

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇAY NUMUNESİNDE BULUNAN METİLKSANTİN
TÜREVLERİNİN UV SPEKTROFOTOMETRİSİ İLE
SİMÜLTANE TAYİNİ**

Hülya PEKCAN

Danışman: Doç. Dr. Ahmet Hakan AKTAŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ISPARTA -2011**

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Çayın Tarihçesi	1
1.2. Teobromin ve Sağlık Açısından Etkisi.....	5
1.3. Teofilin ve Sağlık Açısından Etkisi.....	7
1.4. Kafein ve Sağlık Açısından Etkisi.....	7
1.5. UV ve Görünür Bölge Spektroskopisi.....	11
1.5.1. Absorpsiyonun nicel yorumu.....	11
1.5.2. UV ve görünür bölge absorpsiyon spektrofotometreleri.....	12
1.5.3. UV ve görünür bölge moleküler absorpsiyon spektroskopisinin uygulamaları.....	13
1.5.3.1. Nitel analiz.....	13
1.5.3.2. Nicel analiz.....	14
1.6. Kemometri.....	14
1.6.1. Çok değişkenli kalibrasyon algoritmaları.....	17
1.6.1.1. Temel bileşen analizi yöntemi (Principal component analysis method).....	17
1.6.1.2. Kısmi en küçük kareler yöntemi (Partial least squares regression method).....	18
1.6.2 Kalibrasyon (derişim) setinin tasarımı.....	19
1.6.3. Çapraz validasyon işlemi (Cross-validation procedure).....	20
1.6.4. Kemometrik kalibrasyon yöntemlerinin uygulamaları.....	20

1.6.4.1. Kemometrik yöntemlerin uygulama alanları.	20
1.6.4.2. Çoklu bileşen analizi (Multicomponent analysis).	21
1.6.4.3. Organik bileşiklerin kantitatif analizi.	21
1.6.5. Varyans analizi (ANOVA)	21
2. KAYNAK ÖZETLERİ.	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM.	36
3.1 Materyal.	36
3.2. Kullanılan Cihazlar.	36
3.2.1. UV-görünür spektrofotometre cihazı.	36
3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler.	37
3.3.1 Kullanılan çözeltiler.	37
3.4. Yöntem.	38
3.4.1. UV/VIS spektroskopisi yöntemi.	38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.	40
4.1. UV Spektroskopisi.	40
4.1.1. Saf halde renk maddelerinden elde edilen spektrumlar.	40
4.1.2. Temel bileşen analizi (PCA)	42
4.1.2.1. Kalibrasyon yönteminin validasyonu.	43
4.1.3. Kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS).	45
4.1.3.1. Kalibrasyon yönteminin validasyonu.	45
4.1.3.2. PLS yöntemi için ANOVA testi.	47
4.1.3.3. PLS yönteminde istatistiksel analiz.	48
4.1.3.4. Kısmi en küçük kareler Yönteminin ticari numuneye uygulanması. .	52
4.1.4. Klasik UV-spektroskopisiyle elde edilen bulgular.	51
4.2. Yöntemlerin Çay Numunesine Uygulanmasıyla Elde Edilen Bulgular. . . .	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.	53
6. KAYNAKLAR.	55
ÖZGEÇMİŞ.	59

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi ÇAY NUMUNESİNDE BULUNAN METİLKSANTİN TÜREVLERİNİN UV SPEKTROFOTOMERİSİ İLE SİMÜLTANE TAYİNİ

Hülya PEKCAN

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ahmet Hakan AKTAŞ

Bu tez çalışmasında, kemometrik kalibrasyon yöntemlerinden kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS) farklı çay örneklerinde bulunan metilksantin türevleri olan kafein, teofilin ve teobromin maddelerinin aynı anda miktar tayinlerine hiç bir ayırma işlemi kullanmaksızın başarıyla uygulanmıştır. Bu yöntemler uygulanmadan önce temel bileşen analizi (PCA) hesaplamalara uygulanmıştır. UV-Görünür Alan Spektroskopisi ile elde edilen veriler kemometrik olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: PLS, UV, kemometri, metilksantin türevleri

2011, 59 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF METHYLYXANTHINES IN TEA SAMPLE BY UV-VIS SPECTROPHOTOMETRY

Hülya PEKCAN

**Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Chemistry**

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet Hakan AKTAŞ

In this study, chemometric calibration method partial least squares method (PLS) in different tea samples with the methylxanthine derivatives caffeine, theophylline and theobromine determinations amount of materials at the same time without using any separation process has been successfully applied. Before applying these methods, principal component analysis (PCA) was applied in the calculations. The data obtained from UV-Visible Spectroscopy and Chemometric evaluated.

Key Words: PLS, UV, chemometrics, methylxanthines

2011, 59 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan Sayın Danışman Hocam Doç. Dr. A. Hakan AKTAŞ'a teşekkür eder sonsuz saygılarımı sunarım.

Hayatım boyunca ve tezim sırasında manevi desteklerini üzerimden eksik etmeyen annem Seher PEKCAN ve babam İsmet PEKCAN'a teşekkür ederim.

Araştırmanın yürütülmesinde ve tezimin yazımı esnasında benden yardımlarını eksik etmeyen sevgili kardeşim Dr. Güzide PEKCAN ERTOKUŞ'a teşekkür eder, herşeyin gönlünce olmasını dilerim.

Tezimin esnasında bana hep destek olan eşim Sezer ÖZDEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin maddi desteğini 2055-YL-09 nolu proje ile sağlayan Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projelerine teşekkür ederim.

Hülya PEKCAN
ISPARTA, 2011

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil.1.1. Teobrominin kimyasal formülü.	5
Şekil.1.2. Teofilinin kimyasal formülü.	7
Şekil.1.3. Kafeinin kimyasal formülü.	7
Sekil 1.4. Bir kapta bulunan bir çözelti üzerine gönderilen ışın demetinde yansıma, saçılma (dağılma) ve absorbansla I_0 demetinin zayıflaması ve I demeti olarak çözeltiyi terk etmesi.	12
Sekil 1.5. Bir spektrofotometrenin temel bileşenleri.	13
Şekil 1.6. UV-görünür alan cihazı.	13
Şekil 1.7. Kemometrinin ilişkili olduğu disiplinler.	15
Şekil 1.8. X1 ve X2 olan iki değişken için PC1 ve PC2 olan iki esas bileşeni gösteren diyagram.	17
Şekil 1.9. PLS2 kalibrasyonu.	18
Şekil 4.1. Kafein maddesinin absorpsiyon spektrumu.	40
Şekil.4.2. Teofilin maddesinin absorpsiyon spektrumu.	41
Şekil.4.3. Teobromin maddesinin absorpsiyon spektrumu.	41
Şekil 4.4. Değişkenlerin doğrusal bileşenleri.	42
Şekil 4.5. Kemometrik verilerden elde edilen özdeğerlerin grafiği.	43
Şekil 4.6. Sentetik karışımın absorpsiyon spektrumu.	44
Şekil 4.7. Atık değerlerinin dağılımı.	47
Şekil 4.8. Kemometrik hesaplamalar esnasında oluşturulan matris.	48
Şekil 4.9. PLS kalibrasyon basamağında kafein için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.	50
Şekil 4.10. PLS kalibrasyon basamağında teofilin için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.	50
Şekil 4.11. PLS kalibrasyon basamağında teobromin için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve formülleri.	37
Çizelge 4.1. Metilksantin türevlerinin spektroskopik özellikleri.	40
Çizelge 4.2. Kafein, teobromin ve teofilin karışımlarını içeren kalibrasyon seti.	44
Çizelge 4.3. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki metilksantin türevlerinin PLS kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları.	46
Çizelge 4.4. Çay numunede bulunan renk maddelerinin PLS kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları.	50
Çizelge 4.5. Çay numunede bulunan renk maddelerinin PCR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları.	51
Çizelge 4.6. Çay numunesinde bulunan metilksantin türevlerinin kemometrik olarak hesaplanan sonuçları.	52

SİMGELER DİZİNİ

ANOVA	Varyans Analizi (Analysis of Variance)
BSS	% Bağlı Standart Sapma
PCA	Temel Bileşen Analizi Yöntemi (Principal Component Analysis)
PLS	Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi (Partial Component Regression)
R	Regresyon Katsayısı
SS	Standart Sapma
UV-Vis	Ultra Viyole Görünür Alan Spektroskopisi
x	Ortalama Değer

1. GİRİŞ

1.1. Çayın Tarihçesi

Çinliler çayı 5.000 yıldan beri içmektedirler. Efsanede başlangıç belirsizdir, en bilinen olanı İmparator Shen Nung ile alakalı olanıdır. Çay şans eseri buluşuna kadar henüz çay milattan önce 2737 yılına kadar bulamamıştı.

Binlerce yıllardır Çinliler çayı hem sağlık, hem eğlence amacıyla almaktadırlar. Hiçkimse *Camellia sinensis* 'in parlak, düz, yeşil yapraklarını neyin çizdiğini bilemez, fakat popüler bir efsane bilgilerdeki eksiklikleri tamamlamaktadır.

Bir gün İmparator Shen Nung kaynamış su içmekteyken, bardağın içine ağaçtan birkaç yaprak düştü. Meraklı İmparator bunu tatmaya karar verir ve bu demlemenin hem lezzetli hem canlandırıcı olduğunun farkına varır.

Bir Hindistan efsanesi de çayın bulunuşunu Budist bir rahip olan Bodhidharmanın bulduğudur. Yedi yıllık uykusuzluk düşüncesine son verildiği zaman rahip son derece yorgundu. Ümitsizlik içindeyken yakınındaki ağaçtan birkaç yaprak çiğnedi ve birdenbire canlandı.

Hindistan, 19.yy öncesine kadar herhangi bir çay içmeyle alakalı kayıtları olmamasına rağmen Hindistan şu an dünyanın en büyük çay üreticilerinden biridir. Bodhidharma'nın yaprağı çiğneme tecrübesi şu ana kadar çayı genel bir olay yapamadı.

Düşünceli Budist rahip, Bodhidharma hakkında diğer bir efsane, uyanık olduğunu söylemeyecek haldeyken yere düşen göz kapaklarını nasıl fırlattığını anlatmaktadır. Çay bitkisi göz kapaklarını düştüğü yerden kaldırdı. Bu yeni bitkinin yaprakları mucizevî bir şekilde onun yorgunluğunu iyileştirdi.

Çay Japonya'ya çok tanıdık değildir, bu nedenle bu efsane en azından bir adada birden varoluşlarının açıklamasının yapılmasını sağlamaktadır. Hakikat biraz daha renksizdir; 9.yy. başlarında geleceği gören Dengyo Daishi adında Japon bir rahip Çin'den çay tohumlarını beraberinde geri getirdi.

Çayın açık kapta şansla yapım metodu İmparator Shen Nung'a aittir. Bugün kullandığımız demleme metodu ise 4,000 yıl önce geliştirilmiştir.

Ming Dynasty (1368–1644) zamanında, Çinliler çay yapraklarını kaynamış suya batırmaya başladı. Birkaç uyarlamayla, geleneksel Çin kapaklı şarap ibriği, mükemmel bir çaydanlık haline gelmiştir.

Çay

'Tea' ve dünya çapında bütün yazım ve telaffuzları tek bir kaynaktan gelmektedir. 'Tea' Çin'in Amoy lehçesine göre çay anlamındadır. Mandarin kelimesi olan çay anlamındaki 'cha' birkaç türetmeyle dünya çapında kullanılmaktadır.

Çay Avrupa'ya onyedinci yüzyılın başlarında ulaşmıştır. Çayın hakkındaki abartılı tıbbi iddialara rağmen, Avrupalılar kahvenin tadını tercih ettiler. Sadece birkaç soylu hizipler arasında çay popüler hale gelmiştir.

Avrupa'ya ulaşma

17.yy. başlarında Hollandalı ve Portekiz tüccarlar ilk kez Avrupa'ya Çin çayını tanıttı. Portekizliler Çin'in kıyı kesimi olan Macao'dan gemiyle, Hollandalılar da Endonezya yolu ile Avrupa'ya çayı getirmiştir.

İpek ve baharat kargoları aralarında gelen tuhaf demleme ani bir başarı değildir. Avrupalılar tadını tattılar, fakat kahvenin tadını tercih ettiler. Çayın ticaretini yapmaya başlamadan önce, kuşkulu İngiltere 1652 yılına kadar bekledi.

Ruslar eskiden beri çaya düşkündür. Rusların çayları Çin'den develerle kara yolundan getirilmektedir.

Çay sevdası Rusya'da artmaya başladı ve deve sürüleriyle Asya'ya kadar uzadı. 18.yy. sonunda, 200-300 trenlerle binlerce deve Çin sınırlarını geçmeye başladı.

Sibirya'dan geçen demiryolu develerin hak edilmiş emekli olmalarını sağladı, fakat

develerin romantik yolculuk yaşamları Çin siyah çay harmanı kadar popüler ve hassastır ve bunlar Rus Kervanı olarak bilinmektedir.

Krallığın promosyonu

17.yy Avrupa'sında, krallığın korumasından daha fazla ürün satılamazdı. İngiliz Kral Charles II'nin bir Portekiz prensesi olan ve çay içme heveslisi Catherine of Braganza ile evlenmesi ile 1662'de çay içme alışkanlığı şanslı molasını edinmiştir. Catherine çayı sarayda hassas, yarı şeffaf Çin kase ve kavanozları içinde almaya başladı ve böylece saraylılarda buna uymaya başladılar.

Çay zaten pahalıydı, fakat şimdi aynı zamanda moda da uygundu. Aniden çay bir stil ve özellik kazandı. Bilinçli soyluların gözünde, çay karşı konulmaz bir şeydi.

17.yy Avrupa'sında çay büyük potansiyeli ile pratik bir üründü. Birçok su içmeye uygun değildi. Bu nedenle, hastalıktan uzak durmak isteyenler için seçenek ilham vermiyordu: bakterileri öldürmek için heyecan verici bir kap kaynamış su veya bira yeteri kadar güçlüydü.

Britanya ve diğer birçok ülkede, ale türü bira genel kahvaltılık içeceği olmasına rağmen çay da ona alternatif olarak gelmiştir. Nihayet susamışlığı söndüren, canlandırıcı ve dinçleştirici çay, lezzet doluydu ve bunlara ilaveten içmesi son derece güvenli bir içecektir.

18.yy., zengin evlerde çay içme büyük merasimlerde bir fırsattı. Değerli çay yaprakları sık sık, sadece bir anahtarı olan kilitli çay kutusunda saklanırdı. Haftada bir veya iki defa evin hanımı aile ikramlarında servis için ya da önemli misafirleri etkilemek amacıyla kutuyu açardı.

Merasimlere anlam katmasının yanı sıra çayın servis edildiği güzel porselenler ailenin zenginliğini vurgulardı. Kibar bir bayanın solgun cildini ve hassas kemik yapısını sergilemek için yarısaydam saf Çin porseleni bir fırsattı. O zamanlarda bu ikisi bir bayanın saflığının ölçülmesine yorulmaktaydı (Matissek, 1997).

18.yy. ilk yarısında sosyal hayat, kahve evlerinin çok karmaşık olmasından dolayı çay bahçelerine yol verdi. Çay bahçeleri bir cennet görüntüsü almaya başladı: ağaçlandırılmış bulvarlar, fenerli yürüyüşler, müzik, dans, havai fişekler ve güzel bir yemek bir fincan çaya eşlik etti. Çay bahçeleri sadece eğlenceli değildi, sosyal bir kaynaşma sahasıydı. Bu egzotik peyzajların içinde, kraliyet ailesi ve halk birlikte gezinebilirdi.

Çay tüketimi 19.yy. başlarında artmaya başladı. Moda ve düşük fiyat, arz edenlerin müşterileri tatmin etmekte zorlandıkları bir pazar oluşturdu. Çinlilerin tekeli kırabilmek için, çay ticareti boşluğu doldurmak için Hindistan'a yöneldi.

Hindistan

Çay tüketiminin 19.yy. başlarında artmasıyla, Doğu Hindistan Şirketi yeni kaynaklar aramaya başladı. Çinlilerin çay yetiştirmeyi tekele aldığından beri, tek çözüm çayı başka bir yerde yetiştirmektir.

Çin çayı tohumu ile ilk denemeler Kuzeydoğu Hindistan'daki Assam'da yürütüldü. Bu denemeler başarısızlıkla sonuçlandı, buna rağmen aynı tohumlar Kuzey Hindistan'daki Darjeeling'de sonradan iyi bir şekilde yetişti.

Daha sonra 1820'de, bitkibilimciler Assam'da bazı tanımlanmamış yerli ağaçlar fark ettiler. Yaprak örnekleri analiz için Londra'ya gönderdiler. Örnekler hemen çay olarak tanıtıldı – çay Hindistan'da geçmişte bilinmeyen bir bitkiydi – böylece Hindistan çay endüstrisi doğmuş oldu.

Paketleme

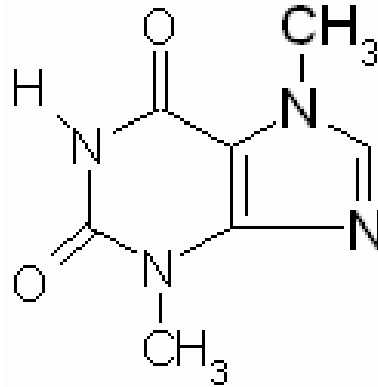
1826'ya kadar çay her zaman başıboş bir şekilde satıldı. Bu da ahlaksız satıcılar için çayı katkı maddeleriyle satması için bir davetiyeydi. 1826'da John Horniman ön-mühürlenmiş, kurşun gömlekli çay paketlerini geliştirdi fakat bakkallar tarafından hemen onay görmedi. Onlar, karlarını çabucak arttırmayı tercih ettiler. Horniman, daha sonra başka bir yol denedi. Paketler üzerine tıbbi mesajlar koydu ve çayı eczacılara sattı. Eczacılar ve müşterileri ise onun bu yaklaşımına oldukça uzaktılar.

Poşet çayların kazara ulaştığı söylendi. Thomas Sullivan adında New York'lu bir çay ithalatçısı çay örneklerini müşterilere küçük ipek poşetlerde gönderdi. Müşteriler açıkça rahatlığı sevdiler çünkü yakın zaman sonra hepsi çaylarını poşetler içinde istediler.

5.000 yıldan sonra, çay tüketimi ve üretimi artmaya devam etti. Dünya çapında, kabaca her yıl üç milyon ton çay hasat ediliyor.

Şu anda uluslararası pazarları iki faktör sürdürüyor. Gelişmekte olan ülkelerde, çay içme Avrupalıların üç asır önceki almasıyla aynı nedenden ötürü benimsenmektedir: güvenli içme suyundan zevk almanın yolu olmasından ötürü. Gelişmiş ülkelerde, susamışlık için çeşitlilik ve yeni tatlar özel çayların tüketimini arttırmaktadır.

1.2. Teobromin ve Sağlık Açısından Etkisi



Şekil.1.1. Teobrominin kimyasal formülü

Azot içeren organik bileşikler dünyada son derece yaygındır. Bunların arasında metilksantin türevleri olan kafein, teobromin ve teophillin vardır. Bunlar çok yakından alakalı yapılardır ve farmakolojik özellikleri çok benzerdir. Genellikle alkaloidler olarak isimlendirilirler. Teobromin kakaoda bulunan başlıca alkaloiddir ve kakaonun tipik bitter tadına katkı da bulunduğu söylenir.

İçecek ve çikolata ürünleri arasındaki MAFF tarafından yapılan metilksantine ait araştırma çikolata ürünleri hariç teobromin seviyesinin düşük olduğunu göstermiştir.

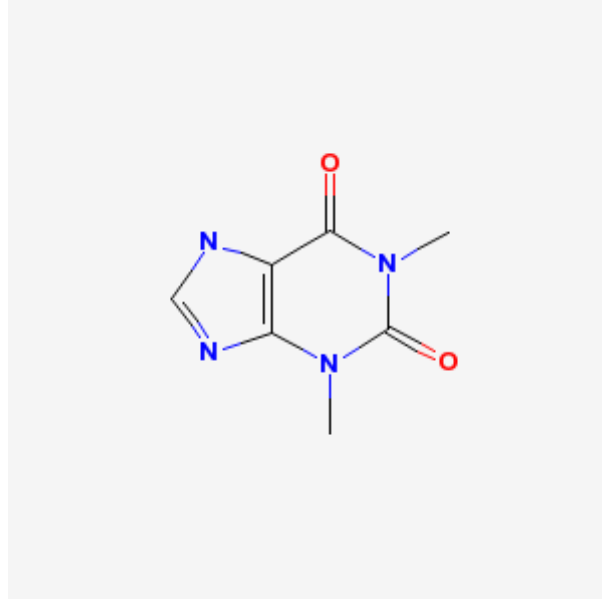
Toz haline getirilmiş içeceklerde teobromin derişim 85 – 590 mg/l ve ortalama değer olarak da 367 mg/l değerindedir. ikolatalı süt içeceklerinde teobromin derişimi 141 ila 371 mg/l arasındadır. Çikolata mousses'ında 386 ve 651 mg/kg teobromin içeriğine sahiptir. Çikolata parçalarında teobromin seviyesi 1300 ila 4710 mg/kg aralığındadır. Yüksek kakao içeriğine sahip (%70 kakao) ikolata parçalarında teobromin derişim 10370 mg/kg'dır.

Çikolata parçalarında bulunan değişik seviyelerdeki teobrominin kakao çekirdeklerinde bulunan değişik derişimleri yansıttığı düşünülmektedir. Kakao ekirdeklerindeki metilksantinlerin miktarları çeşitli etkili faktöre bağlıdır: işlem prosedürleri, genetik özellik, coğrafi köken, hasat zamanındaki olgunluk derecesi ve kakao çekirdeğinin ağırlığı.

Metilksantinler insanlar tarafından hızlı bir şekilde absorblanır ve tüketimden 6 ve 10 saat arasında teobromin seviyesi yarıya iner. Metilksantinler hafif uyarıcıdır fakat teobromin merkezi sinir sistemi üzerinde neredeyse hiç etkisi yoktur. Bütün metilksantinler akciğerdeki bronşlardaki düz kaslarda rahatlatıcı bir etki göstermektedir, fakat bir gıda veya ieeğin yanında tüketildikleri zaman bu etki fark edilememektedir. Bütün metilksantinler diüretik etkiye sahiptir fakat bu etki sadece bol miktarda su ile tüketildiğinde fark edilebilir.

Araştırmalar, ev hayvanların özellikle de köpeklerin teobromin duyarlı olduğunu göstermiştir. Köpek zehirlenmelerinin birkaç vakası rapor edilmiştir ve yenilen çikolata miktarı 100g ile 1kg arasında değişmektedir. Köpeklerin semptomları genellikle nrolojikti (titreme ve çırpınma) fakat ishal gibi diğer semptomlarda meydana gelmiştir. Metilksantinle alakalı diyetisyenler ve toksikologlar tarafından yapılan son değerlendirmede metilksantin içeren bitkilerin sağlık üzerine herhangi bir hasar vermeden uzun süre tüketildiğini göstermektedir. Bilimsel alışmalar göstermiştir ki aşırı derecede tüketilmediği sürece bu maddelerin tüketilmesinde herhangi bir sorun bulunmamaktadır. Kakao tüketilmesinde her hangi bir sorun bulunmamaktadır. Kakao rnlerindeki metilksantininin insan sağlığı üzerine negatif bir etkisi bulunmamaktadır çünkü çikolata ve kakao içeren işlenmiş diğer gıda ürünlerindeki miktarları son derece düşüktür (Matissek, 1997).

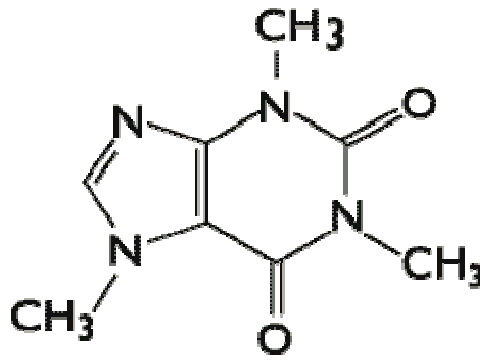
1.3. Teofilin ve Sağlık Açısından Etkisi



Şekil.1.2. Teofilin kimyasal formülü

Çay, kahve ve çikolata içinde bulunan dimetilksantin' dir. Kafeine benzer yapıda olmasına rağmen çok güçlü bronkodilatatördür. Teofilin, Astım tedavisinde kullanılmaktadır. Yan etkileri: Uykusuzluk, sinirlilik, kardiyak uyarıdır. Teofilin çocuklarda tehlikeli konvulsiyonlara yol açabilir (Dökmeçi, 1995).

1.4. Kafein ve Sağlık Açısından Etkisi



Şekil.1.3. Kafeinin kimyasal formülü

Siyah çayın işleme aşamalarından biri olan soldurma anında kafein miktarı artar. O nedenle kuru madde ilkesine göre siyah çayın kafein miktarı kuru madde miktarı

yeşil çay yaprağının kafein miktarından daha yüksektir. Çay bitkisinde kafein nükleik asitlerin parçalanmaları sonucu oluşmakta ve bu parçalanma soldurma aşamasında da sürüdüğü için siyah çayın kafein kapsamı artmaktadır.

Çayın insanlarda yorgunluk giderici, canlılık verici etkisi, içerdiği kafein ile yakından ilgilidir. Bugünkü bilgilerimize göre; bir bardak çayın kafein içeriği özdeş miktardaki kahvenin içeriğinden yaklaşık %50 daha azdır. Kuruçay %1-5 oranında kafein içerir.

Normal şekilde yapılan demleme ile çayda bulunan kafeinin yaklaşık %80'i deme geçer. Buna göre 5-6 bardak çay içen kimse ortalama 300 mg kafein alıyor demektir. Bu miktar İngiliz Eczacılık Kodeksi'nce kabul edilen (650 mg saf kafein) günlük dozun yarısından azdır. Ancak kafeinin özel fizikokimyasal durumu nedeniyle çay içildiği zaman vücudun kafeine karşı direnci daha fazla olmakta, tolerans sınırı yükselmektedir. Kafein ve kafeinden oluşan metabolik maddeler de vücutta birikmeyip ifrazat yoluyla metil ürik asit şeklinde atılırlar.

Kafein beyindeki kılcıl damarların önemli derecede genişlemesine neden olur, bu kan hareketinin hızlanmasına, insanların canlılık kazanmasına ve yorgunluklarının azalmasını sağlar. Mide salgılarını çoğaltır. Kafeinin olumsuz etkilerinin çayda olumlu etkilere dönüşmesi konusu gerçekten ilginçtir. Çay içersinde bulunan ve thearubigin adı verilen bileşikler kafein ile tepkimeye girerek mide üzerindeki olumsuz etkilerini önlemektedir.

Gölge koşullarında yetişen çay bitkisinde kafein kapsamı artmaktadır.

Çay atıklarından kafein üretilmesi günümüzde de üzerinde durulan ve tartışılan bir konudur. Çay atıklarında bulunan kafein miktarları yaklaşık %1-3 arasında değişmektedir. Koşullara uygun olarak hasat edilen çayda atık madde oranı ortalama %4 iken, ülkemizde ise bu oranın en iyimser bir tahminle %10 olduğu düşünülmektedir.

Ülkemizde kafein gereksinimi tümüyle dış alım yolu ile sağlanmaktadır ve kafein başta ilaç sanayinde olmak üzere soğuk içeceklerin üretiminde de kullanılmaktadır. Yıllık kafein dış alımımız 50 ton civarındadır.

Düzenli kullanılan kafeinin kesilmesiyle ortaya çıkan ve yaygın olarak rastlanan yoksunluk belirtileri:

- Baş ağrısı
- Yorgunluk, halsizlik
- Uykusuzluk / uykulu olma hali (esneme, sersemlik)
- Konsantrasyon eksikliği
- İşte karşılaşılan zorluklar (motivasyon ve dikkat eksikliği, düşük performans)
- Huzursuzluk (mutsuzluk, can sıkıntısı, huysuzluk, diken üstünde olma)
- Depresyon (üzüntü, halsizlik, endişe, isteksizlik, küskünlük vb.)
- Sinirlilik
- Nezle ve benzeri belirtiler (mide bulantısı, kusma, eklem ağrıları vb.)
- Düşünsel aktivitede ve hafızada yavaşlık

Kafein; tein, matein ve guaranin olarak da bilinir. Bir alkaloid olan kafein doğal olarak kahvede, çayda, yerba mate'de, guarana'da ve az miktarda, kakao içinde bulunur. Kafeinin karakteristik, yoğun bir acı tadı vardır. Kola gibi bazı gazlı içeceklerle tat vermesi için eklenmektedir. İlk olarak Alman kimyager Friedich Ferdinand Runge tarafından 1819'da bulunmuştur. Aynı zamanda kafein ismini kimya literatürüne geçirmiştir. Kahveden yaralanarak bu ismi vermiştir

Kafein, merkezi sinir sistemine etki ederek, beyne giden ve beyinden gelen mesajları hızlandırır ve stimulan etkisi yapar. Kafein birçok bitkide değişik miktarlarda bulunmaktadır. Fasulyelerde, yapraklarda ve meyvelerde 60 çeşit bitkide bulunur. Bilinen kuru çay, %10 luk $Pb(CH_3COO)$ (kurşun asetat) ya da $CaCO_3$ ile birlikte kaynatıldıktan sonra ayırma hunisinde kloroform ile ekstrakte edilir kalan alt faz alınıp içindeki kloroform uçurulur ve kalan sıvı süblimasyon yöntemi ile saflaştırılarak kafein elde edilebilir.

Temel farmakolojik özellikleri:

- Merkezi sinir sistemi'nde (MSS) psikotropik etkiyi uyaran
- Solunum sistemi uyarıcı
- Kalp atış hızı artırıcı
- Hafif diüretik etki

Kafein ve bağımlılık tartışması

Kafein doğada bulunan bir maddedir. Doğada en az 63 bitkinin tohumlarında ve yapraklarında bulunur. Çay ve kahve beslenmemizdeki ana kafein kaynaklarıdır.

Kafein nedeniyle kolanın bağımlılık yaptığı söylenir. Ancak, 330 ml'lik her Coca Cola kutusunda 33 miligram kafein var ama aynı büyüklükteki bir fincan kahvedeki kafein 112 mg civarındır. Coca Cola'da çay ve kahvede bulunan kafeinin üçte biri bulunur.

Ürün Kafein her 100 ml

Kahve(Filtre) 60 mg

Kahve (kuru) 42 mg

Çay 28 mg

Coca Cola 13 mg

Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA - Food and Drug Administration) kafeinin gazlı alkolsüz içeceklerde kullanmasıyla sağlığı olumsuz yönde etkilediğine dair bir kanıt rastlanmamış; 140'tan fazla ülkede, kafeinin güvenliği araştırılıp içeceklerde çeşitli seviyelerde kullanımına izin verilmiştir. WHO'ya göre bağımlılık yapan ilaçların neden olduğu sosyal ve fiziksel sonuçlar ile kafein arasında uzaktan yakından bir bağlantı olduğuna dair hiçbir kanıt bulunamamıştır

1.5. UV ve Görünür Bölge Spektroskopisi

Her madde üzerine düşürülen ışıklardan bazılarını absorplayabilir. Maddenin hangi dalga boylarındaki ışınları absorplayacağı kendine özgüdür. Bundan yararlanılarak nitel analiz yapılabilir. Bir maddenin absorplayacağı ışın şiddeti ise madde miktarı ile orantılıdır. Bundan yararlanılarak da nicel analiz yapılabilir. Bu amaçla madde üzerine çok çeşitli enerjilere sahip ışınlar gönderilebilir. Madde ile etkileşen ışının enerjisi değiştiğinde madde ile etkileşim mekanizması da değişir. Buna bağlı olarak ölçüm tekniğinin de değişmesi gerekir. Bu nedenle elektromanyetik spektrumun tümü için ölçüm yapılabilecek tek bir cihazın bulunması mümkün değildir. Elektromanyetik spektrumun farklı bölgeleri için farklı cihazlar kullanılır. Dalga boyu 110 nm – 1000 nm arasındaki UV ve görünür bölge ışınları ile çalışılabilen cihazlara *UV ve Görünür Bölge Spektrofotometreleri* denir. Bu bölgedeki ışınların absorplanmalarının ölçümlerini temel alan analitik yöntemde *UV ve Görünür Bölge Spektroskopisi* denir. UV ve görünür bölge ışınları molekülün en üst enerji seviyesindeki bir elektronun daha yüksek bir enerji düzeyine geçiş yapmasına sebep olur. UV ve görünür bölge ışınları, moleküllerde benzer etki yaptığı için birleştirilmişlerdir. Hem organik, hem de anorganik moleküller UV ve görünür bölge ışınlarını absorplarlar. Her iki grup molekülde de ışın absorpsiyonu elektron geçişi ile gerçekleşmesine rağmen etkileşim mekanizmaları farklıdır. Organik moleküllerdeki absorpsiyon molekül orbital teorisine göre, anorganik moleküllerdeki absorpsiyon ise kristal alan teorisine göre açıklanır.

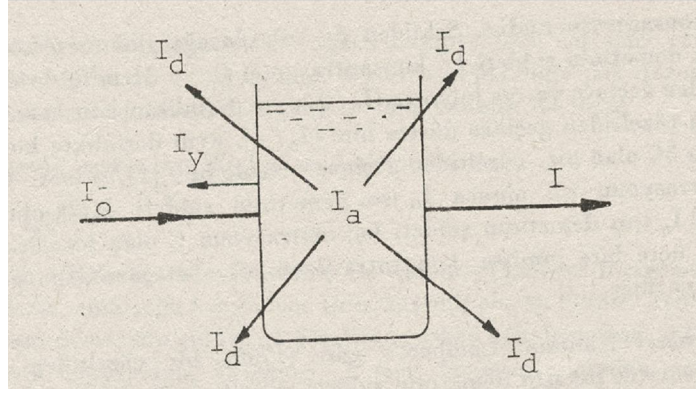
1.5.1. Absorpsiyonun nicel yorumu

Işığı geçiren bir kap içerisinde bulunan bir madde üzerine I_0 şiddetindeki monokromatik ışın demeti gönderilecek olursa demetten bir kısım ışın yansır (I_y) (ışın demeti çözeltiliye dik olarak geldiği için çözeltili kabının cidarına dik olarak geri döner), bir kısmı maddenin tanecikleri (iyon, molekül) tarafından absorplanır (I_a), bir kısmı çözeltide bulunan büyük veya büyükçe moleküller tarafından etrafa saçılır (I_d),

bir kısmı da çözültiden geçer (I). Sekil 1.2'de bu olaylar görülmektedir. Bunlar arasında,

$$I_0 = I + I_a + I_y + I_d \quad (1.1)$$

şeklinde bir bağıntı vardır.

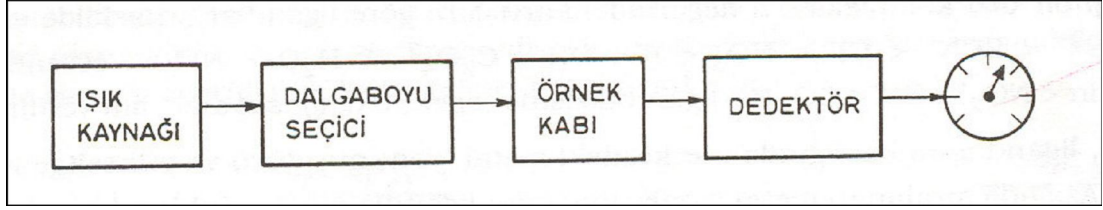


Sekil 1.4. Bir kapta bulunan bir çözülti üzerine gönderilen ışın demetinde yansıma, saçılma (dağılma) ve absorbanla I_0 demetinin zayıflaması ve I demeti olarak çözültiyi terk etmesi

Burada amaç ışık şiddetinin madde tarafından absorplanan ışık miktarını ölçmektir. Bu nedenle saçılma ve yansımada oluşan kayıpların engellenmesi gerekir. Bu amaçla I_0 şiddetindeki ışın demeti birkaç kez çözücüden birkaç kez de incelenecek maddeyi içeren çözültiden geçirilir. Saf çözücüden geçen ışık şiddeti I_0 olarak alınır. Maddeyi içeren çözültide yansıma, saçılma ve absorplama, saf çözücüde ise sadece yansıma ve saçılma gerçekleşir.

1.5.2. UV ve görünür bölge absorpsiyon spektrofotometreleri

Maddenin ışığı absorplamasını incelemek için kullanılan düzeneğe absorpsiyon spektrometresi veya absorpsiyon spektrofotometresi adı verilir. Bir spektrofotometre düzeneği sekil 1.5.'de görüldüğü gibi başlıca : ışık kaynağı, dalga boyu seçicisi ve dedektörden oluşur. Dedektörde elektrik sinyaline çevrilen optik sinyal bir kaydedici veya bir galvanometre ile ölçülür.



Sekil 1.5. Bir spektrofotometrenin temel bileşenleri

Bu ana bileşenlere ek olarak spektrofotometrelerde ışığı toplamak, odaklamak, yansıtmak, iki demete bölmek ve örnek üzerine belli bir şiddette göndermek amacıyla mercekler, aynalar, ışık bölücüleri ve giriş ve çıkış aralıkları vardır. Örnek ise, kullanılan dalga boyu bölgesinde ışığı geçiren maddeden yapılmış örnek kaplarına konularak ışık yoluna yerleştirilir.



Şekil 1.6. UV-Görünür Alan cihazı

1.5.3. UV ve görünür bölge moleküler absorpsiyon spektroskopisinin uygulamaları

Bu yöntemin başlıca uygulama alanları şunlardır.

1.5.3.1. Nitel analiz

Analizi yapılacak olan bilinmeyen madde saflaştırıldıktan sonra uygun bir çözücüde çözülerek spektrumu alınır. Bu spektrum bilinen bileşiklerin aynı koşullarda çekilmiş

spektrumları ile karşılaştırılır. Bilinmeyen madde spektrumu kendisinininkine tam olarak uygun maddedir. Bu yöntem nitel analiz için çok uygun bir yöntem değildir. Çünkü moleküllerin absorpsiyon bantları oldukça geniştir ve bazı kromoforların absorpsiyon bantları birbiri ile örtüşebilir. Ayrıca moleküllerin UV ve görünür bölge absorpsiyon spektrumlarında çok az sayıda bant bulunur. Bu az sayıda bandın birbiri ile karşılaştırılarak karar verilmesi bazen hatalı sonuçlara yol açabilir.

1.5.3.2. Nicel analiz

Işının absorplamasına dayanan analiz yöntemleri nicel analiz için oldukça yararlı ve güçlü yöntemlerdir. Bu yöntemlerin klasik yöntemlere göre önemli avantajları vardır;

- a) Analiz süresi kısadır. Sonuç çabuk alınır.
- b) Doğruluk derecesi yüksektir. Çoğunlukla analizlerdeki hata binde bir veya iki civarındadır.
- c) Oldukça duyarlı bir yöntemdir. 10^{-8} M a kadar seyreltik çözeltilerin bile analizleri yapılabilir.
- d) Her maddenin kendine özgü bir absorpsiyon spektrumu olduğu için seçiciliği yüksektir. Çoğunlukla bir karışımdaki maddeler bir ön ayırma işlemine gerek kalmaksızın analizleri yapılabilir.
- e) Hem organik hem de anorganik pek çok molekül UV ve görünür bölge ışınları absorpladığından uygulama alanı geniştir (Şener, 2006).

1.6. Kemometri

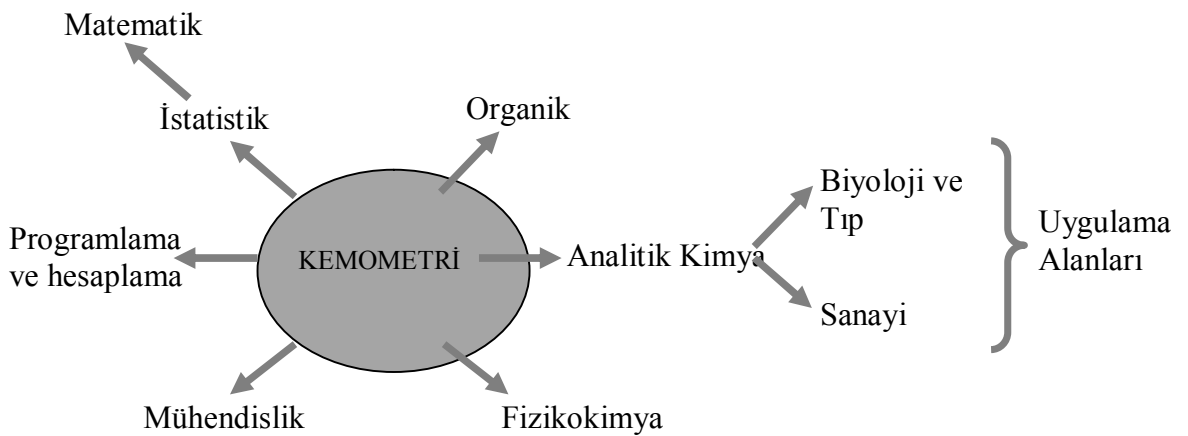
Kemometri kelime olarak, 1970'li yıllarda istatistik ve matematiksel yöntemler ile birlikte bilgisayar ve yazılımların kullanıldığı kimyadaki uygulamaları için sözü edilmeye başlanmıştır. Kemometri kavramı, 1972 yılında İsveçli Svante Wold ve Amerikalı Bruce R. Kowalski tarafından ileri sürülmüştür ve 1974 yılında Uluslararası Kemometri Derneği tarafından bu disiplinin ilk resmi açıklaması yapılmıştır. İzleyen yıllarda, dünyada, ulusal ve uluslararası kemometri konferanslarının da organize edildiği gözlenmektedir.

Tanımlayıcı ve açıklayıcı istatistik, sinyal işleme (signal processing), deneysel tasarım (experimental design), modelleme (modeling), kalibrasyon (calibration), optimizasyon (optimization), yapı tanıma (pattern recognition), sınıflandırma (classification), yapay akıl yöntemleri (artificial intelligence methods), resim işleme (image processing), bilgi ve sistem kuramı (information and system theory) gibi kavram ve uygulamalar kemometrinin konularını oluşturmaktadır.

Kemometri disiplininde temel olarak üzerinde vurgu yapılan istatistik- matematik yöntemlerdir. Rastgele (düzensiz) veriler, sırasıyla istatistiğin tanımlayıcı ve açıklayıcı yöntemleriyle karakterize ve test edilirler. Analitik verilerin işlenmesinde, istatistik ve uygulamalı matematik kemometrinin temel araçlarıdır.

Sinyallerin işlenmesi, düzleştirme (smoothing), filtreleme (filtering), türev ve integrasyon için kullanılan algoritmalar vasıtasıyla gerçekleştirilir. Fourier ve dalgacık dönüşümü gibi yöntemler sinyal işlemek için kullanılan yöntemlerdir.

Kemometrik yöntemlerin en büyük kullanıcısı analitik kimyacılar olmakla birlikte, laboratuvar ve analiz çalışması yapan komşu branşlarda da kullanıldığı yayınlanan eğitici notlardan ve bilimsel makalelerden gözlenmektedir. Kemometrinin farklı disiplinler ile ilişkileri Şekil 1. 10. de sunulmaktadır.



Şekil 1.7. Kemometrinin ilişkili olduğu disiplinler

Şekil 1.7. da görüldüğü kemometrik çalışmalarda, analitik kimyacıların ve diğer ilgili disiplinlerin ihtiyaçları ölçüsünde uygulamalı matematik ve istatistik bilgisine sahip

olmaları gerektiği açıktır. Burada programlama ve hesaplama çok önemlidir. Kemometrik uygulamaların çoğu kompleks hesaplamalar içermektedir. Bu hesaplamaları elle veya basit hesap makineleriyle gerçekleştirmek mümkün olmadığı için bilgisayar programlarına ihtiyaç vardır. Kemometrik hesaplamalarda genellikle EXCEL, MATLAB, PANORAMA, MİNİTAB, XLSTAT, SOLO ve diğer paket programlar kullanılmaktadır.

Kemometri; analitik kimya, adli tıp, biyoloji, gıda kimyası, çevre kimyası, arkeoloji gibi alanlarda kullanılmaktadır. Fizikokimyacılar ve madde bilimcilerin sinyal işleme ve çok değişkenli verilerin analizinde kemometrik yöntemleri uyguladıkları görülmektedir. Organik kimyacılar ve farmasotik kimyacılar, reaksiyon koşullarının optimizasyonunda deneysel tasarım ve ilaç tasarımında yapı etki ilişkisi çalışmalarında kemometrinin araçlarını kullanmaktadırlar.

İki veya daha fazla aktif bileşiği içeren karışımlarda bu aktif bileşiklerin hiçbir ayırma işlemi kullanmaksızın analizi analitik kimyanın ve diğer komşu branşların temel problemlerinden birisidir. Karışım halindeki numunelerin analizi için çeşitli kromatografik ve spektrofotometrik yöntemlerin yaygın olarak kullanıldığı çalışmalarda da görülmektedir. Bazı durumlarda bahsedilen bu yöntemlerin iyi sonuçlar vermediği de bir gerçektir. Sayılan bu nedenlerden dolayı daha düşük miktarlarda numunelerin analizi için gelişmiş analitik cihazlar geliştirilmesine rağmen klasik analitik cihazlardan elde edilen verilerin çeşitli matematiksel algoritmalara tabi tutularak yöntemlerin hassasiyeti ve sonuçların doğruluğu artırılmaya çalışılmaktadır. Örneğin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi, cihazın pahalı olması ve kromatografik şartların optimizasyonun uzun zaman alması gibi dezavantajlara sahiptir. Diğer taraftan türev spektrofotometrisi gibi klasik grafik işlemlere dayanan yöntemler ikili karışımların analizi için kullanılabilirliğine rağmen ikiden daha fazla aktif bileşiği içeren numunelerin analizinde yetersiz kalmaktadır (Dinç, 2007).

1.6.1 Çok değişkenli kalibrasyon algoritmaları

1.6.1.1. Temel bileşen analizi yöntemi (Principal component analysis (PCA) method)

Çok bileşenli verilerle ilgili en önemli sorunlardan biri, orijinal verilerin tamamının desen ve ilişkilerinin görülmesini engellemesidir. Çok değişkenli analiz yöntemlerinin birçoğunun temel hedefi verilerin boyutunu küçültmektir. Temel bileşen analizi daha çok bileşenler arasında korelasyonun olmadığı durumlarda verilerin miktarını azaltmak için kullanılan bir tekniktir.

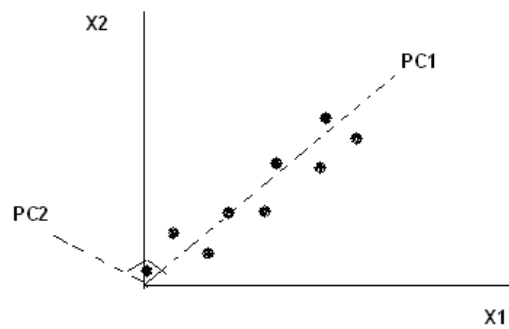
Temel bileşen analizinin dayandığı ana fikir, her bir numuneyi tanımlayan orijinal değişkenlerin, X_1, X_2, \dots, X_n , doğrusal kombinasyonu olan $PC1, PC2, \dots, PCn$ şeklindeki temel bileşenleri bulmaktır.

$$PC1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + \dots + a_{1n}X_n \quad (1.2)$$

$$PC2 = a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + \dots + a_{2n}X_n$$

vb.

Esas bileşenler genellikle ortak varyans (kovaryans) matrisinden elde edilir. Ortak varyans, iki değişkenin birleşik varyansının bir ölçüsüdür. Matematiksel anlamda temel bileşenler (PC), ortak varyans matrisinin eigenvektör (özvektör) leridir ve bu vektörlerin bulunmasında kullanılan tekniğe eigen analizi adı verilir. Her bir esas bileşene (yani, eigen vektörüne) karşılık gelen eigen değeri, o esas bileşenle tanımlanan veri takımının varyansının miktarını gösterir. Esas bileşenler birbirine dik açı oluşturur. Bu özellik diksellik olarak adlandırılır (Uyanık, 2008).

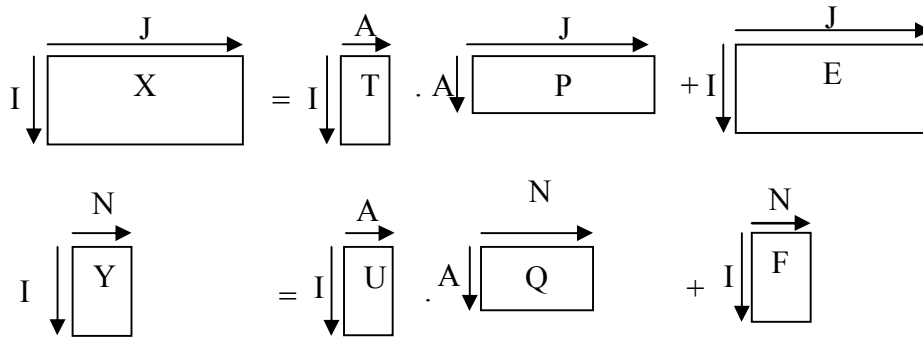


Şekil 1.8. X_1 ve X_2 olan iki değişken için $PC1$ ve $PC2$ olan iki esas bileşenigösteren diyagram (Uyanık, 2008)

1.6.1.2. Kısmi en küçük kareler yöntemi (Partial least squares regression method)

Kemometrik kalibrasyonlardan en yaygın ve popüler olanı PLS yöntemidir. PLS yönteminde kalibrasyonun kurulması için kullanılan PLS algoritmalarına göre, ortogonalize edilmiş PLS algoritması (orthogonalized PLS algorithm) ve ortogonalize olmayan PLS algoritması (non-ortogonalized PLS algorithm) gibi şekilleri vardır. Ortogonalize PLS ve ortogonalize olmayan PLS kalibrasyonunun PLS₁ ve PLS₂ şeklinde iki tipi söz konusudur. PLS₁ de bir bileşik model içerisinde iken; PLS₂ de bütün bileşikler modele dahil edilmektedir.

Wold ve Martens tarafından verilen PLS algoritması en genel olanlarıdır. PLS kalibrasyonu, sayı vektörleri vasıtasıyla X- ve Y- blokları arasındaki ilişkiye dayanır. PLS algoritmasına göre sıfır etrafında merkezleştirilmiş X- değişkeninin matrisi ve sıfır etrafında merkezleştirilmiş Y- değişkeninin parçalanması aşağıdaki biçimde verilir.



Şekil 1.9.
PLS2 kalibrasyonu

$$X = T.P^T + E \quad (1.8)$$

$$Y = U.Q^T + F$$

$$Y = X.B + F$$

$$B = W (P^T.W)^{-1} . Q^T$$

Burada $X=$ bağımlı değişken absorbans verileri), $Y=$ bağımsız değişken (örneğin derişim), $T= X$ için sayı matrisi, $U= Y$ için sayı matrisi , $P= X$ için yük matrisi, $Q= Y$ için yük matrisi, $E= X$ -kalıntı matrisi , $F= Y$ -kalıntı matrisi , $W= \max$ (kovaryans (E,F))

PCR algoritmasında olduğu gibi bu katsayılar (B) linear regresyon denkleminde yerine konursa analiz edilecek numunenin absorbans değerleri bu eşitlikte yerine yazılarak hesaplanabilir.

a) Yöntemin avantajları ; *i*) PLS kalibrasyon işlemi CLS ve ILS hesap tekniklerini kapsamaktadır, *ii*) tek aşamalı bir dekompozisyon ve regresyon işlemi gerektirir, kalibrasyonda kullanılan öz vektörler analiz edilen bileşenler ile en geniş ortak spektral değişimin olduğu bölgede doğrudan ilişkilidir, *iii*) kalibrasyonlar genellikle kalibrasyon setinin bilinmeyen numunelerden beklenen değişik derişimlerini yansıtması daha fazla güvenilirlik sağlayacaktır, *iv*) yalnızca analiz edilecek bileşenlerin bilinmesi şartıyla kompleks karışımlar için kullanılabilir, *v*) bazı durumlarda orijinal kalibrasyon karışımlarında bulunan fakat numunede olmayan bileşenli numunelerin miktar tayininde kullanılabilir, *vi*) bu tekniklerin hepsi spektral kantitatif analiz için uygulanırken literatürdeki sebepler genellikle PLS' nin tahmin gücünün yüksek olduğunu göstermektedir. Birçok durumda PLS metodları PCR' den daha iyi sonuçlar verir.

b) Yöntemin dezavantajları; *i*) PLS hesaplamaları klasik metodlardan daha yavaştır, *ii*) PLS modellerin anlaşılması ve yorumlanması zor olup son derece soyuttur, *iii*) genellikle çok sayıda numune için doğru bir kalibrasyon gereklidir, *iv*) kalibrasyon numunelerinin hazırlanması bileşenlerin derişimleri ile doğrusallıktan uzaklaşmaları nedeniyle zordur (Dinç, 2007).

1.6.2. Kalibrasyon (derişim) setinin tasarımı

Kemometrik kalibrasyonlar için kalibrasyon seti ya rasgele (randomly) yada analizi yapılacak numunede yer alan maddelerin derişimlerini içerecek şekilde kalibrasyon (derişim) setinin tasarımı yapılır. Simetrik kalibrasyon setinin planlanmasında analiz

edilecek maddelerin derişimleri, kalibrasyon setinin içinde ana kümenin permütasyonları şeklinde alt kümeler oluşturmaldır. Kemometrik çalışmalarda rasgele kalibrasyon setinin hazırlanmasından ziyade, analiz edilecek maddelerin derişimlerine göre simetrik ve hataların minimize edilmesi açısından tercih edilecek bir durumdur. Çalışmalarda derişim seti hazırlanmasında, çeşitli tasarım şekilleri verilmekle birlikte rastgele hazırlanan derişim setleri de kullanılmaktadır (Dinç, 2007).

1.6.3. Çapraz validasyon işlemleri (Cross-validation procedure)

Kemometrik kalibrasyonların validasyonu için kalibrasyonu ve tayin basamaklarında kalibrasyonun standart hatası (Standard error of calibration→ SEC) ve tayinin (tahminin) standart hatası (Standard error of prediction→ SEP) gibi parametreler kullanılmaktadır. SEC ve SEP değerlerini minimum yapan kalibrasyon koşulları ve F-istatistiği kullanılır. Kalibrasyon performanslarını değerlendirmek için, kemometrik kalibrasyonların SEC ve SEP değerleri yanında, bilinen ve tahmin edilen derişim değerlerinin lineer regresyon analizi yapılarak, korelasyon katsayısı , doğrunun eğim (m) ve kesim (n) değerleri kullanılır.

PCR ve PLS kalibrasyonlarının kurulmasında faktör seçimi için çapraz validasyon işlemleri (Cross-validation procedure) kullanılır. Bunun için karelerin tahmin (tayin) hatalarının toplamı (prediction error sum of squares→PRESS) hesaplanır. Optimal faktör sayısını bulmak için önerilen kriterler minimum PRESS değeri ve F-istatistiğidir (Dinç, 2007).

1.6.4. Kemometrik kalibrasyon yöntemlerinin uygulamaları

1.6.4.1. Kemometrik yöntemlerin uygulama alanları

Analitik kimyadaki miktar tayini çalışmalarda, kemometrik kalibrasyon yöntemleri yada çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri IR spektrofotometre, UV- görünür alan spektrofotometre, spektroflorimetre, HPLC ve kapiler elektroforez gibi analitik

cihazlardan elde edilen analitik veriler uygulanmaktadır. Analitik kimyanın prensip ve yöntemleri çok değişik komşu disiplin tarafından kullanılmaktadır. Bu da analitik kimyanın biyoloji, tıp, ziraat, gıda ve eczacılık gibi alanlarda geniş bir uygulama alanı olduğunu göstermektedir.

Analitik çalışmalarda kemometrik yöntemlerin uygulamaları anorganik analiz, organik analiz, ilaç analizi, klinik ve biyolojik numunelerin analizi, gıda ve su analizleri, çevre analizleri ve stabilite tayinleri, çözünme hızı testleri şeklinde özetlenebilir (Dinç, 2007).

1.6.4.2. Çoklu bileşen analizi (Multicomponent analysis)

Son yıllarda, çoklu bileşen analizi, analitik kimyacılar için en önemli konulardan birisi olmuştur. Bu bağlamda, aynı anda miktar tayinlerinin klinik kimyası, ilaç analizi, kirlilik kontrolü vb. gibi değişik disiplinler ile ilgili aktif bileşikler içeren karışımların kantitatif analizi için oldukça kullanışlı olduğu kanıtlanmıştır. Çok değişkenli kalibrasyonların absorban sinyallerine uygulanmasıyla çoklu bileşen analizlerinden elde edilen sonuçların doğruluğu, yöntem ve kullanılan analitik sinyallere bağlıdır.

1.6.4.3. Organik bileşiklerin kantitatif analizi

- Farmasotik analizdeki uygulamalar
- Gıdalardan renk maddelerinin analizi
- Biyolojik sıvılardaki uygulamalar
- Çevre analizindeki uygulamalar
- Anorganik analizlerdeki uygulamalar(Dinç, 2007)

1.6.5. Varyans Analizi (ANOVA)

Varyans analizi tekniği kullanılarak grup ortalamaları arasındaki farklılığın veya farklı analitik yöntemler ile elde edilen analiz sonuçlarının ortalamaları arasındaki

farklılığın önemli olup olmadığına bakılabilir. Bir araştırmada k tane işlemin (veya k tane yöntemin) n tekrarının sonunda elde edilen veriler bir tabloda özet haline getirilir. Sonra kontrol ve karşıt hipotezi aşağıdaki şekilde kurulur.

H_0 : İşlemlerin temsil ettiği popülasyon ortalamaları arasındaki fark tesadüften ileri gelmektedir. İşlem ortalamaları arasındaki gözlenen fark sıfır kabul edilebilir:

$$\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k \text{ dir.}$$

H_1 : En az iki muamele grubunun ortalaması arasında gözlenen fark tesadüften ileri gelmektedir. En az iki işlem grubunun incelenen özellik üzerine olan etkileri birbirinden farklıdır, yani aralarındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

Karşıt hipotez kurulurken en az iki işlem arasındaki fark önemlidir denilmektedir. Çünkü kontrol hipotezinin yapılan analiz sonucunda reddedilmesi için denemede dikkate alınan k tane işlemin birbirinden farklı olması gerekmez. En az iki işlem arasındaki farklılık kontrol hipotezinin reddedilmesine sebep olabilir.

Yapılan hipotez kontrolü sonucunda karşıt hipotez kabul edilmiş ise bu en az iki grup ortalaması arasındaki farklılığın önemli olduğu “çoklu karşılaştırma yöntemleri” kullanılarak araştırılır.

Gruplar arası, gruplar içi serbestlik dereceleri ve gruplar arası- gruplar içi kareler toplamı hesaplanır. Bu değerlerin oranlanmasıyla F değeri elde edilir. Elde edilen F değeri F değeri F tablosundan ($\alpha:0,05$) okunan değerle kıyaslanır.

Varyans analiz çizelgesi (ANOVA testi çizelgesi = ANalysis Of VAriation)

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F-değeri
Yöntemler arası (Gruplar arası)	$k-1$	$\sum_{i=1}^k n_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2$	$\sum_{i=1}^k n_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2 / (k-1)$	$F = \frac{\sum_{i=1}^k n_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2}{k-1} / \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X}_i)^2}{k(n-1)}$
Yöntemler içi (Gruplar içi)	$k(n-1)$	$\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X}_i)^2$	$\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X}_i)^2 / (k(n-1))$	
Genel varyasyon	$nk-1$	$\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X})^2$		

(Dinç,2009).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bouhsain ve Garrigues (1997) bu çalışmada basit ve hızlı bir analitik metot önermişlerdir. Bu metotta, 216-300 nm arasında 5 nm aralıklarla spektrofotometrik absorbanslarla PLS ile ilaçlarda olan parasetamol, asetilsalisilik asit ve kafeinin eş zamanlı tayini yapılmıştır. Üç bileşiğin sekiz standart karışımının kullanılmasını içeren metot, iki derişim seviyesinde ölçülmüştür ve %20 etanol-su karışımında örneklerin absorbanslarının ölçümü önceden incelenmiştir. Gerçek ve sentetik değerlerin analizinde, gerçek ve tahmini değerler örneklerin dayanma seviyesi olarak % den daha düşük varyasyon katsayısı ve doğruluk hatası durumlarında önceki yöntemle bulunmuştur.

Yongnian ve Gong (1997), bu çalışmada tartrazine, sunset yellow, ponceau 4R, amaranth ve brilliant blue içeren karışımların kimyasal ön ayırması olmaksızın spektrofotometrik olarak eş zamanlı analizleri bu metotla yapılmışlardır. Deneylelerden elde edilen veriler , CLS, PCR, PLS ve ITTFA gibi kemometrik yaklaşımlarla incelenmiştir. Bu işlem sırasında normal absorbans spektrumu ve 1. ve 2. türev spektrumları kullanılmıştır. Renklendiricilerin tamamından oluşan farklı derişimler içeren 16 sentetik karışımı incelenmiştir. Sonuçların farklı kemometrik yaklaşımlarla karşılaştırılarak uygulaması sağlanmıştır. ITTFA yönteminin PCR, PLS ve CLS den daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Kalibrasyonlar ilk türevlere dayandırılmıştır. Önerilen metotla, bazı ticari gıda ürünlerindeki renk maddelerinin belirlenmesi sağlanmıştır.

Berzas Nevado vd. (1998), yaptıkları çalışmada çok basit olan bir spektrofotometrik metot denemişlerdir. Bu metotta, sıfır kesişme dalgaboyunda yapılan ölçümlerle oran spektrumunun ilk türevi kullanılarak tartrazine, sunset yellow ve ponceau 4R , renk maddelerinin çoklu karışımları incelenmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafikleri 20 mg/L tartrazine (E-102), 40 mg/L sunset yellow (E-110), 32 mg/L ponceau 4R (E-124) e kadar lineerdir. 8 mg/L tartrazine, 8 mg/L sunset yellow ve 8 mg/L ponceau 4R nin dokuz standardı için sırasıyla % 0,9 ; % 0,8 ve % 2,4 standart sapmaları elde edilmiştir. Bu metotta % 94-105 oranında geri kazanım hesaplanmıştır

ve bu oran bu renklendiricileri farklı oranlarda içeren sentetik karışımlara uygulanabilirliği gösterir. Ayrıca metot ayrılma basamağı gerektirmeyen üç renk maddesini içeren üç ayrı ticari örneğede uygulanmıştır. Sonuçlar, HPLC ile karşılaştırılmıştır ve elde edilen sonuçlar benzerdir.

Capitán-Valley vd. (1998), yaptıkları çalışmada gıdalarda renk maddesi olarak kullanılan tartrazine(TT), sunset yellow (SY) ve ponceau 4R (PR) nin simultane tayini için bir metot geliştirmişlerdir. Renklendiriciler, pH:2,0 da Sephadex DEAE A-25 jelinde kararlaştırılmış ve daha sonra 1 mm silika hücrelerinde paketlenmişlerdir. Katı destekle kararlaştırılan analitlerin spektrumları 400-800 nm arasında köre karşı okunarak kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçların hesaplanmasında kısmi en küçük kareler metodu (PLS) kullanılmıştır. Üç renk maddesi için kalibrasyon grafiklerinin, lineer oranı 50-650 mg/mL dir. Bu oranlar PLS-1 algoritması kullanılarak kalibrasyon matriksinin optimizasyonuna karşı alınmıştır. Kalibrasyon matriksi için faktörlerin optimum miktarını gösteren deneysel sonuçlar, bütün örneklerde dördür ve bağıl standart sapmalar, SY için 5,5267; TT için 6,3878 ve PR için 6,9816 dır. Korelasyon katsayısının karesi, sırasıyla SY, TT, PR için 0,9977; 0,9978; 0,9954 dür. Metot, gıdalarda bulunan renk maddelerine uygulanmıştır ve sonuçlar referans metot olarak HPLC ile elde edilen sonuçlarla kıyaslanmıştır. Hesaplanan sonuçlar, dokuz ticari örnekten sekizinde kabul edilebilirdir. Bağıl standart sapmalar ise 0,5-10,8 arasındadır.

Berzas vd. (1999), bu çalışmada dört spektrofotometrik metot tanımlanmıştır ve bu metotlar tartrazine, patent blue V ve indigo karmin gibi gıda boyalarının çoklu karışımlarını çözmek için uygulanmıştır. Bu üç renk maddesinin eş zamanlı tayini, üç ticari üründe farklı oranlarda olan bu renklendiricilerin sentetik karışımlarının en iyi şekilde belirlenmesi için kullanılan ilk türev ve oran spektrum-sıfır kesişme türevi kullanılarak iki türev metodu ile başarılmıştır. Bileşiklerin direk absorpsiyon spektrumu, PLS-1 ve PCR la kalibrasyon uygulamak için spektrum verilerini optimize etmek için kullanılmıştır. Kalibrasyon metotlarının her ikisi de internal validasyonla, croos-validasyonla ve external validasyonla değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme, hem sentetik hem de ticari numunelere uygulanmıştır. Tanımlanan

dört metotta da, herhangi bir ön ayırma işlemi yapılmamıştır. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik dört spektrofotometrik metotta %95 güven sınırında çok farklılıkların olmadığını gösteren her bir boya için dokuz standardın iki serisi başarılmıştır. İki türev ve iki çok bileşenli kalibrasyon sonuçları arasındaki kıyaslamada, değerlerin iyi bir durumunda ticari ürünlerin sonuçlarının iyi olduğu bulunmuştur.

Chaloosi vd. (2001), bu çalışmada siklo-1,3,5-trimetilen-2,4,6- trinitroamin (RDX) ve siklo-1,3,5,7- tetrametilen-2,4,6,8- tetranitroamin (HMX) in UV-absorpsiyon spektrumlarını incelemişlerdir. Bu spektrumlar, kuvvetli bir şekilde üst üste çakışır ve alışımlı metotlarla ön ayırma olmaksızın direk olarak belirlenmesine izin verilmez. PLS, üst üste çakışan spektrumların kompleks karışımlarının analizi için duyarlı ve doğru bir teknik olarak geliştirilen çok bileşenli analiz yöntemidir. Deneysel kalibrasyon matrisi, 15 örnekle düzenlenir. Derişim, HMX için, 0,584 µg/mL ve 10,220 µg/mL arasında, RDX için 0,400 µg/mL ve 8,00 µg/mL arasında değişir. Cross-validasyon metodunda faktörlerin miktarı kullanılmıştır. Önerilen metodun doğruluğunu kontrol etmek için uygun model olan PLS-2 endüstriyel örneklerde bu bileşenin tayini için uygulanmıştır.

Altınöz ve Toptan (2002), yaptıkları çalışmada ikili karışımlardaki tartrazine ve ponceau 4R nin belirlenmesi bir metot önermişlerdir. Bu metotlar, sakkaroz ve sitrik asit içeren çeşitli ticari gıda örneklerindeki iki renk maddesinin eşzamanlı belirlenmesini sağlamıştır. İlk türev oran UV spektrofotometrik metodu, 300-700 nm dalgaboyu aralığında ve pH: 7,0 de fosfat tamponu ile çalışılmıştır. Doğrusallık oranı, 1,00-60,00 µg/mL tartrazine, 1,00-52,00 µg/mL ponceau 4R olarak Vierordt's metodu ile ve ilk türev UV spektrofotometrik metoduyla bulunmuştur. Değerler; farklı metotlarla ve HPLC için verilen literatür verileriyle kıyaslanmıştır. Bu metotlarda istatistik olarak çok büyük farklılıklar yoktur. Geliştirilen Vierordt's metodu ile ve ilk türev UV spektrofotometrik metodu doğru, kesin, tekrarlanabilir ve gıda örneklerine kolayca uygulanabilir.

Dinç ve Baleanu (2002), bu çalışmada tabletlerdeki silazapril ve hidroklorotiazid in eşzamanlı tayininde farklı kemometrik metotlar uygulamışlardır. CLS, ILS, PCR ve PLS metotları, karışımdaki iki ilacın üst üste çakışan spektrumlarının ön ayrılmasına gerek kalmamıştır. 0,1 M HCl ve 1:1 metanolle iki ilacın rastgele karışımını içeren kalibrasyon setleri hazırlanmıştır. UV-VIS spektrumundaki absorpsiyon verileri, $\Delta\lambda$: 4 nm aralıklarla 210-290 nm spektrum oranında 222 nm den 276 nm ye kadar 15 dalgaboyu noktasında ölçülmüştür. Geliştirilen metotların kalibrasyonu yalnızca absorbans ve derişim verilerinin matrislerini içermektedir. Geliştirilen kalibrasyonlar iki ilacın sentetik karışımları ile test edilmiştir ve Maple V programı ile kemometrik kalibrasyonlar oluşturulmuştur. Metotların sonuçları HPLC metodu ile elde edilen sonuçlarla kıyaslanmıştır.

Dinç vd. (2002), yaptıkları bu çalışmada çift ayrımlı-oran spektral türevi (grafiksel metot), CLS ve PCR metotları, kimyasal ayırma gerektirmeksizin üç renk maddesinin sentetik karışımlarında ve toz içeceklerin spektrofotometrik çok bileşenli analizi için geliştirilmiştir. Grafiksel metot, çift ayırım kullanılarak oran spektrumlarının türev sinyallerinin kullanılmasına dayandırılmıştır. Bu metotta, doğrusal belirleme oranları, 2-8 $\mu\text{g/mL}$ sunset yellow, 4-18 $\mu\text{g/mL}$ tartrazine, 2-8 $\mu\text{g/mL}$ allura reddir. Numerik metotlarda, training seti, 0-8 $\mu\text{g/mL}$ sunset yellow, 0-18 $\mu\text{g/mL}$ tartrazine, 0-8 $\mu\text{g/mL}$ allura red arasında 18 tane örneğin kullanılmasıyla hazırlanmıştır. Kemometrik kalibrasyonlar, 325-584 nm arasında 375 den 50 ye kadar 7 noktada absorbanslar ve kullanılan tahmini training seti hesaplanmıştır. Önerilen metot, toz içeceklerde olan 3 renk maddesinin eş zamanlı tayini için uygulanmıştır. Bulunan sonuçlar, istatistiksel olarak birbiri ile kıyaslanmıştır.

González vd. (2002) bu çalışmada diot sıralı dedektörlerle sıvı kromatografisi gibi pahalı enstrümental yöntemlerinin azaltılması için gıdalarda sentetik ve doğal olarak bulunan renk maddelerinin tayini için basit bir yöntem geliştirmişlerdir. Hızlı akım sistemi yalnızca sentetik karışımların alıkondduğu ve sulu amonyakla daha sonra ayrıldığı yün/pamuk kolondan geçirilen asetik asit ortamında sentetik ve doğal renklendiricileri içeren örnekleri incelemeyi amaçlandırmışlardır. Spektrofotometrede sırasıyla sarı, kırmızı ve yeşil-mavi-kahverengi eklemelerle 400,

530, 610 nm de gözlemler yapılmıştır. Doğal ve sentetik renklendiricilerin arasında tamamen ayrılma, sentetik renklendiricilerin dedeksiyon limitinin 2000 (sarı), 2000 (kırmızı), 10.000 (kahverengi) nin üstünde doğal renklendiricilerin molar derişimleri bulunmuştur. Metotta, sentetik renklendiriciler olan tartrazine, eritrosin B, brilliant black BN nin 5 konsatrasyonunda tahminler yapılmıştır. İki dedeksiyon limitinin derişimi için hatalı negatif yüzde oranları, %8 den %12 ye kadardır. Sonuç olarak, metot bazı meyveli içeceklere uygulanmıştır ve 10 /saat sürekli örneklendirmeyele sentetik renklendiriciler belirlenmiştir.

Dinç ve Üstündağ (2003), bu çalışmada tabletlerde bulunan hidroklorothazin ve spironolaktunun spektrofotometrik eşzamanlı tayinini yaparak sonuçları, CLS, ILS, PCR ve PLS ile değerlendirmişlerdir. Kemometrik analiz metotları, ön ayırma gerektirmez. İlaçların ikisini de içeren 25 standart karışımın çalışma seti, karışım dizaynına göre 2-20 µg/mL derişim aralığında hazırlanmıştır. Çoklu kalibrasyonlar, çalışma seti kullanılarak 220 den 290 nm ye kadar 15 noktada zero-order ve ilk türev absorbansları ölçülmüştür. Çok bileşenli analiz metotlarının validasyonu, hidroklorothazin ve spironolaktunun sentetik karışımları analiz edilerek incelenmiştir. Sentetik karışımlar ve tabletlerden elde edile sonuçlar, tekyollu ANOVA testi ile istatistiksel olarak kıyaslanmıştır. Kemometrik analiz metotları, farmakolojik tablet formülasyonunda, hidroklorothazin ve spironolaktunun eş zamanlı tayini için uygun görülmüştür.

López-Martínez vd. (2003), bu çalışmada PLS-1 kullanarak kahve ve çay örneklerinde kafein (CF) ve theobromine (TB) nin simultane tayinini yapmışlardır. Örnek hazırlama güçlü karışım bileşenlerini elimine etmek için gereklidir. Kafein ve theobromidin HPLC ile dört derişimi kahve ve çay için universal kalibrasyon matrislerini düzenlemede kullanılmıştır. Theobromidin düşük seviyesinden dolayı (1000:1) kafeinle karıştırılmıştır. Geliştirilmiş metot uygulaması için bu gereklidir. Metot, HPLC standartıyla istatistiksel olarak farklılıklar göstermemiştir.

Yongnian vd. (2003), yaptıkları bu çalışmada gıda maddelerindeki glukoz (GLU), fruktoz (FRU) ve laktoz (LAC) un eş zamanlı nicel tayini için farklı bir

spektrofotometrik metot geliştirmişlerdir. Bu metot, oksidant olarak potasyumferrisiyanür ve oksidatif reaksiyonda analitlerin farklı kinetik oranlarına dayanmaktadır. Reaksiyon verileri, potasyumferrisiyanürün spektrumunun 420 nm analitik dalga boyunda kaydedilmiştir. Glukoz, fruktoz ve laktozun kinetik hızlarının üst üste çakışmasıyla, durum numaraları, deneysel şartların optimizasyonu ile veri matrisi için hesaplanmıştır. 80°C ve 1,5 mol/L değerinde sırasıyla NaOH in sıcaklık ve derişimi seçilmiştir. Doğrusal kalibrasyon grafikleri, glukoz, fruktoz ve laktoz için sırasıyla 2,96-66,7; 3,21-67,1; 4,66-101 mg/L derişim oranında elde edilmiştir. Şekerlerin sentetik karışımları hazırlanmıştır. Elde edilen veriler, normal ve ilk türev kinetik verileri kullanılarak, PLS, PCR, BP-ANN, RBF-ANN gibi kemometrik metotlarla belirlenmiştir. Sonuçlar, analitin tahmini için gelişmelere sahip olan ilk türev verilerine dayandırılan kalibrasyonları ve RBF-ANN nin 5 kemometrik metodunun en düşük tahmini hatalarını verdiğini göstermektedir. Önerilen metodun validasyonu incelenerek, bazı ticari gıda örneklerinde bu üç şekerin tayini uygulanmaktadır ve bütün örneklerde standart ekleme metodu uygun sonuçlar vermiştir.

Abdollahi ve Bagheri (2004), yaptıkları bu çalışmada cloud point ekstraksiyonunu kullanarak verileri PLS ile değerlendirmişlerdir. Cloud point ekstraksiyonu, surfaktan olarak oktilfenoksipolietoksietanolun (Triton-X-114) kullanıldığı genetik algoritma-PLS ile anilin reaksiyonundan sonra eş zamanlı spektrofotometrik analizden sonra vitamin K₃ ve 1,4-naftokinonun ön derişimi için kullanılmıştır. Metodolojinin analitik performansını etkileyen kimyasal değişkenlerle çalışır ve optimizasyon sağlanır. Optimum koşullar altında örnek çözeltinin 15 mL sinin ön derişimleri, sırasıyla vitamin K₃ ve 1,4-naftokinon için 0,05 ve 0,08 µg/mL olarak dedeksiyonla sağlanır. PLS, GA-PLS, ITTFA ve PC-ANN nin tahmini yeteneği, iki kinolinin eş zamanlı tayini için kontrol edilmektedir. GA-PLS; kimyasal sistem hakkında kullanılabilen bileşimin olduğu, tahmini kapasitenin eksikliği olmaksızın genetik algoritma kullanılan PLS kalibrasyonunda dalgaboyu seçinine bağlı olarak uygulanan diğer çok bileşenli analiz yöntemlerine göre üstünlük göstermektedir.

Abbaspour ve Mirzajani (2004), bu çalışmada β -düzeltme soektrumları kullanılarak kalibrasyon matrisi uygulandığında V(V) ve Al (III) un eş zamanlı tayinini, neural network un uygulanmasıyla sağlamışlardır. V(V) ve Al (III) un arasında alizarin kırmızısı (ARS) nin ligandlığıyla incelenmektedir. Bu metal iyonlarının simultane spektrofotometrik tayini uygulanmıştır. Sistemin davranışının kontrolündeki parametreler incelenir ve optimum koşullar seçilmiştir. Neural network metodu, optimum koşullar altında karışımlarda nicel olarak bulunan metal iyonlarını bulur. Sigmoidal fonksiyon gizli kullanılmıştır. Tayinler, V(V) in 0,90-7,80 $\mu\text{g/mL}$, Al (III) un 0,11-4,20 $\mu\text{g/mL}$ derişim oranlarında yapılmıştır. Toplam bağıl standart sapma hatası, %4,02 den daha az olan bazı sentetik çözeltilerde olan bu metal iyonlarının eş zamanlı tayini için iyi sonuçlar veren bir yöntemdir.

Palabıyık vd. (2004) bu çalışmada, spektrofotometrik metotlar, psedöfedrin hidroklorik ve ibuprofenin eş zamanlı tayini yapılmıştır. Elde edilen verilen, 5 farklı metot kullanılarak değerlendirilmiştir. İlk metot, oran spektal türev spektrofotometrisidir. Ve bu yöntemde analitik sinyaller, 0,1 M HCl çözeltilinde her bir spektrum kullanılarak elde edilen oran spektrumunun ilk türev spektrumunda, iki ilac için hem maksimum hem minumuma bağılı olarak dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Diğer dört spektrofotometrik metot, kemometrik metotlardır. Bu metotlar, klasik kalibrasyon metodu, ters faz kalibrasyonu, bileşen regresyonu (PCR) ve kısmi en küçük kareler metodu (PLS) dir. Bu yöntemlerde, derişim veri matrisi, metanol:0,1 M HCl de (3:1) bu ilaçların sentetik karışımları kullanılarak hazırlanmıştır. Derişim veri matrisiyle ilgili olarak absorpsiyon veri matrisleri, zero-order spektrumunda 18 dalgaboyunda 2,5 nm aralıklarla 240-285 nm aralığında absorpsiyon ölçümleriyle elde edilmiştir. Kalibrasyon veya regresyon, karışımda psedöfedrin hidroklorik ve ibuprofenin bilinmeyen derişimlerinin tahmini için absorpsiyon veri matrisi ve derişim veri matrisi kullanılarak elde edilmiştir. Yöntemler, herhangi bir ayırma basamağı gerektirmez. Doğrusal oran, bütün beş metotta da ibuprofen için 300-1300 $\mu\text{g/mL}$, psedöfedrin HCl için 100-1300 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Metodun kesinliği ve tahmini belirlenir ve analiz edilen sentetik karışımlarla kontrol yapılır. Beş metotta başarılı olarak tabletlere uygulamıştır.

Dinç vd. (2005), bu çalışmada üst üste çakışan spektrumların olduğu efervesan tabletlerde askorbik asit (AA) ve asetilsalisilik asit (ASA) simultane spektrofotometrik tayini ; sürekli dalgaboyu transferi (CWT) , türev spektrofotometresi (DS), PLS ile herhangi bir ön ayırma işlemi olmaksızın başarıyla yapılmıştır. CWT ve DS, AA ve ASA nm kalibrasyon eşitlikleridir. AA ve ASA için CWT ve DS kalibrasyon eşitlikleri, sırasıyla çizilen sürekli dalgaboyu katsayıları ve ilk türev absorbans değerlerine karşı dalgaboylarıyla sağlanan spektrumun sıfır-kesişme noktalarıyla ölçülen CWT ve DS boşluklarıyla bulunmuştur. PLS kalibrasyonu 210-310 nm oranında 220 den 305 nm ye kadar 850 noktanın bütün absorbans verileri ve derişim seti kullanılarak şekillendirilmiştir. Bu üç metot, yukarıdaki ilaçların sentetik karışımları analiz edilerek test edilmiştir ve konu olan ilaçların iki ticari karışımını içeren gerçek örneklere uygulanmıştır. Karşılaştırma çalışması, üç analitik metodun metodolojisi ve doğru sonuçların bulunmasından elde edilen deneysel sonuçlarla desteklenmiştir.

Dinç vd. (2005), yaptıkları bu çalışmada parasetamol (PAR), asetilsalisilik asit (ASP) ve kafeinin (CAF) inin çoklu karışımları ve nicel olarak çözülebilen tabletlerinde, oran-spektrum ilk türev-sıfır kesişmesi ve oran-spektrum sürekli dalgaboyu transferi metotları (CWT) gibi iki grafiksel transform metoduyla, üst üste çakışan spektrumlar verdiklerinden dolayı başarıyla incelenmişlerdir. Bu çalışmada, oran-spektrum ilk türev-sıfır kesişmesi ve oran-spektrum sürekli dalgaboyu transferi metotları, ölçülen $dA / d\lambda$ ve sıfır kesişme noktalarına karşı oran spektrumunun transform sinyallerine dayandırılmıştır. Bulunan kalibrasyonlar, sentetik karışımlar ve standart ekleme tekniği kullanılarak test edilmiştir ve ticari ilaç numunelerinde PAR, ASP ve CAF in eşzamanlı tayinine uygulanmıştır. Sonuçlar, HPLC metodundan elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

Espinosa-Mansilla vd. (2005), bu çalışmada çok bileşenli kalibrasyon metotlarını, çok kararlı dedeksiyonla spektroskopik verilerin analizine uygulamışlardır. Spektrofotometrik ve fluorimetrik sinyallerin dayandırıldığı iki yöntem, iki florokinolonun (siproflaksin ve oflaksin) ve iki non-steroidal ateş düşürücü ilaçların (diklorofenac ve metenamic) eş zamanlı tayini için kullanılmıştır. Spektrofotometrik

metotta, sayılan iyon olarak trioktilmetilamoniyumklorit-adojenin kullanıldığı klororoform ekstraktif yöntemi optimize edilmiştir. Optimizasyon, idrar örneklerinden ve elimine edilen matrislerden ekstarkte edilen analitler ayrılmıştır. Ayırmadan sonra, organik fazın absorpsiyon absorpsiyon spektrumu PLS metodunda analitik sinyal olarak kullanılmıştır. Ekstraksiyon emisyon floresans matrislerinin kullanıldığı fotolanan metot (PIF), ön ekstraktif temizleme basamağı olmaksızın idrar örneklerinde oflaksin, siproflaksin, diklorofenac analizinin amacıyla üç yollu kemometrik kalibrasyon uygulanması amaçlanmıştır. Her iki yöntem için, geri kazanım değerleri bütün analitler için % 100 dür. PIF üç yollu kemometrik metodu, en duyarlı ve seçici methodur. Bu metot, üç yollu kemometrik metot kullanılarak, idrar engellerini module etmiştir.

Güler (2005), yaptığı bu çalışmada Türkiyede Türk tatlılarının 140 örneğinde ve 96 toz örnekte, hem nicel hem de nitel olarak UV-VIS spektrofotometrik tayinlerinde renklendiriciler analiz etmiştir. 6 ve 5 sentetik renk maddesi, sırasıyla şekerlemelerde ve toz örneklerde tayin edilmiştir. Eritrosin hariç şekerlemelerde bulunan bütün renk maddeleri analiz edilmiştir. Bu renk maddeleri, Türk Gıda Kodeksi ve Avrupa Komitesinin kullanım için izin verdiği ölçüdedir. İzin verilen renk maddeleri 63 seviyesinde %43,7 dir. Toz örnekler için % 36,45 dir.

Longares-Patrón ve Cañizares-Macías (2005), bu çalışmada vanilya tohumundan vanilya ve p-hidroksibenzaldehit (PHB) nin hızlı ekstraksiyonu için hızlı bir metot önerilmiştir. Hızlandırılan ekstraksiyon prosesi ve fotometrik denetleme için mikrodalga enerjisiyle aydınlatılan örnekler sırasıyla vanilya ve p-hidroksibenzaldehit (PHB) için 348nm ve 329 nm dir. Ekstraktlardan vanilya ve p-hidroksibenzaldehit (PHB) eş zamanlı tayini için % 2,5 dan daha az olarak açıklanan bağıl standart sapmaları olan Vierordt's Metodu uygulanmıştır. Mikrodalga aydınlatma tozu, aydınlatmanın miktarı ve aydınlatmayan devirler, aydınlatma zamanı ve etanol derişimi, aydınlatma tozu ve aydınlatma devir miktarının vanilya ekstraksiyon prosesinde en önemli şartlar olduğunu gösteren çoklu ortalama optimize edilmiştir. Odaklanmış mikrodalga destek ekstraksiyonu; ticari, iyofilize ve kuru vanilya örneklerine uygulanmıştır. Ticari vanilya örneklerinde vanilya ve PHB nin

ekstraksiyonu, kuru ve iyofilize örneklerden daha yüksek sonuçlar vermiştir. 62 kez ekstraksiyon zamanında artışla/azalışla amaçlanan FMAE ile vanilya ve PHB derişimleri arasında %40-%50 oranında nokta vardır.

Sorouraddin vd. (2005), yaptıkları bu çalışmada PLS ve PCR metotlarını, pridoksin (PY) ve melatonin (MT) in eş zamanlı spektroflorimetrik ve spektrofotometrik tayini için kullanmışlardır. Bu ilaçların üst üste çakışan emisyon ve absorpsiyon spektrumlarından dolayı, PY ve MT ne florimetrik ne de spektrofotometrik metotlarla direk olarak tayin edilemez. Tüm-spektrum çok bileşenli kalibrasyon PLS ve PCR metotları, hem florimetrik hem de spektrofotometrik olarak geliştirilmiştir. Şartlar, florimetrik olduğu kadar spektrofotometrik tayin içinde optimize edilmiştir. PY ve MT nin simultane tayini, florimetri için 324-500 nm arasında emisyon floresans spektrumu kaydedilmiş, spektrofotometre için 250-350 nm arasında absorpsiyon spektrumu kaydedilen örnekle çalışılmıştır. Deneysel kalibrasyon matrisleri, dikey olarak dizayn edilmiştir. Uygun şartlarda, dinamik oran, florimetri için 0,04 - 1,4 ve 0,1 - 4,0 µg/mL dir, spektrofotometri için 1 – 22 µg/mL ve 1 – 24 µg/mL dir. Bu değerler sırasıyla MT ve PY içindir. Kalibrasyon derişimleri, dinamik oranda hazırlanmıştır. MT ve PY nin simultane tayini için kemometrik yöntemlerin parametreleri optimize edilir ve önerilen metot, tahmini setle validasyon yapılmıştır. Sonuç olarak yöntemler, sentetik karışımlar ve farmakolojik formülasyonda PY ve MT nin tayini için oldukça başarılıdır.

Yongnian vd. (2005), bu çalışmada gıda katkı maddeleri olan maltol (MAL), etilmaltol (EMA), Vanilin(VAL) ve etilvanilin (EVA)nın UV spektrumu ile tayinin yapmışlardır. Bu maddeler üst üste çakışan spektrum veren türlerdir ve ön ayırma olmaksızın karışımlarından tek tek belirlenmeleri zordur. Bu çalışmada kemometrik yaklaşımlar, bu bileşiklerin eşzamanlı olarak tayini için üst üste çakışan spektrumların çözülmesi ile uygulanmıştır. 200-350 nm arasında, absorpsiyon spektrumlarını içeren, ortogonal verilerin kullanılmasıyla bu dört bileşiğin analizi, bu bileşiklerin karışımını içeren kalibrasyon setinden sağlanmıştır. CLS, PCR, PLS, ANN gibi farklı metotlarla incelenmişlerdir. Kemometrik modeller, dört bileşiğin sentetik çözeltilerinden yapılandırılan validasyonun kullanılmasıyla test edilmiştir.

Kemometrik metotların analitik performansı, bağıl tahmin hataları (RPE) ve geri kazanımlar ile karakterize edilmiştir. Önerilen metodun ticari gıda ürünlerinin analizine uygulanması başarılıdır. RBF-ANN, kemometrik metotlardan en iyi sonuç verendir. CLS ve DCLS zayıf sonuçlar verirken, PLS, PCR, DPLS ve DPCR daha iyi sonuçlar vermektedir. Dört bileşiğin 1,0-20,0 mg/L derişim oranında doğrusallığı vardır. Dedeksiyon limiti (LOD) ise MAL, EMA, VAN, EVA için 0,39; 0,56; 0,49; 0,38 mg/L dir.

Aktaş ve Pekcan (2006), bu çalışmada yapay sinir ağı (ANN) yöntemini sunset yellow, tartrazine ve allura red karışımlarının spektrofotometrik verilerini değerlendirmek için kullanmışlardır. Network yapısının optimize edilmesiyle, doğruluk elde edilmiştir. Bu çalışmanın amacı, katı faz spektrofotometresi kullanarak ticari ürünlerde renklendiricilerin karışımlarını çözmek için ANN metodunun uygulanmasıdır. Önerilen metot hızlı ve kolay uygulanabilirdir. Ayrıca duyarlılığı ve seçiciliği yüksektir.

Aktaş vd (2006), yapay sinir ağı (ANN) yöntemi başarıyla çok doğal sularda ikili içeren farklı maddelerin bileşen analizi uygulanmıştır. Bu uygulamada YSA yöntemi bu maddelerin karışımlarının kantitatif çözünürlük ve bu yaklaşım herhangi bir ayırma ve ekstraksiyon adımları gerektirmez uygundur. Yöntemi çeşitli sentetik üçlü karışımları ve örnek uygulanan ve başarılı sonuçlar kullanılarak test edildi elde edilmiştir.

Dinç ve Baleanu (2006), bu çalışmada fonksiyonel dalgaboyu transferinin (FWT) yeni bir uygulaması, enjeksiyon için farmakolojik kombinasyonda ampicillin (AP) ve sulbactam (SB) in eşzamanlı tayini önerilmiştir. FWT nin yaklaşımı, absorpsiyon spektrumundan konuyla ilgisiz bilgiyi ve gürültüyü kaldırmaktır. Spektrum oranının, yüksek pik genişliği, elimine edilen gürültü ve genişletilen keskin piklere ait en önemli bilgi, orijinal absorpsiyon spektrumları için FWT yönteminin uygulaması ile sağlanmıştır. Bu çalışmada, FWT; 211,5-313-8 nm dalgaboyu aralığında SB ve AP den sağlanan UV-sinyallerinin veri vektörlerine bağlıdır. Türev transform, FWT nin genelleştirilmesi ile orijinal asborpsiyon sinyaline uygulanmıştır. AP ve SB nin

kalibrasyon grafikleri, sıfır-kesişme noktasında FWT ölçümünden ve genel türev genişliğinden bulunmuştur. Metot validasyonu, sentetik karışımlar kullanılarak yapılmıştır. Amaç, FWT metodunun kemometrik metotlarla ve genel türev spektrofotometrisiyle kıyaslanmasıdır. Oldukça iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Afkhami vd. (2007), bu çalışmada PLS-1 kalibrasyon modelini CN^- ve SCN^- nin eşzamanlı tayini için spektrofotometrik yöntemden elde edilen sonuçlara uygulamışlardır. Bu metot, 30 °C de pH: 4,0 tamponunda kloramin-T ile CN^- ve SCN^- iyonları arasındaki reaksiyonun oranında farklılıklar içermektedir. Retilen siyonojen klorit ($CNCl$); piridinle reaksiyona sokulmuş ve ürün, barbitürik asitle yoğunlaştırılmış ve son renk maddesi ile biçimlendirilmiştir. Çözeltilerin absorpsiyon kinetik profilleri, iki saniye aralıklarla reaksiyonun başlangıcından sonra 20-180 saniye zaman aralığında 578 nm de ölçülen absorbanslarla görüntülenmiştir. PLS-1 kalibrasyonu için deneysel kalibrasyon matrisi 31 örnekle düzenlenmiştir. Cross-validasyon metodu, faktörlerin seçilen sayısı için kullanılmıştır. Sonuçlar, sırasıyla CN^- ve SCN^- iyonları için 10,0-900 ng/mL ve 50-1200 ng/mL oranında uygulandığını göstermiştir. Önerilen metot, su örneklerinde CN^- ve SCN^- in eşzamanlı tayinine uygulanmıştır.

Hemmateenejad vd. (2007), bu çalışmada PLS ve PCR üstünlüğü sorgulanan çok bileşenli analiz için kemometride önemi dikkat vurgulanmıştır. Dalgaboyu seçiminin etkisi hesaba katılarak, anilin, fenol, difenilamin (DPA) nın eşzamanlı spektrofotometrik tayiniyle PCR ve PLS metotları arasında bir kıyaslama yapılmıştır. Analitlerin UV absorbans spektrumları, 1,0-10,0 µg/mL derişim oranlarında ölçülmüş ve sonuçlar PLS ve PCR ye tabi tutulmuştur. Modellere, cross-validasyonla validasyon işlemi yapılmıştır. Modifiye edilen değişen hareket pencereleri ile, her bir analit için daha iyi spektral bölge seçimi amaçlanmıştır. Daha güvenilir sonuçların olduğu regresyon metotları için tahminlerin dalga sayısı seçimi ile gelişen niteliği doğrusal komşu dalgaboyunun taşınması ile bulunmuştur. Sonuçlandırılan veriler, bütün spektrumlar kullanıldığında çok veya az sonuçlar üreten PLS ile açıklanmıştır. Fakat seçilen dalgaboyu aralıkları durumunda benzer sonuçlar üretilmiştir. Ana fark

PCR için faktörlerin yüksek miktarlarıyla sağlanmıştır. Bu büyük bir sorun oluşturmamıştır.

Liao vd. (2007), bu çalışmada zayıf asit karışımlarının eş zamanlı tayini için kemometri ile birleştirilen yeni spektrofotometrik titrasyon metodu geliştirilmiştir. Bu metotta, titrant olarak sodyum hidroksit-asit/baz indikatörü karışımı kullanılmıştır. İndikatör, titrasyon yöntemini denetlemek için kullanılmıştır. Titrasyon yönteminde, her bir titrasyon noktasında titrant ve çözünen sitin eklenen hacimleri, least square algoritmasıyla absorbans spektrumundan simultane olarak hesaplanmıştır. Sonra karışımdaki her bileşenin derişimleri, PCR ile titrasyon eğrisinden bulunmuştur. Metot, analitik sonuçların elde edilmesi için bilgi gerektirir ve hacim ölçümlerinden bağımsızdır. Analizler , titrasyonun son noktasından bağımsızdır. İndikatör ve asitlerin kararlılık sabitlerinin doğru değerlerini gerektirmektedir. Metot, mükemmel sonuçlarla benzoik asit, salisilik asit karışımlarının ve fenol, o-klorofenol ve p-klorofenol karışımlarının eş zamanlı analizi için uygulanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada, UV/VIS spektrofotometrisi yöntemi ile çay numunesinde bulunan metilksantin türevlerinin (kafein, teofilin, teobromin) nicel olarak tayini yapılmıştır. Bu metilksantin türevleri kafein (Fluka), teofilin (Sigma), teobromin (Sigma)dir. Elde edilen veriler, PCA, PLS gibi kemometrik yöntemlerle değerlendirilmiştir. Önce tek tek sonra farklı oranlarda hazırlanan sentetik karışımların spektrumları alınmıştır. Son işlem olarak da ticari olarak alınan farklı çay örneklerinde ölçümler yapılmıştır.

Elde edilen veriler, Minitab 15, Panorama, XLSTAT Solo adı verilen kemometrik programlar ile değerlendirilmiştir. Temelde bu programlar,

- Veri ve Dosya Yönetimi
- Temel İstatistikler
- Regresyon Analizi
- Varyans Analizi (ANOVA)
- İstatistiksel Süreç Kontrolü (Statistical Process Control - SPC)
- Deney Tasarımı
- Güvenilirlik Analizleri
- Çok Değişkenli Analiz
- Zaman Serileri ve Kestirim
- Simülasyonlar ve Dağılımlar

özelliklerini içermektedir.

3.2. Kullanılan Cihazlar

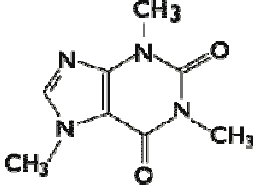
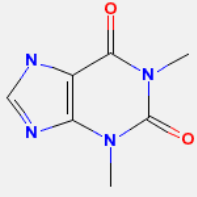
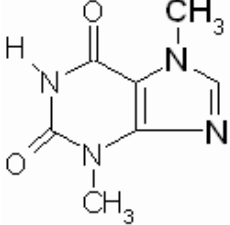
3.2.1. UV-görünür spektrofotometre cihazı

UV – Vis spektrumları, bilgisayar tarafından kontrol edilen 1 cm uzunluğundaki hücre ile donatılan UV 1700 PHARMASPEC SHIMADZU spektrofotometresi kullanılarak belirlenen spektrum değerleri çay numunelerindeki metilksantin türevlerinin miktarını belirlemek için kemometrik metoda uygulanmıştır.

3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneyleerde analitik saflıkta olan kimyasallar kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan kimyasallar Çizelge 3.1.' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve formülleri.

BİLEŞİĞİN ADI	BİLEŞİĞİN FORMULÜ
Kafein	
Teofilin	
Teobromin	
Kurşun asetat	$Pb(CH_3COO)_2$
Sodyum karbonat	$NaCO_3$

Su , 0,05 S. cm⁻¹ den düşük kondüktiviteye sahip , Milli – Q su arıtma (Millipore Corp.) sisteminden sağlanmıştır.

3.3.1 Kullanılan çözeltiler

Çalışmada spektrofotometrik ölçümler için :

Bütün metilksantin türevleri 10 mg / 100 mL olacak şekilde stok çözeltileri hazırlanmıştır.

Stok Kafein Çözeltisi

Kafein maddesinden 0,0100 g tartılarak bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim 100 mL ye tamamlanmıştır.

Stok Teofilin Çözeltisi

Teofilin maddesinden 0,0115 g tartılarak bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim 100 mL ye tamamlanmıştır.

Stok Teobromin Çözeltisi

Teobromin maddesinden 0,0101 g tartılarak bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim 100 mL ye tamamlanmıştır.

Çay Numunesinin Hazırlanması

1 gram çay 30 dakika 100 mL suda kaynatılır. Elde edilen çözelti süzülür ve hacmi 100 mL ye tamamlanır. % 10' luk 0,5 mL kurşunasetat, 100 mL den alınan 25 mL'lik örneğe eklenir ve karışım 2 dakika oda sıcaklığında karıştırılır. Çözelti tekrar süzülür ve ortamda fazla kalan kurşun asetati uzaklaştırmak için 0,1 mL %10' luk sodyumkarbonat eklenir. Karışım tekrar süzülür ve hacim 100 mL' e tamamlanır.

3.4. Yöntem

3.4.1. UV/VIS spektroskopisi yöntemi

Bu çalışmada, spektrofotometrik ölçümlerle metilksantin türevlerinin stok çözeltilerinin spektrumları okunmuştur. Bu işlem için önce tek tek sonra farklı oranlarda hazırlanan sentetik karışımların spektrumları alınmıştır. Son işlem olarak da farklı çay örneklerinde ölçümler yapılmıştır. Elde edilen veriler, farklı kemometrik yöntemlerle değerlendirilmiştir. İlk basamakta, UV spektrofotometre cihazının kalibrasyonu (sıfırlama işlemi) yapılmıştır. Kalibrasyon işlemi önce her iki hücre boş bırakılarak havaya karşı yapılmıştır. Sonra aynı işlem bu kez her iki ışık yoluna saf su ile hazırlanan kör numunesi konularak yapılmıştır. Bütün okumalarda hep kör bu şekilde hazırlanmıştır. Kör olarak sadece saf su kullanılmasının nedeni bu

çalışmada genel olarak çözücümüz saf su olduğu içindir. Kör seçimi yapılırken girişim etkilerini yok etmek için, kör olarak çözücü tercih edilmiştir. İkinci basamakta, saf metilksantin türevlerinin tek tek spektrumları alınmıştır. Bu işlem esnasında stok metilksantin türevlerinin derişimleri 5-20 ppm arasında olacak şekilde 0,0025-0,02 mL arasında saf maddeler stoklardan alınarak toplam hacim 25 mL ye tamamlanarak çözeltileri hazırlanmıştır ve UV spektroskopisinde absorbands okumaları yapılmıştır. Üçüncü basamakta, her bir madde ayrı bir dalga boyunda maksimum verdiğiinden saf metilksantin türevlerinden oluşturulan sentetik karışımların UV spektroskopisinde absorbands okumaları yapılmıştır ve birbiri yanında herhangi bir ön ayırma işlemine gerek olmaksızın metilksantin türevlerini incelenmiştir. En son basamakta ise, çay numunesinden hazırlanan çözeltiler incelenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. UV Spektroskopisi

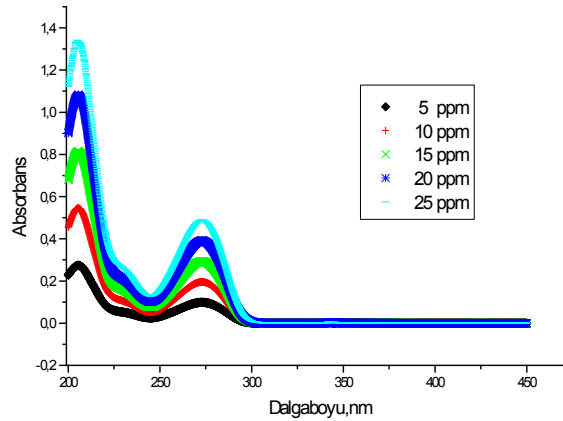
Önce her bir metilksantin türevinin saf halde ~ 10 mg/100 mL saf suda standart çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra 0,0025-0,02 mL mL arasında saf maddeler stoklardan alınarak toplam hacim 25 ml'ye tamamlanmıştır. Bu işlem sonrası absorbanslar ölçülerek kaydedilmiştir. Her bir metilksantin türevinin derişimleri ppm olarak hesaplanmış ve absorbanslardan yararlanılarak molar absorpsiyon katsayıları belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Metilksantin türevlerinin spektroskopik özellikleri

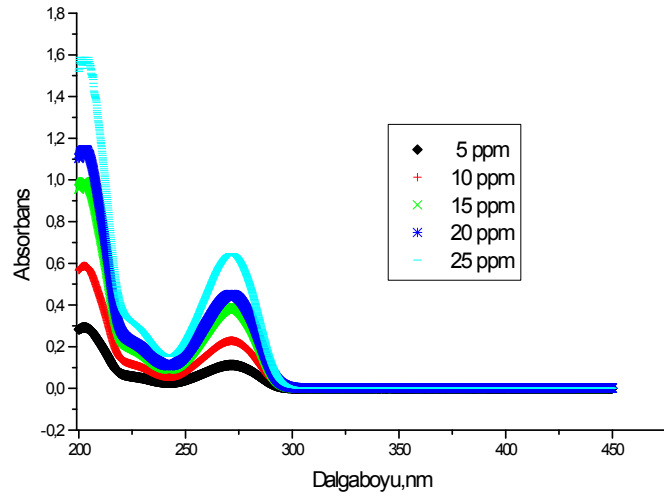
	MAK. ABS. YAPTIĞI DALGABOYU	MOLAR ABSORPSİYON KATSAYISI	KALİBRASYON DENKLEMİ	KORELASYON KATSAYISI
Kafein	273,1 nm	10304	$y = 10304x + 0,0137$	0,998
Teofilin	276,4 nm	11518	$y = 11518x + 0,0062$	0,998
Teobromin	275,2 nm	8761,2	$y = 8761,2x + 0,0132$	0,999

Her bir metilksantin türevinin saf halde yani tekli durumda spektrumları alınır. Bu spektrumlar alınırken kafein, teofilin ve teobromin için 5-20 µg / mL dir. Bu derişim aralığı, tayin edilecek maddeler için doğrusalığın olduğu bölgedir.

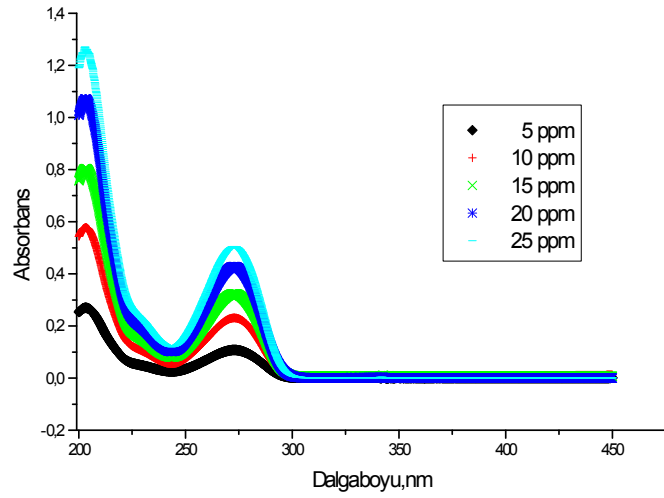
4.1.1. Saf halde metilksantin türevlerinden elde edilen spektrumlar



Şekil 4.1. Kafein maddesinin absorpsiyon spektrumu



Şekil. 4.2. Teofilin maddesinin absorpsiyon spektrumu

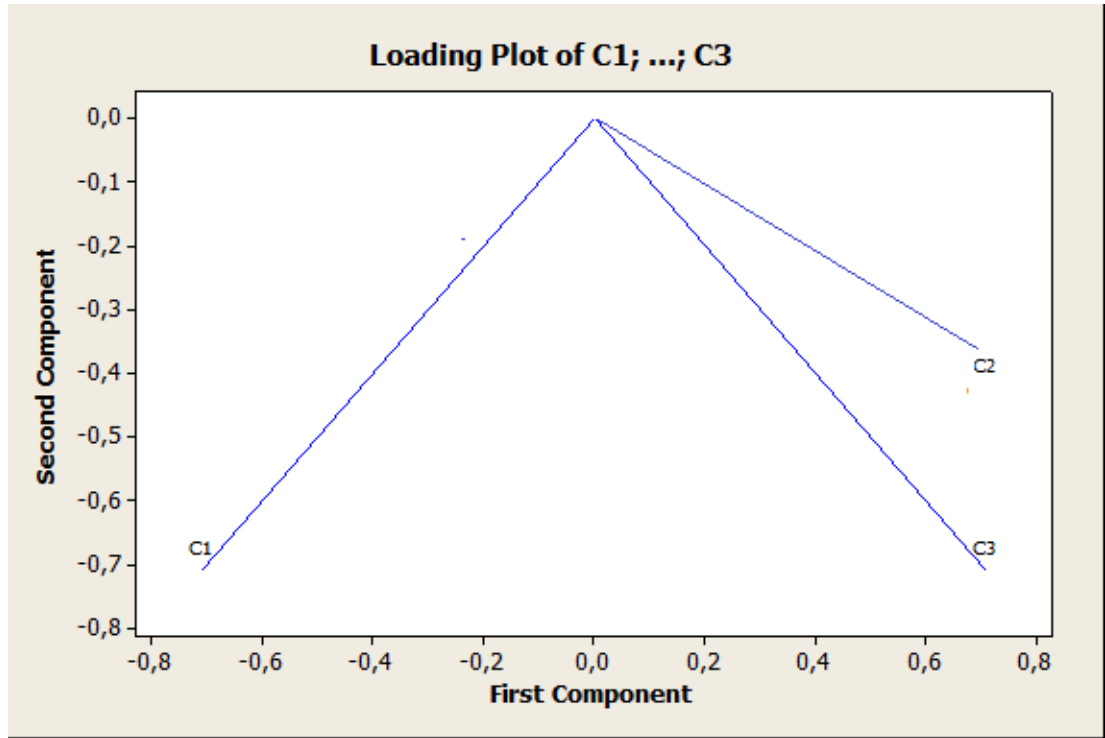


Şekil. 4.3. Teobromin maddesinin absorpsiyon spektrumu

Her bir madde ayrı bir dalga boyunda maksimum absorbands vermektedir. Daha sonra bundan yararlanılarak sentetik karışımlar hazırlanmıştır ve birbiri yanında herhangi bir ön ayırma yapmaksızın metilksantin türevleri incelenmiştir. Metilksantin türevleri ayrıca sürekli spektrum göstermektedir ve üst üste örtüşen spektrumlar gözlenmektedir.

4.1.2. Temel bileşen analizi (PCA)

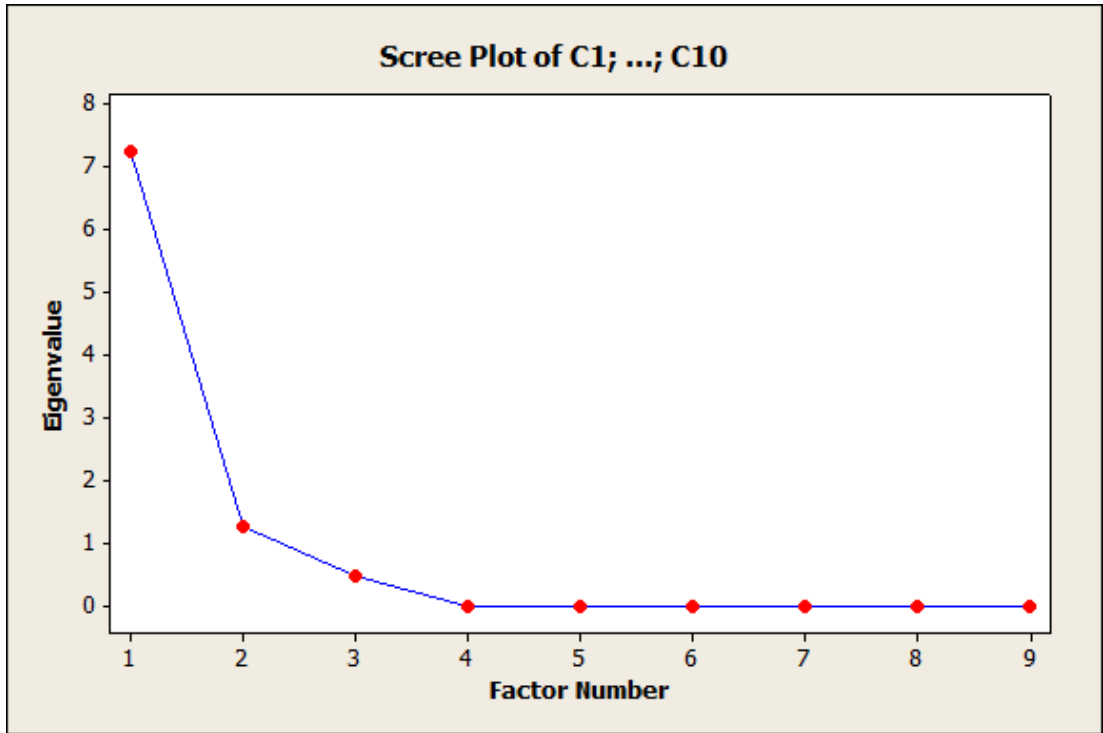
Sentetik çözeltilerde hesap yaparken programın kendi içinde ilk yaptığı işlem temel bileşen analizi yapmaktır. Temel bileşen analizi uygulanmasının amaçları, bir orijinal değişkeni temsil eden n sayıda orijinal aksı (doğruyu) yeni akslar haline dönüştürmektir. Bu dönüşüm işleminde yeni akslar, verilerin maksimum varyans yönelimleri boyunca uzanır ve yeni aksların özelliği, ortogonal olmalarıdır ve bu yeni değişkenler arasında korelasyon yoktur. Numune verilerinin varyansının çoğunu açıklamak için ihtiyaç olan yeni değişkenlerin sayısı (p), n sayıdaki orijinal akslardan daha azdır. Temel bileşen analizi, çok değişkenli verilerin boyutunu indirmek veya verileri azaltmak için bir yöntem olarak kabul edilir. Aynı zamanda değişkenlerin doğrusal bileşenlerini ortaya çıkarır.



Şekil 4.4. Değişkenlerin doğrusal bileşenleri

Şekil 4.4. e bakıldığında programa yüklediğimiz verilerden birinci temel aks ve ikinci temel aks üzerinden doğrusal bileşenler bulunmuştur. İşlemlerin doğruluğu ölçüsünde doğrusal bileşenler elde edilmiştir. Bu grafik varyans-kovaryans matrisinin elemanlarının orijinin merkezine olan büyük aks birinci temel bileşeni (C2) ve bu bileşene 90 °C lik açı ile ikinci temel bileşen (C3) uzanmaktadır. Bir kare

matris için , varyans-kovaryans matrisinin elemanları koordinat sisteminin orijini boyunca uzanır. Büyük aksın eğimi, birinci temel bileşen ile birleştirilmiş özvektör (eigenvector)dür. Bu “özvektöre” karşılık gelen “özdeğer” (eigenvalue) Şekil 4.4. deki büyük aksın uzunluğudur. Şekil 4.5. da özdeğerlerin grafiği görülmektedir. Özdeğerlerin simetrik bir veri matrisinden çıkarılması kısmi en küçük kareler yöntemi ve temel bileşen analizi için önemlidir. Özdeğerler ve özvektörler elde edildikten sonra yapılacak işlem diğer kemometrik hesaplamalara geçiştir. Temel bileşen analizi ile elde edilen temel bileşenler yardımıyla oluşturulan korelasyon matrisi diğer kemometrik regresyonlara (PLS, PCR...) ışık tutmaktadır.



Şekil 4.5. Kemometrik verilerden elde edilen özdeğerlerin grafiği

Şekil 4.6. de belirgin bir şekilde görüldüğü gibi özdeğerler 2. değerden 3. değere doğru düşmüştür. İlk iki faktör, toplam varyansın % 99'undan daha fazla güvenilirdir.

4.1.2.1. Kalibrasyon yönteminin validasyonu

Temel Bileşen Analizi için 5-20 µg / mL doğrusal çalışma aralığında kafein, teobromin ve teofilin içeren çözeltilerin standart serisi stok çözeltilerinden yararlanılarak hazırlanmıştır. Metilksantin türevlerini içeren 12 adet yapay karışım

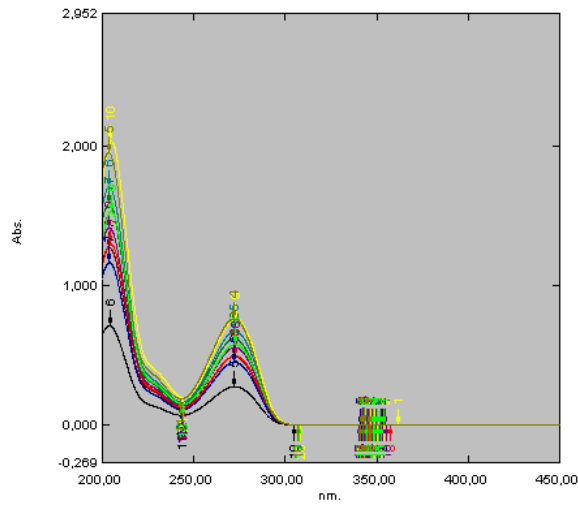
çözeltilerinden ibaret olan bir kalibrasyon seti (Çizelge 4.2.) hazırlanmıştır. Önce saf maddelerle çalışılarak her bir bileşenin hangi aralıkta spektrum verdiği belirlenmiştir (Bölüm 4.1.1.). Ölçümler 200 - 800 nm arasında yapılmıştır. Daha sonra aralık kalibrasyon seti için ve kullanılacak olan istatistik programı doğrultusunda dalga boyu aralığı 200 - 450 nm olarak daraltılmıştır. Kalibrasyon seti hazırlanırken saf halde alınan spektrumların absorpsanlarıyla ilişkili değerlendirme yapılmıştır.

Çizelge 4.2. Kafein, teobromin ve teofilin karışımlarını içeren kalibrasyon seti

No	Kafein ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	Teobromin ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	Teofilin ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
1	5	5	5
2	5	5	10
3	5	5	15
4	5	5	20
5	5	5	5
6	5	10	5
7	5	15	5
8	5	20	5
9	5	5	5
10	10	5	5
11	15	5	5
12	20	5	5

Sentetik Karışımlar:

Kafein, teobromin ve teofilinden oluşur.



Şekil 4.6. Sentetik karışımın absorpsiyon spektrumu.

4.1.3. Kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS)

Kısmi en küçük kareler yönteminde Çizelge 4.2 göre hazırlanan kalibrasyon seti kullanılmıştır. Ölçümler 200-800 nm arasında yapılmıştır. Daha sonra aralık kalibrasyon seti için ve kullanılacak olan istatistik programı doğrultusunda dalga boyu aralığı 200 - 450 nm olarak daraltılmıştır. 273,1; 273,4; 273,7; 274; 274,3; 274,6; 274,9; 275,2; 275,5; 275,8; 276,1; 276,4 ye karşılık gelen 12 noktada absorbans okunmuştur. PLS kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon setinin 200-450 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda= 0,1$ nm aralıklarla absorbans okunmuştur. Kullanılan istatistik program ile kalibrasyon setinin absorbans ve derişim değerlerinin varyans-kovaryans matrisleri hesaplanmıştır. Derişimler arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı PLS kalibrasyonu kurulmuştur. Metilksantin türevlerini içeren karışımların yukarıda belirtilen dalga boylarındaki absorbans değerleri okunarak PLS kalibrasyonunda bu maddelerinin miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir.

4.1.3.1. Kalibrasyon yönteminin validasyonu

PLS yöntemini valide etmek amacıyla kafein ve teobromin için 5-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı derişimlerde 12 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir set hazırlanmıştır. Hazırlanan bu validasyon seti (Çizelge 4.2) kullanılarak kurulan PLS kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edilmiştir. Geri kazanım (GK) değerleri; kafein için % 99,83, teofilin için % 99,8047 , teobromin için % 99,9125 bulunmuştur. Bağlı standart sapma değerleri kafein için % 0,061, teofilin için % 0,49 , teobromin için % 0,29 olarak hesaplanmıştır. PLS kalibrasyon yönteminin sentetik karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3. de gösterilmiştir.

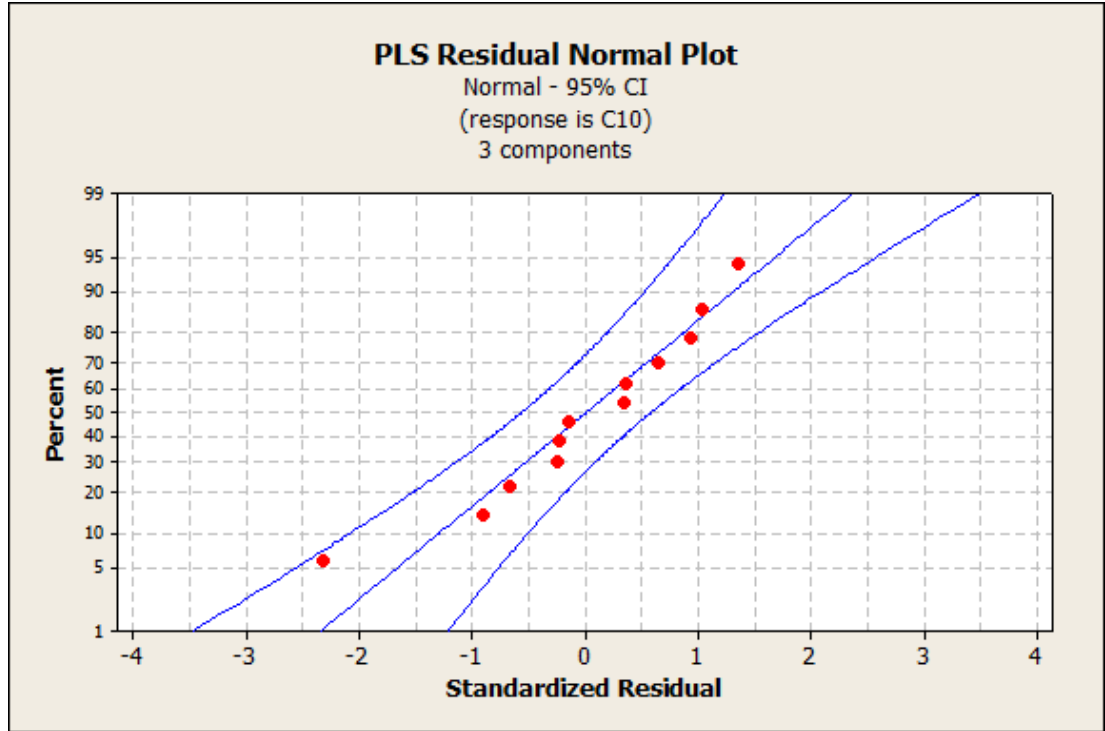
Çizelge 4.3. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki metilksantin türevlerinin PLS kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları

Karışım No	Kafein UV Sonuçları			Teofilin UV Sonuçları		
	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım
1	5	4,988	99,76	5	5	100
2	5	4,990	99,8	5	5	100
3	5	4,991	99,82	5	5	100
4	5	4,990	99,80	5	4,97	99,4
5	5	4,988	99,76	5	4,96	99,2
6	5	4,9901	99,80	10	9,98	99,8
7	5	4,989	99,78	15	14,97	99,8
8	5	4,991	99,82	20	19,97	99,85
9	5	4,990	99,80	5	5	100
10	10	9,990	99,90	5	5	100
11	15	14,988	99,92	5	5	100
12	20	19,988	99,94	5	4,98	99,6
			x = 99,83 SS = 0,061 BSS = % 0,061			x = 99,8047 SS = 0,49 BSS = % 0,49
Karışım No	Teobromin UV Sonuçları					
	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım			
1	5	5	100			
2	10	10	100			
3	15	14,97	99,8			
4	20	19,99	99,95			
5	5	5	100			
6	5	4,98	99,6			
7	5	5	100			
8	5	5	100			
9	5	5	100			
10	5	5	100			
11	5	5	100			
12	5	4,98	99,6			
			x = 99,9125 SS = 0,29 BSS = % 0,29			

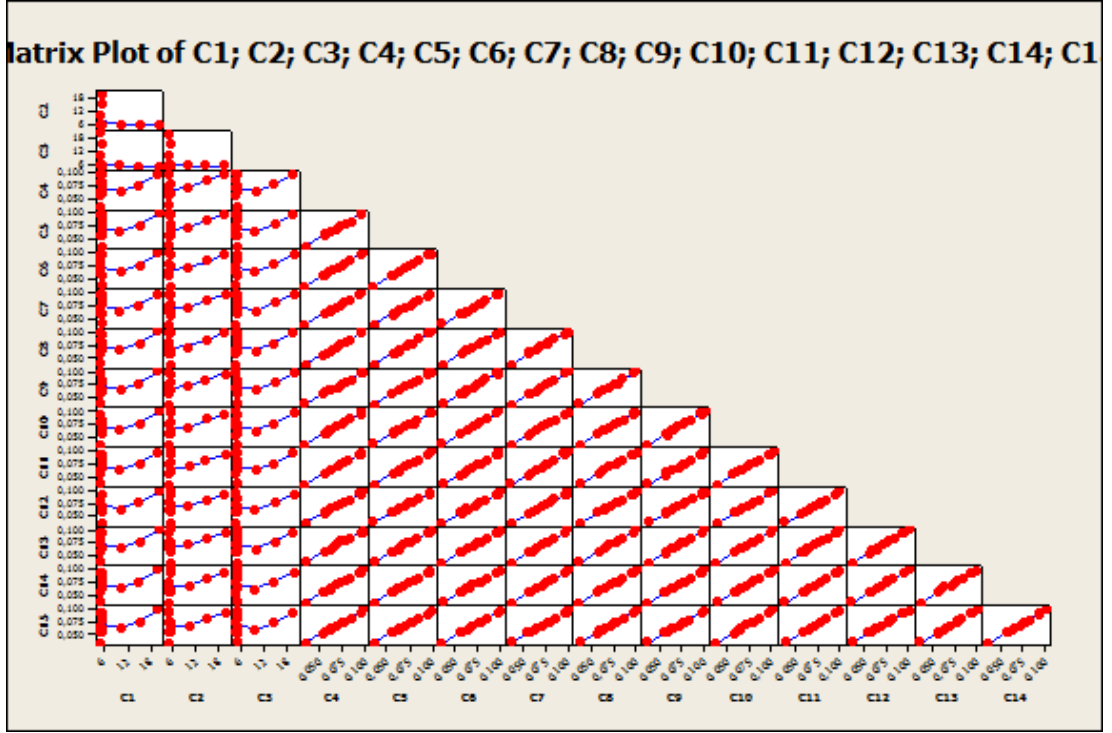
4.1.3.2. PLS yöntemi için ANOVA testi

PLS kalibrasyon yönteminin doğruluk ve kesinliğini valide etmek amacıyla elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulanmıştır. Gruplar arası serbestlik derecesi=1, grup içi serbestlik derecesi=22 % 95 güven aralığında F-tablo değeri 4,30 olmasına karşılık kafein için hesaplanan F-test değeri 2,68E-05 ve p-değeri 0,99, teofilin için hesaplanan F-test değeri 4,82E-05 ve p-değeri 0,99 olarak, teobromin için hesaplanan F-test değeri 1,07E-05 ve p-değeri 0,99 bulunmuştur.

ANOVA testinde $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$ ve $p\text{-değeri} > p=0,05$ olduğu için % 95 güven aralığında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Varyans analizinde iki serbestlik derecesi kullanılır. Gruplar arası serbestlik derecesi=1 Grup içi serbestlik derecesi=22. $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$ ve $p\text{-değeri} > p=0,05$ olduğu için bu kalibrasyon modeli ticari numunenin incelenmesinde kullanılabilir olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 4.7. Atık değerlerinin dağılımı



Şekil 4.8. Kemometrik hesaplamalar esnasında oluşturulan matris

Kemometrik hesaplamalar esnasında elde edilen atık değerleri Şekil 4.7. de görülmektedir ve standart eğride dağılım göstermektedir.

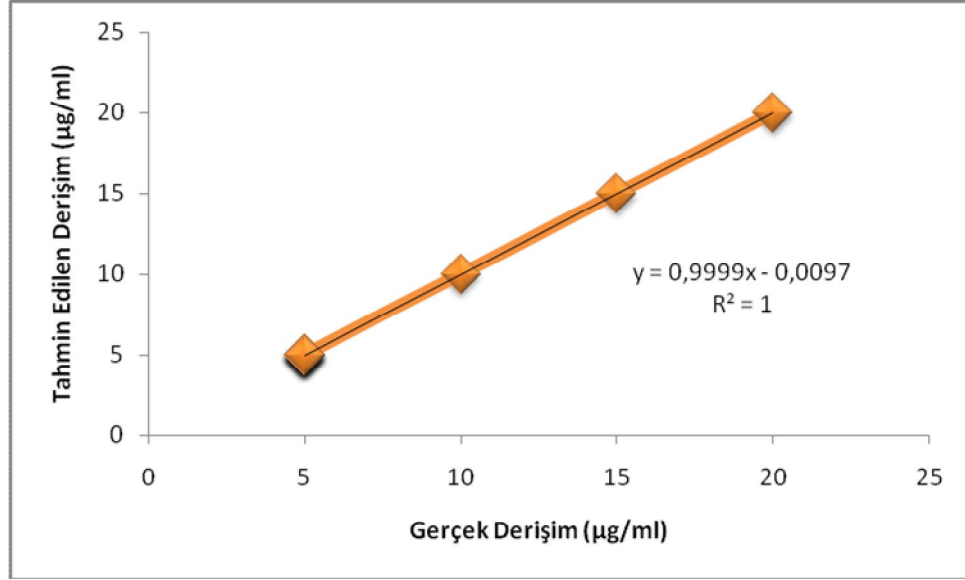
Hesaplamaların doğru ve güvenilir elde edilmesi için simetrik bir matris oluşturulması gerekmektedir. Şekil 4.8. da oluşturulan kare matrisin verilerle dağılımı görülmektedir.

4.1.3.3. PLS yönteminde istatistiksel analiz

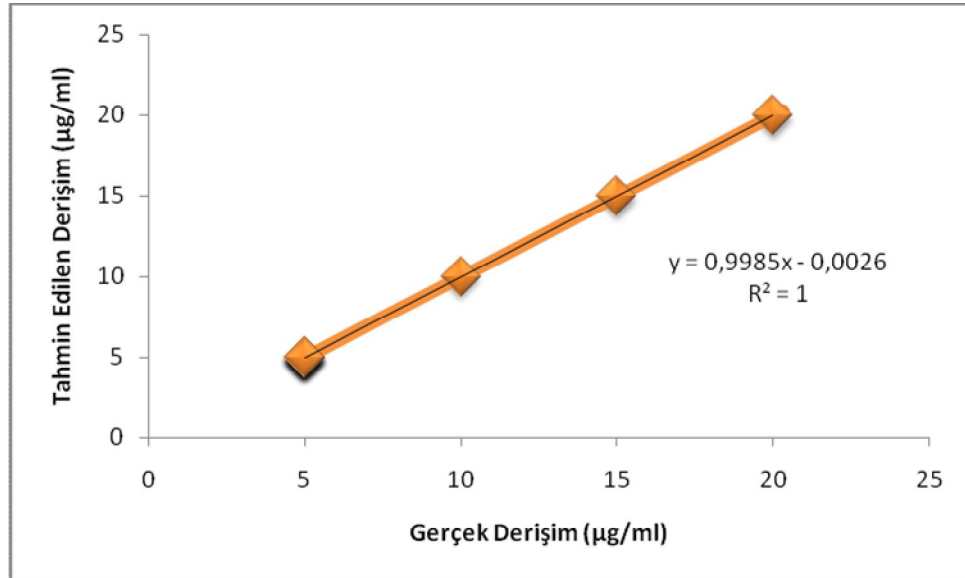
4.1.3.3.a. Kalibrasyonun Standart hatası

Metilksantin türevlerini içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için PLS kalibrasyonun kurulmasında çapraz validasyon işleminde tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (Predicted Residual Error Some of Squares→ PRESS) minimal değerleri elde edilmiştir. Metilksantin maddeleri için kurulan PLS kalibrasyonunda PRESS değeri kafein, teofilin ve teobromin için sırasıyla 0,0161;

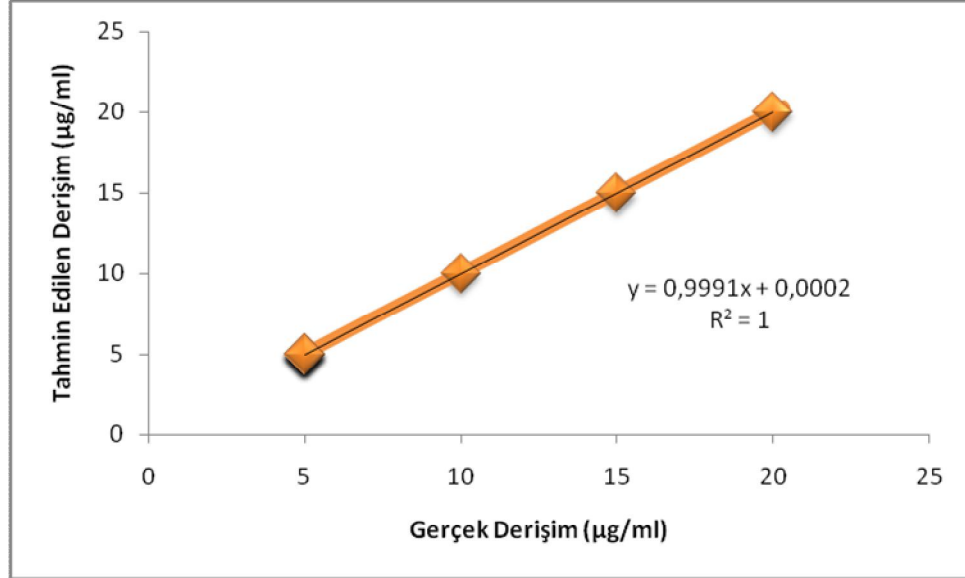
0,0289; 0,0064 olarak hesaplanmıştır. PRESS değerinin sıfıra yakın olması doğruluk derecesini arttırmaktadır. Elde edilen PRESS değerleri yeterince küçüktür.



Şekil 4.9. PLS kalibrasyon basamağında kafein için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.10. PLS kalibrasyon basamağında teofilin için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.11. PLS kalibrasyon basamağında teobromin için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar

4.1.3.4. Kısmi En Küçük Kareler Yönteminin Ticari Numuneye Uygulanması

Çay numunenin tayini için 200-450 nm dalgaboyu bölgesinde $\Delta\lambda = 0,1$ nm aralıklarla ölçülen absorbans değerlerine PLS algoritması uygulanmıştır ve içecek içeriğindeki metilksantin türevleri hesaplanmıştır.

Çizelge 4.4. Çay numunesinde bulunan metilksantin türevlerinin PLS kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları

Numune No	Çay Numunesi 1			Çay Numunesi 2		
	Kafein (µg / mL)	Teofilin (µg / mL)	Teobromin (µg / mL)	Kafein (µg / mL)	Teofilin (µg / mL)	Teobromin (µg / mL)
1	60,894±0,01	1,427±0,62	1,338±0,31	63,987±0,45	1,568±0,21	1,472±0,11
2	60,986±0,04	1,519±0,01	1,430±0,24	64,872±0,30	1,497±0,14	1,498±0,78

Her bir metilksantin türevi için türetilen kalibrasyon eşitlikleri şu şekildedir:

$$C_{\text{Kafein}} = 2,66 + 19304 A_1 - 31546 A_2 - 2730 A_3 + 5979 A_4 - 948 A_5 + 2497 A_6 + 3702 A_7 + 18327 A_8 - 22920 A_9 + 8181 A_{10} + 231 A_{11}$$

$$C_{\text{Teobromin}} = 6,92 - 160259 A_1 + 149677 A_2 - 42826 A_3 + 55166 A_4 + 36826 A_5 + 71553 A_6 - 147558 A_7 + 34294 A_8 + 45525 A_9 + 63459 A_{10} - 107516 A_{11}$$

$$C_{\text{Teofilin}} = -3,98 + 145494 A_1 - 184833 A_2 + 21906 A_3 - 22004 A_4 + 23006 A_5 - 26284 A_6 + 85118 A_7 + 2699 A_8 - 80991 A_9 - 18362 A_{10} + 55102 A_{11}$$

Elde edilen kalibrasyon eşitliklerine absorbans değerleri uygulanarak ticari numunedeki miktarlar hesaplanmıştır. Burada derişim ile absorbans arasındaki ifade de ters kalibrasyon yapılmıştır. Ters kalibrasyonun avantajları şu şekildedir:

- Numune için ölçülen absorbans değeri, formülde yerine konulduğu zaman doğrudan derişimi hesaplamak mümkündür, bu durum hesaplamalarda zaman kaybını ortadan kaldırır.
- Analiz edilen bileşiklerin bilinmesi şartıyla bu kalibrasyon modeli çok kompleks karışımların analizine olanak tanır.

4.1.4. Klasik UV-spektroskopisiyle elde edilen bulgular

Çizelge 4.1. incelendiğinde metilksantin türevlerinin spektroskopik özellikleri görülmektedir.

Her bir çay numunesinin metilksantin türevlerinin maksimum gösterdiği üç dalga boyundaki absorbans değerlerine bağlı oluşturulan eşitlikler şu şekildedir:

$$A_{273,1} = \varepsilon_{273,1} \cdot I \cdot C_{\text{kafein}} + \varepsilon'_{273,1} \cdot I \cdot C_{\text{teobromin}} + \varepsilon''_{273,1} \cdot I \cdot C_{\text{teofilin}}$$

$$A_{276,4} = \varepsilon_{276,4} \cdot I \cdot C_{\text{kafein}} + \varepsilon'_{276,4} \cdot I \cdot C_{\text{teobromin}} + \varepsilon''_{276,4} \cdot I \cdot C_{\text{teofilin}}$$

$$A_{275,2} = \varepsilon_{275,2} \cdot I \cdot C_{\text{kafein}} + \varepsilon'_{275,2} \cdot I \cdot C_{\text{teobromin}} + \varepsilon''_{275,2} \cdot I \cdot C_{\text{teofilin}}$$

Çizelge 4.5. Çay numunesinde bulunan metilksantin türevlerinin UV yöntemi ile hesaplanan sonuçları

Numune No	Çay Numunesi 1			Çay Numunesi 2		
	Kafein (µg / mL)	Teofilin (µg / mL)	Teobromin (µg / mL)	Kafein (µg / mL)	Teofilin (µg / mL)	Teobromin (µg / mL)
1	59,878	1,397	1,416	61,569	1,542	1,578
2	58,793	1,245	1,392	63,458	1,462	1,492

4.2.Yöntemlerin Çay Numunesine Uygulanmasıyla Elde Edilen Bulgular

Kesinlik, doğruluk ve tekrarlanabilirliğin her üç yöntemdeki karşılaştırılması ile çay numunesinden elde edilen sonuçlar şu şekildedir.

Çizelge 4.6. Çay numunesinde bulunan metilksantin türevlerinin hesaplanan sonuçları
PLS Yöntemi

Numune No	Çay Numunesi 1			Çay Numunesi 2		
	Kafein (µg / mL)	Teofilin (µg / mL)	Teobromin (µg / mL)	Kafein (µg / mL)	Teofilin (µg / mL)	Teobromin (µg / mL)
1	60,894±0,01	1,427±0,62	1,338±0,31	63,987±0,45	1,568±0,21	1,472±0,11
2	60,986±0,04	1,519±0,01	1,430±0,24	64,872±0,30	1,497±0,14	1,498±0,78

Klasik UV Yöntemi

Numune No	Çay Numunesi 1			Çay Numunesi 2		
	Kafein (µg / mL)	Teofilin (µg / mL)	Teobromin (µg / mL)	Kafein (µg / mL)	Teofilin (µg / mL)	Teobromin (µg / mL)
1	59,878	1,397	1,416	61,569	1,542	1,578
2	58,793	1,245	1,392	63,458	1,462	1,492

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tükettiğimiz çayda bulunan metilksantin türevlerinden olan kafein, teobromin ve teofilinin çaydaki miktarlarının analizi için Ultra-Viyole Görünür Alan Spektroskopisi yöntemi geliştirilmeye çalışılmıştır.

Kafein, teobromin ve teofilinin standart maddelerinin UV spektrumları alınarak, çalışma yapılabilecek saflıkta olduğu belirlenmiş ve analiz çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Kafein, teobromin ve teofilin karışımı için, UV geliştirilerek, bulgular klasik spektroskopi yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Geliştirilen UV yönteminin regresyon analizi yapılarak sonuçlar istatistik hesaplanmıştır. Oluşturulan eğrilerin bir doğru olup olmadığını anlamak, bulunan doğrusallık sınırının uygun olup olmadığını belirlemek için doğrusallıktan ayrılışın önem testi yapılmıştır. $F_H < F_T$ olduğundan, doğrusallıktan sapmanın önemsiz olduğu bulunmuştur.

Kemometrik program kullanılırken de yine F testi göz önüne alınmıştır. Ticari numuneye geçmeden önce yapılan deneysel tasarım esnasında hazırlanan sentetik modelde de sonuçlar kıyaslanmıştır. Sentetik modele ilave ettiğimiz madde miktarları ile kemometrik programdan elde ettiğimiz deneysel sonuçlar kıyaslanmıştır. Grup içi ve gruplar arası serbestlik dereceleri yardımıyla F testi yapılmıştır. F testi sonucuna göre kullandığımız modeli ticari numuneye uygulayıp uygulayamayacağımıza karar verilmiştir. $F_H < F_T$ olduğunda model uygulanmıştır.

Kafein, teobromin ve teofilin türevleri için doğruluk ve kesinlik değerleri saptanmıştır. Bu değerlerde SS ve BSS değerleri küçük olduğu için geliştirilen yöntemlerin kesin ve doğru bir yöntem olduğuna karar verilmiştir.

Çizelge 4.3. incelendiğinde bu yöntemle metilksantin türevlerinin miktar tayininde en düşük bağıl standart sapma değerinin, kafein maddesi için bulunduğu görülmüştür. Bu çizelgedeki değerler belirtildiği gibi kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS) ile hesaplanmıştır.

UV yönteminde kafein, teobromin ve teofilinin için % geri kazanım değerleri ortalama olarak bulunmuştur. Kullanılan yöntem için geri kazanımlar yüksek değerlerde bulunmuştur.

Kullanılan yöntemin tekrarlanabilir sonuçlar vermesi, yüksek duyarlılık ve doğruluğun yanı sıra hızlı oluşu ve çay numunesinin analizi için önerilecek yöntem olmalarını sağlamaktadır.

Geliştirilen yöntemler, tekrarlanabilir, duyarlı ve doğru sonuç veren yöntemler olup gerek farklı çay numuneleri gerekse farklı ticari gıda numunelerinin analizinde önerilebilir.

KAYNAKLAR

- Abbaspour, A., Mirzajani, R., 2004. Application of the spectral correction method and “neural networks” for simultaneous determination of V(V) and Al (III). *Talanta*, 64, 435-441.
- Abdollahi, H., Bagheri, L., 2004. Simultaneous spectrophotometric determination of vitamin K₃ and 1,4-naphthoquinone after cloud point extraction by using genetic algorithm based wavelength selection- partial least squares regression. *Analytica Chimica Acta*, 514, 211-218.
- Afkhami, A., Sarlak, N., Zarei, A.R., 2007. Simultaneous kinetic spectrophotometric determination of cyanide and thiocyanate using the partial least squares (PLS) Regression. *Talanta*, 71, 893-899.
- Aktaş, A.H., Pekcan, G., 2006. Simultaneous spectrophotometric determination of tartrazin, sunset yellow and allura red in commercial products by artificial neural network calibration. *Asian Journal Of Chemistry*, 18(3), 2025-2031.
- Aktaş, A.H., Şener, M., Ertokuş Pekcan, G., 2006. Artificial neural network calibration for the simultaneous determination of calcium and magnesium in natural waters, *Revista De Chimie*, 57(12): 1287-1290
- Altınöz, S., Toptan, S., 2002. Determination of tartrazin, ponso 4R in various food samples by vierordt’s method and ratio spectra first-order derivative UV spectrophotometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 667-683.
- Berzas Nevado, J.J., Rodríguez Flores, J., Guiberteau Cabanillas, C., Villaseñor Llerena, M.J., Contento Salcedo, A., 1998. Resolution of ternary mixtures of tartrazin, sunset yellow and ponso 4R by derivative spectrophotometric ratio spectrum-zero crossing method in commercial foods. *Talanta*, 46, 933-942.
- Berzas, J.J., Rodríguez Flores, J., Villaseñor Llerena, M.J., Rodríguez Fariñas, N., 1999. Spectrophotometric resolution of ternary mixtures of tartrazin, patent blue V and indigo carmine in commercial products. *Analytica Chimica Acta*, 391, 353-364.
- Bouhsain, Z., Garrigues, S., 1997. PLS - UV spectrophotometric method for simultaneous determination of paracetamol, acetylsalicylic acid and caffeine in pharmaceutical formulations. *Journal of Analytical Chemistry*, 357, 973-976.
- Capitán-Valley, L.F., Fernández, M.D., De Orbe, I., Avidad, R., 1998. Simultaneous determination of colorants tartrazin, ponso 4R and sunset yellow FCF in foodstuffs by solid phase spectrophotometry using partial least squares multivariate calibration. *Talanta*, 47, 861-868.

- Chaloosi, M., Gholamian, F., Zarei, A., 2001. Determination of binary mixtures of nitramines by a spectrophotometric method using partial least squares multivariate calibration. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics*, 26,21-25.
- Dinç, E., 2007. Kemometri çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri, 27(1), 61-92.
- Dinç, E., 2009. Kemometrik işlem ve yöntemlerin analitik kimyadaki tipik uygulamaları, *Uygulamalı Kemometri Yaz Okulu Notları*, 13-17.
- Dinç, E., Baleanu, D., 2002. Spectrophotometric quantitative determination of cilazapril and hydrochlorothiazide in tablets by chemometric methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 715-723.
- Dinç, E., Baleanu, D., 2006. A new fractional wavelent approach for the simultaneous determination of ampicillin sodium and sulbactam sodium in a binary mixture. *Spectrochimica Acta Part A*, 63, 631-638.
- Dinç, E., Üstündağ, Ö., 2003. Spectrophotometric quantitative resolution of hydrochlorothiazide and spiro lactone in tablets by chemometric analysis methods. *II Farmaco*, 58, 1151-1161.
- Dinç, E., Üstündağ, Ö., 2005. Application of multivariate calibration techniques to HPLC data for quantitative analysis of a binary mixture of hydrochlorothiazide and losartan in tablets. *Chromatographia*, 61, 237-244.
- Dinç, E., Üstündağ, Ö., Özdemir, A., Baleanu, D., 2005. A New application of chemometric techniques to HPLC data for the simultaneous of a two-component mixture. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28, 2179-2194.
- Dinç, E., Baydan, E., Kanbur, M., Onur, F., 2002. Spectrophotometric multicomponent determination of sunset yellow, tartrazin and allura red in soft drink powder by double divisor-ratio spectra derivative, Inverse Least-Squares And Principal Component Regression Methods. *Talanta*, 58, 579-594.
- Dökmeci İ., 1995. *Farmakoloji*;s:111-112; Saray Kitabevi
- Espinosa-Mansilla, A., Muñoz De La Peña, A., Cañada- Cañada, F., González Gómez, D., 2005. Determinations of fluoroquinolones and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in urine by extractive spectrophotometry and photoinduced spectrofluorimetry using multivariate calibration. *Analytical Biochemistry*, 347, 275-286.

- González, M., Gallego, M., Valcárcel, M., 2002. Automatic screening method for the rapid and simple discrimination between synthetic and natural colorants in foods. *Analytica Chimica Acta*, 464, 237-247.
- Güler, Z., 2005. Determination of synthetic colorants in confectionery and instant drink powders consumed in turkey using UV/VIS spectrophotometry. *Journal of Food Quality*, 28, 98-108.
- Hemmateenejad, B., Akhond, M., Samari, F., 2007. A comparative study between PCR and PLS in simultaneous spectrophotometric determination of diphenylamine, aniline and phenol: effect of wavelength selection. *Spectrochimica Acta Part A, Molecular And Biomolecular Spectroscopy*, 67, 958-965.
- Liao, L., Yang, J., Yuan, J., 2007. Process monitored spectrophotometric titration coupled with chemometrics for simultaneous determination of mixtures of weak acids. *Analytica Chimica Acta*, 591, 123-131.
- Longares-Patrón, A., Cañizares-Macías, M.P., 2005. Focused microwaves-assisted extraction and simultaneous spectrophotometric determination of vanillin and p-Hydroxybenzaldehyde from vanilla fragans. *Talanta*, 69(4), 882-887.
- López - Martínez, L., López – de - Alba, P.L., García -Campos, R., León-Rodríguez, L.M.D., 2003. Simultaneous determination of methylxanthines in coffees and teas by UV-Vis spectrophotometry and partial least squares. *Analytica Chimica Acta*, 493, 83-94.
- Matissek, R., 1997. Evaluation of xanthine derivatives in chocolate - nutritional and chemical aspects. *Z. Lebensm. Unters Forsch. A*, 205: 175-184.
- Palabıyık, I.M., Dinç, E., Onur, F., 2004. Simultaneous spectrophotometric determination of pseudoephedrine hydrochloride and ibuprofen in a pharmaceutical preparation using ratio spectra derivative spectrophotometry and multivariate calibration techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34, 473-483.
- Sorouraddin, M.H., Rashidi, M.R., Ghorbani - Kalhor, E., Asadpour - Zeynali, K., 2005. Simultaneous spectrofluorimetric and spectrophotometric determination of melatonin and pyridoxine in pharmaceutical preparations by multivariate calibration methods. *II Farmaco*, 60, 451-458.
- Şener, M., 2006. İçme sularında kalsiyum ve magnezyumun spektrofotometrik metotla simultane tayini ve yapay sınır ağları ile kemometrik analizi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 40s, Isparta.

- Uyanık, A., 2008. Analitik kimyacılar için istatistik ve kemometri, 254-259.
- Yongnian, N., Gong, X., 1997. Simultaneous spectrophotometric determination of mixtures of food colorants. *Analytica Chimica Acta*, 354, 163-171.
- Yongnian, N., Huang, C., Kokot, S., 2003. A kinetic spectrophotometric methods for the determination of ternary mixtures of reducing sugars with the aid of artificial neural networks and multivariate calibration. *Analytica Chimica Acta*, 480, 53-65.
- Yongnian, N., Zhang, G., Kokot, S., 2005. Simultaneous spectrophotometric determination of maltol, ethyl maltol, vanillin, ethyl vanillin in foods by multivariate calibration and artificial neural networks. *Food Chemistry*, 89, 465-473.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Hülya Pekcan

Doğum Yeri ve Yılı: Isparta- 15.03.1984

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce



Eğitim Durumu

Lise: Isparta Anadolu Lisesi 1999 - 2002

Lisans: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya

Mühendisliği, 2002 - 2006

Çalıştığı Kurum ve Yıl

Gülçiçek Kozmetik, Sorumlu Müdürlük, 2006 - Devam ediyor.

