

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**AZAFLAVANON-3-OL BİLEŞİĞİ İLE YENİ BİR SPEKTROFLORİMETRİK  
DEMİR TAYİNİ METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Kimyager Aysel BAŞOĞLU**

**HAZİRAN 2014**

**TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**AZAFLAVANON-3-OL BİLEŞİĞİ İLE YENİ BİR SPEKTROFLORİMETRİK**  
**DEMİR TAYİNİ METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ**

**Kimyager Aysel BAŞOĞLU**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde**  
**“ DOKTOR (KİMYA)”**  
**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 23.05.2014**  
**Tezin Savunma Tarih : 13.06.2014**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ümmühan OCAK**

**Trabzon 2014**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Kimya Anabilim Dalında**

**Aysel BAŞOĞLU tarafından hazırlanan**

**AZAFLAVANON-3-OL BİLEŞİĞİ İLE YENİ BİR SPEKTROFLORİMETRİK  
DEMİR TAYİNİ METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 27/ 05 / 2014 gün ve 1555 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda  
DOKTORA TEZİ  
olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Prof. Dr. Esmâ KILIÇ** .....

**Üye : Prof. Dr. Ümmühan OCAK** .....

**Üye : Prof. Dr. Hasan Basri ŞENTÜRK** .....

**Üye : Prof. Dr. Münevver SÖKMEN** .....

**Üye : Doç. Dr. Hasan GENÇ** .....

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, 10481 kodlu proje ile KTÜ-Bilimsel Araştırma Projeleri (KTÜ-BAP) tarafından desteklenmiştir.

Doktora Tez çalışmam süresince değerli zamanlarını bana ayıran, desteğini, emeğini, bilgi ve tecrübesini hiçbir zaman benden esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ümmühan OCAK'a sabrı, ilgisi ve emekleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında ilgi ve yardımlarını gördüğüm Sayın Prof. Dr. Halit KANTEKİN ve Sayın Doç. Dr. Miraç OCAK hocalarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarımda kullandığım ligandın sentezlenmesini ve karakterizasyonunu gerçekleştiren Sayın Prof. Dr. Nurettin YAYLI'ya ve Arş. Gör. Gonca TOSUN'a teşekkür ederim.

İletkenlik ölçümlerimi gerçekleştirmemde yardımcı olan Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Kerim SERBEST'e, kompleksin teorik kararlılığını hesaplama çalışmalarını gerçekleştiren Sayın Prof. Dr. İsmail DEĞERMENCİOĞU'na ve numune çözünürleştirilmesi konusunda yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Celal DURAN'a ve yüksek lisans öğrencisi Süreyya TUMAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen çalışma grubumuzdan doktora öğrencisi arkadaşlarım Yasemin ÇAĞLAR'a, Semanur PARLAYAN'a ve yüksek lisans öğrencisi Serhat GÜN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tüm eğitim-öğretim ve akademik hayatım boyunca sevgilerini, maddi ve manevi desteklerini ve kıymetli zamanlarını benim için harcayan, canım ailem ve ablam Filiz'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu çalışma süresi boyunca gösterdikleri sabır ve anlayış için sevgili eşim Mehmet'e ve dünya tatlısı oğlum Murat Efe'ye çok teşekkür ederim.

Aysel BAŞOĞLU

Trabzon, 2014

## TEZ BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Azaflavanon-3-ol BileŖiđi ile Yeni Bir Spektroflorimetrik Demir Tayini Metodunun GeliŖtirilmesi” baŖlıklı bu alıŖmayı baŖtan sona kadar danıŖmanım Prof. Dr. Ümmühan OCAK’ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, baŖka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, alıŖma sürecinde bilimsel araŖtırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 27/05/ 2014

Aysel BAŖOđLU

## İÇİNDEKİLER

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VIII
SUMMARY.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XIII
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XV
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş ve Çalışmanın Amacı.....	1
1.2. Işın Absorpsiyonu ve Lambert-Beer Kanunu.....	4
1.3. Moleküler Lüminesans Spektroskopisi.....	5
1.3.1. Floresansın Temeli.....	6
1.3.2. Floresans Ömrü ve Kuantum Verimi.....	12
1.3.3. Floresans Sönüm.....	12
1.3.4. Floresansı Etkileyen Faktörler.....	14
1.3.5. Spektroflorimetri.....	15
1.3.6. Floresans Özellik Gösteren Floresent Bileşikler.....	15
1.3.7. Floroiyonoforlar.....	17
1.4. Moleküler Floresans Spektroskopisinin Uygulama Alanları.....	19
1.5. Moleküler Sensörler.....	20
1.5.1. Katyon Bağlayıcı Floresent Sensörler.....	22
1.5.2. Katyon Bağlayıcı Floresent Sensörlerin Çalışma Mekanizmaları.....	23
1.5.2.1. PET Sensörler.....	23
1.5.2.2. PCT Sensörler.....	25
1.6. Demirin İnsan Hayatındaki Önemi.....	26
1.7. Fenolik Bileşikler.....	27
1.7.1. Flavonoidlerin Yapısı ve Oluşumları.....	28
1.8. Flavonoidlerin Özellikleri ve Kullanım Alanları.....	31

1.9.	Metot Validasyonu .....	31
1.9.1.	Doğruluk .....	32
1.9.2.	Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik .....	32
1.9.3.	Seçimlilik ve Duyarlılık .....	33
1.9.4.	Gözlenebilme Sınırı (GS, LOD) .....	33
1.9.5.	Tayin sınırı (TS, LOQ).....	33
1.9.6.	Çalışma Aralığı .....	34
1.10.	Floresans Spektrometrisi ile Elementlerin Kantitatif Tayini .....	34
1.10.1.	Dış Kalibrasyon Doğrusu Yöntemi .....	34
1.10.2.	Standart Ekleme Yöntemi .....	34
1.11.	Literatür Özeti .....	35
1.11.1.	Demir Tayini İçin Önerilen Floresent Sensörler .....	35
1.11.2.	Gerçek Numunelerde Demir Tayininde Kullanılan Floresent Sensörler .....	41
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	49
2.1.	Kullanılan Cihazlar .....	49
2.2.	Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	50
2.3.	Kullanılan Ligant .....	50
2.4.	Ligant Çözeltisinin Hazırlanması.....	51
2.5.	Anyon ve Katyon Çözeltilerinin Hazırlanması .....	51
2.6.	Gıda ve İlaç Numunelerinin Temini .....	51
2.7.	Gıda Numunelerinin ve Standart Referans Materyallerin Mikrodalga Çözünürleştirme Sistemiyle Çözünürleştirilmesi.....	52
2.8.	Maltofer Fol ve Ferrum Fort İlaç Tabletlerinin Yaş Yakma Yöntemi ile Çözünürleştirilerek Analize Hazırlanması .....	53
2.9.	Deresuyu Numunesinin Analize Hazırlanması .....	53
2.10.	Yöntem Geliştirme .....	53
3.	BULGULAR .....	55
3.1.	Spektrofotometrik Ölçümler .....	55
3.1.1.	Çözücü Seçimi .....	55
3.1.1.	Ligant Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....	56
3.1.2.	Ligandın Absorpsiyon Spektrumuna İyonların Etkisi.....	57
3.2.	Spektroflorimetrik Ölçümler .....	59
3.2.1.	Çözücüsü Seçimi .....	59
3.2.2.	Uyarma Dalga Boyunun Belirlenmesi .....	60
3.2.3.	Ligant Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....	60

3.2.4.	Ligandın Floresans Şiddetine pH'ın Etkisi .....	61
3.2.5.	Ligandın Floresans Spektrumuna İyonların Etkisi.....	62
3.2.6.	Yabancı İyon Etkisi.....	65
3.2.7.	Job Metodu ile Ligant-Fe <sup>3+</sup> Kompleks Bileşiminin Belirlenmesi .....	68
3.2.8.	Kompleksin Floresans Şiddetine Zamanın Etkisi .....	68
3.2.9.	Uygun Çalışma pH Aralığının Tespiti .....	69
3.2.10.	Kararlılık Sabiti Tayini .....	70
3.2.11.	Stern-Volmer Grafiği .....	73
3.2.11.1.	Stern-Volmer Grafiğinin Sıcaklıkla Değişimi .....	75
3.2.12.	Fe <sup>3+</sup> İyonu İçin Doğrusal Aralık ve Lambert-Beer Kanunu'ndan Sapma.....	76
3.3.	Uygulanan Modifiye Standart Ekleme Yöntemi.....	78
3.3.1.	Sabit Standart Konsantrasyonunun Optimizasyonu.....	79
3.4.	Geliştirilen Metodun Validasyonu .....	80
3.4.1.	Doğruluk .....	80
3.4.2.	Kesinlik .....	81
3.4.3.	Gözlenebilme Sınırı (GS).....	81
3.4.4.	Tayin sınırı (TS).....	82
3.4.5.	Tayin Aralığı .....	82
3.5.	Sertifikalı Referans Materyal Uygulamaları ve Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	82
3.6.	Demir Tableti Uygulamaları ve Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	83
3.7.	Gerçek Numune Uygulamaları ve İstatistiksel Değerlendirilmeleri.....	84
3.8.	Standart Referans Materyallerin Analizi Sonuçları .....	86
3.9.	Gerçek Numunelerin Demir Analizi Sonuçları.....	87
3.10.	Deresuyu Numunelerinde Geri Kazanım Çalışmaları.....	88
3.11.	Geliştirilen Yönteme Göre Demir Tayinindeki Optimum Şartlar.....	89
4.	TARTIŞMA .....	90
5.	SONUÇLAR .....	102
6.	KAYNAKLAR .....	103

ÖZGEÇMİŞ



Doktora Tezi

ÖZET

AZAFLAVANON-3-OL BİLEŞİĞİ İLE YENİ BİR SPEKTROFLORİMETRİK DEMİR  
TAYİNİ METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ

Aysel BAŞOĞLU

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ümmühan OCAK

2014, 112 Sayfa, 3 Ek Sayfa

Bu çalışmada, literatürde son zamanlarda bildirilen bir azaflavanon-3-ol bileşiği kullanılarak demir tayini için yeni bir spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. Ligant 375 nm’de uyarılmış, 400-650 nm arasında emisyon şiddetleri kaydedilmiş ve maksimum emisyon dalga boyu 503 nm olarak belirlenmiştir Yapılan spektrofotometrik titrasyonlarda ligandın artan  $Fe^{3+}$  iyonuna karşı 1,44 - 71,04 mg/L aralığında doğrusal cevap verdiği görülmüştür. Ligandın  $Fe^{3+}$  iyonu ile metanol:su ortamında 1:1 kompleksi oluşturduğu Job Metodu kullanılarak belirlenmiştir. Demir tayini için geliştirilen metotta modifiye bir standart ekleme yöntemi kullanılmıştır. Yöntemin gözlenebilirlik sınırı 0,81 mg/L ve tayin sınırı 2,43 mg/L olarak hesaplanmıştır. Metodun doğruluğu sertifikalı referans materyallerin analizi ile belirlenmiştir. Bu yöntem ıspanak, nane, dereotu, semizotu, roka, kurufasülye ve kırmızı mercimek numunelerine ve bunun yanında iki farklı demir ilacı tabletine uygulanmıştır. Bu ölçümlerin tümü için % bağıl standart sapma (BSS) 2,0’ın altında bulunmuştur. Ayrıca dere suyu örneğinde % geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. % Geri kazanımlar 98’in üzerinde bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler** :Azaflavanon-3-ol, Ligant, Spektrofotometrik titrasyon, Sönüm, Standart ekleme yöntemi, Demir tayini, İlaç, Gıda

Phd. Thesis

SUMMARY

A NOVEL SPECTROFLUORIMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF IRON  
WITH AZAFLAVANONE-3-OL COMPOUNDS

Aysel BAŞOĞLU

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Chemistry Graduate Program

Supervisor: Prof. Dr. Ümmühan OCAK

2014, 112 Pages, 3 Appendix Pages

In this study, a new spectrofluorimetric method for determination iron that applied to real sample by using recently reported 2-(4-floromophenyl)-3-hydroxy-2,3-dihydroquinolin-4(1H)-one compound, that have been devoloped. The fluorescence spectrum of the ligand give strong monomer emission at 503 nm when excites at 375 nm. The obtained results from the fluorimetric titration of the ligand with increasing  $Fe^{3+}$  ions concentration, it was seen that the ligand at pH 7,0 with  $Fe^{3+}$  ion gave the linear response of flouescence. The binding assay of  $Fe^{3+}$  ion were determined using the method of continuous variations (Job's plots), which resulted with 1:1 stoichiometry with the ligand. The proposed method contains a modified standart addion method. In order to commentate the analytical performance of the new methods, the linear range, the values of limit of dedection and the values of limit of quantification have been calculated respectively as 1,44 – 21,64 mg/L, 0,81 mg/L and 2,43 mg/L. Additionally, checking the accuracy of methods the certified reference materials were analyzed. This method was applied to the determination of iron in spinach, mint, dill, rocket, purslane, red lentil and haricot bean samples and two different iron tablets with RSS % values below than 2,0. For the determination of iron in stream water samples including the concentrated matrix was tested in the recovery studies by adding the known amounts of iron. The recoveries obtained for the stream water samples was upper than 98 %.

**Key Words:** Azaflavanon-3-ol, Ligand, Spectroflorimetric titration, Quenching, Standart addition method, Determination of iron, Food, Medicine

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1. 1. Elektronik yapıların gösterimi .....	6
Şekil 1. 2. Floresans ve fosforesans için Jablonski enerji diyagramı .....	7
Şekil 1. 3. Floresans Basamakları .....	9
Şekil 1. 4. Fosforesans basamakları .....	9
Şekil 1. 5. Monomoleküler deaktivasyon prosesleri.....	10
Şekil 1. 6. Bimoleküler deaktivasyon prosesleri .....	11
Şekil 1. 7. Statik Sönümlenme Mekanizması .....	13
Şekil 1. 8. Dinamik ve statik sönümlemenin sıcaklığa bağlılığı.....	13
Şekil 1. 9. Bazı tipik floresent bileşiklerin yapısı ve floresans ışımaları.....	16
Şekil 1. 10. Bazı floresent gruplar .....	17
Şekil 1. 11. Floresent moleküler sensörlerin temel görüntüsü .....	18
Şekil 1. 12. Çeşitli floroiyonoforların şematik gösterimleri.....	19
Şekil 1. 13. Konak - konuk etkileşimi ile moleküler sensör gösterimi.....	21
Şekil 1. 14. Katyon bağlayıcı floresent moleküler sensörlerin şeması.....	22
Şekil 1. 15. Metal katyonu ile ışına dayalı elektron transferindeki (PET) değişim.....	24
Şekil 1. 16. PCT sensörlerde bir katyonun elektron veren veya alan grupla etkileşimi sonucu oluşan spektral kaymalar .....	25
Şekil 1. 17. Sırasıyla Flavan halkası, fenil benzopiron ve flavonoidlerin genel yapısı,.....	29
Şekil 1. 18. Flavonoidlerin iskelet yapıları.....	30
Şekil 1. 19. Reseptörün $Fe^{3+}$ ve $I^-$ iyonlarına bağlanması .....	35
Şekil 1. 20. Üzüm kabuğunda bulunan ve $Fe^{3+}$ iyonunu tayini için önerilen Antosiyanin bileşiği .....	36
Şekil 1. 21. $Fe^{3+}$ tayini için önerilen benzimidazol ve antrasen iki floresent grup içeren bir bileşik.....	37
Şekil 1. 22. $Fe^{3+}$ tayini için önerilen 2-hidroksi-1-naftaldehit'in 4-feniltiyosemikarbazit ile reaksiyonu ile oluşan sensör bileşik .....	37

Şekil 1. 23. Naftalen floroforu taşıyan aminodihidroksamik asit bileşiğinin $Fe^{3+}$ iyonu ile muhtemel kompleksi .....	38
Şekil 1. 24. $Fe^{3+}$ tayini için önerilen metoksikumarin floroforu taşıyan floroionofor bileşik .....	39
Şekil 1. 25. $Fe^{3+}$ tayini için önerilen naftalen floroforu taşıyan floroionofor bileşik.....	39
Şekil 1. 26. $Fe^{3+}$ tayini için önerilen rodamin esaslı floresent bir bileşik.....	41
Şekil 1. 27. $Fe^{3+}$ tayini için önerilen Rodamin esaslı bir kemosensör.....	42
Şekil 1. 28. $Fe^{3+}$ tayini için önerilen 4-hidroksikinolin .....	43
Şekil 1. 29. $Fe^{3+}$ tayini için önerilen RDI-1 ve RDI-2 bileşikleri.....	43
Şekil 1. 30. $Fe^{3+}$ tayini için önerilen salisilik asit.....	44
Şekil 1. 31. $Fe^{3+}$ tayini için önerilen 2-(4-(2,2-Bipridin-5-il)fenil)-1H-fenantro[9,10-d]imidazole .....	45
Şekil 1. 32. $Fe^{3+}$ tayini için önerilen 4-hidroksikinolin 1-naftol-2 sulfonat'ın potasyum tuzu.....	45
Şekil 2. 1. 2-(4-florofenil)-3-hidroksi-2,3-dihidrokinolin-4(1H)-on bileşiği .....	51
Şekil 3. 1. Ligandın $1,3 \times 10^{-5}$ M konsantrasyonda farklı çözücü sistemlerinde alınan absorpsiyon spektrumları.....	55
Şekil 3. 2. Farklı konsantrasyonlardaki ligandın metanol:su (1:1) çözücü karışımında absorpsiyon spektrumları.....	56
Şekil 3.3. $Li^+$ , $Na^+$ , $K^+$ , $Mg^{2+}$ , $Ca^{2+}$ , $Sr^{2+}$ , $Ba^{2+}$ , $Al^{3+}$ , $Sn^{2+}$ , $Pb^{2+}$ , $Cr^{3+}$ , $Mn^{2+}$ , $Fe^{2+}$ , $Fe^{3+}$ , $Co^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Ag^+$ , $Zn^{2+}$ , $Cd^{2+}$ ve $Hg^{2+}$ metal katyonlarının ligandın absorpsiyon spektrumuna etkisinin incelenmesi. [iyon]: $1,3 \times 10^{-4}$ M, [Ligant]: $1,3 \times 10^{-5}$ M .....	57
Şekil 3. 4. $F^-$ , $Cl^-$ , $Br^-$ , $I^-$ , $CH_3COO^-$ , $HCO_3^-$ , $HSO_4^-$ , $H_2PO_4^-$ , $CN^-$ , $SCN^-$ , $NO_3^-$ , $C_2O_4^{2-}$ , $CO_3^{2-}$ , $SO_4^{2-}$ , $S_2O_7^{2-}$ , $Cr_2O_7^{2-}$ ve $CrO_4^{2-}$ anyonlarının ligandın absorpsiyon spektrumuna etkisinin ile incelenmesi. [iyon]: $1,3 \times 10^{-4}$ M, [ligant]: $1,3 \times 10^{-5}$ M .....	58
Şekil 3.5. $1,3 \times 10^{-5}$ M Ligandın farklı çözücü sistemlerinde alınan floresans spektrumları.....	59
Şekil 3. 6. Ligandın absorpsiyon, uyarma ve emisyon spektrumları.....	60
Şekil 3.7. Farklı konsantrasyonlardaki ligandın Metanol:su (1:1) çözücü karışımında floresans spektrumları.....	61
Şekil 3.8. Ligandın 503 nm'deki floresans şiddetine pH etkisi.....	62
Şekil 3.9. $Li^+$ , $Na^+$ , $K^+$ , $Mg^{2+}$ , $Ca^{2+}$ , $Sr^{2+}$ , $Ba^{2+}$ , $Al^{3+}$ , $Sn^{2+}$ , $Pb^{2+}$ , $Cr^{3+}$ , $Mn^{2+}$ , $Fe^{2+}$ , $Fe^{3+}$ , $Co^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Ag^+$ , $Zn^{2+}$ , $Cd^{2+}$ ve $Hg^{2+}$ metal katyonlarının ligandın floresans spektrumuna etkisinin incelenmesi. [iyon]: $1,3 \times 10^{-4}$ M, [ligant]: $1,3 \times 10^{-5}$ M .....	63

Şekil 3.10. F <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , I <sup>-</sup> , CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , HSO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , CN <sup>-</sup> , SCN <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>2-</sup> , Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>2-</sup> ve CrO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ligandın floresans spektrumuna etkisinin ile incelenmesi. [iyon]: 1,3 x 10 <sup>-4</sup> M, [ligant]: 1,3x10 <sup>-5</sup> M.....	63
Şekil 3.11. Fe <sup>2+</sup> iyonu için elde edilen kalibrasyon grafiği. Dalga boyu=503 nm .....	64
Şekil 3.12. Job metodu ile ligant:Fe <sup>3+</sup> 'nın stokiometrisinin belirlenmesi .....	68
Şekil 3.13. Kompleks kararlılığının incelenmesi için kompleksin floresansının zamanla değişimi .....	69
Şekil 3.14. Ligant:Fe <sup>3+</sup> kompleksinin floresans şiddetine pH etkisi .....	70
Şekil 3.15. Kararlılık sabitinin belirlenmesi için [M] <sup>-1</sup> 'e karşı F <sub>0</sub> /(F <sub>0</sub> -F ) grafiği .....	72
Şekil 3.16. 400-650 nm dalga boyları arasında ligandın floresans spektrumuna artan konsantrasyondaki Fe <sup>3+</sup> iyonlarının etkisi. λ <sub>uy</sub> = 375 nm, λ <sub>em</sub> = 503 nm, [ligant]= 1,3x10 <sup>-5</sup> M .....	73
Şekil 3.17. Ligandın artan Fe <sup>3+</sup> iyonu konsantrasyonuna karşı çizilen Stern-Volmer grafiği .....	74
Şekil 3.18. Stern-Volmer grafiğinin doğrusal aralığı .....	75
Şekil 3.19. Fe <sup>3+</sup> iyonları için Stern-Volmer grafiğinin sıcaklıkla değişimi.....	76
Şekil 3.20. Standart Fe <sup>3+</sup> 'ün tayinine ait doğrusal aralık ve Lambert- Beer Kanunu'ndan sapma. λ <sub>em</sub> =503 nm. [Ligant] =1,3x10 <sup>-5</sup> M.....	77
Şekil 3.21. Geliştirilen modifiye standart ekleme yönteminin deneysel uygulama şeması	78
Şekil 3.22. Ispanakta demir tayini için çizilen modifiye standart ekleme yönteminin grafiği .....	79
Şekil 4.1. Teorik hesaplamalara göre ligandın Fe <sup>3+</sup> ile oluşturduğu en kararlı yapı.....	96
Şekil 4. 2. Ligandın Fe <sup>3+</sup> kompleksi için önerilen yapı .....	97

## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1. 1.	Önerilen günlük alınması gereken demir miktarları.....	27
Tablo 1. 2.	Fenolik bileşiklerin yapısal olarak sınıflandırılması.....	28
Tablo 2. 1.	Katı numunelerin mikrodalga çözünürleştirme sistemiyle çözünürleştirilmesi için uygulanan program .....	52
Tablo 3. 1.	Florimetrik titrasyonda % 5'den daha az bağıl hata ile yabancı metal iyonlarının maksimum tolerans konsantrasyonları. Şartlar: [Ligant]= $1,3 \times 10^{-5}$ M; $[Fe^{3+}] = 1,3 \times 10^{-5}$ M; pH=7,0 (Sitrat Tamponu).....	66
Tablo 3. 2.	Florimetrik titrasyonda % 5'den daha az bağıl hata ile yabancı anyonların maksimum tolerans konsantrasyonları. Şartlar: [GF]= $1,3 \times 10^{-5}$ M; $[Fe^{3+}] = 1,3 \times 10^{-5}$ M; pH=7 (Sitrat Tamponu).....	67
Tablo 3.3.	$Fe^{3+}$ iyonu için Stern-Volmer verileri (503 nm'de).....	75
Tablo 3. 4.	Sabit standart konsantrasyonunun belirlenmesi için toprak-kum standart referans materyali ve Ferrum Fort tableti numuneleri için hesaplanan % hata değerleri .....	80
Tablo 3. 5.	CRM-SA-C Sandy Soil C ve Mixed Polish Herbs (INCT-MPH-2) sertifikalı materyallerin önerilen metotla analizinden elde edilen sonuçların öğrenci t-testi (student's t-test) ile irdelenmesi.....	82
Tablo 3. 6.	Önerilen metotla CRM-SA-C Sandy Soil C ve Mixed Polish Herbs (INCT-MPH-2) için bulunan % BSS değerleri .....	83
Tablo 3. 7.	Ticari ilaç tabletleri için akredite laboratuardan elde edilen sonuçlarla önerilen metottan elde edilen sonuçların öğrenci t-testi (student's t-test) ile karşılaştırılması.....	84
Tablo 3. 8.	Önerilen metotla ticari Ferrum Fort ve Maltofer demir ilacı tabletleri için bulunan % BSS değerleri.....	84
Tablo 3. 9.	Ispanak, nane, dereotu, semizotu, roka, kurufasülye ve kırmızı mercimek numuneleri için akredite laboratuardan elde edilen sonuçlarla önerilen metottan elde edilen sonuçların öğrenci t-testi (student's t-test) ile karşılaştırılması.....	85
Tablo 3. 10.	Önerilen metotla bazı sebze ve baklagiller için bulunan % BSS değerleri ...	86
Tablo 3. 11.	Standart referans materyallerde demir tayini.....	87
Tablo 3. 12.	Ticari ilaç tabletlerinde demir analizi sonuçları .....	87
Tablo 3. 13.	Sebze numunelerinde demir analizi sonuçları .....	88

Tablo 3. 14. Trabzon İli Değirmendere Deresi Deliklitaş mevkiinden alınan su numunelerinde geri kazanım çalışmaları .....	89
Tablo 3. 15. Demir tayini için önerilen spektrofotometrik metodun özellikleri.....	89

## SEMBOLLER DİZİNİ

A	: Absorbans
AAS	: Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi
AES	: Atomik Emisyon Spektroskopisi
BSS	: Bağlı Standart Sapma
dak.	: Dakika
DMF	: N,N-dimetilformamit
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
F	: Floresans Şiddeti
F <sub>0</sub>	: Ligandın Floresans Şiddeti
GS	: Gözlenebilme Sınırı
g	: Gram
h	: Planck sabiti
HEPES	: 2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]etansülfonik asit
HOMO	: En Yüksek Enerjili Dolu Moleküler Orbital
ICP	: İndüktif Eşleşmiş Plazma
IR	: İnfrared Spektroskopisi
K	: Kompleks Kararlılık Sabiti
K <sub>a</sub>	: Kararlılık sabiti
LUMA	: En Düşük Enerjili Boş Moleküler Orbital
M	: Molar
M <sup>+</sup>	: Metal İyonu
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
MS	: Kütle Spektroskopisi
nm	: Nanometre
PET	: Işına Dayalı Elektron Transferi
PCT	: Işına Dayalı Yük Transferi
pH	: H <sup>+</sup> İyonu Aktivitesinin Eksi Logaritması
R <sup>2</sup>	: Korelasyon Katsayısı



T	: Sıcaklık
THF	:Tetrahidrofurana
TS	: Tayin Sınırı
UV-Vis	: Ultraviyole Görünür Bölge Spektroskopisi
$\delta_{\text{ppm}}$	: Kimyasal Kayma Değeri
$\mu\text{g}$	: Mikrogram
$\lambda_{\text{em}}$	: Maksimum Emisyon Dalga Boyu
$\lambda_{\text{uy}}$	: Uyarma Dalga Boyu
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat Derece
$^1\text{H-NMR}$	: Proton Nükleer Magnetik Rezonans Spektroskopisi
$[\text{M}]^+$	: Moleküler İyon Piki

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş ve Çalışmanın Amacı

Analitik kimyada yapılan çalışmaların en önemlilerinden biri, çevresel numunelerdeki element konsantrasyonlarının ve cinslerinin belirlenmesini amaçlayan pratik ve güvenilir metotlar geliştirmektir. Eser terimi; çok küçük miktarda analit miktarını belirtmektedir. Genel olarak organik ve inorganik numunelerde konsantrasyonları  $100 \mu\text{g g}^{-1}$ 'in altında bulunan elementler, eser element olarak ifade edilirler. Son yıllarda eser element analizleri analitik kimyanın yanı sıra biyoloji, tıp, fizik, çevre, ziraat bilimleri ve kalite kontrol alanlarında da araştırma konusu olmuştur (Mizuike, 1983).

Floresans spektroskopisi çevre kimyası, klinik kimya, ilaç analizi, genetik analiz, biyomoleküler çalışmalar vb. birçok alanda kullanılan bir yöntemdir. Florimetrik analiz yöntemleri, gelişmiş floresans cihazına dayalı teknikler sayesinde doğru, hassas, hızlı, güvenilir sonuçlara ve yorumlara ulaşılmasını sağlayan optik yöntemlerdir. Ayrıca tepkime oluşumlarına ve etkileşmelere çok duyarlı ve etkindir.

Floresans şiddeti ölçümüne dayanan analitik metotlar, yüksek seçicilikleri ve duyarlılıkları sebebiyle çok güncel metotlardır. Literatürde yapılan incelemelerde pek çok iyon veya molekül tayini için florimetrik yeni metotların geliştirildiği görülmüştür.

Floresent bir analitin direkt spektrofluorimetrik tayinini yapmak mümkündür. Bu uygulamalar aromatik hidrokarbonlar, proteinler, bazı ilaçlar ve klorofiller içerir. Böyle direkt tayinlerle yağlar, besinler, ilaçlar ve hava-su kirleticilerin analizi gibi çalışmalar bildirilmiştir. Oysaki pek çok iyon ve molekül floresent değildir ve aşağıda belirtilen durumlarda temel *indirekt* (dolaylı) *metotlar* kullanılır: 1) *Türevlendirme*; örneğin, analitin floresent bir bileşik oluşumuna sebep olan bir reaktifle reaksiyonu, floresans tayini ile birleştirilen sıvı kromatografisinde kullanılır. 2) *Floresent kompleks oluşumu*, iyon ve molekül tanıma metotlarının çoğunun temelidir. 3) *Floresans sönümü (kuençing)*, analitin floresent bir bileşikle çarpışması sonucu gerçekleşir. Bu metot  $\text{O}_2$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{Cl}_2$  ve klorokarbon gibi gazların tayini için özellikle uygun olan bir metottur (Valeur vd., 2002).

Son yıllarda, sulu çözeltilerde metal iyonlarının belirlenmesi için geliştirilen floresent kimyasal sensörler, biyokimya, klinik-tıp bilimi, hücre biyolojisi, analitik kimya

ve çevre bilimi gibi pek çok bilim dalında potansiyel uygulamaları olması nedeniyle giderek artan bir öneme sahip olmuştur (Bargossi vd., 2000). Farklı kimyasal sensörler arasında floresans kaynaklı olanlar, yüksek seçiciliğe, duyarlılığa, düşük maliyete, kolaylığa ve çok yönlülüğe sahip oldukları için özellikle ilgi çekicidirler (Prodi vd., 2000; Martinez-Manez ve Sanceno'n, 2003; Espada-Bellido vd., 2010).

On yılı aşkın süredir, metal iyonlarının tayini için geliştirilen floresent kimyasal sensörler üzerine yapılan araştırmalar, uygulanabilirliklerindeki basitlik, yüksek duyarlılık ve ölçüm kolaylığı sayesinde yüksek oranda bir artış göstermiştir (Lohani ve Lee, 2010).

Floresent kemosensörler reseptör ve florofor olmak üzere iki kısımdan oluşur. Reseptör, analitle etkileşir, florofor ise bu etkileşmeyi sinyale dönüştürür. Çevresel ve biyolojik tayin amaçlı pek çok kimyasal floresent sensör, çeşitli floroforların reseptörlerle birleştirilmesiyle sentezlenmiştir. Kemosensörlerde ideal bir florofor, yüksek floresans kuantum verimine, yüksek sönüm sabitine, uzun uyarma ve yayılma dalga boyuna, uzun ömre ve fotokararlılığa sahip olmalıdır. Bu yüzden florofor seçimi, yeni floresent kemosensör tasarımında en önemli faktördür (Lohani ve Lee, 2010).

$Pb^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ve  $Hg^{2+}$  gibi biyolojik ve çevresel olarak önemli metal iyonlarının tayini için geliştirilen kimyasal sensörlerin geliştirilmesi ciddi bir araştırma konusudur (Liu ve Wu, 2012). Demir, insanlarda en çok gerekli geçiş metalidir ve pek çok protein için biyokimyasal proseslerin büyük bir kısmında kofaktör olarak davranır. Bu prosesler oksijen transferi, elektron transferi ve oksidoredüktaz katalizi proseslerini içerir (Cowan, 1997). İnsan vücudundaki demirin düzenlenmesi son derece kontrollü bir prosesdir. Demir eksikliği hücrelere düşük oksijen taşınmasına sebep olur ve bu durum anemiye, düşük kan basıncına ve zayıf bağışıklık sistemine sebebiyet verir (Haas ve Brownlie, 2001). Sağlıklı yetişkin bir insan, hemoglobin ve protein deposu olarak 4 g demir ihtiva eder (Malone, 2007; Bertini vd., 2007; Sivaraman vd., 2014). Aksine, canlı hücrelerde demir iyonlarının aşırı miktarda birikmesi, Fenton Reaksiyonları ile reaktif oksijen türlerin oluşumuna sebep olur. Bu reaktif türler, lipitlere, nükleik asitlere ve proteinlere zarar verebilir. Ayrıca demir iyonlarının hücre üzerindeki toksik etkisi, Alzaymır, Parkinson ve Huntington gibi bir çok ciddi hastalığa neden olur (Burdo ve Connor, 2003; Bonda vd., 2011; Pithadia ve Lee, 2012).

Araştırmacılar tarafından, çeşitli numunelerdeki demir iyonlarının ölçülmesi için atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS) (Andersen, 2005), indüktif eşleşmiş plazma-kütle spektroskopisi (ICP-MS) (Castillo Busto vd., 2005), indüktif eşleşmiş plazma-atomik

emiyon spektroskopisi (ICP-AES) (Pomazal vd., 1999) ve voltametriyi (Berg, 2006) içeren pek çok geleneksel metot geliştirilmiştir. Bu metotlar gelişmiş cihazlar gerektirir ve analizlerde kolaylıkla kullanılamaz. Bu nedenle pek çok araştırmacı, demir tayini için seçici ve duyarlı sensörler geliştirmeye odaklanmışlardır (Liu ve Wu, 2012). Fe<sup>3+</sup>’un kimyasal ve biyolojik proseslerde önemli görevleri olmasına rağmen seçici ve selektif floresant kemosenrleri literatürde oldukça azdır. Bunun nedeni Fe<sup>3+</sup>’un floresans sönümüne yol açan paramanyetik özelliği olabilir (Chai vd., 2012). Fe<sup>3+</sup> iyonları, bu paramanyetik yapıları nedeniyle floresans söndürücüler olarak bilinir (Wang vd., 2013).

Çeşitli araştırma grupları, birbirlerinden bağımsız olarak UV ve yakın görünür ışık arasında uyurma dalga boyuna sahip naftalen, dansil, antrasen ve kumarin gibi florofor bileşikleri içeren Fe<sup>3+</sup> kemosenrler sentezlemiştir (Lohani ve Lee, 2010).

Floresans spektroskopisinde sönüm, ilk olarak biyokimyasal proseslerde 1960’lı yılların sonlarında uygulanmaya başlanmıştır. Sönüm olayları miktarı az olan, bozulmayan, floresans problemleri içeren numunelerde kolaylıkla gerekleēebilir ve bu reaksiyonlardan ilgili sistem için son derece önemli bilgiler elde edilebilir. Örneğin; snme reaksiyonlarında oksijen (O<sub>2</sub>), akridin gibi söndürücüler kullanılarak makromoleküllerin yapısındaki floresans gruplarının yerleri hakkında bilgi edinilebilir. Snme reaksiyonları, değişik Őartların neden olduğu yapı değişiminde veya tomografik bir makromolekülün özelliklerini belirlemede kullanılabilir (Lakowicz, 2002).

Günümüzde doğanın maruz kaldığı çevresel kirlilikler ve fabrika atıkları nedeniyle ağır metaller toprağa ve suya karışmaktadır. Topraktaki ve sudaki canlıları etkileyen hatta ölümüne yol açan, yiyecek (sebze, meyve vb.) ve ieceklerimize (içme suyu vb.) karışan ağır metaller, insan sağlığı açısından büyük bir tehlike oluşturmaktadır.

Hücre içi demir elementi, belli konsantrasyon seviyelerinde canlı metabolizmasında kanser gibi pek çok hastalığa, organların işlev bozukluğuna sebep olmaktadır. Bu nedenle canlıların sıkça tükettiği gıda ve su numunelerinde eser miktardaki demir iyonu seviyesinin doğru ve güvenilir olarak saptanması çok önemlidir.

Eser konsantrasyondan daha düşük konsantrasyondaki metallerin tayinini yapan yöntemler günümüzde mevcuttur. Fakat bu yöntemlerle tayin yapılabilmesi için metal iyonlarının çeşitli yöntemlerle zenginleştirilmesi gerekmektedir. Geliştirilen bu yöntemlerin pek çoğunda tayin basamağından önce, matriks ayırma ve zenginleştirme yöntemleri gibi bir ön işleme tabi tutulur (Tokalıoğlu ve Yıldız, 2009). Bunun nedeni Şu Şekilde açıklanabilir; çevresel numunelerde bulunan elementlerin çeşitli tekniklerle

doğrudan tayin edilemeyecek konsantrasyonda olması ve buldukları matriksin bozucu etkileridir.

Yapılan çalışmanın amacı, gerçek numunelerde demir tayini için daha avantajlı, kolay ve ucuz yeni bir spektrofotometrik tayin yöntemi geliştirmektir. Bu yöntem 2-(4-florofenil)-3-hidroksi-2,3-dihidrokinolin-4(1H)-on bileşiğinin seçimli floresent ligant olarak kullanılmasına dayandırılmıştır.

Bu amaç için öncelikle  $Fe^{3+}$  iyonunun ligant ile kompleks oluşturduğu uygun konsantrasyon, pH, kompleksleşme süresi, çeşitli metal iyonlarının girişimi gibi etkiler incelenecektir. Bahsedilen bileşik kullanılarak çeşitli sebze ve bakliyat numunelerinde toplam demirin  $Fe^{3+}$  iyonu halinde tayin çalışmaları gerçekleştirilecektir. Metotun doğruluğu standart referans materyallerin analizi ile gösterilecektir.

Geliştirilecek yöntemin analiz öncesinde numunede herhangi bir ayırma veya ön temizleme işlemi gerektirmemesi ve sulu ortamda demirin kolayca tayinini sağlaması açısından literatürdeki mevcut demir tayin metotlarına göre daha avantajlı olacağı düşünülmektedir. Diğer enstrümental analiz yöntemleri tayin öncesi matrikste ön ayırma ve zenginleştirme gerektirdiğinden uygulanması zor ve zaman alıcıdır. Buna karşılık geliştirilecek yöntemin daha kolay ve kısa zamanda uygulanabilecek özelliğe sahip olacağı düşünülmektedir.

## 1.2. Işın Absorpsiyonu ve Lambert-Beer Kanunu

Çeşitli dalga boylarında ışın içeren bir demet, şeffaf bir ortamdan geçirilirse, içinden bazı dalga boylarının kaybolduğu görülür. Bu olaya absorpsiyon (soğurma) denir (Lakowicz, 2007).

Absorpsiyon spektroskopisinde elektromanyetik dalganın numune tarafından ne kadar absorplandığı Lambert-Beer yasası ile verilir. Deneysel olarak ışığın absorplanması, numune üzerine gelen ışığın 1 cm' lik bir numune içerisinden geçerken ışık şiddetinde meydana gelen değişimin ölçülmesiyle dalga boyu  $\lambda$ ' nın veya dalgasayısı  $\nu = \lambda^{-1}$ 'in bir fonksiyonu olarak kaydedilir. C konsantrasyonundaki homojen çözeltiler için Lambert-Beer kanunu olarak adlandırılan denklem aşağıda verilmiştir:

$$\text{Log}(I_0/I) = \epsilon.c.l = A \quad (1.1)$$

Bu denklemdeki  $c$ ; çözeltilinin molar konsantrasyonu ( $\text{mol L}^{-1}$ ),  $\epsilon$ ; çözeltilinin molar absorpsiyon katsayısı ( $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) ve  $l$ ; elektromanyetik dalganın çözeltili içinde aldığı yoldur (cm). Bunların üçünün birden çarpımı ise absorbans olarak tanımlanır.

Denklem 1.1, örneğin içinden geçen ışık şiddetinin ( $I$ ), yol uzunluğu ( $l$ ) ve numune konsantrasyonunun ( $c$ ) artması ile azalacağını gösterir.

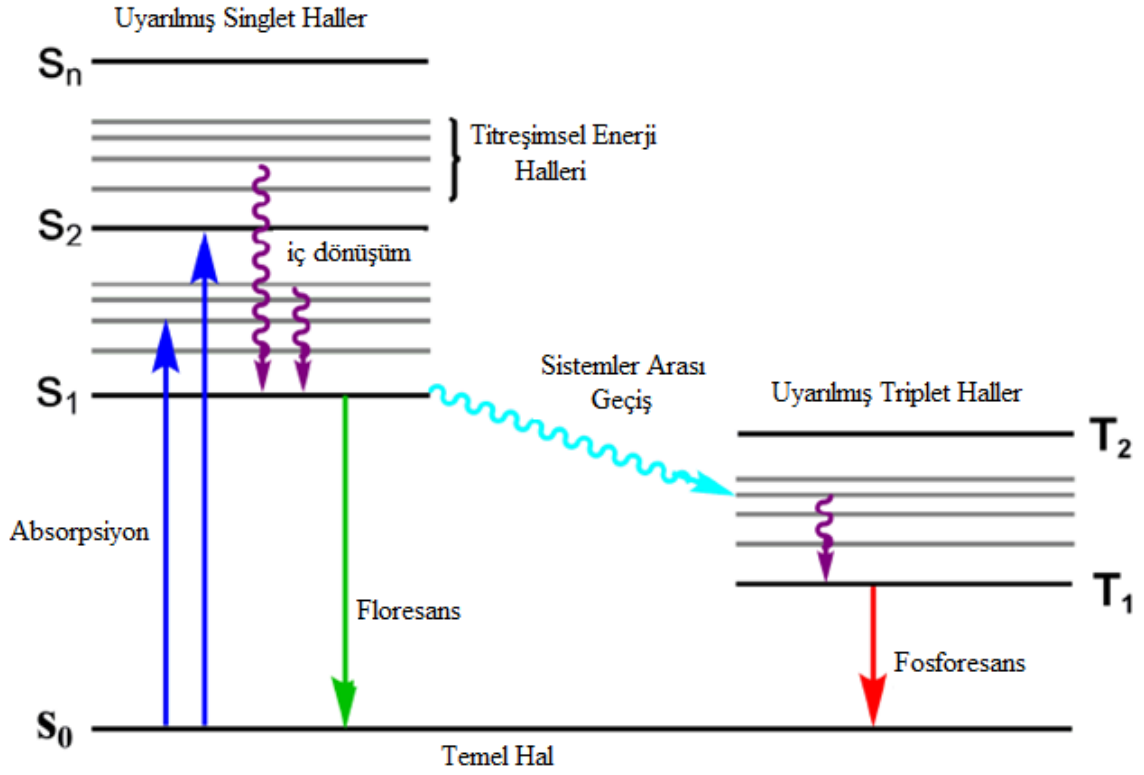
### 1.3. Moleküler Lüminesans Spektroskopisi

Bir molekül yüksek enerji düzeyinden daha düşük enerji düzeyine geçiş yaparken, sahip olduğu fazla enerjiyi foton olarak yayar. Bu olaya “moleküler emisyon (yayma)” denir (Lakowicz, 2007). Moleküler floresans olayı da bir moleküler emisyondur.

Moleküler floresans, moleküler fosforesans ve kemilüminesans maddenin bir birine yakın üç ayrı fiziksel özelliğidir. Bu özelliklere *lüminesans* da denir. İlk iki metotta maddenin çözeltilisi üzerine ışın enerjisi gönderilerek madde uyarılır (eskite edilir). Uyarılan maddenin aldığı enerjiyi geri vererek ilk haline dönmesi esnasında davranışları incelenir. Bu inceleme sonucunda madde hakkında kalitatif ve kantitatif bilgiler elde edilir. Madde üzerine gönderilen ışınlar; ultraviyole, görünür alan nadiren de infrared ışınlardır. Bu ışınlar madde tarafından önce çok kısa bir süre absorplanır ve ondan sonra da floresans ve fosforesans ışınları olarak yayılırlar (Gündüz, 2002).

Floresans ve fosforesans maddelerde ışının alınıp verilmesi şöyle açıklanabilir: Bir molekül tarafından ultraviyole veya görünür bölge ışının absorpsiyonu, (Şekil 1.1) bir elektronun, başlangıçta düşük enerjili ve dolu elektronlu olan bir orbitalden, daha yüksek enerjili boş olan bir orbitale elektronik olarak uyarılmasına neden olur (Turro, 1978). Uyarılmış hal, kararsız bir hal olduğundan atom aldığı enerjiyi geri yayarak eski haline dönmek ister. Işının absorpsiyonu ile bir üst elektronik enerji seviyesinde bulunan molekülün, kararlı hali olan temel hale geçmesi için mümkün olan iki yol vardır. Bunlardan biri ışımasız geçiş olup sistem aldığı enerjiyi çevresine ısı olarak verir, bu ısı ortamın sıcaklığını arttıracak kadar olmayıp sadece moleküllerin kinetik enerjilerini arttırır, diğeri ise *floresans* ve *fosforesans* olarak bilinen ışımalı geçişlerdir (Gündüz, 2002).





Şekil 1. 2. Floresans ve fosforesans için Jablonski enerji diyagramı

Şekil 1.2’de verilen diyagramı kısaca açıklayacak olursak;

Işımalı işlemler

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

Floresans :  $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu'$

Fosforesans :  $T_1 \rightarrow S_0 + h\nu''$

Burada; h: Planck sabiti ;  $\nu$ ,  $\nu'$ ,  $\nu''$ : Absorbe edilen veya yayılan ışının frekanslarıdır.

Işımasız işlemler

İç dönüşüm :  $S_1 \rightarrow S_0 + ısı$

Sistemler arası geçiş:  $T_1 \rightarrow S_0$  veya  $S_1 \rightarrow T_1$

Absorpsiyon; singlet temel halden singlet uyarılmış hale olan bir elektronik geçiştir. Bu geçiş spektroskopik olarak mücade edilen bir olaydır. Zaman bakımından singlet absorpsiyonu yaklaşık  $10^{-15}$  saniyede gerçekleşir.

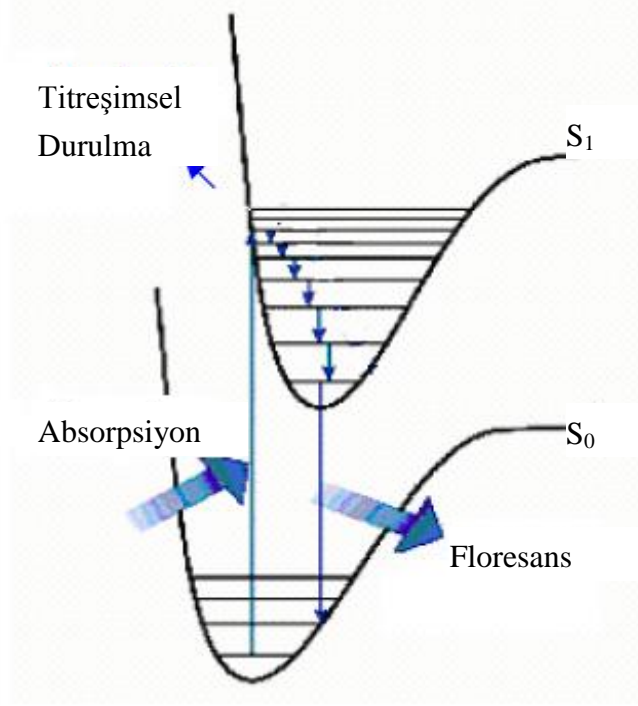
Singlet-Triplet absorpsiyonu; Bu basamakta sistem singlet temel halden uyarılmış triplet hale geçerken spin değiştirmektedir. Çoğunlukla sistemler, triplet uyarılmış hale



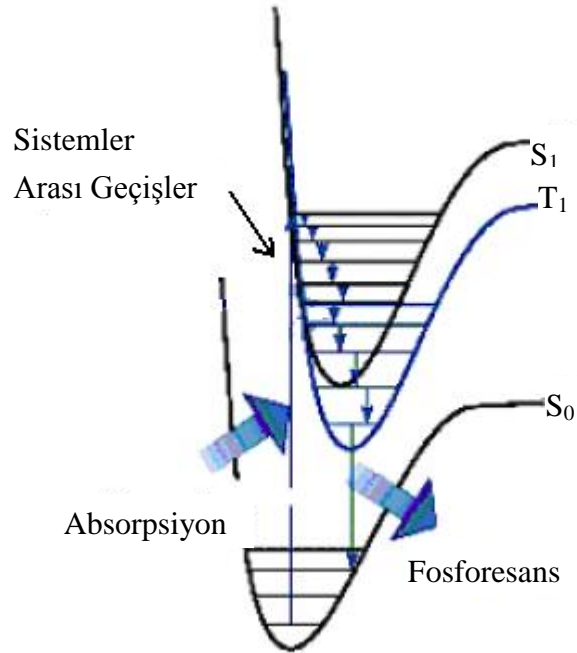
singlet uyarılmış ( $S_1$ ) hal üzerinden geçer. Bu nedenle böyle bir absorpsiyon olayının gerçekleşme ihtimali çok düşüktür.

Singlet-singlet emisyonu basamağı (floresans): Uyarılan molekül, etrafını saran moleküllerle çarpışmalara maruz kalır ve enerjisini ışın yaymadan verirken, titreşim enerji seviyelerini basamak basamak inerek elektronik olarak uyarılan halin en düşük titreşim enerji seviyesine iner. Fakat çevredeki moleküller, molekülü temel elektronik hale getirmek için gerekli daha büyük enerji farkını kabul edemeyebilir. Bu nedenle elektronik uyarılmış tür, kendiliğinden ışın yaymak için yeterli ömür kazanır ve kalan fazla enerjiyi ışın olarak yayar. Yani sistem singlet uyarılmış halden singlet temel hale geçerken enerjisini ışımalı şekilde çevresine yayar. Bu olay floresans olarak bilinmektedir. Işıma yapan madde tarafından yayınlanan ışın absorblanan ışımandan daha düşük enerjili olduğundan daha uzun dalga boyuna sahiptir. Floresans olayı  $10^{-10}$  -  $10^{-7}$  saniyelik bir zaman aralığında gerçekleşir. Floresans olayının basamakları Şekil 1.3'de gösterilmiştir.

Triplet-singlet emisyon basamağı (fosforesans): Birinci basamak floresanstakinin aynısıdır, fakat triplet uyarılmış halin varlığı belirleyici rol oynar. Singlet ve triplet uyarılmış haller potansiyel enerji eğrilerinin kesiştiği noktada ortak bir geometri paylaşırlar. Bu yüzden, iki elektronik spin eşlenmesini bozmak için bir mekanizma varsa, yani spin değişimi mümkünse, molekül sistemler arası geçişe uğrar ve bir triplet hal oluşur. Sistem triplet uyarılmış halden singlet temel hale geçer. Bu esnada elektronun spininde değişiklik olmaktadır. Bu olay yasaklı bir geçiş olarak bilinmektedir. Bu ışımalı geçiş fosforesans olarak adlandırılmaktadır. Zaman bakımından  $10^{-6}$  - 1 saniye aralığında gerçekleşmektedir. Fosforesans olayının basamakları Şekil 1.4'de gösterilmiştir.



Şekil 1. 3. Floresans Basamakları (Atkins, 2010).



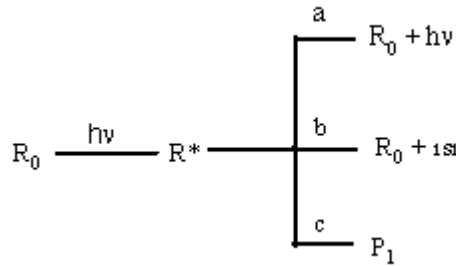
Şekil 1. 4. Fosforesans basamakları (Atkins, 2010).

İç dönüşüm (ışınmasız geçiş): Çoğunlukla uyarılmış elektronik enerji seviyelerinin ( $S_2 \rightarrow S_1$ ) titreşim enerji seviyeleri arasında gerçekleşir. Eğer temel halin titreşim enerji seviyeleri ile uyarılmış halin elektronik enerji seviyesi bir birine çok yakınsa veya çakışıyorsa bu olay gözlenebilir. Bazen de sistem  $S_1$  enerji seviyesinden temel hale ( $S_0$ ) ışımasız geçebilir. Sistem temel hale geçerken sahip olduğu enerjiyi sadece moleküllerin kinetik enerjilerinde bir artışa neden olan moleküler çarpışmalarla ısı olarak vermektedir. İç dönüşüm olayı zaman bakımından genelde  $10^{-11}$  -  $10^{-9}$  saniyelik bir zaman aralığında gerçekleşir.

Sistemler arası geçiş: Bu proses ışımasız olarak gerçekleşir ve gerçekte yasaklanmış bir geçiş şeklindedir. Çünkü sistem singlet uyarılmış halden ( $S_1$ ) triplet uyarılmış hale ( $T_1$ ) geçerken, elektronun spini değişmektedir.

Bir diğer sistemler arası geçiş olayı ise triplet uyarılmış halden ( $T_1$ ) singlet temel hale ( $S_0$ ) olan geçişle gerçekleşebilir. Zaman bakımından sistemler arası geçiş  $10^{-10}$  -  $10^{-8}$  saniye arasında gerçekleşir.

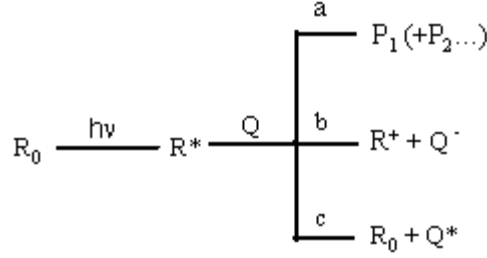
Uyarılmış halin deaktivasyonu, Jablonski diyagramında anlatılan fotofiziksel olaylar üzerinden gerçekleşebileceği gibi, fotokimyasal olaylarla da gerçekleşebilir. Fotokimyasal prosesler genellikle uyarılmış hal üzerinden gerçekleşmektedir. Fotokimyasal olaylar monomoleküler (tek molekülü) veya bimoleküler (iki molekülü) olarak gerçekleşmektedir. Monomoleküler olarak gerçekleşen prosesler temsili olarak Şekil 1.5'de verilmiştir.



Şekil 1. 5. Monomoleküler deaktivasyon prosesleri

Şekil 1.5'de a ve b fotofiziksel (floresans ve iç dönüşüm olayları) , c ise fotokimyasal bir işlemdir.  $R_0$ , temel haldeki molekülü,  $R^*$  uyarılmış haldeki molekülü,  $P_1$  ise uyarılma sonucu oluşan herhangi bir ürünü temsil etmektedir.

Bimoleküler etkileşmeler incelenecek olursa, ortamda  $R^*$ 'ın haricinde onunla etkileşecek bir Q molekülünün olduğu kabul edilir. Genel olarak bimoleküler prosesler temsili olarak Şekil 1.6'da verilmiştir.



Şekil 1. 6. Bimoleküler deaktivasyon prosesleri

Bir molekülün uyarılmış hali  $R^*$  oluşarak ortamda temel halde bulunan Q molekülüyle etkileşir ve bir ürüne dönüşür ( $P_1$  gibi). Bu etkileşim ile  $P_1+P_2\dots$  gibi birden fazla ürün de oluşabilir (Şekil 1.6'da a prosesi).

Uyarılmış haldeki  $R^*$  molekülü, ortamda bulunan Q molekülüne elektron vererek  $R^+$  ve  $Q^-$  hallerinin oluşmasına sebep olabilir (Şekil 1.6'da b prosesi).

Uyarılmış molekül ( $R^*$ ) belli bir enerjiye sahiptir. Bu molekül eğer ortamda başka bir molekül varsa enerjisini o moleküle transfer ederek enerji yükünü azaltır ve kendi ışımsız olarak temel hale geçerken, Q molekülünün uyarılmasına neden olur. Bu proseste transfer olan enerjinin ışımaya şeklinde gözlenmesi mümkün değildir. Bu proseste olduğu gibi, uyarılma enerjisini bir başka moleküle transfer ederek molekülün ışımsız bir şekilde temel hale geçme olayına sönme olayı denir. Buna neden olan moleküle ise “söndürücü” adı verilir. Ayrıca  $R^*$  molekülünün elektronik uyarılma enerjisini Q molekülüne aktarması olayı enerji transferi olarak da tanımlanabilir.

Sönme olayı bimoleküler bir proses olduğundan uyarılmış haldeki  $R^*$  molekülüyle Q molekülünün birbirleriyle etkileşimi önemlidir.  $R^*$  molekülü ile Q molekülü arasında çarpışmalar olabileceği gibi bu iki molekülün etkileşimi sonucu kompleks de oluşabilir (Lakowicz, 1983).

### 1.3.2. Floresans Ömrü ve Kuantum Verimi

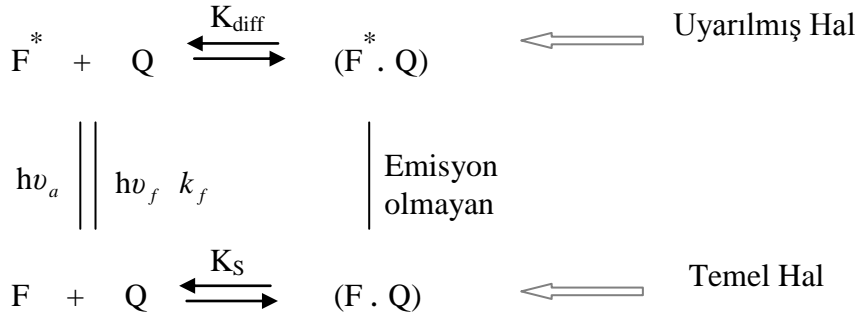
Floresans ömrü ve kuantum verimi bir floroforun en önemli özelliklerindedir. Kuantum verimi, absorplanan foton sayısına bağlı yayılan foton sayısıdır. Yani, kuantum verimi birim zamanda, sistemde yayınlanan foton sayısının, absorplanan foton sayısına oranına denir. Başka bir ifadeyle, çözeltideki floresans ışması gösteren moleküllerin sayısının, toplam uyarılmış molekül sayısına oranıdır. Bir madde yüksek kuantum verimine sahipse çok yüksek bir emisyon şiddeti göstereceği söylenebilir. Kuvvetli bir floresentin kuantum verimi 1'e çok yakındır. Bunun aksine floresent olmayan türlerin kuantum verimi ise sıfırdır (Lakowicz, 2007).

Floresans ömrü de ayrıca çok önemlidir. Çünkü, floresans ömrü, floroforun çevresiyle etkileştiği zaman ile ilişkilidir. Böylece; emisyon hakkında bilgi sahibi olunur. Floresans özelliği gösteren maddenin uyarılmış halde kalma süresi floresans ömrü olarak adlandırılır. Emisyonun yüksek hızla gerçekleştiği floresans ömrü  $10^{-8}$  s kadardır.

### 1.3.3. Floresans Sönüm

Bir seri işlem molekülün floresans şiddetinde azalmaya yol açabilir. Uyarılmış hal sürecinde gerçekleşen bu azalmalar moleküler oryantasyon değişiklikleri, enerji transferleri, temel hal kompleks oluşumu ve çarpışmalı sönüm gibi çok çeşitli moleküler etkileşimler sonucu gerçekleşebilir.

Floresans sönüm, mekanizmasına göre genellikle statik veya dinamik olarak sınıflandırılır. Dinamik sönüm, florofor ile söndürücü molekülleri arasındaki çarpışmadan kaynaklanır. Statik sönüm, kompleks oluşumundan kaynaklanmaktadır. Statik sönümde söndürücü ile florofor arasında kompleks oluşur ve bu oluşan kompleks floresans özelliğe sahip değildir. Statik ve dinamik sönüm için florofor ile söndürücü temas halinde olmalıdır. Çarpışma sonucu sönüm olabilmesi için söndürücünün, uyarılmış hal sürecinde florofora ulaşmış olması gerekir.

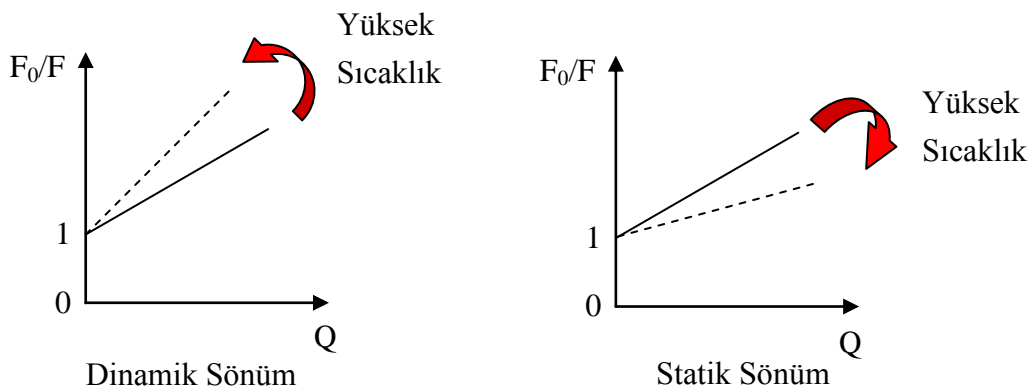


F: Florofor; Q: Söndürücü

Şekil 1. 7. Statik Sönümleme Mekanizması

Şekil 1.7'de görüldüğü gibi Statik sönüm iki farklı şekilde gerçekleşebilir. Florofor (F) ile söndürücü (Q) arasında temel halde, floresans özelliği olmayan bir kompleks oluşabileceği gibi floresans özelliği olmayan bu kompleks florofor uyarıldıktan sonra da oluşabilir.

Dinamik ve statik sönümü ayırt etmek için sıcaklık, floresans yaşam ömürleri ya da viskozite kullanılır. Difüzyona bağlı sönümde (dinamik sönümde) bimoleküler sönüm sabitleri artan sıcaklıkla artar (Şekil 1.8). Bunun nedeni sıcaklık arttıkça difüzyon katsayısının artmasıdır. Aksine statik sönümde sıcaklık artışıyla statik sönüm sabitinin (kompleksin kararlılığı azalacağı için) değeri düşer (Lakowicz, 1983).



Şekil 1. 8. Dinamik ve statik sönümlemenin sıcaklığa bağlılığı

Sönüm, numunenin optik özelliklerinden de oluşabilmektedir. Örneğin; yüksek optik yoğunluk ve bulanıklık floresans şiddetinin azalmasına sebep olur. Bu sönümlenme çeşidi önemsizdir.

Floresans sönüm verileri Stern-Volmer eşitliği ile incelenir (Denklem 1.2) (Lakowicz, 2007)

$$F_0 / F = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + \tau_0 k_q [Q] \quad (1.2)$$

$F_0$  ve  $F$ , floresent maddenin sırası ile söndürücü yokluğunda ve varlığındaki floresans şiddetlerini gösterir.  $[Q]$  söndürücü maddenin konsantrasyonudur.  $K_{SV}$  Stern-Volmer sönüm sabiti,  $k_q$  bimolekül sönüm hız sabiti,  $\tau_0$  ise ortamda söndürücü molekül yokken floresent molekülün ortalama ömrüdür.

#### 1.3.4. Floresansı Etkileyen Faktörler

Floresansı etkileyen faktörleri şu şekilde sıralayabiliriz: 1) Yapı; En şiddetli floresans içinde aromatik halkalar bulunan sistemlerde görülür. 2) Yapısal rijitlik; Molekül yapısı rijit ise, floresansı artar. 3) pH; Asit veya baz grubu içeriğine göre pH ile birlikte floresans değişir. 3) Sıcaklık; Sıcaklığın yükselmesi moleküller arası çarpışmayı artırır dolayısıyla floresans ışınmasını azaltır. 4) Çözücünün polarlığı; Çözücünün polarlığının artması da floresansı artırır. 5) Çözünmüş oksijen; Genellikle floresans şiddetini azaltır. 6) Gelen ışığın dalga boyu ve şiddeti; Floresansı oluşturan ışığın dalga boyunun alt sınırı 250 nm'dir. Gelen ışığın şiddetinin artması, floresansı artırır. 7) Konsantrasyon; Floresans şiddeti, çözelti içindeki floresent maddenin konsantrasyonuyla orantılıdır.

Lambert-Beer Kanunu'na göre (Denklem 1.3):

$$P = P_0 e^{-\epsilon/C} \quad (1.3)$$

Burada  $P_0$  floresent maddeyi içeren çözeltinin üzerine gönderilen ışığın şiddetidir.  $P$  ise  $P_0$ 'ın çözelti içinde  $d$  kadar yol aldıktan sonraki şiddetini ifade etmektedir.  $\epsilon$ , çözeltinin molar absorbtivitesini ifade etmektedir.  $C$  ise çözeltinin konsantrasyonudur.

### 1.3.5. Spektroflorimetri

Floresans spektrometre sistemini oluşturan birimler: Ark lamba yuvası (75W'lık Ksenon lamba), ayarlanabilir slitler, uyarma monokromatörü, numune kompartmanı, filitre tutucusu, uyarma ve emisyon optik düzenekleri, küvet tutucusu, emisyon panjuru, emisyon monokromatörü, PMT dedektörü, kuartz küvet ve katı numune tutucusu'dur.

### 1.3.6. Floresans Özellik Gösteren Floresent Bileşikler

Floresans tipik olarak aromatik bileşiklerden meydana gelir. Tipik bazı floresent maddeler Şekil 1.9'da gösterilmiştir. Tonik sularda bulunan kinin bileşiği en sık karşılaşılan florofor bileşiklerdendir. Tonik su şişesi güneş ışığına tutulduğunda çoğu zaman yüzeyde açık mavi parlıltı görülür. Şişe güneş ışığının yönüne bağlı olarak doğru açıda incelendiğinde ve alkol gibi düşük polaritedeki bir çözücü eklenerek dielektrik sabiti düşürüldüğünde, bu parlıltı oldukça belirgin hale gelir. Tonik sudaki kinin, güneşten gelen ultraviyole ışın tafından uyarılır. Kinin, temel hale dönerken yaklaşık 450 nm dalga boyunda mavi ışık yayar. Bir kinin çözeltilisinde ilk floresansın araştırmaları Sir John Frederick Herscel (Şekil 1.9) tarafından 1845'de yapılmıştır (Lakowicz, 2002).

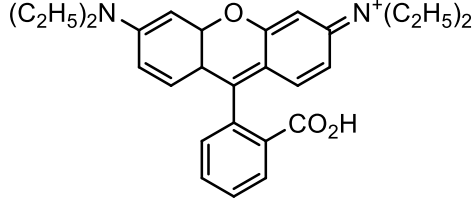
Bilinen ilk florofor olan kininin 1950 li yıllarda görülen ilk spektroflorimetrelerin geliştirilmesine sebep olması ilginçtir. II. Dünya savaşı boyunca, savaş departmanları kinin içeren anti-sıtma ilaçlarını incelemekle ilgilenmişlerdir. Bu erken ilaç denemeleri, ilk uygulamalı spektroflorimetrimin geliştirilmesi için Ulusal Sağlık Enstitülerinde daha sonraki planların oluşturulmasına olanak sağlamıştır (URL-1, 2014; Lakowicz, 2002).

Başka türlü pek çok floroforla günlük yaşantımızda karşılaşabiliriz. Örneğin eser miktardaki Floresein ve Rodamin nedeniyle antifrizlerde sırasıyla yeşil veya kırmızı - oranj parlıltılar görülür (Şekil 1.9). Antresen ve piren gibi polinükleer aromatik hidrokarbonlar da birer floresent bileşiktir ve bu türden bileşiklerdeki emisyon; hava kirliliğinin çevresel izlenmesinde kullanılır. Ayrıca bazı süstitüe organik bileşikler de floresenttir. Örneğin, 1,4-bis(5 fenilokzazol-2-il)benzen (POPOP) bileşiği kıvılcım saymak için ve akrinin oranj ise sıklıkla bir DNA bozucusu olarak kullanılır. Ayrıca pridin 1 (Şekil 1.9) ve rodamin floresent bileşikleri genellikle lazer boyalarında faydalanılır (Lakowicz, 2002).

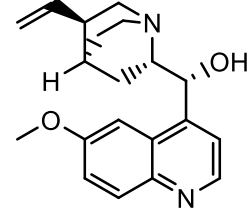
Floresent maddeler veya floresent kısımlar, floresans spektroskopisi için önemli bir çalışma alanı oluştururlar. Bu tür yapılar biyoanalitik uygulamalarda, immüno-florimetrik



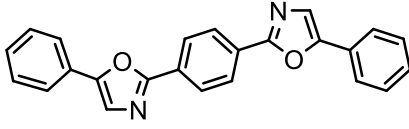
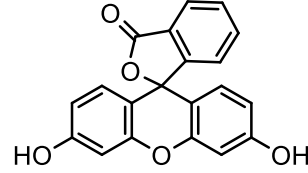
tekniklerde ve biyomolekül işaretleme çalışmalarında oldukça sık kullanılırlar (Lakowicz, 2002).



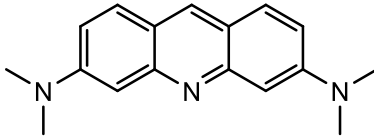
Rodamin B



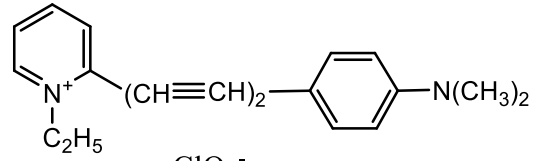
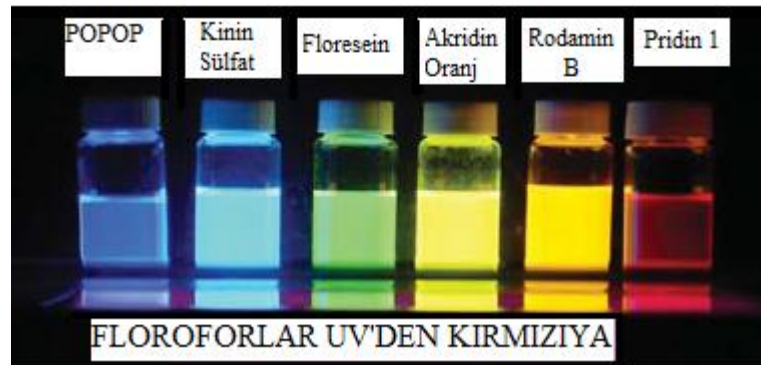
Kinin

1,4-bis(5-fenilokzazol-2-yl)benzen  
(POPOP)

Floresein



Acridine Oranj

Pridin 1  
ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>

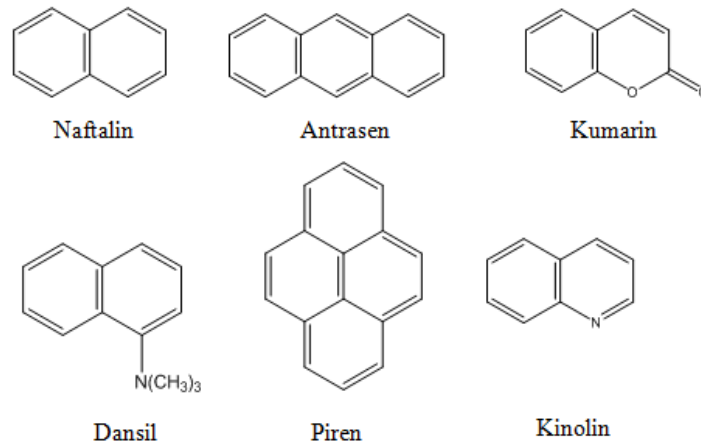
Şekil 1. 9. Bazı tipik floresent bileşiklerin yapısı ve floresans ışıkları (Lakowicz, 2002).

Bazı floresent gruplar floresans özellik göstermeyen veya az gösteren biyomoleküllere bağlandığında, ona floresans özellik kazandırır veya spektroskopik özelliğini değiştirir.

Buna işaretleme (labelling) denir. İşaretleme biyomolekülün yapı ve fonksiyonlarının incelenmesine ve izlenmesine fırsat verir. Bu uçlar, protein, nükleik asit, hormon, büyüme faktörü vb. gibi birçok biyomoleküllerle kovalent olarak bağlanarak bu türlerin yapı ve fonksiyonlarının incelenmesine olanak sağlarlar. Elde edilen veriler patoloji, parazitoloji, klinik teşhis sonuçlarında kullanılabilir. Floresant uçlar genel olarak iki gruba ayrılırlar: 1) İntrinsik (iç veya doğal) uçlar: Bunlar doğal floresant maddelerdir. Aromatik amino asitler, flavinler, klorofil türevleri gibi bileşikler. 2) Ekstrinsik (dış) uçlar: Floresant özellik göstermeyen yapılara bağlanırlar ve onların yapı ve özellikleri konusunda bilgi veren maddelerdir. Dansil klorür, floresein, kumarin, rodamin ve çeşitli bileşikler bu gruba girerler.

### 1.3.7. Floroiyonoforlar

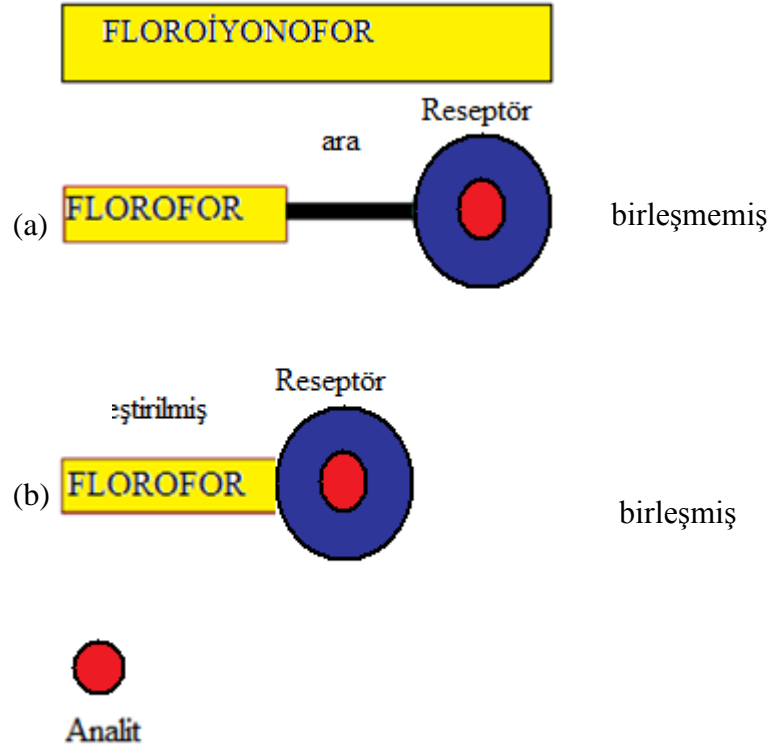
İyon bağlama özelliği gösteren moleküllere “iyonofor” maddeler denir. Eğer bir iyonofora floresant grup dahil edilirse oluşan bileşik “floroiyonofor” olarak adlandırılır ve kationun moleküle bağlanması üzerinden floresans özellik gösteren grubun floresans özelliklerindeki değişimin takibi ile kompleks oluşumunun incelenmesi mümkündür. Şekil 1.10’da bazı floresant gruplar gösterilmektedir.



Şekil 1.10. Bazı floresant gruplar

Floroiyonoforlar iyon tayinlerinde kullanılabilen moleküler sensörler olarak düşünülebilir. Makrosiklik bileşikler ve şelatlaştırıcı bileşikler bu moleküler sensörlerin iyon bağlayıcı kısımlarını oluşturur. Moleküler sensörlerin iyonofor kısımları olarak

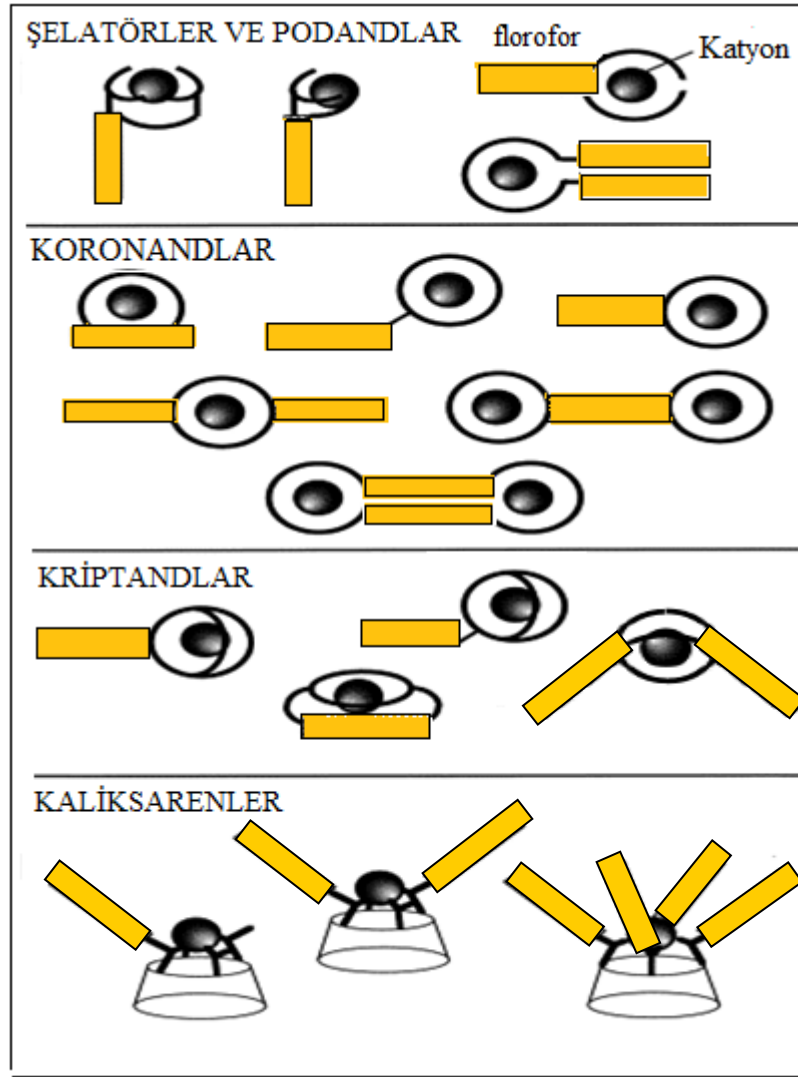
makrosiklik bileşiklerden crown eterler, kriptandlar ve kaliksarenler kullanılabilir. Bu tür bileşikler supramoleküler kimyanın çalışma konusudur (Beer vd., 1999). Şelatlaştırıcı bileşikler de iyonofor olarak görev yapabilir. Florofor ve reseptör, bir floresent sensörün temel parçalarıdır (Şekil 1.11).



Şekil 1.11. Floresent moleküler sensörlerin temel görüntüsü

Şekil 1.11’de görüldüğü gibi florofor reseptör kısım ile birleşmiş olabileceği gibi (b) bu iki kısım arasında başka bir kısımda bulunabilir (a).

Çeşitli şekillerde floroionoforlar oluşabilir. Bu oluşumlarda floresent sinyal üretici kısım iyonofora bir ara kısım ile bağlanabileceği gibi direkt bağlanma da gerçekleştirilebilir. Ayrıca iyonoforun bazı atomlarının kompleksleşmeye katıldığı floroionofor oluşumları mevcuttur. Şekil 1.12’de bazı floroionoforların topolojileri gösterilmektedir (Valeur ve Leray, 2000).



Şekil 1. 12. Çeşitli floroyonoforların şematik gösterimleri (Valeur ve Leray, 2000).

#### 1.4. Moleküler Floresans Spektroskopisinin Uygulama Alanları

Moleküler floresans spektroskopisi, nükleer araştırmalarda uranyum tuzlarının belirlenmesinde, inorganik iyonların, vitamin B1 ve B2'in ve biyolojik ve çevresel numunelerde eser bileşenlerin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

Eosin, florosein, akridin, 2-naftakinon ve 2-hidroksi sinamik asit gibi floresent bileşikler indikatör olarak tercih edilmektedir.

Kromatografi (özellikle HPLC) ve elektroforez cihazlarına spektroflorimetrisinin dedektör olarak eklenmesi pek çok uygulama alanında kolaylık sağlamaktadır.

Bütün bunların yanında floresans spektroskopisi, biyolojik sistemlerdeki özel bileşenleri tayin için immüno test uygulamalarında, DNA dizilemede, biyolojik sistemlerde ligant bağlama gibi çalışmalarda kullanılmaktadır.

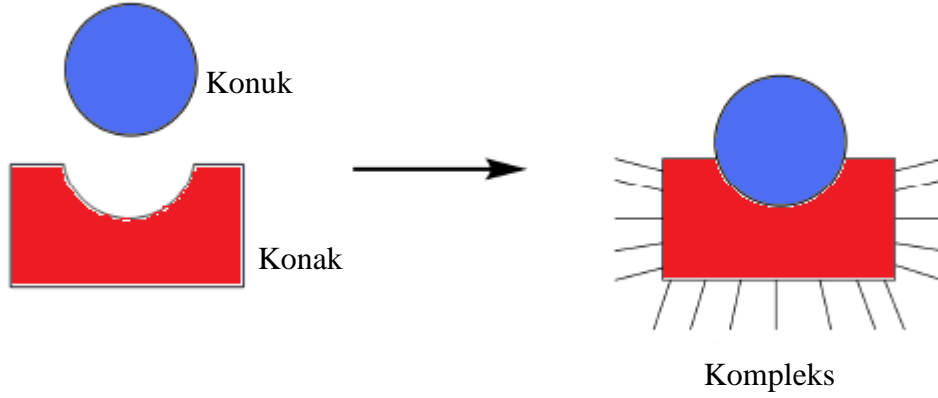
Floresans yöntemlerinin biyokimya ve çevre kirliliği analizlerinde kullanılması hem organik hem de anorganik maddelerin tayini için büyük bir öneme sahiptir. Floresans gösteren bir maddenin yaydığı ışının dalga boyu o madde için karakteristik olduğundan floresans analizleri ile maddelerin kalitatif analizi mümkün olur. Kantitatif analizler ise belirli bir konsantrasyon aralığında floresans şiddeti ile konsantrasyon arasındaki ilişkinin doğrusal olmasından yararlanılarak yapılır. Kolorimetrik veya spektrofotometrik yöntemlerle tayin edilemeyen çok düşük konsantrasyondaki çözeltiler ( $10^{-4}$  -  $10^{-9}$  M) floresans yöntemiyle tayin edilebilirler.

Çözelti halindeyken floresans gösteren az sayıda anorganik iyon bulunmaktadır. Bunlardan en iyi bilineni uranil iyonudur. Bunlardan başka  $Cr^{3+}$ ,  $Ce^{3+}$  ve  $Tl^{+}$  iyonları da floresans özellik gösterir. Az sayıda anorganik iyon doğrudan doğruya floresans göstermesine rağmen, pek çok sayıda anorganik iyon bazı aromatik yapıda maddeler ile şelat oluşturarak kuvvetli floresans yayan bileşikler oluştururlar. Böylece pek çok elementin hassas bir şekilde tayinini yapmak mümkün olmaktadır.

Birçok enzimin etkinlik ölçümleri florimetrik yöntemle yapılabilmektedir. Enzimatik etkinlik tayinindeki floresans ölçümleri, oda sıcaklığındaki çözelti içerisinde, organik bileşiklerin yapılarına özgü olan substrat ve koenzim dikkatle seçilerek reaksiyon ürünü olan bileşiğin uyarma ve emisyon dalga boyu tayin edildikten sonra ölçümler yapılabilir.

### **1.5. Moleküler Sensörler**

Moleküler sensörler veya kemosensörler analit ile etkileştiğinde tespit edilebilen bir değişiklik gösteren moleküllerdir. Bu değişiklikler genellikle spektroskopik olarak incelenebilen değişikliklerdir. Yani sensörün analitle etkileşmesi sensör molekülün spektroskopik özelliklerini değiştirir. Mesela sensör, floresans özelliği gösteren bir molekül ise bu özelliği azalabilir, kaybolabilir veya artabilir. Bu değişimin incelenmesinden analitin tayini yapılabilir. Böylece moleküler sensörlerde konak – konuk etkileşiminin olması söz konusudur (Şekil 1.13).



Şekil 1. 13. Konak - konuk etkileşimi ile moleküler sensör gösterimi

Reseptör, bazı fiziksel araçlarla konuğun varlığını bildirebiliyorsa bir sensör olarak kullanılabilir. Sensör ideal olarak özel bir konuk için seçici olmalıdır. Sensör, konuk molekülünün varlığını bildirmeli bunun yanında konuğun konsantrasyonunun izlemesine de izin vermelidir. Konuğun konsantrasyonunun izlenmesi fiziksel fonksiyon göstergelerini izlemek için tıbbi ve kirlilik seviyesini izlemek için ise çevresel açıdan çok önemlidir (De Silva vd., 1997).

Farklı türdeki analitlerin belirlenmesi için çok sayıda analitik metot mevcuttur. Ancak bunlar çok masraflı olmalarının yanında büyük miktarda numune gerektirirler. Bu nedenle moleküler sensörler, analitik tayinde birincil öneme sahiptirler. Moleküler sensörler, iki büyük sınıfa ayrılabilirler; bunlar elektrokimyasal ve optik sensörlerdir.

Elektrokimyasal sensörler, redoks aktif birimin reseptör kısma bağlanmasıyla elde edilebilir. Reseptörün yükseltgenme - indirgenme özelliklerindeki bir değişim, siklik voltametri (CV) gibi elektrokimyasal bir teknik ile belirlenebilir.

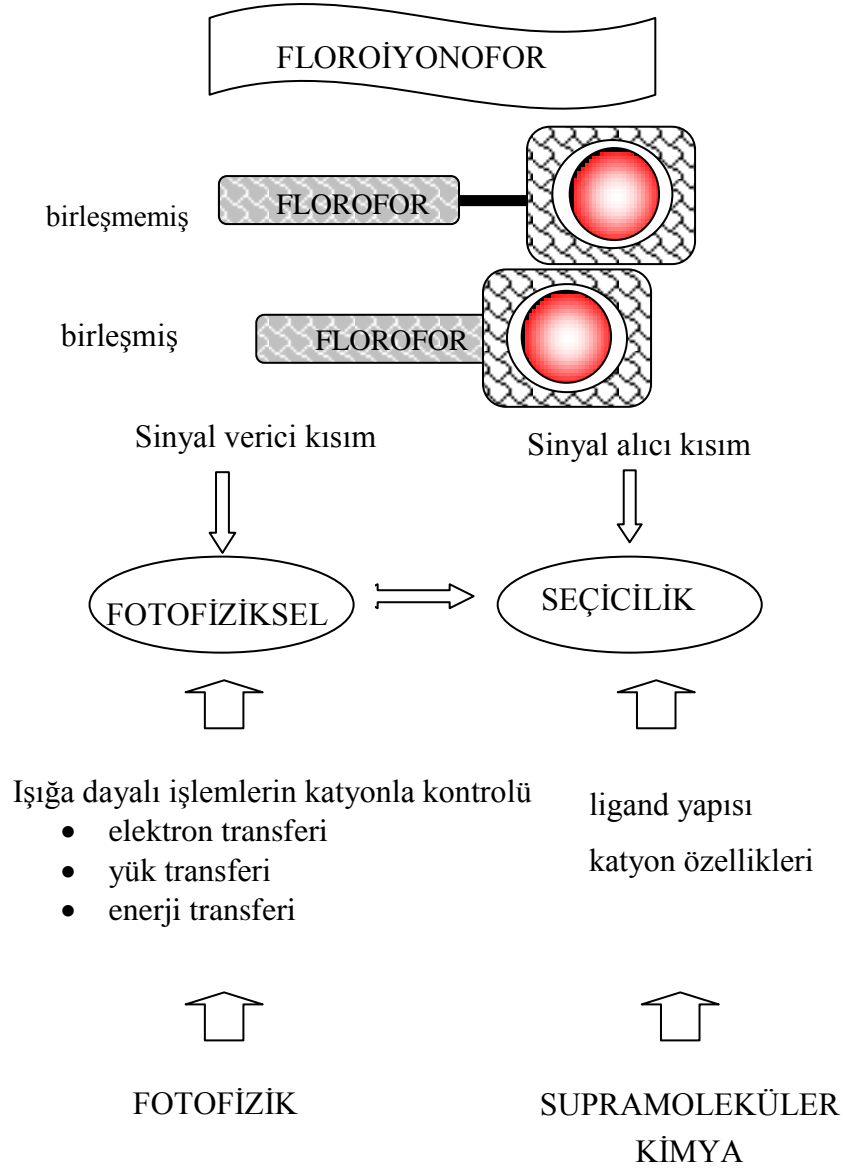
Optik sensörlerin en yaygın tipi floresent sensörlerdir. Çünkü diğer ışık - kaynaklı tayin metotları arasında floresans tayini yüksek duyarlılık, yüksek hız ve yüksek güvenlik gibi üç büyük avantaja sahiptir.

Yüksek duyarlılıkları sebebiyle moleküler sensörler, biyolojik sistemlerde kullanılmaya çok uygundur.

Floresent sensörler tehlikeli bir ürün oluşturmadığı ve numuneleri etkilemediği veya numunelere zarar vermediği için güvenle kullanılabilirler.

### 1.5.1. Katyon Bağlayıcı Floresent Sensörler

Katyon bağlayıcı floresent sensörlerin tasarımı ve işlevleri Şekil 1.14'de gösterilmiştir.



Şekil 1. 14. Katyon bağlayıcı floresent moleküler sensörlerin şeması (Valeur ve Leray, 2000).

Bu sensörlerin oluşumunda katyon kabul edici (alıcı) ve sinyal üretici kısımlar çok önemlidir. Sinyal kısmı sinyal dönüştürücüsü olarak görev yapar. Örneğin, katyon bağlanması; floroforun fotofiziksel özelliğinde bir değişiklik olarak ifade eden optik bir sinyale dönüştürür. Bu değişikliklerin sebebi katyon bağlanması ile elektron transferi, yük

transferi, enerji transferi, excimer (uyarılmış dimer) veya exciplex (uyarılmış kompleks) oluşumu veya sönme gibi ışına dayalı işlevlerin etkilenmesidir. Bu bakış açısı fotofizik alanı ile ilişkidir.

Floroionoforun alıcı (reseptör) kısmı, ligant yapısını, katyon karakterini (iyon çapı, iyon yükü, koordinasyon sayısı ve sertlik gibi) ve çözücünün özelliklerini belirleyen etkin ve seçici bir bağın oluşumundan sorumludur. Bu görüş ise supramoleküler kimya alanı ile ilişkilidir (Valeur ve Leray, 2000).

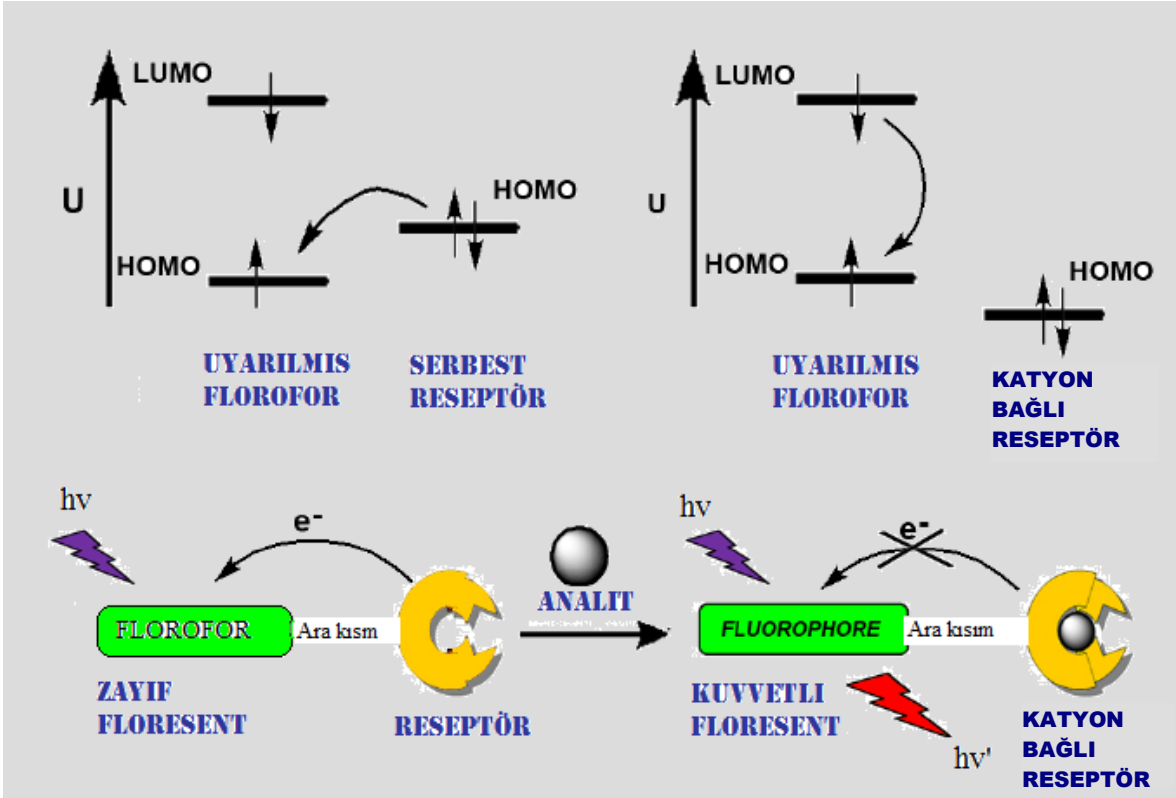
### **1.5.2. Katyon Bağlayıcı Floresent Sensörlerin Çalışma Mekanizmaları**

Katyon bağlayıcı floresent sensörleri ışığa dayalı işlemlerin yapısına göre 1) ışına dayalı elektron transferi (PET), 2) ışığa dayalı yük transferi (PCT), 3) uyarılmış dimer oluşumu şeklinde sınıflandırabiliriz (Valeur ve Leray, 2000).

#### **1.5.2.1. PET Sensörler**

Katyon bağlayıcı PET sensörler büyük ölçüde çalışma konusu olmuşlardır. Şekil 1.15'de gösterildiği gibi katyon alıcısının bir elektron donör olduğu (örneğin amino grupları) ve floroforun bir akseptör olarak rol oynadığı floroionoforda ışına dayalı elektron transferi (PET) bir katyon tarafından kontrol edilir.





Şekil 1. 15. Metal katyonu ile ışına dayalı elektron transferindeki (PET) değişim (Gawley vd., 2007).

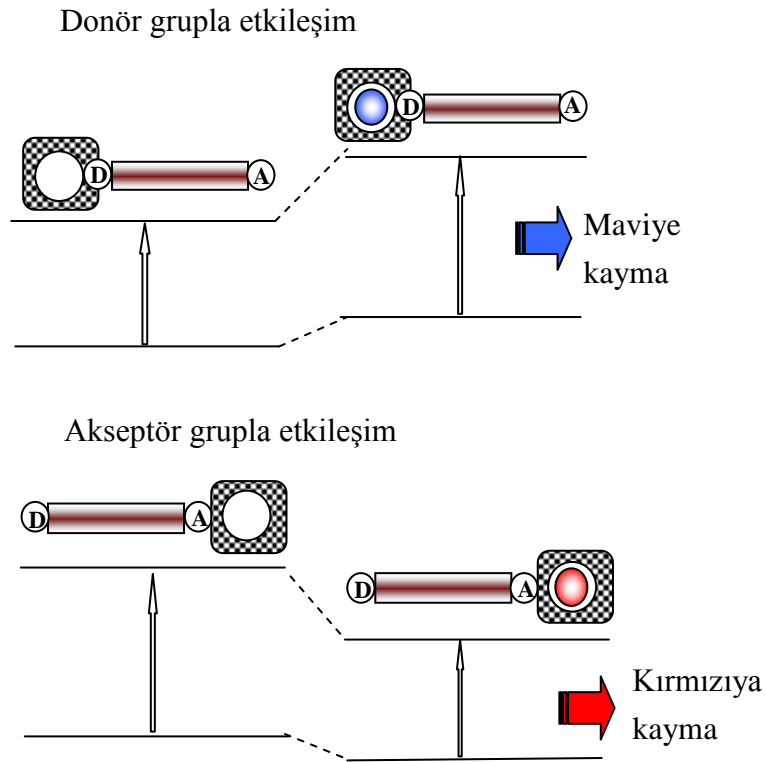
Katyon bağlanmadan önce sensörün florofor kısmı ışınla uyarıldığında HOMO orbitalindeki bir elektron LUMO orbitaline geçer. Bu durumda reseptör kısmındaki donör atomun (örneğin amino grubundaki) HOMO orbitalinden floroforun HOMO orbitaline bir elektron aktarılır. Böylece floroforun HOMO orbitalindeki elektron eşleşmiş olur. Bu durumda floresans ışınmasına sebep olacak olan LUMO orbitalinden HOMO orbitaline elektron aktarılması mümkün olmaz. Bu da floresans sönümüne yani floresans kaybına sebep olur.

Sensörün reseptör kısmı katyon bağladığında ise; donör atomun redoks potansiyeli artmıştır. Böylece donör atomun HOMO orbitali floroforun HOMO orbitalinden daha düşük enerjili olmuştur ve PET işlemi gerçekleşmez. Bu durumda floroforun LUMO orbitalinden HOMO orbitaline elektron geçişi mümkün olur. Bu da floresans ışınmasının artması anlamına gelir.

### 1.5.2.2. PCT Sensörler

Elektron-veren gruplar içeren bir florofor elektron çeken grup ile konjuge olduğunda ışık ile uyarılma sırasında donörden akseptöre molekül içi yük transferi azalır. Bir katyonun donör veya akseptör kısım ile etkileşmesi durumunda ise floroforun fotofiziksel özelliklerinin değişmesi beklenir. Çünkü kompleksleşmiş katyon molekül içi yük transfer oranını etkiler.

Floresent PCT sensörlerin PET sensörlerden temel farkı, katyon bağlanması ile PCT sensörlerde floresans spektrumunda meydana gelen kaymadır (Şekil 1.16).



Şekil 1. 16. PCT sensörlerde bir katyonun elektron veren veya alan grupla etkileşimi sonucu oluşan spektral kaymalar (Valeur ve Leray, 2000).

Bu kaymalar katyon reseptörünün yapısındaki fonksiyonel gruplara bağlıdır. PCT sensörlerde katyon bağlanması sonucunda floresans şiddeti azalabilir veya artabilir. Genellikle PCT ile floresans artışı PET ile olan kadar fazla değildir.

Bu sensörlerde florofor kısım elektron donör ve elektron akseptör kısımlar bulundurabilir. Işınla etkileşme sonucunda bu iki kısım arasında molekül içi yük aktarımı

gerçekleşir. Floroforda elektron veren bir grup (bir amino grubu) katyonla etkileştiğinde konjugasyon azaldığı için bu grubun elektron verme karakteri düşer, geçiş için daha çok enerji gerekir ve maviye kayma gözlenir. Tersine akseptör grupla etkileşen bir katyon bu grubun elektron çekme karakterini artırır. Böylece absorpsiyon spektrumunda daha az enerji ile kırmızıya kayma ve molar absorpsiyon katsayısında yükselme görülür. Ayrıca bu tür etkileşimler ile kuvantum veriminde de değişiklikler belirlenmiştir. Floresans spektrumundaki bu kayma prensipleri absorpsiyon spektrumu içinde geçerlidir (Valeur ve Leray, 2000).

### 1.6. Demirin İnsan Hayatındaki Önemi

Ünlü Avustralyalı moleküler biyolog Michael Denton, evrendeki doğa kanunlarının ve elementlerin insan yaşamı için özel bir yapıya sahip olduğunu anlattığı Nature's Destiny (Doğanın Kaderi) adlı kitabında, demirle ilgili olarak şunları yazmaktadır: "Tüm metaller arasında, demir kadar yaşam için zorunlu olan biri daha yoktur. Dünyanın ilk kimyasal farklılaşmasını sağlayan, ilkel atmosferi ve sonunda denizleri meydana getiren ısı, demir atomlarının yerçekimi tarafından merkeze doğru çekilmesiyle oluşmuştur." (Denton, 2002).

2003 yılından beri MagForce Nanoterapi denilen bir kanser tedavisi yönteminde demir oksit tanecikleri kullanılmaktadır. Almanya'daki dünyaca ünlü Charite Hastanesi'nden Dr. Andreas Jordan'ın geliştirdiği bu yöntemle manyetik likid hipertermia (yüksek ısılı manyetik sıvı) kanser hücrelerini sağlıklı hücrelere zarar vermeden yok etmektedir.

Demir dünya üzerinde üçüncü en yaygın elementtir ve yerkabuğunun yüzde beşini oluşturur. Demir elementi, dünya'da bu kadar fazla miktarda bulunmasına karşın, demirin oluşumu dünya dışında gerçekleşmiştir. Modern astronomik bulgular, dünya'daki demir madeninin dış uzaydaki dev yıldızlardan geldiğini ortaya koymuştur.

Demir vücudun dışarıdan aldığı, az miktarda ancak mutlak ihtiyaç duyduğu bir elementtir. Günlük en az 1,0 mg demiri yiyeceklerle dışarıdan almak gerekir. İnsan vücudunda demir, yapı taşı olarak görev yapmaktadır. Hemoglobin vücutta en çok demir içeren bileşiktir. Depolanmış haldeki demir ferritin ya da hemosiderindir. Vücutta depolanan demir, erkeklerde yaklaşık 1 gr, kadınlarda ise 0,5 gr'dır. Ferritin suda çözünebilen depo demirken, hemosiderin ferritinin suda çözünemeyen ürünüdür. Demir plazmada transferrin denen proteine bağlı olarak taşınır. İskelet ve kalp kasında

miyoglobulin kısmında demir bulunur (Yılmaz, 1999). En önemli demir kaynakları önem sırasına göre, et, karaciğer, yumurta, böbrek, pekmez, kuru meyveler, yeşil yapraklı sebzelerdir. Demir bakımından zengin olan diğer besinler arasında, kuru fasulye, kırmızı mercimek ve bezelye gibi baklagiller de sayılabilir.

Demir insan vücudunda her hücrede bulunan bir mineraldir. Demir, hem fiziksel hem de ruhsal sağlık açısından hayati önem taşımaktadır. Demir, üç ana fonksiyona sahiptir; bunlar akciğerden vücudun geri kalan kısımlarına oksijen taşıma, sağlıklı bir bağışıklık sistemini sürdürmek ve enerji üretimine yardımcı olmaktır. Bunun yanında yetersiz demir alınımı demir eksikliğine sebep olabilir. Demir eksikliği durumunda yorgunluk, uyuşukluk, daha sık enfeksiyonlar, soğuğa karşı dirençsizlik, öğrenme bozukluğu ve hypoferrimia gibi haller görülebilir. Bu yüzden insanların günlük alması gereken demir miktarı çok önemlidir. Tablo 1.1’de bu miktarlar verilmiştir.

Tablo 1. 1. Önerilen günlük alınması gereken demir miktarları

Yaş Aralığı	Demir (mg)
0-6 ay	10 mg
6-12 ay	15 mg
1-3 yaş	15 mg
4-10 yaş	10 mg
11-18 yaş erkek	18 mg
19 yaş üstü erkek	10 mg
11-50 yaş kadın	18 mg
Gebe kadın	45-60 mg
Emziren kadın	45-60 mg

### 1.7. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler; bitkilerde doğal olarak bulunan ve antioksidan özelliğe sahip olan çok önemli sekonder metabolitlerdir. Çoğunlukla suda çözünür ve aromatik zincir halkasına bağlı bir veya daha fazla sayıda hidroksil grubu içeren, basit fenolik bileşiklerden, yüksek oranda polimerize olmuş çok sayıda fenolik maddeler içeren geniş

bir gruptur. Yapılarındaki farklılıklara rağmen fenolik bileşikler polifenoller olarak da adlandırılmaktadırlar (Balasundram vd., 2006).

Fenolik bileşikler temel olarak fenolik asitler ve flavonoidler olarak ayrılır. Flavonoidler, fenolik bileşiklerin geniş bir grubunu oluşturur ve bu grupta flavonoller, flavanoller, antosiyaninler, kumarinler, tanninler ve lignin gibi önemli maddeler yer alır. Tablo 1.2’de fenolik bileşiklerin sınıflandırılması görülmektedir.

Fenolik bileşiklerin bir alt grubu olan flavonoidler ise, bir asrı aşkın bir süredir bitkisel pigmentler olarak bilinmektedirler. 1990 yılına kadar 5000’den fazla flavonoid alt birimi saptanmıştır (Du vd., 2008).

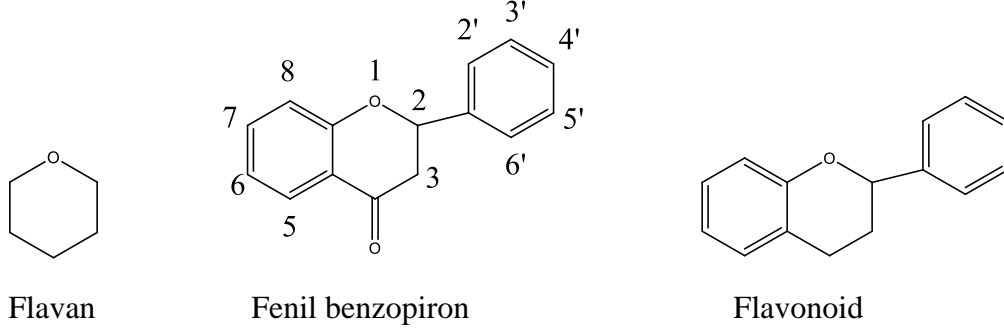
Tablo 1. 2. Fenolik bileşiklerin yapısal olarak sınıflandırılması (Meral vd., 2012).

Fenolik Grup Adı	Yaygın Örnek
Fenolik asitler	
Hidroksibenzoik asit	Gallik asit, Siringik asit, Total galatlar
Hidroksisünamik asit	Kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit
Stilbenler	Resveratrol
Flavonoidler	
Antosiyaninler	Depihidin-3-glikozit, Siyanidin-3-glikozit, Petunidin-3-glikozit, Malvidin-3-glikozit
Flavonoller	Kuersetin, Kaemferol, Kuersatagetin
Flavanoller (Flavan-3-oller)	Kateşin, Epikateşin, Epikateşin galat, Epikateşin-3-gallat
İzoflavonoidler	Genistein, Formononotein, Diadzein
Flavonlar	Rutin, Apigenin, Luteolein
Flavononlar	Mirisetin, Naringin, Naringenin

### 1.7.1. Flavonoidlerin Yapısı ve Oluşumları

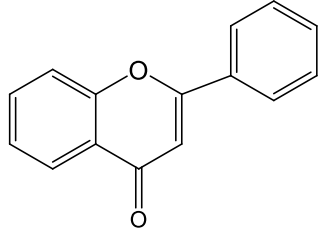
Flavonoidler C<sub>6</sub>–C<sub>3</sub>–C<sub>6</sub> difenilpropan yapısındadır ve fenil grupları arasındaki üçlü karbon köprüsü, oksijenle halka oluşturmaktadır (flavan halkası). Değişik flavonoidler arasındaki farklar; bağlanan hidroksil gruplarının sayısından, doymamışlık derecesinden ve

üçlü karbon segmentinin oksidasyon düzeyinden kaynaklanmaktadır. Şekil 1.17'de sırasıyla flavan halkası, fenil benzopiron ve flavonoidlerin genel yapısı görülmektedir.

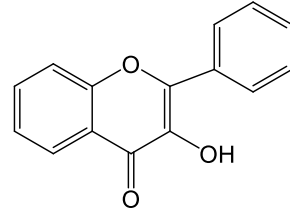


Şekil 1.17. Flavan halkası, fenil benzopiron ve flavonoidlerin genel yapısı

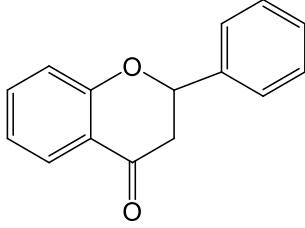
Şekil 1.17'de görülen fenil benzopiron yapısında numaralarla gösterilen yerlerdeki C atomlarına hidroksil (-OH) gruplarının bağlanmasıyla çok çeşitli flavonoidler meydana gelmektedir. Bu flavonoidlerin iskelet yapıları Şekil 1.18'de gösterilmiştir.



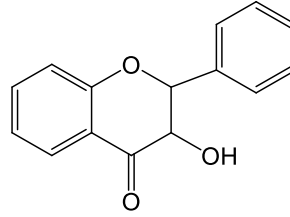
Flavon



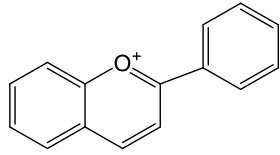
Flavonol



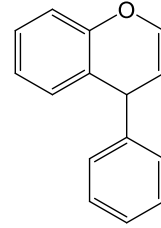
Flavanon



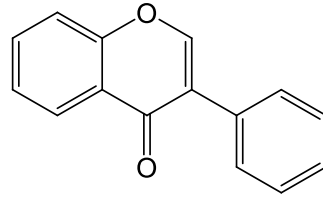
Dihidroflavonol



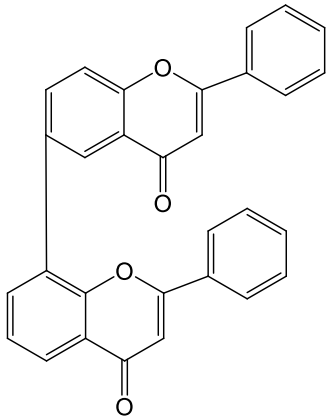
Antosiyanidin



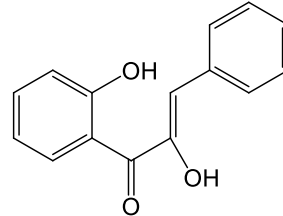
Neoflavon



İzoflavon



Biflavonoid



Kalkon

Şekil 1.18. Flavonoidlerin iskelet yapıları (Kahraman vd., 2002).

### **1.8. Flavonoidlerin Özellikleri ve Kullanım Alanları**

Flavonoidler yıllar önce araştırılmaya başlanmasına rağmen son yıllarda yapılan çalışmalar flavonoidlerin antioksidan özelliklerinin yanında antiinflamatuvar, antiallerjik, antitrombotik ve diğer özelliklerinin de bulunduğunu göstermektedir. Sayılan 5000' in üzerinde olduğu tahmin edilen flavonoidler çay, elma, soğan, baklagiller, domates ve kırmızı şarapta bol miktarda bulunmaktadır (Stavric, 1994; Bors vd., 1990).

Flavonoidler bitkilerde antioksidan, enzim inhibitör ve ışıktan koruma gibi bazı önemli özelliklere sahiptirler. Ayrıca bitkide enerjinin dönüşümüne ve büyüme hormonlarına etki etme gibi olaylardan da sorumludurlar (Harbone vd., 1982)

Flavonoidler, solunumu ve fotosentezi düzenleme ve bulaşıcı hastalıklara karşı savunma fonksiyonlarında görev alırlar (Granados vd., 2009).

Son zamanlarda flavonoidlerin, endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılmasıyla ilgili araştırmaların sayısı artmıştır. Bu bileşiklerin antioksidan, çeşitli ürün ve malzemeleri boyama, metaller ile tepkimede bulunma gibi özellikleri onların besin, tekstil, deri, metalürji, tıp ve ziraat gibi alanlarda kullanımlarını arttırmıştır.

UV ışınlardan koruma özellikleri flavonoidlerin kozmetik ürünlerde önemli katkı maddesi olarak kullanılmalarını sağlamıştır (Deveoğlu ve Karadağ, 2011).

Flavonoidlerin kullanım amacı göz önüne alınarak 1970'li yıllarda gerçekleştirilen araştırmalar sonucu bu bileşiklerin çok çeşitli biyokimyasal ve farmakolojik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir. Örneğin, bu tür bileşiklerin antioksidan (Rice-Evans, 1999), antimikrobiyal (Vazgeçer vd., 2005), antiviral (Kaul vd., 1985) ve antiülserojenik (Arif vd., 2004) özelliklere sahip oldukları açıklanmıştır. Bunun yanında flavonoidlerin (kersetin ve kamferolun) antimutajenetik (Snijman vd., 2007) ve antikarsinojenik (Birman, 2012) etkilere sahip oldukları in vitro ve in vivo şartlarda belirlenmiştir.

### **1.9. Metot Validasyonu**

Analitik kimyacıların laboratuvarlarda elde ettikleri sonuçların ne oranda doğru olabileceği bazı yöntemlerle tahmin edilebilir. Analizcinin elde ettiği sonuç rakamla ifade edilmeli, bu sonucun elde edilmesi sırasında mümkün hata kaynakları ve bu hataların sonuç üzerindeki etkisi belirtilmelidir. Sağlıklı bir analiz sonucu elde edebilmek için analiz en az üç kez değişik numunelerle tekrarlanmalıdır. Bir veya iki analiz ile elde edilen



sonucun gerçeği ne derecede yansıttığını tahmin etmek oldukça güç, hatta olanaksızdır. Bu yüzden yöntem geçerliliği (validasyonu) yapılmalıdır. Bir analitik metodun kendi amacı için kabul edilebilir olduğunu kanıtlayan işlemlere metod validasyonu denir. Bu amaçla; validasyon; metodun özgünlüğü, doğrusallığı, doğruluğu, kesinliği, doğrusal aralığı, gözlenebilme ve tayin sınırı, sağlamlığı gibi parametrelerin belirlenmesiyle sağlanır (Harris, 1995).

### 1.9.1. Doğruluk

Doğruluk (accuracy); analiz sonucunun gerçek değere ne kadar yakın olduğunun bir ifadesidir. Doğruluk, ölçümlerin aritmetik ortalamasının doğru değere yakınlığı olarak tanımlanır ve % hata olarak da ifade edilir.

$$\%Hata = \frac{(X_G - X_{ORT})}{X_G} \times 100 \quad (1.4)$$

Denklem 1.4'te  $X_G$  doğru değeri,  $X_{ORT}$  ise ölçümlerin aritmetik ortalamasını göstermektedir.

### 1.9.2. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Yöntemin kesinliği, herhangi bir değer için tekrarlanabilme kabiliyeti veya bireysel test sonuçlarının birbirine yakınlığının bir derecesidir. Yöntem kesinliği, standartların onayladığı bir dizi farklı ölçümün test sonuçlarına etkisidir. Kesinlik % bağıl standart sapma ile verilir. Kesinlik için kabul edilen kriter analizin tipine dayanır. Eczacılıkta, kalite kontrol analizi için bağıl standart sapma % 1'den daha iyi olan kesinlik kolaylıkla başarılabilirken çevresel ve besin numunelerinde kesinlik, daha çok numune matriksine dayanır. Ayrıca kesinlik, analit konsantrasyonuna, analiz tekniğine bağlı olup bağıl standart sapma % 2 ve % 20 den fazlaya kadar çeşitlilik gösterebilir.

Tekrarlanabilirlik, aynı kişi tarafından aynı şartlarda kısa zaman zarfında aynı miktardaki örneğin belli bir yöntem kullanılarak yapılan bir dizi işlemin, kesinliği olarak tanımlanır. Tekrarlanabilirlik, kesinliğin bir göstergesidir.

### 1.9.3. Seçimlilik ve Duyarlılık

Yöntemin seçimliliği; analiti numunede varlığı tespit edilmiş analit ile girişim yapabildiği diğer bileşenlerden farklı olarak ölçme yeteneğidir. Numune matrisinde bulunması gereken bileşenlerin yanında analiz edilecek maddelerin doğru ve özgün belirlenebilmesi, analitik yöntemlerin seçimliliğini belirler. Duyarlılık ise test işleminin konsantrasyonundaki küçük değişimleri kaydetme kapasitesidir. Kalibrasyon eğrisinin eğimidir (Ertaş ve Kayalı, 2005).

### 1.9.4. Gözlenebilme Sınırı (GS, LOD)

Bir analitik yöntemin performansı genellikle gözlenebilme sınırı ile ölçülür. Gözlenebilme sınırı konsantrasyon birimleri ile verilir (Denklem 1.5). Bir analitik ölçümde konsantrasyon çok düşük ise tanık ile aynı değerde cevap alınır. Pratikte gözlenebilme sınırı, en az on tanık çözelti için ölçülen sinyallerin standart sapmasının üç katı alınarak hesaplanabilir (Harris, 1995).  $\sigma$  : tanığın standart sapması, m: kalibrasyon grafiğinin eğimi

$$LOD = 3\sigma/m \quad (1.5)$$

### 1.9.5. Tayin Sınırı (TS, LOQ)

Gözlenebilme sınırında tekrarlanabilirlik çok düşük olduğundan, gerçek tayinler için sınır LOD değerinin bazen 5, bazen de 9 veya 10 katı olarak alınır ki, bu değere tayin sınırı adı verilir (Denklem 1.6). Bu sınır için önemli bir ölçüt, kabul edilebilir bir bağıl standart sapma değeridir. Sağlıklı tayinler için en az tayin sınırının 3 katı kadar bir konsantrasyon gereklidir (Harris, 1995).  $\sigma$  : tanık sinyalinin standart sapması, m: kalibrasyon grafiğinin eğimi

$$LOQ = \frac{9\sigma}{m} \quad (1.6)$$

### **1.9.6. Çalışma Aralığı**

Tayin edilen alt ve üst tayin sınırları arasında yer alan cevap aralığı bölgesi doğrusal çalışma aralığı olarak tanımlanır.

### **1.10. Floresans Spektrometrisi ile Elementlerin Kantitatif Tayini**

Gravimetri ve kulometri hariç bütün analitik yöntemler için kalibrasyon gerekir. Yöntemin kalibrasyonu ölçülen analitik sinyal ile analit konsantrasyonu arasındaki ilişkinin belirlenmesidir. En çok kullanılan iki yöntem: Dış kalibrasyon doğrusu yöntemi ve standart ekleme yöntemi'dir.

#### **1.10.1. Dış Kalibrasyon Doğrusu Yöntemi**

Floresans spektroskopisinde kantitatif analizler Lambert-Beer yasasına dayanarak yapılır. Konsantrasyonları bilinen standart çözeltilerin kaydedilen floresans şiddeti değerleri, analit konsantrasyona karşı grafiğe geçilerek uygun bir kalibrasyon doğrusu elde edilir. Daha sonra örneğin floresans şiddeti ölçülür ve grafik yardımıyla analizi yapılan elementin konsantrasyonu bulunur.

#### **1.10.2. Standart Ekleme Yöntemi**

Analizde, numunenin bulunduğu matriks etkisiyle fiziksel ve kimyasal girişimler meydana gelebilir. Numunenin matriksi tam olarak bilinmediğinde bu durum sonuçlara etki eder. Numunenin matriksinin tam olarak bilinmediği durumlarda bu etkiyi gidermek için standart ekleme yöntemi kullanılır. Bunun için numune en az üç kısma ayrılır. Birinci kısım belli bir hacme saf su ile tamamlanır. İkinci ve üçüncü kısımlara artan miktarlarda standart çözeltilerden eklenir ve hacmi ilk kısım ile aynı değere kadar saf su ile tamamlanır. Her çözeltinin absorbans veya floresans şiddetleri ölçülür ve eklenen standart konsantrasyonlarına karşı okunan değerler grafiğe geçirilir. Kalibrasyon doğrusunun yatay eksenini kestiği noktanın negatif işaretlisi, çözeltideki bilinmeyen konsantrasyonunu verir.

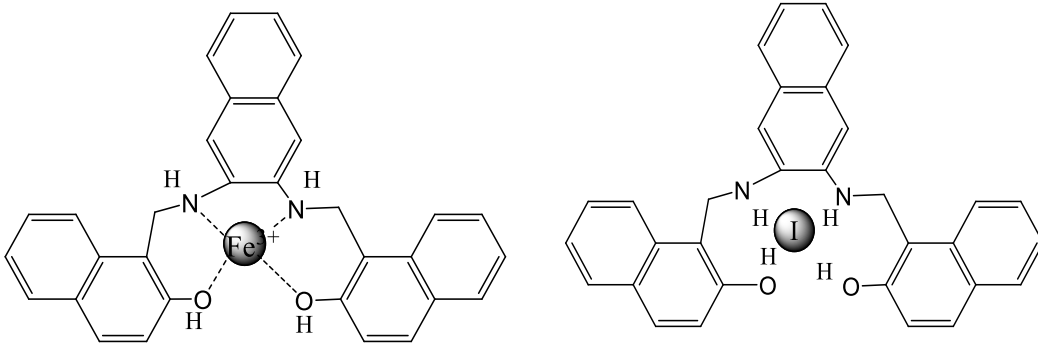
Deneysel çalışmalar sonucu elde edilen değerler, bu değerlerin doğruluğunu ve güvenilirliğini belirtecek şekilde verilir.

## 1.11. Literatür Özeti

### 1.11.1. Demir Tayini İçin Önerilen Floresent Sensörler

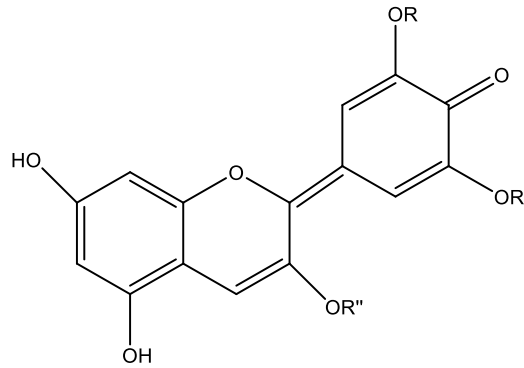
Literatürde demir tayini için önerilen sınırlı sayıda floresent sensör mevcuttur. Bu çalışmalar aşağıda özetlenmiştir:

Jung vd., (2010), oksijen ve azot gibi metal bağlayıcı kısımlar ve anyon bağlama için hidrojen bağ-donor kısımlar içeren yeni bir floresent reseptör (Şekil 1.19) sentezlemiştir. Bu reseptörün fizyolojik olarak uygun katyon ve anyonlara karşı  $I^-$  iyonunu seçici olarak tayin etmesi UV-vis spektrumundaki değişmelerle araştırılmıştır. Diğer taraftan, reseptörün geniş bir doğrusal konsantrasyon aralığı üzerinde  $Fe^{3+}$  iyonunu selektif olarak bağlanması emisyon spektrumundaki değişme ile incelenmiştir. Maksimum floresansın gerçekleştiği 438 nm'de gerçekleştirilen florimetrik çalışmalarda, THF/H<sub>2</sub>O (1:99,v/v) çözücü sisteminde HEPES ile tamponlandığında  $Fe^{3+}$  için yüksek reseptör seçiciliği gösterdiği görülmüştür. Ligant ile  $Fe^{3+}$  arasındaki kompleks stokiyo metrisi Stern-volmer eğrisi ve Job eğrisi metotlarıyla 1:1 olarak belirlenmiştir.  $Fe^{3+}$  ve  $I^-$  için minimum gözlenebilir sınırları sırasıyla  $3,53 \times 10^{-5}$  M ve  $4,25 \times 10^{-7}$  M'dir.  $I^-$  için doğrusal çalışma aralığı 30 - 180  $\mu$ M,  $Fe^{3+}$  için ise 5 - 20  $\mu$ M olarak bulunmuştur. Bu çalışmada, aynı sensör kullanılarak farklı yöntemlerle farklı analitlerin tayinine imkân verilmiştir. Bu çalışma, iki farklı tayin modeli kullanılarak, absorbanstaki değişmelerle  $I^-$  ve emisyondaki değişmelerle  $Fe^{3+}$  iyonlarını tayin edebilen sensöre ilk örnektir.



Şekil 1.19. Reseptörün  $Fe^{3+}$  ve  $I^-$  iyonlarına bağlanması (Jung vd., 2010).

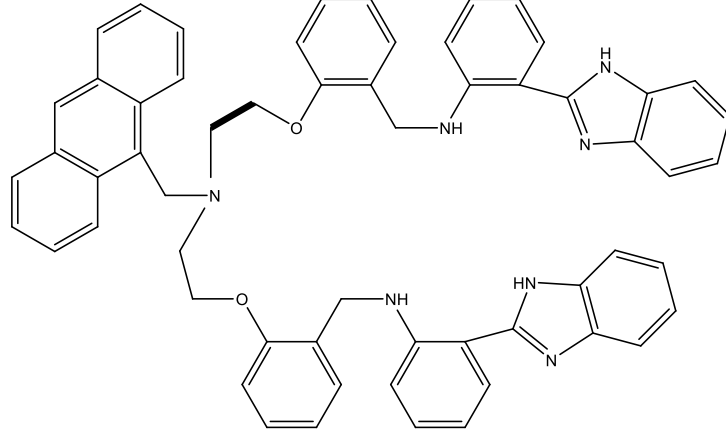
Zhang vd., (2010) doğal floresans moleküllerin iyon tayininde kullanılması üzerine bir çalışma geliştirmiştir. Bu çalışmada doğal floresant madde olan üzüm kabuğu,  $Fe^{3+}$  tayini için bir sensör olarak kullanılmıştır. Üzüm kabuğunun ana pigmenti olan antosiyanin, floresans maddesi olarak bilinmektedir. Üzüm kabuğunda bulunan ve sensör olarak kullanılan antosiyanin bileşiği Şekil 1.20'de gösterilmiştir. Antosiyanin metal iyonları ile kompleks oluşturma özelliği nedeniyle, sensörün floresans şiddeti  $Fe^{3+}$  ile sönmemektedir. Ayrıca, sensörün spektral özellikleri ve  $Fe^{3+}$  iyonuna florimetrik cevabı incelenmiştir. Bunun yanında floresans şiddeti üzerine pH'nın, sıcaklığın ve yabancı iyonların etkisi de çalışılmıştır. Sonuç olarak; pH 5' de  $Fe^{3+}$  iyonunun tayin edilebilmesine dayanan florimetrik bir metot geliştirilmiştir ve üzüm kabuğuna dayanan florimetrik sensörün  $Fe^{3+}$  ün tayini için çok iyi çalıştığı belirlenmiştir. Üzüm kabuğu kaynaklı bu sensör,  $1,0 \times 10^{-8}$  M ile  $1,0 \times 10^{-5}$  M ( $R^2=0,9888$ ) ve  $3,2 \times 10^{-5}$  M ile  $3,2 \times 10^{-4}$  M ( $R^2=0,9856$ ) olmak üzere iki farklı konsantrasyon aralığında  $60$  °C'ta  $Fe^{3+}$  için bir kalibrasyon cevabı gösterilmiştir.  $Fe^{3+}$  için gözlenebilir sınıırı  $0,419$   $\mu\text{g/L}$  olarak bulunmuştur. Tayin için geliştirilen bu sensör gerçek numunelere uygulanmamıştır.



Şekil 1.20. Üzüm kabuğunda bulunan ve  $Fe^{3+}$  iyonunu tayini için önerilen antosiyanin bileşiği (Zhang vd., 2010).

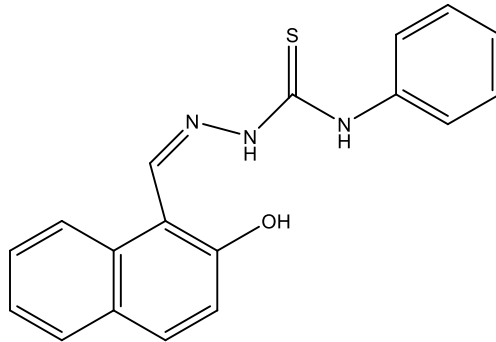
Lee vd., (2014) benzimidazol ve antrasen olmak üzere iki floresant grup içeren bir bileşik (Şekil 1.21) tasarlamıştır. Böylece aynı uyarma dalga boyu ile floresans davranışları oldukça farklı olan iki florofor gruptan meydana gelen ligant uyarılmıştır. 1:1 asetonitril - su çözücü karışımında  $367\text{nm}$ 'de uyarma gerçekleştirildiğinde  $424\text{nm}$ 'de maksimum emisyon meydana gelmiştir. Bu çalışmada pH 7'ye HEPES tamponu kullanılarak ayarlanmıştır. Geçiş metallere karşı yapılan çalışmalarda ligandın  $Fe^{3+}$  iyonlarına karşı seçici ve spesifik davranış gösterdiği belirlenmiştir. Böylece ligandın  $Fe^{3+}$  iyonlarının

tayininde sensör olarak kullanılabilceği önerilmiştir. Ancak gerçek numunelere uygulamalar gerçekleştirilmemiştir.



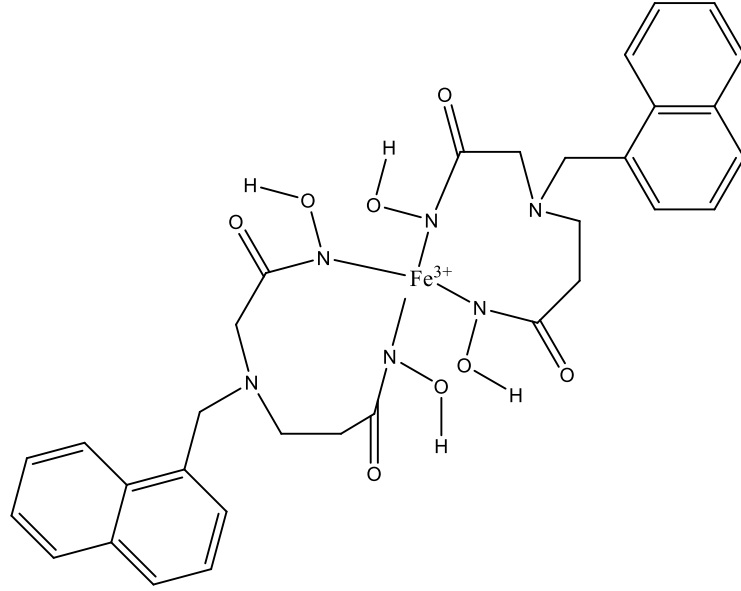
Şekil 1. 21.  $Fe^{3+}$  tayini için önerilen benzimidazol ve antrasen iki floresent grup içeren bir bileşik (Lee vd., 2014).

Casanueva-Marengo vd., (2012) 2-hidroksi-1-naftaldehit'in 4-feniltiyosemikarbazit reaksiyonu ile  $Fe^{3+}$  iyonu için yeni bir sensör (Şekil 1.22) oluşturmuştur. Yapılan çalışma THF:su (9:1) çözücü sisteminde  $1 \times 10^{-5}$  M'lık bileşiğin pH 7,4'te 17–37  $\mu M$  (1,0-2,1 mg/L) aralığında  $Fe^{3+}$  iyonlarını tayin edilebileceğini göstermiştir. Ancak bu çalışmada bileşiğin gerçek numunelerde demir tayininde kullanımına yönelik bir bilgiye rastlanmamıştır.



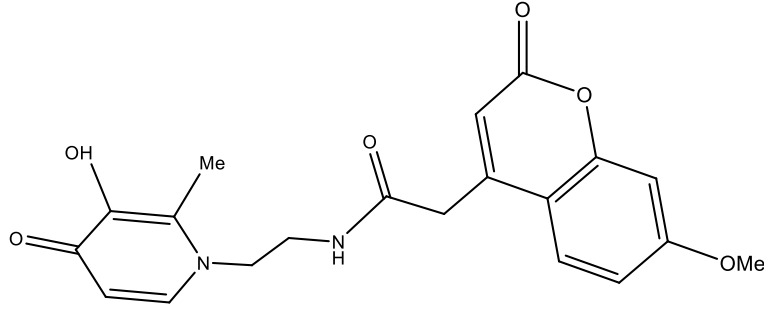
Şekil 1. 22.  $Fe^{3+}$  tayini için önerilen 2-hidroksi-1-naftaldehit'in 4-feniltiyosemikarbazit ile reaksiyonu ile oluşan sensör bileşik (Casanueva-Marengo vd., 2012).

Senthilnithy vd., (2008) naftalen grubu taşıyan aminodihidroksamik asit bileşiğini (Şekil 1.23),  $1 \times 10^{-5}$  M konsantrasyonunda kullandıklarında metanol:su (1:1) ortamında pH 3'te  $Fe^{3+}$  iyonunu  $1,0 \times 10^{-5}$ - $1 \times 10^{-4}$  M (0,6-5,6 mg/L) aralığında tayin edebilmektedir. Gözlenebilirlik sınırı 0,3 mg/L olarak verilmiştir. Bu çalışmada sönme mekanizmasına bağlı olarak bileşiğin  $Fe^{3+}$  iyonları ile 1:1 ve 1:2 kompleksleri oluşturduğu görülmektedir. Bu komplekslerin kararlılık sabitleri sırasıyla  $\log K=3,30$  ve 9,05 olarak verilmiştir. Bu yöntem de gerçek numunelere uygulanmamıştır.



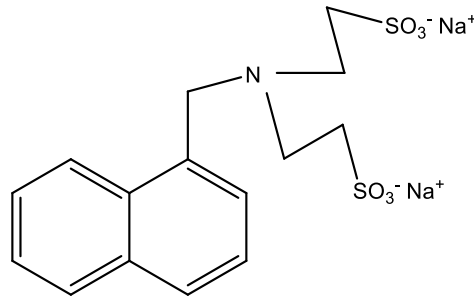
Şekil 1. 23. Naftalen floroforu taşıyan aminodihidroksamik asit bileşiğinin  $Fe^{3+}$  iyonu ile muhtemel kompleksi (Senthilnithy vd., 2008).

Luo vd., (2004) 3-hidroksipiridin-4-on yapısının floresant metoksikumarin grubuyla kombinasyonundan oluşmuş bir floroionofor bileşik (Şekil 1.24) önermiştir ve bileşiğin  $Fe^{3+}$  iyonu ile etkileşimi floresans şiddetinde azalma ile sonuçlanmıştır. Yapılan çalışmada bu bileşiğin  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  iyonları arasından  $Fe^{3+}$  iyonuna karşı seçimli kompleksleşme özelliği gösterdiğini belirlenmiştir. Bu özelliğe dayanarak  $0 - 1,0 \times 10^{-6}$  M (0-0,06 mg/L) aralığında  $Fe^{3+}$  iyonunun pH 7'de sulu çözeltide tayin edilebileceği bildirilmiştir. Ancak önerilen metodu gerçek numunelere uygulamamışlardır.



Şekil 1.24.  $Fe^{3+}$  tayini için önerilen metoksikumarin floroforu taşıyan floroionofor bileşik (Luo vd., 2004).

Singh vd., (2009) aminobisulfonat ionoforunun naftalen floroforu ile birleşmesinden oluşmuş bir floroionofor bileşik (Şekil 1.25) önermiştir.  $Fe^{3+}$  iyonlarının bağlanması bileşiğin floresans şiddetinde sönmeye sebep olmuştur. Bunun sebebinin  $Fe^{3+}$  ve uyarılmış naftalen grubu arasındaki elektron/enerji transferinin olduğu bildirilmiştir. Bu bileşik fizyolojik pH'da  $Fe^{3+}$  iyonu için diğer bir çok metal iyonuna göre seçimli bir sensör olarak önerilmiştir. Sensörün  $Fe^{3+}$  iyonunu sulu çözeltilerde 16-63  $\mu M$  (0,9-3,5 mg/L) doğrusal aralıkta tayin edebildiği görülmüştür. Stern-Volmer analizleri kompleks bileşiminin 1:1 ve Benesi-Hilderbrand eşitliği kompleks kararlılık sabitinin  $\log K=4,88$  olduğunu göstermiştir. Gözlenebilirlik sınırı 0,1 mg/L olarak bildirilmiştir. Ancak bu çalışmada da bileşiğin gerçek numunelerde demir tayininde kullanıldığına dair bir bilgi verilmemiştir.



Şekil 1.25.  $Fe^{3+}$  tayini için önerilen naftalen floroforu taşıyan floroionofor bileşik (Singh vd., 2009).

Feng vd., (2007) tarafından  $\beta$ -siklo dekstrinli 2,6-bis(benzoksazoli)piridin,  $Fe^{3+}$  için seçici ve duyarlı bir floresent kemosensör olarak önerilmiştir.  $Fe^{3+}$  iyonu varlığında



floresans sönüm gerçekleşmiştir ( $\lambda_{uy}= 320 \text{ nm}$  ). Yapılan çalışmada çözücü sistemi, etanol su (1:9) karışımı olarak seçilmiş ve pH optimize edilerek 7'ye ayarlanmıştır. Artan  $\text{Fe}^{3+}$  iyonuna karşı floresans sönümü Stern-Volmer eşitliği ile incelenmiştir ve sönüm sabiti  $1,25 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada  $6,0 \times 10^{-7} \text{ M}$ 'lık  $\text{Fe}^{3+}$  konsantrasyonuna kadar Stern-Volmer ilişkisinin doğrusal ( $R=0,99927$ ) olduğu belirlenmiştir.  $1,47 \times 10^{-2} \text{ mg/mL}$   $\beta$ -siklo dekstrinli  $6,63 \times 10^{-6} \text{ M}$  2,6-bis(benzoksazoli)piridin kullanıldığında  $\text{Fe}^{3+}$  için gözlenebilme sınırı  $6,0 \times 10^{-7} \text{ M}$  olarak verilmiştir. Gerçek numunelerde uygulama yapılmamıştır.

Meng vd., (2012) mikro miktardaki  $\text{Fe}^{3+}$  iyonunun tayini için yeni ve duyarlı florimetrik bir metot geliştirmiştir. Bu metot klorogenik asit çözeltisindeki  $\text{Fe}^{3+}$  iyonunun floresans sönme etkisine dayandırılmıştır. HAc-NaAc tampon çözeltisinde (pH 4,0) klorogenik asidin maksimum uyarma ve emisyon dalga boyları sırasıyla 338 nm ve 420 nm olarak bulunmuştur.  $9,30 \times 10^{-8} \text{ M}$  gözlenebilme sınırı ile  $3,2 \times 10^{-7} \text{ M}$  ile  $1,00 \times 10^{-4} \text{ M}$  konsantrasyon arasında doğrusal bir ilişki bulunmuştur. Gerçek numunelerde uygulama yapılmamıştır.

Long vd., (2008) sefradin'in (CEPC) floresansında  $\text{Fe}^{3+}$ 'ün sönüm etkisine dayandırılan mikro miktardaki  $\text{Fe}^{3+}$  iyonunun tayini için yeni ve duyarlı bir florimetrik sönümü metodu geliştirmiştir. pH'ı 3 olan HCl çözeltisinde sefradin'in miktarı 0,11 g/L, maksimum uyarma ve emisyon dalga boyları ise sırasıyla 351 nm ve 431 nm'dir. Bağlı floresans şiddeti ve  $\text{Fe}^{3+}$ 'ün konsantrasyonu arasında  $1,6 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 'den  $6,3 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 'ye olmak üzere doğrusal bir ilişki bulunmuştur. Gözlenebilme sınırı  $6,25 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$  ve % bağıl standart sapma ( $N=11$ ) 2,10 olarak hesaplanmıştır. Ancak metod gerçek numunelere uygulanmamıştır.

Tavallali vd., (2010)  $\text{Fe}^{3+}$  iyonunun eser miktardaki tayini için basit ve etkili bir spektrofiorimetrik metot geliştirmiştir. Metot, yüzey aktif olarak TX-100 varlığında  $\text{Ce}^{3+}$ 'nin floresans şiddeti üzerine  $\text{Fe}^{3+}$ 'in sönüm etkisine dayandırılmıştır. Ce-Fe-TX-100 için sinyaller  $\lambda_{uy}=303,5 \text{ nm}$ 'de ve  $\lambda_{em}= 354 \text{ nm}$ 'de gözlenmiştir. Metot, optimum şartlarda; pH 4'de  $[\text{TX-100}]=\% 8,33 \times 10^{-5}$ 'de (v/v), 25°'de, 0,13  $\mu\text{g/mL}$  gözlenebilme sınırı ile 0,2-15  $\mu\text{g/mL}$   $\text{Fe}^{3+}$  tayinine imkan sağlamıştır. Çalışmada bazı inorganik anyon ve katyonlar için sönüm etkisi araştırılmıştır ve ciddi bir girişim etkisi gözlenmemiştir. Gerçek numunelerde uygulama yapılmamıştır.

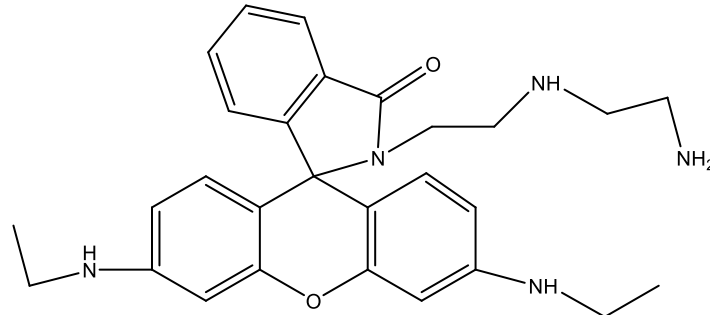
Cha vd., (1996) hidrazon türevi bir ligant olan 2-pridinkarbaldehit-5-nitro-pridilhidrazon kullanarak, metanol-su ortamında direkt  $\text{Fe}^{3+}$  tayini gerçekleştirmişlerdir.

Ligant konsantrasyonu  $1,0 \times 10^{-3}$  M olarak seçilmiştir. Yüzey aktif madde olarak hegzadesiltrimetilamonyum bromür ve pH ayarlamak için hegzametilentetramin maddeleri saf suda çözülerek kullanılmıştır. Yöntem için optimum pH 7,0 olarak belirlenmiştir. Uyarma dalga boyu 300 nm olarak seçilmiş ve 420 nm'deki floresans şiddetleri ölçülmüştür. Tayin aralığı 0,20-1,45 mg/L, gözlenebilme sınırı 0,028 mg/L, % BSS 0,3 mg/L olarak bulunmuştur. Ancak bahsedilen çalışma gerçek numunelere uygulanmamıştır.

### 1.11.2. Gerçek Numunelerde Demir Tayininde Kullanılan Floresent Sensörler

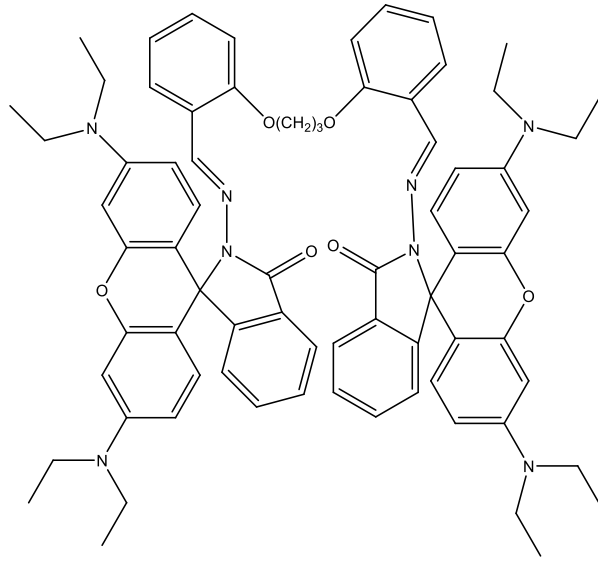
Literatürde demir tayini için önerilen ve gerçek numunelerde uygulanan floresent bileşikler oldukça sınırlı sayıdadır ve aşağıda özetlenmişlerdir:

Mao vd., (2010) rodamin bazlı bir floresent bir bileşiği (Şekil 1.26)  $Fe^{3+}$  iyonunun seçimli tayini için önermiştir (Mao vd., 2010). Bu bileşik  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ve  $Cd^{2+}$  varlığında  $Fe^{3+}$  iyonuna seçimli davranmıştır. Optimum pH'ı ayarlamak için HEPES tampon çözeltisi kullanılmıştır. Uyarma dalga boyu olarak 500 nm seçilmiş ve 552 nm'deki floresans şiddetleri ölçülmüştür. Bu metot musluk suyunda ve atık sularda demir tayininde kullanılmıştır. ICP-AES metodu ile musluk suyu numunesinde 78,5 mol/L ve atık su numunesinde 189,3 mol/L olarak bulunan  $Fe^{3+}$  miktarları önerilen metot kullanılarak sırası ile 75,4 ve 187,3 mol/L olarak bulunmuştur. Metodun tayin aralığı 3,4  $\mu g/L$  -0,4 mg/L olarak verilmiştir. Gözlenebilme sınırı ise 0,8  $\mu g/L$ 'dir.



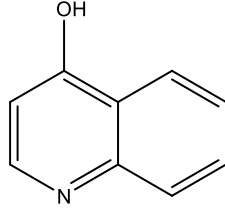
Şekil 1.26.  $Fe^{3+}$  tayini için önerilen rodamin esaslı floresent bir bileşik (Mao vd., 2010).

Rodamin, fotofiziksel özellikleri nedeniyle en ilgi çekici florokromoforlardan biridir, son zamanlarda ağır metal iyonlarının tayini için rodamin esaslı ve polimerik kemosensörlerin geliştirilmesi üzerinde çokça durulmuştur. Bununla birlikte,  $Fe^{3+}$  tespiti için literatürde sadece bir kaç kemosensör mevcuttur. Chereddy vd., (2012) altı yeni rodamin esaslı kemosensör sentezlemiştir. Yapılan bu çalışmada, Şekil 1.27’de gösterilen kemosensörü floresans özelliklerinden yararlanarak, sulu numunelerde toksik  $Fe^{3+}$  iyonlarına maruz kalmış fibroblast canlı hücrelerinin görüntülenmesi kemosensörün olası bir uygulaması olarak sunulmuştur



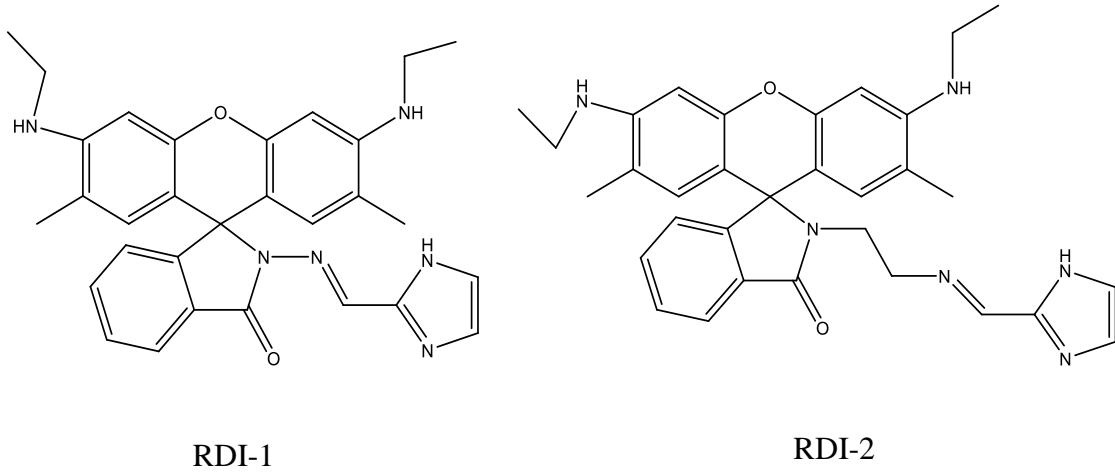
Şekil 1.27.  $Fe^{3+}$  tayini için önerilen rodamin esaslı bir kemosensör (Chereddy vd., 20102).

Ragos vd., (1998) 4-hidroksikinolin bileşiğini (Şekil 1.28) büyük baş hayvan karaciğerinde  $Fe^{3+}$  iyonunun tayininde kullanılmıştır.  $Fe^{3+}$  iyonu ligandın floresans şiddetinde sönmeye sebep olmuştur. 305 nm’de uyarma ile ölçümler 380 nm’de yapılmıştır. Önerilen tayin bazik ortamda (pH=10, KOH ile) mikromolar konsantrasyonlar için gerçekleştirilmiştir. Sığır karaciğerinde  $Fe^{3+}$  tayinini ciddi şekilde etkileyen metal katyonlarını maskeleyerek için potasyum florür ve trietilentetramin çözeltileri kullanılmıştır. Yöntem için tayin aralığı 5 - 10  $\mu\text{mol/L}$ , % BSS 0,80 olarak bulunmuştur.



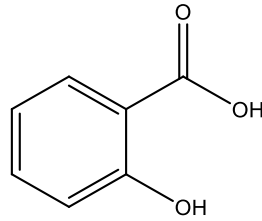
Şekil 1. 28.  $Fe^{3+}$  tayini için önerilen 4-hidroksikinolin (Ragos vd., 1998).

Sivaraman vd., (2014) Rodamin 6G florofor ve 2-formil imidazol'un reaksiyonundan iki rodamin kaynaklı sensör olan RD-1 ve RD-2 bileşiklerini (Şekil 1.29) sentezlemiştir. RD-1 ve RD-2, pH 7,4 tampon çözeltilerinde,  $Fe^{3+}$  iyonlarına karşı çok yüksek seçicilik ve tam bir duyarlılık göstermiştir. RD-1 ve RD-2 bileşiklerine (DMSO/ $H_2O$ 'da 2:8, pH 7,4'de) 1:1 oranında  $Fe^{3+}$  eklenmesiyle renksizden pembeye bir renk değişimi gerçekleşirken kompleksler (RD-1- $Fe^{3+}$ ), RD-2- $Fe^{3+}$ ) floresans özellik kazanmıştır. Bu komplekslerde 523 nm'de kuvvetli bir absorpsiyon görülmüştür. Job eğrisi ve ESI-MS çalışmalarına göre; bileşiklerle  $Fe^{3+}$  arasında 1:1 bir bağlanma modeli olduğu önerilmiştir. Bu yüzden RD-1 ve RD-2, floresan ve kromojenik sensörler olarak önerilmiştir. Sensörler, canlı hücre olarak *Candida albicans* hücrelerinde, görüntüleme uygulamalarında kullanılmıştır.



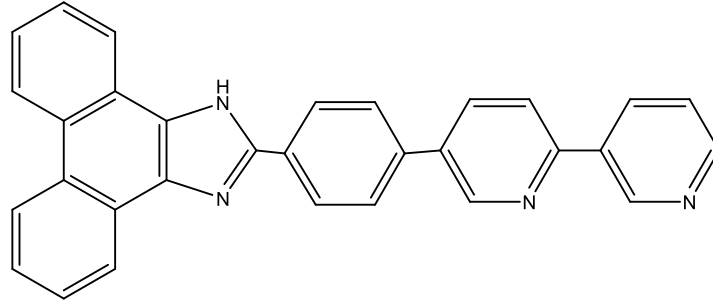
Şekil 1.29.  $Fe^{3+}$  tayini için önerilen RD-1 ve RD-2 bileşikleri (Sivaraman vd., 2014).

Cha vd., (1998) salisilik asit-Fe<sup>3+</sup> kompleksleşmesinden faydalanılarak salisilik asidin (Şekil 1.30) floresans şiddetindeki azalmayı ölçerek Fe<sup>3+</sup>'ün spektrofotometrik tayinini incelemiştir. Yapılan bu çalışmada salisilik asit sulu çözeltilerde 299 nm'de uyarıldığında, 409 nm'de Fe<sup>3+</sup>'nın eklenmesiyle doğrusal olarak azalan bir emisyon şiddetine sahip olduğu gösterilmiştir. Fe<sup>3+</sup> tayini için, doğrusal aralık  $1 \times 10^{-6}$  -  $10 \times 10^{-6}$  M (0,0558 - 0,558 mg/L) ve gözlenebilme sınırı ise  $5 \times 10^{-8}$  M'dır. pH 8'e ayarlamıştır. Önerilen metot musluk suyu ve doğal su numunelerinde uygulanmıştır. Toplam demir miktarını tayin etmek için su numunelerine KMnO<sub>4</sub> ilave edilerek Fe<sup>2+</sup> iyonları Fe<sup>3+</sup>'ya yükseltgenmiştir. Tayin sonuçları ICP-AES sonuçlarıyla karşılaştırılarak doğruluğu gösterilmiştir.



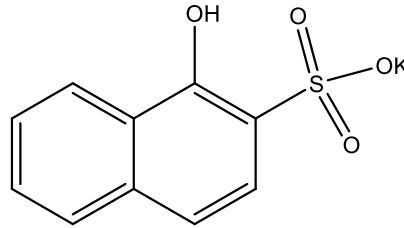
Şekil 1.30. Fe<sup>3+</sup> tayini için önerilen salisilik asit (Cha vd., 1998).

Lin vd., (2009) fenantroimidazol türevi olan 2-(4-(2,2-Bipridin-5-il)fenil)-1H-fenantro[9,10-d] imidazol bileşiğini (Şekil 1.31) ( $5 \mu\text{M}$  %50 sulu metanol'de), Fe<sup>3+</sup> için orantılı floresent sensör olarak kullanmıştır. Fe<sup>3+</sup> tayini için pH aralığı olarak 5-10 arası uygun bulunmuştur. Ligandın Fe<sup>3+</sup> ile etkileşmesiyle 440 nm ve 500 nm de emisyon şiddetlerinin oranlarının 0,36 dan 3,24'e arttığı görülmüştür. Fe<sup>3+</sup> için sensörün tayin aralığı  $1,0 \times 10^{-5}$ - $1,5 \times 10^{-4}$  M ve gözlenebilme sınırı  $5,26 \times 10^{-6}$  M olarak belirlenmiştir. Geliştirilen metot, Yuelu kaynak sularına, musluk sularına ve Xiang nehir sularına uygulanmıştır. Bunun için su numunelerine  $1 \times 10^{-5}$  ve  $5 \times 10^{-4}$  M konsantrasyonda Fe<sup>3+</sup> katılarak gerikazanım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Örneğin,  $1 \times 10^{-5}$  M Yuelu kaynak suyunda yapılan tayinde 99,4 % geri kazanım ve  $0,03 \times 10^{-5}$  bağıl standart sapma ile Fe<sup>3+</sup> iyonu miktarı  $4,97 \times 10^{-5}$  mol/L ;  $5 \times 10^{-4}$  M Yuelu kaynak suyunda ise 98,0 % geri kazanım ve  $0,05 \times 10^{-4}$  bağıl standart sapma ile Fe<sup>3+</sup> miktarı  $0,98 \times 10^{-4}$  mol/L olarak bulunmuştur.



Şekil 1. 31.  $\text{Fe}^{3+}$  tayini için önerilen 2-(4-(2,2-Bipridin-5-il)fenil)-1H-fenantro[9,10-d] imidazole (Lin vd., 2009).

Sayour vd., (2011) suda çözünen 1-naftol-2-sülfonatin potasyum tuzunun (Şekil 1.32) floresans şiddeti üzerine  $\text{Fe}^{3+}$ 'ün sönümü etkisi kullanılarak  $\text{Fe}^{3+}$  akışkan enjeksiyonlu analizi için duyarlı ve seçici bir metot geliştirmiştir. Floresans emisyon spektrumları 283 nm'de uyarma ile alınmıştır. 1-naftol-2-sülfonatin emisyon şiddetinin  $\text{Fe}^{3+}$  konsantrasyonu ile doğrusal olarak düştüğü belirlenmiştir. Akış enjeksiyonlu analiz ile  $\text{Fe}^{3+}$  için bu düzgün doğrusallık aralık 0,1-18 $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve gözlenebilme sınırı ise 3,4 ng/mL olarak bulunmuştur. Metot ile endüstriyel atık numunelerinde ve şehir kanalizasyon numunelerinde ölçüm yapılmıştır. Sonuçlar 0,6 - 1,6 % BSS aralığında bulunmuştur.



Şekil 1. 32.  $\text{Fe}^{3+}$  tayini için önerilen 4-hidroksikinolin 1-naftol-2 sülfonat'ın potasyum tuzu (Sayour vd., 2011).

Rodrigues vd., (2014) etkili basit bir kantitatif metot geliştirmiştir. Bu çalışmada sebzelerin katı ve sıvı yağlarından elde edilen biyo dizelerde demirin florimetrik olarak tayini önerilmiştir. Tayin için suda çözülen CdTe kuantum noktalarıyla kaplı merkaptopropiyonik kullanılmıştır. Tayin öncesinde sıvı yağ numunelerinden ultrasonik

banyo kullanılarak 1:1 (v/v) der. HCl : der. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> karışımında 50 dak. yaklaşık. %100 oranda demir ekstrakte edilmiştir. Çözeltilerin floresans şiddetleri 400 nm uyarma dalga boyunda 420-700 nm arasında tarama yapılarak kaydedilmiştir. Bu biyodizel numunelerdeki kompleks matriksindeki eser elementlerinin tayini için iki farklı kalibrasyon doğrusu geliştirilmiştir: bunlar sulu çözelti ile genel teknik ve metalo-organik standartlar ile standart ekleme teknikleridir. Elde edilen kalibrasyon grafiklerinin eğimleri aynı olduğundan matriks etkisinin olmadığına karar verilmiştir. Optimize deney şartlarında demir tayini için; doğrusal çalışma aralığı, 4,16-100 µg/L ( $R^2=0,9996$ , N=6), gözlene bilme sınırı, 1,25 µg/L olarak bulunmuştur. Beş biyodizel numuneden (soya fasulyesi, mısır, ayçiçeği, kanola ve sığır iç yağı ) geliştirilen metotla elde edilen demir sonuçları bilinen bir yöntem ile HR-CS GFAAS'den elde edilen sonuçlarla kıyaslanarak doğruluğu gösterilmiştir. Ayrıca sonuçlara öğrenci t-testi uygulanmıştır. Bu numunelerde % 4'ün altında sapma ile geri kazanım çalışmaları da gerçekleştirilmiştir.

Xu vd., (2013) naftalimid türevi bir bileşikten 2-hidroksietil metakrilat aktifleştirilmiş cam lamel üzerinde UV-ışınlama ile kopolimer elde etmiştir. 25°C'ta 0,05 mol/L Tris/HCl (pH 6,02) tampon çözeltisine Fe<sup>3+</sup> eklendiğinde optik sensörün floresans şiddetindeki düşüşe ( $\lambda_{uy}= 408$  nm ve  $\lambda_{em}= 521$  nm'dir) dayandırılarak Fe<sup>3+</sup>'nin seçici olarak tayini önerilmiştir. Yapılan çalışmada Fe<sup>3+</sup>'nin kantitatif tayininde, bulunan doğrusal aralık  $1,5 \times 10^{-5}$ - $1,0 \times 10^{-3}$  M ve gözlenebilme sınırı ise  $4,5 \times 10^{-6}$  M olarak verilmiştir. Bu Fe<sup>3+</sup> duyarlı membranın en az iki ay süre kararlı olduğu belirlenmiştir. Metodun doğruluğu ve kesinliği, sudaki demir (1,0 mol/L HNO<sub>3</sub>'de) ve standart referans materyaller analiz edilerek değerlendirilmiştir. Geliştirilen sensör hazırlanmış ilaç numunelerindeki demir tayinde kullanılmıştır. Optimize şartlar altında üç çeşit sülfat tableti analiz edilmiştir. Sonuçlar bilinen bir yöntem olan redoks titrasyon sonuçlarıyla karşılaştırıldığında % bağıl hatanın -2,5 değerinin altında olduğu belirlenmiştir.

Gang vd., (2004) Fe<sup>3+</sup> iyonu ile 2,4-diklorofenilfloron'un floresans sönümünü kullanarak Fe<sup>3+</sup> iyonu tayini için yeni bir metot geliştirmiştir. Fe<sup>3+</sup> iyonunun bu bileşik ile 1:4 kompleks oluşturduğu molar oranlar yöntemine göre belirlenmiştir. 5,2-5,9 tampon çözeltisinde Fe<sup>3+</sup> iyonu ve ligant kırmızı renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Uyarma ve emisyon dalga boyları sırasıyla 282 nm ve 560 nm olarak saptanmıştır. Fe<sup>3+</sup> iyonu için 4 ng/mL ile 24 ng/mL arasında doğrusal bir aralık görülmüştür. Gerçek numunelerde tayin için Çin'deki bitkisel ilaçlarda ve çayda 5'den daha düşük % bağıl hata ile Fe<sup>3+</sup> iyonu tayin edilmiştir.

Asan vd., (2010) salisilik asit kullanarak etanol-su ortamında direkt florimetrik  $Fe^{3+}$  tayin etmiştir. Tayin için akış enjeksiyon sistemi kullanılmıştır. Bu amaç için katyon değiştirme reçinesi içeren bir mini zenginleştirme kolonu akış enjeksiyon analiz sistemine bağlanmıştır. Taşıyıcı çözelti  $2 \times 10^{-6}$  mol/L salisilik asit içerecek şekilde hazırlanmış ve pH'ı 8,5 olarak ayarlanmıştır. Uyarma dalga boyu 299 nm olarak seçilmiş ve 409 nm'deki floresans şiddetleri ölçülmüştür. Yöntemin tayin aralığı 5-100  $\mu\text{g/L}$ , gözlenebilme sınırı 0,3  $\mu\text{g/L}$ , % BSS 1,25 ve örnekleme hızı  $60 \text{ h}^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Bahsedilen çalışma ile deniz suyu, nehir suyu ve kaynak sularında  $Fe^{3+}$  iyon tayini yapılmıştır.

Zhou vd., (2012) bir schiff bazı olan 2-pridinkarbaldehid-p-fenilhidrazon ligandını kullanarak süt tozu ve yasmin çayında  $Fe^{3+}$  iyon tayini gerçekleştirmiştir. Ligandın çalışma konsantrasyonu  $2 \times 10^{-4}$  mol/L olarak seçilmiştir. Optimum pH asetik asit-sodyum asetat tamponu kullanılarak 4,6 olarak belirlenmiştir. Tayin çözeltisinin floresans kararlılığına ulaşması için 30 dakika beklenmiştir. Uyarma ve floresans şiddetlerinin kaydedildiği dalga boyları sırası ile 288 ve 344 nm olarak seçilmiştir. Yöntemin doğrusal aralığı  $6,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-5}$  mol/L, gözlenebilme sınırı  $3,6 \times 10^{-7}$  mol/L, % BSS'sı  $1,0 \times 10^{-5}$  mol/L demir tayini için 4,9 olarak bulunmuştur. Bilinen bir metotla AAS'de 134,2  $\mu\text{g}$  olarak bulunan 1 g süt tozu örneğindeki  $Fe^{3+}$  miktarı, önerilen metotla % 3,8 hata ile 139,4  $\mu\text{g}$  olarak bulunmuştur. Aynı şekilde 1 g yasmin çayında 192,5  $\mu\text{g}$  olarak bulunan  $Fe^{3+}$  önerilen metotla % -1,6 hata ile 189,5  $\mu\text{g}$  olarak bulunmuştur.

Yi vd., (2013) fosfonik asit bağlı floren türevleri olan 9,9-bis(3'-fosfonik asit propil)-2,7-difenilflore ve 2,7-difenilflore-9-ilfosfonik asit ligandları ile su numunelerinde  $Fe^{3+}$  tayini yapmışlardır. Tayinler Tris-HCl tamponu kullanılarak pH 7'de gerçekleştirilmiştir. Floresans kararlılığına ulaşmak için her iki ligant durumunda da tayin çözeltileri 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ligandların floresans ölçümleri için uyarma dalga boyu 330 nm olduğu zaman spektrumlarında hem 377 nm ve hem de 359 nm'de sönüm gözlenmiş ve hesaplamalar bu dalga boylarında yapılmıştır. İlk ligant ile tayinde yöntemin tayin aralığı 1-8  $\mu\text{M}$ , gözlenebilme sınırı 0,02  $\mu\text{M}$  olarak, ikinci ligant ile tayinde ise yöntemin tayin aralığı 1-5  $\mu\text{M}$ , gözlenebilme sınırı 0,01  $\mu\text{M}$  olarak hesaplanmıştır. ICP-OES metodu ile musluk suyu numunesinde 1,218  $\mu\text{M}$  olarak belirlenen  $Fe^{3+}$  miktarı ilk ligant ile 1,382  $\mu\text{M}$ , ikinci ligant ile 1,314  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuştur.

Du vd., (2013) bir çeşit rodamin B türevi olan rodamin amit (RHA) floresans probu ile asetik asit-sodyum asetat tamponu kullanarak su numunelerinde  $Fe^{3+}$  tayini gerçekleştirmişlerdir. Ortam pH'ı 3,2 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada  $Fe^{3+}$ 'nın ortamda



fazla miktarda bulunan KI ile reaksiyonu sonucu oluşan  $I_3^-$  anyonunun ağır atom etkisi ile ligandın floresans şiddetindeki azalma temel alınmıştır.  $Fe^{3+}$  ve KI arasındaki reaksiyon için 10 dak. beklenmiştir. Tayin çözeltisi 510 nm'de uyarılmış ve 575 nm'deki floresans şiddetleri ölçülmüştür. Yöntemin tayin aralığı 0,5 - 5  $\mu\text{mol/L}$ , gözlenebilme sınırı 0,3  $\mu\text{mol/L}$ , tayin sınırı 0,5  $\mu\text{mol/L}$  olarak hesaplanmıştır. Yöntem göl suyu, atık su ve musluk suyu numunelerine uygulanmıştır. % BSS değerleri bu numuneler için 2,0 - 6,0 arasında bulunmuştur.

Shamsipur vd., (2013) yeni bir floresent kimyasal sensör olan 5-(8-hidroksi-2-kinolinmetil)-2,8-ditia-5-aza-2,6-piridinifen ligandını sentezlemişler ve  $Fe^{3+}$ 'nin seçici tayini için kullanmışlardır. Tayin için, ligant, toz PVC, o-nitrofenil oktil eter ve sodyum tetrafenilborat maddelerini farklı oranlarda içeren çözeltiyi tozsuz bir cam plaka üzerine yayarak bir membran hazırlamışlardır. Tayinden önce floresans kararlılığa ulaşması için membran pH'ı 5,5 olan bir asetat tamponu çözeltisinde 20 dakika bekletilmiştir. Yöntemin doğrusal aralığı  $1,0 \times 10^{-7}$  -  $6,0 \times 10^{-4}$  M, gözlenebilme sınırı  $5,0 \times 10^{-8}$  M olarak hesaplanmıştır. Sırasıyla ıspanak ve pirinç numunelerinde ICP-OES yöntemi ile 15,10  $\mu\text{g/g}$  ve 26,40  $\mu\text{g/g}$  olarak bulunan  $Fe^{3+}$  miktarları bahsedilen metot ile % 2 bağıl hata ile 15,4  $\mu\text{g/g}$  ve %1,1 bağıl hata ile 26,1  $\mu\text{g/g}$  olarak bulunmuştur. Metot ayrıca su numunelerine de uygulanmış ve sonuçlar % 0,5 - 1,9 bağıl hata aralığında bulunmuştur.

Huang vd., (2013) doğal bir polisakkarit olan sitoza polimeri ile insan serumunda direkt  $Fe^{3+}$  iyon tayini yapmıştır. Sitoza yapısı gereği düşük bir floresans şiddetine sahiptir.  $95^\circ\text{C}$ 'de 9 saat ısıtılarak sitoza'nın floresans şiddeti arttırılmıştır. Isıtma işleminden önce asetik asit-sodyum hidroksit tamponu kullanılarak sitoza çözeltisinin pH'ı 6,0'a getirilmiştir. Sulu asetik asit çözeltisinde çözülen sitoza polimerinin optimum çalışma konsantrasyonu 3 mg/mL olarak belirlenmiştir. Orjinal sitoza çözeltisinin 325 nm olan uyarma dalga boyu ısıtma prosedüründen sonra 335 nm olarak belirlenmiştir. 432 nm'deki floresans şiddetleri ölçülmüştür. Yöntemin doğrusal aralığı  $1,96 \times 10^{-8}$  -  $2,0 \times 10^{-5}$  M, % BSS'si 6,8 olarak hesaplanmıştır.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Cihazlar

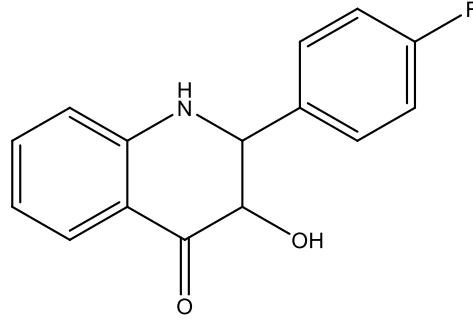
IR Spektrofotometresi	:Perkin Emler One FT-IR Spektrofotometre (K.T.Ü. Kimya Bölümü)
PTIQ Spektroflorimetresi	: QM-4-2006 A Photon Technologies International Quanta Master Spectrofluorimeter (K.T.Ü. Kimya Bölümü)
UV-vis Spektrofotometresi	:Perkin Emler Lambda 25 UV-vis Spektrofotometre (K.T.Ü. Kimya Bölümü)
pH metre	: Orion Reearch Model 601 Digital Ionalyzer (K.T.Ü. Kimya Bölümü)
Analitik terazi	: Sartorius Ed224s (K.T.Ü. Kimya Bölümü)
Vorteks çalkalayıcı	: Labnet Model No 50100-320 V (K.T.Ü. Kimya Bölümü)
Kapalı sistem mikrodalga çözünürleştirme cihazı	: Milestone Ethos D ( maksimum basınç; 1450 psi ve maksimum sıcaklık; 300°C) (K.T.Ü. Kimya Bölümü)
Destile/deiyonize su cihazı	: Sartorius Milli-Q system (arium® 611UV) (K.T.Ü. Kimya Bölümü)
Kondüktometre	: Hana Instruments EC 215 Conductivity Meter (R.T.E.Ü. Kimya Bölümü)
LC-MS	: Quatro MicroMass LC-MS/MS (K.T.Ü. Kimya Bölümü)
Bitki Etüvü	: Nuve, EN 400 (K.T.Ü. Kimya Bölümü)

## 2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan maddeler: Spektroskopik saflıkta metanol, etanol, tetrahidrofuran (THF), asetonitril, dimetilformamit (DMF),  $KNO_3$ ,  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ,  $Pb(NO_3)_2$ ,  $Sr(NO_3)_2$ ,  $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ,  $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ ,  $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ ,  $Mn(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ,  $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ ,  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ,  $Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ,  $Zn(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ,  $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ ,  $AgNO_3$  ve  $NaNO_3$  Merck,  $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  ve  $KF$ ,  $KCl$ ,  $KBr$ ,  $KI$ ,  $K_2C_2O_4$ ,  $K_2CO_3$ ,  $K_2SO_4$ ,  $K_2S_2O_7$ ,  $K_2Cr_2O_7$ ,  $K_2CrO_4$ ,  $KHCO_3$ ,  $KHSO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $KCN$ ,  $KSCN$  ve  $KNO_3$  Sigma Aldrich,  $Ba(NO_3)_2$  ise Alfa Aesar firmalarından temin edilmiş olup, tüm bu kimyasallar analitik saflıktadır. Sulu çözeltilerin gerekli seyreltme işlemleri için deiyonize saf su kullanıldı. pH 1,0 (gülin, sodyum klorür, hidroklorik asit), pH 2,0 (sitrik asit, sodyum hidroksit, hidroklorik asit), pH 3,0 (sitrik asit, sodyum hidroksit, hidroklorik asit), pH 4,0 tamponu (potasyum hidrojen ftalat, pH 5,0 tamponu (sitrik asit, sodyum hidroksit), pH 6,0 ve pH 7,0 tamponu (sitrik asit, sodyum hidroksit), pH 8,0 (borik asit, sodyum hidroksit, hidroklorik asit) hazır tamponları Merck firmasından satın alınıp kullanıldı. Toprak-kum standart referans metaryali (CRM-SA-C Sandy soil C) High Purity Standard Inc., Karışık Bitki Standart referansı (Mixed Polish Herbs (INCT-MPH-2)) Instytut Chemii i Techniki Jadrowej firmalarından temin edildi.

## 2.3. Kullanılan Ligant

$Fe^{3+}$  iyonunun spektrofotometrik tayininde kullanılan ligant Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde Prof. Dr. Nurettin YAYLI'nın laboratuvarında Arş. Gör. Gonca TOSUN tarafından literatüre göre sentezlenmiş ve karakterizasyonu yapılmış olan 2-(4-florofenil)-3-hidroksi-2,3-dihidrokinolin-4(1H)-on bileşiği olup, yapısı Şekil 2.1'de gösterilmiştir (Ahmed vd., 2013).



Şekil 2. 1. 2-(4-florofenil)-3-hidroksi-2,3-dihidrokinolin-4(1H)-on bileşiği

#### 2.4. Ligant Çözeltisinin Hazırlanması

16,60 mg ligant ayrı ayrı metanol, etanol, THF, asetonitril ve DMF’de oda sıcaklığında çözülerek  $2,6 \times 10^{-3}$  M’lık stok çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden gerektiğinde seyreltme yapılarak 100 mL  $2,6 \times 10^{-5}$  M’lık ligant çözeltileri hazırlandı. Bu ligant çözeltileri hem absorbanans hem de floresans şiddeti ölçümlerinde kullanıldı.

#### 2.5. Anyon ve Katyon Çözeltilerinin Hazırlanması

Uygun bileşiklerinden  $2,6 \times 10^{-5}$  M konsantrasyonundaki anyon ve katyonların deiyonize sudaki stok çözeltileri hazırlandı ve istenen konsantrasyona seyreltildi. Hazırlanan bütün çözeltiler polietilen şişelerde  $4^{\circ}\text{C}$ ’ta buzdolabında muhafaza edildi.

#### 2.6. Gıda ve İlaç Numunelerinin Temini

Sebze (ıspanak, dereotu, semizotu, roka) ve kuru baklagil (kırmızı mercimek ve kuru fasulye) numuneleri Trabzon’da yerel marketlerden satın alındı. Nane numunesi ise Trabzon Çukurçayır beldesindeki bahçelerden temin edildi.

Sebze numuneleri önce musluk suyuyla daha sonra deiyonize saf suyla iyice yıkandı. Daha sonra oda sıcaklığında süzgeç kâğıdı üzerinde kurutuldu. Bu ön kurutma işleminden sonra sebze numuneleri  $105^{\circ}\text{C}$ ’ta 24 saat süreyle bitki etüvünde kurutuldu. Plastik poşetlerde saklandı. Sabit tartıma getirilen sebze ve baklagil numuneleri öğütüldü.

Ferrum Fort ve Maltofer olmak üzere iki farklı firmanın demir tabletleri Trabzon’daki eczanelerden satın alındı.

## 2.7. Gıda Numunelerinin ve Standart Referans Materyallerin Mikrodalga Çözünürleştirme Sistemiyle Çözünürleştirilmesi

Geliştirilen metot çeşitli katı gıda numunelerine uygulandı. Bu amaçla katı numune olarak kırmızı mercimek, kuru fasulye, ıspanak, nane, dereotu, semizotu, roka ve sertifikalı referans materyaller olarak CRM-SA-C Sandy Soil C (toprak-kum) ve Mixed Polish Herbs (bitki) seçildi. Katı gıda numuneleri ve sertifikalı standartlar, kapalı sistem mikrodalga çözünürleştirme sistemiyle çözünürleştirildi. Bu amaçla 0,1 mg hassasiyette tartılmış katı numuneler ve sertifikalı standartlar cihazın teflon kaplarına konulduktan sonra; CRM-SA-C Sandy Soil C için çözünürleştirme reaktifi olarak 4,5 mL HCl, 1,5 mL HNO<sub>3</sub>, 1,0 mL HF ve 2,0 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanıldı. Bunun yanında kırmızı mercimek, kuru fasulye, ıspanak, nane, dereotu, semizotu, roka ve Mixed Polish Herbs örneğini çözünürleştirilmesi için ise 6,0 mL HNO<sub>3</sub> ve 2,0 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanıldı. Daha sonra numuneler kapalı sistem mikrodalga çözünürleştirme ünitesinde Tablo 2.1'de gösterilen programa göre çözünürleştirildi. Numunelerin çözelti karışımları yaklaşık 130 °C'ta 4 saat içinde ısıtıcıda kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Sonrasında bu kalıntılar belirlenen hacme deiyonize saf su ilavesiyle seyreltildi ve 0,45 µm'lık gözenek boyutuna sahip selüloz nitrat membrandan süzüldü. Hazırlanan bütün çözeltiler polietilen şişelerde 4 °C'ta buzdolabında muhafaza edildi.

Tablo 2. 1. Katı numunelerin mikrodalga çözünürleştirme sistemiyle çözünürleştirilmesi için uygulanan program

Basamak	Zaman (dak.)	Güç (W)	Basınç (atm)	Sıcaklık (°C)
1	6	250	45	160
2	6	400	45	180
3	6	650	45	220
4	6	250	45	220

Havalandırma süresi: 3dak.

## 2.8. Maltofer Fol ve Ferrum Fort İlaç Tabletlerinin Yaş Yakma Yöntemi ile Çözünürleştirilerek Analize Hazırlanması

İlaç tabletlerinin çözünürleştirilmesi için yaş yakma yöntemi uygulandı (Smrkolj vd., 2005). Bir beher içerisine kuru demir içeren tabletten bir adet konularak 60 mL deiyonize saf suda çözüldü, ısıtıcı üzerine yerleştirildi ve çözelti karışımının sıcaklığının yaklaşık 200 °C'a gelmesi beklendi. Daha sonra karışım üzerine çözünürleştirmede kullanılacak reaktif olan der. HNO<sub>3</sub>'den 1mL ilave edildi. Isıtma işlemine 30 dak. daha devam edildi ve tekrar 1mL der. HNO<sub>3</sub> ilave edildi. Çeker ocakta gerçekleştirilen bu çözünürleştirme işlemine çözelti berraklaşınca kadar (60 – 90 dak.) devam edildi (Tokaloğlu ve Ayhanöz, 2011).

Oda sıcaklığına kadar soğutulan çözelti deiyonize su ile bir miktar seyreltildi, 0,45 µm gözenek boyutuna sahip selüloz nitrat membrandan süzüldü ve 1000 mL'ye suyla tamamlandı. Bu stok tablet çözeltilerinden uygun hacimler alınarak 100 mL'ye seyreltildi. Hazırlanan bütün çözeltiler polietilen şişelerde 4 °C'ta buzdolabında muhafaza edildi.

## 2.9. Deresuyu Numunesinin Analize Hazırlanması

Su numunelerinde geri kazanım çalışmalarının yapılması için Trabzon Değirmendere Deresi Deliklitaş mevkiinden deresuyu numunesi alındı. Alınan bu numuneler çalışma öncesinde 0,45 µm selüloz membrandan süzüldü. Polietilen şişelerde 4 °C'ta buzdolabında muhafaza edildi.

## 2.10. Yöntem Geliştirme

Ligandın alkali (Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) ve toprak alkali metaller (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>), geçiş metalleri (Cr<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup> ve Hg<sup>2+</sup>) bazı diğer metaller (Al<sup>3+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Sn<sup>2+</sup>) olmak üzere toplam 21 ayrı metal iyonları ve halojen anyonlarıyla (F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>) ve bazı diğer anyonlarla (C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, S<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup>, Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup>, CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, CN<sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup> ve NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) etkileşimleri spektrofotometrik ve spektroflorimetrik olarak incelendi. Bu katyonlarda sadece Fe<sup>2+</sup> ve Fe<sup>3+</sup>'nın ligant ile kuvvetli bir şekilde etkileştiği spektroflorimetrik olarak gösterildi. Bu sonuca dayanarak ligant ile sulu çözeltideki demirin spektroflorimetrik olarak tayin edilebileceği düşünüldü.

Artan konsantrasyonda Fe<sup>3+</sup> iyonu ile yapılan spektroflorimetrik titrasyonda ligandın

floresans şiddetinde düzenli bir azalma olduğu gözlemlendi. Bu değişimden faydalanarak demir tayini için bir metot geliştirildi. Yöntemin, toprak-kum ve bitki standart referans materyallerine uygulanmasıyla doğruluğu gösterildi.  $Fe^{3+}$  için çalışma aralığının 2,43 mg/L ile 21,61 mg/L arasında olduğu belirlendi. Gözlenebilme sınırı 0,81 mg/L olarak tespit edildi. Tayin sınırı ise 2,43 mg/L olarak belirlendi. Yöntem doğrulandıktan sonra ıspanak, nane, dereotu, semizotu, roka gibi sebze numunelerine ve kuru fasulye ve kırmızı mercimek gibi baklagil numunelerine ve iki ayrı demir ilacı tabletine uygulandı ve sonuçlar akredite laboratuarlardan alınan analiz sonuçlarıyla kıyaslandı. Ayrıca Trabzon İli Değirmendere Deresi Deliklitaş mevkiinden alınan su numuneleri ile % geri kazanım çalışmaları gerçekleştirildi.

Demir tayini için modifiye bir standart ekleme yöntemi kullanıldı. Bunun için 10 mL'lik 8 farklı tüpe 2 mL  $2,6 \times 10^{-5}$  M ligandın metanoldeki çözeltisinden ve 0,030 mL  $2,6 \times 10^{-3}$  M standart  $Fe(NO_3)_3$  çözeltisinden konuldu (Optimizasyon çalışmaları sonucunda ilave edilen bu sabit standart  $Fe(NO_3)_3$  çözeltisinin konsantrasyonunun 1,0 mg/L olmasına karar verildi). Birinci tüp dışındaki (tanık) diğer tüplerin hepsine analiz edilecek olan numuneden aynı hacimde ilave edildi. Üçüncü tüpten itibaren artan konsantrasyonlarda  $Fe(NO_3)_3$  standart çözeltisi eklendi. Son hacim deiyonize saf su ile 4,0 mL'ye tamamlanmadan önce bütün tüplerin pH'ı 7,0'a sitrat tamponuyla ayarlandı. Daha sonra tüm tüplerdeki çözeltilerin floresans spektrumları 10 mm'lik bir kuartz hücresinde kaydedildi. Toplam hacim olan 4,0 mL'deki standart  $Fe(NO_3)_3$  konsantrasyonları (3. tüp'den itibaren) ligandın maksimum emisyon yaptığı dalga boyundaki (503 nm) floresans şiddetlerine ( $F_1, F_2, F_3 \dots$ ) karşı grafiğe geçirildi. 503 nm'de birinci tüpün floresans şiddeti  $F_0$ , ikinci tüpün floresans şiddeti  $F_1$ , doğrunun eğimi  $m$  ve numunenin konsantrasyonu  $C_x$  olmak üzere Denklem 2.1'den numunenin konsantrasyonu hesapladı.

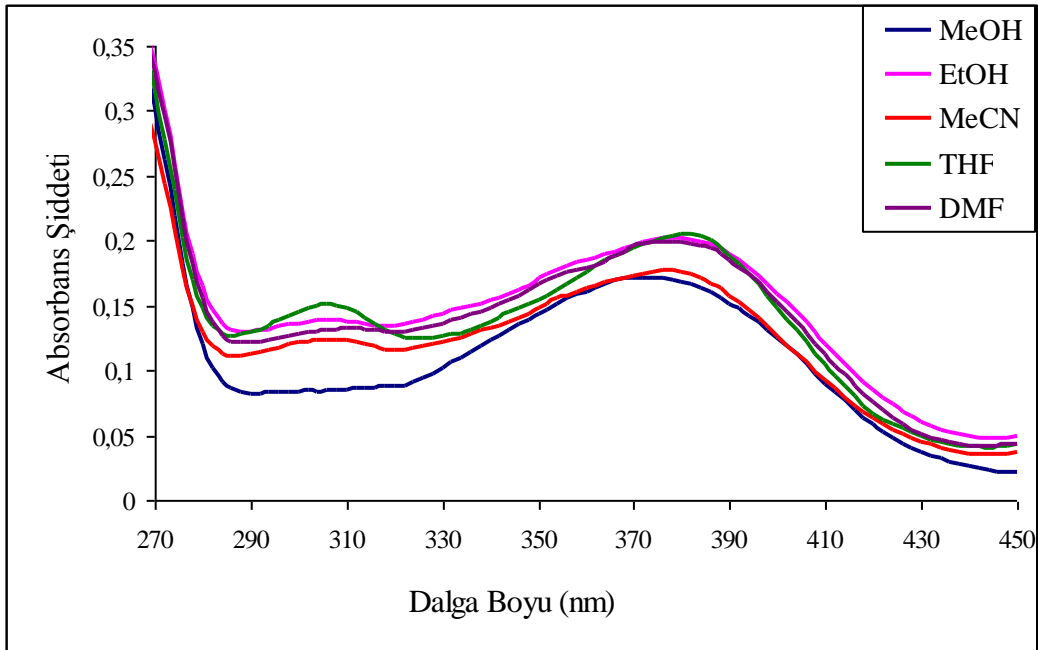
$$C_x = \frac{(F_0 - F_1)}{m} \quad (2.1)$$

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Spektrofotometrik Ölçümler

##### 3.1.1. Çözücü Seçimi

Metanol, etanol, THF, asetonitril ve DMF çözücülerdeki ligandın absorbans spektrumları alındı (Şekil 3.1). Sulu çözeltilerde tayine engel olacağı düşünülen; suyla karışmayıp faz oluşturan; kloroform ve diklorometan gibi çözücülerde ligandın çözünürlüğü iyi olmasına rağmen ligant çözücüsü olarak tercih edilmedi. Bunun yanında daha ucuz, temin edilmesi kolay, doğal numunelerde tayine engel olmaması açısından suyla karışabilen bir çözücü olan metanol ile ligant çözücüsü olarak çalışmak daha uygun görüldü.

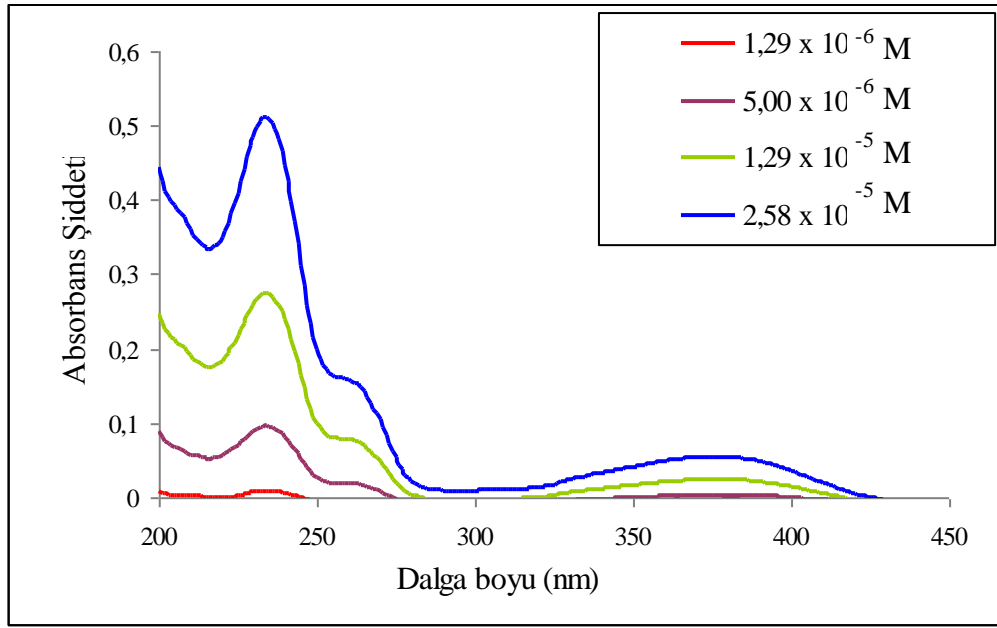


Şekil 3. 1. Ligandın  $1,3 \times 10^{-5}$  M konsantrasyonda farklı çözücü sistemlerinde alınan absorpsiyon spektrumları



### 3.1.1. Ligant Konsantrasyonunun Belirlenmesi

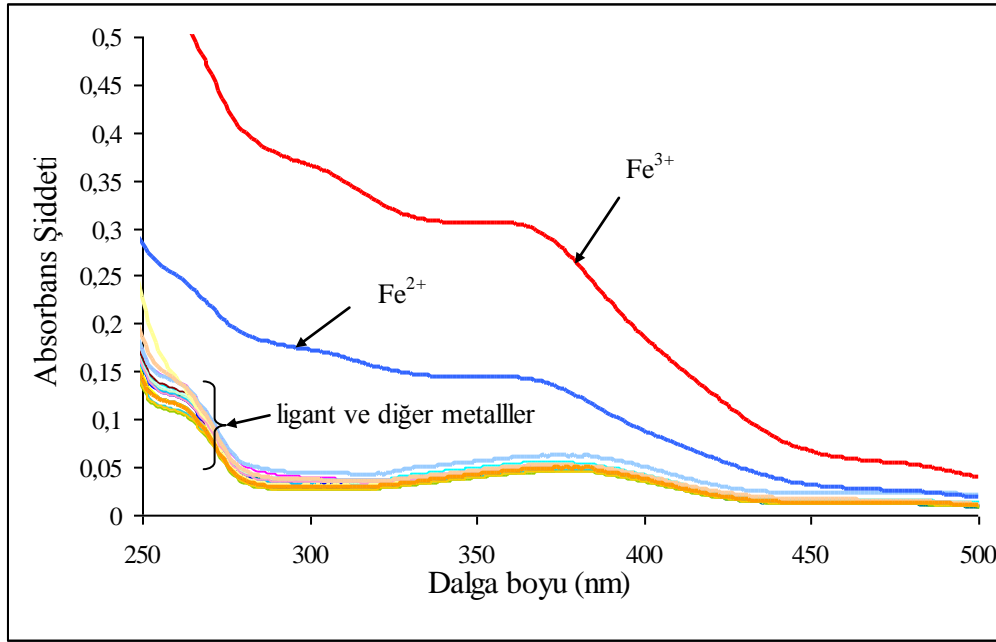
Metanoldeki  $2,6 \times 10^{-6}$  M,  $1,0 \times 10^{-5}$  M,  $2,6 \times 10^{-5}$  M ve  $5,0 \times 10^{-5}$  M'lık ligant çözeltileri, ligandın  $2,6 \times 10^{-3}$  M'lık stok çözeltisinden seyreltilerek hazırlandı. Absorbans okumaları için yukarıda belirtilen konsantrasyonlardaki ligant çözeltilerinin 2,0 mL'sine 2,0 mL deiyonize saf su ilave edildi. Hazırlanan bu çözeltilerin absorpsiyon spektrumları kaydedildi (Şekil 3.2). Absorpsiyon spektrumlarından, 234 nm'de ligant absorbansının 0,2'den daha yüksek olduğu ligant konsantrasyonları belirlendi.  $2,6 \times 10^{-6}$  M ve  $1,0 \times 10^{-5}$  M'lık ligant çözeltilerinin 234 nm'deki absorbansı 0,1'den düşükken,  $5,0 \times 10^{-5}$  M'lık ligant çözeltisinin absorbansı ise 0,5 civarındaydı. Fazla ligant sarfiyatını önlemek için en uygun ligant konsantrasyonu  $2,6 \times 10^{-5}$  M olarak seçildi.



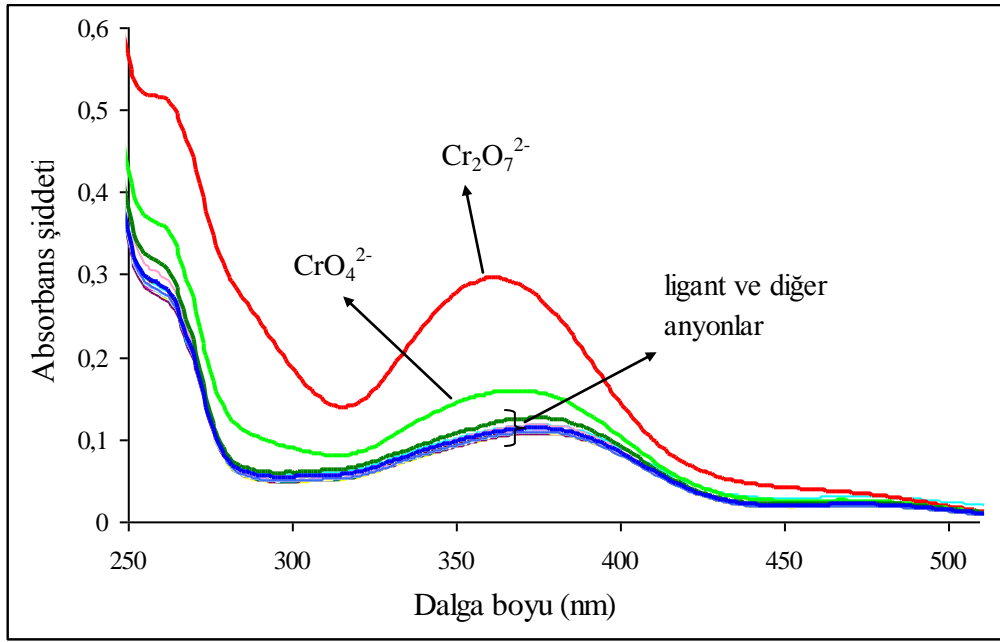
Şekil 3. 2. Farklı konsantrasyonlardaki ligandın metanol:su (1:1) çözücü karışımında absorpsiyon spektrumları

### 3.1.2. Ligandın Absorpsiyon Spektrumuna İyonların Etkisi

Sabit konsantrasyondaki ligant çözeltisinin absorbansına aşırı miktardaki (10 kat) iyon konsantrasyonunun etkisini incelemek için şu şekilde bir çalışma yapıldı: 2,0 mL  $2,6 \times 10^{-5}$  M ligandın metanoldeki çözeltilerine 2,0 mL  $2,6 \times 10^{-4}$  M'lık kation ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  ve  $\text{Hg}^{2+}$ ) ve anyon ( $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{HSO}_4^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_7^{2-}$ ,  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  ve  $\text{CrO}_4^{2-}$ ) çözeltisi eklendi, daha sonra 0,5 mL pH 7,0 tamponu (sitrik asit-sodyum hidroksit tamponu) eklenerek pH'ı 7,0'a ayarlandı ve oda sıcaklığında yaklaşık 1 dak. kadar vorteks çalkalayıcı ile çalkalandı. Sonrasında UV-vis spektrofotometresinde absorpsiyon spektrumları kaydedildi (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4). İyonların ligandın absorpsiyon spektrumu üzerine etkisini karşılaştırmak amacıyla sadece ligandı içerip iyonu içermeyen aynı şartlarda hazırlanmış çözeltinin de absorpsiyon spektrumu alındı.



Şekil 3.3.  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  ve  $\text{Hg}^{2+}$  metal kationlarının ligandın absorpsiyon spektrumuna etkisinin incelenmesi. [iyon]:  $1,3 \times 10^{-4}$  M, [ligant]:  $1,3 \times 10^{-5}$  M



Şekil 3. 4.  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ,  $CH_3COO^-$ ,  $HCO_3^-$ ,  $HSO_4^-$ ,  $H_2PO_4^-$ ,  $CN^-$ ,  $SCN^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $C_2O_4^{2-}$ ,  $CO_3^{2-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $S_2O_7^{2-}$ ,  $Cr_2O_7^{2-}$  ve  $CrO_4^{2-}$  anyonlarının ligandin absorpsiyon spektrumuna etkisinin ile incelenmesi. [iyon]:  $1,3 \times 10^{-4}$  M, [ligant]:  $1,3 \times 10^{-5}$  M

Şekil 3.3 ve Şekil 3.4’de verilen spektrumlarda görüldüğü gibi ligandin  $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $CrO_4^{2-}$  ve  $Cr_2O_7^{2-}$  dışında hiçbir anyon veya katyona karşı spesifik bir davranış göstermediği gözlemlendi. Diğer iyonlar için ligandin maksimum absorbans yaptığı dalga boyları olan 263 nm ve 375 nm’de absorbansda belirgin bir değişim olmadığı görüldü. Katyonlarla yapılan çalışmada; sadece aşırı  $Fe^{3+}$  ve  $Fe^{2+}$  katyonlarının ligandin absorbansında büyük bir artışa sebep olduğu gözlemlendi.

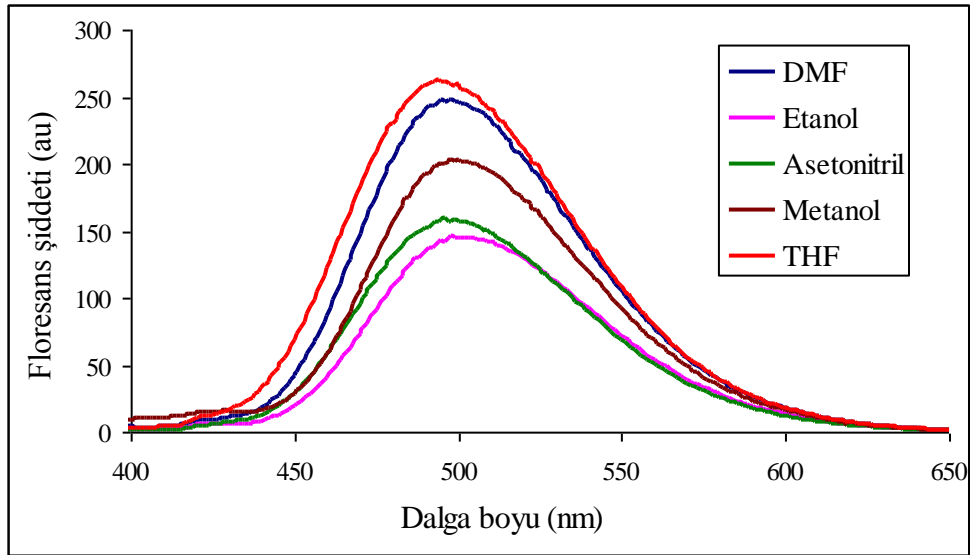
$Fe^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $CrO_4^{2-}$  ve  $Cr_2O_7^{2-}$  iyonları ile spektrofotometrik titrasyonlar gerçekleştirildi. Bunun için  $Fe^{3+}$  ve  $Fe^{2+}$  metallerinin değişen konsantrasyonlarının sabit konsantrasyondaki ligandin absorpsiyon spektrumu üzerine etkisi incelendi. Artan  $Fe^{3+}$  ve  $Fe^{2+}$  iyonlarının konsantrasyonu ile ligandin 263 ve 375 nm’deki absorbanslarının arttığı görüldü.

Ligandin yokluğundaki çalışmalarda da bu iki iyon için aynı artışlar görüldüğünden bu artışların ligantla ilgili olmadığına karar verildi. Benzer durum  $CrO_4^{2-}$  ve  $Cr_2O_7^{2-}$  anyonlarıyla yapılan çalışmalarda da gözlemlendi. Bu nedenle spektrofotometrik ölçümlerle ligandin herhangi bir katyon veya anyonun tayininde kullanılamayacağına karar verilerek spektrofotometrik ölçümlerle çalışmalara devam edildi.

## 3.2. Spektroflorimetrik Ölçümler

### 3.2.1. Çözücüsü Seçimi

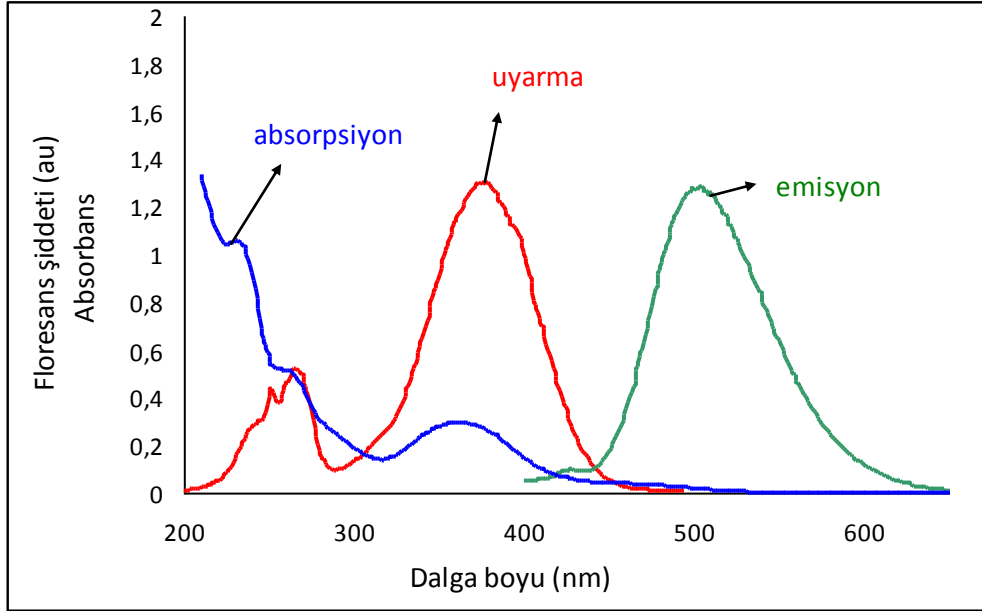
Etanol, metanol, THF, asetonitril ve DMF çözücüleri kullanılarak ligandın floresans spektrumları alındı (Şekil 3.5). THF ve DMF çözücülerinde ligandın alınan floresans spektrumunda emisyon şiddetinin diğer çözücülerde olduğundan daha yüksek olduğu görüldü. Bu yüzden ilk çalışmalar bu çözücülerde yapıldı. Fakat doğrusal çalışma aralığı için en yüksek  $R^2$  değeri metanoldeki çalışmalarla elde edilince çalışmanın devamı bu çözücü ile yapıldı. Etanolde ve asetonitrilde ligandın floresans şiddeti diğer çözücülerde olduğundan daha düşük bulundu. Ayrıca kalibrasyon grafiği elde etmek için yapılan çalışmalarda  $R^2$  değeri metanoldekine göre daha düşük olduğundan bu çözücüler de tercih edilmediler. Kloroform ve diklorometanın tercih edilmemesinin sebebi ise suyla karışmayan çözücüler olmalarıydı. Bütün bu çalışmaların sonrasında daha ucuz, temin edilmesi kolay, doğal numunelerde tayine engel olmayan, suyla karışabilen bir çözücü olan metanol ile ligant çözücüsü olarak çalışmak uygun görüldü.



Şekil 3.5.  $1,3 \times 10^{-5}$  M Ligandın farklı çözücü sistemlerinde alınan floresans spektrumları

### 3.2.2. Uyarma Dalga Boyunun Belirlenmesi

2,0 mL  $2,6 \times 10^{-5}$  M metanoldeki ligant çözeltisine 2,0 mL su ilave edilerek UV-vis absorpsiyon spektrumu alındı. Spektrumdan maksimum absorbansın olduğu dalga boyu 373 nm olarak belirlendi. Bu dalga boyunda uyarılarak çözeltinin floresans spektrumu alındı. Maksimum emisyonun olduğu dalga boyu 503 nm olarak belirlendi. Daha sonra bu dalga boyunda uyarma spektrumu alındı. Maksimum emisyonun olduğu dalga boyunun 375 nm olduğu görüldü. Böylece ligandın floresans spektrumları 375 nm’de uyarılarak alındı. Şekil 3.6’da ligandın absorpsiyon, uyarma ve emisyon spektrumları bir arada görülmektedir.

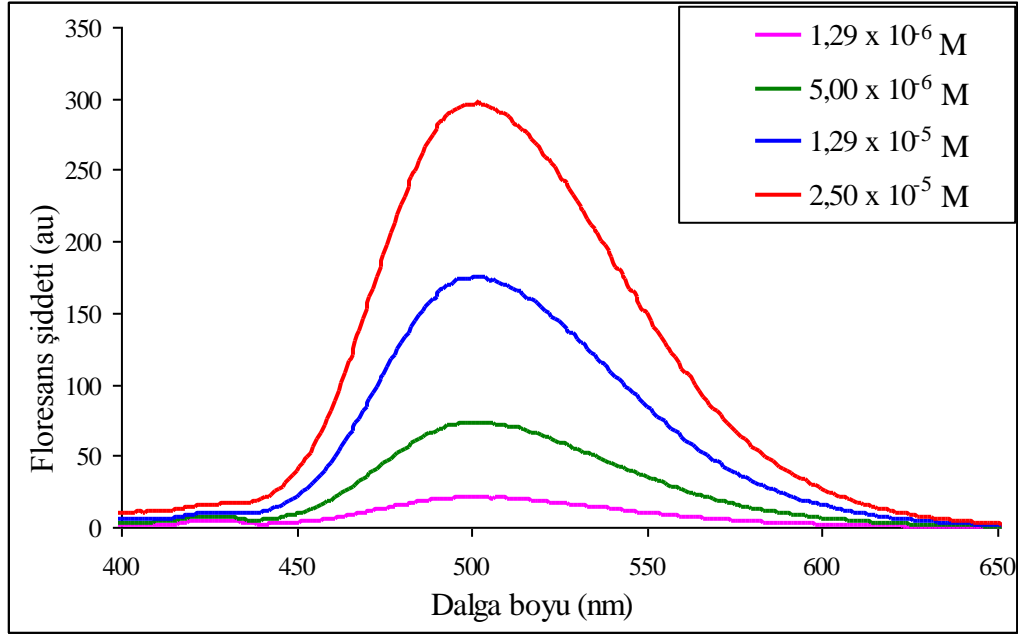


Şekil 3.6. Ligandın absorpsiyon, uyarma ve emisyon spektrumları

### 3.2.3. Ligant Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Metanoldeki  $2,6 \times 10^{-6}$  M,  $1,0 \times 10^{-5}$  M,  $2,6 \times 10^{-5}$  M ve  $5,0 \times 10^{-5}$  M’lık ligant çözeltileri, ligandın  $2,6 \times 10^{-3}$  M’lık çözeltisinden seyreltilerek hazırlandı. Floresans ölçümleri için yukarıda belirtilen konsantrasyondaki ligant çözeltilerinin 2,0 mL’sine 2,0 mL deiyonize saf su ilave edildi. Hazırlanan bu çözeltilerin floresans spektrumları alındı. Spektrumlardan, maksimum floresans şiddetinin 503 nm’de olduğu belirlendi. Konsantrasyon artıkça floresans şiddetinin de arttığı görüldü (Şekil 3.7). Bunun yanında

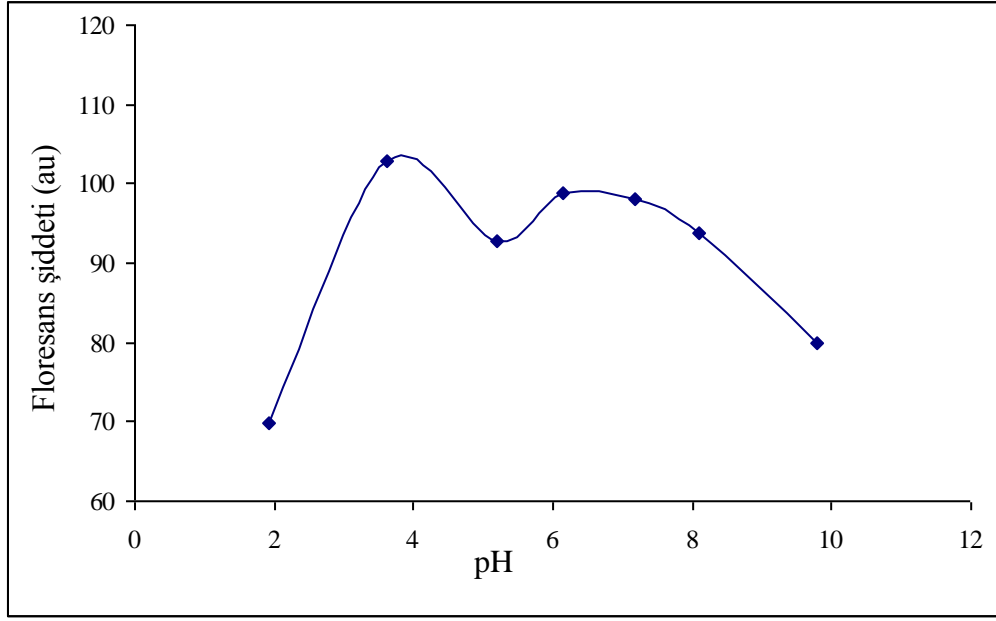
konsantrasyon etkisini görmek amacıyla; yapılan spektrofotometrik ölçümler bu farklı ligant konsantrasyonlarında tekrarlandı. Fakat farklı ligant konsantrasyonlarının tayin sınırını düşürücü bir etkisinin olmadığına karar verildi. Bu nedenle en uygun ligant konsantrasyonu  $1,3 \times 10^{-5} \text{ M}$  olarak belirlendi.



Şekil 3.7. Farklı konsantrasyonlardaki ligandın metanol:su (1:1) çözücü karışımında floresans spektrumları

### 3.2.4. Ligandın Floresans Şiddetine pH'ın Etkisi

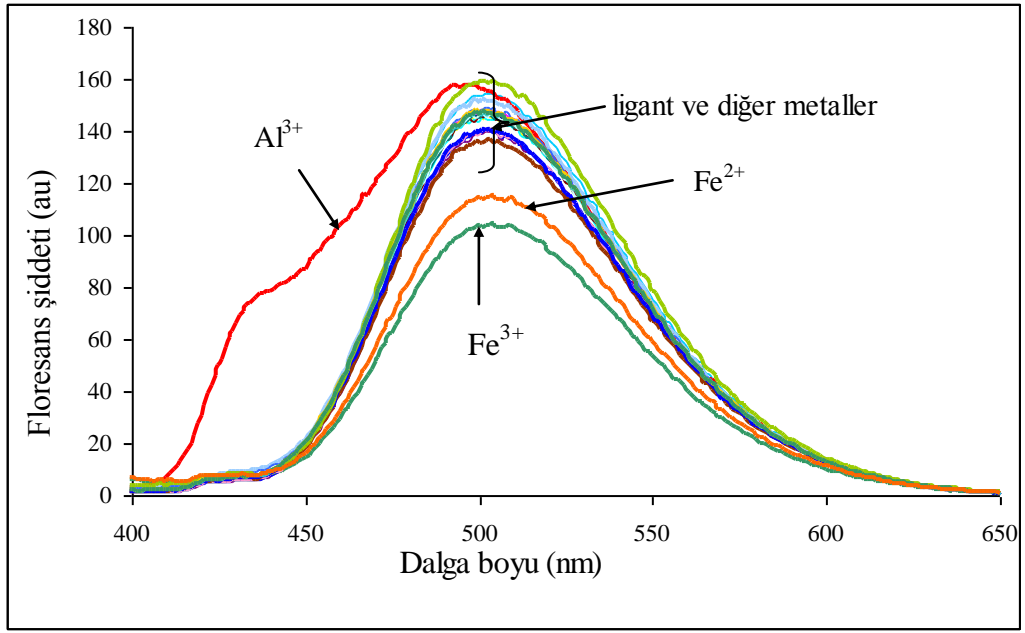
Ligandın floresans şiddetinin pH ile değişimini belirlemek için pH 1-10 aralığında ölçümler yapıldı. Yapılan çalışmalar, ligandın 503 nm'deki floresans şiddetinin pH 5-8 aralığında daha yüksek ve yaklaşık sabit olduğunu gösterdi (Şekil 3.8). Bu yüksek floresans şiddeti nedeniyle ileriki floresans çalışmalarında çözelti karışımlarının pH'ı 7,0'a sitrat tamponu ile ayarlandı.



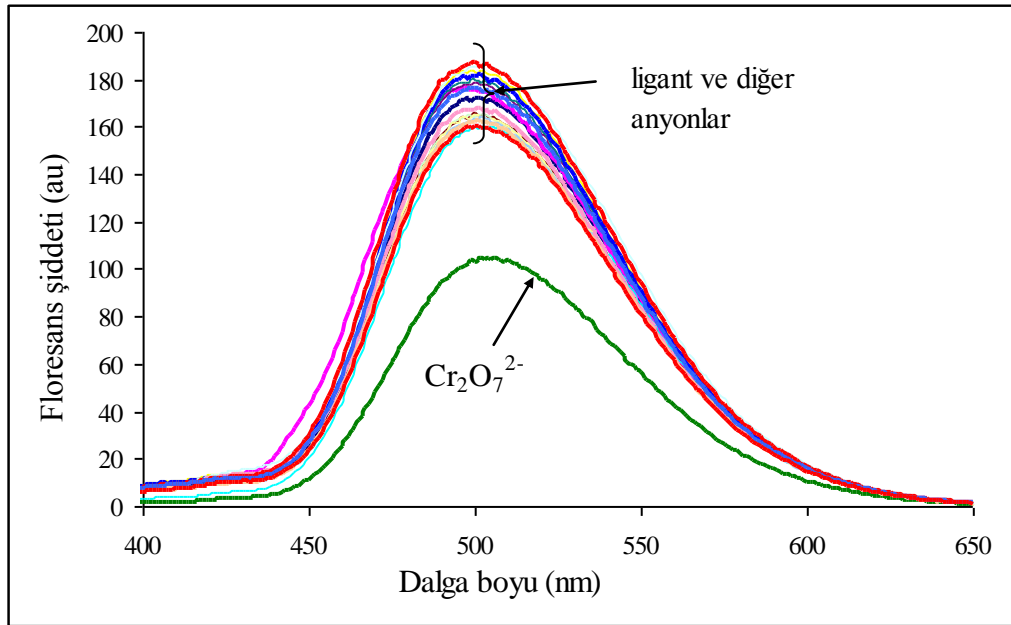
Şekil 3.8. Ligandın 503 nm'deki floresans şiddetine pH etkisi

### 3.2.5. Ligandın Floresans Spektrumuna İyonların Etkisi

Spektroflorimetrik çalışmalarda sabit ligant konsantrasyonundaki ligant çözeltisinin floresans spektrumuna aşırı miktardaki (10 kat) iyon konsantrasyonunun etkisini incelemek için şu şekilde bir çalışma yapılmıştır: 2,0 mL  $2,6 \times 10^{-5}$  M ligant çözeltisine 1,5 mL  $6,9 \times 10^{-4}$  M katyon ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ , ve  $\text{Cr}^{3+}$ ) veya anyon ( $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HSO}_4^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_7^{2-}$ ,  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  ve  $\text{CrO}_4^{2-}$ ) çözeltisi eklendi, daha sonra pH 7,0'a 0,5 mL tampon ilavesiyle ayarlandı ve oda sıcaklığında yaklaşık 1 dak. kadar vorteks çalkalayıcı ile çalkalandı. Sonra spektroflorimetre ile floresans spektrumları kaydedildi (Şekil 3.9 ve Şekil 3.10). Karşılaştırma yapmak için aynı şartlarda ayrıca sadece ligant içerip katyon ve anyonları içermeyen çözeltinin de floresans spektrumu alındı.



Şekil 3.9.  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  ve  $\text{Hg}^{2+}$  metal kationlarının ligandın floresans spektrumuna etkisinin incelenmesi.  $[\text{iyon}]: 1,3 \times 10^{-4}$  M,  $[\text{ligant}]: 1,3 \times 10^{-5}$  M

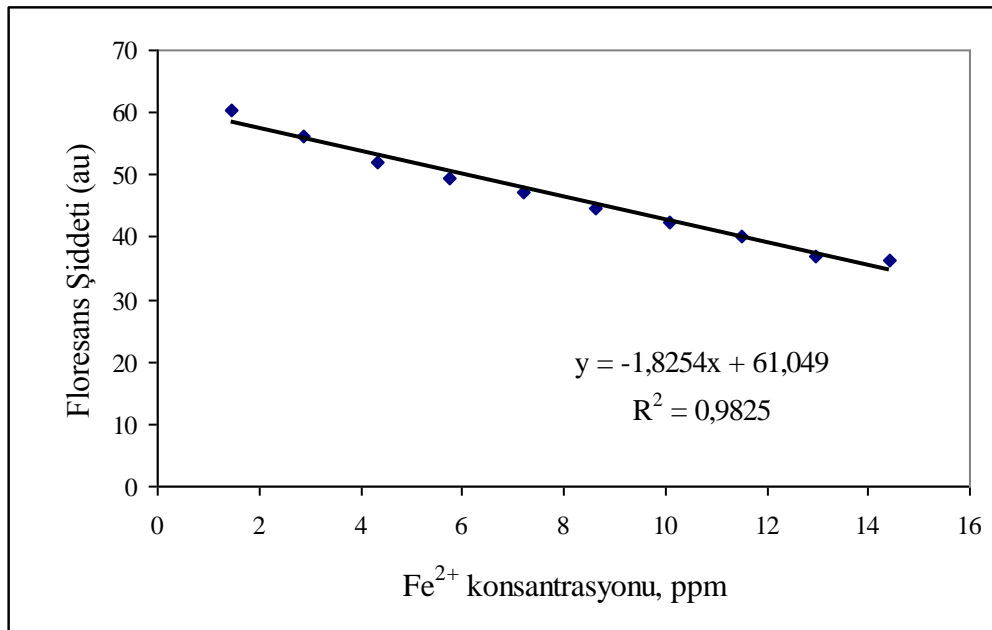


Şekil 3. 10.  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HSO}_4^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_7^{2-}$ ,  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  ve  $\text{CrO}_4^{2-}$  ligandın floresans spektrumuna etkisinin incelenmesi.  $[\text{iyon}]: 1,3 \times 10^{-4}$  M,  $[\text{ligant}]: 1,3 \times 10^{-5}$  M



Şekil 3.9 ve 3.10'daki spektrumlar incelendiğinde 10 kat  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  anyonu ve  $\text{Fe}^{3+}$  ve  $\text{Al}^{3+}$  katyonları etkisiyle ligandın floresans spektrumunda önemli bir değişim gözlemlendi. Çözeltilerin 375 nm'de uyarılmasıyla maksimum floresansın olduğu 503 nm'de  $\text{Fe}^{3+}$  katyonu ve  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  anyonu etkisiyle floresans şiddetinde belirgin bir düşüş olduğu belirlendi. Aksine  $\text{Al}^{3+}$  katyonu etkisiyle 441 nm'de ligandın floresans şiddeti oldukça yüksek olduğu görüldü. Bu etkileşimleri detaylı incelemek için  $\text{Fe}^{3+}$  ve  $\text{Al}^{3+}$  katyonlarının ve  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  anyonunun değişen konsantrasyonlarının sabit konsantrasyondaki ligandın floresans spektrumu üzerine etkisi incelendi. Artan  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  iyonu ile de ligandın floresansında önemli bir düşüş olmasına rağmen bu değişimin düzenli olmadığı saptandı. Bunun yanında artan  $\text{Al}^{3+}$  iyonu ile ligandın floresans şiddeti düzenli bir şekilde arttığı gözlemlendi. Fakat yapılan tekrar çalışmaları bu değişimin kesinliğinin düşük; ligant ile  $\text{Al}^{3+}$  iyonu arasındaki etkileşimin kararsız olduğunu gösterdi. Benzer şekilde artan iyon konsantrasyonunun etkisi ligandın floresans şiddetine çok az etki eden anyon ve katyonlar için de araştırıldı. Ancak düzenli bir değişim gözlemlenmedi.

Artan  $\text{Fe}^{3+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$  iyonu konsantrasyonu ile ligandın 503 nm'deki floresans şiddetinin düzenli bir şekilde azaldığı saptandı. Bununla birlikte  $\text{Fe}^{2+}$  için elde edilen kalibrasyon grafiğinin  $R^2$  değeri (Şekil 3.11)  $\text{Fe}^{3+}$  için elde edilenden (Şekil 3.20) daha düşük olduğu görüldü.



Şekil 3.11.  $\text{Fe}^{2+}$  iyonu için elde edilen kalibrasyon grafiği. Dalga boyu=503 nm

Numunelerin çözünürleştirilmesi sırasında nitrik asitle yükseltgenme olacağından tüm demir türlerinin  $Fe^{3+}$ 'ya dönüşümü mümkün olacaktır. Böylece ayrıca bir indirgeyici reaktif gerektirmediği için  $Fe^{3+}$  iyonunun ligandla olan etkileşimine dayalı kalibrasyon grafiği kullanılarak metodun geliştirilmesine karar verildi (Şekil 3.20).

### 3.2.6. Yabancı İyon Etkisi

Gerçek numunelerde tayinlerde karşılaşılan en büyük problemlerden biri de matriks bileşenlerinden kaynaklanan girişimlerdir. Geliştirilen metodun karmaşık sistemlere uygulanabilirliğine karar vermek için bazı iyonların  $Fe^{3+}$  tayini üzerine etkileri incelendi. Bu amaçla farklı miktardaki anyon ve katyonlar ekivalent miktarda  $Fe^{3+}$  iyonlarını içeren ligant çözeltilerine ilave edildi ve optimum şartlarda spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirildi.

Böylece  $1,3 \times 10^{-5}$  M ligant ve  $Fe^{3+}$  iyonu içeren çözeltilere yabancı iyonlar ilave edildi ve floresans şiddetindeki değişim incelendi. % 5'den daha az bağıl hata ile çeşitli yabancı iyonlar için tolerans sınırları Tablo 3.1 ve 3.2'de gösterildi.

Tablo 3. 1. Florimetrik titrasyonda % 5'den daha az bağıl hata ile yabancı metal iyonlarının maksimum tolerans konsantrasyonları. Şartlar; [ligant]= $1,3 \times 10^{-5}$  M;  $[\text{Fe}^{3+}] = 1,3 \times 10^{-5}$  M; pH=7,0 (sitrata tamponu)

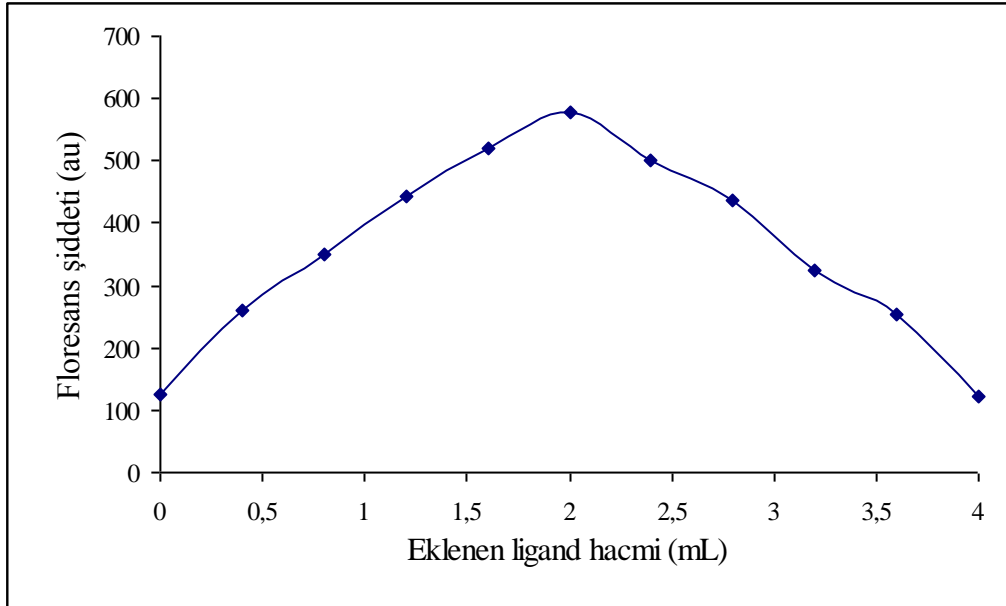
Yabancı İyonlar	Tolerans konsantrasyonu (mol/L)	$\text{Fe}^{3+}$ : yabancı iyon oranı	Tolerans miktarları ( $\mu\text{g}$ )	Yabancı İyonun İlave Edilen Tuzu
$\text{Al}^{3+}$	$5,2 \times 10^{-3}$	1:400	618,8	$\text{Al}(\text{NO}_3)_3$
$\text{Cr}^{3+}$	$5,2 \times 10^{-3}$	1:400	288,9	$\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$
$\text{Sr}^{2+}$	$6,5 \times 10^{-3}$	1:500	2260,6	$\text{Sr}(\text{NO}_3)_3$
$\text{Ba}^{2+}$	$3,9 \times 10^{-3}$	1:300	2125,8	$\text{Ba}(\text{NO}_3)_3$
$\text{Ca}^{2+}$	$1,3 \times 10^{-2}$	1:1000	517,0	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_3$
$\text{Mg}^{2+}$	$1,3 \times 10^{-2}$	1:1000	312,2	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$
$\text{Sn}^{2+}$	$5,2 \times 10^{-3}$	1:400	612,6	$\text{Sn}(\text{NO}_3)_2$
$\text{Pb}^{2+}$	$2,6 \times 10^{-3}$	1:200	2138,3	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$
$\text{Na}^+$	$1,3 \times 10^{-2}$	1:1000	296,4	$\text{NaCl}$
$\text{Li}^+$	$1,3 \times 10^{-2}$	1:1000	89,5	$\text{LiNO}_3$
$\text{K}^+$	$1,3 \times 10^{-2}$	1:1000	504,3	$\text{KOH}$
$\text{Zn}^{2+}$	$1,3 \times 10^{-2}$	1:1000	3374,1	$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$
$\text{Ni}^{2+}$	$3,9 \times 10^{-3}$	1:300	908,5	$\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$
$\text{Co}^{2+}$	$1,2 \times 10^{-3}$	1:90	273,7	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2$
$\text{Cd}^{2+}$	$7,7 \times 10^{-3}$	1:60	3480,2	$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$
$\text{Hg}^{2+}$	$7,7 \times 10^{-3}$	1:60	6210,3	$\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$
$\text{Ag}^+$	$6,5 \times 10^{-4}$	1:50	278,3	$\text{AgNO}_3$
$\text{Cu}^{2+}$	$6,5 \times 10^{-4}$	1:50	163,9	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$
$\text{Mn}^{2+}$	$6,5 \times 10^{-4}$	1:50	141,7	$\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$

Tablo 3. 2. Florimetrik titrasyonda % 5'den daha az bağıl hata ile yabancı anyonların maksimum tolerans konsantrasyonları. Şartlar; [ligant]= $1,3 \times 10^{-5}$  M;  $[\text{Fe}^{3+}] = 1,3 \times 10^{-5}$  M; pH=7,0 (Sitrata Tamponu)

Yabancı İyonlar	Tolerans konsantrasyonu (mol/L)	$\text{Fe}^{3+}$ : yabancı iyon oranı	Tolerans miktarları ( $\mu\text{g}$ )	Yabancı İyonun İlave Edilen Tuzu
$\text{OH}^-$	$1,2 \times 10^{-3}$	1:90	19,7	KOH
$\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$	$7,7 \times 10^{-3}$	1:60	681,1	$\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$
$\text{CO}_3^{2-}$ ,	$1,2 \times 10^{-3}$	1:90	69,6	$\text{K}_2\text{CO}_3$
$\text{SO}_4^{2-}$ ,	$3,9 \times 10^{-3}$	1:300	371,5	$\text{K}_2\text{SO}_4$
$\text{S}_2\text{O}_7^{2-}$	$1,2 \times 10^{-3}$	1:90	204,2	$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_7$
$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$	$5,2 \times 10^{-5}$	1:4	11,1	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
$\text{CrO}_4^{2-}$	$6,5 \times 10^{-4}$	1:50	74,8	$\text{K}_2\text{CrO}_4$
$\text{HCO}_3^-$	$1,2 \times 10^{-3}$	1:90	70,8	$\text{KHCO}_3$
$\text{HSO}_4^-$ ,	$3,9 \times 10^{-3}$	1:300	375,4	$\text{KHSO}_4$
$\text{H}_2\text{PO}_4^-$	$3,9 \times 10^{-3}$	1:300	375,2	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
$\text{CN}^-$	$1,2 \times 10^{-3}$	1:90	30,2	KCN
$\text{SCN}^-$	$1,2 \times 10^{-3}$	1:90	67,3	KSCN
$\text{HSO}_4^-$ ,	$3,9 \times 10^{-3}$	1:300	375,4	$\text{KHSO}_4$
$\text{F}^-$	$1,3 \times 10^{-2}$	1:1000	244,9	TBAF
$\text{Cl}^-$	$1,3 \times 10^{-2}$	1:1000	457,3	TBACl
$\text{Br}^-$	$1,3 \times 10^{-2}$	1:1000	1030,7	TBABr
$\text{I}^-$	$2,6 \times 10^{-3}$	1:200	1637,0	TBAI
$\text{CH}_3\text{COO}^-$	$2,6 \times 10^{-3}$	1:400	152,2	TBACH <sub>3</sub> COO

### 3.2.7. Job Metodu ile Ligant-Fe<sup>3+</sup> Kompleks Bileşiminin Belirlenmesi

Ligandın Fe<sup>3+</sup> ile oluşturduğu kompleksin stokiyometrisi spektrofotometrik olarak Job metodu kullanılarak belirlendi. Job metodu (Job, 1928) ile M:L oranını tespit etmek için ligandın ve metalin  $2,6 \times 10^{-6}$  M çözeltileri hazırlandı. Ligant ve metalin konsantrasyonlarının düzenli değiştiği 4,0 mL'lik bir seri çözelti hazırlandı ve 503 nm'de spektrofotometrik ölçümler yapıldı. Yapılan ölçümler sonucunda eklenen ligant hacmine karşı, floresans şiddeti değerleri grafiğe geçirildi. Elde edilen grafikten (Şekil 3.12) maksimum noktaya karşılık gelen hacmin 2,0 mL ligant hacmi olduğu görüldü. Bu noktadaki metal çözeltisinin hacmi de 2,0 mL olduğundan L/M oranı (2/2) olarak bulundu. Buna göre Fe<sup>3+</sup> : ligant kompleksinin oranının 1:1 olduğu anlaşıldı.

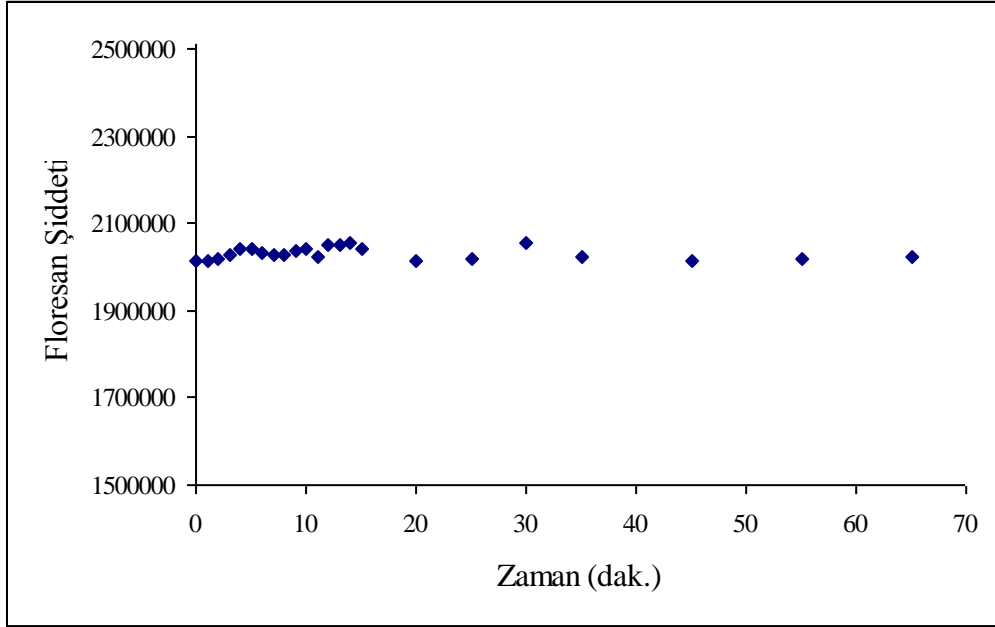


Şekil 3.12. Job metodu ile ligant:Fe<sup>3+</sup>'nin stokiyometrisinin belirlenmesi

### 3.2.8. Kompleksin Floresans Şiddetine Zamanın Etkisi

Ekivalent miktarda Fe<sup>3+</sup> ve ligant içeren ( $1,3 \times 10^{-5}$  M) karışımın 503 nm'de floresans şiddetindeki değişimler zamana karşı belirlendi (Şekil 3.13). Buna göre Fe<sup>3+</sup>-ligant kompleksi 1 dak. içinde kararlılığa ulaştığı gibi 60 dak. boyunca da bu kararlılığı korudu. Şekil 3.13'den görüldüğü gibi Fe<sup>3+</sup>-ligant kompleksinin 1 dak. sonra floresans şiddetinde önemli bir değişim olmadığı belirlendi. Gözlenen değişimin 1 saat boyunca % 2,0'dan

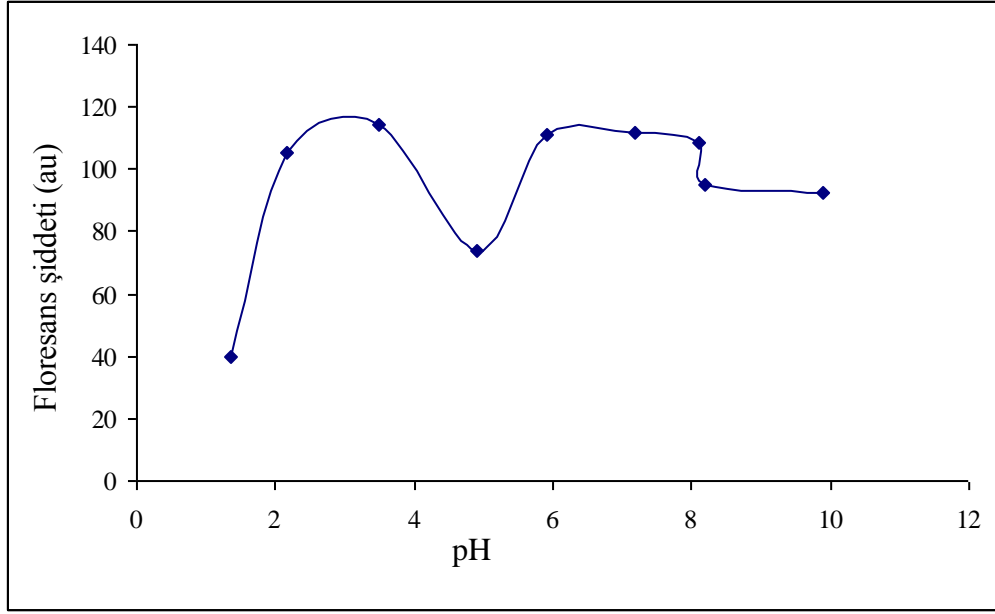
daha az olduğu saptandı. Ölçümden önce 1 dakikalık bir süre beklemenin tayin süresini oldukça kısalttığı görüldü.



Şekil 3.13. Kompleks kararlılığının incelenmesi için kompleksin floresansının zamanla değişimi

### 3.2.9. Uygun Çalışma pH Aralığının Tespiti

Buraya kadar ki çalışmalar ligandın floresans şiddetinin maksimum olduğu pH 7,0'da gerçekleştirildi. Spektroflorimetrik olarak demir tayini gerçekleştirilirken ortamın hangi pH'da olması gerektiğini tespit etmek için Ligant:Fe<sup>3+</sup> kompleks çözeltisi 1:1 oranında hazırlandı ve ortamın pH'ı 1,0'den 10,0'a kadar ayarlanarak 375 nm'de uyarma ile 400-650 nm arasında floresans spektrumları alındı. Maksimum emisyonun gerçekleştiği 503 nm'deki floresans şiddetleri belirlendi ve değişen pH'a karşı grafiğe geçirildi (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Ligant:Fe<sup>3+</sup> kompleksinin floresans şiddetine pH etkisi

Şekil 3.14'deki grafikten görüldüğü gibi pH artışı ile ligant:Fe<sup>3+</sup> kompleksinin floresans şiddetlerinin arttığı ve pH 6,0-8,0 aralığında sabitlediği belirlendi. Önceki çalışmalarla uyumlu olacak şekilde demir tayini için ligandın floresans şiddetinin maksimum olduğu pH seçildi ve böylece çözelti karışımının pH'ı 7,0'a ayarlandı.

### 3.2.10. Kararlılık Sabiti Tayini

Serbest ligant (L) ve metal (M) içeren kompleks (ML) arasındaki dengeyi kontrol eden kararlılık sabiti (K), belirlenen uygun dalga boyundaki absorbans değişiminden tayin edilebilir.



Absorbans değişimi incelendiğinde; serbest ligandın absorbansını ( $A_0$ ) ve metal kationunu içeren çözeltinin absorbansınının ( $A$ ) yer aldığı aşağıdaki denklemler elde edilir (Bourson, 1989).

$$\frac{A_0}{A_0 - A} = \frac{\varepsilon_L c_0}{\varepsilon_L c_0 - (\varepsilon[L] + \varepsilon_{ML}[ML])} \quad (3.2)$$

Burada  $C_0$  ligandın başlangıç konsantrasyonudur.  $\varepsilon_L$  ve  $\varepsilon_{ML}$  sırasıyla ligandın ve kompleksin molar absorpsivitesidir.

Denklem 3.1 ve 3.2'nin yeniden düzenlenmesi ile Denklem 3.3 elde edilir:

$$\frac{A_0}{A_0 - A} = \frac{\varepsilon_L}{\varepsilon_L - \varepsilon_{ML}} (K^{-1}[M]^{-1} + 1) \quad (3.3)$$

$$\frac{\varepsilon_L}{\varepsilon_L - \varepsilon_{ML}} = n \quad \text{denilirse;}$$

$$\frac{A_0}{A_0 - A} = nK^{-1}[M]^{-1} + n \quad (3.4)$$

$$nK^{-1} = m \quad \text{denilirse;}$$

$$\frac{A_0}{A_0 - A} = m[M]^{-1} + n \quad (3.5)$$

eşitliği elde edilir.

Buradan  $[M]^{-1}$ 'e karşı  $A_0/A_0 - A$  grafiği  $y=mx+n$  doğru denklemi ile ifade edilebilir. Böylece denklemin kesim noktasının (n) eğime (m) oranı kararlılık sabitini verir.

Benzer bir denklem floresans ölçümleri için de türetilebilir.

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{\varepsilon_L \Phi_L}{\varepsilon_L \Phi_L - \varepsilon_{ML} \Phi_{ML}} (k^{-1}[M]^{-1} + 1) \quad (3.6)$$

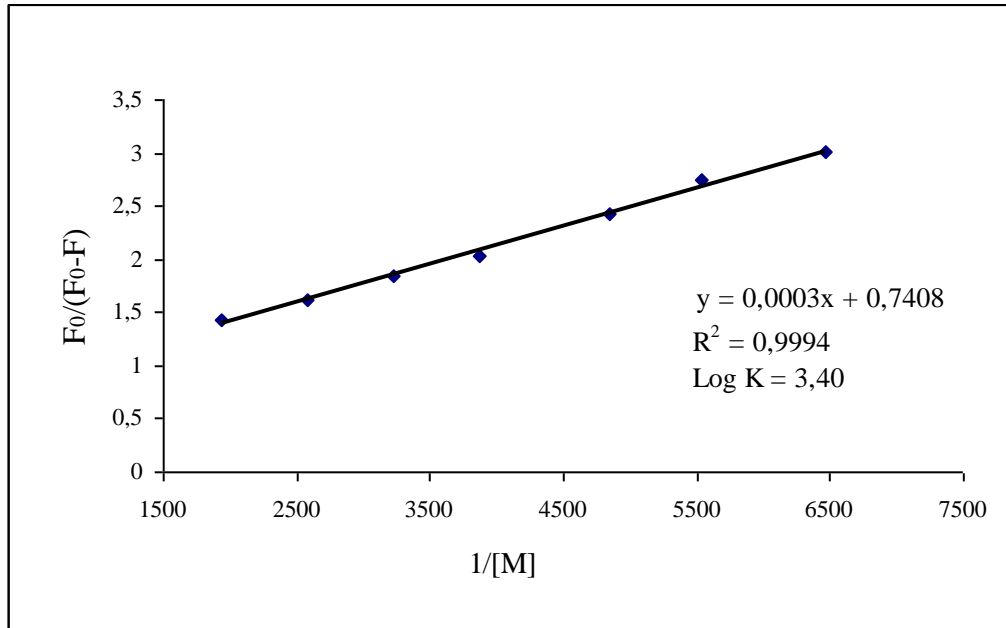


$$\frac{F_0}{F_0 - F} = m[M]^{-1} + n \quad (3.7)$$

Böylece Denklem 3.6'dan Denklem 3.7 elde edilir.

Burada  $\Phi_L$  ve  $\Phi_{ML}$  sırasıyla ligandın ve kompleksin kuantum verimidir.  $[M]^{-1}$ 'e karşı  $F_0/F_0-F$  grafiğinin  $y=mx+n$  denkleminde yine kesim noktasının eğime oranı kararlılık sabitini verir.

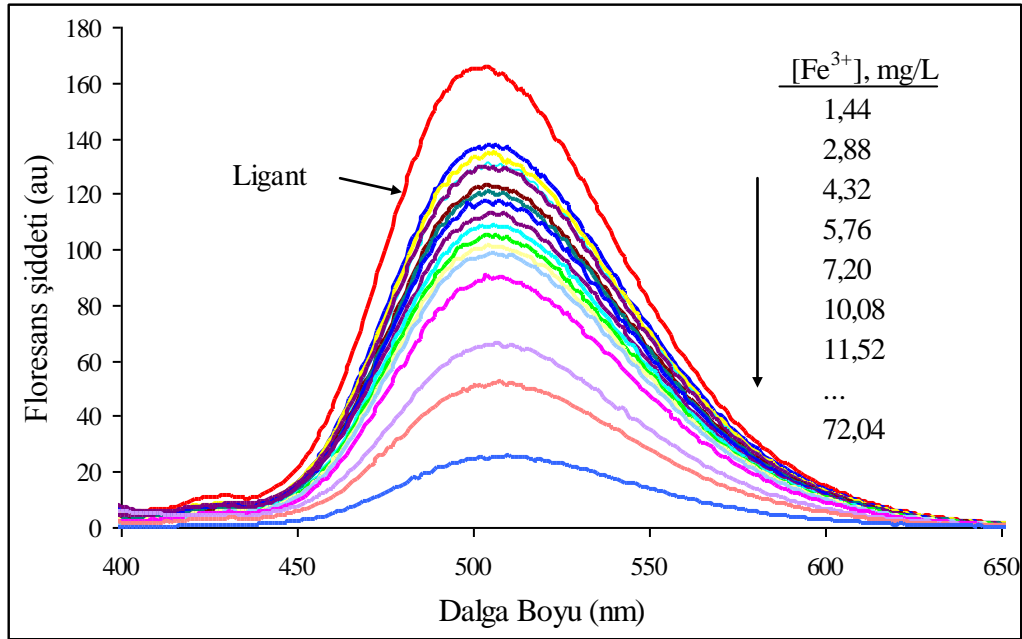
Önceki yapılan denemeler sonucunda absorban ölçümleriyle kompleks oluşumuna dair her hangi bir sonuca varılamaması nedeniyle; floresans ölçümleri kullanılarak ligant- $Fe^{3+}$  kompleksi için kararlılık sabiti hesaplaması Şekil 3.15'de çizilen grafik kullanılarak yapılmıştır. Ligant- $Fe^{3+}$  kompleksinin kararlılık sabiti üç paralel ölçüm sonucunda  $\pm 0,09$  standart sapma ile log K değeri 3,40 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.15. Kararlılık sabitinin belirlenmesi için  $[M]^{-1}$ 'e karşı  $F_0/(F_0-F)$  grafiği

### 3.2.11. Stern-Volmer Grafiği

$Fe^{3+}$  ile yapılan spektrofotometrik titrasyonlarda (pH=7,0) ligant konsantrasyonu  $1,3 \times 10^{-5} M$ 'da sabit tutulup  $Fe^{3+}$  iyonu konsantrasyonunun artırılması ile ligandın emisyon şiddetinde bir azalma olduğu gözlemlendi. Floresans spektrumundaki değişimler Şekil 3.16'da gösterildi.



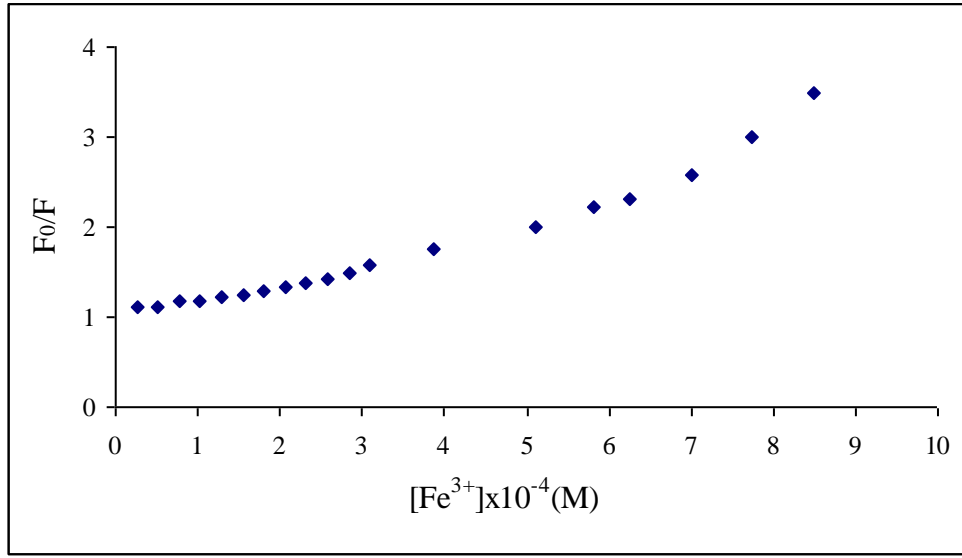
Şekil 3.16. 400-650 nm dalga boyları arasında ligandın floresans spektrumuna artan konsantrasyondaki  $Fe^{3+}$ 'nin etkisi.  $\lambda_{uy}= 375$  nm,  $\lambda_{em}= 503$  nm,  $[ligant]= 1,3 \times 10^{-5} M$

$Fe^{3+}$  iyonu ile ligant arasında meydana gelen sönümün yorumlanması için Stern-Volmer grafikleri oldukça önemlidir. Bu grafiklerde söndürücü konsantrasyonuna karşı  $F_0/F$  değişimi gösterilir.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} [Fe^{3+}] \quad (3.8)$$

Bu Stern-Volmer denkleminde (Denklemler 3.8)  $K_{sv}$  söndürücünün konsantrasyonu,  $F_0$  sadece ligandın,  $F$  ise metali de içeren ligant çözeltisinin floresans şiddetidir.  $F_0/F$  sönüm

etkinliği olarak dűşünülebilir.  $K_{sv}$  ise Stern-Volmer sönüm sabitidir. Burada söndürücü  $Fe^{3+}$  iyonudur. Şekil 3.17’de Stern-Volmer grafiği gösterildi. Şekil 3.17’de görüldüğü gibi Stern-Volmer grafiğinin doğrusal kısmı için kesim noktası beklendiği gibi 1’e eşittir. Bununla birlikte grafiğin artan  $Fe^{3+}$  iyonu konsantrasyonları ile doğrusallıktan pozitif sapma gösterdiği görüldü. Bu sonuç  $Fe^{3+}$  iyonu ile ligandı arasındaki etkileşim sonucunda gözlenen floresans sönümünün hem statik hem de dinamik sönümün birarada olmasından kaynaklandığını gösterir. (Al-Kady vd., 2011; Reddy vd., 2004).



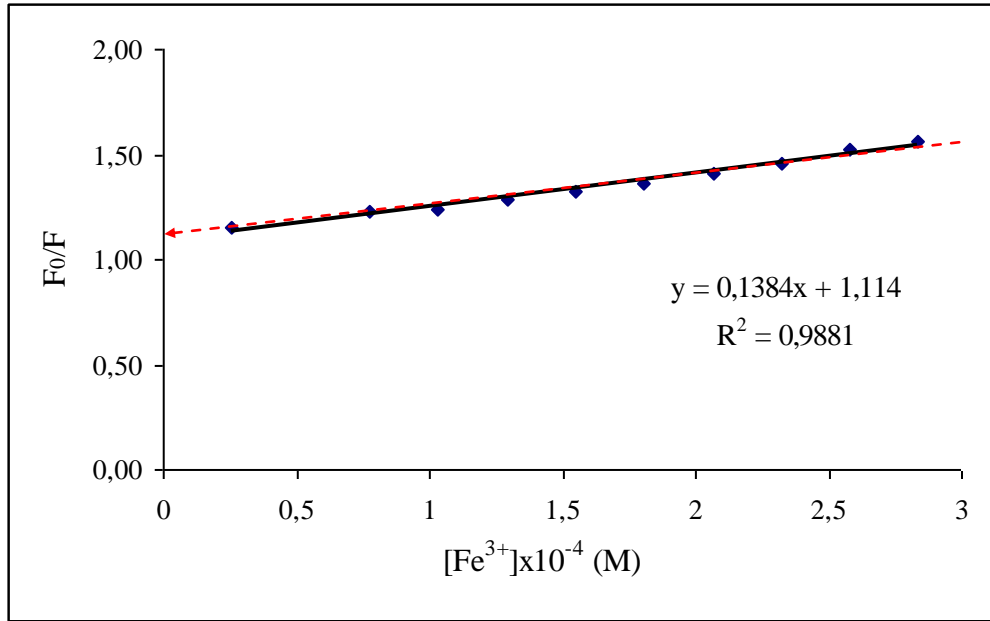
Şekil 3.17. Ligandın artan  $Fe^{3+}$  iyonu konsantrasyonuna karşı çizilen Stern-Volmer grafiği

Stern-Volmer grafiğinin çizilmesi için üç ölçüm yapıldı. Tablo 3.3’de bu ölçümlerdeki her bir demir konsantrasyonu için elde edilen  $F_0/F$  değerleri ve standart sapmaları gösterildi. Grafiklerin doğrusal bölgelerine düşen bu konsantrasyonlar için elde edilen denklemin y eksenini kestiği noktanın 1’e eşit olduğu Şekil 3.18’den daha açık bir şekilde görüldü.

Tablo 3.3. Fe<sup>3+</sup> iyonu için Stern-Volmer verileri (503 nm'de)

[Fe <sup>3+</sup> ] (mol/L)	(F <sub>0</sub> /F) ± s*
1,3x10 <sup>-5</sup>	1,037 ± 0,002
2,6x10 <sup>-5</sup>	1,062 ± 0,011
5,16x10 <sup>-5</sup>	1,140 ± 0,003
7,74x10 <sup>-5</sup>	1,224 ± 0,006
1,03x10 <sup>-4</sup>	1,308 ± 0,014
1,3x10 <sup>-4</sup>	1,396 ± 0,005
1,55x10 <sup>-4</sup>	1,498 ± 0,014

\*: F<sub>0</sub>/F değerlerinin standart sapması, N=3

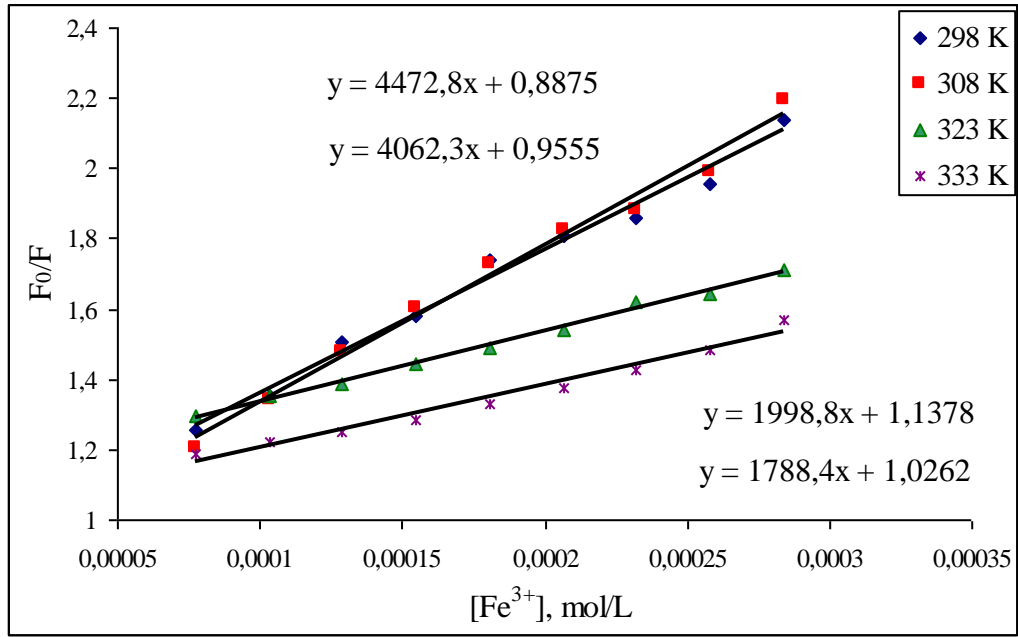


Şekil 3.18. Stern-Volmer grafiğinin doğrusal aralığı

### 3.2.11.1. Stern-Volmer Grafiğinin Sıcaklıkla Değişimi

Fe<sup>3+</sup>'nin ligandın floresans şiddetindeki sönümüne statik ve dinamik sönümün etkisini ayırt etmede kullanılan yöntemlerden biri sıcaklığa bağlı olarak F<sub>0</sub>/F oranının incelenmesi (Sun vd., 2008) olduğundan söz konusu olan ölçümler gerçekleştirildi. Çalışmada 298 K, 308 K, 323 K ve 333 K gibi farklı sıcaklıklarda ölçülen floresans

şiddetleri kullanılarak Stern-Volmer grafikleri çizildi (Şekil 3.19). 298 K'den 308 K'e sıcaklık artışının eğimi çok fazla etkilemediği grafikten görüldü. Oysaki 323 K ve 333 K'de Stern-Volmer grafiğinin eğiminde büyük oranda bir azalma saptandı. Bu sonuçlara göre sıcaklık artışıyla grafiğın eğiminin azalması  $Fe^{3+}$  etkisi ile gözlenen sönümde statik sönümün etkili olduğunu gösterdi. Bu da  $Fe^{3+}$  ile ligant arasında bir temel hal kompleksinin oluştuğunu destekledi.



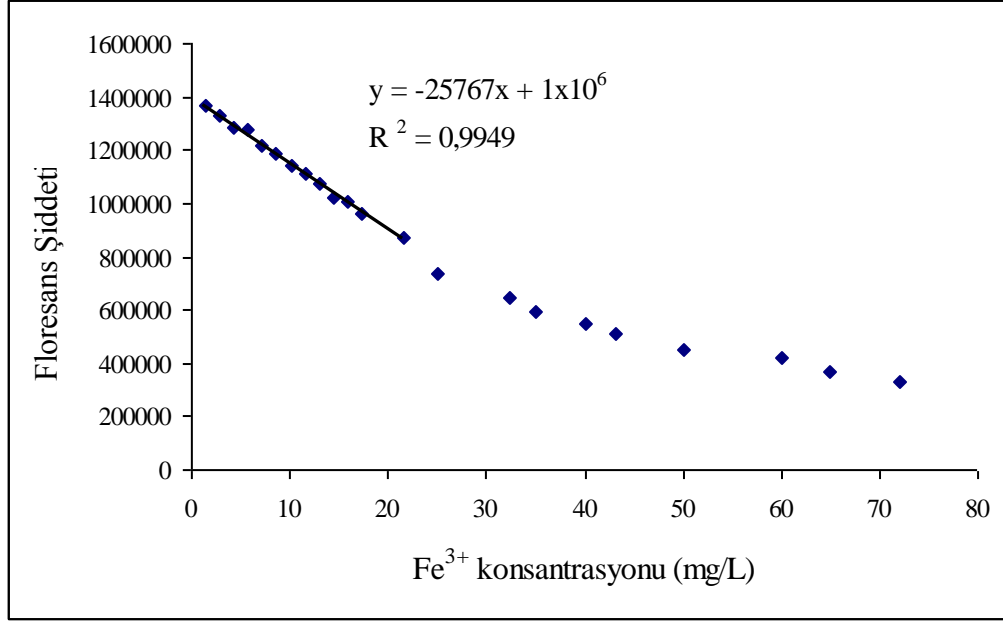
Şekil 3.19.  $Fe^{3+}$  iyonları için Stern-Volmer grafiğinin sıcaklıkla değişimi

### 3.2.12. $Fe^{3+}$ İyonu İçin Doğrusal Aralık ve Lambert-Beer Kanunu'ndan Sapma

$Fe^{3+}$ 'ün spektrofotometrik tayini için geliştirilen metodun doğrusal çalışma aralığı, tayin sınırı ve gözlenebilirlik sınırı gibi parametrelerin tespiti için 1,44 mg/L ile 72,04 mg/L değişen konsantrasyonlarda  $Fe^{3+}$  ve 2,0 mL  $2,6 \times 10^{-5}$  M lık ligant içeren çözeltiler sitrat tamponuyla pH 7,0'a ayarlandı. Artan konsantrasyonda  $Fe^{3+}$  içeren bu çözelti karışımlarına toplam hacim 4,0 mL olacak şekilde deiyonize saf su ilave edildi. Bu çözeltiler 1 dak. vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı. Sonra spektrofotometrede 375 nm ile uyarma yapılarak 400-650 nm arasında 10 mm'lik kuartz hücrede ölçümler alındı (Şekil 3.16).

503 nm'deki floresans şiddetindeki değişimler  $Fe^{3+}$  konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi (Şekil 3.20). Şekil 3.20'de görüldüğü gibi 1,44-21,61 mg/L aralığında doğrusal bir

değişim belirlendi. 21,61 mg/L'den sonra Beer Kanunu'ndan sapma gözlemlendi.



Şekil 3.20. Standart Fe<sup>3+</sup>'ün tayinine ait doğrusal aralık ve Lambert - Beer Kanunu'ndan sapma.  $\lambda_{em}=503$  nm. [ligant] =  $1,3 \times 10^{-5}$  M

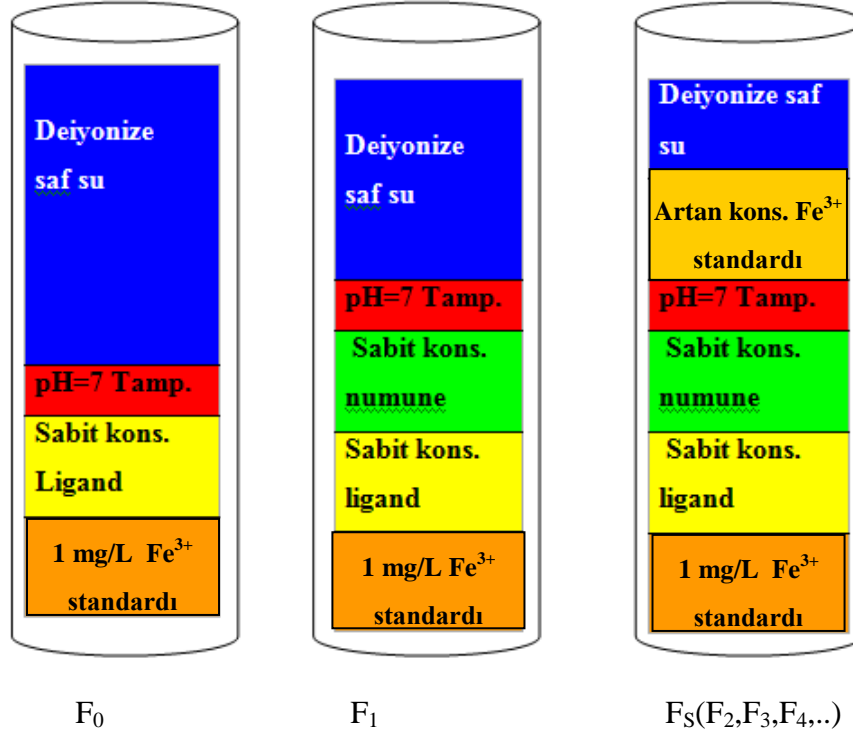
1,44-21,61 mg/L aralığında gözlenen doğrusallıkla ilgili R<sup>2</sup> değeri 0,9949'dur. Bu aralık için elde edilen doğrunun denklemi aşağıdaki gibi tespit edilmiştir (3.10):

$$y = -25767x + 1 \times 10^6 \quad (3.10)$$

Yukarıdaki denklemde y; floresans şiddeti, x; Fe<sup>3+</sup>'nin mg/L olarak konsantrasyonu ve R<sup>2</sup> ise korelasyon katsayısıdır. Bu kalibrasyon grafiğine göre standart referans materyallerde Fe<sup>3+</sup> iyonu analizi istenen doğrulukta gerçekleştirilemediğinden yapılan tayinler aşağıda ayrıntılı olarak anlatılan bir modifiye standart ekleme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

### 3.3. Uygulanan Modifiye Standart Ekleme Yöntemi

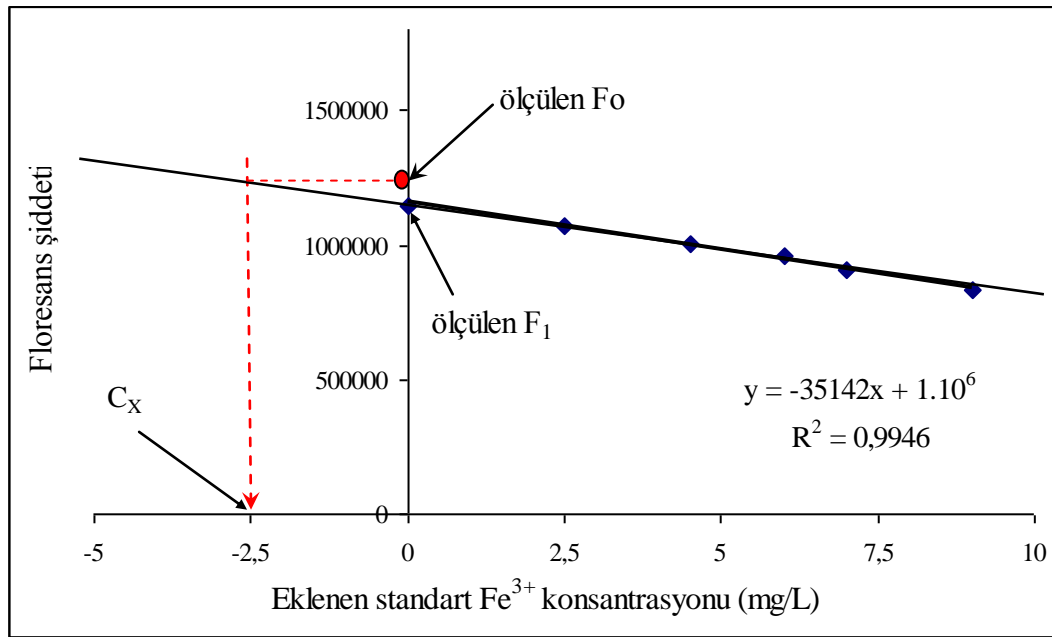
Standart ekleme yöntemi spektrofotometrik ölçümlerde kullanılan bir yöntemdir (Kaewsuya vd., 2007). Ancak bilinen uygulama ile sonuç alınmadığından farklı bir standart ekleme yöntemi uygulandı.



Şekil 3.21. Modifiye standart ekleme yönteminin deneysel uygulama şeması

Bu yöntemde bütün tüplere Şekil 3.21’de gösterilen ilaveler gerçekleştirildi. Önce bütün tüplere 2,0 mL  $2,6 \times 10^{-5}$  M ligant ve sabit konsantrasyonda  $\text{Fe}^{3+}$  standardı (1,0 mg/L) konuldu. Burada floresans şiddeti  $F_0$  olan tüp tanık tüpüdür. Floresans şiddeti  $F_1$  olan tüpten itibaren bütün tüplere tayini yapılacak olan numuneden sabit hacimde ilaveler gerçekleştirildi. Floresans şiddeti  $F_S$  olan tüp ise artan konsantrasyonda demir standardı ilave edilen tüpleri temsil etmektedir. Bu tüpler için floresans şiddetleri  $F_2$ ,  $F_3$ ,  $F_4$  ve  $F_5$  gibi değerlerdir. Son olarak hacim 4,0 mL’ye tamamlanmadan önce bütün tüplerdeki çözeltilerin pH’ı 7,0’a sitrat tamponuyla ayarlandı. Sonuç olarak numune

konsantrasyonunun belirlenmesi için Şekil 3.22’de gösterilen grafik çizildi. Bu grafiğin çizilmesi için eklenen standart demir konsantrasyonlarına karşı 503 nm’de kaydedilen  $F_2$ ,  $F_3$ ,  $F_4$  ve  $F_5$  gibi floresans şiddetleri grafiğe geçirildi. 1. tüpün floresans şiddeti  $F_0$ , 2. tüpün floresans şiddeti  $F_1$  ile gösterildi. Doğrusal grafiğin ekstraplasyonunun  $F_0$  değeri ile kesiştiği noktadan x eksenine bir dikme indirildiğinde 4,0 mL’deki demir konsantrasyonu belirlenmiş oldu. Şekil 3.22’deki grafik önerilen modifiye standart ekleme yöntemi kullanılarak ıspanakta demir tayinine ait grafikdir.



Şekil 3.22. Ispanakta demir tayini için çizilen modifiye standart ekleme yönteminin grafiği

### 3.3.1. Sabit Standart Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Sabit standart konsantrasyonunun belirlenmesi için CRM-SA-C Sandy Soil C sertifikalı materyali ve Ferrum Fort demir ilacı tableti numunelerinde farklı konsantrasyonda sabit standart kullanılarak tayinler gerçekleştirildi. Sırasıyla 0,2, 0,6, 0,8, 1,0, 1,3, 1,5, 2,0 ve 3,0 mg/L sabit  $Fe(NO_3)_3$  standardı kullanıldı. 2 mg/L demir içeren standart referans materyal ve demir ilacı tablet numunelerinin  $Fe^{3+}$  iyonu içerikleri analiz edilerek hesaplanan % bağıl hata değerlerinden uygun sabit standart konsantrasyonu



belirlendi (Tablo 3.4). % Bağıl hata ve sabit standart konsantrasyonunun en düşük olduğu değer 1 mg/L olarak bulundu. Böylece önerilen metotta 1,0 mg/L'lik sabit standart konsantrasyonu ile çalışılmasına karar verildi.

Tablo 3. 4. Sabit standart konsantrasyonunun belirlenmesi için toprak-kum standart referans metaryali ve Ferrum Fort tableti numuneleri için hesaplanan % bağıl hata değerleri. Numunelerin demir içerikleri 2,50 mg/kg'dır.

Sabit Fe <sup>3+</sup> konsantrasyonu <sup>a</sup> (mg/L)	% Bağıl Hata	
	Toprak-Kum standart referans metaryali	Ferrum Fort demir ilacı tableti
0,2	17,10	12,90
0,6	13,05	15,17
0,8	3,32	3,12
<b>1,0</b>	<b>1,50</b>	<b>1,11</b>
1,3	1,61	1,05
1,5	1,93	1,02
2,0	2,50	1,56
3,0	10,4	5,06

<sup>a</sup> Standart Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> çözeltisi kullanılmıştır

### 3.4. Geliştirilen Metodun Validasyonu

Geliştirilen metodun validasyonu, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik (gün içi ve günler arası), tayin sınırı (TS) ve gözlenebilme sınırı (GS) tespiti ile gerçekleştirildi.

#### 3.4.1. Doğruluk

Yöntemin doğruluğu iki şekilde test edildi. Bunlardan ilkinde standart referans materyaller (Sandy Soil ve Herbs) önerilen yöntemle analiz edilerek analiz sonuçları sertifikalı demir içerikleriyle karşılaştırıldı ve böylece yöntemin doğruluğu belirlendi (Tablo 3.5). İkinci doğruluk testi ise demir ilacı tableti ve gıda numunelerde önerilen

metotla belirlenen demir miktarları, bu numunelerin bilinen standart bir metotla analizinden (Ankara Düzen Norwest Laboratuvarı ve Trabzon Gıda Analiz Laboratuvarı'ndan) elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmasıyla yapıldı ( Tablo 3.7 ve 3.9 ). Bu iki doğrulama yöntemi için de demir miktarları arasında karşılaştırma yapılırken sonuçların önemli oranda farklı olup olmadığını göstermek için sonuçlara t-testi (student's test) uygulandı. Hesaplanan bu değerler Tablo 3.5, 3.7 ve 3.9'da gösterildi.

### 3.4.2. Kesinlik

Yöntemin kesinliği için bağıl standart sapma değerleri hesaplandı (Denklem 3.11). Bağıl standart sapmalar 100 ile çarpılarak % BSS olarak verildi (Denklem 3.12) (Skoog, 1991).

$$BSS = \left( s / \bar{x} \right) \quad (3.11)$$

$$\% BSS = \left( s / \bar{x} \right) * 100 \quad (3.12)$$

% BSS değerleri, tayinler gün içinde ve günler arasında 3'er defa tekrar edilerek hesaplandı. Gün içi kesinlik olarak % BSS değerlerinin hesaplanması için yapılan tayinler sabah, öğlen ve akşam saatlerinde 5 saat arayla gün içinde tekrarlandı. Günler arası kesinlik olarak, % BSS değerlerinin hesaplanması için ise tayinler 2 gün arayla gerçekleştirildi. Sonuçlar Tablo 3.6, 3.8 ve 3.10'da verilmiştir.

### 3.4.3. Gözlenebilme Sınırı (GS)

Yapılan tayinlerde modifiye standart ekleme yöntemi uygulanırken tanığın floresans şiddetinin ( $F_0$ ) standart sapması 11 paralel çalışma yapılarak belirlendi. Sonrasında gözlenebilme sınırının hesaplanması için, bu değer standart sapmasının 3 katı alındı ve önerilen yöntemin modifiye standart ekleme grafiğinin eğimine bölünmesiyle GS hesaplandı. Standart referans metaryallerle, demir tabletleriyle ve gıda numuneleriyle yapılan çalışmaların hepsinde gözlenebilme sınırı 0,81 mg/L  $Fe^{3+}$  iyonu olarak bulundu.

### 3.4.4. Tayin sınırı (TS)

Tayin sınırı, gözlenebilme sınırı değerinin 3 katı alınarak hesaplandı. Tayin sınırı 2,43 mg/L Fe<sup>3+</sup> iyonu olarak bulundu.

### 3.4.5. Tayin Aralığı

Önerilen metodun tayin aralığı 2,43-21,61 mg/L Fe<sup>3+</sup> iyonu olarak belirlendi (Şekil 3.20).

## 3.5. Sertifikalı Referans Materyal Uygulamaları ve Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu test etmek için; yöntem, öncelikle toprak-kum (CRM-SA-C Sandy Soil C) sertifikalı referans materyaline daha sonra da karışık bitki sertifikalı referans materyaline (Mixed Polish Herbs (INCT-MPH-2)) uygulandı.

Üç tekrar numunesi analiz edildi ve her iki standart referans materyalin analizi için de önerilen metotla bulunan sonuçlar arasındaki fark ( $X_R - X_{ORT}$ ), kritik değer ( $t_s / \sqrt{N}$ )'den % 95 güven seviyesi ile daha düşük bulundu. Böylece gözlenen hatanın rastgele hatalardan kaynaklandığına karar verildi. Dolayısıyla metodun doğruluğu gösterildi. Standart referans materyallerin önerilen metotla analizinden elde edilen sonuçların öğrenci t-testi (student's t-test) ile irdelenmesi yapıldı. Bu sonuçlar Tablo 3.5'de verildi.

Tablo 3. 5. CRM-SA-C Sandy Soil C ve Mixed Polish Herbs (INCT-MPH-2) sertifikalı materyallerin önerilen metotla analizinden elde edilen sonuçların öğrenci t-testi (student's t-test) ile irdelenmesi.

Element	s	X <sub>R</sub>	X <sub>ort</sub>	X <sub>R</sub> - X <sub>ort</sub>	* $t_s / \sqrt{N}$	Karşılaştırma
<sup>a</sup> Fe <sup>3+</sup>	0,02	2,50	2,46	0,03	0,06	0,03 < 0,06
<sup>b</sup> Fe <sup>3+</sup>	0,03	2,50	2,46	0,04	0,08	0,04 < 0,08

<sup>a</sup>: CRM-SA-C Sandy Soil C sertifikalı materyalleri için; <sup>b</sup>: Mixed Polish Herbs (INCT-MPH-2) sertifikalı materyalleri için; t: 4,30 (% 95 güven seviyesinde); N=3; s: standart sapma; X<sub>ort</sub>: bulunan ortalama değer; X<sub>R</sub>=sertifikalı referans materyalin değeri; Konsantrasyon mg/kg olarak ifade edilmiştir.

Sertifikalı materyallerde metodun kesinliğini ifade eden % bağıl standart sapma değerleri gün içi ve günler arası kesinlik olarak hesaplandı ve % 3,00'in altında bulundu. (Tablo 3.6)

Tablo 3. 6. Önerilen metotla CRM-SA-C Sandy Soil C ve Mixed Polish Herbs (INCT-MPH-2) için bulunan % BSS değerleri

	<sup>a</sup> Sertifikalı Konsantrasyon Değeri	Gün-İçi Kesinlik		Günler-Arası Kesinlik	
		Ortalama Değer	% BSS	Ortalama Değer	% BSS
<sup>b</sup> Fe <sup>3+</sup>	2,50	2,51	1,96	2,46	1,01
<sup>c</sup> Fe <sup>3+</sup>	2,50	2,51	1,38	2,47	1,28

<sup>a</sup>: Sertifikalı materyallerden hesaplanan demir konsantrasyonu; <sup>b</sup>: CRM-SA-C Sandy Soil C; <sup>c</sup>: Mixed Polish Herbs (INCT-MPH-2); N=3; Konsantrasyon mg/kg olarak ifade edilmiştir.

### 3.6. Demir Tableti Uygulamaları ve Sonuçların İstatiksel Değerlendirilmesi

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu test etmek için; yöntem ayrıca demir tabletlerine uygulandı. İki farklı firmanın ürettiği demir tabletlerinde uygulamalar yapıldı. Ferrum Fort ve Maltofer demir ilacı tabletleri ICP-OES yöntemi kullanılarak KYTG 504-12 kodlu işletme içi standart metodu ile Düzen Norwest Laboratuvarında (Ankara) analiz ettirildi. Aynı numunelerin paralelleri önerilen metotla analiz edildi. Önerilen metot uygulanarak elde edilen sonuçlar referans metotlardan elde edilenler ile karşılaştırıldı. Sonuçlar t- testi ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde yukarıda anlatıldığı gibi % 95 güven seviyesinde önerilen metot sonuçları ile akredite laboratuvar sonuçları arasındaki farklılıkların rastgele hatalardan kaynaklandığı görüldü. Böylece önerilen metodun bir sistematik hatasının olmadığı sonucuna varıldı. Dolayısıyla yöntemin doğruluğu tekrar gösterildi. Akredite laboratuvarın kullandığı ICP metodunun çalışmada önerilen metottan (spektroflorimetrik) farklı bir prensibe dayanması önerilen metodun doğruluğunu teyit etmede daha anlamlı olduğunu gösterdi. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.7'de verildi.

Tablo 3. 7. Ticari ilaç tabletleri için akredite laboratuardan elde edilen sonuçlarla önerilen metottan elde edilen sonuçların öğrenci t-testi (student's t-test) ile karşılaştırılması.

Element	s	X <sub>R</sub>	X <sub>ort</sub>	X <sub>R</sub> - X <sub>ort</sub>	* $t_s / \sqrt{N}$	Karşılaştırma
<sup>a</sup> Fe <sup>3+</sup>	0,02	2,50	2,47	0,03	0,06	0,03<0,06
<sup>b</sup> Fe <sup>3+</sup>	0,01	2,50	2,49	0,01	0,03	0,01<0,03

<sup>a</sup>: Ticari Ferrum Fort demir ilacı tableti; <sup>b</sup>: Ticari Maltofer demir ilacı tableti; \*: t=4,30 (%95 güven seviyesinde); N=3; s= standart sapma; X<sub>ort</sub>=bulunan ortalama değer; X<sub>R</sub>=Ferrum Fort ve Maltofer tabletinde Ankara Düzen Norwest Laboratuvarından elde edilen demir miktarı; Konsantrasyon mg/kg olarak ifade edilmiştir.

Ticari ilaç tabletlerinde metodun kesinliğini ifade eden % bağıl standart sapma değerleri gün içi ve günler arası kesinlik olarak hesaplandı ve % 3'in altında bulundu. (Tablo 3.8)

Tablo 3. 8. Önerilen metotla ticari Ferrum Fort ve Maltofer demir ilacı tabletleri için bulunan % BSS değerleri

	<sup>a</sup> Sertifikalı Konsantrasyon Değeri	Gün-İçi Kesinlik		Günler-Arası Kesinlik	
		Ortalama Değer	% BSS	Ortalama Değer	% BSS
<sup>b</sup> Fe <sup>3+</sup>	2,50	2,47	0,94	2,47	1,01
<sup>c</sup> Fe <sup>3+</sup>	2,50	2,50	0,16	2,49	0,52

<sup>a</sup>: Sertifikalı metaryallerden hesaplanan demir konsantrasyonu; <sup>b</sup>: Ticari Ferrum Fort demir ilacı tableti; <sup>c</sup>: Maltofer demir ilacı tableti; N=3; Konsantrasyon mg/kg olarak ifade edilmiştir.

### 3.7. Gerçek Numune Uygulamaları ve İstatistiksel Değerlendirilmeleri

Demir tayini için geliştirilen yöntemin doğruluğu test edildikten sonra yöntem, ıspanak, nane, dereotu, semizotu ve roka gibi bazı sebze ve kurufasülye ve kırmızı

mercimek gibi bazı baklagil numunelerine uygulandı. Bunun için gıda numuneleri de AAS yöntemi kullanılarak NMKL 161 metodu ile Trabzon Gıda Kontrol Laboratuvarında analiz ettirildi. Aynı numunelerin paralelleri önerilen metotla analiz edildi. Sonuçlar t- testi ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde yukarıda anlatıldığı gibi % 95 güven seviyesinde önerilen metot sonuçları ile akredite laboratuvar sonuçları arasındaki farklılıkların rastgele hatalardan kaynaklandığı görüldü. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.9’de gösterildi.

Tablo 3.9. Ispanak, nane, dereotu, semizotu, roka, kurufasulye ve kırmızı mercimek numuneleri için akredite laboratuardan elde edilen sonuçlarla önerilen metottan elde edilen sonuçların öğrenci t-testi (student’s t-test) ile karşılaştırılması

Numune	s	X <sub>R</sub>	X <sub>ORT</sub>	X <sub>R</sub> - X <sub>ORT</sub>	* t <sub>S</sub> / $\sqrt{N}$	Karşılaştırma
Ispanak	0,04	2,50	2,46	0,04	0,10	0,04 < 0,10
Nane	0,02	2,50	2,48	0,02	0,05	0,02 < 0,05
Dereotu	0,04	2,50	2,45	0,05	0,10	0,05 < 0,10
Semizotu	0,01	2,50	2,50	0,01	0,03	0,01 < 0,03
Roka	0,01	2,50	2,51	0,01	0,03	0,01 < 0,03
Kuru fasulye	0,02	2,50	2,49	0,02	0,06	0,02 < 0,06
Kırmızı mercimek	0,01	2,50	2,51	0,01	0,04	0,01 < 0,04

X<sub>R</sub>: AAS kullanılarak NMKL 161 metodu ile Trabzon Gıda Kontrol Laboratuvarında ıspanak, nane, semizotu, dereotu, roka, kurufasulye ve kırmızı mercimek numuneleri için elde edilen demir miktarı; \*t = 4,30 (%95 güven seviyesinde), N=3; X<sub>ORT</sub>=Önerilen metotla bulunan ortalama demir konsantrasyonu; Konsantrasyon mg/kg olarak ifade edilmiştir.

Gerçek numunelerde metodun kesinliğini ifade eden % bağıl standart sapma değerleri gün içi ve günler arası kesinlik olarak hesaplandı ve % 2'in altında bulundu (Tablo 3.10).

Tablo 3. 10. Önerilen metotla bazı sebze ve baklagiller için bulunan % BSS değerleri

	<sup>a</sup> Akradite Laboratuvar Değeri	Gün-İçi Kesinlik		Günler – Arası Kesinlik	
		Ortalama Değer	% BSS	Ortalama Değer	% BSS
Ispanak	2,50	2,46	1,64	2,46	1,64
Nane	2,50	2,48	0,74	2,49	1,38
Dereotu	2,50	2,45	1,69	2,45	1,71
Semizotu	2,50	2,51	0,32	2,51	0,41
Roka	2,50	2,54	1,37	2,51	0,41
Kuru fasulye	2,50	2,49	0,59	2,48	0,99
Kırmızı Mercimek	2,50	2,51	0,27	2,51	0,57

a: AAS kullanılarak NMKL 161 metodu ile Trabzon Gıda Kontrol Laboratuvarı'nda analiz edildi. N=3; Konsantrasyon mg/kg olarak ifade edildi.

### 3.8. Standart Referans Materyallerin Analizi Sonuçları

Geliştirilen yöntem ile standart referans maddeler analiz edildi ve sonuçlar Tablo 3.11'de verildi. Bu analiz sonuçları gün içi yapılan deneylerden hesaplanmıştır.

Tablo 3. 11. Standart referans materyallerde demir tayini

Numuneler	Demir miktarı (mg/g)			
	Önerilen Metot		Sertifikalı Materyal	
	Bulunan Değer	% BSS	Sertifikalı Değer	u
Toprak-kum standart referans materyali	13,94	1,96	13,9	1,2
Bitki standart referans materyali	0,45	1,38	0,46	*

u: Sertifikalı materyal için % 95 güven seviyesinde bildirilen ölçüm belirsizliği;

\*: belirsizlik belirtilmemiştir

### 3.9. Gerçek Numunelerin Demir Analizi Sonuçları

Geliştirilen yöntemin doğruluğu test edildikten sonra yöntem, ticari ilaç tabletlerine ve gıda numunelerine uygulandı. Bu numuneleri toplam demir miktarı Tablo 3.12 ve 3.13’de verildi. Bu analiz sonuçları gün içi yapılan deneylerden hesaplandı.

Tablo 3. 12. Ticari ilaç tabletlerinde demir analizi sonuçları

Numuneler	Demir miktarı (g/kg)			
	Önerilen Metot		Standart Metot	
	Bulunan Değer	% BSS	Akredite Laboratuvar Değer	s
Ferrum Fort Tableti	155,22	0,94	157,3	2,05
Maltofer Tableti	138,62	0,16	138,5	1,07

s: Ankara Düzen Norwest Laboratuvarının uyguladığı metodun standart sapma değeri



Tablo 3. 13. Kuru gıda numunelerinde demir analizi sonuçları

Numuneler	Demir miktarı (g/kg)			
	Önerilen Metot		Standart Metot	
	Bulunan Değer	% BSS	Akredite Laboratuvar Değer	u
Ispanak	215,60	1,64	219,17	17,75
Nane	642,65	0,74	648,42	52,52
Roka	615,70	1,37	606,97	49,16
Semizotu	136,27	0,32	135,69	10,99
Dereotu	78,51	1,69	80,07	6,48
Kuru fasülye	102,63	0,59	102,94	8,34
Mercimek	86,80	0,27	86,39	7,00

u: Trabzon Gıda Kontrol Laboratuvarının AAS kullanılarak uyguladığı NMKL 161 metodunun ölçüm belirsizliği

### 3.10. Deresuyu Numunelerinde Geri Kazanım Çalışmaları

Çevresel su numunelerinde bulunan demir iyonu konsantrasyonu 1 mg/L'in altında iken içme sularında bu değer çok daha düşüktür. Demir iyonu tayini için geliştirilen metodun tayin sınırı 2,43 mg/L'dir. Bu yüzden su numunelerinde demir tayini yapılması mümkün olmamıştır. Trabzon Değirmendere Deresi Deliklitaş mevkiinden alınan su numunesi üzerinde sadece geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. % Geri kazanım sonuçları Tablo 3.14'te verilmiştir.

Tablo 3. 14. Trabzon İli Değirmendere Deresi Deliklitaş mevkiinden alınan su numunelerinde geri kazanım çalışmaları

Numune	Eklenen Fe <sup>3+</sup> Standardı	X <sub>ORT</sub> ± % BSS	% Geri Kazanım
Değirmendere	2,50	2,47 ± 0,81	98,88
Deresuyu	5,00	4,98 ± 0,20	99,60
	7,50	7,47 ± 0,28	99,64

N=3; Konsantrasyon mg/kg olarak ifade edilmiştir.

### 3.11. Geliştirilen Yönteme Göre Demir Tayinindeki Optimum Şartlar

Geliştirilen yöntemin analitik performansını gösteren değerler Tablo 3.4'de verilmiştir.

Tablo 3. 15. Demir tayini için önerilen spektrofotometrik metodun özellikleri

Parametreler	Değerler
Uyarma dalga boyu	375 nm
Emisyon dalga boyu	503 nm
Gözlenebilme sınırı	0,81 mg/L
Tayin sınırı	2,43 mg/L
Tayin aralığı	2,43-21,61 mg/L
Optimum pH	7,0
Ligant kons.	1,3 x 10 <sup>-5</sup> M
Ligant hacmi	2,0 mL
Toplam hacim	4,0 mL
Çözücü ortamı	Metanol:su (1:1)
Kompleksleşme Süresi	1-2 dak.
Korelasyon Katsayısı (R <sup>2</sup> )	0,9949

#### 4. TARTIŞMA

Ağır metaller, canlı hücrelerde ve çevrede birikmeleri nedeniyle çevre kirliliklerinin temel kaynaklarından. Bu nedenle çeşitli ortamlardaki miktarlarının tespiti ve tayini son derece önemlidir. Yerkürenin temel elementlerden biri olan demir ise biyolojik sistemlerde oldukça önemli bir role sahiptir. Özellikle 3+ yükseltgenme basamağındaki demir insan vücudu için gereklidir. Demir hemoglobin ve miyogloblin gibi proteinlerin üretiminde ve oksijenin taşınımında önemli bir role sahiptir. Aşırı veya yetersiz miktarda alımı insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle çevresel numunelerde ve gıdalarda demir miktarının belirlenmesi önemlidir.

Spektroflorimetrik olarak metal iyonlarının seçici olarak tayin edilmesi ve miktarlarının belirlenmesi için uygun sensörlerin geliştirilmesi tıp, biyoloji, çevre, gıda ve kimya gibi birçok alanda araştırma konusu olmuştur. Spektroflorimetrik teknikler, hassas ve seçici olarak düşük maliyetle hızlı bir şekilde numuneyi tahrip etmeden çok bileşenli sistemlere uygulanabilir. Belirtilen bu avantajları nedeniyle önerilen çalışmada gerçek numunelerde demir tayini azaflavanon-3-ol türde bir bileşik kullanılarak spektroflorimetrik yöntemle gerçekleştirilmiştir.

Flavanonoller bir tür fenolik bileşik olan flavonoid sınıfındadır. Flavonoidler bitkilerde doğal olarak bulunan ve antioksidan özelliğe sahip olan çok önemli metabolitlerdir. Kullanılan bileşik de sentetik bir flavonoid bileşimidir. Flavonoidler antioksidan, antibakteriyel, antikanserojenik ve antialerjik gibi çok geniş biyolojik fonksiyonlar göstermektedir. Bu yüzden florimetrik çalışmalarda çeşitli sentetik flavonoid türevlerinin daha çok biyolojik amaçlar için kullanımına rastlanmaktadır. Literatürde flavonoid türevi *morin* (Hu vd., 2012), *hesperidin* (Wang vd., 2007) ve *2-(4-florofenil)-1-fenil-1H-fenantro [9,10-d] imidazole* (Jayabharathi vd., 2012) bileşiklerin fizyolojik şartlarda, sığır serum albumini ile etkileşimi floresans spektroskopisi ile araştırılmış ve Stern-Volmer eşitliği ile sıcaklık gibi termodinamik parametrelere bağlı bağ sabitleri ve bağlanma bölgeleri belirlenmiştir. Ayrıca çeşitli flavonoid türevi bileşiklerin insan hemoglobini ile etkileşimi spektroflorimetrik olarak ve moleküler modelleme çalışmalarıyla bulunmuştur (Chaudhuri vd., 2011; Chakraborty vd., 2012). Benzer çalışmalar hedef proteinlerle (Gutzeit vd., 2004) ve kırmızı kan hücre membran lipit ve proteinleriyle (Chaudhuri vd., 2007) de gerçekleştirilmiştir. Böylece bu flavonoidlerin

antioksidan ve antihemolitik gibi etkileri hakkında bilgi edinilmiştir. Bununla birlikte doğal veya sentetik flavonoidler kullanılarak metal tayini ile ilgili yapılan spektrofotometrik çalışmalara literatürde rastlanmamıştır. Bu bakımdan sunulan çalışma literatür için yeni bir örnek teşkil etmektedir.

Yöntemde kapalı sistem mikrodalga çözünürleştirme sistemiyle çözünürleştirilen nane, ıspanak, dereotu, roka ve semizotu gibi sebze; kuru fasulye ve kırmızı mercimek gibi baklagil numunelerinde demir tayini pH 7,0'da metanol:su (1:1) ortamında hızlı ve basit bir spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilmiştir.

Aza-flavanon-3-ol türü ligandın absorpsiyon spektrumu alındığında maksimum absorbanstaki dalga boyu 373 nm olarak belirlenmiştir. 375 nm'de uyarılarak ligandın floresans spektrumu alındığında emisyon dalga boyu 503 nm olarak bulunmuştur. Daha sonra birçok anyon ve katyonun söz konusu bileşikle etkileşimi metanol-su ortamında spektrofotometrik ve spektrofotometrik ölçümlerle incelenmiştir. Bu iyonlardan  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $CrO_4^{2-}$  ve  $Cr_2O_7^{2-}$  iyonlarının ligandın absorbanstaki bu değişimin sebebinin ligant ile etkileşimleri değil bu iyonların kendilerinin olduğu ligantsız yapılan çalışmalarda anlaşılmıştır. Bu yüzden çalışmaların devamında absorbanstaki ölçümlerine yer verilmemiştir. Spektrofotometrik çalışmalarda ise özellikle  $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$  ve  $Cr_2O_7^{2-}$  iyonlarının ligandın floresans şiddetinde önemli bir azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.9 ve 3.10).  $Cr_2O_7^{2-}$  iyonunun konsantrasyonu arttıkça ligandın floresans şiddetinde düzenli bir değişiklik söz konusu olmamıştır.  $Fe^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$  iyonlarıyla yapılan spektrofotometrik titrasyonlarda bu iyonların konsantrasyonu arttıkça ligandın floresans şiddetinin düzenli olarak azaldığı belirlenmiştir (sırasıyla Şekil 3.11 ve 3.20). Bununla birlikte  $Fe^{3+}$  ile yapılan çalışmada  $R^2$  değerinin (0,9949)  $Fe^{2+}$  ile yapılan çalışmadakinden daha yüksek olduğu görülmüştür.  $Fe^{2+}$  için  $R^2$  değeri 0,9825'tir (Şekil 3.11). Buna ilaveten katı numunelerin çözünürleştirilmesi sırasında kullanılan nitrik asitin de numuneyi yükseltmeyeceği dolayısıyla demir türlerinin 3+ basamağına dönüşeceği dikkate alınarak  $Fe^{3+}$  iyonunun ligantla etkileşimine dayalı bir yöntemin optimizasyonuna karar verilmiştir.

Geliştirilen yöntemde, spektrofotometrik olarak demir tayininde kullanılacak flavanonol ligandının konsantrasyonunu belirlemek için metanolde  $2,6 \times 10^{-6}$  M,  $1,0 \times 10^{-5}$  M,  $2,6 \times 10^{-5}$  M ve  $5,0 \times 10^{-5}$  M olan ligant çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin her birinden alınan 2,0 mL'lik kısımların üzerine 2,0 mL deiyonize su ilave edildi. Hazırlanan çözeltilerin 375 nm'de uyarılmasıyla emisyon spektrumları 400-650 nm arasında alındı

(Şekil 3.7). Daha sonra uygun ligant konsantrasyonunu optimize etmek için bu konsantrasyonlarda bir seri ligant çözeltisi ile florimetrik  $Fe^{3+}$  iyon titrasyonları gerçekleştirildi. Ölçümlerden floresans şiddetleri dalga boyuna karşı grafiğe geçirildi. Maksimum floresans şiddetinin olduğu 503 nm'deki emisyonlar artan  $Fe^{3+}$  iyonu konsantrasyonuna (mg/L) karşı grafiğe geçirildiğinde en yüksek  $R^2$  değeri veren kalibrasyon grafiği  $1,3 \times 10^{-5}$  M ligant çözeltisi için elde edildiği görüldü (Şekil 3.20).

Yapılan titrasyonlarda ligant çözücüsü olarak metanol yerine etanol, asetonitril, THF ve DMF de kullanılmıştır. Yukarıda belirtildiği gibi kalibrasyon grafiklerinin  $R^2$  değerine bakılarak metanolde çalışmanın uygun olduğu görülmüştür. Metanoldeki  $1,3 \times 10^{-5}$  M'lık ligant çözeltisinin  $Fe^{3+}$  iyonu ile spektrofluorimetrik titrasyonunda kalibrasyon grafiğinin  $R^2$  değeri 0,9949 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.20).

Ligandın floresans spektrumuna pH etkisini incelemek için metanol:su (1:1) ortamındaki  $1,3 \times 10^{-5}$  M'lık ligant çözeltilerinin her birinin pH'ı 1,0'dan 10,0'a kadar uygun tampon çözeltiler kullanılarak ayarlandı ve 375 nm'de uyarma ile floresans spektrumları alındı. 503 nm'deki emisyonlar bu pH değerlerine karşı grafiğe geçirildiğinde ligandın maksimum emisyon verdiği pH'ın 5,0 ile 8,0 aralığında olduğu görüldü (Şekil 3.8). Bu nedenle çalışma pH'ı olarak bu değerler arasındaki bir değer olan 7,0'ye karar verildi.

Ligant ile  $Fe^{3+}$  iyonu arasındaki etkileşimin bir kompleks oluşumundan kaynaklanıp kaynaklanmadığını göstermek için Job metodu uygulandı (Job, 1928). Bu amaçla ligandın ve  $Fe^{3+}$  iyonunun  $2,6 \times 10^{-6}$  M çözeltileri hazırlandı ve pH 7,0'a ayarlandı. Son hacim 4 mL olacak şekilde ligandın konsantrasyonu artarken  $Fe^{3+}$  iyonu konsantrasyonunun azaldığı bir seri çözeltinin 503 nm'deki floresans şiddetleri ligant hacmine karşı grafiğe geçirildi. Elde edilen grafiğin üçgen şeklinde olması ligandla  $Fe^{3+}$  iyonu arasında bir kompleks oluştuğunu göstermektedir. Bu üçgenin tepe noktasından ligant hacminin bulunduğu eksene bir dikme indirildiğinde 2,0 mL'ye karşılık geldiği görülmektedir. Bu noktada metal hacmi de 2,0 mL olduğundan kompleks stokiometrisinin 1:1 olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.12).

Ölçümden önceki bekleme süresinin optimizasyonu için; 2,0 mL  $2,6 \times 10^{-5}$  M ligandın metanoldeki çözeltisine 2,0 mL  $2,6 \times 10^{-5}$  M  $Fe^{3+}$ 'nın sudaki çözeltisi eklendi, 1-2 dak. vorteks çalkalayıcıda çalkalandı ve 1-60 dakika arasında 503 nm'deki emisyon şiddetinde meydana gelen değişiklikler incelendi.  $Fe^{3+}$ - ligant 1:1 kompleksinin birinci dakikadan itibaren kararlılığa ulaştığı ve 60 dakika boyunca kararlı kaldığı tespit edildi.

(Şekil 3.13). Bu süre içerisinde floresans şiddetindeki değişimlerin % 2,0'dan fazla olmadığı belirlenmiştir. Ligant-Fe<sup>3+</sup> arasındaki kompleksin hızlı bir şekilde kararlı hale gelmesi tayinin süresini de azalttığı için önemli bir avantaj sağlamaktadır.

Fe<sup>3+</sup> iyonunun spektrofotometrik tayinine pH etkisinin incelenmesi için 2,6x10<sup>-5</sup> M ekivalent miktarda ligant ve Fe<sup>3+</sup> iyonu içeren çözelti karışımlarının her birinin pH'ı 1,0 ile 10,0 arasında ayarlandı ve floresans spektrumları alındı. 503 nm'deki emisyonlar bu pH değerlerine karşı grafiğe geçirildiğinde ligant:Fe<sup>3+</sup> kompleksinin en yüksek floresans şiddetini pH 5,0 ile 8,0 arasında verdiği görüldü (Şekil 3.14). Böylece tayin pH'ı olarak 7,0'a karar verildi.

Literatürde Fe<sup>3+</sup> iyonunun florimetrik tayini için verilen floresent ligandların Fe<sup>3+</sup> iyonu ile kompleksleşme süreleri oldukça uzundur. Bu durum tayin sürelerini de uzatmaktadır. Örneğin Zhou vd., (2012) süt tozu ve yasmin çayında Fe<sup>3+</sup> iyonu tayini gerçekleştirilirken 2-pridinkarbaldehid-p-fenilhidrazon-Fe<sup>3+</sup> kompleksinin kararlılığa ulaşması için 30 dakika beklenmesi gerektiğini belirtmiştir. Yi vd., (2013) 9,9-bis(3'-fosfonik asit propil)-2,7-difenilflore ve 2,7-difenilflore-9-ilfosfonik asit ligandlarını kullanarak su numunelerinde Fe<sup>3+</sup> iyonu tayini gerçekleştirdiği çalışmada ise tayin çözeltilerinin floresans kararlılığa ulaşması için 24 saat oda sıcaklığında beklenmesi gerektiğini bildirmiştir. Benzer şekilde Du vd., (2013) da rodamin amid floresans probu ile su numunelerinde Fe<sup>3+</sup> iyonu tayininde, çözeltinin floresans kararlılığına ulaşması için 20 dakika beklemiştir. Huang vd., (2013) ise insan serumunda direkt Fe<sup>3+</sup> iyonu tayininde kullandığı doğal bir polisakkarit olan sitozaanın floresans şiddetini arttırmak için 9 saat ısıtmıştır. Böylece önerilen çalışmadaki metodun literatürdeki spektrofotometrik Fe<sup>3+</sup> iyonu tayini metodlarından daha hızlı bir metot olduğu anlaşılabilir.

Floresent bir türün floresans şiddetindeki sönümüyle ilgili statik ve dinamik sönüm mekanizmalarını açıklamak için Stern-Volmer grafiği çizilir. Bunun için söndürücü konsantrasyonuna [Q]'ya karşı F<sub>0</sub>/F değerleri grafiğe geçirilir. Her iki sönüm için de (statik sönüm ve dinamik sönüm) Stern-Volmer grafiği y eksenini 1'de kesen doğrusal grafiklerdir (Denklem 3.8). (Al-Kady vd., 2011; Reddy vd., 2004). Önerilen çalışmada ligant ile Fe<sup>3+</sup> iyonu arasındaki etkileşim sonucu oluşan sönümün mekanizması hakkında fikir sahibi olmak için Stern-Volmer grafikleri çizildi. Bu amaçla yapılan ölçümlerde, pH 7,0'da metanol : su (1:1) ortamında ligant konsantrasyonu 1,3 x 10<sup>-5</sup> M'da sabit tutulup Fe<sup>3+</sup> iyonunun konsantrasyonunun artırılması ile ligandın emisyon şiddetinde görülen azalmalar dikkate alındı. Elde edilen spektrumlar Şekil 3.17'de gösterildi. 375 nm'deki uyarma

sonucunda 503 nm'deki floresans şiddetleri ölçülerek demir konsantrasyonuna karşı  $F_0/F$  değerleri grafiğe geçirildi. Üç ölçüm yapılmıştır. Bu ölçümlerin standart sapması Tablo 3.3'de gösterildi.

Şekil 3.17' den görüldüğü gibi elde edilen eğrinin düşük demir konsantrasyonlarına karşılık gelen kısmı doğrusaldır ve beklendiği gibi kesim noktası yaklaşık 1'e eşittir. Doğrusal değişimin olduğu bu konsantrasyon aralığına ait grafik Şekil 3.18'de gösterilmiştir. Ancak yüksek metal konsantrasyonlarında Şekil 3.17' den görüldüğü gibi eğri doğrusallıktan pozitif sapma göstermektedir. Bu sonuç ligant ile  $Fe^{3+}$  iyonu arasındaki etkileşim sonucu gözlenen floresans sönümünün dinamik ve statik sönümün birarada olmasından kaynaklandığını göstermektedir. Literatürde buna benzer sonuçlara sıkça rastlanmıştır (Chaudhuri vd., 2011; Wei vd., 2014; Wang, 2009) Ayrıca sönümün bir temel hal metal-ligant kompleksinin etkili olduğu bir statik sönümün üzerinden mi yoksa uyarılmış hal sırasında oluşan bir kompleksin ışımasız olarak temel hale dönmesi üzerinden mi gerçekleştiğinin belirlenmesine yönelik çalışmaların yapıldığı literatürde görülmektedir (Şekil 1.7) (Behera, 1995). Ancak bu çalışmalardan  $K_{sv}$  ve  $K_a$  sabitlerinin doğru olarak tespiti büyük ölçüde floresans ömrü (lifetime) değerinin ölçülmesine bağlıdır. Yapılan çalışmada kullanılan spektrofloreometre ile ligandın floresans ömrü ölçme imkanı olmadığından statik sönüm mekanizması ayırt edilememiştir. Bununla birlikte dinamik sönüme eşlik eden statik sönümün mevcut olduğu floresans etkinliği üzerine sıcaklığın etkisinin incelenmesi ile de doğrulanmıştır.

Bunun için 298 K, 308 K, 323 K ve 333 K sıcaklıklarda kompleksleşme incelenmiştir. Şekil 3.19 sönüm etkinliği ( $F_0/F$ ) üzerine sıcaklığın etkisini göstermektedir. Şekil 3.19'da görüldüğü gibi 308 K'deki sönüm etkinliği 323 K'dekinden, 323 K'deki sönüm etkinliği ise 333 K'dekinden daha fazladır. Yani sıcaklığın artmasıyla sönüm etkinliği ( $F_0/F$ ) azalmıştır. Bu nedenle artan  $Fe^{3+}$  konsantrasyonu ile 503 nm'de ligandının floresans şiddetindeki sönümünde statik sönümün etkili olduğu söylenebilir. Bu sonuç ligant ile  $Fe^{3+}$  arasında bir temel hal kompleksi oluşumunu desteklemektedir.

Bu çalışmada demir tayininde kullanılmak üzere önerilen azaflavanon-3-ol bileşiğinin  $Fe^{3+}$  iyonu ile etkileşimi de ayrıntılı olarak incelenmiştir. Öncelikle metanol:su ortamında 1:1 bileşimine sahip bir kompleksin oluştuğu belirlenmiştir. Ligand ile  $Fe^{3+}$  iyonu arasındaki kompleksin kararlılık sabitinin hesaplanması için Denklem 3.7 eşitliği kullanılmıştır (Bourson, 1989). Bu eşitliğe göre  $1/[Fe^{3+}]$ 'nın,  $F_0/(F_0-F)$ 'ye karşı değişimi grafiğe geçirildiğinde doğrunun denklemi  $y=0,0003x+0,7408$  olarak elde edilmiştir (Şekil

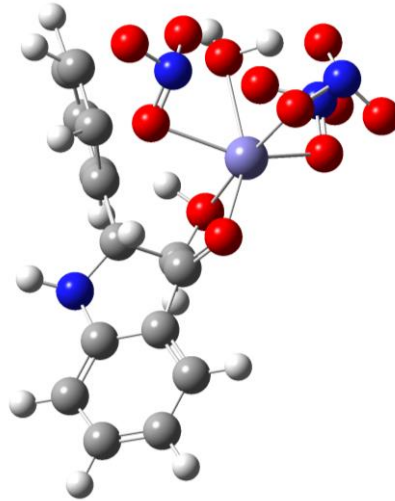
3.15). Şekil 3.15'te doğru denkleminin kesim noktası olan 0,7408 değeri eğimi olan 0,0003 değerine bölünüp logaritması alındığında log K değeri 3,40 olarak bulunmuştur.

Ligandın  $Fe^{3+}$  iyonu ile oluşturduğu kompleksin özellikleri hakkında ayrıntılı bilgi edinmek için katı faz halinde kompleks hazırlandı. Bunun için ekivalent miktardaki ( $2,6 \times 10^{-3}$  M)  $Fe^{3+}$  iyonunun sulu çözeltisi ile ligandın metanoldeki çözeltisi  $40\text{ }^{\circ}C$ 'de 1 saat karıştırıldı. Çözücü kuruluğa kadar evaporatörde uzaklaştırıldı ve kalıntı dietil eter ile muamele edildi. Dietileterde çözünmeyen katı kompleks süzüldü ve vakum etüvünde  $P_2O_5$  kurutuldu. Kompleksin IR spektrumu alındı ve ligandınki ile karşılaştırıldı. Ek 1 liganda ait IR spektrumunu göstermektedir. Ek 2 ise kompleksin IR spektrumunu göstermektedir. Ligandın IR spektrumunda gözlenen  $1665\text{ cm}^{-1}$ 'deki  $C=O$  grubunun gerilme titreşiminin şiddeti kompleksin IR spektrumunda zayıflamıştır ve  $1684\text{ cm}^{-1}$ 'e kaymıştır. Bu sonuç  $Fe^{3+}$  iyonunun ligandın karbonil grubu ile etkileştiğini gösterir. Ayrıca ligandın IR spektrumunda  $3415\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen OH grubuna ait gerilme titreşiminin yerine kompleksin IR spektrumunda geniş bir band görülmektedir. Bu bandın kompleksin yapısında bulunabilecek bir su molekülünden kaynaklandığı düşünülmektedir. Kompleksin IR spektrumu incelendiğinde  $1157-1533\text{ cm}^{-1}$  arasında gözlenen şiddetli pikler nitrat gruplarının varlığını göstermektedir.  $1231-1295$  ve  $1403-1533\text{ cm}^{-1}$ 'deki piklerin varlığı koordine olmuş yani kovalent bağlı nitrat gruplarının varlığını göstermektedir (Arora, 2009). Bu piklerin nitrat komplekslerindeki koordinasyona katılan nitrat iyonlarının varlığında gözlenen  $NO_2$  grubuna ait gerilme titreşimleri olduğu bildirilmektedir (Radhakrishnan, 2005). IR spektrumunda  $1380\text{ cm}^{-1}$ 'de absorpsiyon bandının gözlenmemesi koordine olmamış yani iyonik nitrat grubunun olmadığını göstermektedir. [Rama 2008]. Bu sonuçlar ligant ile  $Fe^{3+}$  iyonunun oluşturduğu komplekste sadece iç koordinasyon küresinde bağlı nitrat iyonlarının bulunduğunu göstermektedir. Bu düşüncenin doğrulanması için kompleksin iletkenlik ölçümleri gerçekleştirildi. Bunun için kompleksin  $2,6 \times 10^{-4}$  M dimetilformamidteki çözeltisi kullanıldı ve iletkenliğinin literatürde verilen yöntemle göre  $19\text{ ohm}^{-1}\text{ cm}^2\text{ mol}^{-1}$  olduğu belirlendi (Geary, 1971). Bu sonuç oluşan kompleksin non-elektrolit olduğunu yani iletken olmadığını gösterdi. Böylece IR spektrumundan ve iletkenlik ölçümlerinden kompleksin iyonik bağlı nitrat grubu içermediği tüm nitrat gruplarının iç koordinasyon küresinde bulunduğunu doğrulamaktadır.

Job metodu ile gösterilen 1:1'lik kompleks bileşimine sahip yapının oluştuğu baz alınarak IR spektroskopik ölçümleri ve iletkenlik ölçümleri sonuçları da dikkate



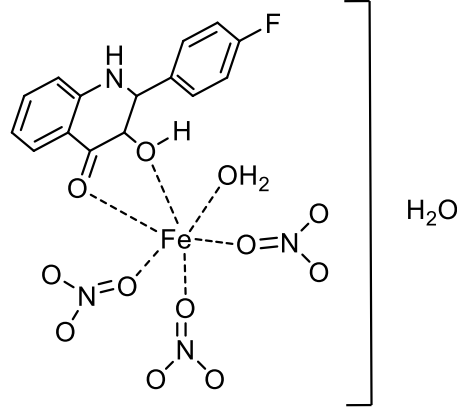
alındığında olası bazı koordinasyonlara ait teorik kararlılık hesaplamaları yapıldı. İlk adımda yapı yarı deneysel yöntem olan ZINDO1 yöntemiyle optimize edildi. Sonra elde edilen ham yapılar, DFT-B3LYP/6-31G(d) temel seti ile yeniden optimize edildi (Becke, 1993; Lee, 1988). Tüm hesaplamalar Gaussian 03 W programı ile gerçekleştirildi (Frisch, 2003). Hesaplamalarda, hata payını minimuma indirgeyen “tight converge” kriteri kullanıldı. Nitrat anyonlarının koordinasyonları ile birlikte; ligandın NH, karbonil, ve OH gruplarının kompleksleşmeye katılımını sağlayan muhtemel bağlanma modları için ve ligandın sadece karbonil grubu ile OH grubunun kompleksleşmeye katılımını sağlayan bağlanma modları için teorik kararlılık hesaplamaları yapıldı. Bahsedilen yöntemle, molekülleri tanımlayan bağ uzunlukları ve bağ açıları optimize edilerek, muhtemel yapılar içerisinde en kararlı olan yapı elde edildi. Hesaplamalar sonucunda, -254694.8750 kJ/mol enerji değeriyle oldukça kararlı olan yapının Şekil 4.1’de verilen yapı olduğu belirlendi.



Şekil 4.1. Teorik hesaplamalara göre ligandın  $Fe^{3+}$  ile oluşturduğu en kararlı yapı

Metalin, ligandın yapısındaki karbonil ve OH oksijeni ile etkileşerek oluşturduğu bidentat beş üyeli halka yapıya termodinamik kararlılık sağlamaktadır. Üç nitrat grubu monodentat tarzında bağlanırken bir su molekülü de koordinasyona katılarak oktahedral bir yapı oluşmaktadır (Şekil 4.1).

IR ve kütle spektroskopik verileri, iletkenlik ölçümleri ve teorik hesaplamaların sonuçlarına dayanarak ligandın  $Fe^{3+}$  iyonu ile oluşturduğu kompleks için Şekil 4.2’de gösterilen bağlanma modu önerilmiştir.



Şekil 4.2. Ligandın  $Fe^{3+}$  kompleksi için bağlanma modu

IR spektrumundan karar verilen kompleksin su içerdiği fikrini destekleyecek şekilde kütle spektrumunun incelenmesinden  $[LFe(NO_3)_3H_2O].H_2O$  kapalı formülüne uyan iyon 533  $[M-1]^+$  pikinin görülmesi yapının önerildiği şekilde olabileceğini göstermektedir. Yine kütle spektrumunda  $[LFe(NO_3)_3]$  koordinasyon bileşiğine ait 496  $[M-2]^+$  pikinin varlığı önerilen yapıyı destekler niteliktedir (Ek 3).

$Fe^{3+}$  iyonunun spektrofotometrik olarak tayinine yabancı iyonların etkisini tespit etmek için  $1,3 \times 10^{-5}$  M ligant ve ekivalent miktarda  $Fe^{3+}$  iyonu içeren çözeltilere uygun konsantrasyonda çeşitli yabancı iyonlar ilave edildi. Ligant: $Fe^{3+}$  (1:1) ve uygun konsantrasyonda yabancı iyon içeren çözeltilerin 503 nm’deki floresans şiddetleri ligant: $Fe^{3+}$  (1:1) çözeltisinin floresans şiddeti ile karşılaştırıldı. % 5’ten daha fazla farka sebep olmayan en yüksek yabancı iyon konsantrasyonu tolerans limiti olarak verildi (Tablo 3.1 ve 3.2). Tablo 3.1 ve 3.2’deki verilerden yüksek konsantrasyonlarda dahi birçok iyonun tayini önemli ölçüde etkilemediği anlaşıldı. Bu da önerilen metodun  $Fe^{3+}$  iyonu için seçimli olduğunu gösterir nitelikteydi.

Yöntemin analitik parametrelerinin verilebilmesi için % bağıl standart sapma (% BSS), gözlenebilme sınırı (GS) ve tayin sınırı (TS) değerleri hesaplandı. Bu metodun gözlenebilme sınırı, 11 adet tanık numunenin floresan şiddetlerinin standart sapmasının üç katının kalibrasyon grafiğinin eğimine oranı alınarak 0,81 mg/L bulundu. Tayin sınırı ise

gözlenebilme sınırının 3 katı alınarak 2,43 mg/L olarak hesaplandı.

Önerilen yöntemle sertifikalı referans materyaller, demir tabletleri, ıspanak, nane, dereotu, semizotu, roka kurufasülye, kırmızı mercimek numunelerinde  $Fe^{3+}$  iyonu analizlerine ait sonuçların % bağıl standart sapması, aynı gün içinde yapılan analizlerden elde edilen verilere göre 0,16-1,69 değerleri arasında, farklı günlerde yapılan analizlerden elde edilen verilere göre 0,41-1,71 değerleri arasında bulundu. Sonuçlar Tablo 3.6'da 3.8'de ve 3.10'da verildi. Bu sonuçlar metodun hem gün içi hem de günler arası kesinliğinin % 2,0'ın altında olduğunu gösterdi. Bu kesinlik değerinin istatistiksel olarak yeterince iyi olduğu söylenebilir.

Geliştirilen yöntemde,  $Fe^{3+}$ 'nın spektrofotometrik tayini için standart referans materyallere, demir ilacı tabletlerine ve gıda numunelere çözünürleştirmeden başka herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Bu durum yöntemin uygulamadaki kolaylığını gösteren bir diğer önemli noktadır. Oysaki Ragos vd.,'nin (1998), Asan vd.,'nin (2010) ve Mao vd.,'nin (2010) metotları gibi literatürde önerilen bazı metotlarda tayinden önce numuneye bazı iyileştirme işlemleri yapılması gerektiğinden bahsedilmektedir. Örneğin Ragos vd., (1998) 4-hidroksikinolin ile sığır karaciğerinde spektrofotometrik olarak  $Fe^{3+}$  iyonu tayininde metal katyonlarının bozucu etkisini maskeleyerek için potasyum florür ve trietilentetramin çözeltileri kullanmıştır. Literatürde bildirilen çalışmaların bazılarında analitin deriştirilmesi için bazı zenginleştirme işlemleri yapılmıştır. Asan vd., (2010) katyon değiştirme reçinesi içeren bir mini zenginleştirme kolonu kullanarak numuneyi zenginleştirmiş ve florimetrik olarak salisilik asit ile  $Fe^{3+}$  iyonunun tayini gerçekleştirmiştir. Mao vd, (2010) dolgu maddesi aktif karbon bağlı etilendiamin (AC-EDA) adsorbenti olan 50 mm x 9,0 mm boyutlarında bir PTFE kolon kullanılarak % 100 sulu sistemlerde rodamin esaslı floresans bir prob olan RC maddesi ile fizyolojik pH'da  $Fe^{3+}$  iyonu tayinini gerçekleştirmiştir. Böyle işlemler tayin süresünün uzamasına sebep olur. Oysaki bu çalışmada önerilen metotta her hangi bir zenginleştirme işlemi yapılmamıştır. Bu sayede tayin süresi uzamamıştır.

Bölüm 3.3'te detaylı bir şekilde anlatılan modifiye standart ekleme yönteminin uygulanması son derece kolaydır. Bu yöntemin uygulanmasında öncelikle eklenen sabit  $Fe^{3+}$  konsantrasyonu optimize edildi. Bunun için toprak-kum standart referans materyalinde ve Ferrum Fort isimli demir ilacı tableti numunelerinde 2,5 mg/kg'lik demir tayini farklı konsantrasyonda "sabit standart  $Fe^{3+}$ , ilaveleri yapılarak gerçekleştirildi. Bulunan sonuçlar % hata olarak değerlendirildi. Sabit standart konsantrasyonunun ve %

hata değerinin en d¼ş¼k olduğu değer metot uygulanırken kullanılacak olan “sabit Fe<sup>3+</sup> konsantrasyonu” olarak se¼ildi. Tablo 3.4’te gör¼ld¼ę¼ gibi bu konsantrasyon 1,0 mg/L olarak belirlendi.

Yöntemin doğruluğu ve ger¼ek numunelere uygulanabilirliği iki Şekilde belirlenmiştir. Bir analitik metodun sapmasını bulmak için en yaygın yol geliştirilen metodu bileŐimi doğru olarak bilinen bir numunenin analizinde kullanmaktır. Bu amaçla doğruluk testinin ilki olarak bu geliştirilen modifiye standart ekleme yöntemi toprak-kum standart referans materyaline (HPS, sany-soil CRM-SA-C) ve bitki standart referans materyaline (Polish CRM, Mixed Polish Herbs, INCT-MPH-2) uygulandı ve sonu¼lar % 95 güven seviyesinde öğrenci t-tesisi ile değerlendirildi. Öğrenci t-tesiti,  $X_R - X_{ort}$  farkı se¼ilen bir olasılık seviyesi için  $(ts/\sqrt{N})$  kritik değerinden önemli oranda büyükse farkın sistematik hatadan kaynaklandığını belirtir (Skoog, 1991). Sertifikalı doğru değer ile ölç¼len sonu¼ların (N=3) ortalaması arasındaki farkın  $(X_R - X_{ort})$  %95 güven seviyesi için hesaplanan kritik değerden  $(ts/\sqrt{N})$  küçük olması yöntemin analiz sonu¼ları ile sertifikalı değerlerden beklenen sonu¼ların istatistik olarak aynı olduğu göstermektedir. Bu sonu¼lar gözlenen farkların rastgele hatadan kaynaklandığını, metodun sistematik hatasının olmadığını ortaya koymaktadır (Tablo 3.5).

Doğruluğun tespitinin ikinci Őekli ise bilinen standart metotlarla analizdir. Bunun için ger¼ek numuneler kullanılmıştır. Demir ila¼ları, ıspanak, nane, dereotu, semizotu, roka, kuru fasulye ve kırmızı mercimek numuneleri bilinen standart metotlarla akredite laboratuvarlarda analiz ettirildi ve bu laboratuvardan alınan sonu¼lar bu tezde önerilen yöntemden elde edilen sonu¼larla karşılaştırıldı. Öğrenci t-tesiti (student’s t-test) uygulandığında sonu¼ların istatistiksel olarak aynı olduğu gör¼ld¼ (Tablo 3.7 ve 3.9). Tablo 3.5, 3.7 ve 3.9’da gör¼ld¼ę¼ gibi akredite laboratuvardan alınan değer ile önerilen metotla elde edilen değerlerin ortalaması arasındaki fark olan  $X_R - X_{ort}$  değeri %95 güven seviyesi için hesaplanan kritik değer olan  $ts/\sqrt{N}$  değerinden küç¼ktür. Önerilen metotla yapılan ölç¼m sayısı N=3’tür.

Fe<sup>3+</sup> iyonu tayini için az sayıda spektrofotometrik yöntem literatürde bulunmaktadır (Cha vd., 1996; Jung vd., 2010; Zhang vd., 2010; Lee vd., 2014; Feng vd., 2007; Wei vd., 2014; Liping, vd., 2008). Cha vd.,’nin (1996), Wei vd.,’nin (2014) ve Liping vd.,’nin (2008) geliştirdiği metotlarda ise gözlenebilme sınırı 0,04 mg/L’nin altındadır. Bazı araştırmacılar önerdikleri metotlar için gözlenebilme sınırını belirtmemiŐlerdir (Lee vd., (2014). Jung vd.,’nin (2010) önerdiği metodun gözlenebilme sınırı yaklaşık 2 mg/L’dir.

Ancak yapılan çalışmada gözlenebilme sınırına dair bir bilgiye rastlanmamıştır. Bir başka spektrofotometrik metotta gözlenebilme sınırı 0,4 µg/L (Zhang vd., 2010). Siklo dekstrin içeren bir başka floresent ligant demir tayini için önerilmiştir ve bu metodun gözlenebilme sınırı ise 1 µg/L olarak belirtilmiştir (Feng vd., 2007). Bununla birlikte önerilen metodun gerçek numunelere uygulanmasıyla ilgili bir bilgi verilmemiştir.

Literatürdeki az sayıdaki spektrofotometrik demir tayini yöntemlerinin gözlenebilme sınırları önerilen çalışmadakinden düşüktür (Cha vd., 1998; Sayour vd., 2011). Bununla birlikte tayinde kullandıkları bileşikler (salisilik asit ve 1-naftol-2-sulfonattın potasyum tuzu) doğal bileşikler olmayıp toksik özellikleri olabilecek olan bileşiklerdir. Önerilen metotta Fe<sup>3+</sup> iyonu tayini için kullanılan aza-flavanon-3-ol türevi olan bileşik biyolojik etkinlikleri oldukça yüksek olan flavonoid bileşiklerindedir. Flavonoid bileşikler antioksidan özellikleri ile de tanınırlar. Bu yüzden çevresel kirlilik ve insan sağlığı açısından önerilen ligandın bir toksik etkisinin olmayacağı düşünülmektedir. Bileşik literatüre yeni kazandırılan bir bileşik olduğundan henüz biyolojik aktivitesi hakkında kesin bir bilgi mevcut değildir. Bununla birlikte kullanılan ligandın yapısına benzer yapıdaki 2-aril-4-kinolonlar ve 2-aril-3-hidroksi-2,3-dihidro-4-kinolonlar yumurtalıklarda antikanser aktivitesi göstermeleri ve fare ömründe % 13'lük bir artışa sebep olmaları gibi dikkat çekici biyolojik özellikler göstermişlerdir (Li vd., 1994).

Lin vd., (2009) bir fenantroimidazol türevi kullanarak kaynak, musluk ve nehir sularında florimetrik Fe<sup>3+</sup> tayini için geri kazanımın çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmanın tayin aralığı oldukça dardır (0,6-8,4 mg/L). Halbuki önerilen çalışmada tayin aralığı daha geniştir (2,43-21,61 mg/L). Bir başka çalışmada bir membran hazırlanmıştır ve bu membran çalışılan sistem entegre edilmiştir ve metodun tayin aralığı 0,04-7,8 mg/L olarak verilmiştir. Ancak yöntem sadece bazı vitamin ilaçlarında uygulanmıştır (Zhang vd., 2010). Görüldüğü gibi literatürde bazı önerilen spektrofotometrik demir tayini metotları belli bazı matriksler için uygulanmıştır (Cha vd., 1998; Sayour vd., 2011; Lin vd., 2009; Zhang vd., 2007) Bunlar genellikle su ve ilaçlardır. Önerilen çalışmada ise farklı özellikte numune matriksleri için tayinler yapılmıştır. Bunlar gıda, ilaç, toprak ve su matriksleridir.

Bu çalışmada geliştirilen metot çok fazla kimyasal maddeye ihtiyaç göstermemektedir. Sentezi basit ve % 89 gibi yüksek bir verimle literatüre göre sentezlenen ligant kullanılmaktadır. Literatürdeki metotların bir çoğu maskeleyme, membran hazırlanması gibi işlemler için fazladan kimyasalların kullanılmasını gerektirir (Ragos vd., 1998; Shamsipur vd., 2013). Sonuç olarak önemli bir antioksidan potansiyele

sahip olabilecek ve sağlık açısından tehlike oluşturmayacak bir flavonoid tur bileşik kullanılarak demir tayini için uygulaması kolay, deney suresi kısa, hassasiyeti yuksek, masrafsız, uçucu organik çözücüler ve matrikste n deriştirme ve ekstraksiyon gibi işlemler gerektirmeyen bir spektroflorimetrik demir tayini yöntemi geliştirilmiştir.

## 5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, demir için spesifik olan, herhangi bir zenginleştirme işlemi gerektirmeyen ve direkt numune çözeltisinde spektrofotometrik olarak demir tayininde kullanılmak üzere yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemin esası, metanol:su ortamında azaflavanon-3-ol ligandı ile  $Fe^{3+}$  iyonu arasında oluşan 1:1 kompleksinin 375 nm'de uyarılmasıyla 503 nm'de gerçekleşen floresans sönümüne dayanmaktadır.

Yapılan literatür çalışmasında flavonoid bileşiklerin analitik amaçlı reaktif olarak kullanılmasıyla metal tayinlerinin gerçekleştirildiği uygulamalara rastlanmamıştır. Bu nedenle bir flavonoid türü bileşik olan 2-(4-florofenil)-3-hidroksi-2,3-dihidrokinolin-4(1H)-on bileşiği kullanılarak basit ve hızlı bir demir tayini metodunun geliştirilmesi açısından özgündür.

Önerilen modifiye standart ekleme yöntemi de literatürde bilinen standart ekleme yönteminin geliştirilmesiyle uygulanmıştır. Böyle bir standart ekleme yönteminin açıklandığı benzer bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Yöntemin uygulaması son derece pratik ve hızlıdır. Floresans çözeltilerin 1-2 dak. içerisinde kararlılığa ulaşmaları tayinin kısa süre içerisinde gerçekleştirilmesini sağlamaktadır. Yöntemin ligant,  $Fe(NO_3)_3$  standardı, tampon ve metanol çözücüsü dışında her hangi bir reaktif gerektirmemesi ve spektrofotometrik ölçüme dayanması ekonomik olduğunun bir kanıtıdır.

## 6. KAYNAKLAR

- Ahmed, N., Kumar, H. ve Babu, B. V., 2013. Intramolecular Aminolysis of 2'-Aminochoalcone Epoxides Using  $\text{InBr}_3$  or  $\text{BiCl}_3$  as Efficient Catalysts, Taylor & Francis Group, 43, 567–581.
- Al-Kady, A. S., Gaber, M., Hussein, M. M. ve Ebeid, El-Z., 2011. Structural and Fluorescence Quenching Characterization of Hematite Nanoparticles, Spect. Chim. Act. Part A: Mol. and Biomol. Spect., 83, 398-405
- Andersen, J. E. T., 2005. A Novel Method for the Filterless Preconcentration of Iron, Analyst, 130, 385–390.
- Arif, R., Küpeli, E. ve Ergun F., 2004. The Biological Activity of Centaurea L. Species, Journal of Science, 17, 149-164.
- Arora, K., Sharma, M. ve Sharma, K.P., 2009. Studies of Some Lanthanide (III) Nitrate Complexes of Schiff Base Ligands, E-J. Chem., 6, 201-210.
- Asan, A., Andac, M. ve Işıldak, I., 2010. Flow Injection Spectrofluorimetric Determination of Iron (III) in Water Using Salicylic Acid, Chem. Pap., 64, 424-428.
- Atkins, P., W., 2010. Physical Chemistry, Oxford University Press, New York, 992 s.
- Balasundram, N., Sundram, K. ve Saman, S., 2006. Phenolic Compounds in Plants Agri-Industrial by Products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses, Food Chemistry, 99, 191-203.
- Bargossi, C., Fiorini, M. C., Montalti, M., Prodi, L. ve Zaccheroni, N., 2000. Recent Developments in Transition Metal Ion Detection by Luminescent Chemosensors, Coord. Chem. Rev., 208, 1, 17-32.
- Becke, A. D., 1993. Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange, J. Chem. Phys., 98, 5648-5652.
- Beer, P. D., Gale, P. A. ve Smith, D. K., 1999. Supramolecular Chemistry, Oxford University Press, New York, 92 s.
- Behera, P. K., Mukherjee, T. ve Mishra A. K. 1995. Simultaneous Presence of Static and Dynamic Component in the Fluorescence Quenching for Substituted Naphthalene -  $\text{CCl}_4$  System, J. Lumin., 65, 131-136.
- Berg, C. M. G., 2006. Chemical Speciation of Iron in Seawater by Cathodic Stripping Voltammetry with Dihydroxynaphthalene, Analytical Chemistry, 78, 156–163.
- Bertini, I., Gray, H. B., Stiefel, E. I. ve Valentine, J. S., 2007. Biological Inorganic Chemistry, University Science Book, California, 1432 s.



- Birman, H., 2012. Bioactivities of Plant Flavonoids and The Possible Action Mechanisms, J. Ist. Faculty Med., 75, 46-49.
- Bonda, D. J., Lee, H., Blair, J. A., Zhu, X., Perryab, G. ve Smith, M. A., 2011. Role of Metal Dyshomeostasis in Alzheimer's Disease, Metallomics, 3, 267–270.
- Bors W, Heller W, Michel C. ve Saran M., 1990. Flavonoid as Antioxidants: Determination of Radical-Scavenging Efficiencies, Methods in Enzimology, 186, 343-355.
- Bourson, J. ve Valeur B., 1989. Ion-responsive Fluorescent Compounds. 2. Cation-steered Intramolecular Charge Transfer in a Crowned Merocyanine, J. Phys. Chem., 93, 3871-3876.
- Burdo, J. R. ve Connor, J. R., 2003. Brain Iron Uptake and Homeostatic Mechanisms: An Overview, BioMetals, 16, 63–75.
- Casanueva-Marenco M. J., Fowley, C., Hyland, B. W., Hamilton, G. R. C., Galindo-Riano, D. ve Callan, J. F., 2012. A New Use for an Old Molecule:N-Phenyl-2-(2-Hydroxynaphthalenylmethylene) Hydrazinecarbothioamide as a Ratiometric 'Off-On' Fluorescent Probe for Iron, Tetrahedron Lett., 53, 670–673.
- Castillo Busto, M. E., Montes-Bayon, M., Blanco-Gonzalez, E., Meija, J. ve Sanz- Medel, A., 2005. Strategies to Study Human Serum Transferrin Isoforms Using Integrated Liquid Chromatography ICPMS, MALDI-TOF, and ESI-Q-TOF Detection: Application to Chronic Alcohol Abuse, Analytical Chemistry, 77, 5615–5621.
- Cha. K. W. ve Park. C. I., 1996. Spectrofluorimetric Determination of Iron(III) with 2-Pyridinecarbaldehyde-5-Nitro-Pyridylhydrazone in the Presence of Hexadecyltrimethylammonium Bromide Surfactant, Talanta, 43, 1335-1340.
- Cha, K. W. ve Park, K. W., 1998. Determination of Iron (III) with Salicylic Acid by the Fluorescence Quenching Method, Talanta, 46, 1567-1571.
- Chai, M., Zhang, D., Wang, M., Hong, H., Ye, Y. ve Zhao, Y., 2012. Four Rhodamine B-Based Fluorescent Chemosensor for Fe<sup>3+</sup> in Aqueous Solution, Sensors and Actuators B, 174 231-236.
- Chakraborty, S., Chaudhuri, S., Pahari, B., Taylor, J., Sengupta, P.K. ve Sengupta B., 2012. A Critical Study on the Interactions of Hesperitin with Human Hemoglobin: Fluorescence Spectroscopic and Molecular Modeling Approach, J. Lumin., 132, 1522-1528.
- Chaudhuri, S., Banerjee, A., Basu, K., Sengupta, B. ve Sengupta P.K., 2007. Interaction of Flavonoids with Red Blood Cell Membrane Lipids and Proteins: Antioxidant and Antihemolytic Effects, Int. J. of Biol. Macromol., 41, 42-48.
- Chaudhuri, S., Chakraborty, S. ve Sengupta P. K., 2011. Probing the Interactions of Hemoglobin with Antioxidant Flavonoids via Fluorescence Spectroscopy and Molecular Modeling Studies, Biophysical Chemistry, 154, 26-34.

- Chereddy, N. R., Suman, K., Korrapati, P. S., Thennarasu, S. ve Mandal, A. B., 2012. Design and Synthesis of Rhodamine Based Chemosensors for the Detection of Fe<sup>3+</sup> Ions, Dyes and Pigments, 95, 606-613.
- Cowan, J. A., 1997. Inorganic Biochemistry: An Introduction, Wiley-VCH, New York, 456 s.
- Çınar, Z., 1994. Kuantum Kimyası, Çağlayan Kitap Evi, İstanbul, 210 s.
- De Silva, A. P., Gunaratne, H.Q.N., Gunnlaugsson, T., Huxley, A.J.M., Rademacher, J.T. ve Rice, T.E., 1997. Chemosensors for Ion and Molecule Recognition, Kluwer Academic Publishers, New York, 147 s.
- Denton, M., 2002. Nature's Destiny, Free Press, New York, 480 s.
- Deveoğlu, O. ve Karadağ R., 2011. Genel Bir Bakış: Doğal Boyar Maddeler, Fen Bilimleri Dergisi, 23, 21-32.
- Du, Q., Zheng, J. ve Xu, Y., 2008. Composition of Anthocyanins in Mulberry and Their Antioxidant Activity, Journal of Food Composition and Analysis, 21, 390-395.
- Du, Y., Chen, M., Zhang, Y., Luo, F., He, C., Li, M. ve Chen, X., 2013. Determination of Iron(III) Based on the Fluorescence Quenching of Rhodamine B Derivative, Talanta, 106, 261-265.
- Ertuş Söğüt, Ö. ve Kayalı, A., 2005. Analitik Yöntem Geçerliliğine Genel Bir Bakış, Ankara Ecz. Fak. Derg., 34, 41 – 57.
- Espada-Bellido, E., Galindo-Riaño, M. D., García-Vargas, M. ve Narayanaswamy, R., 2010. Selective Chemosensor for Copper Ions Based on Fluorescence Quenching of a Schiff-Base Fluorophore, Appl. Spect., 64, 7, 727-732.
- Feng, L., Chen, Z. ve Wang, D., 2007. Selective Sensing of Fe<sup>3+</sup> Based on Fluorescence Quenching by 2,6-Bis(benzoxazolyl)pyridine with  $\beta$ -Cyclodextrin in Neutral Aqueous Solution, Spectrochim. Acta Part A, 66, 599-603.
- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G.E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Montgomery, J. A., Vreven, T., Kudin, K. N., Burant, J. C., Millam, J. M., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Barone, V., Mennucci, B., Cossi, M., Scalmani, G., Rega, N., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Akajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Klene, M., Li, X., Knox, E. J., Hratchian, H. P., Cross, J. B., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Ayala, P. Y., Morokuma, K., Voth, G. A., Salvadr, P., Dannenberg, J. J., Zakrzewski, V. G., Dappich, S., Daniels, A. D., Strain, M. C., Farkas, C., Malick, D. K., Rabuck, A. D., Raghavachari, K., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cui, Q., Baboul, A. G., Clifford, S., Cioslowski, J., Stefanov, B. B., Liu, G., Liashenko, A., Piskorz, P., Komaromi, I., Martin, R. L., Fox, D. J., Keith, T., Al-Laham, M. A., Peng, C. Y., Nanayakkara, A., Challacombe, M., Gill, P. M. W., Johnson, B., Chen, W., Wong, M. W., Gonzalez, C., Pople, J. A., Gaussian-03 C.02, Gaussian, Inc, Pittsburg, PA, 2003.

- Gang, D., Gao-Wa, A. ve Pu, G., 2004. Determination of Iron (III) in Chinese Herbal Medicine and Tea Based on Fluorescence Quenching of 2,4-Dichlo-Phenyfluorone, Guang pu, 24, 848-850.
- Gawley, R. E., Mao, H., Haque, M. M., Thome, J. B. ve Pharr, J. S., 2007. Visible Fluorescence Chemosensor for Saxitoxin, J. Org. Chem., 72, 2187-2191.
- Geary, W.J., 1971. The Use of Conductivity Measurements in Organic Solvents for the Characterisation of Coordination Compounds, Coord. Chem. Rew., 7, 81-122.
- Granados, E. H., Maldonado, L. ve Wacker, A., 2009. Cook Synthesis of Isoflavones: Formononetine, Tetrahedron Letters, 50, 1542-1545.
- Gutzeit, H.O., Henker, Y., Kind, B. ve Franz A., 2004. Specific Interactions of Quercetin and Other Flavonoids with Target Proteins are Revealed by Elicited Fluorescence, Biochem. and Biophys. Research Commun., 318,490-495.
- Gündüz, T., 2002. İnrümentel Analiz, Altıncı Baskı, Gazi Kitap Evi Tic. Ltd. Şti, Ankara, 1357 s.
- Haas, J. D. ve Brownlie, T., 2001. Iron Deficiency and Reduced Work Capacity: a Critical Review of the Research to Determine a Causal Relationship, J. Nutr., 131, 676–688.
- Harbone J. B., Marby T. J. ve Marby H., 1982. The Flavonoids, Chapman and Hall, London, 82 s.
- Harris, D. C., 1995. Quantitative Chemical Analysis, W. H. Freeman, New York, 750 s.
- Hu, Y. J., Yue, H. L., Li, X. L., Zhang, S. S., Tang, E. ve Zhang, L. P., 2012. Molecular Spectroscopic Studies on the Interaction of Morin with Bovine Serum Albumin, J. Photochem. and Photobiol. B: Biology, 112, 16-22.
- Huang, H., Liu, F., Chen, S., Zhao, Q., Liao, B., Long, Y., Zheng, Y. ve Xia, X., 2013. Enhanced Fluorescence of Chitosan Based on Size Change of Micelles and Application to Directly Selective Detection Fe<sup>3+</sup> in Human Serum, Biosensors and Bioelectronics, 42, 539-544.
- Jayabharathi, J., Thanikachalam, V., Sathishkumar, R. ve Jayamoorthy K., 2012. Fluorescence Investigation of the Interaction of 2-(4-Fluorophenyl)-1-Phenyl-1H-Phenanthro [9,10-D] Imidazole with Bovine Serum Albumin, J. Photochem. and Photobiol. B: Biology, 117, 222-227.
- Job, P., 1928. Formation and Stability of Inorganic Complexes in Solution, Annali di Chimica Applicata, 9, 113-203.
- Jung, H. J., Singh N., Lee, D. Y. ve Jang, D. O., 2010. Single Sensor For Multiple Analytes: Chromogenic Detection of I- and Fluorescent Detection of Fe<sup>3+</sup>, Tetrahedron Letters, 51, 3962–3965.

- Kaewsuya, P., Danielson, N.D. ve Ekhterae, D., 2007. Fluorescent Determination of Cardiolipin Using 10-N-Nonyl Acridine Orange, Anal. Bioanal. Chem., 387, 2775–2782.
- Kahraman, A., Koken, T. ve Serteser, M., 2002. Flavonoidler, The Medical Journal of Kocatepe, 3, 1-8.
- Kaul, T. N., Middleton, E. ve Ogra, P. L., 1985. Antiviral Effect of Flavonoids on Human Viruses, J. Med. Virol., 15, 71–79.
- Lakowicz, J. R., 1983. Principle of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, New York, 256 s.
- Lakowicz, J. R., 2002. Topics in Fluorescence Spectroscopy, Volume 2: Principles, Kluwer Academic publishers, New York, 449 s.
- Lakowicz, J. R., 2007. Principles of Fluorescence Spektroskopy, Springer Science+Business Media, 980 s.
- Lee, C., Yang, W. ve Parr, R. G., 1988 Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron Density, Phys. Rev. B, 37, 785-789
- Lee, D.Y., Singh, N. ve Jang, O, D., 2014. Fine Tuning of a Solvatochromic Fluorophore for Selective Determination of Fe<sup>3+</sup>: A New Type of Benzimidazole-Based Anthracene-Coupled Receptor, Fuel, 117, 520-527.
- Li, L., Wang, H. K., Kuo, S. C., Wu, T. S., Lednicer, D., Lin, C., Hamel, E. ve Lee, K. H., 1994. Antitumor Agents 155: Synthesis and Biological Evaluation of 3',6,7-Substituted 2-Phenyl-4-Quinolones as Antimicrotubule Agents, J. Med. Chem., 37, 3400-3407.
- Lin, W., Long, L., Yuan L., Cao, Z. ve Feng, J., 2009. A Novel Ratiometric Fluorescent Fe<sup>3+</sup> Sensor Based on a Phenanthroimidazole Chromophore, Anal. Chim. Acta, 634, 262–266.
- Liping, L., Zaihui, D., Jiaoliang, W. ve Qingjiao, L., 2008. Determination of Fe (III) by Cerradine Fluorescence Quenching Method, Huagong Huanbao, 28, 549-552.
- Liu, S. R. ve Wu, S. P., 2012. New Water-Soluble Highly Selective Fluorescent Chemosensor for Fe (III) Ions and Its Application to Living Cell Imaging, Sensors and Actuators B, 171– 172, 1110– 1116.
- Lohani, C. R. ve Lee, K. H., 2010. The Effect of Absorbance of Fe<sup>3+</sup> on the Detection of Fe<sup>3+</sup> by Fluorescent Chemical Sensors, Sensors and Actuators B, 143, 649–654.
- Long, L., Deng, Z., Wang, J. ve Luo, Q., 2008. Determination of Fe<sup>3+</sup> by Cerradine Fluorescence Quenching Method, Huagong Huanbao, 28, 549-552.

- Luo, W., Ma, Y. M., Quinn, P. J., Hider, R.C. ve Liu, Z. D., 2004. Design, Synthesis and Properties of Novel Iron (III)-Specific Fluorescent Probes, J. Pharm Pharmacol, 56, 529–536.
- Malone, R.M.R., 2007. Bio İnorganic Chemistry - A Short Course, 2. Baskı, John Wiley and Sons, New Jersey, 544 s.
- Mao, J., He, Q. ve Liu, W., 2010. An Rhodamine-Based Fluorescence Probe for Iron (III) Ion Determination in Aqueous Solution, Talanta, 80, 2093–2098.
- Martinez-Manez, R. ve Sancenón, F., 2003. Fluorogenic and Chromogenic Chemosensors and Reagents for Anions, Chem. Rev., 103, 4419-4476.
- Meng, W., Long, L. P., Pu, Y. Y., Xiao, N. L. ve Xie, D., 2012. Study on the Determination Iron (III) Based on Fluorescence Quenching of Chlorogenic Acid, Ziran Kexueban, 21, 65-68.
- Meral, R., Doğan, İ. S. ve Kanberoğlu, G. S., 2012. Fonksiyonel Gıda Bileşeni Olarak Antioksidanlar, Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech., 2, 45-50.
- Mizuike, A., 1983. Enrichment Techniques for Inorganic Trace Analysis, Springer-Verlag, New York, 144 s.
- Pithadia, A. S. ve Lee, M. H., 2012. Metal-Associated Amyloid Species in Alzheimer's Disease, Current Opinion in Chemical Biology, 16, 67–73.
- Pomazal, K., Prohaska, C., Steffan, I., Reich, G. ve Huber, J. F. K., 1999. Determination Of Cu, Fe, Mn, and Zn in Blood Fractions By SEC–HPLC–ICP–AES Coupling, Analyst 124, 657–663.
- Prodi, L., Bolletta, F., Montalti, M. ve Zaccheroni, N., 2000. Luminescent Chemosensors for Transition Metal Ions, Coord. Chem. Rev., 205, 1, 59-83.
- Radhakrishnan, P. K. ve Raju, K. C., 2005. Complexes of Iron(III) with 1,2-Dihydro-1,5-Dimethyl-2-Phenyl-4-Formyl(Benzhydrazide)-3h-Pyrazol-3-One, Ind. J. Chem., 44, 1812-1816.
- Ragos, G. C., Demertzis, M. A. ve Issopoulos, P. B., 1998. A High-Sensitive Spectrofluorimetric Method for the Determination of Micromolar Concentrations of Iron(III) in Bovine Liver with 4-Hydroxyquinoline, Il Farmaco, 53, 611-616.
- Rama Krishna Reddy, K., Sunuetha, P., Karigar, C. S., Manjunath, N. H., Mahendra, K. N., 2008. Cobalt (II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II), Hg(II), UO<sub>2</sub>(VI) and Th(IV) Complexes from Schiff Base Ligand, J.Chil.Chem. Soc., 53, 1653-1657.
- Redy, A., Thipperudrappa, J., Biradar, D. S., Lagare, M. T. ve Hanagodimath, S. M., 2004. Fluorescence Quenching of Anthracene by Aniline in Different Solvents, Ind. J. Pur. Appl. Phys., 42, 648-652
- Rice-Evans, C., 1999. Screening of Phenolics and Flavonoids for Antioxidant Activity. in: Antioxidant Food Supplements in Human Health. Academic Press, 511 s.

- Rodrigues, S. S. M., Lima, A. S., Teixeira, L. S. G. ve Korn, M. G. A., 2014. Determination of Iron in Biodiesel Based on Fluorescence Quenching of Cdte Quantum Dots, Fuel, 117, 520-527.
- Sayour, H. E. M., Razek, T. M. A. ve Fadel K. F., 2011. Flow Injection Spectrofluorimetric Determination of Iron Industrial Effluents Based on Fluorescence Quenching of 1-Naphthol-2-Sulfonate, Journal of Fluorescence, 21, 1385-1391.
- Senthilnithy, R., De-Costa, M. D. P., Gunawardhana, H. D., 2008. Fluorescence Quenching and Bonding Properties of Some Hydroxamic Acid Derivatives By Iron(III) and Manganese (II), Luminescence, 24, 203–208.
- Shamsipur, M., Sadeghi, M., Garau, A. ve Lippolis, V., 2013. An Efficient and Selective Fluorescent Chemical Sensor Based on 5-(8-Hydroxy-2-Quinolinylmethyl)-2,8-Ditiha-5-Aza-2,6-Pyridinophane as a New Fluoroionophore for Determination of Ion (III) Ions. A Novel Probe for Iron Speciation, Anal. Chim. Act., 761, 169-177.
- Singh, N., Kaur, N., Dunn, J., MacKay, M. ve Callan, J.F., 2009. A New Fluorescent Chemosensor for Iron (III) Based on the Aminobisulfonate receptor, Tetrahedron Lett., 50, 953–956.
- Sivaraman, G., Sathiyaraja, V. ve Chellappa, D., 2014. Turn-on Fluorogenic And Chromogenic Detection of Fe<sup>3+</sup> and its Application in Living Cell Imaging, Journal of Luminescence, 145, 480–485.
- Skoog, W. H., 1991. Analitik Kimya Temelleri, birinci cilt, Bilim yayıncılık, Ankara, 496 s.
- Smrkolj, P., Pograjc, L., Hlastan-Ribi, C. ve Stibilj, V., 2005. Selenium Content in Selected Slovenian Food Stuff sand Estimated Daily Intakes of Selenium, Food Chemistry, 90, 691-697.
- Snijman, P. W., Swanevelder, S., Joubert, E., Gren, I. R. ve Gelderblom, W. C. A., 2007. The Antimutagenic Activity of the Major Flavonoids of Rooibos (Aspalathus Linearis): Some Dose–Response Effects on Mutagen Activation–Flavonoid Interactions, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 631, 111-123.
- Stavric, B., 1994. Role of Chemopreventers in Human Diet, Clin. Biochem., 27, 319-332.
- Stavric B., 1994. Quercetin in Our Diet: From Potent Mutagen to Probable Anticarcinogen, Clin. Biochem, 27, 245-248.
- Sun, Y., Bi, S., Song, D., Qioa, C., Mu, D., ve Zhang, H., 2008. Study on the Interaction Mechanism Between DNA and the Main Active Component in Scutellaria Baicalensis Georgi, Sensors and Actuator B, 129, 799-810.
- Tavallali, H. ve Najabat, R., 2010. Effect of Surfactant on Spectrofluorimetric Determination of Fe<sup>3+</sup>, Asian Journal of Chemistry, 22, 6663-6668.

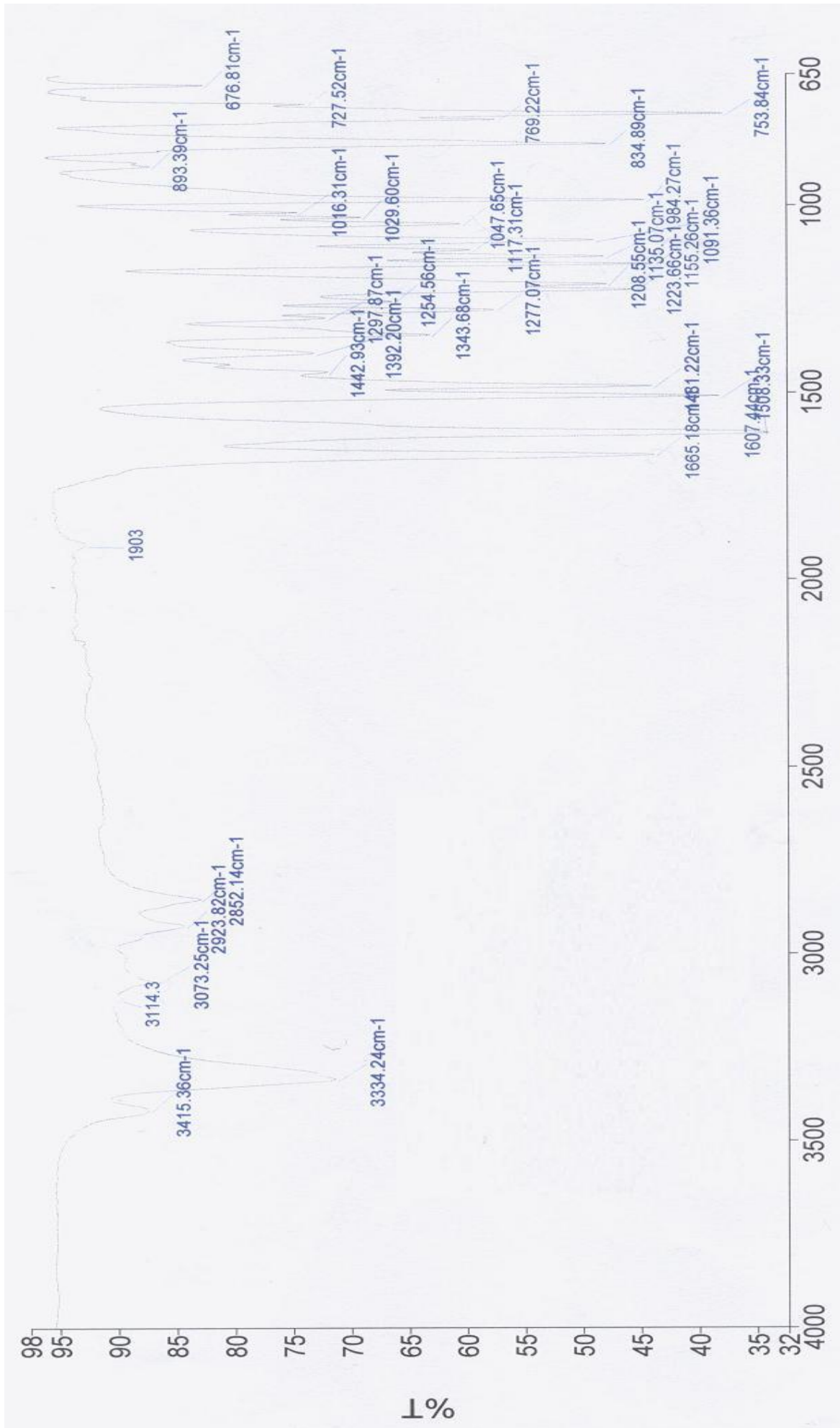
- Tokalioğlu, Ő. ve Ayhanöz H., 2011. Use of Cu(II) and Fe (III) N-Benzoyl-N-Phenylhydroxylamine Coprecipitants for Preconcentration of Some Trace Metal Ions in Food Samples, Food Chemistry, 127, 359–363.
- Tokalioğlu, Ő. ve Yıldız, S., 2009. A Comparative Study on the Preconcentration of Some Metal Ions in Water Samples With Cu(II) And Ni(II) Salicylaldehyde Coprecipitants, Microchimica Acta, 165, 129-133.
- Turro, N. J., 1978. Modern Molecular Photochemistry, Benjamin/Cummings Publishing Company, New York, 286 s.
- URL-1, <http://www.moleculardevices.com/pages/instruments/gemini.html>. 05.01.2014.
- Valeur, B. ve Leray, I., 2000. Design Principle of Fluorescent Molecular Sensors For Cation Recognition, Coordination Chemistry Reviews, 205, 3-40.
- Valeur, B. ve Berberan-Santos, M. N., 2002. Molecular Fluorescence Principles and Applications, Wiley-VCH, 2. Baskı, Weinheim, 381 s.
- Vazgeçer, B., Ulu, H. ve Öztan, A., 2005. Et ve Et Ürünlerinde Baharatın Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivitesi, Gıda, 30, 75-81.
- Wang, M., Wang, J., Xue, W. ve Wu, A., 2013. A Benzimidazole-Based Ratiometric Fluorescent Sensor For Cr<sup>3+</sup> And Fe<sup>3+</sup> in Aqueous Solution, Dyes and Pigments, 97, 475-480.
- Wang, Y., Lu, J., Tong, Z. ve Huang, H., 2009. A Fluorescence Quenching Method for Determination of Copper Ions with CdTe Quantum Dots, J. Chil. Chem. Soc., 54, 274-277.
- Wang, Y. Q., Zhang, H., M., Zhang, G. C., Tao, W. H. ve Tang S. H., 2007. Interaction of the Flavonoid Hesperidin with Bovine Serum Albumin: A Fluorescence Quenching Study, Journal of Luminescence, 126, 211-218.
- Wei, J., Jin, F., Wu, Q., Jiang, Y., Gao, D. ve Liu, H., 2014. Molecular Interaction Study Of Flavonoid Derivative 3d with Human Serum Albumin Using Multispectroscopic and Molecular Modeling Approach, Talanta, 126, 116–121.
- Xu, J. H., Hou, Y. M., Ma, Q. J., Wu, X. F. ve Wei, X. J., 2013. A Highly Selective Fluorescent Sensor for Fe<sup>3+</sup> Based on Covalently Immobilized Derivative of Naphthalimide, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 112, 116-124.
- Yılmaz, B. 1999. Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi, Özel basım, Ankara, 562 s.
- Yi, C., Tian, W., Song, B., Zheng, Y., Qi, Z., Qi, Q. ve Sun, Y., 2013. A New Turn-Off Fluorescent Chemosensor for Iron (III) Based on New Dipenylfluorenes with Phosponic Acid, Journal of Luminescence, 141, 15-22.

- Zhang, M., Zheng, B., Yuan H. ve Xiao D., 2010. A Spectrofluorimetric Sensor Based on Grape Skin Tissue for Determination of Iron (III), Bull. Chem. Soc. Ethiop, 24, 31-37.
- Zhang, X-B., Cheng, G., Zhang, W-J., Shen, G-L. ve Yu R-Q., 2007. A Fluorescence Chemical Sensor for Fe<sup>3+</sup> Based on Blocking of Intramolecular Proton Transfer of A Quinazolinone Derivative, Talanta 71, 171-177.
- Zhou. Q., Liu, W., Chang. L. ve Chen. F., 2012. Spectral Study of the Interaction Between 2-Pyridinecarbaldehyde-P-Phenyldihydrazone and Ferric Iron and its Analytical Application, Spect. Chim. Act. Part A: Mol. and Biomol. Spect., 92, 78-83.

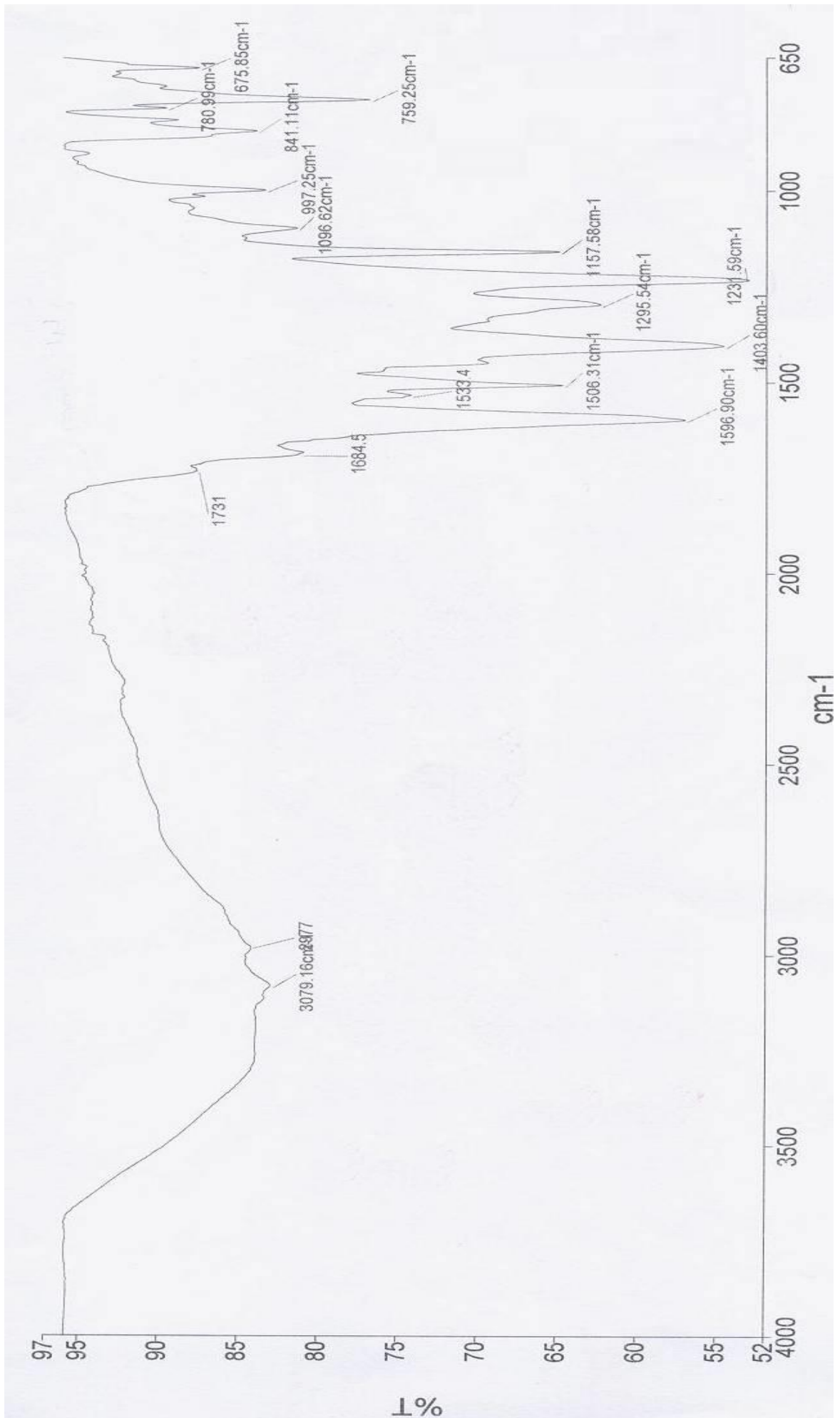


## ÖZGEÇMİŞ

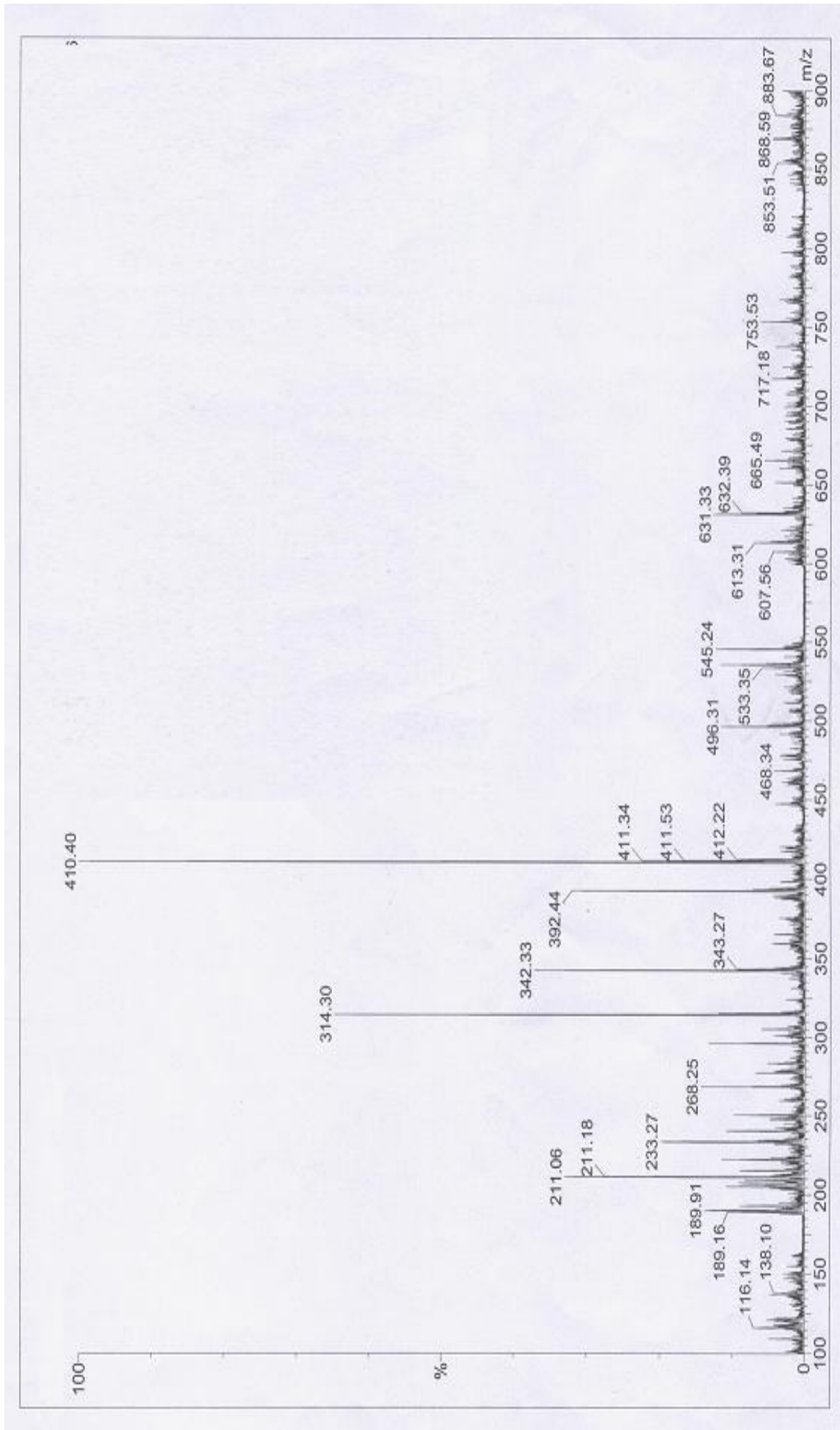
1982’de Trabzon’da doğdu. IV. sınıfa kadar Araklı Merkez ilköğretim Okulu’nda okuduktan sonra ilköğrenimini Sürmene Hasan Tahsin Kırvali ilköğretim Okulu’nda bitirdi. Ortaöğrenimini Sürmene Lisesi (Yabancı dil ağırlıklı program)’nde tamamladı. 2000 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’ne kayıt oldu. Bir yıl ingilizce hazırlık okuduktan sonra 2004 - 2005 eğitim öğretim yılında bölümünü ikincilikle bitirdi. 2006 bahar yarıyılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programına (tezli) kayıt yaptırdı. Ağustos 2008’de “Naftaldimin Grubu İçeren Yeni Floresent Makrobisiklik Ligandların Kompleksleşme Özelliklerinin Spektroskopik Metodlarla İncelenmesi” adlı tez çalışmasını hazırlayarak Yüksek Lisans eğitimini tamamladı. Yine 2008 yılı Ekim ayında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda Doktora programına başladı. Şubat 2009 yılında Bayburt Üniversitesi Meslek Yüksekokulu Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojisi Bölümü’ne Öğretim Görevlisi olarak atandı. Halen bu görevine devam etmektedir. Evli ve bir çocuk annesi olan Aysel BAŞOĞLU iyi seviyede ingilizce bilmektedir.



EK1. 2-(4-florofenil)-3-hidroksi-2,3-dihidrokinolin-4(1H)-on bileşinin IR spektrumu



EK 2. 2-(4-florofenil)-3-hidroksi-2,3-dihidrokinolin-4(1H)-on - Fe<sup>3+</sup> kompleksinin IR spektrumu



EK3. (2-(4-florofenil)-3-hidroksi-2,3,3-dihidrokinolin-4(IH)-on - Fe<sup>3+</sup>) kompleksinin kütle spektrumu