

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA ÜRÜNLERİNDE SUDAN BOYALARININ
ANALİZİNDE YENİ SIVI EKSTRAKSİYONU
TEKNİKLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Mehmet KILINÇER

Mayıs, 2014

İZMİR

**GIDA ÜRÜNLERİNDE SUDAN BOYALARININ
ANALİZİNDE YENİ SIVI EKSTRAKSİYONU
TEKNİKLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Mehmet KILINÇER

Mayıs, 2014

İZMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

MEHMET KILINÇER, tarafından DOÇ. DR. SERAP SEYHAN BOZKURT yönetiminde hazırlanan “GIDA ÜRÜNLERİNDE SUDAN BOYALARININ ANALİZİNDE YENİ SIVI EKSTRAKSİYONU TEKNİKLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Serap SEYHAN BOZKURT

Yönetici



Prof. Dr. Melih Madra

Jüri Üyesi



Jüri Üyesi



Prof. Dr. Ayşe OKUR

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisansım ve tez çalışmam boyunca bilimsel bakış açısı edinmemi sağlayan, öğrencisi olduğum için her zaman gurur duyduğum ve gurur duyacağım, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Serap SEYHAN BOZKURT'a tüm emekleri ve katkıları için sonsuz teşekkür ederim.

Yardımlarını, sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen ve tez çalışmalarım boyunca her zaman olumlu katkıları ile destek olan; yardımseverliği ve pozitif kişiliği ile örnek alacağım Sayın Prof. Dr. Melek MERDİVAN'a

Tez çalışmalarım esnasında tüm laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan başta Laboratuvar Müdürüm Sayın Erol BULUT olmak üzere tüm İzmir Gıda Kontrol Laboratuvarı çalışanlarına;

Yüksek lisans sırasında 2013.KB.FEN.007 nolu proje ile tez çalışmalarımı destekleyen Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne

Tez çalışmalarımda yardımlarını hiç esirgemeyen değerli arkadaşım İbrahim ŞEN'e;

Maddi, manevi her türlü sıkıntıda ve mutlulukta yanımda olan aileme ve her anımda yanımda hissettiğim, sabrı ve desteğiyle bana güç veren, hayat arkadaşım Nigar KILINÇER'e;

Sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Mehmet KILINÇER

GIDA ÜRÜNLERİNDE SUDAN BOYALARININ ANALİZİNDE YENİ SIVI EKSTRAKSİYONU TEKNİKLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

ÖZ

Çalışmada öncelikle, ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılması için 1-oktil-3-metil imidazolyum hegzaflorofosfat iyonik sıvısı sentezlenmiştir. Elde edilen iyonik sıvı FTIR ile karakterize edilerek termal davranışı TG/DTG eğrisi ile incelenmiştir. Sudan (I-IV) boya kalıntılarının kromatografik tayin öncesi zenginleştirilmeleri için iyonik sıvı bazlı dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi geliştirilmiş ve yöntem optimize edilmiştir. Sudan boya kalıntıları pH 7'de, 250 mikrolitre dispersif çözücü, 75 mikrolitre iyonik sıvı kullanılarak zenginleştirilmişlerdir. Geliştirilen yöntem, kırmızı pul biber, toz biber ve domates salça örneklerindeki Sudan (I-IV) boya kalıntı miktarlarının tayin öncesi zenginleştirilmeleri için başarıyla uygulanmıştır. Gerçek örneklerde boya kalıntılarına rastlanılmamıştır. Her bir boya için doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilirlik sınırı, gün-İçerik ve günler-arası tekrarlanabilirlik belirlenmiştir. Yöntemin doğruluğu için, belli derişimlerde standart Sudan (I-IV) boya kalıntı örnekleri eklenmiş ve yüzde 80-100 arasında geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Sudan boya kalıntıları, iyonik sıvı, dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon, yüksek performanslı sıvı kromatografisi

PROGRESSING NEW SOLVENT EXTRACTION TECHNIQUES IN ANALYSIS OF SUDAN DYES IN FOOD MATRIXES

ABSTRACT

In study, 1-octyl-3-methyl imidazolium hexafluorophosphate ionic liquid has been firstly synthesized for used as extraction solvent. The resulting ionic liquid has been characterized by FTIR and thermal property investigated by TG/DTG curve. Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction method was developed for preconcentration of Sudan (I-IV) dyes before chromatographic determination and the method was optimized. Sudan (I-IV) dyes have been concentrated using 250 microliter dispersive solvent and 75 microliter ionic liquid at pH 7. Proposed method has been successfully applied to preconcentration of residues of Sudan (I-IV) dyes in red pepper flakes, chilli powder and tomato sauce samples prior to determination. Dye residues have not been found in real samples. Linear working range, limit of detection, reproducibilities of within-day and between days have been determined for each dyes. Standard solutions of Sudan (I-IV) dyes in certain amount have been added to samples for accuracy of method and recovery values have been obtained between percentage 80-100.

Keywords: Sudan dyes, ionic liquid, dispersive liquid-liquid microextraction, high performance liquid chromatography

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZ	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ.....	x
BÖLÜM BİR - GİRİŞ.....	1
1.1 Gıda Renklendiricileri	1
1.1.1 Doğal Renklendiriciler.....	1
1.1.2 Yapay Renklendiriciler	2
1.1.2.1 Azo Boyalar	3
1.1.2.2 Sudan Boyaları	4
1.1.2.3 Sudan Boyalarının Tayini	4
1.1.2.4 Sudan Boyalarının Tayin Öncesi Zenginleştirilmesi	5
1.2 Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu	5
1.2.1 İyonik Sıvı Bazlı Dispersif Sıvı Sıvı Mikroekstraksiyonu	8
1.2.1.1 Geleneksel IS-DSSME.....	9
1.2.1.2 Sıcaklık Kontrollü IS-DSSME.....	9
1.2.1.3 Mikrodalga, ultrason, vorteks destekli IS-DSSME.....	10
1.2.1.4 In-Situ IS-DSSME	11
1.2.2 İyonik Sıvılar	11
1.3 Çeşitli Ekstraksiyon Yöntemleriyle Sudan (I-IV) Boyalarının Uygulamaları .	17
1.4 Çalışmanın Amacı	19

BÖLÜM İKİ - MATERYAL VE YÖNTEM 20

2.1	Reaktif ve Çözeltiler.....	20
2.2	Cihazlar	21
2.3	İyonik Sıvının Sentezi	21
2.3.1	1-oktil-3-metil-imidazolyum bromür (OMIBr) Sentezi	21
2.3.2	1-oktil-3-metil imidazolyum hegzaflofosfat (OMIPF ₆) Sentezi.....	22
2.4	Sudan Boyalarının HPLC ile Analizi	22
2.5	Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon (DSSME) Yöntemi.....	24
2.5.1	Optimizasyon Çalışmaları.....	24
2.6	Gerçek Örnekler	25
2.6.1	Gerçek Örneklerin Analize Hazırlanması.....	25

BÖLÜM ÜÇ - SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME 26

3.1	İyonik Sıvının Karakterizasyonu.....	26
3.1.1	FTIR Spektrumu	26
3.1.2	Termal Analiz	28
3.2	DSSME Yönteminin Optimizasyonu	29
3.2.1	pH Optimizasyonu	30
3.2.2	Santrifüj Süresi	31
3.2.3	Dispersif Çözücü Hacmi.....	32
3.2.4	İyonik Sıvı Hacmi	33
3.2.5	Ekstraksiyon Süresi.....	34
3.2.6	Dispersif Çözücü Çeşidi	35
3.2.7	Tuz Etkisi.....	36
3.3	DSSME Yönteminin Analitik Performansı	37
3.4	Gerçek Örnekler	39
3.5	Değerlendirme	44

KAYNAKLAR 45

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi.....	6
Şekil 1.2 Geleneksel IS-DSSME yöntemi	9
Şekil 1.3 Sıcaklık kontrollü IS-DSSME	10
Şekil 1.4 Mikrodalga, ultrason, vorteks destekli IS-DSSME yöntemi	10
Şekil 1.5 In-situ IS-DSSME yöntemi	11
Şekil 2.1 Çalışmada kullanılan Sudan boyaalarının kimyasal yapıları	20
Şekil 2.2 OMIBr iyonik sıvısının sentezi	21
Şekil 2.3 OMIPF ₆ iyonik sıvısının sentezi.....	22
Şekil 2.4 1 µg/mL derişimindeki standart Sudan (I-IV) boyaalarının kromatogramı ...	23
Şekil 2.5 Sudan (I-IV) boyaaları için kalibrasyon grafikleri	24
Şekil 3.1 İyonik sıvılar için FTIR spektrumu	27
Şekil 3.2 OMIPF ₆ iyonik sıvısının TG/DTG eğrisi	28
Şekil 3.3 DSSME yöntemine sulu çözeltinin pH'nın etkisi. (Ekstraksiyon koşulları: Örnek hacmi: 10 mL, ekstraksiyon süresi: 60 sn; iyonik sıvı hacmi: 50 µL; dispersif çözücü: metanol; dispersif çözücü hacmi: 200 µL; santrifüj süresi: 5 dakika).....	30
Şekil 3.4 DSSME yöntemine santrifüj süresinin etkisi (Ekstraksiyon koşulları : Örnek hacmi: 10 mL, örnek pH'ı: 7; ekstraksiyon süresi: 60 sn; iyonik sıvı hacmi: 50 µL; dispersif çözücü: metanol; dispersif çözücü hacmi: 250 µL).....	31
Şekil 3.5 DSSME yöntemine dispersif çözücü hacminin etkisi (Ekstraksiyon koşulları: Örnek hacmi: 10 mL, örnek pH'ı: 7; ekstraksiyon süresi: 60 sn; iyonik sıvı hacmi: 50 µL; dispersif çözücü: metanol; santrifüj süresi: 5 dakika)	32
Şekil 3.6 DSSME yöntemine iyonik sıvı hacminin etkisi (Ekstraksiyon koşulları : Örnek hacmi: 10 mL, örnek pH'ı: 7; ekstraksiyon süresi: 60 sn; dispersif çözücü: metanol; dispersif çözücü hacmi: 250 µL, santrifüj süresi: 5 dakika)	33
Şekil 3.7 DSSME yöntemine ekstraksiyon süresinin etkisi (Ekstraksiyon koşulları : Örnek hacmi: 10 mL, örnek pH'ı: 7; iyonik sıvı hacmi: 75 µL, dispersif	

çözücü: metanol; dispersif çözücü hacmi: 250 µL, santrifüj süresi: 5 dakika)	34
Şekil 3.8 DSSME yöntemine dispersif çözücü çeşidinin etkisi (Ekstraksiyon koşulları: Örnek hacmi: 10 mL, örnek pH'ı: 7; iyonik sıvı hacmi: 75 µL, ekstraksiyon süresi: 15 sn; dispersif çözücü hacmi: 250 µL, santrifüj süresi: 5 dakika)	35
Şekil 3.9 DSSME yöntemine tuz etkisi (Ekstraksiyon koşulları: Örnek hacmi: 10 mL, örnek pH'ı: 7; iyonik sıvı hacmi: 75 µL, ekstraksiyon süresi: 15 sn; dispersif çözücü: asetonitril, dispersif çözücü hacmi: 250 µL, santrifüj süresi: 5 dakika)	36
Şekil 3.10 Domates salçası için elde edilen kromatogram a) domates salçası b) 0,1 µg/mL standart eklenmiş domates salçası örneği.....	40

TABLolar LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1 İyonik sıvıların sentezinde kullanılan bazı katyon ve anyonlar	13
Tablo 1.2 Bazı iyonik sıvıların fizikokimyasal özellikleri.....	14
Tablo 3.1 OMIBr ve OMIPF ₆ için FTIR spektrum verileri	26
Tablo 3.2 Geliştirilen yöntemin analitik performansı	38
Tablo3.3 Kırmızı pul biber örneğinde Sudan (I-IV) boya larının analiz sonuçları (n=3)	41
Tablo3.4 Kırmızı toz biber örneğinde Sudan (I-IV) boya larının analiz sonuçları (n=3)	42
Tablo 3.5 Domates salça örneğinde Sudan (I-IV) boya larının analiz sonuçları (n=3)	43

BÖLÜM BİR

GİRİŞ

1.1 Gıda Renklendiricileri

Gıda renklendiricileri ya da renk katkı maddeleri, gıdalara ve içeceklere eklendiklerinde renk veren boya, pigment ya da maddelerdir. Gıdalarda renklendiricilerin kullanımı, M.Ö. 1500 yılları öncesinde Mısır da şeker üreticilerinin gıdaların görünümünü iyileştirmek için gıdalara doğal özütler ve şarap eklemesiyle başladığı düşünülmektedir (Madhava Naidu ve Sowbhagya, 2012). 19. yüzyılın ortalarına kadar safran gibi baharatlar dekoratif amaçlı bazı gıda maddelerine eklenmiştir. Sanayi devrimi ile birlikte hem gıda hem de işlenmiş gıda sanayisi hızlıca gelişmiştir (Meggos, 1995).

1856 yılında İngiliz bilim adamı Sir Elvin Perkin tarafından ilk sentetik boya olan mauvine sentezlenmiştir ve 19. yüzyılın sonlarına doğru on bin yeni sentetik boyar madde geliştirilmiş ve üretilmiştir (Robinson, McMullan, Marchant ve Nigam, 2001). Yine yüzyılın sonlarına doğru, renk katkı maddelerinin Amerika ve Avrupa'da şarap, ketçap, hardal, şekerlemeler gibi yaygın tüketilen gıdalarda kullanımı ciddi şekilde artış göstermiştir (Walford, 1980).

Gıda renklendiricileri; doğal ve yapay renklendiriciler olmak üzere iki temel grup altında toplanmaktadır.

1.1.1 Doğal Renklendiriciler

Doğal renklendiriciler hayvansal ve bitkisel kaynaklardan elde edilen maddelerdir. Gıdalarda doğal olarak oluşan bu renklendiriciler, farklı kimyasal yapılaraya sahip oldukları için bir kısmı suda çözünürken pek çoğu suda çözünmemektedir. Doğal renklendiricilerin ısı, sıcaklık, pH gibi etkilere karşı kararlılıklarının düşük olmasına ve gıdalarda kullanımları çeşitli problemlere yol açmasına rağmen, bu renklendiricilerin yapılan araştırmalarda sağlık üzerine yaptıkları olumlu etkiler nedeniyle son yıllarda kullanımları artmıştır (Kucharska ve

Grabka, 2010). Doğal renklendiriciler kimyasal yapılarına göre organik ve inorganik olarak gruplandırılmaktadır.

1.1.2 Yapay Renklendiriciler

Yapay renklendiriciler, doğada bulunmayan fakat kimyasal sentez yoluyla üretilen maddelerdir. Bu renklendiriciler, kararlılıkları, renk verme güçleri, kullanım kolaylıkları, suda yüksek oranda çözünme özelliği gibi birçok yönden doğal renklendiricilere göre üstünlüklere sahiptirler. Yapay renklendiriciler çözünürlüklerine göre;

* suda çözünenler,

* yağda çözünenler,

* lake renklendiriciler

olmak üzere üç grupta toplanmaktadır.

Birçok bilimsel çalışma bu boyaların insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olduğunu ortaya çıkarmıştır. Örneğin yapay renklendirici grubunda olan azo boyalar, vücuda girmesi durumunda aromatik aminlere parçalanmakta; bu da yetişkinlerde baş ağrısına neden olurken çocuklarda genellikle dikkat dağınıklığı ve hiperaktiviteye neden olmaktadır (Hawley ve Buckley, 1976; McCann, Barrett, Cooper, Crumpler, Dalen, Grimshaw ve diğer., 2007). Bu nedenle gıdalarda sentetik boyalarının içeriğinin ve miktarının kontrol edilmesi gerekmektedir. Avrupa Komisyonu tarafınca gıdalara eklenebilecek ve maksimum kullanım limitleri olan renklendiriciler belirtilmiştir ve bu sentetik gıda boyaları şu şekildedir: Tartrazine; Quinoline Yellow; Sunset Yellow; Carmoisine; Amaranth; Ponceau 4R; Erythroazine; AlluraRed; Patent Blue; Indigo Carmine; Brilliant Blue FCF; Brown HT (Avrupa Komisyonu, 1994). İzin verilen bu sentetik gıda boyalarının miktarı, insan sağlığı üzerindeki potansiyel risklerinden dolayı sıkı bir şekilde denetlenmektedir. Bu sebeple gıdalardaki bu boyaların tayini için birçok analitik metot geliştirilmiştir.

1.1.2.1 Azo Boyalar

Sentetik boyar maddelerin önemli bir sınıfını oluşturan azo boyalar; gıda maddeleri, tekstil, kağıt, katkı maddeleri, oyuncak, plastik, baskı mürekkepleri, ilaç, kozmetik ürünlerinde yaygın olarak kullanılan maddelerdir. Bu boyalar, spesifik –N=N– kromofor grubu yada azo bağı ile karakterize edilmektedirler. Azo bağlarının sayısının varlığına bağlı olarak bu boyalar monoazo, diazo ve poliazo olarak adlandırılmaktadırlar (Punj, 2008).

Azo boyaları üretim maliyetlerinin düşük olması ve hızlı renk verdikleri için 19.yüzyıl sonlarına doğru çok sayıda endüstriyel alanda kullanılmaya başlanmıştır. 19.yüzyılda kullanım güvenilirliğine dair bilgi olmadığı halde yaygın olarak kullanılan bu sentetik boyalar, gıdaların üretim süreçleri sonrası kaybolan doğal renginin geri kazanılması ya da renksiz olan gıdaların tüketiciler üzerindeki çekiciliğini artırmak amacıyla kullanılmaktadır.

Azo boyar maddelerin vücuda alınması durumunda yapılarındaki azo bağı derideki mikroorganizmalar tarafından koparılarak aminleri oluşturmaktadır. Benzidin, 4-aminobifenil, 2-naftilamin gibi aromatik aminler Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu tarafından kanserojen maddeler olarak sınıflandırılmıştır ve bu aromatik aminler doğrudan temas veya çevresel etkileşim yoluyla sağlık açısından risk oluşturmaktadırlar (Bhaskar, Aruna, Ganesh Jeevan ve Radhakrishnan, 2004; Weisburger, 2002). Bu yüzden bu tür maddeler toksikolojik özelliğe sahip olduğu için gıdalardaki miktarlarının sürekli kontrol edilmesi gerekmektedir.

Yapılan çalışmalarla azo sentetik boyaların gıdalarda kullanımına yasalarca belirli sınırlamalar getirilmiştir. Bu limit değerler gıdanın türüne ve boyar maddenin yapısına bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Allura Red, Ponceau 4R ve Sunset Yellow gibi sentetik azo boyalarının gıdalarda kullanımı için yasal limitler mevcut iken Sudan I-IV gibi azo boyaların kullanımına hiçbir miktarda izin verilmemiştir (Avrupa Komisyonu, 2005).

1.1.2.2 Sudan Boyaları

Sudan boyaları (Sudan I-IV, Sudan Red 7B, Sudan Orange G, Sudan Black B vb.) azo boyalar sınıfında yer alan, gıdalarda kullanımına izin verilmeyen, buna rağmen illegal olarak kullanılan boyar maddelerdendir (Belitz, Grosch ve Schieberle, 2004). Bu renklendiricilerin laboratuvar ortamında fare ve tavşanlarda mesane ve karaciğer kanserine neden oldukları ispatlanmıştır (Stiborová, Martínek, Rýdlová, Hodek ve Frei, 2002). Sudan boyalarının indirgendiği metabolitlerin kansorejon olmalarından dolayı Avrupa ülkeleri dahil birçok ülkede gıda renklendiricileri olarak kullanımları yasaklanmıştır. Buna rağmen Avrupa Birliği Gıda ve Yem için hızlı alarm sistemi (RASFF) tarafından çeşitli gıdalarda bu boyaların varlığı tespit edilmiştir (Rapid Alert System for Food and Feed, 2004). Sentetik Sudan boyaları gıda sanayinde kırmızı biber, köri, zerdeçal, salam, domates salçası, ve palmiye yağı gibi gıda ürünlerinde doğal kırmızı-turuncu rengi taklit etmek amaçlı kullanılmaktadır.

Günümüzde Avrupa komisyonu kararları gereği tüm kırmızı toz biber, köri, zerdeçal içeren gıda ürünleri ve palmiye yağı dahil olmak üzere ithal edilen gıda ürünlerinde sudan boyalarını içermediğine dair analiz raporları istenmektedir. Toplum sağlığını korumak amacı ile pek çok ülkede Sudan boyalarının kullanımı yasaklanmasına rağmen gıda örneklerinde eser miktarda karşılaşılmaktadır. Bu yüzden kompleks matrikslerden bu boyar maddelerin tespit ve tayini için hassas, seçici ve doğru analitik yöntemler geliştirilmesi gerekmektedir.

1.1.2.3 Sudan Boyalarının Tayini

Gıdalarda Sudan boyalarının kalıntı tayinleri genellikle yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile gerçekleştirilmektedir. Bu yöntem, yüksek ayırım gücüne sahip olması, hızlı analiz sağlaması, duyarlılığı yüksek ve seçici bir metot olması nedeni ile Sudan boyalarının analizinde sık kullanılan bir kromatografik yöntemdir (Ertaş, Özer ve Alasalvar, 2007). Bu yöntemde Sudan boyalarının analizi için çeşitli dedektörler kullanılmıştır. Gıda örneklerinde Sudan boyalarının analizinde ultraviyole görünür absorbans ve foto diyot dedektörler en çok kullanılan

dedektörlerdir. Bu iki dedektörün yanında kütle spektroskopisi (MS) dedektörü de kullanılmaktadır.

Sudan boyalarının tayini HPLC'nin dışında sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS) (Siangproh, Sonamit, Chaiyo ve Chailapakul, 2013), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) (He ,Su, Shen, Zeng ve Liu, 2007) gibi kromatografik yöntemler ile de gerçekleştirilmektedir.

1.1.2.4 Sudan Boyalarının Tayin Öncesi Zenginleştirilmesi

Analizi yapılacak olan örnekler analizi yapılacak madde dışında birçok bileşenin yer aldığı kompleks matrislerdir. Bu nedenle analiz öncesi örnek hazırlama amacıyla kullanılan ekstraksiyon, clean-up ve analitlerin zenginleştirilme işlemleri çok önemlidir. Sudan boyalarının örnek hazırlama aşamasında genellikle;

* katı faz ekstraksiyonu (Siangproh, Sonamit, Chaiyo ve Chailapakul, 2013),

* bulutlanma noktası ekstraksiyonu (W. Liu, Zhao, Chen ve Yang, 2007),

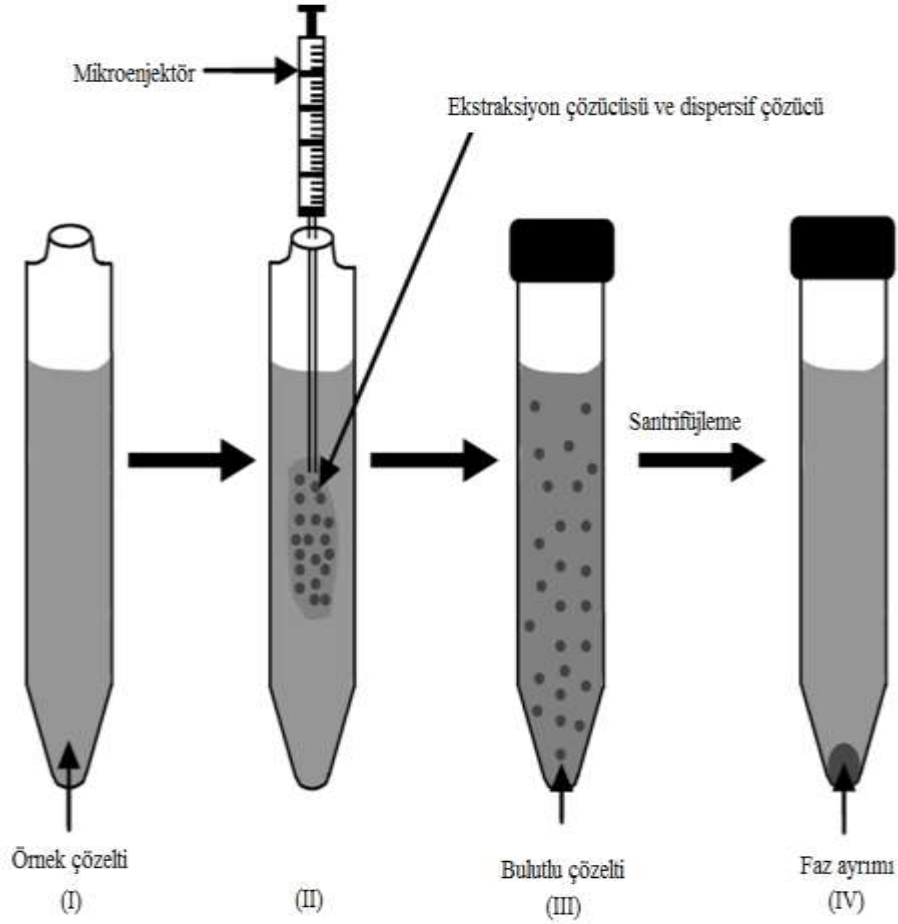
* katı faz mikroekstraksiyonu (Hu, Cai, Fan, Ye ve Cao, 2012),

*dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu (Ho,Tsoi ve Leung, 2013) gibi yöntemler geliştirilmekte ve kullanılmaktadır.

1.2 Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu

Dispersif sıvı sıvı mikro ekstraksiyon (DSSME) yöntemi Assadi ve arkadaşları tarafından geliştirilen bir ekstraksiyon yöntemidir (Rezaee, Assadi, Milani Hosseini, Aghaee, Ahmadi, Sana ve diğer., 2006). Bu yöntem, iki temel basamaktan oluşmaktadır. İlk basamakta analit çözeltisi içerisine dispersif çözücü ve ekstraksiyon çözücü eklenerek karıştırılmakta, elde edilen karışımda bir bulutlanma gözlenmektedir. İkinci basamakta ise bu karışım santrifüjlenerek ekstraksiyon çözücüne geçmiş olan analit, santrifüj tüpünün dip kısmında toplanmaktadır

(Şekil 1.1). Bu şekilde elde edilen faz içerisindeki zenginleştirilmiş olan analit kromatografik ya da spektroskopik yöntemlerle analiz edilmektedir.



Şekil 1.1 Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi (Alver, Demirci ve Özçimder, 2012)

DSSME yöntemi, hızlı olması, uygulanabilirliğinin kolay olması, örnekleme hacminin az olması, düşük maliyetli olması, yüksek geri kazanımlar ile zenginleştirme faktörünün elde edilebilmesi gibi avantajlara sahiptir (Kocúrová, Balogh, Šandrejová ve Andruch, 2012). Bu avantajlarından dolayı bu yöntem, çevresel ve biyolojik örneklerde bulunan metal iyonlarının ve organik türlerin tayin öncesi zenginleştirilmesinde son yıllarda geniş uygulama alanına sahip olmaktadır (Hossien-poor-Zaryabi, Chamsaz, Heidari, Zavar, Behbahani, Salarian ve diğer., 2014).

DSSME yönteminde ekstraksiyon verimini etkileyen faktörler aşağıdaki gibidir:

- Uygun ekstraksiyon çözücüsü
- Uygun dispersif çözücüsü
- Ekstraksiyon çözücüsünün hacmi
- Dispersif çözücünün hacmi

DSSME yönteminin ana parametresi uygun ekstraksiyon çözücüsünün belirlenmesidir. Bu amaçla kullanılacak olan ekstraksiyon çözücülerinin sudan daha yoğun olmaları ve ilgili bileşiklere karşı iyi ekstrakte gücüne sahip olmaları gerekmektedir. Yüksek yoğunluklarından dolayı ekstraksiyon çözücülerini olarak genellikle klorobenzen, kloroform, karbontetraklorür gibi halojenürlü hidrokarbonlar seçilmektedir.

Kullanılacak olan dispersif çözücünün ise hem ekstraksiyon çözücüsünde hem de sulu faz içinde karışabilir özellikte olması gerekmektedir. Bu yüzden dispersif çözücü olarak genellikle aseton, metanol ve asetonitril gibi çözücüler seçilmektedir.

Ekstraksiyon çözücüsünün hacmi zenginleştirme faktörü üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Ekstraksiyon çözücüsünün hacminin artması ile santrifüj ile elde edilen analiti içeren fazın hacmi artar. Buda zenginleştirme faktörünün azalmasına neden olur. Bu yüzden yüksek zenginleştirme faktörü elde etmek için optimum ekstraksiyon çözücü hacminin belirlenmesi gerekmektedir.

Dispersif çözücünün hacmindeki değişimler, santrifüj ile elde edilen analiti içeren fazın hacmini etkiler. Bu nedenle sabit faz hacmi elde etmek için dispersif ve ekstraksiyon çözücülerinin hacmini istemli olarak değiştirmek gerekir. DSMME de tortulaşmış fazın hacmini etkileyen önemli faktörler şunlardır:

- Ekstraksiyon çözücüsünün sudaki çözünürlüğü
- Örnek çözeltisinin hacmi
- Dispersif çözücünün hacmi
- Ekstraksiyon çözücüsünün hacmi

DSSME’de zenginleştirme katsayısı (ZK), örnekteki analitin santrifüj sonrasında oluşan fazdaki derişiminin başlangıç derişimine oranı olarak ifade edilir.

$$ZK = C_{sed}/C_o$$

Ekstraksiyon geri kazanımı (% geri kazanım) santrifüj sonrası oluşan fazın, toplam analit miktarına yüzdesi olarak ifade edilir.

$$\% \text{ Geri kazanım} = n_{sed}/n_o \times 100 = (C_{sed} \times V_{sed} / C_o \times V_{aq}) \times 100$$

$$\% \text{ Geri kazanım} = (V_{sed}/V_{aq}) \times ZK \times 100$$

V_{sed} = Santrifüj sonrası altta toplan fazın hacmi

V_{aq} = Örnek çözeltisi hacmi

Son yıllarda yapılan DSSME yönteminde ekstraksiyon çözücü olarak iyonik sıvılar kullanılmaya başlanmıştır. İyonik sıvı kullanımı ile organik çözücü kullanımı tamamen ortadan kaldırılmaktadır. Böylece ekstraksiyon çevre dostu çözücülerle gerçekleştirilmektedir.

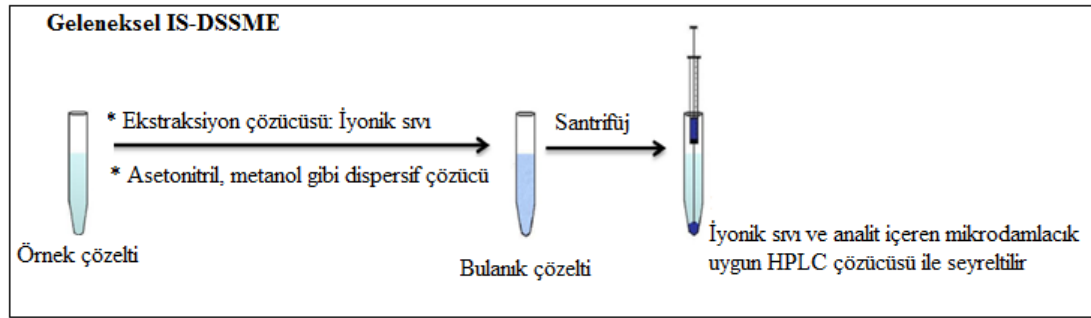
1.2.1 İyonik Sıvı Bazlı Dispersif Sıvı Sıvı Mikroekstraksiyonu

İyonik sıvı bazlı dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonunu (IS-DSSME) 4 ana kategoriye ayırmak mümkündür.

- Geleneksel IS-DSSME
- Sıcaklık kontrollü IS-DSSME
- Mikrodalga, ultrason, vorteks destekli IS-DSSME
- In-situ IS-DSSME

1.2.1.1 Geleneksel IS-DSSME

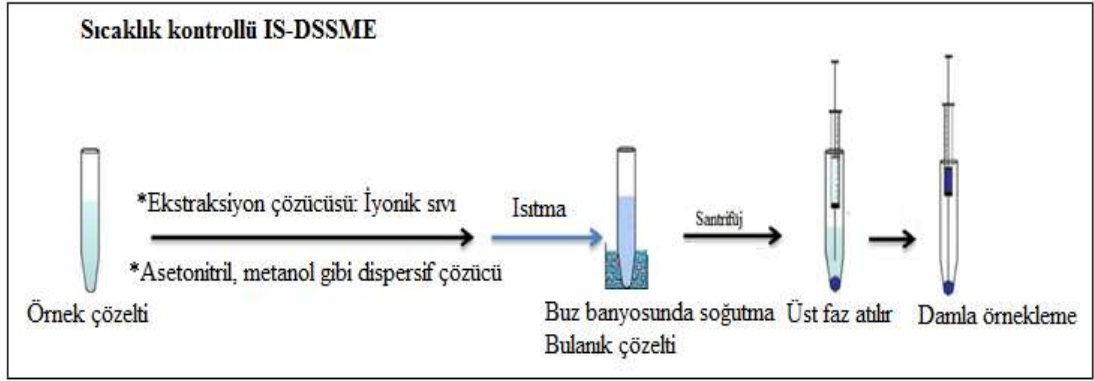
Hidrofobik iyonik sıvıların ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanıldığı, dispersif çözücü ve analitleri içeren sulu örneğin basit karışımına dayanan bir yöntemdir. Karışım manuel karıştırılabilmekte ve iyonik sıvı ile zenginleştirilen analitler, santrifüj ile ayrılmaktadır (Şekil 1.2). Bu yöntem ekstra basamağa gerek duymadığından dolayı IS-DSSME yönteminin en basit türüdür. Metanol, asetonitril, etanol gibi organik çözücüler dispersif çözücü olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemin ilk tanımlaması Liu ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Su örneklerindeki insektisitlerin tayini için yapılan çalışmada dispersif çözücü olarak metanol, ekstraksiyon çözücüsü olarak anyonu hegzaflo-rofoasfat olan ve suda çözünmeyen iyonik sıvı kullanılmıştır (Y. Liu, Zhao, Zhu, Gao ve Zhou, 2009).



Şekil 1.2 Geleneksel IS-DSSME yöntemi (Trujillo-Rodríguez, Rocío-Bautista, Pino ve Afonso, 2013)

1.2.1.2 Sıcaklık Kontrollü IS-DSSME

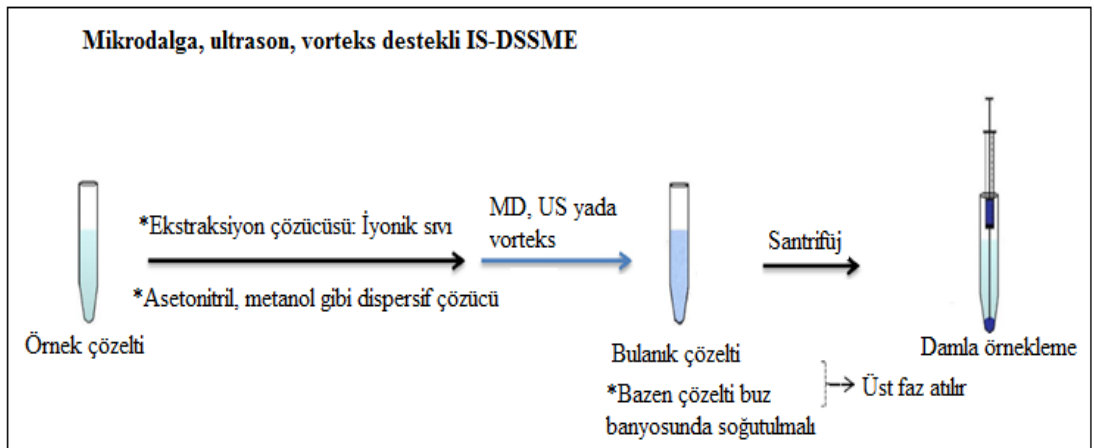
Sıcaklık kontrollü IS-DSSME yönteminde hidrofobik iyonik sıvılar ekstraksiyon çözücü olarak kullanılmakta, fakat analiti içeren iyi bir faz ayrımının sağlanması için ısıtma işlemi uygulanmaktadır (Trujillo-Rodríguez, Rocío-Bautista, Pino ve Afonso, 2013). İyonik sıvıların çözünürlüğü sıcaklık ile artmakta ve böylece ısıtma işlemi ile iyonik sıvının sulu çözelti içinde dağılması sağlanmaktadır. Yöntem ayrıca ekstrakte edilmiş analitleri içeren iyonik sıvı mikro damlacıkların çökmesini kolaylaştırmak için çözelti karışımının soğutulmasını gerektirmektedir (Şekil 1.3). Bu yöntemde de dağıtıcı çözücü olarak metanol, asetonitril gibi organik çözücüler kullanılmaktadır.



Şekil 1.3 Sıcaklık Kontrollü IS-DSSME (Trujillo-Rodríguez, Rocío-Bautista, Pino ve Afonso, 2013)

1.2.1.3 Mikrodalga, ultrason, vorteks destekli IS-DSSME

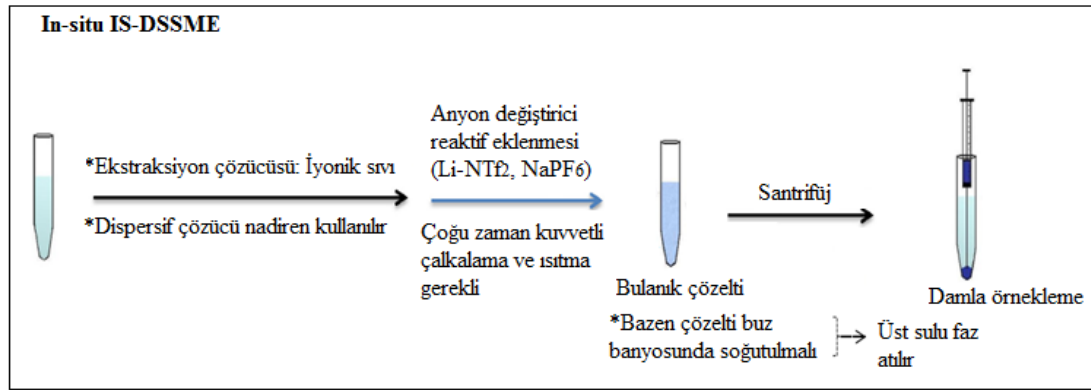
Mikrodalga, ultrason, vorteks destekli IS-DSSME yönteminde de hidrofobik iyonik sıvılar ekstraksiyon çözücüsü olarak, asetonitril, metanol gibi çözücüler ise dispersif çözücü olarak kullanılmaktadır. Faz ayrımı mikrodalga, ultrason veya vorteks ile sağlanmaktadır (Trujillo-Rodríguez, Rocío-Bautista, Pino ve Afonso, 2013). Bu işlemlerden sonra karışımdaki bulanıklığın yeterli olmaması durumunda karışım buz banyosunda soğutulmaktadır (Şekil 1.4). Santrifüjleme işleminden sonra üst faz atılarak analiti içeren iyonik sıvı fazı uygun çözücüde çözülerek analiz edilmektedir.



Şekil 1.4 Mikrodalga, ultrason, vorteks destekli IS-DSSME yöntemi (Trujillo-Rodríguez, Rocío-Bautista, Pino ve Afonso, 2013)

1.2.1.4 In-Situ IS-DSSME

Bu yöntemde de hidrofobik iyonik sıvılar ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılmakta fakat hidrofobik iyonik sıvı ekstraksiyon aşamasında hidrofilik iyonik sıvıdan metatez reaksiyonu ile oluşturulmaktadır (Trujillo-Rodríguez, Rocío-Bautista, Pino ve Afonso, 2013). Hidrofilik iyonik sıvı olarak genellikle anyonu klorür olan imidazolyum bazlı iyonik sıvılar kullanılmaktadır. Ortama sodyum hegzaflo-rofosfat (NaPF_6) veya lityum bis[(triflorometan)sülfonil]imid gibi tuzlar ilave edilerek mikrodalga, ultrason, vorteks gibi yöntemler uygulanmakta böylece anyonu hegzaflo-rofosfat veya bis[(triflorometan)sülfonil]imid olan hidrofobik iyonik sıvılar oluşturulmaktadır. Bu ekstraksiyon çeşidinde dispersif çözücü çok nadir kullanılmaktadır. Santrifüjleme işleminden sonra analiti içeren iyonik sıvı fazı uygun çözücüde çözülerek analiz edilmektedir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5 In-situ IS-DSSME yöntemi (Trujillo-Rodríguez, Rocío-Bautista, Pino ve Afonso, 2013)

1.2.2 İyonik Sıvılar

İyonik sıvılar, hidrofilik polar uç ve hidrofobik hidrokarbon zincirli amfifilik grup içeren, oda sıcaklığında sıvı halde bulunan ve son zamanlarda yaygın olarak kullanılan çözücülerdir (Welton, 1999).

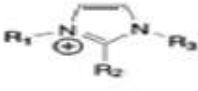
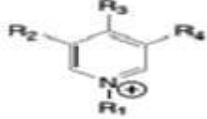
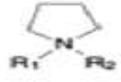
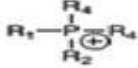
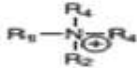
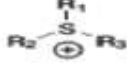


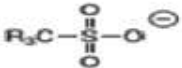
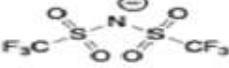



İyonik sıvılar, uçucu olmayan (çevre dostu), yüksek termal kararlılığa sahip, alev-almaz, ayarlanabilir viskozite ile su ve organik çözücüler ile karışabilen özelliklere

sahip oldukları için sentez, ayırma, elektrokimya gibi alanlarda geniş kullanıma sahiptir.

İyonik sıvılarda katyon olarak imidazolyum, piridinyum, tetraalkil amonyum, pirolidinyum, tetraalkil fosfonyum gibi gruplar; anyon olarak ise hegzaflo-rofosfat, tetrafloroborat, triflorosülfonoimid, bromür, klorür gibi inorganik veya organik gruplar kullanılmaktadır (Tablo 1.1).

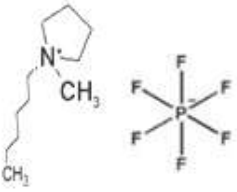
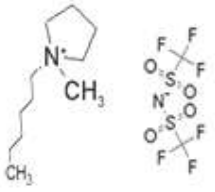
1982 yılında Wilkes ve arkadaşları tarafından ilk kez 1-alkil-3-metilimidazolyum katyonunu içeren iyonik sıvıyı sentezlenmiştir (Wilkes, Levisky, Wilson ve Hussey, 1982). Daha sonra farklı katyon ve anyon içeren, farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip pek çok iyonik sıvı sentezi yapılmıştır. Tablo 1.2’de bazı iyonik sıvıların fizikokimyasal özellikleri verilmiştir.

Tablo 1.1 İyonik sıvıların sentezinde kullanılan bazı katyon ve anyonlar (Chemfiles, 2005).

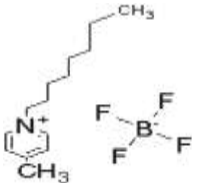
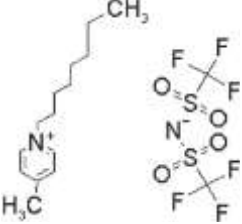
			Kasyon (Organik)	
İmidazolium	Piridinyum	Pirolidinyum		
			Anyon (Organik)	
Fosfonyum	Amonyum	Sülfonyum		
			Anyon (Organik)	
Alkil Sülfat	Tosilat	Metasülfonat		
				Anyon (İnorganik)
Bis-triflorometil sülfonilimid	Hegzaflorofosfat	Tetrafloroborat	Halejenürler	

İyonik sıvıların kullanım alanları kendine has fiziksel ve kimyasal özelliklerden dolayı çok fazladır. Birçok reaksiyonlar için çözücü ve yüzey aktif madde (Jain, Kumar ve Chauhan, 2005; Smirnova ve Safonova, 2010) güneş pilleri için elektrolit (Xue, Wang, Hu, Li, Wang, Cao ve diğer., 2004), katı faz ekstraksiyon çalışmaları için sorbent (Fontanals, Borrull ve Marcé, 2012), kromatografik çalışmalarda için sabit faz olarak (Shashkov, Sidelnikov ve Zaikin, 2014) kullanıldığı birçok değişik kullanım alanları bulunmaktadır.

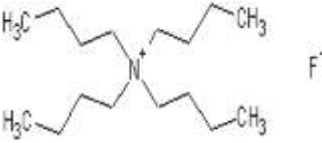
Tablo 1.2 Bazı iyonik sıvıların fizikokimyasal özellikleri (J.F. Liu, Jiang ve Jönsson, 2005; Poole ve Poole, 2010)

Iyonik sıvı	Erime noktası(⁰ C)	Yoğunluk(g mL ⁻¹)	Viskosite(cP)	Referans
İmidazolyum				
 <p>1-hegzil-3-metil-imidazolyum hegzaflorofosfat</p>	-61	1,30	585	(Anderson,Armstrong ve Wei, 2006)
 <p>1-hegzil-3-metil-imidazolyum bis [(triflorometil)sülfonil]imid</p>	-4	1,43	52	(Anderson,Armstrong ve Wei, 2006)

Tablo 1.2 devamı

İyonik sıvı	Erime noktası (°C)	Yoğunluk (g mL ⁻¹)	Viskosite (cP)	Referans
Piridinyum				
		1,08	460	(Papaiconomou, Salminen, Lee ve Prausnitz, 2007)
1-oktil-4-metilpiridinyum tetrafloroborat				
	7	1,29	105	(Papaiconomou, Salminen, Lee ve Prausnitz, 2007)
1-oktil-4-metilpiridinyum bis[(triflorometil)sülfonil]imid				

Tablo 1.2 devamı

İyonik sıvı	Erime noktası (°C)	Yoğunluk (g mL ⁻¹)	Viskosite (cP)	Referans
Kuaterner amonyum				
	62-63			(Matsumoto, Kageyama ve Miyazaki, 2002)
Tetrabutilamonyum florür				

1.3 Çeşitli Ekstraksiyon Yöntemleriyle Sudan (I-IV) Boyalarının Uygulamaları

Sudan (I-IV) boyalarının analiz öncesi örnek matriksinden ayrılması ve zenginleştirilmesi için literatürlerde çeşitli ekstraksiyon teknikleri kullanılmıştır.

Liu ve arkadaşları 2007 yılında toz biberde Sudan (I-IV) boyalarını HPLC-UV ile tayin etmeden önce TritonX-100 yüzey aktif maddesini kullanarak bulutlanma noktası ekstraksiyonu ile zenginleştirmişlerdir. Bu ekstraksiyon yöntemi ile toz bibere eklenen Sudan boyalarını %80,70-%85,45 oranında geri kazanımla elde etmişlerdir (W. Liu, Zhao, Chen ve Yang, 2007)

2010 yılında Xu ve arkadaşları gıdalardaki (toz biber, biber sosu, ördek yumurtası) Sudan boyalarını HPLC ile analiz öncesi katı faz ekstraksiyon yöntemini kullanarak zenginleştirmişlerdir. Sorbent olarak aktif silikayı kullanmışlar ve 196 ile 991 arasında değişen zenginleştirme faktörleri elde etmişlerdir. Çalışılan gıda örneklerine eklenen Sudan boyalarını %70,3-%95,2 oranında geri kazanmışlardır (Zhixiang, Shuo, Guozhen, Jiajia ve Yan, 2010).

Zhang ve arkadaşları 2012 yılında biber sosu örneklerinden Sudan I boyasının ekstraksiyonu için katı faz ekstraksiyon yöntemini kullanmışlardır. Bu ekstraksiyon yönteminde sorbent olarak Sudan I boyası için moleküler baskılanmış polimer sentezlemişlerdir. Yüksek tutma kapasitesi elde ettikleri bu yöntemle zenginleştirilen Sudan I boyasını HPLC ile analiz etmişlerdir (Zhang ,Xu, Li, Xiong, Peng, Chen ve diğer., 2011).

Jiang ve arkadaşları 2012 yılında su örneklerinden Sudan boyalarının ekstraksiyonu için manyetik özellikte nanopartikül sentezlemişler ve elde ettikleri bu sorbenti katı faz ekstraksiyonu için kullanmışlardır. Ekstraksiyon sonrası zenginleştirilen Sudan boyalarını ultra hızlı sıvı kromatografisi ile tayin etmişlerdir. Sorbentin yüksek tutma kapasitesine sahip olduğunu belirtmişlerdir (Jiang, Sun, Yu, Zhang, Sun, Gao ve diğer., 2012).

Yan ve arkadaşları 2011 yılında sosis ürünlerinde Sudan boyalarını tayin etmişler, analiz öncesi boyaları zenginleştirmek için moleküler baskılı sorbent hazırlayarak katı faz ekstraksiyon yöntemini kullanmışlardır. Bu ekstraksiyon yönteminde elue ettikleri analitleri ayrıca dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemini kullanarak zenginleştirmişlerdir (Yan, Qiao, Wang, Yang ve Row, 2011).

Yan ve arkadaşları 2011 yılındaki yaptıkları başka bir çalışmada farklı yumurta sarısı örneklerinde Sudan boyalarını analiz etmişlerdir. Bu çalışmada da analiz öncesi analitleri dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemiyle zenginleştirmişler ve bu ekstraksiyondan öncesi, geliştirmiş oldukları moleküler baskılanmış sorbenti kullanarak katı faz dağılım yöntemini kullanmışlardır (Yan, Wang, Qiao ve Yang, 2011).

Ho ve arkadaşları tarafından 2013 yılında dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemini kullanarak gıda örneklerindeki Sudan boyalarını ve ftalat bileşiklerini ekstrakte etmişler ve zenginleştirdikleri analitleri LC-DAD ile analiz etmişlerdir. Çalışmalarında ekstraksiyon çözücüsü olarak üç farklı iyonik sıvı kullanmışlar ve bu iyonik sıvıların etkinliğini karşılaştırmışlardır (Ho, Tsoi ve Leung, 2013).

1.4 Çalışmanın Amacı

Gıda örneklerinde Sudan boyalarına eser düzeyde karşılaşılmaktadır ve bunların varlığının tespiti ve nicel tayinleri doğal renklendiricilerin ve diğer girişim yapabilen maddelerin yanında oldukça zor olmaktadır. Düşük miktarlarından dolayı bu boyaların analiz öncesi matris ortamdan ayrılması ve zenginleştirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada marketlerden alınan pul biber, kırmızı toz biber ve domates salçasında Sudan (I-IV) boya kalıntılarının HPLC ile tayini öncesi ekstraksiyonları için iyonik sıvı bazlı dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yönteminin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmanın aşamaları aşağıda sıralanmıştır:

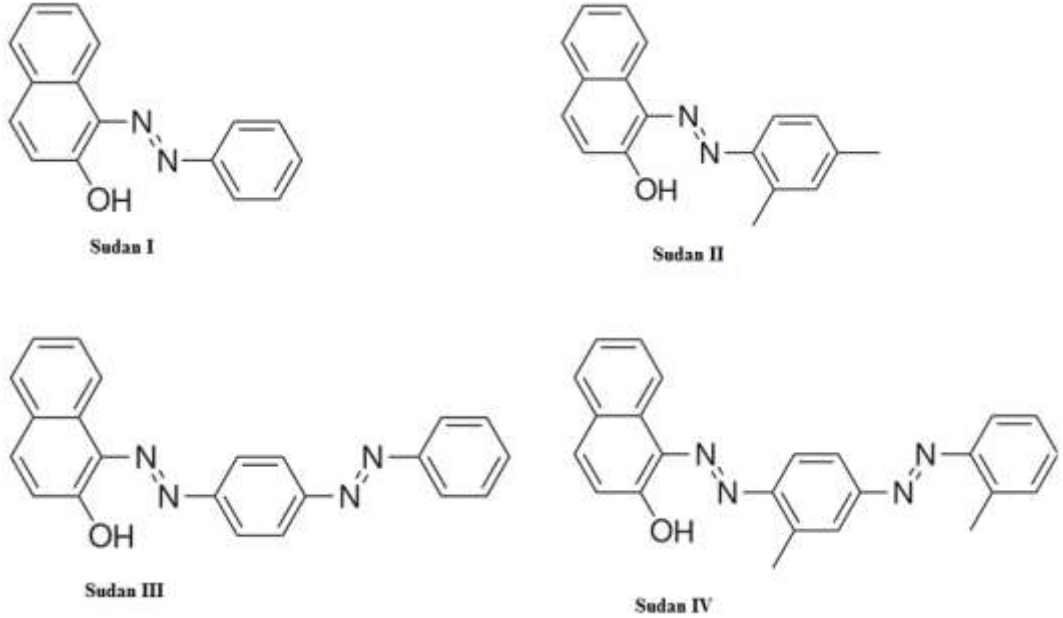
1. 1-oktil-3-metil imidazolyum hegzafloforofosfat iyonik sıvısının sentezi ve karakterizasyonu
2. Sudan (I-IV) boyalarının HPLC’de kromatografik davranışlarının incelenmesi
3. Önerilen dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yönteminin optimizasyonu (pH, ekstraksiyon süresi, iyonik sıvı hacmi, dispersif çözücü çeşidi ve hacmi, santrifüj süresi, tuz etkisi)
4. Geliştirilen yöntemin gerçek örneklerle uygulanması (kırmızı pul biber, kırmızı toz biber ve domates salçası)
5. Analitik parametrelerin belirlenmesi

BÖLÜM İKİ

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Reaktif ve Çözeltiler

N-metil imidazol, oktil bromür, amonyum hegzaflofosfat (NH_4PF_6), toluen, diklorometan çözücüleri analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich veya Merck marka temin edilmiştir. Tetrabutylamonyum bromür (TBAB), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), metanol çözücüleri HPLC saflıkta olup Sigma-Aldrich veya Merck marka satın alınmıştır. Çalışmada kullanılan 1-fenilazonaftil-2-ol (Sudan I), 1-(2,4-dimetilfenil) azonaftalen-2-ol (Sudan II), 1-((4-(fenildiazenil)fenil) azonaftalen-2-ol (Sudan III), 1-(2-metil-4(2-metilfenildiazenil) fenil) azonaftalen-2-ol (Sudan IV) boya ları Sigma-Aldrich veya Merck marka satın alınmıştır. Çalışılan Sudan boya larının formülleri Şekil 2.1’de verilmiştir. Her bir boya nın stok standart çözeltileri $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (metanolde) olarak hazırlanmıştır. Tüm standart çözeltiler 4°C de saklanmıştır. Çalışma çözeltileri stok çözeltilerinin seyreltmesi ile günlük hazırlanmıştır. Ultra saflıkta saf su Milli-Q su saflaştırma sistemi (Millipore) ile sağlanmıştır.



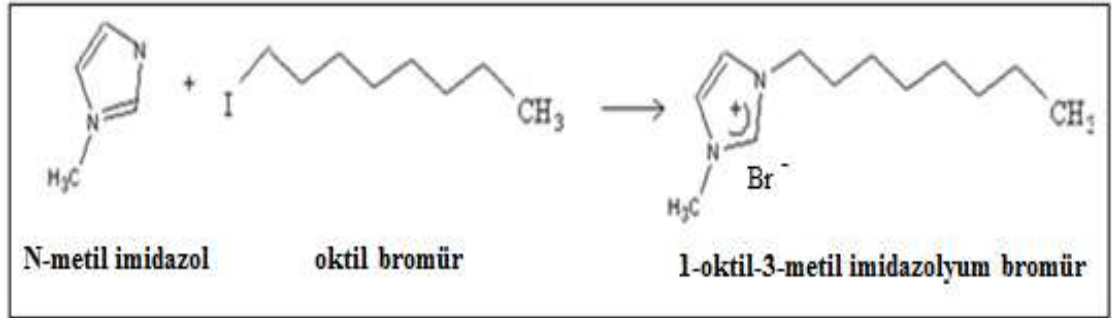
Şekil 2.1 Çalışmada kullanılan Sudan boya larının kimyasal yapıları

2.2 Cihazlar

İyonik sıvı sentezinde Buchi marka Rotary evaporatör, örnek hazırlamada Elmasonic marka ultrasonik banyo ve Wisemix marka vorteks, sentezlenen iyonik sıvının yapısal karakterizasyonda Perkin Elmer marka Spectrum 100 model Fourier Transfer İnfrared Spektrometresi (FTIR) ve Perkin Elmer marka Diamond model Termal Gravimetrik Analiz/Diferansiyel Termal Analiz cihazı kullanılmıştır. pH çalışmaları Mettler Toledo marka Seven Compact model pH metre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sudan boyalarının kromatografik analizleri için Agilent 1100 model Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) cihazı kullanılmıştır. Ultra saf su için Millipore Gradient A10 model saf su cihazından yararlanılmıştır.

2.3 İyonik Sıvının Sentezi

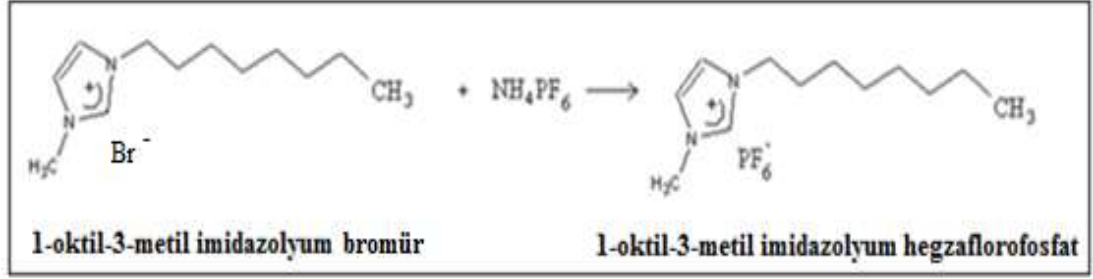
2.3.1 1-oktil-3-metil-imidazolyum bromür (OMIBr) Sentezi



Şekil 2.2 OMIBr iyonik sıvısının sentezi (Özdemir ve diğer., 2010; Zafer ve diğer., 2009)

50 mL'lik yuvarlak dipli bir balona 0,02 mol N-metil-imidazol, 0,02 mol oktil bromür ve ~20 -30 mL toluen ilave edilerek iki saat geri soğutucu altında ısıtılmıştır. Bu süre içerisinde iki faz oluşmuştur (Özdemir ve diğer., 2010; Zafer ve diğer., 2009). OMIBr olan alt faz alınarak 1-oktil 3-metil imidazolyum hegzaflofosfat iyonik sıvısının sentezinde kullanılmıştır (Şekil 2.2).

2.3.2 1-oktil-3-metil imidazolyum hegzaflozofosfat (OMIPF₆) Sentezi



Şekil 2.3 OMIPF₆ iyonik sıvısının sentezi (Özdemir ve diğ., 2010; Zafer ve diğ., 2009)

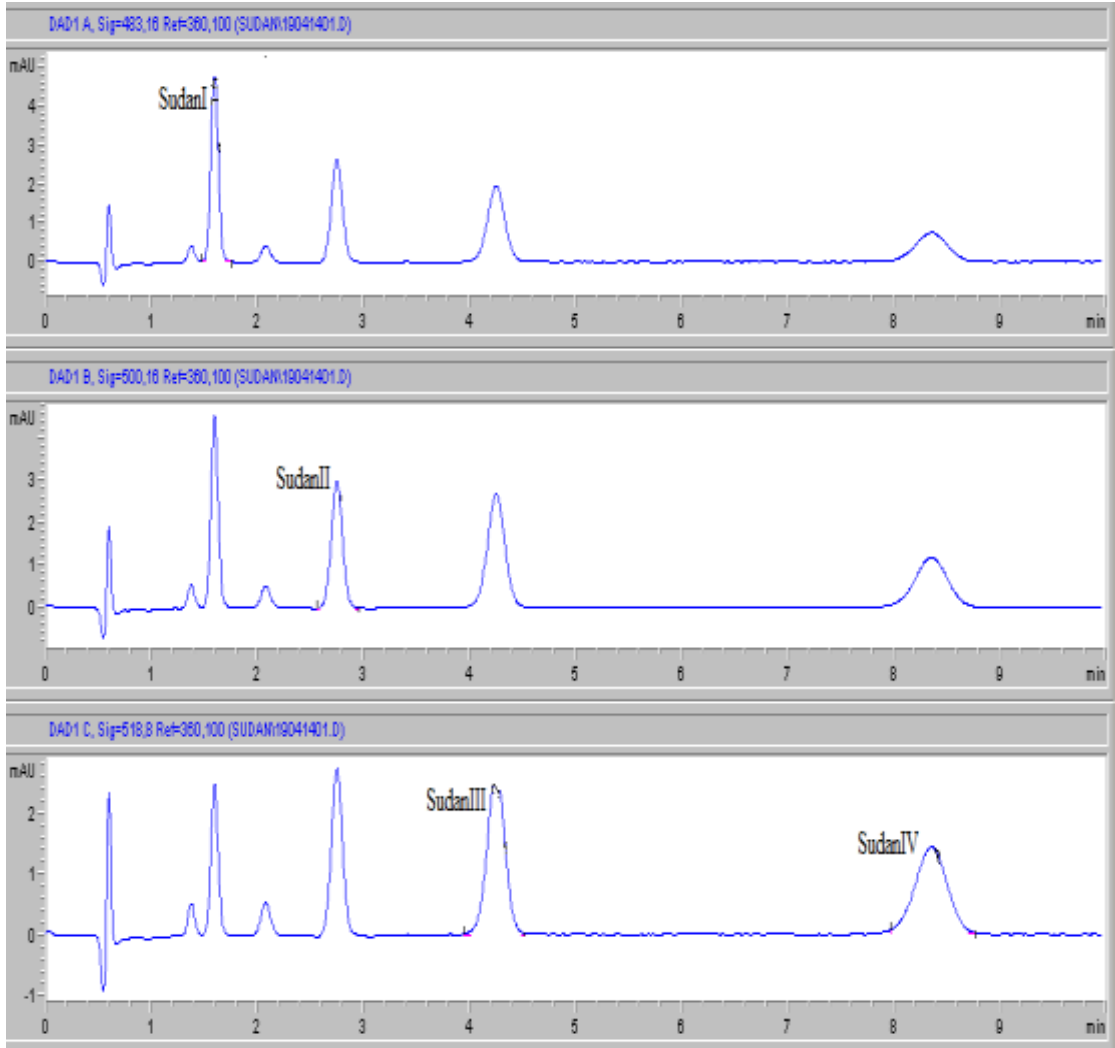
0,02 mol OMIBr ~50 mL diklorometan içerisinde çözülmüştür ve daha sonra bu çözeltiye 0,02 mol amonyum hegzaflozofosfat tuzu ilave edilmiştir. Elde edilen karışım 24 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra çöken amonyum bromür süzülerek karışımdan ayrılmıştır ve sıvı kısımda bulunan diklorometanın evaporatörde uçurulmasıyla OMIPF₆ elde edilmiştir (Şekil 2.3) (Özdemir ve diğ., 2010; Zafer ve diğ., 2009).

2.4 Sudan Boyalarının HPLC ile Analizi

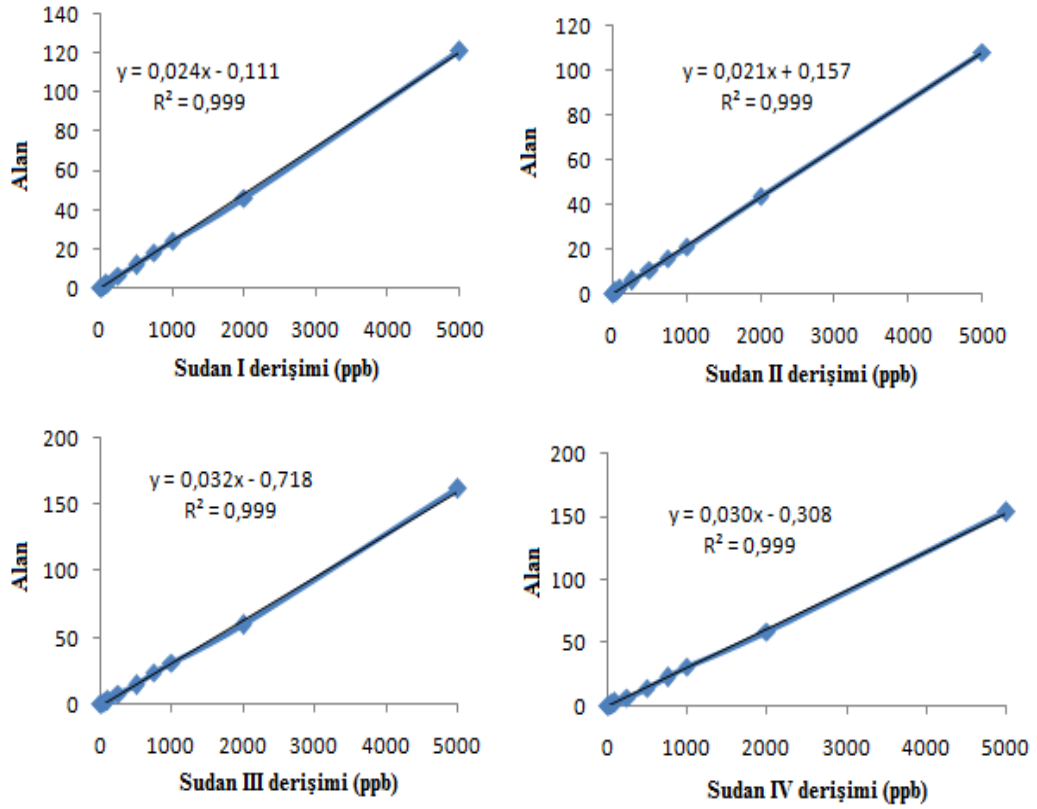
Sudan boyalarının kromatografik analizi, “West Yorkshire Analytical Services Laboratory” isimli laboratuvar tarafınca geliştirilen “Method 145B” analiz yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Food Standart Agency, 2003). Sudan boyalarının analizi için kullanılan kromatografik analiz koşulları aşağıda özetlenmiştir.

- HPLC cihazı: Agilent 1100 model
- Kolon: Thermo ODS Hypersyl Gold C₁₈ (150 mm x 4,6 mm x 5 µm i.d)
- Kolon sıcaklığı: 25⁰C
- Dedektör: Fotodiyot array dedektör (DAD)
- Hareketli faz: 0,3402 gram KH₂PO₄ ve 1,012 gram TBAB’ün 100 mL saf suda çözülerek, hacmin metanol ile 1 litreye tamamlanmasıyla hazırlanan çözelti
- Akış hızı (mL/dak): 2 mL/dakika
- Elüsyon çeşidi: İzokratik elüsyon

Sudan I için 483,16 nm’de, Sudan II için 500,16 nm’de, Sudan III ve Sudan IV boyaları için 518,8 nm’de okuma yapılmıştır. Analiz süresi Sudan I için 1,7 dakika, Sudan II için 2,7 dakika, Sudan III için 4,2 dakika ve sudan IV için 8,1 dakika olarak belirlenmiştir. Şekil 2.4’de derişimi 1 µg/mL Sudan (I-IV) boylarının kromatogramı verilmiştir. Standart kalibrasyon eğrileri her bir Sudan boyası için stok çözeltilerden 10-5000 µg/L derişim aralığında hazırlanan çözeltilerle elde edilmiştir ve her bir boya için elde edilen kalibrasyon eşitliği Şekil 2.5’de verilmiştir.



Şekil 2.4 1 µg/mL derişimindeki standart Sudan (I-IV) boylarının kromatogramı



Şekil 2.5 Sudan (I-IV) boya için kalibrasyon grafikleri

2.5 Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon (DSSME) Yöntemi

2.5.1 Optimizasyon Çalışmaları

Her bir Sudan boyası için derişimleri 1 µg/mL olan 10 mL'lik çözeltiye dispersif çözücü ve iyonik sıvı ilave edilerek karıştırılmış ve daha sonra 3500 rpm'de karışım santrifüjlenmiştir. Sudan boya larını içeren alt faz 1,5 mL metanolde çözülerek HPLC'de analiz edilmiştir. Yöntemi optimize etmek için çalışılan parametreler aşağıda verilmiştir.

- pH (4, 5, 6, 7, 8, 9)
- Dispersif çözücü hacmi (50, 100, 250, 500, 750, 1000 µL)
- Santrifüj süresi (2, 5, 10, 20, 30 dakika)
- İyonik sıvı hacmi (50, 75, 100 ve 200 µL)

- Ekstraksiyon süresi (15, 30, 60, 90, 120 saniye)
- Dispersif çözücü çeşidi (Aseton, asetonitril, metanol)
- Tuz etkisi (% derişim (w/v, NaCl), 0; 0,25; 1; 2; 5; 10; 20)

Her bir parametre için optimum değerler bulunduktan sonra gerçek örnekler bu optimum koşullarda ekstrakte edilerek analiz edilmiştir.

2.6 Gerçek Örnekler

Geliştirilen DSSME yönteminin uygulanabilirliğini göstermek için kırmızı toz biber, pul biber ve domates salçası ile çalışılmıştır. Örnekler İzmir'deki farklı marketlerden satın alınmıştır. Bu örnekler "West Yorkshire Analytical Services Laboratory" isimli laboratuarda Sudan I için geliştirilen "Method 145B" yöntemine göre hazırlanmış ve DSSME yöntemi uygulanmıştır.

2.6.1 Gerçek Örneklerin Analize Hazırlanması

10 gram örnek tartılarak 100 mL'lik balon jöjeye aktarılmış ve hacim metanol ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen karışım 15-20 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda berrak sıvı kısımdan 5 mL alınarak, hacim mobil faz ile 50 mL'ye tamamlanmıştır (Food Standart Agency, 2003). Daha sonra bu örnek çözelti, 0,45 µm'lik filtreden geçirilmiş ve bu örnekten 1 mL alınarak, hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanmış ve elde edilen çözeltiye, optimize edilen DSSME yöntemi uygulanmıştır. Yöntemin doğruluğunu göstermek için DSSME yöntemi uygulanmadan önce, gerçek örnek çözeltisinin içerisine, derişimleri 0,1 ve 0,2 µg/mL olacak şekilde standart Sudan (I-IV) boyalarından eklenmiş ve bu boyaların optimize edilen iyonik sıvı bazlı DSSME yöntemi ile geri kazanımları hesaplanmıştır.

BÖLÜM ÜÇ

SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME

3.1 İyonik Sıvının Karakterizasyonu

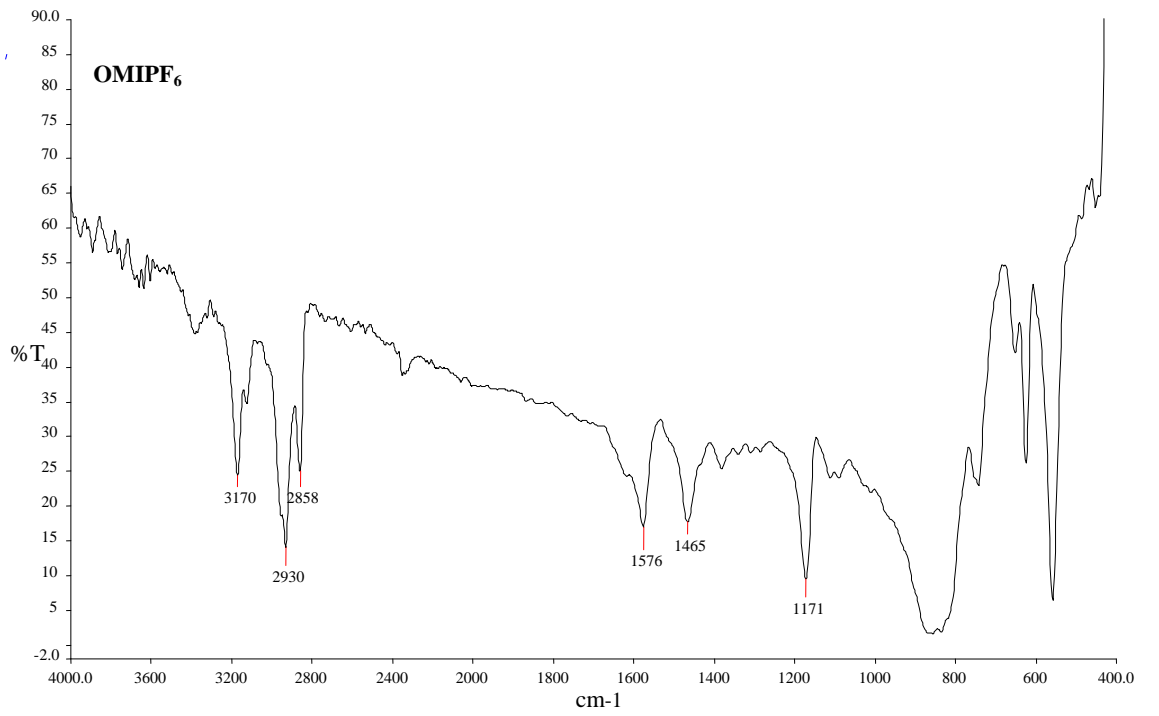
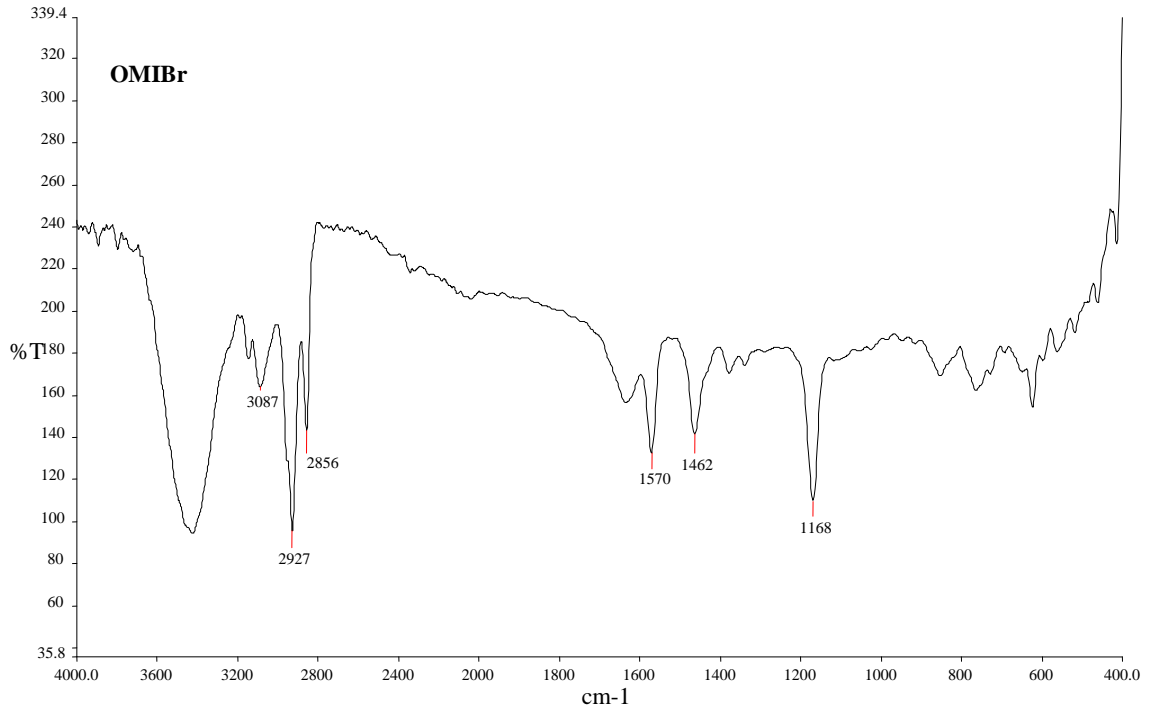
Çalışmada ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılması için sentezlenen OMIPF₆ iyonik sıvısının yapısını karakterize etmek için, bu iyonik sıvının FTIR spektrumu ara ürün olan OMIBr iyonik sıvısının FTIR spektrumu ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca OMIPF₆'nın termal kararlılığı TG/DTG eğrisi ile incelenmiştir.

3.1.1 FTIR Spektrumu

OMIBr ve OMIPF₆ iyonik sıvılarının FTIR spektrumları ATR probu ile 0,1 mL örnek kullanılarak alınmıştır. Şekil 3.1'de OMIBr ve OMIPF₆ için elde edilen FTIR spektrumları verilmiş ve her iki iyonik sıvı için karakteristik pikler Tablo 3.1'de özetlenmiştir. Her iki iyonik sıvı için titreşim değerlerinin farklı olması OMIBr'den OMIPF₆ sentezinin gerçekleştiğini göstermiştir.

Tablo 3.1 OMIBr ve OMIPF₆ için FTIR spektrum verileri

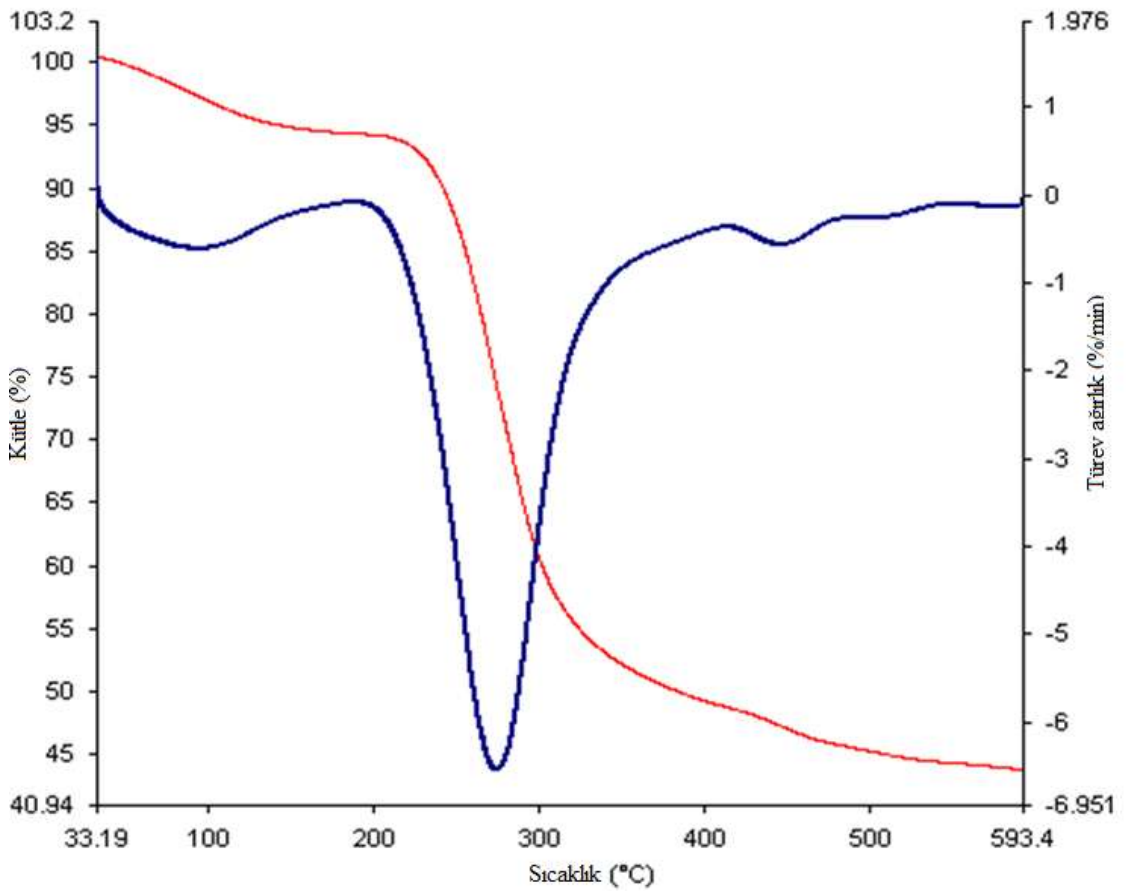
İyonik sıvı	Gerilme titreşimleri cm ⁻¹				
	=C-H	-C-H	C=N	C=C	-C-N
OMIBr	3087	2927-2856	1570	1462	1168
OMIPF ₆	3170	2930-2858	1576	1465	1171



Şekil 3.1 İyonik sıvılar için FTIR spektrumu

3.1.2 Termal Analiz

OMIPF₆ iyonik sıvısının termal karalılığı TG/DTG eğrisi ile incelenmiş ve bu iyonik sıvının termal bozunmasının iki kademedede gerçekleştiği gözlenmiştir (Şekil 3.2). Analiz için OMIPF₆ alüminyum kap içerisinde azot atmosferinde 25-600 °C aralığında (sıcaklık artışı 15 °C/dak) analiz edilmiştir.



Şekil 3.2 OMIPF₆ iyonik sıvısının TG/DTG eğrisi

3.2 DSSME Yönteminin Optimizasyonu

Sudan boyalarının HPLC ile analiz öncesi analitik matriksten ayrılması ve zenginleştirilmesi için önerilen DSSME yöntemi bölüm 2.5.1'de verilen parametrelerde optimize edilmiştir. Optimizasyon prosesinde % geri kazanım ve zenginleştirme katsayısı (ZK) aşağıda verilen eşitliklerle hesaplanmıştır.

$$\text{ZK: } C_{\text{sed}} / C_0$$

$$\% \text{ Geri kazanım: } \text{ZK} \times (V_{\text{sed}} / V_{\text{aq}}) \times 100$$

C_{sed} : Analitin iyonik sıvı fazındaki derişimi

C_0 : Sulu fazdaki analitin ilk derişimi

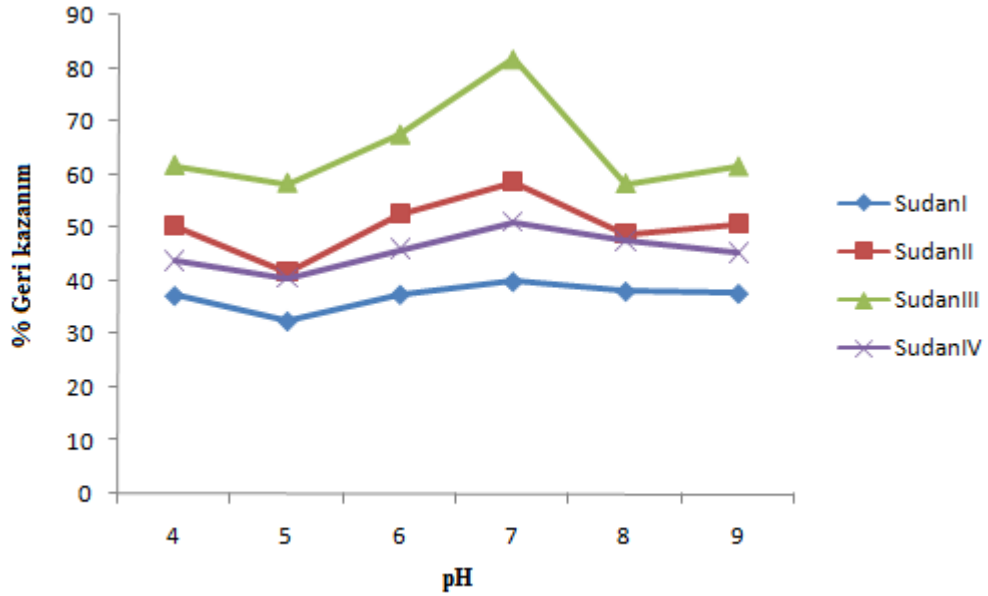
V_{sed} : Ekstraksiyon sonrası altta toplan iyonik sıvı hacmi

V_0 : Başlangıçtaki analiti içeren sulu fazın hacmi

Sudan boyalarının ekstraksiyon sonrası iyonik sıvı fazdaki derişimleri her bir boya için elde edilen kalibrasyon eşitliklerinden yararlanılarak hesaplanmıştır.

3.2.1 pH Optimizasyonu

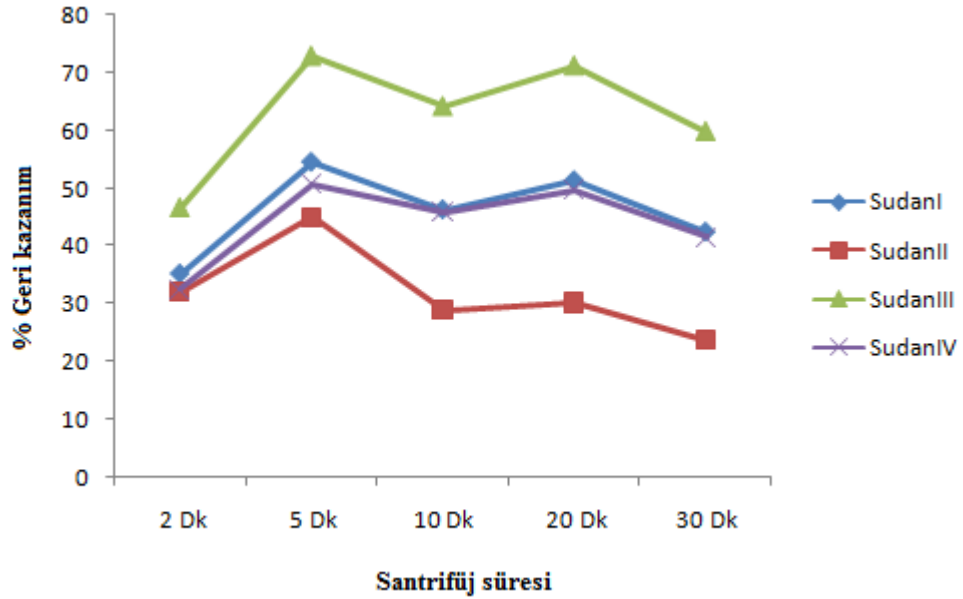
Optimum pH değerini bulmak için Sudan boyalarını içeren sulu çözeltinin pH'ı 4, 5, 6, 7, 8 ve 9'a ayarlanarak DSSME yöntemi uygulanmıştır. Ekstraksiyon sonrası her pH değerine karşılık % geri kazanım hesaplanarak Şekil 3.3 elde edilmiştir. Şekilde görüldüğü dört boya içinde en iyi sonuç pH 7'de gözlenmiştir. % Geri kazanım Sudan III > Sudan II > Sudan IV > Sudan I şeklinde olmuştur. Tüm boyalarda optimum pH 7 olarak bulunduğu için sonraki ekstraksiyon çalışmaları bu pH'da gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3 DSSME yöntemine sulu çözeltinin pH'ın etkisi. (Ekstraksiyon koşulları: Örnek hacmi: 10 mL, ekstraksiyon süresi: 60 sn, iyonik sıvı hacmi: 50 µL, dispersif çözücü: metanol, dispersif çözücü hacmi: 200 µL, santrifüj süresi: 5 dakika)

3.2.2 Santrifüj Süresi

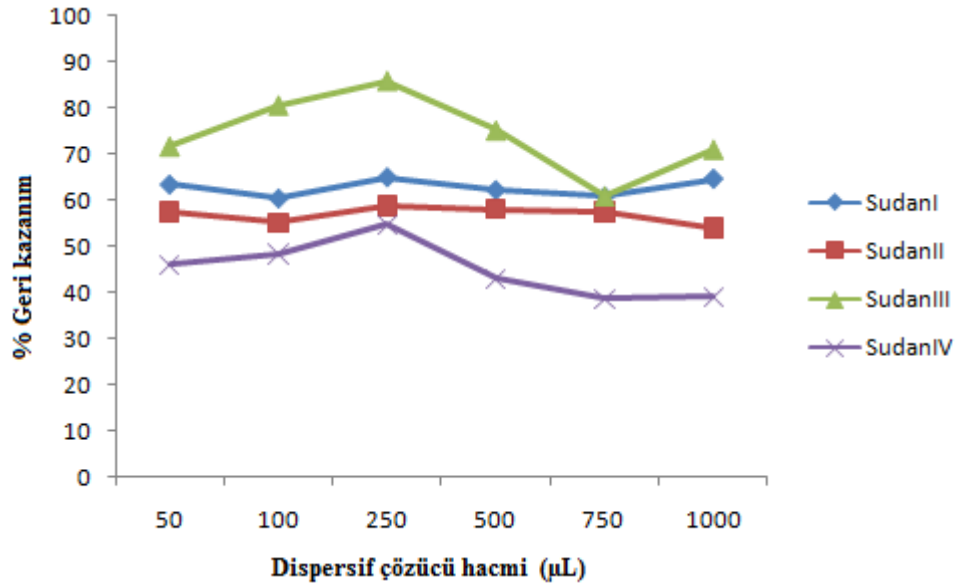
Santrifüjleme işlemi DSSME yönteminde sulu faz ile iyonik sıvı fazın tam olarak birbirinden ayrılması ve analitlerin ekstraksiyon çözücü içerisinde dağılımını sağlaması açısından önemlidir. Bu yüzden optimum santrifüj süresini bulmak için analit çözeltisini, dispersif çözücüyü ve ekstraksiyon çözücüsünü içeren karışım 2, 5, 10, 20 ve 30 dakikada 3500 rpm'de santrifüjlenmiş ve her bir santrifüj süresi sonunda iyonik sıvı fazı 1,5 mL metanol içerisinde çözülerek HPLC'de analiz edilmiştir. Analiz sonucunda her bir süre için % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (Şekil 3.4). En iyi geri kazanım dört Sudan boyası için de 5 dakika santrifüjleme ile elde edilmiştir. Bu yüzden sonraki ekstraksiyon çalışmalarında santrifüjleme süresi 5 dakika olacak şekilde çalışılmıştır.



Şekil 3.4 DSSME yöntemine santrifüj süresinin etkisi (Ekstraksiyon koşulları: Örnek hacmi: 10 mL, örnek pH'ı: 7, ekstraksiyon süresi: 60 sn, iyonik sıvı hacmi: 50 µL, dispersif çözücü: metanol, dispersif çözücü hacmi: 250 µL)

3.2.3 Dispersif Çözücü Hacmi

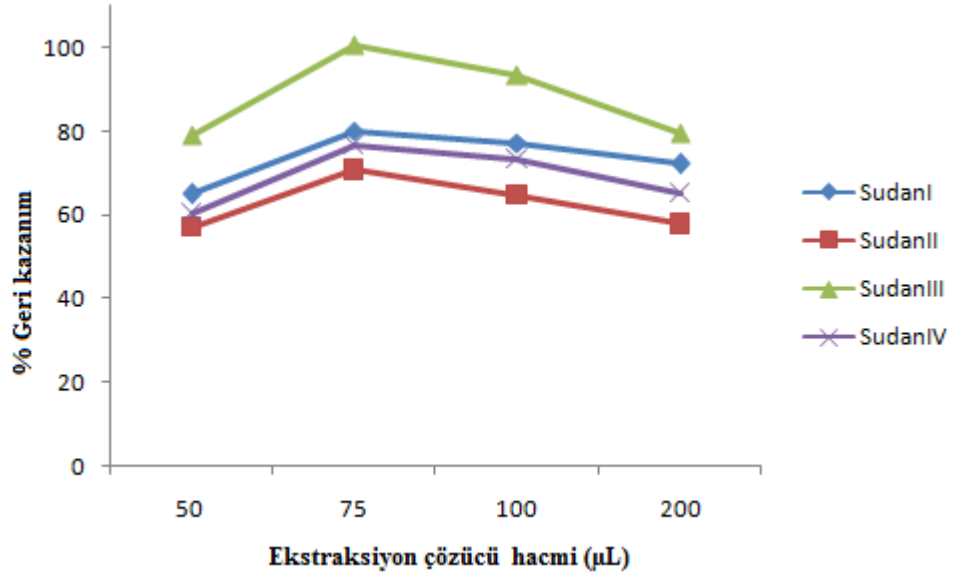
DSSME yöntemi için ortama ilave edilen dispersif çözücünün hacmi ekstraksiyon sonrası sedimente olan iyonik sıvı fazın hacmini etkileyeceği için, bu çözücünün optimum değerinin belirlenmesi önemlidir. Bu yüzden optimum dispersif çözücü hacmini belirlemek için ekstraksiyon sırasında ortama 50, 100, 250, 500, 750, 1000 μL metanol ilave ederek ekstraksiyon gerçekleştirilmiş ve her bir hacim için % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (Şekil 3.5). Grafikte görüldüğü gibi ekstraksiyon için tüm boyalarda en iyi dispersif çözücü hacmi 250 μL 'de elde edilmiştir. Bu yüzden daha sonraki çalışmalarda dispersif çözücü hacmi olarak 250 μL kullanılmıştır. En iyi geri kazanım Sudan III boyası için elde edilmiştir.



Şekil 3.5 DSSME yöntemine dispersif çözücü hacminin etkisi (Ekstraksiyon koşulları: Örnek hacmi: 10 mL, örnek pH: 7, ekstraksiyon süresi: 60 sn, iyonik sıvı hacmi: 50 μL , dispersif çözücü: metanol, santrifüj süresi: 5 dakika)

3.2.4 İyonik Sıvı Hacmi

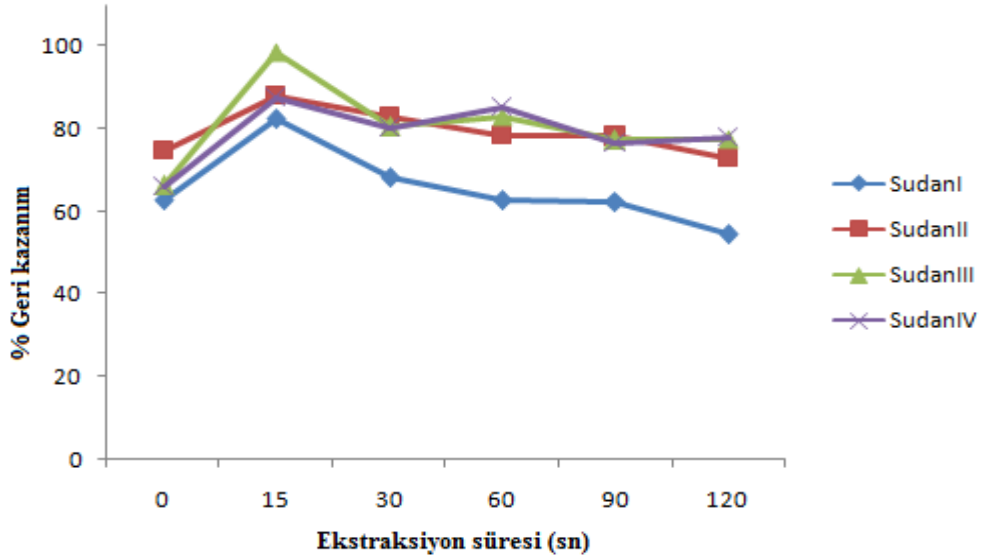
DSSME yönteminde kullanılacak olan ekstraksiyon çözücüsünün sudan daha fazla yoğunluğu sahip olması, suda çözünmemesi ve analitin bu çözücüde çözünürlüğün yüksek olması gerekmektedir. Bu çalışmada ekstraksiyon çözücüsü olarak OMIPF₆ iyonik sıvısı kullanılmıştır. Kullanılan iyonik sıvının optimum hacmini bulmak için 50, 75, 100 ve 200 µL'lik iyonik sıvıyla çalışılmıştır. Her biri için % geri kazanım değerleri hesaplandığında en iyi sonucun 75 µL'de elde edildiği gözlenmiştir (Şekil 3.6). En yüksek geri kazanım (%100) Sudan III boyasında elde edilmiştir. Diğer boyalarda da % geri kazanım değerleri %70-80 arasında olduğu gözlenmiştir. Bu yüzden daha sonraki çalışmalarda ekstraksiyon çözücü hacmi 75 µL olarak alınmıştır.



Şekil 3.6 DSSME yöntemine iyonik sıvı hacminin etkisi (Ekstraksiyon koşulları: Örnek hacmi: 10 mL, örnek pH'ı: 7, ekstraksiyon süresi: 60 sn, dispersif çözücü: metanol, dispersif çözücü hacmi: 250 µL, santrifüj süresi: 5 dakika)

3.2.5 Ekstraksiyon Süresi

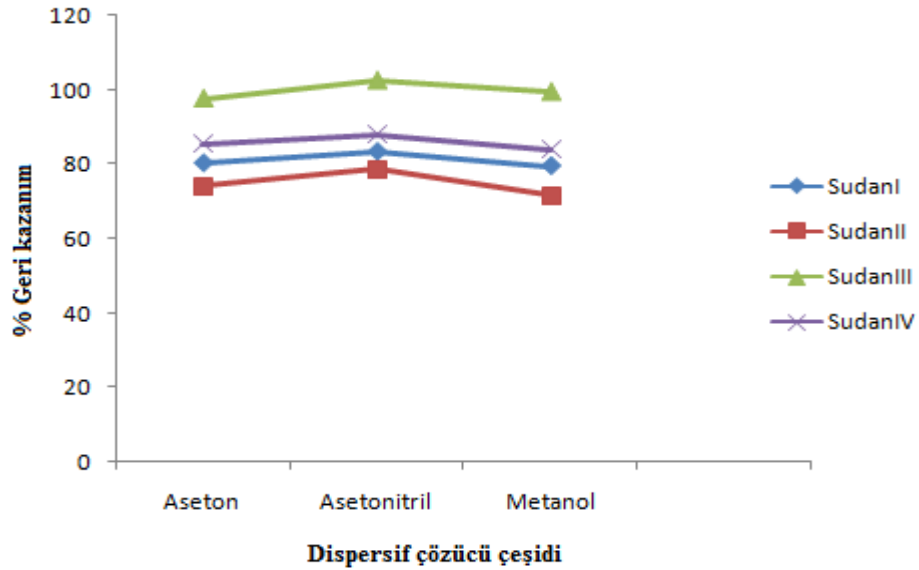
Ekstraksiyon süresi analitin, bulunduğu ortamdan maksimum düzeyde ekstraksiyon çözücü fazına geçmesini sağlaması açısından önemlidir. Bu yüzden optimum ekstraksiyon süresini bulmak için analit çözeltisini, dispersif çözücüyü ve ekstraksiyon çözücüsünü içeren karışım 0, 15, 30, 60, 90 ve 120 saniye olacak şekilde karıştırılmış ve daha sonra her bir karışım 5 dakika 3500 rpm'de santrifüjlenmiş ve santrifüj süresinin sonunda iyonik sıvı fazı 1,5 mL metanol içerisinde çözülerek HPLC'de analiz edilmiştir. Daha sonra her bir ekstraksiyon süresi için % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (Şekil 3.7). En iyi geri kazanım dört Sudan boyası için de 15 saniye ekstraksiyon süresinde elde edilmiştir. Bu yüzden sonraki çalışmalarda ekstraksiyon süresi 15 saniye olacak şekilde çalışılmıştır.



Şekil 3.7 DSSME yöntemine ekstraksiyon süresinin etkisi (Ekstraksiyon koşulları: Örnek hacmi: 10 mL, örnek pH'ı: 7, iyonik sıvı hacmi: 75 μ L, dispersif çözücü: metanol, dispersif çözücü hacmi: 250 μ L, santrifüj süresi: 5 dakika)

3.2.6 Dispersif Çözücü Çeşidi

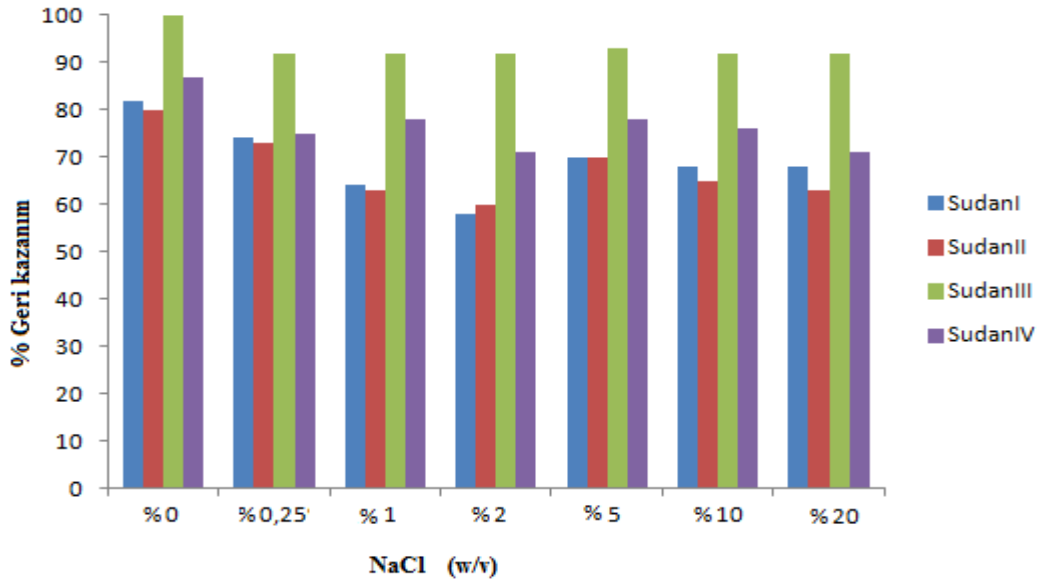
DSSME yönteminde, kullanılacak olan dispersif çözücünün hem ekstraksiyon çözücüsü ile hem de sulu örnek çözelti ile karışabilmesi gerekmektedir. Bu yüzden bu çalışmada dispersif çözücü çeşidini belirlemek için metanol, aseton ve asetonitril kullanılmıştır. Daha önce belirlenen optimum koşullarda bu üç çözücü için ekstraksiyon çalışmaları yapılmış ve her biri için % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (Şekil 3.8). Şekilde de görüldüğü üç çözücü arasında çok büyük farklılık olmamasına rağmen en iyi sonuç asetonitrilde gözlenmiştir. Bu yüzden optimum dispersif çözücü çeşidi olarak asetonitril seçilmiştir. Dört boya için belirlenen bütün optimum koşullarda % geri kazanım değerleri Sudan I için % 83; Sudan II için % 80; Sudan III için % 100 ve Sudan IV için % 88 olarak elde edilmiştir.



Şekil 3.8 DSSME yöntemine dispersif çözücü çeşidinin etkisi (Ekstraksiyon koşulları: Örnek hacmi: 10 mL, örnek pH'ı: 7, iyonik sıvı hacmi: 75 µL, ekstraksiyon süresi: 15 sn, dispersif çözücü hacmi: 250 µL, santrifüj süresi: 5 dakika)

3.2.7 Tuz Etkisi

Ekstraksiyon verimliliğine iyonik kuvvetin etkisini incelemek için farklı derişimlerde NaCl (% 0-20, w/v) ekstraksiyon öncesi örnek çözeltiliye eklenmiştir. Şekil 3.9’da görüldüğü gibi analit çözeltilisine eklenen NaCl tuzu Sudan boyalarının % geri kazanımlarını belli miktarlarda azaltmıştır. Bu yüzden yöntemin gerçek örneklere uygulanması sırasında örnek çözeltilisine tuz eklenmemiştir.



Şekil 3.9 DSSME yöntemine tuz etkisi (Ekstraksiyon koşulları: Örnek hacmi: 10 mL, örnek pH’ı: 7, iyonik sıvı hacmi: 75 µL, ekstraksiyon süresi: 15 sn, dispersif çözücü: asetonitril, dispersif çözücü hacmi: 250 µL, santrifüj süresi: 5 dakika)

3.3 DSSME Yönteminin Analitik Performansı

Her bir Sudan boyasının DSSME yöntemi kullanılarak zenginleştirilmesi ve sonrasında HPLC/DAD yöntemi ile tayini için kalibrasyon doğruları elde edilmiş ve dört boya için doğrusal aralık, gözlenebilme sınırı, tayin sınırı, korelasyon katsayısı ve kesinlik hesaplanmıştır.

Yöntemin kesinliği 3 paralel olarak 1 µg/mL derişiminde aynı gün ve farklı günlerde çalışılarak belirlenmiştir. Kesinlik, % bağıl standart sapma cinsinden ifade edilmiştir. Her bir Sudan boyası için gün-içi tekrarlanabilirlik değerleri (%BSS) 1,64-3,13 aralığında olacak şekilde, günler-arası tekrarlanabilirlik değerleri (%BSS) ise 2,33-5,93 aralığında olacak şekilde hesaplanmıştır.

Her bir Sudan boyası için gözlenebilme sınırı (LOD) yöntemin kalibrasyon eşitliğindeki Sudan boyalarının en küçük derişim değerlerinin 10 paralel okutulması sonucu elde edilen yanıtın standart sapması (SD) ve kalibrasyon doğrusunun eğimine (S) dayanarak, $3(SD/S)$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Yöntemin analitik performansı için elde edilen tüm sonuçlar Tablo 3.2'de verilmiştir.

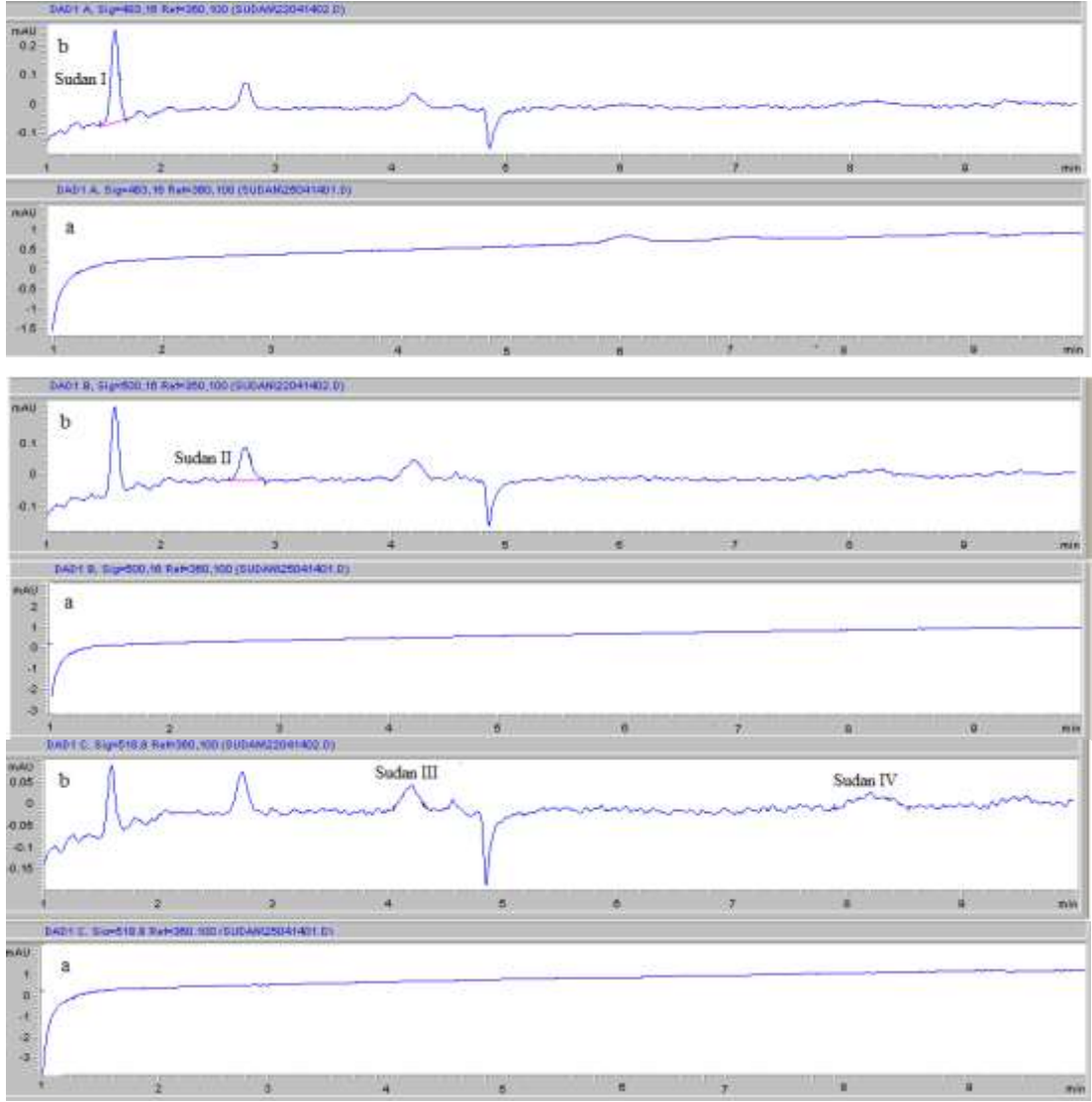
Geliştirilen yöntem ile optimum koşullarda Sudan I (1µg/mL) boyası için geri kazanım % 83 ve zenginleştirme katsayısı 207,5; Sudan II (1µg/mL) için geri kazanım % 80 ve zenginleştirme katsayısı 200; Sudan III (1µg/mL) için geri kazanım %100 ve zenginleştirme katsayısı 250; ve Sudan IV (1µg/mL) için ise geri kazanım %88 ve zenginleştirme katsayısı 220 olarak elde edilmiştir.

Tablo 3.2 Geliştirilen yöntemin analitik performansı

Parametreler	Sudan I	Sudan II	Sudan III	Sudan IV
Doğrusal Aralık (µg/L)	5-1000	5-1000	5-1000	5-1000
Kalibrasyon eşitliği	$y=0,029x+0,266$	$y=0,015x+0,306$	$y=0,018x+0,418$	$y=0,019x+0,001$
R ²	0,998	0,998	0,998	0,995
LOD (µg/L)	1,38	1,42	1,52	1,58
%BSS gün-içi	1,75	1,64	3,13	2,77
%BSS günler-arası	2,33	5,93	4,88	4,94

3.4 Gerçek Örnekler

Kırmızı pul biber, toz biber ve domates salçası İzmir’de yerel marketlerden satın alınarak Bölüm 2.6.1.’de verilen prosedüre göre hazırlanarak optimize edilen DSSME yöntemine göre tayin edilmiştir. Yöntemin geri kazanımı için 0,1 µg/mL ve 0,2 µg/mL standart Sudan boya örneklerine eklenmiştir. Şekil 3.10’da domates salçasına ait kromatogram verilmiştir. Geri kazanımlar tüm örnekler için %70 ile %100 arasında değişim göstermiştir (Tablo 3.3, 3.4, ve 3.5). Elde edilen geri kazanım yüzdeleri, geliştirilen iyonik sıvı bazlı DSSME yönteminin gerçek örneklerle uygulanabilirliğini göstermektedir.



Şekil 3.10 Domates salçası için elde edilen kromatogram a) domates salçası b) 0,1 µg/mL standart eklenmiş domates salçası örneği

Tablo 3.3 Kırmızı pul biber örneğinde Sudan (I-IV) boyaalarının analiz sonuçları (n=3)

Kırmızı pul biber	Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan ($\mu\text{g/mL}$) ($\bar{x}\pm s$)	Geri kazanım (%) ($\bar{x}\pm s$)
Sudan I	-	-	
	0,1	0,08 \pm 0,01	80 \pm 2
	0,2	0,16 \pm 0,02	80 \pm 2
Sudan II	-	-	
	0,1	0,08 \pm 0,01	80 \pm 2
	0,2	0,16 \pm 0,02 ₆	82 \pm 2
Sudan III	-	-	
	0,1	0,09 ₅ \pm 0,01 ₆	95 \pm 3
	0,2	0,2 \pm 0,03	100 \pm 4
Sudan IV	-	-	
	0,1	0,08 ₅ \pm 0,01 ₄	85 \pm 3
	0,2	0,17 \pm 0,02	85 \pm 2

Tablo 3.4 Kırmızı toz biber örneğinde Sudan (I-IV) boyaalarının analiz sonuçları (n=3)

Kırmızı toz biber	Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan ($\mu\text{g/mL}$) ($\bar{x}\pm s$)	Geri kazanım (%) ($\bar{x}\pm s$)
Sudan I	-	-	
	0,1	0,08 ₅ \pm 0,01	85 \pm 3
	0,2	0,16 \pm 0,02	80 \pm 2
Sudan II	-	-	
	0,1	0,08 ₂ \pm 0,01 ₃	82 \pm 2
	0,2	0,16 \pm 0,02	80 \pm 2
Sudan III	-	-	
	0,1	0,10 \pm 0,01	100 \pm 4
	0,2	0,18 ₈ \pm 0,02	94 \pm 3
Sudan IV	-	-	
	0,1	0,08 \pm 0,01	80 \pm 2
	0,2	0,16 ₆ \pm 0,02	83 \pm 2

Tablo 3.5 Domates salça örneğinde Sudan (I-IV) boyalarının analiz sonuçları (n=3)

Domates Salçası	Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan ($\mu\text{g/mL}$) ($\bar{x}\pm s$)	Geri kazanım (%) ($\bar{x}\pm s$)
Sudan I	-	-	
	0,1	0,09 \pm 0,01	90 \pm 3
	0,2	0,17 \pm 0,02	85 \pm 3
Sudan II	-	-	
	0,1	0,08 \pm 0,01	80 \pm 2
	0,2	0,16 \pm 0,02	80 \pm 2
Sudan III	-	-	
	0,1	0,10 \pm 0,01	100 \pm 5
	0,2	0,19 \pm 0,02	95 \pm 4
Sudan IV	-	-	
	0,1	0,08 ₈ \pm 0,01 ₄	88 \pm 3
	0,2	0,17 \pm 0,02	85 \pm 2

3.5 Değerlendirme

Çalışmada Sudan (I-IV) boylarının HPLC ile tayinleri öncesi zenginleştirilmeleri için iyonik sıvı bazlı dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi geliştirilmiş ve yöntem optimize edilerek, kırmızı toz biber, pul biber ve domates salça örneklerine başarıyla uygulanmıştır.

Çalışmada öncelikle 1-oktil-3-metil imidazolyum hegzaflofosfat iyonik sıvısı sentezlenmiş ve yapısı FTIR ile karakterize edilmiştir. İyonik sıvının termal davranışı TG/DTG eğrişi ile incelenmiştir. Sentezlenen bu iyonik sıvı, Sudan boyları için geliştirilen ekstraksiyon yönteminde, ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılmıştır.

Sudan (I-IV) boylarının HPLC'de ayrılması ve nicel analizleri için kromatografik şartlar belirlenmiştir.

Geliştirilen iyonik sıvı bazlı dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi için örnek pH'ı, dispersif çözücü hacmi, iyonik sıvı hacmi, santrifüj süresi, ekstraksiyon süresi, dispersif çözücü çeşidi, tuz etkisi gibi parametreler optimize edilmiştir. Elde edilen optimum değerler: pH 7; dispersif çözücü hacmi: 250 µL; iyonik sıvı hacmi: 75 µL; ekstraksiyon süresi: 15 saniye; santrifüj süresi: 5 dakika; dispersif çözücü çeşidi: asetonitril olarak belirlenmiştir. Örnek çözeltiliye tuz ilavesinin Sudan boylarının % geri kazanımlarını azalttığı gözlenmiştir. Bu yüzden gerçek örneklerle uygulama sırasında örnek çözeltiliye tuz eklenmemiştir.

Geliştirilen yöntem için çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirlik gibi analitik parametreler incelenmiştir. Yöntem kırmızı toz biber, pul biber ve domates salça örneklerine başarıyla uygulanmıştır. Gerçek örneklerde boya kalıntılarına rastlanılmamıştır. Sudan boylarının analizi çevre dostu çözücü ile gerçekteştirilmiştir ve ekstraksiyon süresi çok kısadır. Yöntemin doğruluğu için 0,1 ve 0,2 µg/mL standart Sudan (I-IV) boyları örneklere eklenmiş ve %80-100 aralığında geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Alver, E., Demirci, A. ve Özçimder, M. (2012). Microextraction methods. *Sigma*, 30, 75-90.
- Anderson, J. L., Armstrong, D.W. ve Wei, G.T. (2006). Ionic liquids in analytical chemistry. *Analytical Chemistry*, 78(9), 2892-2902.
- Avrupa Komisyonu, (1994). European Parliament and Council Directive 94/36/EC of 30 June 1994 on colours for use in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L237/13, 10.9.94
- Avrupa Komisyonu, (2005). Commission Decision of 23 May 2005 on emergency measures regarding chilli, chilli products, curcuma and palm oil. *Official Journal of the European Union*, L 135/34, 28.5.2005
- Belitz, H.,Grosch, W. ve Schieberle, P. (2004). *Food Chemistry*, Berlin: Springer.
- Bhaskar, M., Aruna, P., Ganesh Jeevan, R. J. ve Radhakrishnan, G. (2004). β -Cyclodextrin-polyurethane polymer as solid phase extraction material for the analysis of carcinogenic aromatic amines. *Analytica Chimica Acta*, 509(1), 39-45.
- Chemfiles*, (2005). 20 Mayıs 2013, http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Aldrich/Brochure/al_chemfile_v5_n6.pdf
- Ertas, E., Özer, H. ve Alasalvar, C. (2007). A rapid HPLC method for determination of Sudan dyes and Para Red in red chilli pepper. *Food Chemistry*, 105(2), 756-760.
- Fontanals, N., Borrull, F. ve Marcé, R. M. (2012). Ionic liquids in solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 41, 15-26.

- Food Standards Agency, (2003). Method 145b; *Collaborative trial 145 of a method for the detection and determination of Sudan I in chilli products by HPLC*. 10 Şubat 2012, <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/145b.pdf>
- Hawley, C. ve Buckley, R. E. (1976). Hyperkinesia and sensitivity to aniline food dyes. *Journal of Orthomolecular Psychiatry*, 5(2), 129-137.
- He, L., Su, Y., Shen, X., Zeng, Z. ve Liu, Y. (2007). Determination of Sudan dye residues in eggs by liquid chromatography and gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 594(1), 139-146.
- Ho, Y.M., Tsoi, Y.K. ve Leung, K.S.Y. (2013). Ionic-liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction for high-throughput multiple food contaminant screening. *Journal of Separation Science*, 36(23), 3791-3798.
- Hossien-poor-Zaryabi, M., Chamsaz, M., Heidari, T., Zavar, M.H.A., Behbahani, M., Salarian, M. ve diğer. (2014). Application of dispersive liquid–liquid microextraction using mean centering of ratio spectra method for trace determination of Mercury in food and environmental samples. *Food Analytical Methods*, 7(2), 352-359.
- Hu, X., Cai, Q., Fan, Y., Ye, T. ve Cao, Y., (2012). Molecularly imprinted polymer coated solid-phase microextraction fibers for determination of Sudan I–IV dyes in hot chili powder and poultry feed samples. *Journal of Chromatography A*, 1219, 39-46.
- Jain, N., Kumar, A. ve Chauhan, S. (2005). Synthesis of transition metal porphyrins from free-base 5, 10, 15, 20-tetraarylporphyrins under microwave irradiation in ionic liquids. *Synthetic Communications*, 35(9), 1223-1230.
- Jiang, C., Sun, Y., Yu, X., Zhang, L., Sun, X., Gao, Y. ve diğer. (2012). Removal of sudan dyes from water with C₁₈-functional ultrafine magnetic silica nanoparticles. *Talanta*, 89, 38-46.

- Kocúrová, L., Balogh, I.S., Šandrejová, J. ve Andruch, V. (2012). Recent advances in dispersive liquid–liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review. *Microchemical Journal*, 102, 11-17.
- Kucharska, M. ve Grabka, J. (2010). A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes. *Talanta*, 80(3), 1045-1051.
- Liu, J.F., Jiang, G.B. ve Jönsson, J.Å. (2005). Application of ionic liquids in analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24(1), 20-27.
- Liu, W., Zhao, W.J., Chen, J.B. ve Yang, M.M. (2007). A cloud point extraction approach using Triton X-100 for the separation and preconcentration of Sudan dyes in chilli powder. *Analytica Chimica Acta*, 605(1), 41-45.
- Liu, Y., Zhao, E., Zhu, W., Gao, H. ve Zhou, Z. (2009). Determination of four heterocyclic insecticides by ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1216(6), 885-891.
- Madhava Naidu, M. ve Sowbhagya, H. (2012). Technological advances in food colours. *Chemical Industry Digest*, 79-88.
- Matsumoto, H., Kageyama, H. ve Miyazaki, Y. (2002). Room temperature ionic liquids based on small aliphatic ammonium cations and asymmetric amide anions. *Chemical Communications* (16), 1726-1727.
- McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K. ve diğer. (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 370(9598), 1560-1567.
- Meggos, H. (1995). Food colors - an international perspective. *Manufacturing Confectioner*, 75, 59-59.

- Özdemir, S., Varlıklı, C., Öner, İ., Ocakoğlu, K. ve İçli, S. (2010). The synthesis of 1, 8-naphthalimide groups containing imidazolium salts/ionic liquids using Γ , PF_6^- , TFSI anions and their photophysical, electrochemical and thermal properties. *Dyes and Pigments*, 86(3), 206-216.
- Papaiconomou, N., Salminen, J., Lee, J.M. ve Prausnitz, J.M. (2007). Physicochemical properties of hydrophobic ionic liquids containing 1-octylpyridinium, 1-octyl-2-methylpyridinium, or 1-octyl-4-methylpyridinium cations. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 52(3), 833-840.
- Poole, C.F. ve Poole, S.K. (2010). Extraction of organic compounds with room temperature ionic liquids. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2268-2286.
- Punj, S. (2008). *Characterization of Azo Dye reduction in Enterococcus Faecalis*: ProQuest.
- Rapid Alert System For Food And Feed (RASFF), (2004). *Annual report on the functioning of the RASFF*. 20 Ekim 2013; http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2004_en.pdf
- Rezaee, M., Assadi, Y., Milani Hosseini, M.R., Aghaee, E., Ahmadi, F., Berijani, S. ve diğer. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1116(1), 1-9.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. ve Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*, 77(3), 247-255.
- Shashkov, M., Sidelnikov, V. ve Zaikin, P. (2014). Selectivity of stationary phases based on pyridinium ionic liquids for capillary gas chromatography. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 88(4), 717-721.

- Siangproh, W., Sonamit, K., Chaiyo, S. ve Chailapakul, O. (2013). Fast determination of Sudan I-IV in chili products using automated on-line solid phase extraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Letters*, 46(11), 1705-1717.
- Smirnova, N. ve Safonova, E. (2010). Ionic liquids as surfactants. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 84(10), 1695-1704.
- Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Hodek, P. ve Frei, E. (2002). Sudan I is a potential carcinogen for humans evidence for its metabolic activation and detoxication by human recombinant Cytochrome P450 1A1 and liver microsomes. *Cancer Research*, 62(20), 5678-5684.
- Trujillo-Rodríguez, M.J., Rocío-Bautista, P., Pino, V. ve Afonso, A.M. (2013). Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 51, 87-106.
- Walford, J. (1980). Historical development of food colouration. *Developments in Food Colours*, 1, 1.
- Weisburger, J. H. (2002). Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 506, 9-20.
- Welton, T. (1999). Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis. *Chemical Reviews*, 99(8), 2071-2084.
- Wilkes, J.S., Levisky, J.A., Wilson, R.A. ve Hussey, C.L. (1982). Dialkylimidazolium chloroaluminate melts: A new class of room-temperature ionic liquids for electrochemistry, spectroscopy and synthesis. *Inorganic Chemistry*, 21(3), 1263-1264.

- Xue, B., Wang, H., Hu, Y., Li, H., Wang, Z., Cao, Y. ve diğer. (2004). An alternative ionic liquid based electrolyte for dye-sensitized solar cells. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3(10), 918-919.
- Yan, H., Qiao, J., Wang, H., Yang, G. ve Row, K. H. (2011). Molecularly imprinted solid-phase extraction combined with ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of four Sudan dyes in sausage samples. *Analyst*, 136(12), 2629-2634.
- Yan, H., Wang, H., Qiao, J. ve Yang, G. (2011). Molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion combined with dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of four Sudan dyes in egg yolk. *Journal of Chromatography A*, 1218(16), 2182-2188.
- Zafer, C., Ocakoğlu, K., Özsoy, C. ve İçli, S. (2009). Dicationic bis-imidazolium molten salts for efficient dye sensitized solar cells: Synthesis and photovoltaic properties. *Electrochimica Acta*, 54(24), 5709-5714.
- Zhang, Z., Xu, S., Li, J., Xiong, H., Peng, H., Chen, L. ve diğer. (2011). Selective solid-phase extraction of Sudan I in chilli sauce by single-hole hollow molecularly imprinted polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(1), 180-187.
- Zhixiang, X., Shuo, W., Guozhen, F., Jiajia, S. ve Yan, Z. (2010). On-line SPE coupled with LC for analysis of traces of Sudan dyes in foods. *Chromatographia*, 71(5-6), 397-403.