yöntemlerinkinden daha küçük ve kendi aralarında birbirine daha yakındır. Kolorimetrik yöntemlerde AAS yöntemine ilaveten renk oluşturma adımı nedeniyle dolaylılık bir fazla arttığından S'in artıp kesinliğin daha düşük olacağı beklenebilir. En düşük s değerine sahip niketamid, indirekt AAS yöntemiyle en kesin tayin edilebilen bileşiktir. Ancak niketamid ile yapılan denemelerde KA'nın iki ucuna yaklaştıkça s'in artabileceği belirlenmiştir. Bu nedenle yöntem örneğe uygulanırken, tayin edilecek bileşiğin derişimi, KA'nın ortasına gelecek şekilde örneğin seyreltilmesi uygundur.

Sonuç olarak geliştirilen bu yöntemlerin kesinliklerinin, BSS değerlerinin %10'un altında ve %5'e yakın olmalarıyla pek olumsuz olmadığı söylenebilir. Bu değerler literatürdeki indirekt AAS alanındaki genel değerlere uygundur.

4.3. Doğruluk

Doğruluk ile bilgiler, yüzde geri kazanım ve yüzde hata olarak çizelge 13 ve çizelge 14'de gösterilmiştir. Yüzde hata artış ve azalışına göre bileşiklerin sıralaması, Nic. dışında geliştirilen yöntemlerin hepsinde aynıdır. Doğruluk sıralaması şöyledir:

$$ND > N_{ket} > NA$$

Soldan sağa yüzde hata artar, ters yönde ise yüzde geri kazanım 100'e yaklaşır ise doğruluk artar. Geliştirilen yöntemlerden doğruluğu daha yüksek olanı AAS'li olanlardır. Yüzde hatalar ± 5 'i bulmuyor. Bu da indirekt AAS analiz alanındaki genel durumun dışında değildir.

Tütünde nikotin tayini için bir UV spektrofotometrik yöntemle birde burdaki ilgili yöntemi doğruluk açısından karşılaştırmaya yarayan iki husus vardır ki bunlardan elde edilen fikir deneyle de doğrulanmıştır. İlk husus bir ihmalle, diğeri girişimlerle ilgili olup her ikisi pozitif hataya neden olarak hatanın artmasına yol açar.

İlk husus şu bilgilere dayanıyor: AOAC yöntemlerinde pek görülmeyen kromatografik yöntemler dışında hiçbir spektroskopik yöntem tütünde nikotini öbür alkaloidlerin yanında özgül olarak tayin edemiyor. Tütünde nikotin tayin UV spektrofotometrik olan AOAC yöntemi Willits ve Ark (1950) tarafından geliştirilen yöntemeye dayanır. Bu yöntemde toplam alkaloid nikotin cinsinden tayin edilmekte, fakat nornikotin molar soğurganlık katsayısı nikotininkinden %10 daha fazla olduğu, bundan gelecek hatanın tütünde nornikotin az oranda olması nedeniyle önemsiz olacağı ifade edilmektedir (Willits ve Ark 1950). Fakat nornikotin alt sınıfı (sekonder alkaloid olarak) titrasyon yoluyla bile (farklı belirteçlerin yardımıyla) farkedirilebiliyor (Bkz. sf.14,). Buna göre o kadar da düşük oranda olmadığı açıktır ve hatta bazı tütün türlerinde nikotinden de fazla orandadır (Baytop, 1983). Buna göre ilgili yöntemle toplam alkaloid tayininde bundan gelecek hatanın önemsiz olduğu söylenemez. Nikotin alkaloidlerinin herbirinin PMA ile mol eşdeğeri veya stokiyometrilere hepsinde aynı olacaktır ki, çizelge 4'deki molekül yapılarına bakılarak bu rahatça söylenebilir. Yukarda bahsedilen nornikotin molar absorblama katsayısındaki farklılığın ihmali, ilgili yöntemde, nornikotin oranına da bağlı olarak pozitif hataya neden olur. Geliştirilen PMA'lı yöntemde ise ilgili ihmalin yapılip ya-

pılmaması birşeyi değiştirmeyeceğinden bu durum için hata söz konusu olmaz.

İkinci hususa gelince, alkaloid degradasyon ürünleri, bitki pigmentleri ve lipitlerin UV spektrofotometrik yöntemde pozitif girişim yaptığı ve bunların ekstraksiyon yöntemiyle örnek hazırlama yolunda, su buhar damıtmasıyla olandan daha fazla olduğu belirlenmiştir (Willits ve Ark, 1950). Çizelge 15'deki her iki PMA'lı ve UV spektrofotometrik yöntemlere göre tütün örneğinde nikotin analizi sonuçlarına bakıldığı zaman PMA'lı yöntemlere göre sonuçların daha düşük olduğu görülüyor. Bu geliştirilen PMA'lı yöntemin mutlaka negatif hataya sahip olduğunu göstermez. Bu durumun, öbür yöntemde, yukarıda açıklanmış hususların pozitif hataya neden olmasından ileri geldiği söylenebilir. Ayrıca girişim yapan türlerle PMA'nın çökmesi de beklenemez. UV spektrofotometrik yöntemde daha fazla pozitif hataya neden olan ekstraksiyon yolu geliştirilen PMA'lı yöntemde güvenle kullanılabilir.

Sonuç olarak geliştirilen PMA'lı yöntemin, AOAC UV spektrofotometrik yöntemden, tütünde toplam alkaloid belirlenmesinde daha az hatalı olduğu ileri sürülebilir.

4.4. Uygulanabilirlik / Seçicilik

Geliştirilen bu yöntemlerin uygulanabilirliği hakkında, değişik örneklere uygulamadan bazı bilgilerin ışığında fikir verilebilir.

Bu dört bileşiğin her birine ait farmasötik örneklerde eğer bileşik başka farmasötik bileşiklerle kombine halde değilse ilgili yöntemler böyle örneklere uygulanabilir. 1.2.1.2.'de NA için, 1.2.1.4'de Nket için bahsedilen ticari farmasötik maddelere ait örnekler bu türdendir.

Nikotin tayini için ilgili yöntemlerin uygulanacağı doğal örnek tütün yapraklarıdır. İlgili yöntem nikotin alkaloidlerinin toplamını tayin eder, sonuç nikotin cinsinden ifade edilir. Nikotin için HPLC ve GC dışında AOAC ve diğer bilinen yöntemler de seçici değildir.

Tütün örneği her iki tarza (ekstraksiyon veya su buharı damıtması) göre hazırlansa da ilgili yöntemler için girişim sorunu yoktur. Bazı sebze ve yiyeceklerde nikotin kirliliği için bu yöntemler pek iddialı değildir. Bu tür örneklere uygulanabilmesi, girişim ihtimaline karşı örnek bileşiminin bilinmesine ve nikotin derişiminin NÖS değerinin üstünde kalacak şekilde girişimcisiz olarak hazırlanabilmesine bağlıdır.

Bu bileşiklerin daha karmaşık bileşimli, doğal veya farmasötik örneklerine Nket

için rastlanmaz, NA ve ND için ise rastlanır. Bu bileşiklerin böyle örneklerine uygulanabilirliği veya seçiciliğine gelince uygulanan örneğe göre, ortamda bulunabilecek bazı bileşiklerin farklı etkileri nedeniyle bilinen öbür yöntemler yanında avantajlı ve dezavantajlı durumlar ortaya çıkar.

Nikotinic asit için burada geliştirilen yöntemlerle nikotinic asit, nikotinamid yanında tayin edilebilir, $Cu(ND)_4^{+2}$ kompleksi çökmediğinden öbüründen ayrılmış olur. Ancak örnekte ND derişiminin NA'ya göre aşırı olması, $Cu(AC)_2$ 'nin optimal derişimini etkileyebileceğinden biraz fazla alınmasıyla (%4 yerine %5 gibi) durum düzeltilebilir. AOAC yöntemlerde besin/gıda örneklerinde NA, ND yanında tayin edilemez. ND, asit veya bazlarla hidrolizlenerek NA'ya dönüştürülüp Konik reaksiyonu uygulanarak her ikisinin toplamı belirlenip NA cinsinden ifade edilir (Bellion, 1968; AOAC 1990j). Bu durumda NA tayini için burada geliştirilen yöntem, AOAC yöntemine karşı seçicilik yönüyle bir üstünlüğe sahiptir.

NA+ND'yi belirleyebilen fakat AOAC olmayan başka bir yöntem 262 nm'de absorpsiyon ölçümüyledir. Bu yöntemde absorpsiyon bölgesi 240-290 nm olan protein ve nükleik asitlerin olmaması gerekir (Bellion, 1968). NA için burada geliştirilmiş yöntemde ise bunlar girişim yapmazlar. NA, amino asitler yanında da tayin edilebilir, çünkü $Cu(AA)_2$ kompleksi çökmez.

NA'nın ND yanında tayin edilebildiği yukarıda açıklandı. NA yanında ND'nin tayin edilebilmeside NA'nın 3.9'da belirtilen girişim yapmadığı derişim aralığında olmasına bağlıdır. Bu koşullara uyulduğu zaman, burda geliştirilen ilgili yöntem besin örneklerinde NA ve ND'nin toplamını tayin edebilen AOAC yöntemi karşısında seçicilikte bir üstünlük daha sağlar. Ancak vitamin preparatlarında NA yanında ND'yi belirleyebilen bir AOAC yöntemin olduğu da unutulmamalıdır (AOAC, 1990m).

ND ve NA tayini için geliştirilen bu yöntemlerin uygulanabilirliği örnek bileşimin bilinmesine ve örneğin girişimsiz olarak hazırlanabilmesine bağlıdır. Girişim yapanlar ekstraksiyonla ayrılamıyorlarsa kolon ayırmasına başvurulmalıdır. Belirlenecek bileşik eğer örnekte nicel ölçüm sınırının altına düşecek oranda ise geliştirilen ilgili yöntemlerin böyle örneklere uygulanabilmesi derişirme/zenginleştirme yapılabilmesine bağlıdır. Buharlaştırma yolu, NA'nın deriştirilmesi için sağlıklı bir yöntemdir. R.P. Daroga tarafından seyreltik HCl'li ortamda NA'nın kayıpsız olarak çözeltilisinin buharlaştırılabilmesi gösteril-

miştir. (L.C. Thomas ve Ark. 1980b). Aynı yöntem ND ve Nket için hidrolizlenerek bozula-caklarından geçersizdir.

4.5. Kararlılık

Kararlılık durumu burada geliştirilen AAS ve kolorimetrik yöntemlerde farklıdır. Kolorimetrik yöntemlerin kararlılık durumuna 3.5'de değinildiği gibi Mo mavisi oluşumu 15 dakikada tamamlanır ve doğrusallık bir süre için kalıcıdır. Kullanılır aralık gittikçe daralır. Sapma uçlardan özellikle üst kısımdan başlayıp belli bir süre sonra doğrusallık tamamen kalır. Sapmaya ortamdaki eşdeğer organik türün bir etkisi olmadığı gözlemlendi. Burada geliştirilen kolorimetrik yöntemlerin hepsinin kararlılıkları için aynı genelleme yapılabilir. Bu genelleme standart ve örnek ile ilgili renk oluşumunun aralarında zaman aralığı fazla olmayacak şekilde veya pratikçe aynı anda yapılmasını ve absorbanın 1-2 saat geçirmeden hemen okunmasını gerekli kılar.

Organik bileşikler tayin edilirken kullanılan standartların bozulma sorunu vardır. Işıktan koruma, havayla temas etmeme gibi dikkatli koşullar gerektirir. Buna rağmen bunların ilk hazırlandığı günkü gibi olduğundan emin olunamaz. Buradaki ilgili bileşiklerin niko-tin başta olmak üzere hepsinin standartları diğer bilinen analiz yöntemleri için günlük hazırlanmalarını gerektirir. Bu nedenle buradaki kolorimetrik yöntemleri, renk kararsızlığı nedeniyle kararlılık açısından aynı bileşiklerin bilinen fotometrik yöntemlerin karşısında daha dezavantajlı yapmaz. Örneğin NA ve ND için spektrofotometrik AOAC yönteminin dayandığı Bellion (1968) tarafından geliştirilen yöntemde renk kararlılığı buradakilerden daha uzun süreli değildir. Üstelik buradaki Mo mavisi gün ışığından etkilenmez (Tobia ve Ark. 1967). Geliştirilen yöntemlerden AAS yoluyla olanları da kararlılık söz konusu olduğu zaman, bu bileşiklerle ilgili tüm diğer yöntemlerin karşısında bunların eşsiz bir üstünlüğe sahip olduğu görülür. Zira organik standartların kendi eşdeğeri metali içine alan final çözelti bir defa hazırlanmış organik standardın inorganik standarda çevrilmiş hali olup, bozulma sorunu yoktur. Organik bileşiklerin günlük veya sık sık standart hazırlama yükünü kaldırmıştır. Bu harlaşmaması için kabın ağzı kapalı olmak koşuluyla kararlılığı pratikçe sonsuzdur. Bu durum, geliştirilen yöntemlerden AAS yoluyla olanlara çok önemli bir üstünlük kazandırır.

Buradaki kolorimetrik yöntemlerde renk kararlı olmasa da yine de bunların kararlılık açısından AOAC ve diğerleri yanında avantajlı olduğu bir durum vardır. Bu durum renk

oluşumu adımı tekrarlanacağı zaman, hep aynı ve kararlı bir "ara standart çözelti"nin her zaman kullanılabilmesidir. Bu çözelti organik standarttan çıkararak oluşturulup ayrılan çökme ürününün belli bir hacimde çözülmesiyle elde edilen çözeltidir. Bu çözeltideki organik standartın bozulması önemli değildir. Çünkü rengi oluşturacak olan onun eşdeğeri PO_4^{3-} veya $Cu-II$ dir ki, değişimleri söz konusu değildir. Renk tamamlanacağı zaman, daha zahmetli ve zaman alıcı işlemleri en baştan tekrar yapmak yerine bu kullanılabilir. Oysa AOAC ve diğer kolorimetrik yöntemlerde renk tekrarlanacağına ya bozulmadığından emin olunamayan aynı organik standart çözelti tekrar kullanılır ya da organik standart tekrar hazırlanır. Bu da ya hata ihtimali ya da madde ve zaman yükü demektir.

NA ile ilgili buradaki kolorimetrik yöntemde bu ara standart çözelti hacmi 25 ml'dir. Bundan 3.0 ml alınarak renk oluşturmak için eklenen diğer reaktiflerle üç kat seyrelir ve final hacim 75 ml'ye eşdeğer olur. Bu durumda 25/3 yaklaşık 8 defa renk oluşumu tekrarlanabilir. Fakat bu sayı uygun değişikliklerle artırılamaz değildir. Örneğin final hacmi aynı tutarak ara standart hacmi 50 ml olacak şekilde artırılabilmesi veya 10 ml'lik santirifuj tüpü yerine 30 ml'lik tüp kullanarak daha büyük ölçekte çalışılarak aynı derişimlerde daha fazla miktarda standart seti hazırlanabilmesine bu yöntem imkan sağlayabilmektedir.

Nic, ND ve Nket için geliştirilen kolorimetrik yöntemde daha fazlasıyla KA içindeki bazı noktalar NÖS'ün altına düşer kaygısıyla final hacim 25 ml yapılmıştı. Bu da yukarıdaki üstünlüğü gideriyor. Fakat alt sınırdaki muhtemel bir sapmaya göz yumulup final hacim 50 ml yapılabilirse ve böylece 25 ml'lik uygun hacimle ara standart çözeltisi hazırlama imkanı oluşur.

Bu ara çözelti, geliştirilen bu kolorimetrik yöntemlere, renk oluşumu için çabuk olmak üzere tekrarlayabilme imkanı sağlar. AAS yöntemlerinde ise yalnızca seyreltilip ayırmasını devamlı kullanabilme durumu gibi, ilkinden daha önemli derecede önemli üstünlükler kazandırır. AAS yolunda daha önemli ölçüde olan bu avantajlar, bu yöntemlere, ilgili bileşiklerin rutin analizleri için yöntem aranırken seçilme niteliği kazandırır.

4.6. Madde Külfeti

Burada geliştirilmiş yöntemlerde ve bu bileşikler için geliştirilmiş bilinen diğer yöntemlerde en az 2-3 tür reaktifin kullanıldığı madde külfeti var. Bir bileşik için AAS ve

Kolorimetrik yolda madde tüketimi farklıdır. Burdaki yöntemlerde çökme ürününün ayrılmasına kadar, hem AAS hem de kolorimetrik yol için kullanılan reaktifler aynıdır. Fakat bundan sonrası için durum farklıdır.

Çökeleğin ayrılması sonunda AAS yolunda yalnızca çökeleği çözmek için az miktarlarda tampon veya seyreltik asit kullanılır. 4.5. de değinildiği gibi bir kere hazırlanmış bir standart seti kararlılığı nedeniyle devamlı kullanılabilir. AOAC ve öbür yöntemlerde görülen madde tüketiminden ve zahmetten kurtarır. Yöntemin rutin analizlerde uygulandığı varsayılırsa AAS okumalarında alev çözeltinin püskürtülmesi sonucu standardın azalıp belli bir zaman sonra bunun tekrar hazırlanmasını da pek gündeme getirmeyecektir. Çünkü bir okumada yaklaşık 1 ml standart harcansa 50 ml'lik final hacme sahip bir standart seti ile 50'ye yakın analiz yapılabilir. NA için geliştirilen yöntemde bu sayı 250'dir. Böylece bir standart seti ile çok uzun zaman analiz yapılabilme üstünlüğü vardır.

Kolorimetrik yöntemlerde (burdaki) ise madde tüketimi renk oluşturma adımıyla ilgili olarak AAS'dekinden daha fazladır. Fakat bu yöntemde 4.5'de değinilen ara standart çözelti, standartlar tekrar hazırlanacakken yalnızca renk oluşturma adımını tekrarlama ve işlemlerin en baştan tekrarlanmasını gereksiz kılarak zaman ve madde külfetinden kurtarma üstünlüğünü sağlar.

NA ve ND için Konik reaksiyonuna dayalı geliştirilmiş ve AOAC yöntemi de olan kolorimetrik yöntemde kullanılan siyanojen bromür (CNBr) pek bulunabilen bir madde değildir. Buradaki yöntemlerdeki reaktifler ise bulunabilmesi nisbeten daha kolaydır. PMA olmazsa buna seçenek $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4$ daha kolay bulunabilir. İndirgeme reaktifinde az bir oranda bulunan aminonaftol sülfonik asit yerine sülfonik asitin aynı görevi yaptığı da belirlendi.

4.1. de değinildiği gibi NA için NH_3 ile kompleksleştirme yöntemine ait KA'nın eğimi öbürlerine göre çok düşük olarak göze çarpıyor. Burada şu soru akla gelebilir: Cu ile kompleksleşmesi için neden NH_3 değil de, molar soğurganlık katsayısı daha yüksek, örneğin Gawargious (1975) tarafından verilen ve molar soğurganlık katsayısı $\text{abs. cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ olarak yanında gösterilen, kuprizon ($16 \cdot 10^4$) dietilditiyokarbamat ($12.7 \cdot 10^3$) ve neokuproin ($7.95 \cdot 10^3$) gibi kompleksleştiriciler kullanılmadı? Bu kompleksleştiricilerin kullanılması 2.1.1.2.'de de değinildiği gibi genellikle ekstraksiyon gibi ikinci bir ayırma işlemini gerektirir ki, bu madde ve zaman yükünü artırır. Amino asitlerin indirek analizi için yön-

tem geliştirme çalışmalarında eşdeğer bakırın kompleksleştirilmesiyle ilgili buradakine benzer bir durum için Gawargious ve Ark (1975) kompleksleştirici seçimi konusuna şöyle bakmışlardır: "... Bu indirek yöntemlerin (belirtilen kompleksleştiricilerle) çoğu ışık pH ve sıcaklık değişkenlerine duyarlı oldukları için, özenli ve zor deneysel koşullar gerektirir, bunun yanında bunların hazırlanması veya elde edilmeleri zordur. Bu nedenle hazır mevcut ve bulunabilir bir reaktifin kullanımını kapsayan basit ve güvenilir bir metodun geliştirilmesine ilginizi yönelttik". Bu ekip bu bakış açılarıyla Cu tayini için PMA ve KCN reaktifleri ile Mo mavisini oluşturmayı ve bu reaktifleri tercih etmiştir. Bu tezde de NA eşdeğer Cu için bu reaktifler kullanılarak bir yöntem geliştirildi. Daha da ötesi, yine bu tezde yukarıda sözü edilen ekibin düşünüş yolu izlenerek, onlarınkinden daha üstünlüğe sahip denebilecek bir başka reaktif kullanarak bir yöntem daha geliştirildi, bu reaktif amonyaktır. Kolay bulunabilmesi, Cu ile kompleksleşme veya renk oluşumu sırasında başka bir reaktif gerektirmemesi ve nisbeten ucuz olması gibi üstünlüklere sahip bu reaktifle geliştirilen yöntem kesinlik ve doğruluk açısından da tatmin edici olduğu ilgili kısımlarda da görülmüyor.

GENEL SONUÇ

Sonuç olarak, geliştirilen bu yöntemler duyarlık, kesinlik ve doğruluk gibi genel analitik ölçütlere göre genelde iyi denebilecek bir duruma sahiptir.

Geliştirilen yöntemlerden ilgili olanları, nikotin tayini için tütün örneğine uygulanabilir. Bu dört bileşiğin başka farmasötik bileşiklerle kombinasyonu halinde olmayan farmasötik örneklerine ilgili yöntemler uygulanabilir. Daha karmaşık bileşenli örneklerle (doğal ve farmasötik) uygulanabilmesi ise örneklerin girişimcisz hazırlanabilmelerine bağlıdır.

KAYNAKLAR

1. S. Aksu 1967 Tütün Kimya ve Teknolojisi Tekel Enstitüleri Yayınları, Cetvel -I , sf 12.
2. AOAC 1990 a-g Def. of Nicotine Alk. Official Methods of Analysis (OMA)
 - a: Silicotungstic acid (Graw) and spec. Method (Meth.) with distillation in tobacco (tob.) p 65.
 - b: Perchloric acid Meth. in tob. p 66
 - c: GC Meth. in Cambridge Filter Pads, p 66
 - d: GC Meth. in Environmental Tob Smoke in Change in OMA, p1
 - e: Spec. Meth in Feeds, p 103
 - f: Spec. Meth. in Feeds (apples, cabbage and spinach) p 307
 - g: Silicotungstic Acid Meth., in Tob. Products p 176
3. AOAC 1990 (1-M) Def. of Niacin and Niacinamide
 - i: Microbiological Meth. in Vitamin Preparation p 1084
 - j: Colorimetric Meth. in Drugs, Foods and Feeds, p 1054
 - k: Automated Meth. in Cereal Products p. 1055
 - l: Automated meth., in Foods, Drugs and Feeds, p 1056
4. AOAC 1990 m Det. of Niacinamide, Spec. Meth., in Multivitamin Preparations p 1057.
5. AOAC, 1990n Det. of Nikethamide in drugs p 599.
6. APHA • AWWA • WPCF, 1965, Aminonaftolsulfonic acid Meth. for Orthophosphate, Standart Methods, 12 th. Eddition, p 231.
7. M.M. Ayad, S.E. Khayyal, and N.M. Farag, 1985. AAS det. of Nic. in tob. Spectrochimica Acta. Vol. 40 B, No: 8 pp 1127-1131.
8. W.M. Atkinson, S.M. Han, and N. Purdie 1984 Det. of Nic in Tob by Circular Dichroism Septropolarimetry, Anal Chem No: 56, pp 1947-1950.
9. T. Baytop, 1983, Farmakognozi, Cilt II, I.Ü. yayınları, sf. 266.
10. A. Bazzi, J. Montgomery and G. Alent 1988 Indirect Voltammetric and AAS Det of Caffeine, Vol. 113 p 121.
11. E. Bellion, 1968, Rapid Spect. Assay for Nicotinic acid, Analytical Biochemistry 25, 578-582.
12. E.R. Clark and El-Sayed A.K. Yacoub, 1984, Ind. Det. of Org. Comp. by AAS, Talanta Vol. 31, No: 1, pp 15-27.
13. M.Garcia-Vargas, M. Milla and J.A. Perez- Bustamonte, 1983, A.A. Spectroscopy as a Tool for the Det. of Inorganic Anions and Org. Comp., A Rewiew, Analyst, Vol. 108, No: 1293 p 1417.

14. Y.A. Gaworgious, A. Besada and M.E.M. Hassouna, 1977, Microdetermination of α - Amino acids by Colorimetry and AAS, *Microchemical* 22, 96-102.
15. H. Keskin, 1981, Nikotinamid veya PP Faktörü, *Besin Kimyası*, Cilt I, I.Ü. Yayınları, sf. 358.
16. KIRK-OTHMER, 1970, *Encyclopaedia of Chemical Technolohg* Vol: 21
 - a: Nicotinic acid, pp 509-525.
 - b: Nicotinamide, pp 525-526
 - c: Nikethamide, pp 533-535.
17. A.H. Laurena and T.G. Harrell, 1958, improved Spec. Meth. for Det. of Nic. in Tob. Smoke, *An. Chem.* Vol 30, No: 11, p 181.
18. Mahmoud, A. el Sayed and Y. Mohamed, 1975, An Extractive - Spec. Meth. for the Det of Nic. *Plant Medicine* No: 27, p 140.
19. Matsioka, Toshiyasu, Mitsui, Toshiyuki, 1982 Spec. Det of Nic. With ion Associati-on Reagents, *Chem. Abs.* 97, 155 629p.
20. G.Melentyeva, L. Antonova, 1988, *Pharmaceutical Chemistry*, Mir Publishers Mos-kow, English translation, p 330.
21. S.J. Simon and D.F. Boltz, 1975, The Ind. A.A. Spectrometric Det of several Org. Bases Using Molybdophosphoric Acid, *Microchem. J.* Vol: 20 p 468.
22. L.C. Thomas, B.Sc., F.R.I.C., G.J. Chamberlin 1980 a, b, *Colorimetric Chemical Analytical Methods*, 9 th Edition, a: 54, b: 413.
23. S.K. Tobia, Y.A. Gawargious, M.F. El-Shahat, 1967, A simple spec. meth. for the det. of copper based on the formation of Mo Blue *Anal. Chim. Acta*, 39, 392-393.
24. A. De Vries and M. De Boer, 1976 *Tob. Sc.* XX: p 78-81.
25. C.O. Willits, M.L. Swain, J.A. Connely and B.A. Brice, 1950, Spec. Det. of Nic. *An. Chem.* Vol. 22 No: 3, p 430.

ÖZGEÇMİŞ

1953 yılında Amasya'nın Gümüşhacıköy kazâsında doğdu. İlk ve orta öğrenimini bu ilde tamamladı. 1979'da Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Yüksek Mühendisliği bölümünden mezun oldu. Milli Eğitim Bakanlığı Merzifon Lisesi'nde beş yıl öğretmenlik yaptı. Daha sonra Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi'nde araştırma görevliliğine geçerek 1988'de C.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü doktora programına kaydoldu. Doktora çalışmalarını 1994 sonunda tamamladı. Halen (1995) bu üniversitede görev yapmaktadır.

