



T.C.

NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

BAZI KİMYASAL TÜRLERİN ANALİZİNDE
KATI-FAZ FLORESANS SPEKTROSKOPİSİNİN
KULLANILABİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ

MERVE ÖZTÜRK

Ocak 2022

T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

BAZI KİMYASAL TÜRLERİN ANALİZİNDE
KATI-FAZ FLORESANS SPEKTROSKOPİSİNİN
KULLANILABİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ

MERVE ÖZTÜRK

Yüksek Lisans Tezi

Danışman
Prof. Dr. Orhan GEZİCİ

Ocak 2022

Merve ÖZTÜRK tarafından **Prof. Dr. Orhan GEZİCİ** danışmanlığında hazırlanan “**Bazı Kimyasal Türlerin Analizinde Katı-Faz Floresans Spektroskopisinin Kullanılabilirliğinin İncelenmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya** Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : | Prof. Dr. Berkant KAYAN
(Aksaray Üniversitesi) |

Üye : | Prof. Dr. Yeliz KONUKLU
(Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi) |

Üye : | Prof. Dr. Orhan GEZİCİ
(Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi) |

ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../20.... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun/...../20.... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

Prof. Dr. Murat BARUT
MÜDÜR

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Merve ÖZTÜRK

ÖZET

BAZI KİMYASAL TÜRLERİN ANALİZİNDE KATI-FAZ FLORESANS SPEKTROSKOPİSİNİN KULLANILABİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ

ÖZTÜRK, Merve

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Orhan GEZİCİ

Ocak 2022, 42 sayfa

Bu çalışmada, katı-faz floresans spektroskopisi (SPFS) tekniğinin floresans özellik sergileyen türlerin kantitatif analizinde kullanılabilirliği incelenmiştir. Bu amaçla, kantitatif analizde kalibrasyon grafiklerinin türetilmesinde kullanılacak katı seyrelticilerin türü ve ölçümde kullanılacak örnekleme metodunun türü çalışılmıştır. Katı seyrelticiler olarak sodyum karbonat, silika, sodyum klorür ve nişasta olmak üzere dört farklı katı madde, model bileşik olarak seçilen Rodamin b ve Floressein analitlerinin farklı konsantrasyonlara sahip standart karışımlarının hazırlanmasında kullanıldı. Model bileşiklerin hazırlanan standart karışımları (a) katı numune ölçüm hücresi metodu ve (b) vinil bant metodu olmak üzere iki farklı metotla ölçülmüş ve kaydedilen floresans sinyallerinden türetilen kalibrasyon grafiklerinden bazı performans parametreleri türetilmiştir. Çalışılan katı seyrelticiler arasından en iyi sonuçlar sodyum karbonat ve silika ile elde edilirken, ölçüm yöntemleri arasından katı numune ölçüm hücresi metodu belirgin bir üstünlük sergilemiştir. Rodamin b ve floressein için en düşük miktar tayin sınırları (LOQ) sırasıyla 60 ppb ve 110 ppb olarak hesaplanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Floresans, floressein, kantitatif analiz, lüminesans, ön-cephe floresans spektroskopisi, rodamin b, spektroskopi

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE USABILITY OF SOLID-PHASE FLUORESCENCE SPECTROSCOPY IN THE ANALYSIS OF SOME CHEMICAL SPECIES

ÖZTÜRK, Merve

Nigde Ömer Halisdemir University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor : Prof. Dr. Orhan Gezici

January 2022, 42 pages

In this study, the usability of solid-phase fluorescence spectroscopy (SPFS) technique in the quantitative analysis of fluorescent species was investigated. For this purpose, the type of solid diluents to be used in the derivation of calibration graphs in quantitative analysis and the type of sampling method to be used in measurement were studied. As solid diluents, four different solids, namely sodium carbonate, silica, sodium chloride and starch, were used in the preparation of standard mixtures with different concentrations of rhodamine b and fluorescein analytes selected as model compounds. Prepared standard mixtures of model compounds were measured by two different methods, (a) solid sample measuring cell method and (b) vinyl tape method, and some performance parameters were calculated from the calibration graphs derived from the recorded fluorescence signals. The best results were obtained with sodium carbonate and silica among the solid diluents studied, and the solid sample measuring cell method showed a clear superiority among the studied measurement methods. The lowest limit of quantitation (LOQ) values for rhodamine b and fluorescein were calculated as 60 ppb and 110 ppb, respectively.

Keywords: Fluorescence, fluorescein, front-face fluorescence spectroscopy, luminescence, quantitative analysis, rhodamine b, spectroscopy

ÖN SÖZ

Daha çok sıvı örneklerin analizinde kullanılan floresans spektroskopisi, teknolojik gelişmelerin yardımıyla artık günümüzde katıların ve viskoz sıvıların da doğrudan analiz edilebildiği yeni formlara evrilmiştir. Bu amaçla son yıllarda yoğun bir şekilde kullanılmaya başlanan katı-faz floresans spektroskopisi (en. *solid-phase fluorescence spectroscopy*, SPFS) sunduğu pratik çözümlerle dikkatleri üzerine çekmektedir. Özellikle katı numuneler için doğrudan uyarma ve emisyon spektrum taramasını mümkün kılan ve hatta bunu üç boyutlu spektrumlar halinde verebilen cihazların gelişmesiyle bu teknik daha etkili bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Elde edilen bu spektrumlar, katı ve viskoz sıvılar için kalitatif analizlerin pratik bir şekilde yapılabilmesine olanak tanımıştır. Diğer taraftan, analizcinin numune hazırlama aşamalarını büyük oranda *by-pass* etmesine olanak tanıyan bu tekniğin kantitatif amaçlarla kullanım noktasında henüz yeterli bir kullanım alanı bulamadığı görülmüştür. Bu nokta, sunulan bu tez çalışmasının konusunun şekillenmesindeki temel motivasyon kaynağı olmuştur.

Bu çalışmada; katı numunelerin seyreltilmesi için bazı katı bileşiklerin seyreltici ortam olarak kullanılabilirliklerinin incelenmesi ve böylece, SPFS'nin katı türlerin kantitatif analizinde kullanımı noktasında yeni bir yaklaşımın uygulanabilirliğinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Elde edilen sonuçların, konuyla ilgili başka çalışmalar için önemli bir dayanak teşkil edeceği ve SPFS tekniğinin kantitatif analizlerde (kısa ve orta vadede) kullanılmasında bu tür çalışmaların çok faydalı olacağı düşünülmektedir.

Çalışmalarım süresince her konuda yardımcı olan danışman hocam Prof. Dr. Orhan GEZİCİ'ye teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar olanaklarını kullandığım Kimya Bölümü'ne de ayrıca teşekkür etmek isterim. Son olarak, bu çalışmanın yürütülmesinde, FMT-2020/4 numaralı BAGEP projesi ile mali destek sunan Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne de sonsuz şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ÖN SÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR	xii
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II GENEL BİLGİLER	4
2.1 Lüminesans Spektroskopisi	4
2.2 Floresansı Etkileyen Parametreler	7
2.2.1 Moleküler yapı	8
2.2.2 Sıcaklık	9
2.2.3 Çözücü türü	9
2.2.4 Ortam pH'sı	9
2.2.5 Çözünmüş oksijen miktarı	9
2.3 Spektroflorimetreler	9
2.4 Çalışmanın Önemi	10
BÖLÜM III DENEYSEL ÇALIŞMALAR	13
3.1 Kimyasallar	13
3.2 Cihazlar ve ekipmanlar	13
3.3 Metot	14
BÖLÜM IV BULGULAR VE TARTIŞMA	17
4.1. SPFS Analizlerinde Katı Seyreltici Türünün Etkisi	17
4.2.1 Nişasta kullanılarak elde edilen sonuçlar	17
4.2.2 Silika kullanılarak elde edilen sonuçlar	20
4.2.3 Sodyum karbonat kullanılarak elde edilen sonuçlar	23
4.2.4 Sodyum klorür kullanılarak elde edilen sonuçlar	26
4.2. SPFS'de Örnekleme Yönteminin Etkisi	30
4.3. Ölçümlerin Tekrarlanabilirliği	35

BÖLÜM V SONUÇLAR.....	37
KAYNAKLAR	39
ÖZ GEÇMİŞ	42



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Rodamin için bazı performans parametreleri	28
Çizelge 4.2. Floressein için bazı performans parametreleri.....	28



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Kinin için moleküler yapı	4
Şekil 2.2.	Lüminesans spektroskopisinde geçiş halleri	5
Şekil 2.3.	Jablonski enerji diyagramı	6
Şekil 2.4.	Absorpsiyon, floresans ve fosforesans olaylarına ait geçişler	7
Şekil 2.5.	Floressein ve fenolftaleyn için moleküler yapılar.....	8
Şekil 2.7.	Floressein ve Rodamin b bileşiklerinin moleküler yapıları	12
Şekil 3.1.	Katı numune ölçüm standının tasarımı (Hitachi).....	14
Şekil 3.2.	Katı numunelerin ölçümünde kullanılan aparatlar: Katı numune ölçüm aparatu (a) ve toz ölçüm hücresi (b)	14
Şekil 3.3.	Vinil bant yöntemine göre analiz için hazırlanan örnekler	16
Şekil 4.1.	Nişasta ile toz örnekleme yapılarak rodamin b için elde edilen sinyal- konsantrasyon ilişkisi.....	18
Şekil 4.2.	Nişasta ile toz örnekleme yapılarak floressein için elde edilen sinyal- konsantrasyon ilişkisi.....	19
Şekil 4.3.	Nişasta ile toz örnekleme yapılarak floressein için elde edilen sinyal- konsantrasyon ilişkisinin lineer aralıktaki gösterimi	19
Şekil 4.4.	Silika ile toz örnekleme yapılarak rodamin b için elde edilen sinyal- konsantrasyon ilişkisi.....	20
Şekil 4.5.	Silika ile toz örnekleme yapılarak rodamin b için elde edilen sinyal- konsantrasyon ilişkisinin lineer aralıktaki gösterimi	21
Şekil 4.6.	Silika ile toz örnekleme yapılarak floressein için elde edilen sinyal- konsantrasyon ilişkisi.....	22
Şekil 4.7.	Silika ile toz örnekleme yapılarak floressein için elde edilen sinyal- konsantrasyon ilişkisinin lineer aralıktaki gösterimi	22
Şekil 4.8.	Sodyum karbonat ile toz örnekleme yapılarak rodamin b için elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkisi.....	23
Şekil 4.9.	Sodyum karbonat ile toz örnekleme yapılarak rodamin b için elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkisinin lineer aralıktaki gösterimi	24
Şekil 4.10.	Sodyum karbonat ile toz örnekleme yapılarak floressein için elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkisi.....	25

Şekil 4.11. Sodyum karbonat ile toz örnekleme yapılarak floressein için elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkisinin lineer aralıktaki gösterimi	25
Şekil 4.12. Sodyum klorür ile toz örnekleme yapılarak rodamin b için elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkisi	26
Şekil 4.13. Sodyum klorür ile toz örnekleme yapılarak rodamin b için elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkisinin lineer aralıktaki gösterimi	27
Şekil 4.14. Rodamin için bazı katı seyrelticiler kullanılarak elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkilerinin toplu halde gösterimi	29
Şekil 4.15. Floressein için bazı katı seyrelticiler kullanılarak elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkilerinin toplu halde gösterimi	29
Şekil 4.16. Rodamin için sodyum karbonat kullanılarak iki farklı örnekleme yöntemi ile elde edilen veriler	31
Şekil 4.17. Rodamin için silika kullanılarak iki farklı örnekleme yöntemi ile elde edilen veriler	32
Şekil 4.18. Rodamin için vinil bant yöntemi ile iki farklı katı seyreltici kullanılarak elde edilen veriler	32
Şekil 4.19. Floressein için sodyum karbonat kullanılarak iki farklı örnekleme yöntemi ile elde edilen veriler	34
Şekil 4.20. Floressein için silika kullanılarak iki farklı örnekleme yöntemi ile elde edilen veriler	34
Şekil 4.21. Floressein için vinil bant yöntemi ile iki farklı katı seyreltici kullanılarak elde edilen veriler	35
Şekil 4.22. Silika kullanılarak katı numune hücresi ölçüm yöntemi ile yürütülen günler-arası tekrar analizlerinden elde edilen sonuçlar	36

SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler

ppb

R^2

Açıklama

Milyarda kısım

Regresyon sabiti

Kısaltmalar

FFFS

SPFS

LOQ

LOD

Açıklama

Ön-Cephe Floresans Spektroskopisi

Katı-Faz Floresans Spektroskopisi

Kantitatif Tayin Sınırı

Kalitatif Tayin Sınırı

BÖLÜM I

GİRİŞ

Son zamanlarda floresansa dayalı analitik yöntemler, birçok disiplinde hem kalitatif hem de kantitatif amaçlar için en çok kullanılan yöntemler haline gelmiştir (Özbekova ve Kulmırzayev, 2015). DNA çalışmaları, genetik incelemeler, klinik kimya, moleküler biyofizik gibi alanlarda spektroflorimetrik yöntemlere olan ilgi hızla artmıştır. Floresans spektroskopisine duyulan ilginin altında yatan başlıca nedenler yüksek hassasiyet, seçicilik, hız, kolaylık ve esneklik olarak sıralanabilir. Floresans spektroskopisi, moleküllerdeki küçük değişikliklere karşı yüksek duyarlık sergileyen bir teknik olarak ayrıca önemsenmektedir (Özkan, 2016). Floresans spektroskopisi; az ışık gücü, zamandan tasarruf ve düşük analiz maliyeti gibi hususlarda da avantaj sağlamaktadır. Analizlerde görece az kimyasal kullanımı da bu tekniğin üstün yönlerindedir (Cinisli ve Özgül, 2018).

Numune hazırlamak genelde dikkat gerektiren, vakit alan ve zaman zaman sıkıcı hale gelen bir işlemdir. Bundan dolayı uygulanan hazırlıkların bazen sınırlandırılmasına sebep olur ve analiz sırasında kullanılan kimyasal maddelerin zararlı etkileri de önem arz eder. Bu sebeple floresans spektroskopisi ile uygulanan analizlerin diğer tekniklere olan uyumu, araştırmacıların dikkatini çekmiş ve yapılan araştırmalarda bu tekniğin ümit verici bir teknik olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Cinisli ve Özgül, 2018).

Optik spektroskopinin bir dalı olan floresans spektroskopisi; maddenin elektromanyetik ışın ile temel halden bir üst enerji seviyesine uyarılması (absorpsiyon), daha sonra kararsız bir hale tekabül eden bu durumdan tekrar temel hale dönmesi ve absorpladığı enerjiyi ışın olarak vermesi (emisyon) esasına dayanmaktadır. Spektroflorimetrik analizler, bu emisyon ışınmasının ölçülmesine dayanır (Özbekova ve Kulmırzayev, 2015). Yani floresans spektroskopisinde madde, kararsız bir hale tekabül eden uyarılmış halde çok kısa bir süre kalır ve sonra tekrar temel hale geri döner (Yüksekoğul, 2017). Maddenin temel hale dönmesi aşamasında gözlenen ışın emisyonu floresans ve fosforesans olmak üzere iki şekilde gerçekleşebilir. Uyarılmış bir molekül bu halde yaklaşık olarak 10^{-9} s duran madde ışıklı veya ışısız durulma ile temel hale döner. Işıklı durulma işlemine fotoluminesans denir (Toprak, 2006). Floresans ve

fosforesans olaylarının her ikisi de fotolüminesans kapsamında değerlendirilip, her iki durumda da emisyon ışımalarının dalga boyu absorplanan ışının dalga boyundan daha uzundur (Öksüz, 2016). Floresansta uyarılmış singlet halden temel hale geçiş, fosforesansta ise uyarılmış triplet halden temel hale geçiş esastır (Nazli, 2020).

Maddelerin ışığı yayma (emisyon) süresi floresansta fosforesansa göre daha kısadır. Floresans özellik gösteren maddeler 10^{-5} - 10^{-8} saniye süreyle ışık yayarken, fosforesans maddeler genellikle 10^{-4} saniyeden daha uzun süre ışın yayar. Floresans spektroskopisindeki analizler çok küçük konsantrasyonlarda bile çalışılabilecek hassaslıkta olması nedeniyle bazı yöntemlere göre yüksek hassasiyet gösterir. Fakat floresans özellik gösteren maddeler sayıca az olduğu için floresans spektroskopisinin uygulama alanı sınırlı kalmaktadır (Öksüz, 2016).

Floresans spektroskopisinde floresans özelliğe sahip bir türün doğrudan analizi yapılabildiği gibi; bazı türlerin analizi floresans sönmüleme (quenching) yolu ile dolaylı olarak da yapılabilmektedir (Özyol, 2016).

Floresans spektroskopisi, floresans özellik sergileyen türlerin analizi için günümüzde sıkça başvurulan tekniklerden bir tanesidir. Floresans şiddetinin konsantrasyon ile orantılı olması tekniğin kantitatif amaçlarla da kullanılabilmesine olanak tanımaktadır. Analiz edilen örneklerin karmaşık olması, farklı kimyasal türlere ait uyarma ve emisyon dalga boylarının çakışabilmesi gibi bazı nedenlerden dolayı bu teknik çoğu zaman kromatografi gibi bir ayırma yöntemiyle birlikte kullanılmaktadır. Günümüzde, spektroflorimetrelerde kaydedilen teknolojik gelişmeler, bazı türlerin katı ve viskoz ortamlarda doğrudan analizini de mümkün kılmaktadır. Ön-cephe floresans spektroskopisi (eng. *front-face fluorescence spectroscopy*, FFFS) olarak bilinen teknik ile katı numuneler ve viskoz sıvılar ilave bir numune hazırlama aşamasına gerek duyulmadan doğrudan analiz edilebilmektedir. Bu teknik katı örneklerle uygulandığında bazen katı-faz floresans spektroskopisi (eng. *solid-phase fluorescence spectroscopy*, SPFS) olarak da adlandırılabilir (Mounier vd., 2017a).

Bu teknik kullanılarak süt (Hougaard vd., 2013), peynir (Karoui vd., 2007), ilaç (Alves ve Poppi, 2013), kanalizasyon suyu (Muller vd., 2011), toprak (Ammari vd., 2014) ve şarap (Airado-Rodríguez vd., 2011) örneklerinin başarılı bir şekilde analiz edilebildiği

görülmüştür. Ayrıca, ısıl işlemin süt üzerine etkisinin de bu teknikle değerlendirilebildiği görülmüştür (Kulmyrzaev vd., 2005). Dolayısıyla, FFFS ve SPFS teknikleri, birçok alanda farklı özelliklere sahip numunelerin analizinin hızlı ve güvenilir bir şekilde yapılmasını olası kılan teknikler olarak karşımıza çıkmaktadır.

Sunulan bu tez çalışması, SPFS tekniğinin kantitatif analizlerde uygulanabilirliğinin kapsamlı bir şekilde değerlendirildiği bir çalışma niteliği taşımaktadır. Çalışmada, seyreltici ortam olarak bazı destek katılarının SPFS tekniğindeki performansları kantitatif tayin sınırı (LOQ) ve hassasiyet temelinde incelenmiştir.

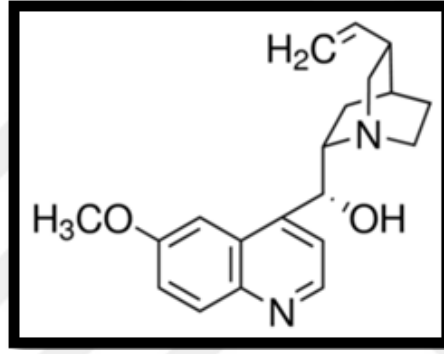


BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

2.1 Lüminesans Spektroskopisi

Floresans özellik sergilediği anlaşılan ilk madde Kinin olarak bilinen ve bir zamanlar sıtma tedavisinde kullanılan bir maddedir (Şekil 2.1). II. Dünya Savaşı'nda sıtmanın tedavisinde kullanılan kimyasalların floresans özellik sergilemesi 1950'li yıllarda ilk spektrofotometrenin geliştirilmesinde etkili olmuştur (Özdamar, 1988).



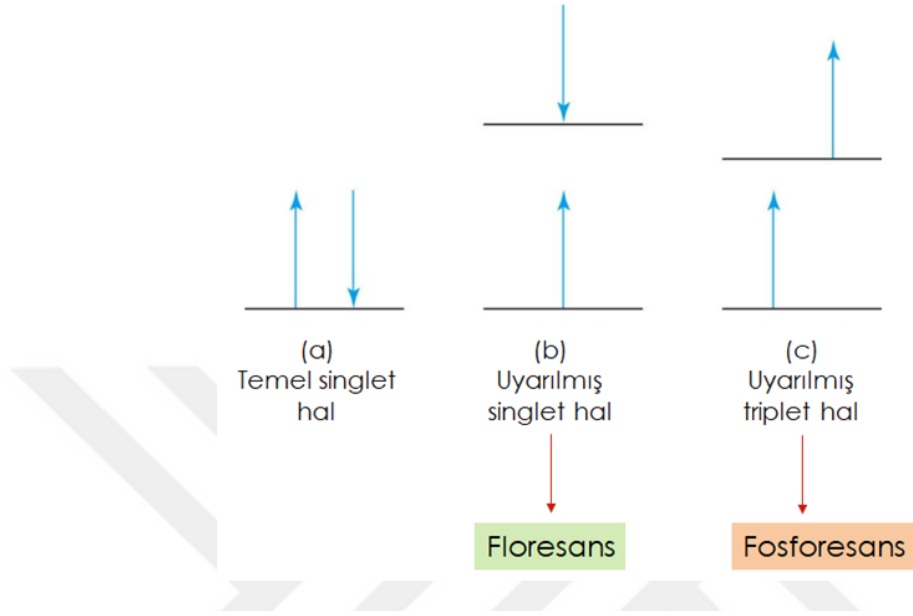
Şekil 2.1. Kinin için moleküler yapı

Lüminesans olayı, uyarılmanın yapıldığı sırada kullanılan enerji kaynağına göre farklı isimlerle adlandırılabilir (Oğuzcan, 2020):

- ❖ Elektrik enerjisi ile uyarıldığında “elektrolüminesans”,
- ❖ Kimyasal reaksiyon enerjisi ile uyarıldığında “kemilüminesans”,
- ❖ Canlılardaki biyomoleküller ile uyarıldığında “biyolüminesans”,
- ❖ Işın ile uyarıldığında “fotolüminesans”.

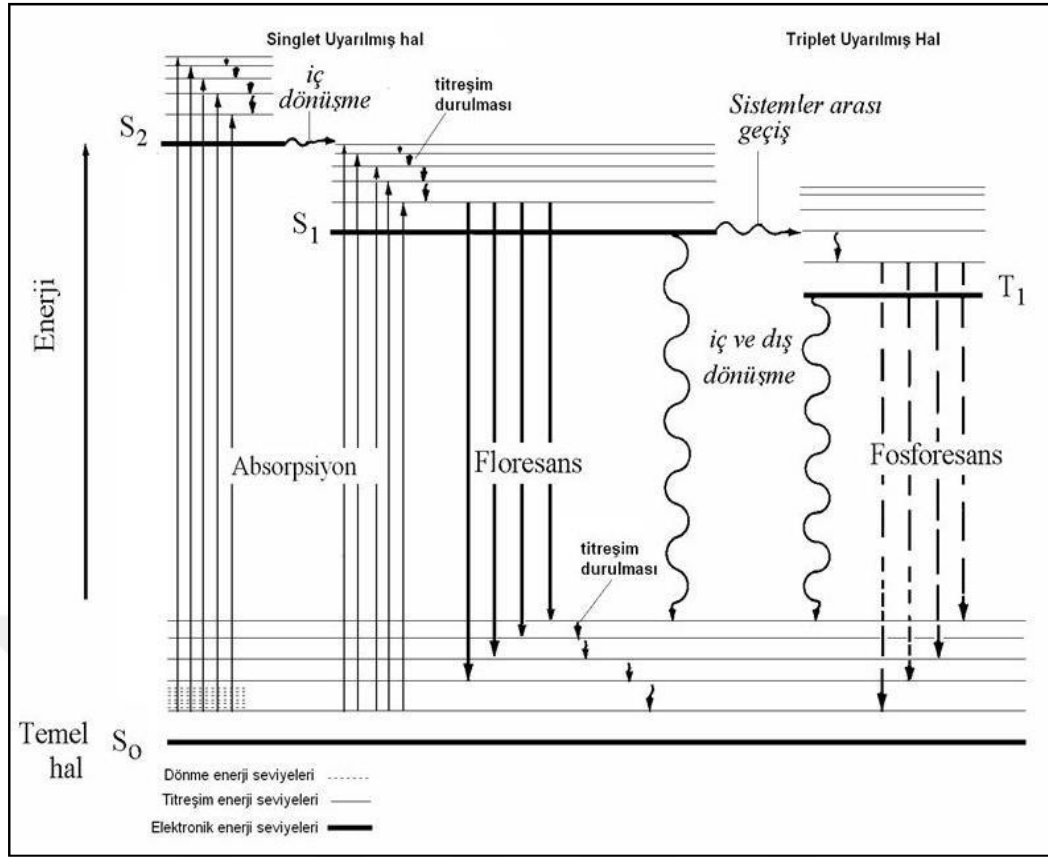
Floresans ve fosforesans olaylarında temel ve uyarılmış hallerdeki farklı elektronik durumlar söz konusudur. Floresansta; madde temel singlet halden önce uyarılmış singlet hale geçer ve ardından tekrar temel singlet hale dönüş yapar. Fosforesansta ise madde

temel singlet halden uyarılmış singlet hale, sonra uyarılmış triplet hale ve son olarak da temel singlet hale geçer. Bu geçişler 'da şematik olarak gösterilmiştir (Şekil 2.2) (Toprak, 2006):



Şekil 2.2. Lüminesans spektroskopisinde geçiş halleri

Alexander Jablonski, ışımali durulma hallerini, Jablonski Diyagramı adı verilen bir diyagram üzerinde başarılı bir şekilde izah etmiştir (Şekil 2.3) (Toprak, 2006).



Şekil 2.3. Jablonski enerji diyagramı

Diyagramda; S_0 singlet temel enerji seviyesini, S_1 uyarılmış 1. singlet elektronik enerji seviyesini, S_2 singlet ikinci uyarılmış enerji seviyesini ve T_1 ise triplet uyarılmış enerji seviyesini göstermektedir (Toprak, 2006). Jablonski diyagramında belirtilen absorpsiyon, floresans ve fosforesans geçişlerini tanımlayacak olursak:

Absorpsiyon

Absorpsiyon, singlet temel enerji seviyesinden (S_0) singlet uyarılmış herhangi bir uyarılma enerji seviyesine (S_1 veya S_2) olan geçiştir. Bir ışının absorplanma hızı çok yüksektir (Toprak, 2006). Enerji seviyeleri arasındaki geçişler 10^{-15} s'de gerçekleşir (Skoog vd., 1998).

Floresans

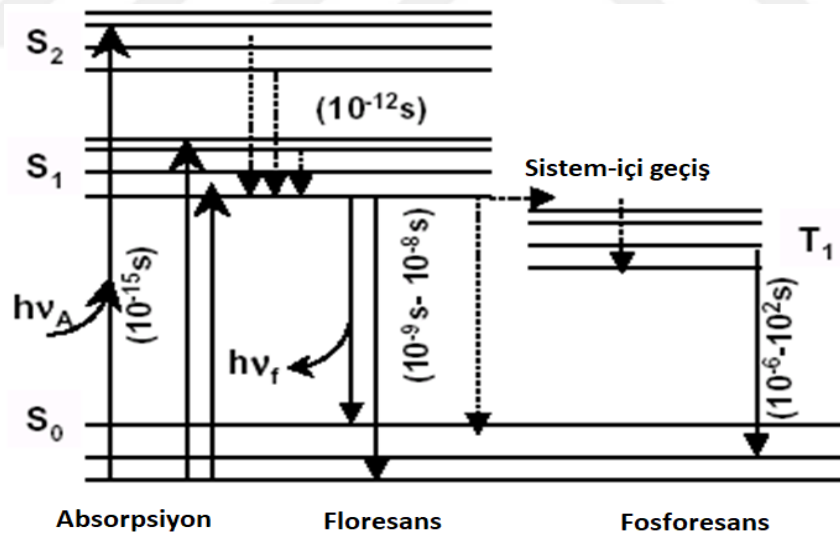
Floresans 10^{-8} s veya 10^{-9} s gibi kısa bir sürede gerçekleşir. Bu olay, izin verilen bir elektronik geçiş basamağıdır ve mekanizma singlet uyarılmış enerji seviyesinden singlet

temel enerji seviyesine dönüşe dayana ışımali bir geçiştir (Kaya, 2014). Floresans emisyonunda moleküller, ışımaz durumlalar nedeniyle absorbladıkları enerjiden daha düşük bir enerji yayarlar. Bu yüzden floresans spektroskopisinde moleküle yollanan ışığın dalga boyundan daha uzun dalga boylarında floresans gözlemlenir. Bu daha yüksek dalga boylarına kayma olayına **Stokes Kayması** adı verilir (Skoog vd., 1998).

Fosforesans

Fosforesans, triplet uyarılmış enerji seviyesinden singlet temel enerji seviyesine ışımali bir geçiştir. Fosforesansta elektron triplet uyarılmış enerji seviyesinden singlet temel enerji seviyesine geçerken spin değiştirmektedir. Bu geçiş absorpsiyon ve floresansa göre daha uzun bir sürede gerçekleşir (10^{-4} - 1 s) (Kaya, 2014). Bu süre bazen 100 s gibi yüksek sürelerde de gözlemlenebilir.

Absorpsiyon, floresans ve fosforesans olaylarındaki geçişler ve geçişlere karşılık gelen süreler Şekil 2.4'te şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 2.4. Absorpsiyon, floresans ve fosforesans olaylarına ait geçişler

2.2 Floresansı Etkileyen Parametreler

Floresans özellik, molekül yapısı ve çevreye bağlıdır. Floresansı kuantum verimi, çözücü ve pH, sıcaklık ve viskozite, derişim, yapısal faktörler, derişim, çözülmüş

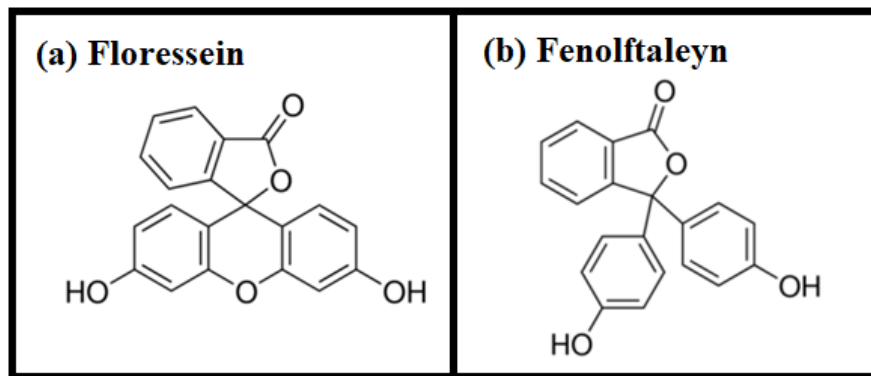
oksijen, moleküler katılık gibi birçok parametre etkileyebilir (Özyol, 2016). Bunlar aşağıda kısaca açıklanmıştır:

2.2.1 Moleküler yapı

Floresansta ilk şart UV veya görünür alandaki radyasyonun madde tarafından absorblanabilmesidir. En düşük enerjili elektronik geçişlerden $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişinde floresans özellik daha fazladır. Bu nedenle, aromatik ve konjuge çift bağ sayısı fazla olan bileşiklerde floresans özellik çok belirgindir. Bu tür bileşiklerin düzlemsel ve katı yapıda olanlarında bu özellik daha belirgindir. π -bağlı heteroatom içeren ve $n \rightarrow \pi^*$ geçişlerine sahip bileşikler genellikle zayıf floresans sergiler. Basit alifatik yapılu bileşiklerde floresans özellik gözlenmez (Skoog vd., 1998).

Bir molekülün kuantum verimi de moleküler yapıyla ilişkilidir. Kuantum verimi floresans ve fosforesans için hesaplanırken lüminesans gerçekleştiren moleküllerin sayısının toplam uyarılmış molekül sayısına oranı esas alınır. Floresans özelliği yüksek kimyasal türler için kuantum verimi 1'e yakınken, floresans özellik göstermeyen kimyasal türlerin kuantum verimi 0'a yakındır (Öksüz, 2016).

Yapısal rijitlik floresans özelliği artıran bir faktördür. Yapısal rijitlik molekülün serbestçe hareket etmesini sınırladığından ışımasız durulma olasılıkları azalır. Floressein ve fenolftaleyn bileşiklerinden floressein çözelti halinde kuvvetli floresans özellik sergilerken yapısal rijitlik sergilemeyen fenolftaleyn böyle bir özellik göstermez (Şekil 2.5) (Öksüz, 2016).



Şekil 2.5. Floressein ve fenolftaleyn için moleküler yapılar

2.2.2 Sıcaklık

Çoğu molekülün floresans özelliği ve kuantum verimi sıcaklığın artmasıyla azalır. Sıcaklığın artması moleküllerin birbirleriyle etkileşimini artıracığından floresans özelliğın azalmasına neden olur (Yüksekoğul, 2017). Yani, sıcaklığın artmasıyla uyarılmış moleküllerin özellikle çözücü molekülleri ile çarpışma olasılığının artması sonucu enerji ışına yapmadan aktarılır. Bu da emisyon sinyalinin azalması anlamına gelir.

2.2.3 Çözücü türü

Uyarılmış haldeki molekül ile çözücünün karışmasıyla hidrojen bağı oluşuyorsa ve bu bağı temel hale ışınmasız dönüşü hızlandırdığından floresans şiddeti azalır. Ağır atom içeren çözücüler floresans şiddetini azaltır (Çapan, 2008).

2.2.4 Ortam pH'sı

Asidik ve bazik fonksiyonel gruplar içeren moleküllerin floresans özelliği ortam pH'sına bağlıdır. Ortamın pH değerine bağlı olarak asit-baz özelliği sergileyen fonksiyonel grupların iyonlaşma düzeyleri değiştiğinden floresans özellikte de farklılaşma gözlenir (Yüksekoğul, 2017).

2.2.5 Çözünmüş oksijen miktarı

Bir çözeltilde çözünmüş oksijenin varlığı floresans şiddetini genellikle azaltır. Özellikle fosforesans olayının gerçekleştiği çalışmalarda ortamdan çözünmüş oksijenin uzaklaştırılması gerekmektedir (Özkan, 2016).

2.3 Spektroflorimetreler

Tipik bir spektroflorimetre başlıca şu kısımlardan oluşur: Işın kaynağı, numune kabı, filtreler, monokromatörler ve detektör. Fotoluminesans ölçümü için kullanılan cihazlarda bulunan ışın kaynağı; filtre, monokromatör, numune kapları gibi bileşenler,

spektrofotometre ve ultraviyole görünür bölge fotometrelerinin bileşenleriyle benzerlik gösterir (Özyol, 2016).

Floresans spektroskopisinde kaynaktan gelen ışın uyarılma filtresinden veya monokromatörden geçer. Bu filtre uyaracak ışınları geçirebilen ancak floresans emisyonunun dalga boyundaki ışınları ayıklayabilen bir filtredir (Çapan, 2008). Floresans ışınması uyarıcı ışına dik bir pozisyonda ölçülerek hücre duvarından veya çözeltiliden kaynaklanan saçılmanın sinyal üzerine etkisi minimuma indirilir (Özyol, 2016).

Bazı cihazlarda detektördeki ve ışın kaynağının şiddetindeki farklılıkları gidermek için çift ışınli sistemler kullanılır. Böyle cihazlarda ışınlardan biri numuneden geçtikten sonra, diğeri ışın ise doğrudan detektöre gelir (Çapan, 2008).

Floresans özelliği olan maddelerin uyarılabilmesi için güçlü ışık kaynağı kullanılması gerekmektedir. UV-Vis. Spektroskopisinde kullanılan tungsten ve döteryum lambası gibi ışın kaynaklarından daha güçlü ışın kaynakları tercih edilir. Bundan dolayı floresans spektroskopisinde yüksek basınçlı ksenon ark lambaları ve düşük basınçlı cıva ark lambaları kullanılır. Son yıllarda lazerlerde de ksenon ark lambası kullanılmaktadır. Farklı dalga boylarında çalışıldığında ksenon lamba, hassas analizlerde ise düşük basınçlı cıva ark lamba tercih edilir (Özyol, 2016).

Floresans ölçümlerinde silindirik veya dikdörtgen prizması şeklinde, cam veya silisten yapılmış numune kapları kullanılır. Numunenin bulunduğu bölme, detektöre ulaşır saçılan ışının saçılmasını en aza indirecek şekilde tasarlanmıştır.

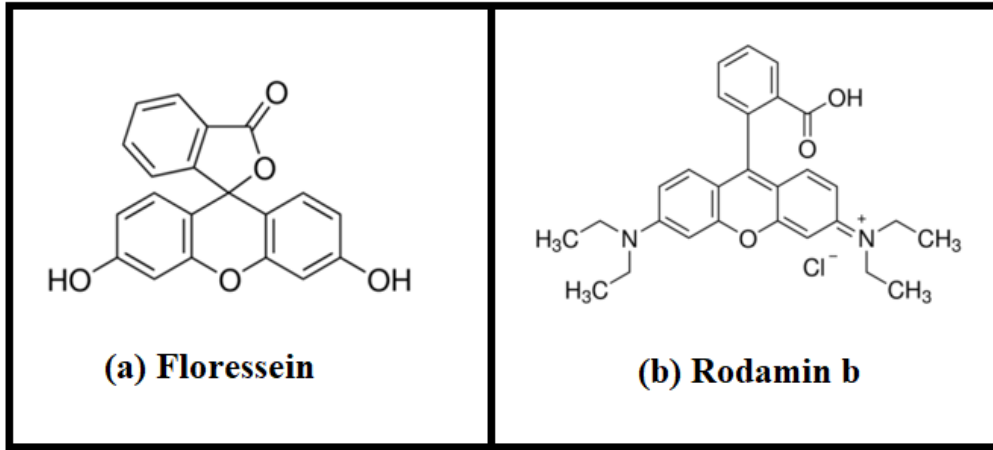
2.4 Çalışmanın Önemi

Kimyasal türlerin analizinde en önemli, en maliyetli ve en zaman alıcı aşama hiç kuşkusuz numune hazırlama basamağıdır. Bu nedenle, günümüzde kimyasal türlerin buldukları matrislerden doğrudan analizi için alternatif analiz yöntemleri önemsenmektedir. Teknolojik ilerlemeler, bazı enstrümantal tekniklerle (ör. spektrofotometre, ATR-FTIR) katı ve viskoz numunelerdeki türlerin analizinin daha kolay ve daha hızlı yapılmasına olanak tanımıştır. Floresans özellik sergileyen kimyasal

türlerin çözelti ortamında tayini ile ilgili çok sayıda çalışma olmakla beraber, bu türlerin katı ve/veya viskoz örneklerde doğrudan tayini için yapılan çalışma sayısının daha az olduğu görülmektedir. Diğer taraftan, bu çalışmalarda son zamanlarda önemli düzeyde artış gözlenmektedir.

Floresans özellik sergileyen türlerin çözelti ortamında yüksek konsantrasyonlarda ve katı halde analizinde karşılaşılan en büyük problemlerden bir tanesi “iç-filtre etkisi (*inner filter effect*)” olarak bilinen olaydır. Bu etkinin sonucu emisyon aşamasında yayılan fotonlar tekrar absorplanır. Bu etki, özellikle düşük Stokes kaymasına sahip sistemlerde çok belirgindir. Katı-faz floresans spektroskopisinde, floroforun optik olarak geçirgen bir katı ile seyreltilmesi iç-filtre etkisini önemli oranda düşürebilir (Khan vd., 2018). Bu durum, katı-faz floresans spektroskopisi temelinde yürütülecek kantitatif analizlerde optik olarak geçirgen katıların seyreltici ortamlar olarak kullanılabilme potansiyelini de düşürmüştür (Alves ve Poppi, 2013; Muller vd., 2011). SPFS analizlerinde katı seyrelticiler olarak çalışılan şartlarda optik olarak geçirgen olan sodyum klorür (Khan vd., 2018), sodyum karbonat (Muller vd., 2011) ve borik asit (Mounier vd., 2017a, 2017b) gibi katılar kullanılmıştır.

SPFS ve/veya FFFS'nin kantitatif analizde kullanılabilirliğinin test edildiği bazı çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Mounir ve arkadaşları (Mounier vd., 2017b), katı seyreltici ortam olarak borik asidi kullanarak triptofan ve floressein için hazırladıkları sentetik örnekleri hem toz halde hem de bu tozların preslenmesi ile elde edilmiş peletler halinde analiz etmiştir. Bir diğer çalışmada ise benzer bir yaklaşım hümitik asit ve bazı kimyasalların analizinde denenmiştir (Mounier vd., 2017a). Diğer taraftan; literatürde, farklı katı seyrelticilerin SPFS'deki performansının (deteksiyon limiti ve hassasiyet temelinde) kapsamlı bir değerlendirmeye tabi tutulduğu bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu noktadan hareketle; sunulan bu çalışmada, SPFS tekniğinde katı seyreltme ortamı olarak bazı katı türlerin seyreltici ortam olarak kantitatif analizdeki performansları karşılaştırmalı olarak ilk defa incelenmiştir. Model bileşikler olarak floresans özelliği yüksek iki bileşik seçilmiştir: Floressein ve rodamin b (Şekil 2.6). Ayrıca, toz numune örnekleme ve vinil bant örnekleme olmak üzere iki farklı örnekleme yönteminin başarısı da ilk defa bu tez çalışmasında karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.



Şekil 2.6. Floressein ve Rodamin b bileşiklerinin moleküler yapıları



BÖLÜM III

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kimyasallar

Deneylerde, spektroskopik saflıkta rodamin b ve floressein kullanılmıştır (Sigma). Model bileşik olarak kullanılan bu maddelerin spektroskopik saflıktaki asetonda (Merck) hazırlanmış standart çözeltileri kullanılarak farklı konsantrasyonlarda katı örnekler hazırlanmıştır. Floressein için standart çözelti hazırlanırken, hacme seyreltmeden önce eşdeğer miktarda 0,1 M NaOH (Merck) çözeltisinden ilave edilmiştir. Katı seyrelticiler olarak analitik saflıkta sodyum karbonat (Sigma), silika (Sigma), sodyum klorür (VWR) ve nişasta (Sigma) kullanılmıştır.

3.2 Cihazlar ve ekipmanlar

Spektroflorimetrik analizlerde Hitachi™-F7100 model spektroflorimetre cihazı kullanıldı. Kütle ölçümleri Sartorius™ marka hassas terazi ile gerçekleştirildi. Katı örnekler porselen bir havanda öğütülerek hazırlandı. Kullanılan tüm cam kaplar ve ekipmanlar kullanılmadan önce analitik saflıktaki aseton ile temizlendi. Spektroflorimetrik ölçümler ön-cephe floresans spektroskopisi esasına göre yapıldı ve bunun için bir katı numune ölçüm aparatı ve toz ölçüm hücresi kullanıldı (Şekil 3.1).

Hitachi™ firmasının tasarladığı katı numune ölçüm aparatında, 30°'lik bir geliş açısına ilaveten üst taraf 10° 'ye eğilmiştir. Bu şekilde optimal verim alındığı tespit edilmiştir (Şekil 3.2) (Hitachi High-Technologies Corporation, 2013).



Şekil 3.1. Katı numune ölçüm standının tasarımı (Hitachi)



(a)

(b)

Şekil 3.2. Katı numunelerin ölçümünde kullanılan aparatlar: Katı numune ölçüm aparatı (a) ve toz ölçüm hücresi (b)

3.3 Metot

Standart rodamin b ve floressein karışımlarını hazırlamak için seyreltici ortamlar olarak sodyum karbonat, silika, sodyum klorür ve nişasta kullanıldı. Bu seyreltici katılar, önceden hazırlanan standart rodamin ve floressein çözeltileri ile farklı oranlarda karıştırıldı. Standart rodamin çözeltisi asetonda hazırlanmıştır. Standart floressein çözeltisi de asetonda hazırlanmış olmakla beraber eşdeğer miktarda NaOH ilavesi yapılmıştır. Çalışılan her bir katı seyreltici kullanılarak rodamin için 0-3.000 ppb aralığında, floressein içinse 0-3.300 ppb aralığında karışımlar hazırlandı ve iki farklı yöntemle örnekleme yapıldı. Örnekleme için kullanılan toz numuneler, asetonda hazırlanan rodamin ve floressein standartlarının uygun oranlarda katı seyrelticiler ile bir porselen havanda iyice ufalanıp karıştırılmasıyla hazırlandı.

Spektroflorimetrik okumalarda katı numune ölçüm aparatı kullanıldı ve okumalar ön-cephe floresans modunda gerçekleştirildi. Bu modda iki farklı yöntem üzerinden okuma yapıldı. Birinci yöntemde standart katı numune ölçüm hücresi kullanıldı (Şekil 3.2). Ölçüm hücresine, tamamen dolacak şekilde toz haldeki numune eklendi ve hücre kapatıldıktan sonra daha önce belirlenen uyarma dalga boyunda emisyon sinyali alındı. İlgili dalga boyundaki emisyon sinyalinin şiddetinin konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon grafikleri elde edildi. Bu kalibrasyon grafiklerinden ve blank analizlerinden kantitatif deteksiyon limiti (LOQ) ve hassasiyet hesaplamaları yapıldı. İkinci yöntemde ise, toz haldeki numuneler siyah renkli yapışkan bir vinil bandın üzerine alındı (Şekil 3.3) ve toz numune ölçüm aparatı (Şekil 3.2) üzerinde analiz edildi. Her bir ölçüm en az 5 defa alındı ve hesaplamalarda ortalama değerler kullanıldı. Sapan değerler için %95 güven seviyesinde Q-testi uygulandıktan sonra ortalama hesaplandı.

LOQ hesaplamalarında aşağıdaki formül esas alındı (Skoog vd., 1998):

$$S_m = S_{bl} + k s_{bl} \quad (1)$$

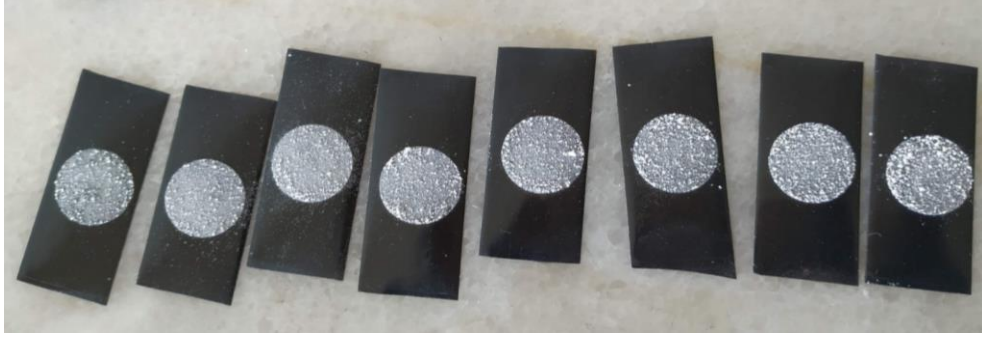
S_m : Gözlenebilen en düşük sinyal,

S_{bl} : Blank için kaydedilen ortalama sinyal (en az 10 okumanın ortalaması),

s_{bl} : Blank için kaydedilen okumaların standart sapması,

k : Bir katsayı (LOD için 3,3 ; LOQ için 9,9)

Bu şekilde hesaplanan S_m değeri daha sonra lineer aralık için çizilen kalibrasyon doğrularının eğimine (m) bölünerek konsantrasyona dönüştürüldü.



Şekil 3.3. Vinil bant yöntemine göre analiz için hazırlanan örnekler

Floresans ölçümlerinde aşağıdaki cihaz parametreleri kullanılmıştır:

Rodamin b:

Uyarma dalga boyu: 490 nm

Emisyon dalga boyu: 570 nm

PMT voltajı: 400 V

Slit aralıkları: 10 nm

Floressein:

Uyarma dalga boyu: 468 nm

Emisyon dalga boyu: 522 nm

PMT voltajı: 350 V

Slit aralıkları: 10 nm

BÖLÜM IV

BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. SPFS Analizlerinde Katı Seyreltici Türünün Etkisi

SPFS tekniğinin kantitatif analizde kullanılabilmesi için analiz edilen türün sinyalinin bozucu bir etkiye sahip olmayan ve bu tür ile muntazam bir şekilde karışabilen bir katının belirlenmesi büyük öneme sahiptir. Bu amaçla yürüttüğümüz ön-çalışmalardan dört adet granüler katının bu amaçla kullanılabileceği belirlendi. Belirlenen bu katılar (nişasta, sodyum klorür, silika ve sodyum karbonat) geniş bir aralıkta farklı oranlarda rodamin b ve floressein ile karıştırılarak sentetik örnekler hazırlandı. Böylece, farklı konsantrasyonlara sahip rodamin b ve floressein karışımları hazırlandı ve bunlar SPFS tekniği ile analiz edildi.

Analiz şamasında iki farklı örnekleme yöntemi kullanıldı. Birinci yöntemde, hazırlanan rodamin ve floressein karışımları doğrudan toz halde ölçülmüş ve bu amaçla toz numune ölçüm hücresi kullanılmıştır. İkinci yöntemde ise, hazırlanan rodamin ve floressein karışımları vinil bir yapışkan bant üzerine muntazam bir şekilde dağıtılmış ve böylece yapışkan bandın üzerine alınan partiküller analize tabi tutulmuştur.

Dolayısıyla hem katı seyreltici türünün hem de örnekleme yönteminin etkisi iki farklı analit kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen verilerden türetilen kalibrasyon grafikleri lineer aralık, LOQ ve hassasiyet temelinde birbiriyle karşılaştırıldı ve en iyi deneysel şartlar irdelendi.

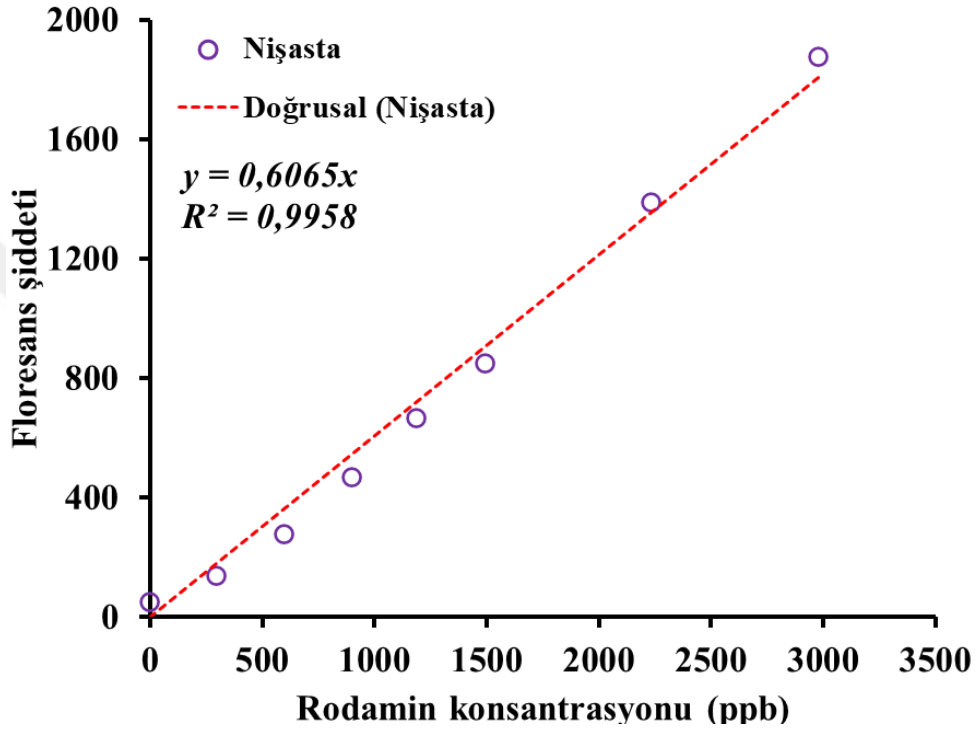
Elde edilen sonuçlar ile ilgili kapsamlı değerlendirmeler önce ayrı başlıklar altında aşağıda sunulmuş ve ardından sonuçlar toplu halde verilerek genel bir değerlendirme yapılmıştır.

4.2.1 Nişasta kullanılarak elde edilen sonuçlar

Katı seyreltici ortam olarak kullandığımız ilk katı olan nişasta ile elde edilen sonuçlar Şekil 4.1'de verilmiştir. Şekilden de görüleceği üzere, geniş bir konsantrasyon

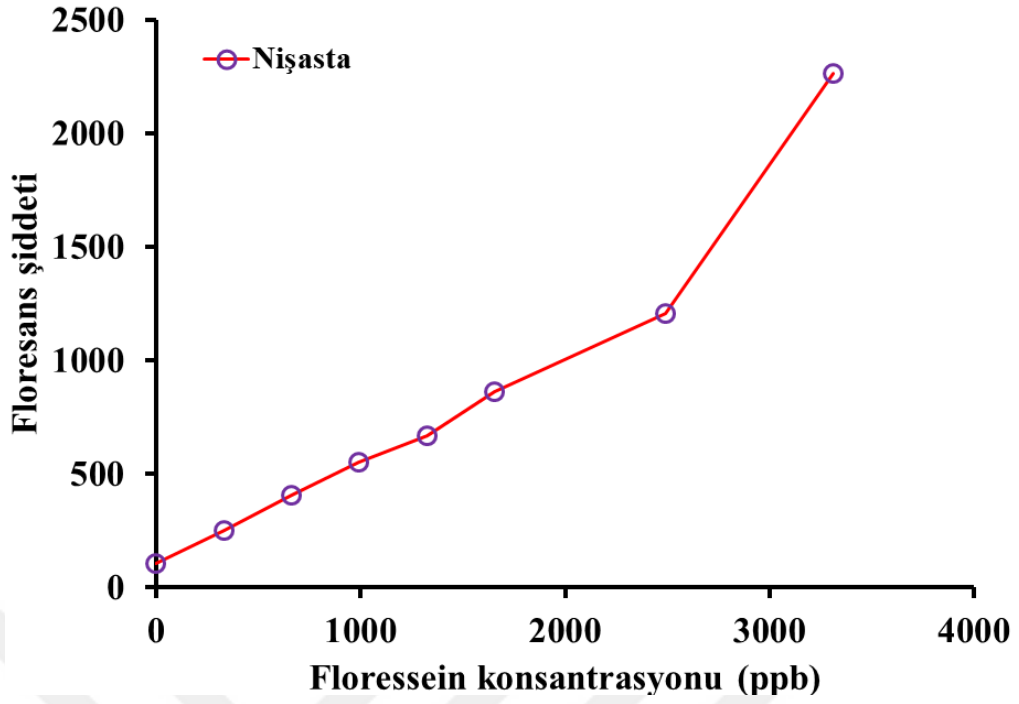
aralığında, nişasta ile elde edilen veriler çok iyi bir lineer dağılım sergilemiştir. Nişasta kullanılarak elde edilen bu veriler, ucuz bir katı olarak nişastanın SPFS’de kullanılabilirliği noktasında önemli bir destek noktası olarak değerlendirilmiştir.

Nişasta kullanıldığı zaman elde edilen ölçüm hassasiyeti 0,6 sinyal/ppb olarak, kantitatif tayin sınırı (LOQ) ise 160 ppb olarak hesaplanmıştır.

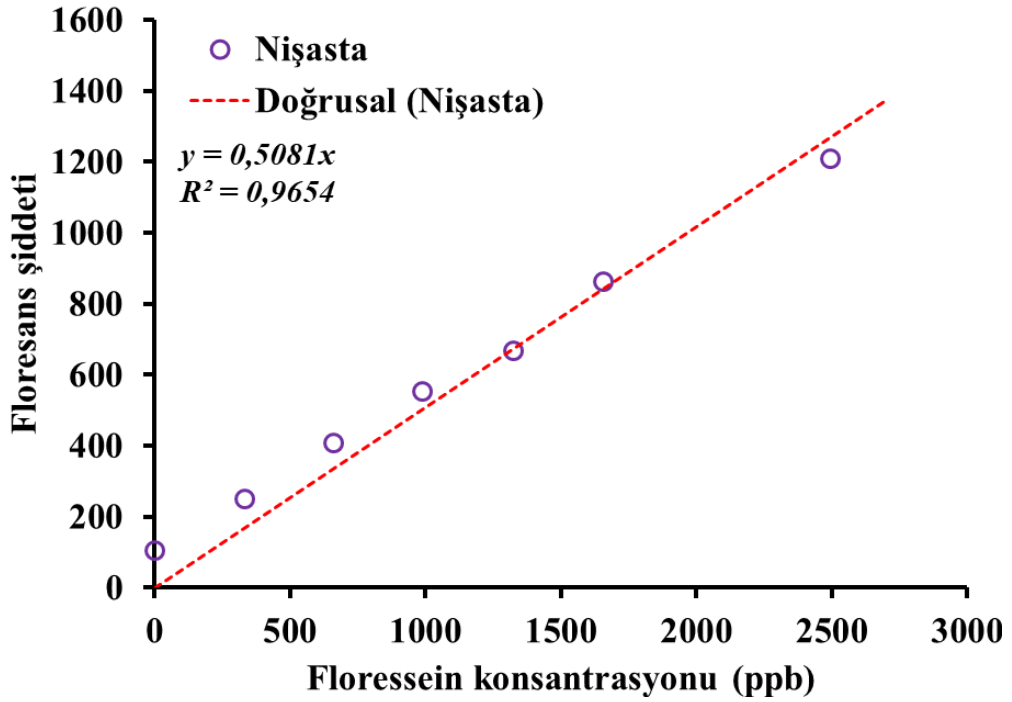


Şekil 4.1. Nişasta ile toz örnekleme yapılarak rodamin b için elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkisi

Nişastanın seyreltici ortam olarak kullanıldığı deneyler, ikinci model bileşik olan floressein ile de yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.2’de verilmiş olup, rodamin b’den farklı olarak floressein kullanıldığı zaman lineer aralık daha dar gözlenmiştir. Bu nedenle LOQ ve hassasiyet hesaplamalarında lineer aralıkta çizilen kalibrasyon grafiği kullanılmıştır (Şekil 4.3). Kalibrasyon grafiği incelendiğinde, sinyal-konsantrasyon ilişkisi için lineer karakterin rodaminde daha belirgin olduğu söylenebilir. LOQ değeri 330 ppb, hassasiyet ise 0,5 sinyal/ppb olarak hesaplanmıştır.



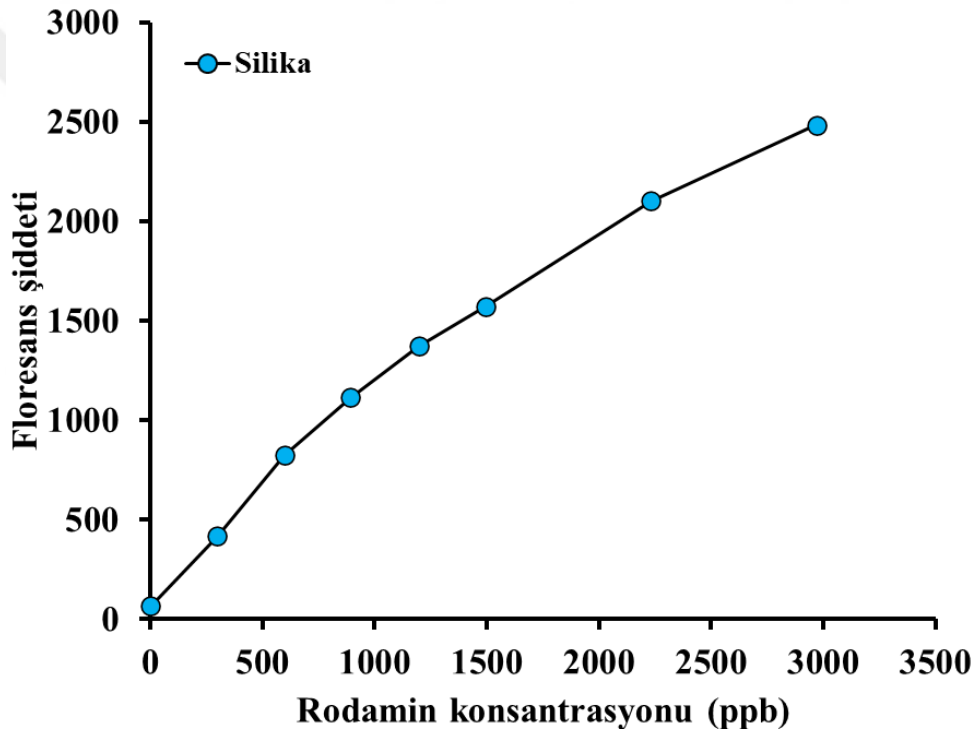
Şekil 4.2. Nişasta ile toz örnekleme yapılarak floressein için elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkisi



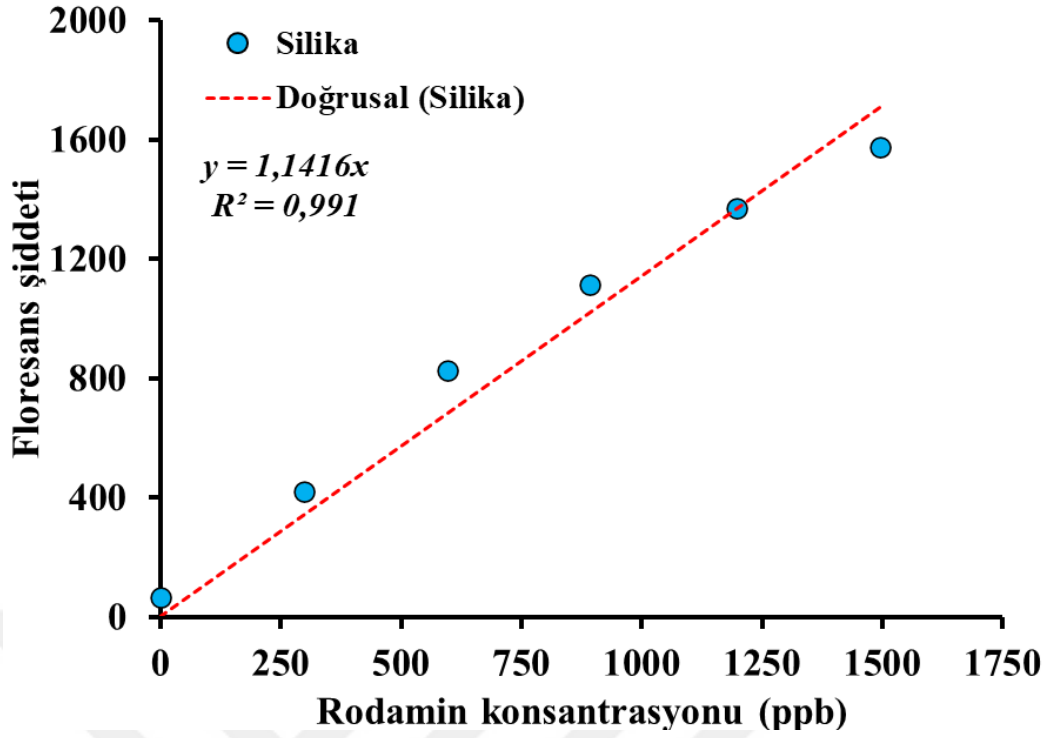
Şekil 4.3. Nişasta ile toz örnekleme yapılarak floressein için elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkisinin lineer aralıktaki gösterimi

4.2.2 Silika kullanılarak elde edilen sonuçlar

Silika kullanılarak yürütülen deneylerden elde edilen sonuçlar Şekil 4.4'te verilmiştir. Verilerden, geniş bir aralıkta sinyal-konsantrasyon ilişkisinin doğrusallığa çok yakın olduğu söylenebilir. Diğer taraftan, LOQ ve hassasiyet hesaplamalarında dar konsantrasyon aralığı kullanılmıştır. Bu aralığa karşılık gelen sinyal-konsantrasyon ilişkisi Şekil 4.5'te verilmiştir. Silika kullanıldığı zaman LOQ değeri 100 ppb, hassasiyet ise 0,7 sinyal/ppb olarak hesaplanmıştır. Silika ile elde edilen LOQ değeri hem nişasta hem de sodyum klorür ile elde edilen 160 ve 120 ppb'lik değerlerden daha düşük çıkmıştır.

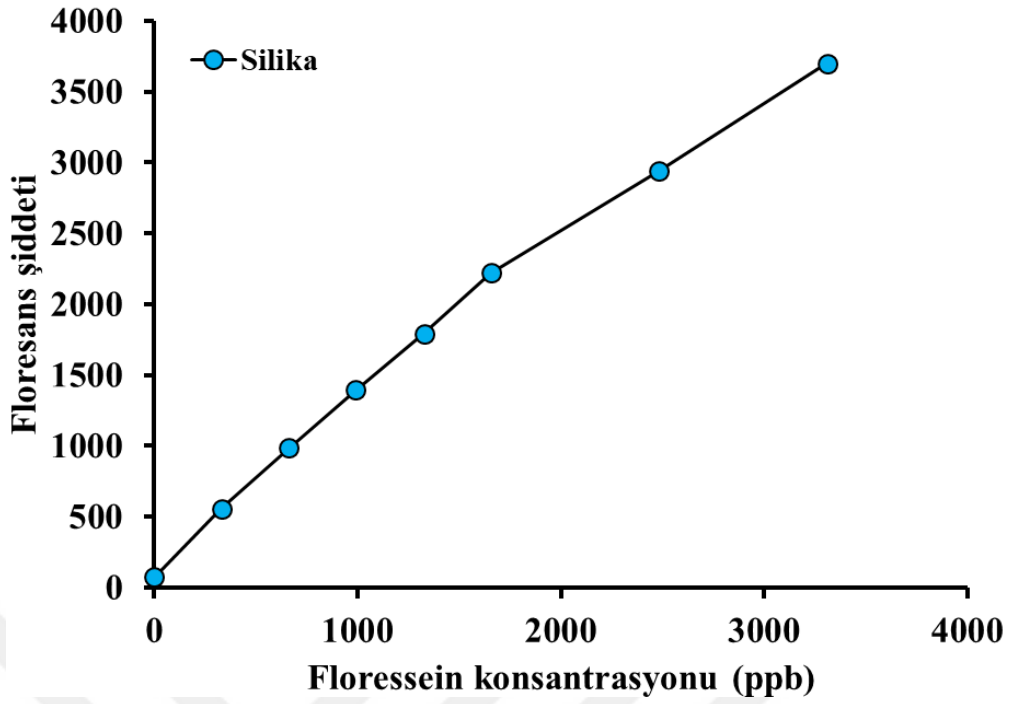


Şekil 4.4. Silika ile toz örnekleme yapılarak rodamin b için elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkisi

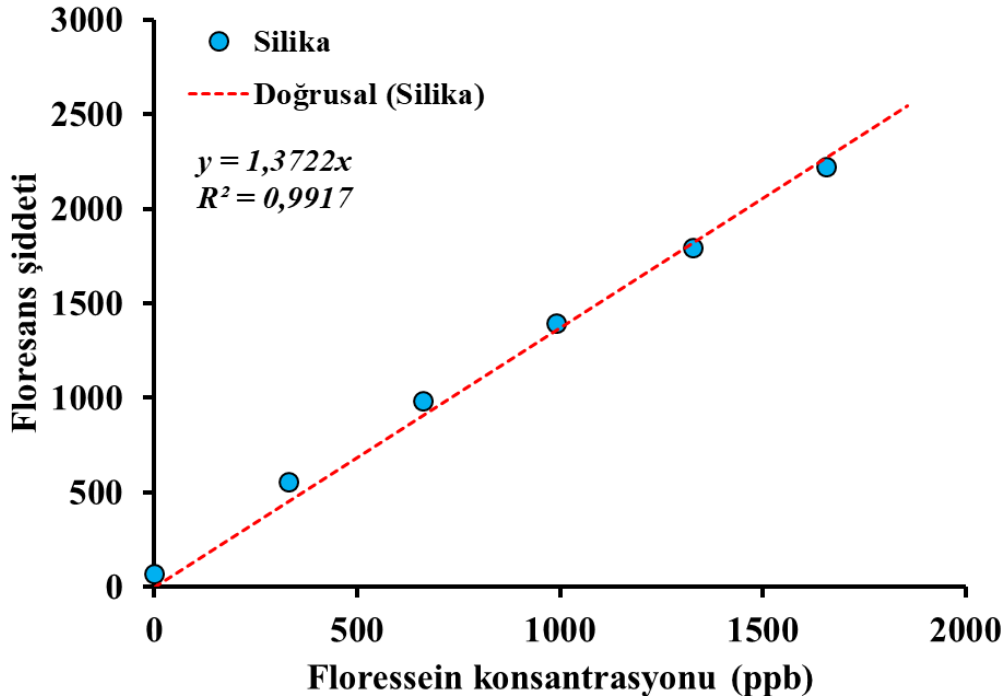


Şekil 4.5. Silika ile toz örnekleme yapılarak rodamin b için elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkisinin lineer aralıktaki gösterimi

Model bileşik olarak floressein kullanıldığı zaman geniş bir konsantrasyon aralığında sinyal-konsantrasyon ilişkisinin lineer karaktere yakın olduğu görülmüştür (Şekil 4.6). Aynı durumun rodamin için de gözlenmiş olması (Şekil 4.4), katı seyreltici olarak silikanın, analiz edilen model bileşiğin türünden bağımsız olarak daha tutarlı bir davranış sergilediğini düşündürmüştür. Lineer karakterin daha yüksek olduğu dar konsantrasyon aralığında sinyal-konsantrasyon ilişkisinin yüksek düzeyde doğrusallık sergilediği lineer regresyon analizi ile gösterilmiştir ($R^2=0,9917$; Şekil 4.7). Silika kullanıldığı zaman LOQ ve hassasiyet değerlerinin 240 ppb ve 1,4 sinyal/ppb olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu verilerden yola çıkarak, silikanın nişastadan daha düşük bir tayin sınırı elde edilmesini sağladığı ve aynı zamanda nişastanın kullanıldığı duruma göre daha hassas ölçümlerin yapılabildiği söylenebilir.



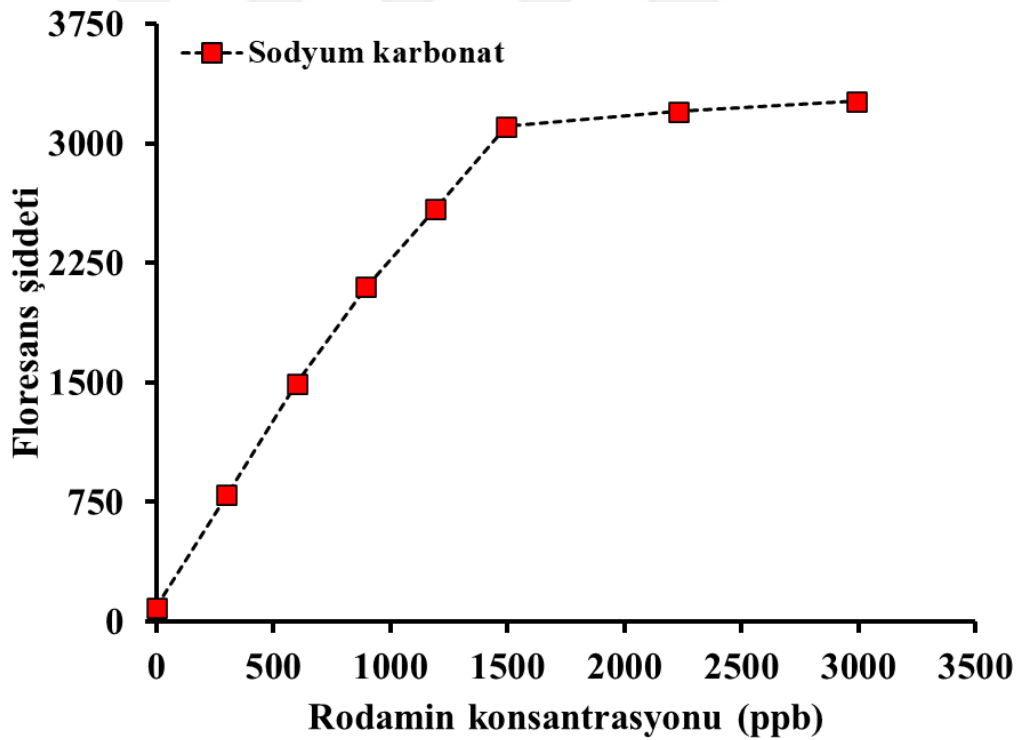
Şekil 4.6. Silika ile toz örnekleme yapılarak floressein için elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkisi



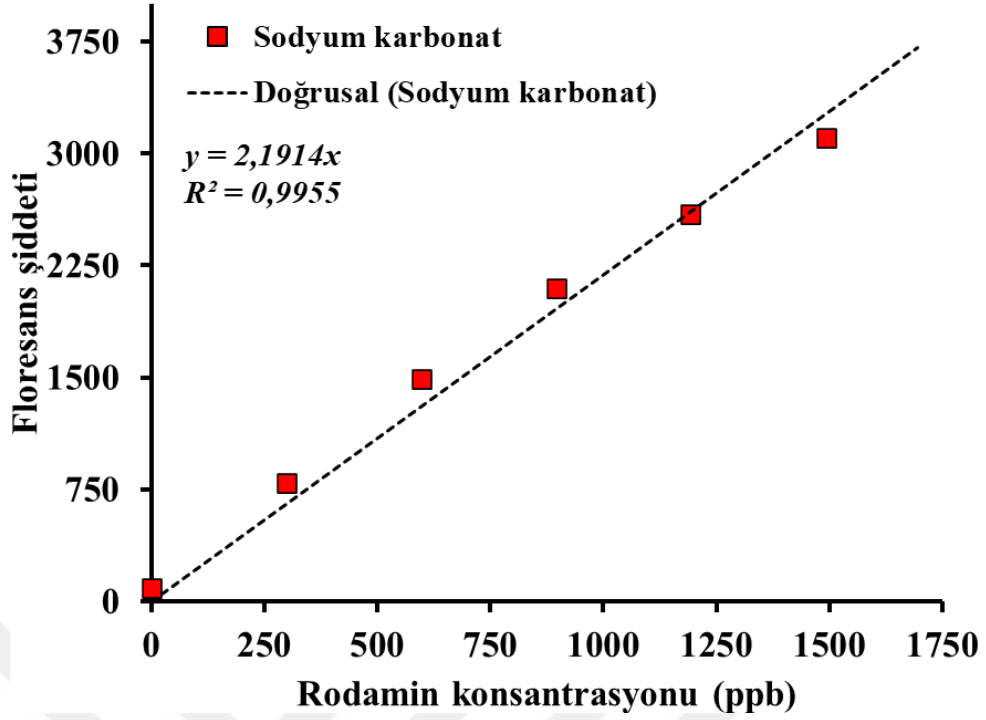
Şekil 4.7. Silika ile toz örnekleme yapılarak floressein için elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkisinin lineer aralıktaki gösterimi

4.2.3 Sodyum karbonat kullanılarak elde edilen sonuçlar

Rodamin b'nin SPFS ile tayininde seyreltici ortam olarak sodyum karbonatın kullanıldığı analizlerden elde edilen deneysel veriler Şekil 4.8'de grafik olarak verildi. Sodyum klorürde gözlenen sinyal-konsantrasyon ilişkisine benzer bir davranış (Şekil 4.12) sodyum karbonat kullanıldığında da gözlemlendi (Şekil 4.8). Yani, 1.500 ppb'den daha yüksek rodamin konsantrasyonlarında sinyal-konsantrasyon ilişkisinde lineerlikten önemli düzeyde sapmaların meydana geldiği görüldü. Diğer taraftan, daha seyreltik konsantrasyonlarda sinyal-konsantrasyon ilişkisinin lineer olduğu anlaşıldı (Şekil 4.9). Çalışılan katı seyrelticiler arasından en düşük LOQ değeri (60 ppb) ve en yüksek hassasiyet (2,2 sinyal/ppb) sodyum karbonat ile elde edildi. Bu durum, SPFS'de seyreltici ortam olarak sodyum karbonatı (çalışılan diğer katılara kıyasla) daha iyi bir seçeneklerden biri haline getirdi.

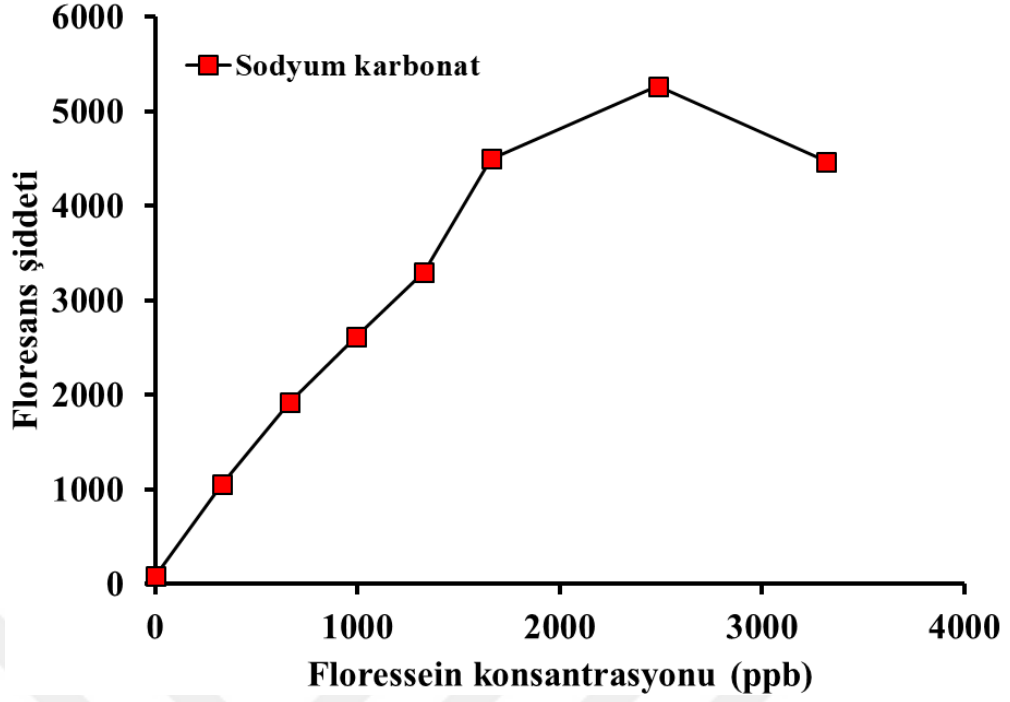


Şekil 4.8. Sodyum karbonat ile toz örnekleme yapılarak rodamin b için elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkisi

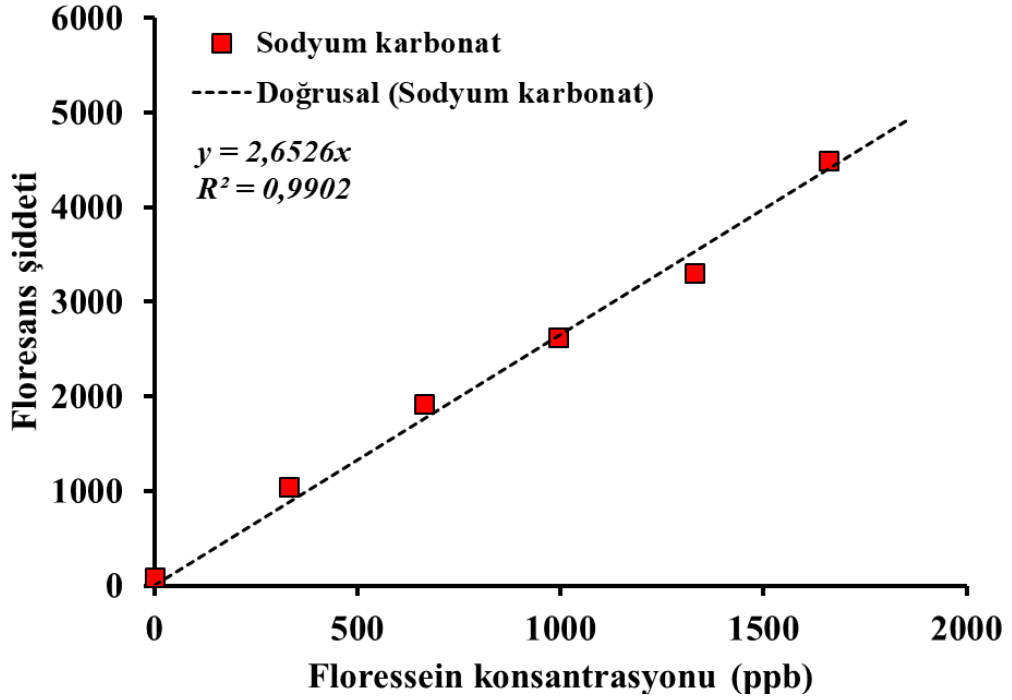


Şekil 4.9. Sodyum karbonat ile toz örnekleme yapılarak rodamin b için elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkisinin lineer aralıktaki gösterimi

Analiz edilen model bileşik değiştirildiğinde sodyum karbonatın da silikaya benzer bir davranış sergilediği görüldü. Yani rodamin veya floresseinin analiz edilmesinden bağımsız olarak lineerlikten sapma davranışının hemen hemen benzer olduğu anlaşıldı (Şekil 4.8 ve Şekil 4.10). Lineer aralıkta yürütülen regresyon analizinden, sinyal-konsantrasyon ilişkisinin lineer karakterinin yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 4.11). LOQ ve hassasiyet değerleri de sırasıyla 110 ppb ve 2,6 sinyal/ppb olarak hesaplandı.



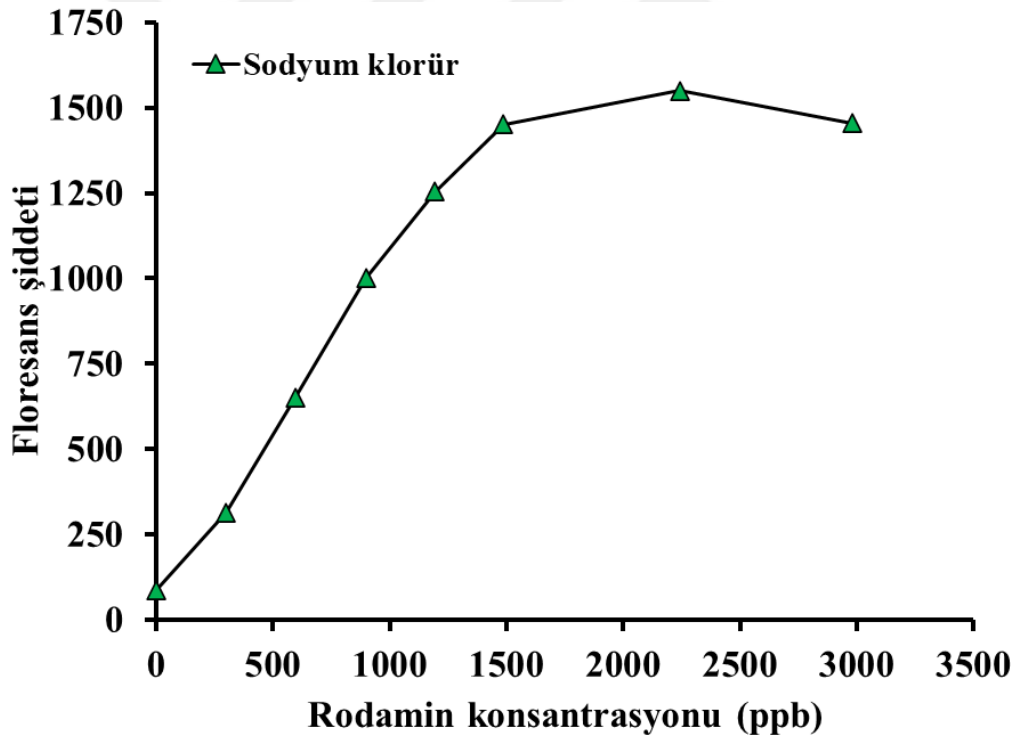
Şekil 4.10. Sodyum karbonat ile toz örnekleme yapılarak floressein için elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkisi



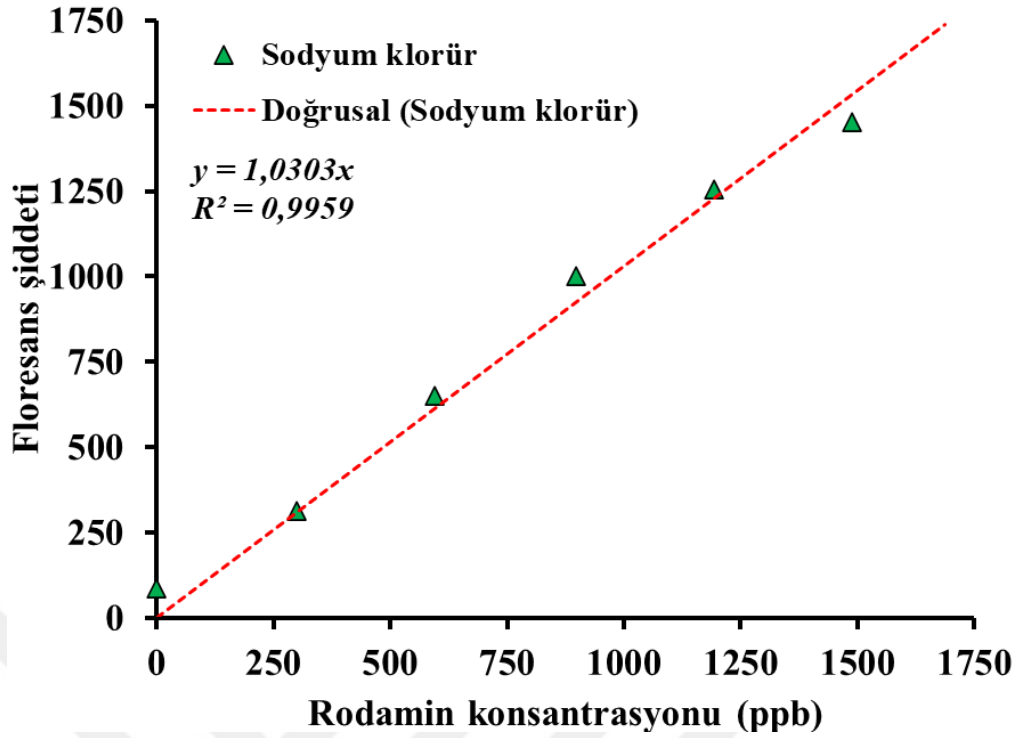
Şekil 4.11. Sodyum karbonat ile toz örnekleme yapılarak floressein için elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkisinin lineer aralıktaki gösterimi

4.2.4 Sodyum klorür kullanılarak elde edilen sonuçlar

Sodyum klorür kullanılarak toz örnekleme yöntemi ile elde edilen verilerden türetilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.12’de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, yaklaşık olarak 1.500 ppb’nin üzerindeki konsantrasyonlarda sinyal ile konsantrasyon arasındaki lineer ilişki bozulmaktadır. Diğer taraftan, 1.500 ppb’ye kadarki aralıkta sinyal ile konsantrasyon arasında çok iyi bir doğrusal ilişki elde edildi (Şekil 4.13). Şekil 4.13’ten, ölçüm hassasiyeti 1,0 sinyal/ppb olarak hesaplanmış olup, bu değer nişastanın kullanıldığı durumda hesaplanan 0,6 sinyal/ppb değerinden daha yüksektir. Yani, sodyum klorür ile daha hassas ölçüm yapılabildiği anlaşıldı. Yine Şekil 4.13’ten hesaplanan 120 ppb’lik LOQ değeri nişastanın kullanıldığı durumda hesaplanan 160 ppb’lik değerden daha düşük bulundu. Bu nedenle çalışma aralığı hariç, sodyum klorürün nişastaya göre daha avantajlı olduğu görüldü.



Şekil 4.12. Sodyum klorür ile toz örnekleme yapılarak rodamin b için elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkisi



Şekil 4.13. Sodyum klorür ile toz örnekleme yapılarak rodamin b için elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkisinin lineer aralıktaki gösterimi

Rodamin ile elde edilen sonuçlardan yola çıkarak, SPFS’de seyreltici ortam olarak çalışılan katılar için LOQ ve hassasiyet temelinde yapılan değerlendirmelerden bu katıların performansların aşağıdaki sıraya göre azaldığı sonucuna varılmıştır:

Sodyum karbonat > Silika > Sodyum klorür > Nişasta

Şunu da belirtmek gerekir ki, floresseın analizinde katı seyreltici olarak sodyum klorür kullanıldığı zaman faydalı sonuçlar alınamamıştır. Bu nedenle, floresseın için sodyum klorür kullanılarak elde edilen veriler tartışmaya dâhil edilmemiştir. Yani hem rodamin hem de floresseın kullanıldığı durumda LOQ değerlerinin sodyum karbonat, silika ve nişasta sırasında arttığı; hassasiyetin ise aynı sırada azaldığı görülmüştür. Floresseın için LOQ ve hassasiyet temelinde yapılan değerlendirmelerden, çalışılan katıların performanslarının aşağıdaki sırada azaldığı görülmüştür:

Sodyum karbonat > Silika > Nişasta

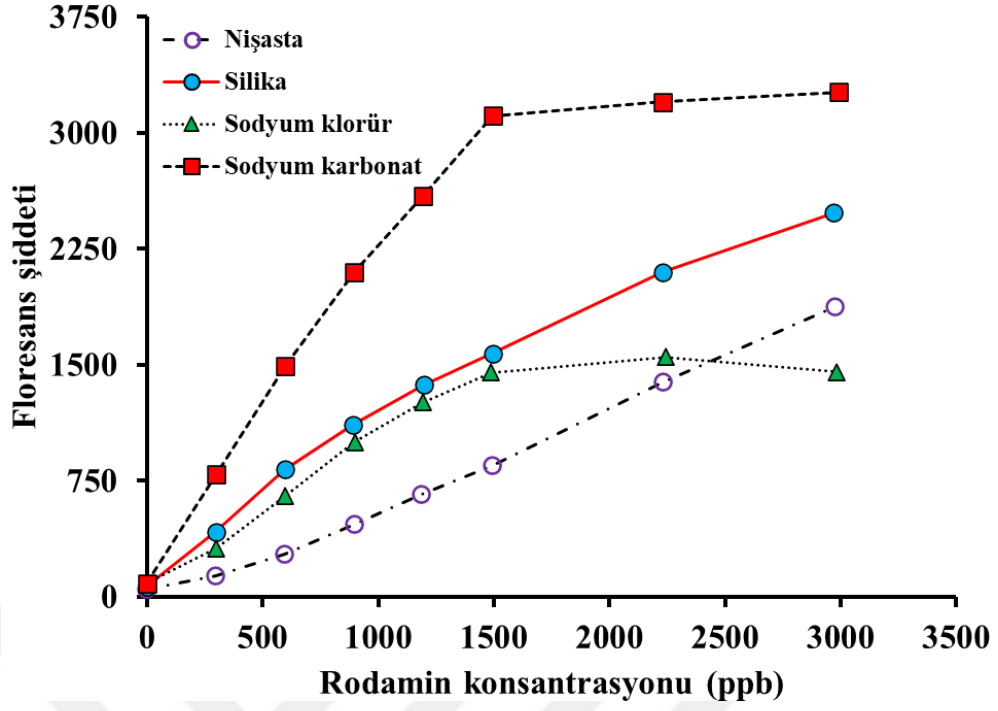
Rodamin b ve floressein için çalışılan katılarla elde edilen sayısal değerler Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2’de listelenmiştir. Ayrıca, çalışılan katılarla elde edilen grafikler Şekil 4.14 ve Şekil 4.15’te toplu halde verilmiştir.

Çizelge 4.1. Rodamin için bazı performans parametreleri

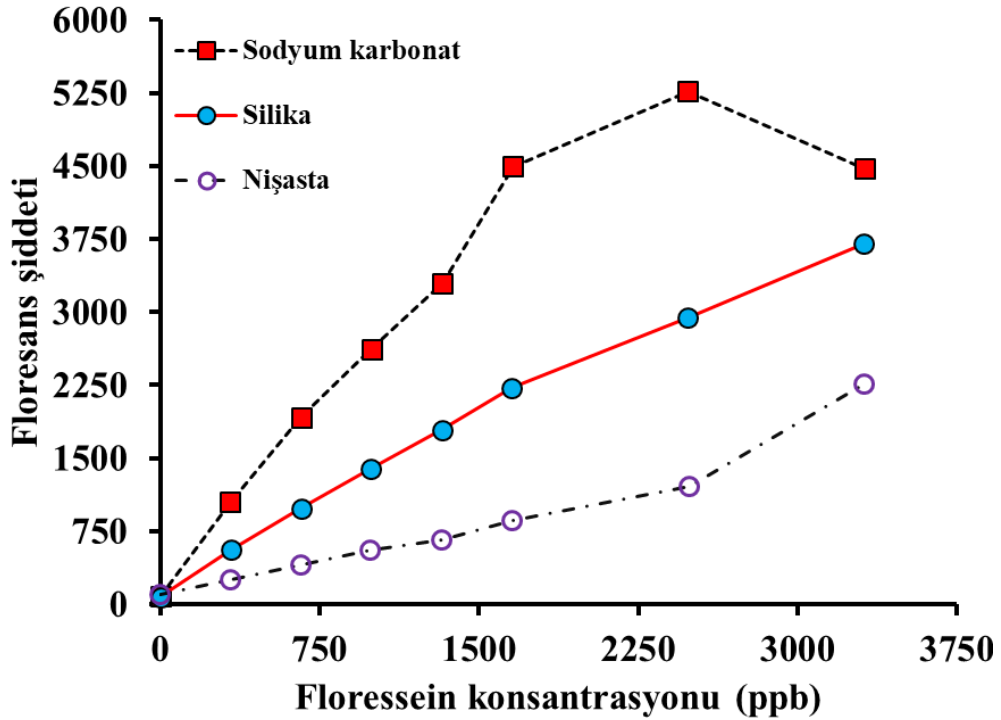
	LOQ (ppb)	Hassasiyet (sinyal/ppb)	R²
Sodyum karbonat	$0,6 \times 10^2$	2,2	0,9955
Silika	$1,0 \times 10^2$	1,1	0,9910
Sodyum klorür	$1,2 \times 10^2$	1,0	0,9959
Nişasta	$1,6 \times 10^2$	0,6	0,9958

Çizelge 4.2. Floressein için bazı performans parametreleri

	LOQ (ppb)	Hassasiyet (sinyal/ppb)	R²
Sodyum karbonat	$1,1 \times 10^2$	2,6	0,9902
Silika	$2,4 \times 10^2$	1,4	0,9917
Nişasta	$3,3 \times 10^2$	0,5	0,9654



Şekil 4.14. Rodamin için bazı katı seyrelticiler kullanılarak elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkilerinin toplu halde gösterimi



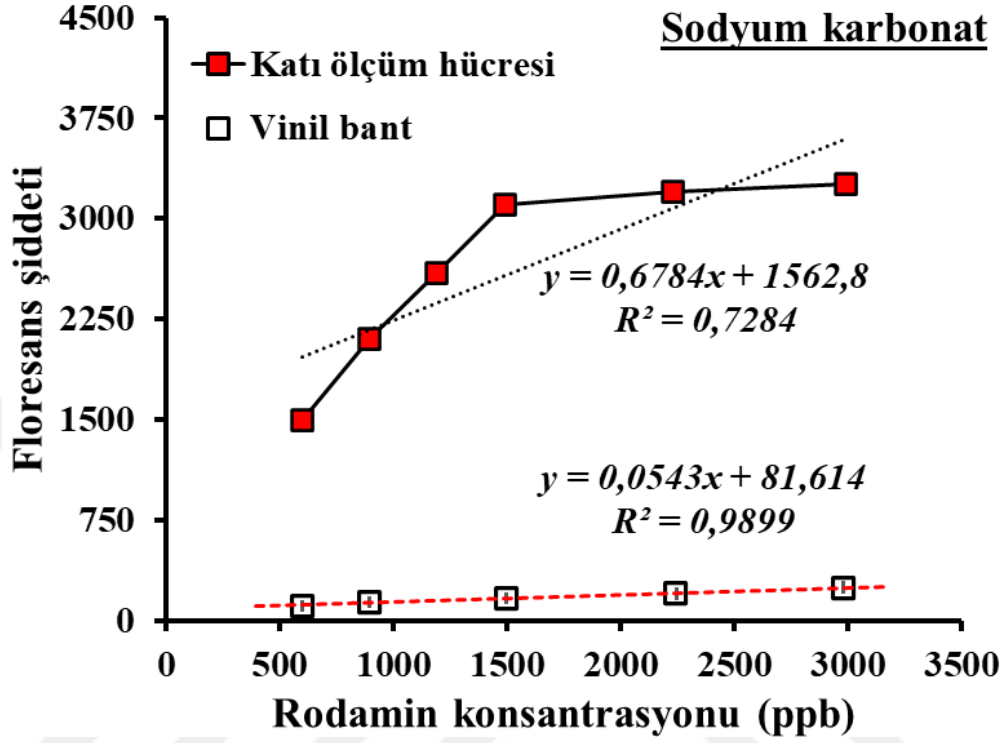
Şekil 4.15. Floressein için bazı katı seyrelticiler kullanılarak elde edilen sinyal-konsantrasyon ilişkilerinin toplu halde gösterimi

4.2. SPFS'de Örnekleme Yönteminin Etkisi

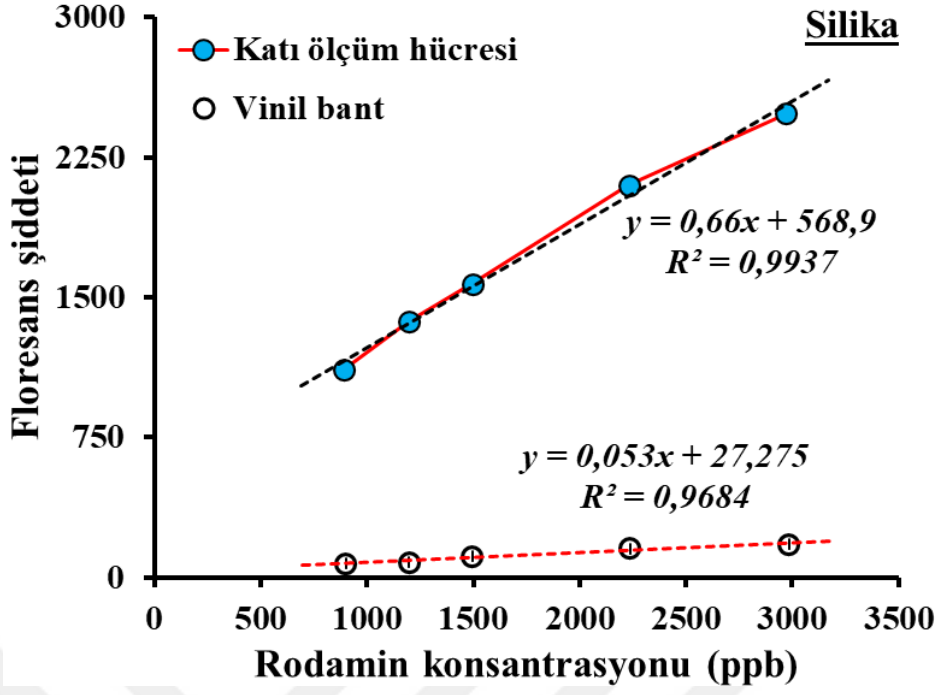
Deneysel çalışmalarda iki farklı örnekleme yönteminin etkisi incelenmiştir. Toz numune ölçüm hücresi kullanılarak gerçekleştirilen birinci yöntemde numune, ölçüm hücresine toz halde konulup doğrudan ölçüm alınmıştır. Bu metot basit olmakla beraber, fazla miktarda numune gerektirmesi bakımından dezavantajlıdır. Çünkü toz numune ölçüm hücresi ile ölçüm alabilmek için hücrenin içerisinde tamamen doldurulmuş olması gerekmektedir. Aksi durumda, katı partiküllerin başta yerçekimi olmak üzere bazı etkilerle hareket etmesi sonucu ölçümün hem tekrarlanabilirliği hem de doğruluğu önemli düzeyde etkilenebilmektedir. Bu nedenle alternatif bir metot olarak yapışkan vinil bandının üzerine toz numunenin alındığı ve bu şekilde ölçümün gerçekleştirildiği ikinci bir yöntem de çalışılmıştır. Bu yöntemde, ölçüm için gerekli olan numune miktarı önemli oranda düşürülebilmektedir. Vinil bant yönteminde gerekli olan numune miktarının, katı ölçüm hücresine dayanan yöntemle göre en az 10-100 kat daha az olduğu görülmüştür.

Yukarıda belirtilen iki metodun performansını karşılaştırmak için hem rodamin b hem de floressein ile en iyi sonuçları veren katı seyrelticilerle (sodyum karbonat ve silika) bazı deneyler yürütülmüştür. Sodyum karbonat ile hazırlanan rodamin örneklerinin vinil bant yöntemi ile analizinden elde edilen sonuçlar Şekil 4.16'da verilmiştir. Şekilden de anlaşılacağı üzere, aynı rodamin konsantrasyonlarında, katı numune ölçüm hücresi ile elde edilen sinyallerin şiddeti vinil bant metodu ile elde edilenlere göre çok daha yüksektir. Bu nedenle, katı ölçüm hücresi yöntemiyle daha düşük rodamin konsantrasyonlarının ölçülebileceği sonucuna varılmıştır. Vinil bant yöntemi ile elde edilen sinyallerin çok zayıf olması nedeniyle bu yöntem için ayrıca bir deteksiyon limiti çalışması yürütülmemiştir. Ayrıca, her iki metodun lineer aralığı dikkate alındığında, birinci metodun ikinci metoda göre yaklaşık 40 kat daha fazla hassasiyet sergilediği görülebilir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.16). Benzer sonuçlar silika kullanılarak yürütülen deneylerden de elde edilmiştir (Şekil 4.17). Silika kullanıldığı zaman katı numune ölçüm hücresinin kullanımına dayanan metodun vinil bant metoduna göre yaklaşık olarak 20 kat daha fazla hassasiyet elde edilmesine olanak tanıdığı görülmüştür (Şekil 4.5 ve Şekil 4.17). Bu nedenle, birinci metodun vinil bant metoduna göre çok daha yüksek performans sergilediği görülmüştür. Vinil bant metodu ile elde edilen en ilginç sonuç ise hem sodyum karbonat hem de silika kullanıldığı zaman rodamin için elde

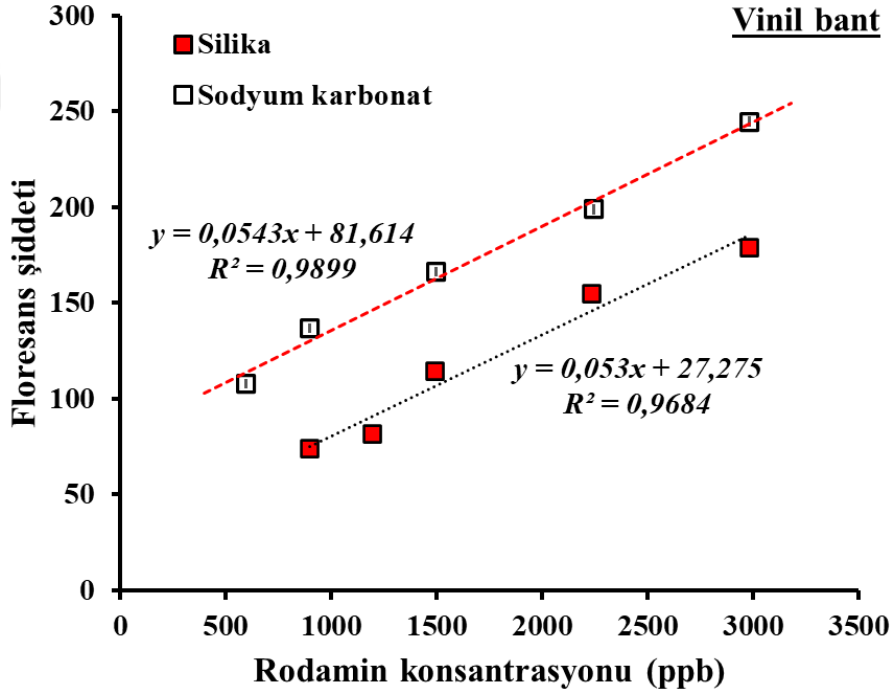
edilen kalibrasyon grafiklerinin her ikisinin de hemen hemen aynı eğimi sergilemeleri olmuştur (Şekil 4.18). Fakat, floresse için aynı sonucun elde edilmediği görülmüştür (Şekil 4.21).



Şekil 4.16. Rodamin için sodyum karbonat kullanılarak iki farklı örnekleme yöntemi ile elde edilen veriler



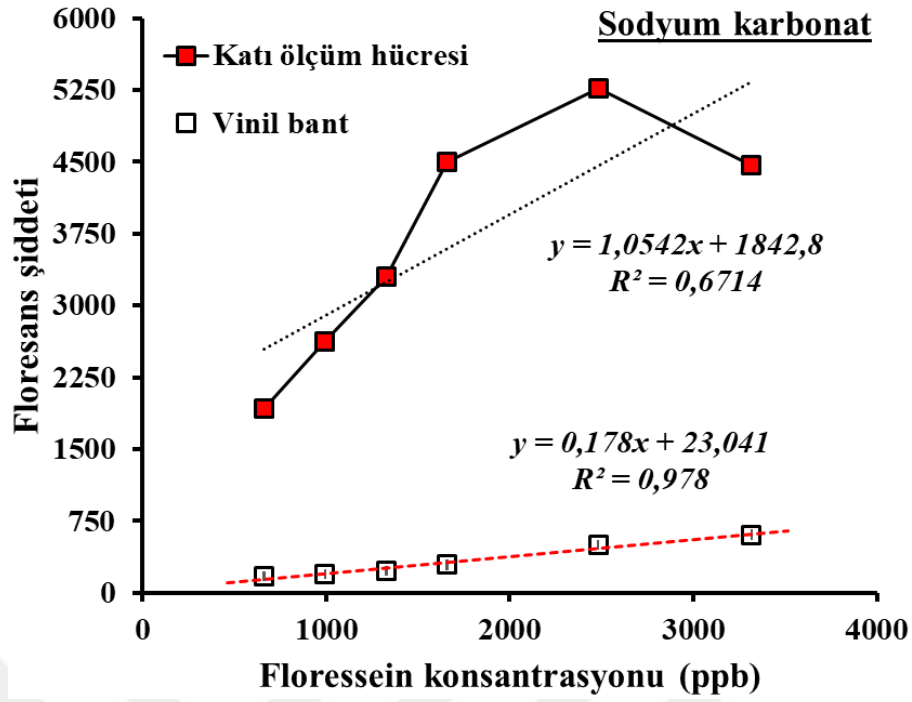
Şekil 4.17. Rodamin için silika kullanılarak iki farklı örnekleme yöntemi ile elde edilen veriler



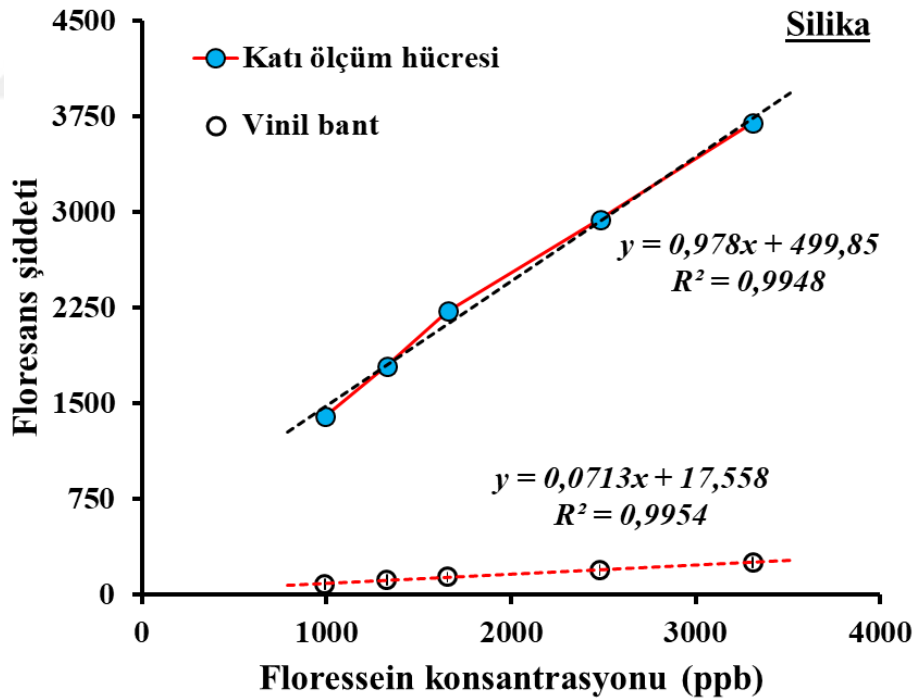
Şekil 4.18. Rodamin için vinil bant yöntemi ile iki farklı katı seyreltici kullanılarak elde edilen veriler

Floressein için her iki metotla yürütülen analizlerden elde edilen sonuçların rodamin için elde edilenlere çok benzediği görülmüştür. En belirgin benzerlik, vinil bant

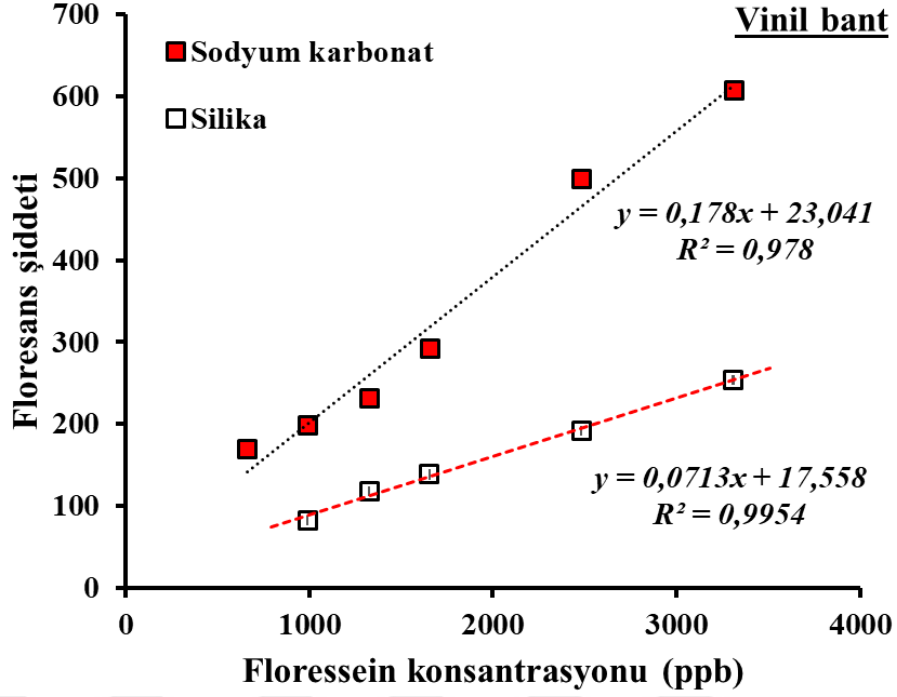
metoduna kıyasla, katı ölçüm hücresi metodu ile elde edilen daha yüksek şiddetteki floresans sinyalleri olmuştur (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20). Bu durum, katı seyrelticinin türünden bağımsız olarak gözlemlenmiştir. Sodyum karbonat kullanıldığında, birinci metodun vinil bant metoduna göre floressein için yaklaşık 15 kat daha hassas sinyaller sağladığı görülmüştür. Silika kullanıldığı durumda ise bu oranın yaklaşık olarak 20 kat düzeyinde olduğu tespit edilmiştir. Yani, katı ölçüm hücresi metodu üstünlüğünü floressein ile de doğrulamıştır. Vinil bant metodunda, sodyum karbonat ile elde edilen ölçüm hassasiyetinin silika ile elde edilene göre yaklaşık 2,5 kat daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.21). Katı ölçüm hücresi metodu kullanıldığında ise bu oran yaklaşık 2 kat düzeyinde çıkmıştır. Dolayısıyla bu iki katı seyreltici kullanılarak floressein için iki farklı metotla elde edilen hassasiyetlerin oranı neredeyse aynı çıkmıştır. Bu nedenle, izlenen metottan bağımsız olarak, floressein için sodyum karbonat ile daha iyi sonuçlar elde edildiği sonucuna varılmıştır. Diğer taraftan rodamin için katı ölçüm hücresi kullanılırken sodyum karbonat daha avantajlı iken (Şekil 4.5 ve Şekil 4.9), vinil bant metodunda sodyum karbonat ile silika arasında çok belirgin bir performans farklılaşması gözlemlenmemiştir (sodyum karbonat kullanıldığında sinyal şiddeti bir miktar yüksek çıkmıştır) (Şekil 4.18). Bu nedenle, analiz edilen türe bağlı olarak vinil bant metodunun farklı sonuçlar verebildiği; diğer taraftan, katı ölçüm hücresi metodunun daha az değişken bir özellik sergilediği sonucuna varılmıştır. Örneğin, rodamin için katı ölçüm hücresi ile sodyum karbonat ve silika kullanılarak elde edilen hassasiyet düzeyleri arasındaki fark 2 civarında çıkmış olup, bu oran floressein için yukarıda verdiğimiz oranın birebir aynısıdır.



Şekil 4.19. Floresseın için sodyum karbonat kullanılarak iki farklı örnekleme yöntemi ile elde edilen veriler



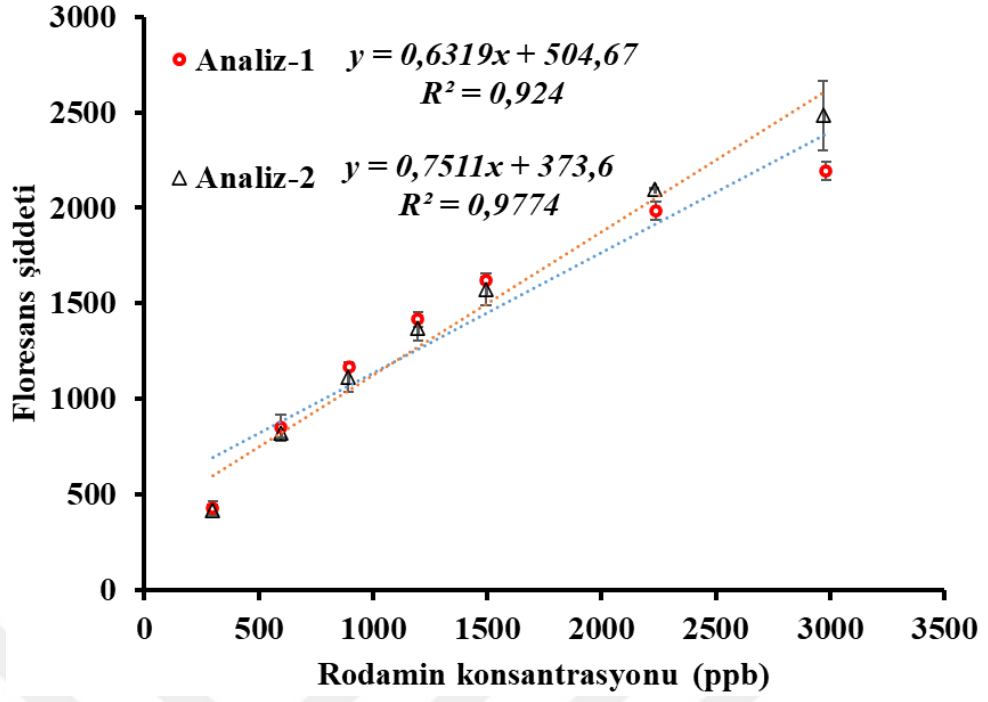
Şekil 4.20. Floresseın için silika kullanılarak iki farklı örnekleme yöntemi ile elde edilen veriler



Şekil 4.21. Floresseın için vinil bant yöntemi ile iki farklı katı seyreltici kullanılarak elde edilen veriler

4.3. Ölçümlerin Tekrarlanabilirliği

Analitik sinyallerin tekrarlanabilirliğini değerlendirmek için katı seyreltici olarak orta düzeyde performans sergileyen silika kullanılarak farklı günlerde iki farklı tekrar analizi yürütülmüştür. Tekrar analizlerinde katı numuneler her defasında taze hazırlanmıştır. Aynı şartlarda elde edilen veriler Şekil 4.22’de verilmiştir. Grafikten de görüleceği üzere, floresans spektroskopisi gibi sıcaklık ve girişimlere karşı son derece hassas olan bir teknikte elde edilmelerine rağmen sinyallerin yüksek tekrarlanabilirlikle elde edilebildiği görülmüştür. Bu durum SPFS tekniğinin kantitatif analizlerde kullanılabilme noktasında potansiyele sahip olduğunun bir başka göstergesidir.



Şekil 4.22. Silika kullanılarak katı numune hücresi ölçüm yöntemi ile yürütülen günler-
arası tekrar analizlerinden elde edilen sonuçlar

BÖLÜM V

SONUÇLAR

- ❖ SPFS tekniğinde katı seyreltici olarak kullanılabilen dört farklı katının (sodyum karbonat, silika, sodyum klorür ve nişasta) performans özellikleri incelenmiştir.
- ❖ Floresans analizlerinde iki farklı örnekleme yöntemi kullanılmıştır: (a) katı numune ölçüm hücresi yöntemi ve (b) vinil bant yöntemi.
- ❖ Çalışılan katılar ve uygulanan yöntemler iki farklı model bileşik (Rodamin b ve Floressein) üzerinde denenmiştir.
- ❖ Aynı uyarma ve emisyon dalga boylarında ve aynı enstrümantal parametrelerde elde edilen sinyallerden LOQ ve hassasiyet hesaplamaları yapılmıştır.
- ❖ Yapılan değerlendirmeler neticesinde, en iyi ölçüm performansının sodyum karbonat katısı ve katı numune ölçüm hücresi ile elde edildiği görülmüştür.
- ❖ Sodyum karbonat kullanıldığında 60 ppb (Rodamin b) ve 110 ppb (Floressein); silika kullanıldığında ise 100 ppb (Rodamin b) ve 240 ppb'lik (Floressein) LOQ değerlerinin elde edildiği görülmüştür. Bunlar, çalışılan şartlarda gözlenen en düşük LOQ değerleri olmuştur.
- ❖ Yüksek LOQ ve düşük hassasiyetine rağmen vinil bant metodunun geniş bir aralıkta lineer sinyal-konsantrasyon ilişkisi sunabildiği, az numune gerektirdiği, daha pratik olduğu ve bu nedenle görece yüksek konsantrasyona sahip numunelerin kantitatif analizinde kullanılabilmesi değerlendirilmiştir.
- ❖ En iyi performans değerlerini sunan katı numune ölçüm hücresi metodunun fazla miktarda numune gerektirmesi bu yöntemde karşılaşılan en önemli dezavantaj olarak değerlendirilmiştir.

- ❖ Genel olarak; SPFS tekniğinin uygun katı seyrelticiler kullanılarak hem kalitatif hem de kantitatif analizlerde kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu ve bu konu ile ilgili daha kapsamlı çalışmalara gereksinim olduğu sonucuna varılmıştır.
- ❖ Sunulan bu çalışmanın, konu ile ilgilenen başka araştırmacılar için de önemli bir kaynak teşkil edeceği düşünölmüştür.



KAYNAKLAR

Airado-Rodríguez, D., Durán-Merás, I., Galeano-Díaz, T. & Wold, J.P., “Front-face fluorescence spectroscopy: A new tool for control in the wine industry”, *Journal of Food Composition and Analysis* 24 (2), 257–264, 2011.

Alves, J.C.L. & Poppi, R.J., “Pharmaceutical analysis in solids using front face fluorescence spectroscopy and multivariate calibration with matrix correction by piecewise direct standardization”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 103 , 311–318, 2013.

Ammari, F., Bendoula, R., Jouan-Rimbaud Bouveresse, D., Rutledge, D.N. & Roger, J.-M., “3D front face solid-phase fluorescence spectroscopy combined with Independent Components Analysis to characterize organic matter in model soils”, *Talanta* 125 , 146–152, 2014.

Çapan, A., 3-hidroksiflavon türevlerinin sentezi ve mikroheterojenik sistemlerle etkileşimlerinin floresans spektroskopisi yöntemi ile incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, s. 1-51, 2008.

Cinislı, K.T. ve Özgül, M., “Enerji dağılım x-ray floresan spektroskopisi ile bitki besin elementi analizleri”, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi* 28 (2), 226–233, 2018.

Hitachi High-Technologies Corporation, "Introduction of the Solid Sample Holder (650-0161) for Hitachi Fluorescence Spectrophotometer", https://www.hitachi-hightech.com/file/global/products/science/appli/ana/fl/solid/fl_120005.pdf, 2013.

Hougaard, A.B., Lawaetz, A.J. & Ipsen, R. H., “Front face fluorescence spectroscopy and multi-way data analysis for characterization of milk pasteurized using instant infusion”, *LWT-Food Science and Technology* 53(1), 331-337, 2013.

Karoui, R., Dufour, E. & De Baerdemaeker, J., "Monitoring the molecular changes by front face fluorescence spectroscopy throughout ripening of a semi-hard cheese", *Food Chemistry* 104(1), 409-420, 2007.

Kaya, M., "Rodamin b ve merosiyanin 540 dye bileşiklerinin kil (Ünye bentonit) içeren süspansiyonlarda moleküler adsorpsiyonu, agregasyonu ve fotofiziği", Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, s. 1-277, 2014.

Khan, T., Bhagabani, K., Kumari, P. & Datta, A., "Accounting for secondary inner filter effect in fluorescence spectra from solid samples", *Current Science* 114 (11), 2353–2356, 2018.

Kulmyrzaev, A.A., Levieux, D. & Dufour, É., "Front-face fluorescence spectroscopy allows the characterization of mild heat treatments applied to milk. Relations with the denaturation of milk proteins", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(3), 502-507, 2005.

Mounier, S., Nicolodelli, G., Redon, R. & Milori, D.M.B.P., "Direct solid surface fluorescence spectroscopy of standard chemicals and humic acid in ternary system", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 177 , 79–85, 2017a.

Mounier, S., Redon, R., Nicolodelli, G. & Milori, D., "Front-face fluorescence spectroscopy of tryptophan and fluorescein using laser induced fluorescence and excitation emission matrix fluorescence", *RSC Advances* 7 (88), 56117–56122, 2017b.

Muller, M., Milori, D.M.B.P., Déléris, S., Steyer, J.-P. & Dudal, Y., "Solid-phase fluorescence spectroscopy to characterize organic wastes", *Waste Management* 31 (9–10), 1916–1923, 2011.

Nazli, M.E., Floresans ışık yayan rodamin türevi schiff bazı bileşiklerinin sentez ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, *Yozgat Bozok Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yozgat, s. 1-102, 2020.

Oğuzcan, E., Psiko-uyarıcı modafinil ile nükleik asitlerin etkileşim mekanizmasının floresans spektroskopisi ile incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Medeniyet Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü*, İstanbul, s. 1-60, 2020.

Öksüz, N., Furan türevi rodamin boyar maddelerin sentezi, çevre ve gıda örneklerindeki bazı ağır metallerin florimetrik yöntem ile tayini, Yüksek Lisans Tezi, *Bozok Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yozgat, s. 1-143, 2016.

Özbekova, C. & Kulmırzayev, A., “Et ürünlerinde yaygın kullanılan katkı maddesi soya ile et arasındaki bağıntının floresans spektroskopisiyle araştırılması”, *Manas Journal of Engineering* 3 (1), 1–10, 2015.

Özdamar, R., Kininil-B12 ve indol-3-asetil-B12 türevlerinin sentezi UV ve floresans özelliklerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, s. 1-70, 1988.

Özkan, Ş., Çeşitli hidrazon türevleri ile nükleik asitlerin bağlanma mekanizmalarının florimetrik yöntemle incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Tekirdağ, s. 1-46, 2016.

Özyol, E., Rodamin türevi boyar maddelerin sentezi, gıda ve çevre örneklerindeki bazı ağır metallerin florimetrik yöntemle tayini, Yüksek Lisans Tezi, *Bozok Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yozgat, s. 1-167, 2016.

Skoog, D.A., Holler, F.J. & Nieman, T.A., Principles of Instrumental Analysis, 5th ed., *Sounders College Publishing*, USA, 1998.

Toprak, M., Metanol ortamında kumarin35 ile pyronin bileşikleri arasındaki floresans enerji transferi, Yüksek Lisans Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, s. 1-52, 2006.

Yüksekoğul, M., Rodamin bazlı yeni Schiff bazı türevlerinin sentezi ve metal iyonlarına karşı florometrik ve kolorimetrik özelliklerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya, s. 1-60, 2017.

ÖZ GEÇMİŞ

Merve ÖZTÜRK, [] doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini [] tamamladı. [] yılında girdiği Niğde Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden [] yılında mezun oldu. [] eğitim-öğretim yılında Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.



