

**DENİZ ÜRÜNLERİNDEKİ BAZI ESER TÜRLERİN
MAGNETİK DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜLER İLE
MİKROEKSTRAKSİYONU VE TAYİNİ İÇİN YEŞİL BİR
YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF A GREEN METHOD FOR THE
MICROEXTRACTION AND DETERMINATION OF
SOME TRACE SPECIES IN SEAFOOD USING
MAGNETIC DEEP EUTECTIC SOLVENTS**

EMİNE BENGİSU SARAÇLAR EKER

PROF. DR. ÇİĞDEM ARPA ÇALIŞIR

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Canım annem, canım babam

ve

Bal tanesi kardeşim için...

ÖZET

DENİZ ÜRÜNLERİNDEKİ BAZI ESER TÜRLERİN MAGNETİK DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜLER İLE MİKROEKSTRAKSİYONU VE TAYİNİ İÇİN YEŞİL BİR YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Emine Bengisu SARAÇLAR EKER

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Çiğdem ARPA ÇALIŞIR

Haziran 2024, 114 sayfa

Sunulan tez kapsamında su örnekleri ve deniz ürünlerindeki eser miktardaki kristal viyole (CV) ve kadmiyumun (Cd(II)) tayini amaçlanmış olup, tayin öncesinde önderiştirilmesi için manyetik derin ötektik çözücü bazlı dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu (MDES-DLLME) geliştirilmesi hedeflenmiştir. Mikroekstraksiyon işleminin ardından CV tayini için UV-Gör spektrofotometre ve Cd(II) tayini için alevli atomik absorpsiyon spektrometresi kullanılmıştır. Geliştirilen bu yöntemde ekstraksiyon çözücüsü olarak sentezi kolay, düşük toksik özellikte, kararlı ve ucuz olan ve yeşil çözücü olarak sınıflandırılan derin ötektik çözücü (DES), magnetik özellik kazandırılarak kullanılmış, bu sayede enerji gereksinimi olmadan faz ayrımı dış magnetik alan uygulaması ile kolaylıkla sağlanmıştır. Magnetik DES'ler magnetik nanopartikül Fe₂O₃ ün, taşıyıcı DES içerisinde süspanse olması ile elde edilmiştir.

Hem CV hem de Cd(II) için ekstraksiyon verimini etkileyen tüm parametreler, pH, Magnetik DES hacmi ve bileşimi, ekstraksiyon süresi, ditizon miktarı vb., optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda, CV için pH: 7, DES bileşimi 1:3 ChCl:Ph, magnetik nanopartikül Fe₂O₃ miktarı 60 mg, ultrason süresi 4 dk olduğunda ekstraksiyonda en yüksek verim elde edilmiştir. Cd(II) için en yüksek verim ise pH: 5, 0.1% (a/h) DTZ hacmi 500 µL, DES

bileşimi 1:3 ChCl:Ph, magnetik nanopartikül Fe₂O₃ miktarı 80 mg, ultrason süresi 4 dk olduğunda elde edilmiştir.

Optimum koşullar altında, CV ve Cd(II) için sırasıyla zenginleştirme faktörü (EF) 22 ve 31; gözlenebilirlik sınırı (LOD), 1.13 ve 0.73 µg L⁻¹, tayin sınırı (LOQ) 3.75 ve 2.43 µg L⁻¹, ve bağıl standart sapma (RSD, n=10) %5.95, %4.80 olarak hesaplanmıştır.

DeneySEL koşullar optimize edildikten ve analitik özellikler değerlendirildikten sonra, geliştirilen yöntem bir sertifikalı referans maddeye (TMDA-61.2, Ontario Gölü Suyu), göl ve balık yetiştirme çiftliğinden edinilen su örneklerine ve çeşitli su canlılarına (karides, midye, levrek, çipura, alabalık) uygulanmıştır. Deneyler sonucunda, matris etkisinden uzak, yüksek duyarlılık ve doğrulukla yüksek geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

Ek olarak, KompleksGAPI, AGREE ve AGREEprep programları kullanarak CV ve Cd(II) için geliştirilmiş olan MDES-DLLME yönteminin yeşil analitik kimyaya uygunluğu değerlendirilmiş ve her üç programa göre de yeşil kimya prensipleriyle uyum içinde olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kadmiyum, Kristal Viyole, Magnetik Derin Ötektik Çözücü, Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrofotometri, UV-Gör Spektrofotometri, Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu, Önderiştirme, Yeşil Analitik Kimya

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A GREEN METHOD FOR THE MICROEXTRACTION AND DETERMINATION OF SOME TRACE SPECIES IN SEAFOOD USING MAGNETIC DEEP EUTECTIC SOLVENTS

Emine Bengisu SARAÇLAR EKER

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Çiğdem ARPA ÇALIŞIR

June 2024, 109 pages

The aim of this thesis is to determine trace amounts of crystal violet (CV) and cadmium (Cd(II)) in water samples and seafood, and to develop a magnetic deep eutectic solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction (MDES-DLLME) method for their pre-concentration before determination. After the microextraction process, UV-Vis spectrophotometry was used for the determination of CV, and flame atomic absorption spectrometry was used for the determination of Cd(II). In this developed method, the extraction solvent was a deep eutectic solvent (DES), which is easy to synthesize, low in toxicity, stable, inexpensive, and classified as a green solvent. Thanks to the magnetic feature, phase separation is easily achieved by applying an external magnetic field, without requiring energy. Magnetic DESs were obtained by suspending the magnetic nanoparticle Fe₂O₃ in the carrier DES.

All parameters affecting the extraction efficiency, such as pH, magnetic DES volume and composition, extraction time, dithizone amount, etc., were optimized for both CV and Cd(II). As a result of the optimization studies, the highest extraction efficiency for CV was achieved with a pH of 7, DES composition of 1:3 ChCl:Ph, magnetic nanoparticle Fe₂O₃ amount of 60 mg, and ultrasound time of 4 minutes. For Cd(II), the highest efficiency was achieved with a pH of 5,

0.1% (w/v) DTZ volume of 500 μL , DES composition of 1:3 ChCl:Ph, magnetic nanoparticle Fe_2O_3 amount of 80 mg, and ultrasound time of 4 minutes.

Under optimum conditions, the enrichment factor (EF) was 22 and 31; the limit of detection (LOD) was 1.13 and 0.73 $\mu\text{g L}^{-1}$, the limit of quantification (LOQ) was 3.75 and 2.43 $\mu\text{g L}^{-1}$, and the relative standard deviation (RSD, $n = 10$) was 5.95% and 4.80% for CV and Cd(II), respectively.

After optimizing the experimental conditions and evaluating the analytical features, the developed method was applied to a certified reference material (TMDA-61.2, Lake Ontario Water), water samples obtained from a lake and a fish farm, and various seafoods (shrimp, mussel, sea bass, sea bream, trout). The experiments resulted in high recovery values with high sensitivity and accuracy, free from matrix effects.

Additionally, the greenness of the developed MDES-DLLME method for CV and Cd(II) was evaluated using ComplexGAPI, AGREE, and AGREEprep programs, and it was concluded that the method is in compliance with the principles of green chemistry according to all three programs.

Keywords: Cadmium, Crystal Violet, Magnetic Deep Eutectic Solvent, Flame Atomic Absorption Spectrophotometry, UV-Vis Spectrophotometry, Dispersive Liquid-Liquid microextraction, preconcentration, Green Analytical Chemistry

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince desteğini esirgemeyen, öğrenimlerim ve çalışmalarım boyunca ilgisi, sabrı ve özverisi ile yoluma ışık tutan, sadece akademik başarılarına değil, şahsi kişiliğine de hayranlık duyduğum, feyz aldığım çok değerli mentorum, danışmanım, biricik hocam **Prof. Dr. Çiğdem ARPA ÇALIŞIR**'a verdiği emeklerinden dolayı en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Laboratuvar çalışmalarımda yardım ve desteğini esirgemeyen sevgili **Sare KESEKLER**'e teşekkür ederim.

Beni emek emek bugünlerime getiren, koştuğumda benimle koşan, düştüğümde kaldıran, neşelerimi, kederlerimi, başarılarımı ve başarısızlıklarımı benimle kucaklayan ve bu hayattaki en büyük şansım olan biricik **annem, babam** ve **kardeşime** tüm kalbimle teşekkür ederim. Edindiğim her başarı ve kalbimdeki her iyilik sizin eseriniz...

Üniversite yıllarımın en başından beri bu yolda benimle yürüyen, beni her zaman kendimin en iyi hali olmama teşvik eden ve aynı zamanda her halimi destekleyen, bir sarılması ile kalbime ilaç gibi gelen biricik eşim **Argun EKER**'e ve bu tezi bitirmemde büyük katkıları olan, stresli olduğumda tüm stresimi sünger gibi çekip alan, neşeme neşe katan, pembe pati **Mia**'ma tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET i

ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Boyar Maddeler ve Canlılar Üzerine Etkileri.....	4
2.1.1. Kristal Viyole.....	4
2.2. Ağır Metaller ve Canlılar Üzerine Etkileri.....	5
2.2.1. Kadmiyum.....	6
2.3. Eser Türlerin Önderiştirilmesi.....	7
2.3.1. Katı Faz Mikroekstraksiyonu (SPME).....	8
2.3.2. Sıvı Faz Mikroekstraksiyonu (LPME).....	9
2.4. Yeşil Çözücüler.....	14
2.4.1 Derin Ötektik Çözücüler.....	16
2.4.2. Magnetik Derin Ötektik Çözücü.....	22
2.5. Yeşil Analitik Kimya.....	25
2.5.1. Yeşillik Değerlendirmeleri.....	26
2.6. Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi (AAS).....	41
2.6.1. Işın Kaynakları.....	42
2.6.2. Atomlaştırıcılar.....	44
2.6.3. Monokromatörler.....	46
2.6.4. Dedektörler.....	47
2.6.5. AAS'de Görülen Girişimler.....	47
2.7. UV-Vis Spektrofotometre.....	49
2.7.1. Absorplayan Türler.....	49
2.7.2 Cihaz Bileşenleri.....	51
2.7.4 Çift Işın Yollu Spektrofotometreler.....	53

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	54
3.1. Kimyasallar ve çözeltiler	54
3.1.1. Kristal viyole (CV) ve kadmiyum (Cd(II)) çözeltilerinin hazırlanması.....	54
3.1.2. Kompleksleştirici çözeltisi.....	54
3.1.3. Ekstraksiyon Çözücüsü	55
3.1.4. Tampon Çözeltiler	55
3.1.5. Diğer kimyasallar.....	56
3.2. Kullanılan Cihazlar	56
3.3. Diğer Cihazlar	57
3.4. Magnetik Derin Ötektik (MDES) Çözücünün Hazırlanması	57
3.5. Manyetik derin ötektik çözücü bazlı dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu (MDES-DLLME) yönteminin prosedürü	59
3.5.1 CV için MDES-DLLME yönteminin uygulanışı	59
3.5.2 Cd(II) için MDES-DLLME yönteminin uygulanışı	60
3.5.3. Gerçek Örneklerin Hazırlanması	61
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	63
4.1. CV için Geliştirilen MDES-DLLME Yöntemine Ait Sonuçlar ve Yorumlar	63
4.1.1. pH Etkisi	63
4.1.2. DES Kompozisyonunun Etkisi	64
4.1.3. Magnetik Nanopartikül Miktarının Etkisi	65
4.1.4. Ekstraksiyon Çözücüsü Hacmi.....	66
4.1.5. Geri-Ekstraksiyon için kullanılacak Eluentin Belirlenmesi.....	66
4.1.6. Geri-Ekstraksiyon Yönteminin Belirlenmesi	67
4.1.7. Ekstraksiyon Süresinin Etkisi	68
4.1.8. Sıcaklık Etkisi	69
4.1.9. Numune Hacminin Etkisi	70
4.1.10. İyonik Şiddetin Etkisi	70
4.1.11. Yabancı Türlerin Etkisi	71
4.1.12. CV için MDES-DLLME Yönteminin Analitik Performans Özellikleri.....	72
4.1.13. CV için geliştirilen MDES-DLLME Yönteminin Doğruluğu	76
4.2. Cd(II) için Geliştirilen MDES-DLLME Yöntemine Ait Sonuçlar ve Yorumlar	78
4.2.1. Cd(II) İyonlarının Kompleksleşmesi	78
4.2.2. pH Etkisi	79
4.2.3. DES Kompozisyonunun Etkisi	80
4.2.4 Magnetik Nanopartikül Miktarının Etkisi	80

4.2.5. Ekstraksiyon Çözücüsü Hacmi.....	81
4.2.6. Geri-Ekstraksiyon Çözeltilisinin Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	82
4.2.7. Kompleksleştirici Hacminin Etkisi.....	83
4.2.8. Ekstraksiyon Süresinin Etkisi.....	84
4.2.9. Sıcaklık Etkisi.....	85
4.2.10. İyonik Şiddetin Etkisi.....	86
4.2.11. Yabancı İyon Etkisi.....	87
4.2.12. Cd(II) İçin Geliştirilen MDES-DLLME Yöntemin Analitik Performans Özellikleri.....	88
4.2.13. Yöntemin Doğruluğu.....	89
4.4. MDES-DLLME Yönteminin Yeşillik Değerlendirmesi.....	92
4.3. MDES-DLLME Yönteminin Diğer Literatür Yöntemleriyle Karşılaştırılması.....	96
5. YORUM.....	101
6. KAYNAKLAR.....	103
7. ÖZGEÇMİŞ.....	115

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kristal Viyolenin Kimyasal Yapısı	5
Şekil 2.2. Katı Faz Mikroekstraksiyonu Şematik Gösterimi [69]	8
Şekil 2.3. Sık Kullanılan Tek Damla Mikroekstraksiyon Örneklerinden Şematik Gösterimi [76].....	10
Şekil 2.4. Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu Şematik Gösterimi [83]	11
Şekil 2.5. Oyuk Fiber Sıvı Faz Mikroekstraksiyon Yöntemi Şematik Gösterimi [86] ..	11
Şekil 2.6. Katılaştırılmış Yüzen Organik Damla Mikroekstraksiyonu (SFODME) Yönteminin Şematik Gösterimi [92].....	12
Şekil 2.7. Dispersif Sıvı Sıvı Mikroekstraksiyon Yönteminin Şematik Gösterimi [104]	14
Şekil 2.8. Solventlerin toksisite sıralaması [105]	14
Şekil 2.9. Yeşil çözücülerin sınıflandırması	15
Şekil 2.10. İyonik sıvılar ve derin ötektik çözücülerin benzerlik ve farklılıkları	17
Şekil 2.11. DES'lerin Sınıflandırması	17
Şekil 2.12. Başlıca HBA ve HBD'lerinin kimyasal yapıları	19
Şekil 2.13. Kolin klorür ve fenolden oluşan DES'in tepkimesi	20
Şekil 2.14. DES yoğunluğunu etkileyen parametreler	21
Şekil 2.15. 2010 yılından 2023 yılına kadar her yıl yayınlanan kaynak sayısı.	23
Şekil 2.16. MDES'in sınıflandırması	24
Şekil 2.17. NEMI Piktogramı	27
Şekil 2.18. Modifiye NEMI Piktogramı	28
Şekil 2.19. GAPI Piktogramı	33
Şekil 2.20. Kompleks GAPI Piktogramı	33
Şekil 2.21. Bir element atomunun ısı veya ışık ile uyarılmasının şematik gösterimi.....	41
Şekil 2.22. Katot Lambasının Şematik Gösterimi	43
Şekil 2.23. Elektrotsuz Boşalım Lambasının Şematik Gösterimi [157].....	44
Şekil 2.23. Moleküler enerji seviyeleri ve elektronik geçişler	51
Şekil 2.24. Farklı numune hacimlerindeki numune kapları.....	52
Şekil 3.4. CV Tayini için MDES-DLLME yönteminin şematik gösterimi	60
Şekil 3.5. Cd(II) Tayini için MDES-DLLME yönteminin şematik gösterimi.....	61
Şekil 4.1. CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde pH etkisi.....	63
Şekil 4.2. CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde DES kompozisyonunun ekstraksiyon verimine etkisi	64
Şekil 4.3. CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde Fe ₂ O ₃ magnetik nanopartiküllerinin miktarının etkisi	65
Şekil 4.4. CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde ekstraksiyon çözücüsü hacminin etkisi	66
Şekil 4.5. Geri-ekstraksiyon eluentinin CV mikroekstraksiyonuna etkisi.....	67
Şekil 4.6. CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde geri-ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi	68
Şekil 4.7. CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde ekstraksiyon süresinin etkisi	69
Şekil 4.8. CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde sıcaklığın etkisi.....	69
Şekil 4.9. CV için geliştirilen MDES-DLLME yöntemine numune hacminin etkisi.....	70
Şekil 4.10. CV için geliştirilen MDES-DLLME yöntemine iyonik şiddetin etkisi.....	71

Şekil 4.11. CV için sulu standart çözeltilerle oluşturulan kalibrasyon.....	73
Şekil 4.12. CV için zenginleştirme sonrası oluşturulan kalibrasyon	73
Şekil 4.13. DTZ-metal iyon kompleksinin yapısı.....	78
Şekil 4.14. Cd(II) için Geliştirilen MDES-DLLME Yönteminde pH Etkisi.....	79
Şekil 4.15. Cd(II) İçin geliştirilen MDES-DLLME yönteminde DES kompozisyonunun etkisi.....	80
Şekil 4.16. Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde Fe ₂ O ₃ magnetik nanopartikül miktarının etkisi.....	81
Şekil 4.17. Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde ekstraksiyon çözücüsü hacminin etkisi.....	82
Şekil 4.18. Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde geri-ekstraksiyon çözeltisi konsantrasyonunun etkisi	83
Şekil 4.19. Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde kompleksleştirici miktarının etkisi	84
Şekil 4.20. Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde ekstraksiyon süresinin etkisi.....	85
Şekil 4.21. Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde sıcaklığın etkisi.....	86
Şekil 4.22. Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME iyonik şiddetin etkisi	87
Şekil 4.23. Cd(II) için sulu standart çözeltilerle oluşturulan kalibrasyon	88
Şekil 4.24. Cd(II) için zenginleştirme sonrası oluşturulan kalibrasyon	88

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Sık Kullanılan DES Komponentleri	18
Çizelge 2.2 Yeşil Analitik Kimya’da 12 prensip [141]	25
Çizelge 2.3 Analitik yöntemin değerlendirilmesi için NEMI kuralları ve kriterleri	26
Çizelge 2.4 Analitik yöntemin değerlendirilmesi için modifiye edilmiş NEMI kuralları ve kriterleri.....	28
Çizelge 2.5 Analitik Eko-ölçek kuralları ve analitik yöntemin değerlendirilmesi için kriterler.....	30
Çizelge 2.6 GAPI yönteminin kriterleri.....	32
Çizelge 2.7 Kompleks GAPI yönteminin kriterleri	34
Çizelge 2.8. AGREE Yönteminin Kriterleri	35
Çizelge 2.9. AGREEprep Yönteminin Kriterleri	39
Çizelge 2. 10. Alevin özellikleri	45
Çizelge 3.1. Kristal viyole stok standard çözeltisinin hazırlanışı	54
Çizelge 3.2. Ditzonun bazı özellikleri ve çözeltisinin hazırlanışı	54
Çizelge 3.3. Bu tez çalışmasında kullanılmış olan MDES’in bileşenleri	55
Çizelge 3.4. Tampon çözeltilerin hazırlanma prosedürleri.....	56
Çizelge 3.5. UV/VIS spektrofotometresinin özellikleri.....	56
Çizelge 3.6. Alevli atomik absorpsiyon spektrofotometresinin özellikleri	56
Çizelge 3. 7. Laboratuvar çalışması sırasında kullanılan diğer ekipmanlar	57
Çizelge 3. 8. Farklı mol oranlarındaki DES’ lerin hazırlanma prosedürü	58
Çizelge 3. 9. Mikrodalga parçalama ısıtma programı.....	62
Çizelge 4. 1. CV için Geliştirilen MDES-DLLME Yöntemine engelleyici türlerin etkisi.	71
Çizelge 4. 2. CV’ ye ait kalibrasyon eğrilerine ait veriler	73
Çizelge 4.3. CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminin analitik performans kriterlerinin hesaplanması [53]	75
Çizelge 4.4. CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminin analitik performans özellikleri	75
Çizelge 4.5. CV için gerçek numune analiz sonuçları	76
Çizelge 4. 6. Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yöntemine engelleyici türlerin etkisi. [Cd(II)]: 100 mg L ⁻¹ , n = 3.	87
Çizelge 4. 7. Cd(II)’ ye ait kalibrasyon eğrilerine ait veriler.....	88
Çizelge 4. 8. Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yönteminin analitik performans özellikleri	89
Çizelge 4. 9. “TMDA–61.2 Ontario Lake” referans suyunda MDES-DLLME yöntemi ile Cd(II) analiz sonuçları	90
Çizelge 4. 10. Cd(II) iyonları için gerçek numune (balık) analiz sonuçları	91
Çizelge 4. 11. CV için geliştirilen MDES-DLLME’nin üç farklı yöntem ile yeşillik değerlendirmesi.....	94
Çizelge 4. 12. Cd için geliştirilen MDES-DLLME MDES-DLLME’nin üç farklı yöntem ile yeşillik değerlendirmesi	95

Çizelge 4. 13. CV için geliştirilen MDES-DLLME Yönteminin Diğer Literatür Yöntemleriyle Karşılaştırılması.....	97
Çizelge 4. 14. Cd için geliştirilen MDES-DLLME Yönteminin Diğer Literatür Yöntemleriyle Karşılaştırılması.....	99

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

m	Eğim
n	Yapılan analiz sayısı
R^2	Korelasyon katsayısı
S	Standart sapma
S_b	Tanık çözeltisinin standart sapması
X_{ort}	Ölçümlerin ortalaması
V	Hacim

Kısaltmalar

AALLME-DES	Hava destekli sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu-Derin ötektik çözücü (Air-assisted liquid-liquid microextraction – deep eutectic solvent)
AAS	Atomik absorpsiyon spektrometresi (Atomic Absorption Spectrophotometry)
AGREE	Analitik Yeşillik (Analytical greenery)
AGREEprep	Numune Hazırlama İçin Analitik Yeşillik (Analytical greenery for sample preparation)
ChCl	Kolin klorür
Ph	Fenol
CPE	Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu (Cloud point extraction)
CV	Kristal Viyole (Crystal Violet)
DES	Derin Ötektik Çözücü
DES-SS-DLLME	Derin ötektik çözücü-Tuzla doyurulmuş-Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu (Deep eutectic solvent- salt saturated-dispersive liquid-liquid microextraction)
DLLME	Dispersif sıvı-sıvı mikro ekstraksiyonu (Dispersive liquid-liquid microextraction)
DSP	Dispersif katı faz (Dispersive solid phase)
DTZ	Ditizon
EF	Zenginleştirme faktörü (Enrichment factor)

FAAS	Alevli atomik absorpsiyon spektrometresi (Flame Atomic Absorption Spectrophotometry)
GAPI	Yeşil Analitik Prosedür Endeksi (Green analytical procedures index)
GC-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (Gas chromatography-Mass Spectrometry)
HBA	Hidrojen bağı alıcısı
HBD	Hidrojen bağı donörü
HF-LPME	Oyuk Fiber Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (Hallow fiber liquid phase microextraction)
H-NMR	Hidrojen-nükleer manyetik rezonans
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High performance liquid chromatography)
ICP-MS	İndüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi (Inductively coupled plasma- Mass Spectrometry)
IL-DLLME-ZCDSP	İyonik sıvı-dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon-Sıfır geçişli birinci türev spektrofotometrik (Ionic liquid- dispersive liquid-liquid microextraction- Zero-crossing first derivative spectrophotometric)
LC-MS/MS	Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (Liquid chromatography-Mass Spectrometry)
LLE	Sıvı-sıvı ekstraksiyonu (Liquid-liquid extraction)
LOD	Gözlenebilme sınırı (Limit of detection)
LOQ	Tayin sınırı (Limit of quantification)
LPME	Sıvı faz mikroekstraksiyonu (Liquid-liquid microextraction)
MB	Magnetik bileşen
MCPE	Mikro bulutlanma noktası ekstraksiyonu (Micro-cloud Point extraction)
MDES-DLLME	Manyetik derin ötektik çözücü bazlı dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu
MIP-SPE	Moleküler baskılanmış polimer-Katı faz ekstraksiyonu (Molecularly imprinted polymers-Solid phase extraction)
MSPME	Magnetik katı faz mikroekstraksiyonu (Magnetic solid-phase microextraction)
NEMI	Ulusal Çevresel Metotlar Endeksi (National environmental methods index)

PF	Önderiştirme faktörü (Preconcentration factor)
RSD	Bağıl standart sapma (Relative standard deviation)
SDME	Tek Damla Mikroekstraksiyonu (Single drop microextraction)
SFODME	Katılaştırılmış Yüzen Organik Damla Mikroekstraksiyonu (Solidified floating organic drop microextraction)
SPE	Katı faz ekstraksiyonu (Solid phase extraction)
SPME	Katı faz mikroekstraksiyonu (Solid phase microextraction)
UA-TC-ILME	Ultrason destekli sıcaklık kontrollü iyonik sıvı mikroekstraksiyonu (Ultrasound-assisted temperature-controlled ionic liquid microextraction)

1. GİRİŞ

Balık tüketiminin sağlık açısından faydası herkes tarafından bilinen bir gerçek olmakla beraber, çoğunlukla kardiyovasküler sağlık için olmak üzere, ruh sağlığından bağışıklık fonksiyonlarına, metabolizma sağlığından bilişsel fonksiyonlara kadar pek çok konuda yararları olduğu tespit edilmiştir [1]. Ancak, balığın sağlık açısından faydalarına rağmen, deniz ürünlerinde kimyasal kirleticilere maruz kalma riski balık tüketimi konusunda endişelere yol açmaktadır. Kimyasal kirleticilerle ilgili bu riskler, balık tüketiminde dikkat edilmesi gereken önemli bir faktör olarak ortaya çıkmıştır. Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalara göre, bu riskler balıkların, ağır metaller, ya da dibenzofuranlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi pek çok bilinen toksik kirleticilere maruz kalmasından kaynaklanabilmektedir [2]. Bu toksik kirleticilerin başında endüstrinin gelişimi ile çevresel kirlenmenin ana nedenlerinden haline gelen ağır metaller vardır. Balık organlarında da birikebilen bu ağır metaller kararlı bileşiklerdir. İnsan fizyolojisini etkileyen en yaygın ağır metallerden bazıları arsenik, kadmiyum, kurşun, civa, bakır ve nikelidir [3]. Ağır metallerin yanı sıra balıklarda adsorbe olabilen ve dolayısıyla insan sağlığı açısından bir başka risk faktörü haline gelen diğer bir endişe kaynağı ise boyar maddelerdir [4]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, su ürünleri yetiştiriciliğinde antiseptik, mantar önleyici ve ekto-parazit önleyici olarak yaygın bir şekilde kullanılan Malahit yeşili, metilen mavisi, kristal viyole gibi trifenilmetan boyalarının da balıklar tarafından absorbe edilebildiğini ve dolayısıyla insan sağlığına ve çevreye tehlikeli olduğunu göstermiştir [4, 5].

Bu tez kapsamında, literatürde balıklarda birikerek insan vücuduna geçen çok sayıdaki toksik metal ve kimyasal kirleticilerden, suda yaşayan organizmalarda biyolojik aktiviteye sahip ve toksik bir ağır metal olan kadmiyum metali [6] ile balık yetiştiriciliğinde çeşitli amaçlarla kullanılan, kanserojenik, mutajenik ve teratojenik etkileri ile bilinen kristal viyole boyar maddesi [7] araştırılmış ve eser düzeydeki miktarlarının gerçek örneklerde analiz edilebilmesi için basit, ucuz, yeşil kimya yaklaşımına uygun bir yöntem geliştirilmiştir.

Günümüzde kadmiyum ve kristal viyole gibi eser düzeydeki türlerin kalitatif ve kantitatif tayinleri için literatürde çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar

incelendiğinde, geçmişten günümüze kadmiyum ve kristal viyolenin zararlı etkileri nedeniyle kalitatif analizinin önemli olduğu görülmüş olup çeşitli kromatografik ve spektroskopik yöntemlerle tayin edildiği fark edilmiştir. Bu doğrultuda, kristal viyolenin bir balık tarafından absorplanması sonucu, vücutta biriken, metabolizma tarafından iki forma çevrilebilen kristal viyole ve hücre içine geçtikten sonra bir kısmının metabolik olarak indirgenmesi sonucu oluşan lökokristal viyole kalıntılarının [4] tespiti için gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) [8], yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) [7] ve sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) [9] olmak üzere pek çok kromatografik yöntem geliştirilmiştir. Ancak uzun ölçüm süreleri, dolaylı ölçüm, pahalı ekipman ve karmaşık ön işlem prosedürleri gibi nedenler kromatografik tayin yöntemlerinin daha az tercih edilmesine neden olmaktadır [5, 10]. Literatürde, kristal viyole tayini için kullanılan spektrofotometrik yöntemlere bakıldığında en fazla UV/VIS spektrofotometre ve kızılötesi spektroskopisi ve H-NMR spektroskopisi ile tayin edildiği [5, 11, 12] görülmüştür. Kadmiyum tayininde en sık kullanılan spektrofotometrik yöntemlerin ise alevli atomik absorpsiyon spektrometresi (FAAS) [13-15] ve indüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi (ICP-MS) [16-18] olduğu görülmüştür. Ancak, özellikle spektroskopik yöntemlerde kullanılan cihazların düşük duyarlılığı nedeni ile, konsantrasyonları çok düşük seviyelerde olan analitlerin ve/veya karmaşık matris ortamında bulunan analitlerin tayinlerinin zor olması nedeni ile analitin tayin limitini artırmak ve/veya karmaşık matris bileşeninin etkisini elimine etmek amacıyla bir önderiştirme/zenginleştirme işlemi gereklidir [19, 20].

Son yıllarda, sıvı-sıvı ekstraksiyonunun (LLE) minyatürleştirilmesi ile türetilen bir yöntem olarak sıvı faz mikro ekstraksiyonu (LPME), minimum organik çözücü kullanımı ve yüksek ekstraksiyon verimi sayesinde karmaşık matrislerdeki analitlerin ekstrakte edilmesinde kullanılmaktadır [15-17]. LLME'nin yaygın uygulanan çeşitlerinden biri olan dispersif sıvı-sıvı mikro ekstraksiyonu (DLLME) tekniğinde uygun oranlardaki ekstraksiyon solventi ile dispersiyon solventi analit çözeltisine hızla eklenerek ekstraksiyon gerçekleştirilir. Bu yöntem, hızlı, basit ve yüksek ekstraksiyon verimine sahiptir. Ancak, kullanılan ekstraksiyon çözücülerinin toksik olması ve santrifüj kullanım zorunluluğu gibi kısıtlamaları vardır [20, 21]. Son yıllarda, derin ötektik çözücüler (DES'ler), düşük maliyeti, ihmal edilebilir düzeydeki toksisitesi, kolay hazırlanması ve hidrofobik veya hidrofilik analitlerin analizine olanak sağlaması nedeniyle çevre dostu çözücüler içinde tercih edilir olmuştur [22-24].

DES'ler, tipik olarak bir hidrojen bağı donörü (HBD) ve bir hidrojen bağı alıcısı (HBA) içeren, hidrojen bağı etkileşimlerine dayalı olarak karıştırılan iki veya üç bileşenden oluşur [25]. DES'ler geleneksel ekstraksiyon çözücülerinin yerine farklı örneklerden çeşitli analitlerin ekstraksiyonu için kullanılabilir [26]. Buna ek olarak, ekstraksiyon sürecinin daha hızlı gerçekleştirilmesi amacıyla DES'lerin alt grubu olarak, manyetik derin ötektik çözücüler (MDES'ler) geliştirilmiştir [20, 27, 28]. MDES'ler, DES'lerdeki ana bileşenler olan HBD'ler ve HBA'lara, Fe(III), Co(II) ve Mn(II) klorürleri gibi manyetik bir bileşenin (MC) eklenmesi ile elde edilir [29]. MDES'in oluşumu, HBD, HBA ve MC bileşenleri arasındaki hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimlerin sonucu gerçekleşir. MDES'lerin özellikleri genel olarak DES'lere benzer. Ancak MDES'lerin dışarıdan uygulanan manyetik alana güçlü bir yanıtının olması gibi üstün bir özelliği bulunmaktadır [30]. MDES'lerin manyetik alan ile ayrılabilmesi, ekstraksiyon verimliliğini artırmak ve santrifüjlemeyi ortadan kaldırmak amacıyla kullanılmaktadır [31].

Bu tez çalışmasında, çeşitli deniz ürünlerinde ve balık yetiştirme çiftliklerinden alınan su örneklerinde kristal viyole ve kadmiyum tayini için yeşil analitik kimya anlayışına uygun manyetik derin ötektik çözücü bazlı dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu (MDES-DLLME) yöntemi geliştirilmiştir. Bu amaçla, kolin klorürün HBA olarak, fenolün HBD olarak ve Fe₃O₄ nanopartiküllerinin de MC olarak kullanılmasıyla hazırlanan MDES ekstraksiyon solventi olarak kullanılmıştır. Ekstraksiyon çözücüsünün manyetik özelliğe sahip olması miknatısla kolayca ayrılmasına, ekstraksiyon işlem basamaklarının azalmasına ve ekstraksiyon veriminin artmasına olanak sağlamıştır. Çalışma sırasında DES bileşimi, numune çözeltisinin pH'ı, ekstraksiyon süresi, manyetik partiküllerin miktarı, geri ekstraksiyon solventinin çeşidi ve miktarı, sıcaklık, ortamdaki diğer türlerin varlığı gibi ekstraksiyon sürecini etkileyen çeşitli parametreler optimize edilmiştir. Önderiştirme/zenginleştirme faktörü, doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, tayin sınırı, günler arası ve gün içi geri kazanımlar ve bağıl standart sapmalar dahil üzere yöntemin nicel tayin parametreleri kapsamlı şekilde değerlendirilmiştir. Ek olarak, yöntemin çevresel etkisi üç farklı yeşillik değerlendirme ölçütü (ComplexGAPI, AGREE ve AGREEprep) kullanılarak değerlendirilmiş ve diğer yöntemlerle çeşitli özellikleri ve yeşillik derecesi bakımından daha önce yayınlanmış yöntemlerle karşılaştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Boyar Maddeler ve Canlılar Üzerine Etkileri

İnsanlık tarihinde boyar maddeler sanat, gıda, ilaç, dekor, kozmetik, tekstil, matbaa gibi hayatın çeşitli alanlarında, farklı amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır. Gelişen endüstriler, beraberinde yüksek hacimlerde su tüketimine ve büyük atıkların oluşmasına sebep olmuştur. Yalnızca tekstil sektörünün oluşturduğu atık su, toplam küresel atık su miktarının %15'inden fazladır [26]. Su kirliliği günümüz dünyasının en büyük ve en tehlikeli problemlerinden birisidir. Farklı endüstrilerde çeşitli amaçlarla kullanılan boyar maddelerin çoğu suda yüksek oranda çözünebilen ve biyolojik olarak parçalanamaz kimyasallardır. Bunun neticesinde yeraltı ve yüzey sularının kirlenmesinin yanı sıra, ekosistemin bozulmasına da sebep olmakta ve insan sağlığına tehditler oluşturmaktadır [26, 32].

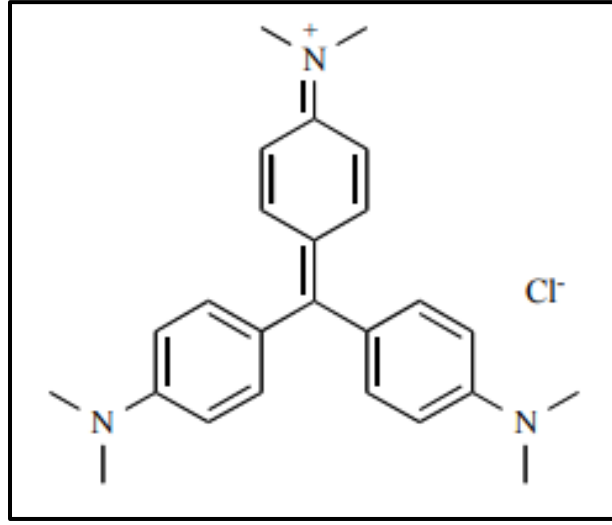
Çeşitli endüstrilerde sıkça kullanılan boyar maddeler arasında indigo karmin, brilliant blue, kristal viyole ve anilin mavisi öne çıkar. Ancak, bu boyaların ağır kanserojen olduğu ve biyolojik toksisiteye yol açtığı bilinmektedir. İnsanlarda doğrudan temas sonucu cilt hastalıkları ve sindirim sistemi sorunları gibi çeşitli sağlık sorunlarına sebep olabilmektedirler [32, 33].

İndigo Karmin, göz ve ciltte tahrişe, konjonktiva iltihabına ve hatta kornea hasarına yol açabilir; ayrıca, gelişim ve üreme üzerinde çeşitli sorunlara ve hatta ölüme sebep olabilir [32, 34]. Kristal viyole ise mitotik bir zehirleyici madde olarak bilinir ve in-vitro ve in-vivo çalışmalarla biyolojik tehlike unsuru olduğu kanıtlanmıştır. Bunun yanı sıra, kristal viyole suda yaşayan balıklarda tümör oluşumuna neden olabilmektedir [32, 33]. Anilin Mavisi ise sindirim sistemi sorunlarına, solunum zorluklarına ve öksürüğe neden olabilir. Ayrıca, suyun kalitesini düşürerek insanların kullanımı için sağlıksız hale getirebilir ve çevresel toksisiteye yol açabilir [32, 35, 36]. Brilliant Blue ise mitokondriyal solunumda hasara neden olabilmektedir [32, 37].

2.1.1. Kristal Viyole

Heksametil Pararosanilin ve çiçek moru olarak da bilinen kristal viyole, bir boyar madde olup, 1951 yılından bu yana kullanım amaçları ile piyasada bulunan trifenilmetan

boyası sınıfındadır [38]. Kapalı formülü $C_{25}H_{30}ClN_3$ olan, moleküler ağırlığı 407.99 olan kristal viyolenin kimyasal yapısı Şekil 2.1’de gösterilmektedir [39].



Şekil 2.1. Kristal Viyolenin Kimyasal Yapısı

Kristal viyolenin sulu çözeltileri mor menekşe renginde olup, maksimum absorbans değeri 585 nm ila 594 nm dalgaboyu aralığındadır [10, 24, 39]. Kullanımı çok eskiye dayanan kristal viyole günümüze kadar antifungal/antibakteriyel özellikleriyle, yanık tedavilerinde ve geçici saç boyamalarında olduğu gibi pamuk ve yün gibi malzemelerin boyanmasında sıkça kullanılmıştır [39]. Bugün ise en yaygın olarak su ürünleri yetiştiriciliğinde antiseptik, mantar önleyici ve ekto-parazitleri engelleyici olarak tercih edilmektedir. Ancak, canlılar tarafından sudan kolayca emilebilme, canlı dokularda birikme eğilimi, karsinogenez ve mutajenizasyon riski taşıması gibi nedenlerle kullanımı riskli görülmektedir. Bununla birlikte, düşük maliyeti ve yüksek verimliliği nedeniyle hala tercih edilmektedir [4, 7, 9, 10, 39-43].

2.2. Ağır Metaller ve Canlılar Üzerine Etkileri

Ağır metaller, sudan en az 5 kat daha fazla yoğunluğa sahip olup, doğal olarak oluşan çevresel maddelerdir ve vücutta biyolojik olarak birikebilme yeteneği sayesinde düşük dozlarda bile olsa uzun süre maruz kalındığında büyük zararlara neden olmaktadır. Normal hücre fonksiyonlarındaki rollerine bağlı olarak, vücut için gerekli olduğu ve olmadığı durumlar mevcuttur. Çeşitli hücresel metabolik yollar ile maruz kalınan, çok düşük dozlardaki esansiyel olmayan ağır metaller toksik etkilere sahiptir [44]. Canlılar ağır metallerle öncelikli olarak madencilik, endüstriyel üretim ve tarımsal kullanım gibi

faaliyetlerin sonucu maruz kalmakla beraber, volkanik patlamalar, karasal ayrışma, buzul atıkları gibi doğal süreçler sonucunda da maruz kalabilmekte ve bu maruziyet sonucu gelişim bozuklukları, organ yetmezlikleri gibi çok ciddi sağlık sorunları oluşabilmektedir [45].

Ağır metaller, esansiyel olup olmamalarına göre genellikle iki ana gruba ayrılır: esansiyel ağır metaller; vücut için belirli miktarlarda gereklidir ve DNA sentezi, hücre solunum, bağışıklığı artırmak gibi normal fizyolojik fonksiyonları destekler. Örnek olarak, demir, çinko, bakır ve mangan gibi elementler esansiyel ağır metallerdir. Vücut, bu metalleri besinler yoluyla alır ve normal metabolizmada kullanır [46]. Esansiyel olmayan ağır metaller vücut için gerekli değildir ve yüksek miktarlarda alındığında toksik etkilere neden olabilirler. Örnek olarak, cıva, kurşun, arsenik ve kadmiyum gibi metaller esansiyel olmayan ağır metallerdir. Bu metaller, genellikle çevresel kirlilik, endüstriyel atıklar veya yanlış kullanım sonucu vücuda alınır ve çok düşük konsantrasyonlarına bile uzun süreli maruziyetleri sağlık sorunlarına yol açabilir. [47]. Özetle, esansiyel ağır metaller vücut için gereklidir, ancak dengeli alınması gerekir. Bunun yanında esansiyel olmayan ağır metaller toksik etkilere neden olabilir ve maruziyetlerinin kontrol altında tutulması son derece önem arz eder.

2.2.1. Kadmiyum

İlk olarak Alman kimyager Friedrich Stromeyer tarafından 1817'de, çinko karbonat numunesindeki bir safsızlıktan keşfedilen, geçiş metali olan ve periyodik tablonun IIB grubunda bulunan kadmiyumun atom numarası 48, atom ağırlığı 112.4, erime noktası 320.9°C, kaynama noktası ise 765°C'dir [48]. Toksik bir ağır metal olmasının yanında herhangi bir temel biyolojik işlevi bilinmemektedir. Doğada Cd^{2+} olarak bulunmakta olup, endüstride iyi bir korozyon direnci sağlayan kaplama olarak, şarj edilebilir veya ikincil güç kaynakları olarak pillerde, fosfat gübrelerde, rafine petrol ürünlerinde, pigmentlerde, polivinil klorür stabilizatörlerinde kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra, insanlarda ve diğer canlılarda biyobirikebilen, kanserojen etkiye sahip, son derece toksik bir ağır metaldir. Kadmiyum zehirlenmesi, bir canlının metali solunum veya yutma yolu ile kontaminantları vücuduna alması ile gerçekleşmektedir. Düşük düzeyde kadmiyum bulantı, kusma ve ishale neden olurken solunan kadmiyum baş ağrısına, boğulmaya, boğaz ağrısı ve kuruluğu gibi semptomlara neden olmaktadır. Uzun süreli maruziyet ise akut ve kronik etkilere, böbrek hasarlarına, yüksek kan basıncına, kalp büyümesine, kas kramplarına ve hatta ölüme neden olabilmektedir. Japonya'da bulunan

Jintsu Nehri Vadisi'nde madencilik ile nehre karışan kadmiyum sudan, balıklardan ve pirinçlerden insan metabolizmasına girerek Japonca olarak "ağrı, ağrı" anlamına gelen, kemik hastalığı ve böbrek işlev bozukluğunun birleşimi olan "itai itai" hastalığına neden olmuştur. Kadmiyumun insan vücuduna girişinin ana yolları besinler ve tütünlü ürünlerdir [49, 50].

2.3. Eser Türlerin Önderiştirilmesi

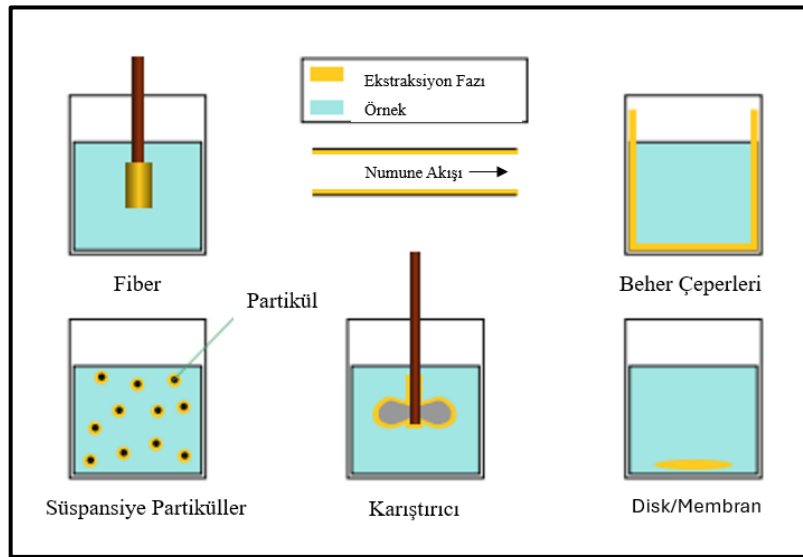
Artan çevre sorunları beraberinde metal kirliliği getirmiş olup, herkesin bildiği gibi metal iyonlarının çevrede açığa çıkması insan sağlığına ve ekolojik sisteme büyük sorun teşkil etmektedir [51]. Bu nedenle metal analizinin hassas ve daha yeşil yöntemlerle tayin edilmesi önem kazanmaktadır. Literatür incelendiğinde ağır metal analizleri tayininde kullanılan yöntemler arasında ICP-MS, İyon Kromatografisi, Kaliper Elektroforez, Atomik Absorpsiyon Spektrometrisi (AAS), Atomik Emisyon Spektrometrisi (AES), X-RAY Floresans Spektrometrisi gibi pek çok yöntemin yer aldığı görülmektedir [51-53]. Ancak gerek yeşil kimya prensiplerine uygunluk için düşük hacimlerde numune hazırlıkları ve düşük hacimlerde atıklar elde etmek için, gerekse çalışılan örnekteki metal konsantrasyonu çok düşük seviyelerde olduğu için, bazen de duyarlılığı ve seçiciliği düşük olan cihazlarda analitin miktarının çok düşük olduğu numuneler de veya karmaşık numune matriksinde tayin edilmek istenen metal konsantrasyonu, hassas ve güvenilir bir şekilde tayin edilememektedir. Bu noktada, çeşitli nedenlerle kantitatif tayini yapılamayan konsantrasyon seviyelerinde hassas ve güvenilir tayinler elde etmek amacı ile numune hazırlama aşamasında tayin edilecek analit numunesine "zenginleştirme" ve/veya "önderiştirme" denilen bir ön işlem uygulanmaktadır. Pek çok önderiştirme yöntemi olmasına rağmen (birlikte çöktürme, elektrolitik biriktirme, uçurma, adsorpsiyon, iyon değiştirme yöntemleri gibi [54-60]) içlerinde en bilinen ve en sık kullanılan yöntem ekstraksiyon yöntemleridir. Ancak geleneksel katı faz ekstraksiyon ve sıvı faz ekstraksiyon yöntemlerinin, yüksek hacimde solvent kullanımı ve yüksek hacimde atık oluşumu, zor ve uzun zamanda faz ayrımı gerçekleşmesi gibi nedenler [61] ile ekstraksiyon yöntemleri yerini mikroekstraksiyon yöntemlerine bırakmıştır. Geçmişten günümüze mikroekstraksiyon yöntemleri en yaygın kullanılan önderiştirme yöntemleri arasında bulunmaktadır [62-65].

Önderiştirme işlemini önemli kılan bazı özelliklerin;

- yüksek hacimlerde çalışmanın pratik olmaması, fazla atığa neden olması, zaman ve maddiyat açısından dezavantajlı olması,
- çok düşük konsantrasyonları nedeni ile hassas tayin edilemeyen analitleri tayin etmek için duyarlılık ve seçiciliği yüksek pahalı enstrümantal cihazlar (ICP-MS) almak yerine, var olan cihaz (UV-VIS Spektrometresi, Atomik Absorpsiyon Spektrometresi (AAS) gibi) ile tayin edebilmek,
- eser ve mikro düzeylerde analiz yaparak daha az kimyasal kullanımı, daha az enerji sarfıyatı, daha yeşil yöntemlerle ucuz maliyetli ve hızlı analiz imkanları sağlaması
- numune matrisinin bozucu etkilerinden kurtulmayı sağlaması gibi avantajlar olduğu yorumu yapılabilmektedir.

2.3.1. Katı Faz Mikroekstraksiyonu (SPME)

İlk olarak 1990 yılında Arthur ve Pawliszyn geliştirilen bu yöntem, numune alma, konsantrasyon ve analit ekleme işlemini tek bir basamağa indirgeyen, çoğunlukla solventsiz, yüksek verimli ve kullanımı kolay bir numune ön hazırlık tekniğidir. Ayırma ve önderiştirme işlemleri amacıyla uzun yıllardır kullanılan bir yöntem haline gelmiştir [66-68]. Katı bir destek üzerinde dağılmış ekstraksiyon fazı, optimize edilmiş bir süre boyunca numuneye maruz bırakılır. Optimize edilmiş süre sonunda numune matrisi ve ekstraksiyon fazı arasında bir dengeye ulaşılır ve kaplamadaki analitlerin zamanlanmış birikimine dayanarak miktar tayini gerçekleştirilebilir [69] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Katı Faz Mikroekstraksiyonu Şematik Gösterimi [69]

Yöntemin dezavantajları;

- yüksek hacimde solvent kullanılması (büyük çoğunlukla toksik solventler)
- yüksek hacimde atık oluşturuyor olması
- faz ayrımının zorluğu
- katı fazın gözeneklerinin tıkanması nedeni ile rejenarasyon gerektirmesi

olarak sayılabilmektedir [61]

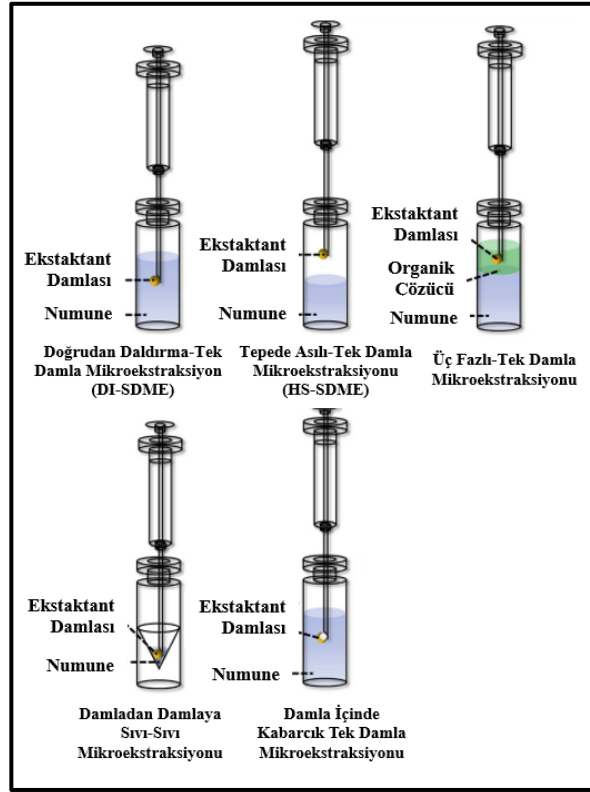
2.3.2. Sıvı Faz Mikroekstraksiyonu (LPME)

Sıvı Faz Mikroekstraksiyonu, yukarıda da bahsedildiği gibi, ilk kez 19. Yüzyılın başlarında geliştirilen Sıvı Faz Ekstraksiyon yönteminin küçük hacimlere indirgenmiş varyasyonudur. İlk kez 1990'ların ortalarında Liuand Dasgupta, Jeannot ve Cantwell ve He ve Lee tarafından çalışılmıştır [70]. Kullanılan organik solvent hacminin az olması, maliyetli olması, az hacimlerde atık üretmesi, hızlı ve kolay faz ayrımı gibi avantajları bulunmaktadır [71]. Zaman içerisinde gelişerek türetilen bir yöntem olup birçok varyasyonu bulunmaktadır [39].

2.3.2.1. Tek Damla Mikroekstraksiyonu (SDME)

Analitik kimyada analit toplayıcısı olarak tek bir damla kullanımı, 1995 yılında Dasgupta ve araştırma arkadaşının çalışmasına dayanmaktadır. Dasgupta, havadan amonyak ve sülfür dioksit gibi maddeleri ekstrakte etmek için gaz örnekleme arayüzü olarak sıvı damlacık içeren yöntemler geliştirmiştir. Bu amaçla, gaz halindeki analitleri toplamak için kullanılan bir su damlacığını desteklemek için silika bir kapiler tüp kullanılmış olup, ardından spektrofotometrik analiz yapılmıştır. [72]. Tek damla mikroekstraksiyon yönteminde, ekstraksiyon az miktarda su ile karışmayan bir çözücü ile analit bileşenlerini içeren sulu faz arasında gerçekleştiği için aslında bu yöntem sıvı faz mikroekstraksiyon yönteminden (LPME) türetilen bir yöntemdir. Alıcı faz, doğrudan kendisi ile karışmayan numunenin içerisine daldırılırsa yöntem "Doğrudan Daldırma Tek Damla Mikroekstraksiyonu", numunenin üzerinde asılı bırakılırsa "Tepede Asılı Tek Damla Mikroekstraksiyonu" olarak isimlendirilmektedir [73]. Son yıllarda, SDME'nin bazı yeni yöntemleri tanıtılmıştır. Bunlardan birisi "Damla İçinde Kabarcık Tek Damla Mikroekstraksiyonu" yöntemidir. Bu yöntemde de damlacık yüzeyini artırmak için bir çözücünün mikro damlasına hava kabarcığı eklenmiştir. Bu sayede kabarcık eklenen çözücü hacmi, kabarcık eklenmeyen çözücü hacminden daha

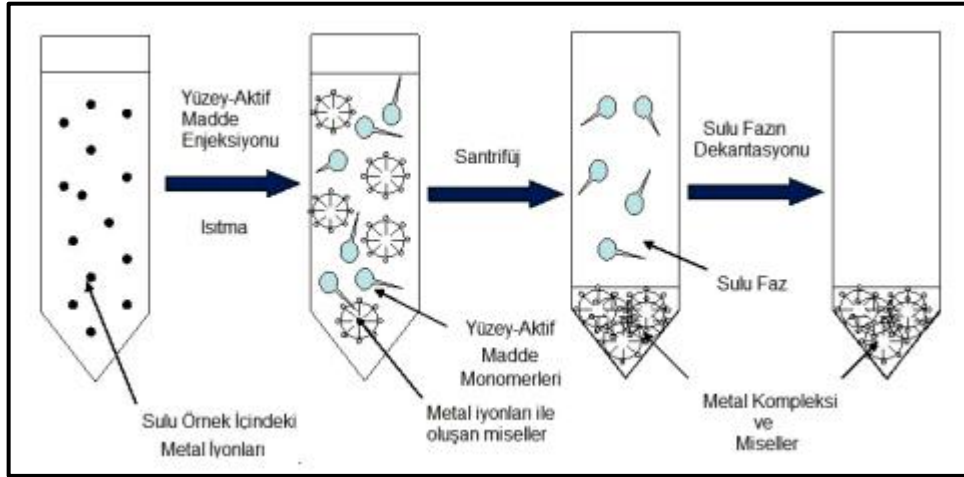
büyük olduğundan, numune-çözücü faz oranı artar, elde edilen zenginleştirme faktörü yükselir. Son yıllarda geliştirilen bir diğer yeni SDME yöntemi ise “Damladan Damlaya Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu” yöntemidir. Bu yöntemde de, birbirine karışmayan iki nanolitre hacminde sıvı damlacığı, birleşme ve karıştırma için elektronlar tarafından harekete geçirilmiştir [74-76] (Bknz. Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Sık Kullanılan Tek Damla Mikroekstraksiyon Örneklerinden Şematik Gösterimi [76]

2.3.2.2. Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu (CPE)

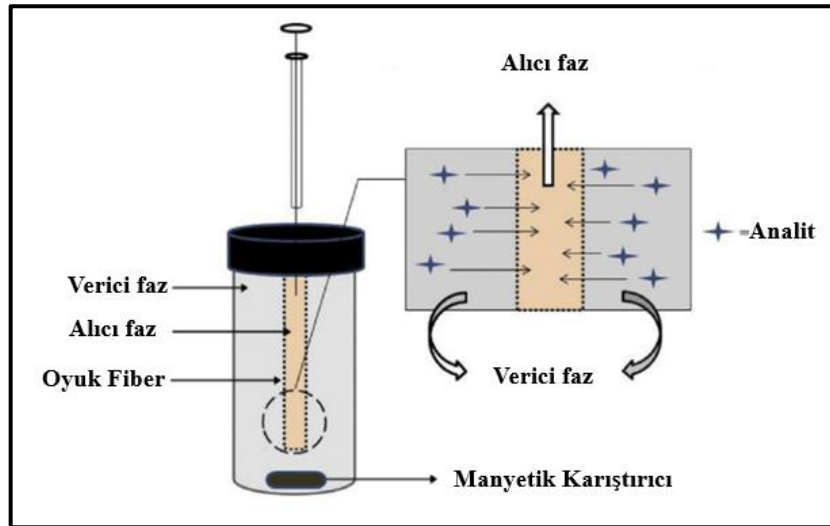
Bu yöntemde, ekstraksiyon işlemi uzun zincirli yapılarda olan yüzey aktif maddeler ile sağlanmaktadır. Belli bir konsantrasyonda bir araya gelerek “Kritik Misel Konsantrasyonu” adı verilen bir konsantrasyon seviyesinde, birleşip agrege olarak misel oluşturmakta ve belli bir sıcaklığın üzerine çıktığında “bulutlanma” olarak tabir edilen sulu fazdan ayrılabilme özelliğine sahip olarak bulanıklaşmaktadırlar. Prensibinde, analitler, uzun zincirli, boşluklu yapılara sahip olan yüzey aktif maddeler tarafından çözünür, ardından belirli konsantrasyon seviyesinde belirli bir sıcaklık üzerinde bulanıklaştırıldıktan sonra sulu fazdan ayrılabilen hale gelen organik fazın ayrımı gerçekleştirilir [77-82] (Bknz. Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu Şematik Gösterimi [83]

2.3.2.3. Oyuk Fiber Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (HF-LPME)

Bu yöntem, yüksek seçiciliğe sahip, uygun maliyetli bir numune ayırma/önderiştirme yöntemidir [84]. Öncüsü olan sıvı faz ekstraksiyonu gibi, bu yöntemde de analitlerin karışmayan sıvılar arasında ayrılmasına dayalı olarak ekstraksiyon mekanizması mevcuttur. Analitlerin ekstraksiyonunu sağlamak için, suyla karışmayan bir organik çözücü, içi boş ve gözenekli bir polimerik fiberin gözeneklerine hapsedilerek desteklenen bir sıvı membran elde edilir. Fiber daha sonra alıcı faz olan ekstraksiyon çözücüsü ile doldurularak analitlerin önce sulu fazdan sıvı membrana ve ardından alıcı faza geçmesi sağlanmaktadır [85].

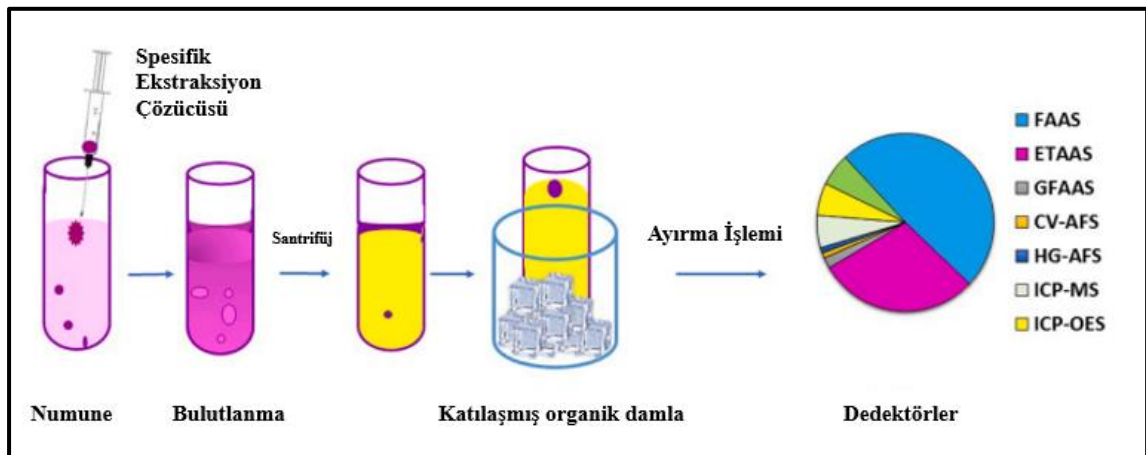


Şekil 2.5. Oyuk Fiber Sıvı Faz Mikroekstraksiyon Yöntemi Şematik Gösterimi [86]

Oyuk fiberin fiziksel özellikleri nedeniyle, matrisi oluşturan makromoleküller fiberin gözeneklerinden geçemeyerek donör fazda kalmaktadır ve bu da fiber içerisinde hapsedilmiş analitlerin ayırma ve önderiştirme verimliliğini artırarak yüksek zenginleştirme faktörü, düşük maliyet gibi avantajlar sağlamaktadır [87-90] (Bknz. Şekil 2.5).

2.3.2.4. Katılaştırılmış Yüzen Organik Damla Mikroekstraksiyonu (SFODME)

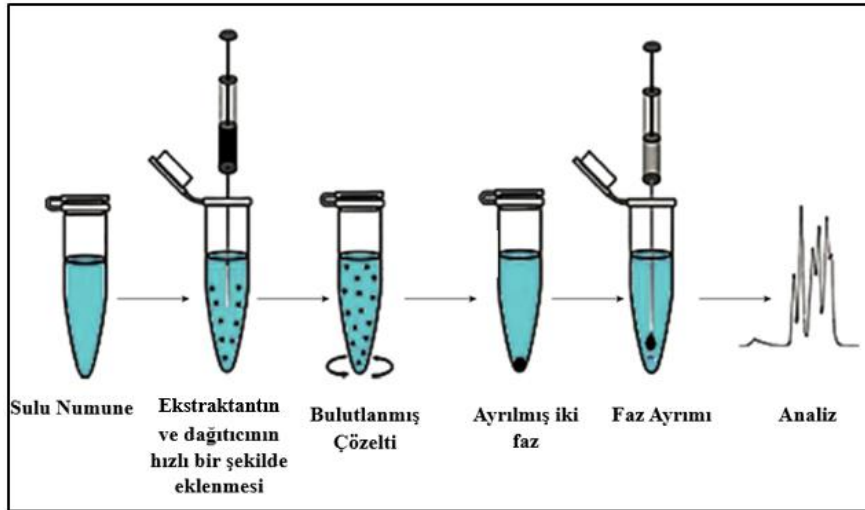
Sıvı Faz Mikroekstraksiyon yöntemine oldukça benzeyen bu yöntemi benzerlerinden ayıran en önemli özelliği ekstraksiyon fazı olarak mikrolitre düzeyinde tek bir damlanın kullanılması ve bu damlanın düşük donma noktası sayesinde oda sıcaklığında katı halde bulunuyor olması, aynı zamanda yoğunluğunun da sulu fazın yoğunluğundan düşük olmasıdır. İşlem basamakları olarak ilk önce, sulu fazda bulunan analit çözeltilerine oda sıcaklığında katı halde bulunan (dekanoik asit gibi) bir organik solvent (ekstraksiyon çözücüsü) eklenmektedir. Vortex ve/veya santrifüj gibi işlemler ile hızlanan ekstraksiyon sonucunda sulu fazda bulunan analitler organik faz olan, katı halde bulunan ekstraksiyon fazına geçiş yapmaktadır. Sulu fazdan düşük yoğunluğa sahip olan, analitlerin bulunduğu donmuş organik faz yüzeyde toplanmaktadır. Bu sayede iki fazın birbirinden ayrımı kolay olup, ekstraksiyon verimi ve önderiştirme faktörü yüksek olmaktadır [71, 91-96] (Bknz. Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Katılaştırılmış Yüzen Organik Damla Mikroekstraksiyonu (SFODME) Yönteminin Şematik Gösterimi [92]

2.3.2.5. Dispersif Sıvı Sıvı Mikroekstraksiyon (DLLME)

Yukarıda da bahsedilmiş olduğu gibi, uzun yıllardır Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu en iyi bilinen ve en yaygın kullanılan numune hazırlama tekniklerinden biri olarak bilinmektedir. Ancak yöntemde yüksek hacimde solvent kullanımı ve yüksek hacimde atık oluşumu yeşil analitik kimya ilkelerine uymamaktadır. Bu durumuna alternatif çözüm olarak mikroekstraksiyon tekniklerinin geliştirilmesi, çözücü tüketimini minimize etmek, atık tüketimini azaltmak, iş kolaylığı sağlamak, uzun ekstraksiyon sürelerini kısaltmak, maliyeti azaltmak gibi amaçlar ile gerekli hale gelmiştir [97]. 2006 yılında Rezaee ile ekibi [98] ve yine aynı yıl Berijani ile ekibi [99] tarafından geliştirilen bu yeni yöntemde sulu numune matrisine mikrolitre hacminde ekstraktant ve yine mikrolitre düzeyinde dispersant (dağıtıcı) ekleyerek bulanık bir emülsiyon oluşturulmaktadır. Ardından analitlerin ekstrakte edildiği organik faz olan ekstraksiyon fazının dağılmış parçaları santrifüj edilerek çöktürülmektedir. Daha sonra sulu faz ile organik fazın ayrımı gerçekleştirilerek ayırma ve önderiştirme işlemleri tamamlanmaktadır [100]. Diğer ekstraksiyon yöntemlerine kıyasla bu yöntem, alıcı-donör faz oranını büyük ölçüde azaltmaktadır [101]. Kullanım kolaylığı, hız, düşük maliyet, yüksek geri kazanım ve yüksek zenginleştirme faktörü bu yöntemin avantajları olarak sayılabilmektedir [98, 99]. Avantajlarının yanı sıra, karmaşık matris ortamı için analite karşı düşük seçicilik, ekstraksiyon solventinin yoğunluğunun sulu fazın yoğunluğuna göre düşük olması gerektiğinden kullanılacak ekstraksiyon solventi seçiminin sınırlı olması gibi dezavantajları bulunmaktadır [102]. Literatür incelendiğinde ise son yıllarda Dağıtılmış Dispersif Sıvı Mikroekstraksiyon'dan geliştirilmiş pek çok yöntem ortaya çıktığı görülmüştür. Bunlardan en popüler olanı Ultrason Destekli-DDLME yöntemidir. Bu yöntemde mikrolitre hacminde çözücü, ayrıca bir dispersiyon çözücüsü olmadan ultrason dalgası ile sulu numuneye dağıtılmaktadır [103] (Bknz. Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Dispersif Sıvı Sıvı Mikroekstraksiyon Yönteminin Şematik Gösterimi [104]

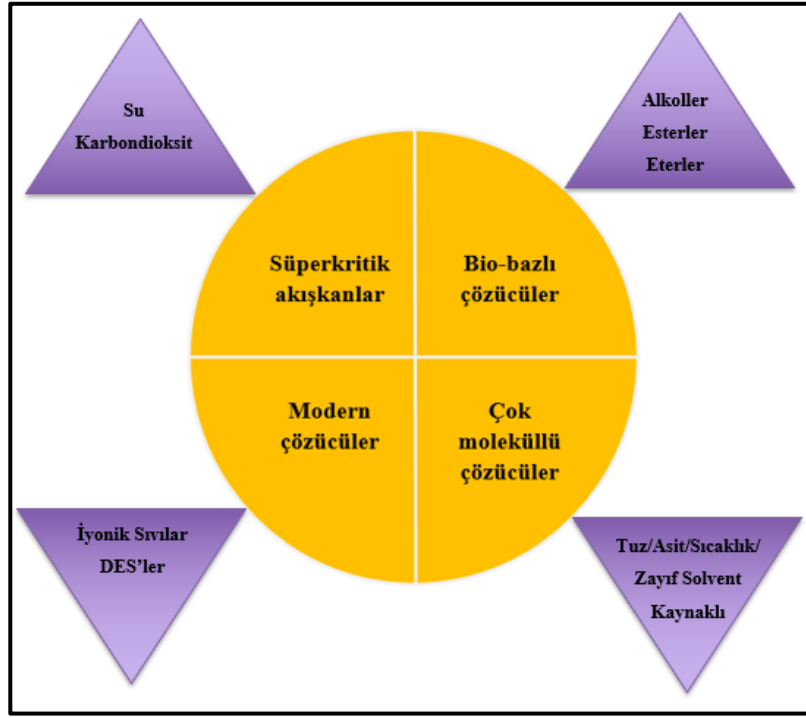
2.4. Yeşil Çözücüler

Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinde büyük hacimlerde toksik çözücüler kullanılırken mikroekstraksiyon yöntemlerinde ise kullanılan çözücü hacminin oldukça azalmış olmasının yanı sıra kullanılan çözücünün de toksik olmayan bir kimyasal olması günümüzde önem kazanmış olan konulardan birisidir. Yeşil çözücüler, toksik olmayan, uçucu olmayan, geri dönüştürülebilir, biyobozunabilir ve sentezi için yüksek maliyet ve enerji gerektirmeyen çözücülerdir. Prat ve arkadaşları [105], çözücülerini toksisite değerlerine göre sınıflandırmışlardır. (Şekil 2.8)

Su, Etanol, İzopropil alkol, N-Bütanol, Etil asetat, İzopropil Asetat, Bütil asetat, Anisol, Sülfolan
Metanol, Tert-Bütanol, Benzil alkol, Etilen glikol, Aseton, Bütanon, Metil izobütil, Keton, Sikloheksanon, Metil asetat, Asetik asit, Asetik anhidrat
2-Metil tetrahidrofuran, Heptan, m-sikloheksafuran, Toluen, Ksilenler, Klorobenzen, Acetonitril, Dimetil-propilenüre, Dimetil sulfoksit
Metil tert-bütil eter, Tetrahidrofuran, Sikloheksan, Diklorometan, Formik asit, Piridin
Diizopropil eter, 1,4-dioksan, Dimetoksietan, Pentan, Hekzan, N,N-dimetil asetamid, Metilprolidon, Metoksi-etanol, Trietanolamin
Dietyl eter, Benzen, Kloroform, Karbon tetraklorür, Dikloroetan, Nitrometan

Şekil 2.8. Solventlerin toksisite sıralaması [105]

Torres-Valenzuela ve arkadaşları [106] ise yeşil çözücü tanımının bir kısmını veya tamamını karşılayabilen, yeşil çözücü olarak yorumlanabilecek çözücülerini sınıflandırmışlardır. Bu sınıflandırma (Şekil 2.9) süperkritik akışkanlar, biyobazlı çözücüler, modern çözücüler ve çok moleküllü çözücüler olmak üzere 4 ana başlıkta toplanmıştır.



Şekil 2.9. Yeşil çözücülerin sınıflandırması

Bir ekstraksiyon işleminde zararlı bir çözücünün daha yeşil bir alternatifle değiştirilmesi basit değildir ancak çevresel olarak kabul edilebilir yeni çözümler geliştirme teknikleri ve toksik ve ağır çözücüler yerine yeni yeşil çözücüler geliştirmek amacı ile “modern çözücüler” in kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır. Şekil 2.9’da da görüldüğü üzere iki çeşit modern çözücü vardır: İyonik Sıvılar ve Derin Ötektik Çözücüler.

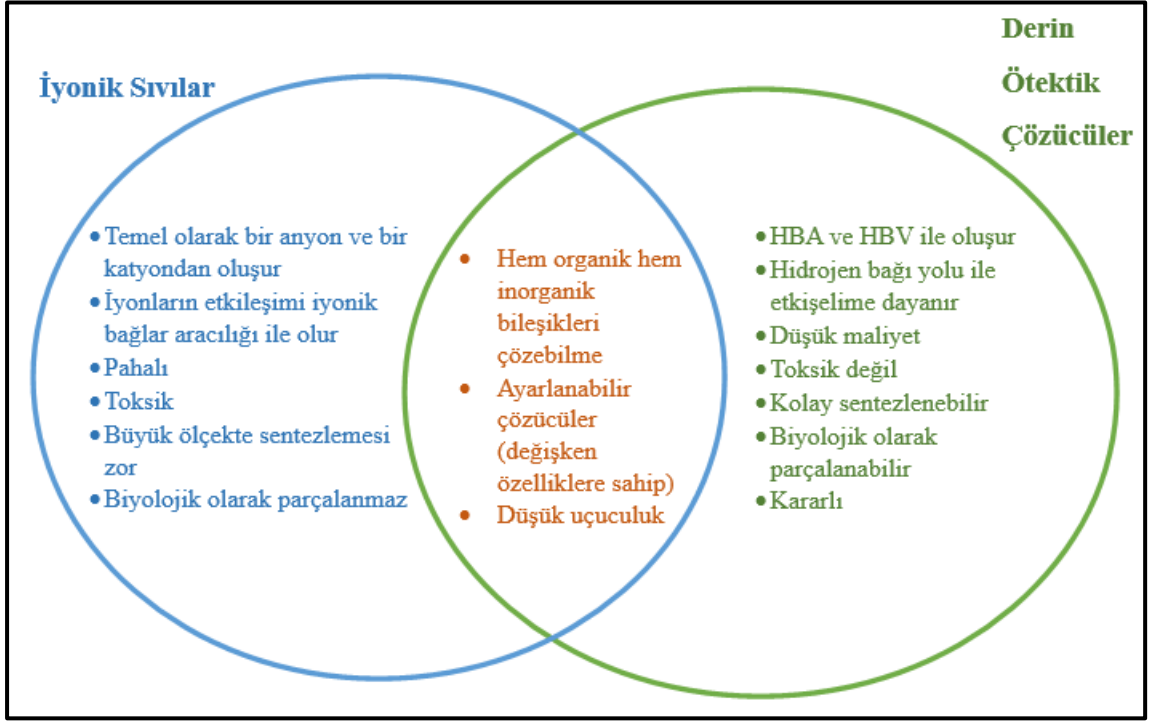
İyonik sıvılar (IL), son yıllarda ekstraksiyon yöntemlerinde organik solventlere göre nispeten yeşil çözücü olarak kullanılan yaygın bir solvent olmasına rağmen, aslında bazı toksik etkileri ve biyolojik bozunma gibi negatif özellikleri mevcuttur. Bu nedenle tüm bu dezavantajları ortadan kaldırmak ve daha yeşil temelli metotlar geliştirip uygulayabilmek adına yeni bir yeşil çözücü sentezlenmiş ve araştırmacılar tarafından kullanılmıştır: Derin ötektik çözücüler (DES)

2.4.1 Derin Ötektik Çözücüler

Derin Ötektik Çözücüler (DES'ler), yeşil çözücüler olarak bilinen ve son yıllarda popülerliği artan çözücülerdir. Bu çözücüler, moleküller arası hidrojen bağlarının oluşumu sonucu meydana gelen, düşük erime noktasına sahip bileşiklerin karışımlarından oluşur. DES'ler, genellikle ikili veya üçlü bileşenlerin bir araya getirilmesiyle elde edilirken, başlangıçta yalnızca kuaterner amonyum tuzlarının çeşitli amidler ve karboksilik asitlerle karışımları halinde oluşturuluyor olsa da, daha sonra alkoller ve kolin klorür karışımları, üre ve şeker karışımları ve/veya üre ve organik asit karışımları gibi pek çeşitli kompozisyonları geliştirilmiş ve kullanılmıştır [107].

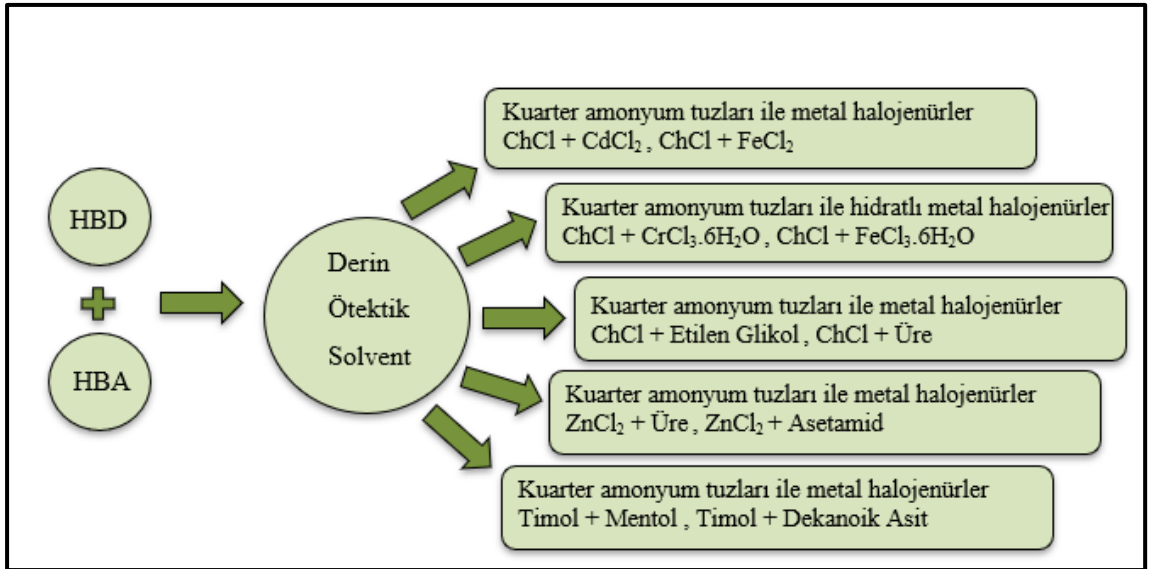
DES, karışımın erime noktasının, karışımı oluşturan saf bileşenlerin erime noktasından çok daha düşük olan, iki veya daha fazla bileşenden oluşan bir solventtir. DES oluşumu, bir hidrojen bağı vericisi (HBD) ve bir hidrojen bağı alıcısı (HBA) arasında oluşan hidrojen bağı kompleksi ile meydana gelmektedir [108-110]. DES'ler uçucu olmayan, termal kararlılığı fazla, sentezi kolay, kararlı, ucuz ve düşük toksik özellikte çözücülerdir ve birçok organik ve inorganik bileşiği kolayca çözer [111].

Modern çözücü sınıfına ait bir diğer yeşil çözücü olan iyonik sıvılar ile derin ötektik çözücüler arasındaki benzerlik ve farklılıklar Şekil 2.10'da gösterilmektedir. Buradan da görüleceği gibi, derin ötektik çözücülerin toksik olmaması, sentez kolaylığı, düşük maliyeti gibi üstünlükleri bulunmaktadır.



Şekil 2.10. İyonik sıvılar ve derin ötektik çözücülerin benzerlik ve farklılıkları

Günümüzde DES' ler, bileşenlerin doğasına göre 5 kategoride sınıflandırılmıştır (Şekil 2.11) [112, 113].



Şekil 2.11. DES'lerin Sınıflandırması

Derin ötektik çözücülerin ekstraksiyon işlemlerinde ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılmasının bazı avantajları mevcuttur [114], bunlar;

- kolay sentezlenme,

- ucuz maliyet,
- yüksek biyolojik parçalanma
- düşük toksisite,
- yüksek termal kararlılık

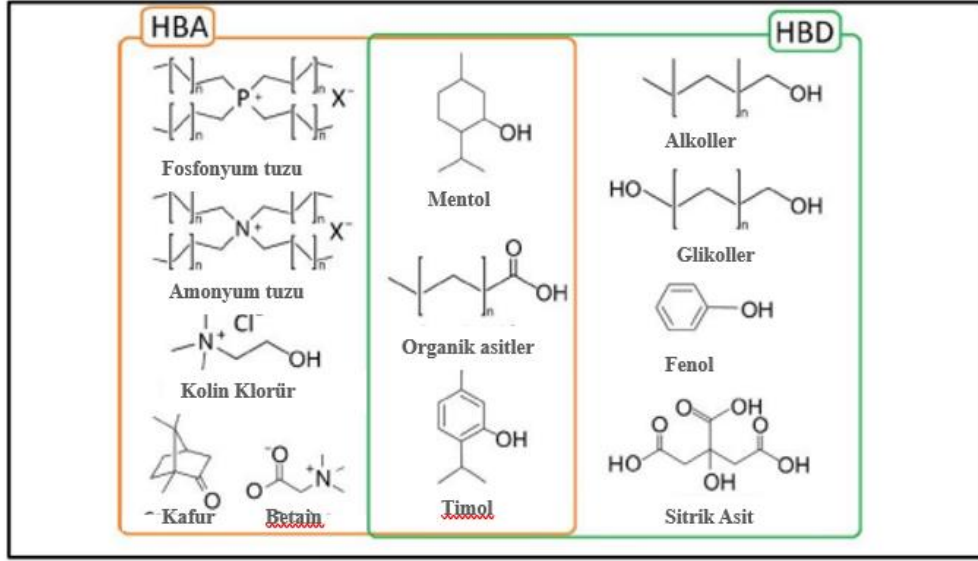
olarak sayılabilmektedir. Kolay sentezlenebilme özelliği hem deney süresini kısaltmak hem de minimum iş gücü ile maksimum etkiyi alabilmek adına önemli bir özelliktir. DES'i oluşturacak olan HBA ve HBD'nin belirli molar oranlarda karıştırılması ve bazı durumlarda HBA ve HBD arasında gerçekleşen ötektik tepkimenin süresini hızlandırmak amacı ile karıştırma işlemi sırasında sıcaklık uygulanması ile sentezlenebilmektedir.

DES'ler farklı HBA ve HBD'ler ile kombine edilerek çeşitli şekillerde sentezlenebilmektedirler. Çizelge 2.1'de DES sentezi için sık kullanılan HBA ve HBD'lerin birkaçı belirtilmektedir [115].

Çizelge 2.1. Sık Kullanılan DES Komponentleri

Hidrojen Bağlı Alıcısı (HBA)	Hidrojen Bağlı Vericisi (HBD)
Kolin Klorür	Fenol
Kolin Klorür	Üre
Kolin Klorür	Asetik Asit
Trietil Amonyum Klorür	Asetamid
Tetra BütilAmonyum Klorür	Trietilen Glikol
Çinko Klorür	Üre
Metil Trifenilfosfonyum Bromür	Gliserol

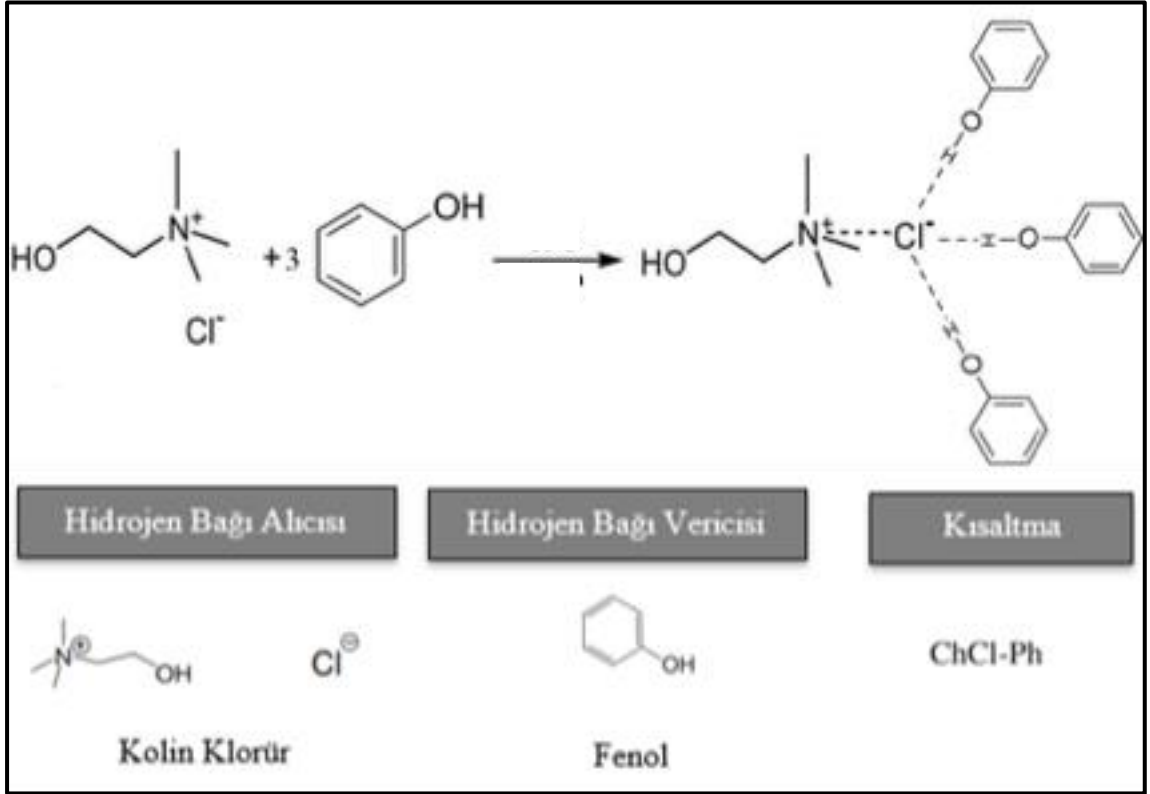
Yaygın olarak kullanılan bu DES komponentlerinin açık formülleri ise Şekil 2.12'de verilmektedir [116, 117]. Bu şekil üzerinde gösterilmiş olan, HBA ve HBD olarak ortak çerçevede bulunan mentol, organik asitler ve timol ise karakteristik grupları (=O ve/veya -COOH) sayesinde hem HBA hem de HBD olarak kullanılabilirlerdir.



Şekil 2.12. Başlıca HBA ve HBD'lerinin kimyasal yapıları

Kolin Klorür (ChCl) bazlı DES'ler gaz absorpsiyonu, ilaç çözünmesi, biyodizelin saflaştırması, metallerin elektrodepozisyonu, muhtelif ekstraksiyonlar, nanopartiküllerin sentezi gibi farklı alanlardaki uygulamalarda kullanılmıştır [118-124].

Bu tez kapsamında kristal viyole ve kadmiyum tayini için geliştirilen her iki ekstraksiyon ile önderiştirme yöntemlerinde kullanılmış olan ekstraksiyon çözücü kolin klorür (ChCl) ve fenol (Ph)'ün ötektik tepkimesi sonucu sentezlenmiş olan derin ötektik çözücüdür. ChCl ve Ph arasındaki tepkimenin ayrıntıları [122] Şekil 2.13'te gösterilmektedir.



Şekil 2.13. Kolin klorür ve fenolden oluşan DES'in tepkimesi

İlerleyen bölümlerde ekstraksiyon yönteminin detaylı açıklamalarında da belirtileceği gibi, ekstraksiyonda sulu faz ve organik fazın birbirinden ayrımını kolay, enerji kullanmadan, daha yeşil bir yöntem ile sağlayabilmek için, sentezlenmiş olan ChCl:Ph bileşenlerinden oluşan DES'e magnetik özellik kazandıracak olan, magnetik bir nanopartikül, Demir Oksit (Fe_3O_4) eklenmiştir.

2.4.1.1. Ekstraksiyonu Etkileyen DES Özellikleri

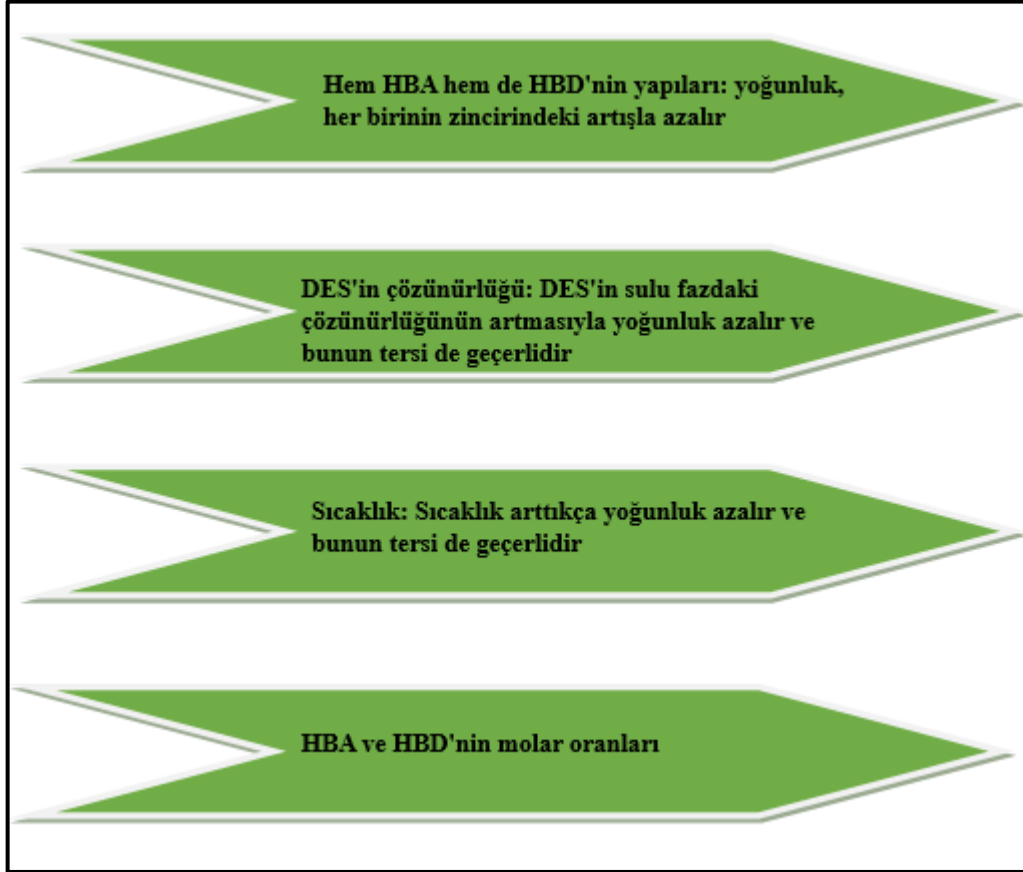
DES'ler farklı HBA ve HBD ile birleştirilerek tasarlanabildikleri için DES'lerin temel fizikokimyasal özellikleri önem arz etmektedir. Bu fizikokimyasal özellikler ilerleyen başlıklarda açıklanmaktadır.

Erime Noktası

Yukarıdaki bölümlerde de bahsedildiği gibi, DES'in erime noktası DES'i oluşturan HBA ve HBD bileşenlerinin ayrı ayrı erime noktalarından daha düşüktür ve HBA ile HBD arasındaki hidrojen bağı etkileşiminin kuvveti arttıkça DES'in erime noktası daha da düşmektedir

Yoğunluk

Ekstraksiyon işlemlerinde DES ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanıldığında yoğunluğunun suyun yoğunluğundan daha yüksek ya da daha düşük olması gerekmektedir [125]. DES yoğunluğunu etkileyen parametreler ise Şekil 2.14'te açıklanmaktadır.



Şekil 2.14. DES yoğunluğunu etkileyen parametreler

Viskozite

DES'i oluşturan her bileşen arasında büyük ve kuvvetli bir hidrojen bağı ağının olması serbest türlerin DES içerisinde daha az hareket etmesine neden olmaktadır. Aynı zamanda DES yüksek viskoz özellik kazanmaktadır. Bunun yanı sıra, DES'in sulu fazda iyi çözünmesi suyun viskozitesini azaltmaktadır. Ayrıca HBA'nın zincir uzunluğunun artması da viskoziteyi artırmaktadır fakat buna rağmen uzun ve dallanmış zincir yapısına sahip bileşenler kullanıldığında viskozitede azalma gözlenmektedir; bu da viskozitenin HBA ve HBD'nin kimyasal özelliklerine bağlı olduğunu göstermektedir.

Diğer yandan DES viskozitesi, sıcaklığa ve mol fraksiyonuna bağlı olarak da değişkenlik göstermektedir [126].

Hidrofobiklik

Genellikle DES, DES'i oluşturan HBA ve HBD'nin arasındaki hidrojen bağları nedeniyle hidrofildir. Bu kapsamda DES'in hidrofobik karakteri büyük oranda HBA ve HBD'nin yapısına bağlıdır. HBA ve HBD'nin uzun zincirli yapıları DES'in sulu fazdaki çözünürlüğünün azalmasına neden olmaktadır. Ek olarak, DES'i oluşturan HBA ve HBD bileşenlerinin ikisinin de hidrofobik özellikte olması, hem hidrofilik hem hidrofobik maddelerden oluşan DES'e kıyasla suda daha kararlı bir özellik kazandırmaktadır [127].

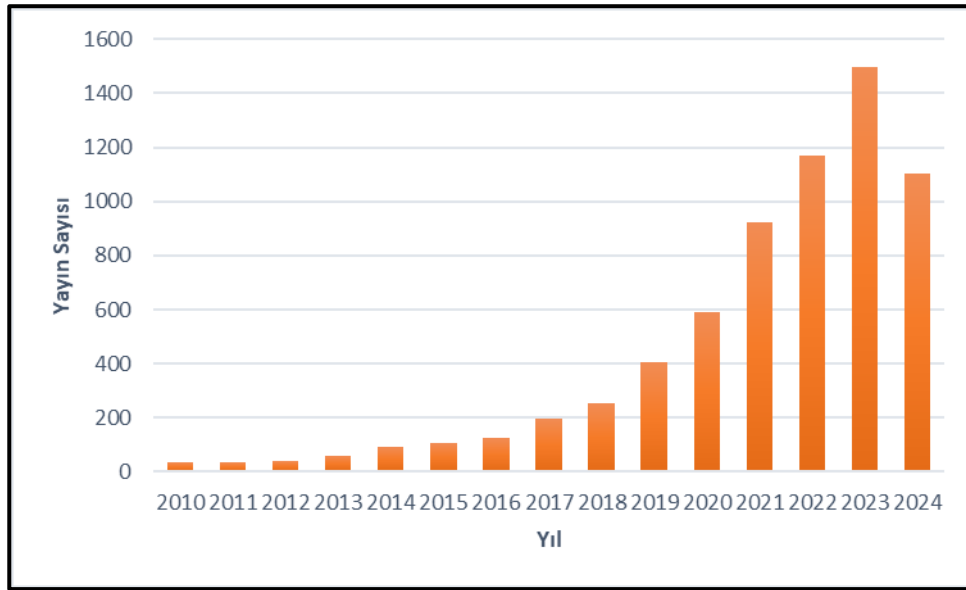
Yüzey Gerilimi

DES'i oluşturan HBA ve HBD bileşenleri arasındaki etkileşimler yüzey gerilimi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir, meydana gelen etkileşimler güçlü olduğunda yüksek yüzey gerilimleri elde edilmekte ve bu sayede ekstraksiyon verimi artmaktadır. Ancak hidrojen bağlarının etkileşimini azaltan faktörlerde, örneğin artan sıcaklık etkisi gibi, DES'in hidrojen bağlarının kırılması sonucunda yüzey geriliminde azalma gerçekleşeceği, dolayısıyla ekstraksiyon veriminin azalacağı bilinmektedir [128, 129].

2.4.2. Magnetik Derin Ötektik Çözücü

Nanoakışkanlar, taşıyıcı veya temel bir akışkan içerisinde dağılan nano boyutlu parçacıklardan (metal, seramik, karbon nanotüpler gibi) oluşan koloidal süspansiyon olup, genellikle etilen glikol, su ve/veya yağ gibi bir sıvı içerisinde dağıtılmaktadır ve bu çözücüler karışabilirlik özellikleri nedeni ile ekstraksiyon işlemlerinde ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılamamaktadırlar. Ancak günümüzde ekstraksiyon çözücüsü olarak popülerite kazanmış olan DES, nanopartiküllerin dağılacağı temel bir akışkan olarak işlev kazandığı zaman, elde edeceği magnetik duyarlılık ile önderiştirme, ayırma ve saflaştırma işlemlerinde kolaylık, hız ve basitlik sağlamaktadır [130-134]. Faz ayırımının mıknatıs ile gerçekleşebilmesi, ekstraksiyon işleminde kolaylık sağlamanın yanı sıra santrifüj gibi ek enerji kullanımı gereksinimini de ortadan kaldırmaktadır [135]. Özetle, magnetik nanoakışkanlar, sahip oldukları yüksek kütle transfer katsayısı sayesinde çeşitli türlerin ekstraksiyonunda yüksek ekstraksiyon verimi elde edilmesi,

daha yeşil yöntemler geliştirebilmek için vorteks, santifüj gibi çeşitli numune hazırlama basamaklarını kaldırarak enerji kullanmadan ekstraksiyon fazını ayırabilmek gibi amaçlar için kullanılmaktadır. Literatürde yayınlanan son yıllardaki manyetik DES ile yapılan çalışmaların sayısı da hızla artarak ilerlemektedir. Şekil 2.15'te 2010-2024 yılları arasında yayınlanan, MDES'in kullanıldığı çalışmaların artan sayısı gösterilmektedir. Grafikten de görülebildiği üzere, son 10 yılda hızla popüler bir araştırma konusu haline gelmiştir.



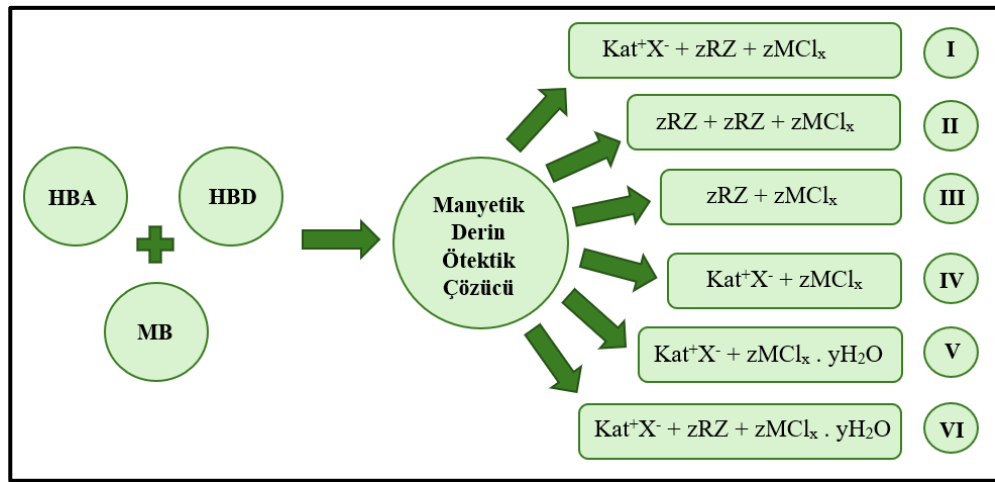
Şekil 2.15. 2010 yılından 2023 yılına kadar her yıl yayınlanan kaynak sayısı.

Grafik, “Science Direct” platformundan “magnetic deep eutectic solvents” anahtar kelimesi aratılarak elde edilmiş olan veriler ile 23.05.2024 tarihinde oluşturulmuştur.

Manyetik DES (MDES) hazırlığında HBA, HBD ve MB (manyetik bileşen) arasında güçlü hidrojen bağları ve daha zayıf elektrostatik etkileşimler oluşmaktadır. Bu durum, MDES'in, MDES'i oluşturan bileşenlerinin ayrı ayrı sahip olduğu erime noktasından daha düşük bir erime noktasına sahip olmasına neden olmaktadır. Çoğu çalışmada MDES'ler iki aşamada hazırlanmaktadır. İlk aşamada HBA ve HBD'nin uygun molar oranlarda karıştırılması ile DES sentezi gerçekleştirilirken, ikinci aşamada berrak bir sıvı haline gelmiş, sentezi tamamlanmış olan DES'e uygun molar oranlarda manyetik bileşen (MB) ile karıştırılmaktadır. MDES sentezi için oldukça yaygın kullanılan bu yöntem dışında MDES hazırlamanın bir diğer yolu ise sentez ve ekstraksiyonun eş zamanlı, yani “in-situ” olarak yürütülebilmesidir. İn-situ hazırlanan MDES'in ilk hazırlık adımı uygun molar oranlarda standart prosedür ile DES oluşturmaktır. Ardından

elde edilen DES, ekstraksiyonu yapılacak numune çözeltisine doğrudan eklenir ve analitler saf DES'e ekstrakste edilir. Daha sonra çözeltinin içerisine uygun miktarda demir klorür eklenir ve karışım çalkalandıktan sonra çözelti içerisinde MDES oluşur [136, 137]. Bu yaklaşım ile MDES hazırlama ve ekstraksiyon aşamaları önemli ölçüde azaltmakta ve hızlandırmaktadır. Ancak elde edilen MDES'in hidrojen bağlarının sadece MDES bileşenleri arasında mı yoksa su ve MDES arasında mı oluştuğu bilinmemektedir.

Şekil 2.11'de verilen DES sınıflandırmasına benzer bir sınıflandırma olarak şekil 2.16'da altı temel MDES yapısı türü bulunmaktadır.



Şekil 2.16. MDES'in sınıflandırması

(burada M: Zn, In, Sn, Al, Fe, Cr, Ni, Cu, Fe, Co ; z-y: molekül sayısı ; RZ: -OH, -COOH, -CONH2 aktif gruplarına sahip bileşikler.

MDES'i oluşturan bileşenlerin etkileşimini anlayabilmek için literatür incelendiğinde, Şekil 2.16'da belirtilen I. ve II. MDES sınıfına ait MDES'lerin merkezi noktasının, MDES'i oluşturan diğer bileşenlerin (HBA ve HBD) bağlandığı MB olduğu görülmüştür. Örneğin, Peng ve arkadaşları 2021 yılında laurik asit: dekanolik asit: $MnCl_2$ 'den, 1:2:0.5 M oranları ile oluşturdukları MDES'in oluşum mekanizmasını açıklamışlardır [138]. Oluşturdukları MDES'te Mn atomu iki dekanolik asit ve laurik asit molekülünün -COOH grubundaki oksijen atomu ile güçlü koordinasyon bağları kurmaktadır. Ayrıca Cl atomları da -COOH gruplarındaki hidrojen atomlarını elektronegatif etki ile kendine çekmektedir, asitler ile MB arasındaki güçlü hidrojen bağları oluşmaktadır. III ve IV grupları, paramanyetik özelliklere sahip bir tuz ile HBA

veya HBD'den oluşan iki bileşenli basit komplekslerdir. DES'in temel sınıflandırmasına göre bu tür MDES'ler, kullanılan bileşen türüne bağlı olarak $Kat^+X + zMCl_x$ veya $MCl_x + zRZ$ grubu olarak sınıflandırılabilir. MDES oluşum mekanizması, geleneksel DES ile tamamen aynıdır [116, 139] V ve VI grupları ise HBA ve hidratlı manyetik bileşenler ile HBA, HBD ve hidratlı MB karışımından oluşmaktadır.

2.5. Yeşil Analitik Kimya

Gelişen dünya ile artan endüstrileşme, bilimin gelişmesi ile çevreye yönelik birçok problemi de beraberinde getirmiştir. Bu problemleri ortadan kaldırmak ya da azaltmak için özellikle 1990'ların başından beri önem kazanan ve günümüzde de gelişmeleri hızla devam eden bazı yaklaşımlar öne çıkmıştır. Bu yaklaşımlar zaman içinde Yeşil Kimya, Çevreye Duyarlı Kimya, Temiz Kimya gibi pek çok isimle anılmakla beraber günümüzde de halen kullanılan en yaygın ismi "Yeşil Kimya" dır [140]. 2000 senesinde, sürdürülebilir ve çevreye duyarlı bir kimya için Anastas ve Warner, 12 prensibin bulunduğu ders kitapları yayımlayarak yeşil kimyayı resmileştirmiştir [141]. Yeşil kimya için belirlenen bu 12 prensip Çizelge 2.2'de sunulmaktadır [142].

Çizelge 2.2 Yeşil Analitik Kimya'da 12 prensip [142]

No.	Prensip
1	Atık oluşumunun önlenmesi
2	Atom ekonomisi konsepti ile kimyasal tepkime verimliliğinin artırılması
3	Daha güvenli kimyasal sentezler
4	Daha güvenli kimyasalların tasarlanması
5	Daha güvenli çözücüler ve yardımcı maddelerin kullanımı
6	Enerjinin verimli kullanımı
7	Yenilenebilir hammadde kullanımı
8	Kimyasal türevlerin azaltılması
9	Katalizör kullanımının artırılması
10	Kimyasalların işlevlerinin sonunda zararsız bozunma ürünlerine dönüşmesi ve doğada kalıcı olmayacak şekilde tasarlanması
11	Kirliliğin önlenmesi için gerçek zamanlı analizler
12	İş ve çevre güvenliğini hedefleyerek kazaları önleme

2.5.1. Yeşillik Değerlendirmeleri

Reaktantların (çözücüler dahil) tüketiminin azaltılması, toksik reaktantların zararsız olanlarla değiştirilmesi, atık ve enerji tüketiminin azaltılması gibi toplamda 12 adet prensibi bulunan Yeşil Analitik Kimyaya uygunluğun önemi gün geçtikçe artmaktadır. Bu doğrultuda pek çok çalışma yapılmış olmakla beraber, konu halen güncelliğini korumaktadır. Geliştirilen yeşil yöntemlerin gerçekten ne kadar yeşil olduğunun kanıtlanması önemlidir. Yöntem yeşilliğinin değerlendirilebilmesi adına literatüre bakıldığında pek çok yöntem geliştirildiği görülmektedir. Literatür incelendiğinde yeşillik değerlendirmesi için geliştirilmiş birkaç yöntem olduğu görülmüştür. Bu yöntemler;

- Ulusal Çevresel Metotlar Endeksi (NEMI),
- Modifiye Edilmiş Ulusal Çevresel Metotlar Endeksi
- Analitik Ekoloji Ölçeği,
- Yeşil Analitik Prosedür Endeksi (GAPI),
- Kompleks Yeşil Analitik Prosedür Endeksi (Complex GAPI)
- Analitik Yeşillik (AGREE)
- Numune Hazırlama İçin Analitik Yeşillik (AGREEprep)

olarak isimlendirilmişlerdir.

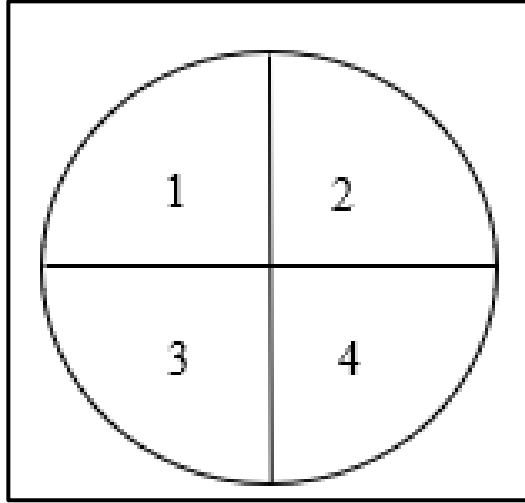
2.5.1.1. Ulusal Çevre İndeksi (National Environmental Methods Index-NEMI)

İlk kez 2002 yılında geliştirilen bu yöntem [143], bir daireyi 4 çeyrek parçaya bölen piktogramlar ile bir değerlendirme sunmaktadır. Piktogram rengini seçmek değerlendirmeye bağlı olarak yapılmaktadır. Değerlendirme, Çizelge 2.3'te belirtilen kurallara göre yapılmaktadır. 4 çeyrek parçaya bölünen piktogramın parçaları Kalıcı-Biyokümülatif-Toksik, Tehlikeli, Korozyon ve Atık başlıkları altında sınıflandırılmaktadır.

Çizelge 2.3 Analitik yöntemin değerlendirilmesi için NEMI kuralları ve kriterleri

Parça No	Parça Adı	Kriter
1	Kalıcı-Biyokümülatif-Toksik	Kalıcı, biyokümülatif veya zehirli bileşenler kullanılmamalıdır.
2	Tehlikeli	Toksik Salım Envanteri (TRI) ve Kaynak Koruma ve Geri Kazanım Yasası (RCRA) listesindeki D, F, P veya U kimyasalları kullanılmamalıdır.
3	Korozyon	pH 2-12 aralığında olmalıdır.
4	Atık	50 gramdan az olmalıdır.

Piktogram, Şekil 2.17’de sunulmaktadır. Prosedürün bu 4 sınıfa ayrılmış ilkeye uygunluğuna göre piktogram renkleri yeşile boyanmaktadır [144-146].

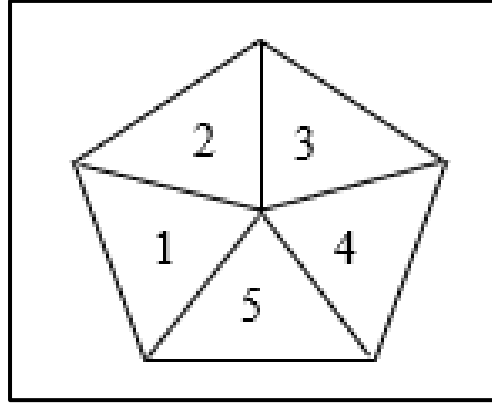


Şekil 2.17. NEMI Piktogramı

2.5.1.2. Modifiye Edilmiş Ulusal Çevre İndeksi (Modified National Environmental Methods Index-NEMI)

NEMI, teknik olarak oldukça basit olmasına rağmen herhangi bir nicel değerlendirmesinin olmaması, manuel bir süreç gerektirmesi dezavantaj olarak sayılmaktadır. NEMI yöntemi, 2009 yılında Raynie ve Driver tarafından modifiye edilerek tekrar geliştirilmiştir [147]. Bu yeni gelişme ile piktogram beşgen halinde çizilmiş ve beş parçaya ayrılmıştır. Bu kez piktogramın parçaları Sağlık, Güvenlik, Atık Kalitesi, Çevre ve Enerji Kullanımı başlıkları altında sınıflandırılmıştır. Piktogram Şekil 2.18’de sunulmuştur. Yöntemde 5 sınıftan yalnızca ilk ikisi (Sağlık ve Güvenlik) ölçülebilir niteliktedir, çünkü bu sınıflar Ulusal Yangın Koruma Birliği (National Fire Protection Association-NFPA) değerlerinden alınmaktadır. Geriye kalan 3 sınıf nicelik

olarak manuel değerlendirilmektedir. Değerlendirme, Çizelge 2.4'te belirtilen kurallara göre yapılmaktadır [144-146].



Şekil 2.18. Modifiye NEMI Piktogramı

Çizelge 2.4 Analitik yöntemin değerlendirilmesi için modifiye edilmiş NEMI kuralları ve kriterleri


Parça No.	Parça Adı	Kriter	Piktogram Rengi		
			Yeşil	Sarı	Kırmızı
1	Sağlık	NFPA sağlık tehlikesi değeri	0-1	2-3	4 veya üzeri
2	Güvenlilik	NFPA yancılık veya instabilite değeri	0-1	2-3	4 veya üzeri
3	Atık Kalitesi	Süreç boyunca oluşan toplam atık	≤50 g (1 numune için)	≤50 g (1 numune için)	250 g (1 numune için)
4	Çevre	Çevre riski (kirlenmiş ve çevresel risk taşıyan atıklar)	≤50 g	50-250 g	250 g
5	Enerji Kullanımı	1 numune için tüketilen enerji	≤0.1 kWh	≤1.5 kWh	>1.5 kWh

2.5.1.3. Analitik Ekoloji Ölçeği (Analytical eco-scale)

2006 yılında Koen Van Aken ve ekibi tarafından geliştirilen bu yöntem [148], ceza puanları ile hesaplanmaktadır. Puanlar, kullanılan kimyasallar, enstrümantal enerji kullanımı, mesleki tehlike ve atık oluşumu değerlendirilerek hesaplanmaktadır. Yöntemin kuralları ve değerlendirme kriterleri Çizelge 2.5'te gösterilmektedir. Yeşillik değerlendirmesi, toplam puan olan 100'den, ceza puanlarının çıkarılması ile hesaplanmaktadır. Toplam ceza puanları, alt toplam ceza puanlarını tehlike sayısı ile çarpılarak hesaplanır. Analitik Ekoloji Ölçeği Yöntemine göre, sonuç puanın > 75 olması çok iyi bir “yeşil yöntem” olarak kabul edilmektedir. Sonuç puan > 50 ise “kabul

edilebilir” olarak, < 50 ise “yeşil değildir” olarak kabul edilmektedir. NEMI ve modifiye edilmiş NEMI yöntemleri gibi, Analitik Ekoloji Ölçeği'nin de bir yazılımı yoktur, manuel olarak hesaplanmaktadır. Bu nedenle insan odaklı bir süreç olup kötüye kullanıma açıktır [144-146].

Çizelge 2.5 Analitik Eko-ölçek kuralları ve analitik yöntemin değerlendirilmesi için kriterler

İsim		Ceza puanı hesaplama kriteri
Kimyasallar veya reaktifler		<p>Ceza puanları, tehlikeli tanımlamasında bulunan sembollerin sayısı, malzeme güvenlik bilgi formundaki (MSDS) sinyal kelimesi ve prosedürde kullanılan kimyasal veya reaktifin hacmi aşağıdaki adımlar izlenerek kontrol edilip hesaplanacaktır.</p> <p>Adım-1: MSDS' de bulunan semboller:</p>  <p>Sinyal kelimesi "TEHLİKE" olarak belirtilmişse, her piktogram 2 ile çarpılmalı. Sinyal kelimesi "UYARI" olarak belirtilmişse, her sembol için 1 puan hesaplanmalı.</p> <p>Adım-2: Kullanılan kimyasal veya reaktif hacmi <10 mL ise, 1 ceza puanı olarak değerlendirilmeli. Kullanılan kimyasal veya reaktif hacmi 10 mL ila 100 mL arasındaysa, 2 ceza puanı olarak değerlendirilmeli. Kullanılan kimyasal veya reaktif hacmi > 100 mL ise, 3 ceza puanı olarak değerlendirilmeli.</p> <p>Adım-3: Adım-1 ceza puanları, adım-2 ceza puanlarıyla çarpılır ve bunlar ilgili kimyasal veya reaktifin nihai ceza puanları olarak raporlanır.</p>
	Cihazlar	<p>Enerji</p> <p>Enerji tüketimi için ceza puanları aşağıdaki gibi değerlendirilmektedir;</p> <ol style="list-style-type: none"> 1- Numune başına < 0.1 kWh enerji tüketiliyorsa ceza puanı 0'dır. 2- Numune başına < 1.5 kWh enerji tüketiliyorsa ceza puanı 1'dir. 3- Numune başına > 1.5 kWh enerji tüketiliyorsa ceza puanı 2'dir. <p>Endüstriyel Atık</p> <p>Buharın çevreye salınmasına bağlıdır.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1- Prosedür çevreye buhar salmıyorsa ceza puanı 0'dır. 2- Prosedür çevreye buhar salıyorsa ceza puanı 3'tür.
Atık	Atık Miktarı	<p>Toplam atık ceza puanları aşağıdaki gibi hesaplanmalıdır;</p> <ol style="list-style-type: none"> 1- Eğer atık < 1 mL ise ceza puanı 1'dir. 2- Eğer atık < 1-10 mL ise ceza puanı 2'dir. 3- Eğer atık > 10 mL ise ceza puanı 5'tir.
	Yönetim	<ol style="list-style-type: none"> 1- Üretilen atığın bir geri dönüşüm süreci varsa ceza puanı 0'dır. 2- Üretilen atık bir bozunma sürecine sahipse ceza puanı 1'dir. 3- Üretilen atığın etkisiz hale getirilme işlemi varsa ceza puanı 2'dir. 4- Üretilen atık herhangi bir işleme tabi tutulmamışsa ceza puanı 3'tür.

2.5.1.4. Yeşil Analitik Prosedür İndeksi (Green Analytical Procedure Index-GAPI)

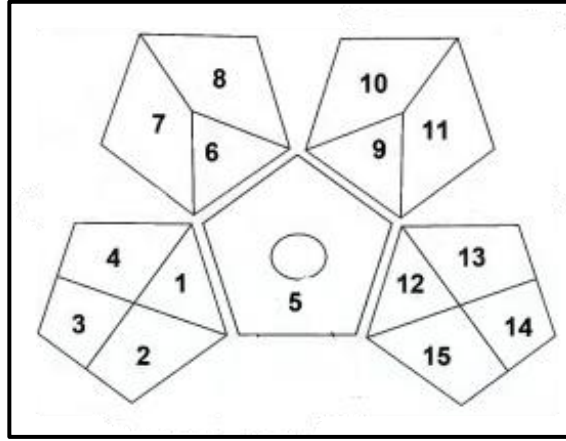
2018 yılında Plotka-Wasyłka tarafından geliştirilen bu yöntemde, düşük, orta ve yüksek etkiyi belirtmek amacı ile yeşil, sarı ve kırmızı renkleri ile temsil edilen bir piktogram sunulmuştur ve renkler sırası ile analitik prosedürlerin çevreye etkisini belirtmektedir (Şekil 2.19). Nitel bir teknik olan bu yöntemde, piktogram 5 bölmeden oluşmaktadır;

1. Numune temini,
2. Yöntem türü,
3. Numune hazırlığı,
4. Kullanılan reaktifler ve kimyasallar,
5. Cihaz.

Tekniğin anlaşılması zor olmakla beraber, belirleme için herhangi bir yazılım kullanılmamaktadır. Piktogram manuel olarak, araştırmacının kendi yorumlarına istinaden doldurulmaktadır. Yazılım <https://mostwiedzy.pl/en/justyna-plotka-wasyлка,647762-1/complexgapi> linki üzerinden ücretsiz olarak indirilebilmektedir. Piktogramda renk seçimi kriterleri Çizelge 2.6'da belirtilmektedir [144-146].

Çizelge 2.6 GAPI yönteminin kriterleri

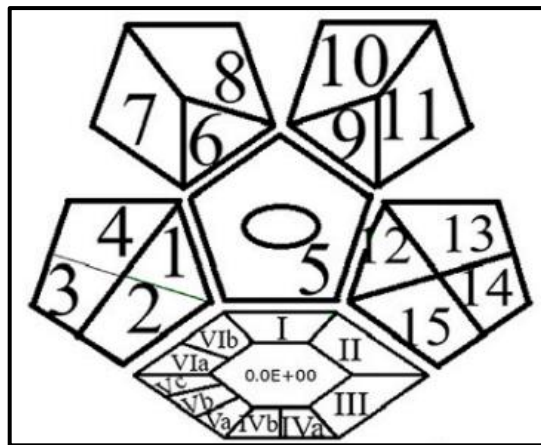
Piktogram Adı	No	Alt Bölümün Adı	Koşullara Göre Renk Seçimi		
			Yeşil	Sarı	Kırmızı
Numune Temini	1	Biriktirme	In-line	On-line	Off-line
	2	Koruma	Hiçbiri	Kimyasal ya da fiziksel (sadece biri olmalı)	Hem kimyasal hem fiziksel
	3	Taşıma	Hiçbiri	Gerekli	-
	4	Saklama	Hiçbiri	Normal Koşullar	Özel Koşul
Yöntem Türü	5	Yöntem Türü (Doğrudan/ Dolaylı)	Hazırlık Yok	Basit Hazırlık	Ekstraksiyon Gerekli
Numune Hazırlığı	6	Ekstraksiyon Ölçeği	Hiçbiri	Mikro	Makro
	7	Çözücüler/ Reaktifler	Hiçbiri	Yeşil çözücüler/ reaktifler	Yeşil olmayan çözücüler/ reaktifler
	8	Ek işlemler	Hiçbiri	Basit (temizleme ve solvent uzaklaştırma)	Gelişmiş (Türevlendirme)
Kullanılan reaktifler ve kimyasallar	9	Miktar	< 10 mL	10-100 mL	> 100 mL
	10	NFPA Sağlık Tehlike Değeri	0-1	2-3	4 ve üzeri
	11	NFPA Yanıcılık ve Kararsızlık Değeri	0-1	2-3	4 ve üzeri
Cihaz	12	Enerji Kullanımı	Numune başına < 0.1 kWh	Numune başına < 1.5 kWh	Numune başına > 1.5 kWh
	13	Mesleki Tehlike	Hiçbiri	-	Atmosfere Buharlaştırma
	14	Atık	< 1 mL	1-10 mL	> 10 mL
	15	Atık Arıtımı	Geri Dönüşebilen	Bozunur	Kalıcı
Sembol	O	Mevcut	nicel ve nitel amaçlı analiz için kullanılıyorsa		
		Mevcut Değil	Eğer yöntem sadece nitel analiz için kullanılıyorsa		



Şekil 2.19. GAPI Piktogramı

2.5.1.5. Kompleks Yeşil Analitik Prosedür İndeksi (Complex Green Analytical Procedure Index-GAPI)

Tamamlayıcı Yeşil Analitik Prosedür İndeksi olarak da bilinen bu yöntem, GAPI'nin geliştirilmiş versiyonudur. GAPI piktogramının altına altıgen bir şekil eklenmiştir (Şekil 2.20). Bu yöntemde, yeşillik değerlendirmesi bir yazılım üzerinden yapılmaktadır. Yazılım "<https://mostwiedzy.pl/en/justyna-plotka-wasylka.647762-1/complexgapi>" linki üzerinden ücretsiz olarak indirilebilmektedir. Yazılım hem GAPI hem de Kompleks GAPI'yi kapsamaktadır [145]. Piktogramın altındaki altıgen şekil altı bölümden oluşmaktadır. İlk üç bölüm tek, dört ve altıncı bölümler iki altbölüme sahiptir. Beşinci bölüm üç altbölüme sahiptir. Kompleks GAPI Çizelge 2.7'de belirtilen kurallar ile oluşturulmaktadır [144-146].



Şekil 2.20. Kompleks GAPI Piktogramı

Çizelge 2.7 Kompleks GAPI yönteminin kriterleri

Kategori	Yeşil	Sarı	Kırmızı
Verim/seçicilik vekoşullar			
Verim (I)	>89%	70-89%	<70%
Sıcaklık/zaman (II)	Oda sıcaklığı, < 1 saat	Oda sıcaklığı, > 1 saat Isıtma, <1 saat 0°C'ye soğutma	Isıtma >1 saat Soğutma < 0°C
Yeşil ekonomi ile ilişkisi			
Karşılanan kural sayısı (III)	5-6	3-4	1-2
Reaktifler ve Çözücüler			
Sağlık tehlikesi (IV a)	Hafif zehirli/tahriş edici NFPA sağlık tehlikesi değeri 0 veya 1	Orta derece toksik/inkapasitasyona neden olma NFPA sağlık tehlikesi değeri 2 veya 3	Ciddi yaralanma/kanserojen
Güvenlik tehlikesi (IV b)	NFPA yanıcılık değeri 0 veya 1	NFPA yanıcılık değeri 2 veya 3	NFPA yanıcılık değeri 4
Cihaz			
Teknik kurulum (Va)	Normal kurulum	Kullanılan ek kurulum/yarı gelişmiş araçlar	Basınçlı ekipman > 1atm/eldiven kutusu
Enerji (Vb)	Örnek başına ≤0.1 kWh	Örnek başına ≤1.5 kWh	Örnek başına ≥1.5 kWh
Mesleki tehlike (Vc)	Analitik sürecin münzevileşmesi	-	Atmosfere buhar emisyonu
Son ürünün işlenmesi ve saflaştırılması (VI a)	Yok/basit süreç	Standart saflaştırma	Gelişmiş saflaştırma
Saflık (VI b)	>98%	97-98%	<97%
Atık (VI c)	<1 mL	1-10 mL	>10 mL
E faktörü: Süreçten kaynaklanan toplam atık kütlesi / Toplam ürün kütlesi			

2.5.1.6. Analitik Yeşillik (AGREE)

2020 yılında, Polonyo'da bulunan Gdask Teknoloji Üniversitesi'nde, Marek Tobiszewski ve ekibi tarafından geliştirilen olan bu yöntemde, yeşil analitik kimyanın 12 ilkesi temel alınarak 12 bölüme ayrılmış dairesel bir piktogram oluşturulmuştur [149]. GAPI yönteminde olduğu gibi, bu yöntemde de yeşillik değerlendirmesi bir yazılım üzerinden yapılmaktadır. Yazılım ücretsiz olarak "<https://mostwiedzy.pl/wojciech-wojnowski,174235-1/AGREE>" linki üzerinden indirilebilmektedir. Yöntemin kriterleri Çizelge 2.8'de sunulmaktadır. Analitik yöntem yeşilliği değerlendirmesi için hem nicel hem de nitel sonuçları mevcuttur. 12 kriterden oluşan 12 bölümün değerlendirmesi 0-1 ölçeğinde yapılmaktadır. Test edilen analitik yöntemin AGREE skoru 1'e ne kadar yakınsa, piktogramın rengi o kadar koyu yeşil olmaktadır ve bu kombinasyon yöntemin yeşilliğini mükemmel olarak tanımlamaktadır. Tersine, yöntemin skoru 0'a ne kadar yakın ise, renk ne kadar kırmızı ise yöntem o kadar yeşil kimyadan uzaktır [144-146]

Çizelge 2.8. AGREE Yönteminin Kriterleri

No	Yeşil Analitik Kimya Prensibi	Koşul	Skor
1	Numune işleminden kaçınmak için doğrudan analitik teknikler uygulanmalıdır.	Numune hasarı olmadan uzaktan algılama	1.00
		Az fiziksel hasarla uzaktan algılama	0.95
		Bozucu olmayan analiz	0.90
		Sahada örnekleme ve doğrudan analiz	0.85
		Sahada örnekleme ve on-line analiz	0.78
		On-line analiz	0.70
		At-line analiz	0.60
		Off-line analiz	0.48
		Dışarıdan numune ön-işlem ve toplu analiz (azaltılmış adım sayısı)	0.30
		Dışarıdan numune ön ve işleme ve toplu analiz (çok sayıda adım)	0.00
2	Minimum örnek hacmi ve minimum sayıda örnek hedeftir.	Ultra mikro hacimlerde analiz	1.00
		Mikro analiz	$= -0.142 \times \ln(\text{numune miktarı g ya da mL}) + 0.65$
		Semimikro analiz	
		Makro analiz	
3	In-situ ölçümler yapılmalıdır.	In-line	1.00
		On-line	0.66
		At-line	0.33
		Off-line	0.00
4	Analitik süreçlerin ve işlemlerin bütünleştirilerek enerji tasarrufu sağlanması ve reaktif kullanımını azaltması hedeflenir.	Analitik süreçteki adım sayısı 3'ten az	1.00
		Analitik süreçteki adım sayısı 4	0.80
		Analitik süreçteki adım sayısı 5	0.60
		Analitik süreçteki adım sayısı 6	0.40
		Analitik süreçteki adım sayısı 7	0.20
		Analitik süreçteki adım sayısı 8'den çok	0.00
5		Otomatik ve minimize	1.00

	Otomatik ve minimize edilmiş yöntemler ile çalışılmalıdır.	Yarı-Otomatik ve Minimalize	0.75
		Manuel ve Minimalize	0.50
		Otomatik ve Minimalize değil	0.50
		Yarı-Otomatik ve Minimalize değil	0.25
		Manuel ve Minimalize değil	0.00
6	Türevlendirmeden kaçınılmalıdır.	Türevlendirme mevcut değil	1.00
		Türevlendirme uygulandı (DA: Türevlendirme)	$= DA_1 \times DA_2 \times \dots \times DA_n$
7	Atık oluşumu minimize edilmeli ve oluşan atıkların uygun şekilde yönetimi sağlanmalıdır.	Atık miktarı 0.1 g (mL)	1.00
		Atık miktarı 10 g (mL)	0.40
		Atık miktarı 25 g (mL)	0.25
		Atık miktarı 100 g (mL)	0.10
		Diğer miktarlar	$= -0.134 \times \ln(\text{atık miktarı g ya da mL}) + 0.6946$
8	Çoklu analit veya çok parametrelili yöntemler, tek seferde bir analit kullanan yöntemlere göre tercih edilmelidir.	1 saatte tayin edilen analit sayısı 1	0.00
		1 saatte tayin edilen analit sayısı 10	0.5
		1 saatte tayin edilen analit sayısı 50	0.9
		1 saatte tayin edilen analit sayısı 70	1.0
		Başka bir analit sayısı	$= 0.2429 \times \ln(1 \text{ saatte tayin edilen analit sayısı}) - 0.0517$
9	Enerji tüketimi minimize edilmelidir.	Numune başına harcanan enerji miktarı < 0.1 kWh	1.00
		Numune başına harcanan enerji miktarı 0.1–1.5 kWh	0.50
		Numune başına harcanan enerji miktarı > 1.5 kWh	0.00
10	Toksik reaktif kullanılmamalıdır.	Toksik reaktif kullanımı yok	1.00
		Toksik reaktif kullanımı var	$= -0.156 \times \ln(\text{toksik reaktif miktarı g ya da mL}) + 0.5898$
11	Yenilenebilir kaynaklardan elde edilen reaktifler tercih edilmelidir.	Hiçbir reaktif kullanılmaz veya tamamı yenilenebilir kaynaktan elde edilir	1.00

		Reaktiflerden bazıları yenilenebilir kaynaktan elde edilir, bazıları edilmez	0.50
		Hiçbir reaktif yenilenebilir kaynaktan elde edilmez	0.00
12	Analistin güvenliği sağlanmalıdır.	<p>Tehlikeler:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sucul yaşam için toksik • Biyoakümülatif • Kalıcı • Yüksek derecede yanıcı • Yüksek derecede oksitlenebilir • Patlayıcı • Aşındırıcı 	
		Tüm tehditler önlenmiş	1.00
		1 tehdit vardır	0.80
		2 tehdit vardır	0.60
		3 tehdit vardır	0.40
		4 tehdit vardır	0.20
		5 tehdit veya fazlası vardır	0.00

2.5.1.7 Numune Hazırlama İçin Analitik Yeşillik (AGREEprep)

2022 yılında Pena-Pereira ve ekibi tarafından geliştirilen bu yöntem, yeşil analitik kimyanın 12 ilkesinden biri olan numune hazırlama işleminin yeşilliğinin ölçülmesi amacını taşımaktadır [150]. Değerlendirme için 10 faktör göz önüne alınmaktadır. Her bölümün skor ölçümü 0 ile 1 arasında yapılmakta olup, altbölüm renkleri yeşilden kırmızıya değişmektedir [144-146].

1. In-situ örnek hazırlama tercih edilmeli.
2. Güvenli çözücü ve güvenli reaktifler kullanılmalı.
3. Sürdürülebilir, yeniden kullanılabilir ve yenilenebilir malzemeler kullanılmalı.
4. Atık oluşumu en aza indirilmeli.
5. Örnek, kimyasal ve malzeme miktarları en aza indirilmeli.
6. Örnek geçişi en aza indirilmeli.
7. Adımlar bütünleştirilip otomasyon teşvik edilmeli.
8. Enerji tüketimi en aza indirilmeli.
9. Analiz için mümkün olan en yeşil örnek hazırlama yöntemi seçilmeli.
10. Güvenlik prosedürleri sağlanmalı.

AGREEprep ile AGREE benzer yöntemler olup, tüm sürecin yeşilliğini göstermek için iki yöntem birleştirilebilmektedir [144]. Yöntem kriterleri Çizelge 2.9'da verilmektedir.

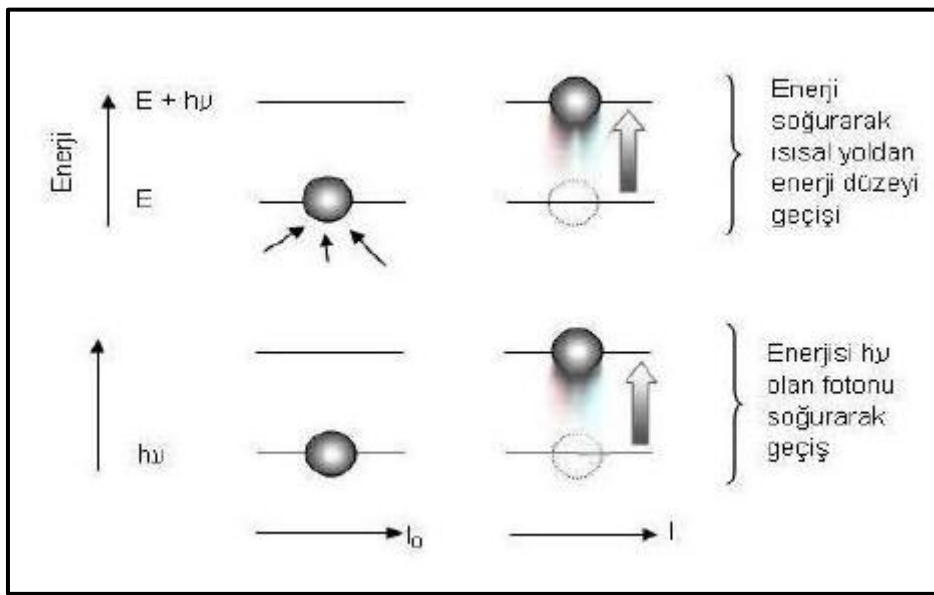
Çizelge 2.9. AGREEprep Yönteminin Kriterleri

No	Kriter	Koşul	Skor
1	Mümkün olduğunca yerinde, doğrudan, gerçek zamanlı (in-situ) analiz yapılmalıdır.	in-line/in-situ	1.00
		on-line/in-situ	0.66
		on-situ	0.33
		ex-situ	0.00
2	Daha güvenli çözücüler ve reaktifler tercih edilmelidir.	Reaktif/çözücü kullanımı yok	1.00
		>10 g veya mL tehlikeli Reaktif/çözücü	0.00
		≤10 g veya mL tehlikeli Reaktif/çözücü	$= -0.145 \times \ln(\text{tehlike miktarı}) + 0.3333$
3	Sürdürülebilir, yeniden kullanılabilir ve yenilenebilir malzemeler hedeflenmelidir.	%100 (n>1)	1.00
		>%75	0.75
		%50-75 (n=1)	0.50
		%0 (n>1)	0.50
		%25-50	0.25
		<%25 (n=1)	0.00
4	Atık oluşumu en aza indirilmelidir.	<1 g	1.00
		>1 g	$= -0.161 \times \ln(\text{atık kütlesi}) + 0.6295$
5	Numune, kimyasal ve malzeme miktarları en aza indirilmelidir.	Pasif numune	1.00
		Diğer	$= -0.145 \times \ln(\text{numune miktarı}) + 0.6667$
6	Numune verimi maksimumuma çıkarılmalıdır.	1 saatte analiz edilen numune sayısı	$= 0.2354 \times \ln(\text{numune sayısı}/\text{1saat})$
7	Adımlar bütünleştirilmeli ve otomasyona yöneltilmelidir.	Numune hazırlığında adım sayısı 2	1.00
		Numune hazırlığında adım sayısı 3	0.75
		Numune hazırlığında adım sayısı 4	0.50
		Numune hazırlığında adım sayısı 5	0.25
		Numune hazırlığında adım sayısı 6	0.00

		Otomatik numune hazırlığı	1.00
		Yarı-otomatik numune hazırlığı	0.50
		Manuel numune hazırlığı	0.25
8	Enerji tüketimi en aza indirilmelidir.	<10 kWh/numune	1.00
		10-500 kWh/numune	= -0.256 x ln (kWh/numune) +1.5886
		>500 kWh/numune	0.00
9	Numune hazırlığı sonrası ölçüm için mümkün olan en çevresi teknik seçilmelidir.	Basit	1.00
		Spektroskopi, voltametri, potansiyometri	0.75
		GC, CE	0.50
		LC, GC-MS	0.25
		ICP-OES, ICP-MS	0.00
10	Analist için güvenli prosedürler sağlanmalıdır.	Tehlike yok	1.00
		1 tehlike	0.75
		2 tehlike	0.50
		3 tehlike	0.25
		≥4 tehlike	0.00

2.6. Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi (AAS)

Wals, Atomik Absorpsiyon Spektrometresi fikrini ilk kez 1955 yılında öne sürmüştür [151]. Dışarıdan bir uyarı almadıkları müddetçe, element atomları kararlı olarak temel hal enerji seviyesinde bulunmayı tercih etmektedirler. Ancak karakteristik olarak belli dalga boyunda foton ile uyarılan element atomları, temel hal enerji seviyesinden uyarılmış hal enerji seviyesine geçiş yaparken gönderilen ışını soğurmaktadır [152] (Şekil 2.21) ve Atomik Absorpsiyon Spektrometresi, elementin en dış katman elektronlarının temel hal ve uyarılmış hal enerji seviyeleri arasında soğurulan (absorbe edilen) enerji miktarını ölçebilmektedir [153, 154].



Şekil 2.21. Bir element atomunun ısı veya ışık ile uyarılmasının şematik gösterimi

Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrofotometrisinin çalışma prensibine bakıldığında, çözelti halinde karmaşık bir matris içerisinde bulunan metal parçacıkları (atom/ion/molekül), atomlaştırıcı sayesinde gaz fazında iyonlarına ayrılmakta ve gaz akışı ile aleve taşınarak, ışın kaynağından gelen ışınlar ile analite özgü dalgaboyu aralığında uyarılarak temel hal enerji seviyesinden uyarılmış hal enerji seviyesine geçiş yapmaktadır. Analite özgü absorplanan dalgaboyu diğer dalgaboylarından, dalgaboyu ayırıcı sayesinde ayrılarak, dedektör sayesinde absorplanmış olan ışığın şiddeti ölçülmektedir. Ölçülen cevap, sinyal okuyucu olarak adlandırılan bir bilgisayara kaydedilmektedir [154, 155].

AAS'nin temelini Beer-Lambert yasası oluşturmaktadır. Beer-Lambert yasası, absorpsiyonun ışın yolu ile lineer bağlantısını bir denklem ile açıklamaktadır. Alev

içerisinde, gaz fazında, temel enerji seviyesinde bulunan analit atomları, kaynaktan düşen ışın ışın şiddeti (I_0)' nin bir kısmını soğurmaktadır. Bunun sonucunda dedektöre yansıyan ışın şiddeti (I), kaynaktan çıkan ilk ışın şiddetinden azdır. Alevde ışını absorplayan analit atomlarının konsantrasyonu, absorplanan ışın şiddeti ile doğru orantılıdır. Geçirgenlik, kaynaktan gelen ışının, alevde bulunan gaz fazındaki element atomları tarafından absorbe edilerek dedektöre yansımalarının bir ifadesidir [155, 156].

$$A = -\log_{10}T = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc \quad (1)$$

A: Absorbans

T: % Geçirgenlik

I_0 : Gelen ışın şiddeti

I : Geçen ışın şiddeti

ϵ : Molar absorbans

c: Absorpsiyon yapan madde derişimi

b: Işın yolu, cm

Eşitlik 1'den de görüldüğü üzere, absorbans ile ışın yolu doğrusal bir ilişki mevcuttur ancak bu doğrusallık bazı durumlarda karşılaşılan sapmalar ile bozulabilmektedir. Bu sapmalar, olayın doğasından meydana gelebildiği gibi absorbans ölçümünün yapılışından veya artan derişimle ($c > 0.001$ M) meydana gelmesinden dolayı oluşabilmektedir. Bu gibi nedenlerden dolayı Lambert-Beer yasasının,

- maddeyi uyarmak için gönderilen ışının monokromatik olması,
- numunenin homojen ve saf olması, aynı zamanda numune matrisindeki türlerin birbirlerinin absorbansını etkilememesi,

gibi sınırlamaları söz konusudur.

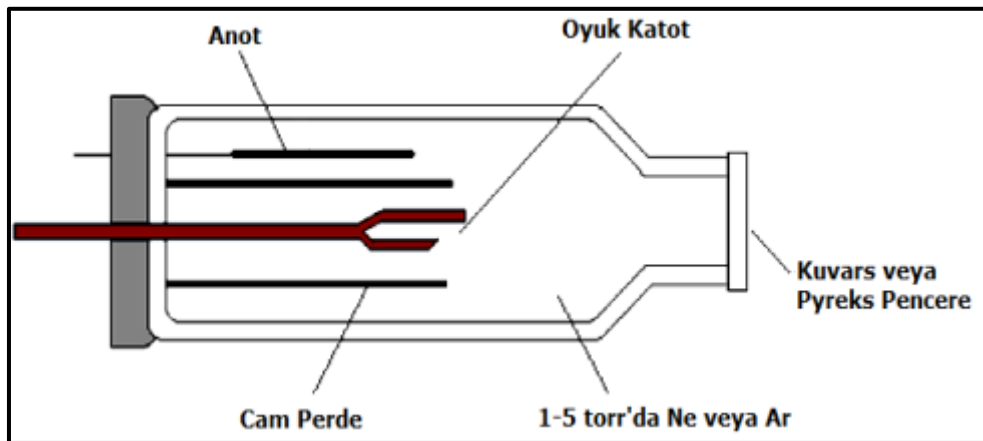
2.6.1. Işın Kaynakları

Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrofotometrisinin çalışma prensibine detaylı bakıldığında, çözelti halinde karmaşık bir matris içerisinde bulunan metal parçacıkları (atom/iyon/molekül), atomlaştırıcı sayesinde gaz fazında iyonlarına ayrılmaktadır. Burada numune matrisinde yalnızca tayin edilmek istenen metal iyonları değil, alevin ısısı nedeni ile matriste bulunan başka parçacıklar da ısı ile uyarılıp temel halden uyarılmış hal enerji seviyesine geçerken emisyon yapabilmektedir. Alev atomlaştırıcı

sayesinde gaz fazına geçerek iyonlaşmış olan parçacıklara kaynaktan gelecek olan ışın yansıtılmaktadır. Burada, kaynağın yaydığı ışın, ortamda bulunan diğer türler ile etkileşime girmeyecek şekilde, tayin edilmek istenen analite özgü, yalnızca analitin elektronik geçiş enerjisine denk gelecek şekilde, analitin absorpsiyon bandından daha dar bir dalga boyu aralığında olmalıdır. Bu nedenle, yaydığı ışın spektrumunun dalga boyu aralığının dar olması nedeni ile çizgi kaynakların kullanımı Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrofotometrisinde önemlidir. Ek olarak, alevin ısısı nedeni ile matriste bulunan başka parçacıkların da girişim yapmasını engellemek amacı ile, alevden gelen ışınların etkisini azaltabilmek için, kaynaktan gelen ışının şiddetinin, sabit frekansta periyodik olarak değiştirilmesi, yani kaynağın modüle edilmesi gerekmektedir [155].

2.6.1.1. Oyuk Katot Lambası

Atomik absorpsiyon ölçümlerinde en sık kullanılan çizgi kaynaktır. Analiz edilecek olan metalden imal edilmiş bir katot ve bir anot, argon veya ksenon ile doldurulmuş cam tüp içerisinde bulunmaktadır (Şekil 2.22) [157]. İnert gaz atomlarının iyonlaşması, elektrotlara yaklaşık 300 V potansiyel gönderildiğinde gerçekleşmektedir ve iyonların katot bileşenlerin, yüksek hızda katoda çekilip çarpışarak katottaki metal atomlarını sıçratmaktadır. Sıçratılan metal atomları uyarılmış halden temel hale dönerken fazla enerjilerini karakteristik ışın olarak yaymaktadırlar [155].



Şekil 2.22. Katot Lambasının Şematik Gösterimi

Oyuk katot lambasının avantaj ve dezavantajlarına bakıldığında,

- çok dar çizgi spektrumları oluşturması sayesinde absorbans ile derişim arasında doğrusal ilişki kurmayı kolaylaştırır,

- kullanımı kolaydır. Çevre koşullarından etkilenmez,
- çoklu element tasarımına uygundur. Tek lamba ile birden fazla element analiz edilebilir,
- ısınma süresi kısadır

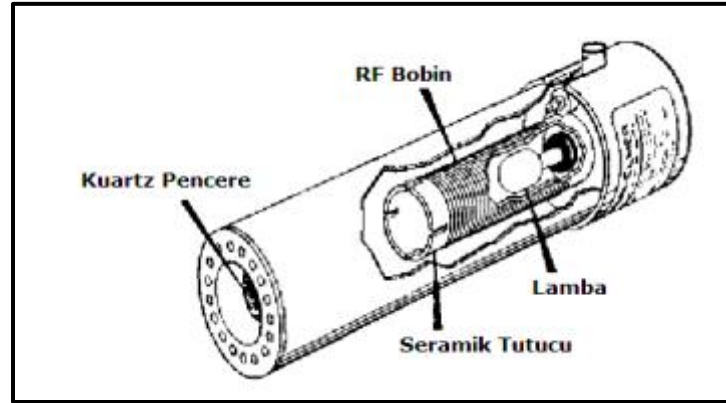
gibi avantajları bulunuyorken,

- her analizden önce lambadan gelecek ışının, alevin tam ortasından geçmesi için ayarlama yapılması gerekir
- uçucu metaller için uygun değildir

gibi dezavantajlarının olduğu da bilinmektedir [154, 155, 158].

2.6.1.2. Elektrotsuz Boşalım Lambası

Oyuk katot lambasına göre daha şiddetli ışın oluşturan bir diğer çizgi kaynağıdır. İner gaz dolu olan ve spesifik metalin bir miktarını içeren, kuvars tüpten meydana gelmektedir (Şekil 2.23). Şiddetli bir radyofrekans ve mikrodalga ışın ile uyarılan metal atomları, uyarılmış hal enerji seviyesinden temel hal enerji seviyesine dönerken emisyon olarak adlandırılan, fazla enerjisini yayma davranışı göstermektedirler [154, 155, 158].



Şekil 2.23. Elektrotsuz Boşalım Lambasının Şematik Gösterimi [157]

2.6.2. Atomlaştırıcılar

Tayin edilmek istenen analitin de bulunduğu numune matrisinin, çözelti halinden gaz fazına geçirilerek iyonlarına ayrışmasını sağlayan analitik prosedür atomlaştırma denilen bir basamak ile gerçekleştirilmektedir. Bu işlem için kullanılan iki çeşit atomlaştırıcı bulunmaktadır [155].

2.6.2.1. Alev Atomlaştırıcılar

Atomlaştırmanın uygun yanıcı ve yükseltgen gaz karışımları kullanılarak oluşturulan alev ortamında gerçekleştirildiği bir yöntemdir. Karmaşık matris ortamında çözelti olarak bulunan analit, kapiler bir boru içerisinde, sisleştirici yardımı ile, yanıcı gaz ve yükseltgen gaz sayesinde aleve püskürtülmekte ve alev içerisinde gaz fazında iyonlarına ayrılarak ilk olarak çözücüsünden ayrılmaktadır. Alevin içerisinde, analitin beraber bulunduğu ortamdaki diğer türler de analit gibi uyarılmakta ve başka türlerin de atomik, iyonik ve/veya moleküler emisyon spektrumları oluşmaktadır. Bu durum yöntemin kesinliğini önemli ölçüde etkilemektedir. Dikkat edilmesi ve değerlendirilmesi gereken bir diğer konu ise alevi oluşturan yakıcı gaz ve yanıcı gazın bileşenleridir. Çözelti içerisinde bulunan metalin (analit) yapısına bağlı olarak, her analitin gaz fazında atom haline dönüşebilmesi için gereken enerji farklıdır. Bu gereken enerji de alevden sağlandığı için, alev sıcaklığı ile enerji miktarı doğru orantı vardır. Tayin edilmek istenen metale özgü olarak alevi oluşturacak gaz karışımları belirlenmektedir [155] (Bkz. Çizelge 2.10). En yaygın kullanılan gaz karışımı, geniş bir spektral aralıkta geçirgen olduğu ve yalnızca 230 nm'den düşük dalga boyu aralığında ciddi ışın absorpsiyonu gösterdiği için, hava-asetilen karışımıdır. Toprak alkali metaller, krom, demir, nikel, soy metaller gibi yaklaşık 30'a yakın metal türü hava-asetilen alevinde tayin edilebilmektedir[154, 155, 158]

Çizelge 2.10. Alevin özellikleri

Yakıcı Gaz	Yükseltgen	Sıcaklık (°C)
Hidrojen	Hava	2000-2100
Hidrojen	Oksijen	2550-2700
Doğal Gaz	Hava	1700-1900
Doğal Gaz	Oksijen	2700-2800
Asetilen	Oksijen	3050-3150
Asetilen	Hava	2100-2400
Asetilen	Nitröz Oksit	2600-2800

Alev atomlaştırıcılar, kullanım kolaylığı ile tekrarlanabilirlik yönünden nispeten iyi olsalar dahi, numune hacminin fazla olması gerekliliği, numunenin büyük bir kısmının aleve giden yolda atığa geçmesi, atomların alev içindeki ışın yolunda kalma sürelerinin çok az olması gibi ciddi dezavantajlar söz konusudur. Bunlara ek olarak numune matrisinde bulunan diğer türler, alev nedeni ile emisyon spektrumu verebilmektedir.

Dedektöre yansıyan bu diğer sinyaller analitin sinyalini doğrudan etkileyip analiz verimini, seçiciliği ve duyarlılığı azaltmaktadır [154, 155, 158].

2.6.2.2. Elektrotermal Atomlaştırıcılar

Elektrotermal atomlaştırmanın temeli grafit bir tüpe enjekte edilen çok küçük (mikrolitre) hacimlerde numunenin elektrik akımı ile buhar aerosolünün oluşturulmasına dayanmaktadır. Grafit fırın olarak da bilinen bu yöntemin çalışma prensibinde, ilk olarak kurutma basamağı olarak bilinen çözücünün uzaklaştırılması adımı uygulanmaktadır. Ardından karmaşık numune matrisinde bulunan analit haricindeki diğer türlerin (organik maddeler ve/veya uçucu bileşenler olabilir) uzaklaştırılması için yüksek sıcaklıklarda (350-1200 °C) ısıtma gerçekleştirerek külleme basamağı olarak adlandırılan işlem gerçekleştirilmiş olmaktadır. Burada tayin edilecek analitin gaz fazında atomlarına dönüşeceği sıcaklıkta çalışmak önemlidir çünkü atomlaştırma öncesi analitleri de çözücüler ile beraber ortamdan uzaklaşmaması gerekmektedir. Bu ayrımı fark edebilmek adına bu aşamada dedektöre yansıyan sinyaller takip edilmelidir. Gaz fazında atomlarına dönüşen analit, çalışılan analite spesifik olarak 2000°C ile 3000°C aralığında bir sıcaklığa 5 saniye süre ile maruz bırakılmaktadır. Bu adımda analit atomları uyarılarak temel hal enerji seviyesinden uyarılmış hal enerji seviyesine geçerken yaptığı absorpsiyon ölçümü yapılarak kaydedilmektedir. Tayin işlemi bittikten sonra grafit fırın yeniden çok yüksek sıcaklıklara çıkarılarak analizden kalan atıkların temizlenmesi sağlanmaktadır [154, 155, 158, 159]. Alev atomlaştırıcıların aksine, çok düşük numune hacimlerinde (mikro hacim) analiz imkânı sunması ile, atomların optik yolda kalış sürelerinin daha fazla olması nedeni ile ve gözlenebilme sınırlarının daha düşük olması nedeni ile, yüksek verim, iyi tekrarlanabilirlik ve yüksek hassasiyet ile sonuç alınmaktadır. Ancak fırın sıcaklığının ısınma ve soğuma sürelerinin uzun olması, maliyetli bir cihaz olması, kullanımda tecrübe gerekliliği olması gibi nedenler dezavantaj olarak bilinmektedir [154, 155, 158, 159].

2.6.3. Monokromatörler

Spektroskopide, absorpsiyon ölçümlerinin duyarlılığı ve seçiciliği için, kullanılan ışın kaynağının bant genişliğinin, tayin edilecek olan analitin absorpsiyon spektrumundan daha dar olması beklenmektedir. Bu amaca hizmet etmesi için dalga boyu seçicilerden, dalga boyunu sürekli değiştirerek spektrum taraması yapabilen ve birbirine yakın dalga

boylarını ayırabilen monokromatörler kullanılmaktadır. Monokromatörler, optik ağı ve prizmalı olacak şekilde iki tasarımda bulunmaktadırlar. Ultraviyole, görünür bölge ve infrared ışınları için kullanılan monokromatörler, giriş sliti, paralel ışın demeti oluşturan mercek, prizma veya optik ağı, odaklanma elemanı ve çıkış sliti bileşenlerinden oluşmaktadır. Optik ağı monokromatörlerde açısız dispersiyon kırınım sonucu oluşmakta iken, prizmalı monokromatörlerde ise açısız dispersiyon kırılma sonucu oluşmaktadır [155].

2.6.4. Dedektörler

Çevredeki basınç, sıcaklık, elektriksel yük, elektromanyetik ışın, atom veya moleküllerin sinyal değişimini algılayan bir sistem olmakla beraber, ışın enerjisini ölçülebilir bir sinyale çevirmektedir. AAS'de kullanılan dedektör çeşidi foto çoğaltıcı tüplerdir. Foto çoğaltıcı tüplerde foto duyarlı bir yüzey mevcuttur ve bu yüzeyden elektron yayılmaktadır. Yayılan elektronlar dinot adı verilen bir yüzeye çarpmaktadır ve elektronların hızlandırılması ile yüzeye çarpan elektron sayısı ve böylece koparılan elektron sayısı artmaktadır [155, 159].

2.6.5. AAS'de Görülen Girişimler

2.6.5.1. Kimyasal Girişimler

Atomlaştırıcıda alev sıcaklığı, numunedeki türlerin ayrıştırılarak gaz fazında atomlarına ayrılabilmesi için önem arz etmektedir. Burada türlerin moleküler formdan serbest atom formuna geçebilmelerine yetecek enerjide alev sıcaklığı kullanmak gerekmektedir. Yüksek alev sıcaklığı kullanarak bu girişim önlenebileceği gibi, analit atomlarını bağlayan moleküler bileşene alternatif olarak termal stabilitesi yüksek başka bir bileşimin aşırı yüklenmesi ile kimyasal bir tepkime oluşumuna neden olarak analit atomlarını bağımsız hale getirme yöntemi de kullanılabilir [156].

2.6.5.2. İyonlaşma Girişimleri

Atomlaştırma basamağında temel halden uyarılmış hale geçecek olan gaz fazındaki analit atomlarını oluşturmak amaçlansa da, alevin içerisinde analitin beraber bulunduğu ortamdaki diğer türler de analit gibi uyarılmakta ve başka türleri de atomik, iyonik ve/veya moleküler emisyon spektrumları oluşturabilmektedir. Bununla beraber, alevin çok yüksek sıcaklıkta olması nedeni ile, temel hal enerji seviyesinden, uyarılmış hal enerji seviyesine geçerken elektron kopararak iyon meydana getirilebilmektedir.

Absorpsiyon olayı, temel halde bulunan parçacıkların uyarılmış hale geçerken yaptığı ışık emme olayı olduğu için, iyonlaşma varlığında temel halde bulunan atom sayısı eksilmekte ve buna bağlı olarak gerçekleşen absorpsiyonun şiddeti azalmaktadır. Bu durum, analitin iyonlaşmasının önüne geçebilecek, analitten daha kolay iyonlaşan bir elementin (potasyum ve/veya sezyum tuzları gibi) fazlaca eklenmesi ile çözülebilmektedir [156].

2.6.5.3. Spektral Girişimler

Analit atomları dışındaki bir türün absorpsiyonundan kaynaklanmaktadır. En yaygın görülen spektral girişim türü, numunedeki her türün gaz fazında atomlarına ayırlamadığında gözlenmekte olan zemin absorpsiyonu (background absorption)'dur. Yukarıda da anlatıldığı gibi, AAS'de kullanılan ışın kaynağının elemente özgü dalga boyunda ışın üretmektedir. Bu sayede, ortamda bulunan başka bir türün yapacağı absorpsiyon spektral bant genişliğine dahil olsa bile, ışık kaynağından o dalga boyu üretilmediği için absorpsiyon gerçekleşmemektedir. Ancak ayrışmamış moleküler, alevdeki parçacıklar geniş bir dalga boyu aralığında ışın saçarak analit atomlarının absorpsiyon yaptığı dalga boyunu örtebilmektedir [156].

Zemin Absorpsiyonunu Düzeltme Yöntemleri

Çift Çizgi ile Düzeltme Yöntemi

Referans olarak ışın kaynağından gelecek olan bir safsızlığın referans çizgisi spektrumu kullanılmaktadır. Bu çizgi, analit atomlarının çizgisine çok yakın olmalı fakat analit atomlarının absorplamayacağı bir çizgi olmalıdır. Numune matrisindeki türlerin ışını saçması veya absorpsiyonu sonucu referans seçilen çizginin gücünde azalma meydana gelmektedir. Numune çözeltisinin analite özgü atomik çizgide ölçülen absorbansı ile referans çizgide ölçülen absorbansın farkının alınması ile analit atomlarının yapmış olduğu net absorbans değerine ulaşarak zemin engellemesinin düzeltilmiş sonucu elde edilmektedir. Ancak bu yöntemde seçilecek olan referans çizgiyi belirlemek zordur. Analit dalga boyunun rezonans çizgisine çok fazla yakın olmayan referans çizgiler ölçümde hataya neden olmaktadır [155, 156].

Sürekli Işın Kaynağı ile Düzeltme Yöntemi

AAS'de ışın kaynağı olarak çizgi kaynaklar kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemde zemin engelleme amacı ile, çizgi kaynağa (oyuk katot lambasına) ek olarak, geniş dalga

boyu aralığında ışımaya yayan sürekli ışın kaynağı (döteryum lamba veya tungsten lamba) kullanılmaktadır. Bu yöntem, hem çizgi kaynaktan gelen ışımaya, hem de sürekli kaynaktan gelen ışımaya, ışın kesici sayesinde sıra ile atomlaştırıcıya gönderilir. Oyuk katot lambasından gelen ışın hem analit hem de zemin tarafından emilirken, döteryum lambasından gelen ışın yalnızca zemin tarafından emileceği için dedektörden ölçülen iki absorptans sinyalinin farkına bakılarak yapılan bir düzeltme yöntemidir [155, 156].

Zeeman Olayına Dayanan Düzeltme Yöntemi

Kuvvetli bir manyetik alana tabii tutulan atomların enerji seviyelerinde bir yarıllama meydana gelmektedir. π piki, düzlem polarize ışını dış manyetik alana paralel yönde absorplarken, σ piki yalnızca 90 derecede polarize ışını absorplamaktadır. Dik bileşen yalnızca engelleme absorptansını verirken, paralel bileşen engelleme ve analit atomunun absorptansını vermektedir. İkisinin farkı alınarak analit atomlarının gerçekleştirdiği gerçek absorptans değerine ulaşılmaktadır [155].

2.7. UV-Vis Spektrofotometre

Elektromanyetik spektrumda 180-780 nm aralığını kapsayan UV-Vis bölgesindeki ışınların absorpsiyon ölçümlerini kapsayan spektrofotometrenin çalışma prensibi, Lambert-Beer yasası kapsamında, numune çözeltisine belirli dalga boyu aralığında ışınlar göndererek numune bileşenlerinin hangi dalga boyu aralığını absorpladığını ölçme temeline dayanmaktadır. Lambert-Beer yasası, Bölüm 2.6'da detaylı olarak açıklanmıştır.

2.7.1. Absorptayan Türler

Atomik veya moleküler bir türün UV veya Görünür Bölge (Vis) ışınını absorptlaması, öncelikle ilgili türün bağ elektronlarının, foton ile etkileşim sonucu, temel hal enerji seviyesinden uyarılmış hal enerji seviyesine çıkması ve daha sonra ömrü çok kısa olan bu uyarılmış hal enerji seviyesinden çok hızlı bir şekilde tekrar temel düzeye dönmesi temelinde oluşmaktadır. Bağ elektronlarının uyarılması çeşitli elektronik geçiş türleri (π , σ , n elektronlarının geçişleri (Şekil 2.23), d ve f elektronlarının geçişi, yük aktarım elektronlarının geçişi) ile olabilmektedir [155].

2.7.1.1. π , σ , ve n Elektronlarını İçeren Işın Absorplayan Türler

Organik moleküller, organik iyonlar ve inorganik anyonlar π , σ ve n elektronlarını içerdikleri için ışın absorplayabilmektelerdir. Organik bileşiklerde tek bağı oluşturan elektronların uyarma enerjileri çok yüksektir ve yapmış oldukları ışın absorpsiyonu elektromanyetik spektrumda deneysel güçlükler yaratan, vakum-ultraviyole bölgesi olarak adlandırılan, 185 nm'den düşük dalga boyu aralığına gelmektedir. Bu nedenle organik bileşiklerin araştırmaları tek bağı oluşturan elektronlar yerine değerlik elektronları taşıyan kromofor grupla 185 nm'den daha yüksek dalga boylarında yapılmaktadır.

2.7.1.2. $\sigma - \sigma^*$ Geçişleri (<185 nm)

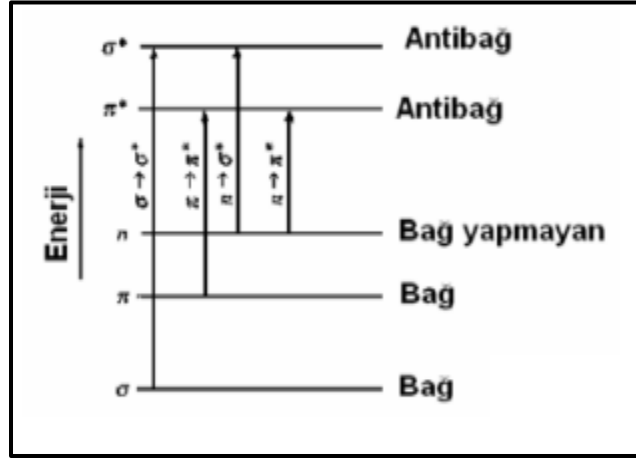
Organik moleküllerde, çift bağ elektronuna karşılık gelen sigma (σ) orbitali ve atomik p orbitallerinin paralel çakışması ile oluşan p orbitalleri mevcuttur. Moleküler enerji seviyelerindeki elektronik geçişlerde σ bağ orbitalindeki bir elektron uyarılma etkisi ile vakum bölgesinden gelen bir ışını absorplar. Bunun sonucunda uyarılan elektron antibağ σ orbitaline orbitaline geçiş yapar. Bu geçiş, mesafesi gereği moleküler enerji seviyelerindeki diğer elektronik geçişlerden daha fazla enerji gerektiren bir geçiştir.

2.7.1.3. n- σ^* Geçişleri (150-250 nm)

Bağ yapmamış elektron çiftleri bu geçişi gösterebilmektedirler. $\sigma - \sigma^*$ geçişine göre daha az enerji gerektirmektedir. n - σ^* geçişlerinin absorpsiyonları polar çözücüler varlığında daha düşük dalga boylarına kayma eğilimindedirler.

2.7.1.4. n - π^* ve $\pi - \pi^*$ Geçişleri (200-700 nm)

Absorpsiyon piklerinin deneysel olarak en elverişli olduğu 200-700 nm dalga boyu aralığına düşmesi nedeniyle en yaygın görülen geçiş türüdür. n - π^* geçişlerinde çözücü polarlığı arttığında n orbitalinin enerjisini düşürerek π^* orbitali ile arasındaki mesafeyi artırmakta ve bunun sonucunda enerji farkları artmakta, böylece elektromanyetik ışına daha düşük dalga boylarına kaymaktadır. Buna karşın çözücü polarlığı arttığında ise π^* orbitalinin enerjisi düşeceği için, enerji farkı azalmakta ve elektromanyetik ışına daha yüksek dalga boylarına kaymaktadır.



Şekil 2.23. Moleküler enerji seviyeleri ve elektronik geçişler

2.7.1.5. d ve f Elektronlarına Ait Absorpsiyonlar

Geçiş metalleri olarak bilinen Lantanit ve Aktinit metallere birçoğu iyon formunda elektromanyetik spektrumun ultraviyole veya görünür bölgesinde absorpsiyon özelliği göstermektedirler. Lantanit serisindeki metaller 4f elektronlarının, aktinit serisindeki metaller ise 5f elektronlarının ışınla etkileşimi sonucu enerji düzeylerindeki geçişlerle absorpsiyon özelliği göstermektedirler.

2.7.1.6. Yük Aktarma Absorpsiyonu

Bir kompleksin yük transferi emilimi sergilemesi için bir bileşenin elektron vericisi olarak işlev görürken diğerinin elektron alıcısı olarak işlev görmesi esastır. Bu senaryoda ışığın absorpsiyonu bir elektronun verici bileşenden alıcı bileşenin orbitaline geçişi ile gerçekleşmektedir. Bu türlerin molar absorptiviteyi çok yüksektir. En çok bilinen yük aktarım kompleksleri arasında Demir(III) tiosiyanat ve demir(II) o-fenantrilin kompleksleri yer almaktadır.

2.7.2 Cihaz Bileşenleri

UV-Vis Spektrofotometrenin bileşenleri, genellikle döteryum veya tungsten lambalardan oluşan bir ışın kaynağı, ışık geçebilen cam, plastik ya da kuvarsdan oluşan numune hücresi, fotoçoğaltıcı tüpler gibi UV-Vis bölge için spesifik olan bir dedektör, bir monokromatör ve sinyal kaydedici olarak bir bilgisayardan oluşmaktadır [155].

2.7.2.1 UV/VIS Işın Kaynakları

UV bölgede en sık sürekli ışın kaynakları olan hidrojen ve döteryum lambalar tercih ediliyorken ksenon ark lambası hem UV hem de görünür bölgede sıklıkla tercih edilmektedir. Bunların yanı sıra görünür ve yakın IR bölgede ışık yayan bir ışın kaynağı da tungsten lambasıdır. Argon lambalar ise vakum UV bölgesinde ışık yaymaktadır.

2.7.2.2 UV/VIS Dalga Boyu Seçicileri

Genellikle absorpsiyona duyarlı çalışan ve renkli camlı olan filtreler görünür bölge için kullanılmaktadır. Bu filtreler, spektrumun belli bir bölgesini absorplama işlevindedir. Bir diğer filtre çeşiti ise girişim filtreleridir. Bunların yanı sıra, filtrelere göre daha iyi bir dalga boyu ayırıcı olan, aynı zamanda spektrum taraması da yapabilen monokromatörler mevcuttur. Birbirine yakın dalga boyları monokromatörler ile daha iyi ayrılabilirlerdir.

2.7.2.3 UV/VIS Numune Kapları

Görünür bölgedeki çalışmalar için cam küvetler, UV bölgesi için ise kuartz küvetler kullanılmaktadır. Çalışılan dalga boyu aralığına göre küvetlerin materyallerinin değişmesinin nedeni çalışılan dalga boyundaki geçirgenliği sağlamaktır. Küvetler aynı zamanda hücre olarak da adlandırılabilirlerdir. Gerçekleştirilecek analizde tayin edilecek son hacme göre farklı hacimlerde hücreler mevcuttur (Şekil 2.24)



Şekil 2.24. Farklı numune hacimlerindeki numune kapları

Analizlerde uygun sonucu almak için numune kaplarının hayati önemi vardır. Çalışılan dalga boyuna uygun, iyi temizlenmiş hücrelerin kullanımı analiz doğruluğunu arttıracaktır. Ek olarak, kullanım sırasında hücrenin cilalı olan karşılıklı iki tarafının ışığın giriş ve çıkış yönünde olmasına dikkat edilmesi gerekmektedir.

2.7.2.4 UV/VIS Dedektörleri

Çevredeki basınç, sıcaklık, elektriksel yük, elektromanyetik ışın, atom veya moleküllerin sinyal değişimini algılayan bir sistem olmakla beraber, ışın enerjisini ölçülebilir bir sinyale çevirmektedir. Fotovoltaik dedektörler, fototüpler ve fotoçoğaltıcı tüpler UV/VIS bölgede kullanılan dedektör çeşitlerindedir. Fotovoltaik dedektörlerde çalışma prensibi ışık yarı iletken bir madde tarafından absorplandığında ışık absorpsiyonu ile iletkenlik bandına geçen elektronlar arasında oluşan elektrik akımına dayanmaktadır. Bunun yanı sıra foto tüpler alkali metal bir yüzey üzerine düşen fotonların yüzeyden elektron koparması temel prensibine dayanarak çalışmaktadır.

2.7.3 Tek Işın Yollu Spektrofotometreler

Üç temel düğme ayarı ile kullanılan tek ışın yollu spektrofotometrelerin ilk düğmesi ölçümün yapılacağı dalga boyunu ayarlamakta ve ikinci düğme ise sıfır geçirgenlik elde etmek için ışık yolunu kapatmaktadır. Son düğmeyle ise ışığın geçtiği aralığın eni değiştirilmektedir.

2.7.4 Çift Işın Yollu Spektrofotometreler

Çift ışık yollu spektrofotometrede, monokromatörden yayılan ışık eşit yoğunlukta iki demet halinde bölünerek bir ışın örneğe, diğeri ise yalnızca çözücüye gönderilmektedir. Bu iki farklı ışın daha sonra iki farklı dedektöre yansıtılmakta ve bu dedektörlerden üretilen sinyaller ölçülmektedir. Numunenin geçirgenliği sürekli olarak çözünün geçirgenliği ile karşılaştırıldığı için iki dedektörün tamamen aynı yoğunluktaki ışığa maruz bırakılması önemlidir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasallar ve çözeltiler

Kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup, hazırlama prosedürleri aşağıda verilmiştir.

3.1.1. Kristal viyole (CV) ve kadmiyum (Cd(II)) çözeltilerinin hazırlanması

CV ve Cd(II)' un standart çözeltileri Çizelge 3.1'de verilen miktarların deiyonize suda çözülmesi ile hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1. Kristal viyole stok standart çözeltisinin hazırlanışı

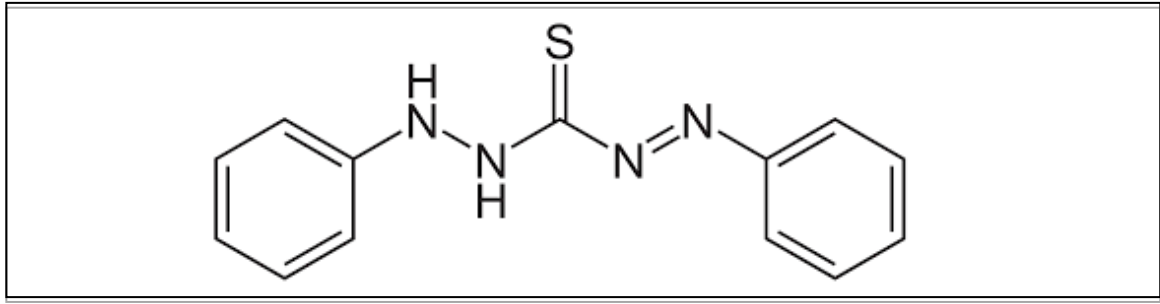
Analit	Eklene	Firma	Hazırlanış
CV	Kristal viyole	Merck, Almanya	0.1 g / 100 mL
Cd(II)	Cd(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	Merck, Almanya	0.686 g / 250 mL

3.1.2. Kompleksleştirici çözeltisi

Cd(II) iyonlarının apolar kompleksinin oluşturulması amacıyla ditizon (DTZ) kompleksleştirici olarak kullanılmıştır. %0.1 (a/h) DTZ' nin kimyasal özellikleri ve hazırlanış prosedürü Çizelge 3.2'de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Ditizonun bazı özellikleri ve çözeltisinin hazırlanışı

Molekül formülü	C ₁₃ H ₁₂ N ₄ S
Molekül kütlesi	256.33 g mol ⁻¹
Firma	Riedel-de Haen, Germany
Renk	Siyah toz
Form	Kristalin
Erime noktası	168°C
Suda çözünürlüğü	Suda çözünmez, etanol, kloroform, dimetil sülfoksit ve piridinde çözünür
Hazırlanış	0.05 g/50 mL etanol



Şekil 3.1. Ditizonun molekül yapısı

3.1.3. Ekstraksiyon Çözücüsü

Bu çalışmada, ekstraksiyon çözücüsü olarak manetik derin ötektik solvent (MDES) kullanılmıştır. Bu amaçla bir hidrojen bağ alıcısı (HBA), bir hidrojen bağ donörü (HBA), ve bir magnetik bileşen (MB) kullanılmıştır. Kullanılmış olan bu bileşenler Çizelge 3.3'te gösterilmektedir. Tablodaki kimyasalların tamamı Sigma Aldrich, Almanya'dan temin edilmiştir.

Çizelge 3.3. Bu tez çalışmasında kullanılmış olan MDES'in bileşenleri

Kimyasal	Formül	Kullanım Amacı	Yapısı
Kolin Klorür (ChCl)	$C_5H_{14}ClNO$	HBA	
Fenol (Ph)	C_6H_6O	HBD	
Demir(III) Oksit	Fe_2O_3	MB	

3.1.4. Tampon Çözeltiler

Geliştirilen yöntemde çözelti pH' larını ayarlamak amacı ile kullanılmış olan tampon çözeltilerin hazırlanma prosedürleri kullanılan kimyasallar Çizelge 3.4'te verilmektedir. Tablodaki kimyasallardan sodyum asetat Sigma Aldrich, Almanya'dan ve diğer tüm kimyasallar ise Merck Almanya' dan temin edilmiştir.

Çizelge 3.4. Tampon çözeltilerin hazırlanma prosedürleri

Tampon Çözelti	Hazırlama prosedürü
pH 3.0 – 5.0	0.1 M asetik asit + 0.1 M sodyum asetat
pH 6.0 – pH 8.0	0.1 M potasyum dihidrojen fosfat + 0.1 M sodyum hidroksit
pH 9.0	0.1 M disodyum fosfat + 0.1 M <u>HCl</u>
pH 10.0	0.1 M sodyum bikarbonat + 0.1 M sodyum karbonat

3.1.5. Diğer kimyasallar

Ekstraksiyon prosedüründe kullanılan etanol, gerçek numunelerin mikrodalga parçalamasında %65 (w/v) (d: 1,39 g mL⁻¹) nitrik asit (HNO₃) ve %30 (w/v) (d: 1,11 g mL⁻¹) hidrojen peroksit (H₂O₂) Merck, Almanya'dan temin edilmiştir. Mikrodalga parçalama işleminin ardından gerçek numunelerin pH'ını ayarlamak için %30 (w/v) (d: 0.90 g mL⁻¹) amonyak (NH₃) kullanılmıştır. Ayrıca önerilen yöntemin validasyonu için Cd(II) iyonu içeren sertifikalı referans madde (CRM) (TMDA-61.2, Environment Canada, Ontario Gölü Suyu) kullanılmıştır. CRM içeriği şu şekildedir: Al 57.9; Sb: 33.6; Ba: 62.7; As 34.4; Be: 36.3; Bi: 22.7; B: 79.0; Cd 58.0; Cr: 67.2; Co 63.0; Li: 33.4; Mo: 72.2; Se: 39.3; Tl: 36.8; Sn: 55.9; Ti: 37.2; U: 36.8; Cu 63.5; Fe 79.7; Mn 75.7; Ni 57.5; Pb 61.4; Zn 71.3 ve V 71.1; µg L⁻¹.

Tüm çözeltiler 18.2 MΩ cm dirence sahip deiyonize su ile hazırlanmıştır. Tüm cam eşyalar, kontaminasyonu önlemek için en az 24 saat boyunca %10 (h/h) hidroklorik asit (37 % (w/v) d: 1.19 g mL⁻¹ (Merck, Almanya)) çözeltisinin içinde bekletilmiş ardından deiyonize su ile durulanmıştır.

3.2. Kullanılan Cihazlar

CV tayini için Çizelge 3.5'te özellikleri verilmiş olan UV-Vis spektrofotometresi, Cd(II) tayini için ise Çizelge 3.6'da özellikleri verilmiş olan alevli atomik absorpsiyon spektrofotometresi kullanılmıştır.

Çizelge 3.5. UV/VIS spektrofotometresinin özellikleri

Marka	Shimadzu
Model	UV mini 1240-UV-VIS Spektrofotometre
Dalga Boyu Aralığı	190 nm – 1100 nm
Lamba	Tungsten-halojen ve döteryum
Dedektör	Si fotodiyot

Çizelge 3.6. Alevli atomik absorpsiyon spektrofotometresinin özellikleri

Marka	Perkin Elmer, USA
Model	AAAnalyst 400 Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi
Atomlaştırıcı	Alevli atomlaştırıcı
Zemin Engellemesi	Döteryum Lamba
Alev Tipi	Hava/ Asetilen
Akış Hızı	17.0/ 2.0 L min ⁻¹
Işın Kaynağı	Kadmiyum için oyuk katot lambası
Dalga Boyu	228.8 nm
Slit Geniğiği	0.7 nm
Lamba Akımı	4 mA

3.3. Diğer Cihazlar

Analit tayin için kullanılan cihazlara ek olarak geliştirilen yöntemi uygulamak için ihtiyaç duyulmuş diğer bazı araçlar Çizelge 3.7 de sunulmuştur.

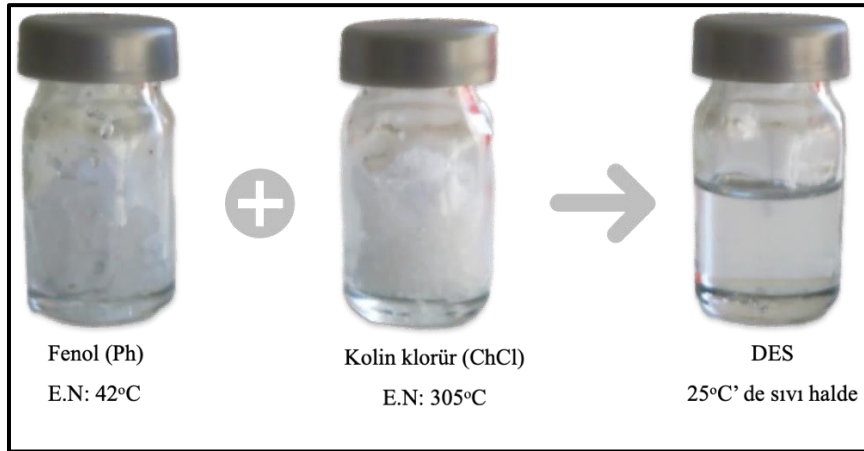
Çizelge 3. 7. Laboratuvar çalışması sırasında kullanılan diğer ekipmanlar

Ekipman	Firma	Kullanım amacı
Millipore Simplicity deiyonize su cihazı	Merck, Germany	Tüm çözeltilerin hazırlanması ve seyreltilmesi.
Dijital pH metre	Isolab Laborgeräte GmbH, Germany	Örnek çözeltilerin pH kontrolü
Ultrasonik banyo	Kudos, SK3310LHC, Şangay	Ekstraksiyonu hızlandırmak
UNE 500 etüv	Memmert, Germany	Gerçek numuneleri kurutma
MARS 6-One Touch Mikrodalga parçalama sistemi	CEM Corporation, USA	Gerçek numuneleri parçalama
Analytical balance	Mettler Toledo, Switzerland	Tüm katı kimyasalları tartmak

3.4. Magnetik Derin Ötektik (MDES) Çözücünün Hazırlanması

Genel olarak MDES spesifik oranlarda HBA, HBD ve MB' nin karıştırılması ile edilir. Bu çalışma esnasında, farklı mol oranlarında kolin klorür (ChCl) ve fenol (Ph) 25°C'de 25 mL'lik beherde manyetik balık yardımı ile karıştırılmış ve her ikisi de katı olan başlangıç maddelerinden sıvı derin ötektik çözücü elde edilene kadar karıştırmaya devam edilmiştir. ChCl ve Ph bir araya geldiğinde, Ph molekülündeki hidroksil grubu (OH) ve ChCl molekülündeki klor atomları arasında hidrojen bağları oluşturur. Bunun

sonucunda karışımın erime noktası, bileşenlerin ayrı ayrı erime noktalarından daha düşük olacak şekilde berrak, sıvı bir DES oluşmaktadır. Bileşenlerin ve DES fiziksel görünümü Şekil 3.2’ de verilmiştir.



Şekil 3.2. ChCl ve Ph’ den oluşmuş DES’ in görünümü

Çizelge 3.8 de farklı mol oranlarına sahip ChCl ve Ph ile hazırlanmış DES’lerin miktarları özetlenmiştir.

Çizelge 3. 8. Farklı mol oranlarındaki DES’ lerin hazırlanma prosedürü

ChCl:Ph mol oranı	ChCl:Ph miktarı
1:1	13.96 g:9.41 g
1:2	13.96 g:18.82 g
1:3	13.96 g:28.20 g
1:4	13.96 g:37.60 g
1:5	13.96 g:47.05g

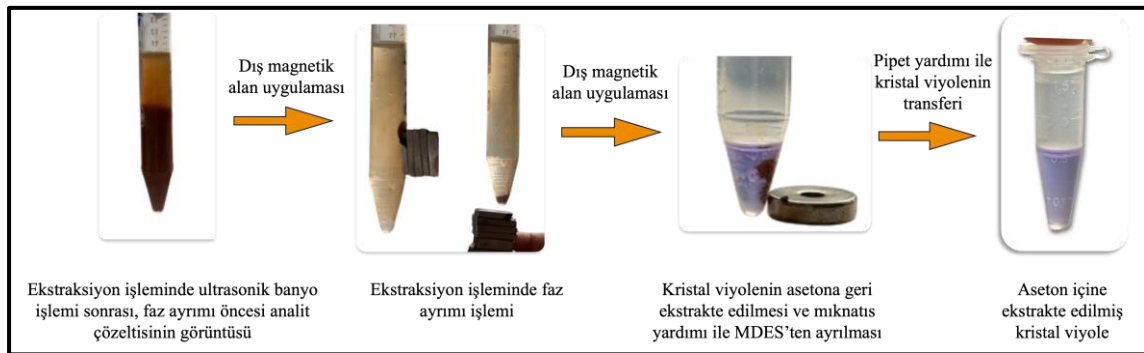
Magnetik özelliğe sahip MDES elde etmek için, CV prosedürü için 68 mg, Cd prosedürü için 60 mg Fe₂O₃ nanopartikülleri (partikül boyutu <50 nm) konik tabanlı bir santrifüj tüpüne alındıktan sonra üzerine 1.0 mL DES eklenmiş ve homojen karışım sağlanması için yaklaşık 15 saniye vortekslenmiş, ardından nanoakışkan elde etmek için oda sıcaklığında 5 dakika ultrasonik banyoda tutulmuştur. Bu şekilde elde edilen kahverengi jel her gün taze olarak hazırlanmış ve homojenliğinden emin olmak için her kullanım öncesi vorteks yardımıyla karıştırılmıştır.

3.5. Manyetik derin ötektik çözücü bazlı dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu (MDES-DLLME) yönteminin prosedürü

CV ve Cd(II) için (MDES-DLLME) yönteminin uygulanmasının ardından CV tayini UV-Vis Spektrofotometresi ile, Cd(II) tayini ise FAAS ile gerçekleştirilmiştir. MDES-DLLME yönteminin işlem basamakları aşağıda detayları ile verilmiştir.

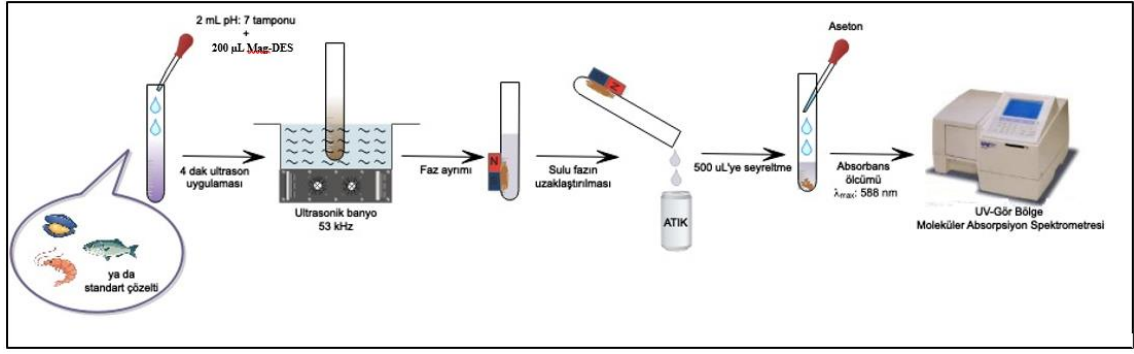
3.5.1 CV için MDES-DLLME yönteminin uygulanışı

CV mikroekstraksiyonu için, 15 mL'lik bir santrifüj tüpüne derişimi 200 ppb olacak şekilde, 200 μL 10 mg L^{-1} CV standart çözeltisi eklenmiştir. Ortamın pH'ını 7' ye ayarlamak için 2 mL $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ tampon çözeltisi, ardından 100 μL MDES ilave edilmiş ve hacim deiyonize su ile 10 mL' ye tamamlanmıştır. Daha sonra tüp, MDES ve analit arasındaki etkileşimi ve dolayısıyla ekstraksiyon verimini artırmak için 4 dakika boyunca oda sıcaklığındaki ultrasonik banyoda tutulmuştur. Analitlerin MDES fazına transferinin ardından ultrasonik banyodan çıkarılan tüpe dışarıdan uygulanan magnetik alanla MDES'ler tüpün dibinde toplanmıştır. Üst taraftaki sıvı fazın dekante edilmesinin ardından, analitlerin serbest hale geçmesi amacıyla 500 μL aseton ilave edilmiştir. Aseton fazına geçişi kolaylaştırmak ve hızlandırmak için mıknatıs hızlıca tüpün çevresinde birkaç kez dolandırılmıştır. Ardından aseton ve MDES fazı bir damlalıklı pipet sayesinde ayrılarak $\lambda_{\text{max}}:588 \text{ nm}$ 'de UV-Vis Spektrofotometre ile tayin edilmiştir. Dış magnetik alan uygulanarak gerçekleştirilen işlemin tüm basamakları Şekil 3.3' de ve MDES-DLLME yönteminin şematik gösterimi Şekil 3.4' de sunulmuştur.



Şekil 3.3. CV mikroekstraksiyonunda faz ayırma basamakları

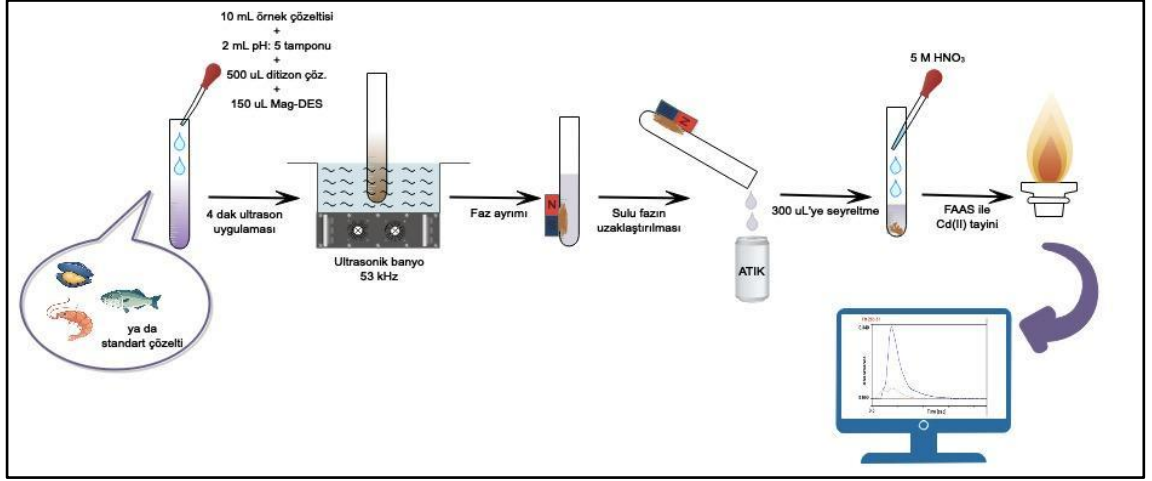
CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminin en yüksek ekstraksiyon verimi ile uygulanmasını sağlamak amacıyla pH, DES bileşimi, MDES miktarı, ekstraksiyon süresi, sıcaklık, tuz etkisi gibi parametreler optimize edilmiştir.



Şekil 3.4. CV Tayini için MDES-DLLME yönteminin şematik gösterimi

3.5.2 Cd(II) için MDES-DLLME yönteminin uygulanışı

Cd(II) iyonlarının mikroekstraksiyonu için, 15 mL'lik santrifüj tüpünün içerisine $100 \mu\text{g L}^{-1}$ olacak şekilde, $100 \mu\text{L}$, 10 mg L^{-1} Cd(II) standart çözeltisi eklenmiştir. Ortamın pH'ını 5' e ayarlamak için 2 mL $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ tampon çözeltisi ve $500 \mu\text{L}$ %0.1 (a/h) DTZ ilave edilmiş ve Cd(II)-DTZ kompleksinin oluşumunu sağlamak amacıyla tüp 10 s el ile çalkalanmıştır. Ardından $150 \mu\text{L}$ MDES ilave edilerek örnek hacmi deiyonize su 10 mL 'ye tamamlanmıştır. Daha sonra tüp, MDES ve analit arasındaki etkileşimi ve dolayısıyla ekstraksiyon verimini artırmak için 4 dakika boyunca 40°C sıcaklıkta ultrasonik banyoda tutulmuştur. Cd(II)-DTZ kompleksinin MDES fazına transferinin ardından ultrasonik banyodan çıkarılan tüpe dışarıdan uygulanan magnetik alanla MDES'ler tüpün dibinde toplanmıştır. Üst taraftaki sıvı fazın dekante edilmesinin ardından, analitlerin serbest hale geçmesi amacıyla $300 \mu\text{L}$, 5 M HNO_3 ilave edilmiştir. Nitrik asit fazına geçişi kolaylaştırmak ve hızlandırmak için mıknatıs hızlıca tüpün çevresinde birkaç kez dolandırılmıştır. Ardından Cd(II)-DTZ içeren nitrik asit fazı ve MDES fazı bir damlalıklı pipet sayesinde ayrılarak mikro-enjeksiyonlu FAAS ile absorbans sinyallerinin tepe yüksekliği okunarak tayin edilmiştir. Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yönteminin şematik gösterimi Şekil 3.5' de sunulmuştur.



Şekil 3.5. Cd(II) Tayini için MDES-DLLME yönteminin şematik gösterimi

Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde en yüksek ekstraksiyon verimini elde edebilmek için pH, DES bileşimi, MDES miktarı, ekstraksiyon süresi, sıcaklık, tuz etkisi gibi parametreler optimize edilmiştir.

Geliştirilen MDES-DLLME yöntemi CRM ya da gerçek örneklerde CV ve Cd(II) tayini için uygulanırken 10 mL örnek çözeltisi alınarak bahsedilen prosedür aşamaları takip edilmiştir.

3.5.3. Gerçek Örneklerin Hazırlanması

Balık ürünlerindeki toplam CV ve Cd(II) içeriğini belirlemek için Ankara'da bulunan bir marketten dondurulmuş midye, ve yine Ankara'da bulunan çeşitli balık restoranlarından ise karides, levrek, çipura, alabalık ve alabalığın bulunduğu havuz suyu temin edilmiş olup deniz ürünleri etüvde 10 saat 110°C'de kurutulmuştur. Kurutulmuş olan örnekler bir öğütücüde homojen hale getirildikten sonra 2'şer gram alabalık, levrek, çipura örnekleri CV analizi için ayrıldıktan sonra alabalık, levrek, çipura, karides ve midye örneklerine Cd(II) analizinde kullanmak üzere mikrodalga parçalaması yapılmıştır. Bu amaçla 0.5' er g tartılan örnekler mikrodalga kaplarına alınmış ve üzerlerine 4 mL derişik HNO₃ (%65, a/h) ve 1 mL H₂O₂ (%30, a/h) eklenerek 15 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından mikrodalga kapları kapatılarak Çizelge 3.9'da yöntemi belirtilen mikrodalga fırın prosedürüne tabii tutulmuşlardır. Verilen mikrodalga öğütme prosedürü tanık çözeltiye de uygulanmıştır. Mikrodalga prosedürünün ardından elde edilen çözeltiler 10 mL hacme tamamlanarak pH' ları NH₃ çözeltisi ile yaklaşık 5 civarına ayarlanmıştır. Ardından son hacim

deiyonize su ile 20 mL yapılarak, elde edilen numune çözeltisinin 10 mL'lik kısmına geliştirilmiş olan MDES-DLLME prosedürü uygulanmıştır.

Çizelge 3. 9. Mikrodalga parçalama ısıtma programı

Isıtma	1600 W ve 800 psi- 15 dakika, 210°C' ye kadar ısıtma
Bekletme	210°C' de 15 dakika bekletme
Soğutma	15 dakika soğutma

CV analizi için ayrılmış 2'şer gramlık balık (alabalık, levrek, çipura) örneklerine ve 10 mL alabalık havuz suyu örneği üzerine 5 mL etil alkol eklenmiş ve 30 dakika ultrasonik banyoda tutulduktan sonra 4 dakika santrifüj edilerek ayrılan süpernatant kısma CV için geliştirilen MDES-DLLME prosedürü uygulanmıştır.

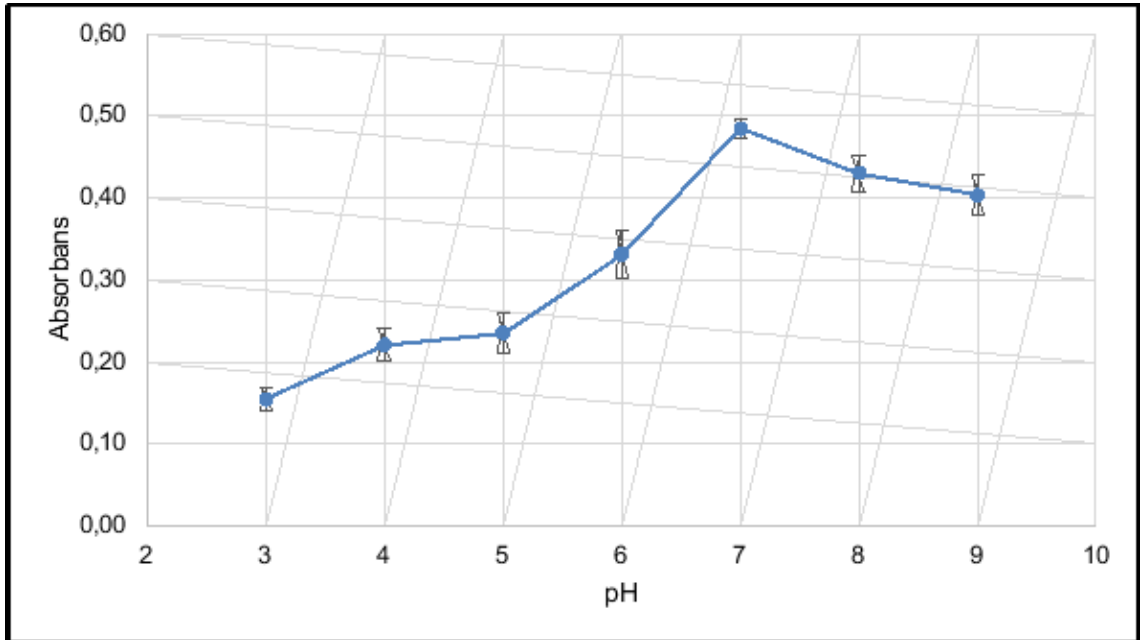
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. CV için Geliştirilen MDES-DLLME Yöntemine Ait Sonuçlar ve Yorumlar

Bu çalışmada, CV miktar tayini için maksimum ekstraksiyon verimi elde etmek amacıyla, MDES-DLLME yöntemini etkileyen çeşitli parametreler (pH, DES bileşenlerinin molar oranları, MDES içindeki Fe_2O_3 miktarı, MDES hacmi, ekstraksiyon süresi, sıcaklık vb.) optimize edilmiştir. Tüm optimizasyon çalışmaları, parametrelerden yalnızca birinin değiştirilip diğerlerinin sabit tutulmasıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmada sunulan tüm veriler, en az üç tekrarlı analiz ortalaması olarak elde edilmiştir.

4.1.1. pH Etkisi

MDES-DLLME yönteminde numune ortamının pH'nın belirlenmesi hayati parametrelerden biridir çünkü ortamın pH'ı ötektik bir reaksiyon ile sentezlenen DES'in çözünürlüğünü, iyonlaşma etkilerini ve kararlılığını değiştirmektedir [160-162]. DES'ler Bronsted-Lowry asitleri ve bazlarından oluşmakta ve ortamın pH'ı hidrojen bağı vericisi ve alıcısının asitliğini ve bazlığını etkilemektedir. Buna ek olarak magnetik nanopartiküllerin aglomerasyonu ve stabilizasyonu da ortam pH'ından etkilenmektedir [161].



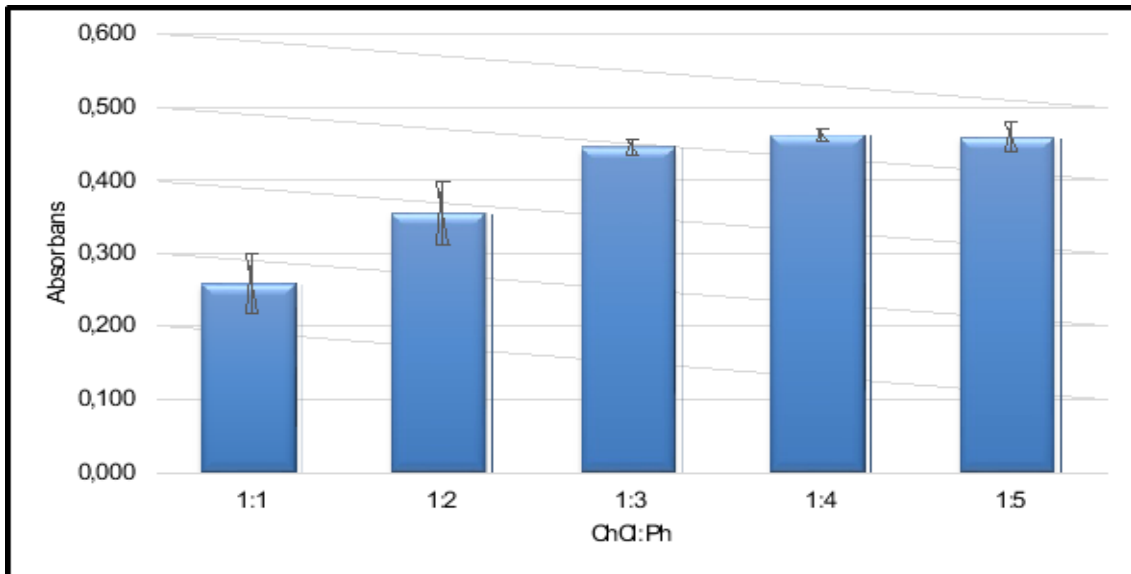
Şekil 4.1. CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde pH etkisi

Optimum Deney Koşulları: 10 mL numune, 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ CV, 100 μL MDES (1:3 ChCl:Ph ve 60 mg Fe_2O_3), 4 dk ultrason, 500 μL aseton (n = 3).

İyonik halde numune matrisinde bulunan CV'nin MDES ile etkileşimi de pH'a bağlı bir değerdir. Bu bilgiler ışığında, MDES-DLLME yönteminde ortam pH'ı 3 ile 9 aralığında değiştirilerek en yüksek ekstraksiyon veriminin elde edileceği pH tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1'de verilmektedir. Grafikten de görüldüğü üzere, en yüksek absorbans değeri pH:7' de gözlenmiştir. pH 7'nin altındaki ve üstündeki değerlerde oluşan CV formlarının MDES ile etkileşiminin azalması sebebiyle en yüksek ekstraksiyon verimi pH:7 de gözlenmiş olup daha sonraki çalışmalar için bu değer optimum pH değeri olarak seçilmiştir.

4.1.2. DES Kompozisyonunun Etkisi

Bu çalışmada ekstraksiyon verimini etkileyen en önemli faktörlerden biri MDES içindeki DES'i oluşturan bileşenlerdir. DES ile hedef analitler arasında hidrofobik, elektrostatik, hidrojen bağları, dipol-polar, van der Waals etkileşimi, π -katyon, π - π ve iyon-dipol gibi çeşitli etkileşimler meydana gelebilir [137] ve bu etkileşimler yöntemin seçiciliğini ve ekstraksiyonun performansını etkilemektedir. Bu nedenle DES elde edilmek üzere seçilen hidrojen bağı alıcısı olarak ChCl ve hidrojen bağı donörü olarak Ph bileşenlerinin birleşme oranları son derece önemlidir.



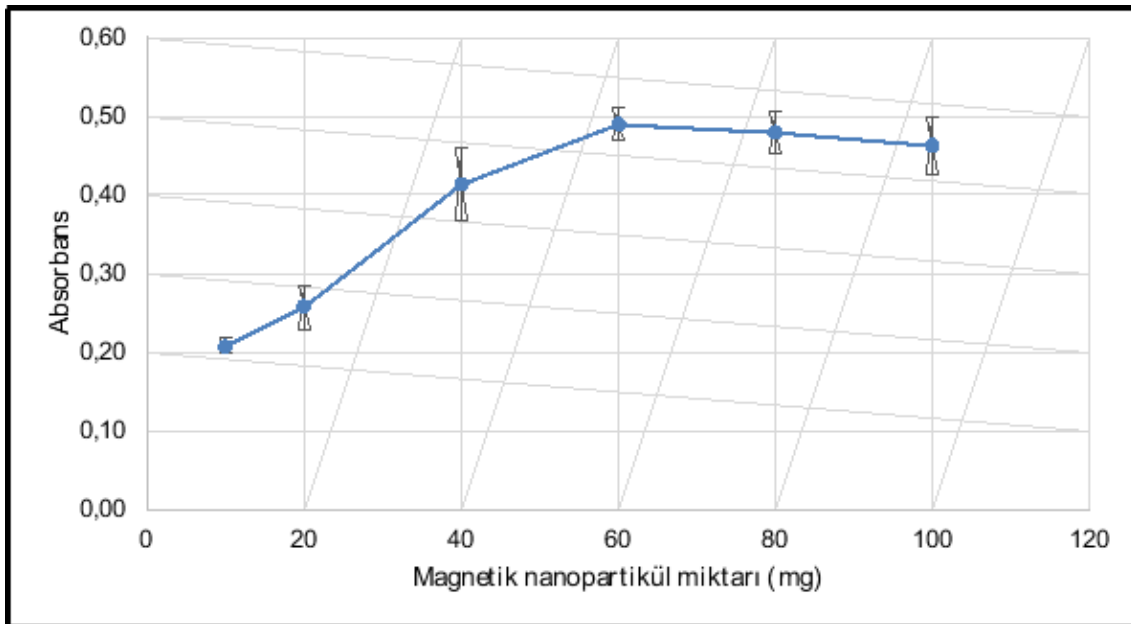
Şekil 4.2. CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde DES kompozisyonunun ekstraksiyon verimine etkisi

Optimum Deneş Koşulları: 10 mL numune, 200 µg L⁻¹ CV, pH: 7, 4 dk ultrason, 500 µL aseton (n = 3).

En yüksek ekstraksiyon veriminin elde edileceği DES kompozisyonunu bulmak için sabit ChCl molüne karşılık Ph miktarı değiştirilerek 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 ve 1:5 mol oranlarında ChCl:Ph kullanılarak hazırlanan DES'lerle MDES-DLLME yöntemi gerçekleştirilmiş ve elde edilen absorbans değerleri kullanılarak çizilen grafik Şekil 4.2 de verilmiştir. Grafikten de görüldüğü üzere, 1:3 mol oranına kadar absorbans, yani ekstraksiyon verimi artmakta, daha sonra yaklaşık aynı kalmaktadır. En az kimyasal kullanımı ile daha yeşil bir analitik yöntem geliştirmek amacı ile ChCl:Ph optimum mol oranı 1:3 olarak belirlenmiştir.

4.1.3. Magnetik Nanopartikül Miktarının Etkisi

Mikroekstraksiyon işleminde esnasında faz ayrımını sağlamak için ekstraksiyon çözücüsü olan DES'e eklenmekte olan magnetik nanopartikül Fe₂O₃'ün ekstraksiyon verimine etkisini araştırmak için, 1:3 ChCl:Ph molar oranından sentezlenen 1 mL DES'e 10-100 mg aralığında 6 farklı miktarda Fe₂O₃ eklenmiştir.



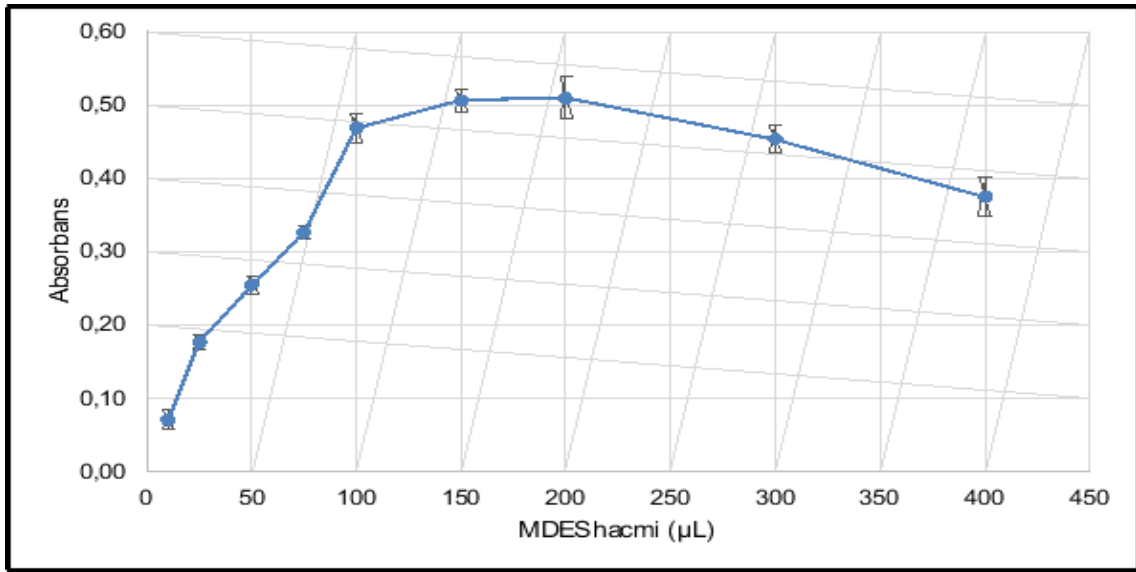
Şekil 4.3. CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde Fe₂O₃ magnetik nanopartiküllerinin miktarının etkisi

Optimum Deneş Koşulları: 10 mL numune, 200 µg L⁻¹ CV, pH: 7, 4 dk ultrason, 500 µL aseton (n = 3).

Elde edilen MDES'ler CV mikroekstraksiyonunda kullanılarak elde edilen sonuçlar Şekil 4.3'te verilmiştir. En yüksek ekstraksiyon verimi 1:3 ChCl:Ph molar oranından sentezlenen 1 mL DES ve 60 mg Fe₂O₃ karışımından oluşan MDES kullanılması ile elde edilmiştir.

4.1.4. Ekstraksiyon Çözücüsü Hacmi

1:3 ChCl:Ph molar oranından sentezlenen 1 mL DES ile, 60 mg Fe₂O₃ magnetik nanopartikül karışımı ile elde edilen MDES ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılmıştır. MDES hacminin geliştirilen mikroekstraksiyon yöntemine etkisini analiz edebilmek için MDES hacmi 10 ile 400 µL arasında değiştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.4'te verilmiştir. Grafikten de görüldüğü üzere, en yüksek absorbands değeri 200 µL MDES kullanıldığında elde edilmiştir. Bu nedenle optimum ekstraksiyon çözücüsü hacmi 200 µL olarak belirlenmiştir.



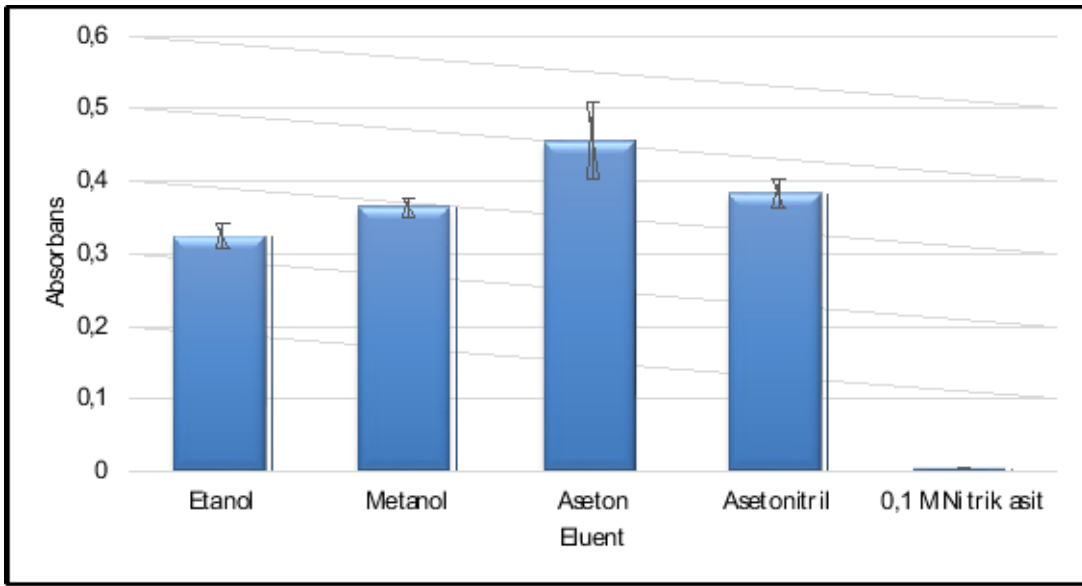
Şekil 4.4. CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde ekstraksiyon çözücüsü hacminin etkisi

Optimum Deneş Koşulları: 10 mL numune, 200 µg L⁻¹ CV, pH: 7, 1:3 ChCl:Ph ve 60 mg Fe₂O₃, 4 dk ultrason, 500 µL aseton (n = 3).

4.1.5. Geri-Ekstraksiyon için kullanılacak Eluentin Belirlenmesi

Ekstraksiyon verimliliğini etkileyen en önemli parametrelerden biri, analitin elüsyonu için kullanılan çözücünün kapasitesidir. CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde MDES fazına ekstrakte edilen analitlerin MDES fazından yeniden ekstrakte

edilebilmesi için etanol, metanol, aseton, asetonitril ve 0,1 M HNO₃ geri-ekstraksiyon eluenti olarak denenmiştir ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.5'te sunulmuştur. Grafikten de görüleceği üzere en yüksek geri-ekstraksiyon verimi asetonun eluent olarak seçildiği durumda elde edilmiştir. Asidik ortamda kristal viyolenin aktif formu ve absorpsiyon karakteristiği değiştiği için 0,1 M HNO₃ in eluent olarak kullanılması durumunda herhangi bir absorpsiyon gözlenememiştir. Bu sebeplerle eluent olarak aseton belirlenmiştir.



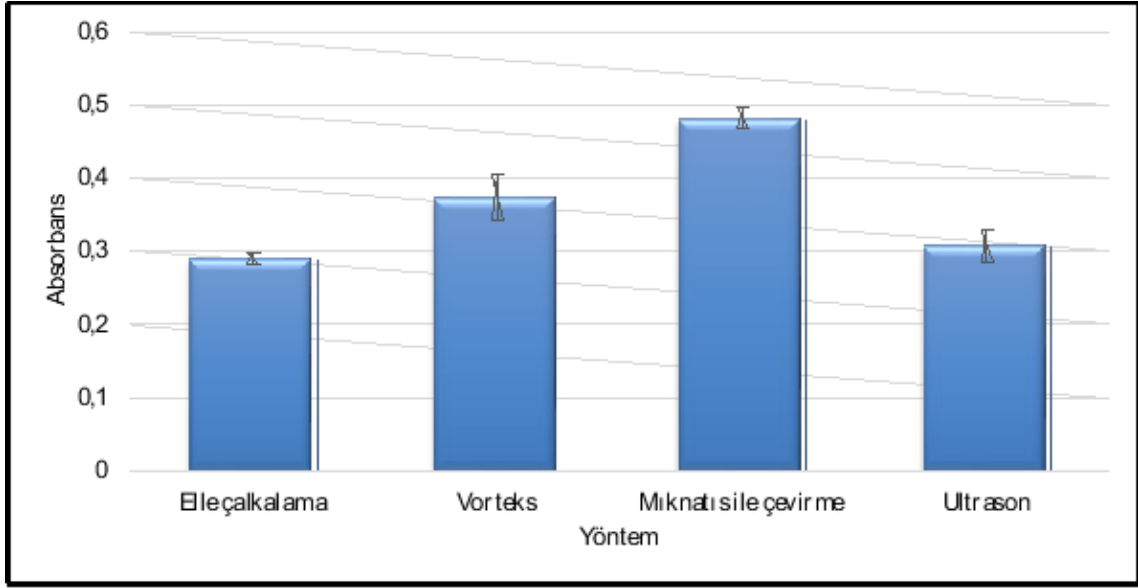
Şekil 4.5. Geri-ekstraksiyon eluentinin CV mikroekstraksiyonuna etkisi.

Optimum Deneş Koşulları: 10 mL numune, 200 µg L⁻¹ CV, pH: 7, 200 µL MDES (1:3 ChCl:Ph ve 60 mg Fe₂O₃), 4 dk ultrason (n = 3).

4.1.6. Geri-Ekstraksiyon Yönteminin Belirlenmesi

CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde MDES fazına ekstrakte edilen analitlerin sulu fazdan ayrıldıktan sonra 500 µL aseton ile organik faza geri-ekstraksiyonunu kolaylaştıracak ve hızlandıracak, bu sayede de ekstraksiyon verimini artıracak elusyon metodunu seçmek önemlidir. Bu amaçla sulu fazdan ayrılmış olan ve CV içeren MDES üzerine 500 µL aseton eklendikten sonra CV'nin asetona geçişini hızlandıracak elle çalkalama, vorteks uygulama, mıknatıs ile çevirme ve sonikasyon yöntemleri ayrı ayrı denenmiştir. İlk işlemde tüp manuel olarak 10 saniye elde çalkalanmıştır. İkinci işlemde tüp 10 saniye vortekste tutulmuş ve 3. işlemde manuel olarak santrifüj tüpünün etrafında mıknatıs çevirerek orta hızda bir karıştırma

sağlanmıştır. Dördüncü işlemde ise tüp 5 dakika oda sıcaklığındaki ultrasonik banyoda tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.6’da görüldüğü üzere, en yüksek ekstraksiyon verimi mıknatıs ile çevirme yönteminde sağlanmıştır. Bu nedenle prosedürde geri-ekstraksiyon basamağında, MDES fazında bulunan analitlerin asetonla elusyonu için, deney tüpünün etrafında orta hızda mıknatısın döndürülmesinin ekstraksiyon verimini artırdığına karar verilmiştir.

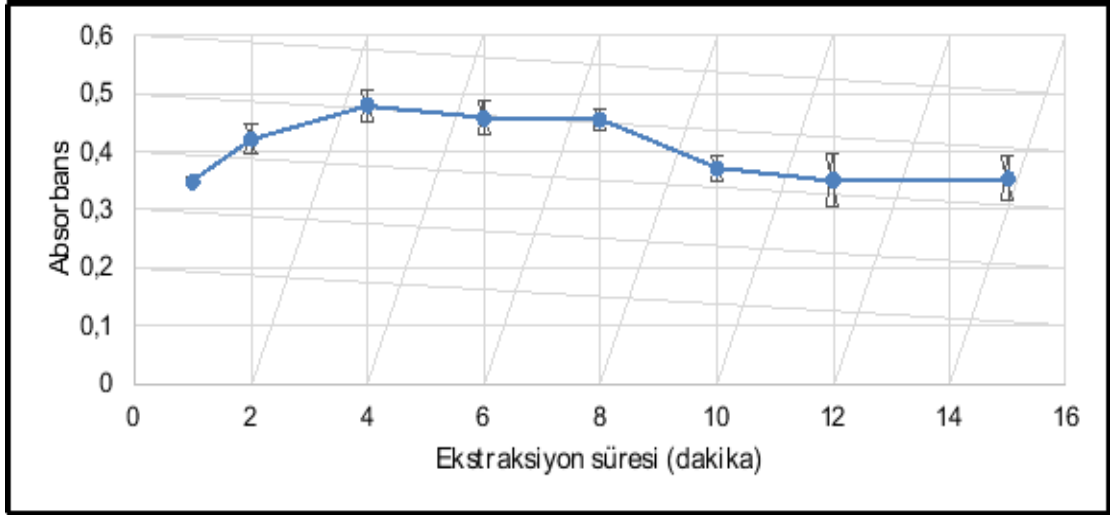


Şekil 4.6. CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde geri-ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi

Optimum Deney Koşulları: 10 mL numune, 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ CV, pH: 7, 200 μL MDES (1:3 ChCl:Ph ve 60 mg Fe_2O_3), 500 μL aseton. (n = 3).

4.1.7. Ekstraksiyon Süresinin Etkisi

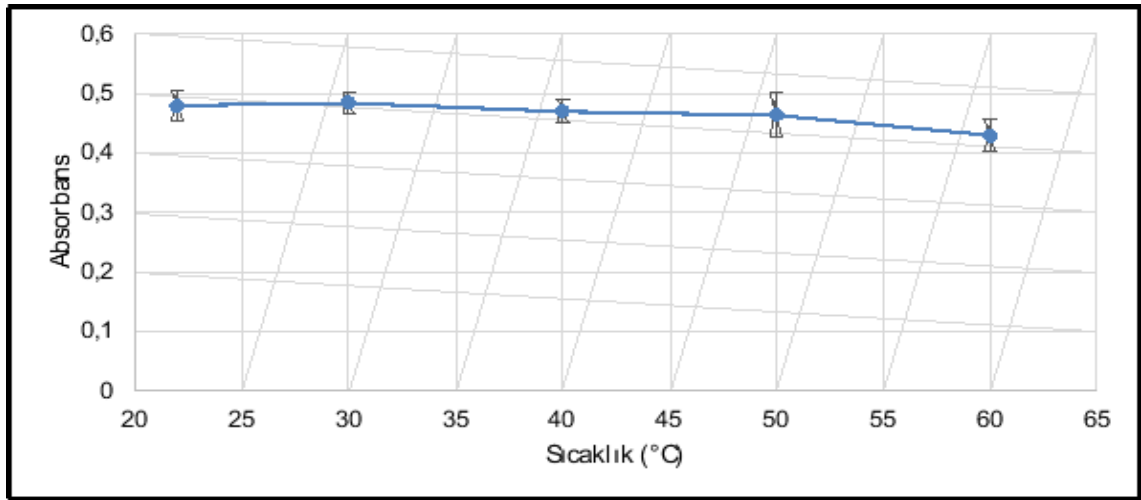
Geliştirilen MDES-DLLME prosedüründe faz ayrımı basamağından önce, tayin edilen analitlerin organik faza ekstraksiyonunu hızlandırmak için uygulanan ultrasonun süresini optimize etmek, dolayısıyla ekstraksiyon süresini belirlemek amacıyla numune çözeltileri 1-15 dakika aralığında ultrasonik banyoda sonikasyona tabii tutulmuştur. Şekil 4.7’deki sonuçlarda da görüleceği gibi, 4 dakikaya kadar ekstraksiyon çözücüsünün yetersiz dağılımından kaynaklanan bir absorbans düşüklüğü söz konusu iken 4-8 dk aralığında maksimum absorbans değeri elde edilmiştir. 8 dakikadan sonra ise ekstraksiyon veriminde bir azalma gözlenmiştir. Bu azalmanın uzun etkileşim süresine bağlı olarak gerçekleşen MDES agregasyonundan kaynaklandığı düşünülebilir. Tüm bu tespitler sonucunda optimum ekstraksiyon süresi 4 dakika olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7. CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde ekstraksiyon süresinin etkisi
Optimum Deney Koşulları: 10 mL numune, 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ CV, pH: 7, 200 μL MDES (1:3 ChCl:Ph ve 60 mg Fe_2O_3), 500 μL aseton. (n = 3).

4.1.8. Sıcaklık Etkisi

Geliştirilen MDES-DLLME yönteminde ekstraksiyon ortamının sıcaklığının CV ekstraksiyonu verimine etkisini araştırmak için ultrasonik banyo sıcaklığı 22-60°C aralığında değiştirilmiş ve numune çözeltileri 4 dk sonikasyona tabii tutulmuştur. Şekil 4.8’de verilen sonuçlardan görüleceği gibi ortam sıcaklığının ekstraksiyon verimi üzerine bir etkisi bulunmamaktadır. Bu nedenle ekstraksiyon işlemleri sırasında herhangi bir ısıtma işlemi uygulanmamıştır.

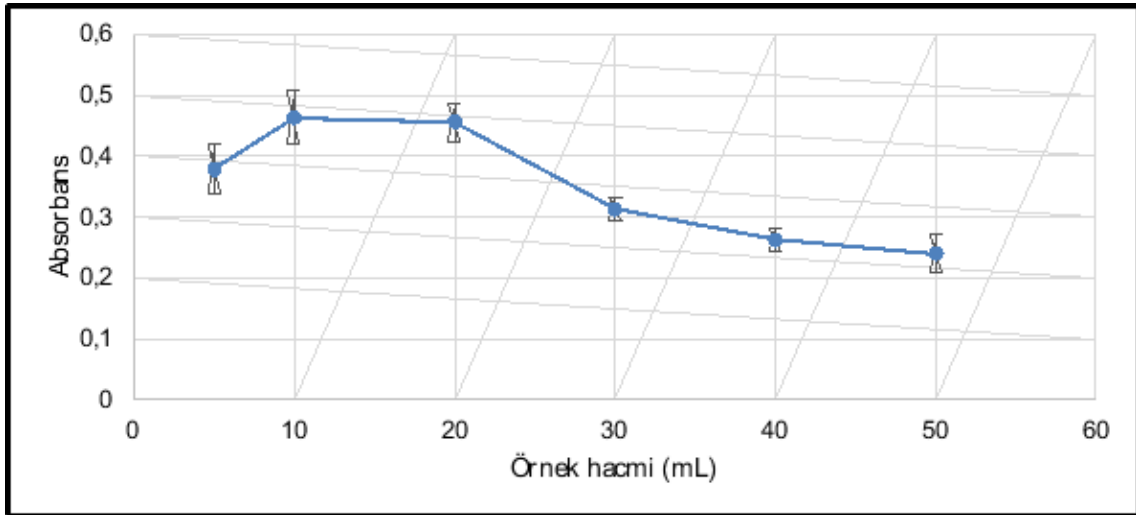


Şekil 4.8. CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde sıcaklığın etkisi

Optimum Deneş Koşulları: 10 mL numune, 200 µg L⁻¹ CV, pH: 7, 200 µL MDES (1:3 ChCl:Ph ve 60 mg Fe₂O₃), 500 µL aseton. (n = 3).

4.1.9. Numune Hacminin Etkisi

Geliştirilen mikroekstraksiyon yönteminde daha düşük tayin limiti ve daha yüksek zenginleştirme faktörü elde etmek için, örnek hacminin (5-50 mL) ekstraksiyon verimi üzerindeki etkisi incelenmiştir (Şekil 4.9). Örnek çözeltisinin hacmi 10 ve 20 mL arasında olduğunda ekstraksiyon veriminde belirgin bir değişiklik gözlenmezken, hacmin 20 mL'yi aşması durumunda ekstraksiyon veriminde azalma eğilimi gözlenmiştir. Bu durum örnek çözeltisinin hacminin artmasıyla ekstraksiyon solvetinin konsantrasyonunun azalmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle geliştirilen MDES-DLLME yönteminde numune çözeltisinin hacmi 10 mL olarak belirlenmiştir.



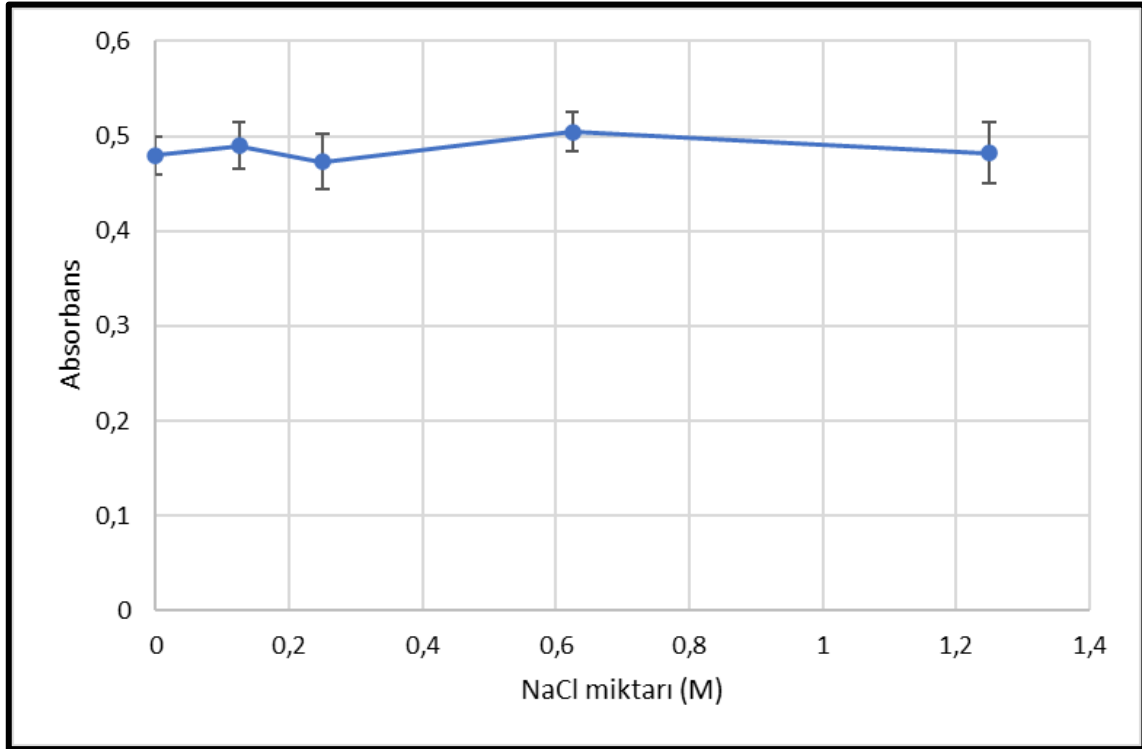
Şekil 4.9. CV için geliştirilen MDES-DLLME yöntemine numune hacminin etkisi

Optimum Deneş Koşulları: 200 µg L⁻¹ CV, pH: 7, 200 µL MDES (1:3 ChCl:Ph ve 60 mg Fe₂O₃), 500 µL aseton. (n = 3).

4.1.10. İyonik Şiddetin Etkisi

Örnek çözeltisinin iyonik şiddeti, ekstraksiyon verimini etkileyen önemli bir analitik parametredir. Genellikle, iyonik şiddet ekstraksiyon verimi üzerinde iki zıt etkiye sahiptir: elektrostatik etkileşimler ve tuz etkisi (salting out) [163]. Tuz etkisi, ekstraksiyon verimini artırırken, tuz iyonları ile hedef analit arasındaki elektrostatik etkileşimler ekstraksiyon verimini azaltır. Bu çalışmada, iyonik şiddetin etkisi, CV örnek çözeltilerine 0 M, 0,125 M, 0,25 M, 0,625 M, 1,25 M olacak şekilde NaCl tuzu eklenerek incelenmiştir. Şekil 4.10' daki sonuçlardan, hedef analitlerin ekstraksiyon

veriminin eklenen NaCl konsantrasyonundan bağımsız olduğu ve çalışılan iyonik güç değerlerinde ekstraksiyon veriminin etkilenmediği anlaşılmıştır.



Şekil 4.10. CV için geliştirilen MDES-DLLME yöntemine iyonik şiddetin etkisi
Optimum Deneş Koşulları: 10 mL numune, 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ CV, pH: 7, 200 μL MDES (1:3 ChCl:Ph ve 60 mg Fe_2O_3), 500 μL aseton. (n = 3).

4.1.11. Yabancı Türlerin Etkisi

Geliştirilmiş olan MDES-DLLME yönteminde CV için seçiciliğinin, ortamda bulunan farklı iyonlar ve boya türleri varlığında nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Bu amaçla, 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ CV içeren standart çözeltilere artan derişimlerde yabancı türler eklenmiştir ve geliştirilen prosedür uygulanmıştır. Elde edilen absorbans değerlerinde $\pm\%5$ değişim gerçekleştiğinde yabancı türün girişim yaptığı kabul edilmiştir [164].

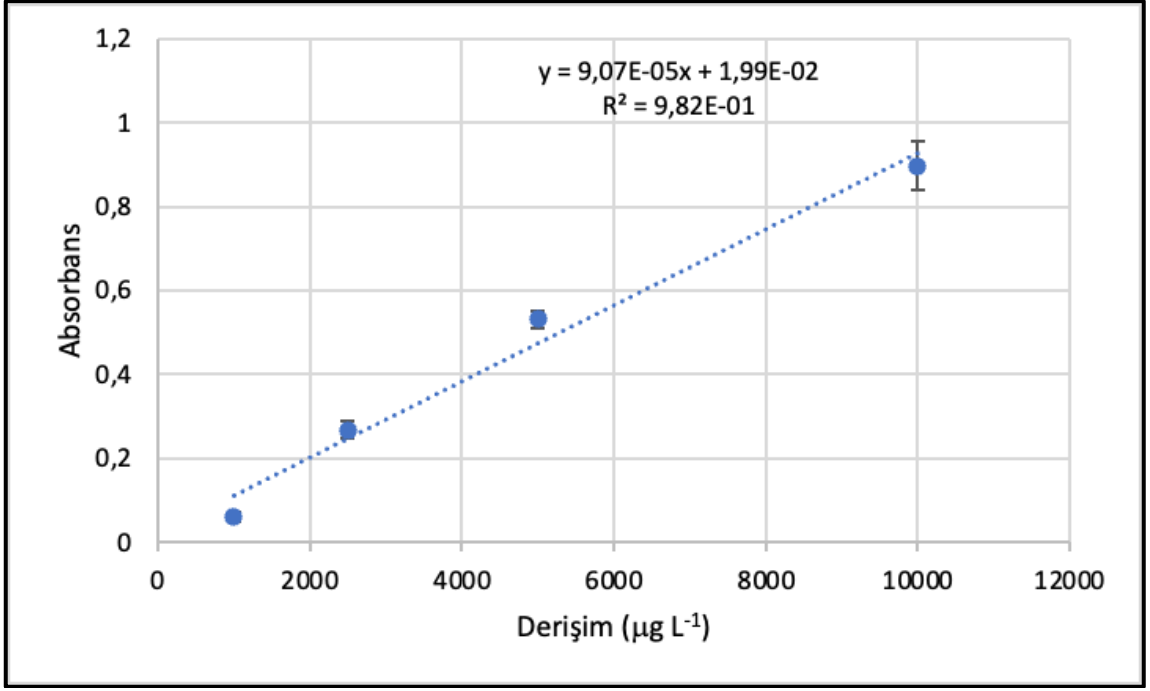
Çizelge 4. 1. CV için Geliştirilen MDES-DLLME Yöntemine engelleyici türlerin etkisi.
[CV]: 200 mg L^{-1} , n = 3.

Engelleyici tür	[CV]:[Engelleyici tür]
Na ⁺ , Mg ²⁺ , Cl ⁻ ,	>1:5000
Zn ²⁺ , Ni ²⁺ , Ca ²⁺ , Co ²⁺ , SO ₄ ²⁻	>1:4000
Pb ²⁺ , F ⁻	1:4000
NO ₃ ⁻	1:2000
Indigo Karmin	1:2000
Safranin	1:500
Malahit Yeşili	1:100

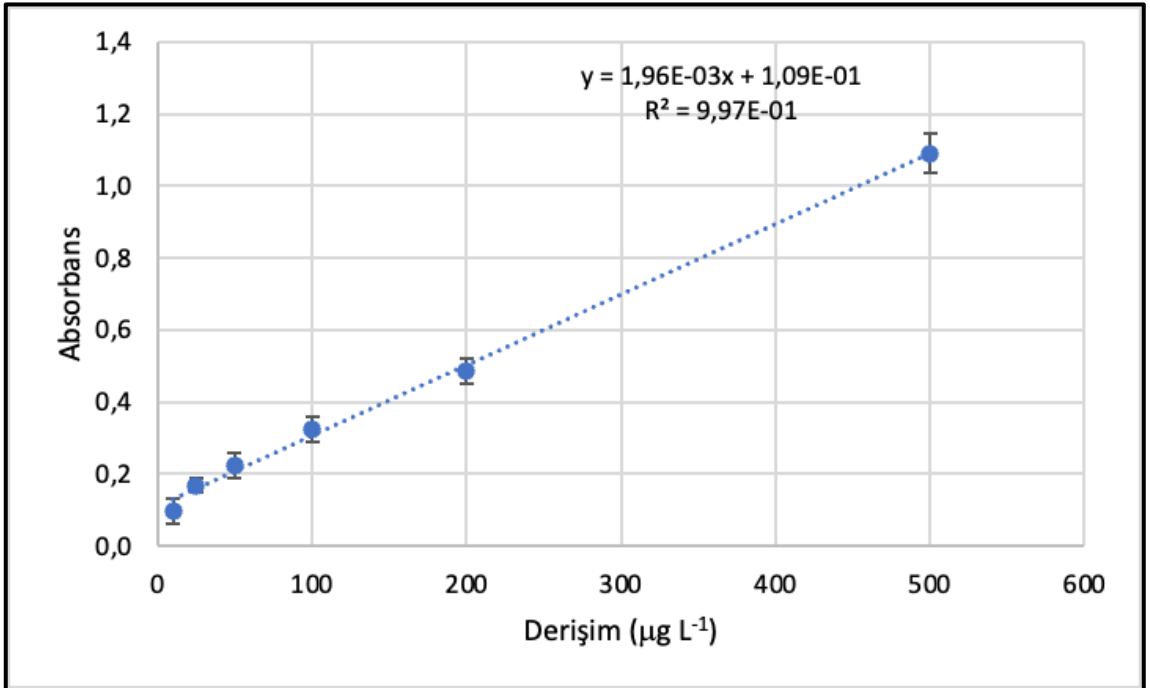
Çizelge 4.1.den görüldüğü gibi ekstraksiyon verimi üzerine eklenen iyonların büyük kısmı CV derişiminin 4000 ve 5000 katına kadar bir etkisi olmadığı, tablodaki diğer iyonlar için de yüksek derişimlere kadar tolerans olduğu saptanmıştır. Bu iyonlar için daha yüksek derişim değerleri çalışılmamıştır. Ayrıca çalışılan boyalardan indigo karminin 2000, safraninin 500 ve malahit yeşilinin 100 kat derişime kadar girişim göstermediği saptanmıştır. Özetle, örneklerde yaygın olarak bulunabilecek katyon ve anyonların ve bazı boya türlerinin CV'nin MDES-DLLME yöntemi ile tayininde ekstraksiyon verimi üzerine olumsuz bir etkisinin olmayacağı söylenebilir.

4.1.12. CV için MDES-DLLME Yönteminin Analitik Performans Özellikleri

Sulu CV standart çözeltileri kullanılarak oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi Şekil 4.11'de, CV çözeltilerinin MDES-DLLME yöntemi ile zenginleştirilmesinin ardından oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi Şekil 4.12'de gösterilmiştir. İlgili kalibrasyon eğrilerine ait veriler ise Çizelge 4.2' de özetlenmiştir.



Şekil 4.11. CV için sulu standart çözeltilerle oluşturulan kalibrasyon



Şekil 4.12. CV için zenginleştirme sonrası oluşturulan kalibrasyon

Çizelge 4. 2. CV' ye ait kalibrasyon eğrilerine ait veriler

Kalibrasyon Türü	Doğrusal Derişim Aralığı ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Doğru Denklemi	R^2
Sulu standart kalibrasyon	1000-10,000	$A=9.07 \cdot 10^{-5}C + 1.99 \cdot 10^{-2}$	0.982
Zenginleştirilmiş kalibrasyon	10-500	$A=1.96 \cdot 10^{-3}C + 1.09 \cdot 10^{-1}$	0.997

CV'nin zenginleştirilmesinden sonra elde edilen kalibrasyon eğiminin (m_2), zenginleştirmeden önceki sulu kalibrasyon eğimine (m_1) oranı ile hesaplanan zenginleştirme faktörü 22 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.3. CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminin analitik performans kriterlerinin hesaplanması [53]

Özellik	Tanım	Hesaplama
Zenginleştirme Faktörü (EF)	Zenginleştirilmeden sonra elde edilen kalibrasyon eğiminin (m_2), zenginleştirilmeden önceki sulu kalibrasyon eğimine (m_1) oranı	$EF = m_2 / m_1$
Önderiştirme Faktörü (PF)	CV' nin başlangıç çözeltisinin hacminin (V_1) ekstraksiyon sonundaki hacme (V_2) oranı	$PF = V_1 / V_2$
Gözlenebilme Sınırı (LOD)	Tespit edilmesine karşın nicel olarak tayin edilemeyen en düşük derişimdir. Tanık çözeltisinin (S_b) standart sapmasının üç katının kalibrasyon eğrisinin eğimine (m) oranı	$LOD = 3 S_b / m$
Tayin Sınırı (LOQ)	Tayin edilebilen en düşük derişimdir. Tanık çözeltisinin (S_b) standart sapmasının üç katının kalibrasyon eğrisinin eğimine (m) oranı	$LOQ = 10 S_b / m$
Kesinlik (Tekraredilebilirlik)	Aynı deneyin, aynı koşullar altında, aynı gün içinde, yapılması sonucu elde edilen ölçümlerin standart sapmasının (S) ölçümlerin ortalamasına (X_{ort}) oranının yüzde olarak ifadesi	$\%RSD = S / X_{ort} \cdot 100$
Ara Kesinlik (Tekrarüretilebilirlik)	Aynı deneyin, farklı koşullar altında, farklı günlerde yapılması sonucu elde edilen ölçümlerin standart sapmasının (S) ölçümlerin ortalamasına (X_{ort}) oranının yüzde olarak ifadesi	

CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminin analitik performans özellikleri Çizelge 4.3'te tanımlandığı şekilde hesaplanmış olup, yöntemin analitik performans göstergeleri Çizelge 4.4'te sunulmuştur.

Çizelge 4.4. CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminin analitik performans özellikleri

Analitik Özellikler	Değer
Zenginleştirme Faktörü (EF)	22
Önderiştirme Faktörü (PF)	20
Başlangıç Örnek Hacmi (mL)	10
Son Örnek Hacmi (mL)	0.5
Gözlenebilme Sınırı (LOD) ($\mu\text{g L}^{-1}$) (n=10)	1.13
Tayin Sınırı (LOQ) ($\mu\text{g L}^{-1}$) (n=10)	3.75
Doğrusal Derişim Aralığı ($\mu\text{g L}^{-1}$)	10-500
Sulu Kalibrasyon Aralığı ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1000-10,000
%RSD (Gün içi) (n=10, 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ CV)	5.95
%RSD (Günler arası) (n=10, 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ CV)	7.86

4.1.13. CV için geliştirilen MDES-DLLME Yönteminin Doğruluğu

CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminin doğruluğunun kanıtlanması için 3 farklı balık çeşidi (levrek, çipura ve alabalık) ve alabalığın yetiştiği havuz suyu örnek olarak kullanılmıştır. Bunun için Bölüm 3.5.3'te anlatılan prosedür uygulanarak mikrodalga ile parçalanmış numunelere CV derişimi 0.125 mg kg⁻¹ (25 µg L⁻¹), 0.25 mg kg⁻¹ (50 µg L⁻¹), ve 0.50 mg kg⁻¹ (100 µg L⁻¹), olacak şekilde ekleme (spike) yapılmış ve MDES-DLLME yöntemini uygulanmıştır. Belli değerlerde ekleme yapılan numune için geri kazanım Eşitlik 2'de verilmektedir.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{C_{\text{bulunan}} - C_{\text{başlangıç}}}{C_{\text{eklenen}}} \times 100 \quad (2)$$

C_{bulunan} : Ekleme yapıldıktan sonra elde edilen derişim değeri (mg kg⁻¹)

$C_{\text{başlangıç}}$: Ekleme yapılmadan önce elde edilen derişim değeri (mg kg⁻¹)

C_{eklenen} : Numuneye eklenen derişim değeri (mg kg⁻¹)

Çizelge 4.5. CV için gerçek numune analiz sonuçları

Örnek	Eklenen (mg kg ⁻¹)	Bulunan (mg kg ⁻¹)	%Geri Kazanım
Levrek	0	0.10 ± 0.01	-
	0.125	0.22 ± 0.02	96.9 ± 9.6
	0.25	0.34 ± 0.01	96.8 ± 5.0
	0.50	0.59 ±	97.8 ± 1.2
Çipura	0	0.08 ± 0.01	-
	0.125	0.20 ± 0.02	99.9 ± 6.9
	0.25	0.33 ± 0.01	101.7 ± 7.3
	0.50	0.58 ±	101.0 ± 4.0
Alabalık	0	0.33 ± 0.02	-
	0.125	0.46 ± 0.01	98.9 ± 2.7
	0.25	0.58 ± 0.02	96.6 ± 0.5
	0.50	0.83 ± 0.01	98.2 ± 1.0
Alabalık Havuz Suyu	Eklenen (µg L ⁻¹)	Bulunan (µg L ⁻¹)	%Geri Kazanım
	0	40.11 ± 0.25	-
	25	64.68 ± 0.84	98.3 ± 2.4
	50	86.23 ± 1.14	92.2 ± 1.8
	100	137.85 ± 1.02	97.7 ± 0.9

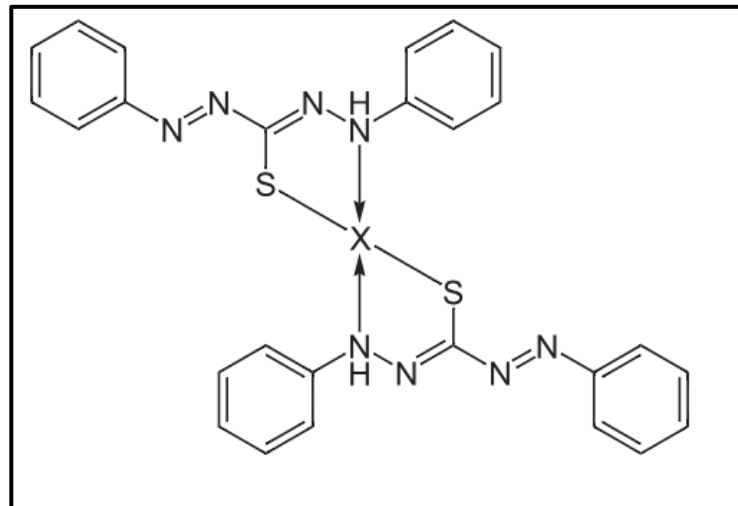
Çizelge 4.5'ten de görüldüğü şekilde, CV tayini için geliştirilen MDES-DLLME yönteminin çeşitli balık türlerine ve balığın yetiştiği havuz suyu örneğine uygulanması sonucu elde edilen yüksek geri kazanımlar yöntemin gerçek numunelere başarı ile uygulanabildiğini kanıtlamaktadır.

4.2. Cd(II) için Geliştirilen MDES-DLLME Yöntemine Ait Sonuçlar ve Yorumlar

Çalışmanın bu aşamasında Cd(II) tayini için geliştirilen MDES-DLLME yöntemini etkileyen çeşitli parametreler, maksimum ekstraksiyon verimi elde etmek amacıyla (pH, DES bileşenlerinin molar oranları, ekstraksiyon solventinin hacmi, kompleksleştirici miktarı, ekstraksiyon süresi vb. gibi) optimize edilmiştir. Tüm optimizasyon çalışmaları parametrelerden sadece biri değiştirilip diğerleri sabit tutularak gerçekleştirilmiş olup, çalışmada sunulan tüm veriler, en az üç tekrarlı analizin ortalaması olarak elde edilmiştir.

4.2.1. Cd(II) İyonlarının Kompleksleşmesi

İnorganik iyonların organik ekstraksiyon solventine ekstraksiyonunu sağlamak için suyla karışmayan bir komplekse dönüştürülmesi gerekir ve bu amaçla çeşitli kompleks oluşturucu maddeler kullanılabilir. Bu tezde kompleks oluşturucu madde olarak ditizon (DTZ) seçilmiştir. DTZ alkali ve alkali toprak metalleri ile kompleks oluşturmazken, genel olarak geçiş metallerine karşı daha seçici ve duyarlıdır ve bu metal iyonlarıyla suda çözünmeyen ve kararlı, renkli kompleksler oluşturabilir [165, 166]. Cd, Fe, Mn, Co, Cu, Ni, Zn, Pd, Ag, Sn, Au, Pt, Pb ve Hg gibi katyonlarla etkileşim, DTZ molekülü üzerindeki bağ donörü S ve N atomları aracılığıyla gerçekleşir [165]. Şekil 4.13'te görüldüğü gibi kompleks, 2:1 DTZ: metal iyonu mol oranından oluşur; burada X, metal iyonunu ifade eder [166]. Bu çalışma boyunca Cd(II) iyonlarının hidrofobik kompleksini oluşturmak amacıyla DTZ kullanılmıştır.

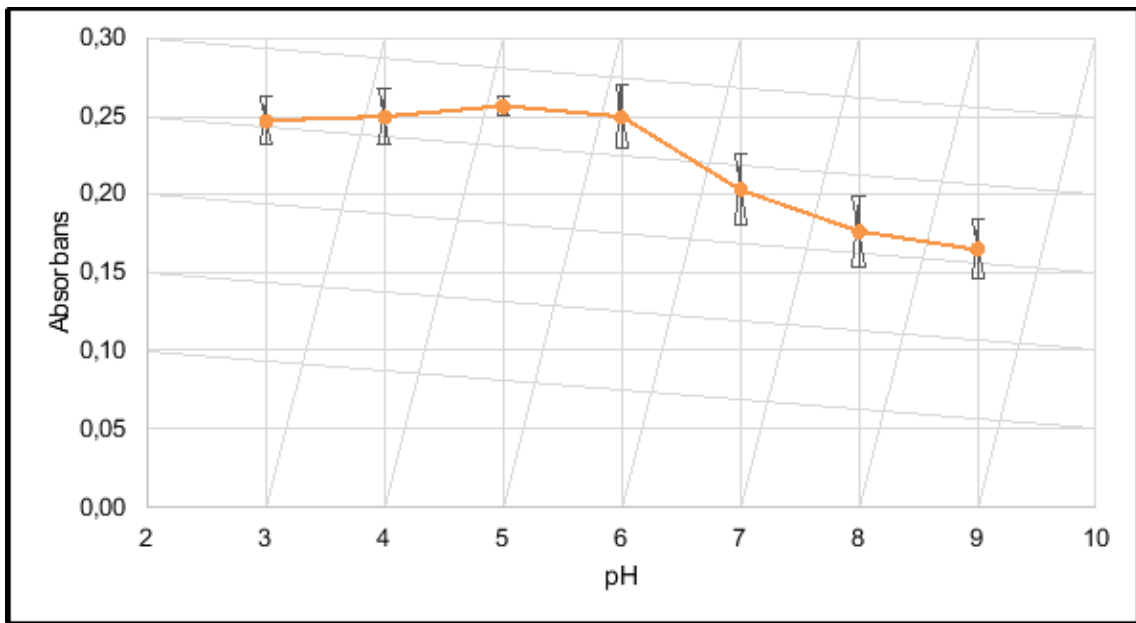


Şekil 4.13. DTZ-metal iyon kompleksinin yapısı

4.2.2. pH Etkisi

Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde de numune ortamının pH'ının belirlenmesi, Bölüm 4.1.4'te anlatılan nedenlerden dolayı en önemli parametrelerden biridir.

Metal iyonlarının ekstraksiyonu sırasında, pH, metal-ligand kompleksinin oluşumunu doğrudan etkiler [167]. Bu nedenle, ekstraksiyon verimini etkileyen pH değerini optimize etmek çok önemlidir. Maksimum ekstraksiyon verimini elde etmek amacıyla, Cd(II) iyonunun standart çözeltileri hazırlanmış ve pH 3 ile pH 9 arasında incelenmiştir. İstenen pH değerleri uygun tampon çözeltiler kullanılarak elde edilmiştir. Şekil 4.14'te gösterilen absorbans değerlerinden, düşük pH'larda ekstraksiyon veriminin en yüksek değerinde olduğunu pH'ın artmasıyla birlikte alkali ortamda verimin düştüğü gözlemlenmiştir. Bazı bölgede verimdeki bu azalma analitin alkali ortamda hidrolize iyonlarına dönüşmesinden kaynaklanabilir. Bu nedenlerden dolayı, optimum pH değeri 5 olarak belirlenmiştir.

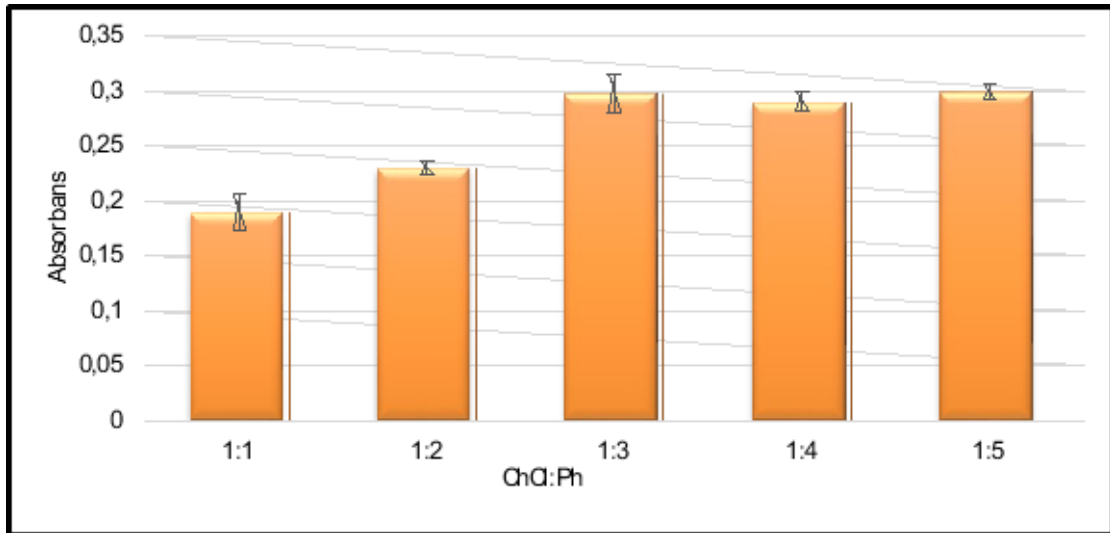


Şekil 4.14. Cd(II) için Geliştirilen MDES-DLLME Yönteminde pH Etkisi

Optimum Deneş Koşulları: 10 mL numune, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd(II), 500 μL 0.1% Ditizon, 100 μL MDES (1:3 ChCl:Ph ve 80 mg Fe_2O_3), 4 dk ultrason, 300 μL 5 M HNO_3 (n = 3).

4.2.3. DES Kompozisyonunun Etkisi

MDES içindeki DES bileşenlerinin ve kompozisyonunun Cd(II)'nin MDES-DLLME yöntemiyle ekstraksiyonu için önemi bilindiği için DES'i oluşturan ChCl ve Ph ün bağıl oranları maksimum ekstraksiyon verimi elde edilecek şekilde optimize edilmiştir. Bu amaçla sabit ChCl molüne karşılık Ph miktarı değiştirilerek 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 ve 1:5 mol oranlarında ChCl:Ph kullanılarak hazırlanan DES'lerle MDES-DLLME yöntemi uygulanmış ve elde edilen absorban değerleri kullanılarak çizilen grafik Şekil 4.15'te sunulmuştur. Grafikten de görüldüğü üzere, 1:3 mol oranına kadar absorban, yani ekstraksiyon verimi artmakta, daha sonra yaklaşık aynı kalmaktadır. Bu nedenle ChCl:Ph için optimum mol oranı 1:3 olarak belirlenmiştir.



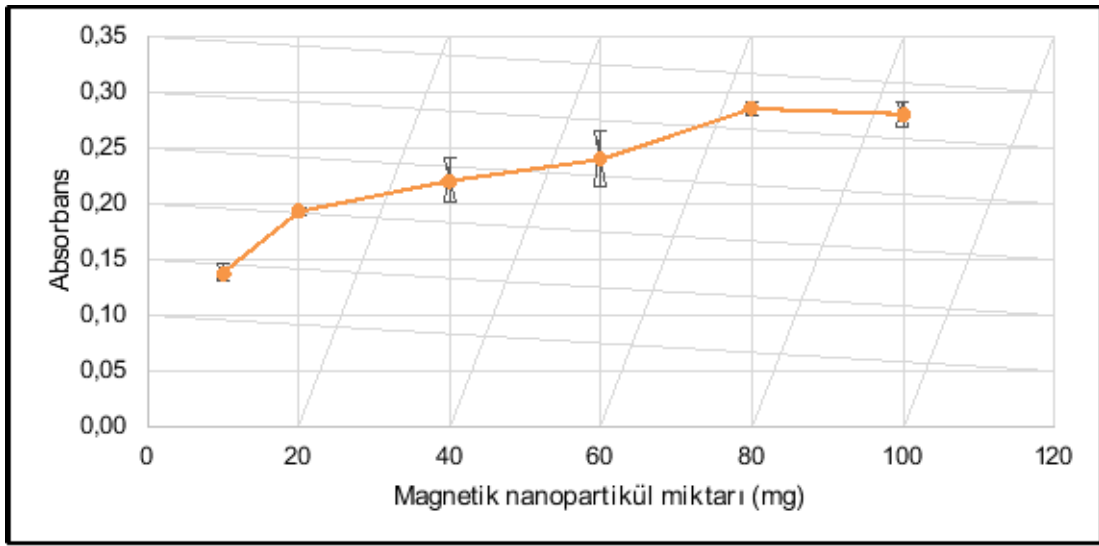
Şekil 4.15. Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde DES kompozisyonunun etkisi

Optimum Deneş Koşulları: 10 mL numune, 100 µg L⁻¹ Cd(II), pH: 5, 500 µL 0.1% Ditizon, 100 µL MDES (1:3 ChCl:Ph ve 80 mg Fe₂O₃), 4 dk ultrason, 300 µL 5 M HNO₃ (n = 3).

4.2.4 Magnetik Nanopartikül Miktarının Etkisi

Mikroekstraksiyon işleminde sırasında faz ayrımını sağlamak amacıyla, ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan DES'e eklenen manyetik nanopartikül Fe₂O₃'ün ekstraksiyon verimi üzerindeki etkisini belirlemek için çeşitli deneyler yapılmıştır. Bu deneylerde, 1:3 ChCl:Ph molar oranında sentezlenen 1 mL DES'e, 5 mg ile 100 mg arasında değişen miktarlarda Fe₂O₃ eklenmiştir. Farklı miktarlarda Fe₂O₃ içeren

MDES'ler, mikroekstraksiyon işlemi sırasında kullanılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.16'da detaylı olarak gösterilmiştir. Elde edilen MDES'ler MDES, Cd(II) mikroekstraksiyonunda kullanılarak ekstraksiyon verimleri analiz edilmiştir. Deney sonuçları, Fe₂O₃ miktarının ekstraksiyon verimi üzerindeki etkisini net bir şekilde ortaya koymuştur. Bu sonuçlara göre, en yüksek ekstraksiyon verimi, 1:3 ChCl:Ph molar oranında sentezlenen 1 mL DES ve 80 mg Fe₂O₃ içeren MDES kullanıldığında elde edilmiştir. Bu bulgu, 80 mg Fe₂O₃ miktarının, faz ayrımı ve ekstraksiyon etkinliği açısından en optimal koşulları sağladığını göstermektedir.



Şekil 4.16. Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde Fe₂O₃ magnetik nanopartikül miktarının etkisi

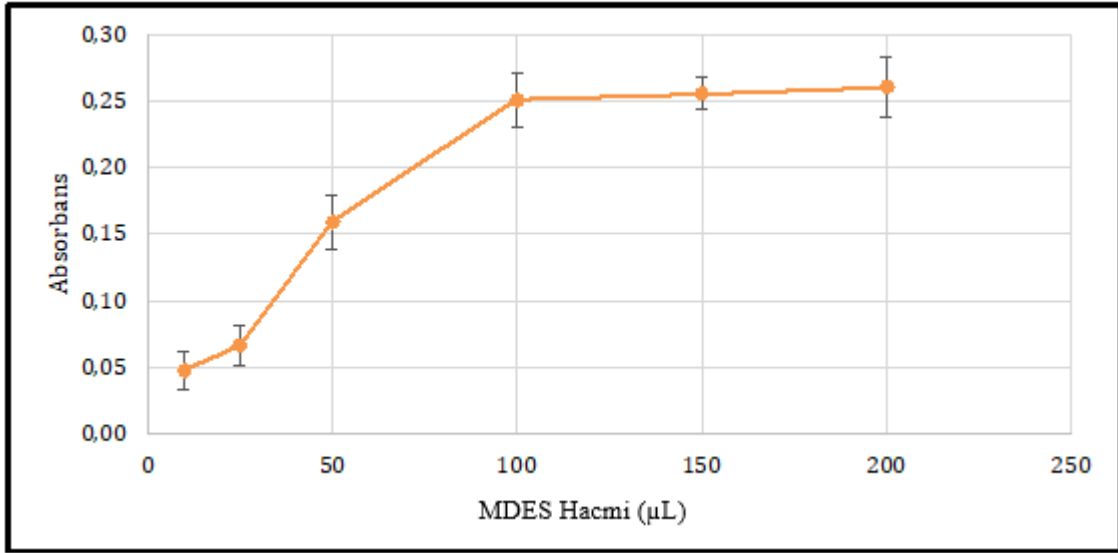
Optimum Deney Koşulları: 10 mL numune, 100 µg L⁻¹ Cd(II), pH: 5, 500 µL 0.1% Ditizon, 100 µL MDES, 4 dk ultrason, 300 µL 5 M HNO₃ (n = 3).

4.2.5. Ekstraksiyon Çözücüsü Hacmi

Cd(II) için Geliştirilen MDES-DLLME Yönteminde ekstraksiyon çözücüsü hacmini belirlemek için 1:3 ChCl:Ph molar oranında sentezlenen 1 mL DES ve 80 mg Fe₂O₃ magnetik nanopartikülden oluşan MDES ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılmış ve miktarı 10 µL ile 200 µL arasında değiştirilmiş ve bu değişikliklerin ekstraksiyon verimi üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, farklı MDES miktarlarının ekstraksiyon verimi üzerindeki etkisini göstermektedir. Şekil 4.17'de sunulan grafiklerden de görüldüğü üzere, MDES miktarı

artıkça ekstraksiyon veriminde bir artış gözlenmiş, ancak, bu artış belirli bir noktadan sonra platoya ulaşmış ve daha fazla MDES eklenmesiyle ekstraksiyon veriminde belirgin bir artış elde edilmemiştir. En yüksek absorbans değeri, 100 µL MDES kullanılarak elde edilmiş olduğu için optimum ekstraksiyon çözücüsü miktarı 100 µL olarak seçilmiştir.

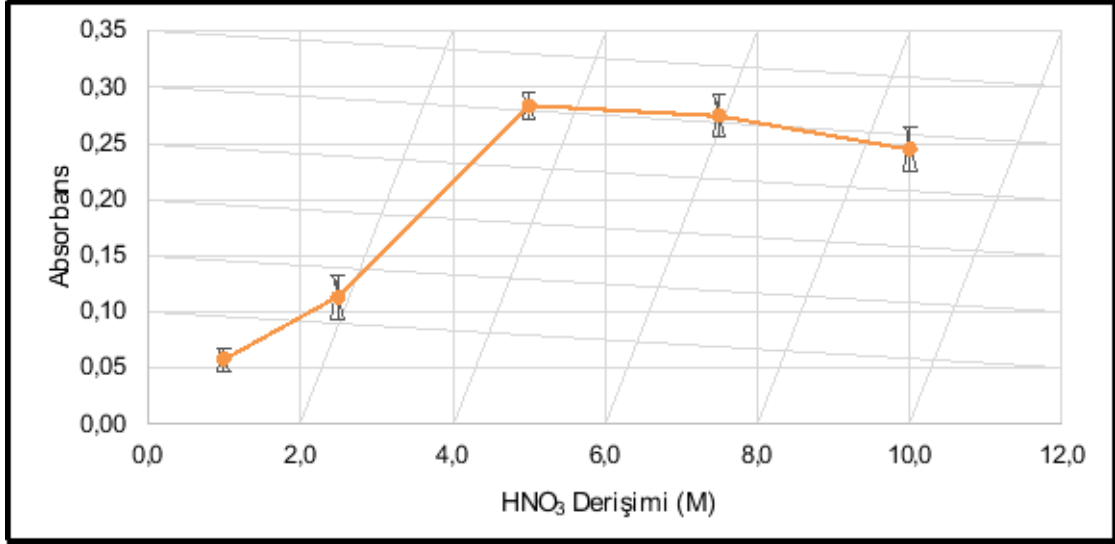


Şekil 4.17. Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde ekstraksiyon çözücüsü hacminin etkisi

Optimum Deneş Koşulları: 10 mL numune, 100 µg L⁻¹ Cd(II), pH: 5, 500 µL 0.1% Ditizon, MDES (1:3 ChCl:Ph ve 80 mg Fe₂O₃), 4 dk ultrason, 300 µL 5 M HNO₃ (n = 3).

4.2.6. Geri-Ekstraksiyon Çözeltisinin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Ekstraksiyon verimliliğini etkileyen en önemli parametrelerden biri, analitin elüsyonunda kullanılan çözücünün etkinliğidir. Literatür bilgileri de dikkate alınarak, Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde, HNO₃ geri ekstraksiyon çözücüsü olarak tercih edilmiş ve en yüksek elüsyon verimini elde etmek amacıyla, Şekil 4.18'de gösterildiği gibi, farklı HNO₃ konsantrasyonlarıyla (1 M ile 10 M arasında) elüsyon gerçekleştirilmiştir [108, 167, 168]. Grafikten görüldüğü üzere 5 M HNO₃ çözeltisinin geri-ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılması ile en yüksek absorbans verimi elde edilmiştir.

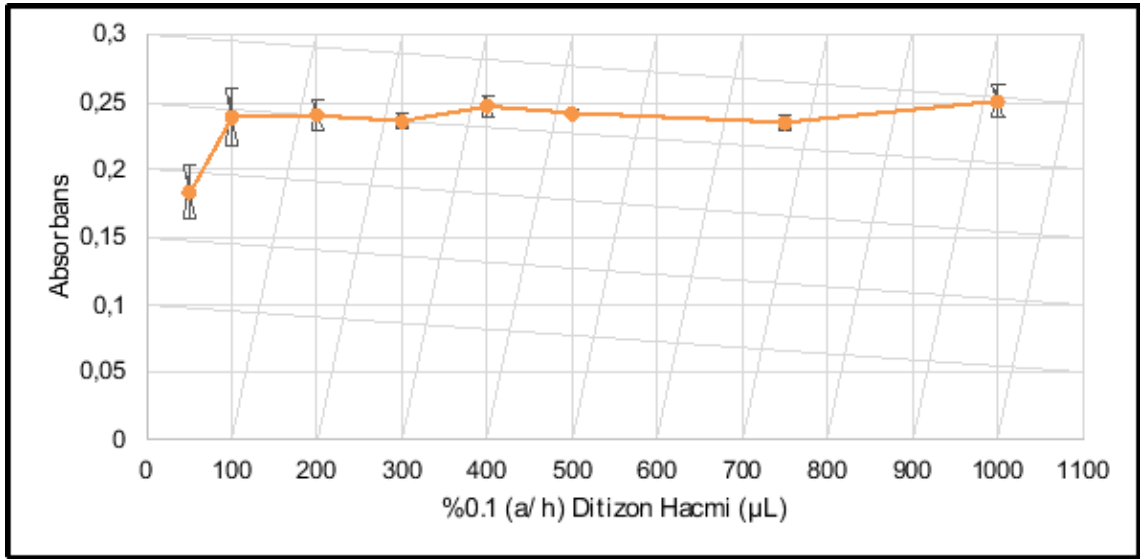


Şekil 4.18. Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde geri-ekstraksiyon çözeltisi konsantrasyonunun etkisi

Optimum Deney Koşulları: 10 mL numune, 100 µg L⁻¹ Cd(II), pH: 5, 500 µL 0.1% Ditizon, 100 µL MDES (1:3 ChCl:Ph ve 80 mg Fe₂O₃), 4 dk ultrason (n = 3).

4.2.7. Kompleksleştirici Hacminin Etkisi

Polar metal iyonlarının hidrofobik derin DES'e ekstrakte olabilmesi için, metal iyonlarının hidrofobik kompleksinin oluşturulması gerekmektedir. Bu amaçla geliştirilen MDES-DLLME prosedüründe numune çözeltisinde bulunan Cd(II) iyonlarının hidrofobik kompleksinin oluşması amacıyla DTZ kullanılmıştır. DTZ miktarının ekstraksiyon verimini etkileyen önemli parametrelerden biri olduğu için optimum değerinin belirlenmesi gerekmektedir. Optimizasyon süreci için, hazırlanan model analit çözeltilerine 50 ile 1000 µL arasında değişen hacimlerde %0.1 (a/h) DTZ eklenmiş, ardından geliştirilen MDES-DLLME yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar, DTZ miktarının ekstraksiyon verimliliği üzerindeki etkisini göstermiştir. Şekil 4.19'da da görüldüğü gibi, 100 µL DTZ miktarından itibaren yüksek ekstraksiyon verimi elde edilmiş, ancak daha yüksek Cd(II) derişimlerinde kompleksleşmenin tam olduğundan emin olmak için 500 µL DTZ hacmi optimum değer olarak belirlenmiştir.

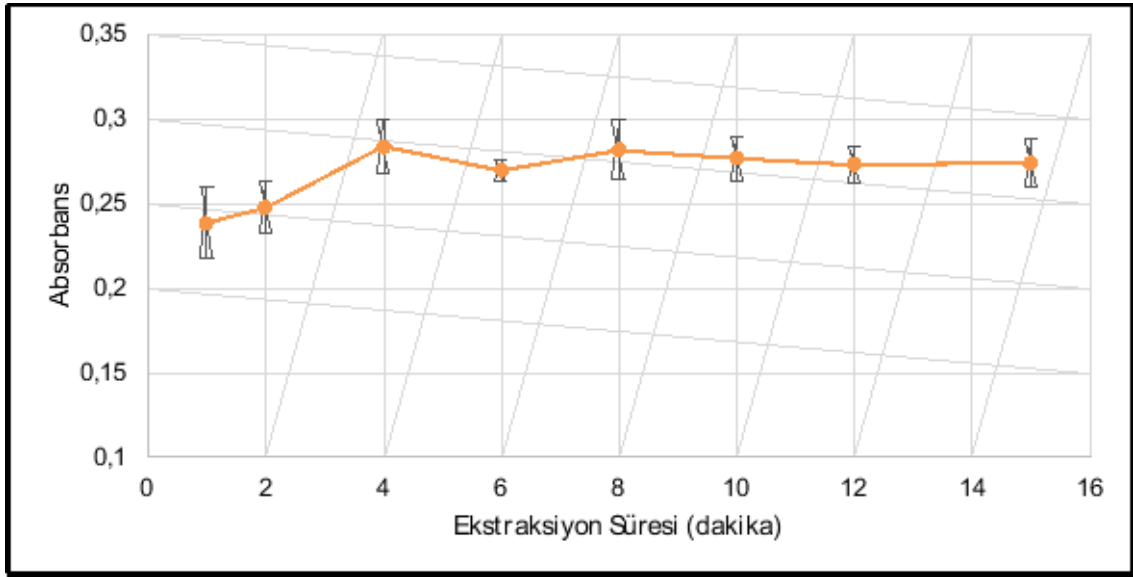


Şekil 4.19. Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde kompleksleştirici miktarının etkisi

Optimum Deney Koşulları: 10 mL numune, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd(II), pH: 5, 100 μL MDES (1:3 ChCl:Ph ve 80 mg Fe_2O_3), 4 dk ultrason, 300 μL 5 M HNO_3 (n = 3).

4.2.8. Ekstraksiyon Süresinin Etkisi

Geliştirilen MDES-DLLME prosedüründe, Cd(II)-DTZ kompleksinin MDES fazına ekstraksiyonunu desteklemek ve hızlandırmak amacıyla, numune çözeltileri ultrasonik banyoda sonikasyona tabi tutulmuştur. Ekstraksiyon süresinin bu işlem üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla, prosedürdeki sonikasyon süresi optimize edilmiştir. Bu amaçla, numune çözeltileri 1 dakika ile 15 dakika arasında değişen sürelerde ultrasonik banyoda sonikasyona tabi tutulmuş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.20'de gösterilmiştir. Grafikte de görüldüğü üzere, 4. dakikaya kadar sonikasyon süresi arttıkça ekstraksiyon verimi de artmış, ancak bu noktadan sonra değişmemiştir. Bu süre, analitin organik faza etkin bir şekilde ekstrakte edilmesi için yeterli bulunmuştur. Dolayısıyla, sonraki çalışmalarda 4 dakikalık sonikasyon süresi yeterli bulunmuştur.

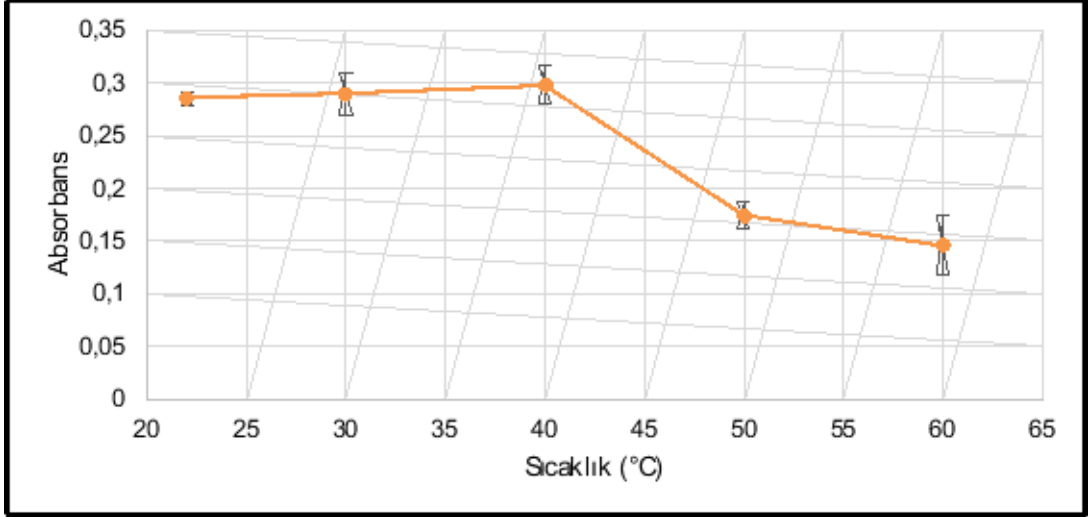


Şekil 4.20. Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde ekstraksiyon süresinin etkisi

Optimum Deneş Koşulları: 10 mL numune, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd(II), pH: 5, 100 μL MDES (1:3 ChCl:Ph ve 80 mg Fe_2O_3), 500 μL 0.1% DTZ, 300 μL 5 M HNO_3 (n = 3).

4.2.9. Sıcaklık Etkisi

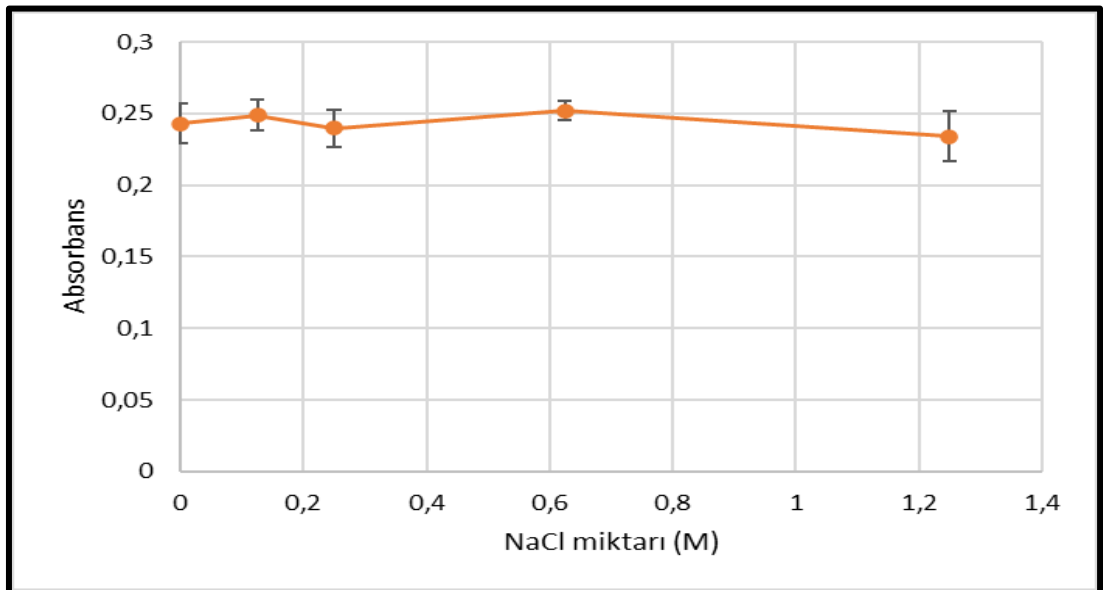
Sıcaklık, Cd(II) ekstraksiyonu için geliştirilen MDES-DLLME yönteminin ekstraksiyon verimi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Yüksek sıcaklıklar, difüzyon katsayılarını değiştirebilir ve analitlerin kütle transferini ve ekstraksiyon hızlarını artırabilir. Bu yöntemin verimliliği üzerindeki sıcaklık etkisi, 22–60°C aralığındaki farklı sıcaklıklarda incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.21'de sunulmuştur. Sonuçlar, Cd(II) için ekstraksiyon veriminin) 40°C'ye kadar neredeyse sabit kaldığını, ancak sıcaklığın artmasıyla birlikte azaldığını ortaya koymuştur. Daha yüksek sıcaklıklarda, Cd-DTZ kompleksinin bozulmuş olması sebebiyle DES fazına ekstrakte olan Cd(II) miktarının azaldığı düşünülmektedir. Bu sebeple, önerilen yöntemin geliştirilmesi için yapılan sonraki çalışmalar oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.21. Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yönteminde sıcaklığın etkisi
Optimum Deneş Koşulları: 10 mL numune, 100 µg L⁻¹ Cd(II), pH: 5, 100 µL MDES (1:3 ChCl:Ph ve 80 mg Fe₂O₃), 500 µL 0.1% DTZ, 4 dk ultrason, 300 µL 5 M HNO₃ (n = 3).

4.2.10. İyonik Şiddetin Etkisi

Örnek çözeltisinin iyonik şiddetinin ekstraksiyon verimini artırıcı (salting out) ya da azaltıcı (elektrostatik etkileşim) etkilerinin olabildiği bilindiği için iyonik şiddet etkisini belirlemek amacıyla bir dizi deneş yapılmıştır. Bu amaçla Cd(II) içeren örnek çözeltilerine 0 M, 0.125 M, 0.25 M, 0.625 M, 1.25 M olacak şekilde NaCl tuzu ilave edilmiştir.



Şekil 4.22. Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME iyonik şiddetin etkisi

Optimum Deneş Koşulları: 10 mL numune, 100 µg L⁻¹ Cd(II), pH: 5, 100 µL MDES (1:3 ChCl:Ph ve 80 mg Fe₂O₃), 500 µL 0.1% DTZ, 4 dk ultrason, 300 µL 5 M HNO₃ (n = 3).

Şekil 4.22'de sunulan veriler, eklenen NaCl konsantrasyonunun Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yönteminin ekstraksiyon verimi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını ve iyonik güç değerlerinin ekstraksiyon verimini etkilemediğini göstermiştir.

4.2.11. Yabancı İyon Etkisi

MDES-DLLME yönteminin optimizasyonu sırasında sulu standart çözeltiler kullanıldığı için, gerçek numunelerle çalışırken ortamda bulunabilecek matris iyonlarının ekstraksiyon verimliliği üzerindeki etkisi belirlenmelidir. Çünkü ortamda bulunan girişim yapan iyonlar, hassasiyetin azalmasına ve dolayısıyla ekstraksiyon veriminin düşmesine neden olabilir. Bu amaçla, gerçek örneklerde bulunabilecek ve DTZ ile kompleksleşebilecek matris iyonlarının girişim etkileri araştırılmıştır. Bu nedenle, önerilen MDES-DLLME' nin toleransı, olası girişim yapan maddelerin artan konsantrasyonlarda 10 mL 100 µg L⁻¹ Cd(II) standart eklenmesiyle incelenmiştir. Bir yabancı iyon, analitin ekstraksiyonunda ±%5'ten büyük bir değişiklik meydana getiriyorsa girişim yapan bir tür olarak kabul edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.6. 'da özetlenmiştir. Bu çizelgeden de görülebileceği gibi, optimize edilmiş deneşsel koşullar altında, girişim yapma olasılığı olan iyonların anlamlı bir girişim görülmemektedir.

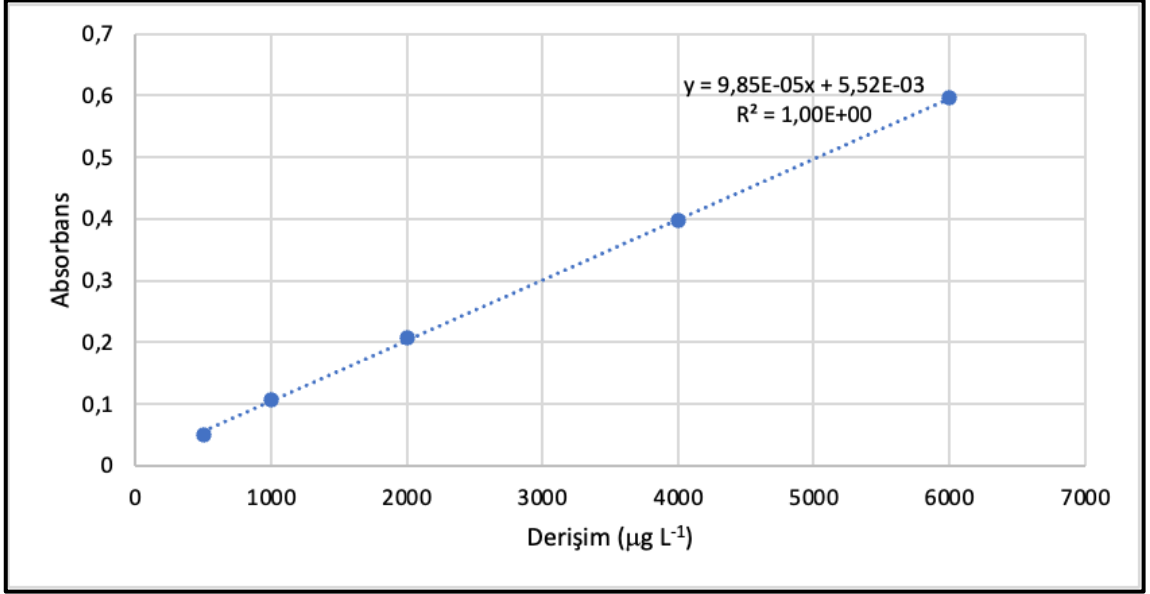
Çizelge 4. 6. Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yöntemine engelleyici türlerin etkisi. [Cd(II)]: 100 mg L⁻¹, n = 3.

Engelleyici Tür	[Cd]:[Engelleyici Tür]
Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺	>1:5000
Co ²⁺ , Pb ²⁺ , Fe ³⁺	1:2000
Zn ²⁺ , Cu ²⁺	1:500

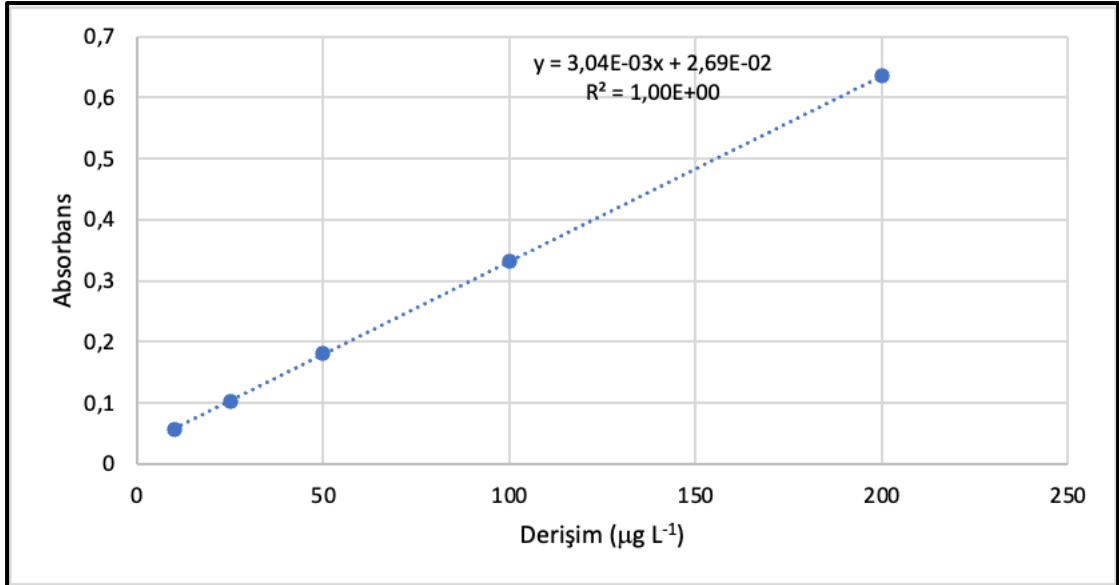
4.2.12. Cd(II) İçin Geliştirilen MDES-DLLME Yönteminin Analitik Performans Özellikleri

Özellikleri

Sulu Cd(II) standart çözeltileri kullanılarak oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi Şekil 4.23'te, Cd(II) çözeltilerinin MDES-DLLME yöntemi ile zenginleştirilmesinin ardından oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi Şekil 4.24'te gösterilmiştir. İlgili kalibrasyon eğrilerine ait veriler ise Çizelge 4.7' de özetlenmiştir.



Şekil 4.23. Cd(II) için sulu standart çözeltilerle oluşturulan kalibrasyon



Şekil 4.24. Cd(II) için zenginleştirme sonrası oluşturulan kalibrasyon

Çizelge 4. 7. Cd(II)' ye ait kalibrasyon eğrilerine ait veriler

Kalibrasyon Türü	Doğrusal Derişim Aralığı ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Doğru Denklemi	R ²
Sulu standart kalibrasyon	250-6000	$A=9.85\times 10^{-5}C + 5.52\times 10^{-3}$	1.00
Zenginleştirilmiş kalibrasyon	10-200	$A=3.04\times 10^{-3}C + 2.69\times 10^{-2}$	1.00

Cd zenginleştirilmesinden sonra elde edilen kalibrasyon eğiminin (m_2), zenginleştirmeden önceki sulu kalibrasyon eğimine (m_1) oranı ile hesaplanan zenginleştirme faktörü 31 olarak bulunmuştur.

Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yönteminin analitik performans özellikleri Çizelge 4.3'te tanımlandığı şekilde hesaplanmış olup, yöntemin analitik performans göstergeleri Çizelge 4.8'de sunulmuştur.

Çizelge 4. 8. Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yönteminin analitik performans özellikleri

Analitik Özellikler	Değer
Zenginleştirme Faktörü (EF)	31
Önderiştirme Faktörü (PF)	33
Başlangıç Örnek Hacmi (mL)	10
Son Örnek Hacmi (mL)	0.3
Gözlenebilme Sınırı (LOD) ($\mu\text{g L}^{-1}$) (n=10)	0.73
Tayin Sınırı (LOQ) ($\mu\text{g L}^{-1}$) (n=10)	2.43
Doğrusal Derişim Aralığı ($\mu\text{g L}^{-1}$)	10-200
Sulu Kalibrasyon Aralığı ($\mu\text{g L}^{-1}$)	250-6000
%RSD (Gün içi) (n=10, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd (II))	4.80

4.2.13. Yöntemin Doğruluğu

Cd(II) için geliştirilen MDES-DLLME yönteminin önerilen yöntemin validasyonu için ilk olarak Cd(II) iyonu içeren sertifikalı referans madde (CRM) (TMDA–61.2, Environment Canada, Ontario Gölü Suyu) analiz edilmiştir. Kullanılan CRM' nin içeriği şu şekildedir: Al 57.9; Sb: 33.6; Ba: 62.7; As 34.4; Be: 36.3; Bi: 22.7; B: 79.0; Cd 58.0; Cr: 67.2; Co 63.0; Li: 33.4; Mo: 72.2; Se: 39.3; Tl: 36.8; Sn: 55.9; Ti: 37.2; U: 36.8; Cu 63.5; Fe 79.7; Mn 75.7; Ni 57.5; Pb 61.4; Zn 71.3 ve V 71.1; $\mu\text{g L}^{-1}$.

İkinci olarak geliştirilen MDES-DLLME yöntemi gerçek numunelere uygulanmış ve bu amaçla göl suyu, alabalık yetiştirme havuzundan alınan su, alabalık, levrek, çipura, karides ve midye kullanılmıştır. Bu amaçla sını numunelere doğrudan katı numunelere Bölüm 3.3.1’de anlatılan prosedür uygulanarak mikrodalga ile parçalayıp, sulu hale getirdikten sonra ekleme (spike) yaparak MDES-DLLME yöntemi uygulanmıştır. CRM için geri kazanım Eşitlik 3’ te verilen formül ile gerçek örneklere ekleme yaptıktan sonra elde edilen geri kazanım ise Eşitlik 4 ile hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar sırasıyla Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.11 de sunulmaktadır.

Çizelge 4. 9. “TMDA–61.2 Ontario Lake” referans suyunda MDES-DLLME yöntemi ile Cd(II) analiz sonuçları

Örnek	Gerçek derişim ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% Geri Kazanım
TMDA-61.2 Ontario Gölü Suyu	58	55.92 \pm 1.04	96.4 \pm 1.8

Çizelge 4. 10. Cd(II) iyonları için gerçek numune (balık) analiz sonuçları

Örnek	Eklenen (mg kg)	Bulunan (mg kg)	%Geri Kazanım
Karides	0	1.06 ± 0.12	-
	1	2.07 ± 0.05	101.5 ± 8.4
	2.5	3.44 ± 0.19	95.1 ± 3.3
	5	6.22 ± 0.17	103.2 ± 5.6
Midye	0	5.03 ± 0.20	-
	1	5.99 ± 0.10	95.7 ± 2.7
	2.5	7.47 ± 0.12	97.4 ± 4.7
	5	10.02 ± 0.12	99.8 ± 2.5
Levrek	0	0.45 ± 0.03	-
	1	1.43 ± 0.03	98.6 ± 1.8
	2.5	3.00 ± 0.06	102.1 ± 2.1
	5	5.47 ± 0.11	100.3 ± 2.6
Çipura	0	0.86 ± 0.03	-
	1	1.81 ± 0.11	95.7 ± 0.9
	2.5	3.32 ± 0.06	98.6 ± 1.3
	5	5.87 ± 0.12	100.3 ± 2.7
Alabalık	0	5.03 ± 0.16	-
	1	5.99 ± 0.03	95.7 ± 2.5
	2.5	7.47 ± 0.06	97.4 ± 5.3
	5	10.019 ± 0.10	99.8 ± 3.5
Alabalık Havuz Suyu	Eklenen (µg L ⁻¹)	Bulunan(µg L ⁻¹)	%Geri Kazanım
	0	-	-
	10	9.98 ± 0.20	99.8 ± 2.0
	50	47.68 ± 1.83	95.4 ± 3.7
100	98.68 ± 0.85	98.7 ± 0.8	
Göl suyu	0	-	-
	10	9.76 ± 0.31	97.6 ± 3.1
	50	49.12 ± 1.02	98.2 ± 2.0
	100	95.35 ± 0.83	95.4 ± 0.8

Sertifikalı referans madde için geri kazanım hesaplaması:

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{C_{\text{bulunan}}}{C_{\text{gerçek}}} \times 100 \quad (3)$$

C_{bulunan} : CRM' nin analizi sonucu elde edilen değer

$C_{\text{gerçek}}$: CRM' deki sertifika değeri

Belli değerlerde ekleneme yapılmış numune için geri kazanım hesaplaması:

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{C_{\text{bulunan}} - C_{\text{başlangıç}}}{C_{\text{eklenen}}} \times 100 \quad (4)$$

C_{bulunan} : Ekleme yapıldıktan sonra elde edilen derişim değeri (mg kg⁻¹)

$C_{\text{başlangıç}}$: Ekleme yapılmadan önce elde edilen derişim değeri (mg kg⁻¹)

C_{eklenen} : Numuneye eklenen derişim değeri (mg kg⁻¹)

Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.11'den görüldüğü üzere, Cd(II) tayini için geliştirilen MDES-DLLME yönteminin CRM, çeşitli su ve deniz canlısı türlerine uygulanması sonucu elde edilen yüksek geri kazanımlar yöntemin gerçek numunelerde ekstraksiyonu ve tayini için başarılı bir yöntem olduğunu kanıtlamaktadır.

4.4. MDES-DLLME Yönteminin Yeşillik Değerlendirmesi

Bölüm 2.5.1'de, günümüzde yeşillik değerlendirmelerinde en sık kullanılan yöntemlerin KompleksGAPI, AGREE ve AGREEprep yöntemlerinin olduğu detaylı olarak açıklanmış olup, bu yöntemlerin hangi kriterleri temel aldığı detaylı olarak verilmiştir. Bu doğrultuda CV ve Cd(II) için geliştirilmiş olan MDES-DLLME yönteminin yeşil kimyaya ne kadar uygun olduğunu belirlemek ve karşılaştırmak amacıyla söz konusu yeşillik değerlendirme yöntemleri kullanılmıştır. Yeşillik değerlendirmesi her ne kadar bir yazılım üzerinden hesaplanırsa da, yazılımdaki parametreler kullanıcı yorumlaması ile doldurulduğu için oldukça dikkatli ve dürüst bir şekilde hesaplamalar yapmak önemlidir.

KompleksGAPI, geliştirilen bir yöntemin yeşilliğini değerlendirmek için geliştirilen en yeni araçtır. Bu araç, çevre dostu analitik prosedürlerin değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılan kriterleri değerlendirir [169]. KompleksGAPI, örnek toplama ve hazırlamadan kullanılan kimyasallara ve ekipmanlara, atık üretimi ve enerji kullanımına kadar tüm yöntemi kapsamlı olarak inceleyen beş beşgenle sembolize edilmektedir. Değerlendirmenin altında bulunan altıgen şekil ise ön analiz işlemlerini temsil eder. Bu ölçek üzerindeki kırmızı renk, çevreye önemli bir tehlikeyi belirtirken, yeşil ve sarı renkler sırasıyla orta ve küçük riskleri belirtir [169]. Ekstraksiyon yöntemleri, merkezde bulunan beşgenin ortasındaki kırmızı bir bölgede ifade edilir ve merkezde bulunan daire prosedürün yeterliliğini ifade eder [170, 171].

AGREE ölçütü, yeşil analitik kimyanın (GAC) 12 ilkesine dayanır ve yeşillik derecesi 0-1 arasında bir ölçekle ifade edilir [172]. AGREE sonuçları, genel puanı merkezde ve her bir GAC ilkesine ait puanı dışarıda dairesel bir şekil ile sunulur. Kırmızı-sarı-yeşil renk ölçeği, 12 değerlendirme ilkesindeki yeşillik derecesini temsil eder.

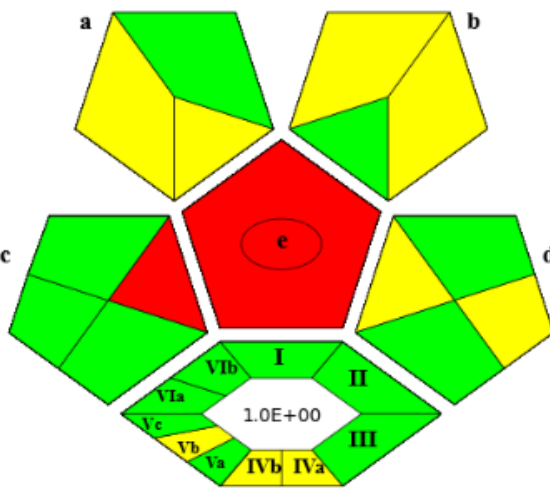

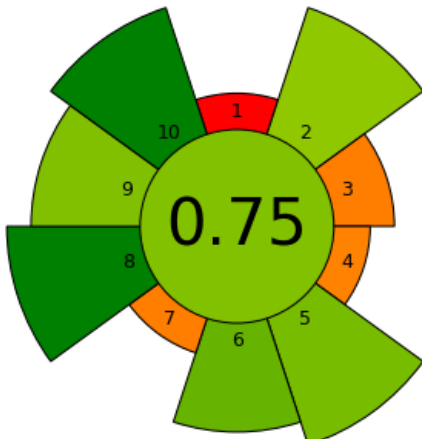
AGREEprep örnek hazırlığına odaklanan kapsamlı bir sürdürülebilirlik değerlendirmesi yapılmasına olanak sağlamaktadır. [172]. Bu değerlendirme aracı, 10 etki kategorisine

dayanır ve yeşillik derecesi 0-1 ölçeğinde hesaplanır. Yeşillik değerlendirilmesi AGREE'deki gibi tüm değerlendirme kategorilerinin kırmızıdan yeşile kadar tek tek belirtildiği dairesel bir şekil ile sunulur. Hem AGREE' de hem de AGREEprep' te değerlendirme skoru şeklin merkezindeki puan ile ifade edilir. Literatürde, bir metodun yeşil olarak kabul edilmesi için en az 0.6 puan alması gerektiği belirtilmektedir [173].

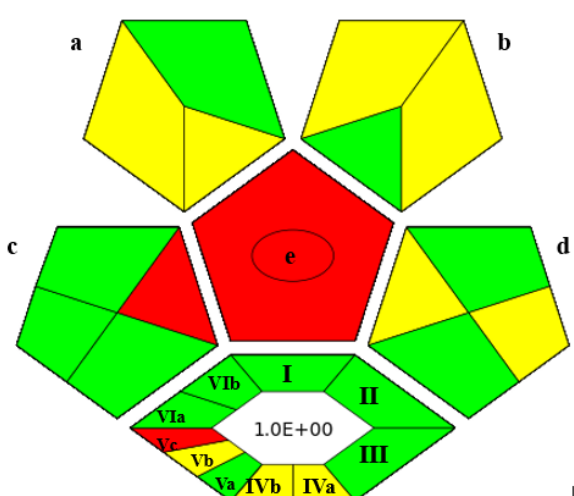

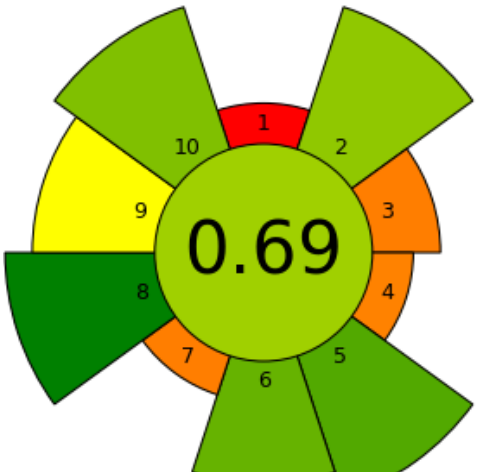
Tüm bu bilgiler ışığında yapılan değerlendirmeler sonucu CV için geliştirilen MDES-DLLME yönteminin yeşillik durumu Çizelge 4.12'de Cd(II) için ise Çizelge 4.13'te sunulmuştur.

KompleksGAPI yönteminde oluşturulan piktogramın toplamında yeşil renk ne kadar fazla yoğunlukta ise yöntem o kadar yeşil bir yöntemdir yorumu yapılmaktadır. Hem CV hem de Cd(II) için geliştirilmiş olan MDES-DLLME yöntemlerinde kompleks GAPI hesaplamaları genel olarak yeşil renk çoğunlukta olduğu için yöntem yeşil bir yöntem olarak değerlendirilebilmektedir.

Çizelge 4. 11. CV için geliştirilen MDES-DLLME'nin üç farklı yöntem ile yeşillik değerlendirmesi

<p>Kompleks GAPI</p>		<p>a: Reaktifler ve çözücüler b: Reaktif miktarı c: Örnek hazırlığı d: Enstrümantal yöntem e: Metot tipi I: Verim II: Sıcaklık/zaman III: Karşılanan kural sayısı IVa: Sağlık tehlikesi IVb: Güvenlik tehlikesi Va: Teknik kurulum Vb: Enerji Vc: Mesleki tehlike VIa: Saflaştırma VIb: Safılık</p>
<p>AGREE</p>		<p>1: Örnek hazırlama 2: Örnek hacmi 3: In-situ analiz 4: Analitik süreçlerdeki enerji kullanılan adım sayısı 5: Yöntem otomasyonu 6: Türevlendirme 7: Atık 8: Analit sayısı&Örnek sayısı/1 saat 9: Analiz yöntemi ve enerji kullanımı 10: Yenilenebilir kaynaklı reaktifler 11: Reaktif toksisitesi 12: Analizci güvenliği</p>
<p>AGREEprep</p>		<p>1: İn-situ analiz 2: Güvenli reaktif ve çözücü 3: Sürdürülebilir, yenilenebilir kimyasallar 4: Atık 5: Minimal reaktif ve çözücü kullanımı 6: Örnek sayısı/1saat 7: Yöntem otomasyonu 8: Enerji kullanımı 9: Analiz yöntemi 10: Analizci güvenliği</p>

Çizelge 4. 12. Cd için geliştirilen MDES-DLLME MDES-DLLME'nin üç farklı yöntem ile yeşillik değerlendirmesi

<p>Kompleks GAPI</p>		<p>a: Reaktifler ve çözücüler b: Reaktif miktarı c: Örnek hazırlığı d: Enstrümantal yöntem e: Metot tipi I: Verim II: Sıcaklık/zaman III: Karşılanaan kural sayısı IVa: Sağlık tehlikesi IVb: Güvenlik tehlikesi Va: Teknik kurulum Vb: Enerji Vc: Mesleki tehlike VIa: Saflaştırma VIb: Sıfık</p>
<p>AGREE</p>		<p>1: Örnek hazırlama 2: Örnek hacmi 3: In-situ analiz 4: Analitik süreçlerdeki enerji kullanılan adım sayısı 5: Yöntem otomasyonu 6: Türevlendirme 7: Atık 8: Analit sayısı&Örnek sayısı/1 saat 9: Analiz yöntemi ve enerji kullanımı 10: Yenilenebilir kaynaklı reaktifler 11: Reaktif toksisitesi 12: Analizci güvenliği</p>
<p>AGREEprep</p>		<p>1: İn-situ analiz 2: Güvenli reaktif ve çözücü 3: Sürdürülebilir, yenilenebilir kimyasallar 4: Atık 5: Minimal reaktif ve çözücü kullanımı 6: Örnek sayısı/1saat 7: Yöntem otomasyonu 8: Enerji kullanımı 9: Analiz yöntemi 10: Analizci güvenliği</p>




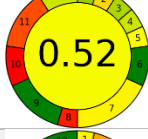
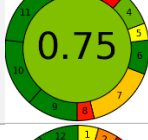
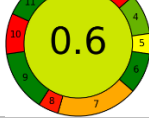
AGREE ve AGREEprep yöntemlerinde hesaplanan sonuç 1'e ne kadar yakınsa, piktoqramın iç çemberindeki yeşil rengi o kadar koyulaşmaktadır. CV ve Cd(II) için her ne kadar benzer iki yöntem geliştirilmiş olsa da, CV tayini UV-Vis spektrofotometre ile, Cd(II) tayini ise FAAS ile yapılmaktadır. Ek olarak Cd(II) için geliştirilen yöntemde DTZ ile türevlendirme yapılmaktadır. Hem iki spektrofotometrenin kullanım enerjisindeki farklılıklar hem de türevlendirme işleminin olması nedeniyle CV için geliştirilen metodun yeşillik düzeyi, Cd için olandan biraz daha yüksek çıkmış olsa da, her iki yöntem için elde edilen sonuç 0.6'dan büyük olduğu için yeşil kimya prensiplerine uygun oldukları sonucuna ulaşılmıştır.



4.3. MDES-DLLME Yönteminin Diğer Literatür Yöntemleriyle Karşılaştırılması

Bu tez çalışması kapsamında önerilen MDES-DLLME yöntemi, literatürde var olan CV ve Cd(II)' un benzer matrislerde tayin edildiği diğer çalışmalarla performans özellikleri bakımından karşılaştırılmıştır. MDES-DLLME yönteminin sonuçlarını karşılaştırmak için yardımcı ekipman, prosedür sıcaklığı, çözücü miktarı, örnek miktarı, toplam ekstraksiyon süresi, tespit sınırı (LOD), zenginleştirme faktörü (EF), doğrusal aralık ve bağıl standart sapma (%RSD) gibi çok çeşitli parametreler göz önünde bulundurulmuştur. Ek olarak bu tez çalışması kapsamında geliştirilen yöntemlerin yeşillik derecesini, literatürdeki diğer yöntemlerin yeşillik derecesi ile kıyaslayabilmek amacıyla AGREE yöntemi seçilmiş ve her çalışmanın yeşilliği hesaplanmıştır.

Hem CV hem de Cd(II) için karşılaştırma tablosundaki çalışmalar değerlendirildiğinde yukarıda bahsedilen karşılaştırma parametrelerinden en az birinin tablodaki diğer metodlardan daha iyi olduğu görülmektedir. Ayrıca CV için sunulan çalışmanın yeşillik skoru tablodaki tüm çalışmalardan daha yüksektir. Cd için hesaplanan yeşillik skoru ise tablodaki diğer çalışmaların skorları ile rekabet edebilecek yüksekliktedir.

Çizelge 4. 13. CV için geliştirilen MDES-DLLME Yönteminin Diğer Literatür Yöntemleriyle Karşılaştırılması

Yöntem	Analiz tekniği	örnek	Yardımcı ekipman	Sıcaklık (°C)	Süre (dak)	Örnek hacmi (mL)	Solvent/ miktarı (mL)	EF	Lineer aralık ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% RSD	AGREE	ref
MCPE ¹	UV-Vis	Atık su	santrifüj	Oda sıcaklığı	Min 6	10	Etanol (40)	85.47	100-800	5.1	17.6	4.50		[11]
CPE ²	UV-Vis	Su	-	40	25	10	Etanol (500)	20	16-1000	4.8	-	-		[5]
MIP-SPE ³	HPLC	Deniz suyu ve deniz ürünleri	-	Oda sıcaklığı	37.5	5	Metanol (1000)	5	0-200	0.1	0.35	4.62		[174]
SPE ve sıvı ekstraksiyonu ⁴	UPLC-MS-MS	Deniz ürünleri	-	oda	66	5	Diklorometan+ metil alkol+ asetonitril (8000)	-	25-100	0.15	0.5	10.4		[9]
DES-SS-DLLME ⁵	UV-Vis	Balık	santrifüj	Oda sıcaklığı	12	10	Methanol (500)	157	1.0-500	0.28	0.97	3.9		[24]
IL-DLLME-ZCDSP ⁶	UV-Vis	Balık, su	santrifüj	Oda sıcaklığı	13	15	Etanol (650)	67	10-500	1.4	-	1.7		[175]

DSP⁷	UV-Vis	su	kariştırıcı	-	15	100	DMF,asetik asit (5)	19.6	30-300	9	3	1.99		[176]
MDES-DLLME	UV-Vis	Su ve balık	ultrason	Oda sıcaklığı	4	10	Aseton 500 µL	22	10-500	1.13	3.75	5.95		Tez çalışması

MCPE¹: Micro-cloud Point extraction

CPE²: Cloud point extraciton

MIP-SPE³: Molecularly imprinted polymers-Solid phase extraction

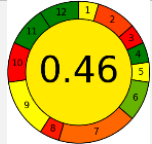





SPE⁴: Solid phase extraction



DES-SS-DLLME⁵: Derin eutectic solvent- salt saturated- dispersive liquid-liquid microextraction

IL-DLLME-ZCDSP⁶: Ionic liquid- dispersive liquid-liquid microextraction- Zero-crossing first derivative spectrophotometric

DSP⁷: Dispersive solid phase

Çizelge 4. 14. Cd için geliştirilen MDES-DLLME Yönteminin Diğer Literatür Yöntemleriyle Karşılaştırılması

Yöntem	Analiz tekniği	Örnek	Yardımcı ekipman	Sıcaklık (°C)	Süre (dak)	Örnek hacmi (mL)	Solvent türü/ miktarı (mL)	EF	Lineer aralık ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% RSD	Agree	ref
DLLME⁸	ICP-OES	Deniz ürünü	Santrifüj	Oda sıcaklığı	3	40	Trikloroetilen/ (200)- etanol/(5000)	16	0.13-100.00	0.03	0.13	-		[177]
UA-TC-ILME⁹	FAAS	Deniz ürünü	Santrifüj	80	15	5	Ionic liquid/(60)	40	0.5-15.0	0.10	0.33	1.5		[178]
SPE⁴	ETAAS	Deniz ürünü	-	Oda sıcaklığı	11	25	HNO ₃ /(2000)	12.5	0-0.24	0.15	0.52	2		[179]
ligandless ILME¹⁰	FAAS	Su, biyolojik örnek	Santrifüj	Oda sıcaklığı	10	10	Ionic liquid/ (100/)-etanol (500)	50	10-200	0.4	1.3	4.3		[180]
AALLME-DES¹¹	FAAS	Su ve meyve suyu	Santrifüj	Oda sıcaklığı	11	5	Methanol (200)	23.4	0.5-10	0.15	0.5	5.2		[181]
MSPME¹²	FAAS	Yengeç	Çalkalayıcı	Oda sıcaklığı	7	30	HCl (500)	31.5	-	0.24	0.80	3.3		[182]

CPE²	FAAS	Hemodiyaliz çözeltilisi ve ton balığı	Santrifüj	60	25	15	Metanol içinde 0.1 M HNO ₃ (500)	42	5-80	0.37	1.2	2.0		[183]
MDES- DLLME	FAAS	Deniz ürünleri ve su	Ultrason	40	4	10	Etanol (300 µL)	33	5-200	0.73	2.43	4.80		Tez çalışması

DLLME⁸: Dispersive liquid-liquid microextraction

UA-TC-ILME⁹: Ultrasound-assisted temperature-controlled ionic liquid microextraction

SPE⁴: Solid phase extraction

Ligandless ILME¹⁰: Ligandless ionic liquid phase microextraction

AALLME-DES¹¹: Air-assisted liquid-liquid microextraction – deep eutectic solvent

MSPME¹²: Magnetic solid-phase microextraction

CPE²: Cloud point extractiton

5. YORUM

Bu tez çalışması kapsamında, canlılar için toksik özellikli kristal viyole ve kadmiyumun sulu ortamlardaki ve deniz canlılarındaki eser düzeyde miktar tayinleri için basit, hızlı, ucuz ve yeşil analitik kimya anlayışı ile uyumlu MDES-DLLME yönteminin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Yeşil analitik kimya prensiplerini desteklemek için yeni nesil yeşil çözücülerden biri olan derin ötektik çözücü (DES) ekstraksiyon fazı olarak seçilmiştir. Mikroekstraksiyon işleminin ardından kristal viyole miktar tayini için UV/Vis spektrofotometre, kadmiyum miktar tayini için ise mikro-örneklemeli FAAS kullanılmıştır.

Bu kapsamda, geliştirilmiş olan MDES-DLLME yöntemi için öncelikle en verimli pH değeri, ekstraksiyon çözücüsünün derişimi ve hacmi, ekstraksiyon sıcaklığı ve süresi gibi ekstraksiyon verimini etkileyebilecek tüm parametreler optimize edilmiştir. Çalışılan parametrelerin optimum değerleri tayin edilen türe ve tayin yöntemine göre değişiklik gösterebilmektedir. Bu tezin “Sonuçlar ve Tartışma” bölümünde ayrıntılı olarak sunulduğu üzere, aynı zenginleştirme metodu her iki analit için de başarı ile uygulanmıştır yorumu yapılabilmektedir.

Önerilen metodun yeşil analitik kimya yaklaşımına uygunluğu Kompleks GAPI, AGREE ve AGREEprep yaklaşımları ile değerlendirilmiş ve her üç yaklaşıma göre de yeşil ve çevre dostu bir yöntem olduğu gösterilmiştir.

Bu tezin öne çıkan bazı özellikleri bulunmaktadır. Sanayi devrimi ile birlikte, bilim ve teknoloji çağında gerçekleştirilen icatların çoğu, genellikle toksik kimyasalların kullanımı, yüksek enerji tüketimi ve büyük hacimli üretimler gerektirmektedir. Bu durum, başta insanlar olmak üzere tüm canlıların sağlığını tehlikeye sokmuş ve artan toplum ve çevre bilinci ile "yeşil kimya" nın ortaya çıkışına zemin hazırlamıştır. Bu bağlamda, literatürde hem kristal viyolenin hem de kadmiyum zenginleştirilmesi ve tayini ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak bu çalışmaların büyük bir çoğunluğu yeşil kimya ilkelerini karşılamamaktadır. Dolayısı ile, bu tez kapsamında geliştirilmiş olan MDES-DLLME yönteminin daha az enerji tüketimi, toksik olmayan çözücülerin kullanılması, düşük hacimlerde mikro analizler ile yeşil kimya gereklilikleri

doğrultusunda geliştirilmesi, aynı zamanda geliştirilen yöntemin ne derecede yeşil olduğunu gösteren yazılımlar ile yöntemin yeşillik değerlendirmesinin kanıtlanmış olması bu tezin önemli değerlerindedir.

Ayrıca, literatürde yeşil ekstraksiyon çözücüsü olarak sıklıkla çeşitli tاینlerde kullanılmış olan DES'in, magnetik nanopartikül ile beraber kullanılarak magnetik nanoakışkan sıvı özelliğine kavuşturulması ve bu özelliği sayesinde enerji tüketen santrifüj kullanımına ihtiyaç duyulmadan, ekstraksiyon fazı ayırımının kolaylıkla sağlanması yöntemin öne çıkan bir diğer önemli üstünlüğüdür.

Literatürde bulunan düşük tekrarlanabilirlik ve el hassasiyeti isteyen diğer mikroekstraksiyon yöntemlerine kıyasla, tekrarlanabilirliği yüksek, el hassasiyeti düşük, hızlı bir teknik olan sıvı faz mikroekstraksiyon yönteminin magnetik nanoakışkan bir ekstraksiyon çözücüsü ile harmanlanması geliştirilen yöntemi olumlu etkilemiştir.

Son olarak, geliştirilen yöntemin öne çıkan özellikleri şu şekilde özetlenebilir:

- (i) geleneksel organik çözücülere kıyasla pratik hazırlama, kolay depolama, düşük maliyet, düşük uçuculuk ve toksik olmama özelliklerine sahip yeşil ekstraksiyon çözücüsü kullanılması,
- (ii) kullanılan ultrasonik enerji sayesinde hızlı dağılım ve kütle transferi sağlanması ve kısa ekstraksiyon süreleri elde edilmesi,
- (iii) magnetik özellikli DES kullanımı sayesinde enerjiye ihtiyaç duymadan faz ayırımının sağlanması,
- (iv) mikro-örneklemeli FAAS sistemi sayesinde μL hacminde örnekler analiz edilerek yüksek ekstraksiyon verimi elde edilmesi,
- (v) pahalı ve maliyetli cihazların LOD değerlerinin, ucuz ve kullanımı kolay UV/Vis spektrofotometre ve FAAS ile elde edilmesi.
- (vi) Yeşil analitik kimya prensiplerine uyum sağlanması.

Tüm bu avantajlar göz önünde bulundurulduğunda, önerilen MDES-DLLME yönteminin sulu ortamlardaki ve deniz canlılarındaki kristal viyole ve kadmiyum tayini için doğruluğu, ekstraksiyon verimi ve hassasiyeti yüksek, tekrarlanabilirliği iyi ve matris etkilerinden uzak yeşil bir yöntem olduğu sonucuna varılabilir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Wyness, L. and A. O'Connor, *Emerging science: an update*. Nutrition Bulletin, 2011. **36**(1): p. 1-3.
- [2] Domingo, J.L., et al., *Benefits and risks of fish consumption: Part I. A quantitative analysis of the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants*. Toxicology, 2007. **230**(2): p. 219-226.
- [3] Kumar, M., et al., *A review on heavy metal-induced toxicity in fishes: Bioaccumulation, antioxidant defense system, histopathological manifestations, and transcriptional profiling of genes*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2023.
- [4] Xie, J., et al., *Determination of malachite green, crystal violet and their leuco-metabolites in fish by HPLC-VIS detection after immunoaffinity column clean-up*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2013. **913-914**: p. 123-8.
- [5] An, L., et al., *Simultaneous spectrophotometric determination of trace amount of malachite green and crystal violet in water after cloud point extraction using partial least squares regression*. J Hazard Mater, 2010. **175**(1-3): p. 883-8.
- [6] Haider, F.U., et al., *Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies*. Ecotoxicol Environ Saf, 2021. **211**: p. 111887.
- [7] Wu, X., et al., *Simultaneous determination of malachite green, gentian violet and their leuco-metabolites in aquatic products by high-performance liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2007. **1172**(2): p. 121-6.
- [8] Allen, J.L. and J.R. Meinertz, *Post-column reaction for simultaneous analysis of chromatic and leuco forms of malachite green and crystal violet by high-performance liquid chromatography with photometric detection*. Journal of Chromatography A, 1991. **536**: p. 217-222.
- [9] Xu, Y.J., et al., *Simultaneous determination of malachite green, crystal violet, methylene blue and the metabolite residues in aquatic products by ultra-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry*. J Chromatogr Sci, 2012. **50**(7): p. 591-7.
- [10] Eisapour, M., F. Shemirani, and B. Majidi, *The ultratrace detection of crystal violet in fish and environmental water samples using cold-induced aggregation microextraction based on ionic liquid (IL-CIAME)*. Analytical Methods, 2013. **5**(20).
- [11] Ghasemi, E. and M. Kaykhaii, *Application of Micro-cloud point extraction for spectrophotometric determination of Malachite green, Crystal violet and Rhodamine B in aqueous samples*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2016. **164**: p. 93-97.
- [12] Orellana, S., C. Soto, and M.I. Toral, *UV-vis, IR and ¹H NMR spectroscopic studies and characterization of ionic-pair crystal violet-oxytetracycline*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2010. **75**(1): p. 437-43.
- [13] Ebrar Karlidag, N., et al., *Development of copper nanoflowers based dispersive solid-phase extraction method for cadmium determination in shalgam juice samples using slotted quartz tube atomic absorption spectrometry*. Food Chem, 2022. **396**: p. 133669.
- [14] Lemes, L.F.R. and C.R.T. Tarley, *Combination of supramolecular solvent-based microextraction and ultrasound-assisted extraction for cadmium determination*

- in flaxseed flour by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry.* Food Chem, 2021. **357**: p. 129695.
- [15] Yılmaz, S., et al., *Vortex-assisted dispersive solid-phase microextraction of cadmium and copper on magnetic polystyrene-b- poly dimethyl siloxane hydrophobic block copolymer for their atomic absorption spectrometric determination in water, soft drink and food samples.* Journal of Food Composition and Analysis, 2023. **123**.
- [16] Kumata, H., et al., *Elimination of interfering molybdenum oxyanion with an anion-exchange monolithic spin tip (AXTip) for precise determination of cadmium in human urine by ICP-MS.* Talanta Open, 2020. **2**.
- [17] Teran-Baamonde, J., et al., *Determination of cadmium in sediments by diluted HCl extraction and isotope dilution ICP-MS.* Talanta, 2018. **186**: p. 272-278.
- [18] Wang, X., et al., *Ore genesis of the Bayanbaolege Ag-Pb-Zn deposit, NE China: Constraints on LA-ICP-MS studies of cadmium and related trace elements in sulfides.* Ore Geology Reviews, 2024. **164**.
- [19] Davudabadi Farahani, M., et al., *Ionic Liquid as a Ferrofluid Carrier for Dispersive Solid Phase Extraction of Copper from Food Samples.* Food Analytical Methods, 2015. **8**(8): p. 1979-1989.
- [20] dos Santos, H.C., M.G.A. Korn, and S.L.C. Ferreira, *Enrichment and determination of molybdenum in geological samples and seawater by ICP-AES using calmagite and activated carbon.* Analytica Chimica Acta, 2001. **426**(1): p. 79-84.
- [21] Kasa, N.A., et al., *Determination of cadmium at trace levels in parsley samples by slotted quartz tube-flame atomic absorption spectrometry after preconcentration with cloud point extraction.* Measurement, 2019. **147**: p. 106841.
- [22] Soylak, M., et al., *Fe₃O₄-SiO₂-MIL-53 (Fe) nanocomposite for magnetic dispersive micro-solid phase extraction of cadmium (II) at trace levels prior to HR-CS-FAAS detection.* Food Chemistry, 2023. **429**: p. 136855.
- [23] Šafařík, I. and M. Šafaříková, *Detection of low concentrations of malachite green and crystal violet in water.* Water research, 2002. **36**(1): p. 196-200.
- [24] Mirzaii, F. and S.H. Hashemi, *Salt saturated dispersive liquid-liquid microextraction of crystal violet from fish and seawater samples based on camphor-thymol based hydrophobic deep eutectic solvent optimized by response surface methodology.* Journal of Food Composition and Analysis, 2024. **126**.
- [25] Shishov, A., et al., *Reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction based on decomposition of deep eutectic solvent for the determination of lead and cadmium in vegetable oil.* Food Chem, 2022. **373**(Pt B): p. 131456.
- [26] Touzi, H., et al., *Detection of dyestuffs with an impedimetric sensor based on Cu²⁺-methyl-naphthyl cyclen complex functionalized gold electrodes.* Sensors and Actuators B: Chemical, 2018. **273**: p. 1211-1221.
- [27] Velusamy, S., et al., *A review on heavy metal ions and containing dyes removal through graphene oxide-based adsorption strategies for textile wastewater treatment.* The Chemical Record, 2021. **21**(7): p. 1570-1610.
- [28] Ashkar, M., et al., *One-minute ultrasound-assisted synthesis of nanostructured silver particles extracted from Desmodium gangeticum for enhanced photocatalytic degradation of toxic dyes and antibacterial studies.* Chemical Physics Letters, 2023. **831**: p. 140850.

- [29] Mittal, A., J. Mittal, and L. Kurup, *Batch and bulk removal of hazardous dye, indigo carmine from wastewater through adsorption*. Journal of Hazardous Materials, 2006. **137**(1): p. 591-602.
- [30] Unuabonah, E.I., K.O. Adebawale, and F.A. Dawodu, *Equilibrium, kinetic and sorber design studies on the adsorption of Aniline blue dye by sodium tetraborate-modified Kaolinite clay adsorbent*. Journal of Hazardous Materials, 2008. **157**(2-3): p. 397-409.
- [31] Wibowo, D., et al., *Enhanced visible light-driven photocatalytic degradation supported by Au-TiO₂ coral-needle nanoparticles*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2020. **398**: p. 112589.
- [32] Ashkar, M.A., et al., *One-minute ultrasound-assisted synthesis of nanostructured silver particles extracted from *Desmodium gangeticum* for enhanced photocatalytic degradation of toxic dyes and antibacterial studies*. Chemical Physics Letters, 2023. **831**.
- [33] Velusamy, S., et al., *A Review on Heavy Metal Ions and Containing Dyes Removal Through Graphene Oxide-Based Adsorption Strategies for Textile Wastewater Treatment*. The Chemical Record, 2021. **21**(7): p. 1570-1610.
- [34] Mittal, A., J. Mittal, and L. Kurup, *Batch and bulk removal of hazardous dye, indigo carmine from wastewater through adsorption*. J Hazard Mater, 2006. **137**(1): p. 591-602.
- [35] Unuabonah, E.I., K.O. Adebawale, and F.A. Dawodu, *Equilibrium, kinetic and sorber design studies on the adsorption of Aniline blue dye by sodium tetraborate-modified Kaolinite clay adsorbent*. J Hazard Mater, 2008. **157**(2-3): p. 397-409.
- [36] Wibowo, D., et al., *Enhanced visible light-driven photocatalytic degradation supported by Au-TiO₂ coral-needle nanoparticles*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2020. **398**.
- [37] Hunge, Y.M., et al., *A highly efficient visible-light responsive sprayed WO₃/FTO photoanode for photoelectrocatalytic degradation of brilliant blue*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2018. **85**: p. 273-281.
- [38] Sagar, K.A., et al., *Determination of Gentian Violet in human urine and poultry feed by high performance liquid chromatography with electrochemical detection using a carbon fibre microelectrode flow cell*. Talanta, 1995. **42**(2): p. 235-242.
- [39] Hakami, A.A.H., et al., *Extraction Procedures and Analytical Methods for the Determination of Methylene Blue, Rhodamine B and Crystal Violet - An Overview*. Current Analytical Chemistry, 2021. **17**(5): p. 708-728.
- [40] Parshetti, G.K., et al., *Biodegradation of crystal violet by *Agrobacterium radiobacter**. J Environ Sci (China), 2011. **23**(8): p. 1384-93.
- [41] Nguyen, P.T., et al., *Application of deep eutectic solvent from phenol and choline chloride in electrolyte to improve stability performance in dye-sensitized solar cells*. Journal of Molecular Liquids, 2019. **277**: p. 157-162.
- [42] Lee, J.B., et al., *Determination of malachite green and crystal violet in processed fish products*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2010. **27**(7): p. 953-61.
- [43] Aydin, F., E. Yilmaz, and M. Soylak, *A simple and novel deep eutectic solvent based ultrasound-assisted emulsification liquid phase microextraction method for malachite green in farmed and ornamental aquarium fish water samples*. Microchemical Journal, 2017. **132**: p. 280-285.

- [44] LeFauve, M.K. and V.P. Connaughton, *Developmental exposure to heavy metals alters visually-guided behaviors in zebrafish*. *Curr Zool*, 2017. **63**(2): p. 221-227.
- [45] Shishehbore, M.R. and M. Safaei, *11 - The use of FNMs-based electrochemical sensors in the food and beverage industry*, in *Functionalized Nanomaterial-Based Electrochemical Sensors*, C.M. Hussain and J.G. Manjunatha, Editors. 2022, Woodhead Publishing. p. 207-259.
- [46] Santos, D., et al., *Zebrafish Early Life Stages for Toxicological Screening: Insights From Molecular and Biochemical Markers*. 2018. p. 151-179.
- [47] Fasae, K.D. and A.O. Abolaji, *Interactions and toxicity of non-essential heavy metals (Cd, Pb and Hg): lessons from Drosophila melanogaster*. *Curr Opin Insect Sci*, 2022. **51**: p. 100900.
- [48] Thornton, I., *Geochemistry of cadmium*, in *Cadmium in the Environment*. 1986, Springer. p. 7-12.
- [49] Wuana, R.A. and F.E. Okieimen, *Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation*. ISRN Ecology, 2011. **2011**: p. 1-20.
- [50] Raikwar, M.K., et al., *Toxic effect of heavy metals in livestock health*. *Veterinary world*, 2008. **1**(1): p. 28.
- [51] Xue, S., et al., *A microscale solid-phase extraction poly(dimethylsiloxane) chip for enrichment and fluorescent detection of metal ions*. *Talanta*, 2013. **116**: p. 1005-9.
- [52] Wang, Z., et al., *On-site separation and enrichment of heavy metal ions in environmental waters with multichannel in-tip microextraction device based on chitosan cryogel*. *Microchemical Journal*, 2022. **175**.
- [53] PELVAN, H.E., *Organik ve Konvansiyonel Tarım Ürünlerinde Eser Düzeydeki Bakır, Kadmiyum ve Kurşun İyonlarının Değişirilebilir Çözücü Bazlı Sıvı Faz Mikroekstraksiyonu ve Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometrisi İle Tayini*. 2020.
- [54] Zaabar, A., et al., *Effect of nettle plant extract on the cementation of copper onto zinc in acidic sulfate solutions*. *Hydrometallurgy*, 2013. **136**: p. 58-64.
- [55] Starvin, A.M., *Offline and online solid phase extraction/preconcentration of inorganics*. 2005.
- [56] Rao, T.P., P. Metilda, and J.M. Gladis, *Preconcentration techniques for uranium(VI) and thorium(IV) prior to analytical determination-an overview*. *Talanta*, 2006. **68**(4): p. 1047-64.
- [57] Pazourek, J., et al., *Separation of polyphenols in Canary Islands wine by capillary zone electrophoresis without preconcentration*. *Journal of Chromatography A*, 2000. **874**(1): p. 111-119.
- [58] MASHKOURI, N.N., P. Shakeri, and E. Ghasemi, *Separation and preconcentration of ultra traces of some heavy metals in environmental samples by electrodeposition technique prior to flame atomic absorption spectroscopy determination (ED-FAAS)*. 2010.
- [59] Hsieh, M.M., W.L. Tseng, and H.T. Chang, *On-column preconcentration and separation of DNA fragments using polymer solutions in the presence of electroosmotic flow*. *Electrophoresis*, 2000. **21**(14): p. 2904-10.
- [60] Feist, B. and B. Mikula, *Preconcentration of some metal ions with lanthanum-8-hydroxyquinoline co-precipitation system*. *Food Chem*, 2014. **147**: p. 225-9.

- [61] Kataoka, H., H.L. Lord, and J. Pawliszyn, *Applications of solid-phase microextraction in food analysis*. Journal of chromatography A, 2000. **880**(1-2): p. 35-62.
- [62] Lashari, A.A., et al., *An ultrasound assisted modified solid phase micro-extraction technique for enrichment of cadmium and lead in aqueous extract of coal gangue soil samples*. Geoderma, 2023. **437**.
- [63] Hilda C. dos Santos, M.G.A.K., Sérgio L.C. Ferreira, *Enrichment and determination of molybdenum in geological samples and seawater by ICP-AES using calmagite and activated carbon*. Analytica Chimica Acta, 2000. **426**: p. 79-89.
- [64] Ghaedi, M., et al., *Cloud point extraction and flame atomic absorption spectrometric determination of cadmium(II), lead(II), palladium(II) and silver(I) in environmental samples*. J Hazard Mater, 2009. **168**(2-3): p. 1022-7.
- [65] Ahmad, H., B.H. Koo, and R.A. Khan, *Enrichment of trace Hg(II) ions from food and water samples after solid phase extraction combined with ICP-OES determination*. Microchemical Journal, 2022. **175**.
- [66] Kong, D., et al., *Sensitive fluorescence detection based on dimeric G-quadruplex combined with enzyme-assisted solid-phase microextraction of streptomycin in honey*. Food Chem, 2024. **442**: p. 138505.
- [67] Kestane, F., *Katı faz mikroekstraksiyonu ile malahit yeşili boyar maddesinin ayrılması-zenginleştirilmesi ve spektrofotometrik tayini*. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [68] Arthur, C.L. and J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers*. Analytical chemistry, 1990. **62**(19): p. 2145-2148.
- [69] Pawliszyn, J., *Solid-Phase Microextraction in Perspective*, in *Handbook of Solid Phase Microextraction*. 2012. p. 1-12.
- [70] Campillo, N., et al., *Liquid-phase microextraction: update May 2016 to December 2018*. Applied Spectroscopy Reviews, 2019. **55**(4): p. 307-326.
- [71] Bidabadi, M.S., S. Dadfarnia, and A.M. Shabani, *Solidified floating organic drop microextraction (SFODME) for simultaneous separation/preconcentration and determination of cobalt and nickel by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS)*. J Hazard Mater, 2009. **166**(1): p. 291-6.
- [72] Liu, S. and P.K. Dasgupta, *Liquid droplet. A renewable gas sampling interface*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(13): p. 2042-2049.
- [73] Xu, L., C. Basheer, and H.K. Lee, *Developments in single-drop microextraction*. J Chromatogr A, 2007. **1152**(1-2): p. 184-92.
- [74] Williams, D.B., et al., *Bubbles in solvent microextraction: the influence of intentionally introduced bubbles on extraction efficiency*. Anal Chem, 2011. **83**(17): p. 6713-6.
- [75] Wijethunga, P.A., et al., *On-chip drop-to-drop liquid microextraction coupled with real-time concentration monitoring technique*. Anal Chem, 2011. **83**(5): p. 1658-64.
- [76] Tang, S., et al., *Single-drop microextraction*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2018. **108**: p. 306-313.
- [77] Shokrollahi, A., et al., *Cloud point extraction and flame atomic absorption spectrometry combination for copper(II) ion in environmental and biological samples*. J Hazard Mater, 2008. **160**(2-3): p. 435-40.

- [78] Şatıroğlu, N. and Ç. Arpa, *Cloud point extraction for the determination of trace copper in water samples by flame atomic absorption spectrometry*. *Microchimica Acta*, 2008. **162**(1-2): p. 107-112.
- [79] Liu, J.-L., et al., *A resorcinarene based chelating agent for selective cloud point extraction of Pb²⁺ ions in water: Synthesis, structural characterization and analytical applications*. *Arabian Journal of Chemistry*, 2023. **16**(7).
- [80] Liang, H., et al., *Selective cloud point extraction of uranium from thorium and lanthanides using Cyanex 301 as extractant*. *Separation and Purification Technology*, 2019. **210**: p. 835-842.
- [81] Ghaedi, M., et al., *Development of efficient method for preconcentration and determination of copper, nickel, zinc and iron ions in environmental samples by combination of cloud point extraction and flame atomic absorption spectrometry*. *Open Chemistry*, 2009. **7**(1): p. 148-154.
- [82] Di Giacomo, M., et al., *Cloud point extraction based on non-ionic surfactants: An ecofriendly tool for recovering papain from papaya latex*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2022. **10**(6).
- [83] Kenanoğlu, Ö., *Alevli atomik absorpsiyon spektrometrisi kullanılarak su örneklerinde eser miktardaki Hg (II) iyonlarının tayini için katılaştırılmış yüzen organik damla ile ultrason-destekli emülsifikasyon mikroekstraksiyonunun uygulanması*. 2014, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [84] Moema, D., et al., *Hollow fiber liquid phase microextraction of fluoroquinolones in chicken livers followed by high pressure liquid chromatography: Greenness assessment using National Environmental Methods Index Label (NEMI), green analytical procedure index (GAPI), Analytical GREEnness metric (AGREE), and Eco Scale*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2023. **117**.
- [85] Isabella Cestaro, B., et al., *Hollow-fiber liquid phase microextraction for determination of fluoxetine in human serum by nano-liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2024. **1234**: p. 124018.
- [86] Khan, W.A., et al., *Hollow fiber-based liquid phase microextraction followed by analytical instrumental techniques for quantitative analysis of heavy metal ions and pharmaceuticals*. *J Pharm Anal*, 2020. **10**(2): p. 109-122.
- [87] Oliveira Martins, R., et al., *Hollow fiber liquid-phase microextraction of multiclass pesticides in soil samples: A green analytical approach for challenging environmental monitoring analysis*. *Microchemical Journal*, 2023. **193**.
- [88] Liu, Q., et al., *Hierarchical porous zeolitic imidazolate framework-8 supported hollow-fiber liquid-phase microextraction of nine typical phenolic pollutants in water samples followed by electrophoretic analysis*. *J Chromatogr A*, 2023. **1706**: p. 464264.
- [89] Díaz-Álvarez, M., E. Turiel, and A. Martín-Esteban, *Hydrophobic natural deep eutectic solvents based on L-menthol as supported liquid membrane for hollow fiber liquid-phase microextraction of triazines from water and urine samples*. *Microchemical Journal*, 2023. **194**.
- [90] Chaikhan, P., et al., *Deep eutectic solvent-based electromembrane hollow fiber liquid phase microextraction for determining Pb in water and food samples*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2023. **118**.

- [91] Yakupova, Z., et al., *Solidified floating organic drop microextraction procedure based on deep eutectic solvent for the determination of melatonin in pharmaceuticals and dietary supplements*. *Microchemical Journal*, 2023. **187**.
- [92] Hussein, A.R., et al., *A greenness evaluation and environmental aspects of solidified floating organic drop microextraction for metals: A review*. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 2023. **37**.
- [93] Guo, X., et al., *Solidified floating organic drop microextraction combined with ETV-ICP-MS for the determination of trace heavy metals in environmental water samples*. *Talanta*, 2012. **94**: p. 70-6.
- [94] Durukan, İ., Ç. Arpa Şahin, and S. Bektaş, *Determination of copper traces in water samples by flow injection-flame atomic absorption spectrometry using a novel solidified floating organic drop microextraction method*. *Microchemical Journal*, 2011. **98**(2): p. 215-219.
- [95] Arpa Sahin, C. and I. Durukan, *Ligandless-solidified floating organic drop microextraction method for the preconcentration of trace amount of cadmium in water samples*. *Talanta*, 2011. **85**(1): p. 657-61.
- [96] Afshar Mogaddam, M.R., et al., *Dispersive solid phase extraction combined with solidification of floating organic drop-liquid-liquid microextraction using in situ formation of deep eutectic solvent for extraction of phytosterols from edible oil samples*. *J Chromatogr A*, 2020. **1630**: p. 461523.
- [97] Sajid, M., *Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with derivatization: A review of different modes, applications, and green aspects*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018. **106**: p. 169-182.
- [98] Rezaee, M., et al., *Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction*. *J Chromatogr A*, 2006. **1116**(1-2): p. 1-9.
- [99] Berijani, S., et al., *Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection. Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water*. *J Chromatogr A*, 2006. **1123**(1): p. 1-9.
- [100] Guo, P., et al., *Molecularly imprinted solid-phase extraction combined with non-ionic hydrophobic deep eutectic solvents dispersed liquid-liquid microextraction for efficient enrichment and determination of the estrogens in serum samples*. *Talanta*, 2024. **269**: p. 125480.
- [101] Gharehbaghi, M., F. Shemirani, and M. Baghdadi, *Dispersive liquid-liquid microextraction and spectrophotometric determination of cobalt in water samples*. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2008. **88**(7): p. 513-523.
- [102] Sarafraz-Yazdi, A. and A. Amiri, *Liquid-phase microextraction*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2010. **29**(1): p. 1-14.
- [103] Asati, A., et al., *Determination of organochlorine compounds in fish liver by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of organic droplet coupled with gas chromatography-electron capture detection*. *J Chromatogr A*, 2018. **1561**: p. 20-27.
- [104] Dmitrienko, S.G., et al., *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction of Organic Compounds: An Overview of Reviews*. *Journal of Analytical Chemistry*, 2020. **75**(10): p. 1237-1251.
- [105] Prat, D., J. Hayler, and A. Wells, *A survey of solvent selection guides*. *Green Chem.*, 2014. **16**(10): p. 4546-4551.

- [106] Torres-Valenzuela, L.S., A. Ballesteros-Gómez, and S. Rubio, *Green Solvents for the Extraction of High Added-Value Compounds from Agri-food Waste*. Food Engineering Reviews, 2019. **12**(1): p. 83-100.
- [107] Dai, Y., et al., *Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology*. Anal Chim Acta, 2013. **766**: p. 61-8.
- [108] Aguirre, M.Á. and A. Canals, *Magnetic deep eutectic solvents in microextraction techniques*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2022. **146**.
- [109] Lamei, N., et al., *Dispersion of magnetic graphene oxide nanoparticles coated with a deep eutectic solvent using ultrasound assistance for preconcentration of methadone in biological and water samples followed by GC-FID and GC-MS*. Anal Bioanal Chem, 2017. **409**(26): p. 6113-6121.
- [110] Liao, Y., et al., *Synthesis, immobilization and acid-catalyzed application of binary and ternary deep eutectic solvent: synthesis of diphenylamine by condensation of aniline*. Journal of Molecular Structure, 2024.
- [111] Shishov, A., et al., *Decomposition of deep eutectic solvents based on choline chloride and phenol in aqueous phase*. Journal of Molecular Liquids, 2020. **301**.
- [112] Bintanel-Cenis, J., et al., *Critical overview on the use of hydrophobic (deep) eutectic solvents for the extraction of organic pollutants in complex matrices*. Talanta, 2023. **270**: p. 125599.
- [113] Smith, E.L., A.P. Abbott, and K.S. Ryder, *Deep eutectic solvents (DESs) and their applications*. Chem Rev, 2014. **114**(21): p. 11060-82.
- [114] Kamal El-Deen, A., et al., *Applications of deep eutectic solvents in microextraction and chromatographic separation techniques: Latest developments, challenges, and prospects*. Talanta, 2023. **265**: p. 124813.
- [115] Jafari, K., M.H. Fatemi, and P. Estellé, *Deep eutectic solvents (DESs): A short overview of the thermophysical properties and current use as base fluid for heat transfer nanofluids*. Journal of Molecular Liquids, 2021. **321**.
- [116] Makoś, P., E. Słupek, and J. Gębicki, *Hydrophobic deep eutectic solvents in microextraction techniques—A review*. Microchemical Journal, 2020. **152**: p. 104384.
- [117] KESEKLER, S., *Preconcentration of Trace Heavy Metal Ions in Textiles and Determination by Flame Atomic Absorption Spectrometer*. 2022.
- [118] Zhao, B.-Y., et al., *Biocompatible Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride: Characterization and Application to the Extraction of Rutin from Sophora japonica*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2015. **3**(11): p. 2746-2755.
- [119] Morrison, H.G., C.C. Sun, and S. Neervannan, *Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles*. Int J Pharm, 2009. **378**(1-2): p. 136-9.
- [120] Liao, H.G., et al., *Shape-controlled synthesis of gold nanoparticles in deep eutectic solvents for studies of structure-functionality relationships in electrocatalysis*. Angew Chem Int Ed Engl, 2008. **47**(47): p. 9100-3.
- [121] Khezeli, T., A. Daneshfar, and R. Sahraei, *A green ultrasonic-assisted liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for the HPLC-UV determination of ferulic, caffeic and cinnamic acid from olive, almond, sesame and cinnamon oil*. Talanta, 2016. **150**: p. 577-85.
- [122] Khezeli, T. and A. Daneshfar, *Synthesis and application of magnetic deep eutectic solvents: Novel solvents for ultrasound assisted liquid-liquid microextraction of thiophene*. Ultrason Sonochem, 2017. **38**: p. 590-597.

- [123] Gómez, E., et al., *Electrodeposition of Co, Sm and SmCo from a Deep Eutectic Solvent*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2011. **658**(1-2): p. 18-24.
- [124] Abbott, A.P., et al., *Extraction of glycerol from biodiesel into a eutectic based ionic liquid*. Green Chemistry, 2007. **9**(8).
- [125] van Osch, D.J.G.P., et al., *A Search for Natural Hydrophobic Deep Eutectic Solvents Based on Natural Components*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2019. **7**(3): p. 2933-2942.
- [126] Dwamena, A.K., *Recent Advances in Hydrophobic Deep Eutectic Solvents for Extraction*. Separations, 2019. **6**(1): p. 9.
- [127] Dwamena, A.K., *Investigating anions and hydrophobicity of deep eutectic solvents by experiment and computational simulation*. 2019: South Dakota State University.
- [128] Francisco, M., et al., *A new low transition temperature mixture (LTTM) formed by choline chloride+lactic acid: Characterization as solvent for CO₂ capture*. Fluid Phase Equilibria, 2013. **340**: p. 77-84.
- [129] Bi, W., M. Tian, and K.H. Row, *Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization*. Journal of Chromatography A, 2013. **1285**: p. 22-30.
- [130] Zarei, A.R., M. Nedaei, and S.A. Ghorbanian, *Deep eutectic solvent based magnetic nanofluid in the development of stir bar sorptive dispersive microextraction: An efficient hyphenated sample preparation for ultra-trace nitroaromatic explosives extraction in wastewater*. J Sep Sci, 2017. **40**(24): p. 4757-4764.
- [131] Mehrabi, F. and M. Ghaedi, *Magnetic nanofluid based on green deep eutectic solvent for enrichment and determination of chloramphenicol in milk and chicken samples by high-performance liquid chromatography-ultraviolet: Optimization of microextraction*. J Chromatogr A, 2023. **1689**: p. 463705.
- [132] Makoś-Chełstowska, P., et al., *Magnetic deep eutectic solvents as efficient media for extraction of furfural and 5-hydroxymethylfurfural from aqueous samples*. Journal of Molecular Liquids, 2023. **390**.
- [133] Lin, Z., et al., *In-situ decomposed nanofluids dispersive liquid-phase microextraction for detection of seven triazole fungicides in fruit juices and tea drinks*. Microchemical Journal, 2022. **173**.
- [134] Fan, C., et al., *New deep eutectic solvent based superparamagnetic nanofluid for determination of perfluoroalkyl substances in edible oils*. Talanta, 2021. **228**: p. 122214.
- [135] Salamat, Q. and M. Soylak, *Novel magnetic deep eutectic solvent/Zn-MOF composite for extraction of Carmoisine from water and food samples*. Journal of Food Composition and Analysis, 2024. **128**.
- [136] Piao, H., et al., *Application of an in-situ formulated magnetic deep eutectic solvent for the determination of triazine herbicides in rice*. Talanta, 2021. **222**: p. 121527.
- [137] Makoś-Chełstowska, P., et al., *Magnetic deep eutectic solvents—Fundamentals and applications*. Journal of Molecular Liquids, 2022. **365**: p. 120158.
- [138] Peng, F., et al., *Synthesis of low-viscosity hydrophobic magnetic deep eutectic solvent: Selective extraction of DNA*. Analytica Chimica Acta, 2021. **1181**: p. 338899.
- [139] Liu, Y., et al., *Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives*. Journal of Natural Products, 2018. **81**(3): p. 679-690.

- [140] Anastas, P.T., *Green Chemistry and the Role of Analytical Methodology Development*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 1999. **29**(3): p. 167-175.
- [141] Anastas, P.T. and J.C. Warner, *Green chemistry: theory and practice*. 2000: Oxford university press.
- [142] de Marco, B.A., et al., *Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review*. Saudi Pharmaceutical Journal, 2019. **27**(1): p. 1-8.
- [143] Keith, L.H., L.U. Gron, and J.L. Young, *Green analytical methodologies*. Chemical reviews, 2007. **107**(6): p. 2695-2708.
- [144] Shi, M., et al., *Overview of sixteen green analytical chemistry metrics for evaluation of the greenness of analytical methods*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2023. **166**.
- [145] Plotka-Wasyłka, J. and W. Wojnowski, *Complementary green analytical procedure index (ComplexGAPI) and software*. Green Chemistry, 2021. **23**(21): p. 8657-8665.
- [146] Kowtharapu, L.P., et al., *Green metric tools for analytical methods assessment critical review, case studies and crucify*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2023. **166**.
- [147] Raynie, D. and J. Driver. *Green assessment of chemical methods*. in *13th Green Chem Conf., USA*. 2009.
- [148] Van Aken, K., L. Streckowski, and L. Patiny, *EcoScale, a semi-quantitative tool to select an organic preparation based on economical and ecological parameters*. Beilstein J Org Chem, 2006. **2**(1): p. 3.
- [149] Pena-Pereira, F., W. Wojnowski, and M. Tobiszewski, *AGREE-Analytical GREENness Metric Approach and Software*. Anal Chem, 2020. **92**(14): p. 10076-10082.
- [150] Wojnowski, W., et al., *AGREEprep—Analytical greenness metric for sample preparation*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2022. **149**: p. 116553.
- [151] Walsh, A., *The application of atomic absorption spectra to chemical analysis*. Spectrochimica Acta, 1955. **7**: p. 108-117.
- [152] Kılıç, Ü., *8-hidroksikinolin İmmobilize Edilmiş Silikon Kolonun Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresine Örnek Sunumunda Yeni Bir Yöntem Olarak Kullanımı*. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [153] Skoog, D.A., F.J. Holler, and S.R. Crouch, *Textbook" Principles of Instrumental Analysis"*. 2019: Cengage Learning; 6 edition.
- [154] Lajunen, L.H. and P. Perämäki, *Spectrochemical analysis by atomic absorption and emission*. 2004: Royal Society of Chemistry.
- [155] Skoog, D.A., F.J. Holler, and S.R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*. 2017: Cengage learning.
- [156] Beaty, R.D. and J.D. Kerber, *Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry*. 1993.
- [157] Arıdaşır, I., *Su Örneklerinde Kurşun Ve Kobalt İyonlarının Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi İle Tayini İçin Yeni Bir Metot: Ultrason Emülsifikasyonu Destekli-İkili Katılaştırılmış Yüzen Organik Damla Mikroekstraksiyonu*. 2018.
- [158] Cantle, J.E., *Atomic absorption spectrometry*. 1986: Elsevier.
- [159] Łobiński, R. and Z. Marczenko, *Spectrochemical trace analysis for metals and metalloids*. 1996: Elsevier.

- [160] Foroutani, Z., et al., *Application of deep eutectic solvents in the extraction of anthocyanins: Stability, bioavailability, and antioxidant property*. Trends in Food Science & Technology, 2024. **144**.
- [161] Długosz, O., et al., *Anhydrous metal nanoparticle suspensions using deep eutectic solvents (DES) – Green approach to metal nanoparticles production*. Journal of Molecular Liquids, 2024. **396**.
- [162] Cai, C., et al., *Aqueous two-phase system based on pH-responsive polymeric deep eutectic solvent for efficient extraction of aromatic amino acids*. Food Chem, 2024. **430**: p. 137029.
- [163] Chen, G. and S. Miao, *HPLC determination and MS confirmation of malachite green, gentian violet, and their leuco metabolite residues in channel catfish muscle*. Journal of agricultural and food chemistry, 2010. **58**(12): p. 7109-7114.
- [164] Arpa, Ç., S. Albayati, and M. Yahya, *Effervescence-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for preconcentration and FAAS determination of copper in aqueous samples*. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2018. **98**(10): p. 938-953.
- [165] Sedghi, R., S. Kazemi, and B. Heidari, *Novel selective and sensitive dual colorimetric sensor for mercury and lead ions derived from dithizone-polymeric nanocomposite hybrid*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2017. **245**: p. 860-867.
- [166] Sedghi, R., et al., *Design and synthesis of colorimetric sensor based on dithizone@TiO₂/poly (tert-butyl acrylate-acrylic acid) nanocomposite for fast visual detection of mercury, lead and cadmium ions in aqueous media*. Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management, 2022. **18**.
- [167] Soylak, M. and M. Koksak, *Deep eutectic solvent microextraction of lead(II), cobalt(II), nickel(II) and manganese(II) ions for the separation and preconcentration in some oil samples from Turkey prior to their microsampling flame atomic absorption spectrometric determination*. Microchemical Journal, 2019. **147**: p. 832-837.
- [168] Borahan, T., et al., *Accurate and sensitive determination of cobalt in urine samples using deep eutectic solvent-assisted magnetic colloidal gel-based dispersive solid phase extraction prior to slotted quartz tube equipped flame atomic absorption spectrometry*. Chemical Papers, 2021. **75**(6): p. 2937-2944.
- [169] Imam, M.S. and M.M. Abdelrahman, *How environmentally friendly is the analytical process? A paradigm overview of ten greenness assessment metric approaches for analytical methods*. Trends in Environmental Analytical Chemistry, 2023: p. e00202.
- [170] Muslim, N.M., et al., *Determination of Selenium in Black Tea Leaves Using the Air-assisted Cloud Point Extraction Method: Evaluation of the Method's Environmental Performance*. Analytical and Bioanalytical Chemistry Research, 2024. **11**(1): p. 11-22.
- [171] Abdulhussein, N.M., et al., *Green preconcentration procedures for the determination of aluminium in bottled beverages prior to electrothermal atomic absorption spectroscopy: a comparative study with environmental assessment tools*. Journal of the Iranian Chemical Society, 2024: p. 1-10.
- [172] Pena-Pereira, F., et al., *A tutorial on AGREEprep an analytical greenness metric for sample preparation*. Advances in Sample Preparation, 2022. **3**: p. 100025.
- [173] Ferreira, S.S., et al., *Greenness of procedures using NADES in the preparation of vegetal samples: Comparison of five green metrics*. Talanta Open, 2022. **6**: p. 100131.

- [174] Lian, Z. and J. Wang, *Determination of crystal violet in seawater and seafood samples through off-line molecularly imprinted SPE followed by HPLC with diode-array detection*. Journal of separation science, 2013. **36**(5): p. 980-985.
- [175] Sadeghi, S. and Z. Nasehi, *Simultaneous determination of Brilliant Green and Crystal Violet dyes in fish and water samples with dispersive liquid-liquid micro-extraction using ionic liquid followed by zero crossing first derivative spectrophotometric analysis method*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018. **201**: p. 134-142.
- [176] Razi-Asrami, M., et al., *Simultaneous spectrophotometric determination of crystal violet and malachite green in water samples using partial least squares regression and central composite design after preconcentration by dispersive solid-phase extraction*. Environmental Monitoring and Assessment, 2017. **189**(4): p. 196.
- [177] Lemos, V.A. and E.V. dos Santos Vieira, *Method for the determination of cadmium, lead, nickel, cobalt and copper in seafood after dispersive liquid-liquid micro-extraction*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2014. **31**(11): p. 1872-1878.
- [178] Lemos, V.A. and L.A. Oliveira, *Ultrasound-assisted temperature-controlled ionic liquid microextraction for the preconcentration and determination of cadmium content in mussel samples*. Food Control, 2015. **50**: p. 901-906.
- [179] Barciela-Alonso, M., et al., *Ionic imprinted polymer based solid phase extraction for cadmium and lead pre-concentration/determination in seafood*. Microchemical Journal, 2014. **114**: p. 106-110.
- [180] Khan, S., M. Soylak, and T.G. Kazi, *A simple ligandless microextraction method based on ionic liquid for the determination of trace cadmium in water and biological samples*. Toxicological & Environmental Chemistry, 2013. **95**(7): p. 1069-1079.
- [181] Sorouraddin, S.M., et al., *Development of an air-assisted liquid-liquid microextraction method based on a ternary solidified deep eutectic solvent in extraction and preconcentration of Cd (II) and Zn (II) ions*. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2021. **101**(11): p. 1567-1580.
- [182] Dias, F.d.S., et al., *Optimization of magnetic solid phase microextraction with CoFe₂O₄ nanoparticles unmodified for preconcentration of cadmium in environmental samples by flame atomic absorption spectrometry*. Microchemical Journal, 2019. **146**: p. 1095-1101.
- [183] Galbeiro, R., S. Garcia, and I. Gaubeur, *A green and efficient procedure for the preconcentration and determination of cadmium, nickel and zinc from freshwater, hemodialysis solutions and tuna fish samples by cloud point extraction and flame atomic absorption spectrometry*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2014. **28**(2): p. 160-165.