



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDA ÖRNEKLERİNDE AROMATİK AMİNLERİN GAZ  
KROMATOĞRAFİSİ KÜTLE SPEKTROMETRESİ (GC-MS) İLE  
TAYİNLERİNDE KATI FAZ EKSTRAKSİYONU UYGULAMALARI**

**Ümran SEVEN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**BURSA 2006**

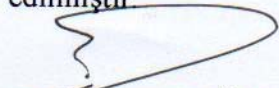
T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ


GIDA ÖRNEKLERİNDE AROMATİK AMİNLERİN GAZ  
KROMATOĞRAFİSİ KÜTLE SPEKTROMETRESİ (GC-MS) İLE  
TAYİNLERİNDE KATI FAZ EKSTRAKSİYONU UYGULAMALARI

Ümran SEVEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI

Bu Tez 03.11.2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Şeref GÜÇER

  
Doç. Dr. Cevdet DEMİR

  
Prof. Dr. Fikri BAŞOĞLU

.....  
(Danışman )

.....

.....

# GIDA ÖRNEKLERİNDE AROMATİK AMİNLERİN GAZ KROMATOĞRAFİSİ KÜTLE SPEKTROMETRESİ (GC-MS) İLE TAYİNLERİNDE KATI FAZ EKSTRAKSİYONU UYGULAMALARI

## ÖZET

Çok sayıda doğal ve sentetik boyar maddeler, renk etkinliğini artırmak için gıda katkı maddesi olarak kullanılabilir. Bu durum; kırmızı renkli Sudan I, II, III ve IV azo boyar maddelerinin biber salçasında illegal olarak kullanımı ile tehlikeli hale gelmektedir. Bu tür örneklerde Sudan boyalarının karakterizasyon ve kantifikasyon çalışmaları için hassas ve seçici analitik metotlar gerekmektedir. Aromatik aminlerin gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile tayinlerine yönelik pek çok çalışma olmasına karşın; bu bileşiklerin kaynama noktalarının GC-MS tayinine uygun olmaması nedeni ile önerilen metotlar genellikle sıvı kromatografisine (LC) dayalıdır.

Çalışmamızda , biber salçasında illegal olarak kullanılacak Sudan I, II, III ve IV boyar maddelerinin tespit ve kantitatif tayinleri için GC-MS analizine dayalı bir analitik metot geliştirilmiştir. Bu amaçla Sudan boyalarına kimyasal indirgeme işlemi uygulanmış; boyar maddelerin parçalanma ürünleri, GC-MS ile karakterize edilmiştir. Bu parçalanma ürünleri de Sudan boyar maddelerini temsil etmek için kullanılmıştır. İndirgenmeyi etkileyen ve ekstraksiyon verimini artıran; indirgenme sıcaklığı, indirgenme süresi, indirgen miktarı ve indirgeme çözeltilisinin pH değeri parametreleri incelenmiş ve optimum parametrelerin boyar maddeye bağlı olarak değiştiği tespit edilirken optimizasyon çalışması için de kemometrik yöntemden yararlanılmıştır. Biber salçasından Sudan boyalarının etkin bir şekilde izole edilebilmesi için aseton ekstraksiyonu uygulanmıştır. Ayrıca; Sudan I-IV boyar maddelerinin deriştirilmesine yönelik katı faz ekstraksiyonunun etkinliği araştırılmıştır. Doğrulama çalışması için örneklere aseton ekstraksiyonu uygulanmış, C<sub>18</sub> katı faz kolonlarında matriks etkilerinden ayırma işlemi sonrası LC-ESI-MS ile analiz yapıldıktan sonra iki kromatografik metot karşılaştırılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Sudan boyaları, azo boyaları indirgenmesi, biber salçası, katı faz ekstraksiyonu, GC-MS, LC-MS.

## **DETERMINATION OF AROMATIC AMINES IN FOOD PRODUCTS BY SOLID PHASE EXTRACTION AND GAS CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETRY (GC-MS)**

### **ABSTRACT**

Azo dyes may be used as an additive in food samples to save or increase the color of food products. Like Sudan dyes some of them are illegally used. The red colored azo dyes classified as Sudan I, II, III, IV are considered to be carcinogenic. Despite this effect, they have been found as a contaminant in food samples. Therefore, sensitive selective and accurate analytical methods are needed for characterization and quantification studies. However gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis is one of the most common methods for aromatic amines, proposed methods are generally based on liquid chromatography (LC) for Sudan dyes because of their unsuitable boiling points for GC-MS analysis.

The aim of this work was to develop an indirect method for Sudan dyes for GC-MS analysis. Determination of Sudan dyes in chili paste by the means of their degradation products is described. For the analysis of degradation products, chemical reduction is performed. The amine products were characterized by GC-MS and these reduction products were used as a fingerprint of Sudan dyes. The parameters that can affect the reduction; such as reduction temperature, reduction time, reducing agent amount and pH of reduction solution were studied and found that these parameters are related with the nature of dye. Optimization studies are performed by chemometric method. Acetone extraction was applied to chili paste in order to extract Sudan dyes from real samples. Solid phase extraction efficiency was investigated for the enrichment studies of Sudan I-IV dyes. For confirmation studies, direct method was used; the real samples extracted with acetone and separated from matrix effects with C<sub>18</sub> for LC-ESI-MS analysis and the two chromatographic methods were compared.

**Keywords:** Sudan dyes, azo dye reduction, chili paste, solid phase extraction, GC-MS, LC-MS.

**İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa No</b>
<b>ÖZET</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	ii
<b>İÇİNDEKİLER</b>	iii
<b>SİMGELER DİZİNİ</b>	ix
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	xi
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	xix
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI</b>	3
<b>2.1. Moleküler Kütle Spektrometri</b>	3
<b>2.1.1. Moleküler Kütle Spektrometrenin Temel İlkeleri</b>	3
<b>2.1.2. Kütle Spektrometrenin Bileşenleri</b>	4
<b>a) İyon Kaynağı</b>	4
<b>b) Kütle Analizörü</b>	7
<b>2.1.3. Kütle Spektrometrenin Uygulamaları</b>	8
<b>2.2. Kütle Spektrometrenin Birlikte Kullanıldığı Kromatografik Yöntemler</b>	8
<b>2.2.1. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS)</b>	8
<b>2.2.2. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS)</b>	10
<b>2.3. Ultraviyole-Görünür Bölge (UV-VIS) Moleküler Absorpsiyon Spektrofotometri</b>	11
<b>2.4. Katı Faz Ekstraksiyonu</b>	13
<b>2.4.1. Katı Faz Ekstraksiyon Kolonlarının Dolgu Maddelerinin Fonksiyonel Grupları ve Yapıları</b>	14
<b>2.4.2. Katı Faz Ekstraksiyon Mekanizmaları, Örnek İçin Bilinmesi Gereken Temel Özellikler ve Çözgen Polariteleri</b>	15
<b>2.5. Kemometrik Yöntemler</b>	15

2.5.1. Merkezi Kompozit Dizayn	16
2.6. Azo Boyaları	17
2.6.1. Azo Boyalarının Sentezi ve İndirgenmesi	18
2.6.2. Azo Boyalarının Kimyasal İndirgenmesi ve İndirgenme Yolu İle Analizleri	21
2.6.3. Azo Boyalarının Mutajenik ve Kanserojenik Etkisi	23
2.7. Aromatik Aminler	24
2.7.1. Aromatik Aminlerin Ekstraksiyonu ve Ekstraksiyon Tekniklerinin Karşılaştırılması	27
2.7.2. Aromatik Aminlerin Tayin Yöntemleri	28
2.8. Sudan Boyaları	29
2.8.1. Sudan Boyalarının Kimyasal Yapıları	29
2.8.2. Sudan Boyalarının Fiziksel Özellikleri	31
2.8.3. Sudan Boyalarının IARC Sınıflandırması	31
2.8.4. Sudan Boyalarının Önemi ve Kullanımı	33
2.8.5. Sudan Boyalarının Toksisiteleri	33
2.8.6. Sudan Boyalarının Ekstraksiyonu ve Analizi	34
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b>	<b>36</b>
<b>3.1. MATERYAL</b>	<b>36</b>
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Aletler	
3.1.1.1. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi	36
3.1.1.2. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi	36
3.1.1.3. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometresi	36
3.1.1.4. pH-Metre	37
3.1.1.5. Ultrasonik Karıştırıcı	37
3.1.1.6. Etüv	37
3.1.1.7. Döner Vakumlu Buharlaştırıcı	37
3.1.1.8. Terazî	37
3.1.1.9. Santrifüj Aleti	37
3.1.1.10. Katı Faz Ekstraksiyon Sistemi	38

<b>3.1.1.11. Saf Su Cihazı</b>	38
<b>3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler</b>	38
<b>3.1.2.1. Kimyasallar</b>	38
<b>3.1.2.1.1. Analitik Saflıktaki Kimyasallar</b>	38
<b>3.1.2.1.2. Sarf Malzemeler</b>	39
<b>3.1.2.2. Çözeltiler</b>	40
<b>3.1.2.2.1. UV-VIS Analizlerinde Kullanılan Boya</b>	
Çözeltilerinin Hazırlanması	40
<b>a) Katı Faz Ekstraksiyonu Çalışmaları İçin Boya</b>	
Çözeltilerinin Hazırlanması	40
<b>b) Çözünürlüğün pH İle Değişiminin İncelenmesi</b>	
İçin Boya Çözeltilerinin Hazırlanması	40
<b>c) pH Ayarlanmasında Kullanılan Çözeltilerin</b>	
Hazırlanması	41
<b>3.1.2.2.2. GC-MS Analizlerinde Kullanılan Çözeltilerin</b>	
Hazırlanması	41
<b>a) Sodyum Ditiyonit İndirgeme Çözeltisinin</b>	
Hazırlanması	41
<b>b) pH=1,5 Tampon Çözeltisinin Hazırlanması</b>	41
<b>3.1.2.2.3. LC-MS Ölçümlerinde Kullanılan Boya</b>	
Çözeltilerinin Hazırlanması	42
<b>3.2. YÖNTEM</b>	42
<b>3.2.1. Katı Faz Ekstraksiyonu</b>	42
<b>a) Sudan Boyaları İçin Çözücü Seçimi</b>	42
<b>b) Sudan Boyaları İçin En Uygun Elüsyon Çözücüsünün Belirlenmesi</b>	44
<b>3.2.2. Kalitatif GC-MS Analizleri</b>	46
<b>a) S I Boyar Maddesi İle Yapılan Kalitatif Çalışma</b>	46
<b>b) S II Boyar Maddesi İle Yapılan Kalitatif Çalışma</b>	48
<b>c) S III Boyar Maddesi İle Yapılan Kalitatif Çalışma</b>	48
<b>d) S IV Boyar Maddesi İle Yapılan Kalitatif Çalışma</b>	49
<b>e) Gerçek Örnek (Salça) Çalışması</b>	50

f) Karışım Halindeki S I, S II, S III ve S IV Boyar Maddelerinin Analizi	51
<b>3.2.3. Kalitatif LC-MS Analizleri</b>	51
a) LC-MS Analizi İçin Gerçek Örnek Çalışması	51
<b>3.2.4. Kantitatif Analiz</b>	52
<b>3.2.4.1. Örnek Hazırlama Prosedürü</b>	52
a) 20 mg Sudan Boyası İle Yapılan Kantitatif Çalışma	52
b) Gerçek Örnekler İçin Ekstraksiyon Çalışması	52
c) Gerçek Örneklerde Geri Kazanımın Belirlenmesi	52
d) pH Değişiminin Geri Kazanım Üzerine Etkisinin İncelenmesi	53
e) Kemometrik Yöntem İle En Uygun Şartların Belirlenmesi	53
<b>3.2.4.2. Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi Çalışma Koşulları</b>	54
a) Kalitatif Analiz Programı	55
i) Kalitatif Analiz Programı-1	55
ii) Kalitatif Analiz Programı-2	56
b) Kantitatif analiz programı	57
<b>4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA</b>	59
<b>4.1. UV-VIS İle İlgili Çalışmalar</b>	59
4.1.1. S I Boyar Maddesinin UV-VIS Spektrumları	59
4.1.2. S II Boyar Maddesinin UV-VIS Spektrumları	61
4.1.3. S III Boyar Maddesinin UV-VIS Spektrumları	63
4.1.4. S IV Boyar Maddesinin UV-VIS Spektrumları	65
<b>4.2. Sudan Boyar Maddelerinin Katı Faz Ekstraksiyonu</b>	67
4.2.1. Sudan Boyaları İçin Çözünürlük Çalışmaları	67
4.2.2. Sudan Boyalarının Elüsyon Çalışmaları	77
<b>4.3. GC-MS İle İlgili Kalitatif Çalışmalar</b>	82
4.3.1. S I Boyar Maddesinin GC-MS Analizi	82
4.3.2. S II Boyar Maddesinin GC-MS Analizi	86
4.3.3. S III Boyar Maddesinin GC-MS Analizi	90
4.3.4. S IV Boyar Maddesinin GC-MS Analizi	93
4.3.5. Gerçek Örneklerle Çalışmalar	97



4.3.6. pH=6 Ortamında Karışım Halindeki S I, S II, S III ve S IV Boyar Maddelerinin Kalitatif Analizi	98
4.4. LC-MS İle İlgili Kalitatif Çalışmalar	103
4.5. GC-MS İle İlgili Kantitatif Çalışmalar	114
4.5.1. 20 mg S I Boyası İle Yapılan Kantitatif Analiz Çalışması	115
4.5.2. 20 mg S II Boyası İle Yapılan Kantitatif Analiz Çalışması	115
4.5.3. 20 mg S III Boyası İle Yapılan Kantitatif Analiz Çalışması	116
4.5.4. 20 mg SIV Boyası İle Yapılan Kantitatif Analiz Çalışması	117
4.5.5. Gerçek Örnek Çalışması	118
4.5.5.1. Gerçek Örneklerde Ekstraksiyon Çalışması	118
4.5.5.2. Gerçek Örneklerden Geri Kazanım Çalışmaları	120
a) Gerçek Örneklerden S I Boyar Maddesinin Geri Kazanımı	120
b) Gerçek Örneklerden S II Boyar Maddesinin Geri Kazanımı	121
c) Gerçek Örneklerden S III Boyar Maddesinin Geri Kazanımı	121
d) Gerçek Örneklerden S IV Boyar Maddesinin Geri Kazanımı	122
4.6. UV-VIS Analizi İle pH Değişiminin Geri Kazanıma Etkisinin İncelenmesi	123
4.7. Farklı pH Değerlerinde Kimyasal İndirgeme İşlemi Yapılmasının Sudan Boyar Maddelerinin Geri Kazanımına Etkisi	125
4.7.1. pH=1,5 Ortamında Çalışılmasının Sudan Boyar Maddelerinin Geri Kazanımına Etkisi	125
4.7.2. pH=1,5 Ortamında Isıl İşlem Olmaksızın, Oda Sıcaklığında ve Ultrasonik Karıştırıcıda Çalışılmasının S II Boyar Maddesinin Geri Kazanımına Etkisi	126
4.7.3. pH=4 Ortamında Çalışılmasının S IV Boyar Maddesinin Geri Kazanımına Etkisi	127
4.7.4. pH=1,5 Ortamında S III Boyar Maddesinin Parçalanma Ürününe Ait Kalibrasyon Eğrisi	128

4.8. Kemometrik Yöntem	129
<b>5. SONUÇ</b>	132
<b>KAYNAKLAR</b>	134
<b>EKLER</b>	145
<b>TEŞEKKÜR</b>	146
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	147

**SİMGELER DİZİNİ**

<b>GC</b>	: Gaz Kromatografisi
<b>MS</b>	: Kütle Spektrometresi
<b>GC-MS</b>	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
<b>HPLC</b>	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
<b>LC</b>	: Sıvı Kromatografisi
<b>LC-MS</b>	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>UV/VIS</b>	: Ultraviyole-Görünür Bölge
<b>EI</b>	: Elektron İmpakt
<b>ESI</b>	: Elektrosprey İyonlaştırma
<b>CI</b>	: Kimyasal İyonlaştırma
<b>CE</b>	: Kapiler Elektroforez
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>TLC</b>	: İnce Tabaka Kromatografisi
<b>IARC</b>	: Uluslararası Kanser Araştırma Teşkilatı
<b>MAK</b>	: Maximale Arbeitsplatz Konzentration
<b>LLE</b>	: Sıvı Sıvı Ekstraksiyon
<b>SPE</b>	: Katı Faz Ekstraksiyon
<b>SPME</b>	: Katı Faz Mikroekstraksiyon
<b>SFE</b>	: Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon
<b>MAE</b>	: Mikrodalga Yardımlı Ekstraksiyon
<b>IR</b>	: İnfrared
<b>m/z</b>	: Kütle/Yük
<b>t<sub>R</sub></b>	: Alınma Zamanı
<b>LOD</b>	: Gözlenebilme Sınırı
<b>LOQ</b>	: Tayin Sınırı

**KISALTMALAR**

<b>Abs</b>	: Absorbans
<b>SD</b>	: Sodyum Ditiyonit
<b>ST</b>	: Sitrat Tampon
<b>S I</b>	: Sudan I
<b>S II</b>	: Sudan II
<b>S III</b>	: Sudan III
<b>S IV</b>	: Sudan IV
<b>t-BME</b>	: ter-Butil Metil Eter
<b>dak.</b>	: Dakika
<b>%R</b>	: Yüzde geri kazanım

## ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil 2.1.1.1.** Moleküler iyon oluşumu

**Şekil 2.1.2.1.** Bir kütle spektrometresinin basitleştirilmiş şematik modeli

**Şekil 2.1.2.2.** EI kaynağının şematik görünümü

**Şekil 2.1.2.3.** Kuadropol kütle analizörünün şematik modeli

**Şekil 2.2.1.1.** GC-MS'te gözlenen kromatogram ve bunlara ait kütle spektrumlarının basit bir şematik gösterimi

**Şekil 2.2.2.1.** LC-MS'in şematik gösterimi

**Şekil 2.2.2.2.** Elektrosprey iyonlaştırmanın şematik gösterimi

**Şekil 2.3.1.** Moleküler absorpsiyonun şematik gösterimi

**Şekil 2.3.2.** Bir tekstil boyasının absorpsiyon spektrumu

**Şekil 2.4.1.** Katı faz ekstraksiyonunun basit bir şematik gösterimi

**Şekil 2.4.1.1.** Bazı dolgu maddelerinin polarite artışlarına ait sıralama

**Şekil 2.4.2.1.** Bazı çözücülerin polarite artışlarına ait sıralama

**Şekil 2.6.1.1.** Azo boyalarının sentezi ve indirgen parçalanması

**Şekil 2.6.1.2.** Bir azo boyasından indirgen parçalanma yolu ile aromatik amin oluşumu

**Şekil 2.6.1.3.** Azo boyalarının indirgenmesinin şematik modeli

**Şekil 2.6.3.1.** Aromatik amin ve aromatik nitro bileşikleri için basitleştirilmiş metabolik yol

**Şekil 3.2.1.1.** Sudan boyaları için uygun çözücü belirlenmesine yönelik katı faz ekstraksiyon şeması

**Şekil 3.2.1.2.** Sudan boyaları için uygun elüsyon çözücüsü belirlenmesine yönelik katı faz ekstraksiyon şeması

**Şekil 3.2.2.1.** S I' in GC-MS analizine yönelik deneysel işlem şeması

**Şekil 3.2.2.2.** Kimyasal indirgeme işlemi uygulanmış S I' in GC-MS analizine yönelik deneysel işlem şeması

**Şekil 3.2.2.3.** S II' nin GC-MS analizine yönelik deneysel işlem şeması

**Şekil 3.2.2.4.** S III' ün GC-MS analizine yönelik deneysel işlem şeması

**Şekil 3.2.2.5.** S IV' ün GC-MS analizine yönelik deneysel işlem şeması

**Şekil 3.2.2.6.** Salça örneğinin GC-MS analizine yönelik deneysel işlem şeması

**Şekil 4.1.1.1.** Metanolde 7 mg/L S I boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

- Şekil 4.1.1.2.** Asetonitrilde 7 mg/L S I boyar maddesinin UV-VIS spektrumu
- Şekil 4.1.1.3.** Etil asetatta 7 mg/L S I boyar maddesinin UV-VIS spektrumu
- Şekil 4.1.2.1.** Metanolde 7 mg/L S II boyar maddesinin UV-VIS spektrumu
- Şekil 4.1.2.2.** Asetonitrilde 7 mg/L S II boyar maddesinin UV-VIS spektrumu
- Şekil 4.1.2.3.** Etil asetatta 7 mg/L S II boyar maddesinin UV-VIS spektrumu
- Şekil 4.1.3.1.** Metanolde 7 mg/L S III boyar maddesinin UV-VIS spektrumu
- Şekil 4.1.3.2.** Asetonitrilde 7 mg/L S III boyar maddesinin UV-VIS spektrumu
- Şekil 4.1.3.3.** Etil asetatta 7 mg/L S III boyar maddesinin UV-VIS spektrumu
- Şekil 4.1.4.1.** Metanolde 7 mg/L S IV boyar maddesinin UV-VIS spektrumu
- Şekil 4.1.4.2.** Asetonitrilde 7 mg/L S IV boyar maddesinin UV-VIS spektrumu
- Şekil 4.1.4.3.** Etil asetatta 7 mg/L S IV boyar maddesinin UV-VIS spektrumu
- Şekil 4.2.1.1.** Suda hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S I boyar maddesinin UV-VIS spektrumu
- Şekil 4.2.1.2.** Metanolde hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S I boyar maddesinin UV-VIS spektrumu
- Şekil 4.2.1.3.** Asetonda hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S I boyar maddesinin UV-VIS spektrumu
- Şekil 4.2.1.4.** Hekzanda hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S I boyar maddesinin UV-VIS spektrumu
- Şekil 4.2.1.5.** Suda hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S II boyar maddesinin UV-VIS spektrumu
- Şekil 4.2.1.6.** Metanolde hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S II boyar maddesinin UV-VIS spektrumu
- Şekil 4.2.1.7.** Asetonda hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S II boyar maddesinin UV-VIS spektrumu
- Şekil 4.2.1.8.** Hekzanda hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S II boyar maddesinin UV-VIS spektrumu
- Şekil 4.2.1.9.** Suda hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S III boyar maddesinin UV-VIS spektrumu
- Şekil 4.2.1.10.** Metanolde hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S III boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

**Şekil 4.2.1.11.** Asetonda hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S III boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

**Şekil 4.2.1.12.** Hekzanda hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S III boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

**Şekil 4.2.1.13.** Suda hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S IV boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

**Şekil 4.2.1.14.** Metanolde hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S IV boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

**Şekil 4.2.1.15.** Asetonda hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S IV boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

**Şekil 4.2.1.16.** Hekzanda hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S IV boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

**Şekil 4.2.2.1.** C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan asetonitril ile elüe edilmiş S I boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

**Şekil 4.2.2.2.** C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan etil asetat ile elüe edilmiş S I boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

**Şekil 4.2.2.3.** C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan asetonitril ile elüe edilmiş S II boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

**Şekil 4.2.2.4.** C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan etil asetat ile elüe edilmiş S II boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

**Şekil 4.2.2.5.** C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan asetonitril ile elüe edilmiş S III boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

**Şekil 4.2.2.6.** C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan etil asetat ile elüe edilmiş S III boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

**Şekil 4.2.2.7.** C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan asetonitril ile elüe edilmiş S IV boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

**Şekil 4.2.2.8.** C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan etil asetat ile elüe edilmiş S IV boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

**Şekil 4.3.1.1.** 500 mg/L S I boyar maddesinin GC-MS kromatogramı

**Şekil 4.3.1.2.** 500 mg/L S I boyar maddesinin kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu

**Şekil 4.3.1.3.** İndirgeme işlemi uygulanmış 500 mg/L S I için GC-MS kromatogramı

**Şekil 4.3.1.4.** İndirgeme işlemi uygulanmış 500 mg/L S I boyar maddesinin kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu

**Şekil 4.3.1.5.** İndirgeme işlemi uygulanmış 500 mg/L S I boyar maddesinin kromatogramındaki 2 numaralı pike ait kütle spektrumu

**Şekil 4.3.1.6.** İndirgeme işlemi uygulanmış 500 mg/L S I için  $m/z=50-100$  aralığında elde edilen GC-MS kromatogramı

**Şekil 4.3.1.7.** İndirgeme işlemi uygulanmış 500 mg/L S I boyar maddesinin  $m/z=50-100$  tarama aralığında elde edilen kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu

**Şekil 4.3.1.8.** 102 mg/L anilin için GC-MS kromatogramı

**Şekil 4.3.1.9.** 102 mg/L aniline ait kromatogramdaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu

**Şekil 4.3.2.1.** 500 mg/L S II boyar maddesinin kromatogramı

**Şekil 4.3.2.2.** 500 mg/L S II boyar maddesinin kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu

**Şekil 4.3.2.3.** Kimyasal indirgeme işlemi uygulanmış 500 mg/L S II boyar maddesinin kromatogramı

**Şekil 4.3.2.4.** İndirgeme işlemi uygulanmış 500 mg/L S II boyar maddesinin kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu

**Şekil 4.3.2.5.** İndirgeme işlemi uygulanmış 500 mg/L S II boyar maddesinin  $m/z=50-130$  aralığında elde edilen GC-MS kromatogramı

**Şekil 4.3.2.6.** İndirgeme işlemi uygulanmış 500 mg/L S II boyar maddesinin  $m/z=50-130$  aralığında elde edilen GC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu

**Şekil 4.3.3.1.** 600 mg/L S III boyar maddesinin GC-MS kromatogramı

**Şekil 4.3.3.2.** İndirgeme işlemi uygulanmış 600 mg/L S III boyar maddesinin GC-MS kromatogramı

**Şekil 4.3.3.3.** İndirgeme işlemi uygulanmış 600 mg/L S III boyar maddesinin GC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu

**Şekil 4.3.3.4.** İndirgeme işlemi uygulanmış 600 mg/L S III boyar maddesinin GC-MS kromatogramındaki 2 numaralı pike ait kütle spektrumu

**Şekil 4.3.3.5.** 102 mg/L anilin için  $m/z=50-100$  aralığında elde edilen kütle spektrumu

**Şekil 4.3.3.6.** 102 mg/L anilin için  $m/z=82-215$  aralığında elde edilen kütle spektrumu



**Şekil 4.3.4.1.** 1000 mg/L S IV boyar maddesinin GC-MS kromatogramı

**Şekil 4.3.4.2.** İndirgeme işlemi uygulanmış 1000 mg/L S IV boyar maddesinin GC-MS kromatogramı

**Şekil 4.3.4.3.** İndirgeme işlemi uygulanmış 1000 mg/L S IV boyar maddesinin kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu

**Şekil 4.3.5.1.** Biber salçası için kalitatif analiz sonucu elde edilen kromatogram

**Şekil 4.3.5.2.** Salça kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=21,733$ )

**Şekil 4.3.5.3.** Salça kromatogramındaki 2 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=38,383$ )

**Şekil 4.3.6.1.** Karışım halindeki sudan boyar maddelerine indirgenme işlemi uygulandığında elde edilen kromatogram

**Şekil 4.3.6.2.** Sudan boyaları karışımı için elde edilen kromatogramdaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu

**Şekil 4.3.6.3.** Sudan boyaları karışımı için elde edilen kromatogramdaki 2 numaralı pike ait kütle spektrumu

**Şekil 4.3.6.4.** Sudan boyaları karışımı için elde edilen kromatogramdaki 3 numaralı pike ait kütle spektrumu

**Şekil 4.3.6.5.** Sudan boyaları karışımı için elde edilen kromatogramdaki 4 numaralı pike ait kütle spektrumu

**Şekil 4.3.6.6.** Sudan boyaları karışımı için elde edilen kromatogramdaki 5 numaralı pike ait kütle spektrumu

**Şekil 4.3.6.7.** Sudan boyaları karışımı için elde edilen kromatogramdaki 6 numaralı pike ait kütle spektrumu

**Şekil 4.4.1.** 20 mg/L S I boyar maddesinin LC-MS kromatogramı

**Şekil 4.4.2.** 20 mg/L S I boyar maddesinin LC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,4$  dak.)

**Şekil 4.4.3.** 20 mg/L S I boyar maddesinin LC-MS kromatogramında S I' i karakterize eden 2 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=2,15$  dak.)

**Şekil 4.4.4.** 20 mg/L S II boyar maddesinin LC-MS kromatogramı

**Şekil 4.4.5.** 20 mg/L S II boyar maddesinin LC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,35$  dak.)

**Şekil 4.4.6.** 20 mg/L S II boyar maddesinin LC-MS kromatogramında S II'yi karakterize eden 2 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=2,7$  dak.)

**Şekil 4.4.7.** 20 mg/L S III boyar maddesinin LC-MS kromatogramı

**Şekil 4.4.8.** 20 mg/L S III boyar maddesinin LC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,45$  dak.)

**Şekil 4.4.9.** 20 mg/L S III boyar maddesinin LC-MS kromatogramında S III'ü karakterize eden 2 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,95$  dak.)

**Şekil 4.4.10.** 20 mg/L S IV boyar maddesinin LC-MS kromatogramı

**Şekil 4.4.11.** 20 mg/L S IV boyar maddesinin LC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,45$  dak.)

**Şekil 4.4.12.** 20 mg/L S IV boyar maddesinin LC-MS kromatogramında S IV'ü karakterize eden 2 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=2,35$  dak.)

**Şekil 4.4.13.** 20 mg/L S IV boyar maddesinin LC-MS kromatogramında S IV'ü karakterize eden 3 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=4,5$  dak.)

**Şekil 4.4.14.** 1 numaralı salça ekstraktının (kör örnek-1) LC-MS kromatogramı

**Şekil 4.4.15.** 1 numaralı salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,45$  dak.)

**Şekil 4.4.16.** 2 numaralı salça ekstraktının (kör örnek-2) LC-MS kromatogramı

**Şekil 4.4.17.** 2 numaralı salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,45$  dak.)

**Şekil 4.4.18.** S I boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramı

**Şekil 4.4.19.** S I boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,45$  dak.)

**Şekil 4.4.20.** S I boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 2 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=2,05$  dak.)

**Şekil 4.4.21.** S II boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramı

**Şekil 4.4.22.** S II boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,4$  dak.)

**Şekil 4.4.23.** S II boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 2 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=2,65$  dak.)

**Şekil 4.4.24.** S III boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramı

**Şekil 4.4.25.** S III boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,45$  dak.)

**Şekil 4.4.26.** S III boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 2 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,95$  dak.)

**Şekil 4.4.27.** S III boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 3 numaralı pike ait kütle spektrumu( $t_R=3,05$  dak.)

**Şekil 4.4.28.** S IV boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramı

**Şekil 4.4.29.** S IV boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,45$  dak.)

**Şekil 4.4.30.** S IV boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 2 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=2,35$  dak.)

**Şekil 4.4.31.** S IV boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 3 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=4,55$  dak.)

**Şekil 4.4.32.** S I-IV boyar maddeleri katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramı

**Şekil 4.4.33.** S I-IV boyar maddeleri katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,9-4,7$  dak.)

**Şekil 4.5.1.1.** S I boyar maddesinin kromatogramında gözlenen anilin pikine ait kalibrasyon eğrisi

**Şekil 4.5.2.1.** S II boyar maddesinin kromatogramında gözlenen 2,4-ksilidin pikine ait kalibrasyon eğrisi

**Şekil 4.5.3.1.** S III boyar maddesinin kromatogramında gözlenen anilin pikine ait kalibrasyon eğrisi

**Şekil 4.5.4.1.** S IV boyar maddesinin kromatogramında gözlenen o-toluidin pikine ait kalibrasyon eğrisi

**Şekil 4.5.5.1.1.** Salça ekstraktı için GC-MS kromatogramı

**Şekil 4.5.5.1.2.** Salça ekstraktına ait kromatogramdaki 1 numaralı pik için kütle spektrumu

**Şekil 4.5.5.1.3.** Salça ekstraktına ait kromatogramdaki 2 numaralı pik için kütle spektrumu

**Şekil 4.6.1.** S I boyar maddesinin pH=1,5-12 aralığında UV-VIS spektrumları

**Şekil 4.6.2.** S II boyar maddesinin pH=1,5-12 aralığında UV-VIS spektrumları

**Şekil 4.6.3.** S III boyar maddesinin pH=1,5-12 aralığında UV-VIS spektrumları

**Şekil 4.6.4.** S IV boyar maddesinin pH=1,5-12 aralığında UV-VIS spektrumları

**Şekil 4.7.4.1.** pH=1,5 ortamında S III boyar maddesinin GC-MS kromatogramında gözlenen anilin pikine ait kalibrasyon eğrisi

**Şekil 4.8.1.** pH=1,5 ortamında ve optimum koşullarda S III boyar maddesinin indirgenme ürünü pikine ait kalibrasyon eğrisi

## ÇİZELGELER DİZİNİ

- Çizelge 2.1.2.1.** Moleküler kütle spektroskopide kullanılan iyon kaynakları
- Çizelge 2.7.1.** MAK aminler listesi
- Çizelge 2.8.1.1.** Sudan boyalarının kimyasal yapıları ve bazı karakteristik özellikleri
- Çizelge 2.8.2.1.** Sudan boyalarının bazı fiziksel özellikleri
- Çizelge 2.8.3.1.** Sudan boyalarının IARC sınıflandırılması
- Çizelge 3.2.3.1.** LC-MS analiz şartları
- Çizelge 3.2.4.1.1.** Merkezi kompozit dizayn (kodlanmış değerler)
- Çizelge 3.2.4.1.2.** Merkezi kompozit dizayn (gerçek değerler)
- Çizelge 3.2.4.2.1.** Kalitatif salça çalışması için kolon sıcaklık programı
- Çizelge 3.2.4.2.2.** Kalitatif analiz programı-1 için gaz kromatografisi (GC) şartları
- Çizelge 3.2.4.2.3.** Kalitatif analiz programı-1 için kütle spektrometresi (MS) şartları
- Çizelge 3.2.4.2.4.** Kalitatif analiz programı-2 için kolon sıcaklık programı
- Çizelge 3.2.4.2.5.** Kalitatif analiz programı-2 için GC şartları
- Çizelge 3.2.4.2.6.** Kalitatif analiz programı-2 için MS Şartları
- Çizelge 3.2.4.2.7.** S I, S II, S III ve S IV boyar maddelerinin kantitatif analizi için kolon sıcaklık programı
- Çizelge 3.2.4.2.8.** S I, S II, S III ve S IV boyar maddeleri maddelerinin kantitatif analizi için GC şartları
- Çizelge 3.2.4.2.9.** S I boyar maddesinin kantitatif analizi için MS şartları
- Çizelge 3.2.4.2.10.** S II boyar maddesinin kantitatif analizi için MS şartları
- Çizelge 3.2.4.2.11.** S III boyar maddesinin kantitatif analizi için MS şartları
- Çizelge 3.2.4.2.12.** S IV boyar maddesinin kantitatif analizi için MS şartları
- Çizelge 4.2.1.1.** S I' in farklı çözücülerdeki UV-VIS spektrumlarından tespit edilen maksimum absorbans değerleri
- Çizelge 4.2.1.2.** S II' in farklı çözücülerdeki UV-VIS spektrumlarından tespit edilen maksimum absorbans değerleri
- Çizelge 4.2.1.3.** S III' ün farklı çözücülerdeki UV-VIS spektrumlarından tespit edilen maksimum absorbans değerleri
- Çizelge 4.2.1.4.** S IV' ün farklı çözücülerdeki UV-VIS spektrumlarından tespit edilen maksimum absorbans değerleri

**Çizelge 4.2.2.1.** Sudan boyalarının metanol, asetonitril ve etil asetatındaki standart çözeltilerinin UV-VIS absorpsiyonları ile katı faz ekstraksiyonu sonucu tespit edilen absorpsiyon değerleri

**Çizelge 4.3.2.1.** İndirgeme işlemi yapılmadan ve kimyasal indirgeme işlemi uygulandıktan sonra S I ve S II boyar maddelerinin kromatogramlarında görülen moleküler iyon piklerine ait pik alanları

**Çizelge 4.3.4.1.** S I boyar maddesinin teorik ve deneysel parçalanma ürünleri

**Çizelge 4.3.4.2.** S II boyar maddesinin teorik ve deneysel parçalanma ürünleri

**Çizelge 4.3.4.3.** S III boyar maddesinin teorik ve deneysel parçalanma ürünleri

**Çizelge 4.3.4.4.** S IV boyar maddesinin teorik ve deneysel parçalanma ürünleri

**Çizelge 4.3.6.1.** Karışım halindeki sudan boyalarının kromatogramlarındaki piklerin karşılaştırılması

**Çizelge 4.5.5.2.1.** S I' in salça örneklerinden geri kazanımı çalışmalarında, GC-MS kromatogramlarında gözlenen anilin pikine ait alan değerleri

**Çizelge 4.5.5.2.2.** S II' nin salça örneklerinden geri kazanımı çalışmalarında, GC-MS kromatogramlarında gözlenen 2,4-kşilidin pikine ait alan değerleri

**Çizelge 4.5.5.2.3.** S III' ün salça örneklerinden geri kazanımı çalışmalarında, GC-MS kromatogramlarında gözlenen anilin pikine ait alan değerleri

**Çizelge 4.5.5.2.4.** S IV' ün salça örneklerinden geri kazanımı çalışmalarında, GC-MS kromatogramlarında gözlenen o-toluidin pikine ait alan değerleri

**Çizelge 4.7.1.1.** Sudan boyar maddelerinin pH=1,5 ve pH=6 ortamlarında parçalanma ürünlerine ait GC-MS kromatogramlarından belirlenen alan değerleri

**Çizelge 4.7.2.1.** S II boyar maddesinin pH=6 ortamında ısıtma işlemi uygulandığında ve pH=6 da ısıtma işlemi olmadan çalışılması sonucu GC-MS kromatogramlarında gözlenen parçalanma ürününe ait ortalama alan değerleri

**Çizelge 4.7.3.1.** Farklı pH değerlerinde S IV boyar maddesinin GC-MS kromatogramlarında gözlenen parçalanma ürününe ait ortalama alan değerleri

**Çizelge 4.8.1.** S III boyasının kimyasal indirgenmesinde sıcaklık ve indirgen miktarının optimizasyonu için deneysel koşullar

**Çizelge 4.8.2.** S III boyasının kimyasal indirgenmesinde sıcaklık ve indirgen miktarının optimizasyonu çalışmalarında her bir deney koşulunu gösteren deneysel plan

**Çizelge 4.8.3.** Optimizasyon çalışmalarında, S III boyasının kimyasal olarak indirgenmesi sonucu, indirgenme ürününe ait olarak her bir deneysel koşulda belirlenen alan değerleri

## 1. GİRİŞ

Sentetik veya doğal çok sayıda boyar madde gıda katkı maddesi olarak kullanılabilir. En yaygın kullanılan sentetik renklendirici maddeler, azo boyar maddeleridir. Bunlar gıda maddelerin görüntü açısından arzu edilen forma dönüştürülmesi için çok sayıda gıda maddesine eklenerek tüketicilere sunulmaktadır. Bazı sentetik boyar maddelerin gıdalarda bulunabileceği sınır değerler mevcutken; bazılarının ise gıdalarda hiçbir seviyede bulunmasına müsaade edilmemektedir. Sudan I-IV azo boyar maddeleri gıdalardaki yasaklı boyalara örnek olarak gösterilebilir. Buna rağmen şiddetli kırmızı-turuncu renkleri nedeni ile çok sayıda gıda maddesinde illegal olarak kullanıldığı tespit edilmiştir. Bir gıda maddesinde ilk olarak sudan I boyar maddesinin tespit edildiği 2003 yılından itibaren yapılan çalışmalarla kanserojen etkisi tespit edildiğinden; ithal edilen ürünlerin sudan boyası içermediği yönünde analiz sertifikası olması gibi gereklilikler getirilirken, Sudan boyası tespit edilen ürünlerin ithalatı yasaklanmış; ürünler geri gönderilmiş ya da imha edilmesi istenmiştir.

Bazı azo boyalarının indirgenerek toksik aril aminleri oluşturabilme olasılıkları olduğu bilinmektedir (**Pielesz 1999, Garrigos ve ark. 2002**). Bu tür toksik aril amin içerikli azo boyalarının kullanımı yasaktır (**Nachiyar ve Rajakumar 2004**). İndirgenme yalnızca kimyasal ortamda değil, farklı yöntemlerle de gerçekleştirilebilir. Bunlar arasında özellikle enzimatik indirgenme, azo boyalarının insan sağlığı açısından değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Boyar maddelerin aril amin içeriklerinin tespiti için yaygın olarak kullanılan metotlar arasında boyar maddenin aril amin bileşenlerine parçalanması ve parçalanma ürünleri üzerinden GC-MS ile tayinleri bulunmaktadır. Özellikle sudan III, IV boyar maddeleri kaynama noktaları yüksek olduğu için GC-MS ile doğrudan tayin edilememekle birlikte bu boyalarının indirgenme ürünleri de aril amin bileşikleri olduğundan; parçalanarak tayin edilmeleri yönünde çalışmalar yapılmıştır.

Çalışmamızda, sudan I-IV boyar maddeleri; özellikle geleneksel mutfığımızın vazgeçilmezlerinden biri olan salça örneklerine katıldığında aynı anda veya her birinin ayrı ayrı nasıl tespit edileceklerine yönelik analitik metot gelişimi üzerinde durulmuştur. Karmaşık yapıları bir matriksten sadece bu boyar maddelerin alınmasına yönelik katı faz ve sıvı sıvı ekstraksiyonunun etkinlikleri ve boyar maddelerin eş zamanlı tayinlerine



yönelik parametreler incelenmiştir. Parçalanmayı etkileyen parametrelerin optimizasyonu için kemometrik yöntemden yararlanılmıştır. Geliştirilen dolaylı analitik metot yanında bu boyar maddelerin doğrudan tayinine yönelik LC-MS analizleri de karşılaştırma amaçlı olarak uygulanmıştır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Moleküler Kütle Spektrometri

#### 2.1.1. Moleküler Kütle Spektrometrenin Temel İlkeleri

Kütle spektrometresi (MS), moleküler kütle tayininde kullanılan bir tekniktir. Bir kütle spektrometre molekülden yüklü parçacıklar (iyonlar) oluşturur. Bu iyonlardan yararlanarak da bileşiğin moleküler kütlesi ve kimyasal yapısı hakkında bilgi edinilir ([http://www.chem.arizona.edu/massspec/intro\\_html/intro.html](http://www.chem.arizona.edu/massspec/intro_html/intro.html)).

Kütle spektrometrik analizin ilk basamağı, analitin gaz halinde iyonlarını elde etmektir. Şekil 2.1.1.1.'de görüldüğü gibi molekülün elektron akışı ile bombardımanı sonucu bir elektron kaybı gerçekleşmiş ve  $M^+$  moleküler iyonu oluşmuştur. Formüldeki noktanın da belirttiği gibi bu iyon radikal halindedir ve molekül ağırlığı molekülünki ile aynıdır. Yüksek enerjili elektronlar ile analit molekülleri arasındaki çarpışmalar moleküle, genel olarak onu uyaracak kadar yüksek enerji verir. Uyarılmış molekülün durulması sık sık parçalanma şeklinde olur ve daha düşük kütleli iyonlar açığa çıkar. Elektron çarpması sonucu elde edilen pozitif yüklü iyonlar, kütle spektrometrenin slit aralığından geçirilir ve kütle/yük ( $m/z$ ) oranına ayarlanmış bir ekranda kütle spektrumu halini alır (Skoog ve ark. 1998).



#### Şekil 2.1.1.1. Moleküler iyon oluşumu

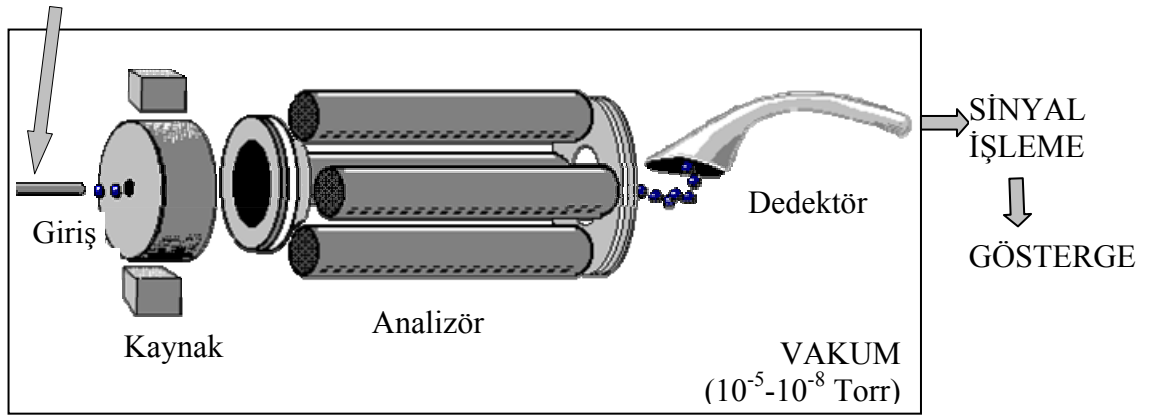
Kütle spektrumundaki her yatay çizgi spesifik  $m/z$  değerine sahip iyonu gösterirken bunların uzunlukları da bağıl yoğunluklarını simgeler. En şiddetli iyonun bolluğu 100 alınır ve temel pik olarak gösterilir. Geri kalan piklerin yükseklikleri bu temel pike oranlanarak temel pikin yüzdesi cinsinden uygun yükseklikte verilir. Kütle spektrometresinde elde edilen pek çok iyon tek yüke sahip olduğu için  $m/z$  aynı zamanda kütle değeridir. Modern kütle spektrometrelerinin ayırma gücü bir atom kütle birimi olduğu için molekül kütlelerinin doğru belirlenmesine imkan verir. Spektrumda en yüksek kütleli iyon, moleküler iyon olarak değerlendirilir. Daha düşük kütleli iyonlar

ise moleküler iyonun parçalanma ürünleridir (Skoog ve ark. 1998, <http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtualText/Spectrpy/MassSpec/masspec1.htm>).

### 2.1.2. Kütle Spektrometrenin Bileşenleri

Bir kütle spektrometre Şekil 2.1.2.1.'de gösterildiği gibi dört temel bileşene ayrılabilir.

NUMUNE



Şekil 2.1.2.1. Bir kütle spektrometresinin basitleştirilmiş şematik modeli

KAYNAK: <http://minyos.its.rmit.edu.au/~rcmfa/>

SKOOG, D.A., F.J. HOLLER, T.A. NIEMAN. 1998. Enstrümantal Analiz İlkeleri. Bilim Yayıncılık, Ankara. s.512.

İyonlar çok reaktif ve kısa ömürlü olduğu için, bunların oluşumu ve hareketi vakum altında olmalıdır. Atmosfer basıncı 760 Torr (mm Hg) iken; burada  $10^{-5}$ - $10^{-8}$  Torr basınç söz konusudur (<http://minyos.its.rmit.edu.au/~rcmfa/>).

#### a) İyon Kaynağı

İyon kaynağı spektrometrenin en önemli kısımlarından biridir. Kütle spektrumlarının görünüşü kullanılan iyonlaştırma yöntemine şiddetle bağlıdır. Moleküler kütle spektrometrelerinde kullanılan iyon kaynakları Çizelge 2.1.2.1.'de özetlenmiştir.

**Çizelge 2.1.2.1.** Moleküler kütle spektroskopide kullanılan iyon kaynakları

Teme Tip	Adı ve Kısaltması	İyonlaştırıcı
Gaz Fazı	Elektron impakt (EI)	Enerjik elektronlar
	Kimyasal iyonlaştırma (CI)	Reaktif gaz iyonları
	Alan iyonlaştırma (FI)	Yüksek-potansiyelli elektrot
Desorpsiyon	Alan desorpsiyonu (FD)	Yüksek-potansiyelli elektrot
	Elektrosprey iyonlaştırma (ESI)	Yüksek elektrik alanı
	Matriks yardımcı desorpsiyon iyonlaştırma (MALDI)	Lazer demeti
	Plazma desorpsiyonu (PD)	<sup>252</sup> Cf nin fisyon ürünleri
	Hızlı atom bombardımanı (FAB)	Enerjik atom demeti
	İkincil iyon kütle spektrometri (SIMS)	Enerjik iyon demeti
	Termosprey iyonlaştırma (TS)	Yüksek sıcaklık

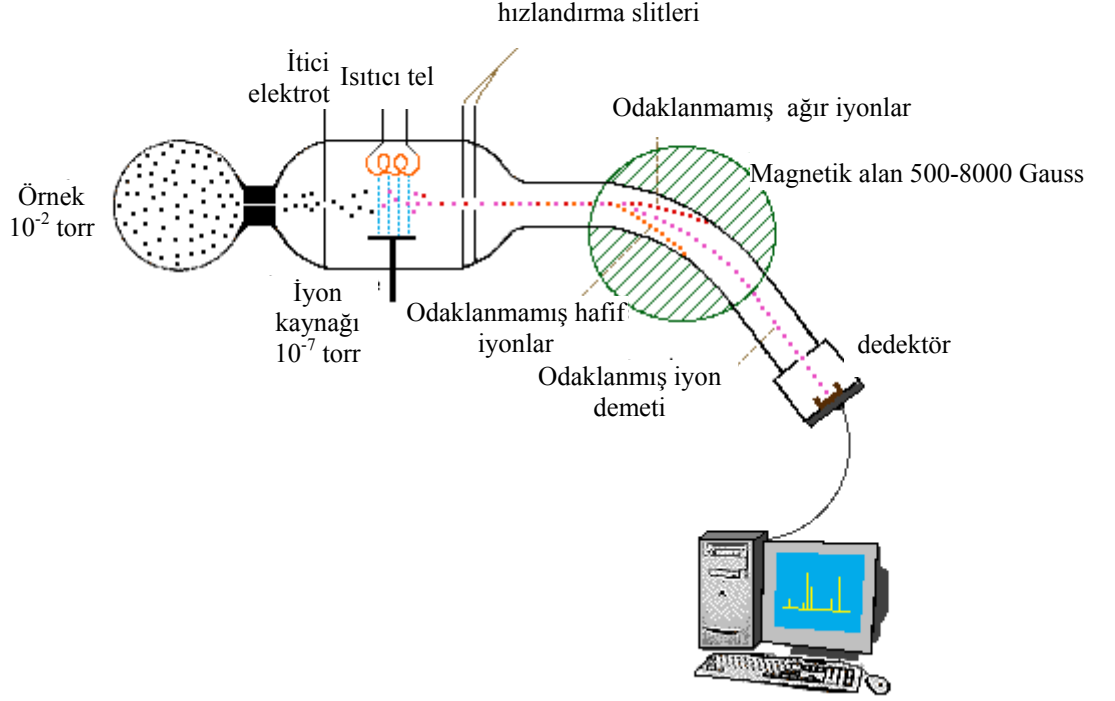
**KAYNAK: SKOOG, D.A., F.J. HOLLER, T.A. NIEMAN. 1998.** Enstrümantal Analiz İlkeleri. Bilim Yayıncılık, Ankara. s.500.

Desorpsiyon kaynaklı kütle spektrometreleri uçucu olmayan, termal olarak kararsız ve mol kütlesi  $10^5$  daltona kadar olan yüksek molekül ağırlıklı numunelere uygulanabilirken gaz fazı iyon kaynaklarının kullanımı kaynama noktaları  $500^{\circ}\text{C}$ 'den küçük termal olarak kararlı maddeler ile sınırlıdır, çoğunlukla mol kütleleri  $10^3$  daltondan daha küçük bileşikler incelenebilir. İyon kaynakları sert ve yumuşak kaynaklar olarak sınıflanır. Sert kaynaklar molekülleri yüksek enerjili uyarılmış hallere çıkarmaya yetecek enerji aktarırlar. Durulma bağ kopması şeklinde olur ve m/z oranı moleküler iyonunkinden küçük iyonlar oluşur. Yumuşak kaynaklar analiti daha az parçalar, kütle spektrumlarında moleküler pik çoğu zaman görülür ve bunun yanında birkaç başka pik bulunur. Sert kaynaklar yapı aydınlatmada kullanılırken, yumuşak kaynaklar molekül veya moleküllerin mol kütlelerinin doğru olarak tayininde yararlıdır (Skoog ve ark. 1998).

En yaygın kullanılan iyonlaştırma tekniği elektron impakt (EI) ve buna alternatif olarak da kimyasal iyonlaştırmadır (CI). İlk teknikte molekülden bir elektron kaybı ve  $M^+$  radikal katyonu ile gösterilen moleküler iyon piki oluşumu ile sonuşlanan bir elektron bombardımanı söz konusudur. Moleküler iyon piki ilgili bileşiğin molekül kütleini verir. Yüksek enerji nedeni ile bu moleküler iyon karakteristik bağıl yoğunluğa sahip daha küçük iyonlara parçalanır. Bu da karışımdaki ilgilenilen bileşiğin diğer bileşenlerden ayrılması ve moleküler yapının tanınmasını sağlayan parmakizini oluşturur. Kimyasal iyonlaşma ise metan veya uygun başka bir gazın iyonlaşması ile başlar. Oluşan iyon,  $[M+H]^+$  moleküler iyonunu oluşturmak üzere numune molekülünü (M) iyonlaştırır. EI ile karşılaştırıldığında molekülün iyonlaşması için daha az enerjili bir yöntem olduğu için daha az parçalanma gerçekteşir; bu nedenle de molekülün ayrıntılı yapısı hakkında daha az bilgi edinilir. Fakat EI ile analit molekülünün daha ileri düzeyde parçalanması gerçekteşebileceği için moleküler iyon bazen dedekte edilemediği halde CI ile moleküler iyon piki tespit edilebilir. Bu nedenle iki teknik birbirini tamamlar.

EI nın şematik olarak gösterilişi şekil 2.1.2.2.'de verilmiştir. Örnek molekülleri (siyah noktalar) ısıtılan telden yayınlanan yüksek enerjili elektronlarla (mavi çizgiler) bombardıman edilir. Bu kaynak EI olarak adlandırılır. Gaz ve uçucu sıvı örneklerin bir rezarvuardan iyon kaynağına akması sağlanırken; uçucu olmayan katı veya sıvılar doğrudan verilebilir. Elektron bombardımanı ile oluşan katyonlardan (kırmızı noktalar) odaklanmış olanlar dedektöre ulaşır. Hafif iyonlar magnetik alan etkisi ile yön değiştirir. İyonlar, magnetik alandan etkilenir ve magnetik alan kuvvetine göre dedektöre odaklanır; elektronik olarak dedekte edilerek bilgisayara aktarılır.

(<http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtualText/Spectrpy/MassSpec/masspec1.htm>)



**Şekil 2.1.2.2.** EI kaynağının şematik görünümü

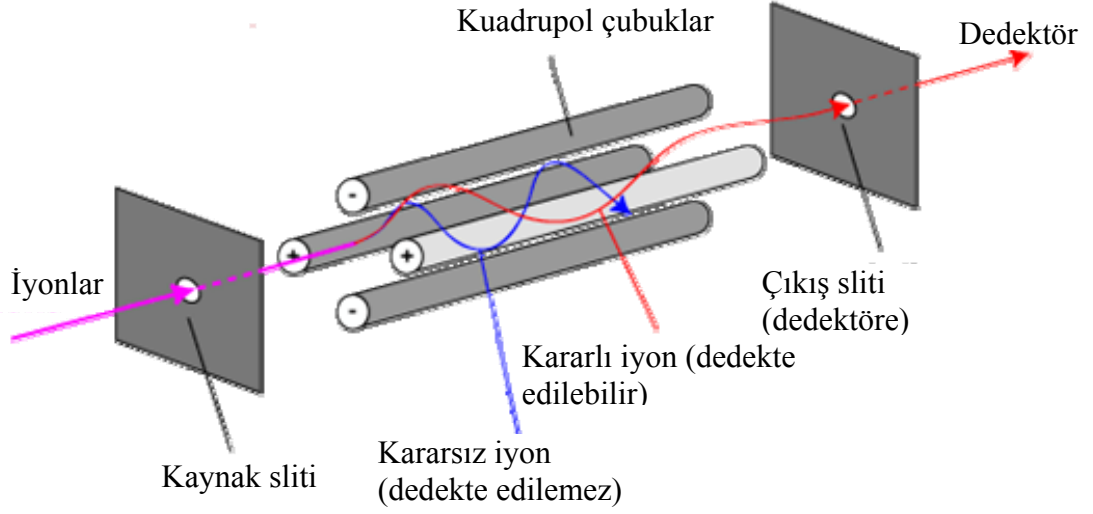
**KAYNAKLAR:** <http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtualText/Spectrpy/MassSpec/masspec1.htm>  
**SKOOG, D.A., F.J.HOLLER, T.A.NIEMAN. 1998.** Enstrümantal Analiz İlkeleri.  
 Bilim Yayıncılık, Ankara. s.502.

## b) Kütle Analizörü

Çeşitli kütle analizörleri bulunmaktadır. Bunlar; iyon tuzaklı, kuadropol, manyetik sektör, uçuş-zamanlı, çift-odaklamalı gibi farklı türlerdedir. En yaygın kullanılanları ise kuadropol ve iyon tuzaklı analizörlerdir. Kuadropol kütle analizörünün şematik modeli Şekil 2.1.2.3.' te gösterilmiştir. Kütle analizöründe iyonlar kütle ve yüklerine göre ayrılırlar. Ayrılan iyonlar dedektörde tespit edilir ve sayılır, bilgisayara gönderilir, bilgisayarda veri şeklinde okunur.

(<http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms.html>,

<http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtualText/Spectrpy/MassSpec/masspec1.htm>)



**Şekil 2.1.2.3.** Kuadrupol kütle analizörünün şematik modeli

**KAYNAK:** <http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms.html>

### 2.1.3. Kütle Spektrometrenin Uygulamaları

Moleküler kütle spektrometri pek çok alanda kullanılmaktadır. Saf bileşiğin kütle spektrumu mol kütlesi ve molekül formülü hakkında bilgi vermektedir. Parçalanma şekli yapısal bilgi verirken spektrum karşılaştırılması veya bilgisayarlı kütüphane tarama sistemlerinden yararlanılarak bileşik teşhisi yapılır (Skoog ve ark. 1998).

## 2.2. Kütle Spektrometrenin Birlikte Kullanıldığı Kromatografik Yöntemler

### 2.2.1. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS)

Numune doğrudan kütle spektrometresinin iyonlaşma kaynağına verilebileceği gibi, çoğunlukla iyonlaşma kaynağı ile son bulan bir kromatografik teknik de kullanılabilir. Kütle spektrometresi ile birlikte kullanılabilen tekniklere örnek olarak gaz kromatografisi (GC), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kapiler elektroforez (CE) verilebilir.

(<http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/MStut/mstutorial.htm>)

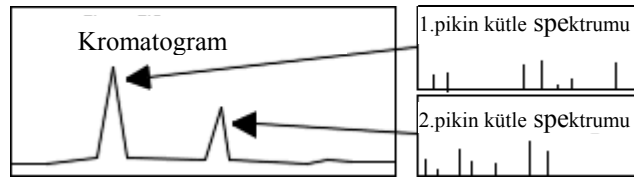
Kütle spektrometresi ile tespit edilebilen bileşik gaz fazında verilmeli ve saf olmalı, yani karışım halinde olmamalıdır. Pek çok gerçek örnek ise karışım olduğu için bunları ayırmak ve buharlaştırmak için kullanılabilen en uygun yöntem kütle spektrometresini gaz kromatografisine bağlamaktır. Bileşenler uçucu olmayan bir sıvı ile kaplı GC kolonundan, kaynama noktalarına ve kolon-taşıyıcı gaz etkileşimlerine göre ayrılırlar. Gaz faz ile etkileşim ne kadar fazla ise ayırım o kadar hızlıdır. Bileşenin, enjeksiyon portundan dedektöre ulaşmaya kadar geçen süre olarak tanımlanan alıkonma zamanı da kendisine özgüdür.

GC ile elde edilen şiddete karşı zaman dedektör sinyali eğrisi, bileşenlerin elüsyonunu simgeler ve kromatogram olarak adlandırılır. Kromatogramdaki her pik de bir bileşeni simgeler.

Pik alanı karışımdaki bileşenin miktarını simgelerken; alan ile konsantrasyon arasında normal şartlarda lineer bir ilişki söz konusudur (<http://www.oberlin.edu/chem/Secondary/ExpDev/GCMSIntro.pdf>).

GC-MS; kompleks karışımların ayrımı, tespit ve tayinlerinin yapılabildiği bir tekniktir. Bu nedenle de molekül kütlesi düşük olan yüzlerce bileşiğin analizi için idealdir. Bir bileşiğin GC-MS ile analiz edilebilmesi için termal olarak kararlı ve yeterince uçucu olması gerekmektedir. Ayrıca fonksiyonel gruplu bazı bileşiklerin, veri kalitesini etkileyecek adsorpsiyon problemlerini önlemek için, analiz öncesi türevlendirme gibi bazı kimyasal modifikasyonları gerekebilmektedir. Örnekler organik çözücüde çözülmüş olarak verildiği için de toprak, sediment, doku gibi örneklerin organik çözücüye alınması için çeşitli teknikler gerekir. Örnek, GC girişine enjekte edilir; buharlaşır ve taşıyıcı gaz (genellikle helyum) ile kolondan süpürülür. Örnek bileşenleri, kolon dolgu maddesi (durgun faz) ve taşıyıcı gaz (hareketli faz) ile etkileşimlerine göre ayrılırlar. Şekil 2.2.1.1.'deki kromatogramda gözlenen pikler böyle bir ayırımın sonucudur. Kolon, buradan elüe edilen bileşiklerin iyonlarına dönüştürüldüğü iyon kaynağı ile son bulur. Ayrılan bileşikler burada iyonlaştırma sonrası kütle spektrometresine aktarılırlar.



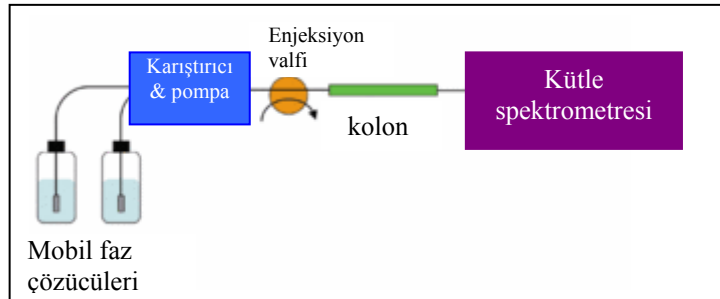


**Şekil 2.2.1.1.** GC-MS'te gözlenen kromatogram ve bunlara ait kütle spektrumlarının basit bir şematik gösterimi

**KAYNAK:** [http://www.chem.arizona.edu/massspec/intro\\_html/intro.html](http://www.chem.arizona.edu/massspec/intro_html/intro.html)

### 2.2.2. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS)

Kütle spektrometri, uçucu olmayan bileşenler içeren numunelerin analizi için sıvı kromatografisi ile birleştirilmiştir. LC-MS, Şekil 2.2.2.1.'de şematik olarak gösterilmiştir. GC'den farklı olarak burada hareketli faz sıvıdır ve bu sıvı faz analit moleküllerini içinde buldukları çözelti fazından, belli uzunluk ve çaptaki kolon yardımı ile ayırır.

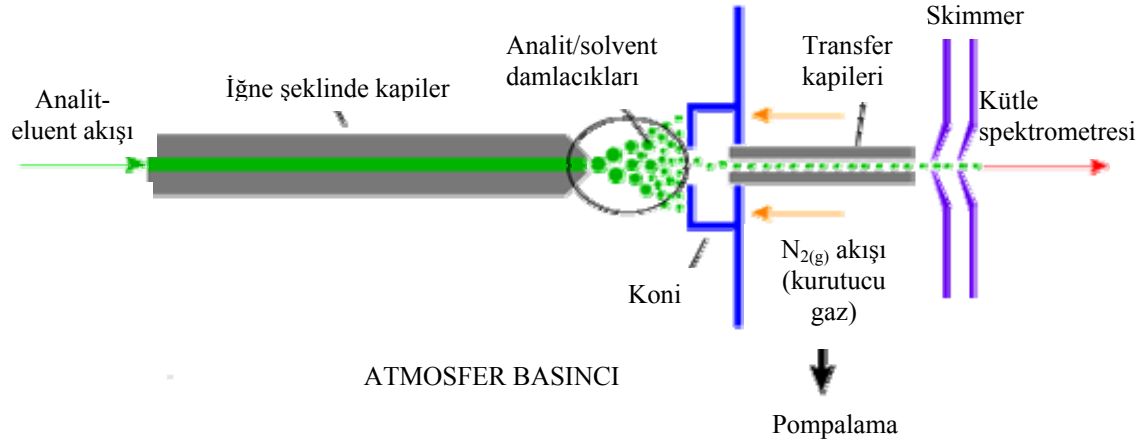


**Şekil 2.2.2.1.** LC-MS'in şematik gösterimi

**KAYNAK:** [http://ch309c.chem.lsu.edu/mswiki/index.php/Liquid\\_chromatography-mass\\_spectrometry](http://ch309c.chem.lsu.edu/mswiki/index.php/Liquid_chromatography-mass_spectrometry)

İyonlaştırma kaynağı olarak kullanılan yöntemlerden biri, elektrosprey iyonlaştırmadır (ESI). Elektrosprey iyonlaştırmının şematik modeki Şekil 2.2.2.2.'de verilmiştir. ESI, atmosfer basıncında ve oda sıcaklığında gerçekleşir. Numune çözeltisi, paslanmaz çelikten iğne şeklinde bir kapiler ile, dakikada birkaç mikrolitre hız sağlanarak pompalanır. İğneye, etrafındaki silindirik elektroda göre birkaç kilovolt potansiyel uygulanır. Oluşan çok küçük ve elektrik yüklü damlacıklar, daha sonra bir

çözücü giderme kapilerinden geçer. Burada çözücü buharlaşır ve elektrik yükleri analit moleküllerine tutunur. Çözücü buharlaşmış damlacıklar küçülürken yük yoğunluğu artar ve iyonlar, gaz fazına desorbe olur (Skoog ve ark. 1998).



Şekil 2.2.2.2. Elektrosprey iyonlaştırmanın şematik gösterimi

KAYNAK: <http://www.bris.ac.uk/nerclsmf/techniques/hplcms.html>

### 2.3. Ultraviyole-Görünür Bölge (UV-VIS) Moleküler Absorpsiyon Spektrofotometri

Moleküler absorpsiyon spektroskopisi, b cm ışın yoluna sahip ışık geçirgen bir kaptaki bulunan bir çözeltinin geçirgenliğinin veya absorpsiyonunun ölçümüne dayanır. Şekil 2.3.1.'de görüldüğü gibi UV-VIS moleküler absorpsiyon spektroskopisinde örnekten ultraviyole veya görünür ışık geçirilir. Işın demetinin bir kısmı olduğu gibi geçerken bir kısmı ise örnek tarafından absorplanır. Geçirgenlik (T),  $P/P_0$  ile; absorpsiyon ise  $-\log T$  ile belirtilir. Normal olarak absorpsiyon, absorpsiyon yapan analit derişimi ile doğrusal olarak değişir. Bunun sonucu Beer yasası aşağıdaki eşitlik ile verilebilir.

$$A = -\log T = \log(P_0/P) = \epsilon b C \quad (2.3.-1.)$$

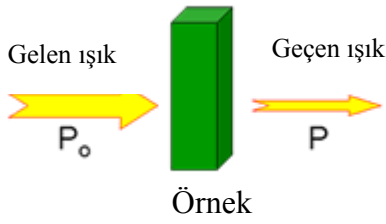
C= Analit derişimi,

b= Işın yolu,

$\epsilon$ = Absorplayıcı türün molar absorptivitesi

$P_0$  = Örnek hücreğine gelen ışık şiddeti,

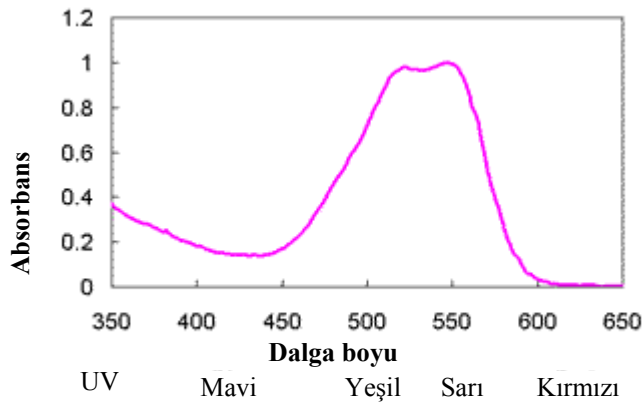
P= Örnek hücrelerinden geçen ışık şiddeti



**Şekil 2.3.1.** Moleküler absorbansın şematik gösterimi

**KAYNAK:** [http://faculty.kutztown.edu/betts/html/UV\\_Vis\\_Absorbance.htm](http://faculty.kutztown.edu/betts/html/UV_Vis_Absorbance.htm)

Molekül tarafından ışığın tüm dalga boyları eşit oranda absorplanmaz. Bir absorpsiyon spektrumu da ışığın hangi dalga boylarının absorplandığını gösterir. Aşağıdaki absorbans spektrumu, bir tekstil boyasından farklı dalga boylu ışığın geçirilmesi ve geçen ışık şiddetinin ölçülmesi ile elde edilmiştir. Absorplanan dalga boyları pikleri gösterirken; çukurlar da absorplanmayan dalga boylarını temsil eder.



**Şekil 2.3.2.** Bir tekstil boyasının absorbans spektrumu

**KAYNAK:** [http://faculty.kutztown.edu/betts/html/UV\\_Vis\\_Absorbance.htm](http://faculty.kutztown.edu/betts/html/UV_Vis_Absorbance.htm)

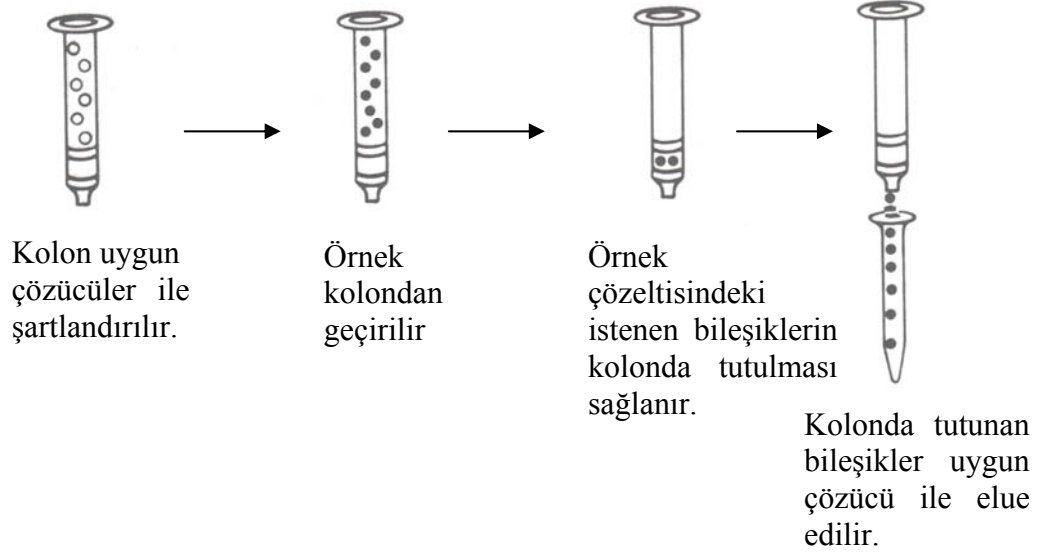
UV (Ultraviyole) veya görünür alanda absorpsiyon genellikle bağ elektronlarının uyarılmasından kaynaklanır; bunun sonucu olarak absorpsiyon piklerinin dalga boyları, incelenen türdeki bağların tipleri ile ilişkilendirilebilir. Bu yüzden moleküler absorpsiyon spektroskopisi bir moleküldeki fonksiyonel grupları tanımak için yararlıdır; ancak daha önemlisi UV-VIS absorpsiyon spektroskopisinin ışık absorplayan gruplar taşıyan bileşiklerin kantitatif tayinine uygulanmasıdır.

Tüm organik bileşikler elektromanyetik ışını absorplayabilir, çünkü hepsinin daha üst enerji düzeylerine uyarılacak değerlik elektronları vardır. Çoğu tek bağı oluşturan elektronlara ilişkin uyarma enerjileri yeterince yüksektir öyle ki bunların ışın absorpsiyonu, vakum ultraviyole bölgesi diye bilinen ( $\lambda < 185$  nm) ve atmosfer bileşenlerinin de kuvvetli absorpsiyon gösterdiği bölge ile kısıtlıdır. Bu bölge ile deneysel güçlükler nedeni ile organik bileşiklerin spektrofotometrik araştırmalarının çoğu 185 nm'den daha yüksek dalga boylu bölgede yapılır. Daha uzun dalga boylu UV ve görünür bölge (VIS) ışınının absorpsiyonu, nispeten düşük uyarma enerjili değerlik elektronları taşıyan ve kromofor olarak adlandırılan sınırlı sayıda fonksiyonel grup ile kısıtlanmıştır. Kromoforları içeren organik moleküllerin elektronik spektrumları genellikle karmaşıktır, çünkü titreşim geçişlerinin elektronik geçişler ile çakışması üst üste binen absorpsiyon çizgilerinin karmaşık bir bileşimini doğurur. Bunun sonucunda da çoğu kez sürekli görünen geniş bir absorpsiyon bandı ortaya çıkar. Bu spektrumların karmaşık yapısı ayrıntılı kuramsal analizi güç ya da olanaksız kılarsa da verilen bir absorpsiyon spektrumundan sorumlu elektronik geçişlerin türlerine ilişkin kalitatif veya yarı kantitatif ifadeler molekül orbital düşüncelerinden çıkarılabilir. Kromoforlara ait teorik olarak belirlenen maksimum absorpsiyon dalga boyu değerleri molekülün yapısal ayrıntılarından ve çözücüden etkileneceği gibi oksokrom adı verilen ve bu maksimumları daha uzun dalga boylarına kaydırıp absorpsiyon şiddetini artıran fonksiyonel grupların etkisi de söz konusudur (**Skoog ve ark. 1998**).

#### 2.4. Katı Faz Ekstraksiyonu

Katı faz ekstraksiyonu; çevre, gıda, klinik, ilaç ve endüstri gibi pek çok alanda uygulanabilen etkin bir ayırma ve deriştirme tekniğidir. Genellikle uygun dolgu maddeleri (sorbentleri) içeren küçük kolon veya kartuşlar ile uygulanır (**Bhaskar ve ark. 2004**).

Katı faz ekstraksiyonu, hızlı ve etkin bir örnek hazırlama tekniğidir. Hacmi mikrolitre ile birkaç yüz mililitre arasında değişen örnek çözeltileri, seçici dolgu maddeleri ile doldurulmuş kolonlardan geçirilir. Örnek çözeltisinde bulunan ve kolonda tutulan ilgili bileşikler, dolgu maddesinden uygun çözücü ile ekstrakte edilir. Katı faz ekstraksiyonunun şematik olarak gösterimi Şekil 2.4.1.'de verilmiştir.




Şekil 2.4.1. Katı faz ekstraksiyonunun basit bir şematik gösterimi

KAYNAK: 'BAKER'-10 SPE Applications Guide. 1984. Vol.2, p.96-110.

#### 2.4.1. Katı Faz Ekstraksiyon Kolonlarının Dolgu Maddelerinin Fonksiyonel Grupları ve Yapıları

Bazı dolgu maddeleri, polaritelerine göre Şekil 2.4.1.1.'de sıralanmıştır.

POLARİTE ARTIŞI ↓	<b>Apolar</b> (polar olmayan)	Oktadesil (C <sub>18</sub> ), Oktil(C <sub>8</sub> ), Butil (C <sub>4</sub> ), Sikloheksil (  ) , Fenil (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> )
	<b>Polar</b>	Siyano (CN), Kiselguhr(SiOH), Silika Jel (SiOH), Diol(CO <sub>2</sub> HCO <sub>2</sub> H), Amino(NH <sub>2</sub> ), Florisil(SiO <sub>n</sub> ) Alumina (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )
	<b>Anyon değiştiriciler</b>	1° , 2° - Amino (NH <sub>2</sub> /NH), kuarterner amin (N <sup>+</sup> )
	<b>Kasyon değiştiriciler</b>	Karboksilik asit (COOH), Sülfonik asit (-SO <sub>3</sub> H)

Şekil 2.4.1.1. Bazı dolgu maddelerinin polarite artışlarına ait sıralama

KAYNAK: 'BAKER'-10 SPE Applications Guide. 1984. Vol.2, p.96-110.

## 2.4.2. Katı Faz Ekstraksiyon Mekanizmaları, Örnek İçin Bilinmesi Gereken Temel Özellikler ve Çözücü Polariteleri

Katı faz ekstraksiyon mekanizmaları özetle; adsorpsiyon, bağlı-faz dağılma, normal faz, ters faz, iyon-çifti ters faz, iyon değişimi, boyut eleme, geniş gözenek katı faz ekstraksiyonu şeklinde verilebilir

Katı faz ekstraksiyonu öncesi yapıya ilişkin molekül ağırlığı, çözünürlük, fonksiyonel grup (veya gruplar), polarite, pH/pK<sub>a</sub> göz önüne alınmalıdır. Çözücü polarite sıralaması da Şekil 2.4.2.1.' de verilmiştir.



**Şekil 2.4.2.1.** Bazı çözücülerin polarite artışlarına ait sıralama

**KAYNAK: 'BAKER'-10 SPE Applications Guide. 1984. Vol.2, p.96-110.**

## 2.5. Kemometrik Yöntemler

Kemometri; bilgisayar, istatistik ve matematiksel yöntemlerin kimyasal verilere uygulanmasıdır. Ne var ki, tüm bu metotların limitleri ve varsayımları tam olarak anlaşılmeden kimyasal problemlerin çözümüne yönelik istatistiksel metotların kullanılması uygun olmamaktadır. Kimyasal veriler tek değişkenli olabildiği gibi çoğu zaman bir çok değişkene bağlı olabilmektedir. Bu değişkenlerin her birinin analiz başlangıcında eşit öneme sahip olduğu önemle düşünülen bir noktadır. Çok değişkenli verilerin analizinde çoğu zaman kemometrik metotlar kullanılmaktadır. Deneysel parametrelerin klasik yöntemlerle optimizasyonunda değişkenlerden biri sabit

tutulurken diğ er değ işkenler faklı oranlarda alınarak bu değ işkenlerin etkileri incelenir. Bu iş lem her bir değ işken için tekrarlanır. Fakat klasik yöntemlerde parametrelerde arasında da etkileş im olabileceğ i ve eę er etkileş im oluyorsa bu iki parametre arasındaki etkileş imin diğ erlerini etkileyebileceğ i hesaplanamamaktadır. Bu nedenle bu yöntem yeterli değ ildir. Kemometrik tekniklerde ise; hangi parametreler etkilidir, bu parametrelerin etkisi ne kadardır ve bu parametrelerin etkileş im miktarları ne ölçüdedir gibi sorulara yanıt aranmaktadır. Bu amaca yönelik bir çok kemometrik optimizasyon tekniğ i geliştirilmiş tir. Kemometrik optimizasyon tekniklerinde optimum koş ulların sağ lanabilmesi için deneysel dizaynlar oluşturulur. Bu dizaynlar deneysel ç alış manın planlı bir şekilde, zaman kaybı olmadan ve yeterli sayıda yapılmasını sağ lar. Değ iş ik amaçlara yönelik çeş itli deneysel dizayn yöntemleri vardır.

Verilerin kemometrik analizi için bilgisayar programlarına ihtiyaç duyulmaktadır. En yaygın kullanılan programlama ortamları arasında MATLAB ve VISUAL BASIC sayılabilir. Bunların dışında bazı hazır programlar da kullanılmaktadır. Bunlar değ iş ik kemometri alanında ç alış an gruplar ticari olarak piyasaya sunulmaktadır. Bazıları ş unlardır. CAMO, EIGENVECTOR RESEARCH, INFOMETRIX, UMETRICS gibi firmalardır (Demir 2003).

### 2.5.1. Merkezi Kompozit Dizayn

Faktoriyel dizaynlar her bir faktörün etkilerini genel olarak inceleyen yöntemlerdir. Her bir faktörün optimum koş ullarının bulunması merkezi kompozit dizayn yöntemi ile yapılır. Buradaki deney sayısı aş ağıdaki formüle göre belirlenir.

$$\text{Deney sayısı} = 2^k + 2k + 1 \quad (k = \text{faktör sayısı}) \quad (2.5.1.-1)$$

Formüldeki  $2^k$  full faktoriyel veya fraksiyonlu faktoriyel dizayndaki deney sayılarını,  $2k$  star dizayn deney sayısını ve 1 ise orta seviyedeki deney sayısını gösterir.  $2^k$  daki seviyeler (-1) ve (+1),  $2k$ 'dakiler  $\pm \alpha$ , 1'deki ise (0)'dır. A değ eri dairesel ve ortogonal dizayna göre farklı seviyeler alır.

Dairesel dizaynda  $\alpha$  aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$\alpha = \pm \sqrt[4]{2^k} \quad (2.5.1.-2)$$

Ortogonal dizaynda ise  $\alpha$  aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$\alpha = \pm \sqrt{k} \quad (2.5.1.-3)$$

## 2.6. Azo Boyaları

Boya ve pigment gibi renklendiriciler önemli endüstriyel kimyasallardır (**Golka ve ark. 2004**). Boyar maddelerin bir grubunu oluşturan azo boyaları; tekstil, kağıt, deri, benzin, katkı maddeleri, gıda maddeleri, oyuncak, plastik, baskı mürekkepleri, ilaç, kozmetik ürünlerinde yaygın olarak kullanılan ve kromofor azo grupları (-N=N-) ile karakterize edilen sentetik organik boyar maddelerdir (**Garrigos ve ark. 2002, Bhaskar ve ark. 2003, Gnanamani ve ark. 2004, Calbiani ve ark. 2004, Ahlström ve ark. 2005**). Kromofor azo grupları, 400-750 nm aralığında görünür bölge ışığını absorplama veya yansıtma yolu ile renk oluşumundan sorumludurlar (**Davies ve ark. 2006**).

Azo boyaları, boya endüstrisinde kullanılan boyaların en geniş sınıfını oluştururlar (**Zhang ve ark. 2005**). Tekstil boyalarının %80'i azo boyalarıdır (**Pielesz 1999**). Bu boyalar, ucuz oldukları ve hızlı renk verdikleri için 19.yy'ın ikinci yarısından itibaren çok sayıda endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (**Ahlström ve ark. 2005**). 1800' l yıllarda güvenilirliğine dair bilgi olmaksızın yaygın olarak kullanılan sentetik boyalar, gıdaların işlem görmeleri sırasında kaybolan doğal renginin sağlanması veya doğal olarak renksiz olan gıdaların tüketiciler üzerindeki çekiciliğini artırmak için kullanılabilmektedirler (**Tripathi ve ark. 2007**). Bununla birlikte bu tür sentetik boyaların gıdalarda ve içeceklerde kullanımına yasalarca belirli limitler getirilmiştir. Limit değerler, gıda türüne ve boyar madde yapısına bağlı olarak değişen belirli aralıktadır (**Chanlon ve ark. 2005**). Sudan I (S I), Sudan II (S II), Sudan III (S III) ve Sudan IV (S IV) boyar maddeleri de gıdalarda bulunmasına izin verilmeyen sentetik boyar maddelerdendir.



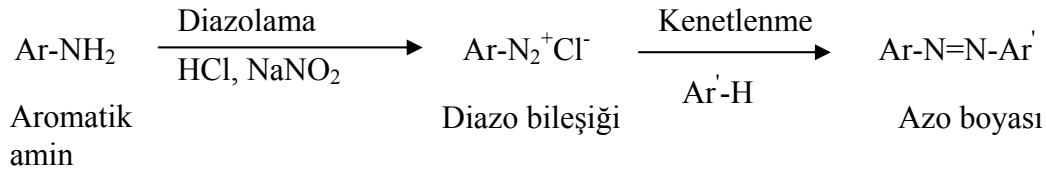
### 2.6.1. Azo Boyalarının Sentezi ve İndirgenmesi

Azo boyar maddeleri; genellikle diazolanmış aminlerin (diazonyum bileşiği) fenol veya başka bir amin (aromatik aminlerle) bileşiği ile reaksiyona girmesi sonucu sentezlenen, bir veya daha fazla azo bağı içeren sentetik organik renklendiricilerdir **(Calbiani ve ark. 2004, Ahlström ve ark. 2005, Sponza ve Işık 2005)**. Yaklaşık iki bin boya bu şekilde sentezlenmiş olmakla birlikte bunların beş yüzden fazlası kanserojen aromatik amin kökenlidir **(Gnanamani ve ark. 2004, Gnanamani ve ark. 2005)**. Hayvanlar üzerinde yapılan bazı denemeler sonucunda azo boyar maddelerinin kanserojen oldukları tespit edilmiştir. Bu maddelerin aromatik aminlere parçalanması toksik etkilerini açıklamaktadır. Bu boyalar kimyasal, biyolojik veya fotolitik yol ile parçalanabilmekte; indirgenme sonrasında genellikle aromatik R-NH<sub>2</sub> verecek şekilde parçalanma ürünleri oluşturmaktadırlar. Bu boyar maddelerin çeşitli yollarla insan metabolizmasına alınması durumunda, biyolojik indirgenme sonucu toksik aminlerin oluşumu tespit edilmiştir **(Pielesz 1999)**. Azo boyalarının indirgenmesi kimyasal ortamda gerçekleşebileceği gibi; karaciğer veya diğer organlardaki azo redüktazlar veya bağırsak bakterilerinin etkisi sonucu insan organizmasında enzimatik indirgenme şeklinde de olabilir **(Oh ve ark. 1997)**. Literatürde; biyolojik (mikroorganizmalarla) **(Gnanamani ve ark. 2004, Gnanamani ve ark. 2005, Kumar ve ark. 2005, Khehra ve ark. 2006)**, fotokimyasal yöntem **(Cisneros ve ark. 2002)**, metalik demir (Fe (0)) **(Feng ve ark. 2000)** ile, fenton sistemi (Fe<sup>2+</sup>/Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)) ve fenton benzeri sistem (Fe<sup>3+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) reaksiyonları **(Hsueh ve ark. 2005)**, radyolitik yöntem **(Zhang ve ark. 2005)**, radyasyon indüklenmiş yöntem **(Wojnarovits ve ark. 2005)**, ultrasonik yöntem **(Gültekin ve İnce 2006, Inoue ve ark. 2006)**, ozonlama yöntemi **(Zhao ve ark. 2004, Gültekin ve İnce 2006)**, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında UV ışığı ile fotooksidatif olarak **(Modirshahla ve Behnajady 2006)** veya ozon-ultrases kombinasyonu ile **(Gültekin ve İnce 2006)** indirgeme işlemi yapılabileceği belirtilmektedir. İndirgenme ile renksizleşme, oksijensiz ortamda biyolojik veya kimyasal olarak meydana gelebilmektedir; mikrobiyal anlamda ise mikroorganizma enzimleri etkindir. İndirgemedeki saf mikroorganizma kültürleri veya karışım kültürlerinin kullanıldığı termofilik şartlar da belirtilmiştir **(Dos Santos ve ark. 2006)**. Kromofor azo grupları boyar maddelerin mikrobiyal etkiye ve oksijenli ortamda renksizleşmeye dayanıklılığını

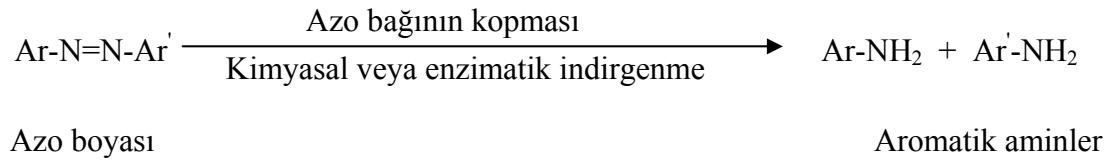
artırmaktadır. Biyolojik indirgenme oksijenli ve oksijensiz ortam mikroorganizmaları, mantar, antinomycetes ve alg gibi çeşitli mikroorganizmalar ile yapılmıştır. Bunlardan antinomycetes ve mantar türleri ile indirgeme boyanın oksidatif olarak aktivasyonudur, katyonik türler oluşur ve boya molekülü suyun nükleofilik saldırısına açık hale gelir. Bakteriyel indirgeme, genellikle oksijensiz şartlarda indirgenmiş koenzimin elektron vericisi olarak davrandığı azoredüktaz ilavesi ile azo bağlarının kopmasını içeren enzimatik biyotransformasyon basamağı ile başlar. Oksijenli ortamda ise azo bağları pratik olarak bakterilerce parçalanmamaktadır. Ancak bazı sülfü gruplu azo boyalarının oksijenli ortamda bakterilerce indirgenmesi de literatürde görülmektedir; burada oksijenin varlığına rağmen, başlangıç basamağında oksijene ilgisiz azo redüktaz enzimi ile azo bağının indirgenmesi söz konusudur. Oksijensiz şartlar altında çok sayıda bakteri bu indirgen parçalanmayı katalizler; sonunda mutajen ve kanserojen aromatik aminler oluşur. Azo bağlarının indirgenerek kopması sonucu bu tür aromatik aminleri verdiği bilinen bazı azo boyaları yasaklanmıştır (**Nachiyar ve Rajakumar 2004**).

Azo boyalarının sentezi ve indirgen parçalanması Şekil 2.6.1.1.'de verildiği gibidir.

#### SENTEZ:



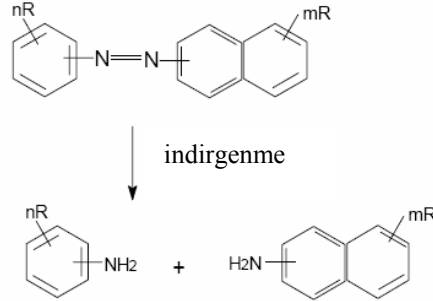
#### İNDİRGEN PARÇALANMA:



**Şekil 2.6.1.1.** Azo boyalarının sentezi ve indirgen parçalanması

**KAYNAK:** OH,S.W., M.N.KANG, C.W.CHO VE M.W.LEE. 1996. Detection of carcinogenic amines from dyestuffs or dyed substrates. Dyes and Pigments, 33(2):119-135.

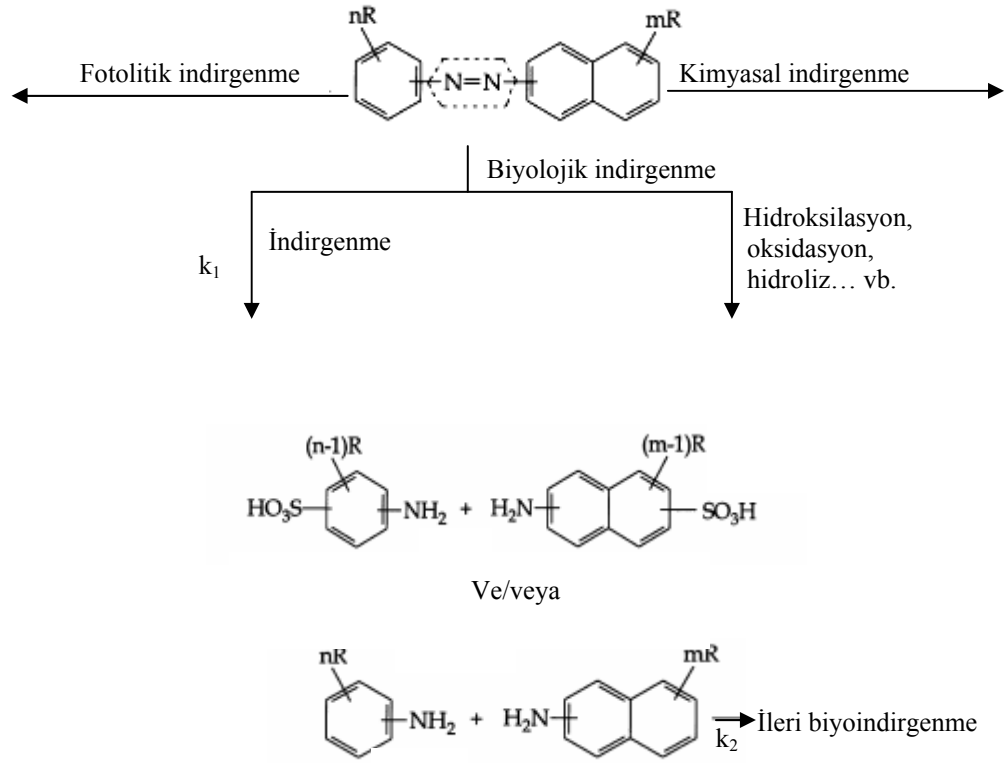
Azo boyalarının indirgen parçalanması, Şekil 2.6.1.2.'deki genel yapı üzerinde de gösterilebilir:



**Şekil 2.6.1.2.** Bir azo boyasından indirgen parçalanma yolu ile aromatik amin oluşumu

**KAYNAK: PIELESZ,A., I.BARANOVSKA, A.RYBAK, A.WLOCHOWICZ. 2002.** Detection and determination of aromatic amines as products of reductive splitting from selected azo dyes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53:42-47.

Şekil 2.6.1.3.'te azo boyasından aromatik aminlerin nasıl oluştuğu özetlenmektedir. Boyar maddelerden aminlerin oluşmasını sağlayan bu metotlar; fotolitik ve kimyasal indirgenme ile biyoindirgenmedir. Azo boyar maddeleri aerobik şartlarda indirgenmeye karşı direnç göstermesine rağmen anaerobik şartlar altında kolaylıkla aromatik aminlere indirgenebilmektedir. İndirgenme; öncelikle bağırsak bakterileri, karaciğer hücreleri ve deri mikro florasındaki azoredüktazlar tarafından azo bağlarının kopması ile meydana gelir (**Pielesz 1999, Pielesz ve ark. 2002**).



**Şekil 2.6.1.3.** Azo boyalarının indirgenmesinin şematik modeli

**KAYNAK: PIELESZ, A. 1999.** The process of the reduction of azo dyes used in dyeing textiles on the basis of infrared spectroscopy analysis. Journal of Molecular Structure, 512-513:337-344.

### 2.6.2. Azo Boyalarının Kimyasal İndirgenmesi ve İndirgenme Yolu İle Analizleri

İndirgenme, azo boyalarının indirgenme reaksiyonu sonucu azo bağlarından parçalanarak karşılık gelen aromatik aminlerin oluşması olarak tanımlanabilmektedir.

Bu amaçla; sodyum ditiyonit, kalay (Sn) (II) klorür, oda sıcaklığında metalik çinko (Zn) ve metanolde amonyum format/formik asit kullanılabileceği gibi, elektrokimyasal işlemler de uygulanabilir. İndirgeme, bileşiğin doğrudan GC' deki ısıtılmış enjeksiyon portuna verilerek de başarılmıştır (**Ahlström ve ark. 2005**). Renksizleşme kimyasal olarak sülfıt, sistein, askorbat veya  $Fe^{2+}$  gibi biyojenik indirgenler ile de meydana gelebilmektedir (**Dos Santos ve ark. 2006**).

Sodyum ditiyonit ve Sn(II) klorür kullanımına dair karşılaştırma çalışmaları literatürde incelenmiştir. Bu amaçla on altı yaygın azo boyasının indirgen parçalanma

prosedürleri iki indirgen için de karşılaştırılmıştır. Kaynayan metanolde sodyum ditiyonit ile indirgeme farklı boyar maddeler için farklı sodyum ditiyonit miktarı gerekliliğini göstermiştir. Diğer indirgen için işlemler de kaynayan metanolde yapılmış ve renksizleşme sonrası sodyum karbonat ilave edilerek, aminler etil asetat ile ekstrakte edilmiştir. Daha fazla ürün oluşturan ve bu nedenle daha etkin olan ikinci indirgenin daha tercihli olduğunu söylense de bu alandaki etkinliklerinin tam karşılaştırılması için daha fazla değerlendirme yapılması gerekliliği vurgulanmaktadır (**Ahlström ve ark. 2005**). Literatürde tekstil ürünlerine yönelik genel test metodu olarak, sulu alkali çözeltide sodyum ditiyonit ile yapılan indirgenme verilmektedir. İndirgenmiş çözeltilerin ekstraksiyonu için etil asetat, ayırma ve belirleme işlemleri için TLC (ince tabaka kromatografisi), GC, LC (sıvı kromatografisi) teknikleri kullanılabilirlikle birlikte; doğrulama imkanı veren GC-MS'ten yararlanıldığı görülmektedir (**Oh ve ark. 1996**). Literatür verileri incelendiğinde ekstraksiyon için ayrıca diklormetan, metanol, veya asetik asit metil esteri önerildiği görülmektedir. Tekstil ürünleri için kaynama sıcaklığındaki 1M NaOH içinde sodyum ditiyonit varlığında yapılan indirgeme daha zorlayıcı koşullar sağlarken; pH=6 tampon ortamında, 70°C' de yapılan indirgemenin daha yumuşak koşullar sağladığı belirtilmiştir (**Pielesz 1999, Pielesz ve ark. 2002**). Oluşan aromatik aminlerin miktarı ise boyar madde yapısına ve indirgenme koşullarına bağlı olarak farklılık göstermektedir (**Pielesz ve ark. 2002**). Boyaların amin içeriklerinin tayini için çoğunlukla tekstil ve deri ürünlerine uygulanan genel proses, sulu ortamda sodyum ditiyonit kullanılarak yapılan indirgen parçalanma işlemini takiben solvent ekstraksiyonu ve oluşan aminlerin sıvı veya gaz kromatografisi ile tayinidir. Bu yöntem oyuncaklarda kullanılan boyar maddeler gibi alanlarda da uygulama alanı bulmuştur. Literatürde; bu yöntemin farklı boyar maddelere uygulanmasında, indirgenme işleminin optimizasyonu için kemometrik yöntemlerden yararlanıldığı görülmektedir. Ayrıca; boyar madde içeren çözeltide renksizleşmenin gerçekleştiği şartlarda azo boyasının parçalanmasının tamamlandığı varsayımının yapılabileceği de belirtilmektedir (**Garrigos ve ark. 2002**).

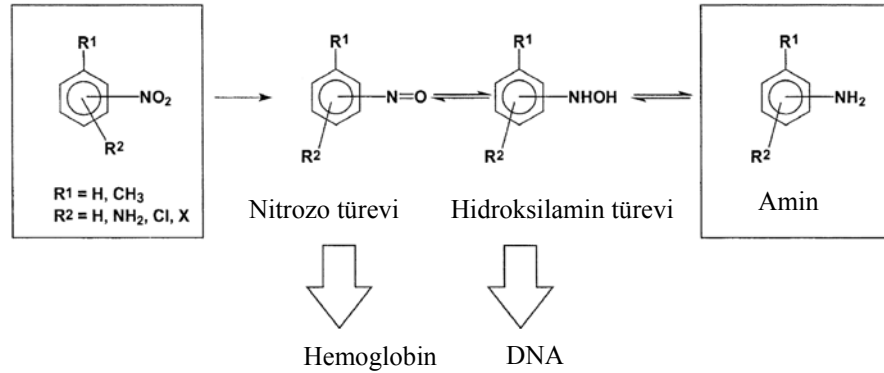
### 2.6.3. Azo Boyalarının Mutajenik ve Kanserojenik Etkisi

Boya molekülü biyolojik olarak inaktif olmasına karşılık **(Eskilsson ve ark. 2002)** derideki veya çevredeki mikroorganizmalar, azo bağlarını koparabilir ve karşılık gelen aminleri oluşturabilir. Böylece; çözünebilen azo boyaları ter veya tükürük yolu ile vücuda alındığında, karaciğer enzimleri ve sindirim sistemindeki mikro flora tarafından karşılık gelen aromatik aminlerine parçalanmaktadır. Benzidin, 4-aminobifenil ve 2-naftilamin gibi bazı aromatik aminler Uluslararası Kanser Araştırma Teşkilatı (IARC) tarafından insan kanserojenleri olarak sınıflandırılmıştır. Bu aromatik aminler doğrudan temas veya çevresel etkileşim yoluyla sağlık açısından risk oluşturmaktadırlar **(Weisburger 2002, Bhaskar ve ark. 2003)**.

Literatür incelendiğinde azo boyar maddelerinin tek başlarına mutajenik aktivite etkilerinin çok az olduğu görülmektedir. Mutajenik etkinin asıl kaynağı, boyar maddelerin yapılarındaki amin içerikleridir. Boya için esas tehlike kriteri, bunların; ter, tükürük veya mide özsuyu ile teması sonrasında aromatik aminlere indirgenebilme özellikleridir. Bununla birlikte organizmada toksik aminlerin oluşumundan esas sorumlu olan, boyar maddenin biyolojik indirgenmesidir **(Pielesz 1999, Pielesz ve ark. 2002)**. Aromatik aminlerin insanlar üzerindeki kanserojenik etkisi ilk kez 1985 yılında Alman cerrah Ludwig Rehn tarafından boya endüstrisinde çalışan ve aniline maruz kalan erkekler arasında yüksek oranda üriner kanser oluştuğunun rapor edilmesi ile ortaya çıkmıştır. Bu konudaki epidemiyolojik çalışmalar detaylandırıldığında, boya endüstrisinde kullanılan benzidin 4-aminobifenil ve 2-naftilamin gibi aromatik aminlere uzun süreli maruz kalınmasının kanser oluşumunu arttırdığı gözlenmiştir **(Ahlström ve ark. 2005)**.

Aromatik aminlerin genetik (mutajenik) ve kanserojenik etkilerinin nedeni DNA (deoksiribonükleik asit) moleküllerine bağlanabilecek reaktif ara ürünler veren ve N-hidroksillenme ile başlayıp esterleşme ve asetillenme gibi reaksiyonlar üzerinden devam eden biyolojik aktivasyon olarak saptanmıştır. Bu durum Şekil 2.6.3.1.'de gösterilmiştir. Nitrozoaril ve N-hidroksiaril ara ürünleri ile hemoglobin ve DNA arası etkileşimler de aromatik aminlerin toksisitelerini açıklamada göz önüne alınmaktadır **(Pinherio ve ark. 2004)**. Kanserojen etkinin moleküler mekanizması kısaca değerlendirilecek olursa; ilk basamakta N-hidroksillenme veya N-asetillenme ve ikinci

basamakta açiloksi aminleri veren O-açillenme gerçekleşir. Oldukça reaktif nitrenyum ve karbonyum iyonları oluşumu sonrası bu elektrofilik reaktanlar, hücre genetik materyali DNA ve RNA (ribonükleik asit)' ya kovalent olarak bağlanır. Bu durum mutasyonu tetiklemekle birlikte mutasyon da tümör oluşumuna götürür (<http://mst.dk/udgiv/publications/1999/87-7909-548-8/pdf/87-7909-546-1.pdf>).



**Şekil 2.6.3.1.** Aromatik amin ve aromatik nitro bileşikleri için basitleştirilmiş metabolik yol

**KAYNAK: WEISS, T., J. ANGERER. 2002.** Simultaneous determination of various aromatic amines and metabolites of aromatic nitro compounds in urine for low level exposure using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 778:179–192.

Tüketiciler, azo boyaları ve bunların indirgenme ürünleri ile doğrudan veya dolaylı olmak üzere iki yolla temas etmektedirler. Boyanmış oyuncak veya deri kıyafetlerin çocuklar tarafından emilmesi ağız yolu ile yani doğrudan temasa; cilde yakın kıyafetlerden terleme ve sürtünme sonucu deri adsorpsiyonu ise dolaylı temasa örnek verilebilir. (Ahlström ve ark. 2005).

## 2.7. Aromatik aminler

Azo boyaları genellikle sodyum ditiyonit veya Sn (II) klorür kullanılarak kimyasal indirgeme ile oluşan aromatik aminleri aracılığı ile dolaylı olarak tayin edilir (Ahlström ve ark. 2005). Aromatik aminler ise genellikle yapılarında bir veya daha fazla aromatik halka ve bunlara bağlı bir veya daha fazla amino grubuna sahip kimyasal bileşikler olarak tanımlanırlar. En basit yapılı anilinden; konjüge aromatik veya heterohalkalı yapıya veya birden fazla süstitüe gruba sahip oldukça kompleks yapıya

kadar değişen aralıkta yer alabilirler. Çevredeki aminlerin ana kaynağı yağ rafinerisi, sentetik polimerler, boyalar, yapıştırıcı, plastik, ilaç, saç boyaları, pestisit ve patlayıcılar gibi ürünlerle ilgili çeşitli kimya endüstrileri olabileceği gibi; otomobil eksozları, proteince zengin gıdaların yanması veya pirolizi, orman yangınları, sigara dumanı, et ürünlerinin ısıll işleme maruz kalması gibi endüstriyel olmayan kaynaklı da olabilmektedir **(Pinheiro ve ark. 2004)**. Sübstitüe aromatik aminler kimya endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bu maddeler endüstriyel proses işlemleri sırasında ve sonrasında çevreye direkt olarak atılabilirler. Azo boyar maddeleri dışında fenilkarbamat, fenilüre ve anilin herbisitlerinden de dolaylı yolla amin bileşikleri oluşabilmektedir. Aromatik aminler kolaylıkla toprağa nüfuz ederek yer altı suyu için kirletici özellik teşkil ederler. Bu nedenle içme suyunda; ayrıca meyve sularında, şekerleme ve diğer gıdalarda da eser düzeylerde bulunabilirler **(Singh ve ark. 2003)**.

Aromatik aminler ve türevleri doğal kanserojen etkileri ve toksisiteleri nedeni ile önemli çevresel kirleticilerdendir **(Singh ve ark. 2003)**. Bu nedenle mutajenik ve kanserojenik etkilerinden şüphelenilen aromatik aminler gibi çevresel konulara giderek artan bir ilgi mevcuttur. Aminler genellikle azo boyalarının kimyasal veya biyolojik indirgenme ürünleridir. Isıl işlem görmüş gıda maddelerinden de aromatik amin oluşumu tespit edilmiştir **(Chiang ve ark. 1999)**. Kanserojen aromatik amin veren azo boyalarının ithali, üretimi ve kullanımı ise yasaktır **(Pielesz ve Wlochowicz 2001)**. Aromatik aminler MAK (Maximale Arbeitsplatz Konzentration) III A1 ve MAK III A2 ; ayrıca IARC ve ETAD (Ekolojik ve Toksikolojik Boyarmadde Üreticileri Birliği) listelerinde sınıflandırılmıştır **(Pielesz 1999, Pielesz ve Wlochowicz 2001)**. Bu maddelerin yasaklılar listelerinde yer alması, azo gruplarından parçalanarak, bir veya daha fazla ve kanserojen özellik gösteren amin türlerinin oluşabilme özelliklerinden kaynaklanmaktadır **(Pielesz 1999)**. Almanya'da tekstil ürünlerinde MAK aminlerin varlığı kesinlikle yasaktır. Türkiye'de 1 Mart 1995 tarihinden itibaren tekstilde yüz otuz azo boyası kullanımı bu aromatik aminler nedeni ile yasaklanmıştır. Buna rağmen etkinlikleri ve düşük maliyeti nedeni ile hala kullanılmaktadırlar **(Sponza ve Işık 2005)**. MAK aminler Çizelge 2.7.1.'de verilmiştir.



**Çizelge 2.7.1. MAK aminler listesi**

MAK AMİNLER		CAS Numarası	Molekül Ağırlığı (g/mol)
MAK III A1	Benzidin	92-87-5	184
	4-aminobifenil	92-67-1	169
	4-Kloro-o-toluidin	95-69-2	141
	2-Naftilamin	91-59-8	143
MAK III A2	o-Aminoazotoluen	97-56-3	225
	2-amino-4-nitrotoluen	99-55-8	152
	p-Kloranilin	106-47-8	127
	2,4-Diaminoanisol	615-05-4	138
	4,4'-Diaminodifenilmetan	101-77-9	198
	3,3'-Diklorbenzidin	91-94-1	252
	3,3'-Dimetoksibenzidin(o-dianisidin)	119-90-4	244
	3,3'-Dimetilbenzidin (o-tolidin)	119-93-7	212
	3,3'-Dimetil-4,4'-diaminodifenilmetan	838-88-0	226
	p-kresidin	120-71-8	137
	4,4'-Metilen-bis-(2-kloranilin)	101-14-4	266
	4,4'-Oksidianilin	101-80-4	200
	4,4'-Tiyodianilin	139-65-1	216
	2-Metilanilin (o-toluidin)	95-53-4	107
	2,4-Tolulendiamin	95-80-7	122
2,4,5-Trimetilanilin	137-17-7	135	

**KAYNAKLAR: PIELESZ,A.1999.** The process of the reduction of azo dyes used in dyeing textiles on the basis of infrared spectroscopy analysis, Journal of Molecular Structure, vol.511-512, p.337-344.

**PIELESZ, A., A. WLOCHOWICZ, W. BINIAS. 2000.** The evaluation of structural changes in wool fibre keratin treated with azo dyes by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Spectrochimica Acta Part A, vol.56, p.1409-1420

**CIONI, F., G. BARTOLUCCI, G. PIERACCINI, S. MELONI, G. MONETI.1999.** Development of a solid phase microextraction method for dedection of the use of banned azo dyes in coloured textiles and leather. Rapid Communications in Mass Spectrometry, vol13, p.1833-1837.

<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidheavy.jsp>

Bazı azo boyaları, indirgen şartlar altında MAK aminleri olarak isimlendirilen ve Çizelge 2.7.1.' de gösterilen yasaklı aromatik aminlere parçalanmaktadır. Bu aminlerin sadece alerjik etkileri değil; aynı zamanda toksik ve mutajenik etkileri de belirtildiği için (Pielesz 1999, Pielesz ve ark. 2002) tekstil endüstrisinde kullanımları çeşitli standartlara göre kesinlikle yasaktır. Fakat bu boyalar yasaklamalara rağmen halen kullanılmakta olup kullanılma problemi yasal olarak tam anlamı ile çözülememiştir (Pielesz ve ark. 2000). Örneğin benzidin, Hindistan'da iki yıl önce yasaklanmasına karşın; düşük maliyetli olması sebebi ile tekstil endüstrisinde hala

yaygın olarak kullanılmaktadır (**Pielesz 1999**). Yasaklanmış olan maddeler, listeler halinde açıkça belirtilmektedir ve potansiyel olarak zararlı olabilecek bileşikler de sürekli olarak listeye eklenmektedir (**Pielesz 1999**). Yasaklı aminler sert analiz şartlarında diğer parçalanma reaksiyonları ile değil; sadece azo gruplarının indirgenmesi ile oluşmalıdır. Bu nedenle biyotoksisite açısından organizmadaki enzimler ile parçalanabilecek azo boyaları yasaklılar kapsamındadır. Çünkü; karaciğerdeki azo redüktazlar ve deri bakterileri sadece azo bağlarını parçalayabilmekte; diğer bağları parçalayamamaktadır (**Pielesz 1999**).

### **2.7.1. Aromatik Aminlerin Ekstraksiyonu ve Ekstraksiyon Tekniklerinin Karşılaştırılması**

Tüm analitik prosedürler içerisinde en az gelişmiş kısım, muhtemelen ekstraksiyon basamağıdır.

Ekstraksiyon için sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE), katı faz ekstraksiyon (SPE), katı faz mikroekstraksiyon (SPME), soxhlet ekstraksiyon; ayrıca süperkritik akışkan ekstraksiyon (SFE) ve mikrodalga yardımcı ekstraksiyon (MAE) teknikleri kullanılabilirdiği gibi (**Eskilsson ve ark. 2002**); sıvı faz mikroekstraksiyon tekniği de önerilmektedir (**Pinheiro ve ark. 2004**). SFE ve MAE'nin daha az çözücü kullanımı, hızlı ekstraksiyon gibi avantajları vardır. SFE metodu ekstraksiyon süresini de kısaltır. MAE, SFE ve soxhlet ekstraksiyonu en genel anlamda karşılaştırıldığında MAE en iyisidir fakat en önemli dezavantajı ekstraksiyondaki daha az seçiciliktir (**Ahlström ve ark. 2005**). SPE tekniği daha az çözücü gerektirmesine rağmen, örnekte partiküler yapının varlığı, kartuşların tıkanmasına neden olabilir. SPME nispeten yeni bir teknik olup; PAWLISZYN ve arkadaşları tarafından geliştirildiği belirtilmiştir. En önemli avantajı, ekstraksiyon sırasında çözücü kullanımını gerektirmemesidir (**Chang ve ark. 2003**).

LLE, yeterli geri kazanım değerine ulaşmak için yüksek hacimde solvent kullanmayı gerektirmektedir. Bu yüksek orandaki çözücünün uzaklaştırılması ise hem zaman hem de enerji kaybına neden olmaktadır. Son yıllarda LLE'nin yerini SPE almıştır. SPE'nin avantajları ise daha az çözücü gereksinimi, matriks bileşenlerinin uzaklaştırılması ve otomasyona elverişliliğidir (**Less ve ark. 1998**). Yine son yıllarda

**Plum ve ark.** tarafından örnek hazırlamada solvent gerektirmeyen bir metot, piroliz GC-MS tekniği ile, tekstil ürünlerindeki azo boyalarından oluşan yedi aromatik aminin kalitatif tayininin yapılabilirliği belirtilmiştir. Bu metotta, aminler analiz sistemine termal olarak ekstrakte edilmekte bu nedenle de ön indirgeme basamağına gerek kalmamaktadır. Saf üç azo boyası ile yapılan başlangıç çalışmalarında aminlerin pik alanı olarak ölçülen geri kazanımlarına pirolizer sıcaklığının etkisi incelenmiştir. Boyalar sıcaklık değişimine farklı yanıt verse de; yüksek sıcaklık değerleri, aminlerin daha ileri parçalanmasına yol açtığı ve bu nedenle daha düşük geri kazanımlara sebep olduğu için; 500 °C gibi ortalama sıcaklık değerinin tercih edilebileceği belirlenmiştir. Bu tekniğin iki büyük dezavantajı, yüzde geri kazanımın matrikse büyük ölçüde bağlı olması ve yüksek örnek hacimlerinin enjeksiyon bölgesindeki kirliliği artırmasıdır. Bu durum ise tayini etkilemektedir (**Ahlström ve ark. 2005**).

### 2.7.2. Aromatik Aminlerin Tayin Yöntemleri

Literatürde, düşük düzeyde aromatik amin tayini için TLC, GC, GC-MS, HPLC-(DAD (diod serisi dedektör) veya floresans dedektörlü) (**Pielesz ve ark. 2002**) gibi çeşitli analitik yöntemler ile çalışıldığı görülmektedir. TLC ve GC daha çok kalitatif amaçlı kullanılırken; kantitatif amaçlar için HPLC daha iyi bir seçim olmaktadır. Bu tayin için infrared (IR) spektrometri (**Pielesz ve Wlochowicz 2001**), UV-VIS spektrofotometri (**Zatar ve ark. 1998, Pinheiro ve ark. 2004**), voltametri, potansiyometri, CE (**Pinheiro ve ark. 2004**), Fourier dönüşümlü- infrared (FT-IR) spektrometri, LC-MS ve kapiler zon elektroforez (**Pielesz 1999, Ahlström ve ark. 2005**) ile; ayrıca ön işlem basamağı gerekmeden ters-faz sıvı kromatografisi-elektrospray iyonlaştırma-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (LC-ESI-MS/MS) (**Mortensen ve ark. 2005**) ile çalışıldığı görülmektedir. Bunlara ek olarak farklı türevlendirme yöntemlerine dayalı GC-MS analizleri de uygulanmıştır (**Jodynis-Liebert ve Bennisir 2000, Singh ve ark. 2002, Smith ve ark. 2003**).

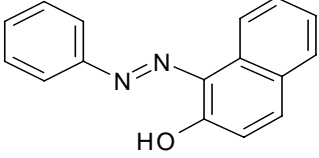
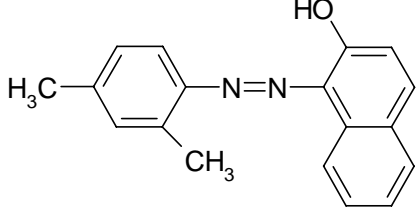
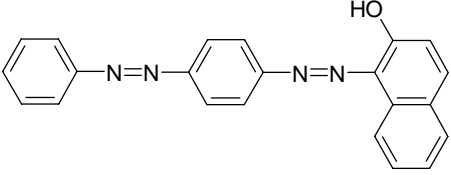
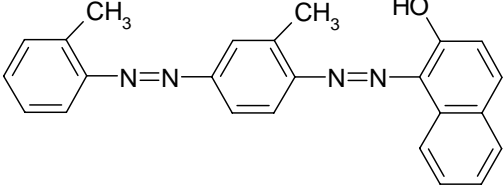
## 2.8. Sudan Boyaları

Mayıs 2003'te Fransa'da, Hindistan'dan ithal edilen pul biberlerde Sudan I tespit edildiği yayınlanmıştır (**Cornet ve ark. 2006**). Bunun üzerine Avrupa birliği hızlı bir alarm sistemi için harekete geçmiş ve alınan Avrupa Birliği komisyon kararı (2003/460/EC) gereğince, gıdalarda kullanımı yasaklanmıştır. Bu komisyon kararı ilk olarak Sudan II, III ve IV (Scarlet Red) boyar maddelerini de içerecek şekilde; daha sonra da sadece pul biberlerle sınırlı kalmayıp pek çok gıda maddesini içerecek şekilde (2004/92/EC, 2005/402/EC) genişletilmiştir (**Comission Decision 2003/460/EC, 2004/92/EC**). Sudan boyaları kanserojen olduğundan şüphelenilen primer aromatik aminlere metabolize olduğu için Avrupa Birliği ülkelerince, gıda ürünlerinde kullanımına izin verilmemektedir. Bu nedenle Haziran 2003 tarihinden itibaren ithalatçı ve üreticilere ilgili gıda ürünleri için sudan I-IV içermediği yönünde analiz sertifikası sağlama zorunluluğu getirilmiştir (**Waite ve ark. 2006**). 2005/402/EC sayılı komisyon kararı gereği, palmye yağı da dahil; kırmızı biber, köri, hint safranı gibi baharatları içeren çok sayıda gıda maddesinin sudan boyaları içermediği yönünde sertifikalı olması gerekmektedir. Kararın alındığı tarihten itibaren İngiltere'de yüz altmıştan fazla gıda maddesinin sudan boyası içerdiği için imha edilmesi istenmiştir (**Cornet ve ark. 2006**).

### 2.8.1. Sudan Boyalarının Kimyasal Yapıları

S I, S II, S III ve S IV boyar maddelerinin yapıları Çizelge 2.8.1.1.'de görülmektedir.

**Çizelge 2.8.1.1.** Sudan boyalarının kimyasal yapıları ve bazı karakteristik özellikleri

 <p><b>SUDAN I (S I)</b> Molekül formülü= C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O *M=248,284 g/mol</p>	 <p><b>SUDAN II (S II)</b> Molekül formülü= C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O *M=276,337g/mol</p>
 <p><b>SUDAN III (S III)</b> Molekül formülü= C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O *M=352,395 g/mol</p>	 <p><b>SUDAN IV (S IV)</b> Molekül formülü= C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O *M=380,449 g/mol</p>

\*M= Molekül kütlesi

**KAYNAK:** <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>

## 2.8.2. Sudan Boyalarının Fiziksel Özellikleri

S I, S II, S III ve S IV boyar maddelerinin bazı fiziksel özellikleri Çizelge 2.8.2.1.'de görülmektedir.

**Çizelge 2.8.2.1.** Sudan boyalarının bazı fiziksel özellikleri

BOYAR MADDE	FİZİKSEL ÖZELLİK		
	Sıcaklık=25°C		
	Erime Noktası (°C)	Sudaki Çözünürlük (mg/L)	Buhar Basıncı (mm Hg)
SUDAN I	134*	0,674**	$7,3 \times 10^{-8**}$
SUDAN II	166*	0,055**	$1,17 \times 10^{-8**}$
SUDAN III	195*	-	-
SUDAN IV	186**	-	-

\* = TEORİK DEĞER

\*\* = TAHMİNİ DEĞER

**KAYNAK:** <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>

## 2.8.3. Sudan Boyalarının IARC Sınıflandırması

Sudan I-IV boyar maddelerinin bazı özellikleri ve IARC (Uluslararası Kanser Araştırma Teşkilatı) sınıflandırması Çizelge 2.8.3.1.'de görülmektedir.

**Çizelge 2.8.3.1. Sudan boyalarının IARC sınıflandırması**

<b>BOYAR MADDE</b>	<b>* CAS RN</b>	<b>** (C.I.)</b>	<b>BAZI SİSTEMATİK ve YAYGIN İSİMLERİ</b>	<b>IARC SINIFLANDIRMASI</b>
<b>S I</b>	842-07-9	12055	1-Fenilazo-2-naftol 2-Naftalenol,1-(fenilazo)- 2-Naftol,1-(fenilazo)- 1-(Fenilazo)-2-naftalenol 1-Benzoazo-2-naftol 1-Fenilazo-beta-naftol 2-Hidroksi-1-fenilazonaftalen 2-Hidroksinaftil-1-azobenzen 2-Naftolazobenzen C.I.Solvent Yellow	Grup 3
<b>S II</b>	3118-97-6	12140	1-[(2,4-Dimetilfenil)azo]-2-naftalenol 1-(2,4-Ksililazo)-2-naftol 1-(o-Ksililazo)-2-naftol 1-Ksililazo-2-naftol 2-Naftalenol, 1-((2,4-dimetilfenil)azo)- 2-Naftol, 1-(2,4-ksililazo)- C.I.Solvent Orange 7 Sudan Red	Grup 3
<b>S III</b>	85-86-9	26100	1-((4-(Fenilazo)fenil)azo)-2-naftalenol 1-(p-(Fenilazo)fenil)azo)-2-naftol 1-(Fenilazofenilazo)-2-hidroksinaftalen 2-Naftol,1-(p-(fenilazo)fenil)azo)- 2-Naftalenol,1-((4-(fenilazo)fenil)azo)- Solvent red 23 CI 26100 D & C Red no. 17	Grup 3
<b>S IV</b>	85-83-6	26105	1-((2-Metil-4-((2-metilfenil)azo)fenil)azo)-2-naftalenol 2-Naftalenol, 1-((2-metil-4-((2-metilfenil)azo)fenil)azo)- 2-Naftol, 1-((4-(o-tolilazo)-o-tolil)azo)- CI 26105 Scarlet red Solvent red 24 1-(4-o-Tolilazo-o-tolilazo)-2-naftol 2',3-Dimetil-4-(2-hidroksinaftilazo)azobenzen	Grup 3

\*CAS RN= CAS kayıt numarası

\*\*C.I. =Renk indeksi (Colour index)

**KAYNAK:** <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>

#### 2.8.4. Sudan Boyalarının Önemi ve Kullanımı

İzin verilen gıda renklendiricileri ve maksimum müsaade edilir seviyeleri Council Directive 94/36/EC'de belirtilmektedir. Sudan boyaları ise gıdalarda kullanımına müsaade edilmeyen; buna rağmen illegal olarak kullanılan boyar maddelerdendir (**Cornet ve ark. 2006**). Azo boyaları sınıfına dahil olan sudan boyaları, iyonik olmayan ve yağda çözünen boyalar olup; tekstil endüstrisinde, kimya endüstrisinde örneğin çözücüler, yağ ve mumları renklendirmede, benzin, dizel, makine yağı, plastik ve polimerlerde, baskı mürekkepleri, dövme, ayakkabı ve döşeme cilalarında ve boya ürünlerinde yaygın olarak kullanılırken; gıdalarda da kullanılabilir. (**Calbiani ve ark. 2004, Puoci ve ark. 2004, Zhang ve ark. 2005, Cornet ve ark. 2006**). Örneğin Sudan I, şiddetli kırmızı-turuncu rengi nedeni ile gıdalarda; özellikle pul biberlerde katkı maddesi olarak kullanılan sentetik azo boyasıdır. Ayrıca; et türevi gıdaların tipik kırmızı renginin korunmasında da Sudan I kullanılabilir. (**Mazzetti ve ark. 2004, Puoci ve ark. 2004**).

Pek çok sos çeşidi, salam, zeytinyağı gibi gıdalarda pul biberler baharat olarak kullanılmaktadır (**Mazzetti ve ark. 2004**). Bu boyalara pul biberlerde kirlilik düzeyinde rastlanabildiği için; bu kontamine pul biberlerinin kullanıldığı çorbalar, soslar ve hazır yemekler sudan boyaları kaynağı haline gelirler. Çin ve Avrupa'da gıda ürünlerinde sudan boyalarının varlığı tespit edilmiş ve bu durum tüketiciler arasında panik yaratmıştır. Bu nedenle kompleks matrikslerden bu boyar maddelerin tespit ve tayini için hassas, seçici ve doğru analitik metot geliştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır (**Zhang ve ark. 2005**).

#### 2.8.5. Sudan Boyalarının Toksikiteği

Sudan I-IV olarak bilinen bu boyar maddelerin, laboratuvar çalışmaları ile, insanlar ve hayvanlar üzerindeki kanserojen etkileri tespit edilmiştir. Sudan boyaları insanlar açısından kanserojendir ve bu nedenle de hiçbir düzeyi insanlar için güvenilir değildir. Buna rağmen pul biberlerde kirlilik düzeyinde, bazı baharatlar ve bunların kullanıldığı fırınlanmış gıdalarda düşük seviyelerde bulunabilmektedirler (**Tateo ve Bononi 2004, Zhang ve ark. 2005**).



Sudan I müsaade edilen bir boya olmamakla birlikte genotoksik kanserojen olarak değerlendirilmiştir (**Calbiani ve ark. 2004**). Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda karaciğerde veya üriner sistemde tümör oluşumuna neden olduğu in vitro ve in-vivo çalışmalarla kanıtlanmıştır (**Stiborova ve ark. 1995, Stiborova ve ark. 1998, Stiborova ve ark. 1999, Mazzetti ve ark. 2004**). Cytochrome P450 1A1 enzimi ile insan karaciğerindeki kanserojenik etkisi de incelenmiştir (**Stiborova ve ark. 2002, Stirobova ve ark. 2005**). Bu nedenle gıda maddelerinde hiçbir amaçla ve hiçbir seviyede kullanımına izin verilmemektedir. Sudan II, Sudan I'in dimetil türevidir ve fare dokularına enjekte edilmesi sonucu özellikle mesane kanseri gelişimi gözlenmiştir. Sudan I, II, III ve IV, IARC tarafından grup 3 kategorisinde belirtilmiştir; yani insanlara doğrudan kanserojen etkileri yoktur (**Calbiani ve ark. 2004**). Bununla birlikte Sudan I'in gıda maddelerinde kullanımı, gıda maddeleri yönetmeliklerinde yasaklanmıştır (**Ma ve ark. 2006**).

#### 2.8.6. Sudan Boyalarının Ekstraksiyonu ve Analizi

Kırmızı bibere dayalı gıda maddelerinden ekstrakte edilebilir renklendirici pigment maddelerinin ekstraksiyonu için literatürde; aseton, mikrodalga ekstraksiyonu, su-aseton, dioksan, etanol, metanol, tetrahidrofuran karışımları ile; ve süperkritik karbondioksit (CO<sub>2</sub>) ekstraksiyonu ile ilgili çalışmalar mevcuttur (**Csiktusnadi Kiss ve ark. 2000, Krajayklang ve ark. 2000, Perva-Uzunalic ve ark. 2004**). İlgili literatür verilerinde de belirtildiği gibi sudan boyalarının ekstraksiyonu için uygun çözücüler; aseton, etanol, asetonitril, dimetilsülfoksit, dimetilformamid (DMF) olarak belirtilirken (**Ma ve ark. 2006, Cornet ve ark. 2006, Wu ve ark. 2006**); tespit ve tayinleri için yaygın olarak kullanılan metotlar ise UV-VIS, LC ve LC-MS teknikleridir; ayrıca gıda örneklerinde özellikle eser düzeyde bulunan Sudan boyası kalıntılarının analizi için LC-MS uygun bir teknik olarak belirtilmiştir (**Calbiani ve ark. 2004, Ghanadzadeh ve ark. 2000, Zhang ve ark. 2005, Ma ve ark. 2006**). LC tekniği Avrupa komisyonu tarafından da önerilmektedir. Ayrıca LC-ESI-MS (sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonlaştırma-kütle spektrometresi) tekniği de doğrulama amaçlı olarak literatürde kullanılmaktadır (**Mazzetti ve ark. 2004, Wu ve ark. 2006**). Literatürde yaygın olarak çalışılan Sudan boyası olan S I' in varlığını tespit etmek için HPLC, GC-MS gibi

değişik metotlar geliştirilmiştir. Bununla birlikte eğer eser düzeyde kullanılmış ise tespiti için LC-MS/MS (sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi) gibi daha pahalı cihazlar gerekmektedir (**Puoci ve ark. 2004**). Bu boyar maddenin ekstraksiyonu için benzen veya toluen kullanıldığına yönelik veriler mevcuttur. Örneğin bir çalışmada, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile pul biberlerden etanol ile ekstrakte edilirken; metanolün de aynı ya da farklı gıda matrisleri için kullanılabilceği önerilmektedir. Başka bir çalışmada ise soxtec ekstraksiyon sistemi ile gıda örneklerinden petrol eteri-etanol karışımı ile ekstrakte edilmiştir (**Mazzetti ve ark. 2004**). Gıdalardaki sentetik boyar maddelerden olan Sudan I ve Sudan III varlığının araştırıldığı bir çalışmada; ayırma ve tespit için kağıt kromatografisi, kantitatif tayin için de spektrofotometrik yöntem uygulanmış; analizlenen örneklerden bazılarında bu boyar maddelerinin var olduğu tespit edilmiştir (**Tripathi ve ark. 2005**). S I' in düşük düzeyde olması durumunda, UV-VIS spektrumuna dayalı HPLC tekniği ile bu boyar maddenin karakterizasyonu gerçekleştirilememektedir (**Tateo ve Bononi 2004**). Yaygın olarak kullanılan LC tekniği, yağda çözünen boyalar sınıfına dahil edilen Sudan boyalarının, spektrumun görünür bölgesindeki absorbans özelliklerine dayanır. Boyar maddelerin yapısal özellikleri nedeni ile UV-VIS spektrumlarına dayalı HPLC analizi ile ayrımları zordur (**Ma ve ark. 2006**). Sudan boyalarının tayinlerine yönelik TLC, LC-ESI-MS/MS, HPLC-APCI-MS (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-atmosferik basınç kimyasal iyonlaştırma-kütle spektrometresi), HPLC-DAD-ESI-MS (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-diyod serisi dedektör-elektrosprey iyonlaştırma-kütle spektrometresi, APCI-MS (atmosferik basınç kimyasal iyonlaştırma-kütle spektrometresi) ve izotop seyreltme, GPC (jel geçirgenlik kromatografisi) ile ön işlem sonrası HPLC-MS (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi) tayini, IR, plasmon rezonans ışık saçılma teknikleri literatürde dikkat çekmektedir (**Marshall 1977, Di Donna ve ark. 2004, Mazzetti ve ark. 2004, Tateo ve Bononi 2004, Ma ve ark. 2006, Wu ve ark. 2006**). Bir çalışmada, palmye yağındaki bu boyaların kalitatif analizleri için TLC tekniği belirtilmekle birlikte; eş zamanlı tayinleri için HPLC-PDAD (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-fotodiyod serisi dedektör) yöntemi uygulanmıştır (**Cornet ve ark. 2006**). Azo grubu boyar maddeler içinde yer alan Sudan boyaları fonksiyonel fenol grupları üzerinden yükseltgenirken aynı redoks reaksiyonu vermeleri nedeni ile toplam Sudan miktarı belirlenebilmiştir (**Wu ve ark. 2006**).

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. MATERYAL**

##### **3.1.1. Çalışmada Kullanılan Aletler**

###### **3.1.1.1. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi**

GC-MS analizleri için Shimadzu marka GC-17A model gaz kromatografisi, dedektör olarak QP-5000 model kütle spektrometresi; ayrıca AOC-20i otomatik enjektör sistemi kullanılmıştır. Analitik kolon; 30 m uzunluğunda, 0,25 mm iç çap ve 0,25 µm film kalınlığına sahip HP-5 kapiler kolondur. Salça bileşenlerinin aydınlatılması için Shimadzu marka GC-17A model gaz komatografisi, dedektör olarak QP-5050A model kütle spektrometresi; ayrıca AOC-20i otomatik enjektör sistemi kullanılmıştır. Bu analizde ise; 30 m uzunluğunda, 0,25 mm iç çap ve 0,25 µm film kalınlığına sahip Optima-5-MS kolonundan yararlanılmıştır.

###### **3.1.1.2. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi**

Çalışmada, karşılaştırma metodu olarak Agilent marka 1100 LC-MSD Trap SL model LC-MS kullanılmıştır. Analitik kolon 30 mm uzunluğunda 2,1 mm iç çap ve 3,5 mikron gözenek çapına sahip Zorbax SB-C<sub>18</sub> kolonudur.

###### **3.1.1.3. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometresi**

UV-VIS ölçümleri Varian marka Cary 5000 model UV-VIS-NIR spektrofotometre ile alınmış olup; ölçümlerde 1 cm'lik kuvarz hücrelerden yararlanılmıştır. Çalışma aralığı 200-900 nm olarak taranmıştır. Ayrıca; katı-faz ekstraksiyonu çalışmalarında Shimadzu marka UV-2100 model spektrofotometre, 1cm'lik kuvarz hücreler ile ve 220-800 nm tarama aralığında çalışılmıştır. UV-VIS-NIR spektrofotometresinde türev alma olanağı mevcuttur.

#### **3.1.1.4. pH-Metre**

Çalışmada, pH 526 model Multical marka pH-metre kullanılmıştır.

#### **3.1.1.5. Ultrasonik Karıştırıcı**

Çalışmada, ELMA Ultrasonic LC 30 ile Ultrasonic LC 30 H marka ve modellerinde ultrasonik karıştırıcılar kullanılmıştır.

#### **3.1.1.6. Etüv**

Deneyisel işlemler sırasında, hava sirkülasyonlu Heraeus marka etüv kullanılmıştır.

#### **3.1.1.7. Döner Vakumlu Buharlaştırıcı**

Deneyisel işlemler sırasında, BÜCHI Vacuum Controller V-800, Rotavapor R-200, BÜCHI Vac V-500, BÜCHI Heating Bath B-490 parçalarından oluşan BUCHI marka döner vakum buharlaştırıcı; 500 mbar basınçta, 50 °C 'de, çevirme hızı 30 olacak şekilde ayarlanarak kullanılmıştır.

#### **3.1.1.8. Terazi**

Deneyisel işlemler sırasında,  $\pm 0,00001$  g duyarlıklı Scaltec SBC 21 marka ve modelindeki analitik terazi ile  $\pm 0,0001$  g duyarlıklı Gec Avery marka analitik terazi kullanılmıştır.

#### **3.1.1.9. Santrifüj Aleti**

Çalışmada, MSE MISTRAC marka 2000 model santrifüj cihazı kullanılmış; ve bu cihaz, deneyisel işlemler sırasında 2500 devir/dak. hızla çalıştırılmıştır.

### 3.1.1.10. Katı Faz Ekstraksiyon Sistemi

Kalitatif LC-MS analizlerinde, BAKER'-10 SPE System (**J.T.Baker Chemical Company, Phillipsburg, NJ 08865, USA**) katı faz ekstraksiyon sistemi, Varian Bond Elut C<sub>18</sub> (100 mg/1,5 ml) katı faz ekstraksiyon kolonları ile birlikte kullanılmıştır. Ayrıca; Sudan boyaalarının katı faz ekstraksiyonu çalışmalarında yine aynı katı faz ekstraksiyon kolonları ile birlikte Watson-Marlow 505S peristaltik pompadan yararlanılmıştır.

### 3.1.1.11. Saf Su Cihazı

Çalışmada kullanılan saf su, Milli-Q Millipore cihazı kullanılarak hazırlanmıştır.

## 3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

### 3.1.2.1. Kimyasallar

#### 3.1.2.1.1. Analitik Safılıktaki Kimyasallar

- ACROS ORGANICS, 147060250, C.A.S.= 842-07-9, EINECS= 212-668-2, Lot=A019108001, Sudan I (C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O), M=248,28 g/mol)
- ACROS ORGANICS, 190150250, C.A.S.= 3118-97-6, EINECS= 221-490-4, Lot=A005453001, Sudan II (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O), M=276,33 g/mol)
- ACROS ORGANICS, 419800250, C.A.S.= 85-86-9, EINECS= 201-638-4, Lot=A019579701, Sudan III (C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O), M=352,39 g/mol)
- ACROS ORGANICS, 419810250, C.A.S.= 85-83-6, EINECS= 201-635-8, Lot=A019554501, Sudan IV (C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O), M=380,45 g/mol)
- Merck, 1.01260 Anilin (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NH<sub>2</sub>, 1L=1,02 kg, M=93,13 g/mol)
- Merck, 1.00013.2500, Aseton (CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>, 58,08 g/mol)
- Riedel-de Haen, 24201, Aseton (1L=0,790-0,792 kg, M=58,08 g/mol)

- Merck, 1.00030, Asetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $1\text{L}=0.786\text{ kg}$ ,  $M=41,05\text{ g/mol}$ )
- Riedel-de Haen 05003, Derişik amonyak (der. $\text{NH}_3$ , %26,  $d=0.892\text{g/cm}^3$  -  $0.919\text{g/cm}^3$ ,  $M=17,0304\text{ g/mol}$ )
- PANREAC, 131020.1612, Derişik hidroklorik asit (der. $\text{HCl}$ , %37,  $d=1,19\text{ g/ml}$ ,  $M=36,46\text{ g/mol}$ )
- Riedel-de Haen 07006, Derişik nitrik asit (der. $\text{HNO}_3$ , %65,  $d=1,40\text{ kg/L}$ ,  $M=63,01\text{ g/mol}$ )
- Merck, 1.00864, Etil asetat ( $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ ,  $88,10\text{ g/mol}$ )
- LACHEMA, 51038 0800, Etil asetat ( $1\text{L}=0,90\text{ kg}$ ,  $M=88,10\text{ g/mol}$ )
- Merck, 1.15093.0001 Extrelut NT Refill pack kolon dolgu materyali, Extrelut NT 20.
- Merck, 1.00264.1000, Formik asit ( $\text{CH}_2\text{O}_2$ ,  $M=46,03\text{ g/mol}$ )
- Merck, 1.06009.2500, Metanol (GC-MS analizleri için,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $M=32,04\text{ g/mol}$ )
- Merck, 1.06007.2500, Metanol (LC-MS analizleri için)
- DOP, 13.00001.2500, Metanol ( $1\text{L}=0,79\text{ kg}$ ,  $32,04\text{ g/mol}$ )
- Merck, 1.04368.2500 n-hekzan ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ,  $1\text{L}=0,66\text{ kg}$ ,  $M=86,18\text{ g/mol}$ )
- Merck, 1.09437.1000, pH=6 ( $20^\circ\text{C}$ ), sitrat tamponu
- Merck, 1.09435.1000, pH=4 ( $20^\circ\text{C}$ ), sitrat tamponu
- Merck, 1.06507.0500, Sodyum ditiyonit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ,  $M=174,11\text{ g/mol}$ )
- Merck, 1.01843.2500, t-butil metil eter ( $(\text{CH}_2)_3\text{COCH}_3$ ,  $M=88,15\text{ g/mol}$ )
- Merck, 6432.1000, Trisodyum sitrat dihidrat ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $M=294,10\text{ g/mol}$ )
- Azot gazı (%99,998 saflıkta)

### 3.1.2.1.2. Sarf Malzemeler

- Filtrak marka siyah bant süzgeç kağıdı
- $0,45\ \mu\text{m}$  PVDF filtre
- Screw-Cap marka  $1,8\text{ ml}$  hacimli vial
- $20\text{ ml}$  hacimli, ısıya dayanıklı vida kapaklı renkli vial
- $250\text{ ml}$ ' lik armudi balon

- 50 ml' lik falcon tüp
- 100-1000 µl hacim aralığında çalışabilen Eppendorf mikropipet
- 10-100 µl hacim aralığında çalışabilen Eppendorf mikropipet
- Varian, Bond Elut C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonları (100 mg/1,5 ml)
- Pastör pipet

### 3.1.2.2. Çözeltiler

#### 3.1.2.2.1. UV-VIS Analizlerinde Kullanılan Boya Çözeltilerinin Hazırlanması

##### a) Katı Faz Ekstraksiyonu Çalışmaları İçin Boya Çözeltilerinin Hazırlanması

Asetonda 200 mg/L stok S I, S II, S III ve S IV çözeltileri hazırlanmıştır. Bunun için 1,1-1,6 mg aralığında boyar madde tartılıp; uygun hacimde (5,5-8 ml) aseton ile ultrasonik karıştırıcıda çözülmüştür. Bu stok çözelti metanol, asetonitril, etil asetat, su, aseton ve hekzan kullanılarak 7 mg/L ve 10 ml hacmine seyreltilmiştir. 200 mg/L stok boya çözeltileri; su, hekzan, metanol ve aseton kullanılarak 1 mg/L, 35 ml hacmine seyreltilmiştir. Hazırlanan 1 mg/L konsantrasyonlu çözeltiler ile metanolde 7 mg/L' lik çözeltiler, Sudan boyalarının katı faz ekstraksiyonunda uygun çözücü belirlenirken; suda 1 mg/L'lik boya çözeltileri ile metanol, asetonitril ve etil asetat 7 mg/L'lik çözeltiler ise uygun elüsyon çözücüsü belirlenirken kullanılmıştır.

##### b) Çözünürlüğün pH İle Değişiminin İncelenmesi İçin Boya Çözeltilerinin Hazırlanması

UV-VIS analizleri için, 100 mg/L konsantrasyon değerinde S I, S II, S III ve S IV çözeltileri hazırlanmıştır. Bunun için her bir boyar maddeden 25 mg tartımlar alınarak bir miktar saf suda çözülüp 250 ml'ye saf su ile tamamlanmıştır. Balonlara magnetik karıştırıcı konularak karanlıkta, 14 saat karıştırıcıda karıştırılmış; çözeltiler bu süre sonunda bir saat ultrasonik karıştırıcıda tutulduktan sonra siyah bant süzgeç kağıdından süzlmüştür. Her bir çözeltinin orijinal pH değeri ölçüldükten sonra; der.

HNO<sub>3</sub>, 0,5 N HNO<sub>3</sub>, der. NH<sub>3</sub>, ve 0,5 N NH<sub>3</sub> çözeltileri kullanılarak pH'ları, pH=1,5-4-6-8-10-12 değerlerine ayarlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan çözeltilerin absorbanları, 200-900 nm aralığında taramalı olarak UV-VIS spektrofotometresi ile ölçülmüştür.

### c) pH Ayarlanmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Analizler sırasında, pH ayarlanması için iki farklı çözelti kullanılmıştır:

- 0,5 N HNO<sub>3</sub> çözeltisinin hazırlanması:

Derişik nitrik asit çözeltisinden 3,46 ml alınarak saf su ile 100 ml' ye tamamlanır.

- 0,5 N NH<sub>3</sub> çözeltisinin hazırlanması:

Derişik amonyak çözeltisinden 3,67 ml alınarak saf su ile 100 ml' ye tamamlanır.

### 3.1.2.2.2. GC-MS Analizlerinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

#### a) Sodyum Ditiyonit İndirgeme Çözeltisinin Hazırlanması

Çalışmada, 200 mg/ml konsantrasyonlu taze hazırlanmış sodyum ditiyonit (SD) indirgeme çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözelti, 600 mg sodyum ditiyonit katısının beherde, 3 ml saf suda çözülmesi ile hazırlanmıştır.

#### b) pH=1,5 Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

Ortam pH değerini pH=1,5' a ayarlamak için aşağıda belirtildiği şekilde tampon çözelti hazırlanmıştır (**Bobrov 1975**) 0,1 M sodyum sitrat (**A çözeltisi**, 29,410 g C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O bir miktar saf suda çözülüp 1 L' ye saf su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.) ve 0,1 M HCl (**B çözeltisi**, derişik hidroklorik asit çözeltisinden 0,83 ml alınarak saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.) çözeltileri hazırlanmıştır. A çözeltisinden 22,2 ml alınıp 0,1 M HCl ile 100 ml'ye seyreltilmiş; yine 0,1 M HCl ile pH değeri tam olarak pH=1,5' a ayarlanmıştır.



### **3.1.2.2.3. LC-MS Ölçümlerinde Kullanılan Boya Çözeltilerinin Hazırlanması**

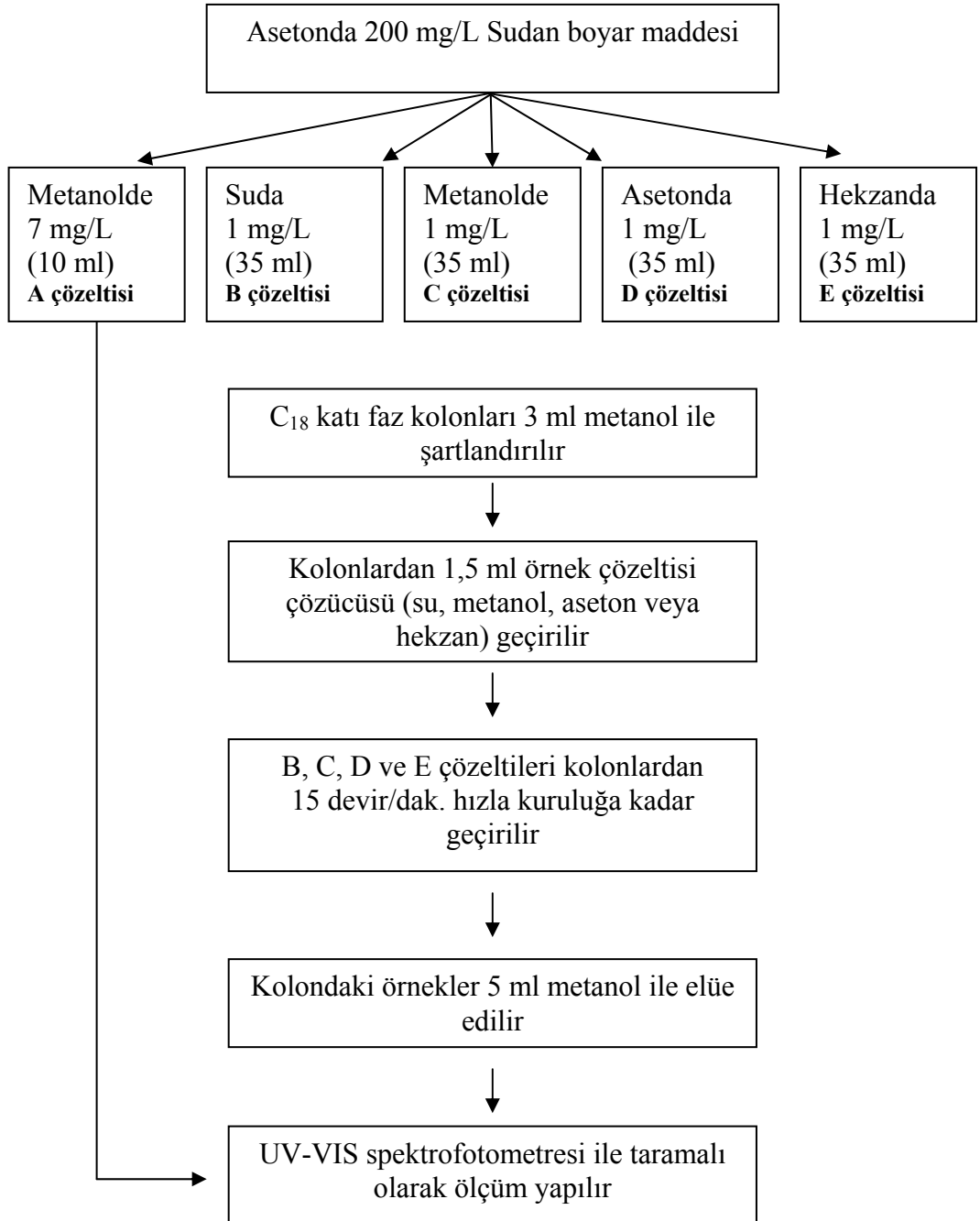
LC-MS analizleri için S I, S II, S III ve S IV boya maddelerinin her birinden, metanolde 100 mg/L konsantrasyonlu stok çözeltiler hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden yine metanol kullanılarak seyreltme ile 20 mg/L' lik çözeltiler hazırlanmış ve LC-MS' de gerçek örnekler öncesi cihaza verilerek, her bir boya madde için alıkonma zamanları belirlenmiştir.

## **3.2. YÖNTEM**

### **3.2.1. KATI FAZ EKSTRAKSİYONU**

#### **a) Sudan Boyaları İçin Çözücü Seçimi**

S I, S II, S III, S IV boya maddeleri için katı faz ekstraksiyonu ile deriştirmenin etkinliğini incelemek amacı ile öncelikle en uygun çözücünün belirlenmesi işlemi gerçekleştirilmiştir. Seçilen, polariteleri birbirinden farklı dört çözücü ile uygulanan deneysel işlemler sırası ile Şekil 3.2.1.1.' de belirtildiği gibidir.

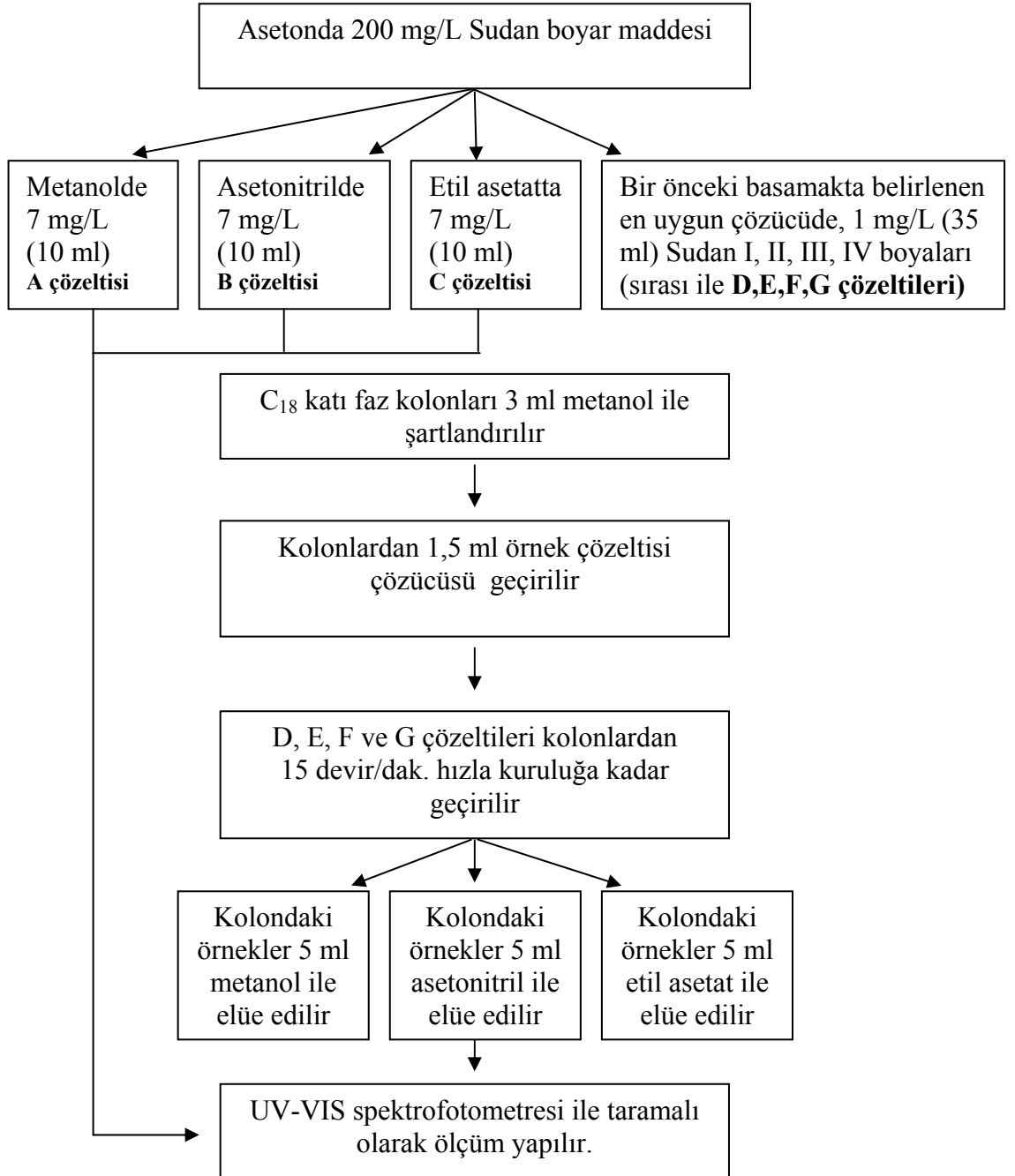


**Şekil 3.2.1.1.** Sudan boya için uygun çözücü belirlenmesine yönelik katı faz ekstraksiyon şeması

Metanolde hazırlanmış 7 mg/L konsantrasyonundaki her bir standart boya çözeltilisinin UV-VIS spektrumlarındaki maksimum absorptans değerleri, katı faz ekstraksiyonu uygulanmış ve metanol ile kolonlardan elüe edilmiş çözeltiler ile karşılaştırılmış ve standart çözeltilere en yakın absorptans değerinin gözlendiği çözücü, en uygun çözücü olarak belirlenmiştir.

### **b) Sudan Boyaları İçin En Uygun Elüsyon Çözücüsünün Belirlenmesi**

S I, S II, S III ve S IV boyar maddelerinin her biri için en uygun çözücü belirlendikten sonra belirlenen bu çözücüde hazırlanan çözeltiler bu kez de seçilen farklı polaritede elüsyon çözücüleri kullanılarak Şekil 3.2.1.2.' de belirtildiği gibi çalışılmıştır. Kolona yüklenen örneklerin elüsyonu için 5 ml asetonitril ve etil asetat kullanılmış; ayrıca bir önceki basamakta elde edilen metanol elüsyonu spektrumlarından bu basamakta da yararlanılmıştır. Boyar maddelerin UV-VIS' deki maksimum absorptans değerleri, elüsyon çözücüsüne karşılık gelen standart çözeltilerinin absorptans değerleri ile karşılaştırıldığında; standart çözeltili absorptansına en yakın absorptans şiddetinin gözlendiği çözücü en uygun elüsyon çözücüsü olarak belirlenmiştir.

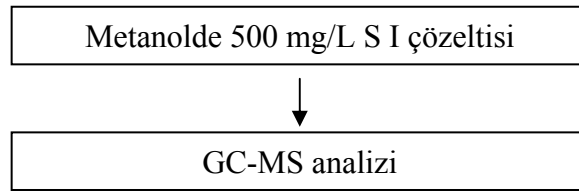


**Şekil 3.2.1.2.** Sudan boyları için uygun elüsyon çözücüsü belirlenmesine yönelik katı faz ekstraksiyon şeması

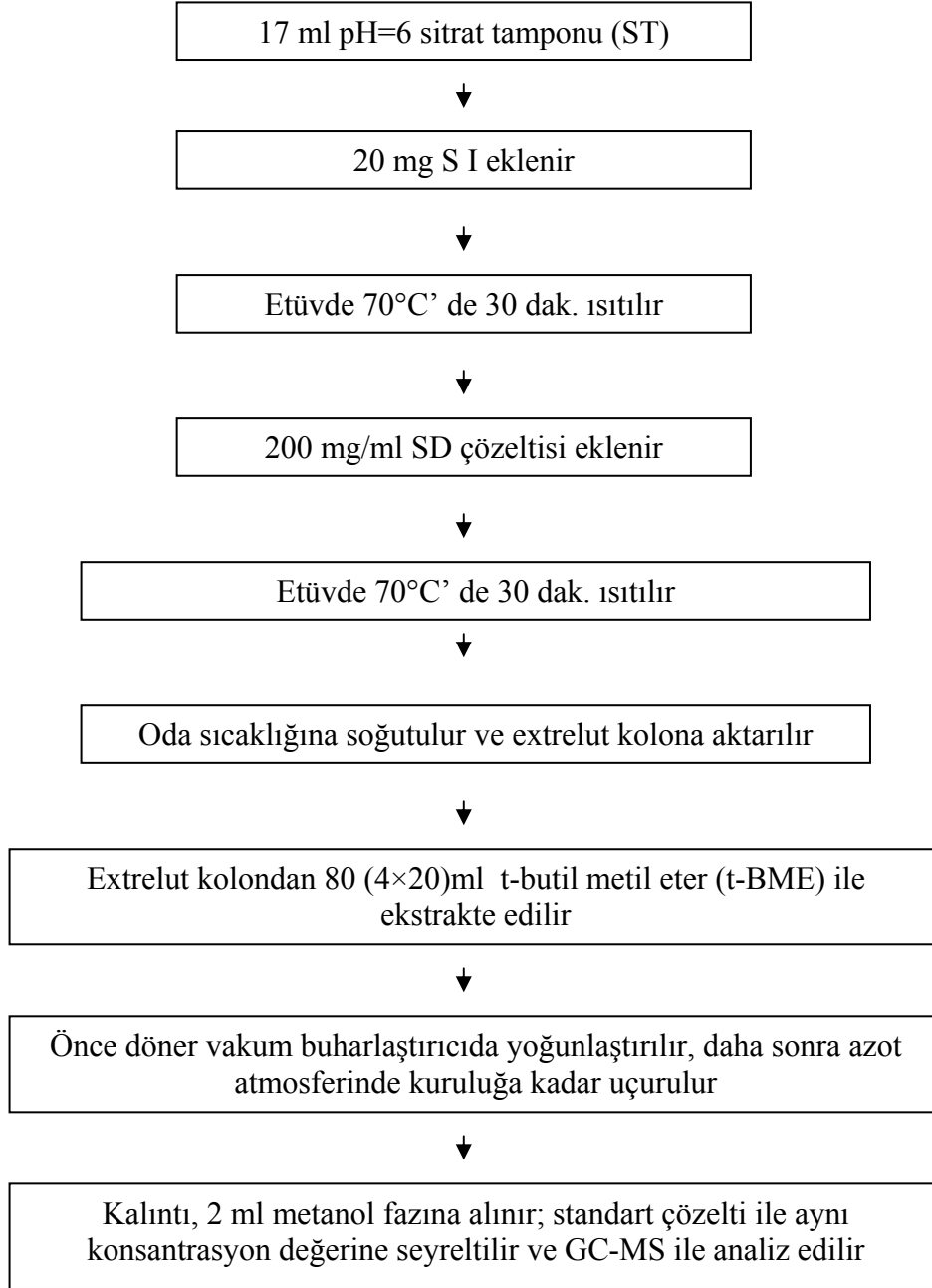
### 3.2.2. Kalitatif GC-MS Analizleri

#### a) S I Boyar Maddesi İle Yapılan Kalitatif Çalışma

Kimyasal indirgeme işlemi uygulanmamış standart S I boyası ile kimyasal indirgeme işlemi uygulanmış S I boyar maddesinin GC-MS analizine yönelik şemalar Şekil 3.2.2.1. ve Şekil 3.2.2.2.' de verilmiştir.



Şekil 3.2.2.1. S I' in GC-MS analizine yönelik deneysel işlem şeması

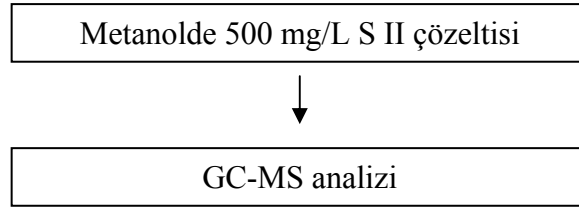


**Şekil 3.2.2.2.** Kimyasal indirgeme işlemi uygulanmış S I' in GC-MS analizine yönelik deneysel işlem şeması

**KAYNAK:** ASU B-82.02/2. 1998-01. Nachweis der Verwendung Bestimmter Azofarbstoffe aus textilen Bedarfsgegenständen. Beuth Verlag, 10772 Berlin.

**b) S II Boyar Maddesi İle Yapılan Kalitatif Çalışma**

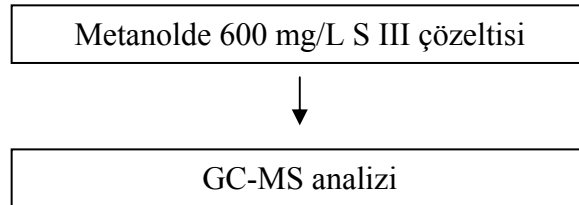
Kimyasal indirgeme işlemi uygulanmamış standart S II boyasının analiz şeması Şekil 3.2.2.3.' te verilmiştir. S I boyar maddesi için Şekil 3.2.2.2.' de verilen işlemler; kimyasal indirgeme işlemi uygulanmış S II boyar maddesinin GC-MS analizi için ve 20 mg S II boyası kullanılarak uygulanmıştır.



**Şekil 3.2.2.3.** S II' nin GC-MS analizine yönelik deneysel işlem şeması

**c) S III Boyar Maddesi İle Yapılan Kalitatif Çalışma**

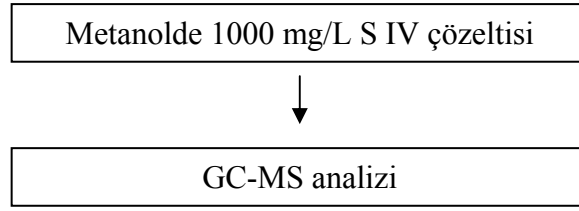
Kimyasal indirgeme işlemi uygulanmamış standart S III boyasının analiz şeması Şekil 3.2.2.4.' te verilmiştir. S I boyar maddesi için Şekil 3.2.2.2.' de verilen işlemler; kimyasal indirgeme işlemi uygulanmış S III boyar maddesinin GC-MS analizi için ve 20 mg S III boyası kullanılarak uygulanmıştır.



**Şekil 3.2.2.4.** S III' ün GC-MS analizine yönelik deneysel işlem şeması

#### d) S IV Boyar Maddesi İle Yapılan Kalitatif Çalışma

Kimyasal indirgeme işlemi uygulanmamış standart S IV boyasının analiz şeması Şekil 3.2.2.5.' te verilmiştir. S I boyar maddesi için Şekil 3.2.2.2.' de verilen işlemler; kimyasal indirgeme işlemi uygulanmış S IV boyar maddesinin GC-MS analizi için ve 20 mg S IV boyası kullanılarak uygulanmıştır.

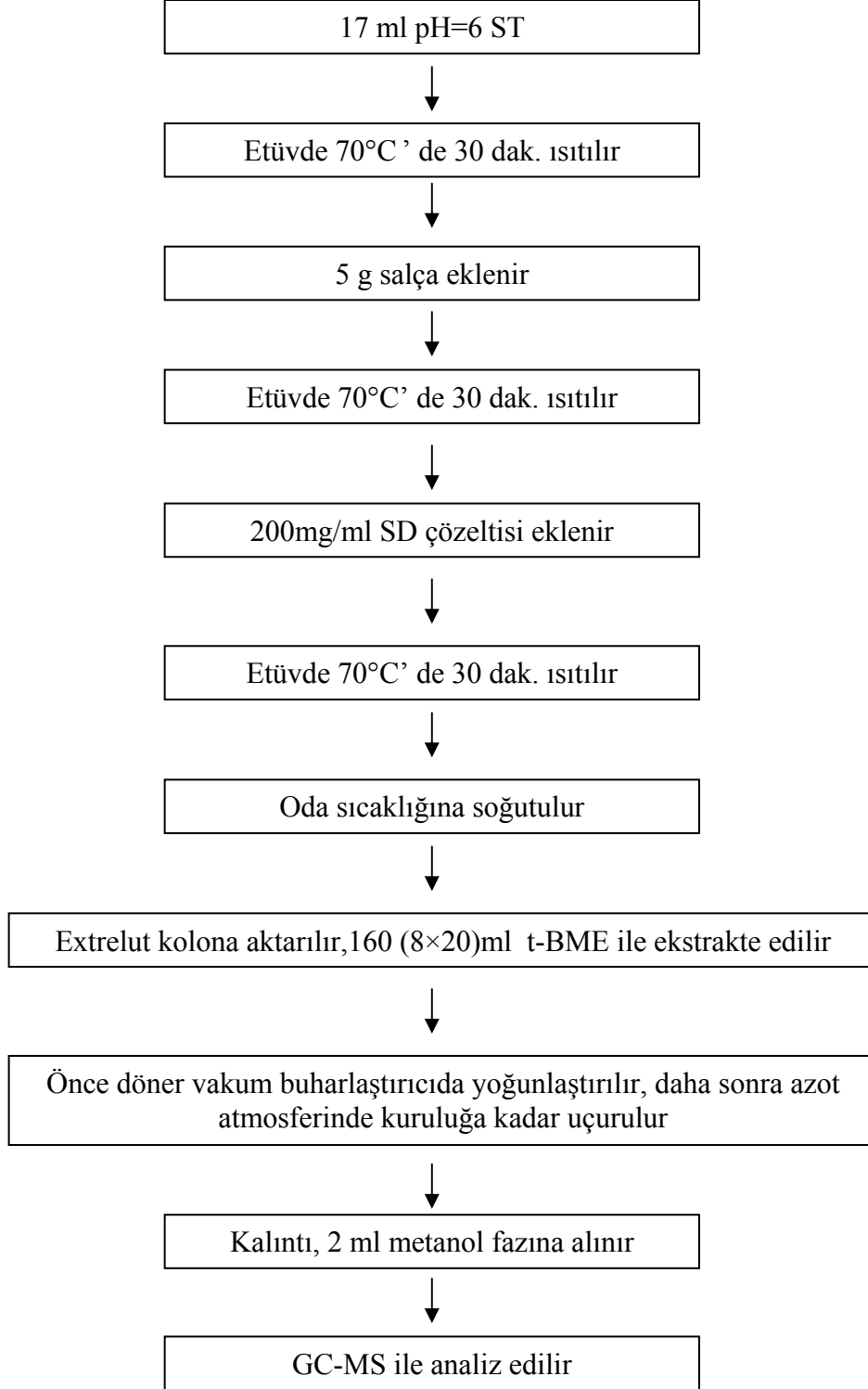


**Şekil 3.2.2.5.** S IV' ün GC-MS analizine yönelik deneysel işlem şeması



**e) Gerçek Örnek (Salça) Çalışması**

Salça örneğine uygulanan deneysel işlemler Şekil 3.2.2.6.'da gösterilmiştir.



**Şekil 3.2.2.6.** Salça örneğinin GC-MS analizine yönelik deneysel işlem şeması

### f) Karışım Halindeki S I, S II, S III ve S IV Boyar Maddelerinin Analizi

Karışım halinde S I, S II, S III ve S IV boyar maddelerin kalitatif analizlerinin mümkün olup olmadığını belirlemek için; her biri yaklaşık 0.06 mmol olan S I-S IV boyarlarının karışımı 20 mg S I yerine kullanılarak, ayrıntıları Şekil 3.2.2.2.' de belirtilen prosedüre göre çalışılmıştır.

### 3.2.3. Kalitatif LC-MS Analizleri

#### a) LC-MS Analizi İçin Gerçek Örnek Çalışması

Yaklaşık 2 g salça örnekleri 50 ml' lik falcon tüplere tartılmış; dördüne, 0,005 g Sudan boyar maddeleri eklenirken bir örneğe de karışım çalışması için her bir boyar maddeden 0,005 g eklenmiştir. Örnekler 25 ml aseton ile 2500 devir/dak. hızda 15 dak. santrifüjlenmiştir. C<sub>18</sub> mini kolonlar katı faz ekstraksiyon sistemine takılarak 2 ml metanol ile vakum altında şartlandırılmıştır. Çözücü tamamen uzaklaştıktan sonra örneklere ait santrifüjler kolonlara yüklenmiş, son damlaya kadar süzülmesi beklendikten sonra 10 ml metanol ile elüsyon gerçekleştirilmiştir. LC-MS analizi, Çizelge 3.2.3.1.'de verilen şartlarda uygulanmıştır.

**Çizelge 3.2.3.1.** LC-MS analiz şartları

Elüent	Metanolde % 0,1 formik asit (* h/h) /Sulu formik asit,% 0,1 (h/h) [97/3 h/h]
Akış Hızı	0,2 ml/dak.
İyon Modu	Pozitif (ESI iyon kaynağı)
Enjeksiyon Hacmi	10 µL/dak.
Kolon Sıcaklığı	35°C
Nebulizer (Sprey Basıncı)	30 psi
Kuru Gaz (N <sub>2</sub> )	5 L/dak.
Kurutma sıcaklığı	280°C
Tarama Aralığı	70-400 (m/z)
Hedef Kütle	277 (m/z)

\*h= HACİM

### **3.2.4. Kantitatif Analiz**

#### **3.2.4.1. Örnek Hazırlama Prosedürü**

##### **a) 20 mg Sudan Boyası İle Yapılan Kantitatif Çalışma**

Her bir boyar maddeden 20 mg tartım alınarak Şekil 3.2.2.2.'de belirtilen işlemler uygulanmıştır. Elde edilen örnekler uygun derişimlerde seyreltilmiş ve her birinin GC-MS kromatogramında gözlenen parçalanma ürünlerine ait kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur.

##### **b) Gerçek Örnekler İçin Ekstraksiyon Çalışması**

Salçadan Sudan boyalarının alınması için gerçek örneklere aseton ekstraksiyonu uygulanmıştır. Yaklaşık 5 g salça örneği 50 ml' lik falcon tüplerde 10 ml aseton içerisine alındıktan sonra 2500 devir/dak. hızda 15 dak. santrifüjlenmiştir. 4 ml santrifügat alınarak üzerine 13 ml pH=6 tamponu eklenmiş ve Şekil 3.2.2.2.'de belirtilen işlem basamakları uygulanmıştır. Kalıntı, 2 ml metanolde çözülerek pastör pipet ile vialer alınmış ve GC-MS ile analiz edilmiştir.

##### **c) Gerçek Örneklerde Geri Kazanımın Belirlenmesi**

Yaklaşık 5 g , dört salça örneğine 50 ml' lik falcon tüplerde 20 mg S I, S II, S III ve S IV boyar maddeleri ayrı ayrı eklenmiş ve her bir örneğe 10 ml aseton ilave edilerek, 2500 devir/dak. hızda 15 dak. santrifüjlenmiştir. Bu şekilde elde edilen örneklerin her birinden 4 ml santrifügat alınmış ve üzerlerine 13 ml pH=6 tamponu eklenerek Şekil 3.2.2.2.'de belirtilen işlemler uygulanmıştır. Her bir kalıntı 10 ml metanolde çözülmüş ve başlangıç boyar madde tartım değerleri temel alınarak S I için 100 mg/L, S II için 200 mg/L, S III için 550 mg/L ve S IV için 450 mg/L konsantrasyonuna seyreltilerek GC-MS ile analiz edilmiştir. Bu analiz sonucunda parçalanma ürünlerine ait olan ve kromatogramlardan elde edilen alan değerleri, 20 mg

standart boyar madde ile çalışıldığında parçalanma ürünleri için elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait denklemlerde yerine konularak deneysel konsantrasyon değerleri; oradan da yüzde geri kazanım (%R) değerleri belirlenmiştir.

#### d) pH Değişiminin Geri Kazanım Üzerine Etkisinin İncelenmesi

pH değişiminin etkisini görmek amacı ile UV-VIS taramalı absorbans ölçümlerinden elde edilen maksimum absorbans değerlerine göre; Sudan I boyar maddesine pH=1,5' te, Sudan II boyar maddesine pH=1,5' te ısıtma işlemi uygulayarak ayrıca pH=6' da ısıtma işlemi uygulamadan ultrasonik karıştırıcıda, Sudan III boyar maddesine pH=1,5'te, Sudan IV boyar maddesine ise pH=1,5 ve pH=4' te indirgeme işlemi uygulanmıştır. Analizler sonrası GC-MS kromatogramlarında gözlenen parçalanma ürünlerine ait alan değerleri, pH=6' da elde edilen alan değerleri ile karşılaştırılarak her bir boyar madde için en uygun pH değeri belirlenmiştir.

#### e) Kemometrik Yöntem İle En Uygun Şartların Belirlenmesi

Optimizasyon için merkezi kompozit dizayn yöntemi kullanılarak, pH=6 ortamında en düşük yüzde geri kazanım veren Sudan III boyar maddesinin tayinine sodyum ditiyonit derişimi ( $x_1$ ) ve reaksiyon sıcaklığının ( $x_2$ ) etkisi incelenmiştir. Çizelge 3.2.4.1.1.'de kodlanmış değerlerden oluşan merkezi kompozit dizayn ve Çizelge 3.2.4.1.2.'de gerçek deneysel değerlerin verildiği dizayn setleri gösterilmiştir.

**Çizelge 3.2.4.1.1.** Merkezi kompozit dizayn (kodlanmış değerler)

	-1,41	-1	0	+1	+1,41
$x_1$	0,295	0,5	1	1,5	1,705
$x_2$	21,8	30	50	70	78,2

**Çizelge 3.2.4.1.2.** Merkezi kompozit dizayn (gerçek değerler)

Deney No	Kod Değer		Deneysel Değer	
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>1</sub> (M)	x <sub>2</sub> (°C)
1	-1	-1	0,5	30
2	+1	-1	1,5	30
3	-1	+1	0,5	70
4	+1	+1	1,5	70
5	-1,41	0	0,295	50
6	+1,41	0	1,705	50
7	0	-1,41	1	21,8
8	0	+1,41	1	78,2
9	0	0	1	50

Çizelge 3.2.4.1.2. verileri kullanılarak en uygun SD derişimi ve sıcaklık değerinin belirlenmesi çalışmalarında, bu iki faktör dışındaki tüm deneysel parametreler her bir deney için sabittir. Her örneğin GC-MS kromatogramlarında parçalanma ürünlerine ait alan değerleri kullanılarak excel programında hesaplamalar yapılmıştır.

$y = b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2$  denkleminin  $x_1$  ve  $x_2$ ' ye göre türevleri alınıp sıfıra eşitlendiğinde bu değişkenler teorik olarak  $x_1 = 0,5904$  ve  $x_2 = -0,2507$  olarak belirlenmiştir. Daha sonra gerçek değerlerin belirlenmesi amacı ile  $x_1 = (x_{1(\text{gerçek})} - 0 \text{ değeri}(\text{orta değeri})) / (0 \text{ değeri ile } \pm 1 \text{ arasındaki fark})$  ve  $x_2 = (x_{2(\text{gerçek})} - 0 \text{ değeri}(\text{orta değeri})) / (0 \text{ değeri ile } \pm 1 \text{ arasındaki fark})$  eşitliklerinden yararlanılmıştır.

### 3.2.4.2. Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi Çalışma Koşulları

Örnek analizi için kalitatif ve kantitatif amaçlı olmak üzere genel olarak iki farklı GC-MS programı kullanılmış olup bu programlar sırası ile aşağıda özetlenmiştir.

### a) Kalitatif Analiz Programı

Kalitatif analiz işlemlerinde iki farklı model GC-MS ile çalışılmış ve iki farklı program üzerinden örnek analizleri gerçekleştirilerek sonuçlar buna göre değerlendirilmiştir.

### i) Kalitatif Analiz Programı-1

Şekil 3.2.2.5.'te ayrıntıları belirtilen salça çalışması sonucu elde edilen örnek, Çizelge 3.2.4.2.1., Çizelge 3.2.4.2.2. ve Çizelge 3.2.4.2.3.'te belirtilen GC-MS analiz şartlarında çalışılmıştır.

**Çizelge 3.2.4.2.1.** Kalitatif salça çalışması için kolon sıcaklık programı

GC sıcaklık programı		
Sıcaklık artışı (°C/dak.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme süresi (dak.)
-	60	1,00
10	190	0,00
3	235	0,00
10	260	5,00
10	280	10,00

**Çizelge 3.2.4.2.2.** Kalitatif analiz programı-1 için gaz kromatografisi (GC) şartları

Enjeksiyon Sıcaklığı	250°C
Arayüzey Sıcaklığı	300°C
Kolon Basıncı	98 kPa
Toplam Akış	45 ml/dak.
Taşıyıcı Gaz	Helyum
Taşıyıcı Gaz Akış Hızı	1,6 ml/dak.
Enjeksiyon Modu	Splitless
Dedektör	MS (Taramalı mod)
Enjeksiyon Hacmi	1 µL

**Çizelge 3.2.4.2.3.** Kalitatif analiz programı-1 için kütle spektrometresi (MS) şartları

Başlangıç zamanı (dak.)	6,50
Tarama Aralığı (m/z)	50-350

**ii) Kalitatif Analiz Programı-2**

Şekil 3.2.2.5.'te ayrıntıları belirtilen salça çalışması haricindeki tüm kalitatif analiz işlemlerindeki GC-MS şartları Çizelge 3.2.4.2.4., Çizelge 3.2.4.2.5. ve Çizelge 3.2.4.2.6.'da belirtildiği gibidir.

**Çizelge 3.2.4.2.4.** Kalitatif analiz programı-2 için kolon sıcaklık programı

GC sıcaklık programı		
Sıcaklık artışı (°C/dak.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme süresi (dak.)
-	60	-
8	300	5

**Çizelge 3.2.4.2.5.** Kalitatif analiz programı-2 için GC şartları

Enjeksiyon Sıcaklığı	250°C
Arayüzey Sıcaklığı	280°C
Kolon Basıncı	100 kPa
Toplam Akış	50 ml/dak.
Taşıyıcı Gaz	Helyum
Taşıyıcı Gaz Akış Hızı	1,6 ml/dak.
Enjeksiyon Modu	Splitless
Dedektör	MS (Taramalı mod)
Enjeksiyon Hacmi	1 µL

**Çizelge 3.2.4.2.6.** Kalitatif analiz programı-2 için MS Şartları

Başlangıç zamanı (dak.)	3,50
Tarama Aralığı (m/z)	50-400

**b) Kantitatif analiz programı**

Kantitatif analiz programı her boyar madde için aynı olmakla birlikte sadece MS şartları Çizelgeler 3.2.4.2.7.,-8.,-9.,-10.,-11.'de belirtildiği gibi farklılık göstermektedir.

**Çizelge 3.2.4.2.7.** S I, S II, S III ve S IV boyar maddelerinin kantitatif analizi için kolon sıcaklık programı

GC sıcaklık programı		
Sıcaklık artışı (°C/dak.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme süresi (dak.)
-	60	-
8	200	-

**Çizelge 3.2.4.2.8.** S I, S II, S III ve S IV boyar maddeleri maddelerinin kantitatif analizi için GC şartları

Enjeksiyon Sıcaklığı	250°C
Arayüzey Sıcaklığı	280°C
Kolon Basıncı	100 kPa
Toplam Akış	50 ml/dak.
Taşıyıcı Gaz	Helyum
Taşıyıcı Gaz Akış Hızı	1,6 ml/dak.
Enjeksiyon Modu	Splitless
Dedektör	MS (Taramalı mod)
Enjeksiyon Hacmi	1 µL



**Çizelge 3.2.4.2.9.** S I boyar maddesinin kantitatif analizi için MS şartları

Başlangıç zamanı (dak.)	3,50
Tarama Aralığı (m/z)	90-162

**Çizelge 3.2.4.2.10.** S II boyar maddesinin kantitatif analizi için MS şartları

Başlangıç zamanı (dak.)	3,50
Tarama Aralığı (m/z)	115-172

**Çizelge 3.2.4.2.11.** S III boyar maddesinin kantitatif analizi için MS şartları

Başlangıç zamanı (dak.)	3,50
Tarama Aralığı (m/z)	85-215

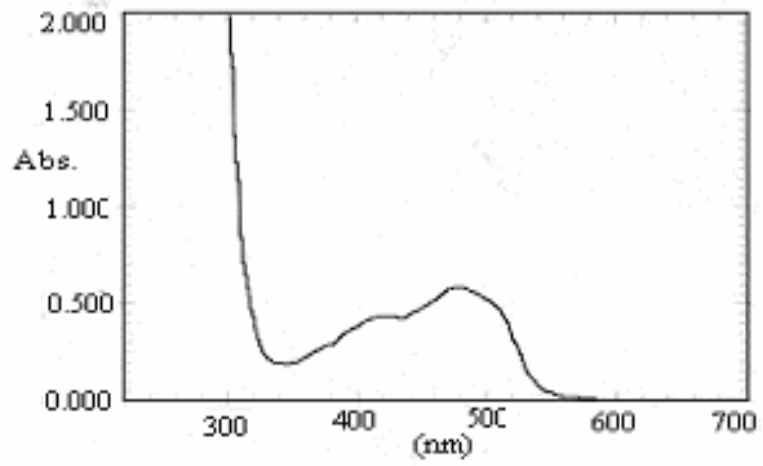
**Çizelge 3.2.4.2.12.** S IV boyar maddesinin kantitatif analizi için MS şartları

Başlangıç zamanı (dak.)	3,50
Tarama Aralığı (m/z)	103-245

#### 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

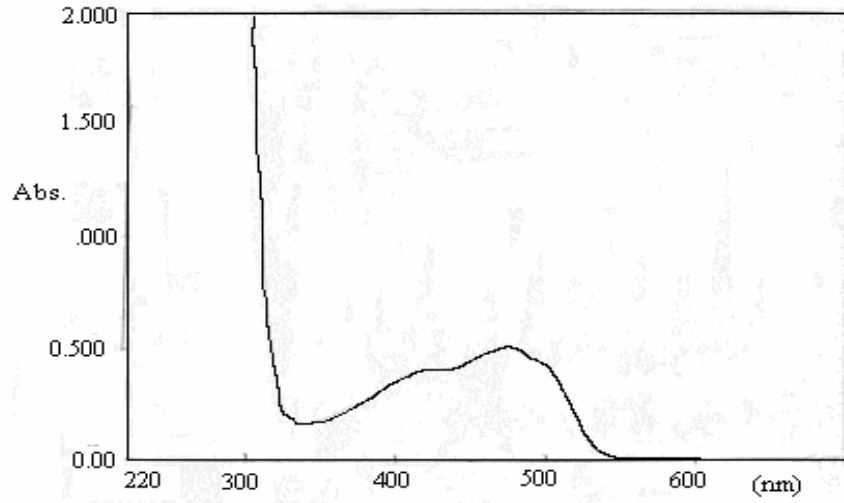
##### 4.1. UV-VIS İle İlgili Çalışmalar

##### 4.1.1. S I Boyar Maddesinin UV-VIS Spektrumları



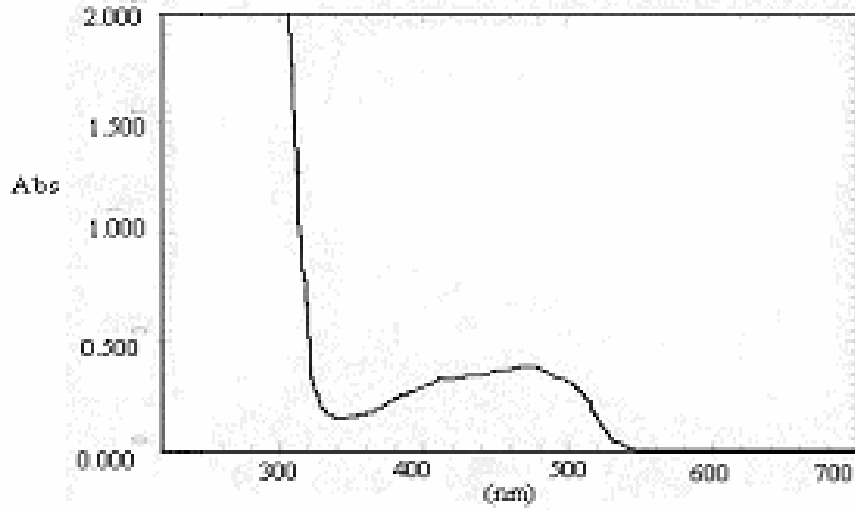
##### 4.1.1.1. Metanolde 7 mg/L S I boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

Metanolde, S I boyar maddesinin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu 478,5 nm ve maksimum absorbans değeri de 0,588 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1.1.2. Asetonitrilde 7 mg/L S I boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

Asetonitrilde, S I boyar maddesinin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu 474,5 nm ve maksimum absorbans değeri de 0,505 olarak belirlenmiştir.

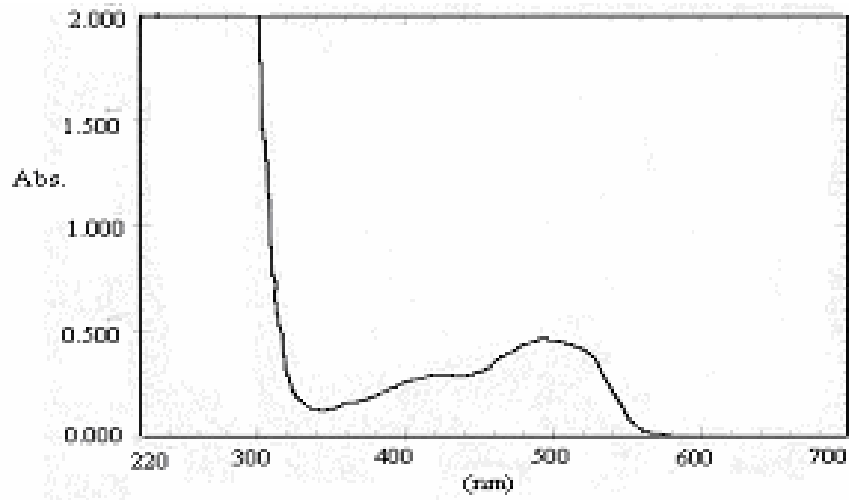


Şekil 4.1.1.3. Etil asetatta 7 mg/L S I boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

Etil asetatta, S I boyar maddesinin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu 470,5 nm ve maksimum absorbans değeri de 0,389 olarak belirlenmiştir.

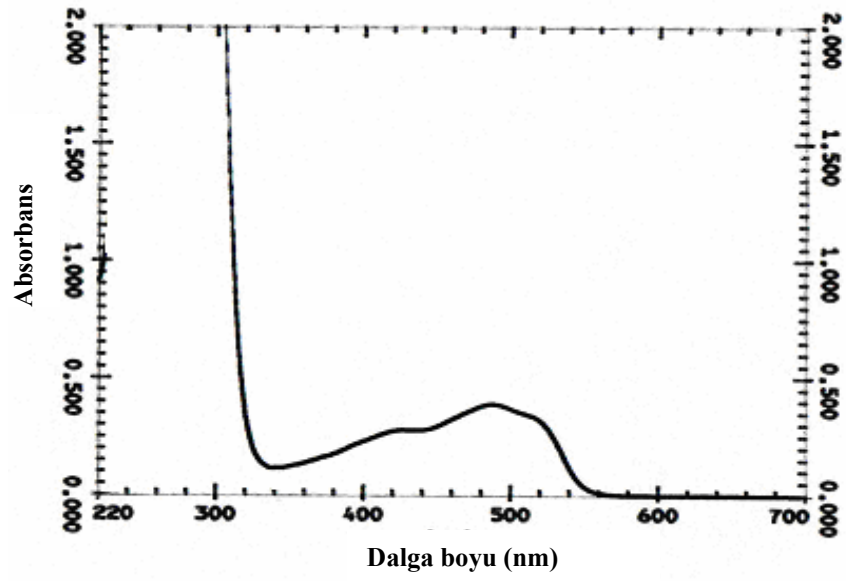
Metanol, asetonitril ve etil asetatın polarite sırası küçükten büyüğe doğru etil asetat, asetonitril, metanol şeklindedir. Çözücü polaritesi arttıkça, S I boyar maddesi için, maksimum absorbans yaptığı dalga boyunun daha yüksek değer aldığı ve absorbans şiddetinin arttığı belirlenmiştir.

#### 4.1.2. S II Boyar Maddesinin UV-VIS Spektrumları



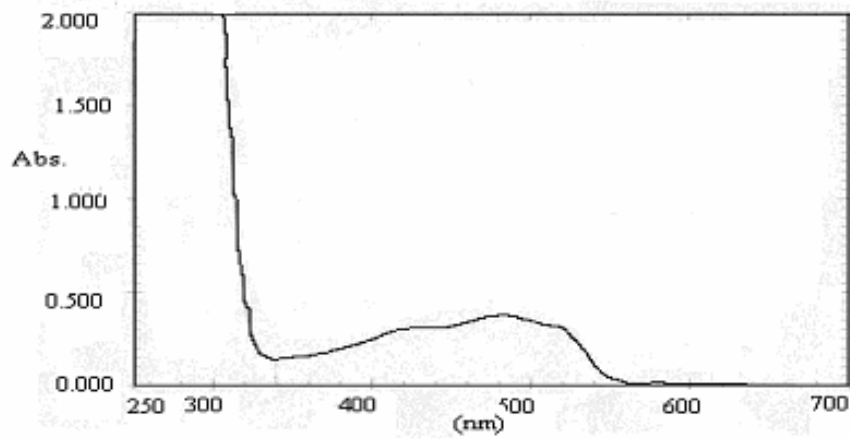
Şekil 4.1.2.1. Metanolde 7 mg/L S II boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

S II boyar maddesinin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu 495,5 nm ve maksimum absorbans değeri de 0,459 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1.2.2. Asetonitrilde 7 mg/L S II boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

Asetonitrilde, S II boyar maddesinin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu 486,5 nm ve maksimum absorbans değeri de 0,389 olarak belirlenmiştir.

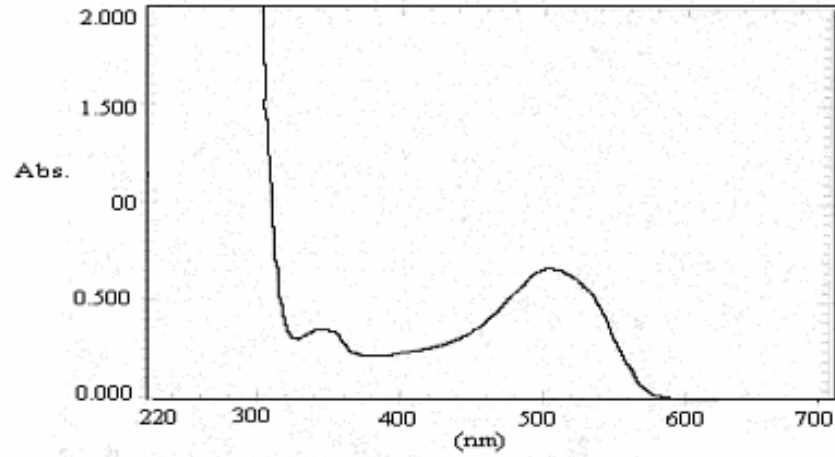


Şekil 4.1.2.3. Etil asetatta 7 mg/L S II boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

Etil asetatta, S II boyar maddesinin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu 483,4 nm ve maksimum absorbans değeri de 0,383 olarak belirlenmiştir.

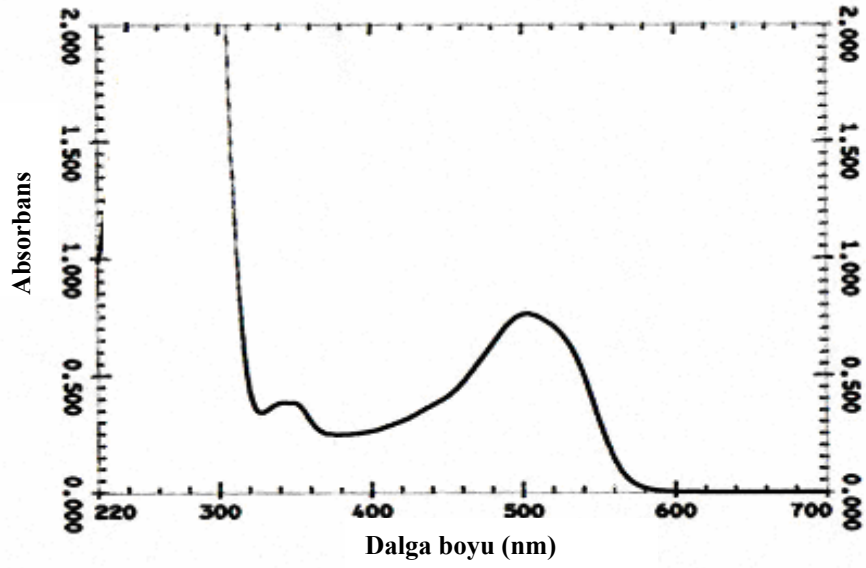
S II boyar maddesi için; çözücü polaritesi arttıkça maksimum absorbans yaptığı dalga boyunun daha yüksek değer aldığı ve absorbans şiddetinin arttığı belirlenmiştir.

#### 4.1.3. S III Boyar Maddesinin UV-VIS Spektrumları



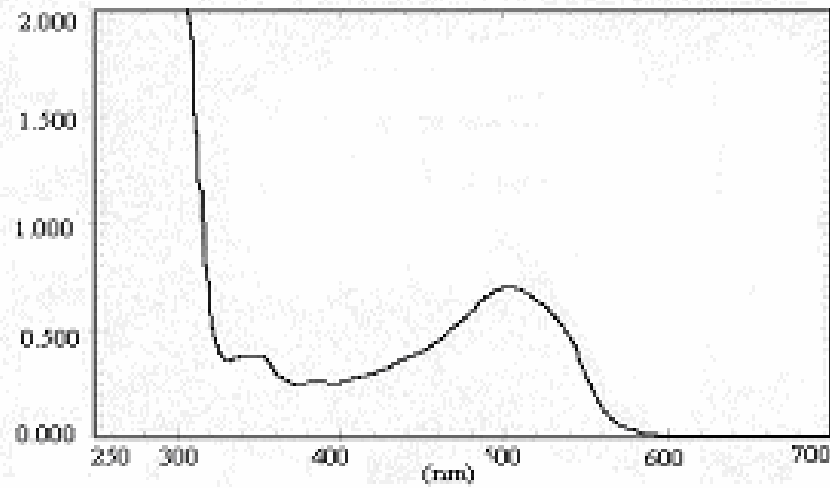
Şekil 4.1.3.1. Metanolde 7 mg/L S III boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

S III boyar maddesinin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu 504,5 nm ve maksimum absorbans değeri de 0,672 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1.3.2. Asetonitrilde 7 mg/L S III boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

Asetonitrilde, S III boyar maddesinin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu 503,0 nm ve maksimum absorbans değeri de 0,761 olarak belirlenmiştir.

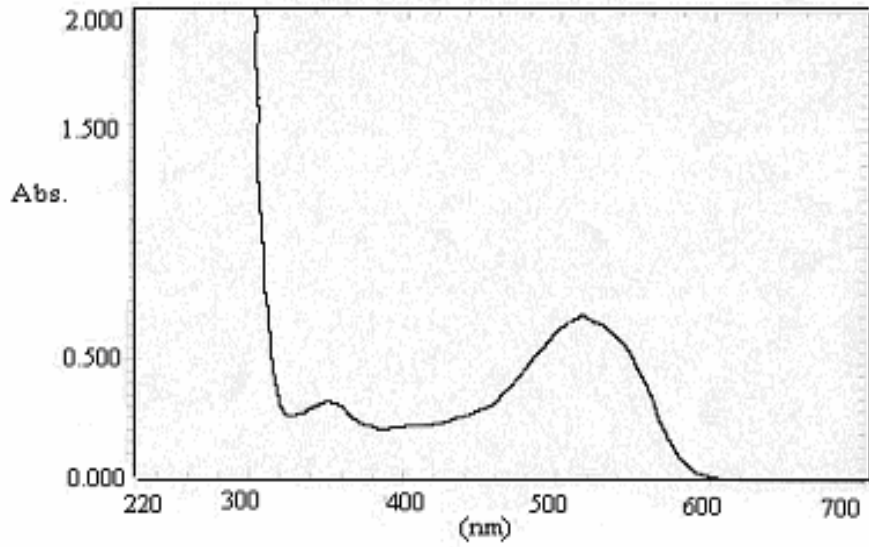


Şekil 4.1.3.3. Etil asetatta 7 mg/L S III boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

Etil asetatta, S III boyar maddesinin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu 501,8 nm ve maksimum absorbans değeri de 0,701 olarak belirlenmiştir.

S III boyar maddesi için; çözücü polaritesi arttıkça maksimum absorbans yaptığı dalga boyunun daha yüksek değer aldığı belirlenmiştir.

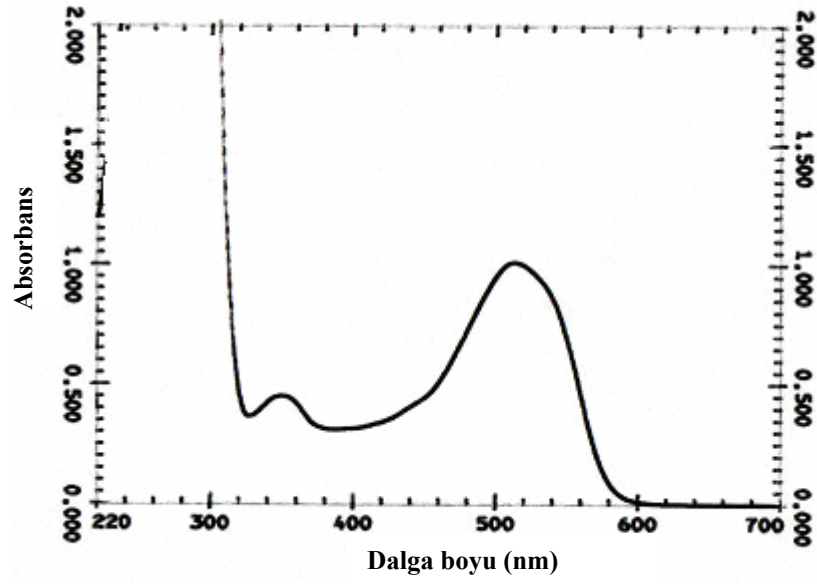
#### 4.1.4. S IV Boyar Maddesinin UV-VIS Spektrumları



Şekil 4.1.4.1. Metanolde 7 mg/L S IV boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

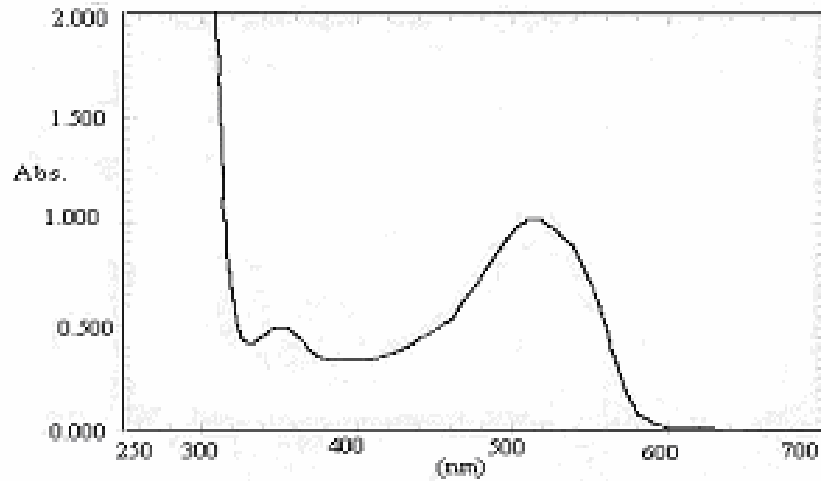
S IV boyar maddesinin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu 515,5 nm ve maksimum absorbans değeri de 0,692 olarak belirlenmiştir.





Şekil 4.1.4.2. Asetonitrilde 7 mg/L S IV boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

Asetonitrilde, S IV boyar maddesinin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu 513,0 nm ve maksimum absorbans değeri de 1,009 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1.4.3. Etil asetatta 7 mg/L S IV boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

Etil asetatta, S IV boyar maddesinin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu 512,2 nm ve maksimum absorbans değeri de 1,022 olarak belirlenmiştir.

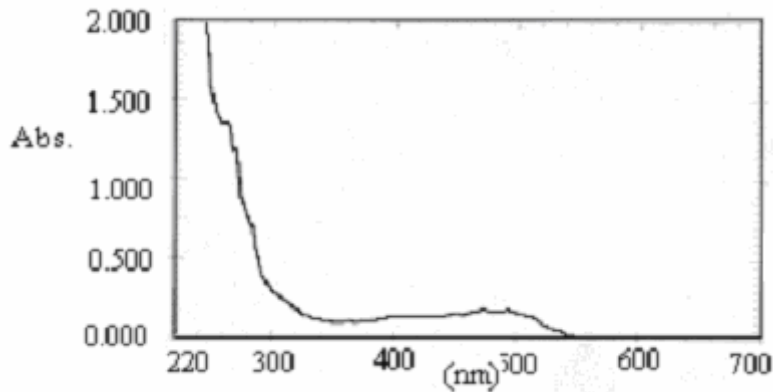
Çözücü polaritesi arttıkça S IV boyar maddesinin maksimum absorbans yaptığı dalga boyu daha yüksek bir değer alırken; absorbans şiddetinde azalma olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 2.8.1.1.'de görüldüğü gibi S I ve S II boyar maddelerinin yapılarındaki tek fark, S II boyar maddesindeki bir metil (-CH<sub>3</sub>) grubudur. Bu grubun, maksimum absorpsiyon dalga boyunu daha büyük bir değere kaydıracağı tespit edilmiştir. S IV boyar maddesinin S III boyar maddesinden farkı ise yapısındaki iki metil grubudur. Bu iki metil grubu, maksimum absorpsiyon dalga boyunu daha büyük bir değere kaydırmış; aynı zamanda absorpsiyon şiddetini de artırmıştır. Bu gibi gruplar kendileri absorpsiyon yapmadıkları halde absorpsiyon dalga boyunu daha uzun dalga boylarına (kırmızıya) kaydıran; ve absorpsiyon şiddetini artıran oksokromlardır.

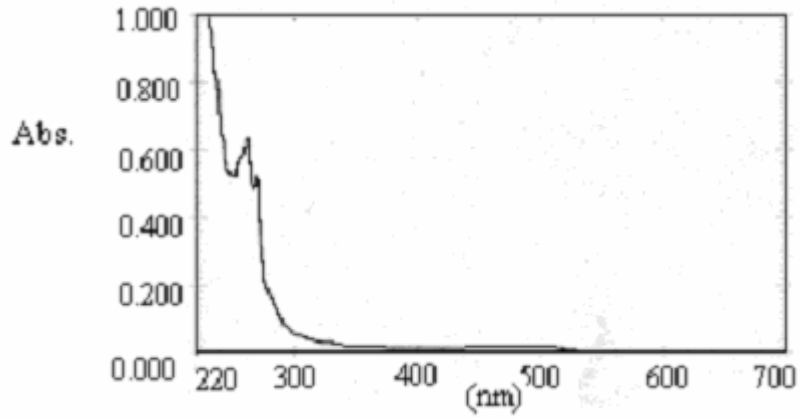
## 4.2. Sudan Boyar Maddelerinin Katı Faz Ekstraksiyonu

### 4.2.1. Sudan Boyaları İçin Çözünürlük Çalışmaları

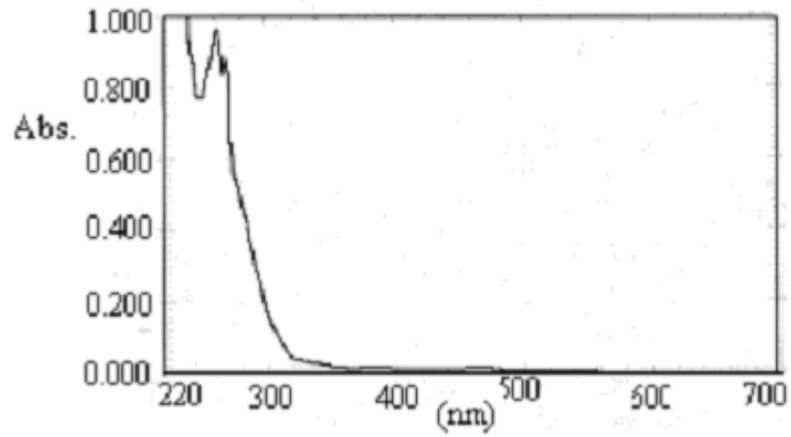
Çözünürlük çalışmaları farklı polaritede dört çözücü (su, metanol, aseton ve hekzan) seçilerek gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.2.1.1.'deki şemaya göre hazırlanan çözeltilerin UV-VIS spektrumları Şekil 4.2.1.1-Şekil 4.2.1.16'da verilmiştir.



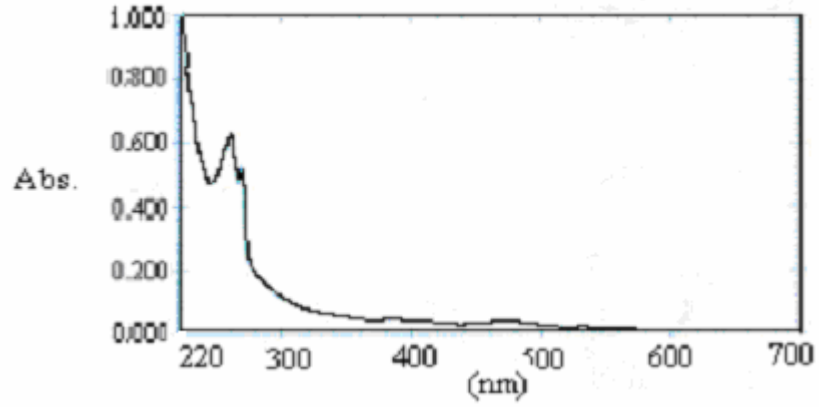
Şekil 4.2.1.1. Suda hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S I boyar maddesinin UV-VIS spektrumu



**Şekil 4.2.1.2.** Metanolde hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S I boyar maddesinin UV-VIS spektrumu



**Şekil 4.2.1.3.** Asetonda hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S I boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

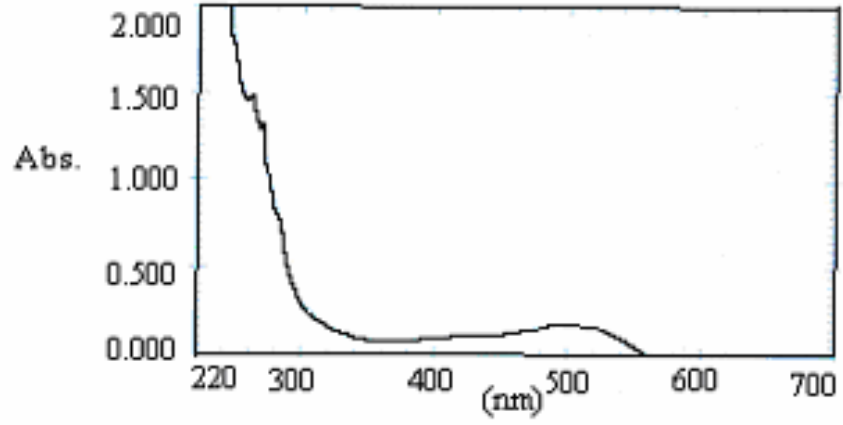


**Şekil 4.2.1.4.** Hekzanda hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S I boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

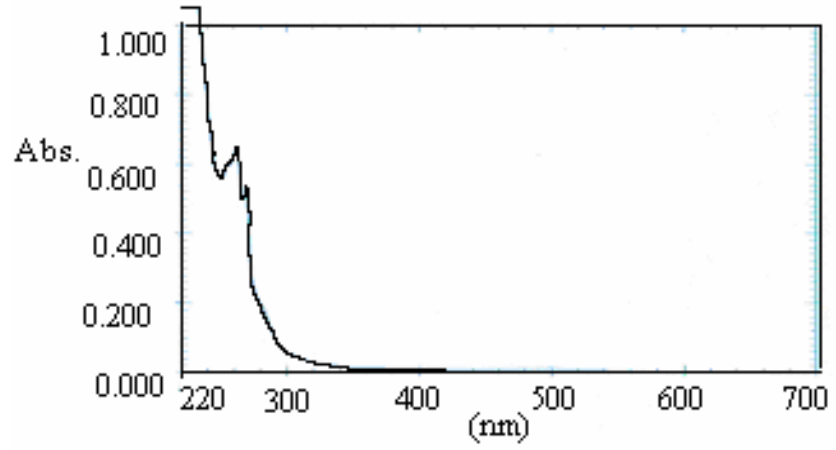
S I boyar maddesi için UV-VIS spektrumlarından tespit edilen maksimum dalga boyuna ait absorbands değerleri Çizelge 4.2.1.1.' de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.1.1.** S I' in farklı çözücülerdeki UV-VIS spektrumlarından tespit edilen maksimum absorbands değerleri

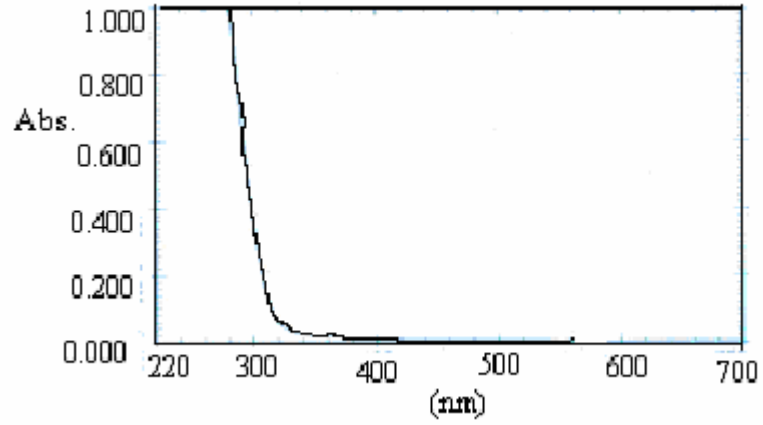
	<b>Çözücü</b>	<b>Absorbans</b>
<b>S I</b>	Su	0,1860
	Metanol	0,0137
	Aseton	0,0067
	Hekzan	0,0315



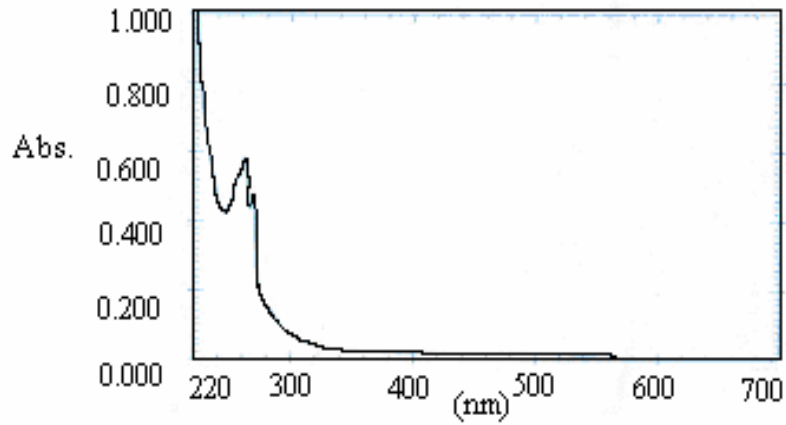
**Şekil 4.2.1.5.** Suda hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S II boyar maddesinin UV-VIS spektrumu



**Şekil 4.2.1.6.** Metanolde hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S II boyar maddesinin UV-VIS spektrumu



**Şekil 4.2.1.7.** Asetonda hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S II boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

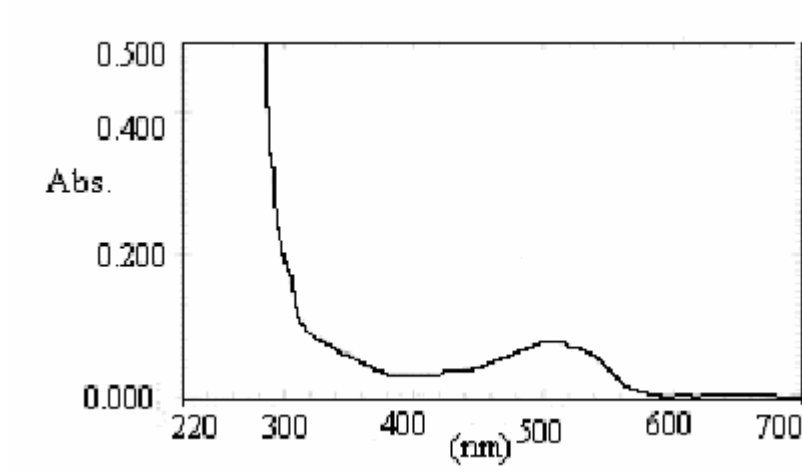


**Şekil 4.2.1.8.** Hekzanda hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S II boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

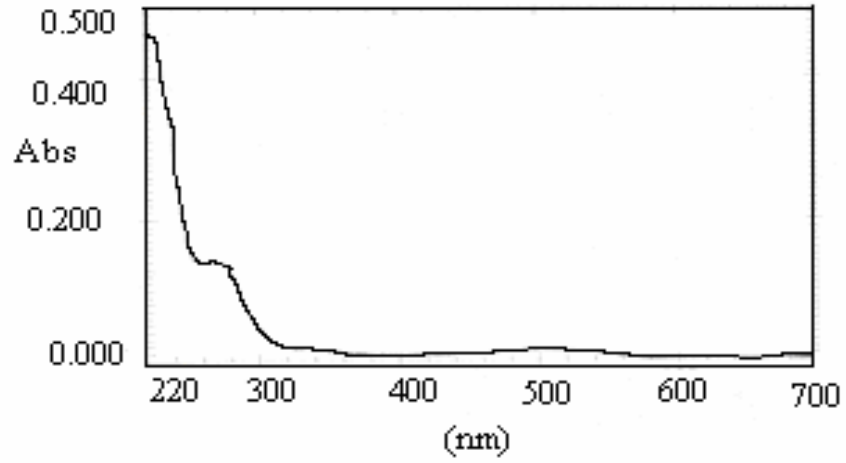
S II için UV-VIS spektrumlarında tespit edilen maksimum dalga boyuna ait absorbans değerleri Çizelge 4.2.1.2.' de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.1.2.** S II' nin farklı çözücülerdeki UV-VIS spektrumlarında tespit edilen maksimum absorbans değerleri

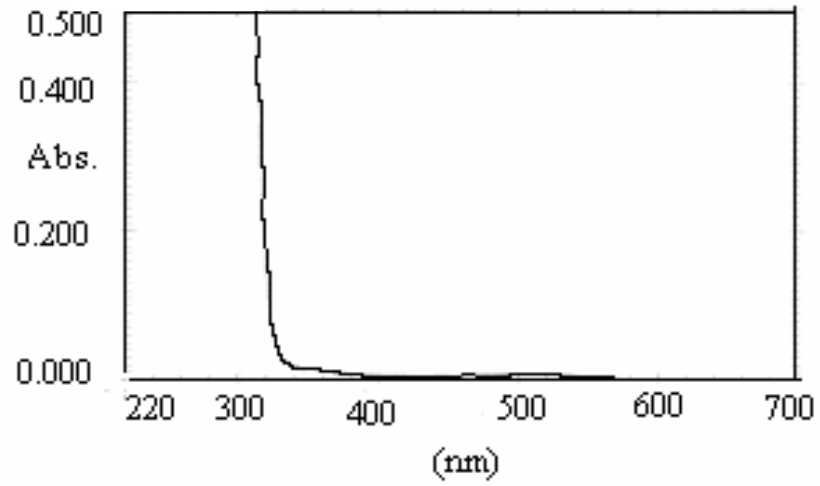
	<b>Çözücü</b>	<b>Absorbans</b>
<b>S II</b>	Su	0,167
	Metanol	0,013
	Aseton	0,009
	Hekzan	0,020



**Şekil 4.2.1.9.** Suda hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S III boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

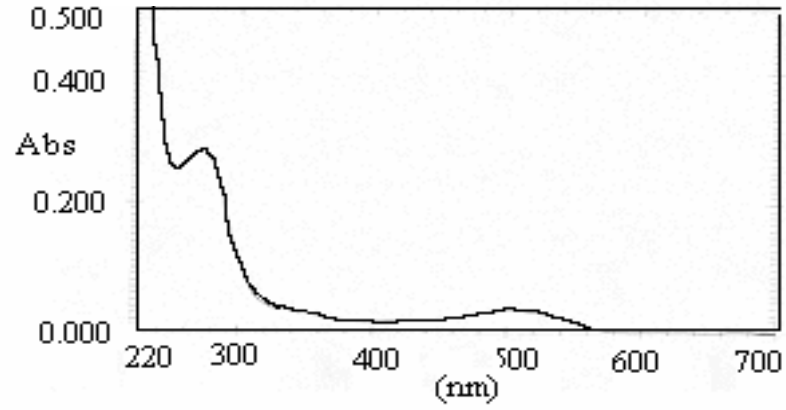


**Şekil 4.2.1.10.** Metanolde hazırlanmış ve metanol ile  $C_{18}$  katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S III boyar maddesinin UV-VIS spektrumu



**Şekil 4.2.1.11.** Asetonda hazırlanmış ve metanol ile  $C_{18}$  katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S III boyar maddesinin UV-VIS spektrumu



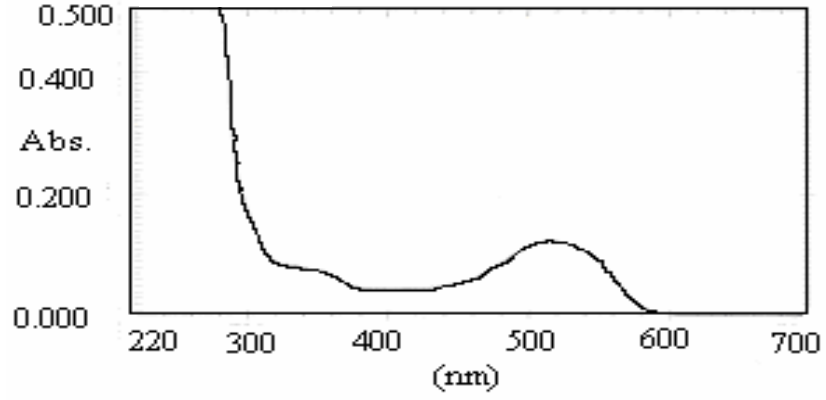


**Şekil 4.2.1.12.** Hekzanda hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S III boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

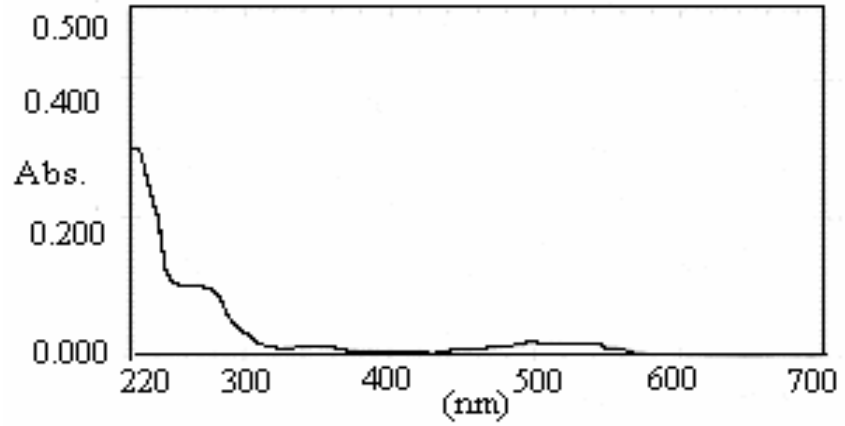
S III için UV-VIS spektrumlarında tespit edilen maksimum dalga boyuna ait absorbands değerleri Çizelge 4.2.1.3.' de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.1.3.** S III' ün farklı çözücülerdeki UV-VIS spektrumlarında tespit edilen maksimum absorbands değerleri

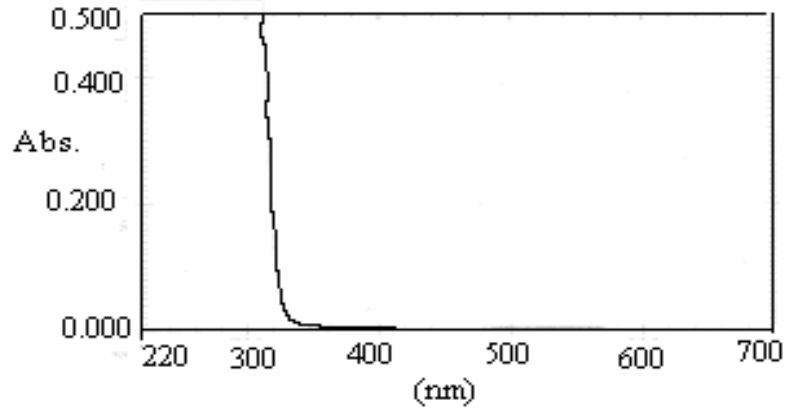
	<b>Çözücü</b>	<b>Absorbans</b>
<b>S III</b>	Su	0,078
	Metanol	0,016
	Aseton	0,008
	Hekzan	0,037



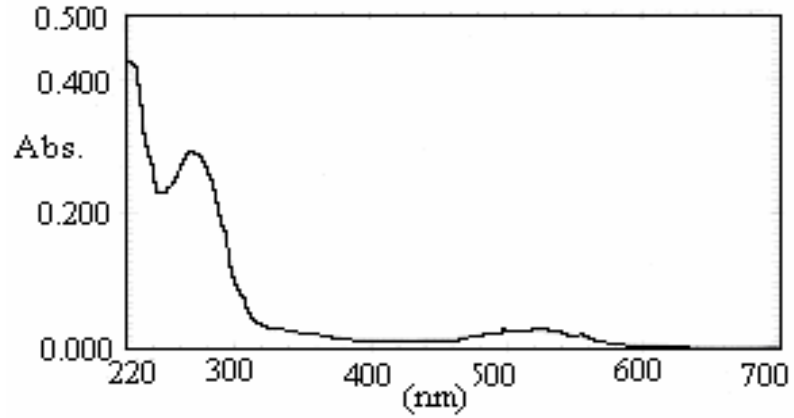
**Şekil 4.2.1.13.** Suda hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S IV boyar maddesinin UV-VIS spektrumu



**Şekil 4.2.1.14.** Metanolde hazırlanmış ve metanol ile C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S IV boyar maddesinin UV-VIS spektrumu



**Şekil 4.2.1.15.** Asetonda hazırlanmış ve metanol ile  $C_{18}$  katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S IV boyar maddesinin UV-VIS spektrumu



**Şekil 4.2.1.16.** Hekzanda hazırlanmış ve metanol ile  $C_{18}$  katı faz ekstraksiyon kolonundan elüe edilmiş S IV boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

S IV için UV-VIS spektrumlarında tespit edilen maksimum dalga boyuna ait absorbans değerleri Çizelge 4.2.1.4.' de verilmiştir.

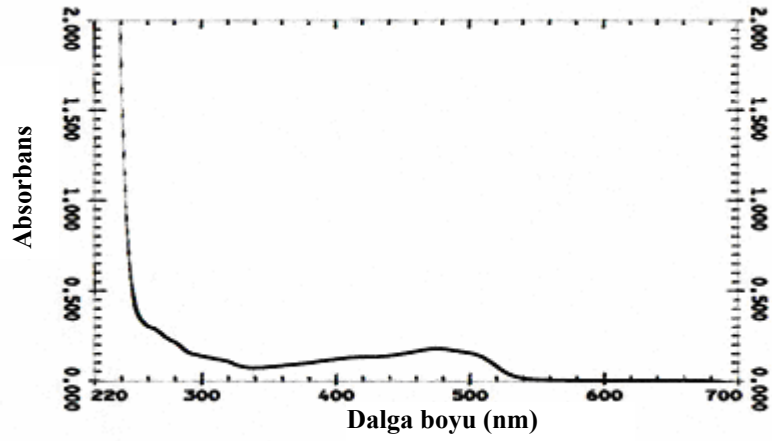
**Çizelge 4.2.1.4.** S IV' ün farklı çözücülerdeki UV-VIS spektrumlarında tespit edilen maksimum absorbans değerleri

	<b>Çözücü</b>	<b>Absorbans</b>
<b>S IV</b>	Su	0,124
	Metanol	0,021
	Aseton	0,005
	Hekzan	0,027

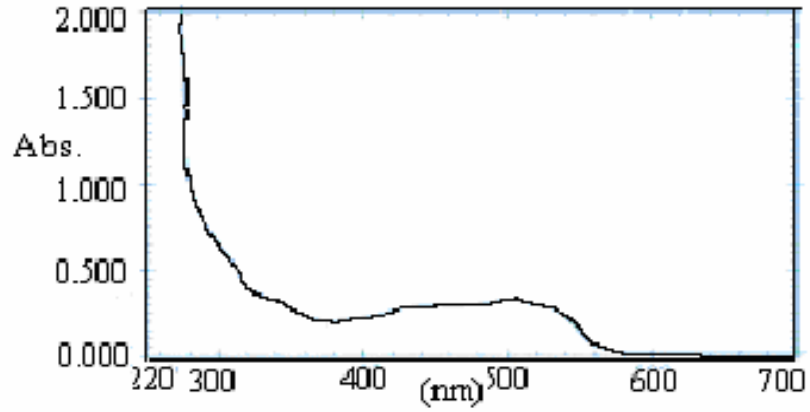
Her bir boyar maddenin belirtilen çözücülerde çözülüp katı faz ekstraksiyonu uygulandıktan sonra UV-VIS spektrumlarından tespit edilen absorbans değerleri, elüsyonlar metanol ile yapıldığından, Şekil 4.1.1.1., Şekil 4.1.2.1., Şekil 4.1.3.1. ve Şekil 4.1.4.1.'de verilen standart çözeltilere ait UV-VIS spektrumlarındaki absorbans değerleri ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda en yüksek absorbans değeri sulu çözeltilerde tespit edildiği için, en uygun çözücünün su olduğuna karar verilmiştir. Bu da boyar maddelerin polaritelerinin yüksek olduğunu; bu nedenle de polar ortamda daha çok çözüldüğünü göstermiştir. Bu nedenle bir sonraki aşamada uygun elüsyon çözücüsü belirlemek için, bu boyaların sudaki çözeltileri hazırlanmıştır.

#### **4.2.2. Sudan Boyalarının Elüsyon Çalışmaları**

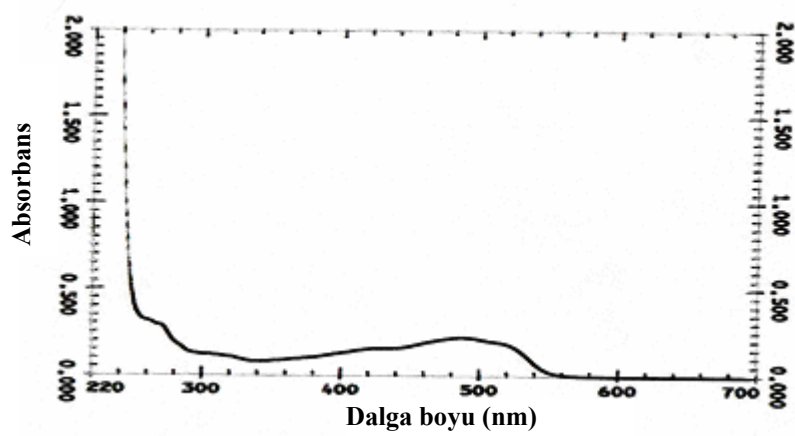
Katı fazda tutunan boyaların elüsyonunda, uygun çözücü belirlemek amacı ile farklı polaritede üç çözücünden (metanol, asetonitril ve etil asetat) yararlanılmıştır. Şekil 3.2.1.2.'de verilen katı faz ekstraksiyon şemasına göre hazırlanan çözeltilerin UV-VIS spektrumları Şekil 4.2.2.1-Şekil 4.2.2.16'da verilmiştir.



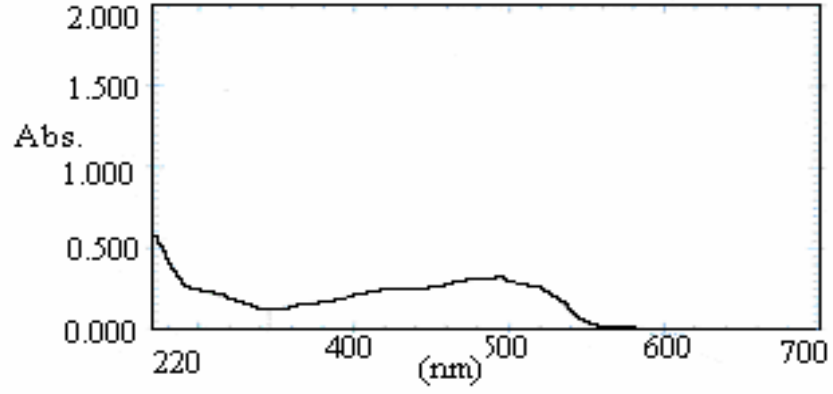
Şekil 4.2.2.1. C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan asetonitril ile elüe edilmiş S I boyar maddesinin UV-VIS spektrumu



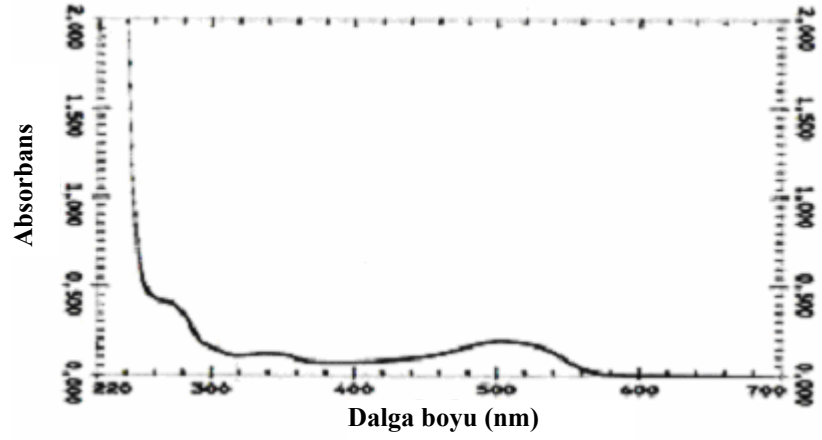
Şekil 4.2.2.2. C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan etil asetat ile elüe edilmiş S I boyar maddesinin UV-VIS spektrumu



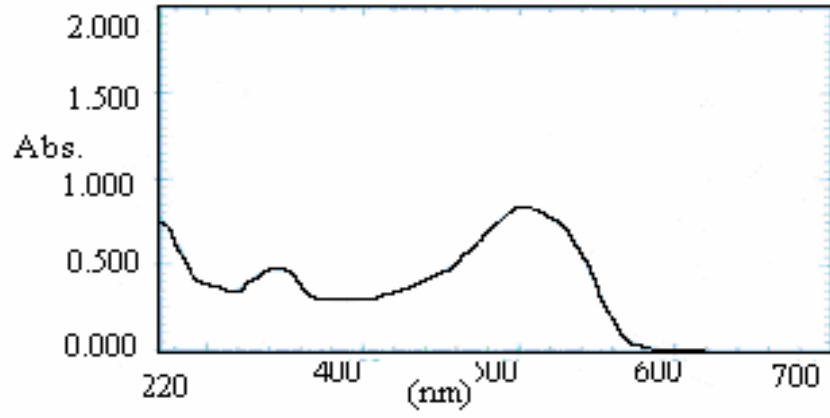
Şekil 4.2.2.3. C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan asetonitril ile elüe edilmiş S II boyar maddesinin UV-VIS spektrumu



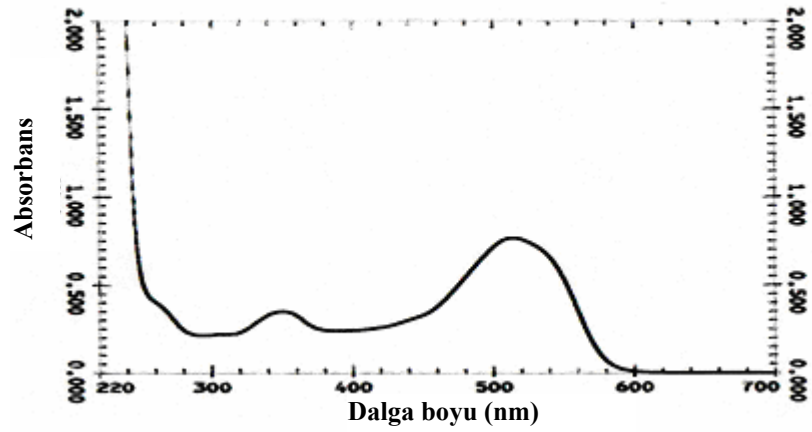
Şekil 4.2.2.4.  $C_{18}$  katı faz ekstraksiyon kolonundan etil asetat ile elüe edilmiş S II boyar maddesinin UV-VIS spektrumu



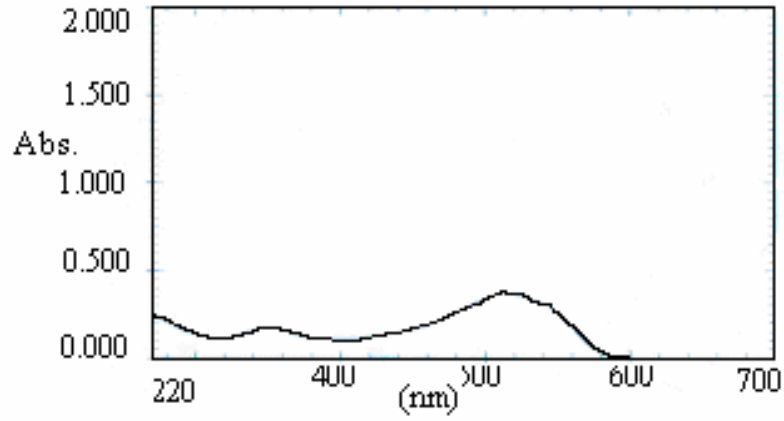
Şekil 4.2.2.5.  $C_{18}$  katı faz ekstraksiyon kolonundan asetonitril ile elüe edilmiş S III boyar maddesinin UV-VIS spektrumu



Şekil 4.2.2.6.  $C_{18}$  katı faz ekstraksiyon kolonundan etil asetat ile elüe edilmiş S III boyar maddesinin UV-VIS spektrumu



Şekil 4.2.2.7.  $C_{18}$  katı faz ekstraksiyon kolonundan asetonitril ile elüe edilmiş S IV boyar maddesinin UV-VIS spektrumu



**Şekil 4.2.2.8.** C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan etil asetat ile elüe edilmiş S IV boyar maddesinin UV-VIS spektrumu

C<sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kolonundan metanol ile elüe edilmiş sudan boyar maddelerinin UV-VIS spektrumları Şekil 4.2.1.1., 4.2.1.5., 4.2.1.9., 4.2.1.13.'te görülmektedir.

Standart çözeltilerin absorbans değerleri ile katı faz ekstraksiyonu uygulanmış ve belirtilen elüsyon çözücüleri ile elüe edilmiş örnek çözeltilerinin UV-VIS spektrumlarından elde edilen absorbans değerleri Çizelge 4.2.2.1'de verilmiştir. Çizelgedeki veriler karşılaştırıldığında, standart çözeltilere en yakın absorbans değerleri tespit edildiğinden orta polaritedeki etil asetatın genel olarak en uygun elüsyon çözücüsü olduğuna karar verilmiştir. Bununla birlikte çözünürlük veriminin düşük olması ve Sudan boyları için uygun olabilecek çözücülerin uçuculuklarının sınırlayıcı etken olması nedeni ile katı faz ekstraksiyonu, deriştirme amaçlı olarak gerçek örneklere uygulanmamıştır.



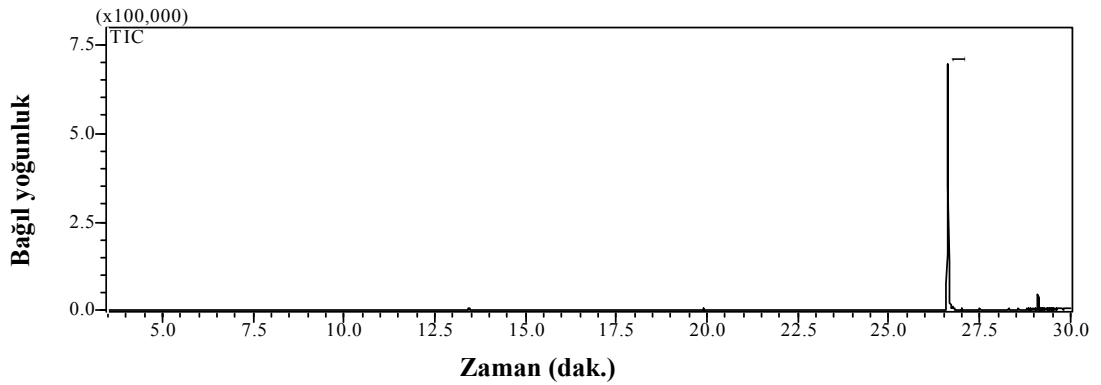
**Çizelge 4.2.2.1.** Sudan boyalarının metanol, asetonitril ve etil asetatteki standart çözeltilerinin UV-VIS absorpsanları ile katı faz ekstraksiyonu sonucu tespit edilen absorpsan değerleri

	Çözücü	Standart çözelti	Kati faz ekstraksiyonu uygulanmış çözelti		Çözücü	Standart çözelti	Kati faz ekstraksiyonu uygulanmış çözelti
S I	Etil asetat	0,389	0,325	S II	Etil asetat	0,383	0,315
	Asetonitril	0,505	0,177		Asetonitril	0,389	0,222
	Metanol	0,588	0,014		Metanol	0,459	0,013
S III	Etil asetat	0,701	0,836	S IV	Etil asetat	1,022	0,367
	Asetonitril	0,761	0,190		Asetonitril	1,009	0,764
	Metanol	0,672	0,016		Metanol	0,692	0,021

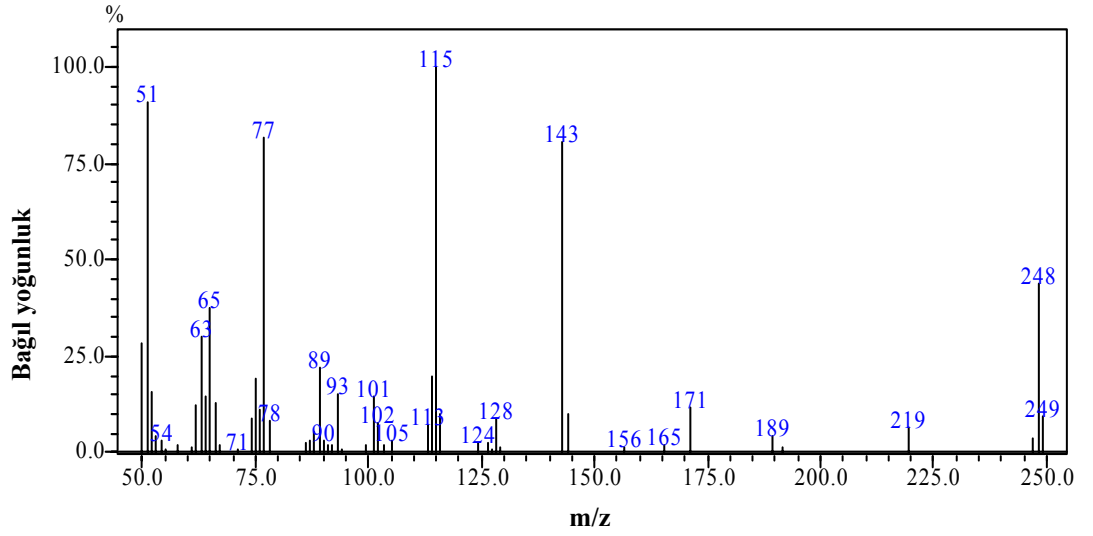
### 4.3. GC-MS İle İlgili Kalitatif Çalışmalar

#### 4.3.1. S I Boyar Maddesinin GC-MS Analizi

500 mg/L konsantrasyonlu S I boyar maddesinin indirgenme işlemi yapılmadan elde edilen kromatogramı ve bu kromatogramda gözlenen pike ait kütle spektrumu Şekil 4.3.1.1. ve Şekil 4.3.1.2.'de verilmiştir.

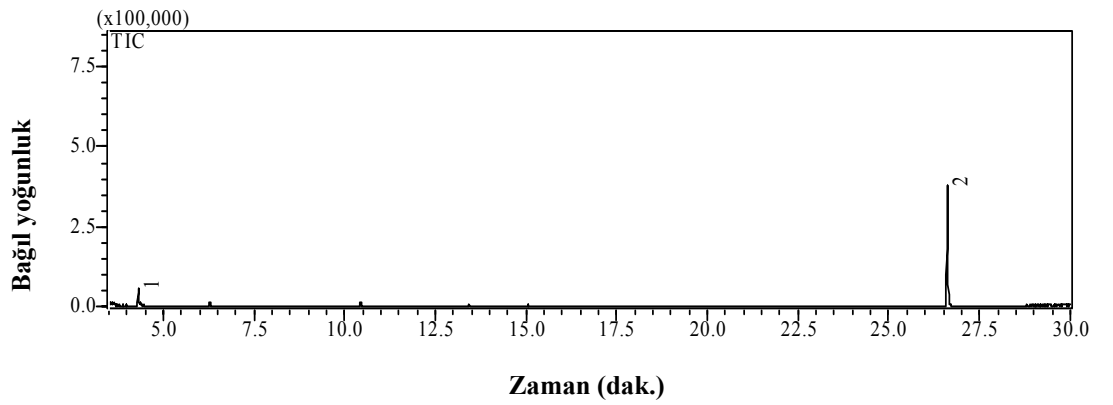


**Şekil 4.3.1.1.** 500 mg/L S I boyar maddesinin GC-MS kromatogramı

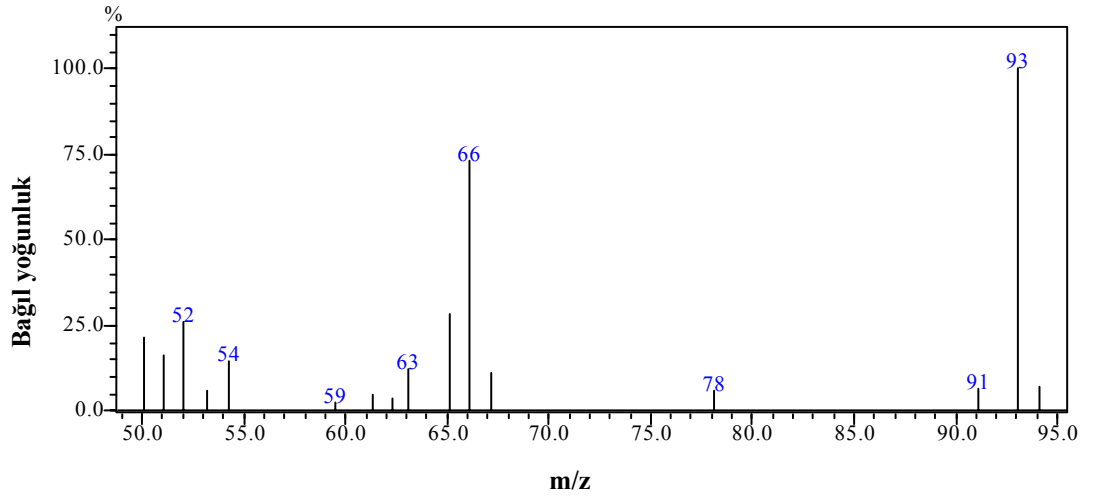


**Şekil 4.3.1.2.** 500 mg/L S I boyar maddesinin kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu

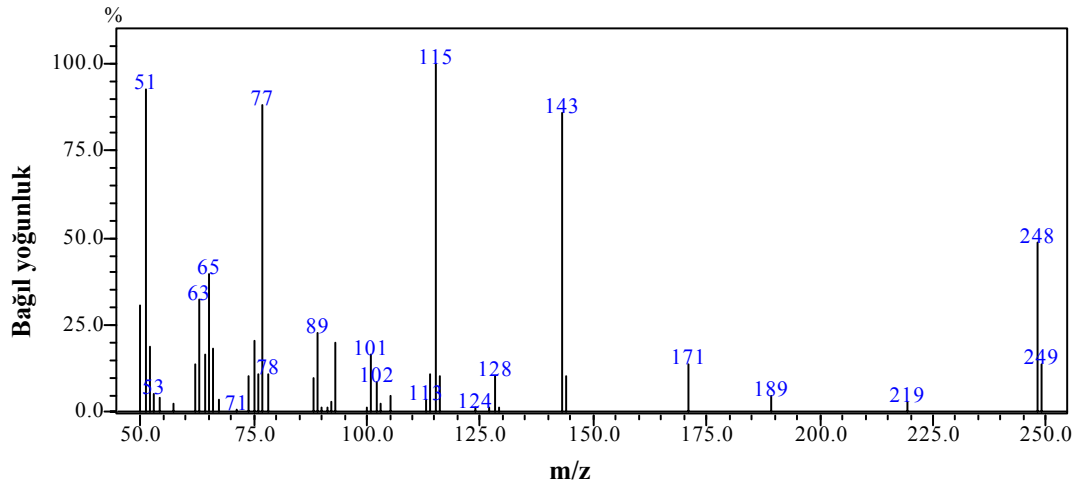
Aynı şartlar altında; 500 mg/L konsantrasyonlu S I boyar maddesinin kimyasal indirgeme işlemi uygulandıktan sonra elde edilen kromatogramı ve bu kromatogramda gözlenen piklere ait kütle spektrumları Şekil 4.3.1.3., Şekil 4.3.1.4. ve Şekil 4.3.1.5.'te verilmiştir.



**Şekil 4.3.1.3.** İndirgeme işlemi uygulanmış 500 mg/L S I için GC-MS kromatogramı

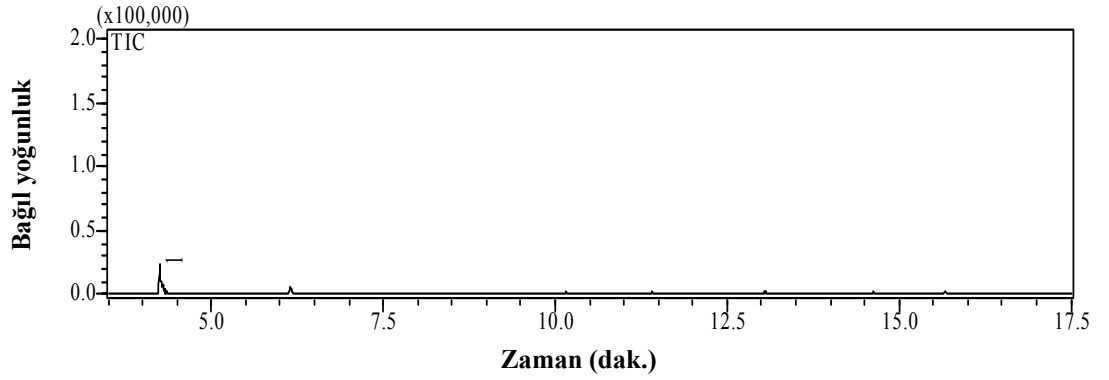


**Şekil 4.3.1.4.** İndirgeme işlemi uygulanmış 500 mg/L S I boyar maddesinin kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu

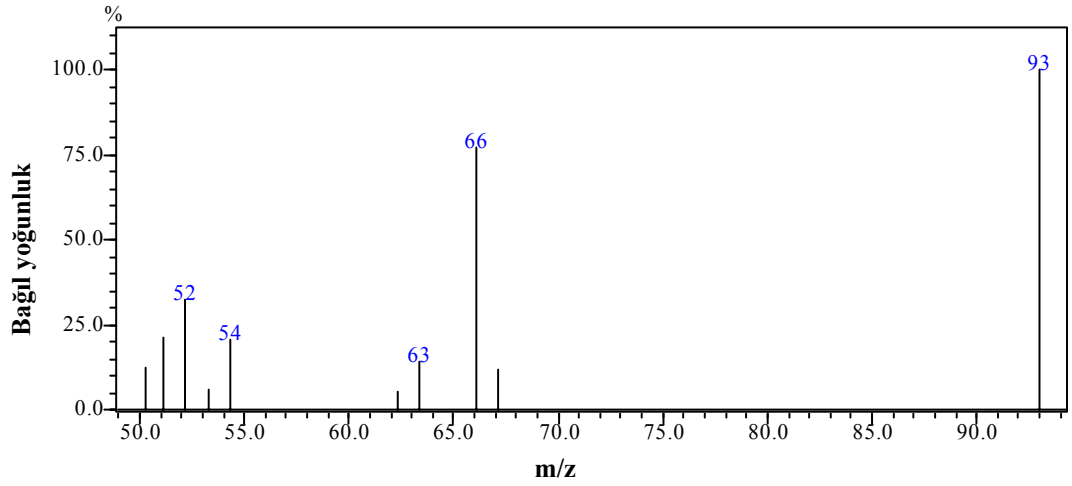


**Şekil 4.3.1.5.** İndirgeme işlemi uygulanmış 500 mg/L S I boyar maddesinin kromatogramındaki 2 numaralı pike ait kütle spektrumu

Şekil 4.3.1.3.'teki kromatogram  $m/z=50-100$  aralığında tarandığında Şekil 4.3.1.6.'daki kromatogram ve Şekil 4.3.1.7.'deki spektrum elde edilmektedir.

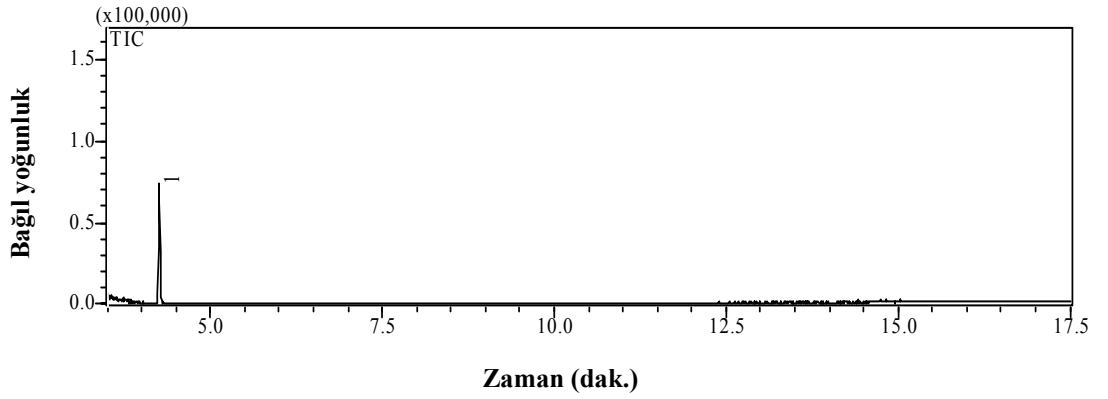


**Şekil 4.3.1.6.** İndirgeme işlemi uygulanmış 500 mg/L S I için  $m/z=50-100$  aralığında elde edilen GC-MS kromatogramı

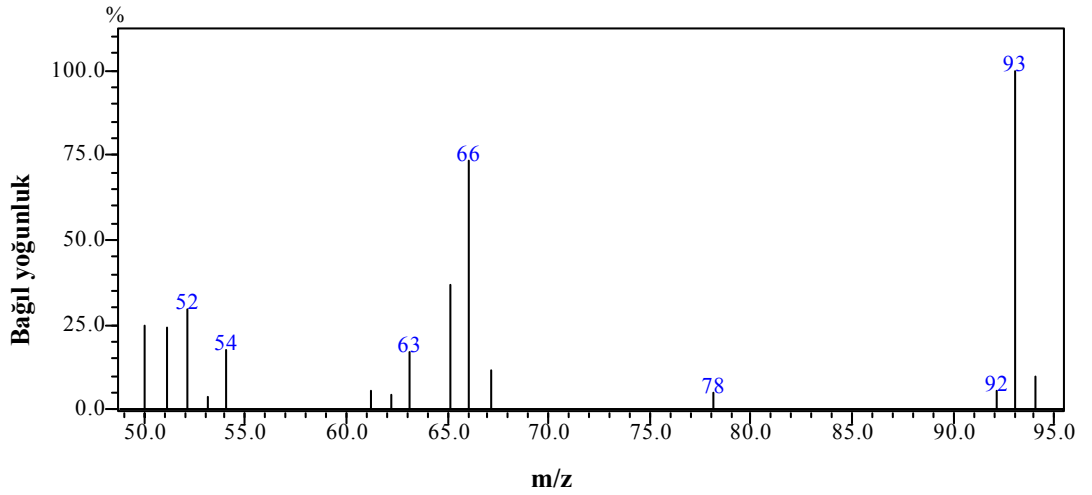


**Şekil 4.3.1.7.** İndirgeme işlemi uygulanmış 500 mg/L S I boyar maddesinin  $m/z=50-100$  tarama aralığında elde edilen kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu

Metanolde hazırlanmış standart anilin çözeltisi ile çalışıldığında elde edilen GC-MS kromatogramı ve kromatogramdaki pike ait kütle spektrumu Şekil 4.3.1.8. ve Şekil 4.3.1.9.'da verilmiştir.



Şekil 4.3.1.8. 102 mg/L anilin için GC-MS kromatogramı

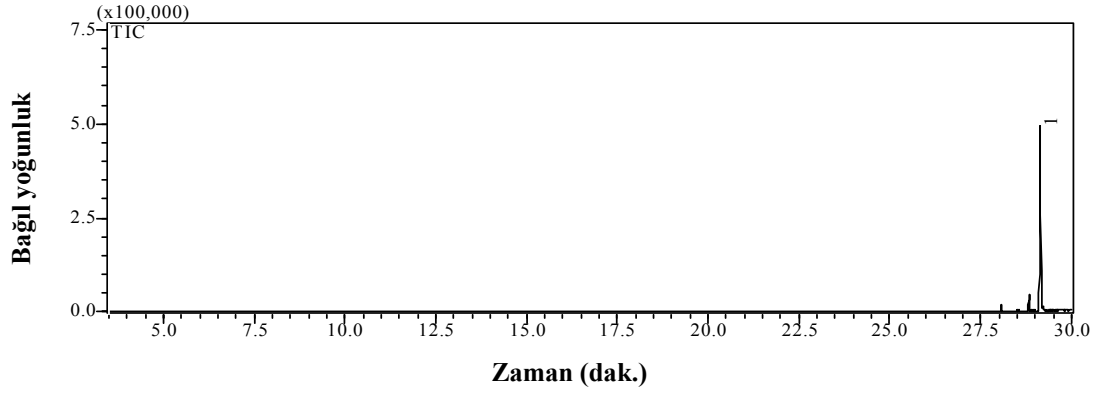


Şekil 4.3.1.9. 102 mg/L aniline ait kromatogramdaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu

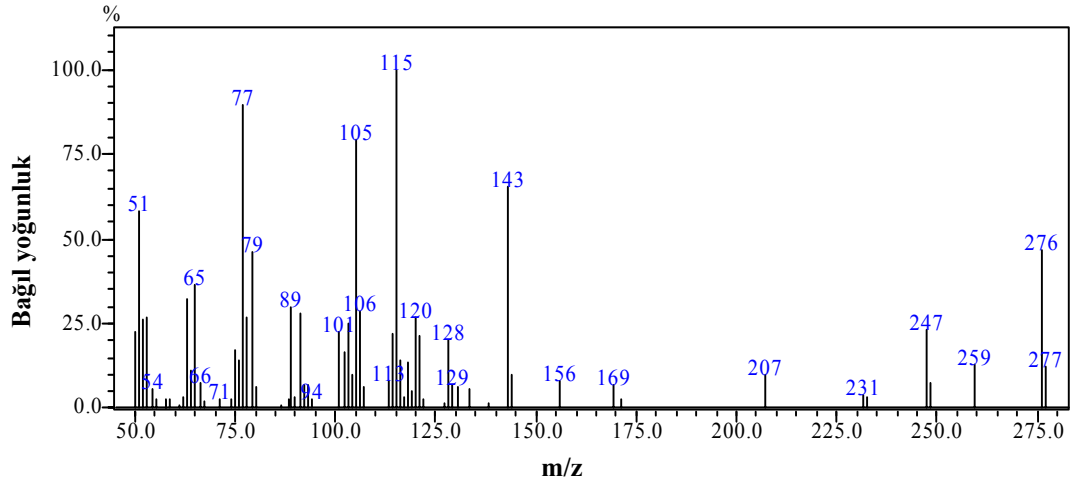
Anilin standardı ile çalışıldığında elde edilen kütle spektrumundan aniline özgü karakteristik m/z değerleri belirlenmiştir. Bu spektrum, S I boyar maddesinin parçalanma ürünlerinden biri olan ve indirgeme işlemi uygulanmış boyar madde kromatogramında görülen anilinin yapısını doğrulayıcı niteliktedir.

#### 4.3.2. S II Boyar Maddesinin GC-MS Analizi

500 mg/L konsantrasyonlu S II boyar maddesinin indirgeme işlemi yapılmadan elde edilen kromatogramı ve bu kromatogramda gözlenen pike ait kütle spektrumu Şekil 4.3.2.1. ve Şekil 4.3.2 .2.'de verilmiştir.

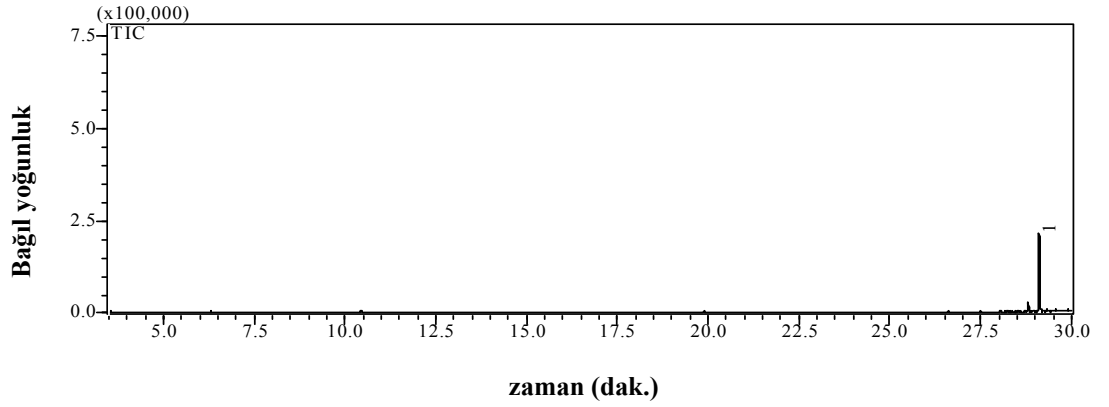


Şekil 4.3.2.1. 500 mg/L S II boyar maddesinin kromatogramı

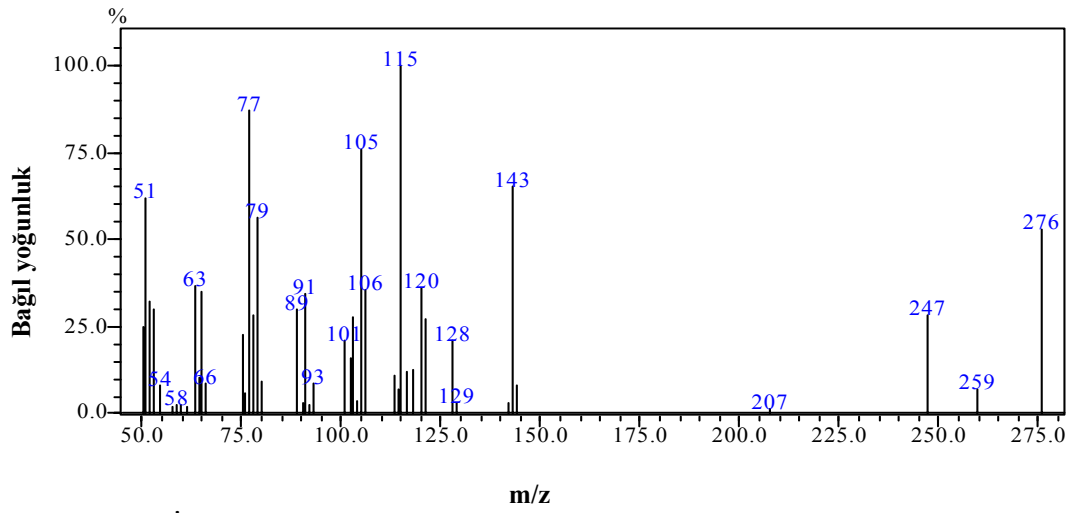


Şekil 4.3.2.2. 500 mg/L S II boyar maddesinin kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu

500 mg/L konsantrasyonlu ve kimyasal indirgeme işlemi uygulanmış S II boyar maddesinin kromatogramı ve bu kromatogramda gözlenen piklere ait kütle spektrumları Şekil 4.3.2.3. ve Şekil 4.3.2.4.'te verilmiştir.

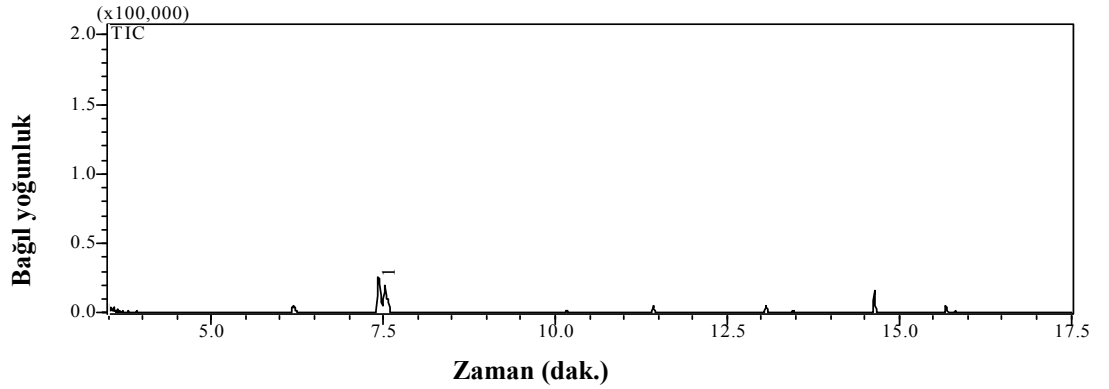


Şekil 4.3.2.3. Kimyasal indirgeme işlemi uygulanmış 500 mg/L S II boyar maddesinin kromatogramı

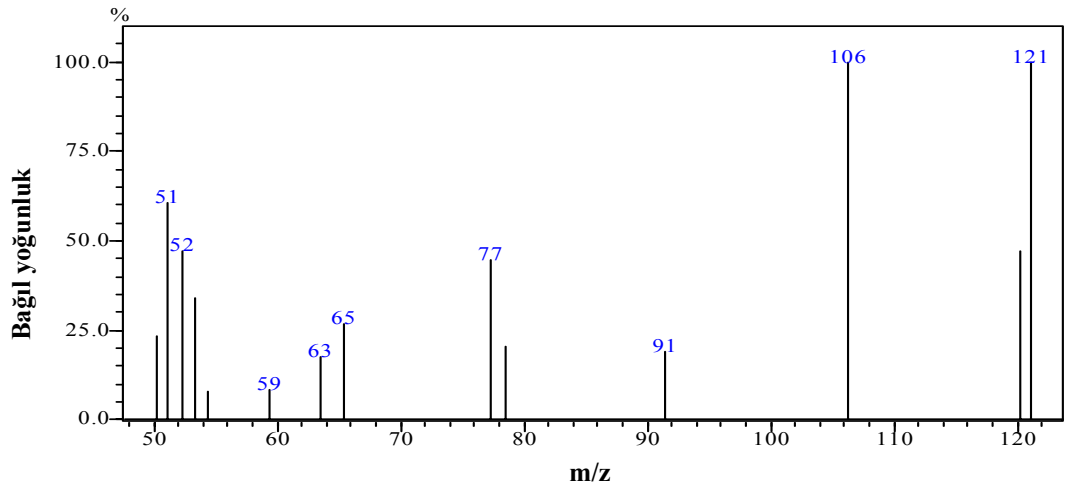


Şekil 4.3.2.4. İndirgeme işlemi uygulanmış 500 mg/L S II boyar maddesinin kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu

Şekil 4.3.2.3.'teki kromatogram  $m/z=50-130$  aralığında tarandığında Şekil 4.3.2.5.'teki kromatogram ve Şekil 4.3.2.6.'daki spektrum elde edilmektedir.



**Şekil 4.3.2.5.** İndirgeme işlemi uygulanmış 500 mg/L S II boyar maddesinin  $m/z=50-130$  aralığında elde edilen GC-MS kromatogramı



**Şekil 4.3.2.6.** İndirgeme işlemi uygulanmış 500 mg/L S II boyar maddesinin  $m/z=50-130$  aralığında elde edilen GC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu

S I ve S II boyar maddelerinin kromatogramları ve kütle spektrumları incelendiğinde işlem görmemiş boya kromatogramındaki 1 numaralı pikin ilgili boyanın moleküler iyon pikine karşı geldiği; işlem görmüş boya kromatogramındaki piklerin moleküler iyon pikine ve boyanın parçalanma ürünlerine ait olduğu kütle spektrumlarından anlaşılmıştır. Kromatogramlardan elde edilen sayısal veriler Çizelge 4.3.2.1.'de verilmiştir.



**Çizelge 4.3.2.1.** İndirgeme işlemi yapılmadan ve kimyasal indirgeme işlemi uygulandıktan sonra S I ve S II boyar maddelerinin kromatogramlarında görülen moleküler iyon piklerine ait pik alanları

Boyar madde	Kromatogram	Moleküler iyon piki		Alan azalma yüzdesi
		Alıkonma zamanı (dak.)	Pik alanı	
S I	*Şekil 4.3.1.1.	26,628	1452617	%50,00
	**Şekil 4.3.1.3.	26,617	740845	
S II	*Şekil 4.3.2.1.	29,144	983480	%51,77
	**Şekil 4.3.2.3.	29,111	474273	

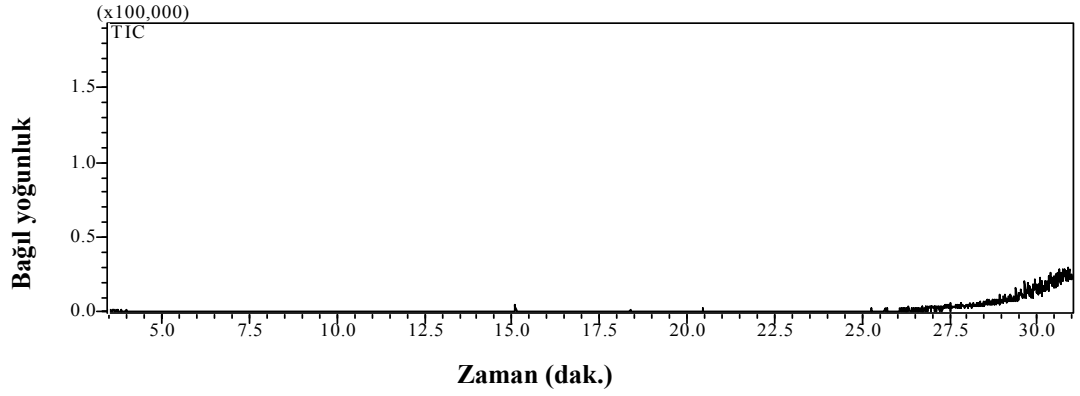
\*= İndirgeme işlemi yapılmadan elde edilen kromatogram

\*\*= İndirgeme işlemi yapıldıktan sonra elde edilen kromatogram

Kimyasal indirgeme işlemi yapılmış S I ve S II boyar maddelerinin kromatogramlarında gözlenen moleküler iyon pikleri, aynı konsantrasyondaki standart S I ve S II boyar maddeleri ile karşılaştırıldığında ilgili boyaların bir kısmının parçalanmamış olduğu söylenebilir. Bu parçalanma sayısal olarak değerlendirilecek olursa S I'in %50'si parçalanmaya uğrarken; S II boyar maddesi için bu oran %51,77 olarak tespit edilmiştir. S I ve S II boyalarının kütle spektrumları incelendiğinde parçalanma ürünlerinin sırası ile anilin ve 2,4-ksilidin olduğu görülmektedir.

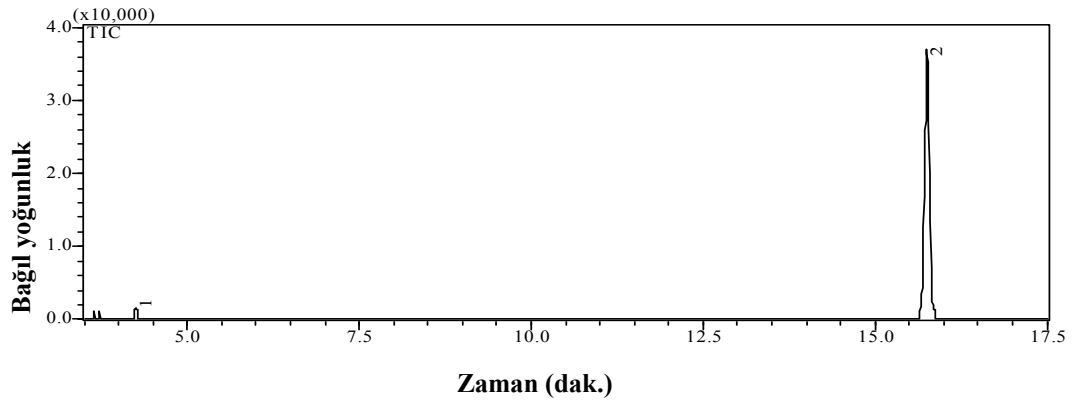
#### 4.3.3. S III Boyar Maddesinin GC-MS Analizi

600 mg/L konsantrasyonlu sudan III boyar maddelerinin indirgeme işlemi yapılmadan ve indirgeme işlemi yapıldıktan sonra elde edilen kromatogramları Şekil 4.3.3.1. ve Şekil 4.3.3.2.'de verilmiştir.

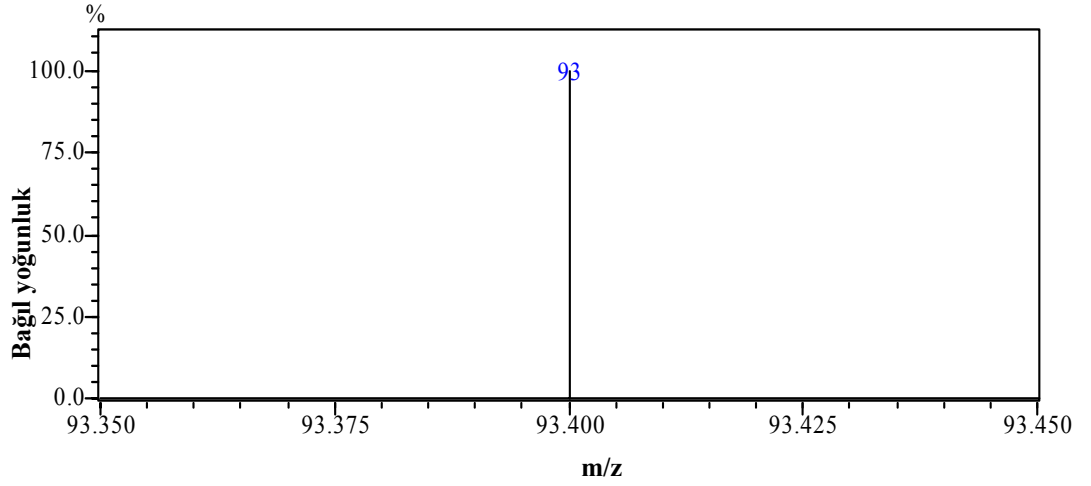


**Şekil 4.3.3.1.** 600 mg/L S III boyar maddesinin GC-MS kromatogramı

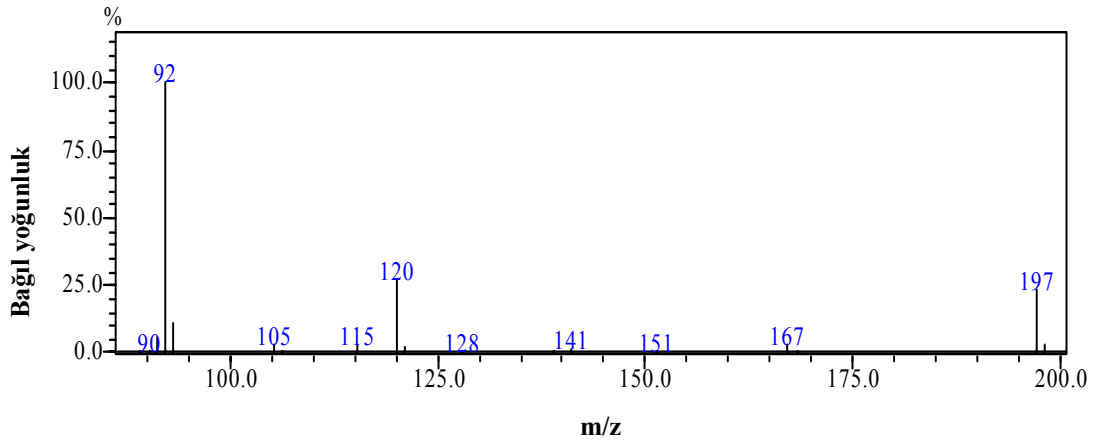
600 mg/L konsantrasyonlu ve kimyasal indirgeme işlemi uygulanmış sudan III boyar maddesinin  $m/z=85-215$  aralığındaki kromatogramı ve bu kromatogramda gözlenen piklere ait kütle spektrumları Şekil 4.3.3.2., Şekil 4.3.3.3. ve Şekil 4.3.3.4'te verilmiştir.



**Şekil 4.3.3.2.** İndirgeme işlemi uygulanmış 600 mg/L S III boyar maddesinin GC-MS kromatogramı

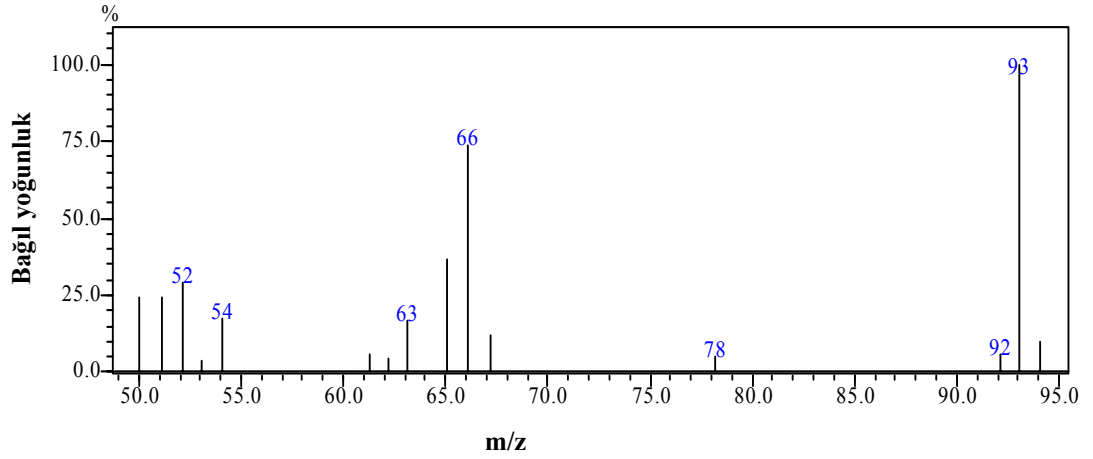


**Şekil 4.3.3.3.** İndirgeme işlemi uygulanmış 600 mg/L S III boyar maddesinin GC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu

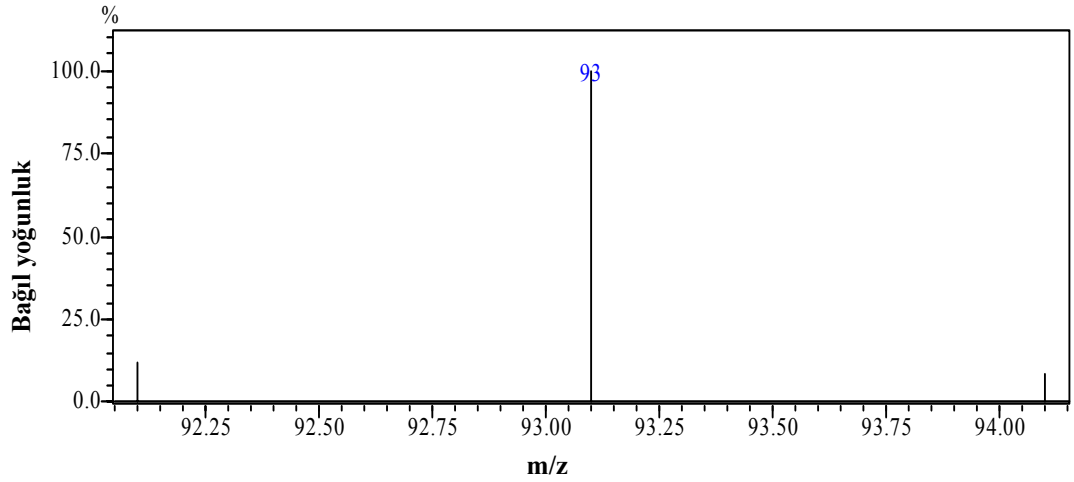


**Şekil 4.3.3.4.** İndirgeme işlemi uygulanmış 600 mg/L S III boyar maddesinin GC-MS kromatogramındaki 2 numaralı pike ait kütle spektrumu

102 mg/L standart anilin çözeltisinin  $m/z=50-100$  ve  $m/z=85-215$  tarama aralıklarında elde edilen kütle spektrumları Şekil 4.3.3.5. ve Şekil 4.3.3.6.'da verilmiştir.



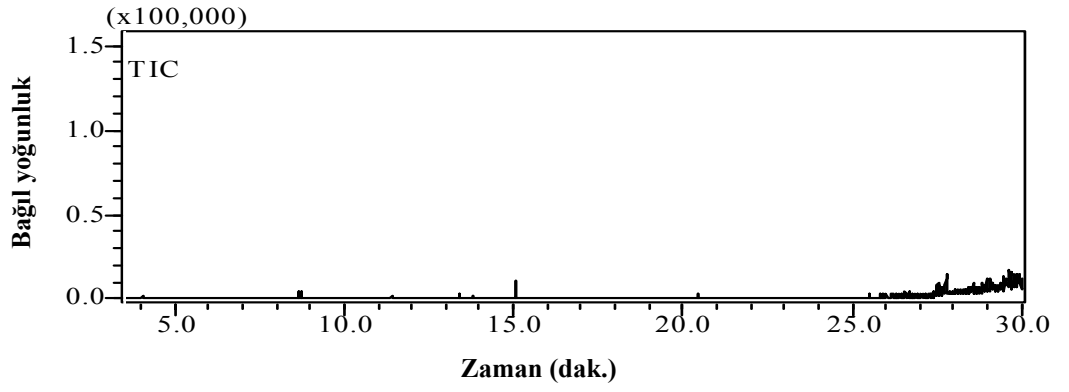
Şekil 4.3.3.5. 102 mg/L anilin için  $m/z=50-100$  aralığında elde edilen kütle spektrumu



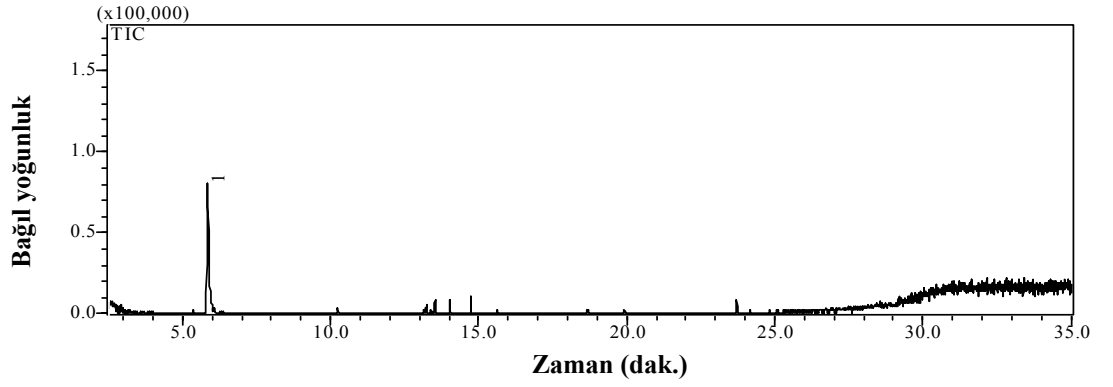
Şekil 4.3.3.6. 102 mg/L anilin için  $m/z=85-215$  aralığında elde edilen kütle spektrumu

#### 4.3.4. S IV Boyar Maddesinin GC-MS Analizi

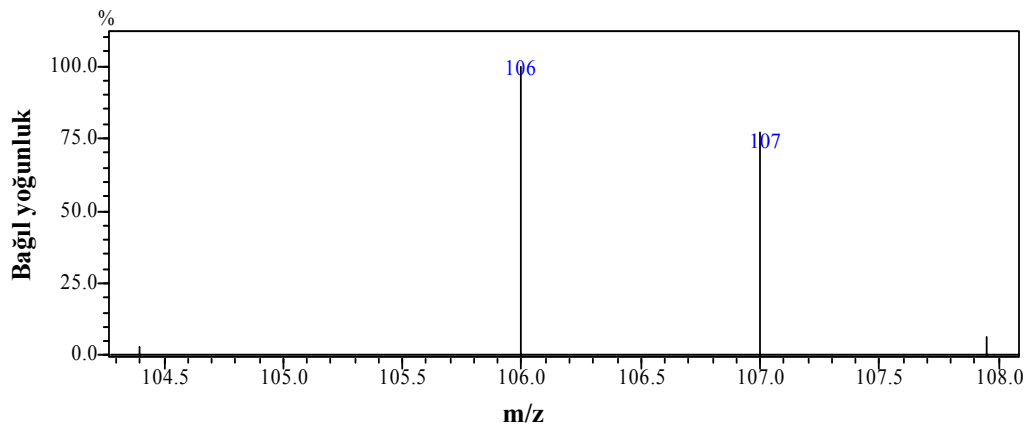
1000 mg/L konsantrasyonlu standart boya çözeltisi ile yine aynı konsantrasyonda ve kimyasal indirgeme işlemi uygulanmış S IV boyar maddesinin  $m/z=103-245$  aralığındaki kromatogramı ve bu kromatogramda gözlenen pike ait kütle spektrumu Şekil 4.3.4.1., Şekil 4.3.4.2. ve Şekil 4.3.4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.3.4.1. 1000 mg/L S IV boyar maddesinin GC-MS kromatogramı



Şekil 4.3.4.2. İndirgeme işlemi uygulanmış 1000 mg/L S IV boyar maddesinin GC-MS kromatogramı

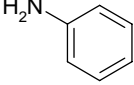
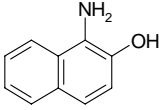


Şekil 4.3.4.3. İndirgeme işlemi uygulanmış 1000 mg/L S IV boyar maddesinin kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu

S III ve S IV boyar maddelerinin kaynama noktaları GC-MS analizine uygun olmadığı için, işlem görmemiş halleri için elde edilen kromatogramlarında, beklenildiği gibi, bu boyaları temsil eden pik veya pikler gözlenmemiştir. Bu nedenle sadece parçalanma ürünleri üzerinden karakterizasyon yapılabileceği tespit edilmiştir. Kimyasal indirgeme işlemi uygulandığında S III ve S IV için belirlenen parçalanma ürünleri sırası ile anilin ve o-toluidindir. Ayrıca S III boyar maddesinin kromatogramında gözlenen  $m/z=197$  piki de S III' ün, S I boyar maddesinden farklı karakteristik bir parçalanma ürününü temsil etmektedir. Bu parçalanma ürününün molekül kütlesi 197 g/mol değerindedir ve Çizelge 4.3.4.3.' te görülmektedir.

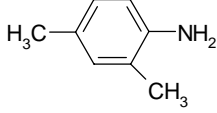
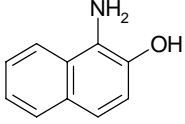
S I, S II, S III, S IV boyar maddelerinin teorik ve deneysel parçalanma ürünleri Çizelge 4.3.4.1., Çizelge 4.3.4.2., Çizelge 4.3.4.3. ve Çizelge 4.3.4.4.'te gösterilmiştir.

**Çizelge 4.3.4.1.** S I boyar maddesinin teorik ve deneysel parçalanma ürünleri

	Anilin	1-Amino-2-naftol
<b>Sudan I</b>		
<b>Molekül kütlesi</b>	93 g/mol	159 g/mol
<b>*Kaynama noktası (KN) (°C)</b>	184,1	-
<b>Deneysel tespit</b>	+	-

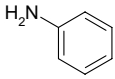
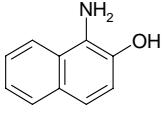
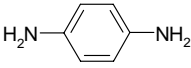
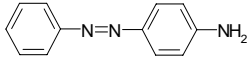
\***KAYNAK:**<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>

**Çizelge 4.3.4.2.** S II boyar maddesinin teorik ve deneysel parçalanma ürünleri

<b>Sudan II</b>	2,4-Ksilidin 	1-Amino-2-naftol 
<b>Molekül kütlesi</b>	121 g/mol	159 g/mol
<b>*KN (°C)</b>	214	-
<b>Deneysel tespit</b>	+	-

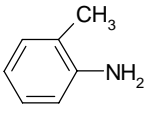
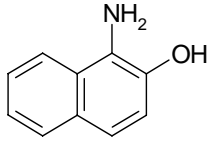
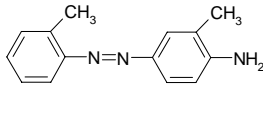
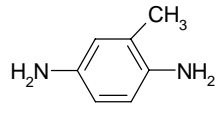
\*KAYNAK: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>

**Çizelge 4.3.4.3.** S III boyar maddesinin teorik ve deneysel parçalanma ürünleri

<b>Sudan III</b>	Anilin 	1-Amino-2-naftol 	1,4-Fenilendiamin 	4-Aminoazobenzen 
<b>Molekül kütlesi</b>	93 g/mol	159 g/mol	108 g/mol	197 g/mol
<b>*KN (°C)</b>	184,1	-	267	-
<b>Deneysel tespit</b>	+	-	-	+

\*KAYNAK: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>

Çizelge 4.3.4.4. S IV boyar maddesinin teorik ve deneysel parçalanma ürünleri

Sudan IV	o-Toluidin	1-Amino-2-naftol	o-Aminoazotoluen	2,5-Diaminotoluen
				
Molekül kütlesi	93 g/mol	159g/mol	197 g/mol	108 g/mol
*KN(°C)	200,3	-	**102	273,5
Deneysel tespit	+	-	-	-

\*KN= Kaynama Noktası (°C)

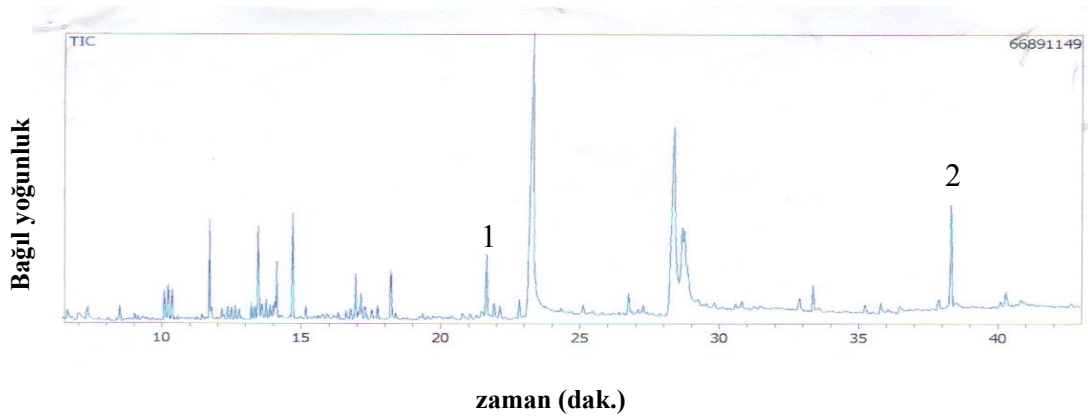
\*\* = Erime Noktası (°C)

KAYNAK: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>

Kaynama noktaları yüksek olan parçalanma ürünleri gözlenmezken; tam gerçekleşmeyen ya da daha ileri düzeyde gerçekleşebilecek olan parçalanma, teorik ve deneysel olarak belirlenen parçalanma ürünleri arasında farklılık oluşturabilecektir.

#### 4.3.5. Gerçek Örneklerle Çalışmalar

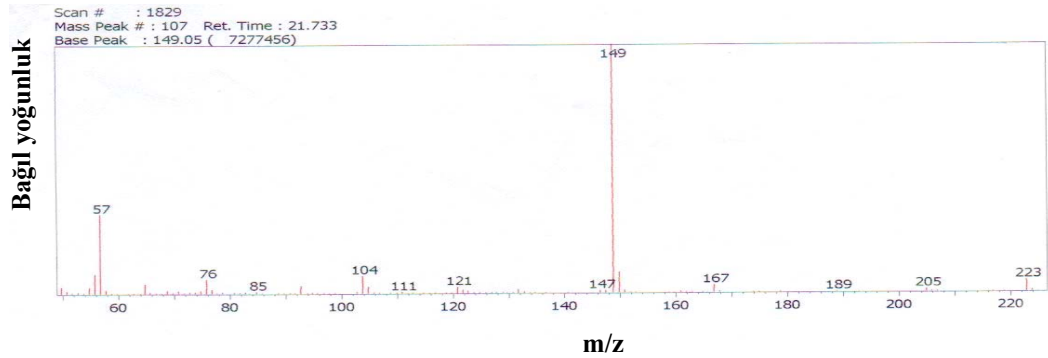
Şekil 3.2.2.6.' da ayrıntıları verilen gerçek örnek çalışması için elde edilen GC-MS kromatogramı Şekil 4.3.5.1.'de verilmiştir.



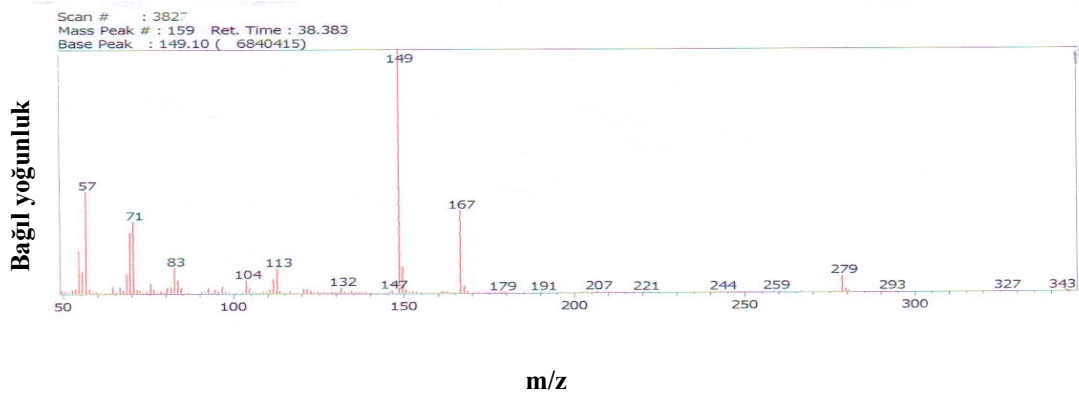
Şekil 4.3.5.1. Biber salçası için kalitatif analiz sonucu elde edilen kromatogram



Şekil 4.3.5.1.'de verilen salça kromatogramında gözlenen 1 ve 2 numaralı piklerin salçayı karakterize ettiği düşünülmüş olup; bunlara ait kütle spektrumları Şekil 4.3.5.2. ve Şekil 4.3.5.3.'te verilmiştir. Kütle spektrumlarına dayalı GC-MS kütüphane karşılaştırma sonuçları, 1,2-benzendikarboksilli asit bis(2-metilpropil) ester; ftalik asit dibütil ester; 1,2-benzendikarboksilli asit diizooktil ester; bis(2-etilhekzil) ftalat; m-nitro ftalik asit gibi yapıları işaret ettiğinden kromatogramdaki bu piklerin, biber yapısından gelebilecek  $\alpha$  ve  $\beta$ -karoten, capsanthin gibi karotenoidler (**Meyer 1961**), 2-izobutil-3-metoksipirazin gibi bileşikler ile karışımda kullanılabilir domatesten gelebilecek 3-metilbutanal, metional gibi farklı aroma bileşikleri ve sitrik veya malik asit gibi karboksilli asitlerden (**Belitz ve ark 2004**) kaynaklanabileceği düşünülmüştür.



Şekil 4.3.5.2. Salça kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=21,733$ )

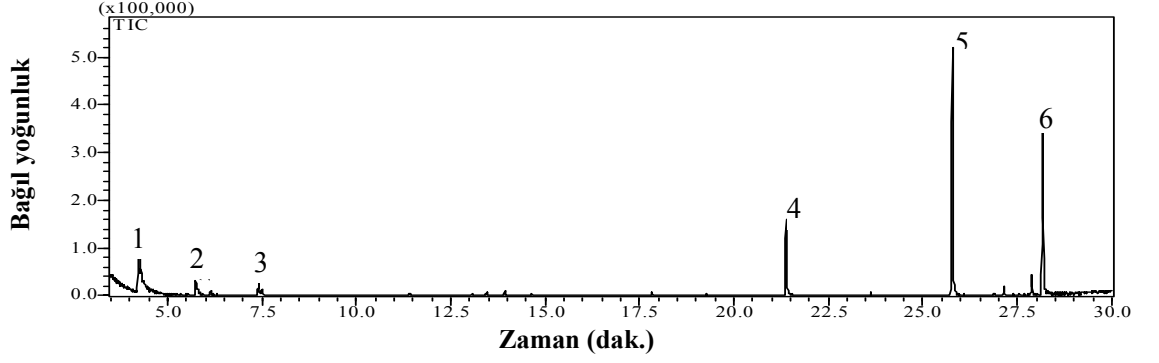


Şekil 4.3.5.3. Salça kromatogramındaki 2 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=38,383$ )

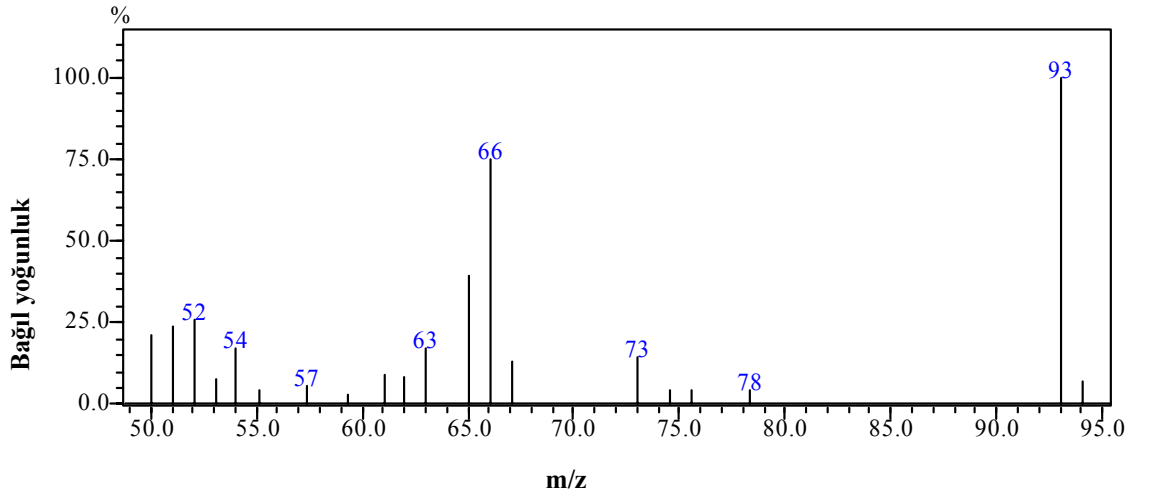
#### 4.3.6. pH=6 Ortamında Karışım Halindeki S I, S II, S III ve S IV Boyar Maddelerinin Kalitatif Analizi

Karışım halindeki sudan boyar maddelerinin Şekil 3.2.2.2.'deki prosedüre göre çalışılması sonucu elde edilen GC-MS kromatogramı ve bu kromatogramdaki piklere ait

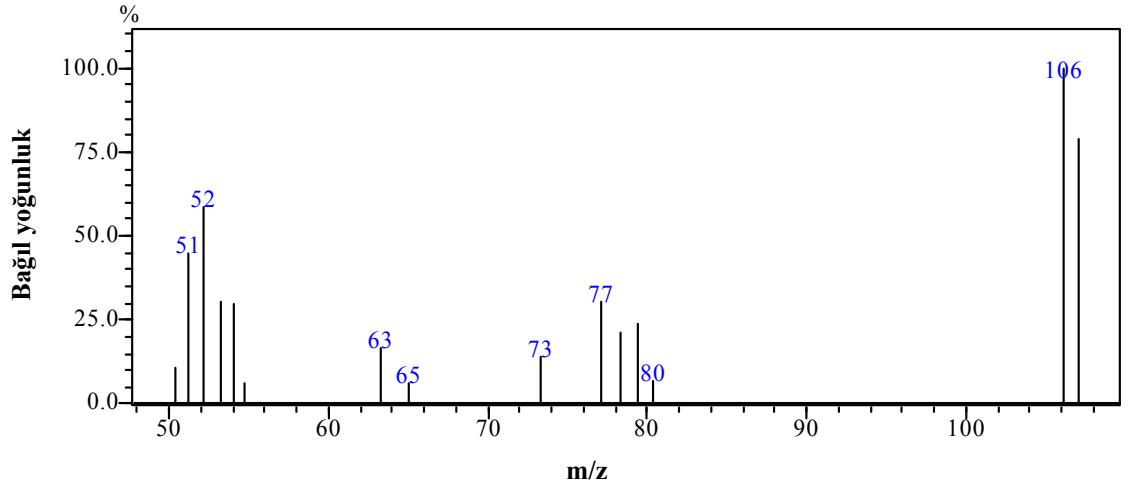
kütle spektrumları Şekil 4.3.6.1., Şekil 4.3.6.2., Şekil 4.3.6.3., Şekil 4.3.6.4., Şekil 4.3.6.5., Şekil 4.3.6.6. ve Şekil 4.3.6.7.' de verilmiştir.



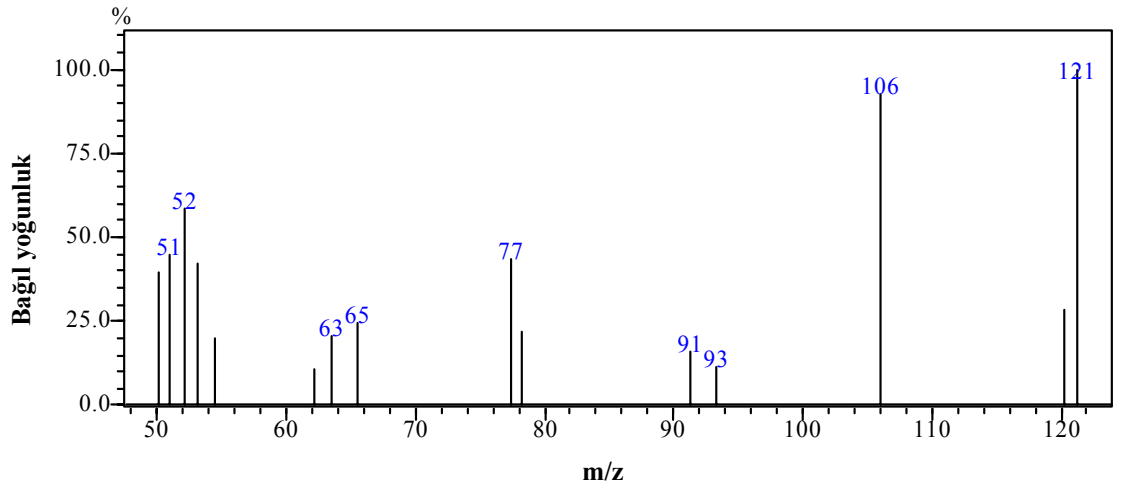
**Şekil 4.3.6.1.** Karışım halindeki sudan boyar maddelerine indirgenme işlemi uygulandığında elde edilen kromatogram



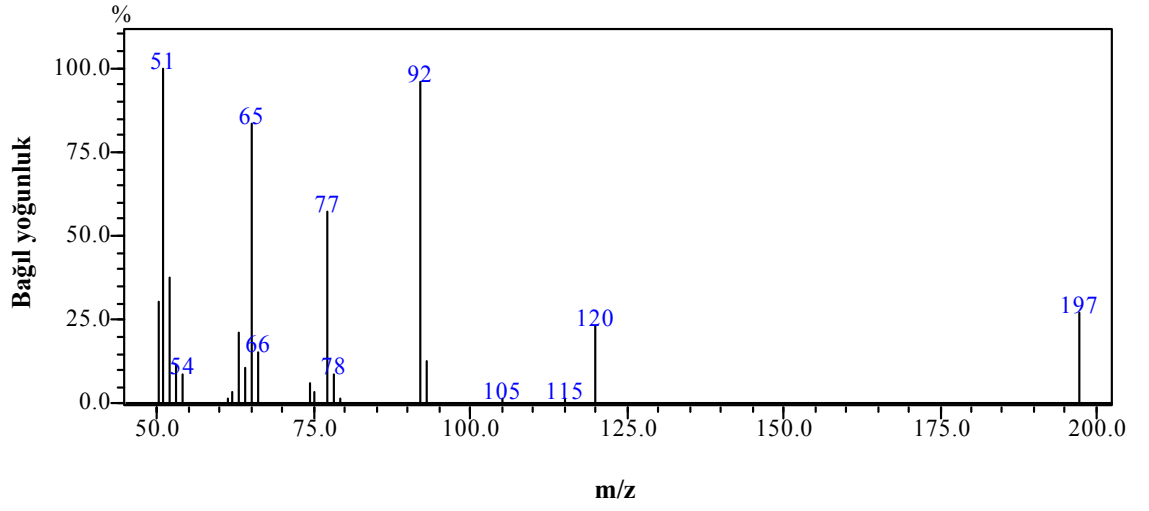
**Şekil 4.3.6.2.** Sudan boyaları karışımı için elde edilen kromatogramdaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu



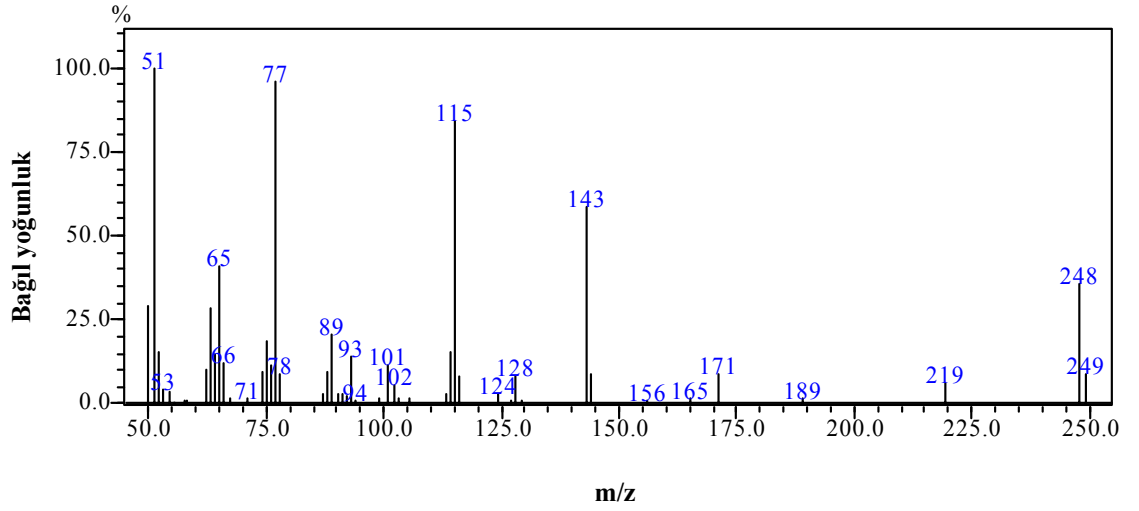
**Şekil 4.3.6.3.** Sudan boyaları karışımı için elde edilen kromatogramdaki 2 numaralı pike ait kütle spektrumu



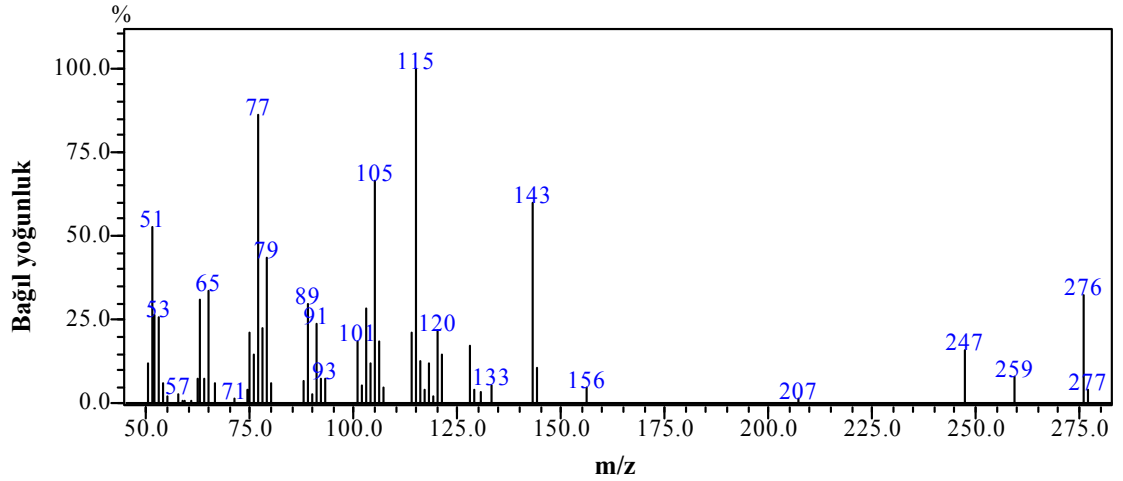
**Şekil 4.3.6.4.** Sudan boyaları karışımı için elde edilen kromatogramdaki 3 numaralı pike ait kütle spektrumu



Şekil 4.3.6.5. Sudan boyaları karışımı için elde edilen kromatogramdaki 4 numaralı pike ait kütle spektrumu



Şekil 4.3.6.6. Sudan boyaları karışımı için elde edilen kromatogramdaki 5 numaralı pike ait kütle spektrumu



**Şekil 4.3.6.7.** Sudan boyaları karışımı için elde edilen kromatogramdaki 6 numaralı pike ait kütle spektrumu

Kromatogramlar ve parçalanma ürünlerine ait değerlendirme Çizelge 4.3.6.1.'de özetlenmektedir.

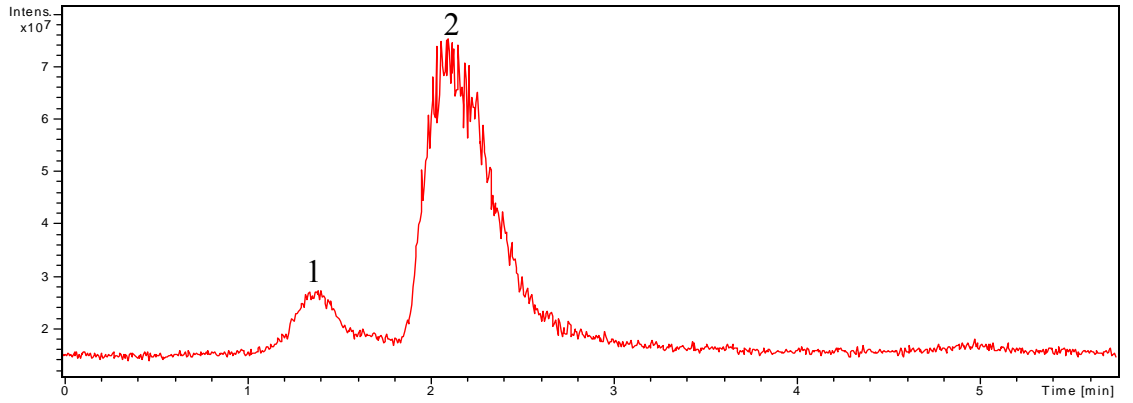
**Çizelge 4.3.6.1.** Karışım halindeki sudan boyalarının kromatogramlarındaki piklerin karşılaştırılması

Boyar madde	Kromatogramdaki pik numarası	m/z değeri	Parçalanma ürünü
S I	1	93	Anilin
	5	249	S I (Parçalanmayan kısım)
S II	3	121	2,4-Ksilidin
	6	277	S II (Parçalanmayan kısım)
S III	1	93	Anilin
	4	197	4-Aminoazobenzen
S IV	2	106	o-Toluidin

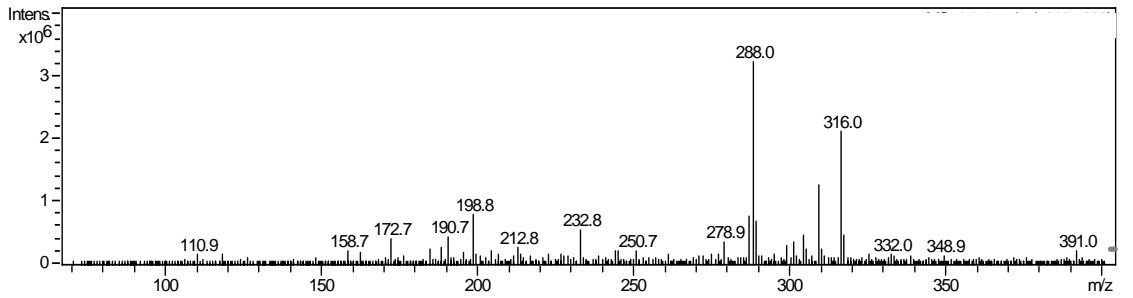
Kromatogramda gözlenen piklerin kütle spektrumları değerlendirildiğinde her bir boyayı temsil eden ve Çizelge 4.3.4.1.-Çizelge 4.3.4.4.' te belirtilen bir parçalanma ürününün bulunması S I, II, III ve IV boyar maddelerinin eş zamanlı tayinlerinin mümkün olduğunu göstermektedir.

#### 4.4. LC-MS İle İlgili Kalitatif Çalışmalar

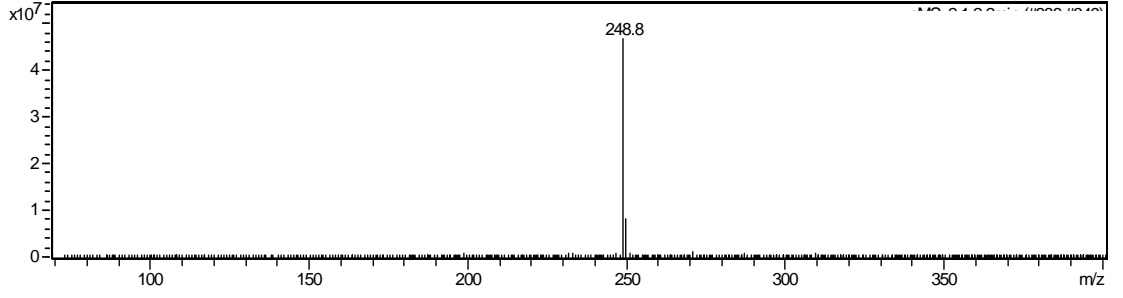
Sudan boyar maddeleri için, standart boyar madde ve gerçek örnek çalışması ile elde edilen LC-MS kromatogramları ve kromatogramlarda gözlenen piklere ait kütle spektrumları Şekil 4.4.1.-Şekil 4.4.17’de verilmiştir.



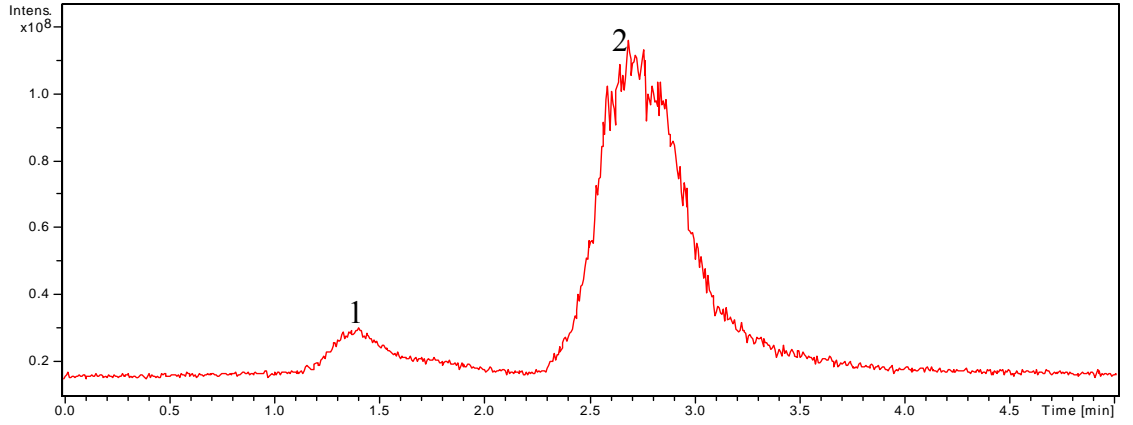
Şekil 4.4.1. 20 mg/L S I boyar maddesinin LC-MS kromatogramı



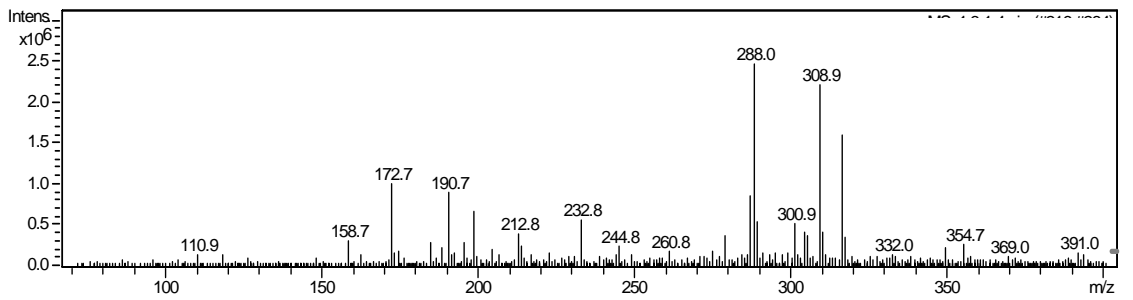
Şekil 4.4.2. 20 mg/L S I boyar maddesinin LC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,4$  dak.)



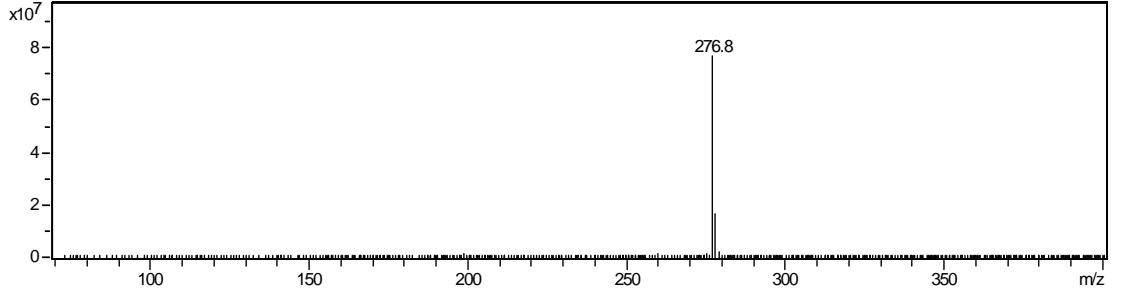
**Şekil 4.4.3.** 20 mg/L S I boyar maddesinin LC-MS kromatogramında S I' i karakterize eden 2 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=2,15$  dak.)



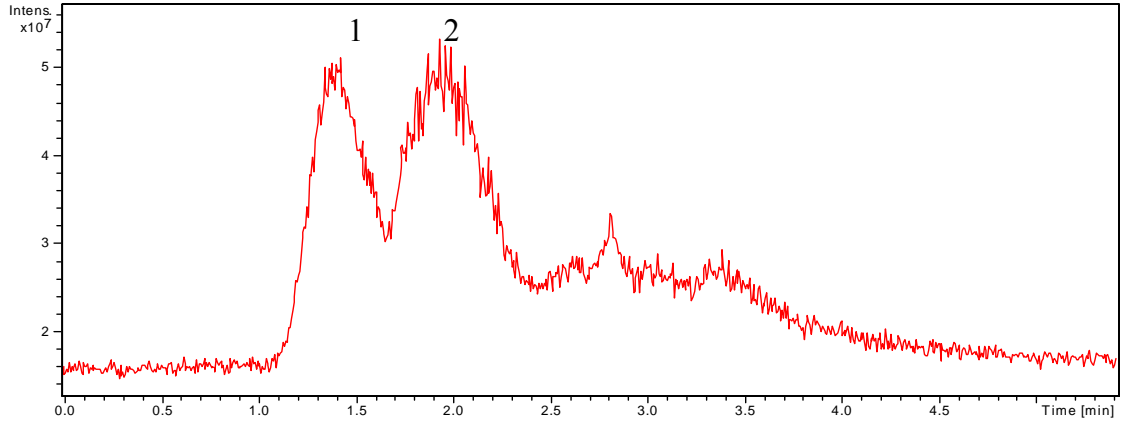
**Şekil 4.4.4.** 20 mg/L S II boyar maddesinin LC-MS kromatogramı



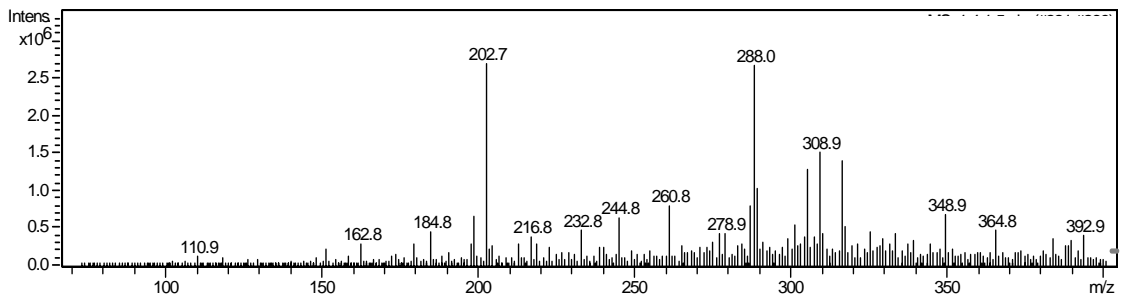
**Şekil 4.4.5.** 20 mg/L S II boyar maddesinin LC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,35$  dak.)



**Şekil 4.4.6.** 20 mg/L S II boyar maddesinin LC-MS kromatogramında S II'yi karakterize eden 2 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=2,7$  dak.)

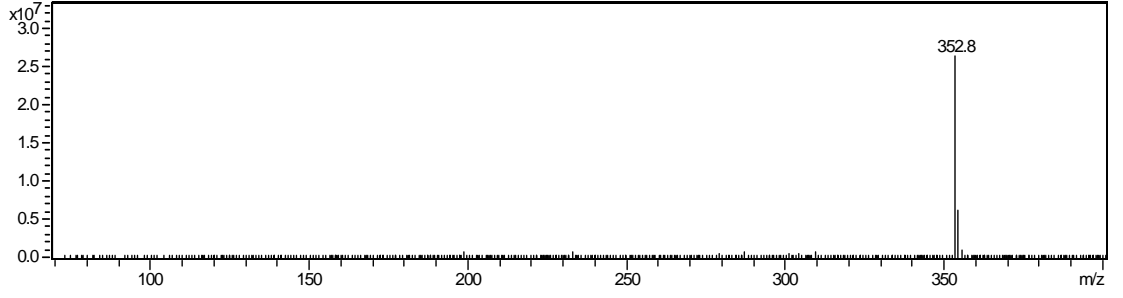


**Şekil 4.4.7.** 20 mg/L S III boyar maddesinin LC-MS kromatogramı

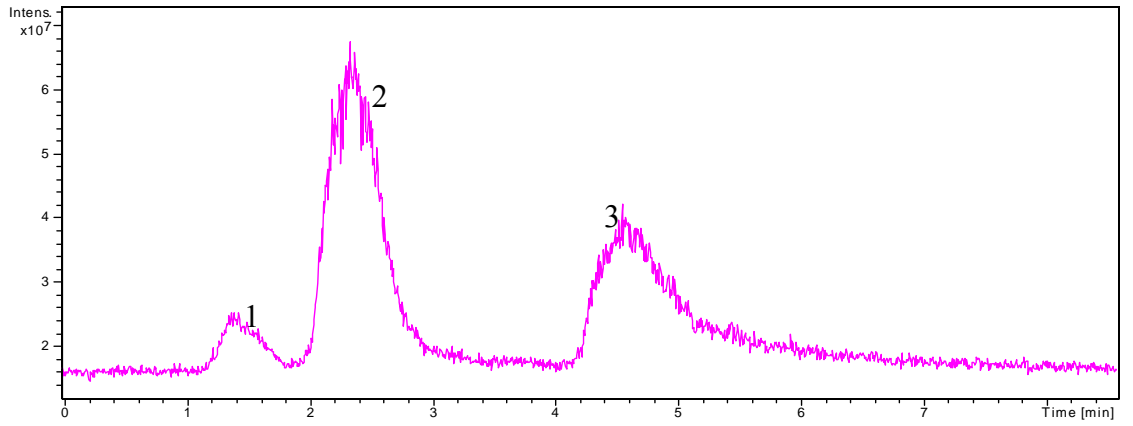


**Şekil 4.4.8.** 20 mg/L S III boyar maddesinin LC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,45$  dak.)

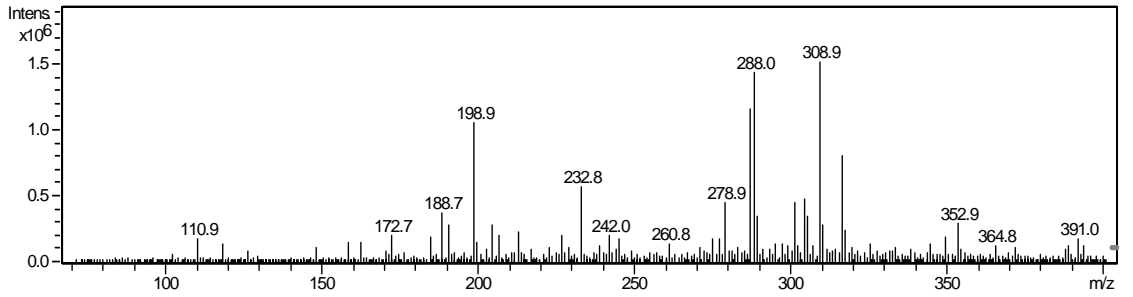




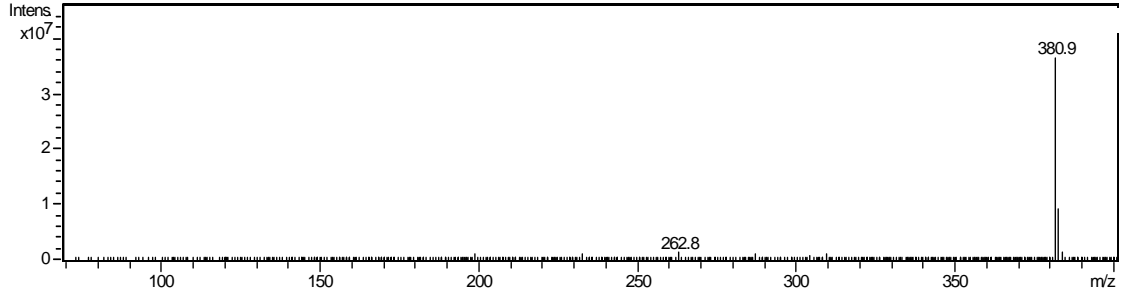
**Şekil 4.4.9.** 20 mg/L S III boyar maddesinin LC-MS kromatogramında S III'ü karakterize eden 2 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,95$  dak.)



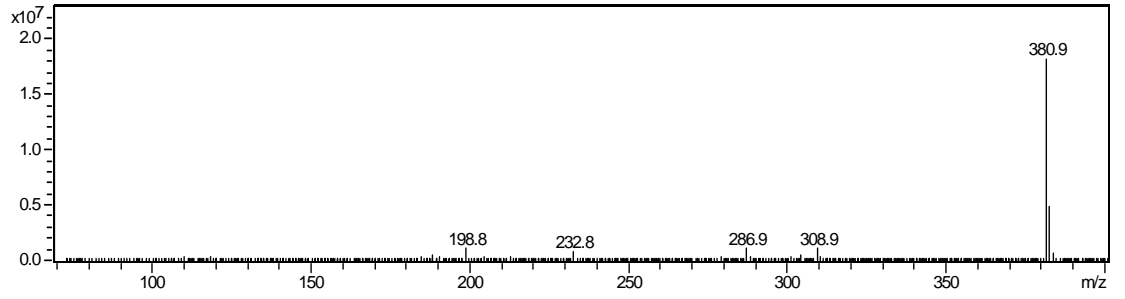
**Şekil 4.4.10.** 20 mg/L S IV boyar maddesinin LC-MS kromatogramı



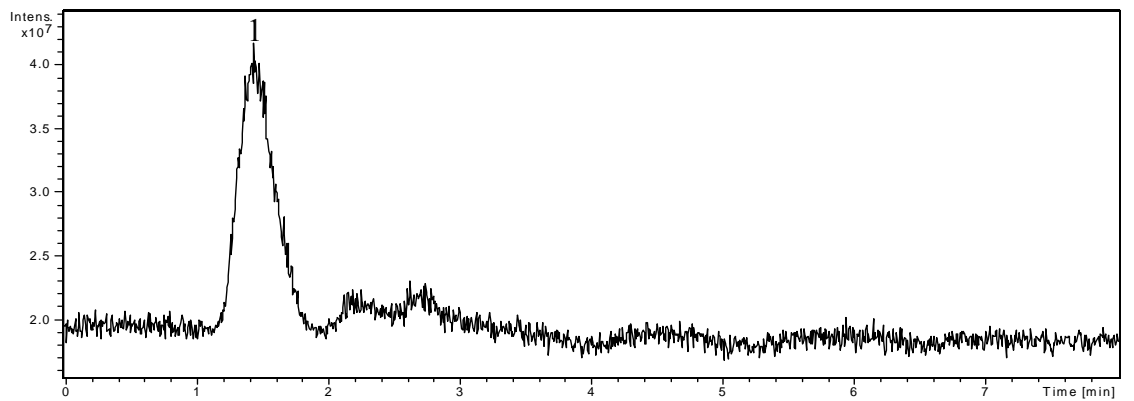
**Şekil 4.4.11.** 20 mg/L S IV boyar maddesinin LC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,45$  dak.)



**Şekil 4.4.12.** 20 mg/L S IV boyar maddesinin LC-MS kromatogramında S IV'ü karakterize eden 2 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=2,35$  dak.)

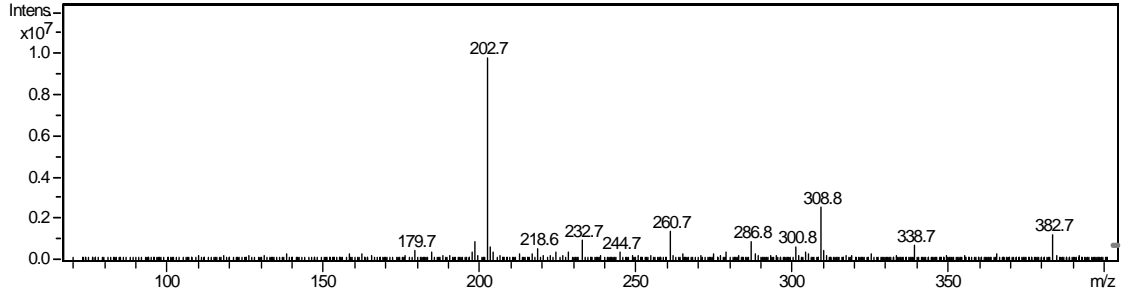


**Şekil 4.4.13.** 20 mg/L S IV boyar maddesinin LC-MS kromatogramında S IV'ü karakterize eden 3 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=4,5$  dak.)

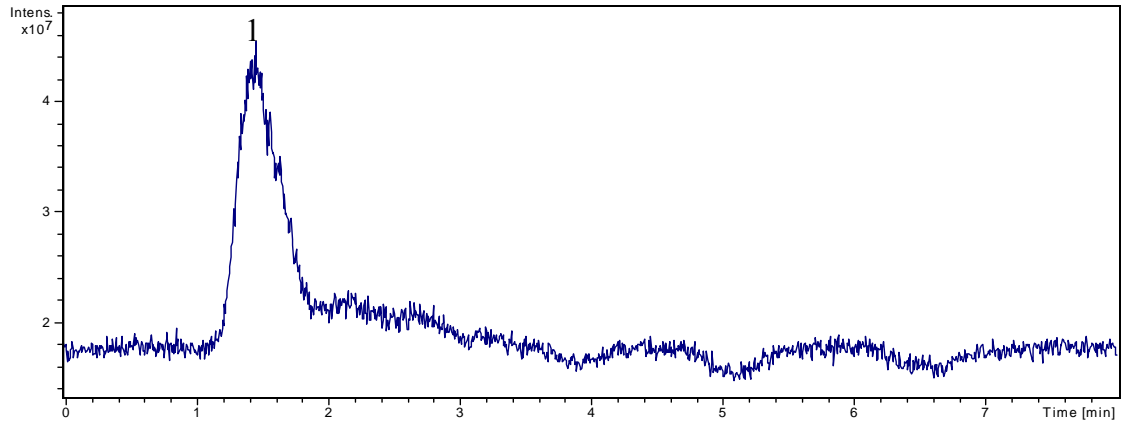


**Şekil 4.4.14.** 1 numaralı salça ekstraktının \* (kör örnek-1) LC-MS kromatogramı

\*Kör örnek-1= Ev yapımı salça

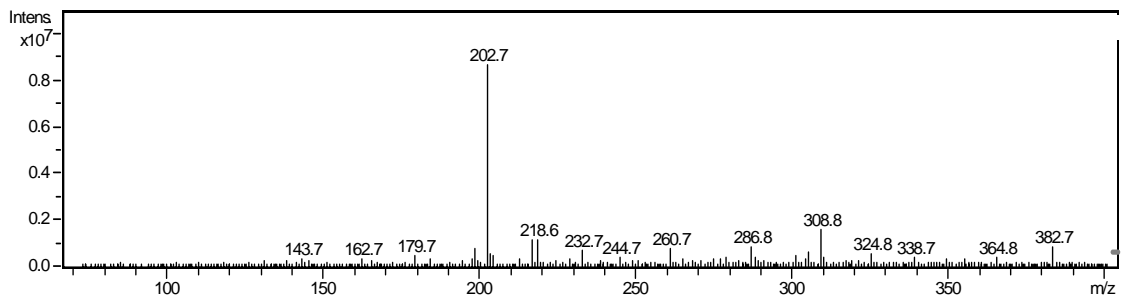


**Şekil 4.4.15.** 1 numaralı salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,45$  dak.)

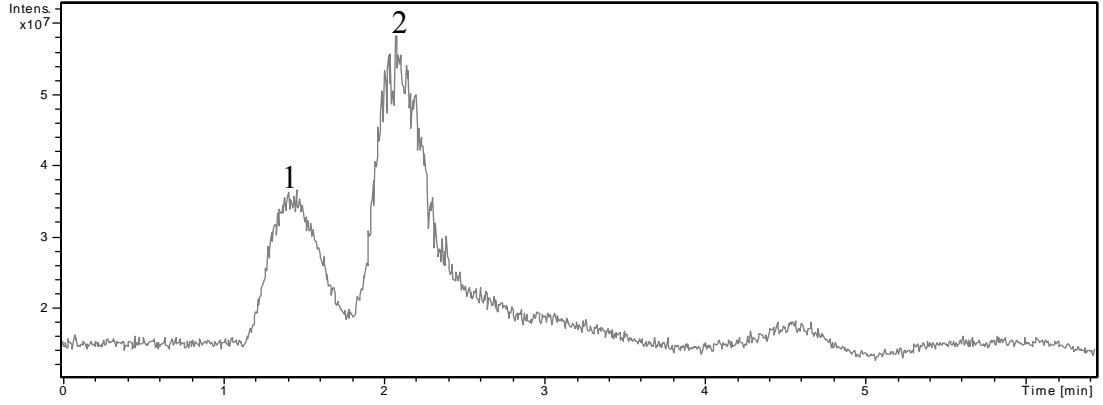


**Şekil 4.4.16.** 2 numaralı salça ekstraktının \* (kör örnek-2) LC-MS kromatogramı

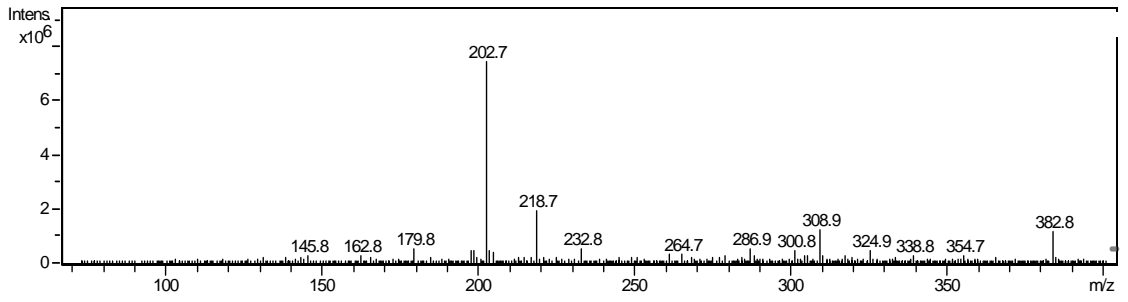
\*Kör örnek-2= Analizlerde kullanılan hazır salça



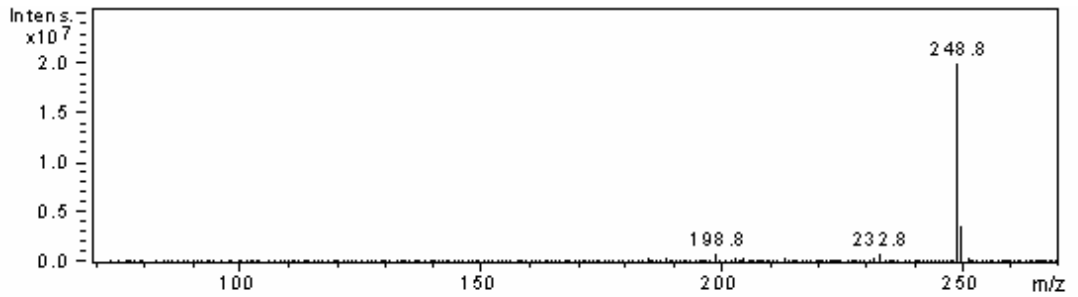
**Şekil 4.4.17.** 2 numaralı salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,45$  dak.)



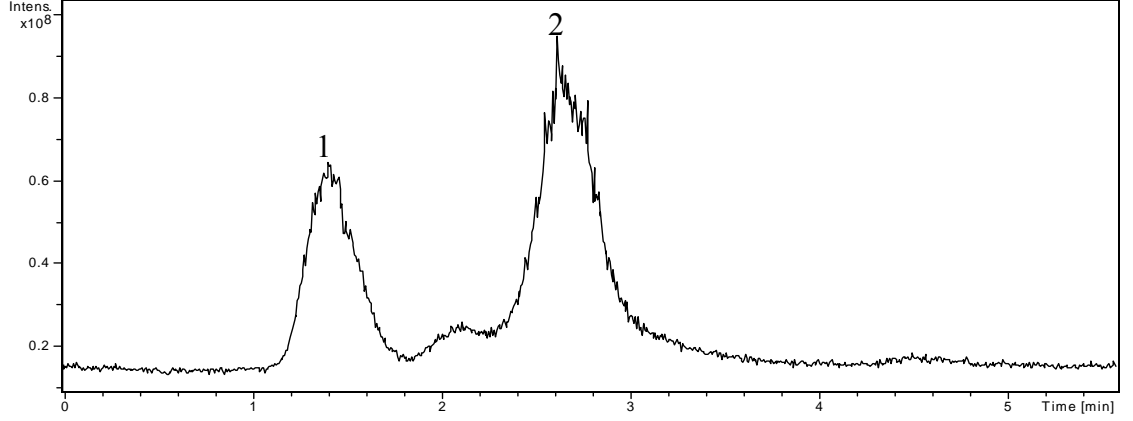
**Şekil 4.4.18.** S I boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramı



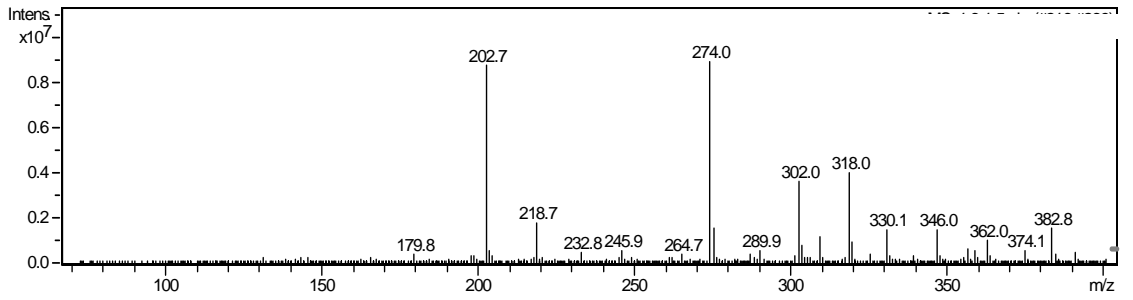
**Şekil 4.4.19.** S I boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,45$  dak.)



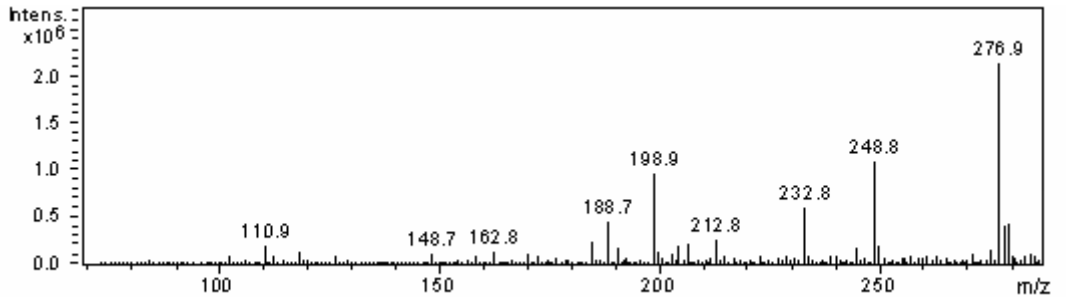
**Şekil 4.4.20.** S I boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 2 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=2,05$  dak.)



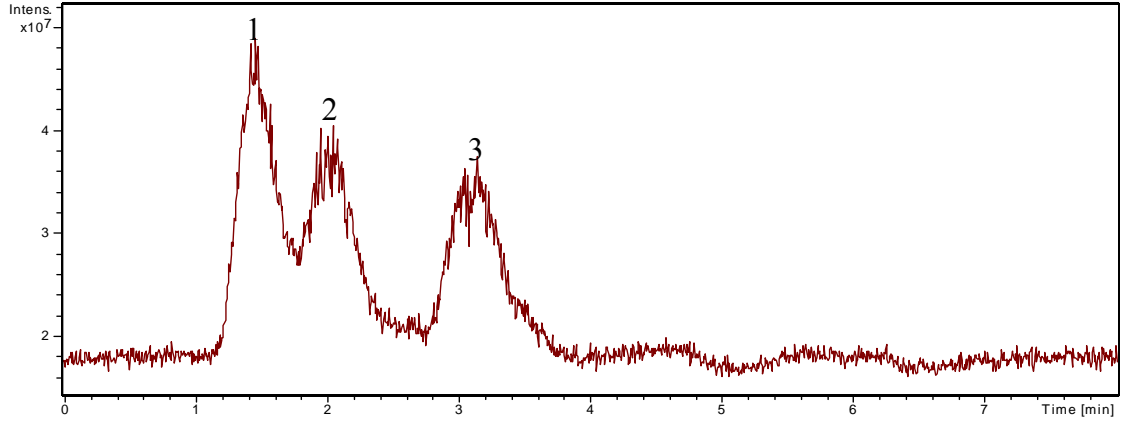
Şekil 4.4.21. S II boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramı



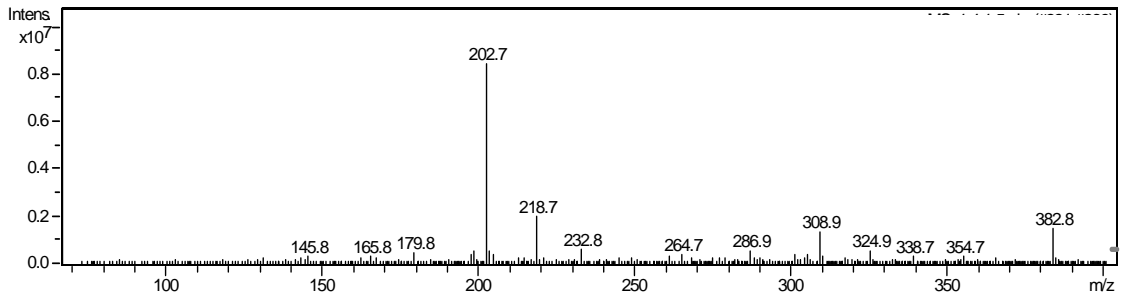
Şekil 4.4.22. S II boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,4$  dak.)



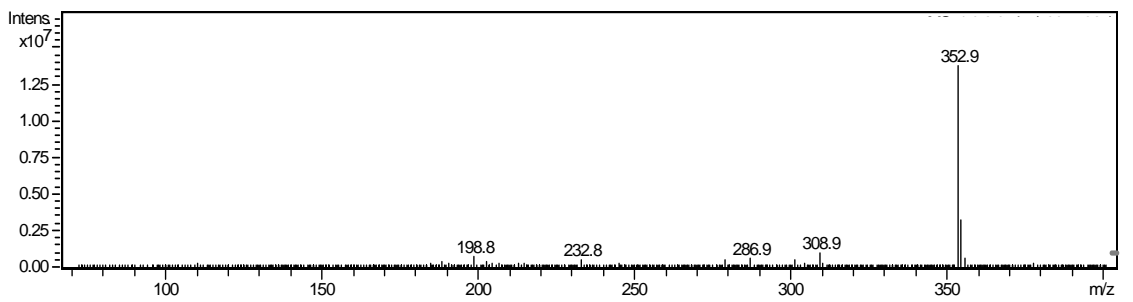
Şekil 4.4.23. S II boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 2 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=2,65$  dak.)



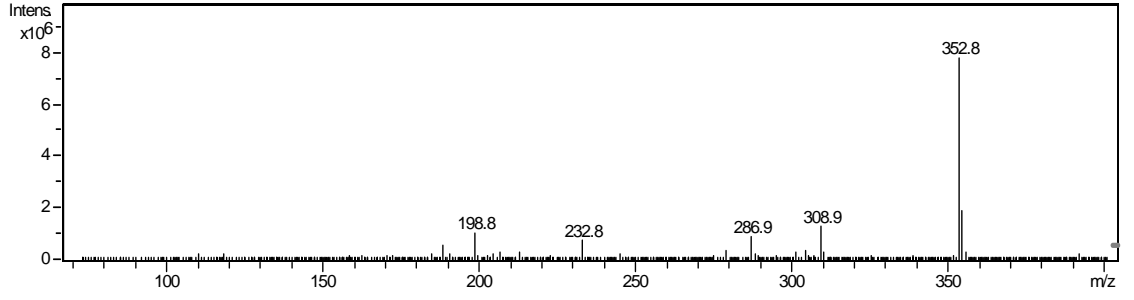
Şekil 4.4.24. S III boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramı



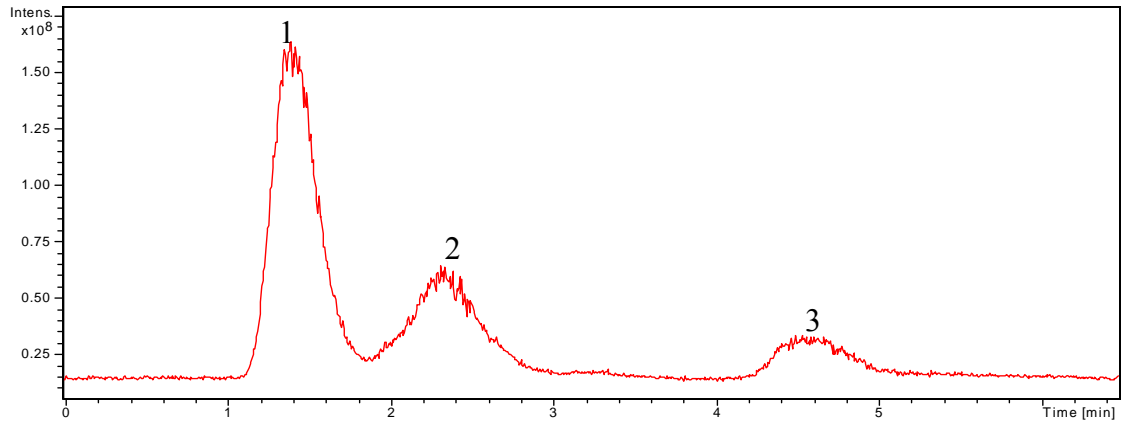
Şekil 4.4.25. S III boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,45$  dak.)



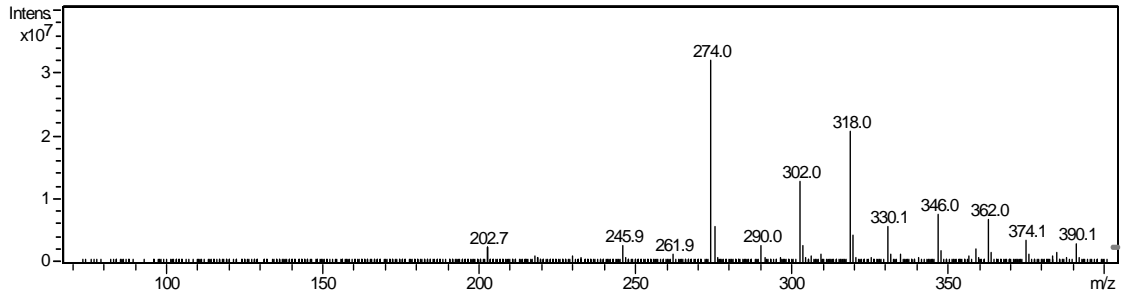
Şekil 4.4.26. S III boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 2 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,95$  dak.)



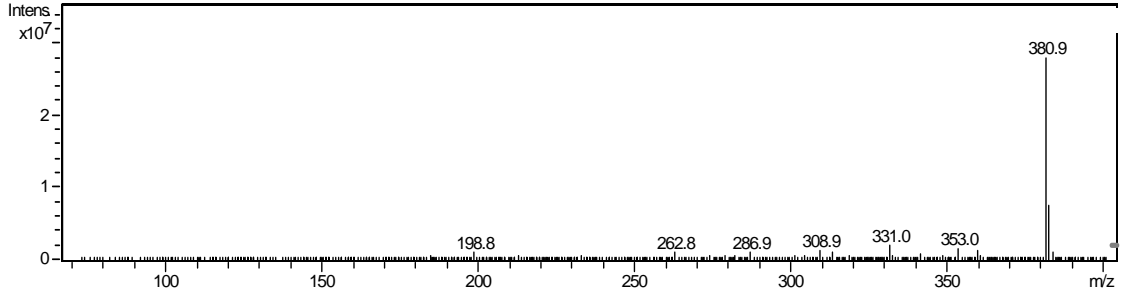
**Şekil 4.4.27.** S III boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 3 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=3,05$  dak.)



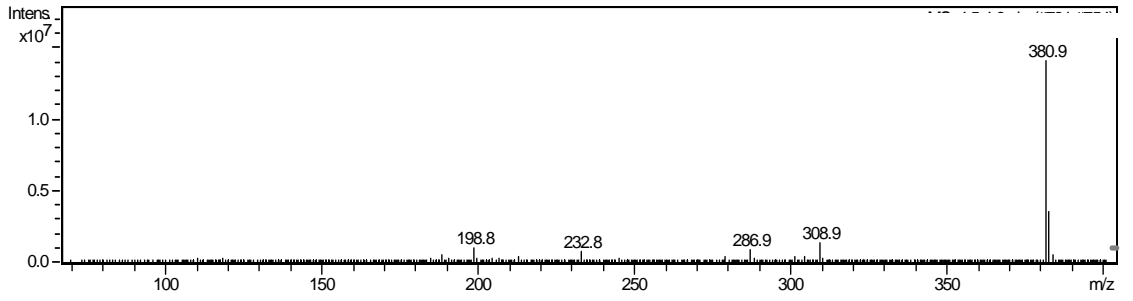
**Şekil 4.4.28.** S IV boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramı



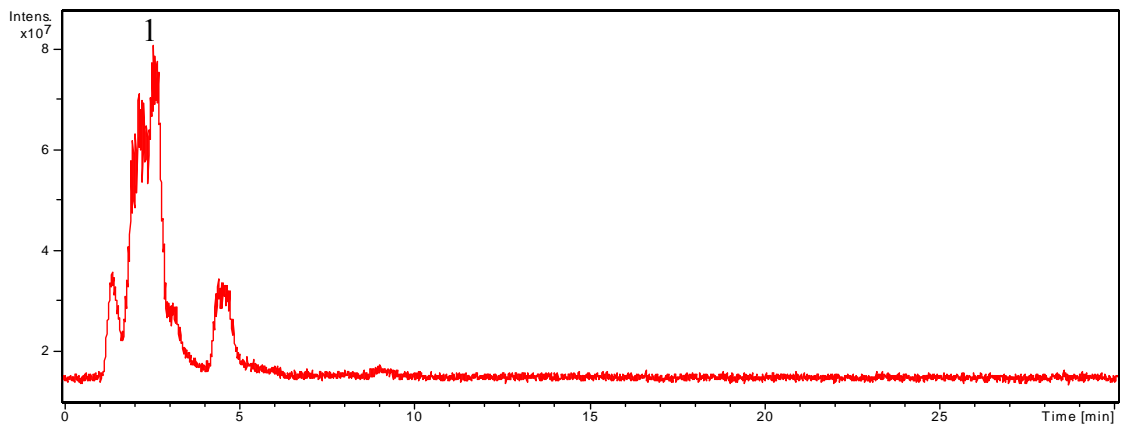
**Şekil 4.4.29.** S IV boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,45$  dak.)



**Şekil 4.4.30.** S IV boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 2 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=2,35$  dak.)

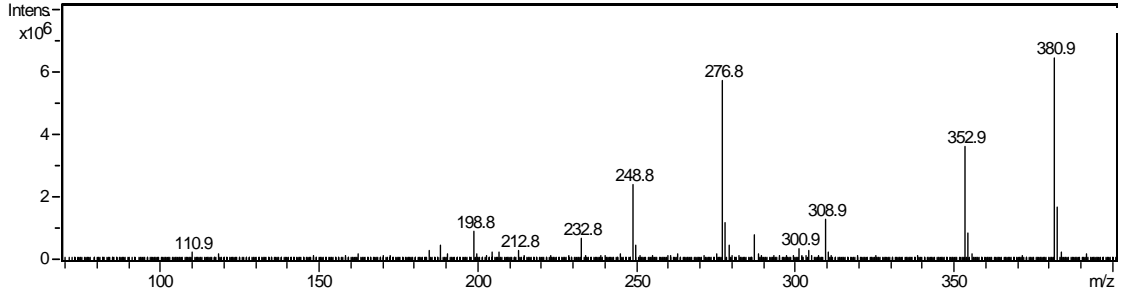


**Şekil 4.4.31.** S IV boyar maddesi katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 3 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=4,55$  dak.)



**Şekil 4.4.32.** S I-IV boyar maddeleri katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramı





**Şekil 4.4.33.** S I-IV boyar maddeleri katılmış salça ekstraktının LC-MS kromatogramındaki 1 numaralı pike ait kütle spektrumu ( $t_R=1,9-4,7$  dak.)

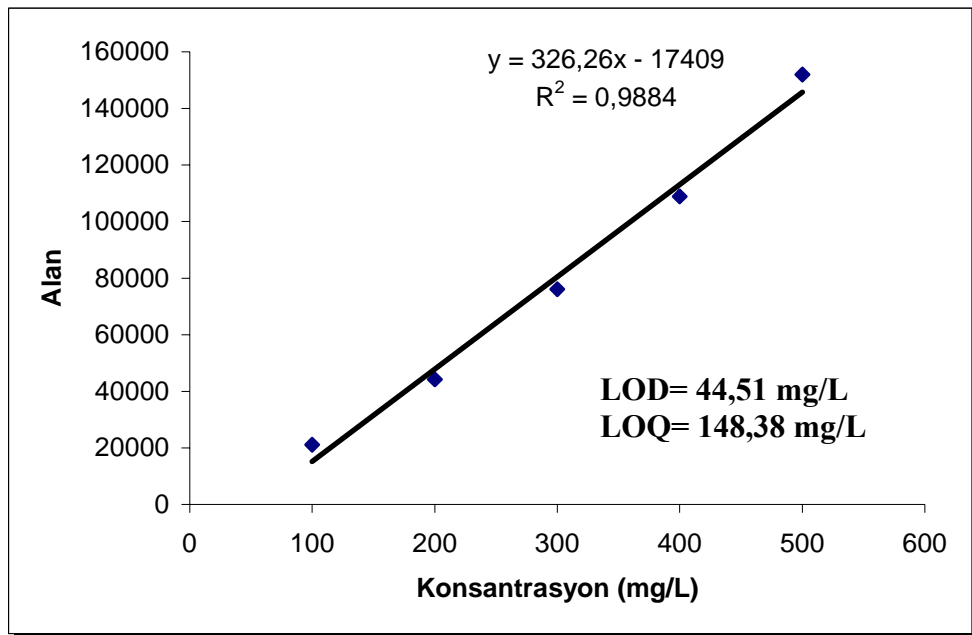
Şekil 4.4.32'deki bir numaralı pik dışındaki diğer iki pik salçayı ve S IV boyar maddesinin kromatogramında daha önce de gözlenen ikinci karakteristik pikini temsil etmektedir. Şekil 4.4.32.'de görüldüğü gibi, 1,9-4,7 dakikaları arasında boyar maddelere ait kromatogramlar üst üste çakışmıştır. Bu da boyar maddelerin daha öncesinde ayrı ayrı elde edilen LC-MS kromatogramlarında tespit edilen alıkonma zamanlarının birbirine yakın olmasından kaynaklanmaktadır. Karışıma ait kütle spektrumunda (Şekil 4.4.33.) her boyar madde için karakteristik olan ve ilgili boyaların molekül kütlelerini veren pikler görülmektedir. Salçaya boyar madde katılması sonucu elde edilen kromatogramlarda, kör örnek çalışmalarının da kanıtladığı gibi, salçayı karakterize eden tek bir pik tespit edilmekle birlikte; kromatogramda gözlenen diğer pik veya piklerin boyar maddelerin karakteristik pikleri veya safsızlıklarından kaynaklanabileceğini düşündüren pikleri olduğu kütle spektrumlarından anlaşılmıştır. Sonuç olarak; katı-faz ekstraksiyonunun örnek hazırlamada uygulanan deneysel şartlarda deriştirmede etkin olmasa da; matriks bileşenlerinden ayırma amaçlı kullanılabileceği belirlenirken LC-MS analizi ile de, indirgeme gibi bir kimyasal ön işlem gerekmeksizin sudan boyar maddelerinin analiz edilebileceği görülmüştür.

#### 4.5. GC-MS İle İlgili Kantitatif Çalışmalar

Kantitatif analiz için; S I, S II, S III ve S IV boyar maddelerinin temel parçalanma ürünleri sırası ile anilin, 2,4-ksilidin, anilin ve o-toluidin seçilerek, kimyasal indirgeme işlemi uygulanmış farklı konsantrasyonlardaki boyar maddelerin bu parçalanma ürünlerine ait kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur.

#### 4.5.1. 20 mg S I Boyası İle Yapılan Kantitatif Analiz Çalışması

20 mg S I boyar maddesinin Şekil 3.2.2.2.'de belirtilen prosedüre göre çalışılması sonucu elde edilen ekstrakt; başlangıçtaki boyar madde tartım değerine göre 100, 200, 300, 400, 500 mg/L'lik çözeltiler elde edilecek şekilde seyreltilmiştir. Her bir konsantrasyon değeri için beş tekrarlı çalışma sonucu elde edilen kromatogramlarda gözlenen anilin pikine ait kalibrasyon eğrisi Şekil 4.5.1.1.'de verilmiştir.

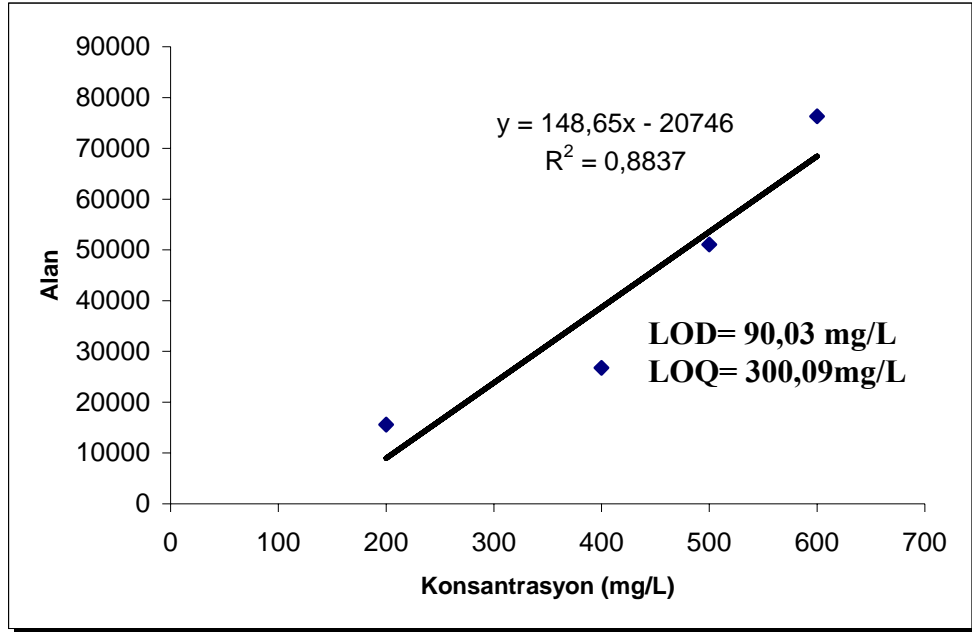


Şekil 4.5.1.1. S I boyar maddesinin kromatogramında gözlenen anilin pikine ait kalibrasyon eğrisi

#### 4.5.2. 20 mg S II Boyası İle Yapılan Kantitatif Analiz Çalışması

20 mg S II boyar maddesinin Şekil 3.2.2.2.'de belirtilen prosedüre göre çalışılması sonucu elde edilen ekstrakt; başlangıçtaki boyar madde tartım değerine göre 200, 400, 500, 600 mg/L'lik çözeltiler elde edilecek şekilde seyreltilmiştir. Her bir konsantrasyon değeri için beş tekrarlı çalışma sonucu elde edilen elde edilen

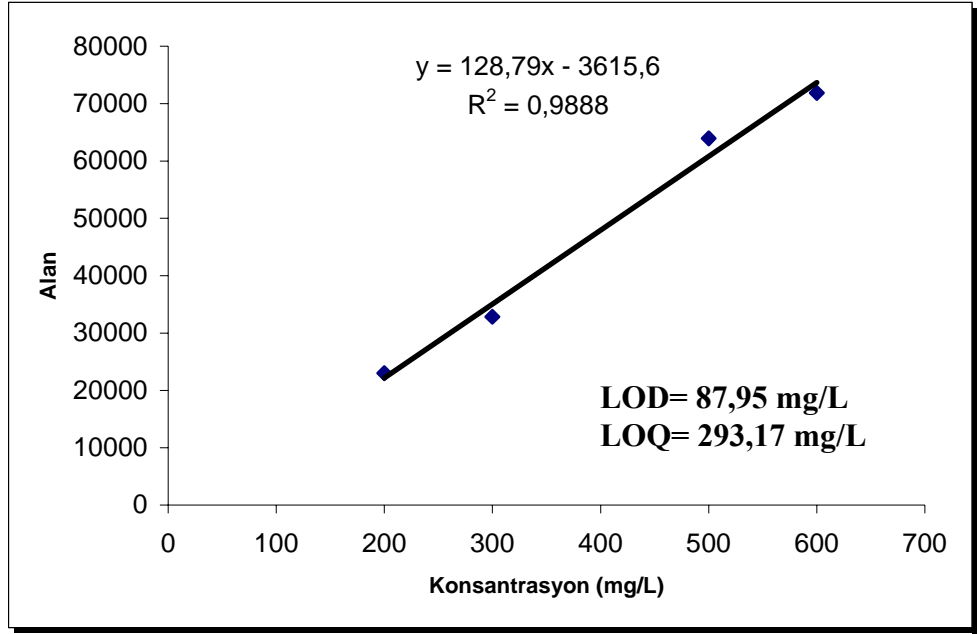
kromatogramlarda gözlenen 2,4-ksilidin pikine ait kalibrasyon eğrisi Şekil 4.5.2.1.'de verilmiştir.



**Şekil 4.5.2.1.** S II boyar maddesinin kromatogramında gözlenen 2,4-ksilidin pikine ait kalibrasyon eğrisi

#### 4.5.3. 20 mg S III Boyası İle Yapılan Kantitatif Analiz Çalışması

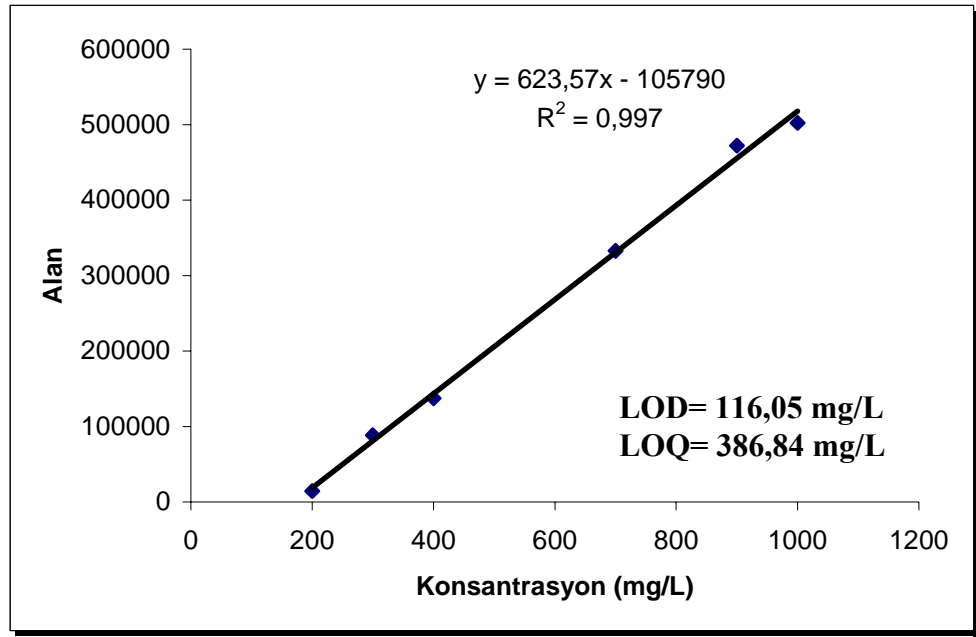
20 mg SIII boyar maddesinin Şekil 3.2.2.2.'de belirtilen prosedüre göre çalışılması sonucu elde edilen ekstrakt; başlangıçtaki boyar madde tartım değerine göre 200, 300, 500, 600 mg/L'lik çözeltiler elde edilecek şekilde seyreltilmiştir. Her bir konsantrasyon değeri için beş tekrarlı çalışma sonucu elde edilen elde edilen kromatogramlarda gözlenen anilin pikine ait kalibrasyon eğrisi Şekil 4.5.3.1.'de verilmiştir.



**Şekil 4.5.3.1.** S III boyar maddesinin kromatogramında gözlenen anilin pikine ait kalibrasyon eğrisi

#### 4.5.4. 20 mg S IV Boyası İle Yapılan Kantitatif Analiz Çalışması

20 mg S IV boyar maddesinin Şekil 3.2.2.2.'de belirtilen prosedüre göre çalışılması sonucu elde edilen ekstrakt; başlangıçtaki boyar madde tartım değerine göre 200, 300, 400, 700, 900, 1000 mg/L'lik çözeltiler elde edilecek şekilde seyreltilmiştir. Her bir konsantrasyon değeri için beş tekrarlı çalışma sonucu elde edilen elde edilen kromatogramlarda gözlenen o-toluidin pikine ait kalibrasyon eğrisi Şekil 4.5.4.1.'de verilmiştir.



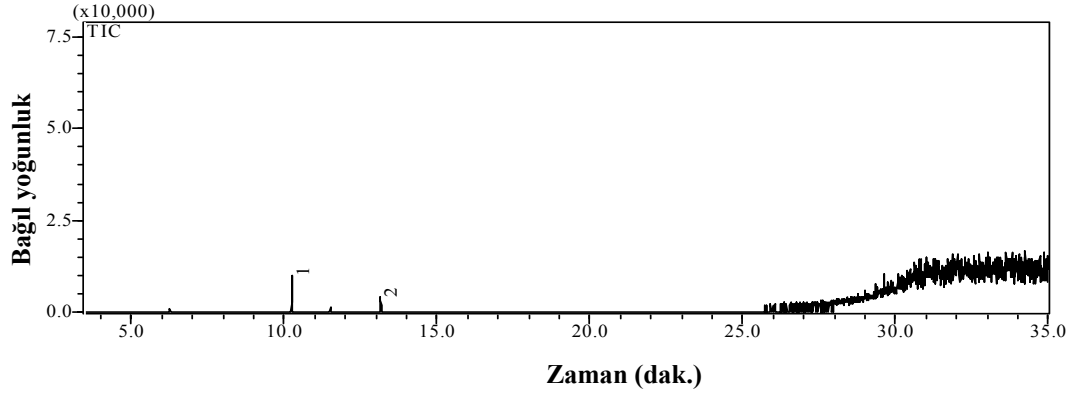
Şekil 4.5.4.1. S IV boyar maddesinin kromatogramında gözlenen o-toluidin pikine ait kalibrasyon eğrisi

#### 4.5.5. Gerçek Örnek Çalışması

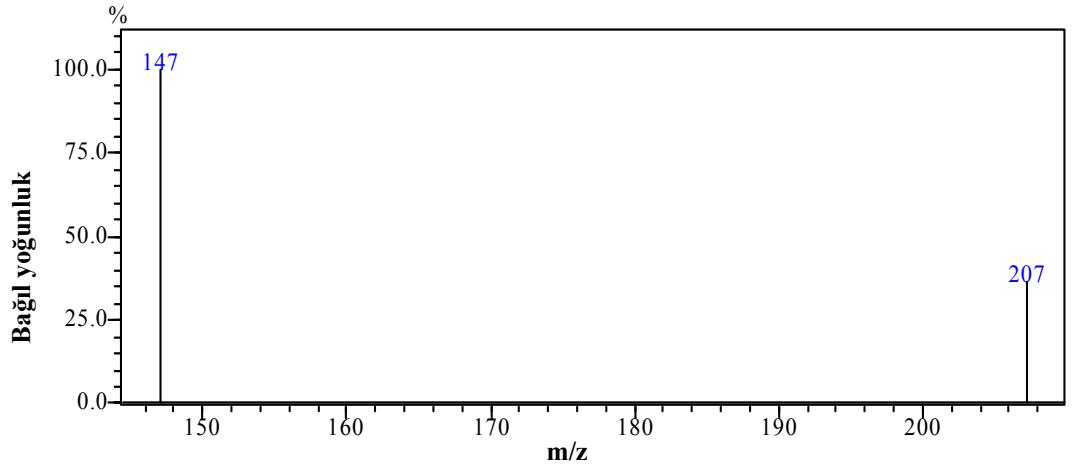
##### 4.5.5.1. Gerçek Örneklerde Ekstraksiyon Çalışması

Salça örneğinin kalitatif analizi sonucu, kromatogramda salçayı karakterize eden çok sayıda pik gözlenmesi özellikle ayırma amaçlı olarak ekstraksiyon teknikleri kullanılması gerekliliği ortaya çıkarmıştır. Bu amaçla Sudan boyar maddelerinin gerçek örneklerden ekstraksiyonu için genel olarak önerilmiş bir yöntem olan aseton ekstraksiyonu (Calbiani ve ark. 2004) uygulanmıştır. 5 g salça/10 ml aseton ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktın 4 ml'sine 13 ml pH=6 tamponu eklenmesi ve örneğin Şekil 3.2.2.2.'de belirtilen prosedüre göre çalışılması sonucu elde edilen GC-MS kromatogramı Şekil 4.5.5.1.1.'de verilmiştir. Bu kromatogramda salçayı karakterize eden 1 ve 2 numaralı piklere ait kütle spektrumları ise Şekil 4.5.5.1.2. ve Şekil 4.5.5.1.3.'te görülmektedir. Kromatogram ve spektrumlar değerlendirilip herhangi bir ekstraksiyon tekniği uygulanmadan elde edilen Şekil 4.3.5.1.'deki kromatogram ile

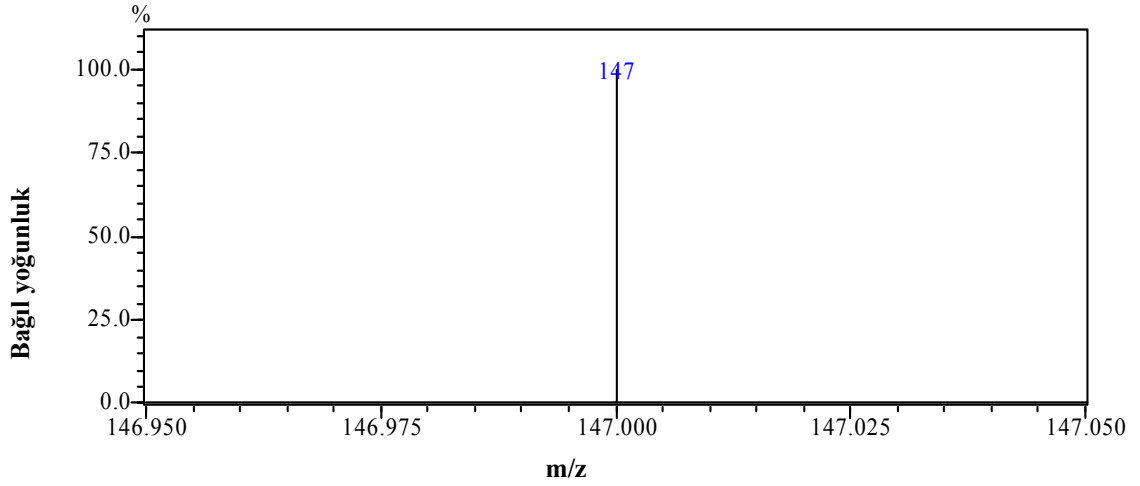
karşılaştırıldığında; salçayı karakterize eden pik sayısındaki azalma nedeni ile aseton ekstraksiyonunun matriks etkilerinden ayırmada etkili olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.5.5.1.1. Salça ekstraktı için GC-MS kromatogramı



Şekil 4.5.5.1.2. Salça ekstraktına ait kromatogramdaki 1 numaralı pik için kütle spektrumu



**Şekil 4.5.5.1.3.** Salça ekstraktına ait kromatogramdaki 2 numaralı pik için kütle spektrumu

#### 4.5.5.2. Gerçek Örneklerden Geri Kazanım Çalışmaları

Salça örneğinde doğal olarak tespit edilemeyen sudan boyar maddelerinin analizi için uygulanan metodun işlevselliğini görmek amacı ile salça örneklerine dışarıdan sudan boyar maddeleri katılmıştır. 3.2.4.1.c.'de belirtildiği şekilde hazırlanan ve Şekil 3.2.2.2.'de belirtilen deneysel işlemlerin uygulandığı örneklerin, GC-MS analizi sonucu elde edilen kromatogramlarında, Sudan boyar maddeleri için kantitatif analizde temel alınan parçalanma ürünleri tespit edilmiştir.

##### a) Gerçek Örneklerden S I Boyar Maddesinin Geri Kazanımı

100 mg/L konsantrasyonundaki S I boyası için altı tekrarlı analiz sonucu elde edilen kromatogramda gözlenen anilin pikine ait alan değerleri Çizelge 4.5.5.2.1.'de verilmiştir. Buradan elde edilen ortalama alan değeri Şekil 4.5.1.1.'de verilen kalibrasyon eğrisinde yerine konulduğunda anilin için deneysel konsantrasyon değeri 71,13 mg/L ve yüzde geri kazanım değeri de %71,13 olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.5.5.2.1.** S I'in salça örneklerinden geri kazanımı çalışmalarında, GC-MS kromatogramlarında gözlenen anilin pikine ait alan değerleri

5791
8734
4386
4425
4223
7220
Ortalama alan = 5797

**b) Gerçek Örneklerden S II Boyar Maddesinin Geri Kazanımı**

200 mg/L konsantrasyonlu S II boyası için altı tekrarlı analiz sonucu elde edilen kromatogramda gözlenen 2,4-ksilidin pikine ait alan değerleri Çizelge 4.5.5.2.2.'de verilmiştir. Buradan elde edilen ortalama alan değeri Şekil 4.5.2.1.'de verilen kalibrasyon eğrisinde yerine konulduğunda 2,4-ksilidin için deneysel konsantrasyon değeri 186,93 mg/L ve yüzde geri kazanım değeri de %93,46 olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.5.5.2.2.** S II'nin salça örneklerinden geri kazanımı çalışmalarında, GC-MS kromatogramlarında gözlenen 2,4-ksilidin pikine ait alan değerleri

9350
5983
8466
5955
5507
6985
Ortalama alan = 7041

**c) Gerçek Örneklerden S III Boyar Maddesinin Geri Kazanımı**

550 mg/L konsantrasyonlu S III boyası için altı tekrarlı analiz sonucu elde edilen kromatogramda gözlenen anilin pikine ait alan değerleri Çizelge 4.5.5.2.3.'te verilmiştir. Buradan elde edilen ortalama alan değeri Şekil 4.5.3.1.'de verilen



kalibrasyon eğrisinde yerine konulduğunda anilin için deneysel konsantrasyon değeri 147,13 mg/L ve yüzde geri kazanım değeri de % 26,75 olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.5.5.2.3.** S III'ün salça örneklerinden geri kazanımı çalışmalarında, GC-MS kromatogramlarında gözlenen o-toluidin pikine ait alan değerleri

12487
16902
18369
19017
12965
12258
Ortalama alan = 15333

#### **d) Gerçek Örneklerden S IV Boyar Maddesinin Geri Kazanımı**

450 mg/L konsantrasyonlu S IV boyası için beş tekrarlı analiz sonucu elde edilen kromatogramda gözlenen o-toluidin pikine ait alan değerleri Çizelge 4.5.5.2.4.'te verilmiştir. Buradan elde edilen ortalama alan değeri Şekil 4.5.4.1.'de verilen kalibrasyon eğrisinde yerine konulduğunda o-toluidin için deneysel konsantrasyon değeri 176,64 mg/L ve yüzde geri kazanım değeri de % 39,25 olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.5.5.2.4.** S IV'ün salça örneklerinden geri kazanımı çalışmalarında, GC-MS kromatogramlarında gözlenen o-toluidin pikine ait alan değerleri

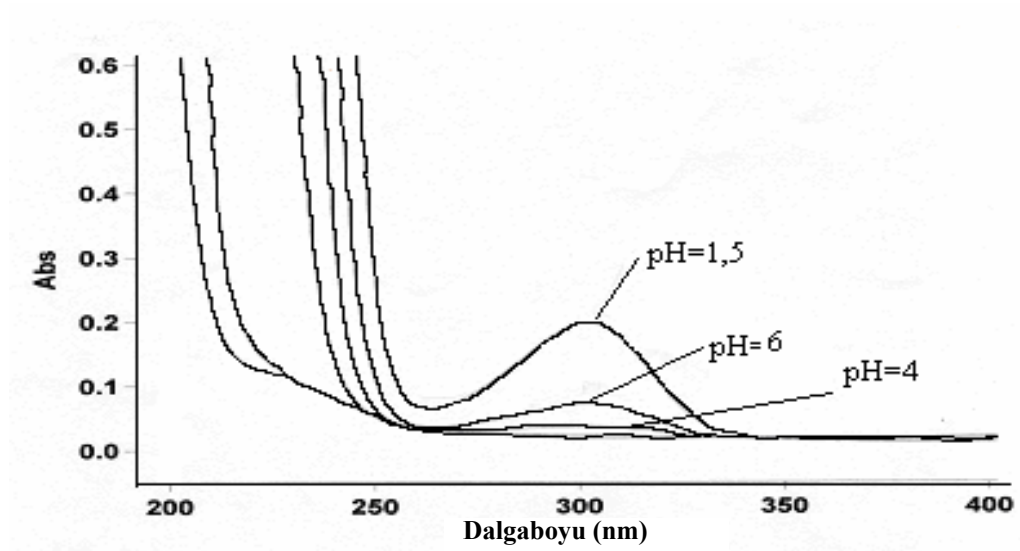
3806
2920
5009
6379
3661
Ortalama alan = 4355

S I ve S II boyar maddelerine ait yüksek geri kazanım değerleri, metodun etkinliğini gösterirken; S III ve S IV boyar maddeleri için farklı modifikasyonların

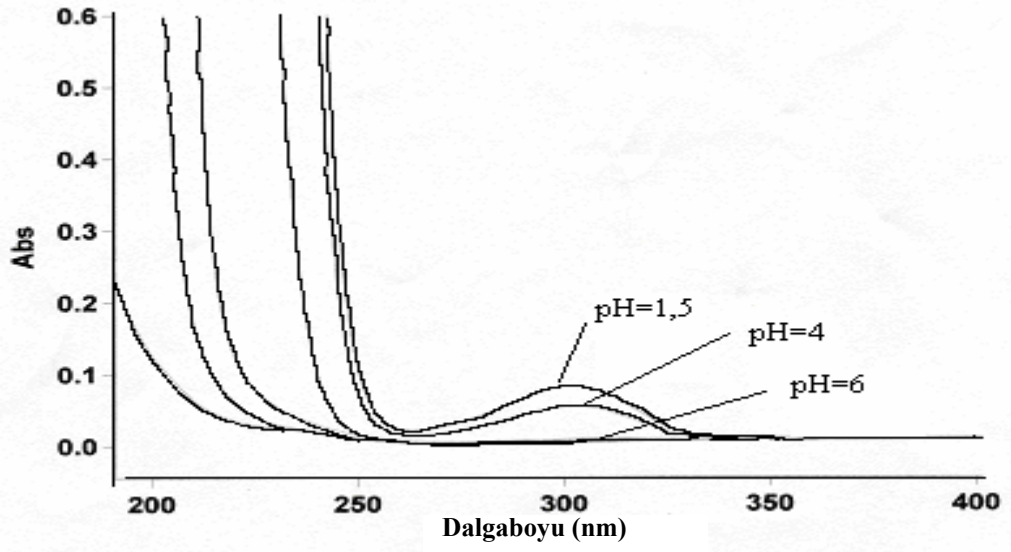
gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu amaçla en düşük geri kazanım veren S III temel alınarak çalışmalar yapılmıştır.

#### 4.6. UV-VIS Analizi İle pH Değişiminin Geri Kazanıma Etkisinin İncelenmesi

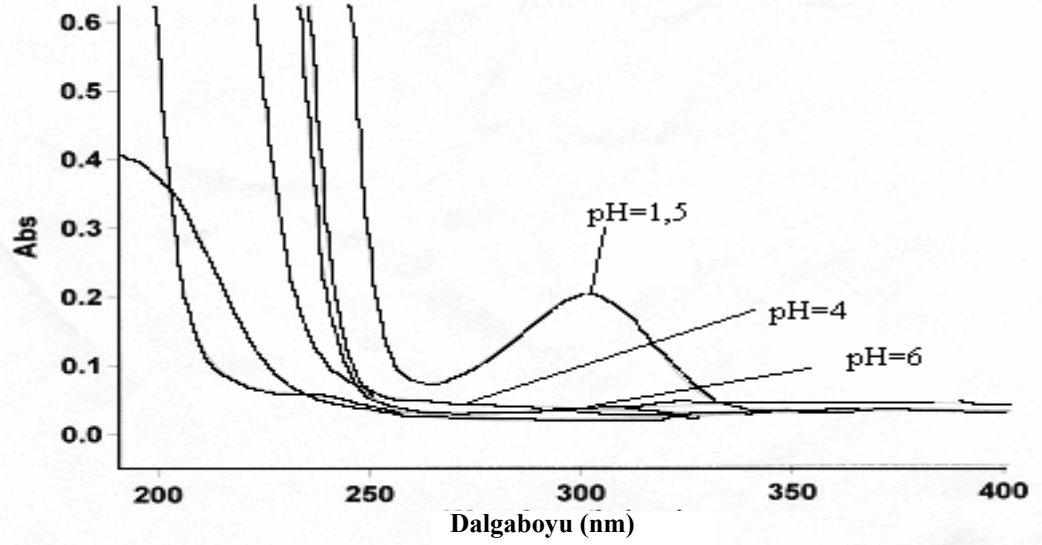
Sudan boyar maddelerine ait sulu çözeltiler pH=1,5-4-6-8-10-12 değerlerine ayarlanmış ve bu çözeltilerin 200-900 nm aralığında taramalı olarak UV-VIS spektrumları alınmıştır. Elde edilen spektrumlar şekil 4.6.1., şekil 4.6.2., şekil 4.6.3. ve şekil 4.6.4.'te verilmiştir.



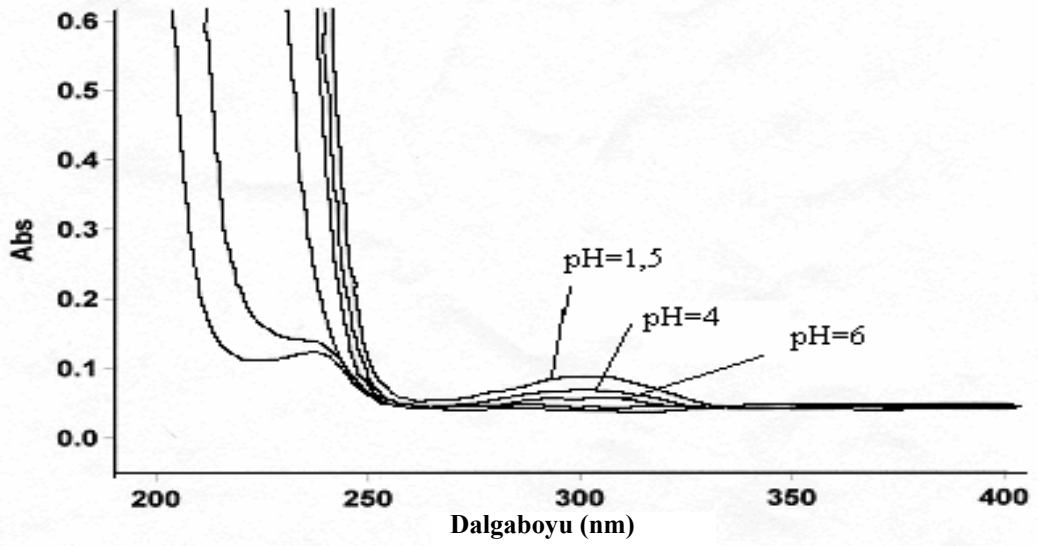
şekil 4.6.1. S I boyar maddesinin pH=1,5-12 aralığında UV-VIS spektrumları



Şekil 4.6.2. S II boyar maddesinin pH=1,5-12 aralığında UV-VIS spektrumları



Şekil 4.6.3. S III boyar maddesinin pH=1,5-12 aralığında UV-VIS spektrumları



Şekil 4.6.4. S IV boyar maddesinin pH=1,5-12 aralığında UV-VIS spektrumları

Maksimum absorbans değerlerinin gözleendiği pH değerleri, çözünürlüğün en çok olduğu değer seçilerek bu pH değerlerinde Şekil 3.2.2.2.'ye göre tekrar çalışılmış, gözlenen parçalanma ürünlerine ait alan değerleri pH=6'da elde edilen alan değerleri ile kıyaslanarak her Sudan boyar maddesi için en uygun pH değeri belirlenmiştir.

#### 4.7. Farklı pH Değerlerinde Kimyasal İndirgeme İşlemi Yapılmasının Sudan Boyar Maddelerinin Geri Kazanımına Etkisi

##### 4.7.1. pH=1,5 Ortamında Çalışılmasının Sudan Boyar Maddelerinin Geri Kazanımına Etkisi

Ortam, pH=1,5 değerine ayarlandığında S I, S II, S III ve S IV boyar maddelerinin GC-MS kromatogramlarında gözlenen anilin, 2,4-ksilidin, anilin ve o-toluidin piklerine ait beş tekrarlı analiz sonucu elde edilen ortalama alan değerleri ve aynı parçalanma ürünlerinin pH=6'daki alan değerleri Çizelge 4.7.1.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.7.1.1.** Sudan boyar maddelerinin pH=1,5 ve pH=6 ortamlarında parçalanma ürünlerine ait GC-MS kromatogramlarından belirlenen alan değerleri

<b>Boyar madde</b>	<b>Ortalama alan değeri (pH=6)</b>	<b>Ortalama alan değeri (pH=1,5)</b>
<b>S I</b>	76070	10500
<b>S II</b>	51053	2982
<b>S III</b>	32809	215041
<b>S IV</b>	88438	56544

#### **4.7.2. pH=1,5 Ortamında Isıl İşlem Olmaksızın, Oda Sıcaklığında ve Ultrasonik Karıştırıcıda Çalışılmasının S II Boyar Maddesinin Geri Kazanımına Etkisi**

Parçalanmada ısıl işlemin etkin olup olmadığının incelenmesi için, en yüksek geri kazanım değerinin tespit edildiği S II boyar maddesi temel alınarak çalışmalar yapılmıştır. Kimyasal indirgeme işlemi; pH=6'da, oda sıcaklığında ve boyar maddenin indirgen madde ile ultrasonik karıştırıcıda tutulması ile gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonucu elde edilen GC-MS kromatogramı, aynı pH değerinde ve 70°C'lik ısıl ortamda gerçekleştirilen kimyasal indirgeme sonucu elde edilen GC-MS kromatogramı ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmada yine beş tekrarlı çalışma yapılmış ve her iki durumda da kromatogramlarda gözlenen 2,4-ksilidine ait alan değerleri temel alınmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.7.2.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.7.2.1.** S II boyar maddesinin pH=6 ortamında ısıl işlem uygulandığında ve pH=6 da ısıl işlem olmadan çalışılması sonucu GC-MS kromatogramlarında gözlenen parçalanma ürününe ait ortalama alan değerleri

	<b>Isıl işlem uygulandığında ortalama alan (pH=6)</b>	<b>Isıl işlem uygulanmadığında ortalama alan (pH=6)</b>
<b>S II</b>	51053	31205

Çizelge 4.7.2.1.'deki veriler karşılaştırıldığında, S II boyar maddesinin ısıl işlem olmadan da parçalanmaya yatkın olduğu görülmektedir.

### 4.7.3. pH=4 Ortamında Çalışılmasının S IV Boyar Maddesinin Geri Kazanımına Etkisi

Ortam, pH=4 değerine ayarlanıp kimyasal indirgeme yapıldığında S IV boyar maddesinin GC-MS kromatogramında gözlenen o-toluidin pikine ait beş tekrarlı analiz sonucu elde edilen ortalama alan değeri ile; diğer çalışılan pH ortamları ve elde edilen alan değerleri Çizelge 4.7.3.1.'de verilmiştir.

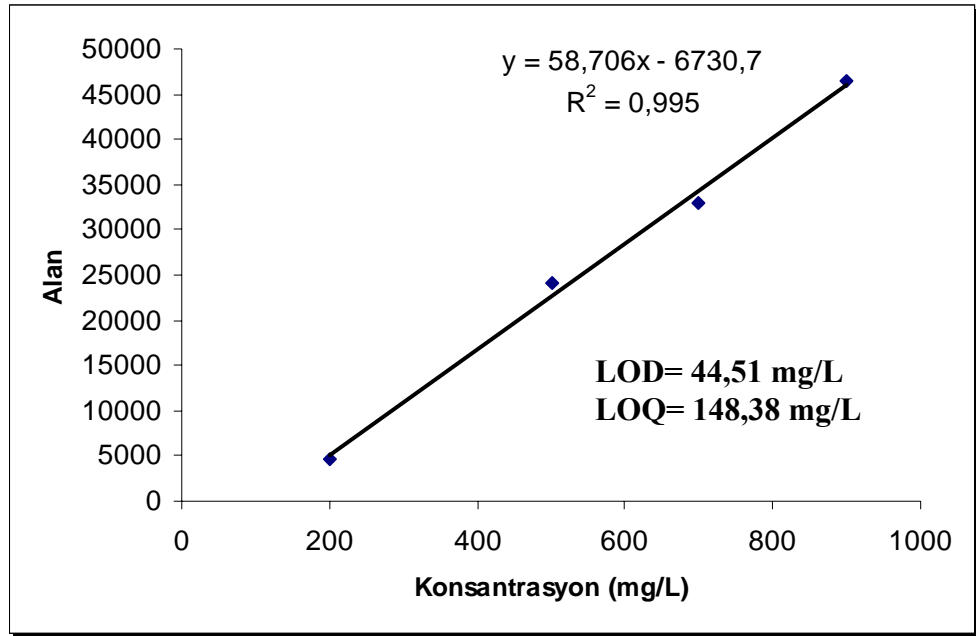
**Çizelge 4.7.3.1.** Farklı pH değerlerinde S IV boyar maddesinin GC-MS kromatogramlarında gözlenen parçalanma ürününe ait ortalama alan değerleri

Boyar madde	Ortalama alan (pH=1,5)	Ortalama alan (pH=4)	Ortalama alan (pH=6)
S IV	56544	83020	88438

S I boyar maddesinin farklı pH değerinde parçalanma ürününe ait ortalama alan değerleri karşılaştırıldığında pH=6'daki alan değerleri ile pH=1,5'teki alan değerinin birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir. S II için de durum aynı olmakla birlikte, ısıl işlem olmadan da Sudan boyar maddelerinin parçalanma etkinliği S II çalışması ile doğrulanmıştır. Bu da boyar maddelerin parçalanmaya dirençli olmadığını göstermektedir. S IV boyar maddesi ile yapılan çalışmalar, diğer deneysel parametreler sabitken sadece pH değişiminin kalibrasyonda farklılık yaratmayacağı sonucunu göstermiştir. S III için ise pH=1,5 değerinin kimyasal indirgemedede daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

#### 4.7.4. pH=1,5 Ortamında S III Boyar Maddesinin Parçalanma Ürününe Ait Kalibrasyon Eğrisi

S III boyar maddesi için, pH=1,5 ortamında çalışılmasının pH=6 ortamına kıyasla parçalanma ürünü için daha yüksek alan değeri vermesi nedeni ile pH=1,5 ortamında çalışılarak geri kazanıma etkisi incelenmiştir. pH değişimi dışındaki diğer deneysel parametreler sabit tutulmuş ve Şekil 4.7.4.1.'de gösterilen yeni kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.



Şekil 4.7.4.1. pH=1,5 ortamında S III boyar maddesinin GC-MS kromatogramında gözlenen anilin pikine ait kalibrasyon eğrisi

Salça örneğine 500 mg/L S III katılması sonrası beş tekrarlı analiz ile elde edilen ortalama alan değeri 8263,33; deneysel konsantrasyon değeri 255,41 ve yüzde geri kazanım ise %51,10 olarak belirlenmiştir. Yüzde geri kazanımın arttığı tespit edildiğinden optimum şartların belirlenmesi için örnek olarak S III boyar maddesi alınarak kemometrik yöntemden yararlanılmıştır.

#### 4.8. Kemometrik Yöntem

Optimizasyon için kullanılan değişkenler sıcaklık ve sodyum ditiyonit indirgeni miktarıdır. Bu değişkenler temel alınarak merkezi kompozit dizayn yöntemi uygulanmıştır. Sıcaklık ve indirgen miktarı hariç; diğer deneysel koşullar sabit tutulmuş ve iki değişken için deneysel koşullar Çizelge 4.8.1.'de; deneysel plan da Çizelge 4.8.2.'de belirtilmiştir.

**Çizelge 4.8.1.** S III boyasının kimyasal indirgenmesinde sıcaklık ve indirgen miktarının optimizasyonu için deneysel koşullar

	-1,41	-1	0	+1	+1,41
$x_1$ (SD derişimi, M)	0,295	0,5	1	1,5	1,705
$x_2$ (Sıcaklık, °C)	21,8	30	50	70	78,2

**Çizelge 4.8.2.** S III boyasının kimyasal indirgenmesinde sıcaklık ve indirgen miktarının optimizasyonu çalışmalarında her bir deney koşulunu gösteren deneysel plan

Deney No	Kod Değer		Deneysel Değer	
	$x_1$	$x_1$	$x_1$ (M)	$x_2$ (°C)
1	-1	-1	0,5	30
2	+1	-1	1,5	30
3	-1	+1	0,5	70
4	+1	+1	1,5	70
5	-1,41	0	0,295	50
6	+1,41	0	1,705	50
7	0	-1,41	1	21,8
8	0	+1,41	1	78,2
9	0	0	1	50



Deneyssel olarak belirlenen anilin alanları Çizelge 4.8.3.'te görölmektedir.

**Çizelge 4.8.3.** Optimizasyon çalışmalarında, S III boyasının kimyasal olarak indirgenmesi sonucu, indirgenme ürününe ait olarak her bir deneysel koşulda belirlenen alan değerleri

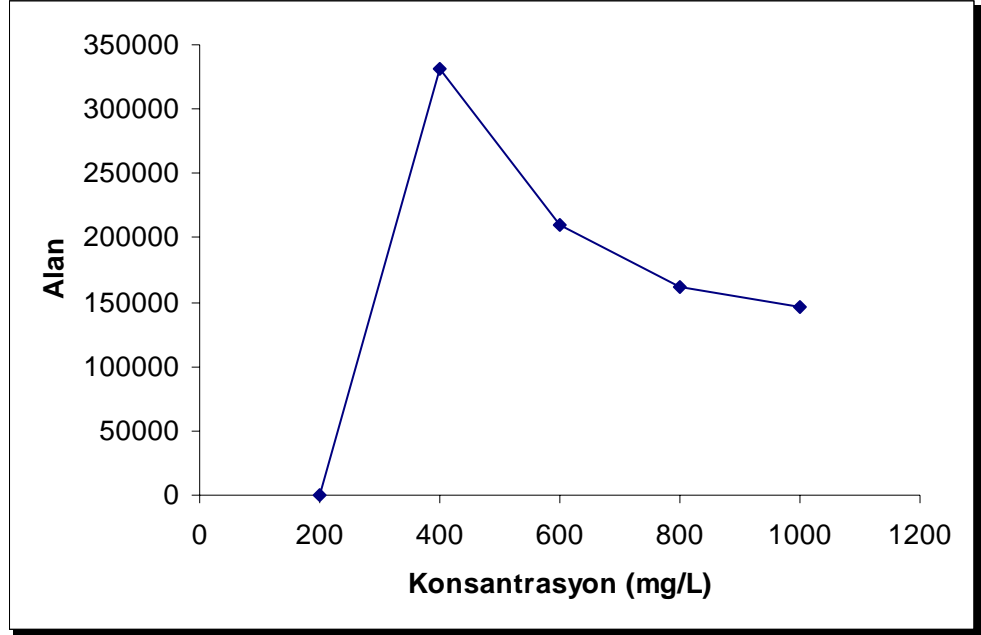
<b>Deney No</b>	<b>y (indirgenme ürününün alan değeri)</b>
1	74498
2	54600,44
3	122912,2
4	28118,8
5	167298,1
6	67398,86
7	20166,38
8	277142,1
9	34378,11

$y=b_1x_1+b_2x_2+b_{11}x_1^2+b_{22}x_2^2+b_{12}x_1x_2$  denkleminin katsayıları **(4.8.3.-1)** eşitliğinde görüldüğü gibidir.

$$(y) \text{ Alan} = -32039 x_1 + 48177x_2 + 42989x_1^2 + 58736x_2^2 -18724x_1x_2 \quad (4.8.3.-1)$$

Bu denklemin sırası ile  $x_1$  ve  $x_2$ ' ye göre alınan türevleri alınıp sıfıra eşitlendiğinde  $x_1$  ve  $x_2$  değişkenleri teorik olarak -0,5904 ve -0,2507 olarak belirlenirken; bu teorik değerler  $x_{\text{teorik}} = ((x_{\text{gerçek}}) - \text{orta değer}) / (\text{orta değer ile en yakını arası fark})$  eşitliğinde yerine konduğunda değişkenlerin deneysel değerleri sırası ile  $x_1=1,3$  M ve  $x_2=45^\circ\text{C}$  olarak belirlenmiştir.

Kemometrik yöntem ile optimum koşullar belirlendikten sonra S III için belirlenen bu optimum koşullarda deneysel olarak elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4.8.1.'de verilmiştir.



**Şekil 4.8.1.** pH=1,5 ortamında ve optimum koşullarda S III boyar maddesinin indirgenme ürünü pikine ait kalibrasyon eğrisi

Kalibrasyon eğrisinden de görüldüğü gibi optimum koşullar, belirli boya derişimi için en yüksek alan değerini vermektedir. Bu da belirlenen miktardaki sodyum ditiyonitin yine belirlenen sıcaklıkta parçalayabileceği boya miktarının da sınırlayıcı etken olduğunu göstermiştir. Optimum konsantrasyon değeri olan 400 mg/L' nin altındaki değerlerde boyar maddenin indirgenme ürününün daha ileri düzeyde parçalanmaya uğradığı; 400 mg/L' nin üstündeki değerlerde ise bu parçalanma ürününe ait alan değerlerinin azaldığı tespit edilmiştir. Buradan, boyar madde miktarı azaldıkça kimyasal indirgen ile temastaki yüzey alanının arttığı; ancak belirli boyar madde derişiminin altındaki değerlerde indirgenin ileri düzeyde parçalanmalara yol açabildiği tespit edilmiştir. Şekil 4.8.1.'deki kalibrasyon eğrisinden de görülebileceği gibi özellikle indirgen derişimi optimum düzeyde iken bu ileri düzeydeki parçalanma önem kazanmaktadır.

## 5. SONUÇ

Sudan I, II, III ve Sudan IV boya ları; genetik ve mutajenik etkileri nedeni ile gıdalarda kullanımı yasal olmayan sentetik azo boya larıdır. Buna rağmen kullanımları tamamen ortadan kaldırılamamıştır. Gıdalarda eser seviyede bulunabileceğinden; bu boyar maddelerin gıda ürünlerinde ilk kez tespit edildiği tarihten itibaren uygun analitik metot gelişimi önem kazanmıştır. Bizim çalışmamız da böyle bir analitik metot gelişimi üzerine odaklanmıştır. Yüksek molekül kütleleri nedeni ile literatürde Sudan boya larının GC-MS çalışmalarına yer verilmemiş olmakla birlikte; çalışmamızda, bu boyar maddelerin tespit ve tayini için yaygın olarak kullanılan sıvı kromatografisine alternatif olarak GC-MS analizlerinin yapılabilirliği gösterilmiştir. Bu anlamda analiz tekniği açısından yenilik sunulmaktadır. Çalışmamız sonucunda; S I ve S II boyar maddelerinin, kaynama noktaları uygun olduğu için, doğrudan GC-MS analizlerinin yapılabilmesi görülmüştür. Azo boya larının kromofor azo grupları üzerinden indirgeneme özellikleri bilindiğinden, S III ve S IV boyar maddelerinin parçalanma yolu ile analizleri gerçekleştirilmiştir. Böylece daha küçük molekül kütleli ve kaynama noktaları GC-MS analizi için uygun parçalanma ürünleri anilin ve o-toluidin üzerinden karakterizasyon yapılmıştır. İndirgeyerek analiz yöntemi sadece S III ve S IV boyar maddelerine değil; S I ve S I boyar maddelerine de uygulanmıştır. Bu boya ların GC-MS analizleri sonucu karakteristik parçalanma ürünleri ise sırası ile anilin ve 2,4-kilidin'dir. Boya yapısının parçalanması amacı ile kimyasal indirgeme yönteminden yararlanılmış ve tekstil ürünlerindeki yasaklı azo boya larının tayininde yaygın olarak kullanılan referans metot temel alınarak sözü edilen parçalanma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu boya ların, ısı işlem olmadan yapılan indirgeme işleminin de kanıtladığı gibi, parçalanmaya yatkın ve parçalanma ürünlerinin yasaklı aril amin listelerinde de görebileğimiz aromatik aminler olduğu belirlenmiştir. Boyar maddelerin pH=1,5 ortamında çözünürlüğünün yüksek olduğu ve ısı işlemle parçalanma veriminin arttığı tespit edilmiştir. Mide pH değeri ve gıdaların pişirilmesi göz önüne alındığında toksisitesinin belirlenmesinin zorunlu olduğu söylenebilir. Bu amaçla da ileri düzeyde indirgemeye neden olmayacak; fakat GC-MS analizi için de tespiti

mümkün kılacak oranda aril amin oluşumunun önemli olduğu görülmektedir. Kullandığımız sodyum ditiyonit indirgeninin de bu anlamda yeterli olduğu kanıtlanmıştır. S III için kemometri çalışmalarından da görüldüğü gibi yaygın olarak kullanılan indirgeme metodunun boyar madde doğasına bağlı olarak modifie edilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. LC-MS analizleri için salça matriksinden bu boyaların izole edilmesinde literatürde önerilen çözücülerden biri olan aseton ekstraksiyonunun yeterli olduğu belirlendiği için; GC-MS analizleri için de aseton ekstraksiyonuna dayalı örnek hazırlama metodu geliştirilmiştir. Her boyar madde için karakteristik parçalanma ürünleri tespit edildiğinden; uyguladığımız deneysel şartlarda LC-MS analizine oranla GC-MS analiz sonuçlarını kromatogramlar açısından karşılaştırırsak; GC-MS'te ayırımın daha iyi olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle de GC-MS, parçalanma ürünleri üzerinden Sudan boyar maddelerinin eş zamanlı tayini için de uygun bir yöntemdir; Sudan boyar maddelerinin LC-MS ile doğrudan tayinlerine alternatif yöntem parçalanarak, GC-MS ile dolaylı tayinleridir.

**KAYNAKLAR**

**AHLSTROM, L-H., C.S. ESKILSSON, E. BJORKLUND. 2005.** Determination of banned azo dyes in consumer goods. Trends in Analytical Chemistry, vol.24, no.1.

**AHLSTROM, L-H., J. RAAB, L. MATHIASSEN. 2005.** Application of standard addition methodology for the determination of banned azo dyes in different leather types. Analytica Chimica Acta, 552:76-80.

**ASU B-82.02/2. 1998-01.** Nachweis der Verwendung Bestimmter Azofarbstoffe aus textilen Bedarfsgegenständen. Beuth Verlag, 10772 Berlin.

**'BAKER'-10 SPE Applications Guide. 1984.** Vol.2, p.96-110.

**BELITZ, H.-D., W. GROSCH, P. SCHIEBERLE. 2004.** Food Chemistry 3rd revised Edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. p.393,787,792.

**BHASKAR, M., A.GNANAMANI, R.J.GANESHJEEVAN, R.CHANDRASEKAR, S.SADULLA, G.RADHAKRISHNAN. 2003.** Analyses of carcinogenic aromatic amines released from harmful azo colorants by Streptomyces SP. SS07. Journal of Chromatography A, 1018:117-123.

**BHASKAR,M., P.ARUNA, R.J.G.JEEVAN, G.RADHAKRISHNAN. 2004.**  $\beta$ -Cyclodextrin-polyurethane polymer as solid phase extraction material for the analysis of carcinogenic aromatic amines. Analytica Chimica Acta, 509:39-45.

**BOBROV, N. 1975.** Ju Lurie Handbook of Analytical Chemistry, Moscow. p.254.

**CALBIANI, F., M. CARERI, L. ELVIRI, A. MANGIA, L. PISTARA, I. ZAGNONI. 2004.** Development and in-house validation of a liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of Sudan I, Sudan II, Sudan III and Sudan IV in hot chilli products. *Journal of Chromatography A*, 1042:123-130.

**CALBIANI, F., M. CARERI, L. ELVIRI, A. MANGIA, I. ZAGNONI. 2004.** Accurate mass measurements for the confirmation of Sudan-azo dyes in hot chilli products by capillary liquid chromatography-electrospray tandem quadrupole orthogonal-acceleration time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1058:127-135.

**CHANG, W-Y., Y-H. SUNG, S-D. HUANG. 2003.** Analysis of carcinogenic aromatic amines in water samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 495:109-122.

**CHANLON, S., L. JOLY-POTTUZ, M. CHATELUT, O. VITTORI, J.L. CRETIER. 2005.** Determination of Carmoisine, Allura red and Ponceau 4R in sweets and soft drinks by differential pulse polarography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18:503–515.

**CHIANG, T-A., W. PEI-FEN, L.S. YING, L-F. WANG, Y.C. KO. 1999.** Mutagenicity and aromatic amine content of fumes from heated cooking oils produced in Taiwan. *Food and Chemical Toxicology*, 37:125-134.

**CIONI, F., G. BARTOLUCCI, G. PIERACCINI, S. MELONI, G. MONETI. 1999.** Development of a solid phase microextraction method for detection of the use of banned azo dyes in coloured textiles and leather. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 13:1833-1837.

**CISNEROS, R.L., A.G. ESPINOZA, M.I. LITTER. 2002.** Photodegradation of an azo dye of the textile industry. *Chemosphere*, 48:393-399.

**COMMISSION DECISION. 2003.** On Emergency Measures Regarding Hot Chilli And Hot Chilli Products. **2003/460/EC.**

**COMMISSION DECISION. 2004.** On Emergency Measures Regarding Chilli And Chilli Products. **2004/92/EC.**

**CORNET, V., Y. GOVAERT, G. MOENS, J.V. LOCO, J-M. DEGROODT. 2006.** Development of a fast analytical method for the determination of sudan dyes in chilli- and curry-containing foodstuffs by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:639-644.

**CSIKTUSNADI KISS,G.A., E.FORGACS, T.CSERHATI, T.MOTA, H.MORAIS, A.RAMOS. 2000.** Optimisation of the microwave-assisted extraction of pigments from paprika (*Capsicum annum L.*) powders. *Journal of Chromatography A*, 889:41–49.

**DAVIES, L.C., I.S. PEDRO, J.M. NOVAIS, S. MARTINS-DIAS. 2006.** Aerobic degradation of acid orange 7 in a vertical-flow constructed wetland. *Water Research*, 40:2055-2063.

**DI DONNA, L., L. MAIUOLO, F. MAZZOTTI, D. DE LUCA, G. SINDONA. 2004.** Assay of sudan I contamination of foodstuff by atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry and isotope dilution. *Analytical Chemistry*, 76(17):5104-5108.

**DEMİR, C. 2003.** Kemometri Yaz Okulu-I Ders Notları. Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü-Tübitak Bursa Test ve Analiz Laboratuvarı. Bursa, 30 Haziran-4 Temmuz 2003. s.5-15.

**DOS SANTOS, A.B., M.P. DE MADRID, F.A.M. DE BOK, A.J.M. STAMS, J.B. VAN LIER, F.J. CERVANTES. 2006.** The contribution of fermentative bacteria and methanogenic archaea to azo dye reduction by a thermophilic anaerobic consortium. *Enzyme and Microbial Technology*, 39:38–46.

**ESKILSSON, C.S., R. DAVIDSSON, L. MATHIASSEN. 2002.** Harmful azo colorants in leather Determination based on their cleavage and extraction of corresponding carcinogenic aromatic amines using modern extraction techniques. *Journal of Chromatography A*, 955:215-227.

**FENG, W., D. NANSHENG, H. HELIN. 2000.** Degradation mechanism of azo dye C. I. reactive red 2 by iron powder reduction and photooxidation in aqueous solutions. *Chemosphere*, 41:1233-1238.

**GARRIGOS, M.C., F. RECHE, M.L. MARIN, A. JIMENEZ. 2002.** Determination of aromatic amines formed from azo colorants in toy products. *Journal of Chromatography A*, 976:309-317.

**GARRIGOS, M.C., F. RECHE, M.L. MARIN, K. PERNIAS, A. JIMENEZ. 2002.** Optimization of the extraction of azo colorants used in toy products. *Journal of Chromatography A*, 963:427-433.

**GHANADZADEH, A., H. GHANADZADEH, G. GHASMI. 2000.** On the molecular structure and aggregative properties of sudan dyes in the anisotropic host. *Journal of Molecular Liquids*, 88:299-308.

**GNANAMANI, A., M. BHASKAR, R. GANGA, G. SEKARAN, S. SADULLA. 2004.** Chemical and enzymatic interactions of Direct Black 38 and Direct Brown 1 on release of carcinogenic amines. *Chemosphere*, 56:833-841.



**GNANAMANI, A., M. BHASKAR, R. GANESHJEEVAN, R. CHANDRASEKAR, G. SEKARAN, S. SADULLA, G. RADHAKRISHNAN. 2005.** Enzymatic and chemical catalysis of xylydine ponceau 2R and evaluation of products released. *Process Biochemistry*, 40:3497–3504.

**GOLKA, K., S. KOPPS, Z. W. MYSLAK. 2004.** Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. *Toxicology Letters*, 151:203-210.

**GULTEKİN, I., N. H. INCE. 2006.** Degradation of aryl-azo-naphthol dyes by ultrasound, ozone and their combination: Effect of  $\alpha$ -substituents. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13:208–214.

**HSUEH, C. L., Y. H. HUANG, C. C. WANG, C. Y. CHEN. 2005.** Degradation of azo dyes using low iron concentration of Fenton and Fenton-like system. *Chemosphere*, 58:1409–1414.

## İNTERNET KAYNAKLARI

[http://www.chem.arizona.edu/massspec/intro\\_html/intro.html](http://www.chem.arizona.edu/massspec/intro_html/intro.html)

<http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtualText/Spectrpy/MassSpec/masspec1.htm>

<http://minyos.its.rmit.edu.au/~rcmfa/>

<http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms.html>

<http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/MStut/mstutorial.htm>

<http://www.oberlin.edu/chem/Secondary/ExpDev/GCMSIntro.pdf>

[http://ch309c.chem.lsu.edu/mswiki/index.php/Liquid\\_chromatography-mass\\_spectrometry](http://ch309c.chem.lsu.edu/mswiki/index.php/Liquid_chromatography-mass_spectrometry)

<http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/hplcms.html>

[http://faculty.kutztown.edu/betts/html/UV\\_Vis\\_Absorbance.htm](http://faculty.kutztown.edu/betts/html/UV_Vis_Absorbance.htm)

<http://mst.dk/udgiv/publications/1999/87-7909-548-8/pdf/87-7909-546-1.pdf>

<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidheavy.jsp>

<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>

**INOUE, M., F. OKADA, A. SAKURAI, M. SAKAKIBARA. 2006.** A new development of dyestuffs degradation system using ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13:313–320.

**JODYNIS-LIEBERT, J., H.A.H. BENNASIR. 2000.** Gas chromatographic method for the determination of toluidines in spiked urine samples. *Journal of Chromatography B*, 738:427-430.

**KHEHRA, M.S., H.S. SAINI, D.K. SHARMA, B.S. CHADHA, S.S. CHIMNI. 2006.** Biodegradation of azo dye C.I. Acid Red 88 by an anoxic-aerobic sequential bioreactor. *Dyes and Pigments*, 70:1-7.

**KRAJAYKLANG, M., A. KLIEBER, P.R. DRY. 2000.** Colour at harvest and post-harvest behaviour influence paprika and chilli spice quality. *Postharvest Biology and Technology*, 20:269-278.

**KUMAR, K., S. SARAVANA DEVI, K. KRISHNAMURTHI, S. GAMPAWAR, N. MISHRA, G.H.PANDYA, T.CHAKRABARTI. 2006.** Decolorisation, biodegradation and detoxification of benzidine based azo dye. *Bioresource Technology*, 97:407-413.

**LESS, M., T.C. SCHMIDT, E. VON LÖW, G. STORK. 1998.** Gas chromatographic determination of aromatic amines in water samples after solid-phase extraction and derivatization with iodine II. Enrichment. *Journal of Chromatography A*, 810:173-182.

**MA, M., X. LUO, B. CHEN, S. SU, S. YAO. 2006.** Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1103:170-176.

**MARSHALL, P.N. 1977.** Thin-layer chromatography of Sudan dyes. *Journal of Chromatography A*, 136(2):353-357.

**MAZZETTI, M., R. FASCIOLI, I. MAZZONCINI, G. SPINELLI, I. MORELLI, A. BERTOLI. 2004.** Determination of 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) in chilli powder and in chilli-containing food products by GPC clean-up and HPLC with LC/MS confirmation. *Food Additives and Contaminants*, 21(10):935-941.

**MEYER, L.H. 1961.** *Food Chemistry*, Reinhold Publishing Corporation, United States of America. p.233.

**MODIRSHAHLA, N., M.A. BEHNAJADY. 2006.** Photooxidative degradation of Malachite Green (MG) by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Influence of operational parameters and kinetic modeling. *Dyes and Pigments*, 70:54-59.

**MORTENSEN, S.K., X.T. TRIER, A. FOVERSKOV, J.H. PETERSEN. 2005.** Specific determination of 20 primary aromatic amines in aqueous food simulants by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1091:40-50.

**NACHIYAR, C.V., G.S. RAJAKUMAR. 2004.** Mechanism of Navitan Fast Blue S5R degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemosphere*, 57:165-169.

**OH, S.W., M.N. KANG, C.W. CHO, M.W. LEE. 1997.** Detection of carcinogenic amines from dyestuffs or dyed substrates. *Dyes and Pigments*, 33:119-135.

**PERVA-UZUNALIC, A., M. SKERGET, B. WEINREICH, Z. KNEZ. 2004.** Extraction of chilli pepper (var. Byedige) with supercritical CO<sub>2</sub>: Effect of pressure and temperature on capsaicinoid and colour extraction efficiency. *Food Chemistry*, 87:51-58.

**PIELESZ, A. 1999.** The process of the reduction of azo dyes used in dyeing textiles on the basis of infrared spectroscopy analysis. *Journal of Molecular Structure*, 511-512:337-344.

**PIELESZ, A., A. WLOCHOWICZ, W. BINIAS. 2000.** The evaluation of structural changes in wool fibre keratin treated with azo dyes by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A*, 56:1409-1420.

**PIELESZ, A., A. WLOCHOWICZ. 2001.** Semiempirical infrared spectra simulations for some aromatic amines of interest for azo dye chemistry. *Spectrochimica Acta Part A*, 57:2637-2646.

**PIELESZ, A., I. BARANOWSKA, A. RYBAK, A. WLOCHOWICZ. 2002.** Detection and determination of aromatic amines as products of reductive splitting from selected azo dyes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53:42-47.

**PINHEIROA, H.M., E. TOURAUD, O. THOMAS. 2004.** Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. *Dyes and Pigments*, 61:121–139.

**PLUM, A., W. ENGEWALD, A. REHOREK. 2003.** Rapid qualitative pyrolysis GC-MS analysis of carcinogenic aromatic amines from dyed textiles. *Chromatographia Supplement* 57:S243-S248.

**PUOCI, F., C. GARREFFA, F. IEMMA, R. MUZZALUPO, U.G. SPIZZIRRI, N. PICCI. 2004.** Molecularly imprinted solid phase extraction for detection of sudan I in food matrices. *Food Chemistry*, 93(2):349-353.

**SINGH, V., M. GUPTA, A. JAIN, K.K. VERMA. 2003.** Determination of aromatic primary amines at  $\mu\text{g l}^{-1}$  level in environmental waters by gas chromatography–mass spectrometry involving N-allyl-N'-arylthiourea formation and their on-line pyrolysis to aryl isothiocyanates. *Journal of Chromatography A*, 1010:243–253.

**SKOOG, D., F.J. HOLLER, T.A. NIEMAN. 1998.** *Enstrümantal Analiz İlkeleri*, Bilim Yayıncılık, Ankara. s.253-258,330,331,332,335,499,500,502,509,512,524-528.

**SMITH, C.J., G.L. DOOLY, S.C. MOLDOVEANU. 2003.** New technique using solid-phase extraction for the analysis of aromatic amines in mainstream cigarette smoke. *Journal of Chromatography A*, 991:99-107.

**SPONZA, D.T., M. IŞIK. 2005.** Toxicity and intermediates of C.I. Direct Red 28 dye through sequential anaerobic/aerobic treatment. *Process Biochemistry*, 40:2735–2744.

**STIBOROVA, M., B. ASFAW, E. FREI, H.H. SCHMEISER, M. WIESSLER. 1995.** Benzenediazonium ion derived from sudan-I forms an 8-(phenylazo)guanine adduct in DNA. *Chemical Research in Toxicology*, 8(4):489-498.

**STIBOROVA, M., B. ASFAW, P. ANZENBACHER. 1988.** Activation of carcinogens by peroxidase Horseradish peroxidase-mediated formation of benzenediazonium ion from a non-aminoazo dye, 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene (Sudan I) and its binding to DNA. *FEBS LETTERS*, 232(2):387-390.

**STIBOROVA, M., H.H. SCHMEISER, E. FREI. 1999.** Prostaglandin H synthase-mediated oxidation and binding to DNA of a detoxication metabolite of carcinogenic Sudan I, 1-(phenylazo)-2,6-dihydroxynaphthalene. *Cancer Letters*, 146:53-60.

**STIBOROVA, M., V. MARTINEK, H. RYDLOVA, P. HODEK, E. FREI. 2002.** Sudan I is a potential carcinogen for humans: Evidence for its metabolic activation and detoxication by human recombinant cytochrome P450 1A1 and liver microsomes. *Cancer Research*, 62(20):5678-5684.

**STIBOROVA, M., V. MARTINEK, H. RYDLOVA, T. KOBLAS, P. HODEK. 2005.** Expression of cytochrome P450 1A1 and its contribution to oxidation of a potential human carcinogen 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) in human livers. *Cancer Letters*, 220:145-154.

**TATEO, F., M. BONONI. 2004.** Fast determination of sudan I by HPLC/APCI-MS in hot chilli spices, and oven-baked foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:655-658.

**TRIPATHI, M., S.K. KHANNA, M. DAS. 2007.** Surveillance on use of synthetic colours in eatables vis a vis Prevention of Food Adulteration Act of India. *Food Control*, 18:211-219.

**WAITE, S., D. HANSEN, M. MCGINLEY. 2006.** Easy isocratic HPLC determination of Sudan dyes. *LC GC NORTH AMERICA*, 46-46 Suppl. S.

**WEISS, T., J. ANGERER. 2002.** Simultaneous determination of various aromatic amines and metabolites of aromatic nitro compounds in urine for low level exposure using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 778:179–192.

**WEISBURGER, J.H. 2002.** Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. *Mutation Research*, 506-507:9-20.

**WU, L.P., Y.F. LI, C.Z. HUANG, Q. ZHANG. 2006.** Visual detection of sudan dyes based on the plasmon resonance light scattering signals of silver nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 78(15):5570-5577.

**WOJNAROVITS, L., T. PALFI, E. TAKACS, S.S. EMMI. 2005.** Reactivity differences of hydroxyl radicals and hydrated electrons in destructing azo dyes. *Radiation Physics and Chemistry*, 74(3-4):239–246.

**ZATAR, N.A., A.Z. ABU-ZUHRI, A.A. ABU-SHAWEESH. 1998.** Spectrophotometric determination of some aromatic amines. *Talanta*, 47:883-890.

**ZHANG, Y.P., Y.J. ZHANG, W.J. GONG, A.I. GOPALAN, K-P. LEE. 2005.** Rapid separation of Sudan dyes by reverse-phase high performance liquid chromatography through statistically designed experiments. *Journal of Chromatography A*, 1098:183-187.

**ZHANG, S-J., H-Q. YU, Q-R. LI. 2005.** Radiolytic degradation of Acid Orange 7: A mechanistic study. *Chemosphere*, 61:1003-1011.

**ZHAO, W., H. SHI, D. WANG. 2004.** Ozonation of Cationic Red X-GRL in aqueous solution: degradation and mechanism. *Chemosphere*, 57:1189–1199.

**EKLER****TEZ KAPSAMINDA GERÇEKLEŞTİRİLEN BİLİMSEL FAALİYETLER****KONGRELER**

Ümran SEVEN, Şeref GÜÇER; “Biber Salçasına Katılan Sudan Boyalarının Karakterizasyonu ve Sudan I' in (1-Fenilazo-2-naftol) GC-MS İle Kantitatif Olarak Belirlenmesi”, **III. ULUSAL ANALİTİK KİMYA KONGRESİ**, 5-7 Temmuz 2006, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, ÇANAKKALE. Bildiri Özetleri, s.57.

Ümran SEVEN, Nihan KOYUNCU, Şeref GÜÇER; “Characterization Studies of Sudan Dyes in Chilli Products by Chromatographic Methods” **5<sup>th</sup> AEGEAN ANALYTICAL CHEMISTRY DAYS**, 5-8 October 2006, Aristotle University of Thessaloniki, Chemistry Department, , Thessaloniki/GREECE. Book of Abstracts, p.80.



## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisansım ve tez çalışmam boyunca bilimsel bakış açısı edinmemi sağlayan, öğrencisi olduğum için her zaman gurur duyduğum ve gurur duyacağım, hayatım boyunca her yönü ile hep örnek alacağım, tezimin en büyük mimarı, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Şeref GÜÇER'e tüm emekleri, katkıları, ilgi ve sevgisi için sonsuz teşekkür ederim.

Yardımlarını, sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen ve tez çalışmalarım boyunca her zaman olumlu katkıları ile destek olan; yardımseverliği, pozitif ve sonsuz sevgi dolu kişiliği ile örnek alacağım Sayın Yrd.Doç.Dr. Belgin İZGİ'ye;

Manevi ablam olarak gördüğüm Araş.Gör. Elif TÜMAY ÖZER'e;

Deneysel çalışmalarım boyunca gösterdikleri katkıları hiçbir zaman unutamayacağım, başta Nihan KOYUNCU ve Murat KAYAR olmak üzere, tüm Tübitak-Bursa Test ve Analiz Laboratuvarı çalışanlarına;

Yardımseverlikleri anlatmakla bitirilemeyecek olan ve kendilerini tanıdığım için yaşadığım mutluluğu tarif edemeyeceğim, her zaman olumlu katkılarını ve karşılıksız yardımlarını gördüğüm; bu nedenle de ayrı yerleri olan Araş.Gör. Yeliz FATURACI, Araş.Gör. Hasene MUTLU ve Araş.Gör.Bilgen OSMAN' a;

Lisans öğrenimimden başlayarak hep yanımda olan değerli arkadaşım Aylin Öztürk'e;

Geç tanımış olsam da manevi olarak yanımda olduklarını hissettiren arkadaşlarım Gülsüm Ekici ve Neslihan Fındıkkaya'ya;

Ve tabi ki bugünlere gelmemde en büyük katkısı olan başta biricik anneciğim olmak üzere aileme;

Sonsuz teşekkür ederim.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1982 yılında Kelkit/Gümüşhane’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Aliğa/İzmir’ de tamamladı. 1999 yılında Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2003 yılında Fen-Edebiyat Fakültesi Birincisi ve Kimya Bölümü Birincisi olarak mezun oldu. Aynı yıl, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Bilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Ocak 2005 yılından itibaren de Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.