



T.C.

SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI TÜR DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜLERİN KEMOMETRİK
STRATEJİYLE GIDA ÜRÜNLERİNDE SÜLFADİAZİN
KALINTILARININ TAYİNİ İÇİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hatice TAŞPINAR

(20219209005)

Kimya Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nail ALTUNAY

SİVAS

HAZİRAN 2024

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



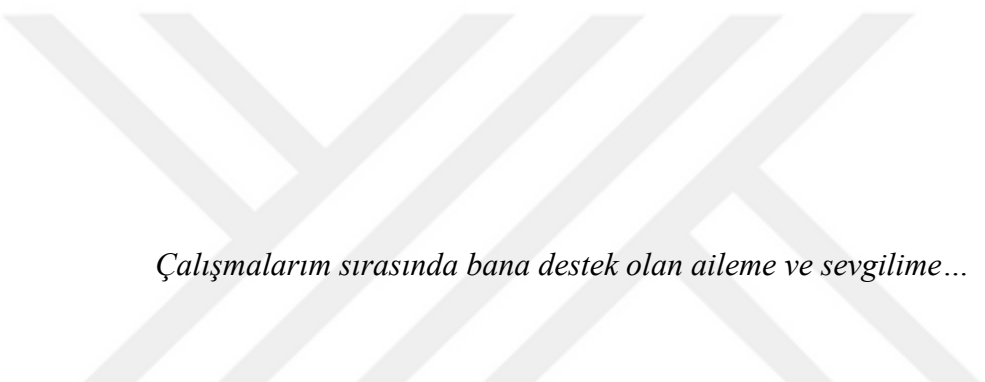
*Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından **F-2022-673** Nolu proje kapsamında desteklenmiştir.*



Bütün hakları saklıdır.

Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Hatice TAŞPINAR, 2024



Çalışmalarım sırasında bana destek olan aileme ve sevgilime...

ETİK

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

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

11.06.2024

Hatice TAŞPINAR

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini ve güler yüzlerini hiç esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden sürekli yararlandığım ve tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen başta sayın danışmanım Prof. Dr. Nail ALTUNAY olmak üzere, sayın hocam Prof. Dr. Adil ELİK'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Hayatım boyunca desteklerini üzerimden hiç esirgemeyen, bana hep güvenen, sonsuz sevgileriyle her zaman yanımda olan babam Yasin TAŞPINAR'a, canım annem Selma TAŞPINAR'a, varlıklarıyla beni her zaman mutlu eden kardeşlerim Samet TAŞPINAR ile Buğlem TAŞPINAR'a sonsuz şükranlarımı sunarım.

Son olarak, bana hep destek olup yanımda olan, tezimi yazarken fikir ve düşünceleriyle bana hep destek olan erkek arkadaşım Bünyamin DOĞAN'a ve sevgili arkadaşım Ayşenur ÖZTÜRK ALTUNAY'a teşekkür eder ve sonsuz şükranlarımı sunarım.

Bu Tez çalışmasına F-2022-673 kodlu ile maddi destek sağlayan Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

ÖZET

FARKLI TÜR DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜLERİN KEMOMETRİK STRATEJİYLE GIDA ÜRÜNLERİNDE SÜLFADIAZİN KALINTILARININ TAYİNİ İÇİN ARAŞTIRILMASI

Hatice TAŞPINAR

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nail ALTUNAY

2024, 60+xiii sayfa

Bu tez çalışmasında, gıda numunelerinde sülfadiazinin verimli ekstraksiyonu için düşük viskoziteli hidrofobik derin ötektik (DES) çözücülerin kullanım süreci açıklamaktadır. Analitik yöntem tayin basamağında, UV–VIS Spektrofotometrenin kullanıldığı yeni, basit ve yeşil sonikasyon destekli DES bazlı sıvı-sıvı mikroekstraksiyonunun (SA-DES-LLME) kullanılmasını içermektedir. Ön deneyler ışığında, SA-DES-LLME yönteminin önemli parametreleri (pH, DES hacmi, sonikasyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığı) merkezi kompozit tasarım kullanılarak optimize edildi. Seçicilik, geri kazanım, sağlamlık, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik gibi doğrulama parametreleri optimize edilmiş koşullar altında araştırıldı. Ek olarak, optimize edilmiş SA-DES-LLME yöntemi, sülfadiazin için iyi ekstraksiyon geri kazanımı (96 ± 3), düşük bağıl standart sapma ($1,9$), geniş doğrusal aralık ($2\text{--}250 \text{ ng mL}^{-1}$), düşük tespit limiti ($0,6 \text{ ng mL}^{-1}$) ve yüksek önderiştirme faktörü (200) sağladı. Son olarak, optimize edilmiş SA-DES-LLME yöntemi, gıda numunelerinde sülfadiazin tayini ve ekstraksiyonu için başarıyla uygulandı ve 89 ± 7 ile 98 ± 5 arasında kantitatif geri kazanımlar sağlandı.

Anahtar Kelimeler: Deney tasarımı, Sülfadiazin, Sonikasyon destekli mikroekstraksiyon, Derin ötektik çözücüler, Gıda numuneleri

ABSTRACT

INVESTIGATION OF DIFFERENT TYPES OF DEEP EUTECTIC SOLVENTS FOR THE DETERMINATION OF SULFADIAZINE RESIDUES IN FOOD PRODUCTS BY CHEMOMETRIC STRATEGY

Hatice TAŞPINAR

Master's Thesis

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Nail ALTUNAY

2024, 60+xiii pages

In the thesis study, describes the process of using low viscous hydrophobic deep eutectic (DES) solvents for efficient extraction of sulfadiazine in food samples. The analytical method involved the use of a combination of a novel, simple and green sonication-assisted DES-based liquid-liquid microextraction (SA-DES-LLME) with detection by UV–VIS spectrophotometer (UV–VIS). In the light of the preliminary experiments, the important parameters (pH, DES volume, sonication time and extraction temperature) of the SA-DES-LLME method were optimized using a central composite design. Validation parameters such as selectivity, recovery, robustness, repeatability and reproducibility were determined under optimized conditions. In addition, the optimized SA-DES-LLME provides good extraction recovery ($96 \pm 3\%$), low relative standard deviation (1.9%), wide linear concentration range ($2\text{--}250 \text{ ng mL}^{-1}$), low limit of detection (0.6 ng mL^{-1}), and high preconcentration factor (200) for sulfadiazine. Finally, the optimized SA-DES-LLME has been successfully applied for the determination and extraction of sulfadiazine in food samples, and quantitative recoveries were achieved between $89 \pm 7\%$ and $98 \pm 5\%$.

Keywords: Experimental design, Sulfadiazine, Sonication assisted microextraction, Deep eutectic solvents, Food samples

İÇİNDEKİLER

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR.....	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Sülfonamid	1
1.1.1 Sülfonamid türleri	3
1.2 Sülfadiazin.....	4
1.2.1 Sülfadiazin'in kullanım alanları	6
1.2.2 Sülfadiazin'in avantaj ve dezavantajları	6
1.2.3 Sülfadiazin'in çevreye etkisi.....	7
1.3 Ekstraksiyon	8
1.4 Mikroekstraksiyon.....	10
1.4.1 Mikroekstraksiyonun sınıflandırılması	11
1.5 Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon Yöntemleri	13
1.5.1 Sıvı-Sıvı mikroekstraksiyon yöntemlerinde kullanılan yeni nesil çözücüler	14
1.6 Derin Ötektik Çözücüler	15
1.6.1 Derin ötektik çözücü türleri	17
1.6.2 Derin ötektik çözücülerin özellikleri	19
1.7 Optimizasyonda Deneysel Tasarım.....	20
1.7.1 Merkezi kompozit tasarım	22
1.8 Analitik Parametreler	23
2. MATERYAL VE METOD	26
2.1 Cihazlar	26
2.2 Kimyasallar	26
2.3 Numune Toplama ve Hazırlama	26
2.4 Düşük Viskoziteli Hidrofobik DES'lerin Hazırlanması	27
2.5 SA-DES-LLME Prosedürü	28
2.6 Optimizasyon Stratejisi	29
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	31
3.1 Ön Çalışmalar.....	31
3.1.1 Uygun DES seçimi.....	31
3.1.2 DES'in molar oranının etkisi.....	32

3.1.3 Karıştırma türünün etkisi.....	33
3.1.4 KCI derişiminin etkisi	34
3.1.5 Numune hacminin etkisi.....	35
3.2 CCD ile Önemli Parametrelerin Optimizasyonu.....	35
3.2.1 ANOVA sonuçları.....	37
3.2.2 Yüzey yanıt grafikleri.....	39
3.2.3 Parametrelerin optimum değerleri	42
3.3 Analitik Performans	43
3.4 Seçicilik.....	44
3.5 Tekrarlanabilirlik ve Tekrar Üretilirlik	45
3.6 Sağlamlık.....	46
3.7 Gıda Numunelerinde Uygulama	46
3.8 Diğer Yaklaşımlarla Karşılaştırma.....	48
4. SONUÇ	50
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Sülfonamidlerin kimyasal yapısı.	2
Şekil 1.2 SDZ'nin moleküler yapısı	5
Şekil 1.3 ChCl ve üre ile gösterilen derin ötektik bir çözücünün oluşumunun şematik gösterimi.....	18
Şekil 1.4 DES oluşumunda yaygın olarak kullanılan bazı HBA ve HBD örnekleri	19
Şekil 2.1 SA-DES-LLME prosedürünün optimal koşulları altında gerçek bir numuneden ekstrakte edilen SDZ için farklı derişimlerde UV spektrumu.	28
Şekil 2.2 Yöntemin deneysel şeması.	29
Şekil 3.1 DES türünün SDZ geri kazanımına etkisi	31
Şekil 3.2 DES-3'ün molar oranının SDZ'in geri kazanımları üzerindeki etkisi.	32
Şekil 3.3 Karıştırma türü SDZ'in geri kazanımları üzerindeki etkisi.....	33
Şekil 3.4 KCl derişiminin SDZ geri kazanımları üzerindeki etkisi.....	34
Şekil 3.5 Numune hacminin SDZ geri kazanımları üzerindeki etkisi	35
Şekil 3.6 Deney sonuçları ile CCD'in tahmin edilen değerleri arasındaki uyum.....	39
Şekil 3.7(a-d) SDZ'nin geri kazanımına ikili etkileşimlerin, etkisini gösteren yüzey yanıt grafikleri: (a) DES-3 hacmi ve pH; (b) Sonikasyon süresi ve DES-3 hacmi; (c) Ekstraksiyon sıcaklığı ve DES-3 hacmi; (d) Ekstraksiyon sıcaklığı ve süresi.....	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Sistemik sülfonamidlerin eliminasyon yarı ömürlerine göre sınıflandırılmaları.....	4
Çizelge 1.2 Yaygın mikroekstraksiyon yöntemlerinin sınıflandırılması	12
Çizelge 1.3 DES'in sınıflandırması	17
Çizelge 1.4 CCD'in deney noktaları	22
Çizelge 2.1 Hazırlanan düşük viskoziteli hidrofobik DES'lerin bileşimi, kısaltması, molar oranı ve erime noktası	27
Çizelge 2.2 SA-DES-LLME prosedürü için CCD modellemesi	30
Çizelge 3.1 SDZ ekstraksiyonu için CCD tasarımı ve geri kazanım sonuçları	36
Çizelge 3.2 Mikroekstraksiyon adımının optimizasyonu için ikinci dereceden modelin ANOVA sonuçları	38
Çizelge 3.3 CCD'nin kalite parametrelerinin sonuçları.....	38
Çizelge 3.4 Optimize edilmiş SA-DES-LLME-UV/VIS yönteminin analitik performansı	43
Çizelge 3.5 Farklı türler varlığında 25 ng mL ⁻¹ SDZ'nin geri kazanımı, %BSS ve tolerans sınırı.....	44
Çizelge 3.6 Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmalarının sonuçları.....	45
Çizelge 3.7 Gıda numunelerine uygulanan optimize SA-DES-LLME ile analizi	47
Çizelge 3.8 Optimize edilmiş SA-DES-LLME yönteminin analitik parametrelerinin, SDZ tayini için bildirilen diğer yöntemlerle karşılaştırılması	49

KISALTMALAR DİZİNİ

AA	: Hava Destekli
BBD	: Box – Behnken Tasarım
BSS	: Bağlı Standart Sapma
CCD	: Merkezi Kompozit Tasarım
CE	: Kapiler Elektroforez
DES	: Derin Ötektik Çözücü
DLLME	: Dispersif Sıvı – Sıvı Mikroekstraksiyon
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EF	: Zenginleştirme Faktörü
GC	: Gaz Kromatografisi
HBA	: Hidrojen Bağlı Alıcısı
HBD	: Hidrojen Bağlı Vericisi
HF-LPME	: Oyuk Fiber Sıvı Faz Mikroekstraksiyon
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC-MS/MS	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi/ Kütle Spektrometrisi
IL	: İyonik Sıvı
KCI	: Potasyum Klorür
LLE	: Sıvı – Sıvı Ekstraksiyon
LLME	: Sıvı – Sıvı Mikroekstraksiyon
LOD	: Tespit Limiti
LOQ	: Tayin Limiti
LPME	: Sıvı – Faz Mikroekstraksiyon
MA	: Mikrodalga Destekli
N₄₄₄₄Br	: Tetrabütilamonyum Bromür
N₈₈₈₁CI	: Metiltrioktilamonyum Klorür
PABA	: Para – Amino Benzoik Asit
PF	: Önderiştirme faktörü
R²	: Regresyon Katsayısı
RNA	: Ribonükleik Asit
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
RSM	: Yüzey Yanıt Metodu
SA-DES-LLME	: Sonikasyon Destekli DES Bazlı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon
SDME	: Asılı Damla Mikroekstraksiyon
SDZ	: Sülfadiazin
SFODME	: Yüzen Katı Organik Damla Mikroekstraksiyon
SMT	: Sülfametazin
SMX	: Sülfametoksazol
SNA	: Sülfanilamid
SPE	: Katı – Faz Ekstraksiyon
SPME	: Katı – Faz Mikroekstraksiyon
SPY	: Sülfapiridin
STZ	: Sülfatiazol
UA	: Ultrasonik Destekli
UV-VIS	: Ultraviyole – Görünür Spektrofotometri
VA	: Vorteks Destekli
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

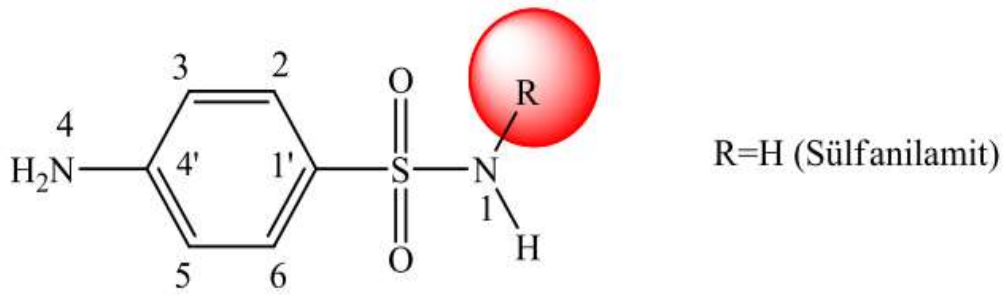
1. GİRİŞ

1.1 Sülfonamid

Sülfonamid, bakteriyel enfeksiyonların ve diğer mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde günümüzde hala kullanılan en eski ve önemli sentetik bakteriyostatik antibiyotik sınıfıdır [1, 2]. Antibakteriyel çağı başlatan sülfonamid bileşiği Prontosil, piyasada bulunan ilk antibakteriyel maddedir, ayrıca sülfonamidlerin antibakteriyel özelliği sebebiyle bilim insanlarınca binlerce türevi sentezlenmiştir. Yalnız yapılan çalışmalar neticesinde sülfonamidlerin bakteriyi öldürmediği, bunun yerine gelişmesini ve üremesini engellediği görülmüştür [3, 4]. Sülfonamidler patojen bakterilerin gelişme dönemlerinde çok daha etkili olup, üremesi engellenen bu bakteriler daha sonra vücuttaki savunma mekanizması tarafından yok edilirler [5]. Sülfonamidler, penisilinlerin tedavi amaçlı başlangıcına kadar bakteriyel enfeksiyonlarda düzenli kullanılabilen ilk kemoterapötik ilaçlardır [6].

Sülfonamidlerin fonksiyonel grupları, antibakteriyel ilaçların bildirilmesinden şu ana dek tıbbi kimyada önem kazanmıştır [3]. Yapılarında benzen halkası, amin grubu ve sülfonamid grubu bulunduran antibakteriyel ilaçlardır [6]. Bir sülfanilamid grubu ve belirgin bir beş veya altı üyeli heterosiklik halka içeren bir dizi sentetik antimikrobiyal ajan olan sülfonamidler, geniş aktivite spektrumları ve düşük maliyetleri nedeniyle bakteriyel enfektif hastalıkları önlemek ve bu hastalıkları tedavi etmek amacıyla yaygın olarak uygulanmaktadır [7].

Sülfonamidler, esas itibarıyla sülfanilamid (para-aminobenzen-sülfonamid) maddesinin türevidirler. Tüm sülfonamid türevleri sentetik olarak hazırlanırlar ve benzer yapıya sahiptirler. Sülfonamidlerin genel yapısı, $-SO_2NH_2$ grubu ile amino grubunun para- pozisyonunda bağlandığı benzen çekirdeğinden meydana gelir [8]. Sülfonamidler, geniş bir spektruma sahip sentetik bakteriyostatiklerdir ve bu özelliklerinden dolayı gram-pozitif ve gram-negatif organizmalara karşı kullanılabilirler [5]. Yapısındaki azot atomlarından birinin yerine farklı gruplar bağlanarak, etki gücü ve süreleri olan birçok sülfonamid bileşikleri türetilir. Bakteriler üzerinde etkinlik için molekülde N4-paraamino grubunun serbest olarak bulunması esastır [8]. Sülfonamidlerin genel kimyasal yapısı Şekil 1.1’de sunulmaktadır [6].



Şekil 1.1 Sülfonamidlerin kimyasal yapısı [6].

Sülfonamidlerin, sıklıkla rastlanan bakteriyel enfeksiyonların neden olduğu hastalıkların çoğunluğuna karşı yüksek verim elde edilmesi ve ucuz maliyetli olmasından dolayı özellikle veterinerlikte yaygın bir şekilde kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Ayrıca, sülfonamid içeren antibiyotikler insan ve çiftlik hayvanlarının tedavisinde sıklıkla kullanıldığı gibi, su ürünleri yetiştiriciliğinde de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [5]. İnsanlardaki bulaşıcı hastalıklarda başarıyla uygulanan ve ilk antibakteriyel olan sülfonamidler insanlarda ayrıca; İdrar yolu enfeksiyonları, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, gastrointestinal enfeksiyonlar, kulak enfeksiyonları, kronik bronşit, bakteriyel menenjit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ve birtakım göz enfeksiyonları gibi daha birçok farklı enfeksiyonu tedavi etme amacıyla kullanılmaktadır. Özellikle üriner sistem enfeksiyonlarında kullanımları günümüzde de devam eden, tedaviyi destekleyen ve düşük maliyetli olan güvenilebilir nitelikte ilaçlardır. Ayrıca, veterinerlikte yaygın olarak kullanılan sülfonamidler, hayvanlarda büyüme ve gelişmeye yardımcı olarak kullanılmakta olup, yem verimini arttırmak amacı ile de kullanılmaktadır. Bu antibiyotik türevi akarsular, yeraltı suları ve sızıntıdan kaynaklı oluşan sularda da en sık rastlanan farmasötiklerden biridir [5, 6, 9]. Geniş kullanımları nedeniyle hayvan ürünlerindeki sülfonamid kalıntıları, alerjik özelliklerinden kaynaklı olası sağlık riskleri oluşturmakta ve günümüzde kalıntı tayinlerinde ilk sırada yer almaktadır [6]. Bu sebeplerden dolayı antimikrobiyal sülfonamidler ve metabolitleri kalıcı organik kirleticiler olarak sınıflandırılır. Sülfonamidlerin neden olduğu sorunların giderilmesi için çeşitli oksidasyon teknikleri uygulanabilir. Bu teknikler genellikle sülfonamidlerin bozunmasını ve çevreden uzaklaştırılmasını sağlayan klorlama ve ileri oksidasyon işlemleri, adsorpsiyon işlemleri, membran işlemleri ve birleştirilerek uygulanan işlemlerden oluşmaktadır [10].

1.1.1 Sülfonamid türleri

Sülfonamidler, emilim ve atılım hızlarına göre sınıflandırılırlar. Bu hızlılık temeline örnek olarak, sülfisoksazol ve sülfadiazin türleri hızlı emilip, atılan maddeler kısa etkili sülfonamidlerdir; sülfametoksazol gibi hızlı emilim gösteren fakat yavaş dışarı atılım sağlayan orta etkili sülfonamidler; sulfametoksipridazin ve sülfadoksin gibi çok yavaş atılım sağlayan fakat uzun etkili sülfonamidler (depo sülfonamidler) olarak sınıflandırılabilirler [9].

Sülfonamidlerin şimdiye kadar 10 000'den fazla türevinin sentezlendiği bilinmektedir. Ayrıca, bu sentezlenen sülfonamid türevlerinin 40'ının veteriner ve medikal uygulamalar için yararlanıldığı bilinmektedir. Bu uygulamalar için kullanılan en yaygın sülfonamid türleri ise şunlardır; Sülfametoksazol (SMX), Sülfapiridin (SPY), Sülfanilamid (SNA), Sülfametazin (SMT), Sülfatiazol (STZ) ve Sülfadiazin (SDZ)'dir [5].

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından listelenmiş olan Sülfam antibiyotiklerin en önemli bileşiklerinden biride, Sülfadiazin'dir [9].

Sülfonamidlerin sınıflandırılması kimyasal yapıları, aktivite süreleri, aktivite spektrumları ve terapötik uygulamalarına göre yapılmaktadır. Genellikle en sık kullanılan sınıflandırma yöntemi ise terapötik uygulamalarına göre'dir. Diğer bir önemli sınıflandırmada aktivite süreleridir ve bu sınıflandırma yönteminde sülfonamidler dört grupta incelenir [4]. Aşağıda verilen Çizelge 1.1'de bazı sülfonamid türlerinin eliminasyon yarı ömürlerine göre sınıflandırılması verilmiştir.

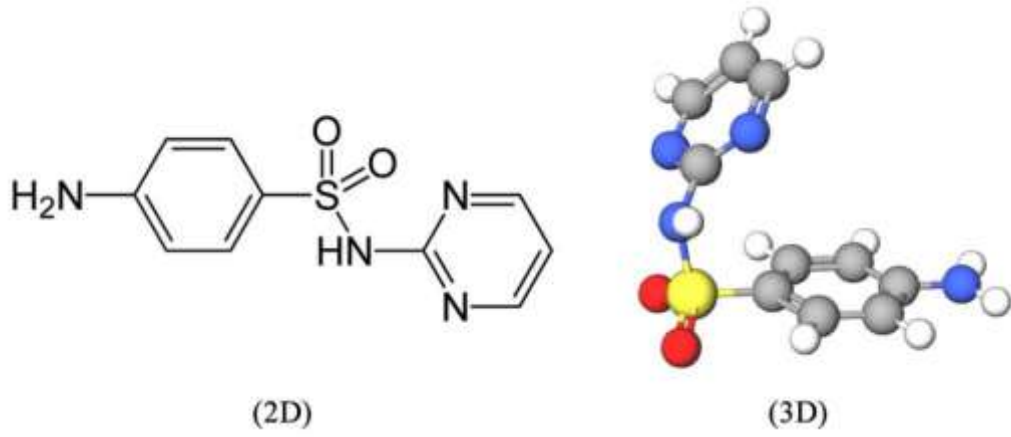
Çizelge 1.1 Sistemik sülfonamidlerin eliminasyon yarı ömürlerine göre sınıflandırılmaları [11]

Eliminasyon Yarı Ömrü	Sülfonamid	Yarı Ömrü (saat)	Doz (g)	Doz Aralığı (saat)
Kısa Yarı Ömür	Sülfisomadin	6	1,5	8
	Sülfisoksazol	6	1	6
	SMT	7	1,5	6
	Sülfakarbamid	6	1	8
Orta Yarı Ömür	SMX	11	1	12
	Sülfafenazol	10	0,5	12
	SDZ	16	1	12
	Sülfamoksol	10	0,5	12
	Sülfametrol	9	1	12
	Sülfadimetoksin	35	1	24
Uzun Yarı Ömür	Sülfaperin	24	0,5	12
	Sülfamerazin	24	0,5	24
Depo Sülfonamidler	Sülfadoksin	150	1	7 gün

1.2 Sülfadiazin

Bu tez çalışmasının konusu olan SDZ, birinci kuşak Sülfä antibiyotiklerin en önemli bileşici olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, WHO tarafından listelenen sülfonamid temel ilaçları listesinde ön sıralarda bulunan SDZ, birçok enfeksiyonu tedavi etme amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [5, 12, 13].

SDZ antibiyotiğinin kimyasal olarak IUPAC adı; 4-amino-N-pirimidin- 2-il-benzensülfonamid, N1-(2-pirimidinil)-sülfanilamid ve 2-sülfanilamidopirimidin olarak adlandırılmaktadır. SDZ'nin kimyasal yapısı Şekil 1.2'de sunulmaktadır [9, 14, 15].



Şekil 1.2 SDZ'nin moleküler yapısı [16, 17].

- Moleküler formülü: $C_{10}H_{10}N_4O_2S$
- Molekül ağırlığı: $250,278 \text{ g mol}^{-1}$
- Yoğunluk: $1,496 \text{ g cm}^{-3}$
- Erime noktası: $255,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$
- pK_a : 6,4

SDZ, beyaz veya sarımsı-beyaz kristalize bir tozudur. Sudaki çözünürlüğü 77 mg L^{-1} 'dir. Alkolde hafifçe çözünür. Alkali hidroksit çözeltilerde ve seyreltik mineral asitlerde çözünür [17]. Vücutta nispeten az asetillenen, gerek kendisinin ve gerekse asetil türevinin sudaki çözünürlüğü epeyce fazla olan sülfonamid türevidir. Yarılanma ömrü 10–21 saattir [18]. Piyasada bulunan birçok antibiyotiğin etken maddesi olarak kullanılan SDZ'ye örnek olarak verilebilecek bazı ilaçların isimleri; Lantrisol, Neotrizine, Sulfa-Triple, Sulfaloid, Sulfadiazine, Sulfonamides Duplex, Sulfose, Terfonyl, Triple Sülf, Triple Sulfas ve Triple Sulfoid'dir [19].

1.2.1 Sülfadiazin'in kullanım alanları

SDZ, klinik uygulamada bakteriler üzerinde güçlü bir inhibitör etkiye sahip olan yaygın olarak kullanılan bir sülfonamid ilacıdır, bu nedenle genellikle bakteriyel enfeksiyonların neden olduğu hayvan ve insan hastalıklarında tedavi amaçlı yaygın bir şekilde kullanılır [20].

SDZ, bakteriler ile diğer organizmaların büyümesini durdurarak çalışır [12]. Sülfonamid grubu bir antibiyotik olan SDZ antibiyotiği bakteri hücresi içindeki folik asit üretimini durdurarak enfeksiyonlara neden olan bakterileri ortadan kaldırır ve idrar yolu enfeksiyonlarını tedavi etmek için yaygın olarak kullanılır [21]. *Toxoplasma gondii* bakterisinin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde de kullanılmıştır [22]. Ayrıca kombinasyon halinde, SDZ ve pirimetamin, *Toxoplasma gondii* bakterisinin neden olduğu bir hastalık olan *Toksoplazmoz*'u tedavi etmek için kullanılabilir [5, 16].

SDZ, antibakteriyel özelliklerinden dolayı hayvancılık sektörü ile su ürünleri endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılan antibiyotiktir. Şu anda da SDZ, hayvan yemlerinde kullanılan en yaygın kontaminant antibiyotiktir [23].

1.2.2 Sülfadiazin'in avantaj ve dezavantajları

SDZ'nin çevrede kalıcılığı, mikrobiyal toplulukların bileşiminde değişikliklere ve antibiyotik direnç genlerinin oluşumuna yol açarak besin zinciri ve içme suyu yoluyla insan sağlığına büyük bir tehdit oluşturur [20]. Aşırı SDZ'ye maruz kalmak, insanlarda alerjik veya toksik reaksiyonlar gibi ciddi sağlık sorunlarına neden olur [23]. SDZ, PABA (Para-Amino Benzoik Asit) analogu olup dihidropteroat sentetaz enzimini inhibe ederek folik asit sentezini durdurur ve bunun sonucunda RNA ile DNA sentezi bozulur. SDZ uygulanması sırasında; SDZ'nin yan etkilerinden olan kristalüri, hematüri ve deri döküntülerini gidermek amacıyla hastaların bol miktarda su tüketmesi ve ağız yoluyla bikarbonat takviyesi alınması uzmanlar tarafından tavsiye edilir. Bu sayede, idrarın bazikleştirilmesi kristalüriyi engeller, fakat ilacın atılımını hızlandırarak etkinliğini azaltır [18, 24]. SDZ'nin yaygın kullanımı nedeniyle son yıllarda yeraltı ve yüzey sularında sıklıkla tespit edilmiştir. Parçalanması zor olan SDZ'nin geleneksel yöntemlerle sudan

uzaklaştırılması zordur. Bu nedenle, SDZ'nin sudan uzaklaştırılmasının araştırılması büyük önem taşımaktadır [20].

1.2.3 Sülfadiazin'in çevreye etkisi

Antibiyotiklerin canlılardan doğaya kadar uzanan yolculuğunda çevreyi de etkileyen durumlar meydana gelebilmektedir. Bu antibiyotiklerin belirli bir bölümü vücuttan tümüyle parçalanarak atılabilirken, diğer bir kısmı ise orta ve zayıf düzeylerde parçalanmalarından kaynaklı olarak tümüyle bozunmaya uğramayan antibiyotik kalıntıları vücuttan atılırlar [19]. Böylece, çevreye salınan antibiyotik kalıntıları kanalizasyon şebekelerinden su arıtım tesislerine kadar ulaşp, karışır [25].

İnsan ve hayvanlardaki enfeksiyonların tedavisinde, tarım ile hayvancılıkta kullanılan büyüme ajanı ve gübre olarak antibiyotik kullanımının artması ilk başta toprağı kirletir, bununla birlikte akıntı ve sızıntılardan kaynaklanan yeraltı ve yerüstü sulara karışmasına sebep olur [19, 26]. Antibiyotiğın çevreye verdiği bir diğer zarar ise, son kullanım tarihleri geçen veya kullanılmayan antibiyotiklerin doğrudan kanalizasyon şebekelerine ya da depolama alanlarına atılmasından oluşmaktadır [25]. Ayrıca, mikrobiyolojik kirliliğe sebep olan hastanelerin atık suları, son dönemlerde antibiyotikler ve diğer türevlerdeki ilaç kalıntıları nedeniyle sucul çevre kirliliğinin başlıca nedenleri arasında yer almaktadır [27, 28]. Bu antibiyotikler biyolojik bozunmaya karşı son derece dirençlidir ve bu nedenle mikroorganizma üremesini inhibe etme veya bazı türleri teşvik etme etkisi ile çevrede uzun süre kalırlar. Mikroorganizmalar üzerindeki doğrudan etkiye ek olarak, sülfonamidlerin ortamdaki kalıcılığı da ekosistem dengesini etkileyebilir [13, 29].

Ek olarak, bakteriler antibiyotiklerin aşırı kullanımı nedeniyle hayvanlarda direnç geliştirebilir. Süt ($0,07 \text{ mg L}^{-1}$) ve yumurta ($0,02 \text{ mg L}^{-1}$) dahil olmak üzere farklı gıdalardaki SDZ için maksimum kalıntı sınırlarının, tüketicileri SDZ kalıntılarıyla ilişkili risklerden koruduğı bildirilmiştir [30]. Bu gerçek, gıda güvenliği konusunda önemli tartışmalara neden olmuştur. Bu verilere dayanarak, gıda numunelerinde SDZ'nin doğru ve seçici bir şekilde belirlenmesi için yeni analitik yöntemlerin geliştirilmesi esastır.

1.3 Ekstraksiyon

Son dönemlerde matriks numunelerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde hassas, doğru ve hızlı olan yöntemlerin geliştirilmesi önemli bir konu olmuştur. Yalnız biyolojik, çevresel, farmasötik ve gıda alanlarında kullanılan ürünlerin analizi için yüksek hassasiyete sahip analitik cihazların geliştirilmesine karşın, bu analitik cihazların genellikle matriks numune tayinlerinde başarısız olmaktadır. Dolayısıyla matriks ortamında bulunan analitleri ayırma ve zenginleştirme işlemleri için genel olarak ön işlem uygulaması gerekmektedir. Bu ön işlemler çoğunlukla damıtma, katı bir yüzeyde adsorpsiyon ve ekstraksiyon gibi yöntemler uygulanarak gerçekleştirilir [31].

Eser analiz çalışmalarında matriks etkisi ve kullanılan tekniğin ölçüm kapasitesi gibi önemli problemler bulunmaktadır. Bu sorunları en aza indirmek için, belirleme adımından önce uygun ve seçici bir ekstraksiyon prosedürü uygulanmalıdır [32]. Uygulanacak olan bu ekstraksiyon işlemi, kullanılan çözeltilerin birbiri ile karışmayacak olan bir sıvı fazdan diğer bir sıvı faza geçmesidir. Bu prosedürde, genel olarak incelenen fazın biri su diğeri suyla karışmayan organik çözücülerdir [33]. Ekstraksiyon yöntemleri ana hatlarıyla yukarıda anlatılan şekilde sınıflandırılrsa bile gelişmekte olan teknolojiye paralel olarak kozmetik, ilaç ve besin vb. gibi farklı sektörlerde bir numuneden istenilen bileşiklerin ayrılmasında kullanılan temel veya gelişmiş birçok çeşitli teknikler bulunmaktadır. Temelde ekstrakte edilmesi amaçlanan bileşiğin transfer işlemi sadece istenen bileşiğin çözünebileceği bir çözücüyle gerçekleştirilmiş olsa dahi ekstraksiyon işleminde sadece çözünürlük etkili değildir. Ekstraksiyonu etkileyen unsurlardan bir diğeri çözünen bileşiğin her fazdaki aktiflik katsayısında oluşan değişiktir. Ekstrakte edilebilen bileşiklerin fazlar arası dağılımı elektrostatik bağlara (iki iyon arasındaki, bir iyon ve dipol arasındaki veya iki dipol arasındaki elektrostatik bağlar), hidrojen bağlarına ve kimyasal bağlara bağlı olarak değişim gösterir. Genel olarak bileşiğin su veya alkol içerisindeki çözünürlüğü bileşiğin hidrojen bağı oluşturma yeteneğine bağlıdır, bu yetenek ise bileşiğin dipol momenti ile ölçülebilen polarlığına bağlıdır. Kimyasal bağlar ise π (pi) ve σ (sigma) bağlarını kapsayan asit baz etkileşimleriyle ilişkilidir [34]. Dolayısıyla ekstraksiyon, teoride dağılıma kanunu uyarınca ifade edilir [35].

Ekstraksiyon, çoğu analitik prosedürdeki adımlardan biridir [32]. Genellikle ekstraksiyon uygulamaları sıvı-sıvı, katı-sıvı ve katı faz biçiminde uygulanır [31]. Ayrıca, çeşitli matriksi bulunan ve/veya düşük miktarlarda analit içeren numune analizlerinde daha güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek amacıyla ekstraksiyon yöntemleri sıklıkla kullanılır [33].

Her yöntemin kendi avantajları ve dezavantajları vardır ve ekstraksiyon yönteminin seçimi uygulanabilirlik ve çevre dostu olması gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Ayrıca, eser düzeydeki analitlerin tayin edilmesinde sıklıkla kullanılan bu yöntemin avantajları arasında kolay uygulanabilirliği ve yüksek geri kazanım nedeniyle yöntemin seçiciliği de bulunmaktadır [32, 36]. Dezavantajları ise;

- Uygulanan yöntemin daima tek seferde gerçekleşmesi mümkün olmadığı için yapılan tekrar işlemlerinin yüksek çalışma potansiyeli gerektirmesi,
- Yüksek çalışma potansiyelinin neden olduğu zaman kayıpları,
- Maliyetli olması,
- Yüksek hacimlerde kullanılan organik çözücülerin çevreye karşı zararlı etkiler oluşturması şeklindedir [35, 36].

Ayrıca, yüksek hacimlerde kullanılan organik çözücülerin analiz basamağından önce kesinlikle bir uçurma basamağına gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle uçurma basamağı uygulanırken, yüksek uçuculuk özelliğine sahip olan kimi analitler için ciddi kayıplar oluşabilmektedir. Dolayısıyla bu durum analiz yönteminin hassasiyetini düşürmektedir. Bu klasik ekstraksiyon yöntemlerinin dezavantajlarından dolayı son dönemlerde daha basit, duyarlı, hızlı ve spesifik mikroekstraksiyon yöntemlerine duyulan ilgi giderek artmaktadır [36].

Son dönemlerde, yüksek çözücü tüketimine sahip geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinin aksine, analit(ler)in ekstraksiyonu için analitik prosedürlerde mikroekstraksiyon/önderiştirme yöntemleri çok popüler hale gelmiştir. SDZ'nin farklı matrikslerde ekstraksiyonu için dispersif mikro katı faz ekstraksiyonu [32], bulut noktası mikroekstraksiyonu [37], manyetik katı faz ekstraksiyonu [38], değiştirilebilir hidrofiliklik çözücü bazlı sıvı faz mikroekstraksiyonu [39], ultrason destekli dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu [40] ve düşük sıcaklıkta bölümleme mikroekstraksiyonu [41] gibi birçok farklı mikroekstraksiyon prosedürü bildirilmiştir.

1.4 Mikroekstraksiyon

Klasik yöntemlerde kullanılan, toksik etkiye sahip organik çözücülerin yüksek miktarlarda kullanımı çevre kirliliğine neden olduğu için hem doğaya hem de insan sağlığına karşı büyük bir tehlike oluşturmaktadır [36]. Geleneksel sıvı–sıvı ekstraksiyonu (LLE) ve katı–faz ekstraksiyonu (SPE) evrensel olarak kullanılan yöntemlerdir fakat uzun süren ekstraksiyon, fazla miktarda toksik çözücü kullanımı, çoklu ekstraksiyon adımları, büyük numune miktarları ve oluşan atık gibi bazı dezavantajlara sahiptirler. Bu oluşan dezavantajları dengelemek amacıyla, esas olarak LLE ve SPE'nin temel prensiplerine dayalı olarak mikroekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir [42].

İdeal numune hazırlama teknikleri hızlı analiz, kullanımı kolay, ucuz, az miktarda numune kullanımı, yüksek ekstraksiyon çıktısı, analitin geri kazanımı ve birçok analitik cihaza uygulanabilir olmalıdır [31, 42]. Mikroekstraksiyonun ana endişelerinden bir diğeri, toksik kimyasalların çok az kullanımının veya hiç kullanılmamasının teşvik edildiği ve üretilen atığın çevreye salınmasının minimum düzeyde veya güvenli olduğu yeşil kimyaya uygunluktur [42]. Ayrıca, klasik ekstraksiyon çözücülerini suya göre yüksek yoğunlukta olan kloro benzen, kloroform ve tetrakloro metan gibi çözücüler ile sınırlıdır ve bu tarz çözücülerin tümü zehirli ve çevre düşmanıdır [33]. Bununla ilgili olarak, yeni eğilim organik çözücü tüketimini minimum düzeylere indirmek, numune hazırlama adımını kolaylaştırma ve küçültme şeklindedir [31]. Eser kimyasal tür analizlerinin yapılabilmesi ve uygulanan zenginleştirme yöntemi sonucunda makul sinyalin gözlenmesi için eser kimyasal tür derişiminin belirli bir seviyenin üzerinde olması gerekir [35]. Bunun için mikroekstraksiyon yöntemlerine karşı duyulan ilgi önemli derecede artmıştır [31]. Analitik mikroekstraksiyon yöntemleri, numune hazırlama alanında basitlik, minyatürleştirme ve zaman verimliliği konularını ele alan önemli bir gelişmeyi temsil eder [43, 44]. Mikroekstraksiyon yöntemleri;

- Klasik LLE ve SPE yöntemlerinde kullanılan toksik ve maliyetli ekstraksiyon sıvılarının kullanımını mikrolitre düzeylerine indirgenmesi,
- Buharlaştırma ve saflaştırma gibi uygulamalara ihtiyacın kalmaması,
- Yüksek oranda zenginleştirme,
- Ekstraksiyon ve zenginleştirme işlemlerinin yanı sıra, ayırma işleminin de uygulanabilmesi,

- Otomasyonun yapılabilmesi,
- Ekstraksiyondan sonra alınan örneğin direkt Gaz Kromatografi (GC), Kapiler Elektroforez (CE) ya da Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)'ye enjekte edilebilmesine olanak sağlaması gibi avantajlardan kaynaklı son dönemlerde klasik LLE, SPE ve katı-sıvı ekstraksiyon yöntemlerinin yerlerini almaya başlamışlardır [31, 45].

Son dönemlerde eser kimyasal türlerin zenginleştirilmesi için geliştirilmiş olan mikroekstraksiyon yöntemleriyle birlikte organik çözücüye duyulan ihtiyaç minimuma indirilmiştir [35]. Ayrıca, çevresel analizlerde (pestisitler, hormonlar), gıda analizlerinde, toksikolojik ve adli amaçlarla biyoanalizde veya doping analizinde birçok mikroekstraksiyon yöntemi geliştirilmiştir [44]. Kısaca, numune hazırlama yöntemi olan mikroekstraksiyon yöntemi yeşil kimya prensiplerine uygun ve çevreye karşı duyarlı, çözücü miktarını en aza indirgeyen, numune hazırlama basamağının süresini düşüren, yüksek zenginleştirme faktörü sağlayan, kısa süre içerisinde gerçekleşen ve laboratuvarlarda bulunan basit/klasik aletlerle uygulanabilen bir numune hazırlama yöntemidir [46].

1.4.1 Mikroekstraksiyonun sınıflandırılması

Alışagelmış numune hazırlama tekniklerinin neden olduğu sınırlamaları gidermek ve uygun bir teknik için ekstraksiyon yöntemlerinin minyatürleştirilmesi amaçlanmıştır [47]. Mikroekstraksiyon yöntemleri genellikle iki gruba ayrılmaktadır, bunlar **Katı Faz Mikroekstraksiyon (SPME)** ve **Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (LPME)** yöntemleridir [36].

Mikroekstraksiyonun oluşumu Pawliszyn ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmayla açıklanmıştır. 1990'ların başında ve o zamandan bu yana, mevcut yöntemlerde yeni gelişmeler ve modifikasyonlarda bir artış yaşanmıştır. Bu nedenle genel olarak literatürde SPME ve LPME yöntemlerini açıklayan çeşitli mikroekstraksiyon terminolojileri ile kısaltmaları bulunmaktadır. Mikroekstraksiyon yöntemlerinin kısaltmaları çoğunlukla ekstraksiyon verimliliğini artırmak amacıyla kullanılan parçalama veya numune çalkalama türünü içerir ve bunlar arasında ultrasonik destekli (UA), mikrodalga destekli (MA), vorteks destekli (VA) ve hava destekli (AA) yöntemler bulunur. Çeşitli

analitler için kullanılan yaygın mikroekstraksiyon yöntemlerinin bir listesi Çizelge1.2’de sunulmaktadır [42].

Çizelge 1.2 Yaygın mikroekstraksiyon yöntemlerinin sınıflandırılması [42]

Mikroekstraksiyon Yöntemi	Kısaltmalar	Genel Sınıflandırma
Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon	DLLME	LPME
Sıralı enjeksiyon dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon	SI-DLLME	
Headspace-tek damla mikroekstraksiyon	HS-SDME	
Doğrudan asılı damlacık mikroekstraksiyon	DSDME	
Doğrudan daldırma tek damla mikroekstraksiyon	DI-SDME	
Oyuk (Hollow) fiber sıvı faz mikroekstraksiyon	HF-LPME	
Karıştırma çubuğu emici ekstraksiyon	SBSE	SPME
Headspace katı faz mikroekstraksiyon	HS-SPME	
Dispersif mikro-katı faz ekstraksiyonu	DMSPE	
Hızlandırılmış katı faz dinamik ekstraksiyon	ASPDE	
Oyuk (Hollow) fiber katı faz mikroekstraksiyon	HF-SPME	
Oyuk (Hollow) fiber 3-fazlı sıvı mikroekstraksiyon	HF-LLLME	
Katı faz nano ekstraksiyonu	SPNE	SPME
Adsorptif mikroekstraksiyon	A _μ E	
Doğrudan daldırılmalı katı faz mikroekstraksiyonu	DI-SPME	
Elektro sorpsiyon-güçlendirilmiş katı faz mikroekstraksiyon	EE-SPME	
Sorbent arayüzü ile membran ekstraksiyonu	MES ₁	
Çoklu karıştırma çubuğu emici ekstraksiyon	MSBSE	
Dönen disk emici ekstraksiyon	RDSE	

1.5 Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon Yöntemleri

LLE yöntemi, birçok standart analitik metotlarda yaygın bir şekilde kullanılan klasik numune hazırlama yöntemidir. Fakat klasik olarak kullanılan bu LLE yöntemi, bağıl olarak aşırı toksik organik çözücü ve reaktif tüketimine, uzun ekstraksiyon süresine sahip olmasından dolayı maliyetli ve çevre dostu olmayan bir yöntemdir. Bu nedenlerden kaynaklı klasik LLE yönteminin uygulamalarında rastlanan problemlerin giderilmesi ya da indirgenmesi amacıyla LLME yöntemleri geliştirilmeye ve kullanılmaya başlamıştır [48]. LLME minyatürize numune hazırlama metotlarına alternatif olarak 1990'lı yılların ortalarında ortaya çıkmıştır [49]. Fakat, 1996 yılında Liu, Dasgupta ve Jeannot, Cantwell LLME yöntemlerine yönelik ilk çalışmaları yapmışlardır. Bu çalışmaların ardından, aynı senelerde He, Lee ve Jager, Andrews de LLME yöntemleri üzerine olan çalışmalarını literatüre kazandırmışlardır [50]. Bu yöntemle ilgili araştırmalar, bir mikro şırınga iğnesinin ucundan asılı duran küçük organik çözücü damlacıklarının kullanılmasıyla başladı. Ancak, farklı doğadaki bileşikleri analiz etmek ve nispeten kısa ekstraksiyon süreleri kullanarak büyük zenginleştirme faktörleri elde etmek için yeni yaklaşımlar geliştirilmiştir [51].

LLME yöntemini, klasik LLE'den ayıran en önemli fark ekstraksiyon sıvısının mikrolitre (μL) seviyelerine indirilmesidir. Böylelikle zenginleştirme işlemi uygulanırken, hem çözücü kaybı önlenir hem de buharlaştırma işlemine gerek kalmaz [45]. Bu nedenlerden dolayı LLME hızlı analiz basamakları, çevre dostu olması ve daha basit bir yöntem olmasından dolayı daha çok tercih edilen bir yöntemdir [47]. LLME yöntemlerinde ekstraksiyon verimi, yararlanılan ekstraksiyon çözücüsünün türü ile bu çözücünün sulu numunelerde hangi oranda dağıldığına bağlıdır [36]. LLME uygulaması, küçük hacimli suyla karışmayan bir çözücü ile ilgilenilen analitleri içeren sulu bir faz arasında gerçekleştirilir. Alıcı faz, üst boşluğun ekstraksiyonu için doğrudan numunenin içine daldırılabilir veya numunenin üzerinde süspanse edilebilir. Alıcı fazın hacmi, yüksek zenginleştirme faktörlerine izin veren μL veya alt μL aralığındadır [51]. Bu yöntem sayesinde, sulu çözeltilerde bulunan analitlerin su ile karışmayan farklı bir organik çözücü içerisine alınmasıyla ya da apolar fazda yer alan analitlerin polar ekstraksiyon fazına alınmasıyla ortamdan uzaklaştırılıp zenginleştirilmesi sağlanır. Böylece, küçük hacimli ekstraksiyon fazına geçen analit en ideal yöntemle ayrılır [46].

Geleneksel LLE yöntemlerinde el ile çalkalama gibi kolay olan bir işlem uygulanırken, LLME yöntemlerinde ise ekstraksiyon çözücüsünün sulu numune içerisinde etkili biçimde dağılması amacıyla çeşitli karıştırma türleri (sonikasyon, vorteks, manyetik karıştırıcı gibi) ya da çeşitli mekanizmalar (hava destekli yöntemler ya da dağıtıcı çözücü kullanılması gibi) uygulanmaktadır. LLME yöntemlerinde ekstraksiyon ile önderiştirme işlemleri tek aşamada gerçekleşmektedir [36, 52]. Ayrıca, örneği analize hazırlama ve önderiştirme işlemleri için son zamanlarda yaygın olarak kullanılan güçlü bir metottur [49]. Fakat diğer metotlarda olduğu gibi bu metotta da bazı dezavantajlar söz konusudur. Bu dezavantajlar; hızlı karıştırmaya bağlı olarak organik damlanın kırılmasına neden olma eğilimi, hava kabarcıkların oluşması, ekstraksiyonun uzun sürmesi ve çoğu durumda dengeye ulaşamama durumu örnek olarak verilebilir [53].

1.5.1 Sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemlerinde kullanılan yeni nesil çözücüler

Son dönemlerde LLME yöntemlerinde atık üretimini azaltan, non-toxic, minimum düzeyde kullanılması ile kantitatif sonuçlar gözlenebilen (μL düzeylerinde), kısa süreli uygulama sağlayan, yeşil kimya ilkelerince çevreye zarar veren sıvı faz ekstraksiyon çalışmaları için kullanılan geleneksel çözücüler yerine çevreye verdiği zar minimum düzeylere getirilmiş yeni nesil yeşil çözücüler kullanılmaktadır [46]. Analitik kimya alanı, kimyanın en değerli dallarından biri olup, son dönemlerde yeşil kimyaya gösterilen ilgi ile bu alana uygun yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır ve bu alan için yeni nesle uygun olan Yeşil Analitik Kimya ismi verilmiştir [54, 55].

Çözücüler, öncelikli olarak ilk sırada yer alan kimya endüstrisi ile tekstil, gıda, kağıt türevleri, biyokütle, farmakoloji gibi çok sayıdaki çeşitli endüstri alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Laboratuvar boyutlu çalışmalarda ise sentez, pürifikasyon, ekstraksiyon/mikroekstraksiyon gibi proseslerde kullanım alanı bulunmaktadır. Sıvıların çözücü olarak kullanılması amacıyla birtakım özellikleri karşılamaları gerekmektedir. Örnek olarak açıklamak gerekirse, çalışma ortamlarına bağlı sıcaklık ve basınçlarda sıvı fazda bulunabilmeli, ticari saflıkta olabilmeli veya basit bir şekilde saflaştırılabilmeli ayrıca az maliyetli olmalıdır [56, 57].

Yeni nesil yeşil çözücülerin en önemli özellikleri non-toxic, geri dönüştürülebilir, uçucu olmayan ve sentezi için düşük maliyet gerektiren çözücüler olmaları olarak sıralanabilir. Klasik olarak kullanılan tehlikeli çözücülerin yerine, sürdürülebilir döngüyü destekleyen yeni nesil yeşil çözücülerin kullanımı desteklenmelidir [57].

Yaygın olarak en çok kullanılan yeşil çözücüler;

- Derin Ötektik Çözücüler (DES),
- Sürfaktanlar (Yüzey Aktif Maddeler),
- İyonik Sıvılar (IL),
- Süperkritik Akışkanlar/Sıvılar,
- Biyolojik olarak türetilen çözücüler dahil olmak üzere, çevreci yeşil çözücü alternatifleri kullanılmaktadır [58, 59].

1.6 Derin Ötektik Çözücüler

DES'ler genel olarak IL ile pek çok benzer özellik gösterdiğinden dolayı, IL'ların yeni bir sınıfı olarak kabul görmektedir. Benzer özelliklerinden dolayı DES ve IL terimleri birbirlerinin yerine kullanılabilir, fakat bunların gerçekte iki farklı çözücü türü olduğu bilinmelidir. DES'ler, farklı anyonik ve/veya katyonik türleri kapsayabilen bir ötektik Lewis asidi ya da Brønsted bazı karışımından oluşan sistemlerdir. Ayrıca, DES'lerin IL'lar ile fiziksel özellikleri benzer olmasına rağmen, kimyasal özellikleri bakımından önemli derecede farklıdır [60]. DES'lerin IL'lara göre daha ucuz olması, daha kolay hazırlanması ve çevreye daha az olumsuz etkisi olması gibi avantajları vardır [61]. Ayrıca, hedefe özel olacak şekilde ayarlanabilirler. Literatürde bildirilen DES'lerin çoğu hidrofiliktir [62]. Bununla birlikte, sulu numunelerde hidrofilik DES'lerin kullanımı, su ile hidrojen bağı etkileşimleri nedeniyle pratik uygulamalarını sınırlar [63]. Bu nedenle, son yıllarda araştırmacılar tarafından yeni bir DES sınıfı olan, düşük viskoziteli hidrofobik DES kullanılmıştır [64]. Bilinen toksik etkileri olan ve geleneksel olarak kullanılan çözücü sistemlerini değiştirmek için çevre dostu ve yeni nesil çözücüler geliştirmek amacıyla yeşil kimya üzerinde çalışılmaktadır [65].

DES'ler hidrojen bağı etkileşimleri yoluyla oluşur [33]. DES'ler genellikle bir hidrojen bağı alıcısı (HBA) ile bir hidrojen bağı vericisi (HBD) uygun molar

oranlarda karıştırılarak hazırlanır [66]. Yani DES oluşumunda, bileşikler arasında kovalent bağ değil, hidrojen bağı meydana gelmektedir [56]. DES'ler düşük örgü enerjisine ve dolayısıyla düşük erime noktalarına sahip büyük, simetrik olmayan iyonlar içerir. Genel olarak bir kuarterner amonyum tuzunun bir metal tuzu ya da hidrojen bağ vericisi ile kompleksleştirilmesi sayesinde elde edilirler [60]. Ötektiği oluşturan HBA ve HBD arasındaki oran, bileşenlerin karşılıklı bağlanma yeteneklerine bağlıdır [59]. DES'ler genellikle oda sıcaklığı ve 70 °C aralığında sıvı fazda bulunur [33].

Ekstraksiyon işleminde DES'lerin kullanılmasının en önemli nedeni olarak; yüksek çözme yetenekleridir, yani moleküller arasındaki hidrojen bağı oluşumunu kolaylaştıran proton ve elektron alma/verme yetenekleri gösterilmektedir. Bunun yanı sıra, viskozite ve polarite gibi ayarlanabilir fizikokimyasal özellikleri sayesinde DES'lerin kullanımı ekstraksiyon süreçlerinde önem arz etmektedir [56]. DES'lerin, klasik çözücüler yerine tercih edilmesinin temel nedeni çok fazla avantajının olmasından kaynaklanmaktadır. Öncelikle, DES'lerin polaritelerinin fazlaca yüksek olmasından dolayı, klasik çözücülerde çözünemeyen selüloz tarzı birçok organik veya inorganik maddeyi çözebilme kabiliyetine sahiptir. DES'ler; organik maddelerden oluşan düşük maliyetli, biyobozunur, yanıcı ve uçucu olmayan, çevre dostu, hazırlanması basit, kokusuz ve renksiz çözücülerdir. Ayrıca, sudan daha yüksek yoğunluğa sahip olan DES'ler yüksek viskozite ve düşük iyonik iletkenliğe de sahip çözücülerdir. Son dönemlerde yukarıda açıklanan avantajları sebebiyle DES'ler dikkat çeken bir konu haline gelmiştir [33, 67].

İlk düşük viskoziteli hidrofobik DES çalışması, Van Osch ve arkadaşları (2015) [68] tarafından sulardan uçucu yağ asitlerinin ekstraksiyonu için çeşitli kuaterner amonyum tuzları ve organik karboksilik yağ asidi dekanolik asit kullanılarak hazırlanan DES'e dayanıyordu. Ek olarak, pirüvik asit, asetik asit, laktik asit ve laurik asit gibi farklı alkil zincir uzunluklarına sahip çeşitli doğal yağ asitlerinin kullanımına dayanan bir başka düşük viskoziteli hidrofobik DES bazlı çalışma; kafein, triptofan, izoftalik asit ve vanilin ekstraksiyonu gerçekleştirildi [69]. Ultrason destekli, hava destekli, girdap destekli, çalkalayıcı destekli, efervesan destekli, sıcaklık kontrollü ve mikrodalga destekli gibi birçok farklı uygulamayı içeren mikroekstraksiyon çalışmaları, numune çözeltisi ile DES fazı arasındaki verimi ve kütle aktarım hızını artırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır [70, 71].

1.6.1 Derin ötektik çözücü türleri

IL'lar ayrı bir anyon ve katyon içerirken, DES'ler farklı anyonik ve katyonik türlere sahip Lewis veya Brønsted asitleri ve bazlarının ötektik karışımlarını içerir. Ötektik bir karışım oluşturabilecek çok sayıda olası HBD ve HBA kombinasyonu vardır [72]. DES'ler genel olarak dört türe ayrılır. Bu dört tür DES, Çizelge 1.3'te verilen HBA ve HBD türüne göre birbirinden farklılık göstermektedir [73].

Çizelge 1.3 DES'in sınıflandırması [73]

Tür	Tanım	Formül	Şartlar	Örnekler
I	Kuarterner tuz ve metal halojenür	$Cat^+X^- + zMCl_x$	$M = Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In$	$ChCl + ZnCl_2$
II	Kuarterner tuz ve hidratlı metal halojenür	$Cat^+X^- + zMCl_x \cdot yH_2O$	$M = Cr, Co, Cu, Ni, Fe$	$ChCl + CoCl_2 \cdot 6H_2O$
III	Kuarterner tuz ve hidrojen bağı vericisi	$Cat^+X^- + zRZ$	$Z = CONH_2, COOH, OH$	$ChCl + Üre$
IV	Metal halojenür ve hidrojen bağı vericisi	$MCl_x + zRZ$	$M = Al, Zn, Ve$ $Z = CONH_2, OH$	$ZnCl_2 + Üre$

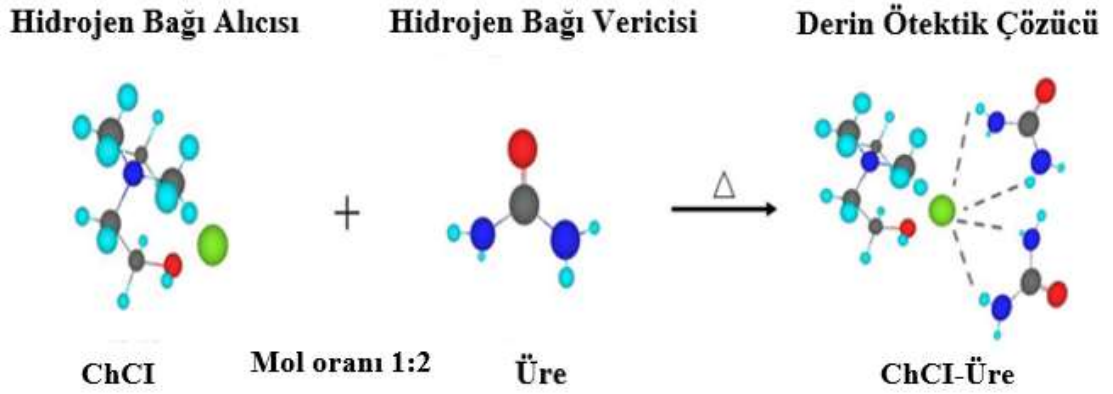
DES'ler genel bir formülle tanımlanabilir;

$$Cat^+X^-zY \quad (1)$$

Formülde verilen Cat^+ prensipte herhangi bir amonyum, fosfonyum ya da sülfonyum katyonudur ve X bir Lewis bazıdır, genellikle bir halojenür anyonudur. Karmaşık anyonik türler, X^- ile bir Lewis ya da Brønsted asidi olan Y arasında oluşur (z, anyonla etkileşimde bulunan Y moleküllerinin sayısını belirtir). Ayrıca, MCl_x bir metal klorürü ifade eder ve RZ'de bir organik bileşiktir [73, 74].

Halojenür tuzu veya HBA ve HBD arasındaki ana etkileşimler esasen hidrojen bağlarıdır, ancak ara sıra elektrostatik kuvvetler ve van der Waals etkileşimlerinin de kurulması muhtemeldir. Deneysel ve teorik çalışmalar, genel

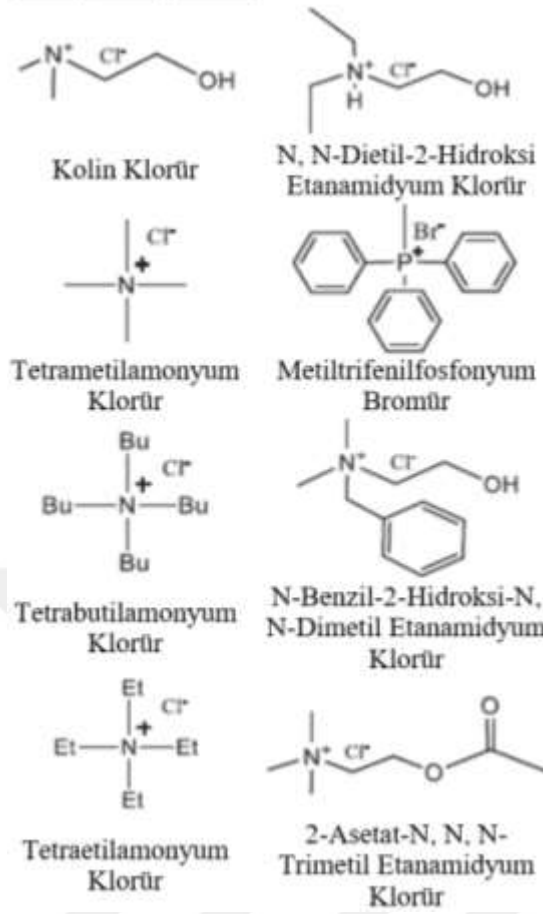
olarak DES'deki hidrojen bağlarının en yüksek fraksiyonunun molekül içi olduğunu ve HBD ile halojenür anyonu arasında oluştuğunu göstermiştir [75]. Çalışmaların çoğu, kuarterner amonyum ve imidazolyum katyonlarına odaklanmıştır ve özellikle kolin klorür kullanan daha pratik sistemlere vurgu yapılmıştır [ChCl, HOC₂H₄N⁺(CH₃)₃Cl⁻] [73]. Derin ötektik bir çözücünün oluşumunun şematik bir gösterimi Şekil 1.3'de sunulmaktadır [74].



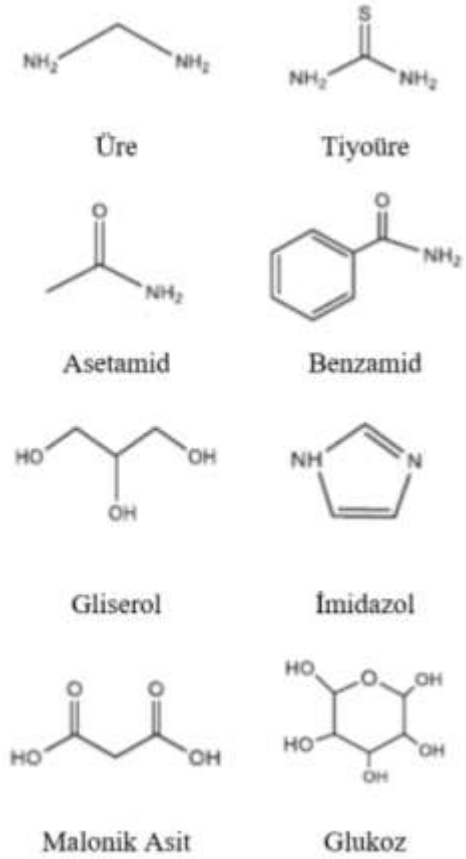
Şekil 1.3 ChCl ve üre ile gösterilen derin ötektik bir çözücünün oluşumunun şematik gösterimi [74].

Ayrıca, DES'in ortak bileşenleri Şekil 1.4'te gösterilmektedir. Listelenen türler arasında çalışmaların çoğu, amidler, asitler ve alkoller gibi hidrojen bağları oluşturabilen bileşiklerle kombinasyon halinde kullanılan, güvenli, ucuz ve toksik olmadığı bilinen dörtlü amonyum katyonlarına odaklanılmıştır [74, 75].

Hidrojen Bağı Alıcısı



Hidrojen Bağı Donörü



Şekil 1.4 DES oluşumunda yaygın olarak kullanılan bazı HBA ve HBD örnekleri [74]

1.6.2 Derin ötektik çözücülerin özellikleri

DES'ler düşük buhar basıncı, düşük toksisite, düşük yanıcılık, çözücüyü oluşturan bileşenlerin iyi huylu doğası ve düşük maliyet gibi özelliklerinden dolayı yeşil iyonik çözücülerin yeni bir sınıfı olarak sınıflandırılmaktadır [76]. Çevre dostu ve sürdürülebilir proseslere olan talebin artması nedeniyle DES'lerin uygulama alanları sürekli artmaktadır [72, 76]. Bu açıdan bakıldığında DES'lerin özelliklerinin performansı üzerinde önemli bir rolü vardır. DES'ler için en yaygın olarak bildirilen fiziksel özellikler yoğunluk ve viskozitedir, çünkü bunlar kimyasal işlemlerde kütle transfer operasyonlarında DES'in uygulanabilirliğini belirleyen ana özelliklerdir [72, 75].

Bu tez çalışması kapsamında, gıda numunelerinde SDZ'nin verimli ekstraksiyonu için düşük viskoziteli hidrofobik DES'lerin kullanım sürecini

açıklamaktadır. Analitik yöntem, UV–VIS spektrofotometresi ile tespit edilen yeni, basit ve yeşil sonikasyon destekli DES bazlı sıvı–sıvı mikroekstraksiyonunun (SA-DES-LLME) bir kombinasyonunun kullanılmasını içeriyor. Ön deneyler ışığında, bu yaklaşımın çok basit olması ve deneysel çalışma sayısının az olması nedeniyle yöntemin önemli parametreleri Merkezi Kompozit Tasarım (CCD) kullanılarak optimize edilmiştir. Yeşil analitik kimya ilkelerine uygun olarak, mikroekstraksiyon aşamasında yüksek derecede toksik organik çözücüler yerine çevre dostu düşük yoğunluklu DES'ler kullanılmıştır.

1.7 Optimizasyonda Deneysel Tasarım

Analitik kimyada geleneksel olarak yapılan optimizasyon, bir değişkenin deneysel sonuçlar üzerindeki etkisini izlemektir ve sadece bir değişken değiştirilip diğer tüm değişkenler sabit tutulmaktadır [77]. Herhangi bir optimizasyon prosedürü, genel olarak hedef fonksiyon adı ile tanımlanan önceden tanımlanmış olan kriterleri maksimize ya da minimize etmek amacıyla bağımsız değişken adı verilen belirlenmiş olan koşulların değiştirilmesini içerir [78]. Yapılan bu optimizasyon geleneksel tek faktör optimizasyonu olarak adlandırılmaktadır [77]. Proses koşullarının optimizasyonu birtakım deneyler gerektirmektedir. Deneysel bir tasarım metodolojisinin, maksimum miktarda karmaşık bilgiyi çıkarmak, önemli deneysel zamandan ve ayrıca analizler için kullanılan malzemeden ve kişisel maliyetlerden tasarruf etmek için çok ekonomik olması önemlidir [79].

Klasik deneylerde incelenen belirli bir olay vardır ve bu olayı etkileyen çeşitli faktörlerden sadece bir tanesi seçilerek gerekli hipotez oluşturulur. Fakat, olay ile olayı etkileyen diğer faktörler arasında oluşan etkileşimi belirlemek ve matematiksel bir model meydana getirmek için belirli bir yöntem yoktur [80]. Bu sebeplerden dolayı, geleneksel optimizasyonun en önemli sorunu yapılan çalışmalarda bulunan değişkenler arasında interaktif bir etkinin olmamasıdır. Bu nedenle bu teknik, parametrelerin sonuçlar üzerindeki etkisini tam olarak göstermemektedir [77]. Deneysel tasarım ise bu noktada araştırmacıya yardımcı olmakta ve olayın bütün faktörleriyle birlikte incelenerek gerçeğe en çok uyan modelin ortaya çıkmasını sağlamaktadır.

Deneylerin istatistiksel biçimde tasarlanmasının amaçları;

- Deney sayısının minimum düzeylere indirgenmesi,
- Belirlenmiş olan değişken için, en fazla etkili olan faktörlerin belirlenmesi,
- Belirlenmiş olan değişken için, amaçlanan değere en çok yaklaşan kontrol faktörlerinin belirlenmesi,
- Değişkenliği minimum düzeylere indirebilecek kontrol faktörlerinin belirlenmesi,
- İstatistiksel tahminlerde minimum düzeyde hata yapılması,
- Kontrol edilemeyecek olan faktörlerin etkisini minimum düzeye indirgeyecek faktörlerin belirlenmesi,
- Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanmasının kolay olması,
- Analiz sonuçlarının gerçekte elde edilebilirliğinin sağlama alınması olarak özetlenebilir.

Deneysel tasarım, uygulanacak olan deneylerin planlanmasında etkin bir çözüm yöntemi olmasının yanı sıra geçerli ve tarafsız bilgiye en kısa sürede ulaşılmasını sağlamaktadır [80, 81]. Tek faktör optimizasyonundaki dezavantaj ise araştırma ile ilgili yapılması gereken deney sayısının artmasıdır. Deney sayısının artması sonucunda ise süre, materyal ve kimyasal madde tüketimi de artmaktadır. Bu sorunun giderilmesi için de analitik prosedürlerin optimizasyonu çok değişkenli istatistiksel tekniklerin kullanılması ile gerçekleşmektedir. Analitik optimizasyon için kullanılacak olan çok değişkenli istatistiksel tekniklerden en ideali Yüzey Yanıt Metodudur (RSM) [77]. RSM birçok farklı değişkenlerin, bağımlı olan değişkenin değerini optimize etmek amacıyla istatistiksel ve matematiksel tekniklerin birlikte kullanılmasına olanak sağlayan bir yöntemdir. RSM’de bağımlı değişkenler yanıt olarak değerlendirilirken, bağımsız değişkenler ise faktör olarak değerlendirilir. RSM, yanıtın çok sayıda faktörden etkilendiği işlemlerin analizinde, modellemesinde ve optimizasyonunda kullanılmaktadır [82, 83].

Mikroekstraksiyon çalışmalarında etkili parametreleri belirlemek ve performans iyileştirmesini gerçekleştirmek için RSM’ye dayalı taguchi, tam faktöriyel tasarım, merkezi kompozit tasarımlar (CCD) ve Box-Behnken tasarımları (BBD) gibi deneyel tasarım yöntemleri kullanılmaktadır [84]. Deney tasarımında istatistiksel olarak faydalı bir yöntem olan RSM’nin en sık kullanılan

optimizasyon modelleri, CCD ve Box-Behnken tasarımıdır [82]. Ayrıca tek değişkenli optimizasyon stratejisine göre bu yöntemler optimizasyon adımını daha az deneme ile tamamlamada ve parametreler arasındaki etkileşimi açıklamada yardımcı olmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı optimizasyon basamağında deneysel tasarımın uygulandığı çalışmalar son yıllarda artış göstermiştir [84].

1.7.1 Merkezi kompozit tasarım

CCD ikinci dereceden tasarımlarda en çok kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir [85]. CCD, deney içerisinde optimum değerlerin bulunması amacıyla kullanılır [81].

Tasarım, iki-seviyeli deneyler için tanımlanmış birden fazla faktörlü deneyler tam veya kesirli deneyler şeklinde oluşturulabilir. Kesirli deneylerde Çözüm-V oluşmaktadır. k ; faktöriyel noktalar olmak üzere CCD, Şekil 1.5’de gösterildiği gibi deneyin oluşturulacağı noktalar $2k$ sayıda ekseninde, 2^k sayıda küp noktasında ve n_c sayıda merkez noktasında meydana gelmektedir [80, 86].

Çizelge 1.4 CCD’in deney noktaları [86]

X_1	X_2		X_K	
-1	-1		-1	2^k çok etkenli deneye ait nokta (küp noktaları)
-1	-1		1	
-1	1		-1	
-1	1		1	
1	-1		-1	
1	-1		1	
1	1		-1	
1	1		1	
$-\alpha$	0		0	$2k$ eksen noktası
α	0		0	
0	$-\alpha$		0	
0	α		0	
.	.		.	
.	.		.	
.	.		.	
0	0		$-\alpha$	
0	0		α	n_c merkez noktası
0	0		0	
0	0		0	
0	0		0	

Modelde bulunan faktörlerin minimum iki düzeyli olma zorunluluğu vardır. Oluşturulmak istenen bu ikinci dereceden modelin ana etkileri ve birinci dereceden interaksiyon etkileri 2k denemesinden elde edilirken, merkez noktaların yardımı ile sistemin eğriselliği test edilmiş olur. Eksen noktaları yardımıyla modelde yer alan karesel terimler tahmin edilir [80, 86, 87].

CCD’de deney sayısı aşağıdaki formülle belirlenir;

$$N = 2^k + 2k + n_c \quad (2)$$

N: Deney sayısı,

k: Faktör sayısı,

n_c: Merkez noktada yapılan tekrar deneylerinin sayısını belirtmektedir [88].

1.8 Analitik Parametreler

Analitik bir prosedürün doğruluğunu kanıtlamak için yapılan validasyon çalışmaları, laboratuvarda uygulanan prosedürde metot ve yöntem performansına yönelik ihtiyaçların karşılanması için tespit edilen işlemdir [89]. Geliştirilen yöntemin validasyon parametreleri seçilen optimum koşullarda belirlenir. Araştırılacak validasyon parametreleri ve onların nasıl hesaplanacağı aşağıdaki formüller ile açıklanmıştır.

Doğrusal aralık: Analitin derişimi ile ortaya çıkan analitik sinyal arasındaki korelasyonun bir ölçüsüdür. Bu parametre, SDZ’nin farklı derişimlerdeki standart çözeltisinin model çözeltilere veya matriks uyumlu çözeltilere eklenmesi ve buna göre değişen analitik sinyalin kaydedilmesiyle belirlenir.

Tespit limiti (LOD): Analitik kalibrasyon eğrisinin niceliksel sınırları dışındaki en düşük derişimdir. Bu parametre aşağıdaki denklemden hesaplanır.

$$LOD = 3 \times s_{k\ddot{o}r}/m \quad (3)$$

Burada S_{kör}, kör çözeltinin tekrarlanan ölçümlerin standart sapmasıdır; m, kalibrasyon eğrisinin eğimidir.

Tayin limiti (LOQ): Analitin doğru ve kesin olarak belirlenebildiği en düşük derişim olarak tanımlanır. Bu parametre aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanır.

$$LOQ = 10 \times s_{k\ddot{o}r}/m \quad (4)$$

Burada $S_{k\ddot{o}r}$, kör çözeltilerin tekrarlanan ölçümlerin standart sapmasıdır; m, kalibrasyon eğrisinin eğimidir.

Bağıl standart sapma (BSS): Analitik bir yöntemin kesinliğini ifade eder. Aynı şekilde elde edilen tekrarlı sonuçlar arasındaki uyumun ölçüsüdür. Analitik yöntemde genel olarak BSS'nin %5'ten az olması istenir. BSS'yi hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılır.

$$BSS(\%) = [s/\bar{x}] \times 100 \quad (5)$$

Burada s, analitik veri setinin standart sapması ve $\bar{x}$, bu veri setinin ortalamasıdır.

Zenginleştirme faktörü (EF): Geliştirilen analitik yöntem kullanılarak analitin derişiminin kaç kat artırıldığını gösterir. EF'yi hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılır.

$$EF = C_{\ddot{O}l\ddot{c}üm}/C_{Başlangıç} \quad (6)$$

Burada $C_{\ddot{O}l\ddot{c}üm}$, mikroekstraksiyondan sonra ölçülen fazdaki SDZ derişimidir ve $C_{Başlangıç}$, SDZ'nin başlangıç solüsyonundaki derişimidir.

Ön derişirme faktörü (PF): Bu değer başlangıçtaki numune hacminin final hacme oranından hesaplanır. PF'yi hesaplamak için formül aşağıda verilmiştir.

$$PF = V_{Başlangıç\ Hacim}/V_{Final\ Hacim} \quad (7)$$

Burada $V_{Başlangıç\ Hacim}$, başlangıçtaki numune hacmi ve $V_{Final\ Hacim}$, zenginleştirmeden sonraki final hacmidir.

Geri kazanım (%): Yöntemin doğruluğunu araştırmak için kullanılır ve geri kazanım aşağıdaki formüle göre hesaplanır;

$$Geri\ Kazanım\ (\%) = [(C_{Bulunan} - C_{Örnek})/C_{Eklenen}] \times 100 \quad (8)$$

Burada $C_{Eklenen}$, ekstraksiyondan önce model çözeltisine eklenen standart SDZ derişimini ifade eder; $C_{Bulunan}$, analitik yöntemin uygulanması sonucunda bulunan SDZ derişimini ifade eder ve $C_{Örnek}$, ekleme öncesinde numune çözeltisindeki SDZ miktarının belirlenmesini ifade eder.

Matriks etkisi: Farklı türlerin varlığında analit için analitik yöntemin seçiciliğini ifade etmek için kullanılır. Bu faktör aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$Matris\ Etkisi = [m_1/m_2] \times 100 \quad (9)$$

Burada m_1 , model çözümlerinin kalibrasyon grafiğinin eğimidir ve m_2 , matriks uyumlu kalibrasyon çözümlerinin eğimidir.

Sağlamlık: Deneysel çalışmaların laboratuvar ortamından kaynaklı birtakım küçük sapmaların ve bunların analiz sonuçları üzerindeki etkisini inceler. Unsurların tanımlanmasının ardından, her unsur üzerinde küçük değişiklikler uygulanır. Elde edilen sonuçları önemli derecede etkileyen unsurların metot protokolünde açıklayıcı biçimde tanımlanması gerekmektedir. Metot parametrelerinde rutin işlemler uygulanırken küçük değişikliklerin analiz sonucuna etkisi ne kadar az ise uygulanan metot da o kadar sağlamdır [89, 90].

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Cihazlar

Spektrofotometrik analiz için 500 µL kuvars hücreli (Fisher, Almanya) bir Ultraviyole-Görünür Spektrofotometri (UV-VIS) (Shimadzu, 1800 model, Kyoto, Japonya) kullanıldı. Düşük viskoziteli hidrofobik DES'leri dağıtmak için bir ultrasonik banyo (SK5210LHC Kudos, Şangay, Çin) kullanıldı. Faz ayrımını sağlamak için santrifüj (320R model Universal Hettich, Londra, BK) kullanıldı. Çözeltilerin pH'ını ayarlamak amacıyla bir dijital pH metre (Sartorius Docu-model, Kuzey Amerika) kullanıldı. Optimizasyon adımı, bir istatistiksel paket yazılım sürümü (Design-Expert 12.0.1, Stat-Ease, Minneapolis) kullanılarak gerçekleştirildi. Ultra saf su, Direct-Q3 UV Millipore sistemi (Molsheim, Fransa) ile elde edildi.

2.2 Kimyasallar

Tüm kimyasallar analitik sınıftaydı ve daha fazla saflaştırılmadan kullanıldı. Düşük viskoziteli hidrofobik DES'lerin hazırlanması için laurik asit, dekanolik asit, 1-dodekanol ve n-oktil alkol Merck'ten (Darmstadt, Almanya), metil trioktil amonyum klorür [N₈₈₈₁Cl], tetrabutilamonyum bromür [N₄₄₄₄Br] Sigma Aldrich'ten (Steinheim, Almanya) satın alındı. 4-amino-N-piridin-2-il-benzen sülfonamid (SDZ) Merck'ten satın alındı. SDZ'in stok çözeltisi (1000 µg mL⁻¹), 1,01g SDZ'nin metanol içinde çözülmesiyle hazırlandı ve karanlıkta 4 °C'de saklandı. Kalibrasyon/çalışma çözeltileri, bu stok çözeltinin ayrıışık seyreltilmesi ile hazırlandı. Optimizasyon çalışmalarında numune çözeltilerin pH'ı borat, sitrat, fosfat ve Tris tampon çözeltileri kullanılarak ayarlandı.

2.3 Numune Toplama ve Hazırlama

Yöntemin uygulanabilirliğini test etmek için; inek sütü, koyun sütü, tam yağlı süt, yarım yağlı süt, çiçek balı, kestane balı, çam balı, süt tozu, yumurta ve beyaz peynir dahil olmak üzere gıda numunesindeki SDZ'nin ekstraksiyonuna ve tayinine optimize edilmiş SA-DES-LLME yöntemi uygulandı. Tüm numuneler Kasım 2022'de Sivas'taki marketlerden satın alındı. Süt ürünleri, numune hazırlama

yöntemi uygulanana kadar buzdolabında saklandı. Bu numuneler için uygulanan numune hazırlama adımları aşağıda açıklandı [38]. Birinci adımda süt (5 mL), yumurta (10 g) ve peynir numuneleri (10 g) 10 mL asetonitril içeren konik tüplere aktarıldı. İkinci adımda, tüpler 3 dakika 300 rpm’de vortekslendi. Üçüncü adımda, tüpler 5 dakika boyunca 4000 rpm’de santrifüjlendi ve süpernatant fazı diğer konik tüplere aktarıldı. Son olarak dördüncü adımda, konik tüplerin nihai hacimleri su ile 10 mL’ye seyreltildi. Bal numuneleri için numune hazırlama adımları aşağıda özetlendi [91]. Birinci adımda, 10 mL su içeren konik bir tüpe 5 g bal ilave edildi. İkinci adımda, tüpler 3 dakika boyunca 300 rpm’de vortekslendi ve 0,45 milipor filtre kullanılarak filtrelendi. Üçüncü adımda ise, elde edilen çözelti su ile 50 mL’ye seyreltildi.

2.4 Düşük Viskoziteli Hidrofobik DES’lerin Hazırlanması

Bu çalışmada, daha önce bildirilen yöntemle göre düşük viskoziteli hidrofobik DES’ler hazırlandı [92, 93]. HBA olarak N₈₈₈₁Cl, N₄₄₄₄Br ve dekanolik asit, HBD olarak laurik asit, 1–dodekanol ve n–oktil alkol kullanıldı. Hazırlanan DES’lerin kimyasal bileşimi ve fiziksel koşulları Çizelge 2.1’de sunuldu. Uygulanan deneysel adımlar kısaca aşağıdaki gibidir. Birinci adımda, uygun molar oranda HBA ve HBD tartılarak beherlere ilave edildi ve karıştırıldı. İkinci adımda, ısıtma tablasına yerleştirildi ve homojen bir çözelti elde edilene kadar yaklaşık 80 °C’ye ısıtıldı. Son olarak üçüncü adımda, hazırlanan DES’ler bir desikatörde oda sıcaklığına soğutuldu.

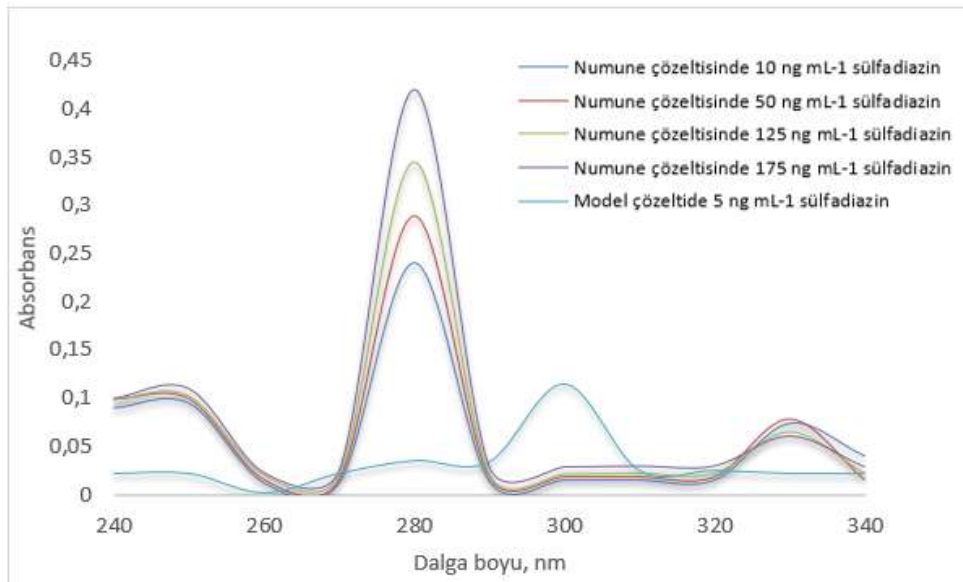
Çizelge 2.1 Hazırlanan düşük viskoziteli hidrofobik DES’lerin bileşimi, kısaltması, molar oranı ve erime noktası

Kısaltma	HBA	HBD	Molar Oran (HBA:HBD)	Erime Noktası (°C)
DES-1	N ₈₈₈₁ Cl	n–oktil alkol	1:2	-81
DES-2	N ₈₈₈₁ Cl	Laurik asit	1:2	15
DES-3	N ₄₄₄₄ Br	1–dodekanol	1:2	1
DES-4	Dekanoik asit	n–oktil alkol	1:2	-55

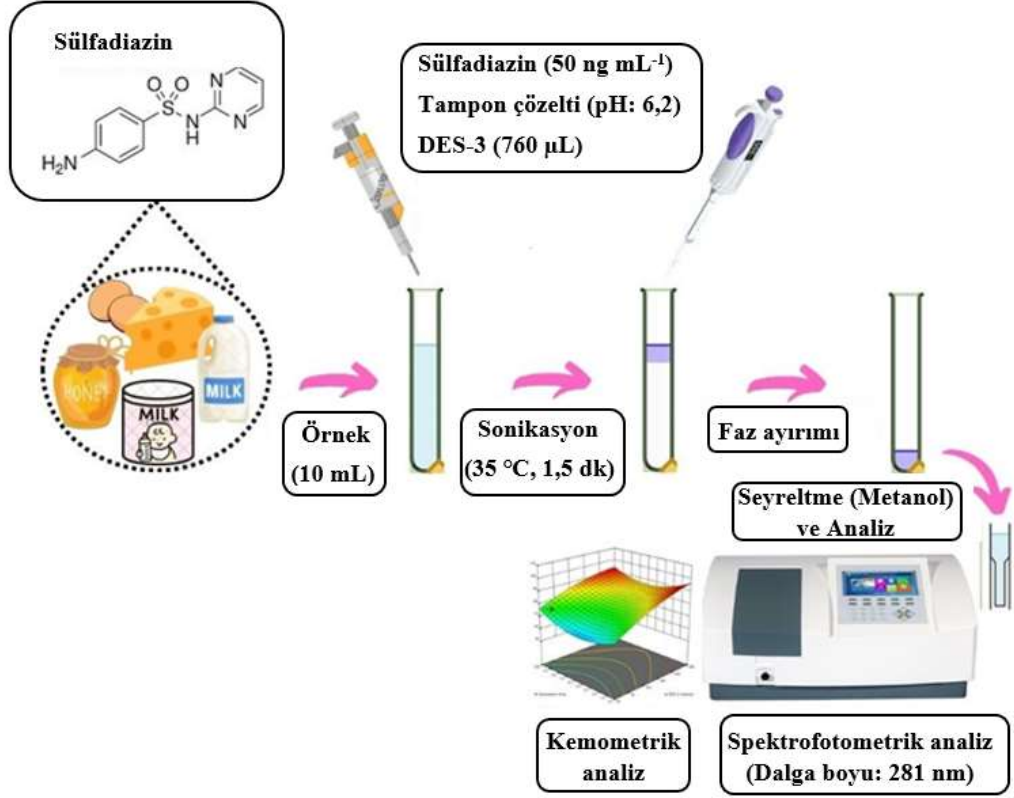
HBA: Hidrojen bağı alıcıları; HBD: Hidrojen bağı vericileri; N₈₈₈₁Cl: Metil trioktil amonyum klorür; N₄₄₄₄Br: Tetrabütülamonyum bromür

2.5 SA-DES-LLME Prosedürü

CCD ile optimizasyondan sonra, SDZ'nin seçici ekstraksiyonu ve tayini için geliştirilen yöntemin deneysel adımları aşağıdaki gibidir. Birinci adımda, bölüm 2.4'te hazırlanan gıda numunelerinin 10 mL'si, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ SDZ içeren konik tüplere eklendi. Numune çözeltisi ikinci adımda, fosfat tampon çözeltisi $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ kullanılarak pH 6,2'ye ayarlandı. Üçüncü adımda, numune çözeltisinden SDZ'nin ekstraksiyonunu sağlamak için ekstraksiyon çözücüsü olarak 760 μL DES-3 (1:2 molar oranında N_{4444}Br ve 1-dodekanol karışımı içerir) elde edilen karışıma ilave edildi. SDZ'nin kantitatif ekstraksiyonunu elde etmek için, eklenen DES-3'ün numune çözeltisinde etkili bir şekilde dağılması gerekir. Bu olayı sağlamak için konik tüpler ultrasonik banyoya yerleştirildi ve 35°C 'de 1,5 dakika sonike edildi. Bu aşamada bulanık bir çözelti oluşturuldu ve oda sıcaklığında yaklaşık 1 dakika sonra sulu çözeltinin üzerine SDZ içeren DES fazı toplandı. Sulu kısım bir mikro şırınga kullanılarak boşaltıldı ve kalan DES fazının son hacmi metanol ile 500 μL 'ye tamamlandı. Son olarak elde edilen faz küvete alınıp, UV-VIS spektrofotometreye yerleştirildi ve λ 281 nm'de kör numuneye karşı absorbans ölçümleri alındı. Çalışmalardan elde edilen UV spektrumları Şekil 2.1'de sunuldu. Ayrıca, yöntemin deneysel şeması Şekil 2.2'de sunuldu.



Şekil 2.1 SA-DES-LLME prosedürünün optimal koşulları altında gerçek bir numuneden ekstrakte edilen SDZ için farklı derişimlerde UV spektrumu.



Şekil 2.2 Yöntemin deneysel şeması.

2.6 Optimizasyon Stratejisi

Birincil amaç, mümkün olduğunca az deneyle SDZ ekstraksiyonunu etkileyen önemli faktörleri optimize etmektir. Ön deneyler ışığında, SDZ ekstraksiyonu için önemli parametreler olarak pH, DES-3 hacmi, sonikasyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığı gibi değişkenler seçildi. Bu değişkenlerin optimizasyonu için dört faktörlü ve beş seviyeli CCD uygulandı. Dikkate alınan değişkenler pH (4–10), DES-3 hacmi (200–800 µL), sonikasyon süresi (1–10 dakika) ve ekstraksiyon sıcaklığı (25–50 °C) idi. Oluşturulan CCD tasarımı hakkında ayrıntılı bilgi Çizelge 2.2’de sunuldu. Değişkenlerin optimizasyonu için 6’sı merkez olmak üzere toplam 30 deney yapıldı. Dört değişken için optimum koşullar ve bu değişkenler arasındaki etkileşimler belirlendi. Değişkenlerin optimizasyonu aşağıdaki ikinci dereceden modele uyuyordu.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad (10)$$

Burada, analitik sonuç (Y), değişkenler (X_1 , X_2 ve X_3), ikinci dereceden katsayılar (β_{11} , β_{22} ve β_{33}), doğrusal katsayılar (β_1 , β_2 ve β_3), etkileşim katsayıları (β_{12} , β_{13} ve β_{23}) ve (β_0) bir sabittir.

Çizelge 2.2 SA-DES-LLME prosedürü için CCD modellemesi

Parametreler	Sembol	Birim	Seviyeler				
			Düşük	Orta	Yüksek	$-\alpha$	$+\alpha$
pH	A		4	7	10	3,4	10,6
DES-3 hacmi	B	μL	200	500	800	140	860
Sonikasyon süresi	C	dk	1	5,5	10	0,1	10,9
Ekstraksiyon sıcaklığı	D	$^{\circ}\text{C}$	25	67,5	50	22,5	52,5

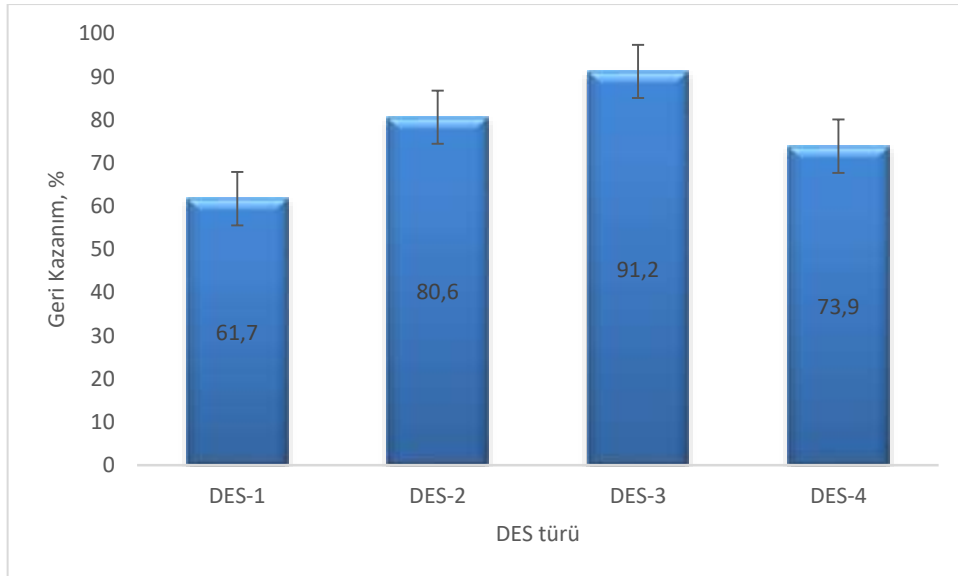
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 Ön Çalışmalar

Deneyisel tasarımdan önce, SA-DES-LLME yönteminin önemli parametrelerini belirlemek için; DES türü ve molar oranı, numune hacmi, karıştırma türü, ekstraksiyon sıcaklığı, pH, sonikasyon süresi ve KCl derişimi gibi ekstraksiyon değişkenleri için ön çalışmalar yapıldı.

3.1.1 Uygun DES seçimi

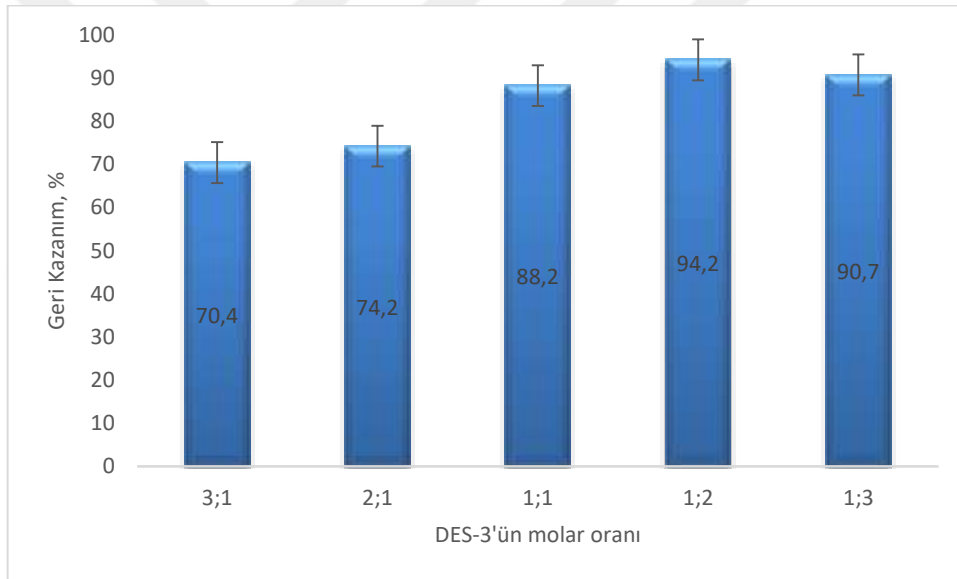
Seçilecek ekstraksiyon çözücüsünün sulu çözeltiden kolayca ayrılması, su ile karışmaması ve analit ile etkileşiminin yüksek olması tercih edilir. Bu bağlamda, SDZ seçici ekstraksiyonu sağlamak için dört farklı DES (Bkz. Bölüm 2.3) hazırlandı. Hazırlanan DES'lerin aynı molar oran (1:2) ve hacimde (400 µL) SDZ geri kazanımı üzerindeki etkisi araştırıldı. DES-1, DES-2, DES-3 ve DES-4 için elde edilen geri kazanımlar sırasıyla %61,7, %80,6, %91,2 ve %73,9 hesaplandı. Sonuçlardan da görülebileceği gibi (Bkz. Şekil 3.1), en iyi SDZ geri kazanımı, N₄₄₄₄Br ve 1–dodekanol karışımından oluşan DES-3'ten elde edildi. Bu nedenle, DES-3, SDZ ekstraksiyonu için uygun ekstraksiyon çözücüsü olarak seçildi.



Şekil 3.1 DES türünün SDZ geri kazanımına etkisi (N=3).

3.1.2 DES'in molar oranının etkisi

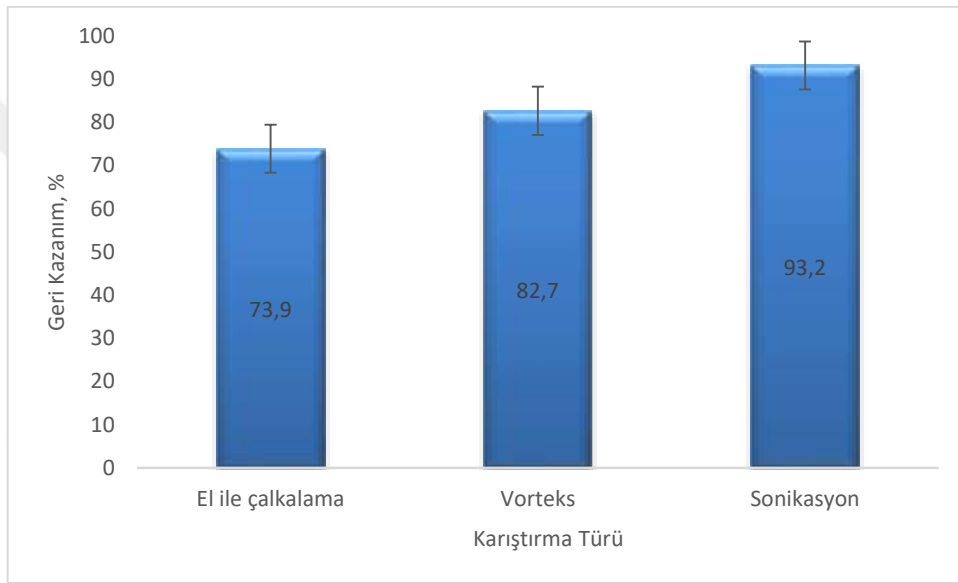
Uygun DES seçildikten sonra, DES'i oluşturan bileşenlerin molar oranı ekstraksiyon etkinliğini değiştirebilir durumdadır. Bu nedenle $N_{4444}Br$ ve 1-dodekanol oluşturan DES-3'ün farklı molar oranlarda karıştırılarak hazırlanan DES-3'ün SDZ'nin geri kazanımı üzerindeki etkisi araştırıldı. Şekil 3.2'deki sonuçlardan da görülebileceği gibi, DES-3'deki 1-dodekanolün molar oranı arttıkça SDZ'nin geri kazanımı artmıştır. Burada, DES-3'teki HBD grubunun molar oranındaki artışa bağlı olarak, hidrojen bağlarının oluşumu kolaylaştırıldığı için SDZ'nin geri kazanımı artmıştır. SDZ maksimum geri kazanımı, $N_{4444}Br$ ve 1-dodekanolün molar oranı 1:2 olduğunda elde edildi. Bu nedenle, sonraki çalışmalar için DES-3'ün molar oranı 1:2 olarak belirlendi.



Şekil 3.2 DES-3'ün molar oranının SDZ'in geri kazanımları üzerindeki etkisi (N=3).

3.1.3 Karıştırma türünün etkisi

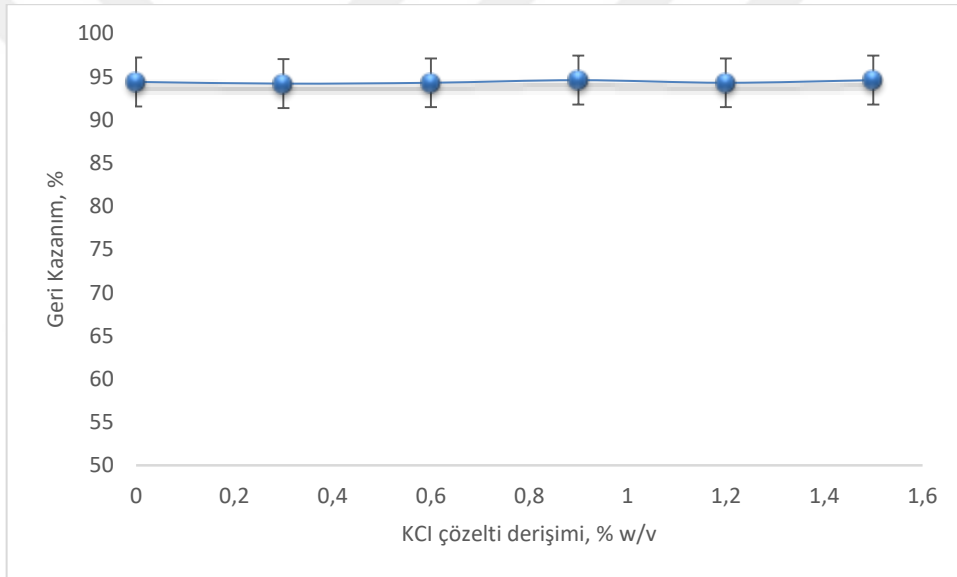
Ekstraksiyon çözücüsü sulu çözeltiye eklendikten sonra, analit ile etkileşimini artırmak için test tüpleri karıştırılmalıdır. Bu nedenle, el ile çalkalama, sonikasyon ve vorteksleme gibi karıştırma türlerinin SDZ geri kazanımına etkisi araştırıldı. Sonuçlar Şekil 3.3’de sunuldu. Her üç karıştırma türünde de elde edilen geri kazanım %70’in üzerinde hesaplandı. SDZ için en uygun geri kazanım, sonikasyon ($\geq 90\%$) uygulanarak elde edildi. Dolayısıyla, sonraki çalışmalar için DES’i sulu çözeltiye dağıtmak için karıştırma türü olarak sonikasyon seçildi.



Şekil 3.3 Karıştırma türü SDZ’in geri kazanımları üzerindeki etkisi (N=3).

3.1.4 KCl derişiminin etkisi

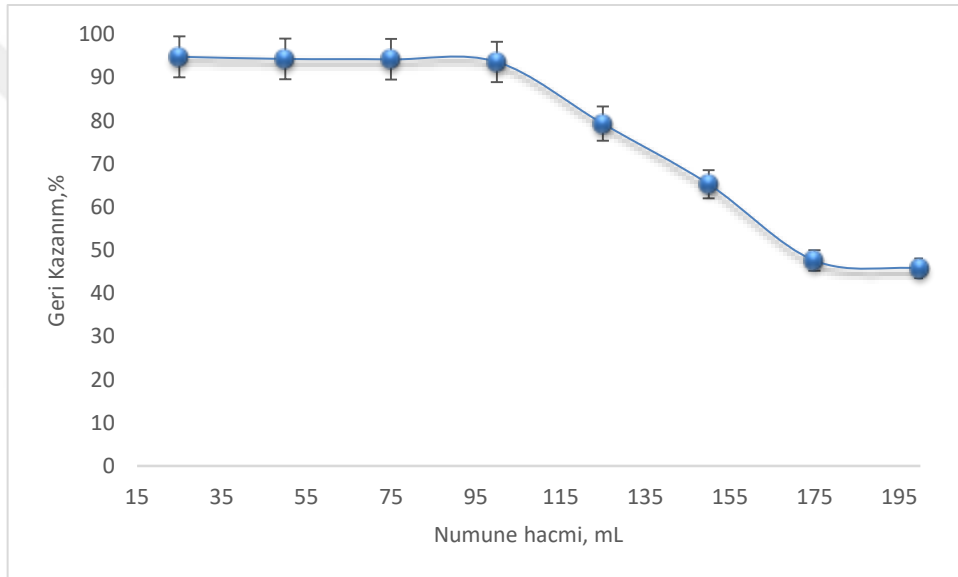
DES'in kullanıldığı çalışmalarda sulu çözeltinin iyonik kuvvetinin artması nedeniyle faz ayrımı kolaylaşabilmektedir. Sulu çözeltideki iyonik kuvvetin arttırılması, moleküller arasındaki iyonik etkileşimlerin artmasına neden olur. Buna bağlı olarak, hedef analitlerle DES'in moleküler etkileşimi artabilir. Açıklanan bu etkileri görmek için sulu çözeltinin iyonik kuvveti KCl çözeltisi ile ayarlandı. Bu kapsamda KCl çözeltisi derişiminin SDZ geri kazanımına etkisi %0 ile %1,5 (w/v) aralığında araştırıldı. Şekil 3.4'deki sonuçlar, artan KCl derişimi ile SDZ'nin geri kazanımının değişmediği gözlemlendi. Bu nedenle, sonraki çalışmalarda KCl çözeltisi kullanılmadı.



Şekil 3.4 KCl derişiminin SDZ geri kazanımları üzerindeki etkisi (N=3).

3.1.5 Numune hacminin etkisi

Numune hacmi, yöntemin önderiştirme faktörünü (PF) hesaplamak için önemli bir parametredir. Çünkü PF, numune hacminin ekstraksiyondan sonra elde edilen nihai hacme oranından hesaplanır. Bu gerçekler ışığında numune hacminin SDZ'in geri kazanımı üzerindeki etkisi 10 mL ile 200 mL arasındaki hacim aralığında araştırıldı (Bkz. Şekil 3.5). Numune hacmi 10 mL–100 mL aralığında olduğunda SDZ'nin geri kazanımı kantitatifti. Bununla birlikte, 100 mL'den büyük numune hacimlerinde SDZ geri kazanımında ciddi bir düşüş oldu. Nihai hacim 0,5 mL olduğundan, yukarıdaki tanım gereği PF 200 olarak hesaplandı.



Şekil 3.5 Numune hacminin SDZ geri kazanımları üzerindeki etkisi (N=3).

3.2 CCD ile Önemli Parametrelerin Optimizasyonu

Ön deneylerden elde edilen verilere dayanarak, optimizasyon adımı için pH, DES-3 hacmi, sonikasyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığı önemli değişkenler olarak seçildi. CCD'ye dayalı deney tasarımı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1'de sunuldu. Tüm çalışmalar üç tekrar halinde gerçekleştirildi. Çalışmalardan elde edilen veriler ışığında ANOVA analizi, değişkenlerin SDZ ekstraksiyonu üzerindeki etkisi ve optimum değerleri içeren açıklamalar aşağıda detaylandırıldı.

Çizelge 3.1 SDZ ekstraksiyonu için CCD tasarımı ve geri kazanım sonuçları

Deney	A	B (μ L)	C (dk)	D (°C)	Geri Kazanım, (%)	
					Deneysel	Tahmin edilen
1	7	500	5,5	37,5	74,1	74,67
2	7	860	5,5	37,5	81,2	81,21
3	7	500	5,5	22,5	73,3	72,99
4	10,6	500	5,5	37,5	48,2	48,80
5	10	200	1	25	60,8	60,64
6	10	200	10	50	46,2	46,15
7	7	500	5,5	37,5	74,6	74,67
8	10	200	10	25	57,3	57,37
9	7	500	10,9	37,5	87,2	87,10
10	7	140	5,5	37,5	68,9	68,88
11	10	800	1	25	77,3	77,13
12	4	200	1	25	71,8	71,87
13	7	500	5,5	37,5	74,9	74,67
14	7	500	5,5	52,5	66,8	67,10
15	4	200	10	25	81,7	81,92
16	10	800	10	25	66,1	66,19
17	4	800	1	50	79,2	78,80
18	10	800	10	50	61,6	61,19
19	4	800	10	50	73,6	74,10
20	7	500	5,5	37,5	75,2	74,67
21	4	200	1	50	66,8	67,05
22	4	800	1	25	77	77,39
23	7	500	5,5	37,5	74,3	74,67
24	10	800	1	50	79,1	79,22
25	4	800	10	25	79,9	79,77
26	3,4	500	5,5	37,5	63,9	63,29
27	4	200	10	50	70,2	70,03
28	7	500	0,1	37,5	91,8	91,89
29	7	500	5,5	37,5	74,9	74,67
30	10	200	1	50	56,7	56,50

3.2.1 ANOVA sonuçları

Gıda numunelerinde SDZ ekstraksiyonu için oluşturulan CCD'den elde edilen sonuçların güvenilirliği ANOVA sonuçları ile değerlendirildi. ANOVA sonuçları Çizelge 3.2'de sunuldu. İlk değerlendirme p-değeri ile yapılmalıdır, çünkü oluşturulan modelin veya değişkenlerin SDZ ekstraksiyonu için anlamlı olması gerektiğinden dolayı p-değerinin % 95 güven düzeyinde 0,05'ten az olması gerekir. Bu bağlamda CCD modelinin, p değeri < 0,0001 olduğu için anlamlıdır. Ayrıca AD (p-değeri: 0,1402) ve B² (p-değeri: 0,1902) etkileşimleri dışında tüm doğrusal, ikili ve karesel etkileşimler anlamlıydı. Değişkenlerin oluşturulan CCD'ye katkısını değerlendirmek için F-değerleri dikkate alınır. Bu bağlamda, F-değeri ne kadar büyük olursa, oluşturulan CCD'ye katkı o kadar yüksek olur. Bu açıklamalara dayanarak; doğrusal, ikili ve karesel etkileşimlerde kurulan CCD'ye en çok katkıda bulunan değişkenler sırasıyla A (F-değeri: 3660,95), AC (F-değeri: 945,32) ve A² (F-değeri: 4615,17) idi. Belirsiz hataların sonuçlara etkisini değerlendirmek için Lack of Fit p-değeri dikkate alınır. Bu bağlamda belirsiz hataların sonuçlara etkisinin anlamsız olması için bu p-değerinin 0,05'den büyük olması gerekir. Yapılan bu açıklamalar Çizelge 3.2'deki sonuçlarla değerlendirildiğinde yöntemin belirsiz hatalarının (Lack of Fit, p-değeri:0,4657) sonuçlara etkisinin önemsiz olduğu görülür. Son olarak, optimize edilmiş değişkenlerin SDZ'nin geri kazanımı üzerindeki etkisi aşağıdaki ikinci dereceden denklem kullanılarak açıklandı.

$$\begin{aligned} \text{Geri Kazanım (\%)} = & +74,67 - 6,03A + 5,14B - 1,99C - 2,45D + \\ & 2,74AB - 3,33AC + 0,1688AD - 1,92BC + \\ & 1,56BD - 1,77CD - 12,93A^2 + 0,2609B^2 + \\ & 10,30C^2 - 3,21D^2 \end{aligned} \quad (11)$$

Elde edilen sonuçların güvenilirliği ve oluşturulan CCD'nin tahmin gücü R² değerleri (düzeltilmiş-R², tahmin edilen-R²) ile açıklandı. Burada R² değerinin 1'e yakın olması sonuçların güvenilirliği açısından istenmektedir. Çizelge 3.3'deki sonuçlardan R² değerinin 0,9991 olduğu görülür. Düzeltilmiş-R², modele katkıda bulunan etkileşimler dikkate alınarak hesaplandı. Modele katkı sağlamayan etkileşimler modelden çıkarılırsa düzeltilmiş-R² değeri yükselir. Düzeltilmiş-R² (0,9983) istenilen düzeyde olduğu için modele katkı sağlayamayan AD ve B² etkileşimleri kaldırılmadı. Yeterli hassasiyet, sinyal-gürültü oranıdır ve anlamlı sonuçlar için bu değerin 4'ten büyük olması gerekir. Sonuçlar, kurulan CCD'nin

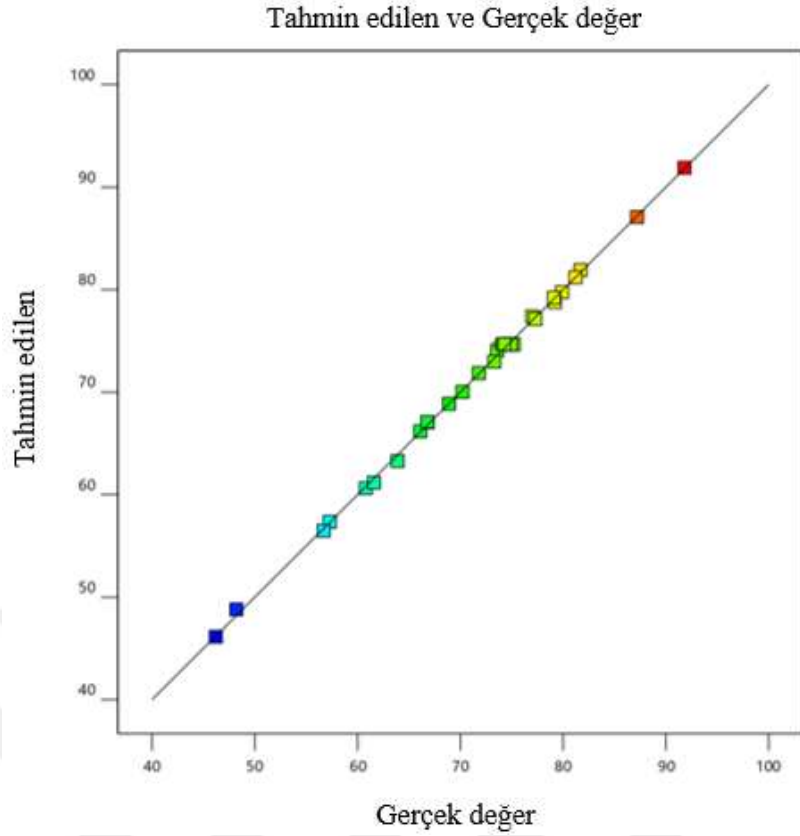
yeterli hassasiyete sahip olduğunu gösterdi (Yeterli hassasiyet: 149,2508). İstatistiksel değerlendirmede, varyasyon katsayısı (% C.V.) 20'den az olmalıdır. %C.V. 0,6091 olduğu için çalışmamızdaki sonuç istatistiksel açıklamayı desteklemektedir. Ayrıntılı veriler Çizelge 3.3'de sunuldu. Oluşturulan CCD'nin tahmin değerleri ile deneysel sonuçlar arasındaki uyum (Bkz. Şekil 3.6) kalite parametreleri için elde edilen sonuçların güvenilirliğini destekledi.

Çizelge 3.2 Mikroekstraksiyon adımının optimizasyonu için ikinci dereceden modelin ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	df	Ortalama Kare	F-değeri	p-değeri	
Model	3126,26	14	223,30	1188,89	< 0,0001	Anlamlı
A	687,62	1	687,62	3660,95	< 0,0001	
B	498,97	1	498,97	2656,58	< 0,0001	
C	74,96	1	74,96	399,10	< 0,0001	
D	113,54	1	113,54	604,51	< 0,0001	
AB	120,45	1	120,45	641,29	< 0,0001	
AC	177,56	1	177,56	945,32	< 0,0001	
AD	0,4556	1	0,4556	2,43	0,1402	
BC	58,91	1	58,91	313,62	< 0,0001	
BD	38,75	1	38,75	206,31	< 0,0001	
CD	50,06	1	50,06	266,50	< 0,0001	
A ²	866,85	1	866,85	4615,17	< 0,0001	
B ²	0,3529	1	0,3529	1,88	0,1906	
C ²	549,31	1	549,31	2924,59	< 0,0001	
D ²	53,44	1	53,44	284,52	< 0,0001	
Lack of Fit	1,96	10	0,1964	1,15	0,4657	Anlamsız

Çizelge 3.3 CCD'nin kalite parametrelerinin sonuçları

Std. Dev.	0,4334	R ²	0,9991
Yeterli Hassasiyet	149,2508	Düzeltilmiş R ²	0,9983
Değişim Katsayısı (% C.V.)	0,6091	Tahmin edilen R ²	0,9958

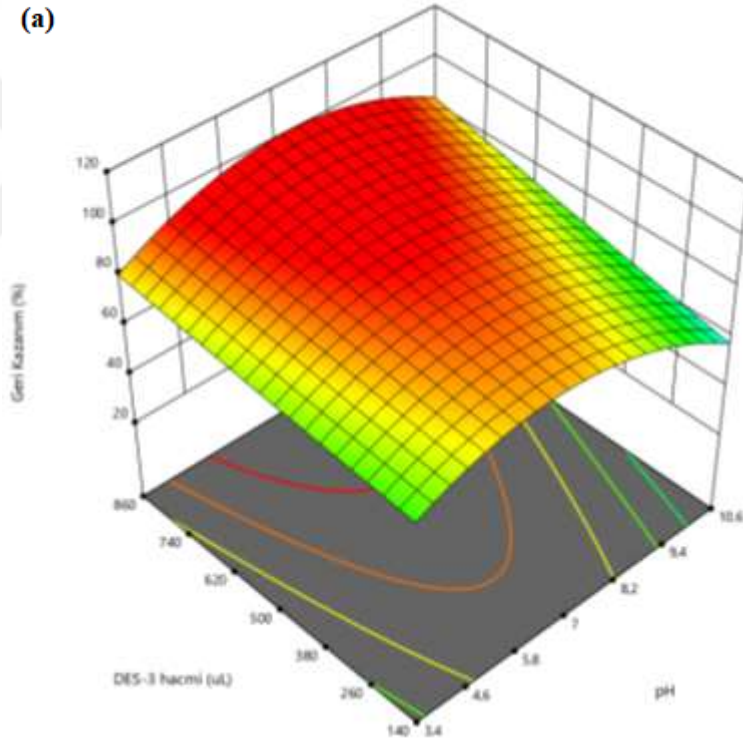


Şekil 3.6 Deney sonuçları ile CCD’ın tahmin edilen değerleri arasındaki uyum.

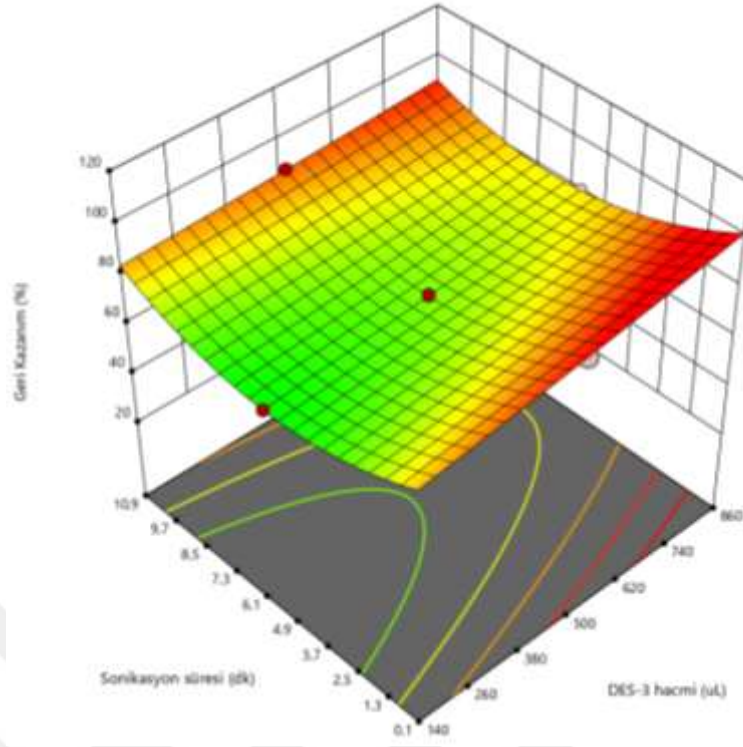
3.2.2 Yüzey yanıt grafikleri

İkili etkileşimlerin SDZ geri kazanımı üzerindeki etkisi, üç boyutlu yüzey yanıt grafikleri çizilerek değerlendirildi. Şekil 3.7a, DES-3 hacmi ve pH arasındaki etkileşimin SDZ geri kazanımı üzerindeki etkisini göstermektedir. SDZ’nin geri kazanımı, özellikle pH asidik ($\leq 5,8$) ve bazik ($8,2 \geq$) bölgelerde ve düşük DES hacimlerinde ($\leq 320 \mu\text{L}$) düşüktür. Asidik ve bazik bölgelerde DES-3 molekülleri arasındaki etkileşimin yetersiz olmasından dolayı SDZ’nin geri kazanımı azalmıştır. Şekil 3.7b, sonikasyon süresi ile DES-3 hacmi arasındaki etkileşimin SDZ’nin geri kazanımı üzerindeki etkisini göstermektedir. Genel olarak sonikasyon, DES-3 moleküllerinin numune çözeltisinde etkili bir şekilde dağılmasını sağlar. Şekil 3.7b’den $700 \mu\text{L}$ DES-3 hacminde ve düşük sonikasyon sürelerinde ($\leq 2\text{dk}$) kantitatif geri kazanımların sağlandığı görüldü. Düşük DES-3 hacimlerinde ($\leq 500 \mu\text{L}$), neredeyse tüm sonikasyon zamanlarında kantitatif geri kazanımlar sağlanamadı. Bunun ana nedeni, SDZ ekstraksiyonu için eklenen DES-3 miktarının yetersizliğidir. Şekil 3.7c, ekstraksiyon sıcaklığı ile DES-3 hacmi arasındaki etkileşimin SDZ geri kazanımı üzerindeki etkisini göstermektedir.

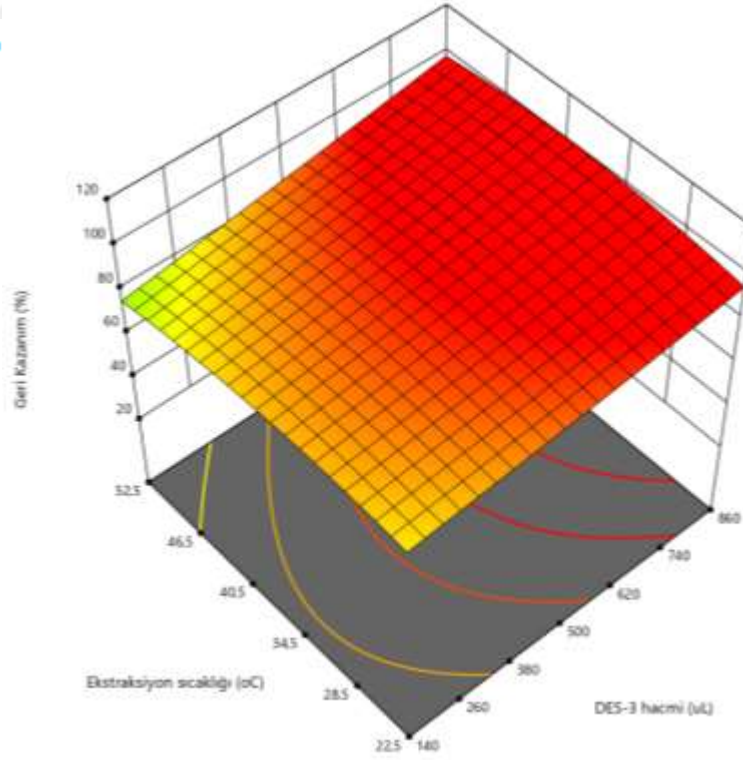
Ekstraksiyon sıcaklığı 40 °C'nin üzerinde olduğunda, hemen hemen tüm DES hacimlerinde SDZ geri kazanımı azaldı. Bu azalmanın muhtemel nedeni, sıcaklıktaki artışla birlikte SDZ'in DES-3 moleküllerine ekstraksiyonundaki azalmadan kaynaklanıyordu. SDZ için kantitatif geri kazanımlar özellikle 30–40 °C ekstraksiyon sıcaklık aralığında ve 700 µL DES-3 hacminin üzerinde gözlemlendi. Şekil 3.7d, ekstraksiyon sıcaklığı ile sonikasyon süresi arasındaki etkileşim SDZ'in geri kazanımı üzerindeki etkisini göstermektedir. Kantitatif geri kazanım, sonikasyon süresi 2 dakikadan az ve ekstraksiyon sıcaklığı 35 °C'ye kadar elde edildi. Ayrıca, sonikasyon süresi arttıkça, SDZ'nin geri kazanımı hemen hemen tüm sıcaklıklarda azaldı.



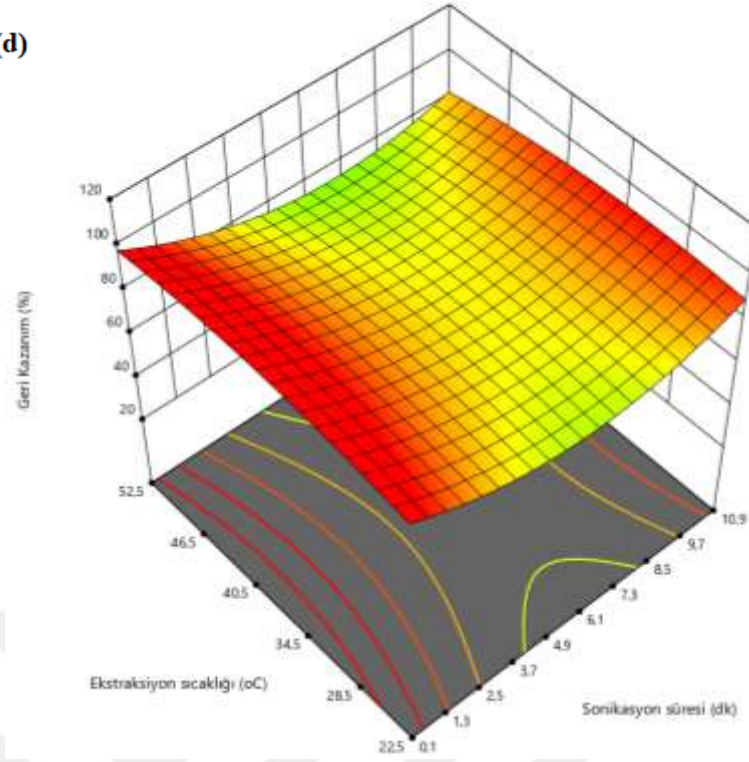
(b)



(c)



(d)



Şekil 3.7(a-d) SDZ'nin geri kazanımına ikili etkileşimlerin, etkisini gösteren yüzey yanıt grafikleri: (a) DES-3 hacmi ve pH; (b) Sonikasyon süresi ve DES-3 hacmi; (c) Ekstraksiyon sıcaklığı ve DES-3 hacmi; (d) Ekstraksiyon sıcaklığı ve süresi.

3.2.3 Parametrelerin optimum değerleri

Çalışma parametrelerinin optimum değerleri belirlenirken SDZ'nin geri kazanımının nicel ve maksimum olması hedeflendi. Bu bağlamda, CCD modellemesi pH, DES-3 hacmi, sonikasyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığı sırasıyla 6,2, 760 μ L, 1,5 dakika ve 35 °C olduğunda SDZ'nin geri kazanımı %93,8 olarak tahmin etmiştir. Bu değerler kullanılarak yapılan 5 tekrarlı deneysel çalışma sonucu SDZ'nin geri kazanımı %92,4 olarak hesaplandı. Deneysel sonuçlar ve CCD modelinin tahmin değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi. Bu nedenle değişkenler için, bu değerler daha sonraki çalışmalar da optimum olarak seçildi.

3.3 Analitik Performans

Optimize edilmiş SA-DES-LLME yönteminin analitik performansını test etmek için kalibrasyon denklemi, regresyon katsayısı (R^2), doğrusal derişim aralığı, LOD, LOQ, ekstraksiyon geri kazanımı, %BSS, sağlamlık, seçicilik, EF ve PF optimum koşullar altında araştırıldı. Model çözeltiler üzerinde tekrarlanan çalışmalardan, SDZ için doğrusal derişim aralığı, 0,992 R^2 ile 2–250 ng mL⁻¹ aralığında bulundu. Kalibrasyon denklemi $A = 0,0127 [\text{SDZ, ng mL}^{-1}] + 0,009$ bulundu. LOD ve LOQ, sırasıyla 0,6 ng mL⁻¹ ve 0,2 ng mL⁻¹ olarak hesaplandı. Ekstraksiyon geri kazanımı ve %BSS 25 ng mL⁻¹ SDZ derişimi için sırasıyla %96 $\pm$ 3 ve %1,9 olarak hesaplandı. Kapsamlı analitik sonuçlar Çizelge 3.4’te sunuldu.

Çizelge 3.4 Optimize edilmiş SA-DES-LLME-UV/VIS yönteminin analitik performansı

Parametreler	Optimum Değerler
Kalibrasyon denklemi	$A=0,0127 [\text{SDZ, ng mL}^{-1}]+0,009$
R^2	0,992
Doğrusal derişim aralığı (ng mL ⁻¹)	2–250
LOD (ng mL ⁻¹)	0,6
LOQ (ng mL ⁻¹)	2
Ekstraksiyon geri kazanımı (%)*	96 $\pm$ 3
%BSS*	1,9
EF	142
PF	200

* 25 ng mL⁻¹ SDZ derişiminin beş tekrarlı ölçümü.

3.4 Seçicilik

Mikroekstraksiyon çalışmalarında kantitatif ve kabul edilebilir sonuçlar için hedef analitin numune solüsyonundan seçici ekstraksiyonu sağlanmalıdır. Optimizasyon çalışmaları model çözeltiler üzerinde yapılan deneylerle belirlendiğinden, geliştirilen yöntemin seçiciliği farklı kimyasal türlerin varlığında araştırılmalıdır. Bu gerçeğe dayanarak, SA-DES-LLME yönteminin seçiciliği, farklı anyon ve katyonların varlığında optimize edilmiş koşullar kullanılarak araştırıldı. Bu çalışmada eklenen kimyasal türlerin tolerans sınırı ve bu türlerin varlığında SDZ geri kazanımı ve %BSS değeri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.5’te sunuldu. Özellikle sulfasalazin, sülfatiazol, sülfametoksipiridazin, sülfadoksin ve sülfametoksazol gibi benzer kimyasal türlerin varlığında tolerans sınırı 100 ile 250 aralığındadır. Ayrıca, %BSS 1,5–2,9 aralığında iken, geri kazanım 91 ± 6 – 99 ± 2 aralığındaydı. Bu sonuçlar, SDZ için optimize edilmiş SA-DES-LLME yönteminin yüksek seçiciliğini göstermektedir.

Çizelge 3.5 Farklı türler varlığında 25 ng mL⁻¹ SDZ’nin geri kazanımı, %BSS ve tolerans sınırı (N=3)

Eklenen Türler	Tolerans Sınırı*	BSS (%)	Geri Kazanım (%)
Na ⁺	15000	1,9	99±2
F ⁻	15000	2,2	99±1
CO ₃ ²⁻	15000	2,0	98±3
Cl ⁻	15000	2,4	97±3
K ⁺	10000	1,7	97±4
Ca ²⁺	10000	1,9	97±2
Mg ²⁺	10000	1,5	96±3
SO ₄ ²⁻	5000	2,3	97±3
Al ³⁺	5000	2,4	98±4
Fe ³⁺	2500	2,0	98±2
Pb ²⁺	2500	1,9	97±5
Cu ²⁺	1000	2,2	97±2
Cd ²⁺	1000	2,1	96±3
Mn ²⁺	1000	1,9	98±3
Co ²⁺	500	1,7	97±2
Cr ³⁺	500	2,6	96±4
Sülfasalazin	250	2,4	96±5
STZ	200	1,8	94±5
Sülfametoksipiridazin	200	2,0	95±3
Sülfadoksin	100	2,9	91±4
SMX	100	2,7	91±6

* [Eklenen tür derişimi] / [SDZ derişimi]

3.5 Tekrarlanabilirlik ve Tekrar Üretilirlik

Yöntemin kesinliğini ve doğruluğunu test etmek için tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmaları gerçekleştirildi. Bu çalışmalarda düşük (10 ng mL^{-1}), orta (125 ng mL^{-1}) ve yüksek (200 ng mL^{-1}) derişimlerde SDZ gıda numunelerine ilave edildi. Tekrarlanabilirlik çalışması, eklenen gıda numunelerinin aynı gün içerisinde önerilen yöntemin üç tekrarlı uygulanması ile gerçekleştirildi. Tekrar üretilebilirlik çalışması, eklenen gıda numunelerinin birbirini takip eden üç günde önerilen yöntemin üç tekrarlı uygulanması ile gerçekleştirildi. Yöntemin tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmalarındaki %BSS sırasıyla %2,7–4,1 ve %3,5–4,8 aralığında bulundu. Ayrıca tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmalarında SDZ'nin geri kazanımı sırasıyla %95,7–97,2 ve %92,3–96,9 aralığında bulundu. Ayrıntılı veriler Çizelge 3.6'da sunuldu.

Çizelge 3.6 Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmalarının sonuçları

Eklenen SDZ Derişimi	Tekrarlanabilirlik (N=3)		Tekrar Üretilirlik (N=3x3)	
	Geri Kazanım (%)	BSS (%)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
Düşük (10 ng mL^{-1})	95,7	3,3	92,3	3,5
Orta (125 ng mL^{-1})	96,3	2,7	94,4	4,0
Yüksek (200 ng mL^{-1})	97,2	4,1	96,9	4,8

3.6 Sağlamlık

Sağlamlık, Youden testi ile değerlendirildi [94]. Deneyin sağlamlığını değerlendirmek için, pH (6,5), DES-3 hacmi (800 µL), sonikasyon süresi (2 dakika) ve ekstraksiyon sıcaklığı (40 °C) dahil olmak üzere optimize edilmiş dört faktörde küçük değişiklikler yapılarak SDZ'nin geri kazanımı üzerindeki etkisi araştırıldı. Optimize edilen faktörler çalışma boyunca değiştirilirken diğer faktörler sabit tutuldu. Sağlamlık verilerinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı.

$$SDi = \sqrt{2 \sum \left(\frac{Di}{4} \right)} \quad (12)$$

Bu formülde verilen *SDi*, standart sapma ve *Di*, standart sapmanın toplamıdır.

DeneySEL sonuçlardan elde edilen *SDi* değeri %5,2'den düşüktü, bu da optimize edilmiş SA-DES-LLME yönteminin tekrarlanabilirliğinden önemli ölçüde daha büyük değildi. Optimize edilmiş değişkenlerin küçük varyasyonlarının yöntem performansını önemli ölçüde etkilemediği ve bu nedenle yöntemin tatmin edici bir sağlamlığa sahip olduğu söylenebilir.

3.7 Gıda Numunelerinde Uygulama

Optimize edilmiş SA-DES-LLME yönteminin uygulanabilirliğini test etmek için inek sütü, koyun sütü, tam yağlı süt, yarım yağlı süt, çiçek balı, kestane balı, çam balı, süt tozu, yumurta ve beyaz peynir gibi gıda numunelerinde SDZ tayini yöntemi uygulandı. Optimize edilmiş SA-DES-LLME yöntemi ile gerçek numunelerin analizinde matriks etkisini test etmek için bu gıdalara üç farklı derişimde (10, 125 ve 200 ng mL⁻¹) SDZ eklendi. SDZ eklenen numunelerin analizi üç tekrar halinde gerçekleştirildi. SDZ için elde edilen %BSS ve geri kazanım Çizelge 3.7'de sunuldu. Çizelge 3.7'de geri kazanımın %88±7–98±5 arasında değiştiği görölmektedir. Bu sonuçlar, seçilen gıdaların düşük matriks etkisine sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca elde edilen düşük %BSS değerleri (≤ %3,1) yöntemin gıda numunelerinin analizinde iyi bir kesinlik gösterdi. Bu nedenle, optimize edilmiş SA-DES-LLME yöntemi, gıda numunelerinde SDZ ekstraksiyonu ve tayini için güvenilir bir şekilde uygulanabilir. Analiz edilen gıda örneklerindeki SDZ miktarı yöntemin tespit limitinden daha düşük olduğu için sonuçlarda sadece standart eklenmiş verilen sunuldu.

Çizelge 3.7 Gıda numunelerine uygulanan optimize SA-DES-LLME ile analizi

Gıdalar	Eklenen SDZ (ng mL ⁻¹)	Hesaplanan SDZ (ng mL ⁻¹)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
İnek sütü-1	10	9,3	93±4	2,4
	125	120	96±2	2,8
	200	196	98±5	3,1
İnek sütü-2	10	9,1	91±6	2,3
	125	117,5	94±4	2,6
	200	194	97±3	2,8
Koyun sütü	10	9,4	94±3	1,7
	125	120	96±4	2,1
	200	194	97±1	2,4
Tan yağlı süt	10	9,0	90±5	1,3
	125	116,3	93±3	1,8
	200	192	96±3	2,0
Yarım yağlı süt	10	9,1	91±7	2,3
	125	118,8	95±4	2,6
	200	192	96±5	2,8
Çiçek balı	10	8,9	89±6	1,6
	125	116,3	93±3	1,9
	200	190	95±4	2,4
Kestane balı	10	9,3	93±2	1,9
	125	118,8	95±3	2,3
	200	194	97±4	2,8
Çam balı	10	9,1	91±6	2,3
	125	117,5	94±4	2,6
	200	194	97±3	2,8
Süt tozu	10	9,0	90±5	2,0
	125	117,5	94±4	2,3
	200	192	96±2	2,5
Yumurta	10	8,8	88±7	1,7
	125	115	92±4	2,1
	200	190	95±4	2,6
Beyaz peynir	10	9,2	92±6	2,2
	125	118,8	95±4	2,4
	200	196	98±2	2,8

3.8 Diğer Yaklaşımlarla Karşılaştırma

Optimize edilmiş SA-DES-LLME yönteminin literatüre katkısını değerlendirmek için yöntem, farklı analitik yaklaşımlarla karşılaştırıldı. Doğrusal aralık (2–250 ng mL⁻¹), LOD (0,6 ng mL⁻¹), %BSS (%1,9), PF/EF (200), ekstraksiyon geri kazanımı (96±3) ve ekstraksiyon süresi (1,5 dk) gibi analitik parametreler değerlendirildi. Karşılaştırma verileri Çizelge 3.8’de sunuldu. Özellikle benzer analitik tekniklere göre SA-DES-LLME yöntemi daha geniş çalışma aralığı ve düşük LOD sergiledi. Ayrıca ekstraksiyon süresi diğer yöntemlere göre daha kısaydı. HPLC ve HPLC-MS/MS gibi uzman kullanıcı gerektiren pahalı tekniklere göre optimize edilmiş yöntemle daha düşük %BSS 'si ve kantitatif geri kazanımlar elde edildi.

Çizelge 3.8 Optimize edilmiş SA-DES-LLME yönteminin analitik parametrelerinin, SDZ tayini için bildirilen diğer yöntemlerle karşılaştırılması

Analiz Tekniği	Ekstraksiyon Yöntemi	Doğrusal Aralık (ng mL ⁻¹)	LOD (ng mL ⁻¹)	BSS (%)	PF/EF	Ekstraksiyon Geri Kazanımı	Ekstraksiyon Süresi (dk)	Kaynaklar
UV-VIS	SHS-LPME	15–300	4,5	2,7	150	96 ± 3	7	[39]
UV-VIS	CPE	10–800	2,8	4,7	170	95,1	15	[37]
HPLC	MSPE	1–200	0,3	2,9	–	94,4	40	[95]
HPLC	SHSME	130–5000	40	3,1	3,4	84	17	[96]
HPLC-MS/MS	MI-SPE	1–2500	0,5	3,5	–	63,4–115,7	–	[97]
UV-VIS	DMSPE	30–800	7,8	2,6	200	–	18	[32]
UV-VIS	MSPE	2–50	0,56	2,8	300	–	4	[98]
UV-VIS	SA-DES-LLME	2–250	0,6	1,9	200	96±3	1,5	Mevcut Çalışma

SHS-LPME: Değiştirilebilir hidrofilikliğe sahip solvent bazlı sıvı fazlı mikroekstraksiyon, CPE: Bulutlanma noktası ekstraksiyonu, DMSPE: Dispersif mikro-katı faz ekstraksiyonu, HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, SHSME: Değiştirilebilir hidrofilik solvent bazlı mikroekstraksiyon, HPLC-MS/MS: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi/ Kütle Spektrometrisi, MI-SPE: Moleküler baskılı katı faz ekstraksiyonu.

4. SONUÇ

Bu tez kapsamında SDZ'nin gıda numunelerinde UV–VIS spektrofotometrik tayini öncesi düşük viskoziteli hidrofobik DES'ler kullanılarak basit ve yeşil bir sonikasyon destekli sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi, ilgili numunelerden SDZ'nin ayrılması ve zenginleşmesi için optimize edildi. Optimizasyonda ki en önemli amaç, mümkün oldukça az deney ile SDZ ekstraksiyonunu etkileyen önemli faktörleri optimize etmektir. Bunun için, yeşil analitik kimya ilkelerine uygun olarak, mikroekstraksiyon aşamasında yüksek derecede toksik organik çözücüler yerine çevre dostu düşük yoğunluklu dört farklı DES hazırlandı ve araştırıldı. Bu araştırmalar sonucu SDZ ekstraksiyonu için en uygun ve en iyi geri kazanımı (%91,2) veren ekstraksiyon çözücüsü N₄₄₄Br ve 1–dodekanol karışımından oluşan DES-3 seçildi. Ardından DES-3'ün molar oranının SDZ'nin geri kazanıma olan etkisi araştırıldı ve 1:2 molar optimum değer olarak belirlendi. Geri kazanımı etkileyen diğer bir parametre olan karıştırma türü, ekstraksiyon çözücüsü sulu çözeltiye eklendikten sonra analit ile etkileşimini artırması için test tüpleri el ile çalkalama, vorteksleme ve sonikasyon olmak üzere üç tür yöntem ile değerlendirildi. Bunun sonucunda ise DES-3'ü sulu çözeltiye dağıtmak için karıştırma türü olarak sonikasyon seçildi.

Yöntemin zenginleştirme faktörünü hesaplamak için numune hacmi optimize edildi. Yapılan çalışma sonucunda, 100 mL numune hacminden sonra SDZ'nin geri kazanımı azaldı. Bu bağlamda yüksek PF elde etmek için numune hacmi 100 mL olarak alındı. Final hacim 0,5 mL olduğu için PF 200 olarak hesaplandı. Ön deneylerden elde edilen sonuçlara dayanarak, yöntemi etkileyen pH, DES-3 hacmi, sonikasyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığı CCD yaklaşımı kullanılarak optimize edildi. Bu sayede klasik optimizasyon (tek değişkenli) yaklaşımına göre daha az deney yapıldı ve daha az kimyasal tüketimi sağlandı. Bu da optimizasyon aşamasında maliyet açısından tasarruf sağlandı. Optimizasyon aşamasında elde edilen sonuçların güvenilirliği ANOVA analiziyle değerlendirildi. Yapılan değerlendirme sonucu, SDZ'nin ekstraksiyonu için tasarlanan CCD modellemesi anlamlıdır (p-değeri: < 0,0001). Ayrıca, AD (p-değeri: 0,1402) ve B² (p-değeri: 0,1902) etkileşimleri dışında tüm doğrusal, ikili ve karesel etkileşimler de anlamlıdır. SDZ'nin geri kazanımına en fazla katkı sağlayan parametreleri belirlemek için F-değeri dikkate alındı. Bu bağlamda doğrusal, ikili ve karesel

etkileşimlerden SDZ'nin geri kazanımına en fazla katkı sağlayan parametreler sırasıyla A (F-değeri: 3660,95), AC (F-değeri: 95,32) ve A² (F-değeri: 4615,17) idi. Araştırılan parametrelerin optimum değerleri; pH: 6,2, DES-3 hacmi: 760 µL, sonikasyon süresi: 1,5 dk ve ekstraksiyon sıcaklığı: 35 °C olduğunda SDZ'nin geri kazanımını CCD %93,8 olarak tahmin etmiştir. Yapılan üç tekrarlı çalışma sonucunda, bu optimum değerlerde SDZ'nin geri kazanımı %92,4 olarak hesaplandı. Deneysel sonuç ve tahmin edilen arasındaki yüksek uyum dikkate alınarak, araştırılan parametreler için bu değerler optimum olarak seçildi. Optimize edilmiş SA-DES-LLME yöntemi, geniş çalışma aralığı (2–250 ng mL⁻¹), kantitatif geri kazanım (%88±7–98±5), düşük LOD (0,6 ng mL⁻¹) ve kısa ekstraksiyon süresi (2 dakika) sağlandı. Farklı türler varlığında yöntemin seçicilik çalışması yapıldı, elde edilen nicel geri kazanımlar, düşük %BBS ve yüksek tolerans sınırları yöntemin SDZ için yüksek seçiciliğini gösterdi. Yöntemin kesinliğini değerlendirmek için yapılan tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmalarında %BBS sırasıyla %2,7–4,1 ve %3,5–4,8 aralığında bulundu.

Optimize edilmiş SA-DES-LLME yönteminin gıda numunelerindeki uygulanabilirliğini test etmek için inek sütü, koyun sütü, tam yağlı süt, yarım yağlı süt, çiçek balı, kestane balı, çam balı, süt tozu, yumurta ve beyaz peynir gibi gıda numuneleri kullanıldı. Matriks etkisini test etmek için, SDZ'nin standart derişimleri (10, 125 ve 200 ng mL⁻¹) gıda numunelerine ilave edildi ve geri kazanım çalışması yapıldı. Yapılan çalışma sonucunda, yöntemin geri kazanımı 88±7–98±5 olarak hesaplandı. Gıda numunelerinin analizinden elde edilen sonuçlar, yöntemin gerçek numunelere de uygulanabileceğini gösterdi.

KAYNAKLAR

- [1] Griffith, E.C., Wallace, M.J., Wu, Y., Kumar, G., Gajewski, S., Jackson, P., Phelps, G.A., Zheng, Z., Rock, C.O., Lee, R.E. And White, S.W. 2018. The Structural And Functional Basis For Recurring Sulfa Drug Resistance Mutations In Staphylococcus Aureus Dihydropteroate Synthase. *Frontiers In Microbiology*, 9:1369. Doi:10.3389/Fmicb. 2018.01369.
- [2] Gulçin, İ., & Taslimi, P. (2018). Sulfonamide İnhibitors: A Patent Review 2013-Present. *Expert Opinion On Therapeutic Patents*, 28(7), 541-549.
- [3] Öztürk, H., Yorulmaz, N., Durgun, M., İrak, Z. T., & Sarpün, İ. H. (2021). Determination Of Antibacterial Properties Of Some Sulfonamide Compounds By Molecular Docking. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 16(2), 458-467.
- [4] Ünsal, I. A. (2017). Sütte Ve Ette Sülfonamid Bileşiklerinin Lc-Idms Yöntemiyle Tayini.
- [5] Şirazi, M. (2020). Zeytin Posası (Pirina) Kullanılarak Üretilen Aktif Karbon İle Sulu Çözeltilerden Sülfadiazin Giderimi (Master's Thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [6] Karadeniz, Ş. (2015). Bazı Sülfonamid Türevlerinin Sentezi Ve Karakterizasyonu.
- [7] Özgenç, S. (2011). Chromatographic Determination Of Sulfonamides İn Milk And Honey (Doctoral Dissertation, Deü Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [8] Altıntaş, L. (2006). Ağızdan Kullanılan Bazı Sülfonamid Preparatlarının Broilerlerde Biyoeşdeğerliliği.
- [9] Çelik, S. (2020). Sülfadiazinin Asesülfam Potasyum Varlığında Ve Yokluğunda Zn (Iı), Mn (Iı) Ve Co (Iı) İyonlarıyla Etkileşiminin Voltametrik İncelenmesi (Master's Thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [10] Aygel Örer, A. (2018). Burdur Ve Civarında Yetişen Sığır Etlerinde Bazı Antibiyotik Kalıntıları (Master's Thesis, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- [11] Aslan, G. H. (2008). Çeşitli Sülfonamid Türevleri Ve Bunların Bazı Geçiş Metal Komplekslerinin Sentezi, Antimikrobiyal Etkilerinin İncelenmesi. Gazi Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- [12] Naser, N. A., Alasedi, K. M., & Khan, Z. A. (2018). New Approach For Determination Of Sulfadiazine İn Pharmaceutical Preparations Using 4 (4-Sulphophenylazo) Pyrogallol: Kinetic Spectrophotometric Method. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy*, 201, 267-280.
- [13] Yigen, O. C., (2021). Antibiyotik (Sülfadiazin Ve Enrofloksasin) Etken Maddelerinin Gün Işığına Dayalı Led Fotooksidasyon Prosesleri İle Giderimi (Master's Thesis, Department Of Environmental Engineering).
- [14] Lou, J., An, J., Wang, X., Cheng, M., & Cui, Y. (2024). A Novel Dbd/Vuv/Pms Process For Efficient Sulfadiazine Degradation İn Wastewater: Singlet Oxygen-Dominated Nonradical Oxidation. *Journal Of Hazardous Materials*, 461, 132650.
- [15] Afsharipour, R., Haji Shabani, A. M., Dadfarnia, S., & Kazemi, E. (2020). Selective Fluorometric Determination Of Sulfadiazine Based On The Growth Of Silver Nanoparticles On Graphene Quantum Dots. *Microchimica Acta*, 187, 1-8.
- [16] Özgenç, S. (2011). Chromatographic Determination Of Sulfonamides İn Milk And Honey (Doctoral Dissertation, Deü Fen Bilimleri Enstitüsü).

- [17] **Ertekin Özkan, Z. C.** (2021). Sülfonamidleri İçeren Farmasötik Preparatlardaki Etkin Maddelerin Cevap Yüzey Metodolojisine Dayanan Aşırı Performanslı Sıvı Kromatografisi İle Miktar Tayinleri.
- [18] **Bennett, J. E., Dolin, R., & Blaser, M. J.** (2019). *Mandell, Douglas, And Bennett's Principles And Practice Of Infectious Diseases E-Book: 2-Volume Set*. Elsevier Health Sciences.
- [19] **Tisoğlu, S.** (2016). Ampisilin Ve Sülfadiazin Antibiyotiklerinin Bor Doplanmış Elmas Elektrotlar Kullanılarak Kesikli Sistemde Elektrokimyasal Yöntemle Degradasyonu (Master's Thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [20] **Sun, W., Xiao, G., & Meng, Q.** (2024). Adsorption Of Sulfadiazine On Novel Bilayer Porous Resin: Synergism Of Micropore Filling And Anion Exchange. *Materials Science And Engineering: B*, 299, 117039.
- [21] **Tačić, A., Nikolić, V., Nikolić, L., & Savić, I.** (2017). Antimicrobial Sulfonamide Drugs. *Advanced Technologies*, 6(1), 58-71.
- [22] **Oliveira, C., Meurer, Y. S., Andrade, J., Costa, M. E., Andrade, M., Silva, L. A., ... & Andrade-Neto, V. F.** (2016). Pathogenicity And Phenotypic Sulfadiazine Resistance Of *Toxoplasma Gondii* Isolates Obtained From Livestock In Northeastern Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 111, 391-398.
- [23] **Ovung, A., & Bhattacharyya, J.** (2021). Sulfonamide Drugs: Structure, Antibacterial Property, Toxicity, And Biophysical Interactions. *Biophysical Reviews*, 13(2), 259-272.
- [24] **Ünal, N.** (2012). Bitkisel Ekstraların (Nigella Sativa, Zingiber Officinale) Tek Başına Ve Primetamin-Sülfadiazin İle Birlikte Kullanımının *Toxoplasma Gondii*'ye Karşı İn Vivo Etkisi.
- [25] **Homem, V., & Santos, L.** (2011). Degradation And Removal Methods Of Antibiotics From Aqueous Matrices—A Review. *Journal Of Environmental Management*, 92(10), 2304-2347.
- [26] **Martinez, J. L.** (2009). Environmental Pollution By Antibiotics And By Antibiotic Resistance Determinants. *Environmental Pollution*, 157(11), 2893-2902.
- [27] **De Souza, S. M. L., De Vasconcelos, E. C., Dziedzic, M., & De Oliveira, C. M. R.** (2009). Environmental Risk Assessment Of Antibiotics: An Intensive Care Unit Analysis. *Chemosphere*, 77(7), 962-967.
- [28] **Ajala, O. J., Tijani, J. O., Salau, R. B., Abdulkareem, A. S., & Aremu, O. S.** (2022). A Review Of Emerging Micro-Pollutants In Hospital Wastewater: Environmental Fate And Remediation Options. *Results In Engineering*, 100671.
- [29] **Gilliver, M. A., Bennett, M., Begon, M., Hazel, S. M., & Hart, C. A.** (1999). Antibiotic Resistance Found In Wild Rodents. *Nature*, 401(6750), 233-234.
- [30] **Wang, K., Lin, K., Huang, X., & Chen, M.** (2017). A Simple And Fast Extraction Method For The Determination Of Multiclass Antibiotics In Eggs Using Lc-MS/MS. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 65(24), 5064-5073.
- [31] **Alver, E., Demirci, A., & Özçimder, M.** (2012). Microextraction Methods. *Sigma*, 30, 75-90.
- [32] **Kazemi, E., Dadfarnia, S., Shabani, A. M. H., Abbasi, A., Vaziri, M. R. R., & Behjat, A.** (2016). Iron Oxide Functionalized Graphene Oxide As An Efficient Sorbent For Dispersive Micro-Solid Phase Extraction Of

- Sulfadiazine Followed By Spectrophotometric And Mode-Mismatched Thermal Lens Spectrometric Determination. *Talanta*, 147, 561-568.
- [33] **Özgür, A.** (2021). *Bazı Organik Kirleticilerin Derin Ötektik Çözücülerle Ekstraksiyonu Ve Kromatografik Analizleri* (Master's Thesis, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [34] **Kayali, İ.** (2018). *Butirik Asitin Çevre Dostu Solventlerle Ekstraksiyonu* (Master's Thesis, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü).
- [35] **Yemen, M., Karatepe, A., & Soylak, M.** (2018). *Pb (II) İyonlarının Supramoleküler Çözücü Kullanılarak Zenginleştirilmesi Ve Alevli Aas İle Tayini* (Master's Thesis, Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi).
- [36] **Yildiz, E.** (2019). Seçili Organik Kirleticilerin Eser Seviyelerde Tayinlerine Yönelik Farklı Mikroekstraksiyon Stratejilerinin Geliştirilmesi.
- [37] **Kazemi, E., Dadfarnia, S., Shabani, A. M. H., Fattahi, M. R., & Khodaveisi, J.** (2017a). Indirect Spectrophotometric Determination Of Sulfadiazine Based On Localized Surface Plasmon Resonance Peak Of Silver Nanoparticles After Cloud Point Extraction. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy*, 187, 30-35.
- [38] **Karami-Osboo, R., Miri, R., Javidnia, K., Shojaei, M. H., & Kobarfard, F.** (2015). Extraction And Determination Of Sulfadiazine And Sulfathiazole In Milk Using Magnetic Solid Phase Extraction-Hplc-Uv. *Analytical Methods*, 7(4), 1586-1589.
- [39] **Altunay, N.** (2022). Chemometric Design-Based Optimization Of A Green, Selective And Inexpensive Switchable Hydrophilicity Solvent-Based Liquid Phase Microextraction Procedure For Pre-Concentration And Extraction Of Sulfadiazine In Milk, Honey And Water Samples. *Food Chemistry*, 394, 133540.
- [40] **Guan, J., Zhang, C., Wang, Y., Guo, Y., Huang, P., & Zhao, L.** (2016). Simultaneous Determination Of 12 Pharmaceuticals In Water Samples By Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Coupled With Ultra-High Performance Liquid Chromatography With Tandem Mass Spectrometry. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 408, 8099-8109.
- [41] **Cunha, C. C. R. F., Freitas, M. G., Da Silva Rodrigues, D. A., De Barros, A. L. C., Ribeiro, M. C., Sanson, A. L., & Afonso, R. J. D. C. F.** (2021). Low-Temperature Partitioning Extraction Followed By Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Determination Of Multiclass Antibiotics In Solid And Soluble Wastewater Fractions. *Journal Of Chromatography A*, 1650, 462256.
- [42] **Chormey, D. S.** (2018). Microextraction Techniques And Isotope Dilution For Sensitive Determination Of Some Endocrine Disruptor Compounds And Pesticides In Different Matrices By Gc-Mc, Wastewater Treatment And Bioaccessibility Studies (Doctoral Dissertation, Yıldız Technical University Graduate School Of Natural And Applied Science).
- [43] **Sarafray-Yazdi, A., Mofazzeli, F., & Es' Haghi, Z.** (2010). Determination Of Chlorophenols In Environmental Water Samples Using Directly Suspended Droplet Liquid-Liquid-Liquid Phase Microextraction Prior To High-Performance Liquid Chromatography. *International Journal Of Environmental And Analytical Chemistry*, 90(14-15), 1108-1118.
- [44] **Lubbad, I.** (2018). Development Of Sensitive Analytical Methods Using Liquid-Liquid Microextraction Combined With Online Preconcentration Techniques In Capillary Electrophoresis.

- [45] **Açıkgöz, Ş.** (2014). Su Örneklerinde Organik Reaktifler Ve Uv-Vis Spektrofotometre Kullanarak Metal Tayini İçin Bir Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon (Dilme) Yöntemi Geliştirme (Doctoral Dissertation, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [46] **Uzcan, F.** (2020). *Çevresel Örneklerde Bakır (I)Nin Doğru Ve Duyar Tayini İçin Yeni Bir Yaklaşım* (Master's Thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [47] **Demirok, R.** (2019). *Katılaşma Destekli Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon Tekniği İle Nikelin Çeşitli Su Örneklerinde Ayrılması, Zenginleştirilmesi Ve Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometresi İle Tayini* (Master's Thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [48] **Arslan, O.** (2016). N, N'-Bis (2-Hidroksi-5-Bromo-Benzil) 1, 2 Diaminopropan Kullanılarak Dispersif Sıvı Sıvı Mikroekstraksiyon Yöntemi İle Bakır Ve Kadmiyum İyonlarının Önderiştirilmesi Ve Faas İle Tayini (Master's Thesis, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [49] **Çelik, İ.** (2014). *Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon Yöntemi İle Nadir Toprak Elementlerinin Önderiştirilmesi Ve Icp-MS İle Tayini* (Master's Thesis, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [50] **Yılmaz, E.,** (2016). Mikroekstraksiyon İle Eser Türlerin Ayrılması, Zenginleştirilmesi Ve Türlendirilmesi (Doctoral Dissertation, Erciyes University / Fen Bilimleri Enstitüsü (Turkey)).
- [51] **Mahugo-Santana, C., Sosa-Ferrera, Z., Torres-Padrón, M. E., & Santana-Rodríguez, J. J.** (2011). Application Of New Approaches To Liquid-Phase Microextraction For The Determination Of Emerging Pollutants. *Trac Trends In Analytical Chemistry*, 30(5), 731-748.
- [52] **Sarafraz-Yazdi, A., & Amiri, A.** (2010). Liquid-Phase Microextraction. *Trac Trends In Analytical Chemistry*, 29(1), 1-14.
- [53] **Özdemir, C., Saçmacı, Ş., Kartal, Ş., & Saçmacı, M.** (2014). Determination Of Gold And Palladium İn Environmental Samples By Faas After Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Pretreatment. *Journal Of Industrial And Engineering Chemistry*, 20(6), 4059-4065.
- [54] **Gerçek, Z.** (2012). Kimya'nın Yeni Rengi: Yeşil Kimya. *Yükseköğretim Ve Bilim Dergisi*, (1), 50-53.
- [55] **Kaptan, F.** (2016). Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu İle Bazı Metallerin Zenginleştirilmesi Ve Türlendirilmesi.
- [56] **Kantar, N. K., Yılmaz, M. S., Yakan, A. İ., & Demirkol, Ö. Ş.** (2021). Gıdalardan Biyoaktif Bileşiklerin Ekstraksiyonunda Derin Ötektik Çözücülerin Kullanımı. *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 10(2), 591-597.
- [57] **Kutlu, N., Yılmaz, M. S., İşci, A., & Şakıyan, Ö.** (2021). Gıdalardan Biyoaktif Bileşiklerin Ekstraksiyonunda Derin Ötektik Çözücülerin Kullanımı Utilization Of Deep Eutectic Solvents İn The Extraction Of Bioactive Compounds From Food Materials.
- [58] **Altun, F.** (2013). Zenginleştirme Yöntemleri İle Bazı Ağır Metallerin Tayini (Master's Thesis, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [59] **Pelvan, H. E.** (2020). Organik Ve Konvansiyonel Tarım Ürünlerinde Eser Düzeydeki Bakır, Kadmiyum Ve Kurşun İyonlarının Değiştirilebilir Çözücü Bazlı Sıvı Faz Mikroekstraksiyonu Ve Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometrisi İle Tayini.
- [60] **Topraksever, N.** (2019). Bazı Eser Elementlerin Çeşitli Eekstraksiyon Teknikleri İle Zenginleştirilmesi/Ayrılması Ve Aas Tayini.

- [61] Altunay, N. (2021). Optimization Of Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Of Niacinamide In Pharmaceutical And Cosmetic Samples Using Experimental Design. *Microchemical Journal*, 170, 106659.
- [62] Florindo, C., Branco, L. C., & Marrucho, I. M. (2019). Quest For Green-Solvent Design: From Hydrophilic To Hydrophobic (Deep) Eutectic Solvents. *Chemsuschem*, 12(8), 1549-1559.
- [63] Tiecco, M., Cappellini, F., Nicoletti, F., Del Giacco, T., Germani, R., & Di Profio, P. (2019). Role Of The Hydrogen Bond Donor Component For A Proper Development Of Novel Hydrophobic Deep Eutectic Solvents. *Journal Of Molecular Liquids*, 281, 423-430.
- [64] Makoś, P., Słupek, E., & Gębicki, J. (2020). Hydrophobic Deep Eutectic Solvents In Microextraction Techniques—A Review. *Microchemical Journal*, 152, 104384.
- [65] Xie, W., Li, T., Tiraferri, A., Drioli, E., Figoli, A., Crittenden, J. C., & Liu, B. (2020). Toward The Next Generation Of Sustainable Membranes From Green Chemistry Principles. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(1), 50-75.
- [66] Altunay, N., Elik, A., & Gürkan, R. (2020). Preparation And Application Of Alcohol Based Deep Eutectic Solvents For Extraction Of Curcumin In Food Samples Prior To Its Spectrophotometric Determination. *Food Chemistry*, 310, 125933.
- [67] Aydin, F., Yilmaz, E., & Soylak, M. (2018). Vortex Assisted Deep Eutectic Solvent (Des)-Emulsification Liquid-Liquid Microextraction Of Trace Curcumin In Food And Herbal Tea Samples. *Food Chemistry*, 243, 442-447.
- [68] Van Osch, D. J., Zubeir, L. F., Van Den Bruinhorst, A., Rocha, M. A., & Kroon, M. C. (2015). Hydrophobic Deep Eutectic Solvents As Water-Immiscible Extractants. *Green Chemistry*, 17(9), 4518-4521.
- [69] Ribeiro, B. D., Florindo, C., Iff, L. C., Coelho, M. A., & Marrucho, I. M. (2015). Menthol-Based Eutectic Mixtures: Hydrophobic Low Viscosity Solvents. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, 3(10), 2469-2477.
- [70] Plastiras, O. E., Andreasidou, E., & Samanidou, V. (2020). Microextraction Techniques With Deep Eutectic Solvents. *Molecules*, 25(24), 6026.
- [71] Li, G., & Row, K. H. (2019). Utilization Of Deep Eutectic Solvents In Dispersive Liquid-Liquid Micro-Extraction. *Trac Trends In Analytical Chemistry*, 120, 115651.
- [72] Gözde, E. (2019). *Investigation Of Deep Eutectic Solvents As A Reaction Medium For Metal Chloride Based Chemical Heat Pumps* (Master's Thesis, Middle East Technical University).
- [73] Smith, E. L., Abbott, A. P., & Ryder, K. S. (2014). Deep Eutectic Solvents (Dess) And Their Applications. *Chemical Reviews*, 114(21), 11060-11082.
- [74] Tomé, L. I., Baião, V., Da Silva, W., & Brett, C. M. (2018). Deep Eutectic Solvents For The Production And Application Of New Materials. *Applied Materials Today*, 10, 30-50.
- [75] Zhang, Q., Vigier, K. D. O., Royer, S., & Jérôme, F. (2012). Deep Eutectic Solvents: Syntheses, Properties And Applications. *Chemical Society Reviews*, 41(21), 7108-7146.
- [76] Degam, G. (2017). Deep Eutectic Solvents Synthesis, Characterization And Applications In Pretreatment Of Lignocellulosic Biomass.

- [77] Özyurt, H., Tetik, I., Tetik, P., Saralı, H., & Ötleş, S. (2020). Fındık Zarı Yağının Ekstraksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu Ve Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. *Gıda*, 45(6), 1073-1082.
- [78] Koç, B., & Kaymak-Ertekin, F. (2010). Yanıt Yüzey Yöntemi Vegıda İşleme Uygulamaları. *Gıda*, 35(1), 1-8.
- [79] Zhang, X., Wang, R., Yang, X., & Yu, J. (2007). Central Composite Experimental Design Applied To The Catalytic Aromatization Of İsochorone To 3, 5-Xylenol. *Chemometrics And Intelligent Laboratory Systems*, 89(1), 45-50.
- [80] Değirmen, G. (2015). *Biyokütle Ve Linyit Hızlı Pirolizini Etkileyen Parametrelerin Deney Tasarım Yöntemi Le Optimizasyonu Ve Elde Edilen Ürünlerin Karakterizasyonu* (Doctoral Dissertation, Anadolu University (Turkey)).
- [81] Çayboyu, A. T. (2020). *Kırmızı Şaraplarda Trans-Resveratrol, Toplam Antioksidan Ve Toplam Fenol Tayininde Optimum Ekstraksiyon Koşullarının Belirlenmesi* (Master's Thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [82] Güray, T., & Uysal, Ü. D. (2022). Karmosin İçin Deney Tasarımı Uygulanarak Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu Kullanımı Ve Spektrofotometrik Tayini. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(3), 398-406.
- [83] Özçelik, S. (2013). *Kapiler Elektroforez Yöntemi İle Pıvı Kaplı Kapilerde İnorganik Anyonların Hassas Analizi: Kemometrik Deneysel Tasarım İle Metod Optimizasyonu* (Doctoral Dissertation, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [84] Mousavi, L., Tamiji, Z., & Khoshayand, M. R. (2018). Applications And Opportunities Of Experimental Design For The Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Method—A Review. *Talanta*, 190, 335-356.
- [85] Demircioğlu, M., (2022). *Mısır Bitkisinin Genetiği Değiştirilmiş Organizma (Gdo) Analizinde Gerçek Zamanlı Pcr (Polimerase Chain Reaction) Parametrelerinin Merkezi Kompozit Tasarım İle Optimizasyonu* (Doctoral Dissertation, İstanbul University).
- [86] Kasapoğlu, Ö. A., & Demircioğlu, M. (2022). Optimization Of Real Time Pcr Parameters By Central Composite Design In Gmo Analysis Of Crop Plant. *Kafkas Üniversitesi İktisadi Ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi*, 13(26), 659-681.
- [87] Aykaç, G., N. (2015). *Biyokütlenin Hidrotermal Sıvılaştırma Parametrelerinin Deneysel Tasarım Yaklaşımıyla Optimizasyonu* (Master's Thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [88] Diler, B. (2015). *Badem Ve Kestane Kabukları Kullanılarak Sulu Çözeltilerden Bentazon Ve Metalaxyl Pestisitlerinin Giderimi: Deneysel Tasarım İle Optimizasyon, Adsorpsiyon Kinetiği Ve İzotermine İncelenmesi*.
- [89] Dogramacıoğlu, A. O., & Özcan, C. (2022). Development, Validation For Determination Of Verteporfin By Hplc-Dad And Application To Real Samples.
- [90] Yılmaz, A. (2012). *Kimyasal Analizlerde Metod Validasyonu Ve Verifikasyonu. Turklab Rehber*, (01).
- [91] Yu, F., Liu, C., Guo, Y., & Yang, Y. (2013). Ultrasound-Assisted Cloud Point Extraction For The Determination Of Sulfonamides İn Honey Samples By Fluorescence Spectrophotometry. *Analytical Methods*, 5(16), 3920-3926.
- [92] Li, T., Song, Y., Li, J., Zhang, M., Shi, Y., & Fan, J. (2020). New Low Viscous Hydrophobic Deep Eutectic Solvents İn Vortex-Assisted Liquid-

- Liquid Microextraction For The Determination Of Phthalate Esters From Food-Contacted Plastics. *Food Chemistry*, 309, 125752.
- [93] **Cao, J., Yang, M., Cao, F., Wang, J., & Su, E.** (2017). Well-Designed Hydrophobic Deep Eutectic Solvents As Green And Efficient Media For The Extraction Of Artemisinin From *Artemisia Annua* Leaves. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(4), 3270-3278.
- [94] **Karageorgou, E., & Samanidou, V.** (2014). Youden Test Application In Robustness Assays During Method Validation. *Journal Of Chromatography A*, 1353, 131-139.
- [95] **Zhou, Q., & Fang, Z.** (2015). Highly Sensitive Determination Of Sulfonamides In Environmental Water Samples By Sodium Dodecylbenzene Sulfonate Enhanced Micro-Solid Phase Extraction Combined With High Performance Liquid Chromatography. *Talanta*, 141, 170-174.
- [96] **Pochivalov, A., Vakh, C., Garmonov, S., Moskvina, L., & Bulatov, A.** (2020). An Automated In-Syringe Switchable Hydrophilicity Solvent-Based Microextraction. *Talanta*, 209, 120587.
- [97] **Zhao, X., Wang, J., Wang, J., & Wang, S.** (2018). Development Of Water-Compatible Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction Coupled With High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry For The Detection Of Six Sulfonamides In Animal-Derived Foods. *Journal Of Chromatography A*, 1574, 9-17.
- [98] **Kazemi, E., Dadfarnia, S., & Haji Shabani, A. M.** (2017b). Synthesis Of A Novel Molecularly Imprinted Polymer Based On Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes For Selective Extraction Of Sulfadiazine Prior To Spectrophotometric Determination. *Journal Of The Iranian Chemical Society*, 14, 1935-1944.