

**T.C.
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİMİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**KARADENİZ BÖLGESİNDE YETİŞEN ÇEŞİTLİ BİTKİLERDE BAZI
ANYONLARIN KAPİLER ELEKTROFOREZ İLE TAYİNİ**

Yüksek Lisans Tezi

Zebbron Nchimunya TEMBO

Prof. Dr. Ş. Fatma AYGÜN

**SAMSUN
2020**

TEZ ONAYI

Zebbron Nchimunya Tembo tarafından hazırlanan ‘Karadeniz Bölgesinde Yetişen Çeşitli Bitkilerde Bazı Anyonların Kapiler Elektroforez ile Tayini’ adlı tez çalışması .../.../2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Ondokuz Mayıs Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Ş. Fatma AYGÜN
Kimya Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri

Başkan Prof. Dr.
..... Üniversitesi
..... Anabilim Dalı

Üye Prof. Dr.
..... Üniversitesi
..... Anabilim Dalı

Üye Prof. Dr.
..... Üniversitesi
..... Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım. .../.../2020

.....

Enstitü Müdürü

ZEBRON NCHIMUNYA TEMBO

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.



//2020

Zebron Nchimunya Tembo.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Karadeniz Bölgesinde Yetişen Çeşitli Bitkilerde Bazı Anyonların Kapiler Elektroforez ile Tayini

Zebbron Nchimunya Tembo
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ş. Fatma AYGÜN

Kapiler elektroforez ve yöntem optimizasyonu için bir Box-Behnken kemometrik tasarım ile seçilen bazı bitki ve bitki çaylarında nitrat (NO_3^-), nitrit (NO_2^-) ve bromat (BrO_3^-) iyonlarının eşzamanlı olarak belirlenmesi için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Çalışmada yürütücü tampon olarak pH'sı 3,5 olan 60 mM fosfat çözeltisi, optimum çalışma koşulları için: 40 °C sıcaklık, -22,5 kV uygulama gerilimi, 50 µm çapta 61,5 cm uzunlukta (etkin kapiler uzunluğu 53,5 cm) kapiler kolon ve 50 mbar'lık basınçta 30 s enjeksiyon süresi uygun görülmüştür.

Nitrat, bromat ve nitrit için tayini sınırları 0,49 mg L⁻¹, 1,25 mg L⁻¹ ve 0,11 mg L⁻¹ iken doğruluk değerleri sırasıyla 0,998, 0,996 ve 0,999 olarak belirlenmiştir. Anyonların analizi ise 5 dakikalık sürede gerçekleştirildi. Geliştirilen yöntem çeşitli kuru bitki yapraklarına, çeşitli kuru çay yapraklarına, laboratuvarından alınan musluk suyuna, arıtılmış musluk suyuna ve marketlerden alınan doğal kaynak sularına uygulanmıştır.

Haziran 2020, 74 sayfa

Anahtar Sözcükler: Kapiler Zon Elektroforez, Nitrat, Nitrit, Bromat, Karadeniz Türkiye.

ABSTRACT

Master Thesis

Determination of Some Anions in Various Plants Growing in the Black Sea Region by Capillary Electrophoresis

Zebron Nchimunya Tembo
Ondokuz Mayıs University
Institute of Natural Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Ş. Fatma AYGÜN

A novel approach to the simultaneous determination of nitrate (NO_3^-), nitrite (NO_2^-) and bromate (BrO_3^-) ions in some selected plant and tea samples using capillary electrophoresis and a Box-Behnken chemometric design for method optimization was developed. Optimal conditions of 60 mM phosphate buffer solution at 3.5 pH, capillary temperature of XMR53. 5 cm) with 50 μm i.d, and 50 mbar injection pressure for 30 s were selected.

The limits of detection for nitrate, bromate and nitrite were 0.49 mg L^{-1} , 1.25 mg L^{-1} and 0.11 mg L^{-1} while linearity values were determined as 0.998, 0.996 and 0.999 respectively. The detection of the anions was achievable within 5 min of analysis. The method was then applied to the analysis of different real samples namely dry plant leaves, dry tea leaves, tap water from the lab, purified tap water and two different brands of bottled mineral water sold in markets in Samsun city, Turkey

June 2020, 74 pages

Keywords : Capillary Zone Electrophoresis; Nitrate, Nitrite, Bromate, Black Sea Turkey.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Öncelikle tez danışmanım, sayın hocam, Prof. Dr. Ş. Fatma AYGÜN'e öğrenimim boyunca verdiği destek, rehberlik ve sevgi için çok teşekkür eder, sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm sayın Dr. Öğretim Üyesi Behice YAVUZ ERDOĞAN' a teşekkür ederim. Gerektiğinde desteklerini gördüğüm tüm kimya bölümü hocalarına teşekkür ederim. Çalışmamı gerçekleştirdiğim kapiler elektroforez cihazı ile ilgili problemlerde koşarak yardıma gelen sayın Kazım CANPOLAT'a çok teşekkür ederim.

Son olarak, her zaman yanımda olan; destek ve güç veren eşime ve çocuklarıma teşekkür ederek, bu çalışmayı onlara ithaf ediyorum.

Haziran 2020, SAMSUN

Zebbron Nchimunya Tembo

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	4
2.1. Bitkilerde Bulunan Nitratlar ve Nitritler	4
2.2. Su ve Bitkilerde Bulunan Bromat İyonu	4
2.3. Kapiler Elektroforez (CE)	5
2.4. Kapiler Zon Elektroforezi	7
2.4.1. Kapiler zon elektroforezi prensipler (CZE)	7
2.4.2. Elektroosmotik akış.....	8
2.4.3. Elektrozmotik akışı kontrolü.....	11
2.5. Dağılım ve Verimlilik	12
2.6. Bant Genişlemesi ve Kaynakları	13
2.6.1. Analitin kapiler duvara adsorpsiyon	14
2.6.2. Joule ısıtma ve sıcaklık gradyanı	15
2.7. Ayırma gücü (Rezolusyon)	17
2.8. Detektör.....	17
2.9. UV / VIS absorbanası	18
2.10. Kapiler Elektroforez Modları	18
2.11. Kapiler Zone Elektroforez Optimizasyonu	19
2.11.1. Kemometrik yöntemlerin kapiler elektroforez yöntemi optimizasyonunda uygulanması.	20
2.11.2. Box-Behnken kemometrik Tasarım	20
2.12. Verilerin Kalitatif ve Kantitatif Analizi	21
2.13. Kapiler Elektroforez ile Yapılan Çalışmalar	23

2.14. Kapiler Elektroferez Kullanmanın Avantajları	24
2.15. Çalışmanın Amacı	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
3.1. Kullanılan Cihazlar	26
3.2. Yıkama Yöntemi	26
3.3. Kullanılan Kimyasallar	29
3.4. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	29
3.5. Örneklerinin Hazırlanması	29
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	31
4.1. Yöntem Optimizasyonu	31
4.1.1. Fosfat tampon derişimi, voltaj ve sıcaklığın incelenmesi	31
4.1.2. Fosfat tampon derişimi, voltaj ve sıcaklığı pik alan üzerindeki etkileri	32
4.1.3. pH, tampon derişimi, uygulanan voltaj ve sıcaklığın etkisi	34
4.1.4. Box-Behnken kemometrik yöntem uygulanması.....	35
4.2. Yöntem Validasyonu.....	39
4.2.1. Doğrusallık.....	39
4.2.2. Tekrarlanabilirlik.....	42
4.2.3. Geri alınabilirlik	43
4.3. Yöntemin Örneklere Uygulanması	44
4.3.1. Nitrat ,nitrit ve bromat iyonların bitki örneklerinde tayini	44
4.3.2. Nitrat, nitrit ve bromat iyonlarının çay örneklerinde tayini	47
4.3.3. Nitrat, nitrit ve bromat iyonların su örneklerinde tayini	51
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	54
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ.....	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Türkiye’ de yetişen ve bazı hastalık tedavilerinde kullanılan tıbbi bitkiler (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).	1
Çizelge 2.1. Elektrozmotik akışı kontrolü	12
Çizelge 2.2. Kullanılan dedektörler ve derisim aralığı (Locatelli ve Carlucci, 2010)	17
Çizelge 2.3. Kapiler elektroforez modları (Whatley, 2001).	19
Çizelge 2.4. Kapiler elektroforez optimizasyonunda kullanılan bazı kemometrik tasarımlar (Hanrahan vd, 2008).	20
Çizelge 2.5. Box – Behnken tasarımı	21
Çizelge 4.1. Tam faktöryel kemometrik tasarım	31
Çizelge 4.2. 15 çalışma ve 3 parametrelili Box-Behnken deney tasarımı	36
Çizelge 4.3. Box-Behnken tasarımı için kemometrik modeller	37
Çizelge 4.4. Yöntemin doğrusal performansı	41
Çizelge 4.5. Yöntemin tekrarlanabilirlik performansı	43
Çizelge 4.6. Üç farklı derişimde nitrit, bromat ve nitrit anyonları için % geri alınabilirlik değerleri	44
Çizelge 4.7. Bitki örneklerinde nitrat, nitrit ve bromat derişimleri (n=3)	45
Çizelge 4.8. Çeşitli çay örneklerinde nitrat, nitrit ve bromat derişimleri (n = 3)	47
Çizelge 4.9. Çeşitli su örneklerinde bulunan nitrat, nitrit ve bromat derişimi (n = 3)	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Azot döngüsü (Bernhard, 2010).....	4
Şekil 2.2. Bromatın çevreye girmesi.....	5
Şekil 2.3. Bir kapiler elektroforez cihazının şeması	7
Şekil 2.4. Kapiler yüzeyinde oluşan elektriksel çift tabakanın şematik gösterimi	9
Şekil 2.5. Erimiş bir silika kapilerinde elektroosmotik akış ve analit göçü.....	10
Şekil 2.6. Akış profilleri ve gözlenen pikler (Pei, 2015)	11
Şekil 2.7. Joule ısıtma ve sıcaklık gradyanı (Ahuja ve Jimidar, 2011).....	15
Şekil 2.8. Kapiler elektroforezdeki etken faktörleri.....	19
Şekil 2.9 Analitlerin Kalitatif Analizi	22
Şekil 2.10 Analitlerin kantitatif analizi	23
Şekil 4.1 Sıcaklık ve voltajın piklerin göç zamanının üzerindeki etkisi,	32
Şekil 4.2 Nitrat için tam faktöryel ana etkiler grafiği	33
Şekil 4.3 Bromat için tam faktöryel ana etkiler grafiği.....	33
Şekil 4.4 Nitrit için tam faktöryel ana etkiler grafiği	34
Şekil 4.5. pH değerinin göç zamanının üzerindeki etkisi,.....	35
Şekil 4.6 Nitrat için Box-Behnken tasarımı ana etkiler grafiği.....	37
Şekil 4.7 Bromat için Box-Behnken tasarımı ana etkiler grafiği	38
Şekil 4.8 Nitrit için Box-Behnken tasarımı ana etkiler grafiği	38
Şekil 4.9. Nitrat Kalibrasyon eğrisi.....	40
Şekil 4.10. Bromat Kalibrasyon eğrisi	40
Şekil 4.11. Nitrit kalibrasyon eğrisi	41
Şekil 4.12. Beş farklı bitki örneğinin elektroferogramı,	45
Şekil 4.13. T1, T2, T3 çay örneklerinin elektroferogramı,	48
Şekil 4.14. T4, T5, T6 çay örneklerinin elektroferogramı,	48
Şekil 4.15. T7, T8, T9, T10 çay örneklerinin elektroferogramı, voltaj; -22,5 kV, kapiler uzunluk; 61,5 cm (etkin uzunluk 53,5 cm), iç çap; 50 µm, dalga boyu; 200 nm, tampon derişimi; 60 mM fosfat tamponu, pH; 3,5, sıcaklık; 40 °C, pH; 3,5, enjeksiyon; 50 mbar x 30 s, Pikler; a: nitrat, b: bromat, c: nitrit	49

Şekil 4.16. Dört farklı su örneğinin elektroferogramı. Voltaj; -22,5kV, kapiler uzunluğu; 61,5 cm (etkin kapiler uzunluğu 53,5 cm), iç çap; 50 µm, dalga boyu; 200 nm, tampon derişimi; 60 mM fosfat tamponu, sıcaklık; 40 °C, pH; 3,5, enjeksiyon; 50 mbar x 30 s, Pikler; a: nitrat.....52



KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar:

WHO	Dünya Sağlık Örgütü
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
SCF	Gıda Bilimsel Komitesi
JECFA	Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi
CE	Kapiler elektroforezi
CZE	Kapiler Zon elektroforezi
EOA	Elektroosmotik akış
UV/VIS	Ultraviyole
PDA	Foto diyot dizisi
LIF	Floresans ve lazer kaynaklı floresans
FFD	Tam faktöryel tasarım
CCD	Merkezi kompozit tasarım
BBD	Box-Behnken tasarım
LOD	Tespit sınırı
LOQ	Nicelik sınırı
% BSS	Bağıl standart sapma
SD	Standard Sapma
LC	Sıvı kromatografisi
TLC	İnce tabaka kromatografisi
SFC	Katı faz kromatografisi
GC	Gaz kromatografisi
DAD	Diyot Dizisi Algılama
MS	Kütle spektroskopisi

Simgeler:

kg : Kilogram

g : Gram

mg : Miligram

µg : Mikrogram

$\mu\text{g L}^{-1}$: Mikrogram/litre

mg L^{-1} : Miligram/litre

L : Litre

mL : Mililitre

M : Molarite

$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece

S : Standart sapma

kV: KiloVolt

nm: Nanometre

μm : Micrometre

1. GİRİŞ

Bitki çayları, bitkilerin yapraklarından, çiçeklerinden, tohumlarından, meyvelerinden, saplarından veya köklerinden su varlığında hazırlanmaktadır (Weisburger ve Chung, 2002). Bitkisel çaylar, çok sayıda tıbbi bitkisel ilaç ve bitki çayı çeşitleri nedeniyle popülerdir. Son yıllarda insanlar ilaçlardan daha az yan etkileri olduğuna inandıkları için ilaç yerine bitkisel ürünleri kullanmayı tercih etmeye başlamışlardır (Çelik, 2006; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

Çizelge 1.1. Türkiye’ de yetişen ve bazı hastalık tedavilerinde kullanılan tıbbi bitkiler (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

Hastalık	Bitkiler
Böbrek Hastalığı	Altın otu, atkuyruğu, ayrik otu
Hazımsızlık	Anason, dereotu, havlıcan, kakule, kimyon, papatya, rezene, yenibahar, zencefil
Hemoroit	Civanperçemi, kuşburnu, mazı, sultan otu, zencefil
Kabızlık	Keten tohumu, rezene, sinameki
Kalp Hastalıkları	Alıç, ökseotu
Kanser Hastalığı	Isırgan otu, kırmızıbiber, ökse otu
Karaciğer Hastalığı	Enginar, hindiba, kurtpençesi, zerdeçal
Menopoz	Adaçayı, anason, civanperçemi, karanfil, papatya, tarçın
Mide Kanaması	Civanperçemi, kuşburnu, sumak
Mide Ağrısı ve Bulantısı	Eğir kökü, nane, zencefil
Prostat	Eğir kökü, ısırgan otu kökü, yeşil çay, zerdeçal
Romatizma	Anason, atkuyruğu, biberiye, karanfil, kekik, lavanta, melisa, papatya
Safra Kesesi	Altın otu, civanperçemi, hindiba, pelin otu, zerdeçal

Soğuk Algınlığı, Üşütme ve Öksürük	Ardıç, ebegümece, ekinezya, ıhlamur, karanfil, meyankökü, nane, okaliptüs, papatya, zencefil
Stres, Depresyon ve Endişe	Anason, kantaron, lavanta, melisa, papatya, rezene, şerbetçiotu
Unutkanlık ve Hafıza Zayıflığı	Adaçayı, biberiye, kakule, yeşil çay, zencefil
Uyku Bozukluğu	Anason, çuha çiçeği, kedi otu, melisa, papatya, rezene, şerbetçi otu
Yorgunluk	Ada çayı, biberiye, meyan kökü, kakule, kekik, kuşburnu, zencefil

Genellikle, bitki çayları ve tıbbi bitkiler yüksek miktarda çinko (Zn), mangan (Mn), sodyum (Na), potasyum (K), kalsiyum (Ca), demir (Fe), magnezyum (Mg) ve fosfor (P) gibi esansiyel mineralleri içermektedir. Ancak, bu minerallerin derişimleri bitkiye bağı olarak oldukça geniş aralıklarda değışmektedir (Nakilcioğlu-Taş, 2019). Literatür, tıbbi amaçlar için kullanılan bitkilerin karbonhidratlar, kafein, polifenoller, amino asitler, protein, klorofil, uçucu organik bileşikler, klorür, bromat, nitrat, nitrit gibi inorganik anyonları ve diğere kimyasal maddeleri içerebileceğini bildirmektedir (Jagadish ve Shanmugaselvan, 2018).

Çeşitli çay ve infüzyonların üretimi için kullanılan bitkiler, nitrat, nitrit ve bromat anyonları ile kontamine olabilir. Bitkilerde bulunan nitratlar ve nitritler, yeşil bitkiler tarafından azot metabolizmasının bir sonucudur ve kimyasal gübrelere kullanımını nedeniyle derişimleri artabilir (Stagnari vd, 2007). Sebzelerde, et ve et ürünlerinde, diğere gıdalarda ve suda bulunan nitratların varlığının insan sağlığı için ciddi bir tehdit olduğu bilinmektedir. Gerçekte, nitratlar, son derece kararlı ve toksik olmadıkları için kendi başlarına tehlikeli değıldirler, ancak nitritlere indirgendikleri ve nitritler de kanserojen nitrosaminlere dönüştüğü için tehlike insan sağlığını tehdit etmektedir. Gıda ve su ile alınan nitratın yaklaşık % 25' i tükürükte salgılanır ve yaklaşık % 20' si ağız boşluğundaki mikroorganizmalar tarafından nitrite dönüştürülür (Pannala vd, 2003; Spiegelhalder vd, 1976). Bu nedenle, nitrat içeren gıda tüketimi ile kanser

riskinin artması arasında bir ilişki olduğu literatürde bildirilmiştir (Jimidar vd, 1995; Mitacek vd, 2008)

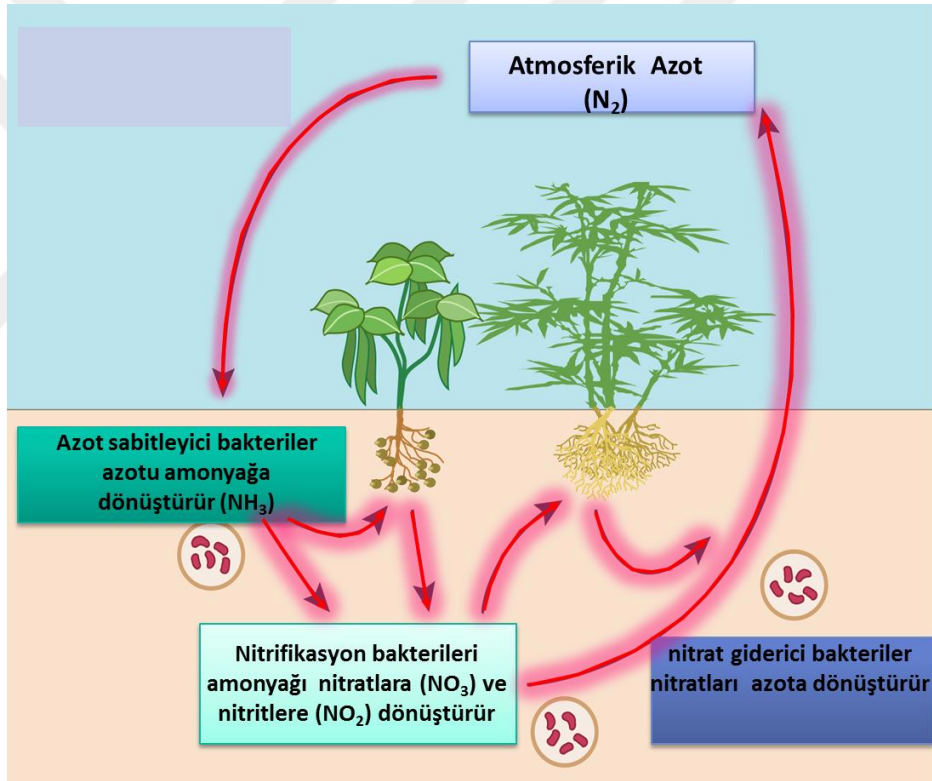
Bromat iyonu ise, özellikle içme ve kullanma sularında ve ekmekte bulunur. İçme suyunda dezenfeksiyon, patojenleri inaktive etmek ve organik bileşikleri oksitlemek için ozonlama yapılır. Ozon, çoğu su kaynağında bulunan bromür iyonu ile tepkimeye girerek bromat anyonu oluşturur (Guo vd, 2003; WHO, 1993). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) bromat iyonunu grup 2B veya “olası insan” kanserojen madde olarak sınıflandırmaktadır. WHO ve Avrupa Komisyonu tarafından günlük alım miktarı maksimum 0,01 mg kg⁻¹ olarak belirlenmiştir (Fawell ve Walker, 2006).

Nitrat ve nitrit alımıyla ilgili risklerin ilk uluslararası değerlendirmesi 1961 yılında Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü, Dünya Sağlık Örgütü (FAO/WHO) ve Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (JECFA) tarafından ortaklaşa gerçekleştirilmiştir. Bu Gıda Bilimsel Komitesi (SCF) 1990 yılında nitrat ve nitritin toksikolojik etkilerini gözden geçirmiş ve günlük alınması gereken derişimlerini 0-3,7 mg kg⁻¹ olarak kabul etmiştir. Aynı komite 1995 yılında da günlük alım için aynı derişim aralığını kabul etmiştir. Nitrit için ise; günlük alım 0-0,06 mg kg⁻¹ olarak belirlenmiştir. 2002 yılında ise, Avrupa gıda katkı maddeleri komitesi nitrat için 0-3,7 mg/kg ve nitrit için 0-0,07 mg kg⁻¹ günlük alım limitini belirlemiştir (Keran vd, 2017). Bu çalışma, Türkiye'nin Karadeniz Bölgesinde tüketilen çeşitli bitkisel çaylarda nitrat, nitrit ve bromat derişimlerinin kapiler elektroforez kullanılarak belirlenmesini amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Bitkilerde Bulunan Nitratlar ve Nitritler

Nitrat ve nitritlerin bitkilere girme süreci, aerobik bakterilerin azot gazını dönüştürmek için oksijen kullanmasıyla başlar. Yani, nitrosomonas bakterileri ilk önce azot gazını nitrite (NO_2^-) dönüştürür ve daha sonra nitrobakter nitriti bir bitki besin maddesi olan nitrata (NO_3^-) dönüştürür. Toprakta nitrobakterler nitrosomonas bakterilerine göre daha fazla olduğu için nitritler toprakta depolanmaz ama nitrobakterler sayesinde nitrata yükseltgenir ve bitkiler tarafından alınır (Bernhard, 2010).

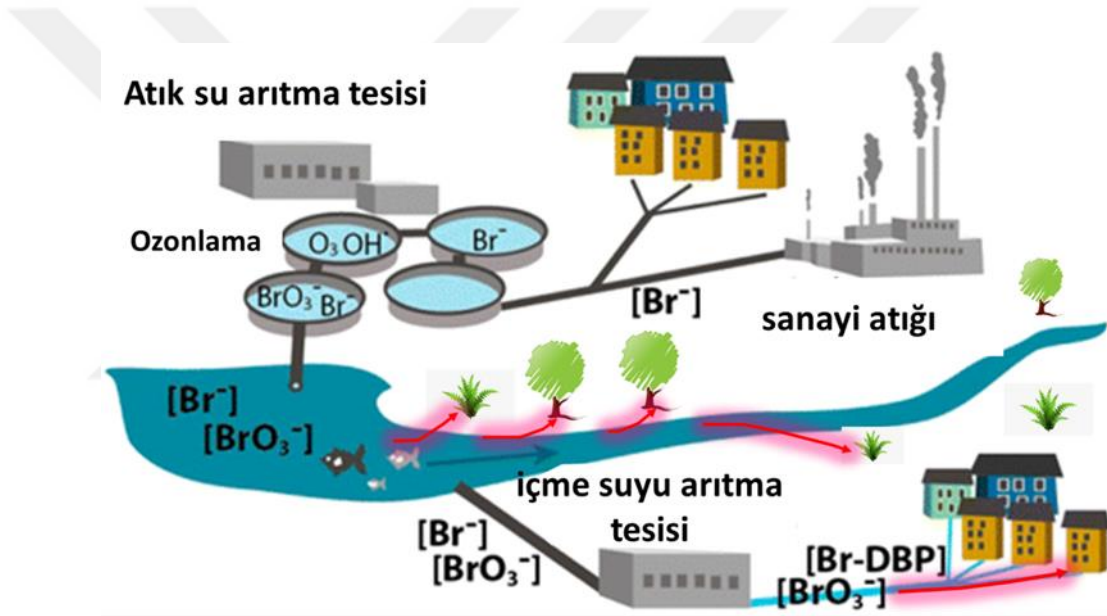


Şekil 2.1. Azot döngüsü (Bernhard, 2010)

2.2. Su ve Bitkilerde Bulunan Bromat İyonu

Bromat, bromür içeren suların dezenfeksiyonu sırasında ozonlanma yapılırken oluşabilir. Ozonlama, ortaya çıkan kirleticilerin, özellikle farmasötik kalıntıların ve böcek ilaçlarının giderilmesi için giderek daha fazla kullanıldığından, sulama ile

bitkilere bulaşabilecek bromat tayininin yapılması önem kazanmaktadır (Yaseneva vd, 2014). Fakat Kanada Çevre Koruma Ajansına göre, bromatın çevreye veya biyolojik çeşitliliğine doğrudan veya uzun vadeli zararlı etkisi olmayacağı düşünülmektedir. Yani bromat, suda kalıcı kriterler içindedir, ancak biyolojik birikim kriterleri içinde değildir (Canada, 2010). Geçmişten günümüze kadar bitkilerde bromat iyonu tayini yapılmaktadır. Özellikle moringa bitkisi, havuç, buğday kökü ve farklı yaprak türleri gibi bitkilerde bromat varlığı araştırılmıştır (Cseh ve Böszörményi, 1964; Oseni vd, 2015; Sahin vd, 2012). Bromatın çevreye girişi Şekil 2.2’ de özetlenmektedir.



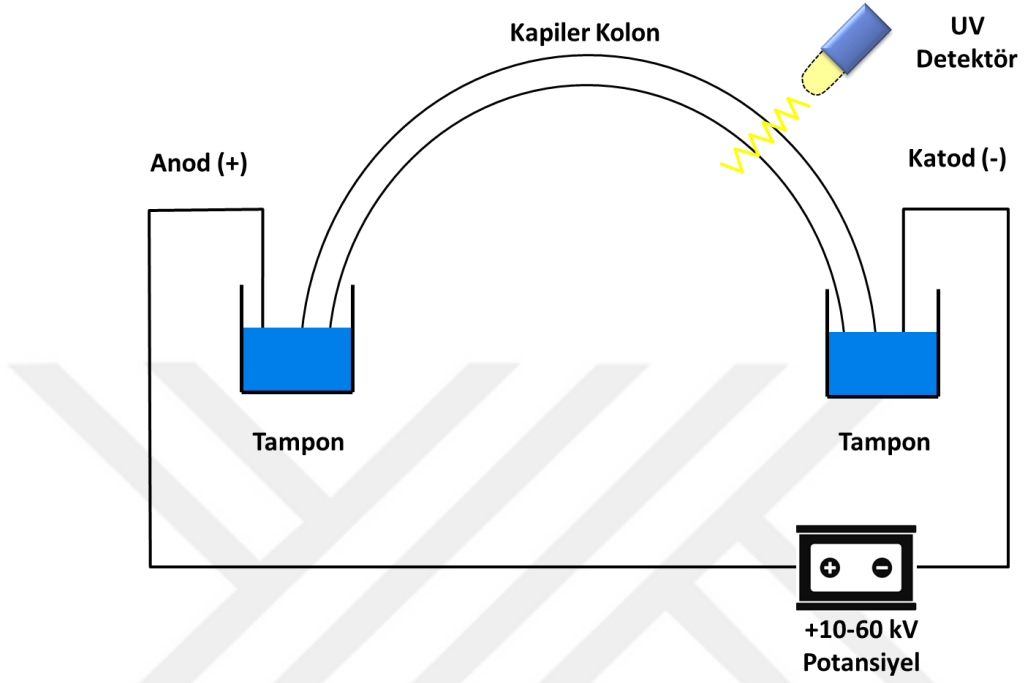
Şekil 2.2. Bromatın çevreye girmesi

2.3. Kapiler Elektroferez (CE)

Kapiler elektroferez (CE), etkili bir ayırma tekniği olarak, çeşitli kimyasal analiz alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. 1980' lerin başında Jorgenson ve Lukacs tarafından kapiler borular arasına gerilim uygulayarak yüksek verimde ayırmalar elde etmişlerdir (Altria, 1999). Kapilerin iç çapı ve uzunluğunun değiştirilerek kullanılması, ayırma verimini arttıran etkili ısı dağılımı sağlamıştır (Macka ve Haddad, 1997). Son yıllarda, kapiler elektroferez, uygulama ve enstrümantasyon açısından kayda değer bir gelişme göstermiştir. Bu gelişmelerle, kapiler elektroferez; iyi tekrarlanabilirlik, hızlı analiz, düşük elektrolit derişimi ve küçük miktarlarda numunelerin yeterli olmasıyla

yaygın olarak kullanılmaktadır (Fung ve Lau, 2003). Kapiler elektroforezde, hem büyük hem de küçük moleküllerin yüksek verimli ayrımlarını sağlamak için 25-75 μm iç çaplı kapiler kolonlar kullanılır. Elektroforez işlemi, elektrik alanında çeşitli yüklü türlerin farklı göç hızlarından faydalanır. Tampon çözelti içeren bir kapiler kolona 10-30 kV arasında değişen gerilim uygulanması elektroosmatik bir akış üreterek iyonik türlerin elektroforetik olarak ayrımını mümkün kılar (Douglas ve Stanley R, 2013; Rogan, 2014). CE'de kullanılan silika kapiler kolonların sağlamlığını arttırmak için kapilerin dış kısmı poliimid kaplama yapılır. Ancak kapiler üzerindeki poliimidin detektör bölmesine gelen kısmı sıyrılarak uzaklaştırılır. Çünkü poliimid ışın absorplayarak analitlerin tayininde çok büyük hataya sebep olur.

Kapilerin iki ucu, iki elektrodun içinde bulunduğu iki tampon haznesi içinde bulunan ve kanal görevi gören sıcaklık ayarlı bir bölmede bulunur. Kapilerin çıkış ucu negatif bir elektrodun bulunduğu tampon çözeltiye daldırılmışken, giriş ucu pozitif elektrodun bulunduğu tampon çözeltiye daldırılarak bir elektrik alanı uygulanmış olur. Kapilerin uçları 30 kV ve 300 μA ' ya kadar yüksek voltaj gücüne bağlı platin elektrotlar ile küçük rezervuarlara daldırılarak pozitif analit iyonlarının anoda (sol taraf) doğru, negatif analit iyonlarının ise katoda (sağ taraf) doğru göç etmesi sağlanır. Tüm yüksek güç kaynakları için bir uç topraklanmıştır (Şekil 2.3'de gösterildiği gibi negatif uç katod dur) (Gary D. Christian vd, 2014).



Şekil 2.3. Bir kapiler elektroforez cihazının şeması

2.4. Kapiler Zon Elektroforezi

2.4.1. Kapiler zon elektroforezi prensipler (CZE)

Kapiler zon elektroforezi (CZE) analitleri hareketliliklerine göre ayırır. Belirli bir analitin hareketliliği kimyasal ortama ve özel olarak tampon çözeltinin pH' ına bağlıdır. Bir elektroosmotik akış (EOA) yokluğunda, elektroforetik hareketlilik, aşağıdaki denklem 2.1 ile verilen μ_e :

$$\mu_e = \frac{v_e}{E} \quad (2.1)$$

v_e : Analitin göç hızı (m s^{-1})

E : Alan kuvveti (V m^{-1})

Elektroforetik işlem sırasında, F_e elektrik kuvveti ve F_f sürtünme kuvveti aynı değere sahip olduğunda sabit bir duruma ulaşılır. Küresel bir iyon için, bunu tanımlayan denklemler 2.2 ve 2.3'tür.

$$F_e = qE \quad (2.2)$$

$$F_f = -6\pi\eta r \quad (2.3)$$

q , analitin yükü olduğunda, η arka toprak elektrolitinin viskozitesi ve r , analit iyonunun yarıçapıdır.

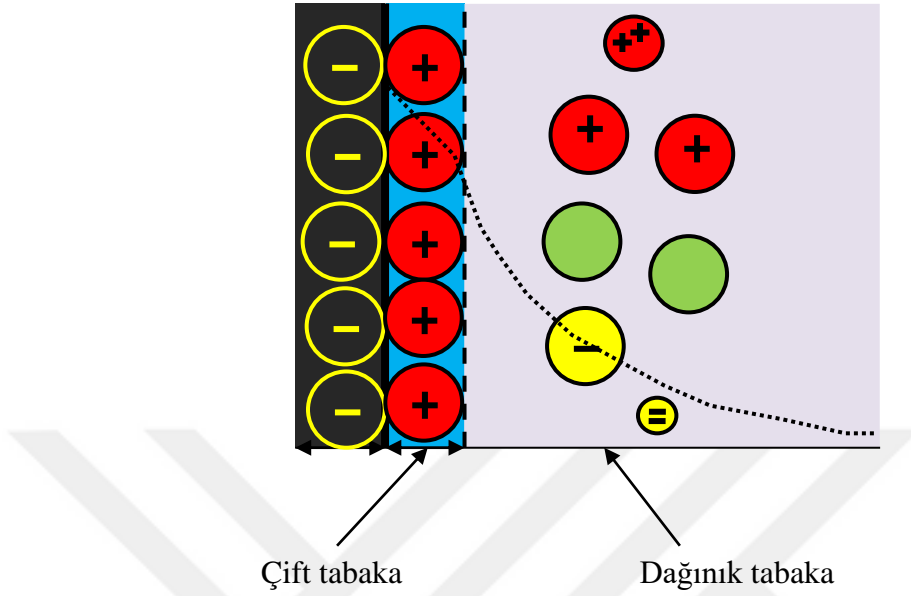
$|F_f|$ sürtünme kuvveti katsayısı ve $|F_e|$ elektrik kuvveti katsayısına eşit olduğunda, 2.1.2.2 ve 2.3 denklemleri;

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (2.4)$$

2.4 denklemi elde edilir. Denklem, iyon yükü yüksek ve iyon yarıçapı küçük olduğunda büyük bir elektroforetik hareketliliğin gözlemlendiğini göstermektedir

2.4.2. Elektroosmotik akış

Elektroforetik ayrımların en önemli bileşenlerinden biri, elektroosmotik akıştır (EOA). Bu akış, sabit bir yükün yüzeyi ile temas halinde yüklü bir sıvının elektrik alanından kaynaklanan kapiler boyunca elektrolitin toplu göçüne karşılık gelir (Foret vd, 1993; Rouessac ve Rouessac, 2013).



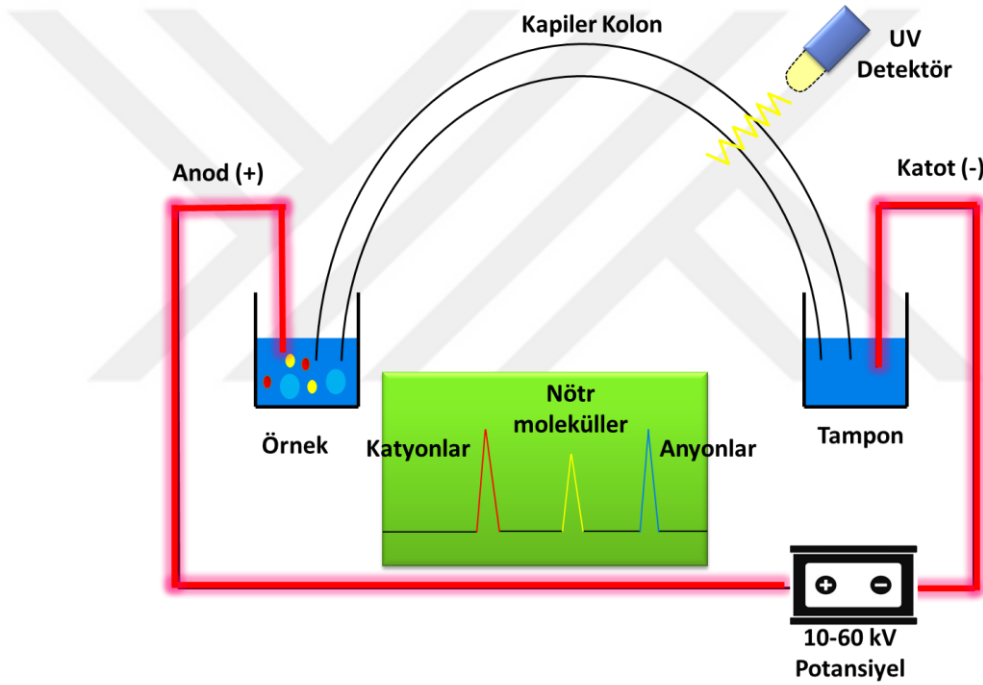
Şekil 2.4. Kapiler yüzeyinde oluşan elektriksel çift tabakanın şematik gösterimi

Erimiş silika kapiler kolonların iç duvarları, zayıf asidik silanol (-SiOH) gruplarının ($pK_a \sim 5.3$) varlığından dolayı negatif bir yük taşır. Çözeltideki kationlar, duvarın negatif yükünü dengelemek için elektriksel bir çift katman oluşturan kapiler duvarın yakınında biriktirilir. Elektriksel çift tabaka, Stern tabaka olarak adlandırılan bir hareketsizleştirilmiş tabakadan ve Debye-Huckel tabaka olarak adlandırılan bir hareketli dağınık tabakadan oluşur (Bard vd, 1980). Bir elektrik alanı uygulandığında, dağınık tabandaki fazla kationlar negatif elektroda (katot) doğru göç eder. Dağınık çift tabandaki fazla kationlar çözüldüğü için, göçleri kapiler içerisinde bir yığın çözelti akışı oluşturarak çözeltiyi beraberinde çeker..

Çift taban, zeta potansiyeli (ζ) olarak adlandırılan, Şekil 2.4' de gösterildiği gibi silika yüzeyi ile dağınık taban arasındaki potansiyelde bir fark oluşmaktadır. Stern tabakadaki zeta potansiyeli, silika yüzeyinden mesafe arttıkça doğrusal olarak azalır. Bununla birlikte, dağınık tabakada, yüzeyden uzaklaştıkça potansiyel katlanarak azalır. Zeta potansiyeli Helmholtz-Smoluchowski denkleminde gösterildiği gibi elektroosmotik akışın hareketliliğini belirler (Alexander IV vd, 1998).

$$\mu_{eo} = \frac{\zeta \varepsilon}{4\pi\eta} \quad (2.5)$$

ζ eta zeta potansiyeli, ε vakuma geçirgenlik ve μ_{eo} elektroosmotik hareketlilik. Kapiler üzerindeki yük pH'ın bir fonksiyonu olarak değiştiğinden, zeta potansiyeli de pH ile değişmektedir. Yani EOA'nin hareketliliği ve hızı yüksek pH'a bağlıdır. Yüksek pH'da, silanol grupları Şekil 2.4' te- gösterildiği gibi kaldırılmıştır. Bu nedenle, EOA yüksek pH'da, düşük pH'dakinden önemli ölçüde daha yüksektir. EOA' nın sağlanmasıyla kapiler içindeki tüm türler katoda doğru göç eder (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Erimiş bir silika kapilerinde elektroosmotik akış ve analit göçü.

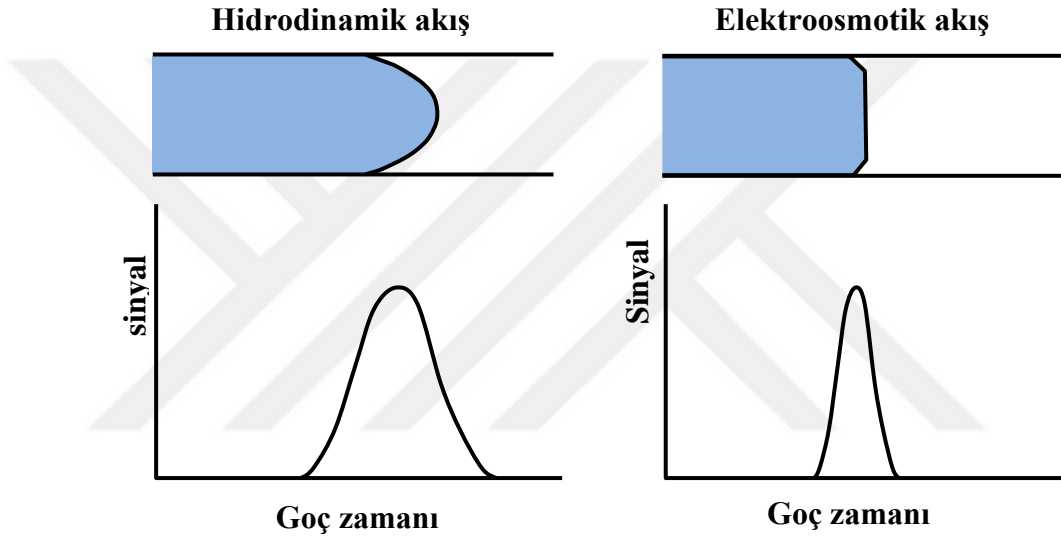
Uygulamalı bir elektrik alanında, bir analitin görünür hareketliliği,

$$\mu_{görünür} = \mu_{eo} + \mu_{ep} \quad (2.6)$$

Belirgin hareketlilik 2.7 denkleminde gösterildiği gibi deneysel yöntemler kullanılarak hesaplanabilir :

$$\mu_{görünür} = \frac{L_t L_D}{t_m V} \quad (2.7)$$

L_t , kapilerin tam uzunluğu, t_m , analitin detektöre ulaşması için geçen zaman, V uygulanan gerilim ve L_D , girişten detektöre kadar olan uzunluktur. Basınçlı bir akıştan meydana gelen parabolik bir profilden farklı olarak, EOA'nin önemli bir özelliği, EOA için itici güç kapiler duvar boyunca düzgün bir şekilde dağıldığından düz akış profil elde edilir (Şekil 2.6). EOA akış profilinin düzlüğü, şekilde gösterildiği gibi basınçla çalışan akışa kıyasla tepe genişlemesini azaltır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Akış profilleri ve gözlenen pikler (Pei, 2015)

2.4.3. Elektroosmotik akışı kontrolü

EOA, şekilde gösterildiği gibi çeşitli tekniklerin uygulanmasıyla kontrol edilebilir (Hailemichael Goitom, 2004 ; (Hailemichael Goitom, 2004)

Çizelge 2.1. Elektrozmotik akışı kontrolü

Parametreler	EOA üzerinde gözlemlenen etki
Tampon çözeltisi için pH	EOA düşük pH'da düşer, yüksek pH'da yükselir
Tampon derişimi (veya tampon çözeltisinin iyonik gücü)	Artan EOA, zeta potansiyelinde azalma ile sonuçlandığında azalır
Elektrik alan	EOA, elektrik alanıyla doğrudan orantılıdır. Bununla birlikte, Joule ısıtma arttırıldığında, çözünürlük ve verimde düşüğe neden olarak ortaya çıkabilir
Sıcaklık	Azalırsa, tamponun viskozitesini etkiler, böylece EOA düşer
Yüzey aktif madde	Anyonik yüzey aktif cisimleri, katod yönünde EOA'yi arttırırken, anyonik yüzey aktif cisimleri, katod yönünde EOA'yi azaltır veya EOA'u anot yönünde tersine çevirir
Nötral hidrofilik polimer	Yüzey yükünü koruyarak ve viskoziteyi arttırarak EOA'yi azaltır

2.5. Dağılım ve Verimlilik

Kapiler elektroforezde, çözünme bölgesi içindeki çözünme hızındaki farklılıklar nedeniyle dispersiyon ortaya çıkar. Çözülen bölgenin uzunluğu, başarılı bir ayrılmanın gerçekleşip gerçekleşmeyeceğini belirlemede önemlidir. Bölgelerin uzunlukları, üzerinde etki eden dağılma işlemlerine bağlıdır. Dağılma, zon uzunluğunu uzattığı ve ayırma elde etmek için ihtiyaç duyulan çözücüler arasındaki hareketlilik farkını arttırdığı için kontrol edilmesi gerekir. (Schaeper, 2002). Dağılma en iyi şekilde bir gauss zirvesi kullanılarak açıklanmaktadır.

$$W_b = 4\sigma \quad (2.8)$$

W_b , taban çizgisi tepe genişliğidir ve zaman (saniye), uzunluk (m) veya hacmin (m^3) gaussian tepe noktasının standart sapmasıdır.

Teorik plaka sayısı N olarak ifade edilen verim;

$$N = \frac{L^2}{\sigma_{\text{toplam}}^2} \quad (2.9)$$

L : kapiler uzunluk (cm)

σ_{toplam}^2 : toplam tepe sapması (cm^2)

2.6. Bant Genişlemesi ve Kaynakları

Kapiler içindeki örnek bileşenlerin göçü sırasında, toplam varyans (σ_{toplam}^2) olarak tanımlanan elektroferogram üzerinde bandın genişlemesine yol açan moleküler bir difüzyon oluşabilir (Buszewski vd, 2013). Toplam varyans, aşağıda gösterildiği gibi bant genişleme ile bağlantılıdır.

$$\sigma_{\text{toplam}}^2 = \frac{2DL^2}{\mu_{\text{görünür}} V} \quad (2.10)$$

D : analitin difüzyon katsayısı,

L : kapiler uzunluk (cm),

$\mu_{\text{görünür}}$: görünen hareketlilik ($cm^2 V^{-1} s^{-1}$) volt olarak voltajdır.

2.10 denkleminin yerine 2.9 denkleminin verilmesine göre verimlilik;

$$N = \frac{\mu_{\text{görünür}} V}{2D} \quad (2.11)$$

V : uygulanan gerilim (kV).

Yukarıdaki 2.11 denklem, etkin bir ısı giderimi olduğunu varsayarak uygulanan voltajı artırarak verimliliğin artırılabilirliğini gösterir. Öte yandan, yüksek bir difüzyon katsayısı ve küçük bir analit hareketliliği verimliliği azaltır (Dziubakiewicz ve Buszewski, 2013). Bununla birlikte, toplam en yüksek varyans, genişlemeyi etkileyen

bireysel faktörlerin tüm farklılıklarının toplamıdır ve aşağıdaki denklem 2.12' de verilmiştir (Pei, 2015).

$$\sigma_{\text{toplam}}^2 = \sigma_{\text{enjek}}^2 + \sigma_{\text{detektör}}^2 + \sigma_{\text{dağıl}}^2 + \sigma_{\text{boydifüz}}^2 + \sigma_{\text{elekdağıl}}^2 + \sigma_{\text{EOA}}^2 + \sigma_{\text{içyüzeyi}}^2 \quad (2.12)$$

σ_{enjek}^2 , kapiller içine numune enjeksiyonuna bağlı olarak değişkenlik gösterir, $\sigma_{\text{detektör}}^2$, dedektörün ölçüm hücresinin hacmine ve şekline bağlı olarak varyansdır, $\sigma_{\text{dağıl}}^2$ bir termal dağılımdan kaynaklanan varyansdır, $\sigma_{\text{boydifüz}}^2$ boyuna difüzyonun, $\sigma_{\text{elekdağıl}}^2$ elektroosmotik dağılımdan kaynaklanan varyans, σ_{EOA}^2 , EOA' den kaynaklanır ve $\sigma_{\text{içyüzeyi}}^2$, analitin kapiller iç yüzeyi ile etkileşimlerinden kaynaklanan varyanstır.

2.6.1. Analitin kapiler duvara adsorpsiyon

Analitlerin CE'deki kapiler duvara adsorbe olması sonucunda kuyruklanma oluşabilir ve bu da ayırma verimini bozar (Gaš vd, 1997). Çoğunlukla adsorbe edilen analitler, yerel yüzey zeta potansiyelini değiştirir, bu da kapiler tüpte homojen olmayan bir EOA' ye neden olur. Analitlerin kapiler duvarlarla hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler ve diğer elektrostatik çekim aracılığıyla etkileşime girmesi (Ermakov vd, 1995), çözünen duvar adsorpsiyonundan kaynaklanan varyans katkısı olarak ifade edilebilir (Pei, 2015).

$$\sigma_{\text{toplam}}^2 = \left[\frac{K^2 r}{D(r + 2K)} + \frac{4K}{(r + 2K)k_d} \right] \cdot v_m^2 t_m \quad (2.13)$$

D : analitin difüzyon katsayısı

K = k_a / k_b , duvar ile çözelti arasındaki dağılım katsayısı

k_a ve k_d : adsorpsiyon ve desorpsiyonun hız sabitleridir

r; kapillerin iç yarıçapı (μm)

v_m : analitin göç hızı (m s^{-1}).

t_m : analitin göç zamanı (s)

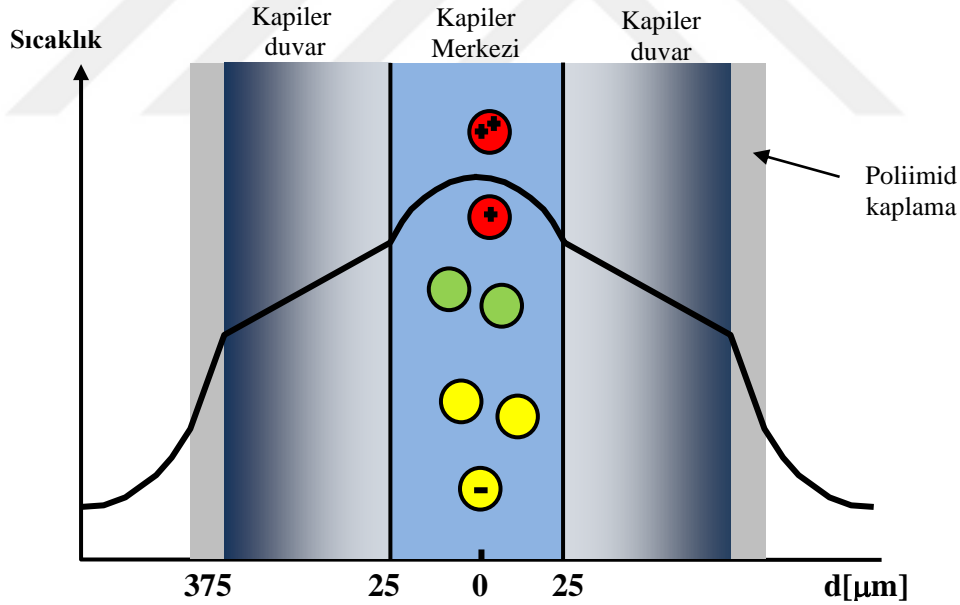
Yukarıdaki 2.13 denklem, bir analitin yavaş bir desorpsiyon kinetiğine sahip olması durumunda büyük bir varyans katkısına yol açan geniş bir bant genişlemesi olduğunu göstermektedir.

2.6.2. Joule ısıtma ve sıcaklık gradyanı

Joule ısıtma, kapiler borudan geçen yüksek voltajdan kaynaklanır ve arka zemin elektroliti ısınırken bant genişlemesi sağlanır (Xuan ve Li, 2004). Analit bantlarının difüzyon hızı. Joule ısıtma, denklem 2.14'de gösterildiği gibi kapiler ve dirençten geçen akımın bir fonksiyonudur.

$$H = VIt \quad (2.14)$$

Joule ısıtma, elektrik alanı kuvvetini azaltarak veya Çizelge 2.1 ve Şekil 2.7' de gösterildiği gibi kapiler çapını azaltarak kontrol edilebilir.



Şekil 2.7. Joule ısıtma ve sıcaklık gradyanı (Ahuja ve Jimidar, 2011)

Kapiler duvardan çevredeki ortama ısının kaybedilmesi, kapiler içindeki tampon çözeltide bir viskozite gradyanı ile sonuçlanan, Şekil 2.7' de gösterildiği gibi kapiler içinde bir radyal sıcaklık gradyanına neden olur. Bu viskozite gradyanı, genişleyen tepelere ve daha düşük bir ayırma verimi ile artan plaka yüksekliklerine, çözünen

maddelerin elektroforetik göç hızı profillerinde radyal değişimlere neden olur (Grushka vd, 1989).

Bununla birlikte, azaltılmış bir kapiler çap, kapiler sistemin yüzey / hacim oranını ve ısı dağılımını artırır. Bazı CE sistemleri, Joule ısıtmanın etkisini en aza indirmek için soğutma gibi termal kontrolleri de içerir. Bununla birlikte, uygulanan bir elektrik alanı kuvvetinin çok düşük olması da bant genişlemesine yol açar. Düşük alan şiddeti uygulandığında, analitler çok yavaş göç eder ve bant genişler.

Kapiller elektroforezde temel olarak iki tip enjeksiyon yöntemi vardır: hidrodinamik ve elektrokinetik. Hidrodinamik enjeksiyon, bir basınç veya vakum uygulaması kullanır ve iki enjeksiyon türünün en az seçici olanı olarak kabul edilir (Harris, 2010).

$$\text{Enjekte edilen hacim} = \frac{\Delta P \pi d^4 t}{128 \eta L_t} \quad (2.15)$$

ΔP ; kapiler uçların arasındaki basınç farkı (Pa),

d ; kapiler iç çap (μm),

t ; enjeksiyon zamanı (s),

η ; örnek viskozitesi ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$),

L_t ; kapilerin toplam uzunluğu (m).

Hidrodinamik enjeksiyonun zayıf noktalarından biri, numunedeki analitler arasında ayırım yapmamasıdır. Öte yandan, elektrokinetik enjeksiyon, yüksek voltaj uygulanarak gerçekleştirilir ve iyonların seçiciliği nedeniyle genellikle daha uygundur (Olofson, 2009). Bir elektrokinetik enjeksiyon her gerçekleştiğinde, ayırma sonuçları numunedeki iyonların hareketliliğine ve yüküne bağlıdır. Kapiller içine alınan her bir iyonun mol sayısı;

$$\text{mol sayısı} = \mu_{\text{görünür}} \left(E \cdot \frac{k_b}{k_s} \right) \cdot t \pi \cdot r^2 C \quad (2.16)$$

$\mu_{\text{görünür}}$: elektroforetik hareketlilik ($\text{cm}^2 \text{v}^{-1} \text{s}^{-1}$),

E : uygulanan elektrik alan (kV),

r : kapiler yarıçap (μm),

C: numune derişimi (mol L⁻¹),

k_b/k_s: Tamponun ve numunenin iletkenlik oranıdır.

2.7. Ayırma gücü (Rezolusyon)

Kapiler elektroforezde, ayırma gücü, iki pikin birbirinden ayrılmasının ölçüsüdür. Kapiler elektroforezde yöntem geliştirmenin amacı, analit pikleri arasında maksimum ayırımı sağlamaktır. Ayırma gücü (R) aşağıdaki eşitlik ile gösterilir.

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} \quad (2.17)$$

Burada,

t: göç süresi (s),

w: süre olarak pikin taban genişliği.

2.8. Detektör

Ticari olarak temin edilebilen CE'de kullanılan başlıca detektör tipleri; ultraviyole - görünür bölge (UV/VIS), foto diyot dizisi (PDA), floresans ve lazer kaynaklı floresans (LIF) tır. Aşağıdaki Çizelge 2.2, kapiler elektroforezde kullanılan bazı detektörleri ve tespit derişim aralığını göstermektedir.

Çizelge 2.2. Kullanılan dedektörler ve derisim aralığı (Locatelli ve Carlucci, 2010)

Detektör	Tayin Sınırı (mol L ⁻¹)
UV absorpsiyon	10 ⁻⁷ - 10 ⁻⁴
Floresans	10 ⁻⁹ - 10 ⁻⁴
Lazer indüklenmiş floresans	10 ⁻¹³ - 10 ⁻⁷
Amperometrik detektör	10 ⁻⁸ - 10 ⁻⁶
İletkenlik detektörü	10 ⁻⁷ - 10 ⁻⁵
Potansiyometrik detektör	10 ⁻⁸

2.9. UV / VIS absorbansı

UV/VIS detektörleri en yaygın olanıdır ve evrensel algılama sağlar. Bu, birçok analit türünü ölçmek için uygun olacakları anlamına gelir (Swinney ve Bornhop, 2000). Bu detektörler çoğu uygulama için makul algılama limitleri sağlayacaktır. Analit tarafından absorplanan ışının miktarı Lambert-Beer yasası ile hesaplanır.

$$A = \epsilon Cl \quad (2.18)$$

Burada,

A; absorbans,

ϵ ; analitin molar absorptivitesi ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$),

l; ışın yolunun uzunluğu (cm),

C; analit derişimi (mol L^{-1}).

2.10. Kapiler Elektroforez Modları

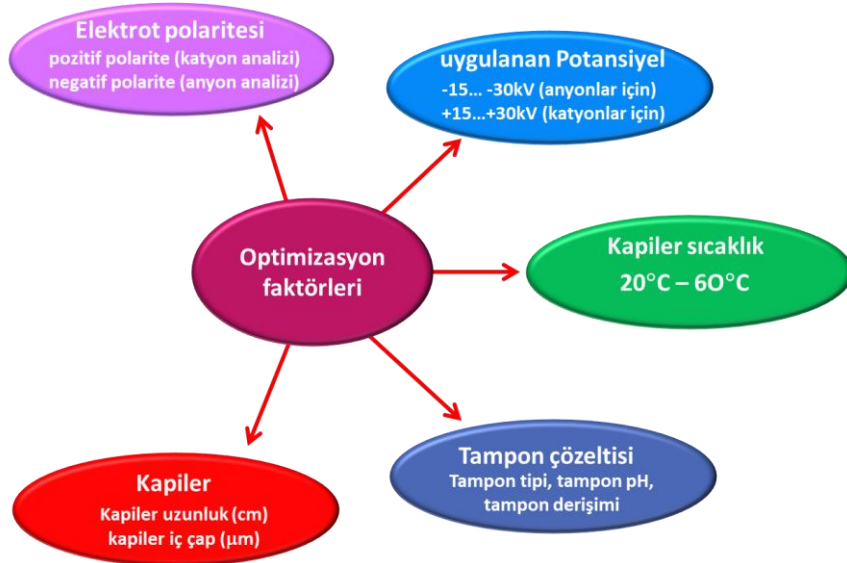
Geçmişten günümüze kadar, CE'nin spesifik analitlere adaptasyon için modifikasyonu önemli ölçüde gelişmiştir. Tüm farklı modlar, ayırma kolonu olarak bir kapiler boru, hareketli faz olarak bir elektrolit çözeltisi ve numuneyi hareketli fazda taşımak için bir elektrik alanı kullanır. Bu, benzer bir cihazın kullanılmasının, ilgilenilen spesifik analitler için, sadece küçük değişikliklerle tüm kapiler elektroforetik ayırmaların gerçekleştirmesini sağlamaktadır (Kaster vd, 1993). Çizelge 2.3 farklı kapiler elektroforez modlarını göstermektedir.

Çizelge 2.3. Kapiler elektroforez modları (Whatley, 2001)

Yöntem	Ayrırmanın Temeli
Misel elektrokinetik kromatografi	Analitlerin misel ile hidrofilik-hidrofobik farklılıkları
İzoelektrik odaklanma	Analitlerin izoelektrik nokta farklılıkları
Elektrokinetik kromatografi	Analitlerin ayırma tamponuna ilave edilen katkı maddesi ile farklı etkileşimi
Kapiler jel elektroforez	Analitlerin büyüklük farklılıklarına göre jel gözeneklerinden geçişi
İzoelektrik odaklanma	Analitlerin izoelektrik nokta farklılıkları
Kapiler elektrokromatografi	Analitlerin kapiler içine doldurulan sabit faz ile sıvı faz arasındaki dağılım farkı
Kapiler zon elektroforez	Analitlerin yük/büyüklük oranlarının farklılıkları

2.11. Kapiler Zone Elektroforez Optimizasyonu

Şekil 2.8' de kapiler elektroforezdeki etken faktörleri gösterilmektedir.



Şekil 2.8. Kapiler elektroforezdeki etken faktörleri

2.11.1. Kemometrik yöntemlerin kapiler elektroforez yöntemi optimizasyonunda uygulanması.

Ayırma seçiciliğini elde etmek ve performans kriterlerini karşılamak için kontrol edilmesi gereken birçok parametre ve değişken nedeniyle kapiler elektroforetik ayırmanın optimizasyonu zor olabilir. Analitik bir yöntemi optimize etmek için kemometrik bir yaklaşım kullanmanın avantajları, deney sayısındaki azalmaları, geliştirilmiş istatistiksel yorumları (özellikle istatistiksel yazılım paketlerinin mevcut kullanılabilirliği ile) ve azaltılmış süreyi içerir. Ayrıca, parametreler arasındaki etkileşim etkileri, diğer yöntemlerle yapılması imkansız olan deneysel tasarım deneyleri ile araştırılabilir (Ragonese vd, 2002).

Çizelge 2.4. Kapiler elektroforez optimizasyonunda kullanılan bazı kemometrik tasarımlar (Hanrahan vd, 2008)

Analitler	Faktörler	Kemometrik tasarım	Kaynaklar
Nitritler, nitratlar ve oksalat	Tampon derişimi, pH, Sıcaklık, gerilim	Tam faktöryel tasarım (FFD)	Erdogan, B. Y. and Onar (2011)
Fenolik bileşikler	Tampon derişimi, pH, gerilim	Merkezi kompozit tasarım (CCD)	Babar, E.J. vd.(2007)
Lösin enkefalin ve bağışıklık kompleksi	Tampon derişimi, pH, gerilim	Box-Behnken tasarım (BBD)	Ballus C.A. vd (2011)

2.11.2. Box-Behnken kemometrik Tasarım

Box – Behnken tasarımı, $N = k^2 + k + cp'$ ye göre bir deney numarası gerektirir; burada (k) faktör sayısı ve (cp) merkezi noktanın kopya sayısıdır Box-Behnken tasarımı, gerçek regresyon modeline en yakın olan bir regresyon modeli oluşturmayı amaçlayan bir cevap yüzeyi yöntemolojisidir. Yapılacak model gözlemlenen verilere dayanmaktadır ve model

ampiriktir (Tekindal, 2012). Aşağıda Çizelge 2.5’ de Box – Behnken tasarımı ve denklem 2.19’ de kemometrik model verilmektedir.

Çizelge 2.5. Box – Behnken tasarımı

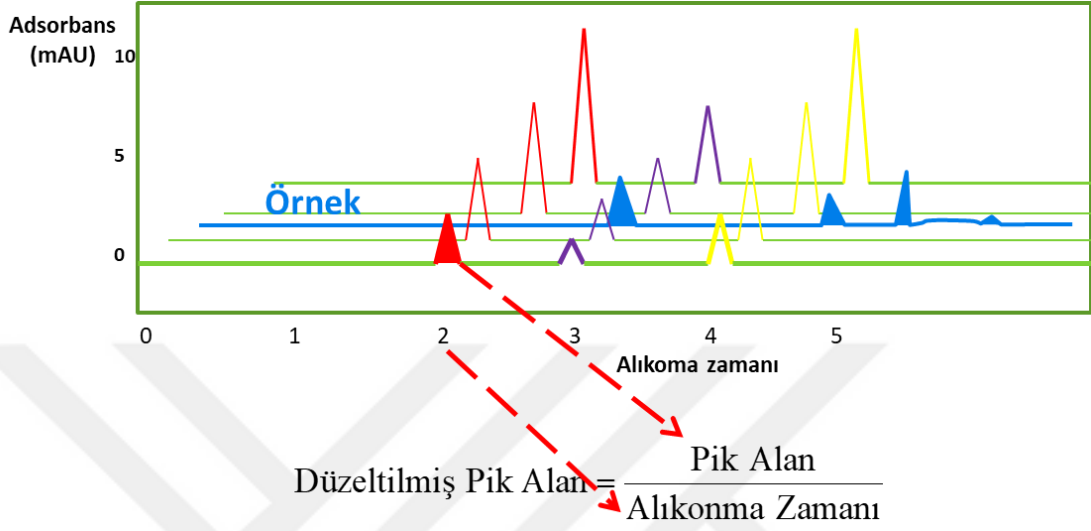
Deney Numara	x ₁	x ₂	x ₃	Tepki
1	-1	-1	0	
2	+1	-1	0	
3	-1	+1	0	
4	+1	+1	0	
5	-1	0	-1	
6	+1	0	-1	
7	-1	0	+1	
8	+1	0	+1	
9	0	-1	-1	
10	0	+1	-1	
11	0	-1	+1	
12	0	+1	+1	
13	0	0	0	
14	0	0	0	
15	0	0	0	

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + e \quad (2.19)$$

R² için 0,80 ile 0,99 arasında değişen bir regresyon katsayısı, cevabın tahmini için iyi bir korelasyon olduğunu gösterir (Abd El-Salam vd, 2019).

2.12. Verilerin Kalitatif ve Kantitatif Analizi

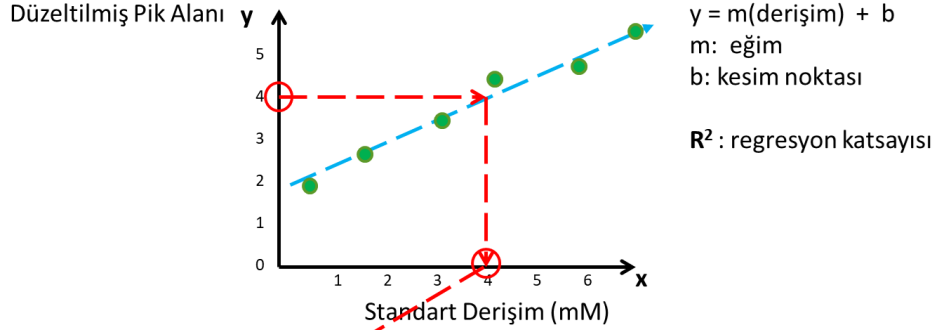
Kalitatif analiz, elektroferogramları analiz ederek ve aşağıdaki Şekil 2.9’da gösterildiği gibi numune ve standart için pik karşılaştırarak yapılır.



Şekil 2.9 Analitlerin Kalitatif Analizi

Kantitatif analiz ise, analitlerin düzeltilmiş pik alanının analiz edilmesiyle yapılır ve derişimin Şekil 2.10' da gösterildiği gibi standartların regresyon denkleminde elde edilir

Kalibrasyon eğrisi



$$\text{Derişim} = \frac{\text{düzeltilmiş Pik Alanı} - b}{m}$$

Derişim ($\text{mg L}^{-1} / \text{mg kg}^{-1} / \mu\text{g L}^{-1}$)

Şekil 2.10 Analitlerin kantitatif analizi

Kullanılan diğer istatistiksel hesaplamalar, aşağıdaki 2.20, 2.21, 2.22 denklemlerde gösterildiği gibi ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapmayı içerir.

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (2.20)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2.21)$$

$$\%BSS = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (2.22)$$

burada \bar{x} ortalama, SD standart sapma ve % BSS bağıl standart sapmadır.

2.13. Kapiler Elektroferez ile Yapılan Çalışmalar

Erdoğan Yavuz ve arkadaşları, optimize edilmiş koşulların belirlenmesi için tam faktöriyelin uygulandığı lahanaya ve yaprak bezelye sebzelerinde nitrat, nitrit ve oksalat

iyonlarının eşzamanlı olarak belirlenmesi için bir CZE yöntemi geliştirmiştir. 50 µm x 42 cm (etkin uzunluk 35 cm) erimiş silika kapiler kullanarak 30°C sıcaklıkta, -20 kV potansiyel uygulayarak bu iyonları ayırmışlardır. Tampon çözeltisi olarak 50 mM fosfat tamponu (pH:3,5) ile 50 mbar basınç ve 50 s enjeksiyon süresi kullanmışlardır (Erdoğan Yavuz ve Onar, 2012).

Erol Özge ve arkadaşları, ateşli silah kalıntılarındaki nitrat ve nitritin eşzamanlı olarak belirlenmesi için bir CZE kullandılar. 214 nm'de UV ışını ile pH 3,5' te 50 mM sodyum fosfat tamponunda tayin yaptılar. Ulaşılan LOD'lar sırasıyla 6,7 ve 4,3 µM idi (Erol Özge vd, 2017).

Takayanagi ve arkadaşları, içme suyundaki bromat iyonunu, doğrudan fotometrik deteksiyon kullanarak kapiler elektroforez ile belirlemişlerdir. Numune çözeltisindeki bromat iyonu, -10 kV'de 50 s boyunca elektrokinetik enjeksiyon ile kapiler kısımda konsantre edilmiştir. Elektroforetik ayırma, uygulanan -25 kV gerilimde yapılmış ve bromat iyonu, 193 nm dalga boyunda tespit edilmiştir. Bromat iyonunun alıkonma zamanı 5 dakika içinde tespit edilmiştir (Takayanagi vd, 2006).

Amran ve arkadaşları, nehir suyunda bromür, bromat, iyodat, iyodür, nitrit, nitrat ve selenit anyonlarının 25 mM fosfat tamponu, 40°C kapiler sıcaklığı, 3,0 pH değerinde ve -20 kV uygulanan potansiyel kullanılarak nehir kıllarında ayrılması için bir kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir (Amran vd, 1993).

2.14. Kapiler Elektroforez Kullanmanın Avantajları

1. Küçük numune hacmi gerekir (1-50 nL enjekte edilir)
2. Sınırlı miktarda kimyasal ve reaktif gereklidir (finansal ve çevresel faydalar)
3. Sulu ortamlarda çalışır
4. Basit enstrümantasyon ve yöntem geliştirme
5. Otomatik enstrümantasyon
6. Seçiciliği ve geniş uygulama aralığını değiştirmek için çok sayıda seçeneklere sahiptir.
7. Diğer tekniklere (LC, TLC, SFC, GC) kıyasla daha geniş analit seçimine uygulanabilir

8. Makro ve mikromoleküllere uygulanabilir
9. Yüklü ve nötr çözünen maddeler için geçerlidir
10. Modern detektör teknolojileri (DAD, MS) kullanılmaktadır.

2.15. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, orta Karadeniz bölgesinde yetişen çeşitli bitkilerde (çoğu çay infüzyonu olarak alınır) NO_3^- , NO_2^- ve BrO_3^- 'ün eşzamanlı olarak belirlenmesi için seçici, hızlı, ucuz bir kapiler elektroforetik yöntem geliştirmektir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

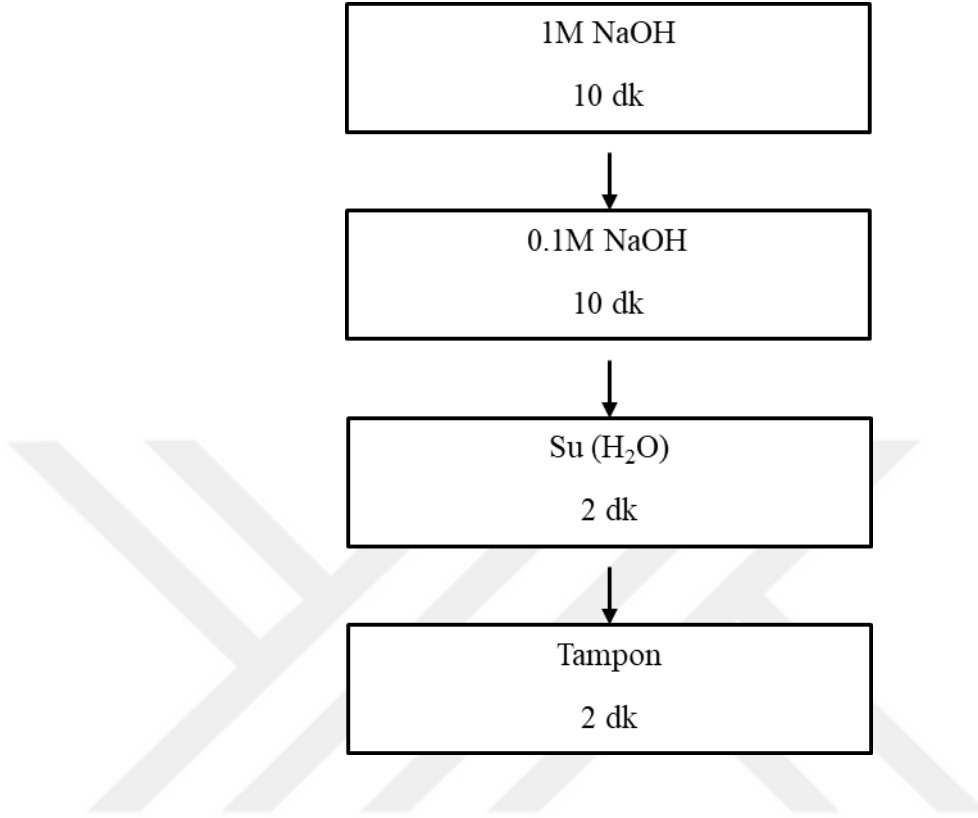
3.1. Kullanılan Cihazlar

Deneyler, 190 ila 214 nm arasında bir diyot ışını detektörüne sahip bir Agilent HP^{3D} kapiler elektroforez sistemi ile gerçekleştirildi. Toplam uzunluğu 61,5 cm, 50 µm iç çaplı ve etkin uzunluğu 53,5 cm olan kaplanmamış Polymicro Technologies marka erimiş silika kolonlar kullanılmıştır. Veri işleme Agilent Chemstation yazılımı kullanılarak yapılmıştır. pH; pH 1100 / pH 2100 Bench pH metre kullanarak ayarlanmıştır. Suyu saflaştırmak için bir Milli-Q ultra saflaştırma sistemi (Millipore, Bedford, MA, ABD) kullanıldı. Tartımlar için; Avery Berkel 0,0001 duyarlıkta terazi kullanılmıştır.

3.2. Yıkama Yöntemi

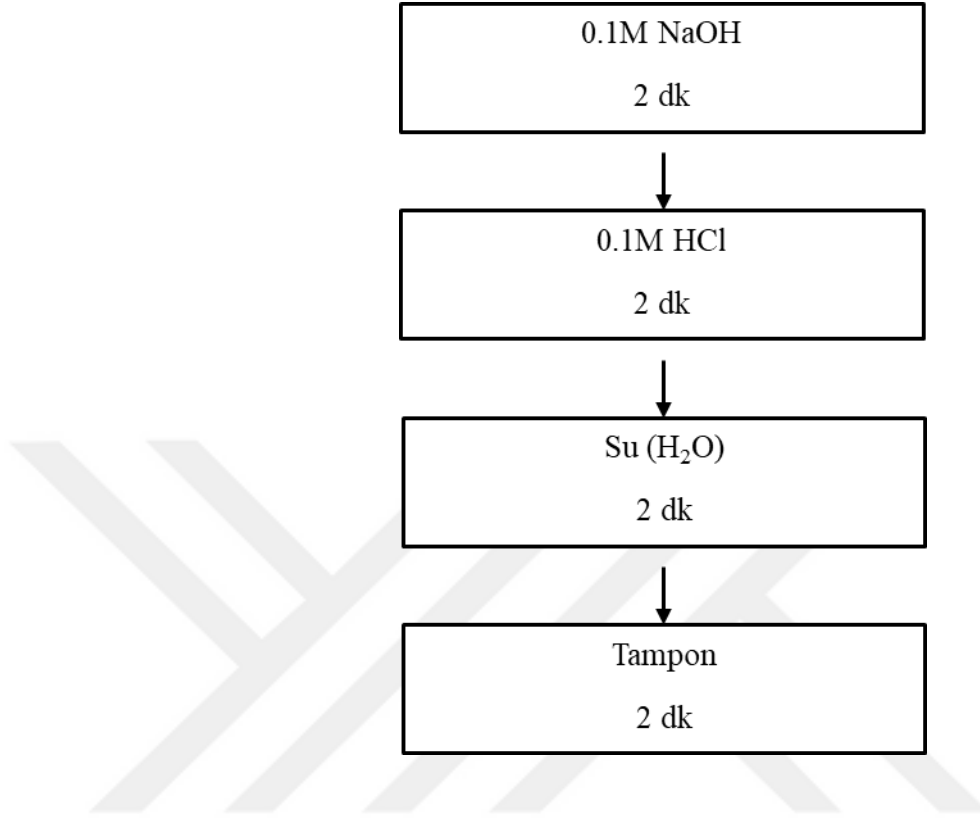
1. Analizde kullanılan yeni kapilerin koşullandırılması:

Analizde kullanılan tüm yeni kapiler kolon ilk olarak 10 dakika boyunca 1M sodyum hidroksit, 10 dakika 0,1M sodyum hidroksit, 2 dakika su ve 2 dakika fosfat tampon çözeltisi ile numune analizinde kullanılmadan önce koşullandı.



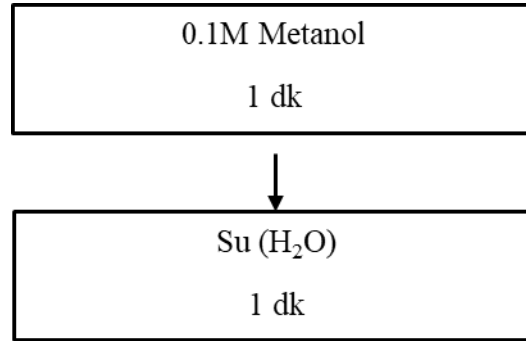
2. Ara yıkamada kapilerin koşullandırılması

Her çalışmadan önce kapiler, 2 dakika 0,1 M sodyum hidroksit, 2 dakika 0,1 M hidroklorik asit, 2 dakika su ve 2 dakika tampon çözeltisi ile koşullandı.



3. Analiz bittikten sonra kapilerin son koşullandırması

Son koşullu yıkama, 1 dakikalık su ile yıkamayı ve 1 dakikalık 0,1 M metanol yıkamasını içermiştir. 0,1M metanol ile bir yıkama, kararlı bir başlangıç çizgisi (bazeline) sağlamıştır. Ayrıca iyi bir geçiş süresi tekrarlanabilirliği de sağlamıştır.



3.3. Kullanılan Kimyasallar

Deneylerde kullanılan tüm kimyasallar daha fazla saflaştırılmayı gerektirmeyen analitik saflıktadır. Çalışmada kullanılan sodyum nitrat, sodyum nitrit Carlo Erba' dan, potasyum bromate, sodyum dihidrojen fosfat Merck' den ve % 96' lık (w/w) fosforik asit J.T. Baker' dan temin edilmiştir. Tüm çözeltiler, deiyonize edilmiş su ile kullanılarak hazırlanarak 0,45 µm 'lik bir membran filtreden süzüldü ve 4 °C de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.4. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

100 mM 250 mL deiyonize su içinde monobazik sodyum fosfat stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözelti daha sonra istenen çalışma derişimlerine seyreltildi. Arzu edilen pH, hidroklorik asit ve pH metre kullanılarak ayarlandı.

10' ar mM'lık sodyum nitrat, sodyum nitrit ve potasyum bromatın stok çözeltileri 50 mL deiyonize su içinde hazırlandı. Her çözeltinin 10 mM' ı, diyonize su ile istenen çalışma derişimine seyrelterek standart çözeltiler hazırlandı. Kalibrasyon eğrilerinin elde edilmesinde kullanılan tüm standart çözeltiler, analitlerin stok çözeltilerinin seyreltilmesi ve iyonların bir karışımının oluşturulmasıyla hazırlandı. Geri alınabilirlik deneyleri, numunelere bilinen standart iyon karışımı derişimlerinin ilave edilmesinden oluşturuldu.

3.5. Örneklerinin Hazırlanması

Samsun' daki marketlerden **G1** (kiraz sapı; kuru karışık bitki çayı), **G2** (kiraz sapı), **G3** (kuru nar çiçeği), **G4** (kuru zeytin yaprağı) ve **G5** (siyah çay) olmak üzere beş farklı bitki örneği satın alındı. Literatürdeki bir numune hazırlama yöntemine göre, her bir numuneden 2,5 g tartılarak, 200 mL deiyonize su içinde 5 dakika kaynatıldı. Ekstrakt daha sonra 0,45 µm'lik bir filtreden süzüldü ve 4°C 'de buzdolabında saklandı (Erdoğan Yavuz B vd, 2011).

T1 (rezene; bitki çayı), **T2** (kiraz sapı; bitki çayı), **T3** (böğürtlenli çay; karışık meyve çayı), **T4** (elma çayı; karışık meyve çayı), **T5** (bitki çayı), **T6** (mistik çay; bitkisel çay), **T7** (deren çay; siyah çay), **T8** (yeşil çay), **T9** (siyah çay) ve Karadeniz'in farklı yerlerinde yetiştirilen **T10** (siyah çay) Samsun kentindeki marketlerden satın alındı. Her

bir çay markasından, 2,5 g tartılarak, 200 mL deiyonize su içinde 5 dakika kaynatıldı. **W1** (doğal kaynaksuyu), **W2** (doğal kaynak suyu), **W3** (arıtılmış musluk suyu) ve **W4** (laboratuvardaki musluk suyu) olarak adlandırılan tüm su numuneleri de 0,45 μm 'lik bir filtreden süzüldü ve analizden önce 4°C 'de buzdolabında saklandı. Her numune üç kez analiz edildi.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Yöntem Optimizasyonu

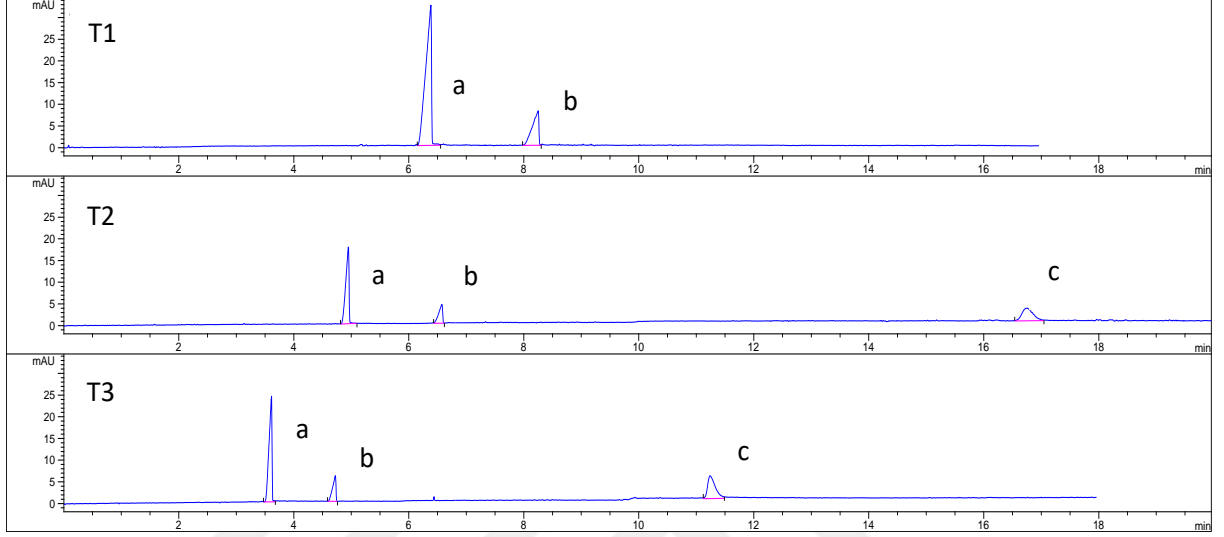
4.1.1. Fosfat tampon derişimi, voltaj ve sıcaklığın incelenmesi

Çizelge 4.1. Tam faktöryel kemometrik tasarımıpH öncelikle 3,0' da sabit tutarak tampon derişimi ve kapiler sıcaklığı tam faktöryel kemometrik tasarım kullanarak belirlendi.

Deney No	Tampon derişim (mM)	Sıcaklık (°C)	Voltaj (kV)	NO ₃ ⁻ DPA	NO ₂ ⁻ DPA	BrO ₃ ⁻ DPA
1	50	20	15	35,4670	7,5889	-
2	70	20	15	18,3788	4,2027	-
3	50	40	15	40,7278	8,8598	4,8439
4	70	40	15	16,4918	3,4592	-
5	50	20	20	23,1445	4,9142	4,4910
6	70	20	20	12,0360	2,9451	-
7	50	40	20	24,1360	5,1118	4,3089
8	70	40	20	16,5296	4,0605	2,0079

DPA; Düzeltilmiş Pik Alanı

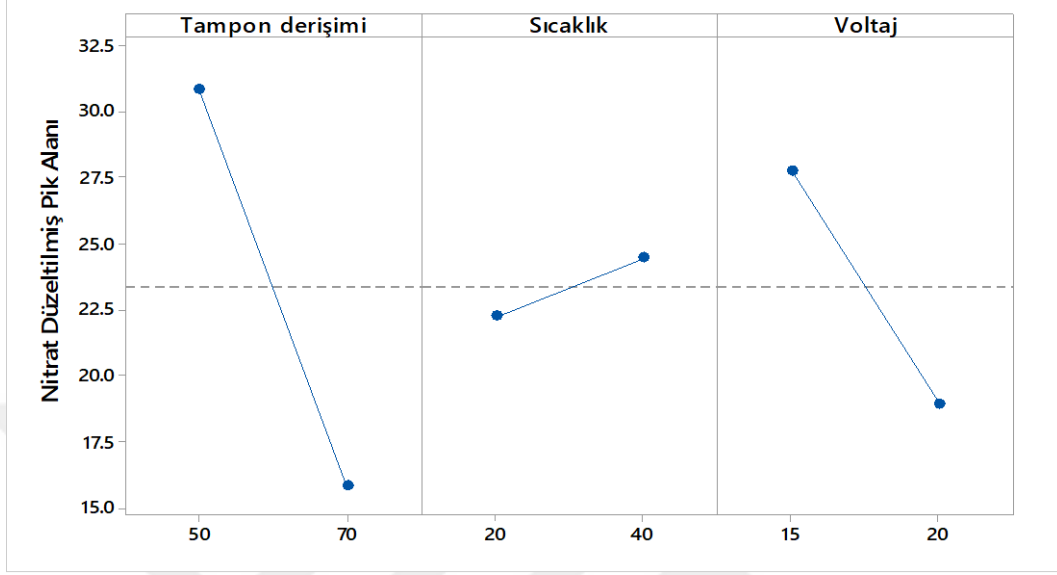
Çizelge 4.1' de görüldüğü gibi, tüm analitler için en yüksek düzeltilmiş pik alanları en uygun 40 °C 'da elde edildi. Şekil 4.1' deki elektroferogram, 50 mM' lık sabit bir tampon derişiminde sıcaklık ve voltajın tüm piklerin göç zamanı üzerindeki etkisini göstermektedir.



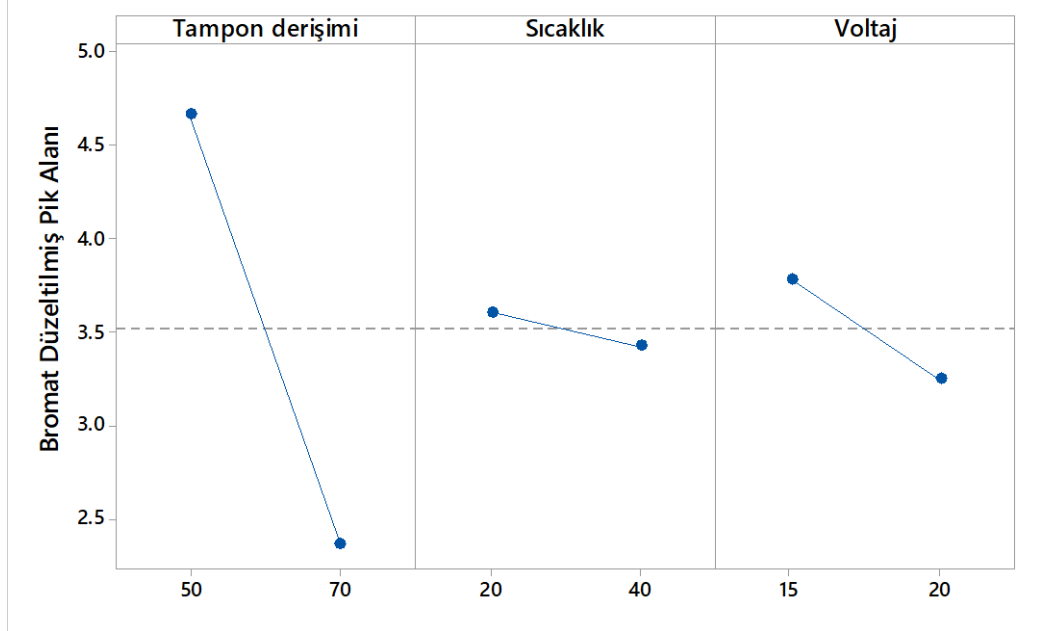
Şekil 4.1 Sıcaklık ve voltajın piklerin göç zamanının üzerindeki etkisi, voltaj; -20 kV, kapiler uzunluk; 61,5 cm (etkin uzunluk 53,5 cm) iç çap; 50 μ m, dalga boyu; 200 nm, tampon derişimi; 50 mM fosfat tamponu, pH; 3,0, enjeksiyon süresi; 50 mbar x 30 s, elektroferogram T1; -15 kV uygulanan voltaj; 20 °C sıcaklık , elektroferogram T2; -15 kV uygulanan voltaj; 40 °C sıcaklık, elektroferogram T3; -20 kV uygulanan voltaj; 40 °C sıcaklık : Pikler; a: Nitrat, b: Bromat, c: Nitrit.

4.1.2. Fosfat tampon derişimi, voltaj ve sıcaklığı pik alan üzerindeki etkileri

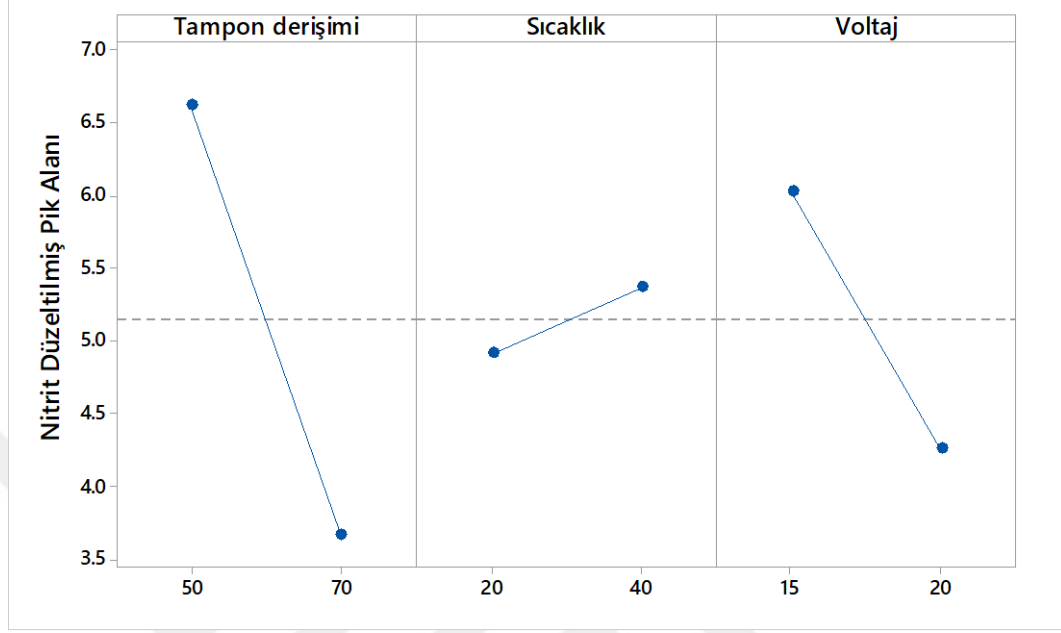
Her bir analit için tampon derişimi, sıcaklık ve voltaj'ın düzeltilmiş pik alan üzerindeki ana etkileri aşağıdaki grafiklerde gösterilmektedir.



Şekil 4.2 Nitrat için tam faktöryel ana etkiler grafiği



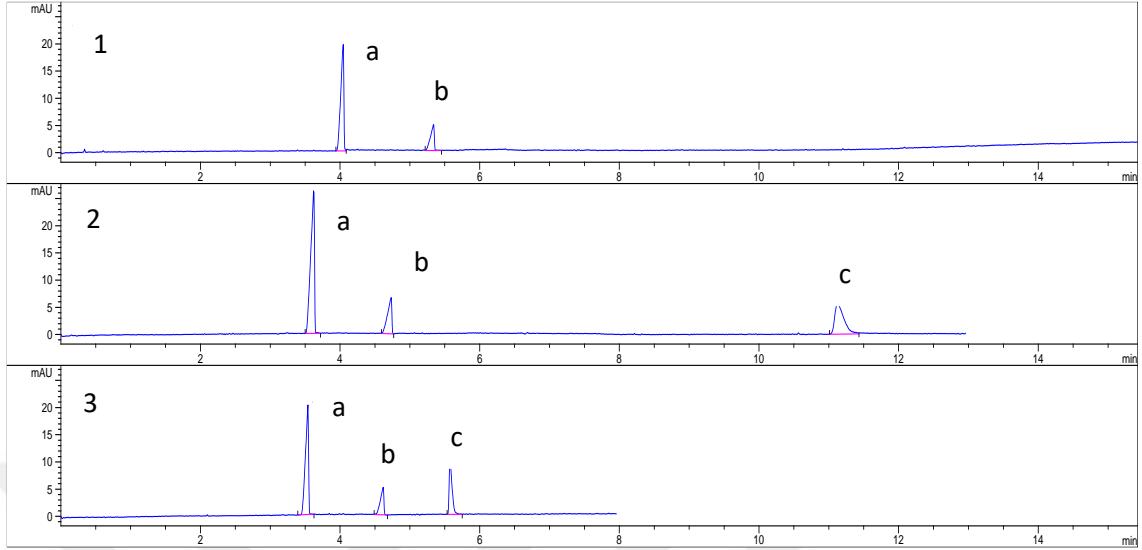
Şekil 4.3 Bromat için tam faktöryel ana etkiler grafiği



Şekil 4.4 Nitrit için tam faktöryel ana etkiler grafiği

4.1.3. pH, tampon derişimi, uygulanan voltaj ve sıcaklığın etkisi

Fosfat, borat gibi inorganik tamponlar çok az UV absorpsiyonu gösterdikleri için kapiler elektroforezde kullanılmaktadır. Bu sebeple 190-210 nm gibi çok düşük dalga boylarında ve düşük pH' da inorganik anyonların analizi için uygundur (Sänger, 2012). Bundan dolayı, bu çalışmada bir fosfat tamponu seçilmiş ve nitrat, nitrit ve bromatın ayrılması üzerindeki pH etkisini incelemek için 2,5-3,5 arasındaki pH aralığı seçilmiştir. 50 mM fosfat tampon derişimi, uygulanan -20 kV voltaj ve kapiler sıcaklık 40°C sabit tutulurken, pH'ın nitrat, nitrit ve bromat iyonlarının ayrılması üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sonuçlar, nitrit iyonunun, 2,5 pH' da analizden sonraki 16 dakika içinde ortaya çıkmadığını gösterdi. pH' ın 3,0' a yükseltilmesi, alıkonma zamanını 10 dakikaya düşürdü, ancak hala nitrit geç gelmekteydi. Üç analitin eşzamanlı olarak tayini için arzu edilen analiz süresi, Şekil 4.5' te gösterildiği gibi pH 3,5 yapılarak elde edildi.



Şekil 4.5. pH değerinin göç zamanının üzerindeki etkisi, voltaj; -20 kV, kapiler uzunluk; 61,5 cm (etkin uzunluk 53,5 cm) iç çap; 50 μ m, dalga boyu; 200 nm, tampon derişimi; 50 mM fosfat tamponu, sıcaklık; 40 $^{\circ}$ C, enjeksiyon; 50 mbar x 30 s, Pikler; a: Nitrat, b: Bromat, c: Nitrit, elektroferogram 1: pH; 2,5 elektroferogram 2: pH; 3,0 elektroferogram 3: pH; 3,5

4.1.4. Box-Behnken kemometrik yöntem uygulanması

Diğer faktörlerin etkisini incelemek ve yöntemin optimal koşullarını belirlemek için Box-Behnken kemometrik tasarım kullanılmıştır. Bu tasarım, her biri üç düzeyde değişen üç faktörün doğrusal, kuadratik ve çapraz ürün etkilerinin araştırılmasına yardımcı olur, bunlar arasında üç çoğaltma için üç merkez noktası bulunur (Maran vd, 2013; Tekindal, 2012). Bu çalışmada, incelenmekte olan üç faktör tampon pH (X_1), tampon derişimi (X_2) ve uygulanan voltaj (X_3) dır. Üç faktörün her biri sırasıyla +1, 0 ve -1 olarak belirtilen yüksek, orta ve düşük seviyeye ayarlanmıştır. Çizelge 4.2’de, 3 seviyede ayarlanan 3 faktör için bir Box-Behnken tasarımında 15 deneyin gerçekleştirilmesinden elde edilen sonuçları göstermektedir. Bu çalışmada kemometrik modeller için test edilen ana cevap nitrat, nitrit ve bromat için düzeltilmiş pik alanlarıydı. Çok değişkenli varyans analizi (ANOVA) minitab 18 kullanılarak yapıldı. Nitrat, bromat ve nitrit için düzeltilmiş pik alanı, pik alanın göç zamanına bölünmesiyle hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2. 15 çalışma ve 3 parametrelili Box-Behnken deney tasarımı

Dene y	Derişim (mM)	Voltaj (kV)	pH	NO ₃ ⁻	BrO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻
				Düzeltilmiş PA	Düzeltilmiş PA	Düzeltilmiş PA
1	50(-1)	20(-1)	3,25(0)	48,5372	10,9151	12,6454
2	70(+1)	20(-1)	3,25(0)	42,2910	9,4574	11,8719
3	50(-1)	25(+1)	3,25(0)	14,2857	3,2313	3,9121
4	70(+1)	25(+1)	3,25(0)	16,1278	3,8797	3,9137
5	50(-1)	22,5(0)	3,00(-1)	15,9894	3,6811	2,9021
6	70(+1)	22,5(0)	3,00(-1)	19,3914	4,1533	2,5864
7	50(-1)	22,5(0)	3,50(+1)	19,7343	6,5901	7,2461
8	70(+1)	22,5(0)	3,50(+1)	19,1510	4,2164	5,9350
9	60(0)	20(-1)	3,00(-1)	13,4122	3,0575	2,2369
10	60(0)	25(+1)	3,00(-1)	16,3636	3,6093	3,4657
11	60(0)	20(-1)	3,50(+1)	42,2692	9,5238	10,2787
12	60(0)	25(+1)	3,50(+1)	19,7947	4,2716	5,7594
13	60(0)	22,5(0)	3,25(0)	43,4517	9,6135	13,5897
14	60(0)	22,5(0)	3,25(0)	43,4783	9,2556	13,0103
15	60(0)	22,5(0)	3,25(0)	42,9711	9,0552	13,1095

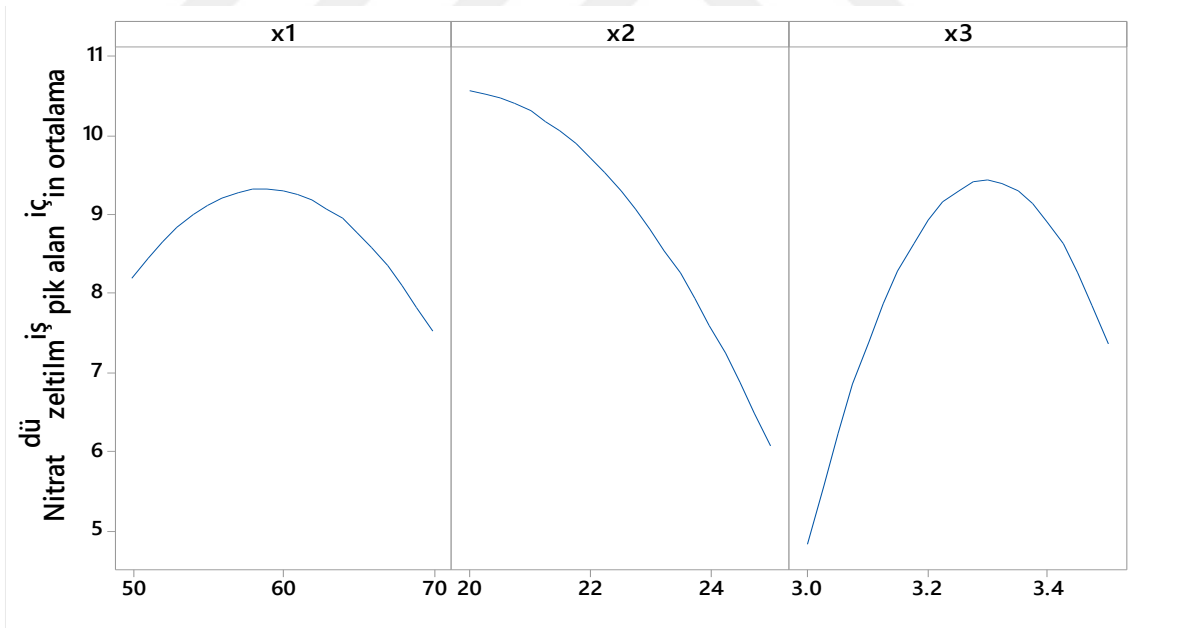
PA; Pik Alanı

Çizelge 4.3' te görüldüğü gibi, çok değişkenli analiz, elde edilen regresyon katsayıları (R^2) bir Box-Behnken tasarımı için kabul edilebilir aralıkta olduğunu ve kemometrik modellerin hepsinin düzeltilmiş pikin belirlenmesi için anlamlı olduğunu ($P < 0,05$) gösterdi (Arida vd, 2016; Dudhipala ve Janga, 2017).

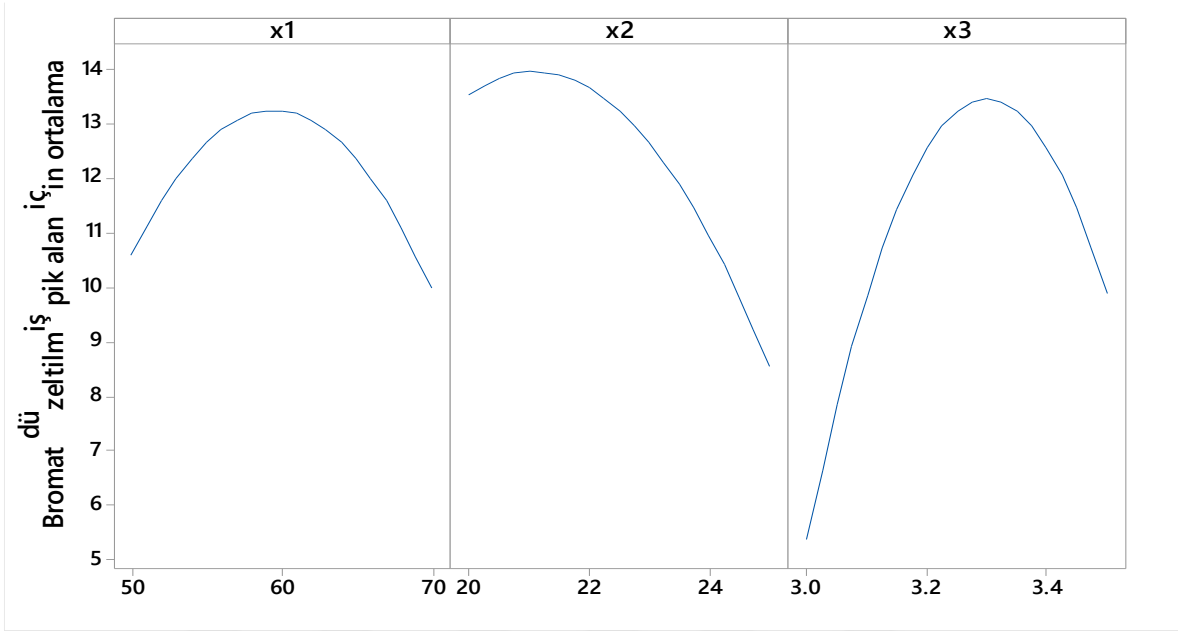
Çizelge 4.3. Box-Behnken tasarımı için kemometrik modeller

Analit	Kemometrik modeller	R ²	P değeri (<0,05)
Nitrat	Düzeltilmiş Pik Alanı = $-4008 + 9,89x_1 + 55,2x_2 + 1939x_3 - 0,0869x_1x_1 - 0,688x_2x_2 - 256,7x_3x_3 + 0,081x_1x_2 - 0,40x_1x_3 - 10,17x_2x_3$	0,879	0,045
Bromat	Düzeltilmiş Pik Alanı = $-1401 + 3,67x_1 + 21,8x_2 + 650x_3 - 0,0296x_1x_1 - 0,351x_2x_2 - 89,8x_3x_3 + 0,0078x_1x_2 - 0,100x_1x_3 - 2,30x_2x_3$	0,905	0,041
Nitrit	Düzeltilmiş Pik Alanı = $-855 + 2,15x_1 + 12,52x_2 + 407,3x_3 - 0,01446x_1x_1 - 0,159x_2x_2 - 51,2x_3x_3 + 0,0211x_1x_2 - 0,285x_1x_3 - 2,32x_2x_3$	0,907	0,033

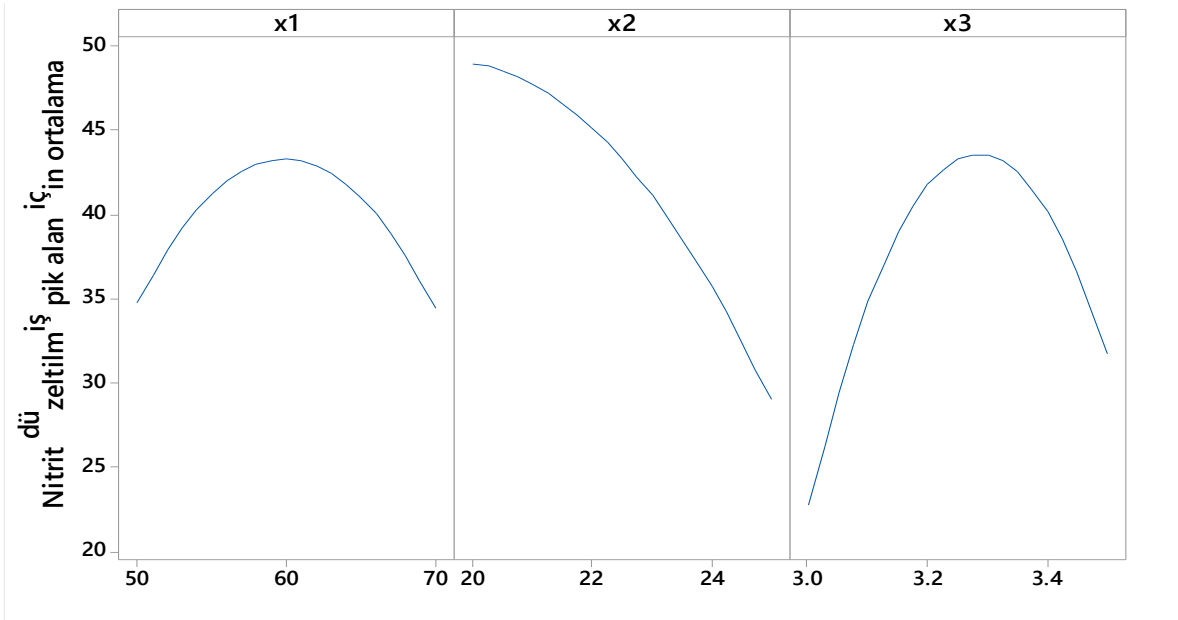
X₁ = Tampon derişim (mM); X₂ = Uygulanan Voltaj (kV); X₃ = Tampon pH; R² = Artıklar kullanarak logaritmik olasılık grafiklerinin regresyon katsayısı



Şekil 4.6 Nitrat için Box-Behnken tasarımı ana etkiler grafiği



Şekil 4.7 Bromat için Box-Behnken tasarımı ana etkiler grafiği



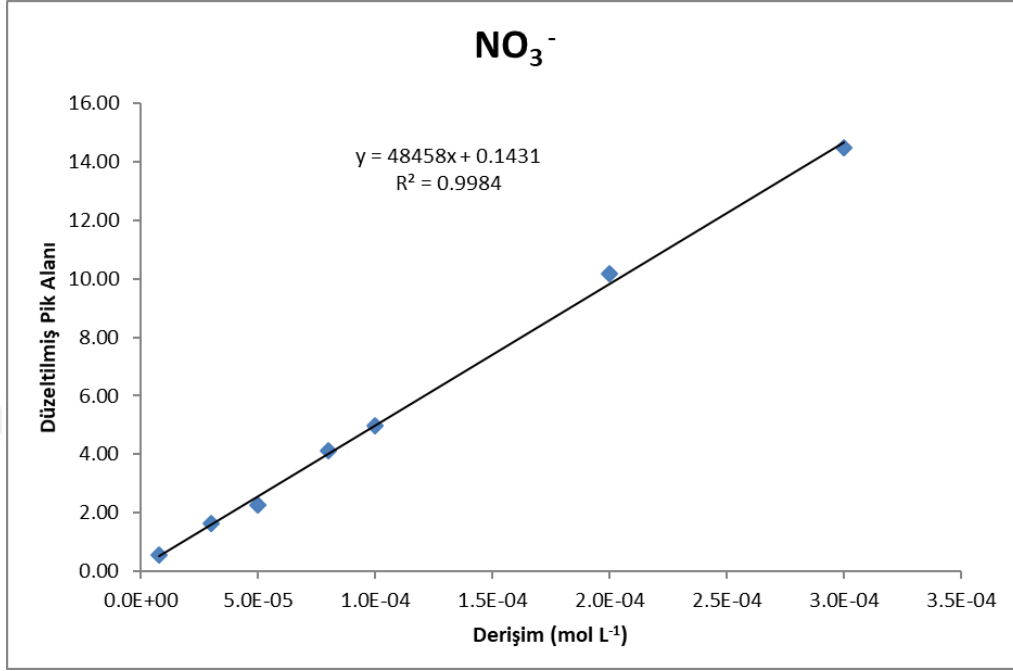
Şekil 4.8 Nitrit için Box-Behnken tasarımı ana etkiler grafiği

Bu çalışmada, faktörlerin düzeltilmiş pik alanını nasıl etkilediğini incelemek için her analit için ana etki grafiğinin çizilmesiyle optimum koşullar belirlenmiştir. Şekil 4.6, 4.7, 4.8'de gösterildiği gibi, tüm analitler için grafiklerde eğrilik vardı. Tüm analitler için tampon derişiminin arttırılması, düzeltilmiş pik alanında maksimum 60 mM'de bir artış sağladı. Uygulanan voltajın 22,5 kV'da düzeltilmiş bir maksimum tepe alanı vardı. PH'ın etkisi, düzeltilmiş pik alanda pH 3,0 ila 3,25 arasında bir artış gösterdi. . Bununla birlikte, ana etki grafiğinin 3,25'lik bir pH'ın uygun olduğunu göstermesine rağmen, çalışmanın amacının bir kısmı, Şekil 4.6, 4.7, 4.8'de gösterildiği gibi sadece 3,5'lik bir pH'da elde edilebilen hızlı bir analiz elde etmektir. Bu nedenle, optimal koşulların 3,5 pH, -22,5 kV uygulanan voltaj, 40°C sıcaklık ve 60 mM fosfat tampon derişimi olarak seçilmesidir.

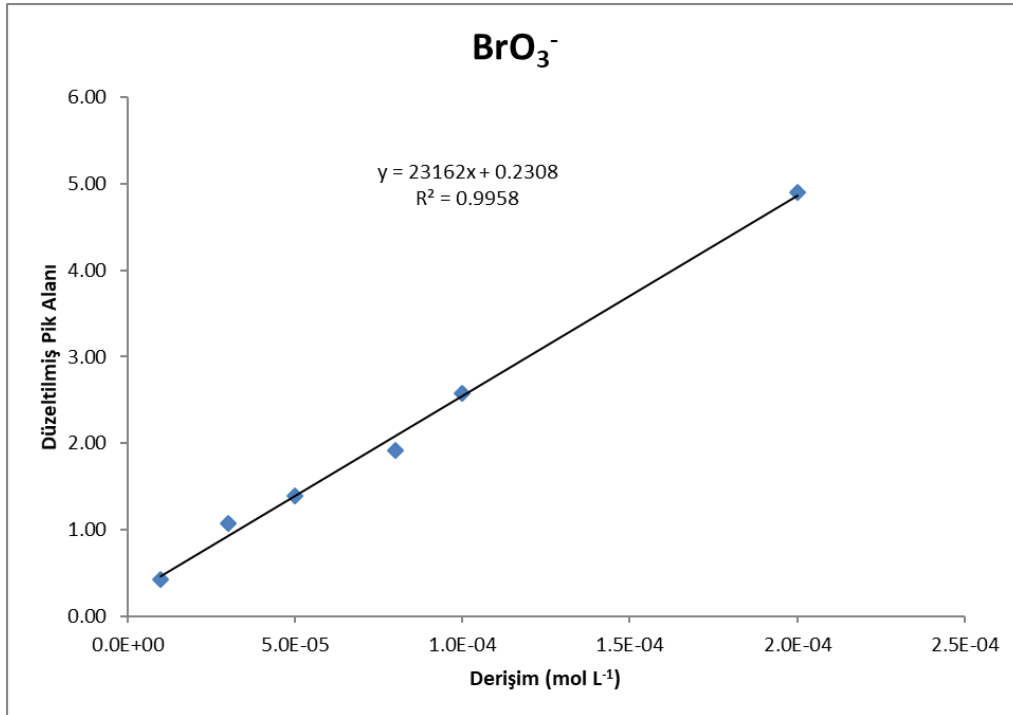
4.2. Yöntem Validasyonu

4.2.1. Doğrusallık

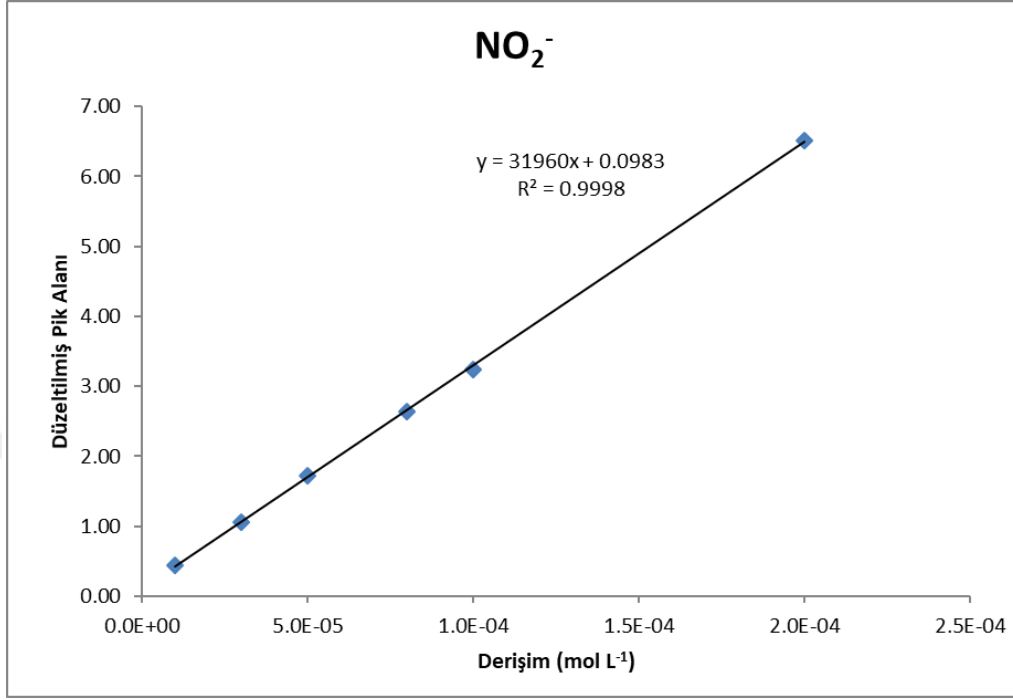
0,5-65 mg L⁻¹ arasındaki derişimlerde kalibrasyon eğrileri hazırlandı. Sonuçlar, Şekil 4.9, 4.10, 4.11 gösterildiği gibi 0,993 ile 0,998 arasında iyi bir korelasyon katsayılarına sahiptir. Kalibrasyon grafiklerinin kesişme noktalarındaki standart sapmalar, MS Excel kullanılarak hesaplandı. Daha sonra kesişme değerine üç kez standart kesişme sapması ilave edildi ve karşılık gelen derişim, gözlenebilme sınırı (LOD) olarak hesaplandı. Kesişimin on kat standart sapması aynı şekilde kullanılarak, karşılık gelen derişim tayin sınırı (LOQ) olarak belirlendi.



Şekil 4.9. Nitrat Kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.10. Bromat Kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.11. Nitrit kalibrasyon eğrisi

Çizelge 4.4. Yöntemin doğrusal performansı

Parametre	Nitrat	Bromat	Nitrit
Doğrusallık			
Doğrusal aralık (mg L ⁻¹)	0,5-65	0,5-65	0,5-65
Eğim için güven aralığı	48458,51 ± 870,92	23162,27 ± 753,29	31959,6 ± 246,59
Kesim noktası	0,1431 ± 0,13	0,230782 ± 0,08	0,0983 ± 0,02
için güven aralığı			
LOD (mg L ⁻¹)	0,49	1,25	0,11
LOQ (mg L ⁻¹)	1,63	4,16	0,35

4.2.2. Tekrarlanabilirlik

Yöntemin hassaslık araştırmaları gün içi ve gün arası tekrarlanabilirlik sonuçları yüzde bağıl standart sapma (% BSS) açısından analiz edilerek yapıldı. Gün içi tekrarlanabilirlik, analitlerin standart bir karışımı için günün farklı zamanlarında  enjeksiyon yapılarak hesaplanmıştır. Günler arası tekrarlanabilirlikler, farklı günlerde standart analit karışımının tek bir enjeksiyonunun arka arkaya yedi gün yapılmasıyla değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar, g zamanında hem gün içi hem de günler arası tekrarlanabilirlikler için 1,59' dan daha düşük bir bağıl standart sapma gösterirken, hem analitik hem de gün içi tekrarlanabilirlikler tüm analitler için düzeltilmiş pik alan için 5,97' den düşük değerler gözlenmiştir.

Çizelge 4.5. Yöntemin tekrarlanabilirlik performansı

Parametre	Nitrat	Bromat	Nitrit
Gün içi			
tekrarlanabilirlik			
(n = 3)			
Ortalama	7,53	2,20	4,23
Düzeltilmiş Pik Alanı			
Düzeltilmiş Pik Alanı (% BSS)	2,03	4,55	3,61
Ortalama Göç Zamanı	3,17	4,19	4,93
Göç Zamanı (% BSS)	0,93	1,03	1,59
Gün arası			
tekrarlanabilirlik			
(n = 7)			
Ortalama	8,33	2,73	4,83
Düzeltilmiş Pik Alanı			
Düzeltilmiş Pik Alanı (% BSS)	1,39	2,11	5,97
Ortalama Göç Zamanı	3,20	4,23	5,00
Göç Zamanı (% BSS)	0,72	0,90	1,34

4.2.3. Geri alınabilirlik

Geri kazanım analizleri standart ekleme yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm nitrat, nitrit ve bromat anyonlarının standart çözeltileri, üç farklı derişimde (0,1, 0,3 ve 0,5 µM) tüm numunelere ilave edildi.

% Geri alınabilirliğin hesaplanmasında kullanılan formül ve elde edilen tüm geri alınabilirlikler Çizelge 4.6' da gösterilmiştir.

$$\% \text{ Geri alınabilirlik} = \frac{\text{standart eklenmiş numune derişimi}}{\text{eklenen standardın derişimi}} \times 100 \quad (4.23)$$

Çizelge 4.6. Üç farklı derişimde nitrit, bromat ve nitrit anyonları için % geri alınabilirlik değerleri

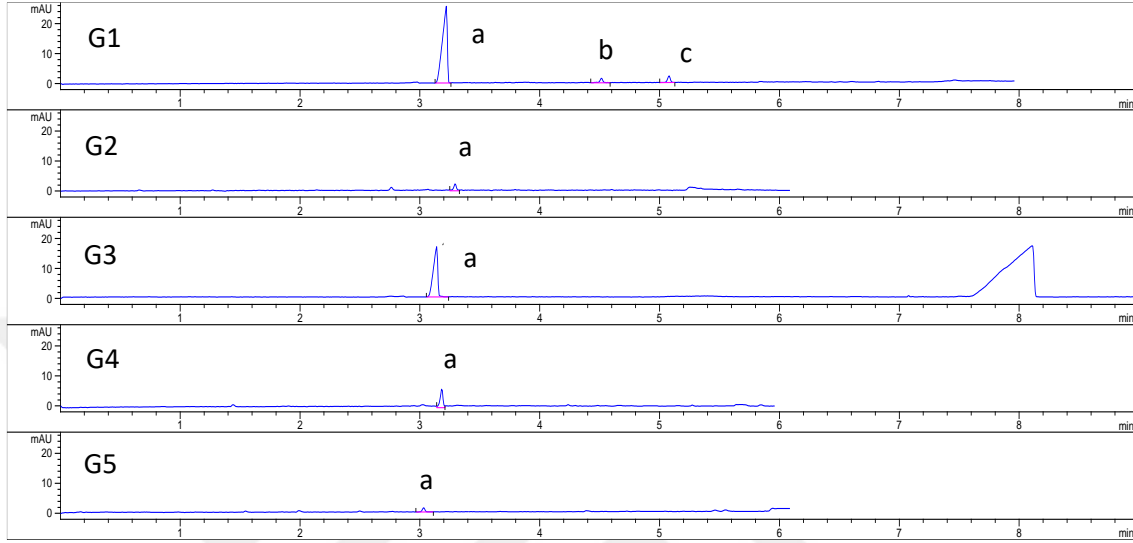
Sample	Nitrat	Bromat	Nitrit
G1	103,75	103,46	105,69
G2	90,71	97,52	93,30
G3	92,92	107,49	109,11
G4	101,36	106,98	98,29
G5	90,99	95,73	93,30
T1	109,09	100,01	104,03
T2	112,62	100,76	107,95
T3	85,74	92,59	95,80
T4	84,45	102,45	94,33
T5	88,17	101,26	98,46
T6	92,35	96,03	94,73
T7	92,90	95,74	96,63
T8	85,09	98,97	85,15
T9	99,50	90,23	95,90
T10	91,82	101,01	95,80
W1	100,16	101,42	90,99
W2	95,36	95,73	93,51
W3	90,21	93,42	97,80
W4	99,34	104,99	103,62

4.3. Yöntemin Örneklere Uygulanması

4.3.1. Nitrat ,nitrit ve bromat iyonların bitki örneklerinde tayini

Bu çalışma için beş bitki örneğindeki mg L⁻¹ cinsinden belirlenen analit derişimleri, Çizelge 4.7'de gösterilmektedir. İncelenen bitki örnekleri için nitrat, nitrit ve bromat derişimleri, gıdalarda WHO tarafından belirlenen maksimum kabul edilebilir günlük alım sınırı ile karşılaştırıldı (nitrat için 3,7 mg L⁻¹, nitrit için 0,07 mg L⁻¹ ve bromat için

0,01 mg L⁻¹). Şekil 4.12’ de ise beş farklı bitki örneklerindeki anyonların elektroferogramları görülmektedir.



Şekil 4.12. Beş farklı bitki örneğinin elektroferogramı,

voltaj; -22,5 kV, kapiler uzunluk; 61,5 cm (etkin uzunluk 53,5 cm) iç çap; 50 µm, dalga boyu; 200 nm, tampon derişimi; 60 mM fosfat tamponu, sıcaklık; 40 °C, pH; 3,5, enjeksiyon; 50 mbar x 30 s, Pikler; a: nitrat, b: bromat, c: nitrit

Çizelge 4.7. Bitki örneklerinde nitrat, nitrit ve bromat derişimleri (n=3)

Örnek	Nitrat (mg L ⁻¹ ± SD)	Nitrit (mg L ⁻¹ ± SD)	Bromat (mg L ⁻¹ ± SD)
G1	13,10 ± 0,62	bLQ	bLQ
G2	2,00 ± 0,16	nd	nd
G3	19,67 ± 0,88	nd	nd
G4	3,35 ± 0,001	nd	nd
G5	bLQ	nd	nd

nd; tayin edilmedi , bLQ; Tayin Sınırının Altında.

Sonuçlar G1 (kiraz sapı; kuru karışık bitkisel çay; 13,10 ± 0,62 mg L⁻¹) ve G3 (kuru nar çiçeği; 19,67 ± 0,88 mg L⁻¹) numuneleri için nitrat miktarlarının kabul edilen günlük alım miktarının (ADI) çok üstünde olduğunu gösterdi. Örnek G2 (kiraz sapı; 2,00 ± 0,16

mg L⁻¹) ve G4 (kuru zeytin yaprakları; 3,35 ± 0,001 mg L⁻¹) nitrat derişimleri ADI değerinden daha az bulunmuştur. Öte yandan nitrat G5 örneğinde (kuru siyah çay) tespit edilebilir, ancak tayin sınırının altında bulunmuştur. Diğer taraftan bromat derişimi, yalnız örnek G1' de (kiraz sapı; kuru karışık bir bitkisel çay) tesbit edilebilir fakat tayin sınırının altında kalmıştır. Nitrit derişimi ise, sadece örnek G1 (kiraz sapı; kuru karışık bir bitkisel çay) tayini sınırının altında kalmıştır. Diğer bitki örneklerinde hiçbir nitrit tayin edilememiştir.

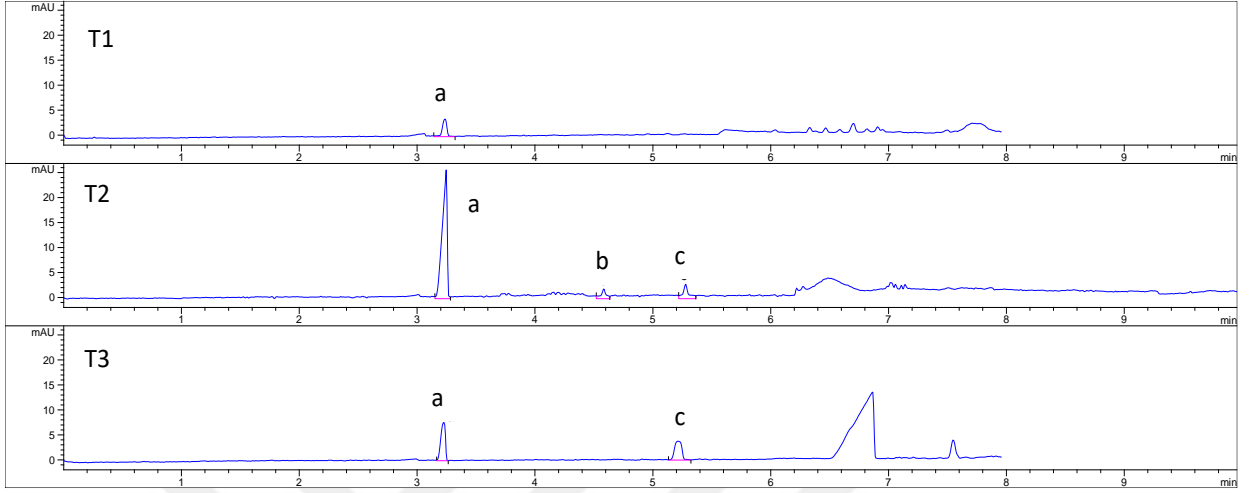
Örnek G1'de (kiraz sapı; kuru karışık bir bitkisel çay) elde edilen yüksek nitrat değerleri, kötü imalat uygulamalarından ve sık sık anyonik içeriği artıran tatlandırıcıların ve diğer bitkilerin eklenmesinden kaynaklanabilir (Mincă vd, 2013). Numune G2 (kiraz sapı; kuru çubuklar) numune G1'e (kiraz sapı; kuru karışık bir bitkisel çay) kıyasla düşük nitrat içeriğine sahiptir. Bundan, örneği bitkisel çay karışımından ziyade çubuklarından bir çay infüzyonu olarak tüketmenin daha güvenli olduğu sonucuna varılabilir. Öte yandan, örnek G3'teki (kuru nar çiçeği) yüksek nitrat içeriği, bitkilerin yetiştirildiği topraklara gübre ilavesinden kaynaklanmış olabilir. G2 (kiraz sapı; kuru çubuklar), G4 (kuru zeytin yaprakları) ve G5 (kuru siyah çay) örneklerindeki düşük nitrat, nitrit ve bromat miktarlarının, yetiştirme sırasında iyi tarım uygulamalarına bağlı olduğunu belirtmek zorunludur. Bu bitkilerin süreci. Örnek G1'de (kiraz sapı; kuru karışık bir bitkisel çay) bromatın izlenmesi, bitkilerin sulanmasında kullanılan suyun bromat ile kirlenebileceğini ima edebilir. Tüm bitki örneklerindeki nitrat derişimi için p < 0,05'te iki yönlü bir ANOVA testi yapıldı ve sonuçlar, en yüksek nitrat içeriğine sahip G3 örneği (kuru nar çiçeği) ile önemli bir fark olduğunu ortaya koydu.

4.3.2. Nitrat, nitrit ve bromat iyonlarının çay örneklerinde tayini

Bu çalışma için on çay örneğindeki mg L⁻¹ cinsinden belirlenen analit derişimleri Çizelge 4.8'de gösterilmektedir.

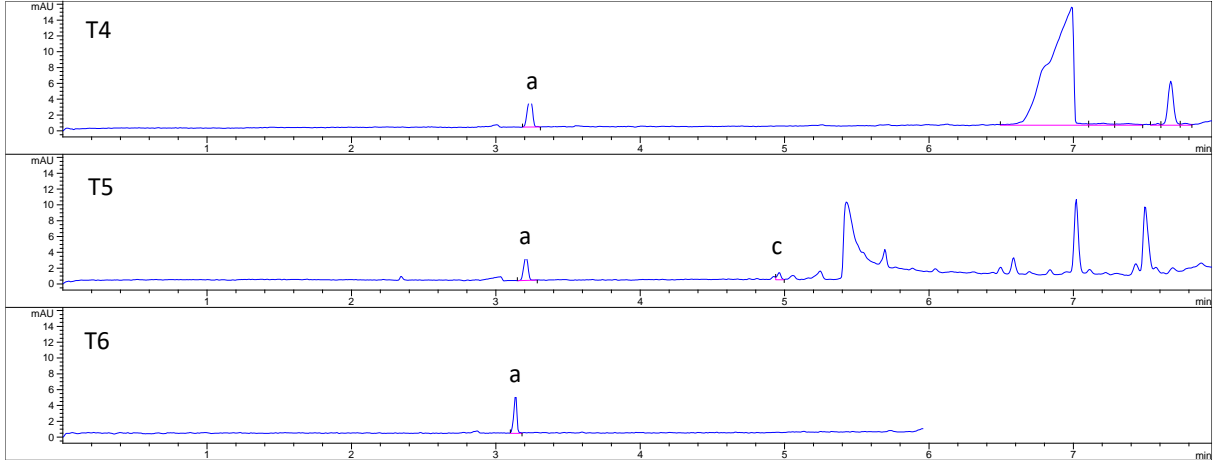
Çizelge 4.8. Çeşitli çay örneklerinde nitrat, nitrit ve bromat derişimleri (n = 3)

rnek	Nitrat (mg L⁻¹ ± SD)	Nitrit (mg L⁻¹ ± SD)	Bromat (mg L⁻¹ ± SD)
Rezene (T1)	3,24 ± 0,61	nd	nd
Kiraz saplı (T2)	13,10 ± 0,62	bLQ	nd
Böğürtlenli (T3)	3,33 ± 0,11	bLQ	nd
Elma çay (T4)	2,70 ± 0,53	nd	nd
Geleneksel (T5)	2,54 ± 0,87	nd	nd
Mistik çay (T6)	2,42 ± 0,69	nd	nd
Deren (T7)	2,71 ± 0,21	bLQ	nd
Yeşil çay (T8)	2,89 ± 0,13	nd	nd
Siyah Çay (T9)	bLQ	nd	nd
Siyah Çay (T10)	bLQ	nd	nd



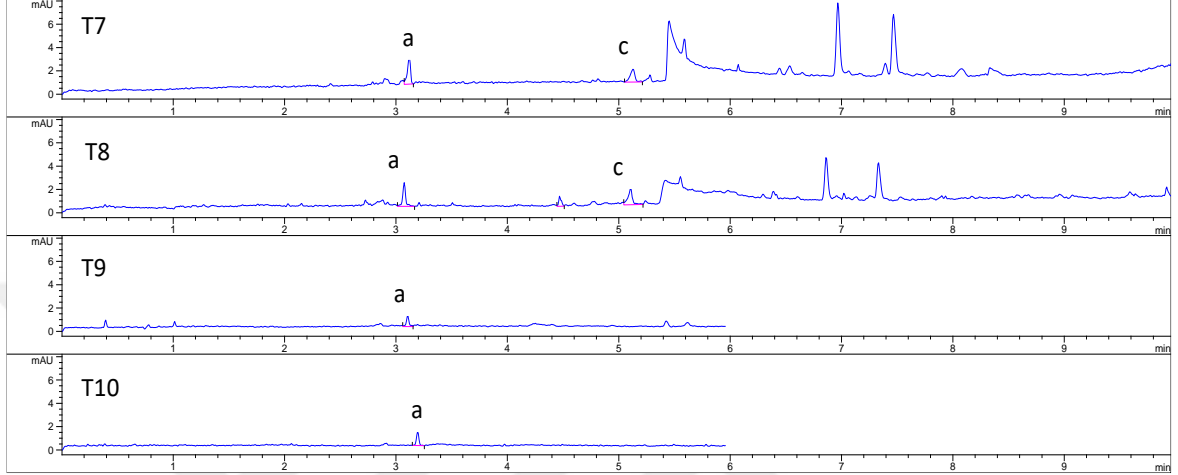
Şekil 4.13. T1, T2, T3 çay örneklerinin elektroferogramı,

voltaj; -22,5 kV, kapiler uzunluk; 61,5 cm (etkin uzunluk 53,5 cm), iç çap; 50 µm, dalga boyu; 200 nm, tampon derişimi; 60 mM fosfat tampon, sıcaklık; 40 °C, pH; 3,5, enjeksiyon; 50 mbar x 30 s, Pikler; a: nitrat, b: bromat c: nitrit



Şekil 4.14. T4, T5, T6 çay örneklerinin elektroferogramı,

voltaj; -22,5 kV, kapiler uzunluk; 61,5 cm (etkin uzunluk 53,5 cm), iç çap; 50 µm, dalga boyu; 200 nm, tampon derişimi; 60 mM fosfat tamponu, sıcaklık; 40 °C, pH; 3,5, enjeksiyon; 50 mbar x 30 s, Pikler; a: nitrat, b: bromat, c: nitrit



Şekil 4.15. T7, T8, T9, T10 çay örneklerinin elektroferogramı, voltaj; -22,5 kV, kapiler uzunluk; 61,5 cm (etkin uzunluk 53,5 cm), iç çap; 50 µm, dalga boyu; 200 nm, tampon derişimi; 60 mM fosfat tamponu, pH; 3,5, sıcaklık; 40 °C, pH; 3,5, enjeksiyon; 50 mbar x 30 s, Pikler; a: nitrat, b: bromat, c: nitrit

Türkiye'de çalışılan bitkilerde nitrat, nitrit ve bromat iyonlarının derişimlerini karşılaştırmak için kullanılabilecek benzer bir çalışma olmadığı belirtilmelidir. Bununla birlikte, elde edilen sonuçlar, nitrat için $3,7 \text{ mg L}^{-1}$, nitrit için $0,07 \text{ mg L}^{-1}$ ve bromat için $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ olan gıdalarda WHO tarafından belirlenen maksimum kabul edilebilir günlük alım sınırı ile karşılaştırıldı. Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15 on çay örneğindeki anyonların pikleri için elektroferogramları göstermektedir.

Elde edilen sonuçlar, T2' nin kiraz sap; bitki çayı) nitrat için ayarlanan $3,7 \text{ mg L}^{-1}$ sınırının çok üzerinde olan $13,10 \pm 0,62 \text{ mg L}^{-1}$ en yüksek nitrat derişimine sahip olduğunu göstermiştir. Bromat iyonu örnek T2 numunesinde tayin edildi, ancak derişim tayin sınırının altında bulunmuştur. Nitrit iyonu ise T2' de tayin edilemedi.

Örnek T1 (rezene; bitki çayı) $3,24 \pm 0,61 \text{ mg L}^{-1}$ nitrat derişimi ile örnek T3'te (böğürtlenli çay; karışık meyve çayı) belirlenen $3,33 \pm 0,11 \text{ mg L}^{-1}$ derişimi birbirine yakın bulunmuştur. T1 ve T3 için nitrat miktarlarında herhangi bir istatistiksel fark olup

olmadığını belirlemek için iki yönlü bir ANOVA testi yapıldığında, sonuçlar istatistiksel bir fark olmadığını ortaya koymuştur ($p < 0,05$). Bromat ve nitrit iyonları hem T1 hem de T3 numunelerinde tespit edilemedi. Değerler, nitrit için, dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından belirlenen $3,7 \text{ mg L}^{-1}$ nitrat sınırının altında bulunmuştur.

T4 (Elma çayı), T5 (Geleneksel çay), T6 (mistik çay), T7 (deren çay) ve T8 (yeşil çay) örnekleri için nitrat derişimleri sırasıyla, $2,70 \pm 0,53 \text{ mg L}^{-1}$, $2,54 \pm 0,87 \text{ mg L}^{-1}$, $2,42 \pm 0,69 \text{ mg L}^{-1}$, $2,71 \pm 0,21 \text{ mg L}^{-1}$ ve $2,89 \pm 0,13 \text{ mg L}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Belirlenen nitrat derişimleri WHO tarafından belirlenen sınırın altındadır. Nitrit ve bromat iyonları tüm numunelerde tespit edilemedi. T9 ve T10 örneklerinde olduğu gibi, nitrat derişimleri tayin sınırının altında kalmıştır. Bromat ve nitrit iyonları ise tespit edilemedi.

Geliştirilen yöntem daha önce yapılmış benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında, gözlemler yöntemimizin analitlerin daha küçük göç süresi açısından çok daha iyi olduğunu gösterdi ve böylece iyi bir pik temel çizgisi (baseline) ve pik ayrılabilirliği ile hızlı bir ayrılma sağladı. Örneğin, Amran vd. (1993) tarafından su örneklerinde yapılan bir çalışmada nitrat, bromat ve nitrit iyonu için ortalama gün içi göç süreleri sırasıyla, 3,98 dakika, 5,24 dakika ve 9,26 dakika olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmada ise göç süreleri sırasıyla 3,17 dakika (NO_3^-), 4,19 dakika (BrO_3^-) ve 4,93 dakika (NO_2^-) olarak daha küçük elde edilmiştir. Diğer yandan, Erdoğan Yavuz vd. (2011) sebzelerde yapılan çalışmada bildirilen nitrat' ın göç süresinden küçük (3,67 dakika) ve nitrit (4,82 dakika) değerleri ile uyumlu bulunmuştur.

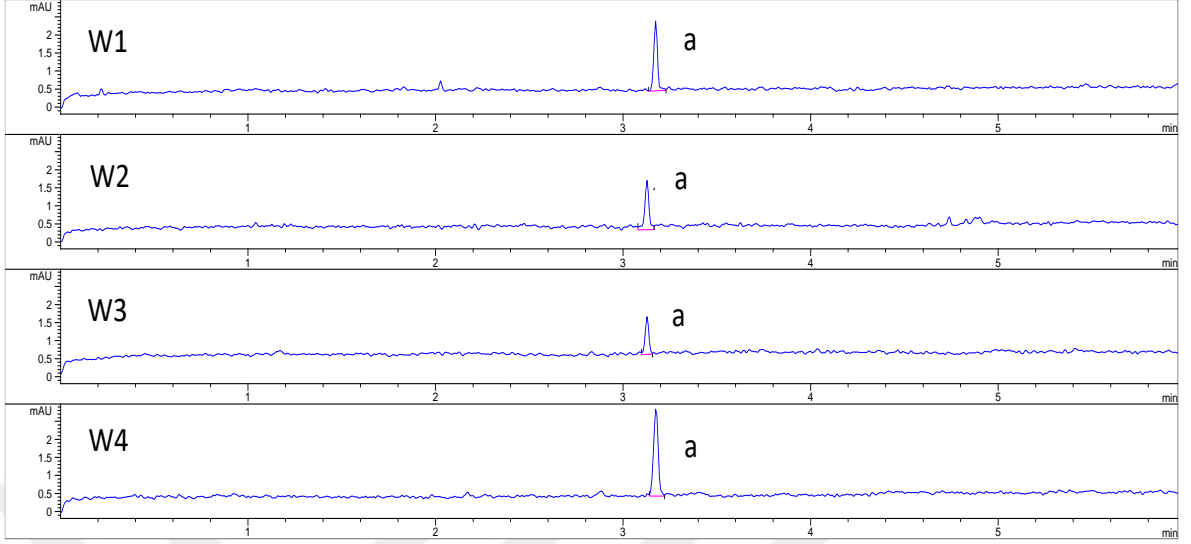
Genel olarak bu çalışmada elde edilen tüm çay numuneleri için Çizelge 4.8' de gösterilen nitrat içeriğinin, incelenen çeşitli çay örneklerinde Michalski (2006) ve Yusenko vd. (2013) tarafından bildirilen değerlerden daha düşük olduğu bulunmuştur. WHO tarafından önerilen ortalama günlük alım sınırının üzerinde nitrat içeriğine sahip çay numuneleri için, fazla miktarda gübre kullanımını azaltarak bu çayların yetiştirildiği bölgelerde önlemlerin alınması tavsiye edilir.

4.3.3. Nitrat, nitrit ve bromat iyonların su örneklerinde tayini

Su numunelerinde belirlenen nitrat derişimi Çizelge 4.9' da gösterilmektedir. İki farklı markadaki doğal su örneklerinde en yüksek nitrat derişimi örnek W3' e aittir ve 2,50 mg L⁻¹ dir. W1 ve W2 örneklerinde ise nitrat derişimi sırasıyla 1,90 ve 1,92 mg L⁻¹ bulunmuştur.

Çizelge 4.9. Çeşitli su örneklerinde bulunan nitrat, nitrit ve bromat derişimi (n = 3)

Örnek	Nitrat (mg L ⁻¹ ±SD)	Nitrit (mg L ⁻¹ ± SD)	Bromat (mg L ⁻¹ ± SD)
Doğal kaynak suyu (W1)	1,90 ± 0,16	nd	nd
Aritılmış musluk suyu (W2)	1,92 ± 0,34	nd	nd
Doğal kaynak suyu (W3)	2,50 ± 0,04	nd	nd
Laboratuvar musluk suyu (W4)	5,30 ± 0,31	nd	bLQ



Şekil 4.16. Dört farklı su örneğinin elektroferogramı. Voltaj; -22,5kV, kapiler uzunluğu; 61,5 cm (etkin kapiler uzunluğu 53,5 cm), iç çap; 50 µm, dalga boyu; 200 nm, tampon derişimi; 60 mM fosfat tamponu, sıcaklık; 40 °C, pH; 3,5, enjeksiyon; 50 mbar x 30 s, Pikler; a: nitrat

Su örnekleri arasında derişimde istatistiksel fark olup olmadığını belirlemek için iki yönlü anova testi yapıldı. Test, W1 ve W2 numunelerinin nitrat içeriği arasında anlamlı bir fark olmadığını ($P < 0,05$) gösterdi. Diğer taraftan, örnek W4' teki (laboratuvar musluk suyu: $5,30 \pm 0,31 \text{ mg L}^{-1}$) nitrat içeriği diğer su örneklerinden daha yüksektir. Bu yüksek değerin nedeni, laboratuvarlara gelen suyun başlangıçta içme amaçlı olmaması ve dolayısıyla arıtma işlemlerinin tam yapılmaması olabilir. Öte yandan, incelenen tüm su örneklerinde bromat iyonu saptanamamıştır. Nitrit, numune W4' te saptanabilirdi, ancak derişim, tayin sınırının altında bulunmuştur.

İncelenen su örnekleri için elde edilen nitrat sonuçları literatürde bildirilen değerlerle karşılaştırıldı. 2001 yılında Yang vd. tarafından ABD'deki Massachuselts'teki şehir suyu, yüzey suyu ve şişelenmiş su örneklerindeki anyonların analizi için kapiler elektroforez kullanılarak yapılan bir çalışmada, şişelenmiş su örneklerindeki nitrat derişimleri $4,0$ ile $4,46 \text{ mg L}^{-1}$ arasında bulunmuştur (Yang vd, 2001). Bizim çalışmada $1,90$ ile $2,50 \text{ mg L}^{-1}$ arasında değişen su örnekleri için elde edilen değerler, bu çalışmada bildirilen değerlerin altında bulunmuştur. Lowell şehri ve Nashua şehri için musluk suyunda nitrat derişimi $1,2$ ve $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte,

5,30 mg L⁻¹ laboratuvar musluk suyu değeri Yang vd. (2001) tarafından bildirilen musluk suyu değerlerine göre daha yüksek bulunmuştur. Khan vd. (2016) tarafından Suudi Arabistan'da yapılan bir içme suyu çalışmasında nitrat, nitrit ve bromat iyonlarının eşzamanlı olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada 20 farklı şişe suyu numunesinde belirlenen nitrat derişimleri 0,97 ila 9,65 mg L⁻¹ arasında değişmektedir. Bizim çalışmada şişelenmiş su örneklere için elde edilen değerler 2,60 mg L⁻¹ 'in altında olduğundan genel olarak düşüktü.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, seçilmiş bazı gerçek numunelerde nitrat (NO_3^-), nitrit (NO_2^-) ve bromat (BrO_3^-) iyonlarının eşzamanlı olarak belirlenmesi için hızlı ve seçici bir kapiler elektroforetik yöntem geliştirilmiştir. Üç faktörlü Box-Behnken tasarımı, önemli modellerle ($P < 0,05$) ve sadece 15 deneyle regresyon katsayıları ile deney koşullarının hızlı bir şekilde optimizasyonunu sağladı. Bu çalışmanın optimal koşulları, pH 3,5 fosfat tamponu, 40 °C sıcaklık ve uygulanan -22,5 kV voltaj ve 60 mM tampon derişimi olarak belirlenmiştir. Yöntem validasyon sonuçları kabul edilebilir sınırlarda ve yöntem, Türkiye'nin Karadeniz bölgesinde bulunan 5 yeşil bitki örneğindeki nitrat (NO_3^-), nitrit (NO_2^-) ve bromat (BrO_3^-) iyonlarının analizine uygulandı. Yöntem ayrıca 10 farklı çay örneğinin, laboratuvardaki musluktan gelen suyun, arıtılmış musluk suyu ve iki farklı marka doğal kaynak suyu örneğinin analizine uygulanmıştır.

İncelenen bitki örnekleri arasında G1 (kiraz sapı; kuru karışık bitkisel çay; $13,10 \pm 0,62 \text{ mg L}^{-1}$) ve G3 (kuru nar çiçeği; $19,67 \pm 0,88 \text{ mg L}^{-1}$) için yüksek nitrat değerleri bulunmuştur. T2 (kiraz sapı; $13,10 \pm 0,62 \text{ mg L}^{-1}$) tüm çay numuneleri için en yüksek nitrat içeriğine sahiptir. W4'ün (laboratuar musluk suyu) incelenen su örnekleri arasında yüksek bir nitrat içeriği $5,30 \pm 0,31 \text{ mg L}^{-1}$ idi. Geri kalan numuneler, WHO tarafından kabul edilen $3,7 \text{ mg L}^{-1}$ değerinin altında nitrat içermektedir.

Bromat iyonu sadece G1 (kiraz sapı; kuru karışık bitkisel çay) ve W4 (laboratuar musluk suyu) örneklerinde saptanabildi ve miktar sınırının altında bulundu. Öte yandan nitrit iyonu sadece G1 (kiraz sapı; kuru karışık bitkisel çay), T2 (kiraz sapı), T5 (geleneksel çay), T7 (deren çay) ve T8 (yeşil çay) örneklerindeki yöntemle tespit edilebilir. Tüm bu örneklerde, derişim günlük alım miktar sınırının altındaydı.

Çalışma sırasında karşılaşılan temel zorluk, kapiler elektroforez yönteminin $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in altındaki derişimleri tespit edememiş olmasıdır.

KAYNAKLAR

- Abd El-Salam, E. A., Morsy, N. F. J. P. B. and Biotechnology 2019. Optimization of the extraction of polyphenols and antioxidant activity from *Malva parviflora* L. leaves using Box–Behnken design. 49:9, 876-883.
- Alexander IV, J. N., Schultz, G. A. and Poli, J. B. 1998. Development of a nano-electrospray mass spectrometry source for nanoscale liquid chromatography and sheathless capillary electrophoresis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 12:17, 1187-1191.
- Altria, K. D. 1999. Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 856:1-2, 443-463.
- Amran, M., Lakkis, M., Lagarde, F., Leroy, M., Lopez-Sanchez, J. and Rauret, F. G. 1993. Separation of bromide, bromate, iodide, iodate, nitrite, nitrate and selenite anions by capillary zone electrophoresis. *Journal of Analytical Chemistry*, 345:6, 420-423.
- Arida, C. V. J., de Luna, M. D. G., Futralan, C. M. and Wan, M. W. 2016. Optimization of As(V) removal using chitosan-coated bentonite from groundwater using Box–Behnken design: effects of adsorbent mass, flow rate, and initial concentration. *Desalination and Water Treatment*, 57:40, 18739-18747.
- Bard, A. J., Faulkner, L. R., Leddy, J. and Zoski, C. G. 1980. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. Wiley New York,
- Bernhard, A. 2010. The nitrogen cycle: processes, players, and human Impact. . *Nature Education Knowledge*:3:25, 542-589.
- Canada, E. 2010. Screening Assessment for the Challenge Bromic acid, potassium salt (Potassium bromate). *Chemical Abstracts Service Registry Number 7758-01-2*:Environment Canada.
- ÇeliK, F. 2006. Çay (*Camellia sinensis*); içeriği, sağlık üzerindeki koruyucu etkisi ve önerilen tüketimi. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 26:6, 642-648.
- Cseh, E. and Böszörményi, Z. 1964. The absorption and metabolism of halides and halogenates by excised wheat roots. *Plant Soil*, 20:3, 371-382.
- Douglas, A. S. F. J. H. and Stanley R, D. M. W. 2013. *Fundamentals of analytical chemistry* (9th editio). Cengage Learning, Inc, CA, United States.

- Dudhipala, N. and Janga, K. Y. 2017. Lipid nanoparticles of zaleplon for improved oral delivery by Box–Behnken design: optimization, in vitro and in vivo evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43:7, 1205-1214.
- Dziubakiewicz, E. and Buszewski, B. 2013. *Electromigration Techniques*. Springer, 5-26.
- Erdoğan Yavuz, B. and Onar, A. N. 2012. Determination of nitrates, nitrites and oxalates in kale and sultana pea by capillary electrophoresis. *Journal of Food and Drug Analysis*, 20:2, 532-538.
- Ermakov, S. V., Zhukov, M. Y., Capelli, L. and Righetti, P. G. 1995. Wall adsorption in capillary electrophoresis Experimental study and computer simulation. *Journal of chromatography A*, 699:1-2, 297-313.
- Erol Özge, Ö., Erdoğan Yavuz, B. and Onar, A. N. 2017. Nitrate and nitrite determination in gunshot residue samples by capillary electrophoresis in acidic run buffer. *Journal of Forensic Sciences*, 62:2, 423-427.
- Fawell, J. and Walker, M. 2006. Approaches to determining regulatory values for carcinogens with particular reference to bromate. *Toxicology*, 221:2-3, 149-153.
- Faydaoğlu, E. and Sürücüoğlu, M. S. 2011. Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 11:1, 52-67.
- Foret, F., Szökő, E. and Karger, B. L. 1993. Trace analysis of proteins by capillary zone electrophoresis with on-column transient isotachophoretic preconcentration. *Electrophoresis*, 14:1, 417-428.
- Fung, Y. S. and Lau, K. M. 2003. Analysis of organic acids and inorganic anions in beverage drinks by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 24:18, 3224-3232.
- Gary D. Christian, Kevin A. Schug and Dasgupta, P. K. 2014. *Analytical chemistry* (7th Edition). Petra Recter, 848 Pages, United States of America.
- Gaš, B., Štědrý, M. and Kenndler, E. 1997. Peak broadening in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, 18:12-13, 2123-2133.
- Grushka, E., McCormick, R. and Kirkland, J. 1989. Effect of temperature gradients on the efficiency of capillary zone electrophoresis separations. *Analytical chemistry*, 61:3, 241-246.
- Guo, Z.-X., Cai, Q., Yu, C. and Yang, Z. J. J. o. A. A. S. 2003. Determination of bromate and bromoacetic acids in water by ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. 18:11, 1396-1399.

- Hailemichael Goitom, A. 2004. Indirect capillary electrophoretic detection methods of cations and anions. Masters Thesis, Stellenbosch: Stellenbosch University Retrieved from https://scholar.sun.ac.za/bitstream/handle/10019.1/49989/hailemichael_indirect_2004.pdf?sequence=1&isAllowed=y (21.12.2019)
- Hanrahan, G., Montes, R., Gomez, F. A. J. A. and chemistry, b. 2008. Chemometric experimental design based optimization techniques in capillary electrophoresis: a critical review of modern applications. *Analytical bioanalytical chemistry*, 390:1, 169-179.
- Harris, D. C. 2010. *Quantitative chemical analysis*. W H Freeman; 5th edition (August 1, 1998), 899 pages,
- Jagadish, R. and Shanmugaselvan, V. A. 2018. Quantification of Inorganic Anions in Tea (*Camellia Sinensis* (L) O. Kuntze) Tissues and Soil Using Ion Chromatography Coupled with Conductivity Detector. *Communications in Soil Science Plant Analysis*, 49:8, 875-888.
- Jimidar, M., Hartmann, C., Cousement, N. and Massart, D. L. 1995. Determination of nitrate and nitrite in vegetables by capillary electrophoresis with indirect detection. *Journal of Chromatography A*, 706:1-2, 479-492.
- Kaster, J. A., de Oliveira, W., Glasser, W. and Velander, W. H. 1993. Essential guides to method development in capillary electrophoresis. *Nature Biotechnology*, 384:317, 319-319.
- Keran, H., Ahmetovic, N., Djakovic, M., Karic, E., Brekalo-Lazarevic, S. and Hadzic, V. 2017. Risk assesment of nitrite intake to health. *International Journal of Advances in Agricultural Science and Technology*, 4, 112-119.
- Locatelli, M. and Carlucci, G. 2010. Advanced capillary electrophoresis techniques in the analytical quantification of drugs, metabolites and biomarkers in biological samples. *Global Journal of Analytical Chemistry Volume*, 1:3.
- Macka, M. and Haddad, P. R. 1997. Determination of metal ions by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 18:12-13, 2482-2501.
- Maran, J. P., Manikandan, S., Thirugnanasambandham, K., Nivetha, C. V. and Dinesh, R. 2013. Box–Behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 92:1, 604-611.
- Mitacek, E. J., Brunnemann, K. D., Suttajit, M., Caplan, L. S., Gagna, C. E., Bhothisuwan, K., Siriamornpun, S., Hummel, C. F., Ohshima, H. and Roy, R. 2008. Geographic distribution of liver and stomach cancers in Thailand in relation to estimated dietary intake of nitrate, nitrite, and nitrosodimethylamine. *Nutrition and cancer*, 60:2, 196-203.

- Olofson, S. 2009. Identification of peroxide explosives and traditional explosive anions by capillary electrophoresis. M.S, Oklahoma State University (1474052).
- Oseni, O., Ogunmoyole, T. and Idowu, K. 2015. Lipid profile and cardio-protective effects of aqueous extract of moringa oleifera (lam) leaf on bromate-induced cardiotoxicity on Wistar albino rats. *European Journal of Advanced Research in Biological Life Sciences*, 3:2.
- Pannala, A. S., Mani, A. R., Spencer, J. P., Skinner, V., Bruckdorfer, K. R., Moore, K. P. and Rice-Evans, C. A. 2003. The effect of dietary nitrate on salivary, plasma, and urinary nitrate metabolism in humans. *Free Radical Biology Medicine*, 34:5, 576-584.
- Pei, L. 2015. Capillary electrophoresis separations of inorganic anions, cations and small molecules. University of Alberta Retrieved from <https://era.library.ualberta.ca/items/c7a5638a-aebf-4a6d-9126-07aa7dd445e0/download/5198ded1-2a7a-4cf1-a8ad-7915395512c2>, (01.05.2019)
- Ragonese, R., Macka, M., Hughes, J., Petocz, P. J. J. o. p. and analysis, b. 2002. The use of the Box- Behnken experimental design in the optimisation and robustness testing of a capillary electrophoresis method for the analysis of ethambutol hydrochloride in a pharmaceutical formulation. 27:6, 995-1007.
- Rogan, M. M., Altria, K. D. and Goodall, D. M. 1994. Plackett-Burman experimental design in chiral analysis using capillary electrophoresis. *Chromatographia*, 38:11-12, 723-729.
- Rouessac, F. and Rouessac, A. 2013. *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. John Wiley & Sons, 600 pages.
- Sahin, O., Taskin, M. B., Kadioglu, Y. K., Inal, A., Gunes, A. and Pilbeam, D. J. 2012. Influence of chloride and bromate interaction on oxidative stress in carrot plants. *Scientia horticulturae*, 137, 81-86.
- Sänger, C. 2012 . Method development in CE: selecting your background electrolyte. Retrieved from <http://www.kantisto.nl/images/Kantisto/CESolution/cesol02.pdf> (24.04.2019)
- Schaeper, J. P. 2002. Reproducibility and optimization in capillary electrophoresis. 3075566 Ph.D., The University of Tennessee, 136, Ann Arbor. Retrieved from <https://search.proquest.com/docview/305501819?accountid=16701> ProQuest Dissertations & Theses Global database (26.07.2019)
- Spiegelhalter, B., Eisenbrand, G. and Preussmann, R. 1976. Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of N-nitroso compounds. *Food Cosmetics Toxicology*, 14:6, 545-548.

- Stagnari, F., Di Bitetto, V. and Pisante, M. 2007. Effects of N fertilizers and rates on yield, safety and nutrients in processing spinach genotypes. *Scientia horticultrae*, 114:4, 225-233.
- Swinney, K. and Bornhop, D. J. 2000. Detection in capillary electrophoresis. *Electrophoresis; An International Journal*, 21:7, 1239-1250.
- Takayanagi, T., Ishida, M., Mbuna, J., Driouich, R. and Motomizu, S. 2006. Determination of bromate ion in drinking water by capillary zone electrophoresis with direct photometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1128:1-2, 298-302.
- Tekindal, M. A., Bayrak, H., Özkaya, B. and Genç, Y 2012. Box-Behnken experimental design in factorial experiments: the importance of bread for nutrition and health running head. *Turkish Journal of Field Crops*, 17:2, 115-123.
- Weisburger, J. and Chung, F.-L. 2002. Mechanisms of chronic disease causation by nutritional factors and tobacco products and their prevention by tea polyphenols. *Food Chemical Toxicology*, 40:8, 1145-1154.
- Whatley, H. 2001. *Clinical and forensic applications of capillary electrophoresis*. Springer, 21-58.
- WHO 1993. *Guidelines for drinking-water quality* (ISBN 92 4 154460). Retrieved from <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259956/9241544600-eng.pdf?sequence=1> (04.12.2019)
- Xuan, X. and Li, D. 2004. Joule heating effects on peak broadening in capillary zone electrophoresis. *Journal of Micromechanics Microengineering*, 14:8, 1171.
- Yang, W.-P., O'Flaherty, B., Cholli, A. L. and Health, P. A. 2001. Fast analysis of water samples for detection of anions by capillary zone electrophoresis. *Journal of Environmental Science*, 36:7, 1271-1285.
- Yaseneva, P., Marti, C. F., Palomares, E., Fan, X., Morgan, T., Perez, P. S., Ronning, M., Huang, F., Yuranova, T. and Kiwi-Minsker, L. 2014. Efficient reduction of bromates using carbon nanofibre supported catalysts: Experimental and a comparative life cycle assessment study. *Chemical Engineering Journal*, 248, 230-241.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Zebron Nchimuya Tembo
Doğum Yeri : Lusaka, Zambiya
Doğum Tarihi : 04.01.1989
Ana dili : İNGİLİZCE
Mail adres : zebronchimunyatembo29@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Kabulong Boys Lisesi
Lisans : Kwame Nkrumah Üniversitesi Kimya Bölümü
Yüksek Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Bilim Dalı (2018-2020)

Yayınlar

Zebron Nchimunya Tembo, Ş. Fatma Aygun. 2020 Development of a method for the simultaneous determination of nitrate, nitrite and bromate by capillary zone electrophoresis in some selected plants found in the black sea region of Turkey. 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020) 19-20, Ankara, Turkey. Page 347