



**T. C.
SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDA, KOZMETİK VE İLAÇ ÖRNEKLERİNDEN
ERİTROSİNİN DOĞRU VE
GÜVENİLİR TAYİNİ İÇİN KEMOMETRİK MODELLEME İLE
DOĞAL DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜLERİN KULLANIMININ
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Seçkin FESLİYAN
(20219209009)**

**Kimya Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil ELİK**

**SIVAS
OCAK, 2024**

Seçkin FESLİYAN'ın hazırladığı ve “**Gıda, kozmetik ve ilaç örneklerinden Eritrosinin doğru vegüvenilir tayini için kemometrik modelleme ile doğal derin ötektik çözücülerinkullanımının araştırılması**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANA BİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı: **Prof. Dr. Adil ELİK**
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

Jüri Üyeleri: **Prof. Dr. Mustafa TÜZEN**
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Prof. Dr. Nail ALTUNAY
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nevcihan GÜRSOY
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

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





Bütün hakları saklıdır.

Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Seçkin FESLİYAN, 2024



***Bana her zaman büyük bir motivasyon kaynağı olan değerli eşim
Nursena FESLİYAN'A...***

ETİK

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

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

16.01.2024

Seçkin FESLİYAN

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR

Tezin her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösterdiği gibi, bilimsel ve sosyal anlamda da katkılarını esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Adil ELİK'e saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma azmi ve başarılarıyla örnek aldığım, tez ve diğer bilimsel çalışmalarında birçok şeyi öğrenmeme katkı sağlayan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Nail ALTUNAY'a teşekkürü borç bilirim.



ÖZET

GIDA, KOZMETİK VE İLAÇ ÖRNEKLERİNDEN ERİTROSİNİN DOĞRU VE GÜVENİLİRTAYİNİ İÇİN KEMOMETRİK MODELLEME İLE DOĞAL DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜLERİN KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

Seçkin FESLİYAN

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Adil ELİK

2024, 43+xiii sayfa

Bu tez çalışmasında, gıda, kozmetik ve ilaç numunelerinden eser miktarda Eritrosin'in tayininden önce ekstraksiyonu için yeşil, basit ve ucuz özellikleriyle yeni bir derin ötektik solvent bazlı sonikasyon destekli sıvı-sıvı mikro ekstraksiyon (DES-SA-LLME) yöntemi geliştirildi. Geliştirilen yöntemde Eritrosin'in seçici ve verimli ekstraksiyonu için 5 farklı derin ötektik çözücü (DES) hazırlandı ve test edildi. Uygun DES olarak 1,2-propandiol ve kolin klorürün sırasıyla 1:2 molar oranda karıştırılmasıyla elde edilen DES-1 seçildi. Deneysel parametreler (pH, DES-1 hacmi, sıcaklık ve sonikasyon süresi)'in basit ve hızlı optimizasyonu için, yüzey yanıt metodolojisine dayalı merkezi kompozit tasarımı (CCD) kullanıldı. Yöntemin analitik parametreleri araştırıldığında, çalışma aralığı $1-400 \text{ ng mL}^{-1}$, zenginleştirme faktörü 175, tayin sınırı $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ve bağlı standart sapma % 2,2 olarak hesaplandı. DES-SA-LLME yöntemi karmaşık numune matrislerinden Eritrosin'in ayrılması ve tayini için oldukça tatmin edici sonuçlar sağladı. Geri kazanım değerleri %94,8-102,7 aralığındaydı.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE USE OF NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENTS WITH CHEMOMETRIC MODELING FOR THE ACCURATE AND RELIABLE DETERMINATION OF ERYTHROSIN FROM FOOD, COSMETIC AND PHARMACEUTICAL SAMPLES

Seçkin FESLİYAN

Master's Thesis

Department of Chemistry

Advisor: Prof. Dr. Adil ELİK

2024, 43+xiii pages

In this thesis study, a new deep eutectic solvent-based sonication-assisted liquid-liquid microextraction (DES-SA-LLME) method with green, simple and inexpensive features was developed for the extraction of trace amounts of Erythrosine from food, cosmetic and pharmaceutical samples before their determination. In the developed method, 5 different deep eutectic solvents (DES) were prepared and tested for the selective and efficient extraction of Erythrosine. DES-1, obtained by mixing 1,2-propanediol and choline chloride in a 1:2 molar ratio, respectively, was selected as the suitable DES. For simple and rapid optimization of experimental parameters (pH, DES-1 volume, temperature and sonication time), central composite design (CCD) based on surface response methodology was used. When the analytical parameters of the method were investigated, the working range was calculated as 1-400 ng mL⁻¹, the enrichment factor was 175, the detection limit was 1.0 ng mL⁻¹ and the relative standard deviation was 2.2%. The DES-SA-LLME method provided very satisfactory results for the separation and determination of Erythrosine from complex sample matrices. Recovery values were in the range of 94.8-102.7%

İÇİNDEKİLER

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1 Gıda Boyaları	1
1.2 Eritrosin	5
1.2.1 Eritrosinin genel özellikleri ve biyokimyasal veriler	5
1.2.2 Eritrosinin sentez tepkimesi	6
1.2.3 Emilim, dağıtım, metabolizma ve atılım	6
1.2.4 Enzimler ve diğer biyokimyasal parametreler üzerindeki etkiler	6
1.2.5 Toksisite ve Karsinojenite	7
1.2.6 Kabul edilebilir günlük alım değeri	7
1.3 Ayırma ve zenginleştirme yöntemleri	8
1.3.1 Mikroekstraksiyon tekniklerinde kullanılan yeşil çözücüler	9
1.4 İstatistiksel ve matematiksel optimizasyon yöntemleri	11
1.5 Geri kazanım ve analitik parametrelerin hesaplanması	13
2. MATERYAL VE METOT	15
2.1 Cihazlar	15
2.2 Kimyasallar	15
2.3 Örnek toplama ve hazırlama	16
2.4 DES hazırlama	16
2.5 Deneyisel modelleme	17
2.6 DES-SA-LLME Yöntemi	17
3. BULGULAR	19
3.1 Yapılan ön çalışmalar	19
3.2 Kemometrik analiz	21
3.3 Faktörlerin etkisi	24
3.4 Optimum koşullar	27
3.5 Yöntemin analitik özellikleri	28
3.6 Gün için ve günler arası çalışmalar	29
3.7 Yöntemin seçiciliği	29
3.8 Çeşitli numunelerin analizi	30
3.9 Diğer analitik yöntemlerle karşılaştırma	31

3.10 Geliştirilen yöntemin yeşil profili.....	32
4. SONUÇLAR	34
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ.....	43



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Azoredüktaz enzimi tarafından katalize edilen reaksiyonda azo boyaların NADPH ile indirgenmesi	2
Şekil 1.2 AB’de (Avrupa Birliği) kısıtlı olarak izin verilen gıda boyaları	3
Şekil 1.3 AB’de gıdalarda kullanımına izin verilmeyen fakat AB ve diğer ülkelerde kullanımı olası görülen gıda boyaları	4
Şekil 1.4 Eritrosin’in kimyasal yapısı	5
Şekil 1.5 Eritrosin’in, rezorsinolün ftalik anhidrit ile birlikte yoğunlaşmasının ürünü olan floresinin (F) iyotlanmasıyla üretilmesi	6
Şekil 1.6 DES hazırlanmasında kullanılan bazı HBA ve HBD’ler	10
Şekil 2.1 DES-SA-LLME yönteminin şematik gösterimi	18
Şekil 2.2 Eritrosinin farklı derişimlerinden elde edilen UV spektrumları	18
Şekil 3.1 DES türünün Eritrosin geri kazanımına etkisi	19
Şekil 3.2 DES-1 bileşenlerinin molar oranının Eritrosin geri kazanımına etkisi ..	20
Şekil 3.3 Çözücü türünün Eritrosin geri kazanımına etkisi.....	20
Şekil 3.4 Tahmini ve gerçek değerler arasındaki regresyon	23
Şekil 3.5 (a-e) Eritrosin’in CCD için yanıt yüzey grafikleri: (a) pH-DES-1 hacmi (µL); (b) pH-Sıcaklık (°C); (c) DES-1 hacmi (µL)-Sıcaklık (°C); (d) DES-1 hacmi (µL)-Sonikasyon süresi (dk); (e) Sıcaklık (°C)-Sonikasyon süresi (dk)	27
Şekil 3.6 CCD modeli tarafından oluşturulan değişkenler için optimum değerler ve tahmin edilen geri kazanım.....	28
Şekil 3.7 AGREE kriterleri ve geliştirilen DES-SA-LLME yöntemiyle elde edilen genel puan.....	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Eritrosin'in bazı özellikleri	5
Çizelge 1.2 Yeşil ekstraksiyon tekniklerinin genel planı	9
Çizelge 1.3 Merkezi kompozit tasarımı için deneysel matrisler; (a) iki değişkenli ve (b) üç değişkenli.....	12
Çizelge 2.1 Hazırlanan DES'lerin molar oranları, bileşenleri ve kısaltmaları.....	17
Çizelge 2.2 CCD'deki değişkenler, birimleri ve sembolleri	17
Çizelge 3.1 Kurulan modele ait CCD ve sonuçları	22
Çizelge 3.2 Geliştirilen yöntemin ANOVA sonuçları	23
Çizelge 3.3 CCD modeline ait kalite parametreleri	23
Çizelge 3.4 DES-SA-LLME yönteminin analitik parametreleri.....	28
Çizelge 3.5 Geliştirilen yöntem için gün içi ve günler arası kesinlik çalışması.....	29
Çizelge 3.6 Geliştirilen yöntemin bazı anyon ve katyonlar varlığındaki seçiciliği	30
Çizelge 3.7 Geliştirilen yöntemin çeşitli örneklerle uygulanmasından elde edilen sonuçlar.....	31
Çizelge 3.8 Geliştirilen yöntemin literatürdeki diğer yöntemlerle karşılaştırılması	32

KISALTMALAR DİZİNİ

AB	: Avrupa Birliği
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
CAS	: Kimyasal Kısaltmalar Servisi
T3	: Triiyodotironin Hormonu
T4	: Tiroksin Hormonu
TRH	: Tirotropin Salgılatıcı Hormon
SCF	: Gıda Bilimsel Komitesi
JECFA	: Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi
ADI	: Kabul Edilebilir Günlük Alım Değeri
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UPLC-ESI	: Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi – Elektrosprey İyonizasyon
UV-Vis	: Ultraviyole Görünür Bölge
SPE	: Katı Faz Ekstraksiyonu
LPE	: Sıvı Faz Ekstraksiyonu
LPME	: Sıvı Faz Mikroekstraksiyonu
DES	: Derin Ötektik Çözücü
IL	: İyonik Sıvı
HBA	: Hidrojen Bağ Alıcı
HBD	: Hidrojen Bağ Verici
CCD	: Merkezi Kompozit Tasarımı
LOD	: Seçme Limiti
LOQ	: Tayin Limiti
SA	: Sonikasyon Destekli
VA	: Vorteks Destekli
LLME	: Sıvı-sıvı Mikroekstraksiyonu
EF	: Zenginleştirme Faktörü
BSS	: Bağlı Standart Sapma
SHS	: Değiştirilebilir Hidrofiliklik Çözücüler

1. GİRİŞ

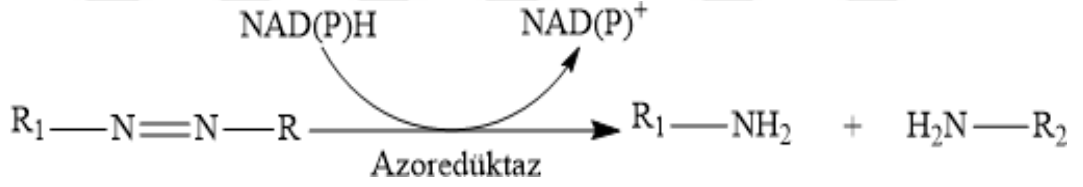
1.1 Gıda Boyaları

Artan insan nüfusu gıdaya olan ihtiyacı beraberinde getirmektedir. Gıdaya olan ihtiyaç ise gıda endüstrisinin hızla gelişmesinin ana nedenidir. Gıda katkı maddeleri gelişen gıda endüstrisinin yeterli arzı sağlayabilmesinde anahtar bir rol üstlenmiştir. Gıda endüstrisinin yanı sıra ilaç, plastik ve kozmetik gibi çeşitli endüstri alanında kullanılan gıda boyaları bu katkı maddelerinin önemli bir sınıfıdır.

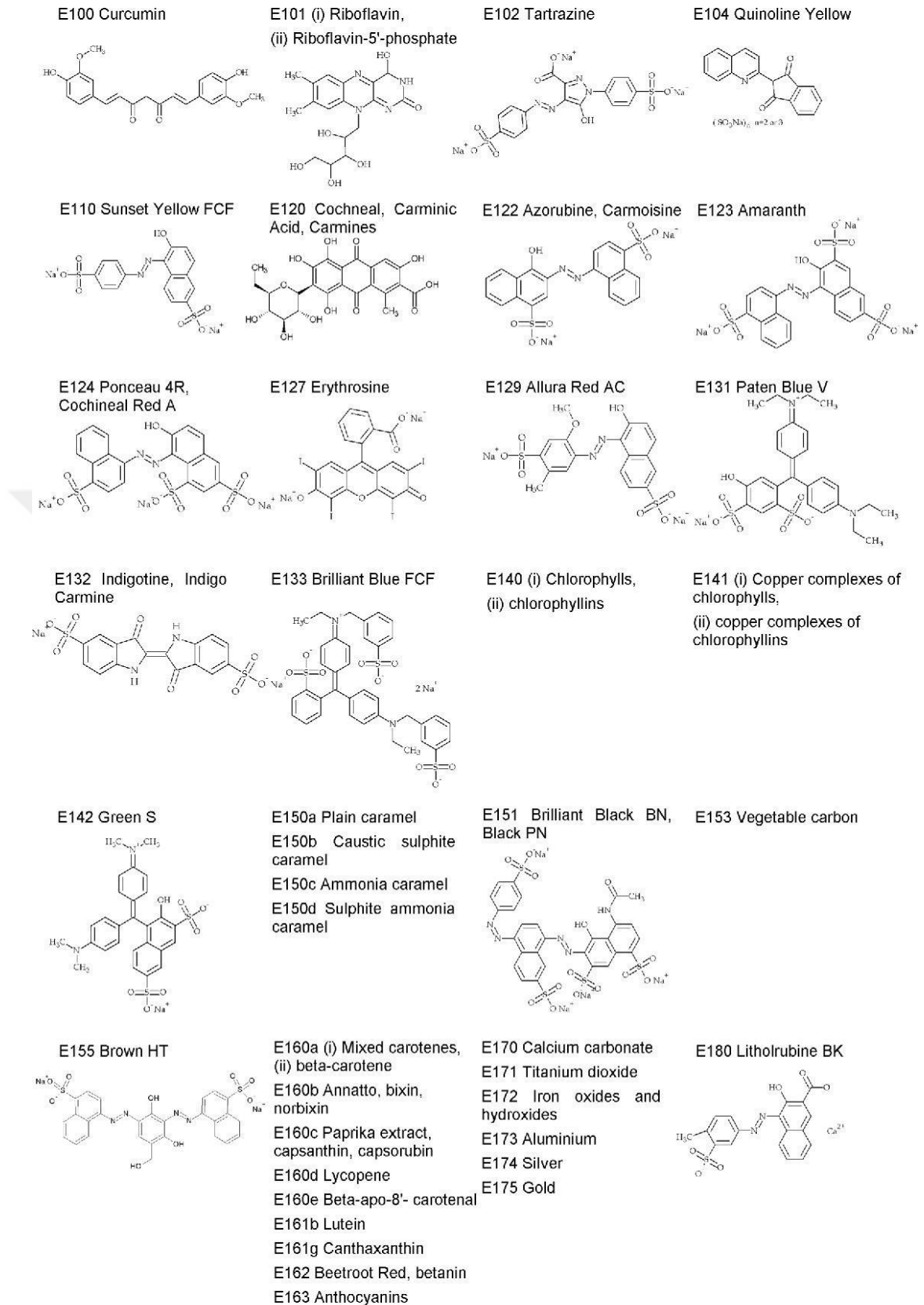
Gıda boyalarının tarihi oldukça eskiye dayanmaktadır. Eski çağlarda Mısırlılar farklı sebze ve mineral türlerini gıda boyası elde etme amaçlı kullanmışlardır. M.Ö 300 yıllarında ise şarapların yapay olarak renklendirildiği bilinmektedir [1, 2]. Günümüzde ise tüketici tarafından ürünün lezzeti ve kalitesiyle ilişkilendirilen gıda boyaları ürünün tüketici gözündeki albenisini artırmak, ürünün renk dağılımındaki farklılıkları gidermek ve daha iyi bir görünüm sunmak için meşrubat, reçel, şekerleme, alkollü içecek ve dondurma gibi çeşitli endüstride kullanılmaktadır [3-5].

Gıda boyaları doğal ve sentetik gıda boyaları olmak üzere ikiye ayrılır. Doğal gıda boyaları havuç, pancar, deniz yosunu, safran, üzüm, kırmızıbiber gibi çeşitli doğal maddelerden elde edilir [6]. Doğal gıda boyalarına riboflavin (E101), klorofiller (E140), karotenler (E160a), betalain (E162) ve antosiyaninler (E163) örnek olarak verilebilir [7]. Sentetik gıda boyaları farklı kimyasal teknikler kullanılarak sentezlenmektedir. Bu boyalar kimyasal yapılarına göre azo boyalar (Tartrazine, Allura Red, Sunset Yellow, Ponceau 4R ve Carmoisine), kinoftalon türevi (Kinolin Sarısı), indigo sülfanat (Indigo Carmine) triarilmetan grubu boyalar (Brilliant Blue) ve ksanten (Erythrosine) şeklinde gruplanmıştır [8]. Doğal gıda boyaları düşük stabiliteye sahip olup kolay bozunabilirken sentetik gıda boyaları doğal gıda boyalarına kıyasla hem daha kararlı hem de daha düşük maliyetlidir [9, 10]. Sağladığı avantajlar sayesinde sentetik gıda boyaları çok sık kullanılmaktadır.

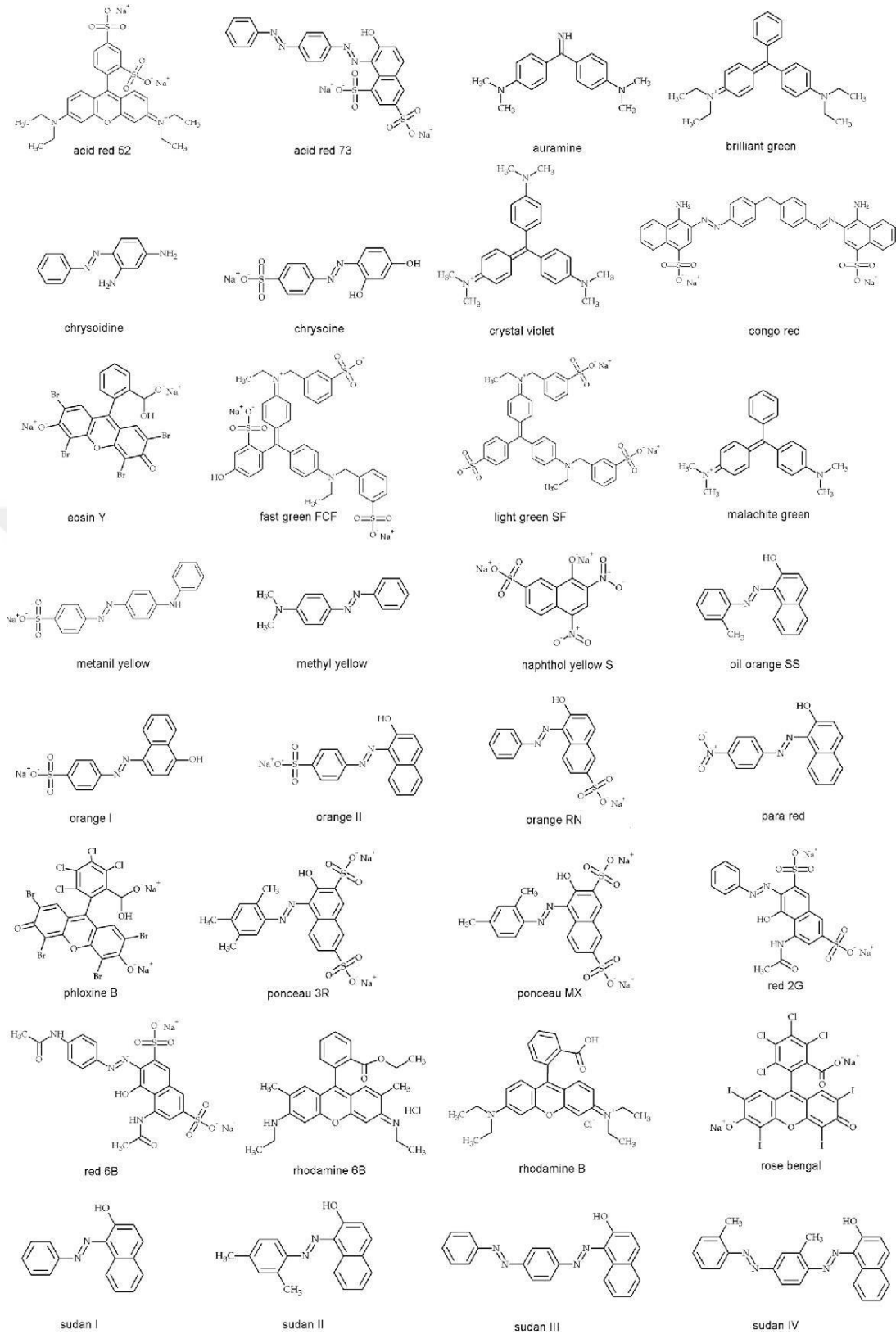
Gıda ve çeşitli endüstriye sağladıkları çeşitli avantajlar gıda boyalarını her ne kadar ilgi çekici kılsa da başta sentetik gıda boyaları olmak üzere birçok gıda boyasının sağlık üzerindeki olumsuz etkileri sıkça tartışılır olmuştur. Birçok bilimsel makalede araştırmacılar bu konuya dikkat çekmiştir. Azo boyaların bağırsak florasında aromatik aminlere parçalanması sonucu ortaya çıkan metabolitlerin karsinojenik ve toksik etkisi, cilt hastalıkları, sık görülen baş ağrısı, astım, disleksi, retinopati gibi hastalıklara sebebiyet vermesi, bağışıklık sistemini zayıflatması, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğuna yol açması bazı çalışmalarda bildirilmiştir [11-13]. Ayrıca tekstil endüstrisinde de kullanılan bu boyalar tekstil ürünleri kaynaklı cilt hastalıklarına sebebiyet verirken su arıtımında da problem teşkil etmektedirler [14]. Tartrazin sürekli alımının postmenopozal dönemdeki kadınlarda primer biliyer siroz riski oluşturduğu öne sürülmüştür [15]. Tartrazin, Allura Red, Azorubin gibi boyaların ilaç-boya etkileşimini gündeme getiren insan serum albüminiyle etkileşimleri tespit edilmiştir [7]. Sunset Yellow'un insan ve sığır albüminiyle etkileşip karmaşık yapılar oluşturduğu bildirilmiştir [16].



Şekil 1.1 Azoreduktaz enzimi tarafından katalize edilen reaksiyonda azo boyaların NADPH ile indirgenmesi [12].



Şekil 1.2 AB (Avrupa Birliği)'de kısıtlı olarak izin verilen gıda boyaları [4].



Şekil 1.3 AB’de gıdalarda kullanımına izin verilmeyen fakat AB ve diğer ülkelerde kullanımı olası görülen gıda boya ları [4].

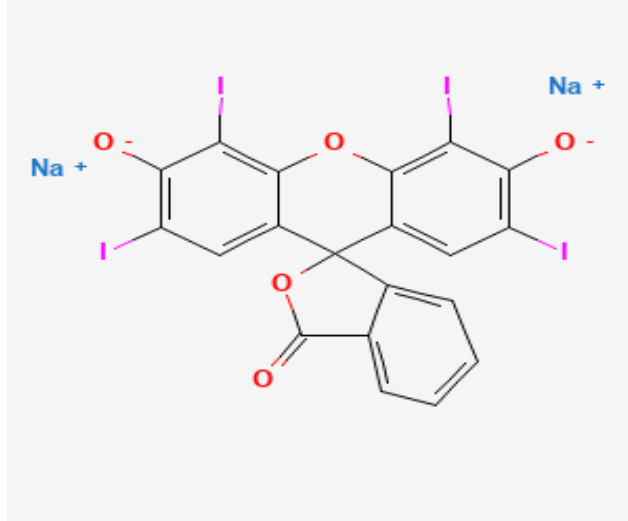
1.2 Eritrosin

1.2.1 Eritrosinin genel özellikleri ve biyokimyasal veriler

Eritrosin, molekül formülü $C_{20}H_6I_4Na_2O_5$ ve IUPAC'a göre kimyasal adlandırması 2-(6-Hydroxy-2,4,5,7-tetraiodo-3-oxo-xanthen-9-yl)benzoic acid olan bir gıda boyasıdır. Kozmetik ürünlerinde, toz içeceklerde, meşrubatlarda, şekerlemelerde, pastane ürünlerinde ve ilaçlarda sıklıkla kullanılmaktadır [17].

Çizelge 1.1 Eritrosin'in bazı özellikleri [18].

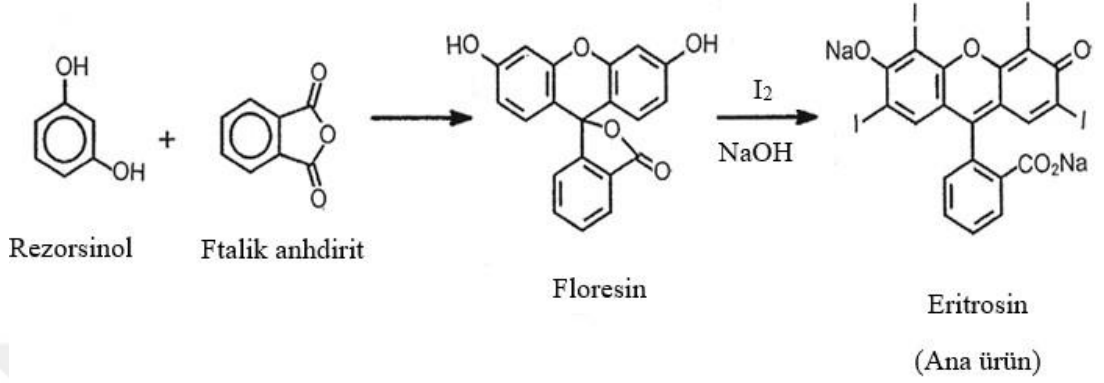
Grubu	Ksanten
Diğer adları	C.I. Acid Red 51, Eritrosin B
Yoğunluk	0,625 – 0,731 g/mL (30,1°C)
Molekül kütlesi	879,6190 g/mol
CAS numarası	16423-68-0
Fiziksel tanımlaması	Kırmızı toz veya granül
Uv spektrumu	Suda maksimum, pH 7'de 526 nm
pH	6,4 (Suda, 30,3°C)



Şekil 1.4 Eritrosin'in kimyasal yapısı [18].

1.2.2 Eritrosin'in sentez tepkimesi

Eritrosin, rezorsinolün ftalik anhidrit ile yoğunlaştırılmasıyla oluşan floresinin saflaştırıldıktan sonra iyotlanması ve en son oluşan ürünün de sodyum hidroksit ile hidrolizlenmesi yoluyla üretilebilir (Şekil 1.4) [19].



Şekil 1.5 Eritrosin'in, rezorsinolün ftalik anhidrit ile birlikte yoğunlaşmasının ürünü olan floresinin iyotlanmasıyla üretilmesi [19].

1.2.3 Emilim, dağıtım, metabolizma ve atılım

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada kg olarak sıçan ağırlığı başına 3 mg Eritrosindamar yoluyla uygulanmıştır. Verilen miktarın %55'i safrada bulunmuştur. Eritrosin'in yaklaşık %50-70 kadarı dışkıyla atılmıştır [20]. Bir başka çalışmada 5, 10, 15 ve 50 mg Eritrosin sıçanlara ağız yoluyla verilmiş ve boyanın dışkı yoluyla, başkalaşıma uğramadan atıldığı görülmüştür. Eritrosinle dozlanan sıçanlarda kan proteinine bağlı iyotun seviyesi yükselmiş ve bu durumun Eritrosin'in iyot içeriğinden kaynaklandığı öner sürülmüştür [21, 22].

İnsan denekler üzerinde yapılan çalışmada, alınan eritrosinin çok az bir kısmının (yaklaşık %1) gastrointestinal sistem tarafından emildiği belirtilmiştir [23].

1.2.4 Enzimler ve diğer biyokimyasal parametreler üzerindeki etkiler

İnsan denekler üzerinde 10 gün boyunca 16 mg Eritrosin oral yolla uygulanmış ve yaklaşık 20 gün sonra kan proteinine bağlı iyot seviyesinin 100 mL serum başına 4 µg yükseldiği gözlemlenmiştir. İyot seviyesinde daha sonra hızlı bir düşüş olduğu tespit edilmiştir [24]. Başka bir çalışmada 200-400 mg/L Eritrosin'in pepsin inhibisyonuna sebep olduğu bildirilmiştir [25].

1.2.5 Toksisite ve Karsinojenite

Farelerde kg fare ağırlığı başına 100 mg ve 200 mg Eritrosin yüklemesi sonucu akciğerde doza bağlı DNA hasarı tespit edilmiştir [26]. Yapılan bir çalışmada sıçanlara kg canlı ağırlık başına 0,008 g ve 0,4 g Eritrosin verilmiş ve 6 saat sonra sıçanlar öldürülmüştür. Deney sonucunda karaciğer, kemik iliği ve beyinde kromozom açısından olağan dışı durumlar tespit edilmiştir [27]. Fareler üzerinde başka bir deneyde 70 adet fareye kg canlı ağırlığı başına 1400 veya 2900 mg Eritrosin verilmiştir. Deneyde farelerin büyük bir çoğunluğu yaşamını yitirirken düşük miktarda tümör oluşumu tespit edilmiştir [28]. Ayrıca Eritrosin'in sıçanlarda T4'ün (tiroksin hormonu) T3'e (triiodotironin hormonu) dönüşümünü etki ettiği böylece triotropin salgılanmasından sorumlu olan hormonun (TRH) hipofizden salınımını uyararak tiroid tümörlerini oluşturduğu bulunmuştur [29]. Farklı bir çalışmada Eritrosin'in insan lenfositleri için toksik potansiyele sahip olduğu ve DNA'ya bağlanabildiği tespit edilmiştir [30].

1.2.6 Kabul edilebilir günlük alım değeri

Yapılan incelemeler ışığında 1984 yılında Gıda Bilimsel Komitesi (SCF) ve 1990 yılında ise Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (JECFA) tarafından eritrosin için kabul edilebilir günlük alım değerinin (ADI) 0-0,1 mg/kg vücut ağırlığı aralığında güvenli olduğu kabul edilmiştir. Avrupa'da Eritrosin'in gerçek tüketim değeri üzerine yapılan bir çalışmada ortalama günlük Eritrosin dozunun nüfusun %95'inde 0,01 mg/kg vücut ağırlığına karşılık geldiği tespit edilmiştir. Eritrosin'in AB'de sadece az sayıda kırmızı gıdada kullanıldığı da göz önünde bulundurularak bu değer kabul edilebilir günlük alım değerinin oldukça altında olduğu söylenebilir [7].

Eritrosin'in sağladığı avantajlar onu çeşitli endüstrilerde oldukça ilgi çekici ve kullanılır kılmaktadır. Fakat üst satırlarda bahsedildiği gibi sağlık açısından hem insanlar hem de hayvanlar üzerinde olumsuz etkiler bıraktığı bilimsel çevrelerce kabul edilmiş ve yetkili kuruluşlar tarafından kullanımı sınırlandırılmıştır.

Bu olgular göz önünde bulundurulduğunda sağlık üzerindeki negatif etkileri en aza indirmek, kalite ve tüketici güvenliği sağlamak için gıda, kozmetik, ilaç gibi ürün gruplarının Eritrosin içeriği sürekli kontrol edilmedilir. Bu amaçla yeni, ucuz, güvenilir ve ulaşılabilir analitik yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Yakın zamanlarda, Eritrosinin tayinine ilişkin literatürde farklı analitik yöntemler kullanılmıştır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) [31, 32], Adsorptif diferansiyel puls-katodik sıyırma voltametrisi[33], ultra performanslı sıvı kromatografisi–elektrosprey iyonizasyon (UPLC-ESI) [34], döngüsel voltametri (CV) [35], lazer kaynaklı floresan – kapiler elektroforez [36], ultraviyole görünür bölge spektrofotometri (UV-Vis) [37, 38]

1.3 Ayırma ve zenginleştirme yöntemleri

Kimyasal analizi yapılacak numuneler genelde kimyasal olarak karmaşık yapıya sahiplerdir. Ayrıca numunede tayin edilmesi istenen analitin derişimi eser düzeyde olabileceğı gibi analitin tayinine girişim yapabilecek kimyasal türler de numunede yer almaktadır. Bu gibi sebepler ayırma ve zenginleştirme tekniklerini kimyasal analiz öncesinde gerekli kılmaktadır. Ayırma ve zenginleştirme yöntemleri analitik cihazlarda iyi ölçüm almak için de gereklidir. İyi çözünmüş ve daha düşük hacime zenginleştirilmiş örnek doğru, güvenilir ve duyarlı kimyasal analizler yapmanın temelini oluşturmaktadır. Son yıllarda Eritrosin'in tayinini temel alan çalışmalarda farklı ayırma ve zenginleştirme yöntemleri kullanılmıştır; dağıtıcı manyetik katı faz ekstraksiyonu [39], bulutlanma noktası ekstraksiyonu [40], değiştirilebilir hidrofilik solvent sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu [29], ultrasonik destekli supramoleküler bazlı dispersiyon katılaştırma sıvı-sıvı mikro ekstraksiyonu [41], iyonik sıvı bazlı dağıtıcı sıvı- sıvı mikroekstraksiyonu [37], derin ötektik çözücü bazlı vorteks destekli dağıtıcı sıvı- sıvı mikroekstraksiyonu [42].

Klasik ekstraksiyon teknikleri zaman alıcı, fazla enerji tüketimine sebep olan ve de sağlık ve çevre için risk teşkil eden organik çözücülerden aşırı miktarlarda gerektiren tekniklerdir [43]. Klasik ekstraksiyon tekniklerinin bu dezavantajları araştırmacıların ilgisini daha minyatürize edilmiş, organik çözücü hacimlerinin mikro seviyelere indirgendiğı, reaktif, numune ve atık miktarının büyük ölçüde azaltıldığı ve yeşil analitik kimyanın ilkelerini karşılayan yeni mikroekstraksiyon tekniklerinin lehine çevirmiştir [44].

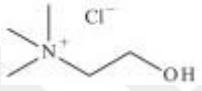
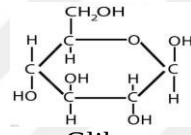
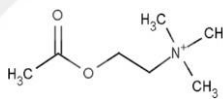
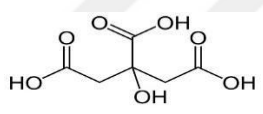
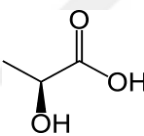
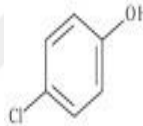
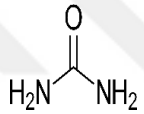
Çizelge 1.2 Yeşil ekstraksiyon tekniklerinin genel planı [44].

Temel Plan	Avantajlar
Minyatürizasyon	Kullanılan reaktiflerin ve oluşan atıkların miktarını azaltmak
Otomasyon	Çevre üzerindeki riskleri ve zararlı kimyasallara maruziyeti azaltmak
Enerji tasarrufu	Enerjiyi minimize etmek ve verimli kullanmak
Sarf edilebilir malzemelerin tasarrufu	Tek kullanımlık plastik sarf malzemelerinin kullanımını önlemek
Atık arıtma faaliyeti	Maliyet azalımı ve toksik kalıntıların birikimini önlemek

1.3.1 Mikroekstraksiyon tekniklerinde kullanılan yeşil çözücüler

Bahsi geçen mikroekstraksiyon tekniklerinden sıvı faz mikroekstraksiyonu (LPME) diğer tekniklere göre seçici, ucuz ve basit olmasıyla üstünlüğe sahiptir. LPME’de çözücü önemli bir parametredir. Doğru çözücü seçimiyle analit-çözücü etkileşimi maksimum düzeyde olabilir ve böylece numuneden çözücüye etkin bir kütle transferi gerçekleşebilir. İstenen ekstraksiyon verimini sağlamak için LPME’de amfifilik çözücüler, derin ötektik çözücüler (DES) ve iyonik sıvılar (IL) sıklıkla kullanılmaktadır. DES’ler IL’lerin bazı türlerinin sergilediği yüksek maliyet, toksisite, biyobozunurluğun zayıflığı gibi dezavantajları ortadan kaldırıp, düşük buhar basıncı, ayarlanabilirlik, kolay hazırlanış ve üstün çözme yeteneği gibi avantajlarıyla iyonik sıvılara iyi bir alternatiftir [45, 46]. DES’ler hidrojen bağı alıcısı(HBA) ve hidrojen bağı vericisi (HBD) olmak üzere iki bileşenden oluşurlar. Bu iki bileşenin uygun sıcaklık ve mol oranında karıştırılmasıyla ötektik karışım oluştururlar.Elde edilen bu karışımlar DES olarak adlandırılır [47]. DES’lerin erime noktaları bileşenlerin her birinin erime noktasından daha düşüktür. Bu durumun başlıca sebebi hidrojen bağı oluşumundan dolayı meydana gelen yük delokalizasyonudur. Ayrıca DES’lerin bileşenlerinden oluşma sürecinde herhangi bir atık oluşturan ürün meydana getirmezler [45, 48, 49]. DES’leri oluşturan bileşenlerde genellikle kuaterner amonyum

tuzları HBA olarak, aminler, karboksilik asitler, alkoller ve karbohidratlar ise HBD olarak kullanılmaktadır. DES'lerin kullanıldığı mikroekstraksiyon tekniklerinde ultrasonik ses dalgalarının enerjisinden ve moleküllerin hareket hızını artırmak adına vorteks oluşumundan faydalanılabilir. Ultrasonik etki ve vorteks etkisi analitle ekstraksiyon çözücüsünün temasını artırmaktadır. Bu durumda etkin kütle transferi gerçekleşmektedir. DES'lerin bileşenleri değiştirilerek farklı kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip yeni ötektik karışımlar oluşturulabilir. Bu durum DES'lerin büyük ölçekli analit grubuna etki edebilmesi açısından oldukça önemlidir.

Hidrojen Bağ Alıcı				
				
Kolin Klorür	Glikoz	Asetil Kolin		
Hidrojen Bağ Verici				
				
Sitrik asit	Laktik Asit	4-klorfenol	Üre	Etilen Glikol

Şekil 1.6 DES hazırlanmasında kullanılan bazı HBA ve HBD'ler [50].

Son dönemlerde mikroekstraksiyon teknikleri ekstraksiyon verimini artırmak için mekanik etki sağlayan cihazlarla kombine edilmektedir. Bu gibi yöntemlere vorteks destekli [51], ultrason (sonikasyon) destekli [52] ve orbital çalkalayıcı [53] destekli mikroekstraksiyon yöntemleri örnek verilebilir. Ultrason destekli mikroekstraksiyon teknikleri homojenizasyonu ve fazlar arası madde transferini hızlandırmasıyla diğer tekniklere iyi bir alternatiftir [6]. Ayrıca ultrasonik etki ısı ile desteklenirse sağlanan avantajları artırma yönünde iyi bir sinerjik etki oluşturulabilir.

1.4 İstatistiksel ve matematiksel optimizasyon yöntemleri

Analitik kimyada optimizasyon, en iyi analitik sinyalin elde edilmesi için gerekli şartların araştırılması ve sağlanması işlemidir. Bu sayede yöntemin sunacağı en iyi etki elde edilmiş olunur. Klasik olarak deney üzerine etki eden parametrelerden her defasında yalnızca birinin değiştirilip diğerlerinin sabit tutulduğu tek değişkenli optimizasyon yaklaşımı bu amaçla kullanılmaktadır. Fakat deneye etki eden her bir parametrenin diğer bir parametre üzerine etkisi söz konusudur ve tek değişkenli optimizasyon parametrelerin birbiri üzerindeki etkilerini içermez. Ayrıca üzerinde çalışılması gereken deney sayısı çok fazla olduğu için bu yaklaşımda kimyasal madde tüketimi, maliyet ve harcanan zaman da artmış olur [54].

Sergilediği dezavantajlardan dolayı tek değişkenli optimizasyon yaklaşımına alternatif olarak çok değişkenli optimizasyon teknikleri araştırmacılar tarafından kullanılmaya başlamıştır. Bu tekniklerden en çok kullanılanı yanıt yüzeyi metodolojisi. Yanıt yüzeyi metodolojisinde amaç istatistiksel tahminlerde bulunmaktır. Bu istatistiksel tahminler ise bir sinyal birkaç değişkenden etkilendiğinde elde edilen verileri tanımlayan bir polinom denkleminin deneysel verilerle uyumluluğuna dayanmaktadır. Yüzey yanıt metodolojisinin uygulanmasına dair bazı adımlar aşağıdaki gibidir;

- Sistem üzerinde en fazla etkiye sahip olan bağımsız değişkenlerin seçimi ve deney bölgesinin daraltılması,
- İlgili deneysel tasarım yönteminin seçimi ve deneylerin gerçekleştirilmesi,
- Deneysel verilerin ilgili polinom denklemine bağlı olarak matematiksel ve istatistiksel olarak işlenmesi,
- Uygunluğun kontrol edilmesi,
- Optimum bölgeye doğru bir kaydırma yapılmasının gerekliliğinin incelenmesi,
- Çalışılan değişkenler için optimum değerlerin elde edilmesidir.

Yüzey yanıt metodolojisi uygulanmadan önce çalışılan deneyle ilgili uygun bir deneysel tasarım metodu seçilmelidir. Doğrusal etkileşimlerden daha fazlasını ele almanın söz konusu olduğu durumlarda deneysel faktörlerin üç seviyeli olarak çalışıldığı Box-Behnken, merkezi kompozit tasarımı (CCD) ve Doehlert tasarımı gibi yöntemler bu amaçla kullanılabilir. Bahsi geçen yöntemlerin birbirinden farkı ise

deneysel noktaların seçimi, yapılan deney sayısı ve değişkenlerin seviyelerinin sayısıdır. Bu yöntemlerden en çok tercih edileni CCD'dir.

CCD aşağıdakileri içermektedir;

- Tam veya fraksiyonlu faktöriyel tasarım
- Deneysel noktaların merkez noktadan uzak olduğu bir ek tasarım (α)
- Merkez nokta

Merkezi kompozit tasarımında aşağıdaki özellikler değerlendirilir;

- N ; deney sayısı, k ; faktör sayısı, c_p ise merkezi noktanın tekrar sayısı olmak üzere $N = k^2 + 2k + c_p$ kadar deney sayısı vardır.
- α değeri değişken sayısına bağlı olan bir değerdir ve $\alpha = 2^{(k-p)/4}$ eşitliğinden hesaplanabilir. İki, üç ve dört değişken için sırasıyla 1.41, 1.68 ve 2.00 olarak bulunur.
- Tüm faktörler $-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$ olmak üzere beş seviyede incelenir.

Çizelge 1.3 Merkezi kompozit tasarımı için deneysel matrisler; (a) iki değişkenli ve (b) üç değişkenli [55].

(a)	x_1	x_2
Faktöriyel tasarım	-1 1 -1 1	-1 -1 1 1
Eksen noktaları	$-\alpha$ α 0 0	0 0 $-\alpha$ α
Merkezi noktalar	0	0

(b)	x_1	x_2	x_3
Faktöriyel tasarım	-1 1 -1 1 -1 1 -1 1	-1 -1 1 1 -1 -1 1 1	-1 -1 -1 -1 1 1 1 1
Eksen noktaları	$-\alpha$ α 0 0 0 0 0 0	0 0 $-\alpha$ α 0 0 0 0	0 0 0 0 $-\alpha$ α 0 0
Merkezi noktalar	0	0	0

Yukarıda verilen bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında gıda, ilaç ve kozmetik örneklerinden Eritrosin'in UV-Vis ile tayininden önce ayrılması ve zenginleştirilmesi için ultrason destekli sıvı-sıvı mikroekstraksiyonuna dayalı bir analitik yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca çalışma kapsamında, deneysel parametreler kemometrik yaklaşımla optimize edildikten sonra optimum yöntemin gerçek örneklerle uygulanması planlanmıştır.

1.5 Geri kazanım ve analitik parametrelerin hesaplanması

Doğruluk: Bir yöntemin doğruluğu, ilgili yöntem kullanıldığında elde edilen sonuçların gerçek veya gerçek kabul edilen değere yakınlığıyla ölçülmektedir. Yüzde geri kazanım, analitin yöntemin doğruluğunu ifade etmektedir. Aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$\text{Geri Kazanım, \%} = \frac{C_{\text{bulunan}}}{C_{\text{eklenen}}} \times 100$$

Burada, C_{eklenen} ekstraksiyon öncesi model çözeltiye ilave edilen eritrosin derişimini, C_{bulunan} ise önerilen yöntem uygulandıktan sonra tayin edilen eritrosin derişimini ifade etmektedir.

Kesinlik: Aynı yolla elde edilen tekrarlı sonuçların birbirlerine yakınlığını göstermektedir. Bir analitik yöntemin kesinliği bağıl standart sapma (BSS) ile verilmektedir. Genel olarak BSS'nin %5'ten daha küçük olması istenmektedir. BSS aşağıdaki eşitlikten hesaplanmıştır;

$$\text{BSS, \%} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

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

Zenginleştirme Faktörü (EF): Geliştirilen yöntemin kullanılmasıyla, analitin derişiminin kaç kat arttırıldığını belirlemektedir. Aşağıdaki eşitlikten hesaplanmıştır.

$$\text{EF} = \frac{C_{\text{ölçüm fazı}}}{C_{\text{başlangıç}}}$$

Verilen eşitlikte $C_{\text{ölçüm fazı}}$, ekstraksiyon sonrası ölçüm fazındaki analitin derişimini, $C_{\text{başlangıç}}$ ise analitin başlangıç çözeltisindeki derişimidir.

Doğrusallık: Analit derişimine karşılık elde edilen analitik sinyalin doğru orantılı bir şekilde artışıını ifade etmektedir. Korelasyon katsayısı (R^2) doğrusallığı belirtmektedir.

Çalışma Aralığı: Kalibrasyon eğrisinde analitin tayin edilebilen en küçük derişimi ve doğrusallıktan sapma meydana gelen derişim aralığını kapsamaktadır.

Seçme Sınırı (LOD): Analitin kantitatif sınırlar içerisine girmeyen en düşük derişimidir. Aşağıdaki eşitlikten hesaplanmıştır.

$$LOD = \frac{3s_{kr}}{m}$$

Eşitlikte yer alan $s_{kr}$ kr çözeltinin standart sapması, m ise kalibrasyon eğırisinin eğıimidir.

Tayin Sınırı (LOQ): Analitin belirli bir doğruluk ve kesinlikle tayin edilebildiğı en düşük derişimidir. Aşağıdaki eşitlikten hesaplanmıştır.

$$LOQ = \frac{10s_{kr}}{m}$$

Duyarlılık: Analitik yöntemin duyarlılığı, analitin derişiminde meydana gelen küçük değişimlere karşılık analitik sinyalin değişmesiyle ifade edilir.

2. MATERYAL VE METOT

Bu tez kapsamındaki deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar, cihazlar ve örneklerin toplanması, hazırlanması gibi adımlar aşağıda detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

2.1 Cihazlar

Ölçüm aşamasında, Shimadzu marka 1800 UV-Vis spektrofotometre kullanılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan tüm çözeltiler Milli-Q su arıtma sisteminden (Millipore, ABD) elde edilen ultra saf su kullanılarak hazırlandı. Ekstraksiyon ve örnek hazırlama adımlarında ultrasonik banyo (A SK5210LHC Kudos, Şanghay, Çin) ve dijital pH metre (Mettler Toledo FE28, Zürih, İsviçre) kullanılmıştır. Kemometrik analiz, deneysel tasarım ve optimizasyon adımları için Design-Expert® yazılımı sürüm 13 (Stat-Ease Inc., Minneapolis) kullanıldı.

2.2 Kimyasallar

Yapılan deneylerde kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Bu nedenle ileri bir saflaştırma adımı uygulanmadı. Eritrosin Sigma-Aldrich'ten (Steinheim, Almanya, saflık $\geq$ %95) satın alındı ve stok çözeltisi (10^{-4} mol L⁻¹) 250 mL saf su içerisinde 0.0219 gramlık kısmının çözündürülmesiyle hazırlandı. Eritrosin'in ekstraksiyon ve kalibrasyon çözeltileri stok çözeltinin saf su ile ardışık seyreltilmesiyle hazırlandı. Britton-Robinson (BR) tampon çözeltisi %100'lük CH₃COOH (Isolab) çözeltisinden 2.3 mL, % 85'lik H₃PO₄ (Merck) çözeltisinden 2.4 mL ve %100 saflıktaki H₃BO₃'ten (Carlo Erba Reaktifi) 2.47 g alınıp 1 L sulu çözeltinin hazırlanmasıyla elde edildi. Elde edilen çözelti 0.4 M olup farklı pH'lardaki tampon çözeltiler bu çözeltiye 3 M NaOH'un farklı miktarları ilave edilip pH-metre ile kontrol edilerek hazırlandı. Derin ötektik çözücülerin hazırlanmasında etilenglikol (saflık $\geq$ %99, Isolab), Dekanoik asit (saflık $\geq$ %99, Acros Organics), salisilik asit (saflık $\geq$ %99, Central Drug House), 1,2-propandiol (%99 saflıkta, Sigma-Aldrich), Kolin klorür (saflık $\geq$ %99, Sigma Aldrich), Laktik asit (saflık $\geq$ %85, Sigma Aldrich), L-prolin (saflık $\geq$ %99, Sigma Aldrich), Kaprilik asit (saflık $\geq$ %99, Sigma Aldrich) kullanıldı. Ekstraktın çözündürülmesinde kullanılan aseton (saflık $\geq$ %99.5) Isolab'tan temin edilmiştir. Deneysel süreçte kullanılan çeşitli cam, plastik vb. malzemeler kontaminasyonu engellemek amacıyla deneyden önce deterjanlı suyla iyice temizlenmiş ve durulanmıştır. Durulanan

malzemeler %5'lik HNO_3 çözeltisinde bekletildikten sonra bol suyla tekrar durulanıp hazır hale getirilmiştir.

2.4 Örnek toplama ve hazırlama

Meyveli bitki çayı, yumuşak şeker, böğürtlen aromalı draje, meyveli toz içecek, meyveli damla çikolata, dudak kremi, meyveli lokum, çilekli süt, meyveli şerbet, meyve suyu ve meyveli yoğurt Sivas'taki yerel marketlerden ağır kesici hap ise eczaneden temin edilmiştir. Örnek hazırlama aşamasında katı örneklerden 1 g, sıvı örneklerden ise 5 mL alınıp 50 mL'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Tüplere 10 mL etanol ilave edildikten sonra, tüpler ultrasonik banyoya yerleştirildi ve 30°C de 52 kHz'de 1.5 saat sonikasyon uygulandı. Sonikasyonun ardından, katı örnekler 10-15 μm gözenek boyutuna sahip filtre kağıdı (Isolab marka, boyut 110 mm) kullanılarak süzüldü. Hazırlanan örneklerin 3 mL' sine geliştirilen yöntem uygulandı.

2.5 DES hazırlama

DES'ler hidrojen bağı alıcısının (HBA) ve hidrojen bağı vericisinin (HBD) belirli bir mol oranında ve uygun sıcaklıkta karıştırılmasıyla hazırlandı. Bu amaçla literatürdeki bir çalışmada yer alan yöntemle göre 5 farklı DES hazırlanmıştır [53]. Hazırlanan DES'lerde kolin klorür, etilen glikol ve dekanolik asit HBA olarak, 1,2-propandiol, kaprilik asit, laktik asit, L-prolin ve salisilik asit ise HBD olarak kullanılmıştır. HBA ve HBD belirli bir mol oranında beherde eklendi. Elde edilen karışım, manyetik bir ısıtıcıda berrak sıvı elde edilene kadar karıştırılarak ısıtıldı. Berrak sıvı DES'lerin hazırlandığını göstermektedir. Hazırlanan DES'ler oda sıcaklığına soğutulduktan sonra mikroekstraksiyon çalışmalarında test edildi. Test edilen DES'lerin bileşenleri, molar oranı ve kısaltmaları Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Hazırlanan DES'lerin molar oranları, bileşenleri ve kısaltmaları

Kısaltması	Bileşen-1	Bileşen-2	Molar oran	Geri kazanım (%)
DES-1	1,2-propandiol	Kolin klorür	1:2	92,7
DES-2	Kaprilik asit	Kolin klorür	1:2	65,2
DES-3	Laktik asit	Kolin klorür	1:2	45,8
DES-4	L-proline	Ethylene glycol	1:2	25,7
DES-5	Salisilik asit	Dekanoik asit	1:2	75,9

2.6 Deneysel modelleme

DES-SA-LLME yönteminin temel mikroekstraksiyon faktörlerinin optimizasyonu için kemometrik yaklaşıma dayalı merkezi kompozit tasarımı (CCD) uygulandı. Ön deneylerin sonucundan yola çıkarak, CCD tarafından optimizasyon için pH (A) DES-1 hacmi (B), sıcaklık (C) ve sonikasyon süresi (D) temel mikroekstraksiyon faktörleri olarak seçildi. Bunlara paralel olarak dört değişkenli ve beş seviyeli bir CCD oluşturulmuştur. Altısı merkezi çalışma olmak üzere toplam 30 deney yapıldı. CCD'nin faktörleri, seviyeleri, birimleri ve sembolleri Çizelge 2.2'de verilmiştir.

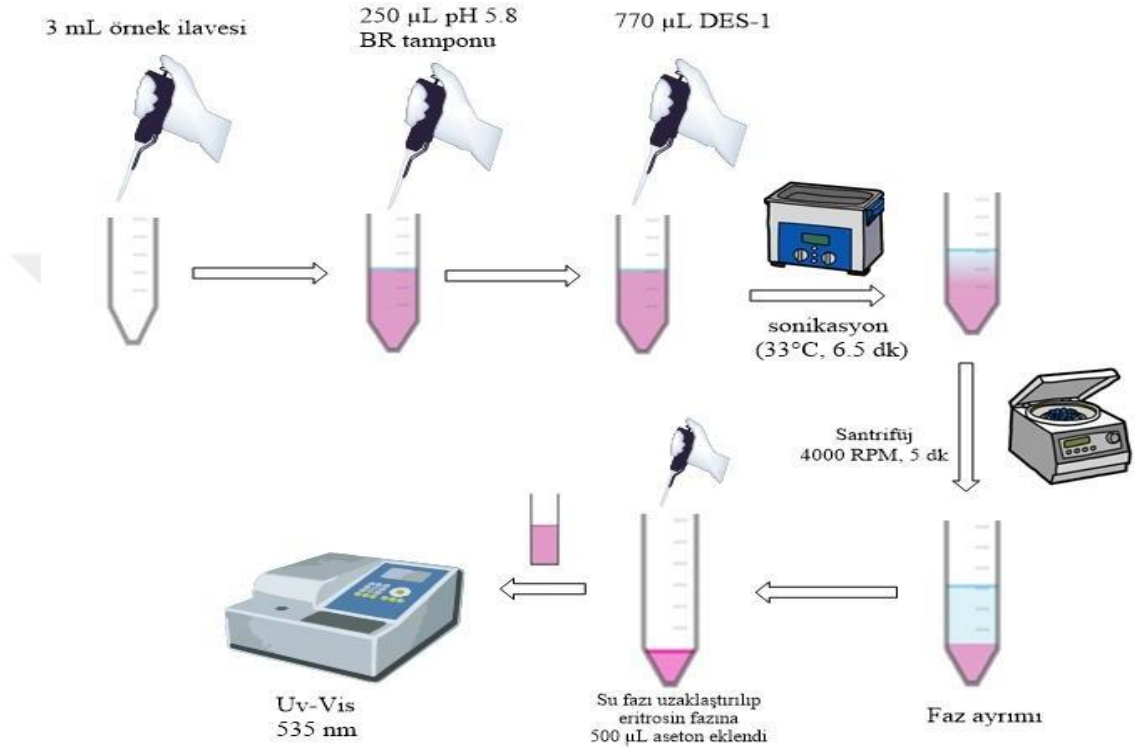
Çizelge 2.2 CCD'deki değişkenler, birimleri ve sembolleri

Değişkenler	Sembol	Birim	Düşük	Orta	Yüksek	-α	+α
pH	A		5,5	8	10,5	4,75	11,25
DES-1 hacmi	B	μL	200	500	800	110	890
Sıcaklık	C	°C	30	37,5	45	27,75	47,25
Sonikasyon süresi	D	dk	3	5	7	2,4	7,6

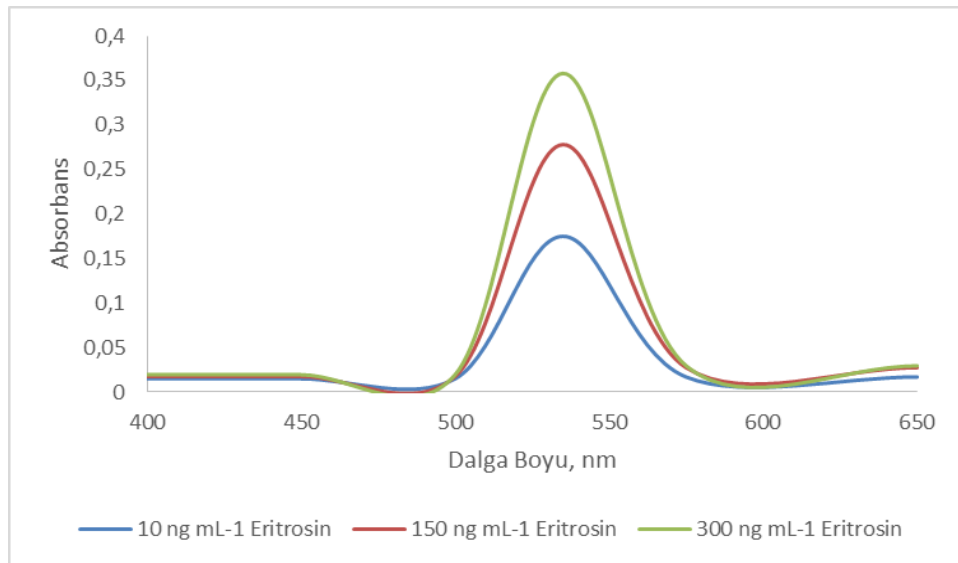
2.7 DES-SA-LLME Yöntemi

Yöntemin ilk aşamasında, bölüm 2.3'te açıklandığı şekliyle hazırlanan numunenin 3 mL'si, içerisinde 1,2 mg L⁻¹ standart Eritrosin bulunan 15 mL'lik falkon santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Daha sonra, numunelerin pH'sı BR tamponundan 250 μL eklenerek pH=5,8'e ayarlandı. Ekstraksiyon çözücüsü olarak 770 μL DES-1 (sırasıyla 1:2 mol oranında 1,2-propandiol:kolin klorür) Eritrosin'i numuneden ekstrakte etmek için tüm tüplere ilave edildikten sonra, Eritrosin ve ekstraksiyon çözücüsünün temasını kolaylaştırmak ve etkin bir kütle transferi sağlamak için tüplere 33°C'de 6,5dakika sonikasyon uygulandı. Sonikasyondan sonra Eritrosin'i içeren ekstraksiyon

fazını ayırmak için tüpler 4000 rpm’de 5 dakika santrifüjlendi. Santrifüj işlemi sonrasında Eritrosin’i içeren ekstraksiyon fazı tüpün dibinde toplandı. Sulu faz üst kısımdan uzaklaştırıldıktan sonra tüpün dibinde kalan ekstraksiyon fazına 500 μ L aseton eklendi ve karıştırıldı. Bu işlem sonucunda elde edilen çözelti mikro kuvars tüplere alınarak 535 nm’de UV-Vis spektrofotometresi kullanılarak absorbans ölçümü gerçekleştirildi.



Şekil 2.1 DES-SA-LLME yönteminin şematik gösterimi



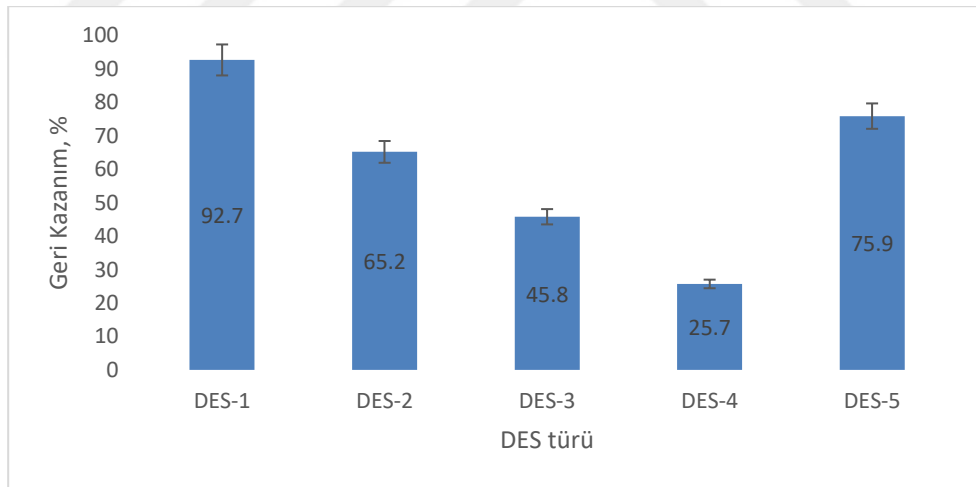
Şekil 2.2 Eritrosin’in farklı derişimlerinden elde edilen UV spektrumları

3. BULGULAR

Eritrosin'in gıda, ilaç ve kozmetik örneklerinden spektrofotometrik tayininden önce ultrason destekli mikroekstraksiyonu için geliştirilen yöntem DES-SA-LLME kullanılmıştır. pH, sıcaklık, DES hacmi, sonikasyon süresi gibi deneysel parametreler optimize edilmiştir. Son aşamada, geliştirilen yöntem bölüm 2.3 de hazırlanan örneklerle standart ekleme-geri kazanma çalışmaları ile uygulanmıştır.

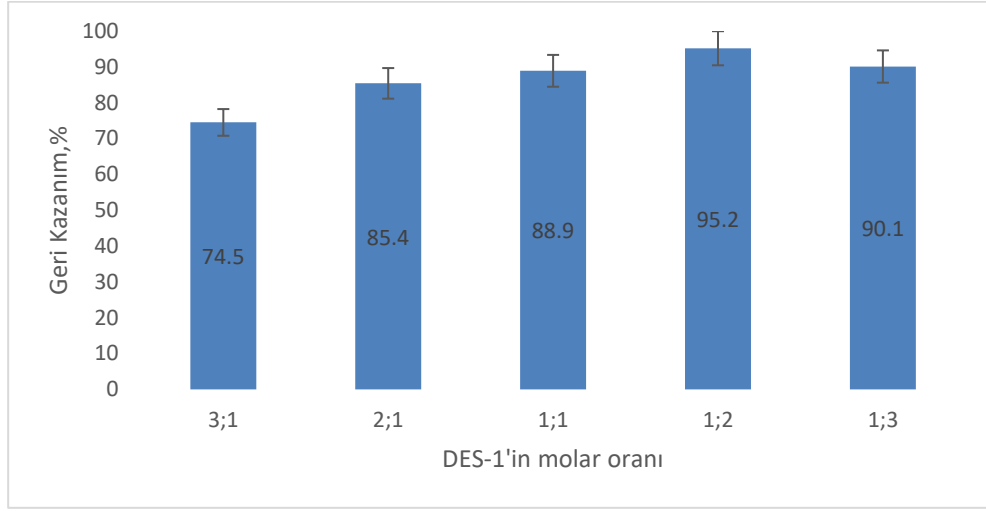
3.1 Yapılan ön çalışmalar

Mikroekstraksiyon tekniklerinde ekstraksiyon veriminin yüksek olması için uygun çözücünün seçimi oldukça önemlidir. Burada ekstraksiyon çözücüsü DES olduğu için ekstraksiyon verimi DES'in bileşenlerine ve bileşenlerin molar oranına bağlıdır. Bu çalışmada beş farklı DES, Eritrosin'in ekstraksiyonu için test edilmiştir. Test edilen DES'lerin eşit hacimleri bu amaçla kullanılmıştır. Yapılan uygulama sonucu elde edilen geri kazanım değerleri Çizelge 2.1 ve Şekil 3.1'de verilmiştir. Görüldüğü üzere en yüksek geri kazanım değeri (%92,7) 1,2-propandiol ve kolin klorürden oluşan DES-1'den elde edilmiştir.



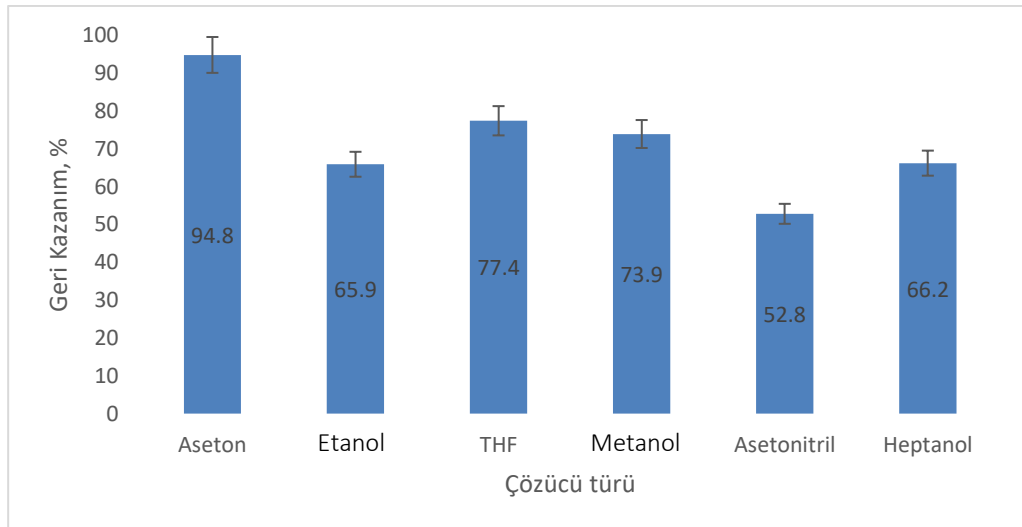
Şekil 3.1 DES türünün Eritrosin geri kazanımına etkisi

DES-1 bileşenlerinin belirlenmesinin ardından bu bileşenlerin en etkili molar oranı belirlenmeye çalışıldı. Bu amaca uygun olarak DES-1'in bileşenleri farklı mol oranında karıştırıldı ve geri kazanım değerleri kaydedildi (Şekil 3.2). Çalışmalar sonucunda en yüksek geri kazanım değeri olan %95,2 DES-1 bileşenleri olan 1,2-propandiol ve kolin klorürün 1:2 molar oranında elde edilmiştir.



Şekil 3.2 DES-1 bileşenlerinin molar oranının Eritrosin geri kazanımına etkisi

Ayrıca iyonik şiddetin ekstraksiyon verimini etkileyebileceği düşünülerek, ön çalışmalar kapsamında farklı derişimlerde (0-%5 (k/h)) KNO_3 ekstraksiyon ortamına ilave edildi ve iyonik şiddetin faz ayrımı ve Eritrosin'in geri kazanımına olan etkisi incelendi. Burada herhangi bir etki gözlemlenemediği için numune çözeltisinin iyonik şiddetini ayarlamak üzere herhangi bir tuz çözeltisi eklenmemiştir. Eritrosin'in numune ortamında ekstraksiyonu aşamasında, sulu kısmın uzaklaştırılmasıyla elde edilen ekstraksiyon fazının spektrofotometrik ölçüme hazırlanması amacıyla çözündürülmesi için uygun çözücünün seçilmesi amaçlandı. Bu doğrultuda 6 farklı çözücü test edildi. En yüksek Eritrosin geri kazanımı %94,8 ile aseton kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Çözücü türünün Eritrosin geri kazanımına etkisi

3.2 Kemometrik analiz

Kemometrik analiz, Design-Expert® yazılımının kullanılmasıyla Çizelge 3.1’de sunulan verilerin işlenmesi yoluyla gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmalarından elde edilen ANOVA sonuçları ise Çizelge 3.2’de sunulmuştur. ANOVA sonuçlarında en önemli parametrelerden biri p değeridir. %95 güven düzeyinde, CCD modelinin p değerinin 0,05’ten küçük olması modelin anlamlı olduğunu ifade etmektedir. Çizelge 3.2’den modelin p değerinin 0,05’ten oldukça küçük olduğu görülmektedir. Buna göre, oluşturulan CCD modelinin Eritrosin’in ekstraksiyonu için anlamlı olduğu kanısına varılmaktadır. Çizelge 3.2’den faktörlerin p değerlerine bakıldığında DES-1 hacmi ve sıcaklık (BC) ikili etkileşimi ile pH (A²) karesel etkileşiminin p değerlerinin 0,05’ten büyük olduğu görülmektedir. Bahsi geçen etkileşimler hariç diğer tüm etkileşimlerdeki CCD faktörleri model için anlamlıdır. ANOVA tablosunda yer alan F değerleri faktörlerin oluşturulan CCD modeline katkısını ifade etmektedir. Bir faktörün F değeri sayısal olarak ne kadar büyükse ilgili faktörün modele katkısı o kadar fazladır. Çizelge 3.2’den görüldüğü üzere 329,13 F değeri ile CCD modeline en fazla katkı yapan faktör sıcaklık-sonikasyon süresi (CD) ikili etkileşimidir. ANOVA tablosundaki diğer bir önemli parametre lack of fit p-değeridir. Lack of fit p-değeri oluşturulan CCD modelinin tekrarlanabilirliğini ifade etmektedir. Yani sonuçlara belirsiz hataların etkisinin önemini açıklamada kullanılır. Bu değerin %95 güven düzeyinde 0,05’ten büyük olması istenmektedir. Çizelge 3.2’den görüleceği üzere modelin lack of fit p-değeri 0,0943 olarak istenileni karşılamaktadır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda yapılan açıklamalardan yola çıkılarak geliştirilen CCD modelinin anlamlı olduğu kanısına varılmaktadır. Buna paralel olarak Eritrosin’in geri kazanımı aşağıdaki ikinci dereceden denklem ile ifade edilmektedir.

$$\text{Geri kazanım (\%)} = +74,84 -1,08A +2,48B +0,9711C +1,14D -2,54AB +3,1AC -2,31AD + 0,0063BC +2,32BD -4,48CD -0,7930A^2 +6,25B^2 +4,77C^2 -5,35D^2$$

Oluşturulan CCD modeline ait kalite parametreleri Çizelge 3.3’de verilmiştir. Kurulan CCD modeline ilişkin analitik sonuçların güvenilirliğini belirtmek adına R² sayısal değerlerinin 1’e yakın olması istenilir. Ayrıca düzeltilmiş R² değeri ve tahmini R² değerlerinin arasındaki farkın 0,2’den az olması gerekmektedir. Yapılan bu açıklamalar Çizelge 3.3’deki R² değerleri (R²: 0,9906, düzeltilmiş R²: 0,9818, tahmini R²: 0,9504) ile uyumludur. Çalışmadan elde edilen analitik sonuçların güvenilirliği

Şekil 3.4’de görülen gerçek ve tahmini değerler arasındaki uyumdan da anlaşılmaktadır.

Çizelge 3.1 Kurulan modele ait CCD ve sonuçları

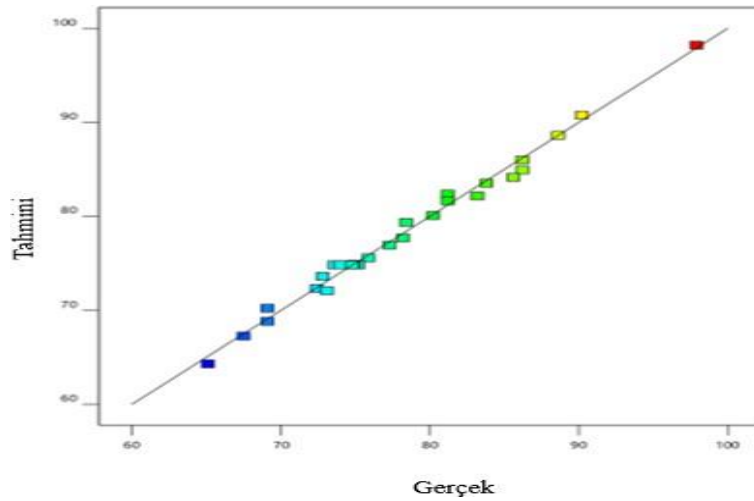
Deney	A	B	C	D	Deneysel	Modelin
		μL	$^{\circ}\text{C}$	dk	Geri Kazanım %	Geri kazanım %
1	5,5	200	45	7	69,1	70,24
2	10,5	800	45	7	78,4	79,35
3	8	500	37,5	5	74	74,84
4	8	500	37,5	7,6	67,5	67,27
5	10,5	200	45	7	74,8	74,82
6	10,5	800	30	7	80,2	80,10
7	8	500	37,5	5	74,8	74,84
8	5,5	800	30	3	78,2	77,73
9	5,5	200	30	3	72,4	72,32
10	5,5	800	30	7	97,9	98,21
11	5,5	200	45	3	77,3	76,95
12	5,5	800	45	3	81,2	82,38
13	10,5	200	30	3	72,8	73,61
14	8	500	37,5	5	74,2	74,84
15	5,5	200	30	7	83,8	83,53
16	11,25	500	37,5	5	73,1	72,10
17	10,5	800	45	3	86,2	86,02
18	10,5	800	30	3	69,1	68,84
19	8	500	37,5	5	74,9	74,84
20	8	500	27,75	5	81,2	81,63
21	8	500	47,25	5	85,6	84,16
22	8	110	37,5	5	83,2	82,17
23	8	500	37,5	5	75,2	74,84
24	8	500	37,5	5	73,6	74,84
25	10,5	200	30	7	75,9	75,59
26	8	500	37,5	2,4	65,1	64,32
27	8	890	37,5	5	88,6	88,62
28	4,75	500	37,5	5	74,9	74,89
29	5,5	800	45	7	86,2	84,94
30	10,5	200	45	3	90,2	90,76

Çizelge 3.2 Geliştirilen yöntemin ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F-değeri	p-değeri	
Model	1540,73	14	110,05	112,73	< 0,0001	Anlamlı
A	22,41	1	22,41	22,96	0,0002	
B	119,48	1	119,48	122,39	< 0,0001	
C	18,28	1	18,28	18,72	0,0006	
D	25,02	1	25,02	25,63	0,0001	
AB	103,53	1	103,53	106,05	< 0,0001	
AC	156,88	1	156,88	160,70	< 0,0001	
AD	85,10	1	85,10	87,17	< 0,0001	
BC	0,0006	1	0,0006	0,0006	0,9801	
BD	86,03	1	86,03	88,12	< 0,0001	
CD	321,31	1	321,31	329,13	< 0,0001	
A ²	4,37	1	4,37	4,47	0,0516	
B ²	271,07	1	271,07	277,67	< 0,0001	
C ²	157,91	1	157,91	161,76	< 0,0001	
D ²	198,67	1	198,67	203,51	< 0,0001	
Lack of Fit	12,77	10	1,28	3,40	0,0943	Anlamsız

Çizelge 3.3 CCD modeline ait kalite parametreleri

Standart sapma	0,9880	R ²	0,9906
Ortalama	77,99	Düzeltilmiş R ²	0,9818
Değişim katsayısı %	1,27	Tahmini R ²	0,9504

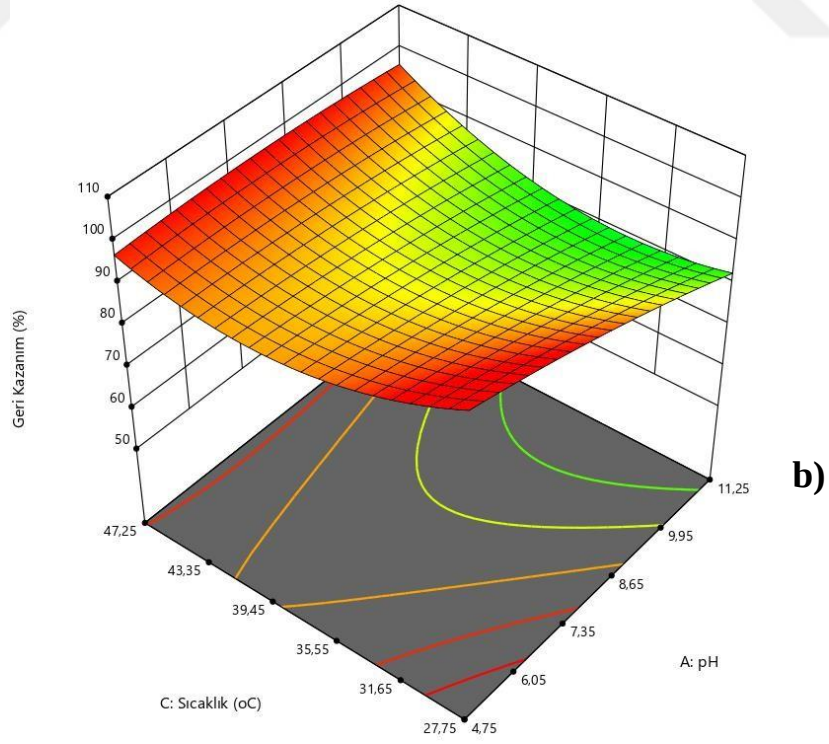
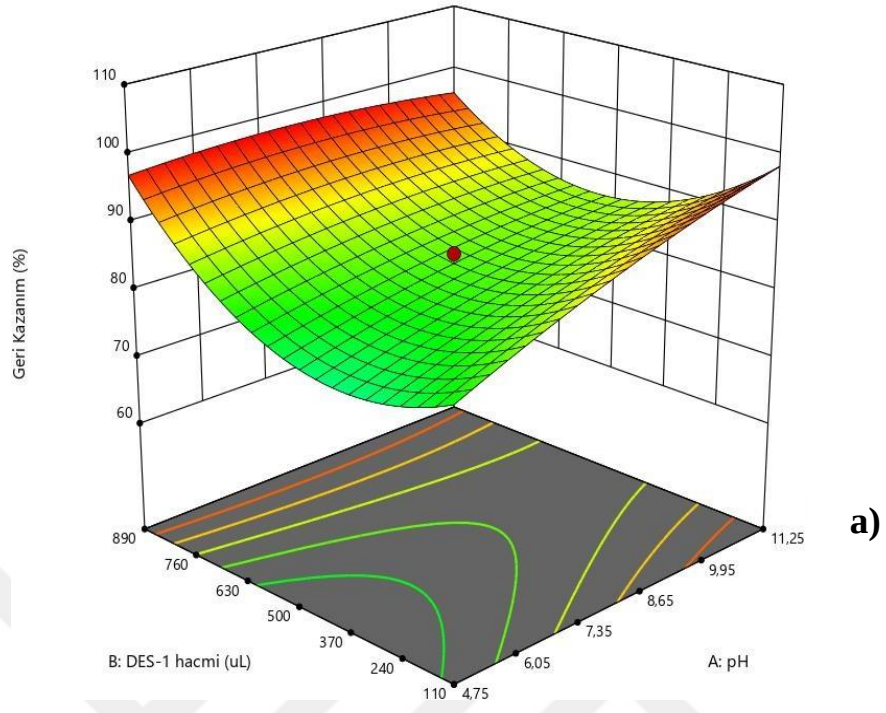


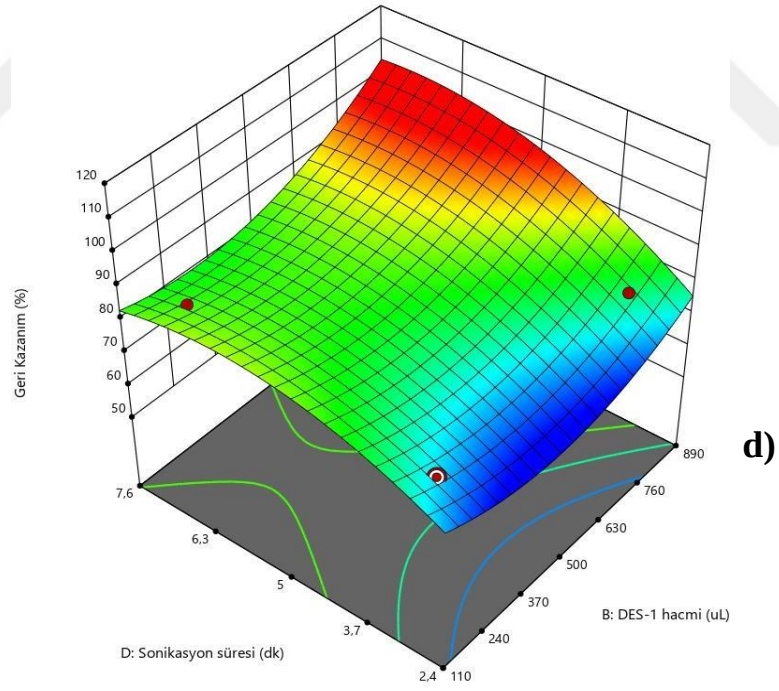
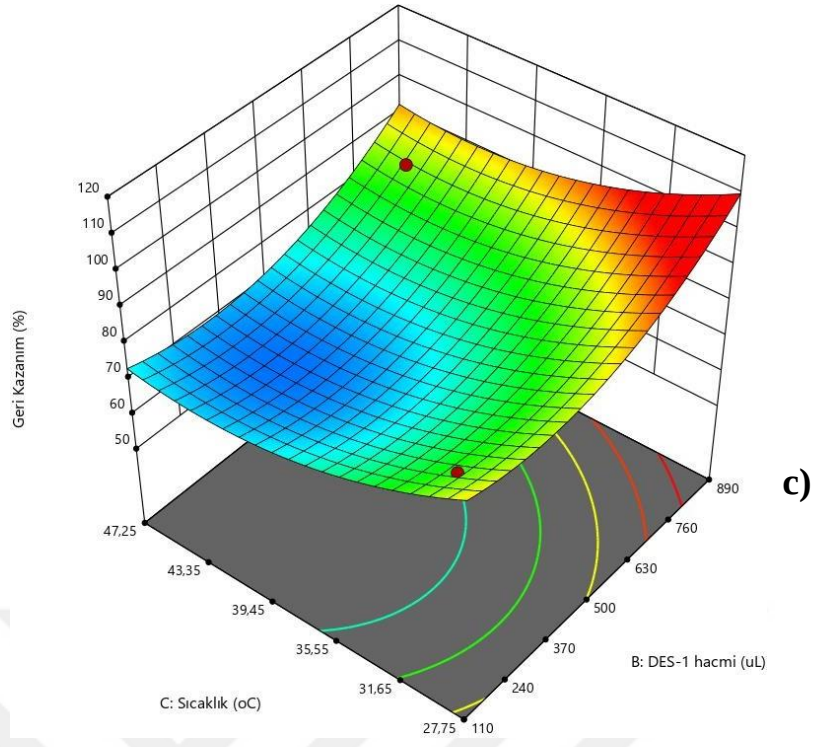
Şekil 3.4 Tahmini ve gerçek değerler arasındaki regresyon

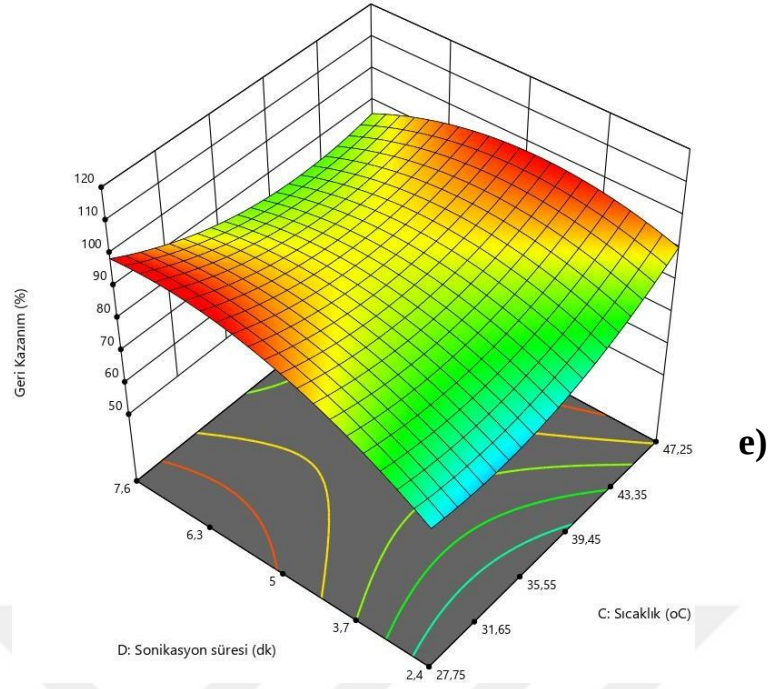
3.3 Faktörlerin etkisi

Kemometrik modelde sunulan ikili etkileşimlerin Eritrosin'in geri kazanımına etkileri 3D yüzey yanıt grafikleri çizilerek incelendi. Şekil 3.5 (a)'da DES-1 hacmi ve pH ikili etkileşiminin Eritrosin'in geri kazanımına olan etkisi verilmiştir. Buna göre, DES-1 hacminin 760 μL 'nin üzerinde olduğu hacimlerde, tüm pH değerlerinde Eritrosin'in geri kazanımı nicel değerlerdedir. DES-1 hacmi 760 μL 'nin altında iken geri kazanımın yüksek olabilmesi için pH'nın 8,65'in üzerinde olması gerektiği görülmektedir. Şekil 3.5 (b)'de sıcaklık ve pH'nın geri kazanıma etkisi incelendiğinde, pH 9,5'in üzerinde ve sıcaklık 35,5-44°C aralığında iken Eritrosin'in geri kazanımının daha düşük olduğu görülmektedir. Fakat sıcaklık 35,5°C'nin altında, pH ise 9,5 seviyelerinin aşağılarında iken ve sıcaklık 45°C'nin üzerindeyken tüm pH seviyelerinde Eritrosin'in geri kazanımı yüksektir. Sıcaklık ve DES-1 hacminin geri kazanıma etkisi Şekil 3.5 (c)'de verilmiştir. Grafikten anlaşılabacağı üzere, sıcaklık 35 °C'in altındayken ve DES-1 hacmi 750 μL 'nin üzerindeyken Eritrosin geri kazanımı niceldir.

Sonikasyon süresi ve DES-1 hacmini Eritrosin geri kazanımına etkisini veren grafiğe (Şekil 3.5 (d)) bakıldığında, 5 dk'nın üzerindeki sonikasyon sürelerinde ve DES-1 hacmi 760 μL 'den daha fazla olduğunda Eritrosin geri kazanımı niceldi. Sıcaklık ve sonikasyon süresinin Eritrosin geri kazanımına olan etkisi Şekil 3.5 (e)'den incelendiğinde, sıcaklık 35,5°C'nin altındayken sonikasyon süresi 5 dk'nın üzerinde tutulduğunda ve sıcaklık 44°C'nin üzerindeyken sonikasyon süresinin ise 3,7 ve 7 dakika aralığında olduğunda Eritrosin'in geri kazanımının yüksek olduğu görülmektedir.



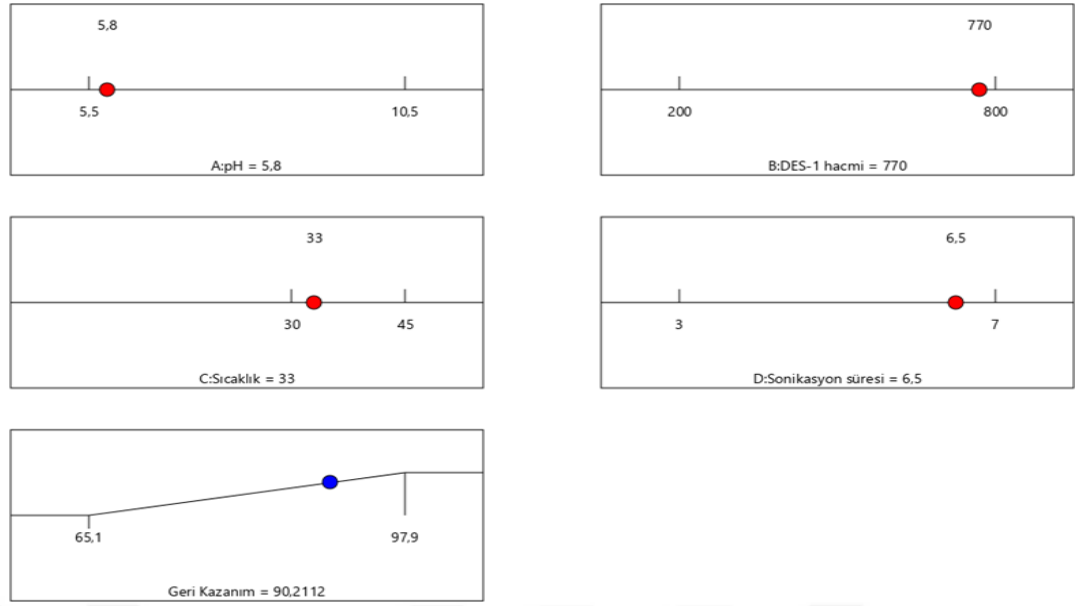




Şekil 3.5 (a-e) Eritrosin'in CCD için yanıt yüzey grafikleri: (a) pH-DES-1 hacmi (μL); (b) pH-Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$); (c) DES-1 hacmi (μL)-Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$); (d) DES-1 hacmi (μL)-Sonikasyon süresi (dk); (e) Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)-Sonikasyon süresi (dk)

3.4 Optimum koşullar

ANOVA değerlendirmesi ve faktörlerin etkileşimleri dikkate alınarak, çalışılan 4 faktörün CCD'ye göre optimum değerleri 5,8 pH, 770 μL DES-1 hacmi, 33 $^{\circ}\text{C}$ sonikasyon sıcaklığı ve 6 dakika sonikasyon süresi olarak kaydedilmiştir. 1,0 arzu edilebilirlik katsayısı için bu optimal koşullarda CCD tarafından tahmin edilen geri kazanım %90,2 bulunmuştur. Üç tekrarlı deneysel çalışmanın sonuçlarından elde edilen ortalama geri kazanım ise %91,8 olarak hesaplanmıştır. CCD modelinin tahmini ve deneysel sonuçlar arasındaki bu uyum ekstraksiyon koşullarının optimum olduğunu göstermektedir. Bu nedenle yapılan çalışmalar bu koşullarda kullanılmıştır.



Şekil 3.6 CCD modeli tarafından oluşturulan değişkenler için optimum değerler ve tahmin edilen geri kazanım

3.5 Yöntemin analitik özellikleri

Optimizasyon adımının tamamlanmasının ardından yapılan validasyon çalışmasıyla önerilen DES-SA-LLME yönteminin analitik parametreleri, matriks uyumlu kalibrasyon çözeltileri kullanılarak yapılan çalışmalarla belirlendi (Çizelge 3.4). Bahsi geçen kalibrasyon çözeltileri seçilen numuneler üzerine farklı miktarlarda standart Eritrosin derişimleri eklenerek yapılmıştır. Ortam benzerliği sağlandıktan sonra potansiyel matriks etkisi sonuçlara yansıtıldı. Deneysel çalışmalar sonucunda DES-SA-LLME yöntemi için dinamik lineer aralık $1\text{-}400\text{ ng mL}^{-1}$ olarak hesaplandı. LOD, LOQ ve EF sırasıyla $0,33\text{ ng mL}^{-1}$, $1,0\text{ ng mL}^{-1}$ ve 175 bulundu. Ayrıca, 10 ng mL^{-1} Eritrosin içinsüründürülen tekrarlı çalışmalar için bağıl standart sapma (%BSS) ve geri kazanım değerleri sırasıyla %2,2 ve %97,8 bulundu.

Çizelge 3.4 DES-SA-LLME yönteminin analitik parametreleri

Analitik özellikler	Optimum değerler
Çalışma aralığı, ng mL^{-1}	1-400
Korelasyon katsayısı, r^2	0,994
Seçme sınırı, ng mL^{-1}	0,33
Tayin sınırı, ng mL^{-1}	1,0
Zenginleştirme faktörü	175
*Bağıl standart sapma, %	2,2
*Geri kazanım, %	97,8

* Optimum koşullarda Eritrosin'in 10 ng mL^{-1} derişimi için yapılan tekrarlı çalışma sonucu

3.6 Gün için ve günler arası çalışmalar

Önerilen yöntemin kesinliği numune çözeltilerine eklenen üç Eritrosin derişimiyle (10, 150 ve 300 ng mL⁻¹) gün içi ve günler arası çalışmalar yapılarak test edilmiştir. Gün içi çalışmalarda, eklenen Eritrosin derişimlerinin ekstraksiyonu ve analizi bir gün içinde üç tekrar halinde gerçekleştirilirken, günler arası çalışmada, aynı derişimlerin ekstraksiyonu ve analizi birbirini takip eden üç gün içinde, üç tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. Eklenen her Eritrosin derişimi için %BSS ve geri kazanım değerleri hesaplandı. BSS değerinin gün içi ve gün arası çalışmalarda sırasıyla %2,1-2,8 ve %2,7-3,2 aralığında değişim gösterdiği kaydedildi. Geri kazanım değerleri gün içi çalışmalarda %94,2-97,5 aralığında iken günler arası çalışmalarda ise %91,7-96,9 aralığında bulundu. Kapsamlı veriler Çizelge 3.5’de görülebilir. Elde edilen BSS ve geri kazanım değerlerine bakıldığında önerilen DES-SA-LLME yönteminin iyi bir kesinlikve yüksek doğruluk gösterdiği söylenebilir.

Çizelge 3.5 Geliştirilen yöntem için gün içi ve günler arası kesinlik çalışması

Çalışma	Eklenen, ng mL ⁻¹	Bulunan, ng mL ⁻¹	BSS, %	Geri kazanım, %
Gün içi (N=3)	10	9,75	2,1	97,5
	150	143,7	2,4	95,8
	300	282,6	2,8	94,2
Günler arası (N=3x5)	10	9,69	2,7	96,9
	150	142,2	3,1	94,8
	300	275,1	3,2	91,7

3.7 Yöntemin seçiciliği

Sonuçların güvenilirliğinin test edilmesi için optimize edilmiş koşulların seçiciliği incelenmiştir. Bu amaçla model çözeltilere Çizelge 3.6’deki matriks türleri ilave edildi ve oluşan karışıma önerilen DES-SA-LLME yöntemi uygulandı. Elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak her tür için tolere edilebilir limit, BSS ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Tolere edilebilir sınırın hesaplanmasında, Eritrosin’in absorbansında $\pm\%5$ ’lik bir değişikliğe neden olan iyon miktarının, eklenen Eritrosin miktarına oranından faydalanıldı. Çizelge 3.6’daki sonuçlar DES-SA-LLME yönteminin benzer kimyasal türlerin varlığında bile yüksek tolere edilebilir limitler sergilediğini göstermektedir. Ayrıca yine aynı çizelgeden geri kazanım değerlerinin (%95,2-99,1) nicel düzeyde olduğu ve BSS’lerin (1,7-2,6) istenen sınırın (%5) altında olduğu görülmektedir.

Çizelge 3.6 Geliştirilen yöntemin bazı anyon ve katyonlar varlığındaki seçiciliği

Kimyasal türler	Tolerans limiti	Geri kazanım, %	BSS, %
As (III)	1500	97,2	1,7
Mg (II)	1500	98,5	2,3
Al (III)	1500	98,2	2,2
Co (II)	1000	99,1	2,5
SCN (I)	1000	96,4	1,9
Mn (II)	750	96,8	1,8
Cr (III)	750	97,0	2,3
Cu (II)	750	97,6	2,1
Cd (II)	500	96,1	2,6
Pb (II)	250	95,2	2,0
Fe (III)	250	96,3	1,9
Sr (II)	100	96,9	2,4
Ni (II)	100	95,4	2,6

3.8 Çeşitli numunelerin analizi

Yöntemin geçerlilik çalışmaları tamamlandıktan sonra, DES-SA-LLME yönteminin farklı örneklerle uygulanabilirliği standart ekleme yaklaşımı kullanılarak araştırılmıştır. Bu bağlamda gıda, ilaç ve kozmetik grubundan oluşmak suretiyle 12 farklı örnek, geliştirilen DES-SA-LLME yöntemine tabi tutulmuştur. Bölüm 2.3’de anlatıldığı gibi hazırlanan örneklerle 100 ng mL⁻¹ standart Eritrosin ilavesi yapıldı ve daha sonra ilgili örneklerle DES-SA-LLME yöntemi uygulandı. Geliştirilen yöntem ağrı kesici hap için uygulandığında faz ayrımı elde edilememiştir. Çizelge 3.7’de görüldüğü gibi her örnek için geri kazanım ve BSS değerleri hesaplandı. Buna göre, %94,8-102,7 aralığında yüksek geri kazanımlar elde edilirken, %1,8-3,4 aralığında elde edilen düşük bağlı standart sapma değerleri yöntemin kesinliğinin iyi olduğunu göstermektedir. En yüksek Eritrosin miktarı (234,1 ng mL⁻¹) toz içecekte tespit edildi. 70 kg vücut ağırlığındaki bir bireyin güvenli Eritrosin alım aralığının üst sınırı (günlük) 0,7 mg olarak ele alındığında, tespit edilen en yüksek Eritrosin miktarının bu sınırın oldukça altında olduğu görülmektedir.

Çizelge 3.7 Geliştirilen yöntemin çeşitli örneklerle uygulanmasından elde edilen sonuçlar

Örnekler	Eklenen, ng mL ⁻¹	Bulunan, ng mL ⁻¹	Geri kazanım, %	BSS, %
Meyveli bitki çayı	-	T.S.A*	-	-
	100	98,2	98,2	2,2
Yumuşak şeker	-	3,3	-	2,7
	100	99,4	96,1	2,1
Böğürten aromalı draje	-	18,6	-	3,2
	100	116,4	97,8	3,4
Meyveli jelibon	-	10,9	-	2,5
	100	106,4	95,5	2,7
Meyve suyu	-	78,1	-	1,8
	100	175,3	98,2	2,3
Meyveli yoğurt	-	T.S.A	-	-
	100	99,4	99,4	3,4
Şerbet	-	T.S.	-	-
	100	101,8	101,8	2,6
Çilekli süt	-	T.S.A	-	-
	100	102,7	102,7	2,9
Meyveli lokum	-	7,2	-	2,0
	100	102,3	95,1	2,4
Dudak kremi	-	185,2	-	1,9
	100	281,4	96,2	2,3
Toz içecek	-	234,1	-	2,8
	100	328,9	94,8	3,0

* Tayin sınırının altında,

3.9 Diğer analitik yöntemlerle karşılaştırma

Geliştirilen DES-SA-LLME yönteminin çalışma aralığı, LOD, BSS, EF, geri kazanım gibi analitik parametreleri literatürdeki diğer yöntemlerdeki parametrelerle kıyaslandı. İlgili veriler Çizelge 3.8’de sunulmuştur. Geliştirilen yöntemin çalışma aralığının literatürden örnek verilen çalışmaların çoğundan daha geniş bir aralığı kapsadığı görülmektedir. EF, literatürde yer alan tekniklerin bildirdiği değerden daha iyidir. Önerilen yöntemin BSS, LOD ve geri kazanım değerlerinin oldukça tatmin edici olduğu ilgili çizelgeden görülmektedir.

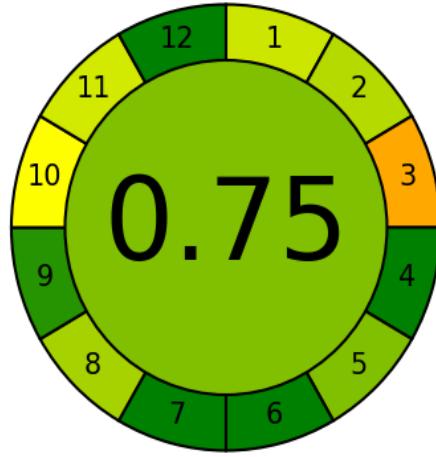
Çizelge 3.8 Geliştirilen yöntemin literatürdeki diğer yöntemlerle karşılaştırılması

Analitik Yöntem	Çalışma Aralığı (ng mL ⁻¹)	LOD (ng mL ⁻¹)	BSS (%)	EF	Geri Kazanım (%)	Kaynak
DES-UA-LLME	0,05–0,25	3,75	≤4,6	40	90-100	[56]
HIH-LLM	30-1400	6	≤2,9	37,5	95-101	[57]
SHS-LLME	86,3-1000	≤25,9	≤4,1	19,9	94,6-103,9	[58]
MSPE	100-500	60	≤5	6,7	94,8-97,6	[59]
UA-SM-DSLLME	1-100	0,6	1,4	142	91,7-93,9	[60]
LPME	8,4-8000	3,2	3,9	-	94-96	[61]
DES-SA-LLME	1-400	1,0	2,2	175	94,8-102,7	Önerilen yöntem

DES-UA-LLME: Derin ötektik solvent ultrason destekli sıvı-sıvı mikroekstraksiyon, HIH-LLME: Isı kaynaklı homojen sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu, SHS-LLME: Değiştirilebilir hidrofilik solvent sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu, MSPE: Manyetik katı faz ekstraksiyonu, UA-SM-DSLLME: Ultrason destekli supramoleküler çözücü bazlı dağılma-katılma sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu, LPME: Sıvı faz mikroekstraksiyonu, , EF: Zenginleştirme faktörü, BSS: Bağlı standart sapma, LOD: seçme sınırı.

3.10 Geliştirilen yöntemin yeşil profili

Önerilen DES-SA-LLME yönteminin yeşil profili Analitik Yeşil Özellik Hesaplayıcı (AGREE) kullanılarak değerlendirilmiştir. AGREE, geliştirilen yöntemin yeşil profili hakkında bilgi vermek üzere 12 kriteri değerlendirmektedir. Bu 12 kriter şu şekildedir; (1) numune işlemekten kaçınmak için doğrudan analitik tekniklerin uygulanması, (2) örnek miktarının minimum seviyelerde olmasının hedeflenmesi, (3) yerinde ölçüm, (4) analitik süreç ve işlemlerin entegrasyonu, (5) otomasyona ve minyatürizasyona uygun yöntemlerin seçilmesi, (6) türevlendirmeden kaçınma, (7) analitik atık oluşumunun engellenmesi, (8) çok analitli veya çok parametrelili analitik tekniklerin kullanılması, (9) kullanılan enerjinin en aza indirgenmesi, (10) yenilebilir kaynaklardan elde edilen reaktiflerin kullanılması, (11) toksik reaktiflerin kullanımının ortadan kaldırılması, (12) Operatör güvenliğinin sağlanması. Geliştirilen analitik yöntem bu on iki kriter üzerinden değerlendirilir ve yöntem için 0 ile 1 arasında genel bir puan belirlenir. Belirlenen bu puan yöntemin yeşil profilinin ortaya koymaktadır [62]. Önerilen DES-SA-LLME yöntemi için tüm kriterler değerlendirildiğinde 0,75 genel puan elde edilmiştir. Genel kabule göre 0.6 ve üzerindeki sayı değerleri yöntemin yeşil karakterde olduğunu belirtmektedir. Elde edilen puan bağlamında önerilen DES-SA-LLME yönteminin yeşil karakterde olduğunu rahatlıkla söyleyebiliriz.



1. Sample treatment
2. Sample amount
3. Device positioning
4. Sample prep. stages
5. Automation, miniaturization
6. Derivatization
7. Waste
8. Analysis throughput
9. Energy consumption
10. Source of reagents
11. Toxicity
12. Operator's safety

Şekil 3.7 AGREE kriterleri ve geliştirilen DES-SA-LLME yöntemiyle elde edilen genel puan

4. SONUÇLAR

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda, çeşitli örneklerden Eritrosin'in ayrılması, zenginleştirilmesi ve tayin edilmesi için yeni bir analitik teknik geliştirilmiştir. Bu bağlamda ilk olarak Eritrosin'in ayrılması ve zenginleştirilmesi için geliştirilen derin ötektik çözücü bazlı ultrason destekli sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu (DES-SA-LLME) mor ötesi – görünür bölge spektrofotometrisi (UV-Vis) ile kombine edilmiştir. Önerilen mikroekstraksiyon tekniğinin verimine etki eden deneysel parametreler kemometrik yaklaşımına dayalı merkezi kompozit tasarımından (CCD) faydalanılarak optimize edilmiştir. Etkin bir faz ayrımı ve verimli bir ekstraksiyon sağlanması için beş farklı derin ötektik çözücü (DES) test edilmiştir. Yapılan çalışmalar ışığında uygun DES bileşenlerinin 1,2-propandiol ve kolin klorür olduğu görülürken, bu bileşenler için en uygun molar oranında sırasıyla 1:2 olması gerektiğine karar verilmiştir. Geliştirilen yöntemde ultrasonik ses dalgalarının enerjisi ve ultrason sıcaklığı sinerjik etki oluşturarak etkin kütle transferi sağlanması yoluyla ekstraksiyon verimini artırdı. Geliştirilen mikroekstraksiyon tekniğiyle kombine edilen mor ötesi-görünür bölge spektrofotometresi, basitliği, çoğu laboratuvarında bulunabilir oluşu ve uzman kullanıcı gerektirmemesi gibi avantajlarıyla öne çıkmaktadır. Kullanılan derin ötektik çözücüler düşük maliyetli, hazırlanması kolay, düşük toksisiteli ve çevreci çözücüler olup geliştirilen yöntemin ‘‘yeşil’’ karakterini arttırmıştır. Ayrıca kemometrik yaklaşıma dayalı olarak uygulanan deneysel tasarım yöntemi de zamandan tasarruf sağlarken, aynı zamanda deney sayısının azalmasını ve buna paralel olarak kimyasal madde maruziyetinin ve maliyetin de azalması yönünde avantaj sağlamıştır. Geliştirilen yöntem optimum koşullarda Eritrosin'in farklı örneklerden ayrılması, zenginleştirilmesi ve tayini için, basit, duyarlı ve seçici bir performans sergilemiştir. Bu bağlamda, geliştirilen DES-SA-LLME analitik yöntemi, Eritrosin'in karmaşık matrikse sahip çeşitli örneklerden ekstraksiyonu ve tayin edilmesi için, seçici, duyarlı, basit, düşük maliyetli ve çevreci bir alternatif olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

- [1] **Durazzo, A., Carochio, M., Heleno, S., Barros, L., Souto, E. B., Santini, A., Lucarini, M.** (2022). Food dyes and health: Literature quantitative research analysis. *Measurement: Food*, 7, 100050.
- [2] **Orna, M. V.** (2019). Carotenoids, cochineal, and copper: food coloring through the ages. In Chemistry's role in food production and sustainability: past and present (pp. 85-109). *American Chemical Society*.
- [3] **Sigurdson, G. T., Tang, P., Giusti, M. M.** (2017). Natural colorants: Food colorants from natural sources. *Annual review of food science and technology*, 8, 261-280.
- [4] **Oplatowska-Stachowiak, M., Elliott, C. T.** (2017). Food colors: Existing and emerging food safety concerns. *Critical Reviews In Food Science and Nutrition*, 57(3), 524-548.
- [5] **Karimi-Maleh, H., Beitollahi, H., Kumar, P. S., Tajik, S., Jahani, P. M., Karimi, F., Karaman, C., Vasseghian, Y., Baghayeri, M., Rouhi, J., Show, P. L., Rajendran, S., Zare, N.** (2022). Recent advances in carbon nanomaterials-based electrochemical sensors for food azo dyes detection. *Food and Chemical Toxicology*, 164, 112961.
- [6] **Ozalp, O., Soylak, M.** (2023). Microextraction Methods for the Separation-Preconcentration and Determination of Food Dyes: A Minireview. *Analytical Letters*, 1-18.
- [7] **Amchova, P., Kotolova, H., & Ruda-Kucerova, J.** (2015). Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(3), 914-922.
- [8] **Miniotti, K. S., Sakellariou, C. F., & Thomaidis, N. S.** (2007). Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. *Analytica Chimica Acta*, 583(1), 103-110.

- [9] **Walford, J.** (1980). Historical development of food coloration. *Developments In Food Colours*, 1, 1-25.
- [10] **Vachirapatama, N., Mahajaroensiri, J., & Visessanguan, W.** (2008). Identification and determination of seven synthetic dyes in foodstuffs and soft drinks on monolithic C18 column by high performance liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16(5), 2.
- [11] **Gholami, Z., Marhamatizadeh, M. H., Yousefinejad, S., Rashedinia, M., Mazloomi, S. M.** (2021). Vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on hydrophobic deep eutectic solvent for the simultaneous identification of eight synthetic dyes in jellies and drinks using HPLC-PDA. *Microchemical Journal*, 170, 106671.
- [12] **Feng, J., Cerniglia, C. E., & Chen, H.** (2012). Toxicological significance of azo dye metabolism by human intestinal microbiota. *Frontiers In Bioscience (Elite edition)*, 4, 568.
- [13] **Rao, P., & Sudershan, R. V.** (2008). Risk assessment of synthetic food colours: a case study in Hyderabad, India. *International Journal of Food Safety, Nutrition and Public Health*, 1(1), 68-87.
- [14] **Becenen, N.** (2017). Azo boyarmaddelerinin yasaklanması: bebek ve çocuk giysilerinde uygulanabilirliğinin araştırılması. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6(10), 1-6.
- [15] **Axon, A., May, F. E., Gaughan, L. E., Williams, F. M., Blain, P. G., & Wright, M. C.** (2012). Tartrazine and sunset yellow are xenoestrogens in a new screening assay to identify modulators of human oestrogen receptor transcriptional activity. *Toxicology*, 298(1-3), 40-51.
- [16] **Masone, D., & Chanforan, C.** (2015). Study on the interaction of artificial and natural food colorants with human serum albumin: A computational point of view. *Computational Biology and Chemistry*, 56, 152-158.
- [17] **Emiroğlu, E.** (2019). Yeni nesil manyetik nanopartikül kullanarak Eritrosin'in (E127) ekstraksiyonu ve Uv-Vis spektrofotometresi ile tayini. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı*. (Yüksek Lisans Tezi), 4s, Kayseri.

- [18] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Erythrosin-B>, alındığı tarih: 24.09.2023
- [19] **Mai, H. T., Brodie, D. L., Meyers, M. B., Baldo, A. L., Krantz, Z., & Weisz, A.** (2006). Determination of 2, 4, 6-triiodoresorcinol and other side reaction products and intermediates in the colour additive FD&C Red No. 3 (erythrosine) using high-performance liquid chromatography. *Food Additives and Contaminants*, 23(6), 547-551.
- [20] **Daniel, J. W.** (1962). The excretion and metabolism of edible food colors. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 4(5), 572-594.
- [21] **Bowie, W. C., Wallace, W. C., Lindstrom, H. V.** (1966). Some clinical manifestations of erythrosin in rats. *Federation of American Societies for Experimental Biology* (Vol. 25, p. 556).
- [22] **Hansen, W. H., Zwickey, R. E., Brouwer, J. B., Fitzhugh, O. G.** (1973). Long-term toxicity studies of erythrosine. I. Effects in rats and dogs. *Food and Cosmetics Toxicology*, 11(4), 527-534.
- [23] **Ingbar, S. H., Garber, J., & Burrows, B. A.** (1984). Further studies of the absorption and metabolism of ingested erythrosine in man. *Unpublished report submitted to WHO by the Certified Color Manufacturers Association, Inc.*, Washington, DC, USA. (As cited by JECFA, 1986).
- [24] **Andersen, C. J., Keiding, N. R., Nielsen, A. B.** (1964). False elevation of serum protein-bound-iodine caused by red colored drugs or foods. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 16(2), 249-249.
- [25] **Diemair, W., & Hausser, H.** (1951). Synthetic dyes and enzymatic reactions. 92(3), 165-170.
- [26] **Sasaki, Y. F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Tsuda, S.** (2002). The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 519(1-2), 103-119.
- [27] **Mekkawy, H. A., Massoud, A., El-Zawahry, A.** (2000). Mutagenic effects of the food color erythrosine in rats. *Problems of Forensic Sciences*, 43, 184-191.

- [28] **EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS).** (2011). Scientific Opinion on the re-evaluation of Erythrosine (E 127) as a food additive. *EFSA Journal*, 9(1), 1854.
- [29] **Hassan, M., Uzcan, F., Alshana, U., Soylak, M.** (2021). Switchable-hydrophilicity solvent liquid–liquid microextraction prior to magnetic nanoparticle-based dispersive solid-phase microextraction for spectrophotometric determination of erythrosine in food and othersamples. *Food Chemistry*, 348, 129053.
- [30] **Mpountoukas, P., Pantazaki, A., Kostareli, E., Christodoulou, P., Kareli, D., Poliliou, S., Lialiaris, T.** (2010). Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2934-2944.
- [31] **Gopal, T.** (2023). Determination of Synthetic Dye (Erythrosine) Present In the Watermelon by HPLC Method. *Acta Biomed*, 94(2), e2023050.
- [32] **Li, R., Wang, Y., Tan, J., Tang, S. H., Jiang, Z. T., Di, S., Geng, Y.** (2020). Simultaneous determination of synthetic edible pigments in beverages by titania-based RP-HPLC. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(2), 3875-3881.
- [33] **Ahmad, W., Aljuhani, E. H., Alwael, H., Assirey, E. A., Nassef, H. M., El-Shahawi, M. S.** (2023). Redox impulse, computational calculation of molecular energy potentials and ultra-trace determination of the food colorant erythrosine b in fruit jams, soft drinks and water. *Journal of Food Composition and Analysis*, 117, 105110.
- [34] **Lee, H. M., Yang, J. S., Lee, H. W., Hwang, I. M., Hwang, Y. S., You, S. Y., Kim, S. H.** (2019). Simultaneous determination of preservatives, artificial sweeteners, and synthetic dyes in kimchi by ultra-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (UPLC-ESI-MS/MS). *Analytical Letters*, 52(16), 2472-2483.
- [35] **Shetti, N. P., Nayak, D. S., Kuchinad, G. T.** (2017). Electrochemical oxidation of erythrosine at TiO₂ nanoparticles modified gold electrode—An environmental application. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(3), 2083-2089.

- [36] **Ryvolová, M., Tábořský, P., Vrábel, P., Krásenský, P., Preisler, J.** (2007). Sensitive determination of erythrosine and other red food colorants using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1141(2), 206-211.
- [37] **Elik, A., Altunay, N.** (2022). Chemometric-Based Optimization of Ionic Liquid-Based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for Separation and Preconcentration of Erythrosine from Real Matrices. *Cumhuriyet Science Journal*, 43(1), 53-60.
- [38] **Snigur, D., Fizer, M., Chebotarev, A., Lukianova, O., Zhukovetska, O.** (2022). Spectroscopic and computational studies of erythrosine food dye protonation in aqueous solution. *Dyes and Pigments*, 198, 110028.
- [39] **Elfadil, D., Della Pelle, F., Compagnone, D., Amine, A.** (2022). Green Synthesis of Molecularly Imprinted Polymers for Dispersive Magnetic Solid-Phase Extraction of Erythrosine B Associated with Smartphone Detection in Food Samples. *Materials*, 15(21), 7653.
- [40] **Nambiar, A. P., Sanyal, M., Shrivastav, P. S.** (2017). Performance evaluation and thermodynamic studies for the simultaneous cloud point extraction of erythrosine and tartrazine using mixed micelles in food samples. *Food Analytical Methods*, 10, 3471-3480.
- [41] **Shokrollahi, A., Pili, H. B., Doust, K. H.** (2017). Microspectrophotometric determination of erythrosine in beverage and water samples after ultrasonic assisted supramolecular-based dispersion solidification liquid-liquid microextraction. *Journal of Analytical Chemistry*, 72, 617-623.
- [42] **Faraji, M.** (2019). Determination of some red dyes in food samples using a hydrophobic deep eutectic solvent-based vortex assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1591, 15-23.
- [43] **Yücel, C.** (2022). Enrichment Of Residual Uv Filters In Environmental Samples By Microextraction Techniques Prior To Chromatographic Analysis. *Ege Üniversitesi Uygulamalı ve Doğa Bilimler Enstitüsü (Doktora Tezi)*, 14s, İzmir.

- [44] **Armenta, S., Garrigues, S., Esteve-Turrillas, F. A., de la Guardia, M.** (2019). Green extraction techniques in green analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116, 248-253.
- [45] **Florindo, C., Romero, L., Rintoul, I., Branco, L. C., Marrucho, I. M.** (2018). From phase change materials to green solvents: hydrophobic low viscous fatty acid-based deep eutectic solvents. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(3), 3888-3895.
- [46] **Mbous, Y. P., Hayyan, M., Hayyan, A., Wong, W. F., Hashim, M. A., Looi, C. Y.** (2017). Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering—Promises and challenges. *Biotechnology advances*, 35(2), 105-134.
- [47] **Li, X., & Row, K. H.** (2016). Development of deep eutectic solvents applied in extraction and separation. *Journal of Separation Science*, 39(18), 3505-3520.
- [48] **Cunha, S. C., & Fernandes, J. O.** (2018). Extraction techniques with deep eutectic solvents. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 105, 225-239.
- [49] **Carasek, E., Bernardi, G., Morelli, D., Merib, J.** (2021). Sustainable green solvents for microextraction techniques: Recent developments and applications. *Journal of Chromatography A*, 1640, 461944.
- [50] **Pacheco-Fernández, I., & Pino, V.** (2019). Green solvents in analytical chemistry. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 18, 42-50.
- [48] **Yiantzi, E., Psillakis, E., Tyrovola, K., Kalogerakis, N.** (2010). Vortex-assisted liquid-liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A. *Talanta*, 80(5), 2057-2062.
- [51] **Elahi, F., Arain, M. B., Khan, W. A., Haq, H. U., Khan, A., Jan, F., Boczkaj, G.** (2022). Ultrasound-assisted deep eutectic solvent-based liquid-liquid microextraction for simultaneous determination of Ni (II) and Zn (II) in food samples. *Food Chemistry*, 393, 133384.
- [52] **Altunay, N., Tuzen, M., Hazer, B., Elik, A.** (2022). Synthesized of a novel xanthate functionalized polypropylene as adsorbent for dispersive solid phase

microextraction of caffeine using orbital shaker in mixed beverage matrices. *Food Chemistry*, 393, 133464.

- [53] **Xu, C. P., Kim, S. W., Hwang, H. J., Choi, J. W., Yun, J. W.** (2003). Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exo-biopolymer production by *Paecilomyces tenuipes* C240. *Process Biochemistry*, 38(7), 1025-1030.
- [54] **Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, L. A.** (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.
- [55] **Li, G., & Row, K. H.** (2019). Utilization of deep eutectic solvents in dispersive liquid-liquid micro-extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 120, 115651
- [56] **Yuvali, D., Seyhaneyildizi, M., Soylak, M., Narin, İ., Yilmaz, E.** (2021). An environment-friendly and rapid liquid-liquid microextraction based on new synthesized hydrophobic deep eutectic solvent for separation and preconcentration of erythrosine (E127) in biological and pharmaceutical samples. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 244, 118842.
- [57] **Ozkantar, N., Yilmaz, E., Soylak, M., Tuzen, M.** (2019). Separation, enrichment and spectrophotometric determination of erythrosine (E127) in drug, cosmetic and food samples by heat-induced homogeneous liquid–liquid microextraction method. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 99(12), 1135-1147.
- [58] **Hassan, M., Uzcan, F., Alshana, U., Soylak, M.** (2021). Switchable-hydrophilicity solvent liquid–liquid microextraction prior to magnetic nanoparticle-based dispersive solid-phase microextraction for spectrophotometric determination of erythrosine in food and other samples. *Food Chemistry*, 348, 129053.
- [59] **Emiroğlu, E., Yuvali, D., Sarp, G., Yilmaz, E., Narin, I.** (2021). Magnetic solid phase extraction of erythrosine (E127) in pharmaceutical samples with Fe₃O₄/C-nanodots hybrid material prior to spectrophotometric analysis. *Microchemical Journal*, 170, 106766.

- [60] **Shokrollahi, A., Pili, H. B., Doust, K. H.** (2017). Microspectrophotometric determination of erythrosine in beverage and water samples after ultrasonic assisted supramolecular-based dispersion solidification liquid–liquid microextraction. *Journal of Analytical Chemistry*, 72, 617-623.
- [61] **Bişgin, A. T.** (2023). Vortex-assisted sequential liquid-phase micro-extraction of E127 and E129 in foodstuffs and pharmaceuticals. *Microchemical Journal*, 187, 108420.
- [62] **Pena-Pereira, F., Wojnowski, W., Tobiszewski, M.** (2020). AGREE—Analytical GREEnness metric approach and software. *Analytical Chemistry*, 92(14), 10076-10082.