



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



MELAMİN TAYİNİ İÇİN POLİMERİK FLUORESANS SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

NEŞE TAŞCI

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU

EŞ DANIŞMAN

Doç. Dr. Soner ÇUBUK

İSTANBUL, 2022



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



MELAMİN TAYİNİ İÇİN POLİMERİK FLUORESANS SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

NEŞE TAŞCI
(720416001)

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU

EŞ DANIŞMAN

Doç. Dr. Soner ÇUBUK

İSTANBUL, 2022

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya programında gerçekleştirilmiş ve FEN-C-DRP-230119-0004 no'lu proje kapsamında Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Tez çalışmam boyunca her türlü hoşgörüsü ve yardımseverliğiyle her zaman yanımda olan, tez çalışması dışında da desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım sayın hocam, Prof. Dr. Ece Kök YETİMOĞLU' na,

Eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, sabrını, hoşgörüsünü ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, benim için her zaman yol gösterici olan, değerli hocam, eş danışmanım Doç. Dr. Soner ÇUBUK' a,

Akademik hayatıma başladığım andan itibaren benden her konuda desteğini, yardımını, anlayış ve değerli önerilerini esirgemeyen, tez izleme sürecinde öneri ve fikirleri ile tezime katkılarını sunan ve her zaman örnek aldığım ve alacağım bir insan olan değerli tez jüri hocam Prof. Dr. M. Vezir KAHRAMAN' a,

Doktora tezi izleme sürecinde öneri ve fikirleri ile tezime katkılarını sunan değerli tez jüri hocam Prof. Dr. Sevgi KOCAOBA' ya,

Tez savunma jüriliğini kabul eden ve tezime olan katkılarından dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. Metin ÖZER ve Doç. Dr. Melike FIRLAK' a

Her zaman gösterdikleri sabır ve destekleri için aileme,

Sonsuz şükran ve teşekkürlerimi sunarım.

İyi ki varsınız...

KASIM, 2022

Neşe TAŞCI

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
YENİLİK BEYANI	viii
SEMBOLLER.....	ix
KISALTMALAR.....	x
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ.....	xiv
BÖLÜM 1.GİRİŞ.....	1
1.1.Melamin	1
1.1.1.Melamin üretimi - tüketimi	1
1.1.2.Melaminin kullanım alanları	3
1.1.3. Melamin skandalı	4
1.1.4. Melamin kaynaklı toksisitenin mekanizması	4
1.1.5.Melamine ilişkin yasal düzenlemeler.....	5
1.1.6. Melamin tayininde (tağışının belirlenmesinde) kullanılan yöntemler.....	8
1.2. Madde Işık Etkileşimi	9
1.2.1. Işık.....	9
1.2.2. Elektromagnetik spektrum	10
1.2.3. Radyasyonun absorblanması: Beer-Lambert yasası	12
1.3. Optik Sensörler	13
1.3.1. Floresans sensörler	14
1.3.2. Moleküler lüminesans spektroskopisi	15
1.3.3. Moleküler floresans spektroskopisinin açıklanmasında kullanılan temel kavramlar	16
1.3.4. Floresansı etkileyen faktörler	18
1.3.5. Spektroflorimetrenin temel bileşenleri.....	22
1.4. UV ile Sertleşme Reaksiyonları.....	23
1.4.1. Serbest radikal polimerizasyonu	23

1.4.1.1. Başlama	24
1.4.1.2. Çoğalma	25
1.4.1.3. Sonlanma	25
1.5. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Kriterleri	26
1.5.1. Seçicilik	26
1.5.2. Doğrusallık	27
1.5.3. Doğruluk	28
1.5.4. Kesinlik	28
1.5.5. Tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı(LOQ)	29
1.5.6. Stabilite	30
1.6. Önerilen Melamin Sensörünün Diğer Fluorimetrik Yöntemlerle Karşılaştırılması	30
BÖLÜM 2. MATERYAL VE YÖNTEM	33
2.1. Kullanılan Kimyasallar Maddeler	33
2.2. Kullanılan Cihaz ve Aletler	37
2.3. Deneysel Yöntem	40
2.3.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması	40
2.3.1.1. Tampon çözeltilerinin hazırlanması	40
2.3.1.2. Kullanılan stok ve çalışma standartlarının hazırlanması.	40
2.3.1.3. Seçicilik, yabancı iyon ve moleküllerin etkisinin araştırılması için kullanılan çözeltilerin hazırlanması	42
2.3.2. Melamin tayini için hazırlanan polimerik membran sensörlerin hazırlanması	43
2.3.2.1. Akrilatlanmış sitrik asit (ACA) fonksiyonel monomerinin sentezi	43
2.3.2.2. Polimerik floresans sensör formülasyonlarının hazırlanması	43
2.3.3. Membran sensörün morfolojik ve yapısal karakterizasyonu	46
2.3.3.1. Akrilatlanmış sitik asit (ACA) monomerinin FT-IR spektrumu	46
2.3.3.2. Akrilatlanmış sitik asit (ACA) monomerinin ¹ H NMR spektrumu	47
2.3.4. Polimerik membran sensörün karakterizasyonu	47
2.3.4.1. Polimerik membran sensörün FT-IR spektrumu	47
2.3.4.2. Polimerik membran sensörün yüzey morfolojisi	47
2.3.5. Polimerik membran sensörün melamin tayini için kullanılabilirliğinin araştırılması	48

2.3.5.1. Optimum membran formülasyonun belirlenmesi ve spektral karakterizasyon çalışması.....	48
2.3.5.2. Floresans şiddeti üzerine pH etkisinin araştırılması.....	48
2.3.5.3. Floresans şiddeti üzerine süre etkisinin araştırılması.....	48
2.3.5.4. Kalibrasyon aralığı	49
2.3.5.5. Sensörün rejenerasyonu ve yeniden kullanılabilirliği	49
2.3.5.6. Sensörün analitik uygulamaları: Süt tozunda melamin analizi	49
2.4. Metot Validasyon Prosedürleri	50
2.4.1. Seçicilik- floresans şiddeti üzerine yabancı iyon ve moleküllerin etkisinin araştırılması.....	50
2.4.2. Doğrusallık.....	50
2.4.3. Doğruluk	51
2.4.5. Tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ).....	51
2.4.6. Stabilitate-Kararlılık.....	51
BÖLÜM 3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	53
3.1. Membran sensörünün morfolojik ve yapısal karakterizasyonu	53
3.1.1. Akrilatlanmış sitrik asit monomerinin (ACA) FTIR spektrumu.....	53
3.1.2. Akrilatlanmış sitrik asit monomerinin (ACA) ¹ H NMR spektrumu	54
3.1.3. Polimerik membranın FT-IR spektrumu.....	54
3.1.4. Polimerik membran sensörün SEM ölçümleri	55
3.2. Polimerik membranın spektral karakterizasyonu	56
3.2.1. Floresans şiddeti üzerine pH etkisinin araştırılması.....	59
3.2.2. Floresans şiddeti üzerine süre etkisinin araştırılması.....	60
3.2.3. Kalibrasyon aralığı	61
3.2.4. Melamin sensörün rejenerasyonu ve yeniden kullanılabilirliğinin araştırılması	62
3.3. Metot validasyon sonuçları	62
3.3.1. Seçicilik - floresans şiddeti üzerine yabancı iyon ve moleküllerin etkisinin araştırılması sonuçları	62
3.3.2. Tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) sonuçları	63
3.3.3. Sensörün ömrü-stabilitesi.....	64
3.3.4. Sensörün analitik uygulamaları: Süt tozunda melamin analizi sonuçları ..	64

BÖLÜM 4. SONUÇLAR	66
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	76



ÖZET

MELAMİN TAYİNİ İÇİN POLİMERİK FLUORESANS SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Melamin, plastikler, temizlik ürünleri, alev geciktiriciler, laminatlar, yapıştırıcılar, gübreler, reçineler ve köpükler gibi birçok endüstriyel kullanıma sahip kimyasal bir bileşiktir. Son yıllarda yapılan araştırmalar melamine uzun süre maruz kalmanın insanlarda ve hayvanlarda ölüme neden olan böbrek yetmezliğine neden olduğunu göstermektedir. Bu nedenle melamin tespiti için hızlı, uygulaması kolay, tespit sınırı düşük, hassas bir analiz yönteminin geliştirilmesi son derece önemlidir.

Bu çalışmada, daha önce melamin tayininde kullanılmayan, akrilatlanmış sitrik asit (ACA) birimlerine sahip bir floresans polimerik membran sensör hazırlanmıştır. Sensör melamine seçici floresans tepki göstermiştir ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 388/425$ nm). Sensörün çalışma koşullarını belirlemek için pH, tepki süresi, çalışma aralığı, seçicilik gibi parametreler incelenmiştir. Sensör, $3,96 \times 10^{-9}$ - $7,93 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ konsantrasyon aralığında doğrusaldır. Melamin için tespit sınırı (LOD) $2,30 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ ve tayin sınırı (LOQ) $7,74 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ (n=10, %RSD= 2,37) olarak bulunmuştur. Sensör için optimum pH değeri 6,0 ve analiz süresi 0-1 dakika arası olarak bulunmuştur. Önerilen sensörün stabilitesi 6 ay olarak belirlenmiştir. Önerilen sensör, süt tozu örneğindeki melamini belirlemek için kullanılmış ve kabul edilebilir sonuçlar elde edilmiştir. Geliştirilen sensör, halihazırda kullanılmakta olan diğer yöntemlere göre kısa tepki süresi, yüksek hassasiyet ve kolay uygulama gibi birçok avantaja sahiptir.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF POLYMERIC FLUORESCENCE SENSOR FOR DETERMINATION OF MELAMINE

Melamine is a chemical compound with many industrial uses such as plastics, cleaning products, flame retardants, laminates, adhesives, fertilizers, resins and foams. Studies in recent years show that prolonged exposure to melamine causes kidney failure, which causes death in humans and animals. For this reason, it is extremely important to develop a fast, easy-to-apply, sensitive analysis method with low detection limit for melamine detection.

In this study, a fluorescence polymeric membrane sensor with acrylated citric acid units, which has not been used in melamine determination before, was prepared. The sensor showed preferable fluorescent response to melamine ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 388/425 \text{ nm}$). In order to determine the working conditions of the sensor, parameters such as pH, response time, working range, potential interfering substances were examined. The linear working range of the sensor was found to be 3.96×10^{-9} - $7.93 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. The detection limit (LOD) for melamine was found as $2.30 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ and the quantification limit (LOQ) as $7.74 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ ($n=10$, %RSD= 2.37). The optimum pH value for the sensor was found to be 6.0 and the response time to less than 1 minute. The stability of the proposed sensor was determined as 6 months. The proposed sensor was used to determine the melamine in the milk powder sample and acceptable results were obtained. Compared to other methods currently in use, the developed sensor has several advantages such as short response time, high sensitivity, and easy application.

YENİLİK BEYANI

Bu tez çalışmasında sulu ortamda bulunan melamini tayin etmek amacıyla radikalik polimerizasyon ile bir floresans sensör hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu amaçla literatürde daha önce sentezlenmemiş olan bir madde olan akrilatlanmış sitrik asit (ACA) maddesi sentezlenmiş ve bu madde melamin tayini için geliştirilen sensör formülasyonunda ana monomer olarak kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasının sunduğu en önemli yenilik, tez çalışması kapsamında sentezlenen akrilatlanmış sitrik asit (ACA) fonksiyonel monomerinin ilk defa sentezlenmiş olmasıdır. Bunun yanı sıra melamin tayini için geliştirilen sensörün yapısındaki ana monomer olarak kullanılarak melamin tayini için ilk defa kullanılıyor olması da bu çalışmayı benzersiz kılmakta ve bu açıdan literatüre katkı sağlamaktadır.

Tez çalışması kapsamında elde edilen veriler SCI kapsamında bir dergide yayınlanmıştır.

Basılmış olan makalelere ait bilgiler aşağıdaki gibidir;

‘A novel polymeric fluorescence sensor based on acrylated citric acid for detection of melamine adulteration: Application in milk powder’, Food Chemistry 394 (2022) 133525.

SEMBOLLER

<u>Semboller</u>	<u>Açıklamalar</u>
A	: Absorbans
cm⁻¹	: Dalgasayısı
°C	: Celsius cinsinden sıcaklık birimi
C	: Konsantrasyon
CDCl₃	: Döterokloroform
ε	: Epsilon (molar absorptivite)
F.I.	: Floresans şiddeti
g	: Gram
¹H	: Hidrojen atomunun 1 kütle numaralı izotopu
hν	: Işık enerjisi
I	: Işık şiddeti
L	: Litre
μL	: Mikrolitre
Ma	: Molekül ağırlığı
mg	: Miligram
μg	: Mikrogram
mL	: Mililitre
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
mmol	: Milimol
nm	: Nanometre
pH	: Çözeltinin asitlik/bazlık derecesini ifade eden ölçü birimi
ppb	: Milyarda bir kısım
ppm	: Milyonda bir kısım
t	: Zaman (s)
T	: Sıcaklık (°C)
V	: Volt
δ	: Kimyasal kayma

KISALTMALAR

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
AAS	: Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi
¹³C NMR	: Karbon Nükleer Magnetik Rezonans
EFSA	: Avrupa Gıda Kurumu
em.	: Emisyon
EPA	: ABD Çevre Koruma Ajansı
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
F.I.	: Floresans Şiddeti
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi
GC	: Gaz Kromatografisi
GC-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
¹H NMR	: Proton Nükleer Magnetik Rezonans
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ICP-MS	: İndüktif Eşleşmiş Plazma- Kütle Spektrometresi
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
LC	: Sıvı Kromatografisi
LC-MS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
LOD	: Tespit Sınırı
LOQ	: Tayin Sınırı
MS	: Kütle Spektrometresi
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
PI	: Fotobaşlatıcı
PMT	: Fotoçoğaltıcı Tüp
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
s	: Saniye
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TDI	: Tolere Edilebilir Günlük Alım Miktarı

TGK	:	Türk Gıda Kodeksi
UV	:	Ultraviyole
UV-Vis.	:	Ultraviyole -Görünür Işık
uy.	:	Uyarma
WHO	:	Dünya Sağlık Örgütü
λ_{max}.	:	Maksimum dalga boyu
λ_{min}.	:	Minimum dalga boyu
SML	:	Spesifik migrasyon limiti



ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA

Şekil 1. 1. Melamin ve analoglarının molekül yapıları.	1
Şekil 1. 2. Melaminin elde edilme reaksiyonları.	2
Şekil 1. 3. Dünyadaki melamin tüketimi.	2
Şekil 1. 4. Melaminin kullanım alanları.	3
Şekil 1. 5. Gıda güvenliğini tehdit eden unsurlar.	5
Şekil 1. 6. Elektromanyetik ısıma.	10
Şekil 1. 7. Elektromanyetik Spektrum.	11
Şekil 1. 8. Işığın numune tarafından absorplanması.	12
Şekil 1. 9. Moleküllerin elektronik spin durumları; a) temel elektronik hal, b) uyarılmış singlet hal ve c) uyarılmış triplet hal	16
Şekil 1. 10. Jablonski diyagramı.	17
Şekil 1. 11. Floresans şiddeti- derişim arasındaki ilişki.	21
Şekil 1. 12. Spektrofluorimetre cihazının temel bileşenlerinin şematik gösterimi.	22
Şekil 1. 13. Doğrusallık grafiği.	27
Şekil 2. 1. ACA fonksiyonel monomerinin sentezi.	43
Şekil 2. 2. Melamin sensörünün hazırlık prosedürü.	45
Şekil 3. 1. ACA monomeri, AC ve SA'ın FT-IR spektrumu.	53
Şekil 3. 2. ACA monomerinin ¹ H NMR spektrumu.	54
Şekil 3. 3. Polimerik membrana ait FT-IR spektrumu.	55
Şekil 3. 4. Polimerik membrana ait SEM görüntüsü.	56
Şekil 3. 5. Optimum sensör formülasyonu.	57
Şekil 3. 6. Sensörün kimyasal yapısı.	58
Şekil 3. 7. Melamin yokluğunda (siyah) ve $7,93 \times 10^{-9}$ mol L ⁻¹ (1ppb) melamin varlığında (kırmızı) polimerik membran sensörün uyarılma ve emisyon spektrumları ($\lambda_{uy}=388$ nm, $\lambda_{em}=425$ nm; slitler (uy/em): 5/5; pH:6,0)	59
Şekil 3. 8. pH etkisi nedeniyle melamin sensörünün floresans şiddetindeki değişim ($7,93 \times 10^{-9}$ mol L ⁻¹ (1ppb) melamin varlığında; $\lambda_{uy}=388$ nm, $\lambda_{em}=425$ nm; pH:6,0)	60

Şekil 3. 9. Melamin sensörünün floresans şiddetinin zamanla değişimi ($7,93 \times 10^{-9}$ mol	
L^{-1} (1ppb) melamin varlığında; $\lambda_{uy}=388$ nm, $\lambda_{em}=425$ nm; pH:6,0)	61
Şekil 3. 10. pH 6,0' da elde edilen kalibrasyon grafiği ($\lambda_{uy}= 388$ nm, $\lambda_{em} = 425$ nm)...	62



TABLO LİSTESİ

SAYFA

Tablo 1. 1. Melamin için bazı ülkeler tarafından gıdalarda bulunmasına izin verilen sınır değerleri	7
Tablo 1. 2. Türkiye’de gıdalarda bulunmasına izin verilen melamin miktarları	7
Tablo 1. 3. Gıda ve yemlerdeki melamin ve türevlerini tespit etmek için kullanılan teknikleri	8
Tablo 1. 4. Çalışma koşullarına göre kesinlik türleri	29
Tablo 1. 5. Melamin tayini için floresans yöntemlerinin karşılaştırılması	31
Tablo 2. 1. Çalışma sırasında kullanılan kimyasal maddeler.	33
Tablo 2. 2. Çalışma sırasında kullanılan cihaz ve aletler	37
Tablo 2. 3. Kalibrasyon standartları hazırlama tablosu	41
Tablo 2. 4. Melamin sensöre girişim etkisi yapabilecek iyon ve moleküller	42
Tablo 2. 5. Hazırlanan polimerik membran sensörlerin hazırlanma reçetesi ve adlandırılması.	45
Tablo 2. 6. Hazırlanan polimerik membran sensör formülasyonlarının değerlendirilmesi	46
Tablo 3. 1. Sensörler için karar verilen optimum cihaz çalışma parametreleri ($7,93 \times 10^{-9}$ mol L ⁻¹ (1 ppb) melamin varlığında).	56
Tablo 3. 2. Optimum çalışma koşullarında $7,93 \times 10^{-9}$ mol L ⁻¹ (1ppb) melamin çözeltisinin floresans şiddeti.....	63
Tablo 3. 3. Süt tozu örneğindeki melamin konsantrasyonu için HPLC yöntemi ile elde edilen verilerin ve önerilen polimerik melamin sensör sonuçlarının karşılaştırılması	65

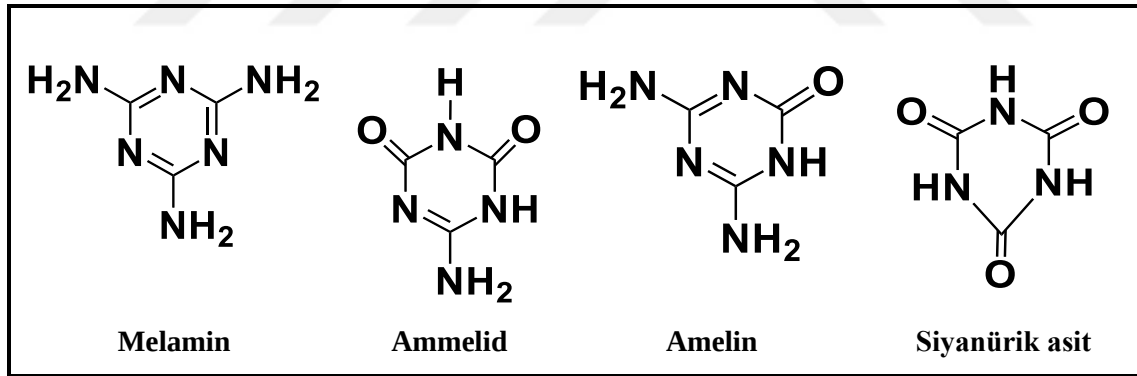
1. GİRİŞ

1.1. Melamin

Melamin (2,4,6-triamino-1,3,5-triazin, $C_3H_6N_6$, MEL); beyaz, toz halinde, molekül ağırlığı 126,12 g/mol olan, zayıf bazik özellik gösteren (pK_a : 5,0), suda iyi çözünebilen, azot seviyesi yüksek (yaklaşık %66), ısıya oldukça dayanıklı (erime noktası: 343 °C) s-triazin türevi organik bir maddedir [1].

Üç adet reaktif amin grubu ve aromatik bir s-triazin halkası içerir. Triazin halkasında bulunan azot atomları, bileşiğin hidrojen bağı oluşturması durumunda alıcı (akseptör) görevi görürken yapıdaki üç primer amin grubu ise verici (donör) olarak görev yapar.

Melamin, amelin, ammelid ve siyanürik asit olmak üzere üç yapısal analogu (benzerleri) bulunmaktadır. Benzer bu üç yapı melaminin keto-enol tautomeridir. Melamin ve analoglarının kimyasal yapıları Şekil 1.1’de gösterildiği gibidir.

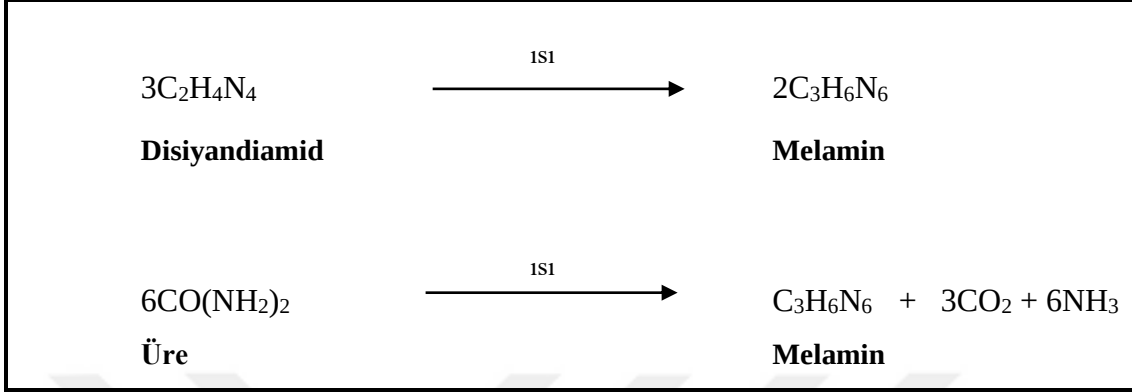


Şekil 1. 1. Melamin ve analoglarının molekül yapıları.

1.1.1. Melamin üretimi- tüketimi

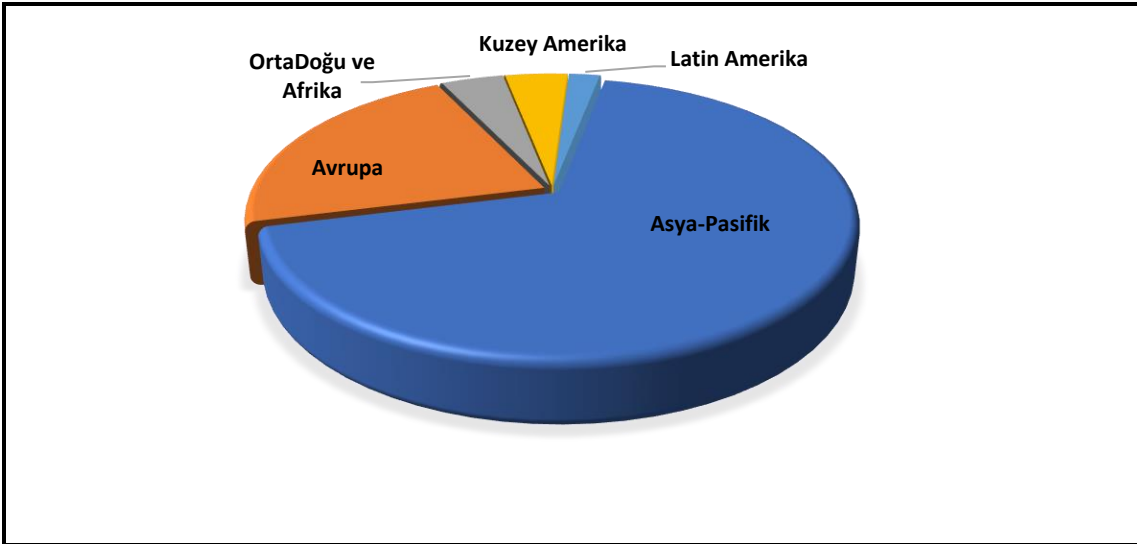
Melamin ilk kez 1834 yılında Alman kimyager Justus von Liebig tarafından potasyum tiyosiyonatın (KSCN) amonyum klorür (NH_4Cl) ile ısıtılması yoluyla sentezlenmiştir. Sonraları guanidin (CH_5N_3), tiyöüre (CH_4N_2S), siyanamit (CH_2N_2) veya disiandiamidin ($C_2H_4N_4$) ısıtılması yoluyla da elde edilme yolları önerilmiştir.

Günümüzde ise daha çok amonyak varlığında disiyandiamid veya ürenin yüksek basınç altında ısıtılması prensibi esas alınarak üretilmektedir [2]. İlgili reaksiyonlar sırasıyla Şekil 1.2’ de verildiği gibidir.



Şekil 1. 2. Melaminin elde edilme reaksiyonları.

Melamin üretiminin büyük bir bölümü Çin’ de yapılmakta olup ABD, Hollanda, Almanya, Polonya ve Japonya dünyada melamin üretimi yapan ülkeler arasında ilk sıralarda gelmektedirler. Çin aynı zamanda dünyadaki en büyük melamin ihracatçısı konumundadır. 2020 yılında yaklaşık 2 trilyon dolar olan küresel melamin pazarının, 2027’de büyümesini sürdürerek 2,7 trilyon dolara ulaşması beklenmektedir. Şekil 1.3’te dünyadaki melamin tüketimi gösterilmektedir [3].



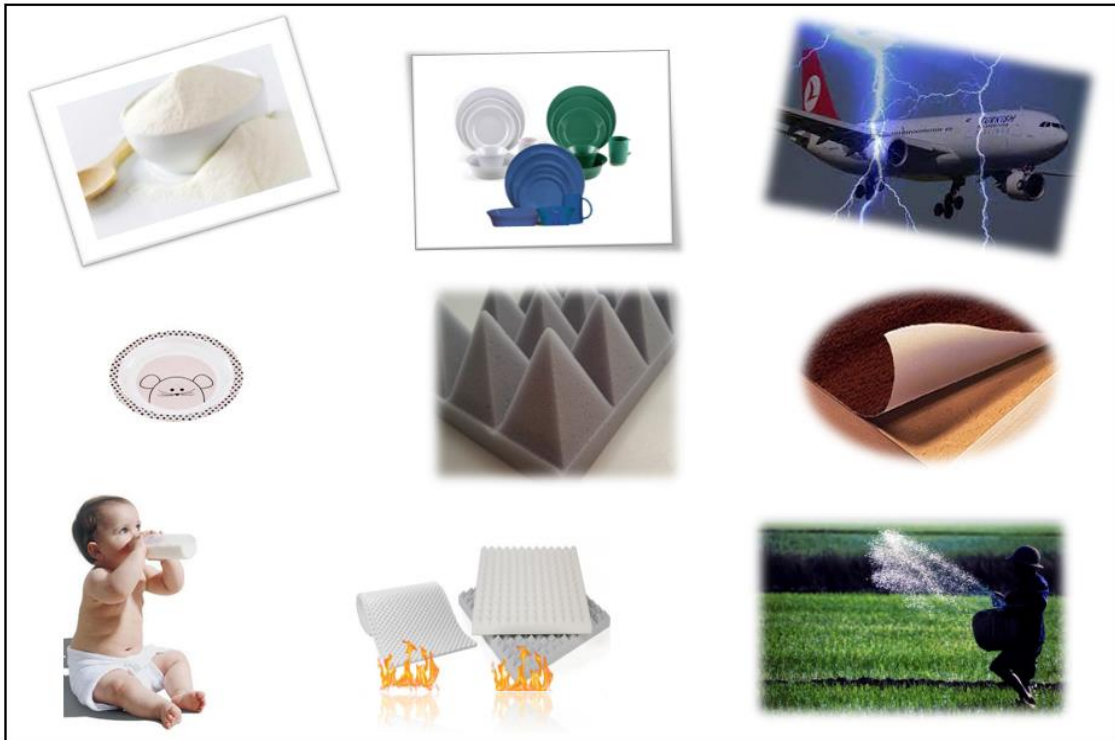
Şekil 1. 3. Dünyadaki melamin tüketimi.

1.1.2. Melaminin kullanım alanları

Melamin, çok sayıda endüstriyel kullanım alanına sahip kimyasal bir bileşiktir. Temizlik ürünleri, laminatlar, yapıştırıcılar, kontakt materyaller, termoset polimerler, melamin-formaldehit reçine formunda yüzey kaplamaları, ticari filtreler, plastik endüstrisi de dahil olmak üzere çok sayıda kullanım alanına sahiptir [4].

Melaminin kullanım alanlarından birisi de yangın geciktirici malzemeler olup melamin, reçine ile karıştırıldığı zaman yapısındaki serbest azot sayesinde yangın geciktirici özellik göstermekte ve bu türden elbiselerin yapımında veya uçak, otobüs gibi araçlarda kaplama materyali olarak kullanım alanı bulmaktadır [5].

Melamin bunların dışında yapısında bulunan azotun yavaş salınım özelliğinden dolayı gübre üretiminde de kullanılmaktadır. Özellikle 1950’li yıllarda gübre üretiminde melamin yoğun olarak kullanılmış olup, sonraları melamine göre daha ekonomik azot kaynakları tercih edilmeye başlanmıştır [6,7].



Şekil 1. 4. Melaminin kullanım alanları.

1.1.3. Melaminin skandalı

1990'ların sonu ve 2000'lerin başında Çin'de melamin üretimi ve tüketiminde ciddi bir artış gözlemlenmiştir. Gıdalara melamin katkısı ile ilgili ilk ciddi endişeler ise 2007 yılında Çin'de üretilen ve ithal edilen evcil hayvan yemlerine eklenen melamin nedeniyle, Amerika Birleşik Devletleri'nde kedi ve köpeklerde böbrek taşı birikmesinin sebep olduğu böbrek yetmezliğine bağlı ani ölümlerin görülmesiyle başlamıştır. Yapılan araştırmalarda evcil hayvan mamalarının hazırlanmasında kullanılan ve Çin'den ithal edilen buğday glütenu ve pirinç proteini ekstraktlarında % 0,8'den % 26' a kadar değişen oranlarda melamine rastlanmıştır ve ölümlerin buna bağlı olarak geliştiği rapor edilmiştir [8]. Bu olay sonrası 1000'in üzerinde kedi ve köpeğin melamin kaynaklı böbrek yetmezliği sebebiyle öldüğü tahmin edilmektedir [9]. Bu olay ile birlikte melaminin çeşitli gıda maddelerine toplam azot içeriğini arttırarak protein içeriğini fazla göstermek amacıyla kasıtlı olarak eklendiği anlaşılmıştır. Sonrasında yapılan araştırmalar Çin ve USA'de sadece kedi-köpek mamalarında değil, yoğurt, süt, süt tozları, bebek mamaları ve toz kahveler de dahil olmak üzere pek çok gıda maddesine melamin katıldığını göstermiştir [10-11].

Bir diğer önemli skandal ise Eylül 2008'de meydana gelmiştir. Çin'de bebek devam sütü formüllerine eklenen melamin kontaminasyonu sebebiyle yaklaşık 300.000 bebek ve küçük çocuğun idrar yolu rahatsızlığı geçirmesi ve bunlardan 50.000'den fazlasının böbrek tüpü tıkanıklığı ve böbrek taşlarının neden olduğu difonksiyonel idrar semptomları nedeniyle hastaneye yatırıldığı, en az 150 tanesinde böbrek yetmezliği tespit edildiği ve bu çocuklardan 6'sının ise melamin kaynaklı toksisiteye bağlı olarak gelişen böbrek yetmezliği nedeniyle yaşamlarını yitirdikleri rapor edilmiştir [12].

1.1.4. Melamin kaynaklı toksisitenin mekanizması

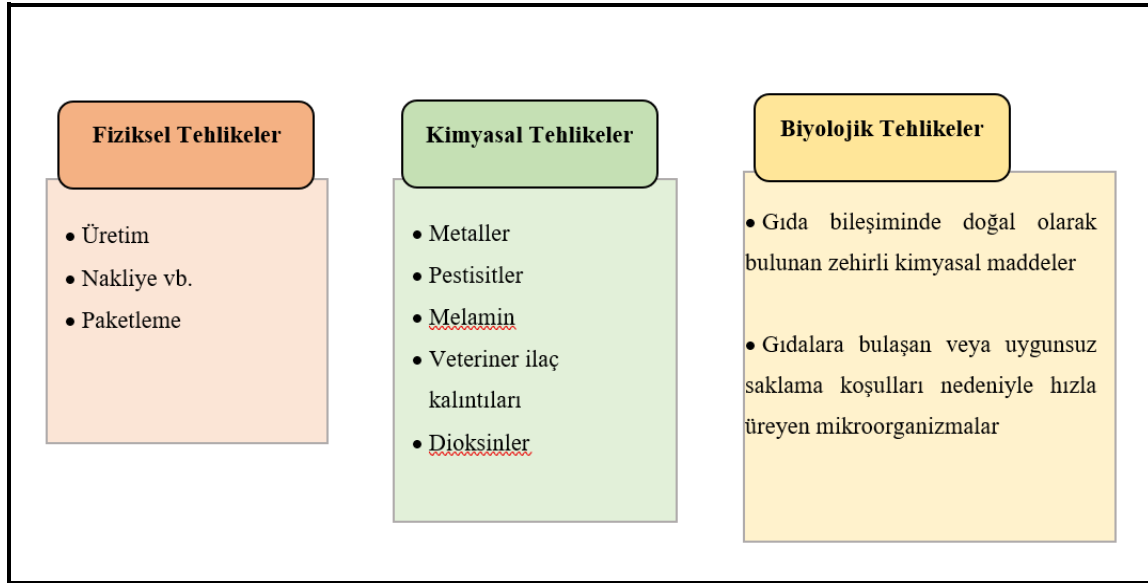
Melamin düşük akut toksisiteye sahip bir bileşik olarak kabul edilir. Melamin toksisitesi ile ilgili verilen direkt olarak insanlar üzerindeki etkilerinden değil de fare, köpek ve sıçan gibi hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen verilere dayanmakta olup kısa dönem maruziyetinden ziyade uzun dönem etkileri ile ilgili yapılan çalışmalara dayanmaktadır. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar melaminin, melamin içerisinde safsızlık olarak bulunan analogu olan siyanürik asit ile birleştiği

zaman kristal formda olan melamin-siyanürat kompleksine dönüştüğünü göstermektedir. Bu kompleksin sudaki çözünürlüğü düşük olduğundan vücuttan atılması sırasında boşaltım sisteminde ciddi hasarlara neden olabilmektedir. Melamin-siyanürat kompleksinin böbrek taşı oluşumundan, idrar yolunda tıkanıklığa ve böbrek yetmezliğine kadar pek çok boşaltım sistemi ile ilgili hastalığa sebebiyet verebildiği yapılan çalışmalarda rapor edilmektedir [13-15].

1.1.5. Melamine ilişkin yasal düzenlemeler

Küreselleşmeyle birlikte dünya nüfusunda meydana gelen artış, çevre kirliliği ve ekonomik yetersizlik gibi sorunların yanı sıra gıda tüketiminde artışı beraberinde getirmiş ve bu durumda her geçen gün büyümeye devam eden beslenme probleminin ortaya çıkmasına zemin hazırlamıştır. Bu durum aynı zamanda dolaylı olarak güvenli gıda temini sorununun da ortaya çıkmasına neden olmuştur. İnsan sağlığının korunması açısından son derece önemli bir konu olan gıda güvenliği konusu bu nedenle tüm dünyada önemi artan ve ilgi çeken bir araştırma konusu haline gelmiştir [16].

Gıda güvenliği için tehdit unsuru olan ve gıda kaynaklı hastalıklara sebep olan unsurları 3 ana başlık altında toplanmak mümkün olup bunlar Şekil 1.5' te özetlenmiştir.



Şekil 1. 5. Gıda güvenliğini tehdit eden unsurlar.

Gıda güvenliği için bir tehdit unsuru olan ve gıda kaynaklı hastalıklara sebebiyet veren kimyasal tehlikelerden birisi de melamindir. Melamin, bahsedilen endüstriyel amaçlı kullanımlarının yanında kütlece %66,6 oranındaki yüksek azot içeriği sebebiyle çeşitli gıdalara (süt tozu, süt, bisküvi, çikolata, evcil hayvan yemleri, bebek maması vb.) protein içeriğini yüksek göstermek amacı ile katkı maddesi olarak illegal şekilde ilave edilebilmektedir [17-19].

Gıdalardaki protein içeriğini ölçmek için standart testler aslında azot seviyesini ölçer ve buradan yola çıkılarak da gıdalardaki protein miktarı tayin edilir. Melaminin azot bakımından yüksek olması, bu testlerde azot miktarının dolayısıyla da protein miktarının yüksek olarak yorumlanmasına sebebiyet verir. Örneğin, sütün su ile seyreltilip melamin eklenmesi durumunda, protein içeriğini belirlemek için azot seviyesinin ölçülmesi, süte su eklenmiş olduğunu anlaşılmasını engeller [20].

Dünyada melaminin gıdalarda direkt kullanılmasına izin veren herhangi bir ülke bulunmamasına rağmen melaminin çeşitli yollarla gıda zincirine dahil olabildiği bilinmektedir. Bu nedenle birçok ülke yem ve gıdalarda melamin kullanımı ile ilgili bazı sınır değerleri belirlemişlerdir. Örneğin; Avrupa Birliği (AB) ülkeleri ithal ettiği süt ve süt ürünü içeriği %15' in üzerinde olan tüm gıda ürünleri için melamin analizini zorunlu tutmakta ve 2,5 mg kg⁻¹'in üstünde melamin içeren ürünlerin imha edilmesi gerektiğini ifade etmektedir. AB ülkelerinin melamin için belirledikleri spesifik migrasyon limiti (SML) değeri ise 30,0 mg kg⁻¹'dir. Bu değer Türkiye için de geçerlidir. Bunun yanında Vietnam, Avustralya, Nijerya, Malezya, Güney Afrika ve Yeni Zelanda'nın melamin için belirledikleri sınır değerleri gıda ve yemler için 2,5 mg kg⁻¹, bebek mamaları ve bebekler için kullanılan takviye gıdalar için 1,0 mg kg⁻¹'dir.

Bazı ülkeler için gıdalarda bulunmasına izin verilen melamin miktarları Tablo 1.1' de özetlenmiştir [21].

Tablo 1. 1. Melamin için bazı ülkeler tarafından gıdalarda bulunmasına izin verilen sınır değerleri.

Ülke	Gıda Türü	Standart Limit (mg kg ⁻¹ , ppm)
Avrupa Birliği (AB)	Süt ve süt ürünleri, yüksek proteinli gıdalar	2,5
ABD	Süt ve süt ürünleri, sütlü gıdalar	0,25
Avusturalya	Toz bebek formülleri	1,0
	Süt ürünleri	2,5
Kanada	Toz bebek formülleri	1,0
	Süt ürünleri	2,5
Rusya	Gıdalar	1,0
Yeni Zelanda	Gıda hammaddeleri	5,0
	Toz bebek formülleri	1,0
Çin	Toz bebek formülleri	-
	Süt tozu, sıvı süt ürünleri, diğer bebek mamaları	-

Türkiye’ de de gıdalarda bulunmasına izin verilen melamin ve yapısal analoglarının sınır değerleri ile ilgili düzenlenmeler yapılmış ve bu düzenleme ile ilgili detaylar 19/12/ 2012 tarihli 28502 sayılı resmî gazetede yayınlamış olup bu detaylar Tablo 1.2’ de verilmiştir [22].

Tablo 1. 2. Türkiye’de gıdalarda bulunmasına için izin verilen melamin sınır değerleri.

Gıda Türü	Standart Limit (mg kg ⁻¹ , ppm)
Gıda (bebek formülleri ve devam formülleri hariç)	2,5
Bebek formülleri ve devam formüllerinin toz halde olanları	1,0

1.1.6. Melamin tayininde (tağışının belirlenmesinde) kullanılan yöntemler

2007 yılına kadar melamin gıdalarda rutin olarak analizi yapılan maddelerden biri değildi. Ancak 2000’li yılların başında gıdalara melamin eklenmesi nedeniyle ciddi sonuçlar doğuran çok sayıda vaka rapor edilmesiyle birlikte tüm dünyanın dikkatini çeken bir konu haline geldi. Bu olaylardan sonra melaminin doğru ve güvenilir bir şekilde tayinin ne derece önemli bir konu olduğu anlaşılmış ve bununla ilgili bazı yasal düzenlemeler yapılması yoluna gidilmiştir. Bu amaçla WHO 2009 yılında gıda ve yemlerdeki melaminin kantitatif olarak tespiti için önermiş olduğu analiz yöntemleri ile ilgili bir bülten yayınlamıştır. WHO yayınladığı bu raporda yem ve gıdalardaki melamin ve analoglarını belirlemek amacıyla kullanılabilecek olan teknikleri, bu yöntemlerin hangi amaçla kullanılabileceğini ve ilgili metotların seçicilik, duyarlılık gibi kriterlerini rapor etmiştir. İlgili sonuçlar Tablo 1.3’te özetlenmiştir [23].

Tablo 1. 3. Yem ve gıdalarda melamin ve analoglarını belirlemek amacıyla kullanılan teknikler.

Analitik Teknikler	Seçicilik	Duyarlılık	Maliyet	Amaç	Açıklamalar
ELISA	Düşük	Düşük	Düşük	Tarama	Şu anlık sadece melamin için
HPLC-UV/DAD	Düşük	Düşük	Orta	Tarama ve doğrulama	Melamin ve türevlerinin tespitinde tercih edilir; bununla birlikte doğrulama gereklidir.
GC/MS	Orta	Orta	Yüksek	Tarama ve doğrulama	Melamin ve türevleri için yöntem doğrulayıcı
GC/MS/MS	Yüksek	Yüksek	Çok yüksek	Tarama ve eser düzeyde doğrulama	Melamin ve türevleri için yöntem doğrulayıcı
LC/MS/MS	Yüksek	Yüksek	Çok yüksek	Tarama ve eser düzeyde doğrulama	Melamin ve türevleri için yöntem doğrulayıcı

1.2. Madde-Işık Etkileşimi

1.2.1. Işık

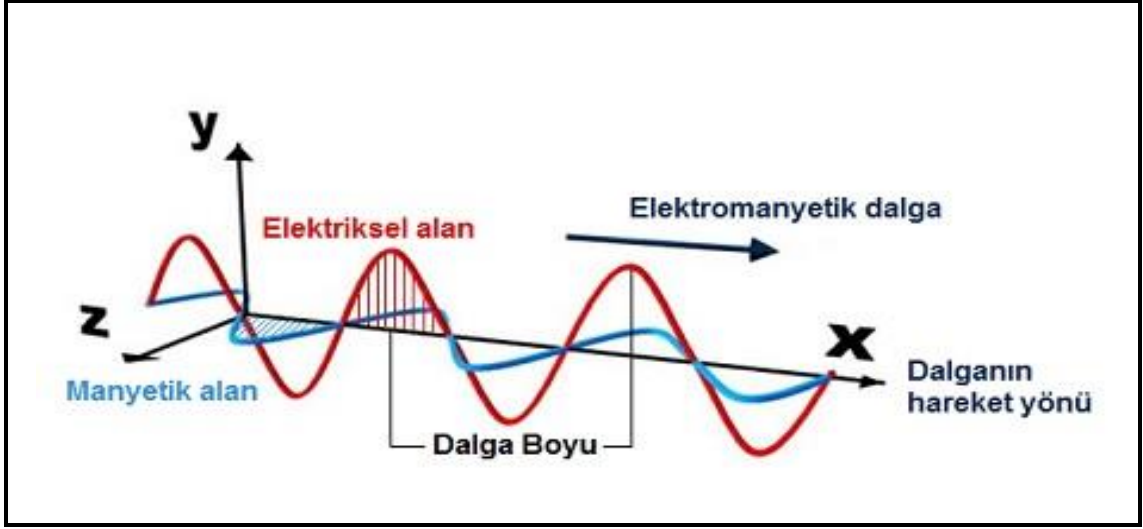
Işık, yüzyıllardır üzerinde en çok çalışılan konulardan birisi olup ışık ile ilgili görüşler yapılan araştırmalar ile sürekli bir gelişmiş göstermiştir.

M.Ö. 500'lü yıllarda yaşadığı düşünülen Yunan filozof Pythagoras'a göre ışık, nesnelerin kendinden gönderdiği çok küçük parçacıklardır ve bu çok küçük parçacıklar görmemizi sağlar. Yine Yunanlı başka bir filozof olan Empedokles'a göre ise gözden çıkan ateşimsi bir ışın sayesinde görme gerçekleşir. Platon ise görme olayının gerçekleşmesi için '*içsel ve dışsal ışık*' olmak üzere iki etken tanımlamış olup; dışsal ışığı nesneden çıkan ışık, içsel ışığı ise gözden çıkan ışık olarak adlandırmıştır. Aristoteles ise ışık kavramına yeni bir bakış açısı getirmiş ve ışığının evreni dolduran çok küçük maddelerin hareketi sonucu oluştuğu fikrini ortaya atmıştır. M.Ö. 350'lerde yaşamış olan Aristoteles'in bu kuramı Orta çağ bitene kadar da geçerliliğini korumuştur.

Işığın bilimsel olarak incelenmesi ise 1600'lü yılların sonunda Newton'un çalışmaları ile başlamıştır. Newton, ışığın oluşumunu partiküller ile açıklamıştır. Newton'a göre ışık, küçük taneciklerden meydana gelir. Işık kaynakları ise çevrelerine bu tanecikleri yayarlar. Onunla aynı dönemde yaşamış olan fizikçi Christian Huyges ve matematikçi Leonhard Euler'a göre ise ışık dalgalar halinde hareket etmektedir. Yani ışık, elektromanyetik bir dalgadır ve dalganın hareket yönüne ve birbirlerine dik bir elektrik bir de manyetik alana sahiptir (Şekil 1.6) Bu elektrik alan (E) ile magnetik alan (B) arasındaki bağıntı aşağıda verildiği gibidir;

$$E = c \times B \quad (1.1)$$

E/B oranı sabittir ve bu ışık hızına (c) eşittir.



Şekil 1. 6. Elektromanyetik ışıma.

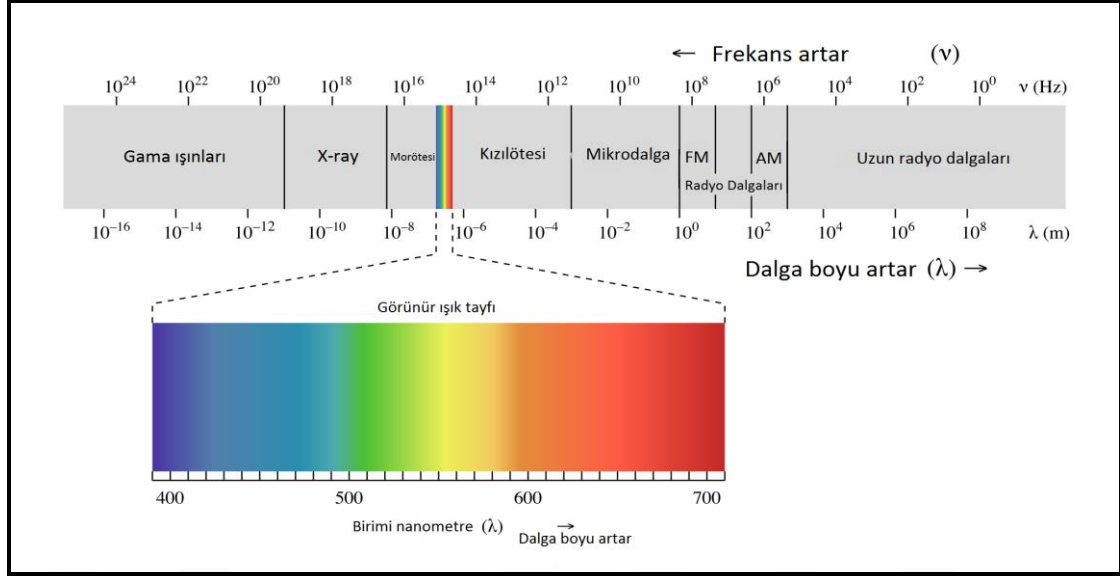
Sürekli bir elektromanyetik ışıma, yüklü bir taneciğin durmaksızın aşağı yukarı titreşmesini gerektirir. Yüklü taneciğin bir saniye boyunca yaptığı titreşim sayısı, o dalganın '*frekansı*' olarak adlandırılır ve ' ν ' sembolü ile gösterilir. Art arda gelen iki dalganın tepe noktaları arasındaki uzaklıkta '*dalga boyu*' olarak adlandırılırken ' λ ' sembolüyle gösterilir. Dalganın frekansı sadece ışımayı oluşturan kaynağın cinsine bağlı olup, ışığın geçtiği ortamdan bağımsızdır. Dalgaboyu ile frekans arasında ise;

$$c = \lambda \times \nu \quad (1.2)$$

bağıntısı vardır.

1.2.2. Elektromanyetik spektrum

Elektromanyetik spektrum, elektromanyetik radyasyon ve farklı ışıma türlerinin frekans (ν) veya dalga boyundan (λ) birine göre göreceli yerlerini gösteren bir ölçüttür. Atom altından başlayıp kilometrelerce uzunlukta olabilen radyo dalgalarına kadar geniş dalga boyu aralığındaki ışımaları kapsar ve pek çok ışıma tipini içermektedir (Şekil 1.7).



Şekil 1. 7. Elektromanyetik spektrum.

Elektromanyetik radyasyon diğer adıyla ışık, partiküllerden (taneciklerden) meydana gelir. Bu partiküllere foton adı verilir ve bunun Planck eşitliğiyle hesaplanan kesin bir enerji değeri vardır. Işık bu enerji miktarları oranında absorblanabilir veya yayılabilir [24].

$$E = h\nu = \frac{h \times c}{\lambda} \quad (1.3)$$

Burada;

E: her bir fotonun enerjisini,

h: Planck sabitini ($6,62 \times 10^{-34}$ J. s. foton⁻¹),

ν: ışığın frekansını (s⁻¹),

c: ışık hızını ($2,99 \times 10^8$ m.s⁻¹),

λ: ışığın dalga boyunu (m)

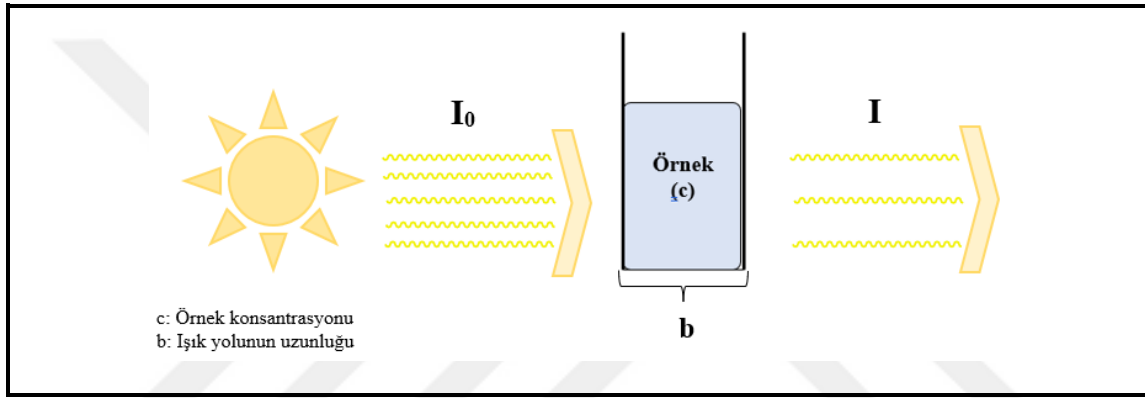
ifade etmektedir.

Verilen bu eşitlik yardımıyla belirli dalga boyu ve belirli geçişler için gerekli olan enerji miktarı kolaylıkla hesaplanabilir. Eşitlikten de görüleceği üzere dalga boyu

ile frekans ve enerji arasında ters bir orantı söz konusudur. Bu da düşük frekanslı elektromanyetik dalgaların uzun dalga boyuna ve düşük enerjiye sahipken, yüksek frekanslı elektromanyetik dalgaların kısa dalga boyu ve yüksek enerjiye sahip olduğunu göstermektedir.

1.2.3. Radyasyonun absorblanması: Beer-Lambert yasası

Homojen bir çözeltiden monokromatik bir ışın geçirildiğinde gelen ışının bir kısmı çözeltide bulunan türler (molekül ya da iyonlar) tarafından absorplanır. Bu durumda gelen ışının şiddeti çıkan ışının şiddetinden düşük olur (Şekil 1.8).



Şekil 1. 8. Işığın numune tarafından absorplanması.

Işımanın homojen çözelti tarafından absorblanan miktarı soğurucunun miktarına iki deneysel bağıntı ile bağlıdır; Beer ve Lambert kanunları. Beer kanununa göre; gelen ışımının homojen soğurucu tarafından absorblanan miktarı, soğurucunun konsantrasyonuna ile doğru orantılıdır. Diğer taraftan, Lambert kanununa göre ise gelen ışımının homojen soğurucu tarafından absorblanan miktarı, numunenin koyulduğu hücrenin genişliğiyle (ışın yolu, b) ile orantılıdır. Monokromatik ışın ile çözelti arasındaki etkileşimi açıklayan bu iki kanun birleştirilerek oluşturulan eşitlik absorbsiyon ölçümlerinin temeli olarak kabul edilen eşitliği meydana getirir (Eşitlik 1.4).

$$\log \frac{I_0}{I} = A = k \cdot b \cdot c \quad (1.4)$$

Burada;

I_0 : Işın kaynağından çıkan monokromatik ışının şiddeti,

I : Numune kabından çıkan ışının şiddeti,

b : Işının çözelti içinde aldığı yolu,

A : Absorbansı,

k : Absorptivite katsayısını,

c : Numune kabı içerisinde bulunan maddenin konsantrasyonunu,

simgelemektedir.

Işının etkileştiği çözeltinin konsantrasyon birimi ' mol L^{-1} ' ve ışığın çözelti içerisinde aldığı yolun uzunluğu ' cm ' olarak alınırsa, absorptivite katsayısına ' k ', molar absorptivite katsayısı adını alır ve " ϵ " ile sembolize edilir.

1.3. Optik Sensörler

Sensör, fiziksel veya kimyasal büyüklükleri elektrik sinyallerine dönüştüren düzeneklere verilen genel bir adlandırmadır. Bir sensörün yüksek seçiciliğe, duyarlılığa ve kararlılığa sahip olması, tekrarlanabilir sonuçlar vermesi, geniş bir ölçüm aralığına ve uzun süreli kullanım ömrüne sahip olması, tayin sınırının düşük, cevap süresinin yüksek olması o sensörü ideal bir sensör haline getirir. Tek bir sensörün tüm bu özelliklere sahip olması her ne kadar mümkün görünmese de bu özellikleri ne oranda barındırdığı o sensörün etkinliğinin ölçüsü olarak kabul edilir.

Sensörleri çalışma prensiplerine bağlı olarak fiziksel ve kimyasal sensörler olarak ikiye ayırmak mümkündür.

Kimyasal sensörlerin bir türü olan optik sensörler diğer adıyla optodlar ise, dönüştürücü vasıtasıyla analitik olarak anlamlı bir sinyal elde etmek amacıyla elektromanyetik ışığa kullanılan sensörlerdir. Optik bir kimyasal sensör, dönüştürücüyle birleştirilmiş bir kimyasal tanıma birimi (iyonofor ya da reseptör) içerir ve bu birim analitin seçici olarak tanınmasına olanak sağlar. Daha sonra ise dönüştürücü, alıcı tarafından üretilen bu optik analitik sinyali ölçülebilir bir sinyale dönüştürür [25, 26].

Optik sensörler sadece ışığın şiddetinin ölçülmesine değil, bunun yanı sıra ışığa

ömrü, saçılması, kırınımı vb. diğer optik özelliklerin de ölçülmesini sağlayan, absorbands, fluoresans, yansıma gibi çeşitli optik prensiplere de dayalı olabilirler [27].

Optik sensörleri ölçtüğü optik özelliklere göre; *absorbans temelli sensörler*, *kırılma temelli sensörler*, *yansıma temelli sensörler*, *opto-termal temelli sensörler*, *ışık saçılımı temelli sensörler* ve *lüminesans temelli sensörler* olarak sınıflandırabiliriz.

Lüminesans temelli sensörler ise, kimyasal bir reaksiyondan sonra yayılan ya da bir uyarma sonucu yayılan ışığın şiddetinin ölçüldüğü bir optik sensör türü olup iki alt türü bulunmaktadır; *fluoresans* ve *fosforesans sensörler*.

1.3.1. Fluoresans sensörler

Fluoresans kemosenörler; bir florofor, bir bağlama bölgesi ve bu ikisi arasındaki iletişimi sağlamak amacıyla bir mekanizma barındıran bileşikler olarak tanımlanırlar [28]. Fluoresans kemosenör çalışmalarının tarihi 1867 yılına dayanmakta olup F. Goppelsröder tarafından yapılan çalışmada rapor edilen alüminyum iyonunun (Al^{3+}) belirlenmesi kullanılan fluoresans morrin şelatının ilk fluoresans sensör olduğu kabul edilir. Rapor edilen bu çalışmadan sonra fluoresans sensör ile ilgili yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. İlk yapılan çalışmalar daha çok metal iyonlarının belirlenmesi için olsa da özellikle 1980'lerden sonra kemosenörlerin babası olarak adlandırılan Silva ve Czarnik tarafından bu alanda yapılan öncü çalışmalar fluoresans sensör araştırmalarının gelişimine büyük katkı sağlamıştır [29].

Fluoresans sensörler, kimyasal sensör türleri arasında en etkili ve en önemli sensör türlerinden birisidir. Hedef iyon ve moleküllerin canlı organizmada gözlenmesini ve görüntülenmesini sağlaması en etkin ve en güçlü yöntemler arasında yer almasını sağlayan en önemli nedenlerden birisidir. Fluoresans sensörlerin bu derece önemli olmasının bir diğer nedeniyse yüksek hassasiyeti ve hızlı bir şekilde görüntülemeye imkân tanıyor oluşudur.

Fluoresans sensör yöntemleri, tayin edilen analitin sensörle etkileşimi sonrası başlangıç emisyon şiddetinde meydana gelen değişimine (emisyonun sönümlenmesi ya da artması) dayanır. Fluoresans sensörü olarak son yıllarda; konjuge organik-inorganik polimerler, lüminesans jeller, kovalent organik polimerler, moleküler baskılanmış polimerler, poröz metal organik çerçeveler, kuantum dotlar vb. pek çok materyaller kullanılmaktadır [30].

Fluoresans sensörlerin uygulama alanı günümüzde fazlasıyla gelişmiş olup biyolojik ve ekolojik çevre açısından önem arz eden çeşitli anyonlar, katyonlar, küçük nötr moleküller ve protein, DNA gibi biyo-makromoleküllerin tayini de dahil olmak üzere çok geniş bir kullanım alanına sahiptir.

Fluoresans kemosensörle bir analitin tespiti genellikle;

- Şelat oluşumuna dayanan indüklenen gelişmiş fluoresans (CHEF) [31],
- Foto indüklenmiş elektron transferi (PET) [32],
- Molekül içi yük transferi (ICT) [33],
- Agregasyon kaynaklı emisyon (AIE)

gibi bir veya daha fazla yaygın fotofiziksel mekanizmaya aracılığıyla gerçekleştirilmektedir [34].

Fluoresans sensörler özellikle yüksek hassasiyetleri, hızlı sonuç vermeleri ve yerinde analize imkân tanımları gibi avantajlarından dolayı biyolojiden, fizyolojiye, farmakolojiden ve çevre bilimlerine kadar çok çeşitli alanlarda yaygın olarak uygulama alanı bulmaktadırlar.

1.3.2. Moleküler lüminesans spektroskopisi

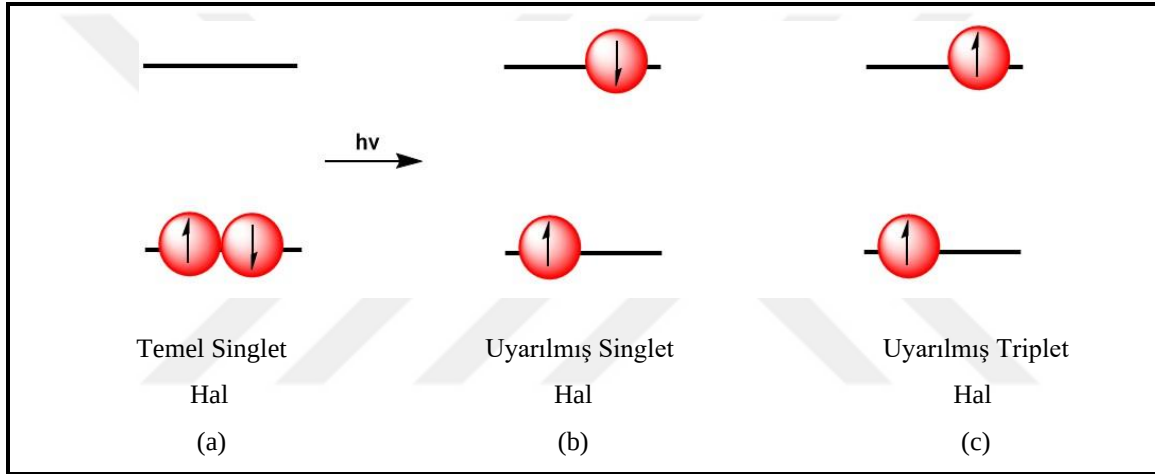
Temel halde bulunan bir atom veya molekül bir ışın enerjisini absorpladığında kararlı halde bulunduğu temel enerji düzeyinde bir bağını oluşturan iki elektrondan biri uygun bir üst enerji seviyesine (uyarılmış enerji düzeyine) çıkar. Bu halde kararsız olan molekül, enerjisinin fazlasını foton olarak verir. Bu olay '*moleküler lüminesans*' olarak adlandırılır ve Moleküler lüminesans olayı üç farklı şekilde meydana gelebilmektedir;

- Kemilüminesans,
- Moleküler fluoresans,
- Moleküler fosforesans.

Fluoresans ve fosforesans olaylarında maddenin elektron verici veya çekici gruplarında bulunan bir elektron, molekül üzerine gönderilen ışın ile uyarılması yoluyla

üst (bir, iki veya üç üst) enerji seviyesine çıkar. Molekölün elektron çiftlerinden birinin daha yüksek enerji seviyesine çıkmasıyla singlet veya triplet hallerden biri meydana gelir.

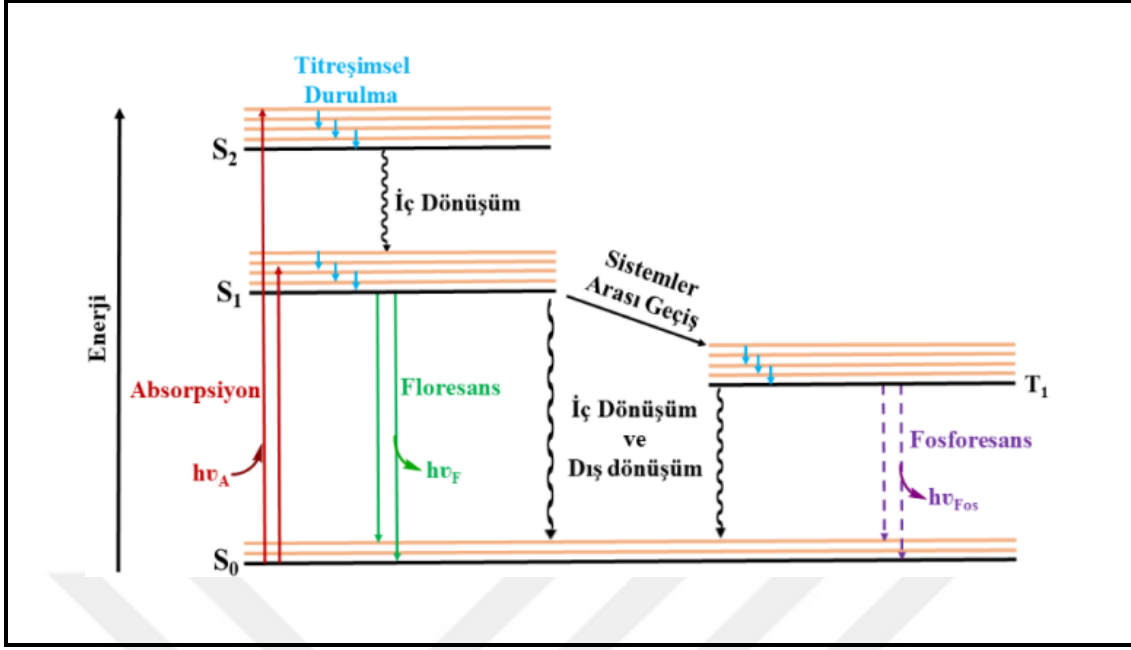
Molekölün uyarılması sonucu üst enerji seviyesine (bir iki veya üç) çıkan elektronun spini değiştirmeden üst enerji seviyesine çıktıysa, yani uyarılmış elektronun spini temel halde bulunan elektron ile zıt spinli olması durumuna ‘uyarılmış singlet hal’ denir. Bu durumdaki moleküller diamanyetik özellik gösterirler. Elektronun uyarılma ile spinini değiştirerek üst enerji seviyesine çıkması durumunaysa ‘uyarılmış triplet hal’ denir ve bu tür moleküller paramanyetik özellik gösterir [35].



Şekil 1. 9. Moleküllerin elektronik spin halleri; a) temel elektronik hal, b) uyarılmış singlet hal ve c) uyarılmış triplet hal.

1.3.3. Moleküler fluoresans spektroskopisinin açıklamasında kullanılan temel kavramlar

Moleküllerin ışın ile olan etkileşimi sonucu meydana gelen olayların açıklaması Alexander Jablonski tarafından geliştirilen “Jablonski Diyagramı” kullanılarak açıklanabilir (Şekil 1. 10). Jablonski diyagramında S_0 , S_1 , S_2 ve T_1 şeklinde gösterilen haller sırasıyla temel singlet hal, birinci ve ikinci enerji uyarılmış singlet hal ve birinci uyarılmış triplet hal enerji düzeylerini sembolize etmektedir.



Şekil 1. 10. Jablonski diyagramı.

Uyarılmış elektronik enerji düzeyinde bulunan bir molekül, çözeltide çözücü molekülüleri arasındaki çarpışmalar sonucu enerjilerini çözücüye veya çözelti ortamında bulunan diğer türlere aktarabilirler. Bu ışımasız duruma olayına “dış dönüşüm veya çarpışma ile sönüm” denir. Uyarılmış olan molekülün, emisyon yapmaksızın düşük enerjili bir elektronik enerji seviyesine geçmesiyle meydana gelen moleküller arası sönümlenme ise “iç dönüşüm” olarak adlandırılır. Spinleri aynı olmayan elektronik enerji seviyeleri arasında oluşan geçişler ise “sistemler arası geçiş” adı verilir.

Uyarılmış elektronik hal kararsız bir haldir ve bu nedenle molekül aldığı enerjii geri vererek temel hale dönme eğilimindedir. Molekülün temel hale dönmesi ışımalı ve ışımasız olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşebilir. Işımalı geçişler molekülün aldığı enerjii ışın fotonunun yayılımı şeklinde geri verdiği fluoresans ve fosforesanstır.

Uyarılan elektron, uyarılmış singlet halden temel enerji seviyesine dönmesi olayına *fluoresans emisyonu* denir. Pauli dışlama prensibine göre bu geçiş izinli bir geçiş olduğundan fluoresans emisyonu 10^{-8} s gibi hızlı bir şekilde gerçekleşir. *Fosforesans emisyonunda* ise, uyarılmış triplet halde bulunan elektron, temel halde bulunan elektron ile aynı spinli olduğundan kararlı olduğu temel hale dönüşü bu haliyle Pauli ilkelerine göre yasaklıdır. Bu nedenle spin değiştirerek temel hale döner ki bu nedenle de fosforesans emisyonu 10^{-6} - 1 s arasında değişen uzun süreli ışıma şeklinde

meydana gelmesine sebep olur [36-38]. Özetle floresans singlet uyarılmış halden temel singlet hale, fosforesans ise uyarılmış triplet halden temel singlet enerji seviyesine ışıma yaparak gerçekleşen elektronik geçişlerdir.

Uyarılmış halden temel hale geçişte en çok, uyarılmış halin ömrünün en az olduğu yol tercih edilir. Bu nedenle, ışımasız geçişlere oranla floresansla sönüm hızlıysa bir emisyon gözlenirken, ışımasız yolun daha büyük hız sabitine sahip olması durumunda, floresans gözlenmez ya da gözlenen floresansın şiddeti çok düşük şiddette olur.

Şekil 1. 10' da verilen Jablonski diyagramını inceleyecek olursak;

- *Işımalı işlemler*

Absorpsiyon	:	$S_0 + h\nu \rightarrow S_1$	veya	$S_0 + h\nu \rightarrow T_1$
Fluoresans	:	$S_1 \rightarrow S_0 + h\nu'$		
Fosforesans	:	$T_1 \rightarrow S_0 + h\nu''$		

Burada; h: Planck sabiti ; ν , ν' , ν'' : Absorbe edilen veya yayılan ışının frekanslarını sembolize etmektedir.

- *Işımasız işlemler*

İç dönüşüm	:	$S_1 \rightarrow S_0 + \text{ısı}$		
Sistemler arası geçiş	:	$T_1 \rightarrow S_0$	veya	$S_1 \rightarrow T_1$

1.3.4. Floresansı etkileyen faktörler

Bir molekülün floresans özelliğinin ölçüsü olarak floresans kuantum verimi (Φ_F) kavramı kullanılır. Floresans kuantum verimi (Φ_F) 0-1 arasında bir skalaya sahip olup, molekülün floresans verme ölçüsü 1'e yaklaştıkça artarken, sıfır olması maddenin floresans özellik göstermediği anlamını taşır. Bir molekülün floresans özelliğini molekülün kimyasal yapısı ve çevresine bağlı olarak değişebilir.

Fluoresansı etkileyen başlıca etkenler ve buna ne şekilde sebep oldukları şu şekilde sıralanabilir;

I. Moleküler yapının etkisi

Yapısında aromatik fonksiyonel gruplar içeren moleküller genellikle yüksek fluoresans özellik gösteren bileşiklerdir. Yapıdaki konjugasyon ve halka sayısının artışı fluoresans şiddetini de doğru orantılı olarak etkiler. Molekül yapısındaki $\pi \longrightarrow \pi^*$ geçiş ihtimali molekülün fluoresans özellik gösterme olasılığına artırmaktadır. Bunun yanı sıra molekül yapısına eklenen sübstitüentler de molekülün fluoresans özelliği üzerine etki etmektedir. Elektron çeken grupların (-COOH, -I vb.) varlığı fluoresans şiddetinde azalışa sebebiyet verirken, elektron veren grupların (-NH₂, -OH vb.) varlığı molekülün fluoresans özellik gösterme özelliğini artırmaktadır.

II. Yapısal rijitlik etkisi

Yapısal rijidite bir molekülün fluoresans özelliği üzerine etki eden bir diğer önemli parametredir. Molekül yapısı rijid olan moleküller daha yüksek fluoresans özellik gösterme eğilimindedirler. Molekülün rijitliği hareket serbestliğini azaltır. Bu da triplet duruma sistemler arası geçiş veya moleküller arası çarpışma gibi ışımasız sistemler arası geçiş olasılığını azaltır. Böylece molekülün fluoresans özellik gösterme eğilim artar. Molekülün bir metal iyonu ile şelat oluşturması da moleküle titreşimleri azaltan bir moleküler katılık sağladığından fluoresans şiddetinin artırmaktadır.

III. Viskozite etkisi

Molekülün fluoresans özelliği üzerine etki eden parametrelerden birisi de vizkozitedir. Vizkozitesindeki artış molekülün fluoresans özelliğini artırır. Vizkozite arttıkça molekülün çözücü ve çözücü içerisindeki diğer türlerle olan çarpışma ihtimali azalacağından ışımasız yolla sönmüleme ihtimali düşer, fluoresans verme ihtimalini artırır.

IV. Sıcaklık etkisi

Sıcaklık ve molekülün floresans özelliği ters orantılıdır. Sıcaklık çarpışma sayısının artmasına neden olur. Sıcaklık arttıkça moleküllerin birbirleri veya çözücü molekülleri ile olan çarpışma sayısı artar. Bu da dış dönüşüm ile sönmelenme ihtimalini dolayısıyla da ışımasız sönmelenme ihtimalini arttırırken floresans özelliğini düşürür.

V. pH etkisi

Molekül yapısında bulunan asidik veya bazik gruplar molekülün floresans özelliğine etki eden bir diğer parametredir. Bu molekülün iyonik ve nötr hallerinin floresansının şiddetinin ve dalgaboyunun farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Buna örnek olarak anilin verilebilir. Bazik ve nötr ortamda floresans özellik gösteren anilin çözeltisi asidik ortamda floresans özellik göstermemektedir. Bu yüzden floresans çalışmalarında pH kontrolü mutlaka yapılmalıdır.

VI. Çözücü etkisi

Molekülün floresans özelliği üzerine etkisi olan etmenlerden birisi de çözücünün polaritesidir. Çözücü polaritesi arttıkça $n \rightarrow \pi^*$ geçişlerindeki enerji farkı arttığından molekülün floresans gösterme özelliği de artar.

VII. Derişim etkisi

Floresans şiddeti ve derişim arasındaki bağıntı aşağıdaki gibidir;

$$F = \Phi_F \times (I_0 - I) \quad (1.5)$$

Burada;

F: floresans şiddeti,

Φ_F : floresans kuantum verimi,

$I_0 - I$: moleküller tarafından absorplanan ışıma miktarını göstermektedir.

Lambert- Beer yasasına göre I ve I₀ arasında ise;

$$(I_0/I) = 10^{-\epsilon b C} \quad (1.6)$$

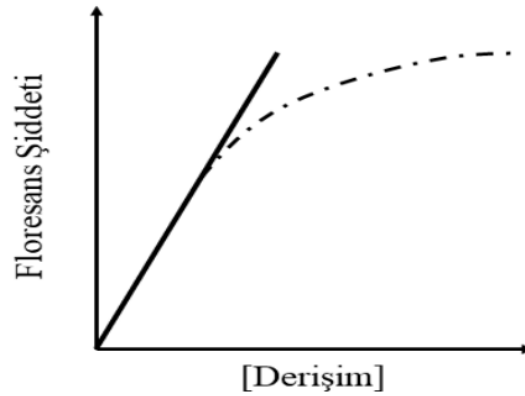
ilişkisi bulunmaktadır.

Bu iki eşitlik birleştirildiğinde;

$$F = \Phi_F \times 10^{-\epsilon b C} \quad (1.7)$$

bağıntısı elde edilir.

Seyreltik çözeltilerde, floresans şiddeti maddenin derişimi ile doğru orantılıdır (Şekil 1.11).



Şekil 1. 11. Floresans şiddeti- derişim arasındaki ilişki.

Ancak absorbansın 0,05'ten yüksek olduğu derişimlerde molekülün kendi kendine sönmelenme ve kendi kendine absorpsiyonundan dolayı doğrusallıktan sapma gözlemlenir [39].

VIII. Çözünmüş oksijen etkisi

Molekülün floresans özelliğini etkileyen parametrelerden birisi de çözelti

ortamında bulunan çözülmüş oksijendir. Çözülmüş oksijen floresans özelliğini azaltan parametrelerden birisidir. Paramanyetik özellik gösteren oksijenin çözelti ortamında bulunması uyarılmış singlet halden uyarılmış triplet hale geçişi kolaylaştırması molekülün floresans şiddetinin düşmesine sebep olur. Bu etki ortamdan belli bir süre $N_2(g)$ geçirilerek nispeten azaltılabilir.

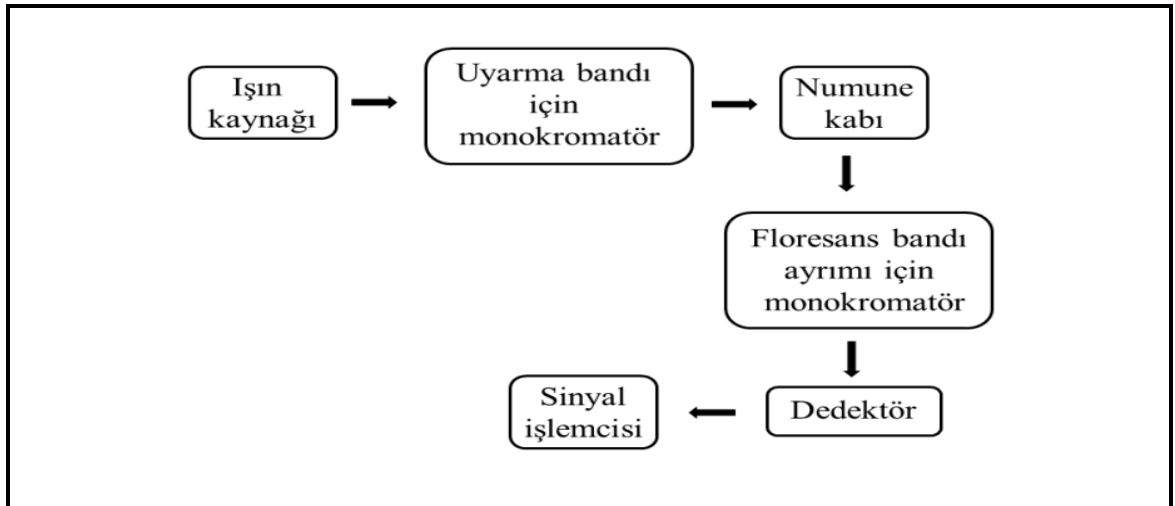
1.3.5. Spektrofluorimetrenin temel bileşenleri

Floresans şiddetini ölçmek için kullanılan floresans spektrometre cihazı;

- ışın kaynağı,
- numune küveti,
- uyarılma ve emisyon dalgaboylarını ayarlayacak bir monokromatör veya çift filtre
- ışık şiddetini elektrik sinyaline çevirecek dedektör

kısımlarından oluşmaktadır.

Fotoluminesans ölçümlerinde kullanılan spektrofluorimetreye ait ana bileşenler Şekil 1.12’de şematik olarak gösterildiği gibidir.



Şekil 1. 12. Spektrofluorimetrenin temel bileşenlerinin şematik gösterimi.

Spektrofluorimetrelerde ışın kaynağı olarak UV-Vis bölgede (250-900 nm) ışın veren ksenon-ark lambası kullanılır ve uyarma ve emisyon dalga boylarını ayırmak için iki monokromatör bulunur. Işık kaynağından çıkan ışın demeti önce uyarma

monokromatörüne gelir. Bu ışın demetinden floresans meydana getirecek olan uygun dalgaboyundaki ışın ayrıştırılır ve numune hücresine gönderilir. Örnekten yayılan lüminesans ışınları 90 derecelik açıyla konumlanmış olan emisyon monokromatörü yardımıyla toplanır ve dedektöre iletilir. Dedektöre ulaşan ışın, sinyal işlemcisi ile bir spektruma dönüştürülür. Fluorimetrelerde dedektör olarak fotoçoğaltıcı tüpler kullanılmaktadır.

1.4. UV ile Sertleşme Reaksiyonları

UV ile sertleşme reaksiyonları 2 temel mekanizmaya dayanmaktadır;

- I. Serbest radikal polimerizasyon,
- II. Katyonik polimerizasyon.

Bunlardan en yaygın kullanılanı zincir (katılma) reaksiyonu mekanizmasını içeren serbest radikal polimerizasyondur.

1.4.1. Serbest radikal polimerizasyonu

Serbest radikalik polimerizasyonun ana adımını bir radikalın akrilatın çifte bağına katılması oluşturur. Serbest radikalik polimerizasyonda ışığı absorplayarak reaksiyonu başlatacak bir bileşene ihtiyaç vardır. Bu bileşen, ısı veya ışık etkisiyle radikalleri üretir. Katılma reaksiyonu bu radikallerin çifte bağa katılması ve yeni radikallerin oluşması yoluyla yürür. Oluşan bu aktifleşmiş moleküle art arda monomerler katılır ve böylece zincir büyür. Aktifleşmiş moleküle monomerlerin eklenmesi adımın ‘yürüme aşaması’ olarak tanımlanırken, polimerizasyonun reaksiyon ortamında monomer kalmayınca ya da aktif zincirin aktifliği bitince sonlanması adımı ise ‘sonlanma aşaması’ olarak adlandırılır.

Bu reaksiyon sırasında zincir büyümesi orantısız bir şekilde ya da belli bir kombinasyonda şeklinde gerçekleşebilir.

Radikal polimerizasyonu hem küçük hem de endüstriyel ölçekte sentezler yapılabilmesine olanak tanınması bu kadar çok kullanılan bir yöntem olmasına sebep olmuştur.

Zincir (katılma) reaksiyonunu fotobaşlatıcı başlatır. Reaksiyon sırasında aktifleşen başlatıcının oksijen (O₂) tarafından söndürülmesi veya deaktif edilmesi olasılık dahilinde olup bunun yanı sıra büyüyen polimer radikalleri oksijen ile reaksiyon da verebilirler. Bu oksijen (O₂) inhibisyonu kısa polimer zincirlerinin oluşumuna sebep olmasının yanı sıra düzgün olmayan yüzeylerin oluşumuna ya da oluşan polimerin zayıf fiziksel özellikler göstermesine sebep olur.

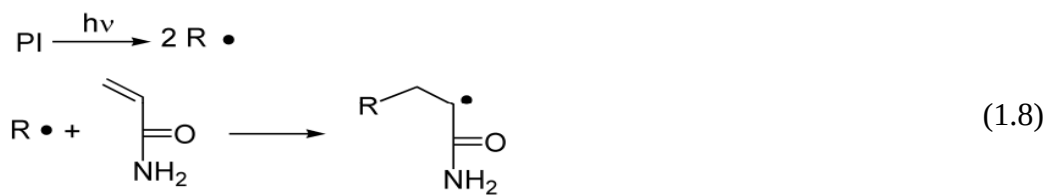
Başlatıcı sistemlerin pek çoğunda çoğalma hızı yüksek olup, oksijen (O₂) söndürümü ile yarışmalı reaksiyonlar oldukça azdır.

Radikalik polimerizasyon reaksiyonu 3 aşamadan (başlama, çoğalma ve sonlanma) oluşup serbest radikal üretmek amacıyla kullanılan bir fotobaşlatıcı (PI) ve reaktif monomerler kullanılarak gerçekleştirilir.

1.4.1.1. Başlama

Serbest radikalik polimerizasyonun ilk adımı olan başlama adımı, birincil radikallerin oluştuğu adımdır. Uyarılmış moleküller, radikal veya radikal iyonlarını oluşturur [40].

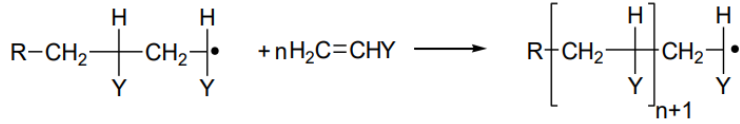
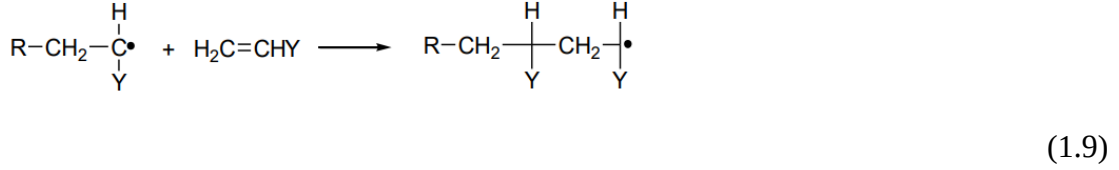
Başlama adımının ikinci reaksiyonu, oluşan radikalın ilk monomere katılması yoluyla bir zincir taşıyıcı oluşturmaya aşamasıdır.



İyi bir başlatıcıdan; kimyasal bir tepkimeye girdiği zaman simetrik (homolitik) olarak parçalanması ve bunun yanı sıra monomerlerden daha fazla aktif olan radikaller vermesi özellikleri beklenir.

1.4.1.2.Çoğalma- Büyüme

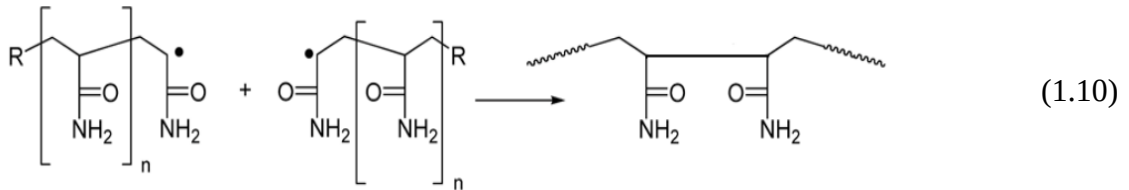
Serbest radikalik polimerizasyonun ikinci adımı çoğalma ya da diğer adıyla büyüme adımıdır. Bu adım monomer birimlerinin aktif radikallere hızlıca katılarak polimer zincirinin büyüdüğü adımdır.



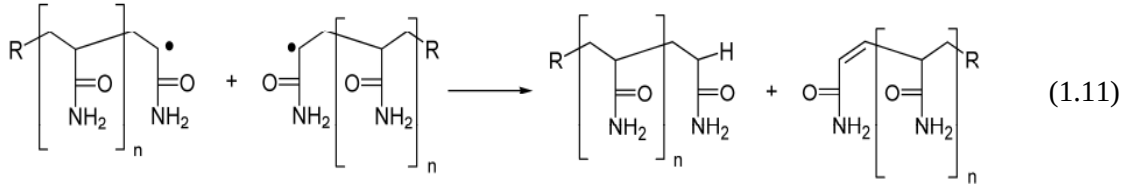
1.4.1.3.Sonlanma

Son adım olan sonlanma adımı polimer zincirinin büyümesi çoğalan zincirin yok edilmesi yoluyla sağlanır. Sonlanma adımı çok düşük konsantrasyonda hızlı bir adım olup, iki farklı mekanizma ile gerçekleşebilmektedir;

- *Birleşme ile sonlanma*; iki radikal çifti birleşerek polimerizasyonu sonlandırır.



- *Orantısız sonlanma*; aktif olan polimer zincirlerden birinin bir diğer polimer zincirinden bir hidrojen koparması yoluyla nötral hale geçerken diğer zincirin de çift bağ oluşturarak aktifliğini kaybetmesi yoluyla sonlanma gerçekleşir.



1.5. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Kriterleri

Yeni bir yöntem geliştirilmesinin ilk adımı yöntemin amacı, kapsamı, uygulama ve performans parametreleriyle birlikte kabul kriterlerinin tanımlandığı adımdır. Daha sonraki adım ise geliştirilen yöntemin validasyonunun yapılmasıdır. Bir yöntemin validasyonu, ölçüm prosedürünün veya metodun, önceden belirlenmiş olan amaçlara uygunluğunun tarafsız bir şekilde test edilip yazılı olarak kanıtlanması olarak tanımlanabilir ve bir metodun performansının tespiti için birtakım değişkenlere göre yapılan test ve ölçme işlemlerini içerir. Yapılan çalışmada yöntem geliştirme aşaması tamamlandıktan sonra geliştirilen yöntemin validasyonu Gıda ve İlaç Dairesi'ne (FDA) prosedürüne göre yapılmış olup bu amaçla seçicilik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, geri kazanım, duyarlılık, tekrarlanabilirlik ve stabilite kriterleri incelenmiştir [41].

1.5.1. Seçicilik

Analitik bir yöntemin seçiciliği, örnek matrisinden etkilenmeden tayin edilecek maddeyi doğru ve güvenilir bir şekilde tayin edebilme özelliği olarak tanımlanabilir. Başka bir şekilde ifade etmek gerekirse bir analitik yöntem, eğer ölçülen sinyal sadece örnekteki analit miktarının bir fonksiyonu olarak ölçülebiliyorsa seçimlidir.

Bir analitik yöntemin seçiciliği uygulamada iki yolla belirlenir;

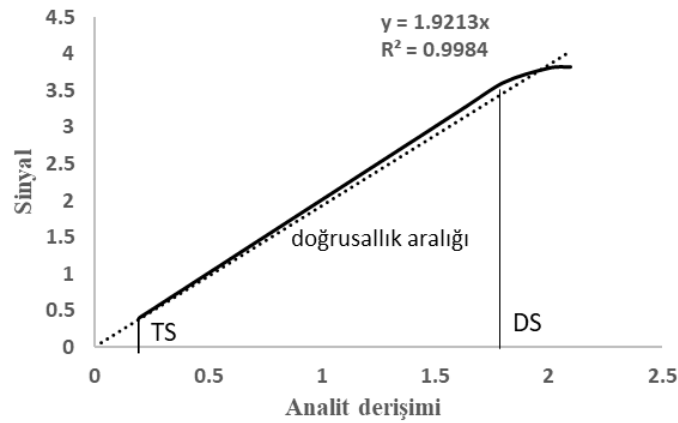
1. Tanımlama (belirtme-nitel analiz) yöntemiyle,
2. Analit/girişimci oranı yöntemiyle.

Tanımlama yönteminde birbirlerine yakın yapı veya özelliklere sahip iki maddenin farkedirilebilirliklerine bakılır. Analit/girişimci oranı yönteminde ise girişimci maddenin girişim yapmadığı konsantrasyon değeri belirlenmeye çalışılır. Bu da iki farklı şekilde yapılabilir. İlkinde analit/girişimci madde oranı değiştirilerek

girişim yapan türün girişim yapmadığı konsantrasyon değeri belirlenir. Diğer seçenek de ise tayin sınırında analit içeren numunenin sinyali ölçülür. Daha sonra bu numune üzerine örnek derişiminin farklı katlarında girişimci madde eklenir ve sinyal değeri kaydedilir. Tayin sınırı mg L^{-1} seviyesinde ise girişimci derişimi de mg/L ; $\mu\text{g/L}$ ise aynı şekilde girişimci derişimi de $\mu\text{g L}^{-1}$ olarak alınır. Girişimcinin, girişim yapıp yapmadığı, her iki yöntem için de ölçülen sinyal değerinin analitin sinyal değerinde $\pm\%5,0$ değişiklik yapma durumuna göre karar verilir. Eğer girişimci tür sinyal değerinde $\pm\%5,0$ 'ten fazla farka sebebiyet vermişse ilgili tür o derişim değerinde girişim yapıyor anlamını taşır. Böyle bir durumda o türün girişim yapmadığı derişim değerini belirlemek için girişimci derişimi kademeli olarak azaltılarak sinyal değerinde $\pm\%5,0$ farkın gözlenmediği konsantrasyon değeri belirlenmeye çalışılır.

1.5.2. Doğrusallık

Bir yöntemin doğrusal aralığı, kalibrasyon grafiğinde tayin sınırıyla doğrusallık sınırı arasında bulunan derişim aralığıdır. Bir diğer ifadeyle analiz edilen maddenin farklı derişim değerlerine karşı alınan analiz sonuçlarının doğrusal olduğu derişim aralığı olarak da tanımlanabilir. Doğrusallığı veren parametreler ise; eğim, kesişim ve korrelasyon katsayısıdır (R^2).



Şekil 1. 13. Doğrusallık grafiği.

1.5.3. Doğruluk

Doğruluk, basitçe elde edilen analiz sonucunun ölçülenin gerçek değerine ya da doğru kabul edilen değere olan yakınlığı olarak tanımlanabilir. Doğruluk, matematiksel olarak mutlak hata ile ifade edilir ve genel olarak bağıl hata ile verilmesi tercih edilir. Bir yöntemin doğruluğu genellikle üç yöntemle kontrol edilir;

1. geliştirilen yöntemin bir standart referans maddeye uygulanması (SRM),
2. aynı örneğin hem geliştirilen yöntemle hem de referans bir yöntemle analiz edilerek sonuçların karşılaştırılması,
3. geri kazanım testleri.

1.5.4. Kesinlik

Bir örneğin analizi veya bir ölçüm, birden fazla kez yapıldığında aynı sonuç elde edilemez. Genellikle elde edilen sonuçlar belirli bir nokta etrafında yayılım gösterir. İşte kesinlik, tamamen aynı yollarla elde edilen analiz sonuçlarının birbirine olan yakınlığını ifade etmek için kullanılan bir terimdir. Kesinlik ölçüm sonuçlarının tekrarlanabilirliğine dayanan bir kavram olup detaylı olarak ifade etmek için 3 kavram kullanılır;

1. *Tekrarlanabilirlik*; aynı gün, aynı analizci, aynı laboratuvar, aynı çözeltiler ve aynı cihaz ile kısa zaman dilimi arasında yapılan tekrarlı ölçüm sonuçlarının birbirleriyle uyumunu ifade eder.
2. *Ara kesinlik - tekrarlanabilirlik*; tekrarlanabilirlikten tek farkı farklı günlerde elde edilen analiz sonuçlarının birbirleriyle uyumunu ifade etmesidir.
3. *Uyarlık (tekrar üretilebilirlik)*; laboratuvarlar arası işbirliği çalışmalarında elde edilen analiz sonuçlarının uyumunu ifade eder. Burada farklı laboratuvarlarda, farklı cihazlarda, farklı çözeltiler ve farklı kişilerce farklı zamanlarda yapılan ölçümlerin uyumuna bakılır.

Tablo 1.4'te çalışma şartlarına göre kesinlik türleri verilmiştir [42].

Tablo 1. 4. Çalışma koşullarına göre kesinlik türleri.

	Tekrarlanabilirlik	Ara kesinlik	Uyarlık
Laboratuvar	Aynı	Aynı	Farklı
Metot	Aynı	Aynı	Aynı
Personel	Aynı	Aynı/ Farklı	Farklı
Numune	Aynı	Aynı/ Eşdeğer	Aynı/ Eşdeğer
Kullanılan reaktif, sarf vb. koşullar	Aynı	Eşdeğer	Eşdeğer
Kalibrasyon eğrisi (varsa)	Aynı	Farklı	Farklı
Cihaz	Aynı	Aynı/Farklı	Farklı
Zaman dilimi	Kısa	Uzun	Uzun

Kesinliğin sayısal ölçütleri; standart sapma (s), yayılım veya aralık (R), varyans (s^2), bağıl standart sapma (RSD) ile ortalamanın standart hatasıdır. Bunlardan en yaygın kullanılanları standart sapma ve bağıl standart sapma olup bağıl standart sapma genellikle %BSS (%RSD) olarak ifade edilir.

Kesinlik çalışması tıpkı doğruluk gibi çalışma aralığında bulunan üç farklı derişim değerinde en az üç tekrarlı ölçüm ile yapılmalıdır.

1.5.5. Tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)

Nicel analiz yapmak amacıyla geliştirilen yeni bir analitik yöntemin geçerli kılınması için tayin edilecek en düşük madde derişiminin belirlenmesi bir gerekliliktir. Bunu belirlemek için farklı çalışma alanlarında farklı hesaplama yöntemleri ve terimleri kullanılabilmektedir. Uluslararası standartlarda kimyasal ölçümlerde bunu ifade etmek için en çok kullanılan terimler *tespit sınırı* (LOD) ve *tayin sınırı* (LOQ)'dır.

Tespit sınırı diğer adıyla dedeksiyon limiti (LOD), IUPAC tarafından yapılan tanımlamaya göre reaktif tanık sinyalinden makul bir kesinlikle anlamlı olarak farkedirilebilen en küçük sinyale karşılık gelen en küçük analit miktarı ya da analit derişimidir. Bir yöntemin *tayin sınırı* (LOQ) ise , kabul edilebilir bir doğruluk ve kesinlikle tayin edilebilecek en düşük analit miktarı veya konsantrasyonu olarak ifade

edilmektedir. Kimyasal analiz için geliştirilen bir yöntemin LOD ve LOQ değerlerini belirlemek için çeşitli yöntemler kullanılabilir.

Bu amaçla en çok kullanılan yöntemler şu şekildedir;

- ✓ Kör numunelerin sonuçlarının standart sapma değerleri kullanılarak,
- ✓ Kullanılan metodun standart sapma değeri kullanılarak,
- ✓ Sinyal/ gürültü (S/N) oranı değeri kullanılarak yapılan hesaplamalar ile.

Hesaplama için daha çok kör ya da düşük miktarda analit içeriğine sahip numunelerin ölçüm sonuçlarının standart sapması kullanılarak deneysel yolla belirleme yöntemi tercih edilmektedir.

1.5.6. Stabilité

Stabilité, diğér adıyla kararlılık belirli bir matris içerisindeki bir analit için uygun bir süre boyunca (1 gün, 1 hafta 1 ay vb.) parametrelerdeki ufak değışimlerden etkilenmeden kalabilme kapasitesidir. Bu parametreler pH, sıcaklık, iyonik güç, organik çözücü yüzdesi vb. etkenler olabilir. Kararlılık yöntem geliştirilirken değıerlendirilmesi gereken bir aşamalardan birisidir.

1.6. Önerilen Melamin Sensörünün Diğér Fluorimetrik Yöntemlerle Karşılaştırılması

Melamin tayini için literatürde çok çeşitli fluorimetrik yöntemler mevcuttur. Önerilen yöntemin melamin tayini için literatürde rapor edilen diğér tayin metotları ile karşılaştırılması Tablo 1.5 'te özetlenmiştir. Tablo 1.5 'te rapor edilen metotların çoğı uzun ön-hazırlık süresine ihtiyaç duyar. Önerilen sensörlerden bazıları, floresans emisyonu elde etmek için ek bir kimyasal gerektirir [43,44], bazıları geri döndürülemez, bazıları çevre dostu değıl, etanol [45], metanol [46], kloroform [47, 48] gereklidir ve bazıları çok uzun analiz süreleri gerektirir [49, 50]. Bu yöntemlerle karşılaştırıldığında, önerilen floresans sensör yöntemi, literatürdeki diğér yöntemlerle karşılaştırılabilir doğrusal bir çalışma aralığına ve düşük LOD değerine sahiptir. Önerilen floresans sensör yöntemi, kısa analiz süresi (0-60 s), tekrarlanabilirliğı (aynı sensör ile en az 250 kez), basitliğı, ucuzluğı ve yüksek seçiciliğı ile öne çıkmaktadır. Ayrıca hazırlanan

polimerik membran sensörü kullanılarak elde edilen sonuçlar, melamin için WHO ve FDA tarafından belirlenen eşik limitine uygundur.

Tablo 1. 5. Melamin tayini için floresans yöntemlerinin karşılaştırılması.

Yöntemler	$\lambda_{uy}/\lambda_{em}$ (nm)	pH	Çalışma Aralığı (mol L ⁻¹)	LOD (mol L ⁻¹)	Analiz süresi (dk)	Referans
Triton X-114 Fluoresans	235/302	3,0	$7,93 \times 10^{-6} - 4,76 \times 10^{-5}$	$6,34 \times 10^{-6}$	20	43
CPN'ler9 ve Au NP'ler arasındaki FRET	365/522	7,0	$9,99 \times 10^{-8} - 1,49 \times 10^{-6}$	$6,82 \times 10^{-9}$	10	44
Fluoresans	355/382	7,4	$5,00 \times 10^{-8} - 5,00 \times 10^{-7}$	$8,00 \times 10^{-9}$	5	45
Fluoresans	510/541	6,5	$1,58 \times 10^{-9} - 1,27 \times 10^{-5}$	$4,76 \times 10^{-9}$	20	46
Fluoresans	440/576	8,0	$5,00 \times 10^{-8} - 4,00 \times 10^{-6}$	$1,00 \times 10^{-8}$	15	47
Fluoresans	450/553	8,0	$7,93 \times 10^{-8} - 7,93 \times 10^{-7}$	$3,96 \times 10^{-8}$	40	48
Fluoresans	520/759	7,4	$1,00 \times 10^{-10} - 1,00 \times 10^{-9}$	$1,00 \times 10^{-14}$	65	49
Fluoresans	350/670	8,0	$1,00 \times 10^{-7} - 6,00 \times 10^{-6}$	$9,50 \times 10^{-9}$	5	50
Fluoresans	350/438	8,0	$4,99 \times 10^{-8} - 4,99 \times 10^{-7}$	$3,65 \times 10^{-8}$	5	51
Fluoresans	380/561	6,5	$7,5 \times 10^{-9} - 3,5 \times 10^{-7}$	$8,90 \times 10^{-10}$	30	52
Fluoresans nanosensör	320/520	6,0	$5,00 \times 10^{-9} - 500,00 \times 10^{-9}$	$4,20 \times 10^{-10}$	20	53
Oransal fluoresans	350 / 445-595	7,0	$0,27 \times 10^{-6} - 110,00 \times 10^{-6}$	$90,00 \times 10^{-9}$	3	54
Fluoresans	400/550	7,0	$1,00 \times 10^{-8} - 4,00 \times 10^{-6}$	$3,00 \times 10^{-9}$	30	55
Fluoresans	365 / 525-625	7,4	$2,00 \times 10^{-6} - 2,00 \times 10^{-5}$	$6,80 \times 10^{-7}$	240	56
Oransal fluoresans	980 / 542-654	6,8	$1,58 \times 10^{-7} - 1,58 \times 10^{-6}$	$8,80 \times 10^{-9}$	15	57
Fluoresans kuantum sensörü	360/532	7,0	$0,01 \times 10^{-9} - 60,00 \times 10^{-6}$	$0,13 \times 10^{-10}$	25-30	58
Fluoresans	980/550	7,0	$3,17 \times 10^{-8} - 4,99 \times 10^{-7}$	$1,82 \times 10^{-9}$	12	59

Tablo 1.5. Devam.

Yöntemler	$\lambda_{uy}/\lambda_{em}$ (nm)	pH	Çalışma Aralığı (mol L⁻¹)	LOD (mol L⁻¹)	Analiz süresi (dk)	Referans
Fluoresans	252/370	3,0	$8,00 \times 10^{-10} - 8,00 \times 10^{-8}$	$6,10 \times 10^{-10}$	40	60
Fluoresans	290/545	7,2	$7,90 \times 10^{-6} - 79,3 \times 10^{-6}$	$1,00 \times 10^{-10}$	10	61
Fluoresans	388/425	6,0	$3,96 \times 10^{-9} - 7,73 \times 10^{-8}$	$2,32 \times 10^{-10}$	1'den az	Bu çalışma

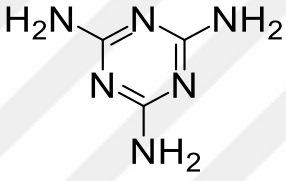
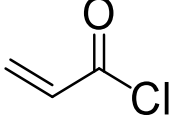
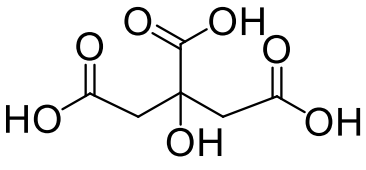
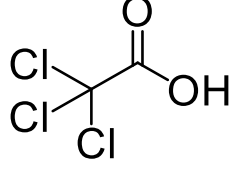
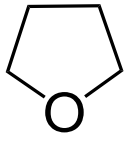
2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

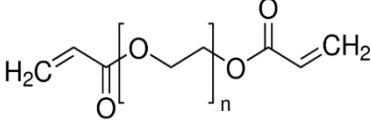
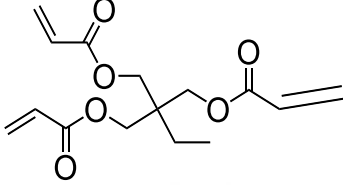
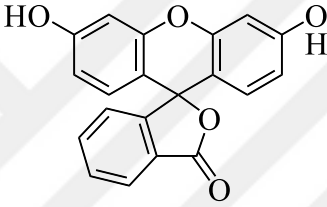
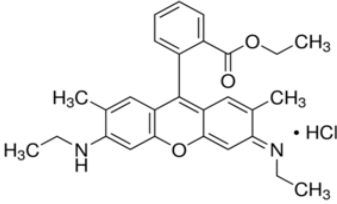
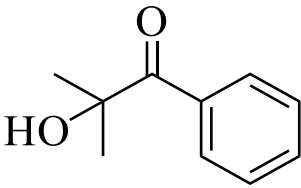
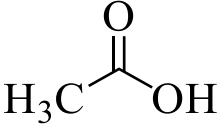
Bu tez çalışmasının ilk aşamasını akrilatlanmış sitrik asit bileşiğinin sentezlenmesi oluşturmaktadır. Sentezlenen bileşiğin FT-IR ve H-NMR yöntemleriyle alınan spektrumlar ile karakterizasyonları yapılmıştır.

Tez bileşiğinin sentezi ve karakterizasyonu sırasında kullanılan kimyasal Tablo 2.1’de ve cihazlar Tablo 2.2’ de verilmiştir.

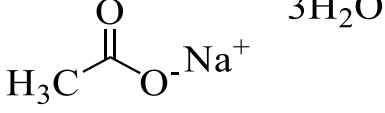
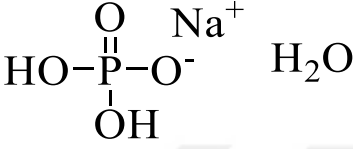
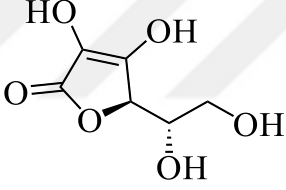
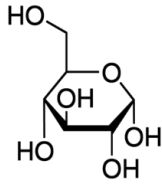
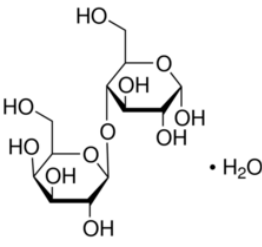
Tablo 2. 1. Çalışma sırasında kullanılan kimyasal maddeler.

Bileşiğin Adı	Molekül Şekli	Üretici Firma	CAS-No
Melamin		Merck	108-78-1
Akriloil Klorür (AC)		Sigma- Aldrich	814-68-6
Sitrik Asit		Sigma- Aldrich	77-92-9
Trikloroasetik Asit (TCAA)		Sigma- Aldrich	76-03-9
Tetra Hidro Furan (THF)		Sigma- Aldrich	109-99-9

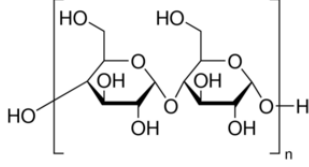
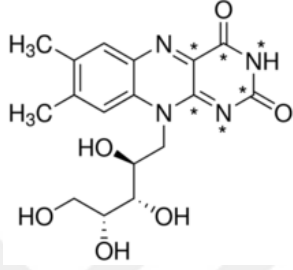
Tablo 2.1. Devam.

Bileşğin Adı	Molekül Şekli	Üretici Firma	CAS-No
Poli (Etilenglikol) Diakrilat (PEGDA)		Sigma- Aldrich	26570-48-9
Trimetilolpropan Triakrilat (TMTPA)		Sigma- Aldrich	15625-89-5
Fluoresein		Sigma- Aldrich	27072-45-3
Rodamin-6G		Sigma- Aldrich	989-38-8
2-Hydroxy-2-methylpropiophenone (Darocure1173)		Sigma- Aldrich	7473-98-5
Asetik Asit (CH ₃ COOH)		Sigma- Aldrich	64-19-7

Tablo 2.1. Devam.

Bileşimin Adı	Molekül Şekli	Üretici Firma	CAS-No
Sodyum Asetat Trihidrat (NaCH ₃ COO.3H ₂ O)		Merck	6131-90-4
Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat (NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O)		Merck	10049-21-5
Hidrojen Klorür	H—Cl	Merck	7647-01-0
Potasyum Klorür	K—Cl	Supelco	7447-40-7
Askorbik Asit (C ₆ H ₈ O ₆ , Vitamin-C)		Sigma- Aldrich	50-81-7
Glukoz (C ₆ H ₁₂ O ₆)		Sigma- Aldrich	50-99-7
Laktoz (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)		Supelco	5089-81-1

Tablo 2.1. Devam.

Bileşğin Adı	Molekül Şekli	Üretici Firma	CAS-No
Nişasta (C ₆ H ₁₀ O ₅)		Sigma- Aldrich	9005-84-9
Vitamin B2 (C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆)		Merck	83-88-5

Tez çalışması sırasında çalışma ortamının pH' ının sabit tutulması için kullanılacak olan tampon çözeltilerin hazırlanması için CH₃COOH, NaCH₃COO.3H₂O, NaH₂PO₄.H₂O, Na₂HPO₄, HCl ve KCl kullanılmıştır.

Melamin tayinine yabancı iyon ve moleküllerin etkisinin incelenmesi çalışmasında ise, C₆H₈O₆, C₆H₈O₇, C₆H₁₂O₆, C₁₂H₂₂O₁₁, C₆H₁₀O₅, C₄H₄O₆²⁻, C₆H₅O₇³⁻, C₁₇H₂₀N₄O₆ molekülleri ve SO₄²⁻, Co²⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, Fe²⁺, Cl⁻, Mg²⁺, NH₄⁺, Zn²⁺ iyonlarının 1000 ppm 'lik standart çözeltileri kullanılmıştır.

2.2. Kullanılan Cihaz ve Aletler

Tablo 2. 2. Çalışma sırasında kullanılan cihaz ve aletler.

Fluoresans Spektrofotometresi

<i>Kullanım Amacı:</i>	Melamin tayini için hazırlanan polimerik membran sensörlerin floresans özelliklerinin araştırılması
<i>Marka-Model:</i>	Varian Cary Eclipse
<i>Bulunduğu Kurum:</i>	Marmara Üniversitesi

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

<i>Kullanım Amacı:</i>	Melamin tayini için hazırlanan polimerik membran sensörlerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi.
<i>Marka-Model:</i>	Philips, XL30 ESEM-FEG/EDAX
<i>Bulunduğu Kurum:</i>	Boğaziçi Üniversitesi

FT-IR Spektrofotometresi

<i>Kullanım Amacı:</i>	Melamin tayini için hazırlanan polimerik membran sensörlerin karakterizasyon çalışmalarının yapılması.
<i>Marka-Model:</i>	Perkin Elmer (100 FT-IR)
<i>Bulunduğu Kurum:</i>	Marmara Üniversitesi

NMR Spektrometresi

<i>Kullanım Amacı:</i>	Melamin tayini için hazırlanan polimerik membran sensörlerin karakterizasyonu.
<i>Marka-Model:</i>	Varian Mercury-VX 400 MHz BB
<i>Bulunduğu Kurum:</i>	Boğaziçi Üniversitesi

Tablo 2. 2. Devam.

pH metre	
<i>Kullanım Amacı:</i>	Tez çalışmasında kullanılan tampon çözeltilerin hazırlanması.
<i>Marka-Model:</i>	Thermo Scientific Orion Star A211
<i>Bulunduğu Kurum:</i>	Marmara Üniversitesi
Ultra saf su cihazı	
<i>Kullanım Amacı:</i>	Tez çalışması boyunca gerekli olan tüm saf su ihtiyacının (18,2 MΩ rezistivite) karşılanması.
<i>Marka-Model:</i>	MERCK MilliporeDirect-Q®- 3
<i>Bulunduğu Kurum:</i>	Marmara Üniversitesi
UV Lamba	
<i>Kullanım Amacı:</i>	Melamin tayininde kullanılacak olan polimerik membran sensörlerin hazırlanması aşamasında polimer karışımının sertleştirilerek polimerik membran sensör haline getirilmesi.
<i>Marka-Model:</i>	OSRAM marka (300 W, $\lambda_{\max}=365$ nm)
<i>Bulunduğu Kurum:</i>	Marmara Üniversitesi
Vakum Etüvü	
<i>Kullanım Amacı:</i>	Hazırlanan polimerik membran sensörlerin kurutulması.
<i>Marka-Model:</i>	Elektro-mag (M 6040 P)
<i>Bulunduğu Kurum:</i>	Marmara Üniversitesi

Tablo 2. 2. Devam.

Hassas Terazî

<i>Kullanım Amacı:</i>	Çalışmadaki tüm tartım işlemlerinin gerçekleştirilmesi.
<i>Marka-Model:</i>	Presica (XB 220A-hassasiyeti 0,0001 g)
<i>Bulunduğu Kurum:</i>	Marmara Üniversitesi

Magnetik Karıştırıcı

<i>Kullanım Amacı:</i>	Çalışma sırasında kullanılan çözeltilerin hazırlanması aşamasında gerekli olan tüm karıştırma işlemlerinin yapılması.
<i>Marka-Model:</i>	Heidolph Magnetic Stirrer (MR Hei-Tec)
<i>Bulunduğu Kurum:</i>	Marmara Üniversitesi

2.3. Deneysel Yöntem

2.3.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

2.3.1.1. Tampon çözeltilerinin hazırlanması

Hazırlanan polimerik membran sensörlerin melamin tayini sırasında ortamın pH değişiminden etkilenip etkilenmediğini incelemek amacıyla pH 1,0- 8,0 aralığında değişen pH değerlerine sahip tampon çözelti ve çözelti sistemleri kullanılmıştır.

pH 1,0 ve 2,0 için;	Potasyum klorür (KCl) / Hidrojen klorür (HCl)
pH 3,0 - 6,0 için;	Asetik asit / Sodyum asetat trihidrat (CH ₃ COOH) / (NaCH ₃ COO.3H ₂ O)
pH 7,0 ve 8,0 için;	Sodyum dihidrojen fosfat / Disodyum hidrojen fosfat (NaH ₂ PO ₄) / Na ₂ HPO ₄)

Yukarıda belirtilen tampon sistemleri kullanılarak istenilen pH değerini elde etmek için hesaplanan uygun hacimler alınıp ultra saf su ile son hacme tamamlanarak Britton Robinson tampon sistemine uygun şekilde tampon çözeltiler hazırlanmıştır.

2.3.1.2. Kullanılan stok ve çalışma standartlarının hazırlanması

Melamin ana stok standardı M_1 'in hazırlanışı ($7,93 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1} / 100 \text{ ppm}$)

100 ppm'lik melamin ana stok standardı 0,010 g melamin tartılıp bir beher içerisine alınarak 50 mL ultra saf su ile ultrasonik banyoda çözünmesi sağlandıktan sonra 100 mL'lik bir balonjoje içerisinde son hacme tamamlanarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti 6 ay boyunca buzdolabında saklanmıştır.

Melamin ara stok standardı M_2 'nin hazırlanışı ($7,93 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} / 1 \text{ ppm}$)

1 ppm'lik melamin ara stok standardı M_2 , M_1 ana stok standardının 250 μL 'si bir balonjoje içerisine alınarak son hacim 25 mL olacak şekilde ultra saf su ile son hacme tamamlanarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti 6 ay boyunca buzdolabında saklanmıştır.

Melamin kalibrasyon standartlarının hazırlanması

Melamin kalibrasyon standartları;

- $3,96 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ (0,5 ppb)
- $7,92 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ (1,0 ppb)
- $2,38 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (3,0 ppb)
- $5,54 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (5,0 ppb)
- $7,92 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (10,0 ppb)

derişim değerlerinde olacak şekilde her analiz için taze olarak hazırlanmıştır.

Kalibrasyon standartları 10 mL'lik balonjojelere tabloda belirtilen miktarda alınan M₂ çözeltiler ile (pH 1,0- 8,0) son hacim 10 mL olacak şekilde tamamlanarak hazırlanmıştır.

Her bir konsantrasyon değeri için 8 farklı pH değerinde (pH 1,0- 8,0) olmak üzere toplam 40 adet kalibrasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Ayrıca bu prosedür hazırlanan her bir polimerik membran sensör formülasyonu için tekrarlanmıştır (F0; F1; F2; F3; F4; C0; C1; R0; R1).

Tablo 2. 3. Kalibrasyon standartları hazırlama prosedürü.

Kalibrasyon Çöz. /Numune Tanımı	M₂ ara standardından alınan hacim (µL)	Tamamlanan çözelti	Son hacim (mL)
0,5 ppb	5	Tampon Çözelti (pH 1,0- 8,0)	10
1,0 ppb	10	Tampon Çözelti (pH 1,0- 8,0)	10
3,0 ppb	30	Tampon Çözelti (pH 1,0- 8,0)	10
7,0 ppb	70	Tampon Çözelti (pH 1,0- 8,0)	10
10,0 ppb	100	Tampon Çözelti (pH 1,0- 8,0)	10

2.3.1.3. Seçicilik- yabancı iyon ve moleküllerin etkisinin araştırılması için kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Herhangi bir analit tayinine yönelik geliştirilmiş bir sensör için, hedeflenen analite karşı yüksek hassasiyetin yanı sıra yüksek seçicilik göstermek de bir o kadar önemli bir kriterdir. Seçici bir sensörün analiz ortamdaki diğer türlerin varlığından etkilenmeden, yalnızca tespit edilecek türü algılaması beklenir.

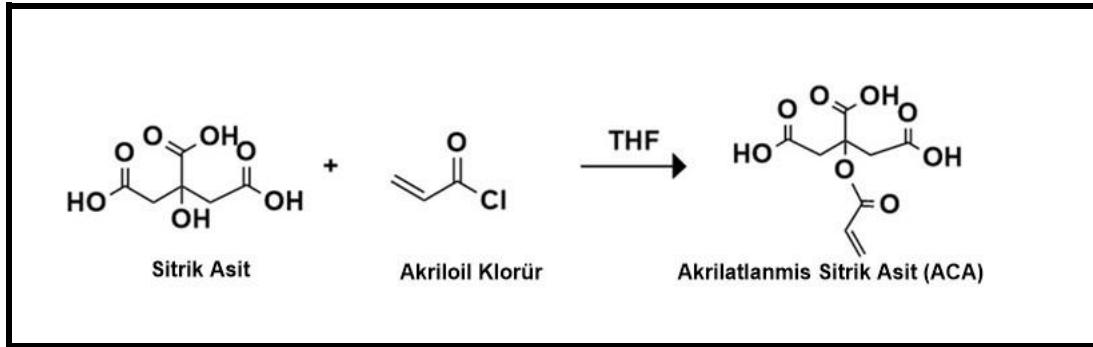
Çalışmada melamine girişim yapabilecek olan yabancı iyon ve moleküllerin geliştirilen sensörün seçiciliği üzerindeki girişim etkisini incelemek amacıyla sistematik bir çalışma yapılmıştır. Öncelikle melamin ile etkileşime girebilecek iyon ve moleküller literatür taraması yapılarak belirlenmiştir. Belirlenmiş olan iyon ve moleküller Tablo 2.1'de özetlenmiştir. Daha sonra melamin:yabancı iyon oranı 1:1'den 1:5000'e olacak şekilde bir seri çözeltiler hazırlanmış ve sensör için karar verilen optimum çalışma koşulları altında spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilerek yabancı iyon ve molekülün girişim yapabileceği en yüksek konsantrasyon değeri tespit edilmiştir.

Tablo 2. 4. Melamin sensöre girişim etkisi yapabilecek iyon ve moleküller.

Girişim yapabilecek iyonlar	Girişim yapabilecek moleküller
SO_4^{2-}	Sitrik asit
Co^{2+}	Tartarat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{2-}$)
Ba^{2+}	Askorbik asit
Ca^{2+}	Sitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$)
Fe^{2+}	Laktoz
Cl^-	Vitamin B2 ($\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$)
Mg^{2+}	Nişasta
NH_4^+	Glukoz
Zn^{2+}	

2.3.2. Melamin tayini için hazırlanan polimerik membran sensörlerin hazırlanması

2.3.2.1. Akrilatlanmış sitrik asit (ACA) fonksiyonel monomerinin sentezi



Şekil 2. 1. ACA fonksiyonel monomerinin sentezi.

Melamin tayininde kullanılacak polimerik membran sensörün hazırlanmasında fonksiyonel monomer olarak kullanılacak olan akrilatlanmış sitrik asit monomerinin (ACA) sentezi literatürdeki akrilat reaksiyonu modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir [62]. Bu amaçla, 21,014 g sitrik asit (SA) tartılıp üç boyunlu reaksiyon balonu içine koyulmuş ve üzerine 40 mL THF ilave edilip oda sıcaklığında karıştırılarak homojenize edilmiştir. Daha sonra reaksiyon balonunda bulunan çözelti üzerine 10,5 g akriloyl klorür (AC) damla damla ilave edilmiştir (~3 saat). Sitrik asidin akrilatlanmasını sağlamak için reaksiyon karışımı 24 saat boyunca N₂ gazı geçirilerek oda sıcaklığında karıştırma işlemi sürdürülmüştür. Daha sonra sıcaklık 50°C' e çıkarılarak reaksiyon karışımı 2 saat boyunca ısıtılarak karıştırmaya devam edilmiştir. Oluşan tuzu reaksiyon ortamından uzaklaştırmak için süre sonunda reaksiyon karışımı sıcakken adi süzgeç kağıdından süzölmüş ve 30 mL THF ile yıkanmıştır. Reaksiyon ortamında kalan fazla THF döner buharlaştırıcıda (rotary) uçurularak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen maddenin karakterizasyonu FT-IR ve ¹H-NMR spektrumları kaydedilerek incelenmiştir.

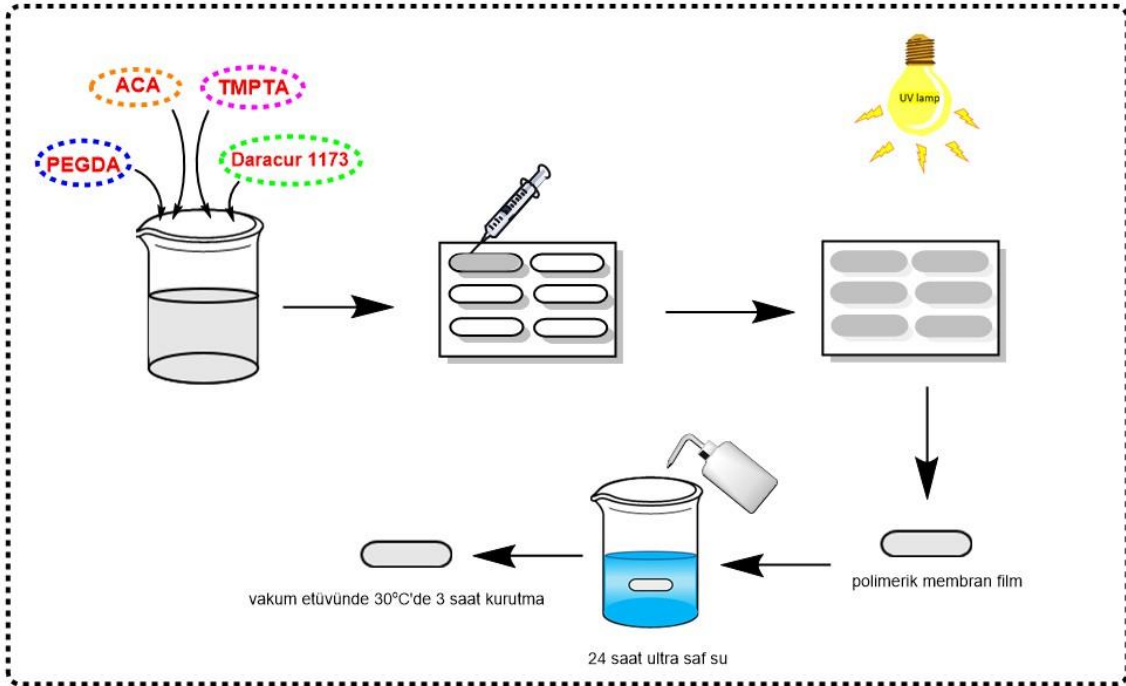
2.3.2.2. Polimerik floresans sensör formülasyonlarının hazırlanması

Melamin tayininde kullanılacak polimerik membran sensör fotopolimerizasyon tekniği kullanılarak hazırlanmıştır. Sensör formülasyonunda ana polimer olarak PEGDA, fonksiyonel monomer olarak ACA, çapraz bağlayıcı olarak TMPTA ve foto başlatıcı olarak Daracur 1173 kullanılmıştır. Hazırlanan formülasyonlardan bazılarında

melamin ile etkileşimde yüksek floresans şiddeti elde etmek amacıyla Fluoresein ve Rodamin 6G floresans boyaları da kullanılmıştır. Melamin tayininde kullanılabilecek en uygun membran formülasyonuna karar verebilmek için reaktif monomer, çapraz bağlı monomerler ve fotobaşlatıcı oranları ile UV lamba altında kürlenme süresi gibi parametreler değiştirilerek farklı formülasyonlarda sensörler elde edilmiştir. Sensör formülasyonları hazırlanması aşağıda anlatıldığı gibi yapılmıştır:

Karar verilen oranlarda PEGDA, TMPTA, ACA, Fluoresein ve Rodamin 6G ışık ile etkileşimi engellemek için dışı alüminyum folyo ile sarılmış olan bir beher içine tartılmış, maddelerin çözünmesini sağlamak ve homojen hale getirmek için karışım cam bir baget ile karıştırılmıştır. Daha sonra sistemde kalan çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak için 15 dakika boyunca sistemden N₂ gazı geçirilmiştir. Hazırlanan bu karışıma karanlık ortamda toplam formülasyonun %3,0'ü oranında fotobaşlatıcı - Daracur 1173- ilave edilmiş ve sensör karışımları özel olarak tasarlanmış olan Teflon® kalıba (GxUxD: 12mm x 40mm x 2mm) bir pastör pipet yardımıyla aktarılmıştır. Kalıba aktarılan karışım, polimerizasyon için yüksek basınçlı UV lambası (OSRAM 300 W, $\lambda_{\max}$ =365 nm, 10 mW.cm²) altında farklı kürlenme sürelerince UV ışınları ile sertleştirilmiş çapraz bağlı membranlar elde etmek üzere kürlenmeye bırakılmışlardır. Elde edilen polimerik membran filmler Teflon kalıptan çıkarılarak filmlerin üzerinde reaksiyona girmeden kalan monomerlerin ve fotobaşlatıcının uzaklaştırılması için 24 saat boyunca deiyonize suda bekletildikten sonra vakum etüvünde düzenli aralıklarda tartılarak sabit tartıma gelinceye kadar 30°C'de kurutulmuşlardır.

Melamin sensörünün hazırlama prosedürü Şekil 2.2' de ve hazırlanan sensör formülasyonları Tablo 2.5' te verilmiştir.



Şekil 2. 2. Melamin sensörünün hazırlık prosedürü.

Tablo 2. 5. Hazırlanan polimerik membran sensörlerin hazırlanma reçetesi ve adlandırılması.

Adlandırma	PEGDA(g)	TMTPA(g)	ACA(g)	Fluoresein(g)	Rodamin 6G (g)	PI(g)
F0	1,4	0,6	-	-	-	0,06
F1	1,4	0,6	0,1	-	-	0,06
F2	1,4	0,6	0,2	-	-	0,06
F3	1,4	0,6	0,3	-	-	0,06
F4	1,4	0,6	0,4	-	-	0,06
C0	1,4	0,6	-	0,01	-	0,06
C1	1,4	0,6	0,1	0,01	-	0,06
R0	1,4	0,6	-	-	0,01	0,06
R1	1,4	0,6	0,1	-	0,01	0,06

Hazırlanmış olan farklı formülasyonlardaki membranların asit dayanımı (farklı pH değerlerinde), su dayanımı (aşırı hidrofilik olup suda şişme veya sulu çözelti ile geç etkileşme durumlarına karşı), sulu çözelti ile geç etkileşim, kıvrılma, tamamen kurumama, homojen, şeffaf ve herhangi bir kabarcık içermeme gibi özellikleri incelenmiş ve uygun görülmeyen membran formülasyonları elenerek çalışmanın diğer aşamalarında kullanılmaya uygun olan formülasyonlara karar verilmiştir. Tablo 2.6’da görüldüğü gibidir.

Tablo 2. 6. Hazırlanan polimerik membran sensör formülasyonlarının değerlendirilmesi.

Formül Kodu	Su dayanımı	Asit dayanımı	Şeffaflık	Homojenlik	Melamine seçicilik
F0	✓	✓	✓	✓	✓
F1	✓	✓	✓	✓	✓
F2	✓	✓	✓	✓	✓
F3	✓	✓	✓	✓	✓
F4	✓	✓	✓	✓	✓
C0	✓	✓	✓	✓	X
C1	✓	✓	✓	✓	X
R0	✓	✓	✓	✓	X
R1	✓	✓	✓	✓	X

2.3.3. Membran sensörünün morfolojik ve yapısal karakterizasyonu

2.3.3.1. Akrilatlanmış sitrik asit (ACA) monomerinin FT-IR spektrumu

Melamin tayini için hazırlanacak olan polimerik membran sensörün yapısında fonksiyonel monomer olarak kullanılacak olan akrilatlanmış sitrik asit (ACA) monomerine ait FT-IR spektrumu, Perkin Elmer marka Spektrum 100 ATR-FTIR

spektrofotometresiyle 4000–400 cm^{-1} dalga boyu aralığında spektrum taraması yapılarak kaydedilmiş olup ilgili spektrum Şekil 3.1’ de gösterildiği gibidir.

2.3.3.2. Akrilatlanmış sitrik asit (ACA) monomerinin ^1H NMR spektrumu

Fonksiyonel monomer olan ACA, The Varian Mercury-VX 400 MHz BB marka ^1H NMR spektrometresi ile karakterize edilmiş ve ilgili sonuçlar Şekil 3.2’ de gösterildiği gibidir.

2.3.4. Polimerik membran sensörün karakterizasyonu

2.3.4.1. Polimerik membran sensörün FT-IR spektrumu

Melamin tayininde kullanılmak üzere tez çalışması kapsamında hazırlanmış olan polimerik membran sensöre ait FT-IR spetrumu ATR-FTIR spektrofotometresiyle 400-4000 cm^{-1} aralığında spektrum taraması yapılarak elde edilmiş olup ilgili spektrum Şekil 3.3’te verildiği gibidir.

2.3.4.2. Polimerik membran sensörün yüzey morfolojisi

Polimerik membran sensörün yüzey morfolojisinin belirlenmesi yüzeye ait fiziksel özelliklerin ve sensörün çevresi ile olan etkileşiminin tespiti için son derece önemlidir. Hazırlanan membran sensörün yüzey morfolojisi Philips XL30 ESEM-FEG/EDAX marka taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak aydınlatılmıştır. Bunun için öncelikle polimerik membran sensör, sıvı azot içine atılarak yapısındaki bağların hareketliliği sabitlenmiş ve daha sonra alüminyum tabaka üzerine yapıştırılan karbon bant üzerine yerleştirilerek farklı büyütme faktörleri ile polimerik membran sensöre ait SEM görüntüleri kaydedilmiştir. Membran sensöre ait farklı büyütme faktörlerinde elde edilen SEM görüntüleri Şekil 3.4’te verildiği gibidir.

2.3.5. Polimerik membran sensörün melamin tayini için kullanılabilirliğinin araştırılması

2.3.5.1. Optimum membran formülasyonun belirlenmesi ve spektral karakterizasyon çalışması

Polimerik membran sensörlerin melamine karşı vereceği cevabın belirlenmesi bir uyarma dalga boyuna karşılık gelen emisyon dalga boyunda floresans şiddetindeki artış veya azalış miktarının belirlenmesi yoluyla olacağından optimum çalışma koşullarının tespiti amacıyla floresans ölçümleri değişik slit aralıkları ve farklı foto çoğaltıcı tüp (PMT) voltaj değerlerinde çalışılarak alınmıştır. Spektrum tarama çalışmaları sonucunda hazırlanan polimerik membran sensörlerin 1 ppb melamin varlığında yapılan spektrum taraması sonuçları Tablo 3.1’de verilmiş olup her bir sensör formülasyonu ile alınan floresans ölçümleri sonucunda melamin tayini için kullanılmasına karar verilen optimum sensör formülasyonunu gösteren grafik Şekil 3.5’te verildiği gibidir.

2.3.5.2. Floresans şiddeti üzerine pH etkisinin araştırılması

Melamin tayini için hazırlanan sensör için optimum çalışma pH değerinin belirlenmesi amacıyla pH 1,0’dan pH 8,0’e kadar Britton Robinson (BR) yöntemine göre tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Daha sonra $7,93 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ (1ppb) melamin içeren çözeltilerin belirlenen optimum çalışma parametrelerinde floresans şiddetleri ölçülmüş ve pH değerlerine göre grafiğe geçirilmiştir. Geliştirilen sensörün melamin tayinindeki optimum pH değerini gösteren grafik Şekil 3. 7’ de verildiği gibidir.

2.3.5.3. Floresans şiddeti üzerine süre etkisinin araştırılması

Melamin tayini için hazırlanan sensör için süre etkisini belirlemek amacıyla $7,93 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ (1ppb) melamin varlığında floresans şiddetindeki değişim zamana bağlı olarak ölçülmüştür. Bu amaçla, 200 saniye boyunca 10 saniye zaman aralıklarıyla elde edilen floresans şiddeti değerleri kaydedilmiş ve elde edilen veriler kullanılarak floresans şiddeti- süre grafiği çizilmiş ve optimum çalışma süresi belirlenmiştir. İlgili grafik Şekil 3. 8’ de gösterildiği gibidir.

2.3.5.4. Kalibrasyon aralığı

Çalışma için karar verilen optimum çalışma pH değerine sahip, tampon çözelti içerisinde hazırlanmış olan ana stok melamin çözeltisi içerisinde uygun miktarlar alınarak gerekli seyreltmeler yapılarak $3,96 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ (0,5 ppb), $7,93 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ (1 ppb), $2,38 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ (3 ppb), $3,96 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ (5 ppb), $5,55 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ (7 ppb) ve $7,93 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ (10 ppb), konsantrasyon değerine sahip 6 standart melamin çözeltisi hazırlanmıştır. Örneklerin floresans şiddetleri belirlenmiş olan çalışma koşullarına kaydedilmiştir. Her bir ölçüm 3 defa tekrarlanmıştır. Bu çözeltilerin kaydedilen floresans şiddeti değerleri kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Bu grafik Şekil 3.9’da verildiği gibidir.

2.3.5.5. Sensörün rejenerasyonu ve yeniden kullanılabilirliği

Sensörün rejenerasyonu amacıyla kullanılmak üzere farklı çözücü ve çözücü sistemleri denenmiştir. Aynı sensörün rejenerasyon sonrası tekrar kullanılabilirliği ile ilgili çalışma yapılmıştır. Rejenerasyon sonrası tekrar kullanımlarda elde edilen floresans şiddetinde $\pm\%5,0$ sapma göstermesi ön kabulü dikkate alınarak sonuçlar değerlendirilmiş olup ilgili sonuçlar bulgular ve tartışma kısmında verilmiştir.

2.3.5.6. Sensörün analitik uygulamaları: Süt tozunda melamin analizi

Sulu ortamdaki melamin tayininde kullanılmak üzere geliştirilen polimerik esaslı optik sensörün gerçek örnek uygulaması için içeriğindeki melamin miktarı HPLC ile belirlenmiş olan süt tozu numunesi kullanılmıştır. Süt tozu numunesinin geliştirilen sensör için karar verilen optimum çalışma koşulları altında floresans şiddeti kaydedilmiş ve elde edilen sonuçlar Student-t testi ile değerlendirilmiştir. Tüm ölçümler 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiş olup ilgili sonuçlar Tablo 3.3’ te verildiği gibidir.

2.4. Metot Validasyon Kriterleri

2.4.1. Seçicilik- floresans şiddeti üzerine yabancı iyon ve moleküllerin etkisinin araştırılması

Bir sensörün seçiciliği, ortamdaki başka bileşenlerin varlığından etkilenmeden, tespit edilecek analiti doğru bir şekilde algılaması yeteneğidir. Başka bir deyişle, bir sensörün seçiciliği yalnızca tek bir analit için doğru yanıt üretebilme yeteneğidir. Geliştirilen sensörün seçiciliğinin test edilmesi için öncelikle girişim yapabilecek olan iyon (SO_4^{2-} , NH_4^+ , Co^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Cl^-) ve moleküller (glukoz, laktoz, nişasta, sitrik asit, tartarat, askorbik asit, sitrat ve Vitamin-B2) belirlenmiştir. Bu iyon ve molekül türlerinin aynı anda bulunması durumunda sensörün melamine seçiciliğini değerlendirmek için ise girişim yapacağı düşünülen iyon türlerinin tümünü içeren Mix 1 ve molekül türlerinin tümünü içeren Mix 2 olarak kodlanan karışımlar hazırlanmıştır.

Sensör için seçicilik çalışması analit/girişimci oranı yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sensörün tayin sınırları içerisinde olan 1 ppb ($\mu\text{g L}^{-1}$) melamin örneğinin sinyal değeri kaydedilmiş ve aynı konsantrasyon değerinde melamin içeren çözelti üzerine girişim yapabilecek olan iyon ve moleküllerin farklı oranlarda (melamin:yabancı iyon/molekül oranı 1:1'den 1:5000'e kadar) eklenmesi ile elde edilen çözeltilerin floresans şiddetlerinin karşılaştırılması ile gerçekleştirilmiştir.

Her bir tür için girişim yapmadığı maksimum konsantrasyon değerleri melamin floresans sinyal değerini $\pm\%5,0$ geçmemesi ön kabulü dikkate alınarak belirlenmiştir. . Geliştirilen melamin sensörü için seçicilik çalışmasının sonuçları Bölüm 3.3.1'de verilmiştir.

2.4.2. Doğrusallık

Geliştirilen sensörün doğrusal aralığını belirlemek için 0,5-10,00 ppb ($\mu\text{g L}^{-1}$) konsantrasyon aralığında 6 farklı konsantrasyon değerinde melamin içeren numune ile çalışılmıştır. Her bir numune için optimum çalışma şartlarında floresans spektrumları alınmıştır. Daha sonra konsantrasyona karşı floresans şiddeti grafiği çizilerek sensör için doğrusal çalışma aralığı belirlenmiştir. İlgili sonuçlar Bölüm 3.2.3' de verilmiştir.

2.4.3. Doğruluk

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu geçerli kılmak için analiz edilen numune hem geliştirilen yöntemle hem de referans bir yöntem ile analiz edilmiştir. Her iki metot ile elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak (Student-t testi ile) karşılaştırılmıştır. İlgili sonuçlar Bölüm 3.3.4’de verilmiştir.

2.4.4. Tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)

Geliştirilen sensörün melamin tayini için tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ), elde edilen kalibrasyon grafiğinin eğimi ve y eksenini kesişiminin standart sapma değerinin kullanıldığı aşağıda verilen eşitlikler yardımıyla hesaplanmış olup elde edilen sonuçlar Bölüm 3.3.2 ’de verilmiştir.

$$LOD = \frac{3ss}{m} \quad (2.1)$$

$$LOQ = \frac{10ss}{m} \quad (2.2)$$

Burada;

m: Kalibrasyon doğrusunun eğimini,

ss: Kalibrasyon doğrusunun y eksenini kesişiminin standart sapmasını ifade etmektedir.

2.4.5. Stabilité- Kararlılık

Geliştirilen sensörün kısa ve uzun dönem stabilitesini belirlemek için iki ayrı çalışma yürütülmüştür. Kısa süreli stabilite çalışması aynı sensör kullanılarak belirli zaman aralıklarında (her 30 dakikada bir) $7,93 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ (1ppb) melamin içeren numunenin floresans şiddeti ölçülerek, uzun süreli stabilite çalışması 12 ay boyunca bir desikatörde karanlık bir odada bekletilerek saklanmış sensör ile her ay aynı konsantrasyonda melamin içeren numunenin floresans şiddeti ölçülerek incelenmiştir. Sensörün stabil olduğu sürenin değerlendirilmesi ölçülen floresans şiddetinde $\pm\%5,0$

değişimin gözleendiği süre olarak kabul edilmiş olup ilgili sonuçlar Bölüm 3.2.3’ da verilmiştir.

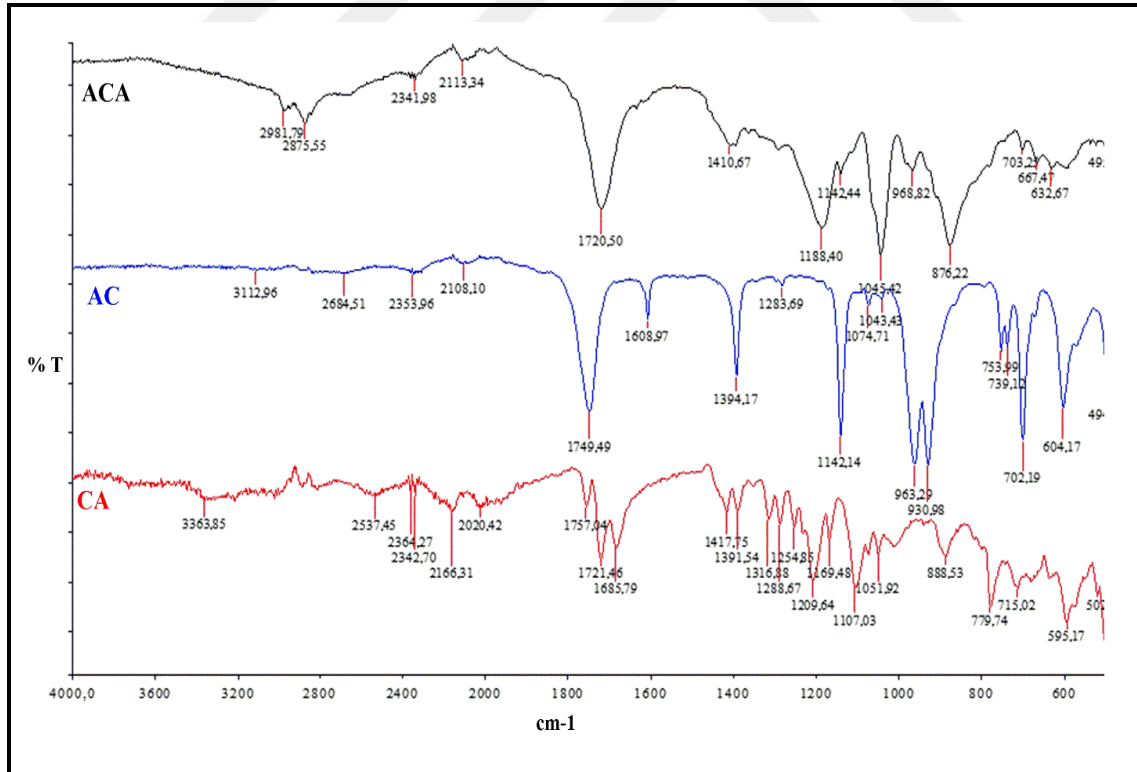


BÖLÜM 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Membran Sensörünün Morfolojik ve Yapısal Karakterizasyonu

3.1.1. Akrilatlanmış sitrik asit monomerinin (ACA) FT-IR spektrumu

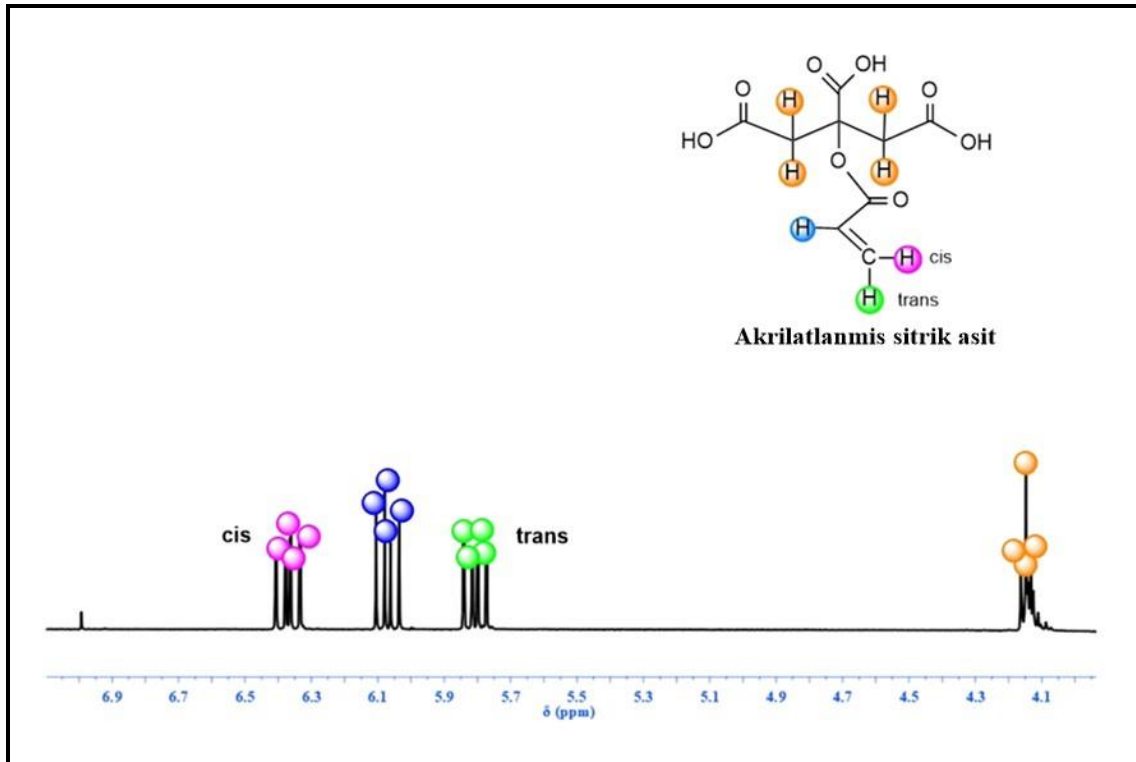
Sitrik asidin (CA) akrilolil klorür (AC) ile akrilatlanmasıyla elde edilen akrilatlanmış sitrik asit (ACA) monomerinin FTIR spektrumu Şekil 3.1’de verildiği gibidir. Spektrumda 2981-2113 cm^{-1} arasındaki zayıf pikler CH_2 gruplarındaki C-H simetrik ve asimetrik gerilmeyi göstermektedir. Yaklaşık 1720 cm^{-1} ve 1630 cm^{-1} ’de görülen pikler, sırasıyla akrilatlar için C=O gerilme bandını ve C=C– titreşim bandını temsil etmektedir [63]. Sitrik asit (CA) spektrumunda 3363 cm^{-1} ’de görülen -OH gerilme titreşimine ait pik, akrilatlanmış sitrik asit monomerine (ACA) ait spektrumda görülmemektedir. Bu da sitrik asidin (SA) başarılı bir şekilde akrilatlanmış olduğunu göstermektedir.



Şekil 3. 1. ACA monomeri, AC ve SA’ın FT-IR spektrumu.

3.1.2. Akrilatlanmış sitrik asit monomerinin (ACA) ^1H NMR spektrumu

ACA monomerinin ^1H NMR spektrumu Şekil 3.2’ de görüldüğü gibidir. Spektrumda sırasıyla cis, geminal ve trans protonlarına karşılık gelen üç merkezli dördüz görülmektedir. Spektrumda 6,3 - 6,4 ppm’ deki pikler cis protona, 6,02 - 6,12 ppm’ deki pikler geminal protona ve 5,77 – 5,85 ppm’ deki pikler trans protona karşılık gelmektedir [64]. 4,1 – 4,2 ppm civarında görülen pik ise $-\text{CH}_2$ protonlarına karşılık gelmektedir.

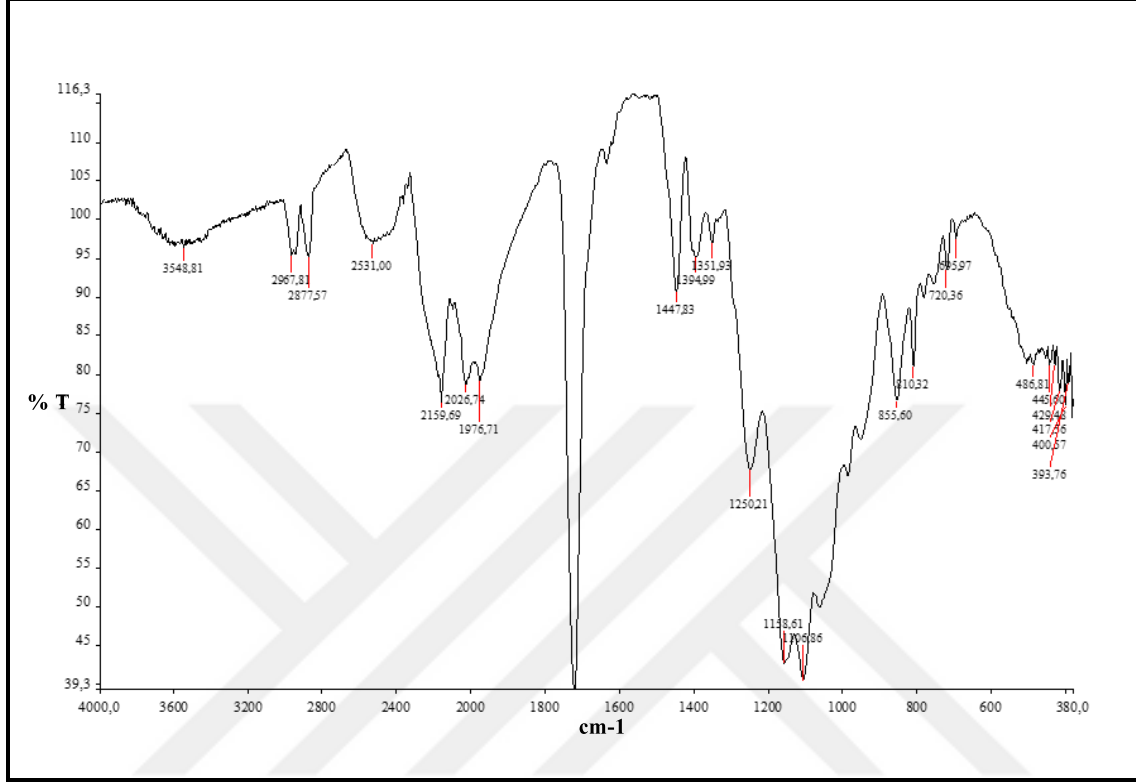


Şekil 3. 2. ACA monomerinin ^1H NMR spektrumu.

3.1.3. Polimerik membranın FT-IR spektrumu

Melamin seçici polimerik membranın 4000-400 cm^{-1} aralığına alınan FTIR spektrumu Şekil 3.3’te görülmektedir. Spektrumda 2967 cm^{-1} ve 2877 cm^{-1} ’ te görülen pikler ACA ve TMPTA’ da bulunan $-\text{CH}_2$ gruplarını ve 2159 cm^{-1} ve 1250 cm^{-1} ’ de görülen pikler $-\text{C}-\text{O}$ gruplarını göstermektedir. 1976 cm^{-1} ’ deki zayıf pik, ACA, TPMTA ve PEGDA’ nın yapısında bulunan çift bağları göstermektedir. 1721 cm^{-1} ’ deki pik; ACA, TPMTA ve PEGDA’ nın yapısındaki $\text{C}=\text{O}$ bağının gerilmesini gösterirken 1640 cm^{-1} ’ deki pik, ACA’ nın $\text{C}=\text{C}$ - titreşim bantlarını göstermektedir. TMPTA’ nın

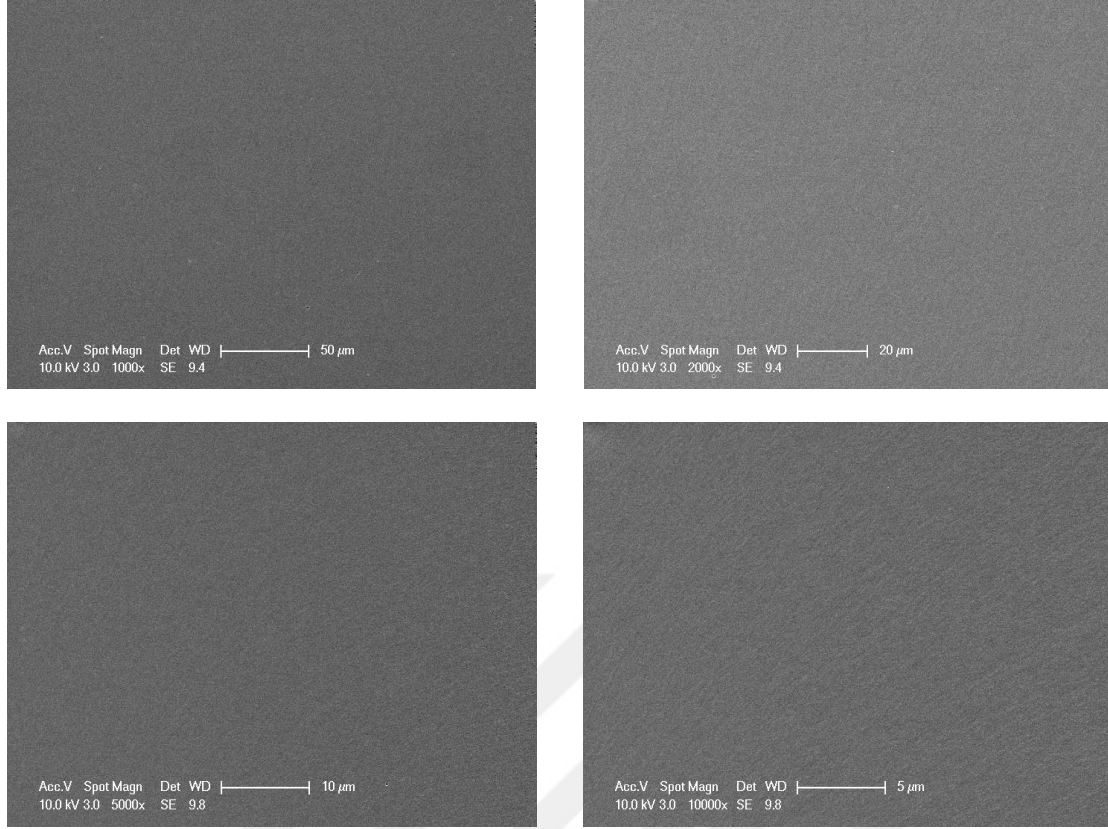
yapısında bulunan metil gruplarının C-H bağı 983 cm^{-1} 'de ve C=O bağı ise 765 cm^{-1} 'de görülmektedir.



Şekil 3. 3. Polimerik membrana ait FT-IR spektrumu.

3.1.4. Polimerik membran sensörünün SEM ölçümleri

Yüzey morfolojisi, polimerik bir membranın floresans sensör olarak kullanılması için önemli bir faktördür. Sensör homojen ve gözeneksiz bir yüzeye sahip olmalıdır. Hazırlanan polimerik membranın yüzey özellikleri, 1000x, 2000x, 5000x ve 10000x büyütme faktörlerinde kaydedilen SEM görüntüleri ile incelenmiş olup Şekil 3.4'de verildiği gibidir. Elde edilen sonuçlar membran sensörün homojen, çatlaksız bir yüzeyinin olduğunu göstermektedir.



Şekil 3. 4. Polimerik membrana ait SEM görüntüsü.

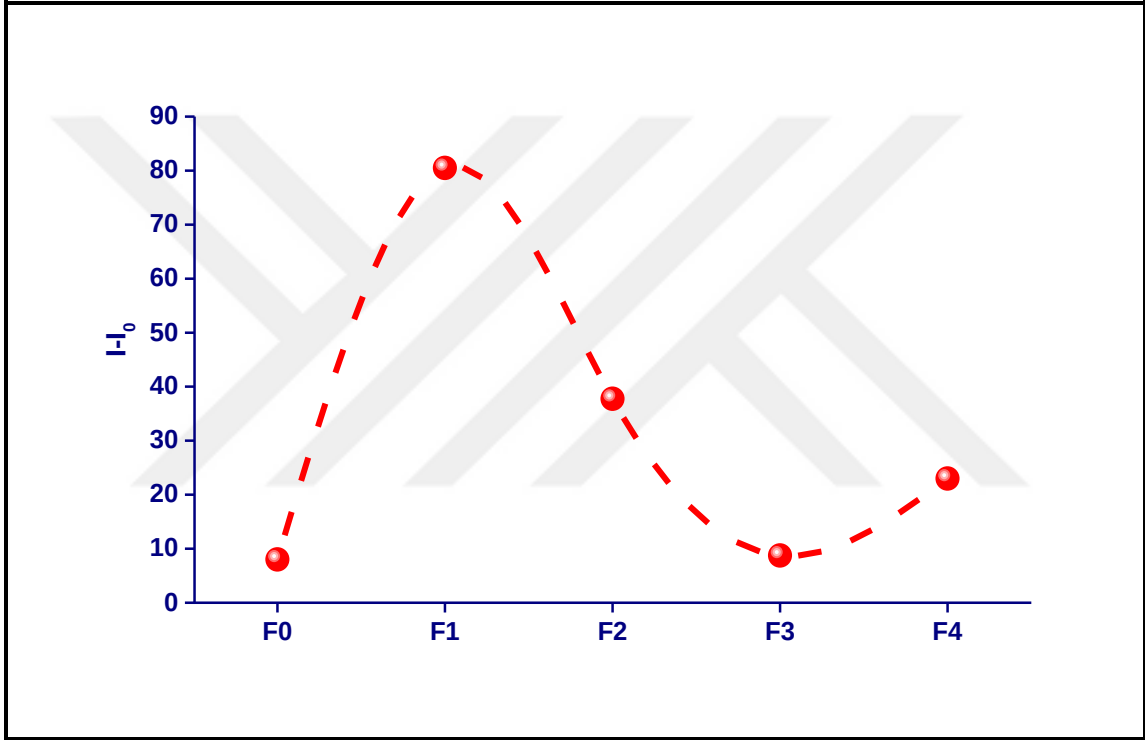
3.2. Polimerik Membranların Spektral Karakterizasyonu

Hazırlanan polimerik esaslı membran sensörlerin floresans şiddetindeki değişim, melamin varlığında ve yokluğunda dalga boyu taraması ile ölçülmüş ve her bir sensör formülasyonu için optimum cihaz çalışma parametreleri belirlenmiş ilgili sonuçlar Tablo 3.1.'de özetlendiği gibidir.

Tablo 3. 1. Sensörler için karar verilen optimum cihaz çalışma parametreleri ($7,93 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ (1 ppb) melamin varlığında).

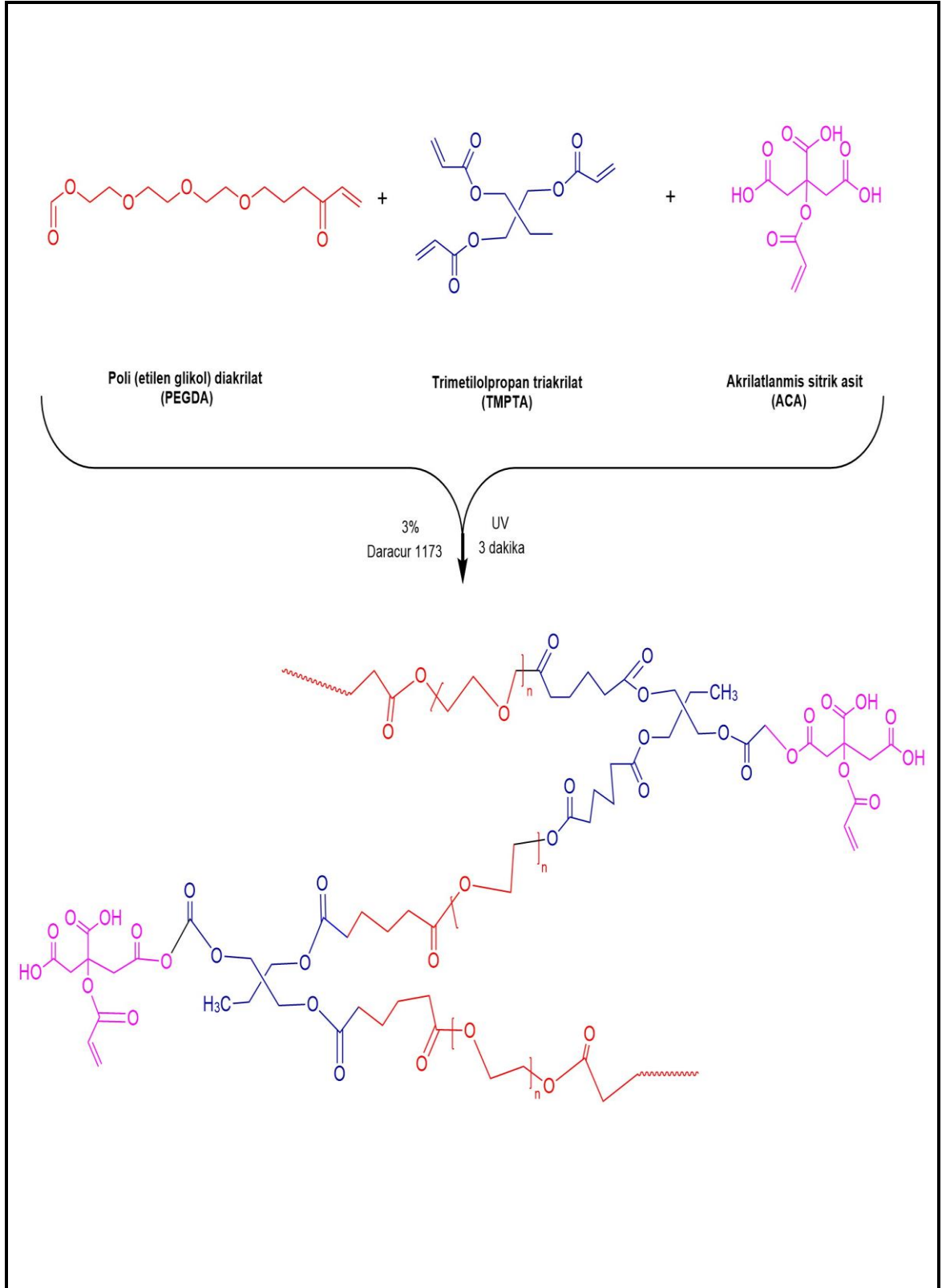
Slit aralıkları	: Uyarma: 5 nm Emisyon: 5 nm		
Foto çoğaltıcı tüp voltajı	: 700 V		
Uyarma ve emisyon dalga boyu :	F0-F4 formülasyonları için	C0, C1 formülasyonları için	R0, R1 formülasyonları için
	388 / 425	390 / 427	537/560

Daha sonra $7,93 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ (1ppb) konsantrasyonda aynı şartlarda melamin içeren çözeltilerin floresans spektrumları alınmış ve konsantrasyona karşı floresans şiddeti grafiğine geçirilmiştir. C0, C1, R0 ve R1 formülasyonları ile alınan floresans ölçümünde floresans şiddetinde anlamlı bir etki gözlenmediğinden ilgili formülasyonlar en başta elenmiştir. F0, F1, F2, F3 ve F4 formülasyonları ile alınan ölçümlerde floresans şiddetinde melamin ile etkileşime bağlı olarak anlamlı bir artış gözlenmiş olup bu formülasyonlar ile alınan ölçüm sonuçlarının karşılaştırıldığı grafik Şekil 3.5'te verilmiştir.



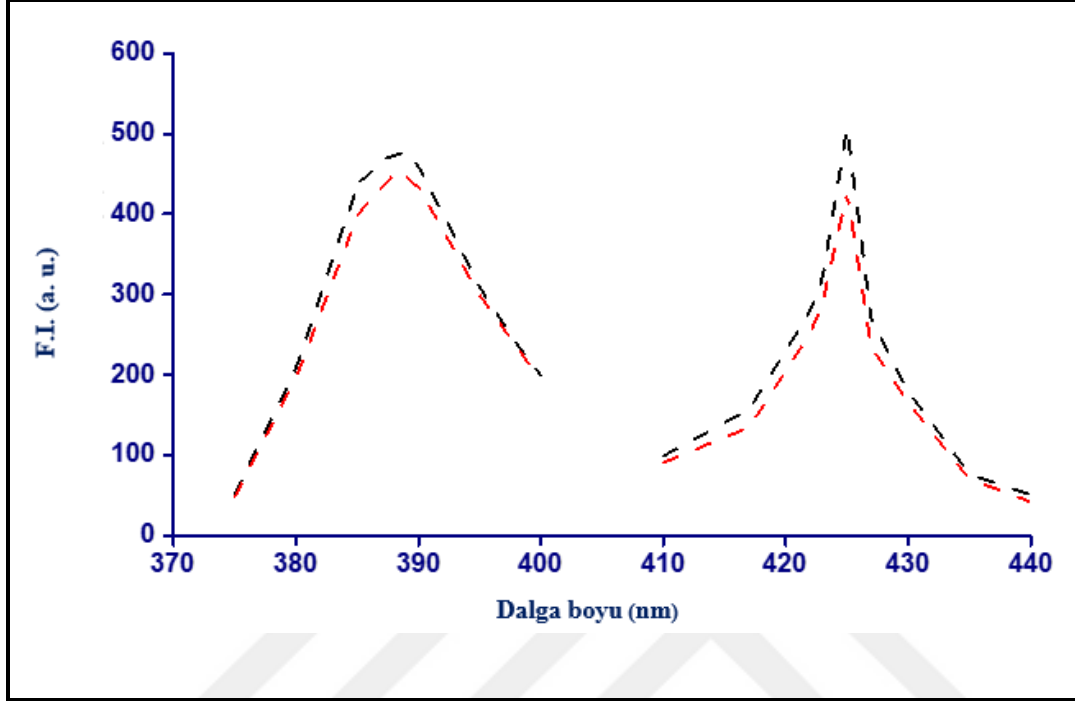
Şekil 3. 5. Optimum sensör formülasyonu.

Buradan yola çıkarak geliştirilen sensör formülasyonları içerisinde melamin tayini için optimum formülasyonun (en yüksek floresans şiddeti artışı gösteren formülasyon) F1 formülasyonu olduğuna karar verilmiş ve çalışmanın ilerleyen bölümleri F1 formülasyonu kullanılarak devam edilmiştir. İlgili sensörün kimyasal yapısı Şekil 3.6'da verildiği gibidir.



Şekil 3. 6. Sensörün kimyasal yapısı.

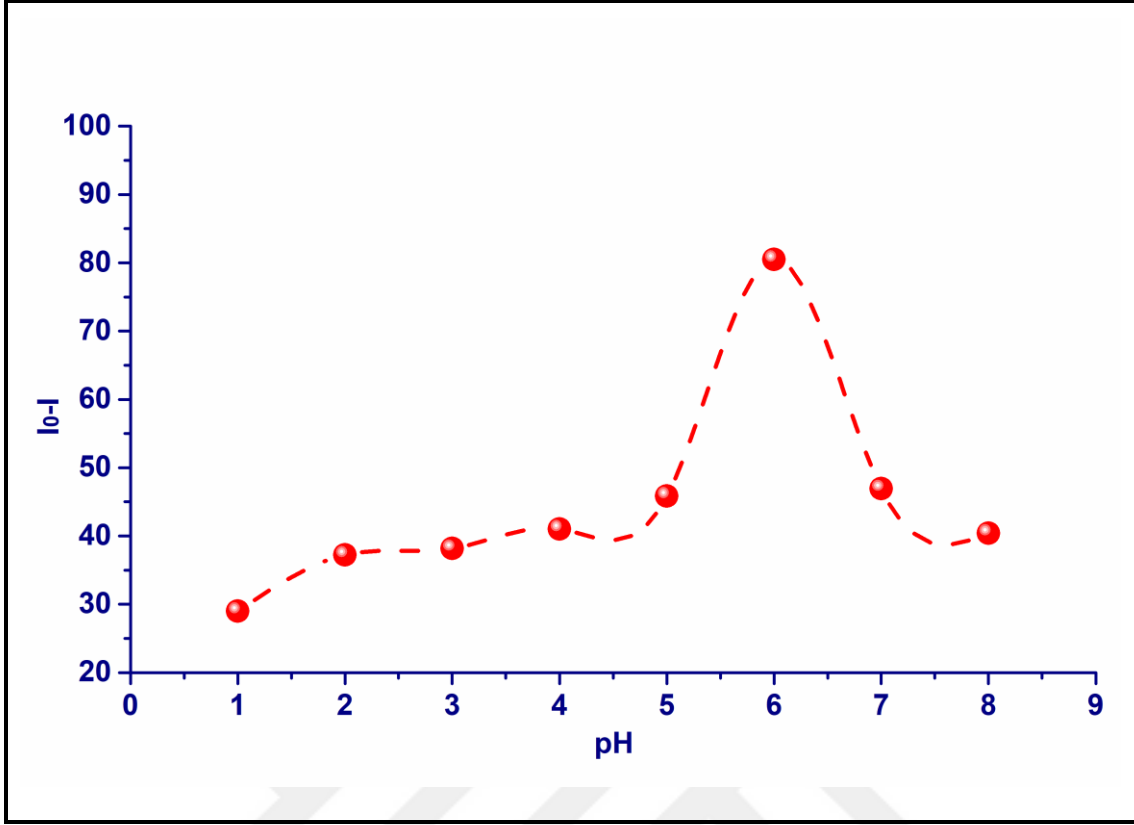
F1 sensörüne ait $7,93 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ (1ppb) melamin varlığında ve ortamda melamin yokken kaydedilen uyarma ve emisyon spektrumunu Şekil 3.7’ da verilmiştir.



Şekil 3. 7. Melamin yokluğunda (siyah) ve $7,93 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ (1ppb) melamin varlığında (kırmızı) polimerik membran sensörün uyarlma ve emisyon spektrumları ($\lambda_{uy} = 388$ nm, $\lambda_{em} = 425$ nm; slitler (uy/em): 5/5 nm; pH: 6,0).

3.2.1. Floresans şiddeti üzerine pH etkisinin araştırılması

Melamin tayini için hazırlanan polimerik membran sensör için pH'ın etkisini incelemek amacıyla Britton Robinson (BR) yöntemine göre hazırlanan tampon çözeltiler kullanılarak ayrı ayrı hazırlanan $7,93 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ melamin içeren çözeltilerin floresans şiddeti pH 1,0 ile 8,0 aralığında ölçülmüş ve pH değerlerine göre grafiğe geçirilmiştir. İlgili grafik Şekil 3.8’ de gösterildiği gibidir.



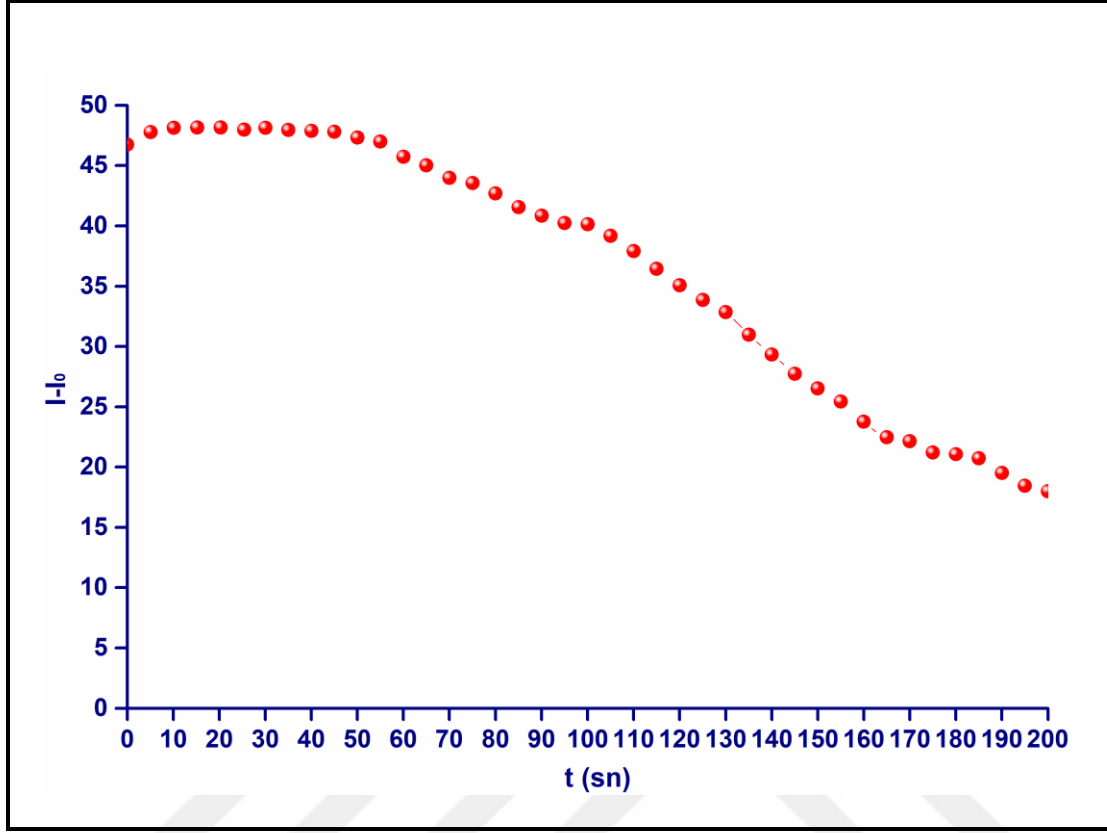
Şekil 3. 8. pH etkisi nedeniyle melamin sensörünün floresans şiddetindeki değişim ($7,93 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ (1ppb) melamin varlığında; $\lambda_{uy} = 388$ nm, $\lambda_{em} = 425$ nm; pH 6,0).

Şekil 3.8’de görüldüğü gibi, floresans şiddeti pH 1,0’ dan pH 6,0’ a yükselme göstermişken, pH 6,0’dan maksimum floresans şiddeti değerine ulaştığı ve 6,0’dan sonra ise floresans şiddetinin azalmaya başladığı görülmektedir. Bu sonuçlara göre sensör için optimum pH değerinin pH 6,0 olması gerektiğine karar verilmiş ve çalışmanın ilerleyen bölümlerinde pH 6,0 asetik asit / sodyum asetat tampon sistemi (AcB) kullanılarak devam edilmiştir.

3.2.2. Floresans şiddeti üzerine süre etkisinin araştırılması

Sensör yanıt süresi ortamın pH’ından ve melamin konsantrasyonundan etkilenir. Tepki süresini belirlemek için optimum çalışma pH değeri olarak karar verilen pH 6,0’ da hazırlanan $7,93 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ (1 ppb) melamin çözeltisinin floresans şiddeti 200 saniye boyunca her 10 saniyede bir ölçülmüştür. Şekil 3.9, sensörün zamana göre cevap süresindeki değişimi göstermektedir. Floresans şiddeti 0 ile 60 saniye arasında sabit iken 60. saniyeden sonra azalmaya başladığı görülmektedir. Buradan yola çıkarak

sensor için optimum cevap süresinin 0-60 saniye aralığında olduğuna karar verilmiştir.

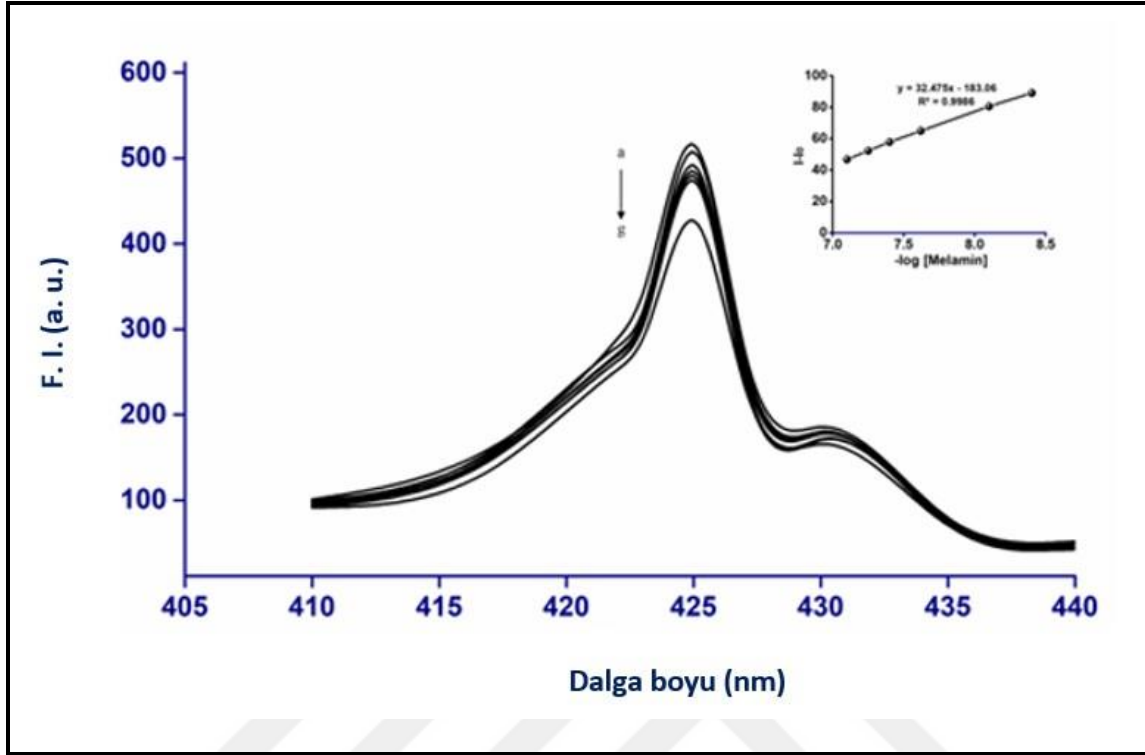


Şekil 3. 9. Melamin sensörünün floresans şiddetinin zamanla değişimi ($7,93 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ (1ppb) melamin varlığında; $\lambda_{uy} = 388$ nm, $\lambda_{em} = 425$ nm, pH 6,0).

3.2.3. Kalibrasyon aralığı

Belirlenen en uygun pH değerinde (pH 6,0) tampon çözelti içinde hazırlanan $7,93 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ stok melamin çözeltisinden, uygun hacimler alınarak tampon çözelti ile farklı konsantrasyon değerlerine sahip melamin çözeltileri için nihai hacim 10 mL olacak şekilde farklı konsantrasyon değerlerinde melamin çözeltileri hazırlanmıştır. Her ölçüm 3 kez tekrarlanmıştır. Bu çözeltilerin floresans şiddeti ayrı ayrı kaydedilmiş ve bunlardan yola çıkılarak kalibrasyon grafiği elde edilmiş olup, ilgili grafik Şekil 3.10'da verilmiştir. Kalibrasyon grafiğinin oluşturulması için hazırlanan melamin çözeltilerinin konsantrasyonlarının eksi logaritmasına karşılık değişen floresans şiddetleri grafiğe aktararak elde edilmiştir. En uygun çalışma aralığı $3,96 \times 10^{-9} - 7,93 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ (0,5- 10 ppb) aralığı olarak belirlenmiştir. $7,93 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ 'den yüksek konsantrasyonlarda kalibrasyon grafiğinin doğrusallıktan saptığı gözlemlendiğinden, bu

değerler grafikte gösterilmemiştir.



Şekil 3. 10. pH 6,0’ da elde edilen kalibrasyon grafiği ($\lambda_{uy}= 388$ nm, $\lambda_{em} = 425$ nm).

3.2.4. Melamin sensörün rejenerasyonu ve yeniden kullanılabilirliğinin araştırılması

Melamin tayini amacıyla geliştirilen sensörün rejenerasyonu için çeşitli çözücü ve çözücü sistemleri denenmiş olup çalışma sonucunda sadece saf su kullanılarak yapılan 30 saniyelik bir yıkamanın sensörün rejenerasyonu için yeterli olduğu görüldüğünden rejenerasyon çözücüsü saf su olarak belirlenmiştir. Aynı sensörün sadece saf su ile rejenere edilerek aynı hassasiyetle yaklaşık 200 kez daha kullanılabileceği belirlenmiştir (%95 güven aralığı, n=7).

3.3. Metod Validasyon Sonuçları

3.3.1. Seçicilik-fluoresans şiddeti üzerine yabancı iyon etkisinin araştırılması sonuçları

Çalışmada, melamin konsantrasyonu $7,93 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹’ e (1ppb) ayarlanmış ve ardından fluoresans tepki özellikleri arasındaki farkı ölçmek için belirlenmiş olan

yabancı iyon ve moleküller eklenmiştir. Kabul edilebilir üst sınır değerinin, floresans şiddetinde $\pm 5,0\%$ lik bir değişikliğin olduğu konsantrasyon değeri olabileceği göz önünde bulundurularak kabul edilebilir üst sınırlar belirlenmiş olup sonuçlar Tablo 3.2’de özetlenmiştir.

Tablo 3. 2. Optimum çalışma koşullarında $7,93 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ (1ppb) melamin çözeltisinin floresans şiddeti üzerine bir arada var olan türlerin etkisi.

Tür	Kabul edilebilir üst limit ^a (mol L ⁻¹)	Melaminin mol sayısının X kat fazlası	Tür	Kabul edilebilir üst limit ^a (mol L ⁻¹)	Melaminin mol sayısının X kat fazlası
SO ₄ ²⁻	$3,12 \times 10^{-7}$	3000	Tartarat	$1,35 \times 10^{-7}$	2000
Co ²⁺	$8,48 \times 10^{-7}$	5000	Askorbik Asit	$1,14 \times 10^{-7}$	2000
Ba ²⁺	$7,28 \times 10^{-8}$	1000	Sitrat	$2,64 \times 10^{-7}$	5000
Ca ²⁺	$2,50 \times 10^{-7}$	1000	Laktoz	$1,46 \times 10^{-7}$	5000
Fe ²⁺	$3,58 \times 10^{-7}$	2000	Vitamin B2	$1,06 \times 10^{-7}$	4000
Cl ⁻	$1,41 \times 10^{-6}$	5000	Nişasta	$1,39 \times 10^{-7}$	5000
Mg ²⁺	$2,06 \times 10^{-6}$	5000	Glukoz	$2,78 \times 10^{-7}$	5000
NH ₄ ⁺	$2,77 \times 10^{-6}$	5000	Mix1	-	1000
Zn ²⁺	$7,65 \times 10^{-6}$	5000	Mix2	-	250
Sitrik asit	$2,60 \times 10^{-6}$	5000			

a: $\pm 5\%$ ’ten az bağıl hata.

3.3.2. Tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) sonuçları

Floresans sensörünün tespit sınırını (LOD) ve tayin sınırını (LOQ) belirlemek için ise, belirlenen optimum çalışma koşullarında $7,93 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ (1ppb) melamin içeren 10 adet numunenin floresans şiddeti ölçümleri alınmıştır. LOD ve LOQ değerleri, kalibrasyon grafiğinin standart sapma değeri (ss) ve eğimi (m) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$LOD = \frac{3ss}{m}$$

$$LOQ = \frac{10ss}{m}$$

Melamin sensörü için $F = 32,475 \times (-\log(\text{Melamin})) - 183,06$ regresyon denklemi kullanılarak LOD değeri $2,32 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ ve LOQ değeri $7,74 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ olarak bulunmuştur. ($n = 10$, % RSD = 2,37).

3.3.3. Sensörün ömrü- Stabilesi

Geliştirilen sensörün kısa ve uzun dönem stabilesini belirlemek için iki ayrı çalışma yürütülmüştür. Kısa süreli stabilite çalışması aynı sensör kullanılarak belirli zaman aralıklarında (her 30 dakikada bir) $7,93 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ (1ppb) melamin içeren numunenin floresans şiddeti ölçülerek, uzun süreli stabilite çalışması 1 yıl boyunca bir desikatörde karanlık bir odada bekletilerek saklanmış sensör ile her ay aynı konsantrasyonda melamin içeren numunenin floresans şiddeti ölçülerek incelenmiştir. Sensörün stabil olduğu sürenin değerlendirilmesi ölçülen floresans şiddetinde $\pm 5,0$ değişimin gözlemlendiği süre olarak kabul edilmiş olup geliştirilen sensör için bu süre süre 6 ay olarak belirlenmiştir.

3.3.4. Sensörün analitik uygulamaları: Süt tozunda melamin analizi sonuçları

Geliştirilen sensörün gerçek numunelerdeki melaminin tespitine imkan tanıyıp tanımadığını test etmek amacıyla süt tozu numunesi karar verilen optimum şartlar altında hazırlanan sensör ile analiz edilmiştir.

Kullanılan süt tozu numunesinin melamin içeriği aynı zamanda akredite bir kurumda HPLC ile de ölçülmüştür.

Analizi yapılan numunenin melamin içeriği HPLC sonucuna göre $1,47 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ iken, geliştirilen yöntemle tekrarlanan üç tekrarlı ölçüm sonucunda $1,44 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu belirlemek için Student-T testi uygulanmıştır. İlgili sonuçlar Tablo 3.3'te özetlenmiştir.

Tablo 3. 3. Süt tozu örneğindeki melamin konsantrasyonu için HPLC yöntemi ile elde edilen verilerin ve önerilen polimerik melamin sensör sonuçlarının karşılaştırılması.

Melamin	SD	μ (mol L ⁻¹)	$\bar{X}$ (mol L ⁻¹)	t_{deneyse}	t_{referans}	Sonuç
Süt tozu numunesi	$0,35 \times 10^{-8}$	$1,47 \times 10^{-8}$	$1,44 \times 10^{-8}$	0,05	4,30	$0,05 < 4,30$ (kabul edilebilir)

n: 3

Denklemden hesaplanan t değeri 0,06 olarak bulunmuştur. Referans t değeri 4,30 olarak belirlenmiştir (%95 güven düzeyinde n=2 serbestlik ile). t_{deneyse} ve t_{referans} karşılaştırıldığında $t_{\text{deneyse}} < t_{\text{referans}}$ olduğu görülmektedir.

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde geliştirilen sensörün gerçek numunelerdeki melamin tayininde yüksek seçicilik ve hassasiyetle güvenle kullanılabilir olduğunu net bir şekilde gösterilmektedir.

BÖLÜM 4. SONUÇLAR

Bu tez kapsamında daha önce sentezlenmemiş olan akrilatlanmış sitrik asit (ACA) fonksiyonel monomeri sentezlenmiş ve bu fonksiyonel monomer ve PEGDA, TMPTA ve çapraz bağlayıcı kullanılarak radikalik polimerizasyon tekniği kullanılarak sadece 3 dakika gibi kısa bir sürede polimerik bir film haline getirilmiş ve yine ilk defa bu çalışma kapsamında melamin tayininde kullanılmıştır. Çalışma melamin tayininde yeni bir tayin yöntemi geliştirilmesi yönüyle literatüre katkı sağlamaktadır. Var olan melamin tayin yöntemleri ile kıyaslandığında bu tez çalışması kapsamında geliştirilen yöntemin yüksek hassasiyet ve seçicilik, düşük tayin limiti, kısa analiz süresi ve daha ekonomik bir cihaz gereksinimi ile son derece iyi bir alternatif olduğu görülmektedir.

Hazırlanan polimerik membran sensörün karakteristik ölçümleri yapılmış ve melamin tayini için kullanılabilirliği ile ilgili aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir;

- Sensörün yüzey morfolojisi SEM-EDAX ile çeşitli büyütme faktörlerinde incelenmiş ve tıpkı öngörüldüğü ve olması gerektiği gibi kırksız, çatlaksız, homojen bir yüzeye sahip olduğu görülmüştür.
- Hazırlanan sensör ile yapılan spektrum taraması sonucunda melamin tayini için floresans şiddetinin en yüksek olduğu uyarma dalga boyu 388 nm ve emisyon dalga boyları 425 nm olarak belirlenmiştir.
- Polimerik sensör ile melamin tayini sırasındaki optimum ortam pH'sının belirlenmesi çalışması için pH 1,0- pH 8,0'e aralığında tüm pH değerlerinde çalışılmış ve sensör için optimum çalışma ortamının en yüksek floresans şiddetini verdiği pH 6,0 olduğuna karar verilmiştir.
- Polimerik sensör için optimum cevap verme süresinin 0-60 saniye aralığı olduğu yapılan çalışma sonucunda belirlenmiştir.
- Sensörün doğrusal çalışma aralığı $3,96 \times 10^{-9}$ - $7,93 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ (0,5-10,0 ppb) konsantrasyon aralığı olarak belirlenmiş, Tespit (LOD) ve tayin (LOQ)

sınırları sırasıyla $2,32 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ ve $7,74 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ olarak hesaplanmıştır (%95 güven aralığında, n=10). Bağıl (relatif) standart sapma değeri (RSD) % 2,37 olarak bulunmuştur.

Polimerik sensörün sadece saf su ile yapılan 30 saniyelik yıkama sonucu kolaylıkla rejenere edilebildiği ve aynı sensörün 6 ay boyunca floresans şiddetinin $\pm\%5,0$ 'i geçmeyen anlamlı bir fark sınırı içerisinde, herhangi bir deformasyona uğramadan 200 ölçümde daha kullanılabilir olduğu görülmüştür.

Literatürde daha önce bu kadar uzun süre stabilitesini koruyan ve sadece saf su ile kolaylıkla rejenere olabilen başka bir tayin yönteminin önerilmemiş olduğu görülmüştür.

- Geliştirilen sensörün seçicilik çalışması için melamine girişim yapabilecek olan molekül ve iyonlar literatüre bakılarak belirlenmiş ve bu türler varlığında geliştirilen sensörün melamin tayini optimum çalışma koşulları altında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar geliştirilen sensörün oldukça yüksek bir tolerasyon limitine sahip olduğunu göstermiştir.

Geliştirilen sensör melamin konsantrasyonunun 5000 katı Co²⁺, Cl⁻, Mg²⁺, Zn²⁺, NH₄⁺, glukoz, nişasta, sitrat, laktoz, sitrik asit; 4000 katı Vitamin B2; 3000 katı SO₄²⁻; 2000 katı Fe²⁺, tartarat, askorbik asit; 1000 katı Ba²⁺, Ca²⁺; 1000 katı kullanılan iyonlardan oluşan karışım ve 250 katı kullanılan moleküllerin karışımı olması durumunda dahi melaminin seçici bir şekilde tayinine olanak sağlamaktadır.

- Geliştirilen sensörün gerçek örneklerde uygulanabilirliği süt tozu numunesi kullanılarak incelenmiş ve elde edilen sonuçlar geliştirilen sensörün gerçek örneklerde de yüksek hassasiyette melamin tayinine imkân tanıdığını göstermiştir. Bunun için daha önce akredite bir laboratuvar da HPLC ile analiz edilen süt tozu numunesi geliştirilen sensör ile de analiz edilmiş ve HPLC ile $(1,47 \pm 0,40) \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ olarak bulunan melamin miktarı geliştirilen yöntemle $(1,44 \pm 0,35) \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ olarak bulunmuştur. İki yöntemin sonucu Student-t testi ile karşılaştırılmış ve %95 güven düzeyinde n=2 serbestlik ile yüksek bir doğrulukta analize imkân tanıdığını göstermiştir.

Sonuç olarak; melamin tayini için geliştirilen bu yöntem hem geliştirilen sensörün yapısındaki ana monomer olan akrilatlanmış sitrik asit (ACA) fonksiyonel monomerinin ilk defa sentezlenmiş olması hem de melamin tayini için ilk defa kullanılıyor olması sebebiyle bu çalışmayı benzersiz kılmakta ve bu açıdan literatüre katkı sağlamaktadır. Bu tez çalışması, literatürdeki yöntemler ile kıyaslandığında 1 dakikadan az olan son derece kısa analiz süresi, sadece saf su ile 30 saniye gibi çok kısa bir sürede rejenere edilerek aynı sensörün 6 ay daha kullanılabilir olması sebebiyle son derece ekonomik bir alternatif olması, girişim yapabilecek pek çok molekül, iyon ve bunların karışımlarının melaminden en az 250 katı daha fazla olduğu ortamlarda dahi sadece melaminin analizine imkan tanıyacak kadar yüksek seçiciliğe sahip olması gibi son derece ilgi çekici özelliklere sahiptir. Ayrıca süt tozundaki melaminin yüksek hassasiyet ve doğrulukla tayin edilmesi geliştirilen sensörün gerçek örnek uygulamalarında da kullanılabilir olduğunun kanıtıdır.

Sonuç olarak, elde edilen veriler önerilen sensörün melamin tayini için son derece önemli bir alternatif olduğunu ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR

- [1] Gao, F., Ye, Q., Cui, P., & Zhang, L., (2012) Efficient Fluorescence Energy Transfer System Between CdTe-Doped Silica Nanoparticles and Gold Nanoparticles for Turn-on Fluorescence Detection of Melamine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60, 4550–4558. <https://doi.org/10.1021/jf300386y>.
- [2] Bann, B., Miller, S. A., (1957), *Melamine and Derivatives of Melamine*. British Oxygen Research and Development Ltd, Deer Park Road, London, 19s, England.
- [3] Melamine: 2022 World Market Outlook and Forecast up to 2031, (2022), <https://mcgroup.co.uk/researches/melamine>, Erişim Tarihi: 12.10.2022.
- [4] L. He, Y. Liu, M. Lin, J. Awika, D. R. Leodux, H. Li, A. Mustapha, (2008), A new approach to measure melamine cyanurate using surface enhanced Raman spectroscopy coupled with gold nanosubstrates, *Sens& Instrumental Food Qual.* 2: 66-71.
- [5] Tyan, Y-C, Yang, M-H, Jong, S-B, Wang, C-K ve Shiea, J., (2009), Melamine contamination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395 (3), 729–735.
- [6] WHO (World Health Organization), (2009), Toxicological and health aspects of melamine and cyanuric acid. Report of a WHO Expert Meeting In collaboration with FAO Supported by Health Canada, Geneva. 1-4 Aralık 2008, www.who.int/foodsafety/publications/chem/Melamine_report09.pdf.
- [7] Wang, Z., Ma, X., Zhang, L., Yang, W., Gong, W., Gong, L., He P. ve Li, Z., (2010), Screening and determination of melamine residues in tissue and body fluid samples. *Analytica Chimica Acta*, 662 (1), 69-75.
- [8] FDA (Food and Drug Administration), (2009), Domestic Infant Formula Testing Results. Erişim Tarihi: 29.12.2021. <http://www.fda.gov/NewsEvents/PublicHealthFocus/ucm179013.htm>.
- [9] WHO (World Health Organization), (2009), Background Paper on the Chemistry of Melamine Alone and in Combination with Related Compounds. Erişim Tarihi: 26.01.2022. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/Melamine_2.pdf.
- [10] Anonim, 2009, Melamin. *Gıda ve Yem Analiz* 35, 3 Aylık Dergisi, 16-17.

- [11] Chan, E. Y. Y., Griffiths, S. M. ve Chan, C. W., (2008), The public health risk of melamine in milk products. *Lancet*, 372 (9648), 1444-1445.
- [12] World Health Organization, (2008), Global Alert and Response, Melamine contaminated powdered infant formula in China. http://www.who.int/csr/don/2008_09_19/en/index.html. 07.09.2022.
- [13] EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF); Scientific Opinion on Melamine in Food and Feed, 2010.
- [14] Hau AK, Kwan TH, Li PK. Melamine toxicity and the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2009, 20: 245-50.
- [15] Wikipedia, Melamine, <http://en.wikipedia.org/wiki/Melamin>. Erişim tarihi: 04.02.2022.
- [16] Erkmen, O., (2010), Gıda kaynaklı tehlikeler ve güvenli gıda üretimi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 53, 220-235.
- [17] Chan, E. Y. Y., Griffiths, S. M. ve Chan, C. W., (2008), The public health risk of melamine in milk products. *Lancet*, 372 (9648), 1444-1445.
- [18] Barreto, M. C., Braga, R. G., Lemos, S. G., & Fragoso, W. D., (2021), Determination of melamine in milk by fluorescence spectroscopy and second-order calibration. *Food Chemistry*, 364, 130407. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130407>.
- [19] Vasimalai, N. ve John, S. A., (2013), Picomolar melamine enhanced the fluorescence of gold nanoparticles: Spectrofluorimetric determination of melamine in milk and infant formulas using functionalized triazole capped gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 42, 267–272.
- [20] Alimentarius Commission, (2010), Proposed Draft Maximum Levels for Melamine In Food and Feed (N13-2009). Erisim tarihi 01.10.2022. https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/shproxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FShared%2BDocuments%252FArchive%252FMeetings%252FCCCCF%252Fccccf4%252Fcf04_05e.pdf.

- [21] Sun, F., Ma, W., Xu, L., Zhu, Y., Liu, L., Peng, C., Wang, L., Kuang, H., Xu, C., (2010), Analytical Methods and Recent Developments in The Detection of Melamine, Trends in Analytical Chemistry, 29(11), 1239-1249.
- [22] Anonim, (2012), Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik, Başbakanlık Mevzuatı Geliştirme ve Yayın Genel Müdürlüğü, 19 Aralık 2012 tarihli, 28502 sayılı Resmî Gazete.
- [23] WHO (World Health Organization), (2009), Toxicological and health aspects of melamine and cyanuric acid. Erişim Tarihi. 12.05.2022. <http://www.who.int/topics/melamine/en>.
- [24] Guillet, J., (1985), Polymer Photophysics and Photochemistry, Cambridge University Press, Cambridge.
- [25] Gründler P., (2007), Chemical Sensors, An Introduction for Scientists and Engineers, 1st Edition, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- [26] Nagl S., Wolfbeis O. S., (2008), Classification of Chemical Sensors and Biosensors Based on Fluorescence and Phosphorescence, 1st Edition, s. 325- 346, Springer, Berlin, Heidelberg.
- [27] Jerónimo P. C. A., Araújo A. N., Conceição B.S.M. Montenegro M., (2007), Optical sensors and biosensors based on sol-gel films, Talanta, 72, 13-27.
- [28] Czarnik, A. W., (1994), Chemical Communication in water using fluorescent chemosensors. Acc. Chem. Res., 27(10), 302–308.
- [29] Czarnik, A. W., (1994), Fluorescent chemosensors for ion and molecule recognition. Instrumentation Science Technology, 22(4), 405–406.
- [30] A. Ciupa, M. F. Mahon, P. A. De Bank, and L. Caggiano, (2012), Simple pyrazoline and pyrazole ‘turn on’ fluorescent sensors selective for Cd²⁺ and Zn²⁺ in MeCN,” Org. Biomol. Chem., doi: 10.1039/c2ob26608c.
- [31] Czarnik, A. W., (1994), Fluorescent chemosensors for ion and molecule recognition. Instrumentation Science Technology, 22(4), 405–406.
- [32] Daly, B., Ling, J., De Silva, A. P., (2015), Current developments in fluorescent PET (photoinduced electron transfer) sensors and switches. Chem. Soc. Rev., 44(13),

4203–4211.

[33] De Silva, A. P., Gunaratne, H. Q. N., Gunnlaugsson, T., Huxley, A. J. M., McCoy, C. P., Rademacher, J. T., Rice, T. E., (1997), Signaling recognition events with fluorescent sensors and switches. *Chem. Rev.*, 97(5), 1515–1566.

[34] Kwok, R. T. K., Leung, C. W. T., Lam, J. W. Y., Tang, B. Z., (2015), Biosensing by luminogens with aggregation-induced emission characteristics. *Chem. Soc. Rev.*, 44(13), 4228–4238.

[35] Turro, N. J., (1978), *Modern Molecular Photochemistry*, Benjamin/Cummings Publishing Company, New York, 286.

[36] Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A., (1998), *Principles of Instrumental Analysis*, 5th Edition, Harcourt Brace Collage Publishing, Florida/USA.

[37] Turro N. J., (1978), *Modern Molecular Photochemistry*, 2nd Edition, s. 286, Benjamin/Cummings Publishing.

[38] Lakowicz J. R., (1983), *Principle of Flourescence Spectroscopy*, 1st Edition, s. 256 Plenium Pres, New York.

[39] Gündüz, T., (2002), *Ėnstrümental Analiz*, Dokuzuncu baskı, Bölüm 12, Gazi Büro Kitabevi, Ankara

[40] Odian G., (1981), “*Principles of Polymerization*”, Wiley-Ėnterscience Press.

[41] US Food and Drug Administration, Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, Accessed on July 17, 2014, Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>

[42] Yöntemlerin Seçilmesi, Doğrulanması ve Geçerli Kılınması Prosedürü, DSI Laboratuvarlar I, (2019), https://cdniys.tarimorman.gov.tr/api/File/GetFile/430/Sayfa/820/1168/DosyaGaleri/p7.200_yontemlerin_secilmesi_dogrulanmasi_ve_gecerli_kilinmasi_proseduru.pdf.

[43] Nascimento, C. F., Rocha, D. L., & Rocha, F. R. P., (2015), A fast and environmental friendly analytical procedure for determination of melamine in milk exploiting fluorescence quenching. *Food Chemistry*, 169, 314–319. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.144>

- [44] Zhang, C., Gao, Z., Wang, Q., Zhang, X., Yao, J., Qiao, C., & Liu, Q., (2018), Highly sensitive detection of melamine based on the fluorescence resonance energy transfer between conjugated polymer nanoparticles and gold nanoparticles. *Polymers*, 10(8), 873. <https://doi.org/10.3390/polym10080873>.
- [45] Qian, Z., Shan, X., Chai, L., Ma, J., Chen, J., & Feng, H., (2014), Si-doped carbon quantum dots: A facile and general preparation strategy, bioimaging application, and multifunctional sensor. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6, 6797–6805. <https://doi.org/10.1021/am500403n>.
- [46] Feng, W., Lv, C., Liping, Y., Cheng, J., & Yan, C., (2012), Determination of melamine concentrations in dairy samples. *LWT Food Science and Technology*, 47(1), 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.12.021>.
- [47] Tang, G., Du, L., & Su, X., (2013), Detection of melamine based on the fluorescence resonance energy transfer between CdTe QDs and Rhodamine B. *Food Chemistry*, 141 (4), 4060–4065. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.135>
- [48] Zhang, M., Cao, X., Li, H., Guan, F., Guo, J., Shen, F., ... Zhang, L., (2012), Sensitive fluorescent detection of melamine in raw milk based on the inner filter effect of Au nanoparticles on the fluorescence of CdTe quantum dots. *Food Chemistry*, 135(3), 1894–1900. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.070>.
- [49] Vasimalai, N., & Abraham John, S., (2013), Picomolar melamine enhanced the fluorescence of gold nanoparticles: Spectrofluorimetric determination of of melamine in milk and infant formulas using functionalized triazole capped gold nanoparticles. *Biosensors & Bioelectronics*, 42, 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.10.023>
- [50] Zhu, H. W., Dai, W. X., Yu, X. D., Xu, J. J., & Chen, H. Y., (2015), Poly thymine stabilized copper nanoclusters as a fluorescence probe for melamine sensing. *Talanta*, 144, 642–647. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.07.022>.
- [51] Dai, H., Shi, Y., Wang, Y., Sun, Y., Hu, J., Ni, P., & Li, Z., (2014), A carbon dot based biosensor for melamine detection by fluorescence resonance energy transfer. *Sensors & Actuators, B: Chemical*, 202, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.05.058>.

- [52] Gao, F., Ye, Q., Cui, P., & Zhang, L., (2012), Efficient Fluorescence Energy Transfer System Between CdTe-Doped Silica Nanoparticles and Gold Nanoparticles for Turnon Fluorescence Detection of Melamine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60, 4550–4558. <https://doi.org/10.1021/jf300386y>.
- [53] Li, Q., Wang, H., Yue, X., & Du, J., (2020), Perovskite nanocrystals fluorescence nanosensor for ultrasensitive detection of trace melamine in dairy products by the manipulation of inner filter effect of gold nanoparticles. *Talanta*, 211, 120705. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120705>.
- [54] Lin, C., Zhonga, C., Songa, Y., & Wang, L., (2021), Ratiometric fluorescence detection of melamine in milk by a zirconium-based metal-organic frameworks composite. *Microchemical Journal*, 162, 105837. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105837>.
- [55] Lu, Q., Zhao, J., Xue, S., Yin, P., Zhang, Y., & Yao, S., (2015), A turn-on fluorescent sensor for ultra sensitive detection of melamine based on a new fluorescence probe and AuNPs. *Analyst*, 140, 1155–1160. <https://doi.org/10.1039/C4AN01847H>.
- [56] Niu, C., Liu, Q., Shang, Z., Zhao, L., & Ouyang, J., (2015), Dual-emission fluorescent sensor based on AIE organic nanoparticles and Au nanoclusters for the detection of mercury and melamine. *Nanoscale*, 7, 8457–8465. <https://doi.org/10.1039/C5NR00554J>.
- [57] Shi, H., Nie, Q., Yang, M., Wang, C., Liu, E., Ji, Z., & Fan, J., (2020), A ratiometric fluorescence probe for melamine detection based on luminescence resonance energy transfer between the NaYF₄: Yb, Er upconversion nanoparticles and gold nanoparticles. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 389, 112259. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2019.112259>.
- [58] Singh, S., Kaur, V., Kumar, N., Garg, M., Pandey, S. K., & Meena, V. K., (2018), Cadmium chalcogenide derived fluorescent quanta-sensor for melamine detection. *Sensors & Actuators, B: Chemical*, 273, 505–510. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.06.063>.
- [59] Wu, Q., Long, Q., Li, H., Zhang, Y., & Yao, S., (2015), An upconversion fluorescence resonance energy transfer nanosensor for one step detection of melamine

in raw milk. *Talanta*, 136, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.01.005>.

[60] Xiang, D., Zeng, G., Zhai, K., Li, L., & He, Z., (2011), Determination of Melamine in Milk Powder Based on the Fluorescence Enhancement of Au Nanoparticles. *Analyst*, 136, 2837–2844. <https://doi.org/10.1039/C1AN00013F>.

[61] Yang, C., Du, C., Su, R., Wang, J., Li, Y., Ma, X., ... Sun, C., (2022), A signal-on fluorescent aptasensor by sensitized Tb³⁺ luminescence for detection of melamine in milk. *Talanta*, 236, 122842. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122842>.

[62] Constantin, M., Bucatariu, S., Ascenzi, P., Simionescu, B. C., & Fundueanu, G., (2014), Poly(NIPAAm-co-b-cyclodextrin) microgels with drug hosting and temperaturedependent delivery properties. *Reactive & Functional Polymers*, 84, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2014.07.024>.

[63] Gao, Q., Li, H., Zeng, X., (2011), Preparation and characterization of UV-curable hyperbranched polyurethane acrylate, *J. Coat. Technol. Res*, 8 (1), 61–66. <https://doi.org/10.1007/s11998-010-9285-y>.

[64] Ramos-Lara, F., Lira, A., Ramírez, M.O., Flores, M., Arroyo, R., Caldino, U., (2006), Optical spectroscopy of Nd³⁺ ions in poly(acrylic acid), *J. Phys.: Condens. Matter* 18, 7951–7959. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/18/34/008>.