

**GIDA VE YAĞMUR SUYU ÖRNEKLERİNDE MANGAN
İLE BAKIR TÜRENDİRMESİ/FRAKSİYONLAMASI
VE HPLC-ICP-MS TEKNİĞİ**

Ümran SEVEN ERDEMİR



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ
KİMYA BÖLÜMÜ

**GIDA VE YAĞMUR SUYU ÖRNEKLERİNDE MANGAN İLE BAKIR
TÜRENDİRMESİ/FRAKSİYONLAMASI VE HPLC-ICP-MS TEKNİĞİ**

Ümran SEVEN ERDEMİR

Prof. Dr. Şeref GÜÇER
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA-2013

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

ÜMRAN SEVEN ERDEMİR tarafından hazırlanan “Gıda ve Yağmur Suyu Örneklerinde Mangan ile Bakır Türlelendirmesi/Fraksiyonlaması ve HPLC-ICP-MS Tekniği” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Şeref GÜÇER

- | | |
|---|------|
| Başkan : Prof. Dr. Şeref GÜÇER
Uludağ Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Kimya Anabilim Dalı | İmza |
| Üye : Prof. Dr. Gürcan GÜLERYÜZ
Uludağ Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı | İmza |
| Üye : Doç. Dr. Haluk TÜRKDEMİR
Uludağ Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Kimya Anabilim Dalı | İmza |
| Üye : Prof. Dr. Cevdet DEMİR
Uludağ Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Kimya Anabilim Dalı | İmza |
| Üye : Prof. Dr. Mehmet YAMAN
Fırat Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Kimya Anabilim Dalı | İmza |

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali Osman DEMİR
Enstitü Müdürü
...../ / 2013

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

03/07/2013

İmza

Ümran SEVEN ERDEMİR

ÖZET

Doktora Tezi

GIDA VE YAĞMUR SUYU ÖRNEKLERİNDE MANGAN İLE BAKIR
TÜRLENDİRMESİ/FRAKSİYONLAMASI VE HPLC-ICP-MS TEKNİĞİ

Ümran SEVEN ERDEMİR

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şeref GÜÇER

Çalışmamızda gıda ve çevre örneklerinde eser element türlemdirmesi/fraksiyonlamasına yönelik örnek hazırlama teknikleri ve farklı analiz yöntemlerinin kullanılması üzerinde durulmuştur. Bu amaçla, biyolojik açıdan önemli olan mangan ve bakır elementleri seçilerek, bu elementlerin fazla bulunduğu iç fındık, ıspanak, buğday unu gibi gıda örnekleri ile yağmur suyu örneklerinde türlemdirme/fraksiyonlama çalışmalarının yapılabilme olanakları araştırılmıştır. Fraksiyonlama çalışmalarında, dağılımdaki mangan ve bakır elementlerinin düşük düzeyde bulunmaları halinde duyar bir teknik olan indüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi kullanılmıştır. Dağılımların güvenilirliği açısından elementlerin bulunabileceği toplam düzeyler için validasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaca ulaşmak için reaktif karışımları ile yaş yakma işlemleri ve kemometrik yöntemler kullanılarak optimum şartlar saptanmıştır. Seçilen matriksler içerisindeki mangan ve bakır elementlerinin dağılımlarının incelenmesi için fraksiyonlama şeması tasarlanmış ve farklı çözümler ile ekstraksiyonlar gerçekleştirilerek organik yapılara bağlı mangan ve bakır türlerinin tayini yapılmıştır. Ayrıca *in-vitro* biyoyararlılık ve aktif karbon adsorpsiyonu gibi farklı tekniklerin kullanımının beslenme açısından değeri yorumlanmıştır. Çevre örneklerinden yağmur suyunda mangan ve bakırın havadan taşınım özelliklerinin incelenmesine imkan verecek olan örnek bir türlemdirme/fraksiyonlama şeması da incelenmiştir. Fraksiyonlama basamaklarından bazılarında daha detaylı bilgi alabilme ve şemayı türlemdirmeye döndürebilme olasılığının belirlenmesi açısından HPLC-ICP-MS ikili tekniğinden alınan sonuçlar irdelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mangan, bakır, fındık, ıspanak, buğday unu, yağmur suyu, fraksiyonlama, türlemdirme, biyoyararlılık, HPLC-ICP-MS

2013, xiv + 172 sayfa.

ABSTRACT

PhD Thesis

MANGANESE AND COPPER SPECIATION/FRACTIONATION ANALYSIS IN FOOD AND RAINWATER SAMPLES AND HPLC-ICP-MS TECHNIQUE

Ümran SEVEN ERDEMİR

Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Şeref GÜÇER

In our study, sample preparation and different analysis techniques were taken into account for trace element speciation/fractionation in food and environmental samples. For this purposes application possibilities of speciation/fractionation studies were investigated in terms of manganese and copper elements. These elements were selected for their biological importance. The principal food sources for manganese and copper elements, namely hazelnut, spinach, wheat flour and rainwater samples were preferred for investigations. In fractionation studies, due to the low concentration of the distribution of these elements in samples, inductively coupled plasma-mass spectrometry analysis technique was found as a proper chose because of its high sensitive capabilities. Validation studies were performed in order to ensure that the distributions will be varied in the total elemental limit. For this reason wet digestions with nitric acid, hydrogen peroxide, sulphuric acid mixtures depending on sample matrix were optimized using chemometric methods. In order to investigate the distributions of manganese and copper in selected matrices, different organic extraction steps were introduced for fractionation schemes. Bounded and free forms of manganese and copper were then outlined. Also different techniques such as *in-vitro* bioavailability procedures and activated carbon adsorption were applied for nutritional interpretations. Additionally, speciation/fractionation scheme was proposed for understanding the mobilities of manganese and copper in air using rain water as an example of environmental samples. Detailed fractionation information and the possibility to speciation analysis were also assessed using HPLC-ICP-MS coupled technique.

Key words: Manganese, copper, hazelnut, spinach, wheat flour, rainwater, fractionation, speciation, bioavailability, HPLC-ICP-MS

2013, xiv + 172 pages.

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne sunulan bu doktora tezi Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde Prof. Dr. Şeref GÜÇER danışmanlığında gerçekleştirilmiştir. Yüksek lisans ve doktora danışmanım, hayatımın bundan sonraki kısmında da öğrencisi olmaktan hep gurur duyacağım, en başta bilimsel olgunluğun nasıl olması gerektiği konusunda bana örnek olan bilim babam, örnek bilim insanı hocam Prof. Dr. Şeref GÜÇER'e; yetişmemdeki, bilimsel vizyon kazanmamdaki katkılarından ve harcadığı mesaiden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu bağlamda hocamızı bize kazandıran, onu yetiştiren saygıdeğer hocalarını da saygıyla anmak isterim. Ayrıca görünmez destekçimiz, hocamızın saygıdeğer eşi Sema GÜÇER'e de teşekkürlerimi sunar, 2013 Mayıs ayı itibari ile emekli olan hocama, eşi ve ailesi ile birlikte sağlıklı ve huzurlu bir emeklilik hayatı dilerim.

Çalışmamızı F-2008/25 numaralı proje ile destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığına; bize bu çalışmayı yapma fırsatı sağladıkları için,

Tez izleme komitemde yer almaları benim için çok büyük şans olan sayın hocalarım Doç. Dr. M. Haluk TÜRKDEMİR ve Prof. Dr. Gürcan GÜLERYÜZ'e çok değerli katkılarından dolayı,

Doktora çalışmalarımı tamamlayıncaya kadar Kimya Bölümünde bölüm başkanlığı görevini yürüten hocamız Prof. Dr. Necati BEŞİRLİ' ye; yüksek lisans ve doktora boyunca çalışmamıza olanak veren tüm katkıları ve iyi bir önder olduğu için,

Deneysel çalışmalarımın bir kısmını hizmet alımı şeklinde gerçekleştirdiğim Tübitak Bursa Test ve Analiz Laboratuvarı'nda başta Sibel TAŞKESEN olmak üzere tüm çalışanlarına benden yardımlarını esirgemedikleri için,

Beni yetiştiren, bu günlere getiren anneme; üzerimdeki tüm emekleri için, benim yanında olamadığım zamanlarda minik oğlumla ilgilenerek çalışmalarına katkı sağladığı için,

En büyük destekçim, her zaman yanımda benimle olan-bazen de arkamdan hep beni iteleyeni güç olan, benimle birlikte sıkıntı çeken ve bir gün dahi desteğini esirgemeyen, eşim, can yoldaşım Mustafa ERDEMİR'e; zorlu doktora sürecinde hep yanımda olduğu, hayatımı kolaylaştırdığı ve son olarak da tezimdeki çoğu şeklin daha iyi görünmesi adına mesai harcayıp yeniden çizmeye yardım ettiği için,

Ve şu an dokuz aylık olan canım oğlum Mert Mustafa'ma; en büyük motivasyon kaynağım olduğu için, doğmadan önce ve doğduktan sonra en yoğun tez çalışmalarım döneminde adeta benimle çalıştığı ve hayatının ilk aylarında annesini bu tez çalışması ile paylaşarak en büyük özveriyi gösterdiği için, bu tezi de kendisine ithaf ederek,

Teşekkür ederim.

Ümran SEVEN ERDEMİR
03/07/2013

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Türlendirme ve Fraksiyonlama Çalışmalarının Önemi	3
2.2. Türlendirme/Fraksiyonlamanın Tanımı ve Analitik Kimyadaki Yeri	4
2.3. Türlendirmede İkili Teknikler	7
2.3.1. HPLC-ICP-MS kesiksiz bağlantısı ve “Chromera” yazılımı	12
2.4. Kesiksiz (On-Line) Tekniklerin Avantajları ve Sınırlılıkları	14
2.5. Türlendirme/ Fraksiyonlama ve Biyoyararlılık İlişkisi	15
2.6. Gıdalarda Metal analizleri	17
2.6.1. Metal analizleri için kullanılan örnek hazırlama ve analiz yöntemleri	19
2.6.2. Katı örneklerin çözünürleştirilmesi ve açık sistem örnek hazırlama	22
2.6.3. Mikrodalga yöntemleri	23
2.6.4. Ultrasonik banyoya dayalı ekstraksiyon teknikleri	24
2.6.5. Katı faz ekstraksiyonu	25
2.6.6. Gıdalarda atomik spektroskopisi ile türlendirme analizleri	26
2.7. ICP-MS	27
2.7.1. ICP-MS analizlerinde girişimler ve türlendirme analizleri	31
2.8. HPLC	34
2.9. Tez kapsamında Seçilen Matrisler	36
2.9.1. Ispanak (<i>Spinacia oleracea L.</i>)	36
2.9.2. Buğday (<i>Triticum aestivum L.</i>) unu	37
2.9.3. Fındık (<i>Corylus avellana L.</i>)	38
2.9.4. Yağmur suyu	41
2.10. Tez kapsamında Seçilen Metaller	43
2.10.1. Mangan	43
2.10.1.1. Gıda bileşenlerinin mangan emilimine etkisi	47
2.10.1.2. Metal türlendirme analizleri ve mangan	47
2.10.2. Bakır	51
3. MATERYAL ve YÖNTEM	53
3.1. Materyal	53
3.1.1. Çalışmada kullanılan analitik cihazlar ve parçaları	53
3.1.1.1. İndüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi	53
3.1.1.2. Yüksek basınç sıvı kromatografisi	53
3.1.1.3. HPLC-ICP-MS arayüzü için çevirici valf	53
3.1.1.4. Alevli atomik absorpsiyon spektrometresi	54
3.1.1.5. Gaz kromatografisi	54
3.1.2. Çalışmada kullanılan temel laboratuvar cihazları	54
3.1.2.1. Su banyosu	54

3.1.2.2. pH-Metre	54
3.1.2.3. Ultrasonik karıştırıcı	54
3.1.2.4. Etüv	55
3.1.2.5. Terazî	55
3.1.2.6. Santrifüj aleti	55
3.1.2.7. Soxhlet ekstraksiyon sistemi	55
3.1.2.8. Vorteks cihazı	55
3.1.2.9. Kül fırını	55
3.1.2.10 Kjeldahl aparatı	56
3.1.2.11. Otomatik destilasyon ünitesi	56
3.1.2.12. Diyet lif/ham selüloz tayin cihazı	56
3.1.2.13. Döner vakumlu buharlaştırıcı	56
3.1.2.14. Mikrodalga parçalama sistemi	56
3.1.2.15. Liyofilizatör (dondurarak kurutma cihazı)	56
3.1.2.16. Saf su cihazı	57
3.1.2.17. Katı faz ekstraksiyon sistemi	57
3.1.2.18. Süzme düzeneği	57
3.1.2.19. Manyetik karıştırıcı ısıtıcı	57
3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar, sarf malzemeler, numuneler ve çözeltiler	57
3.1.3.1. Analitik saflıktaki kimyasallar ve sarf malzemeler	57
3.1.3.2. Sertifikalı referans malzemeler	60
3.1.3.3. Diğer sarf malzemeler	61
3.1.3.4. Numuneler	62
3.1.3.5. Deneysel işlemlerde kullanılacak çözeltilerin hazırlanması	62
3.1.3.5.1. ICP-MS çalışmaları ve örnek hazırlamada kullanılmak üzere yaklaşık 0,1 N, 1 N ve 2 N nitrik asit çözeltilerinin hazırlanması	62
3.1.3.5.2. Biyoyararlılık çalışmaları için gerekli çözeltilerin hazırlanması	63
3.1.3.5.2.1. Yaklaşık 0,1 N HCl çözeltisinin hazırlanması	63
3.1.3.5.2.2. Yaklaşık 0,1 N NaHCO ₃ çözeltisinin hazırlanması	63
3.1.3.5.2.3. Pepsin çözeltisinin hazırlanması	63
3.1.3.5.2.4. Pakreatin çözeltisinin hazırlanması	63
3.1.3.5.3. Örneklerdeki temel bileşenlerin analizleri için gerekli çözeltilerin hazırlanması	63
3.1.3.5.3.1. Ham selüloz tayini için gerekli sülfürik asit ve sodyum hidroksit çözeltilerinin hazırlanması	63
3.1.3.5.3.2. Protein tayini için gerekli çözeltilerin hazırlanması	64
3.1.3.5.3.3. Şeker tayini için gerekli çözeltilerin hazırlanması	64
3.1.3.5.3.4. Diyet lif tayini için gerekli çözeltilerin hazırlanması	64
3.1.3.5.4. Yağ asidi metil esterleri oluşturmak için metanolik potasyum hidroksit çözeltisinin hazırlanması	65
3.1.3.5.5. Katı faz ekstraksiyonu için gerekli çözeltilerin hazırlanması	65
3.1.3.5.5.1. Metanolde % 0,1 (v/v) formik asit çözeltisinin hazırlanması	65
3.1.3.5.5.2. Suda % 2 (v/v) formik asit çözeltisinin hazırlanması	65
3.1.3.5.5.3. Suda % 0,5 (v/v) amonyak çözeltisinin hazırlanması	65
3.2. Yöntem	66
3.2.1. Örneklerin analize hazırlanması	66
3.2.1.1. Ispanak örneklerinin liyofilizasyon işlemine tabi tutulması	66

3.2.1.2. Örneklerinin mikrodalga parçalama yöntemi ile AAS analizine hazırlanması	66
3.2.1.3. Örneklerinin ICP-MS analizine hazırlanması	67
3.2.2. ICP-MS için kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması	68
3.2.3. Fraksiyonlama çalışmaları için örneklerin hazırlanması	68
3.2.4. Ispanak, un ve fındık örneklerindeki temel bileşenlerin belirlenmesi	68
3.2.4.1. Ispanak, un ve fındık örneklerindeki nem içeriğinin belirlenmesi	68
3.2.4.2. Ispanak, un ve fındık örneklerindeki ham selüloz içeriğinin belirlenmesi	69
3.2.4.3. Ispanak, un ve fındık örneklerindeki kül içeriğinin belirlenmesi	70
3.2.4.4. Ispanak, un ve fındık örneklerindeki protein içeriğinin belirlenmesi	71
3.2.4.5. Ispanak, un ve fındık örneklerindeki yağ içeriğinin belirlenmesi	72
3.2.4.5.1. Kloroform:metanol karışımı ile fındık örneklerinin yağ içeriklerinin belirlenmesi	73
3.2.4.5.2. Fındık örneklerinin yağ asitleri bileşiminin belirlenmesi	73
3.2.4.6. Ispanak, un ve fındık örneklerindeki şeker içeriğinin Luff-Schoorl yöntemi ile belirlenmesi	74
3.2.4.7. Ispanak, un ve fındık örneklerindeki diyet lif içeriğinin belirlenmesi	76
3.2.5. Yağ asitleri metil esterlerinin GC ile analizi	77
3.2.6. AAS ile metal analizleri	78
3.2.7. ICP-MS ile metal analizleri	79
3.2.7.1. AAS ile karşılaştırma analizleri	79
3.2.7.2. Açık sistem yağ yakma ile toplam metal analizleri	80
3.2.7.2.1. Açık sistem yağ yakma işleminin optimizasyonu	81
3.2.7.2.2. Optimum koşullarda Mn, Cu analizleri; SRM analizi ve yüzde geri kazanım çalışmaları	85
3.2.7.3. Seyreltik nitrik asit ve ultrasonik ekstraksiyonun etkinliğinin araştırılması	85
3.2.7.4. Matrikslerin yağsız kısmının eldesi ve metal analizi	85
3.2.7.5. Ispanak, un ve fındık örneklerinde çözen ekstraksiyonuna dayalı fraksiyonlama çalışmaları	85
3.2.7.6. “ <i>in-vitro</i> ” mide ve bağırsak sindirim simülasyon işlemleri ile biyoyararlılık çalışmaları	87
3.2.7.7. Biyoyararlılık değerlendirmeleri için <i>n</i> -oktanol ekstraksiyonu çalışmaları	87
3.2.7.8. Aktif karbon ile adsorpsiyon çalışmaları	88
3.2.7.9. AAS ve ICP-MS’de metot validasyon parametrelerinin belirlenmesi	88
3.2.7.10. Katı faz ekstraksiyon çalışmaları	88
3.2.7.11. Yağmur suyunda mangan ve bakır türlendirme analizleri	89
3.2.7.12. HPLC-ICP-MS ikili tekniğine yönelik çalışmalar	89
3.2.7.12.1. HPLC-ICP-MS ikili tekniğine yönelik püskürtme haznesi karşılaştırılması	90
3.2.7.12.2. HPLC-ICP-MS ikili tekniğine yönelik uygun sisleştircinin belirlenmesi	90
3.2.7.12.3. HPLC-ICP-MS ikili tekniğine yönelik peltier soğutmalı siklonik püskürtme haznesi etkinliğinin belirlenmesi	91

3.2.7.12.4. HPLC-ICP-MS ikili tekniği ile türlendirme/fraksiyonlama alışmaları	91
4. BULGULAR	92
4.1. Ispanak, Un ve Fındık rneklerindeki Temel Bileşenler	92
4.2. Fındık rneklerindeki Yağ Asitlerinin Karakterizasyonu	93
4.3. Fındıkta Yağ İçeriğinin Standart Metot ve Kloroform:Metanol Ekstraksiyonu ile Karşılaştırılması	95
4.4. AAS ile Metal Analizleri	95
4.4.1. AAS ile bazı metot validasyon parametrelerinin belirlenmesi	95
4.4.2. AAS’de standart çözeltiler ile elde edilen kalibrasyon eğrileri	96
4.4.3. AAS ile yüzde geri kazanım alışmaları	97
4.4.3.1. Kalibrasyon eğrileri	97
4.4.3.2. Yüzde geri kazanım alışmaları	99
4.4.4. AAS’ de sertifikalı referans malzeme ile yapılan çalışma sonuçları	99
4.4.5. AAS ile metal analizleri	100
4.5. ICP-MS ile Metal Analizleri	100
4.5.1. AAS ile analiz edilen örneklerin ICP-MS ile karşılaştırılması	100
4.5.2. Mikrodalga parçalama ile açık sistem yağ yakmanın karşılaştırılması	101
4.5.3. Merkezi kompozit dizayn yöntemi ile optimizasyon alışmaları	102
4.5.3.1. Optimum koşullarda ICP-MS ile metal düzeylerinin belirlenmesi	105
4.5.4. Serifikalı referans malzemelerin açık sistem yağ yakmalı örnek hazırlama sonrası ICP-MS ile analizleri	106
4.5.5. 0,1 N nitrik asit ile ultrasonik banyoda doğrudan parçalama yöntemi ile toplam metal analizleri	106
4.5.6. Matrikslerin kuru kısımlarında (yağı alınan örneklerde) metal analizleri	107
4.5.7. Fraksiyonlama Sonuçları	108
4.5.7.1. Ispanak rnekleri için fraksiyonlama alışmaları	108
4.4.7.2. Un rnekleri için fraksiyonlama alışmaları	109
4.4.7.3. Fındık rnekleri için fraksiyonlama alışmaları	111
4.5.8. Biyoyararlılık alışmaları	111
4.5.8.1. Ispanak için biyoyararlılık alışmaları	112
4.5.8.2. Un için biyoyararlılık alışmaları	116
4.5.8.3. Fındık için biyoyararlılık alışmaları	122
4.5.9. ICP-MS ile metot duyarlılık parametrelerinin belirlenmesi	126
4.5.10. Katı faz ekstraksiyonu sonuçları	128
4.5.11. evre örneklerinden yağmur suyunda mangan ve bakır türlendirme/fraksiyonlama analizleri	129
4.6. HPLC-ICP-MS İkili Tekniğine Dayanan Türlendirme alışmaları Sonuçları	130
4.6.1. Kalitatif analiz sonuçları	130
4.6.1.1. Standart zeltiler ile yapılan alışmalar	130
4.6.2. Matrikslerden elde edilen kalitatif analiz sonuçları	134
4.6.2.1. Yağmur suyunda kalitatif analiz sonuçları	134
4.6.2.2. Ispanak rneği için kalitatif analiz sonuçları	135
4.6.2.3. Un rneği için kalitatif analiz sonuçları	135
4.6.2.4. Fındık rneği için kalitatif analiz sonuçları	136
4.6.2.5. Metanol içeren mobil fazın ayırmaya etkisi	137

4.6.3. Matrikslerden elde edilen kantitatif analiz sonuçları	139
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	141
KAYNAKLAR	156
EKLER	169
ÖZGEÇMİŞ	172

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

t_R	Alıkonma zamanı
dk	dakika
°C	Derece, Santigrat
g	Gram
v/v	Hacim/hacim
K	Kelvin cinsinden sıcaklık
kg	Kilogram
m/z	Kütle/yük
m/v	Kütle/hacim
L	Litre
μ	Mikro
$\mu\text{g L}^{-1}$	Mikrogram/Litre
mg L^{-1}	Miligram/Litre
mL dk^{-1}	Mililitre/dakika
ppb	Milyarda bir kısım
ppm	Milyonda bir kısım
s	Saniye
\pm	Standart sapma
~	Yaklaşık
%	Yüzde
d	Yoğunluk

Kısaltmalar

Açıklama

AAS	Atomik absorpsiyon spektrometri/Alevli atomik absorpsiyon spektrometresi
AES	Atomik emisyon spektrometresi
CE	Kapiler elektroforez
ICP- DRC-MS	Dinamik reaksiyon hücreli indüktif eşleşmiş plazma- kütle spektrometresi
ETAAS	Elektrotermal atomik absorpsiyon spektrometresi
GC	Gaz kromatografisi
GFAAS	Grafit fırınlı atomik absorpsiyon spektrometresi
HPLC	Yüksek basınç sıvı kromatografisi
ICP	İndüktif eşleşmiş plazma
ICP-MS	İndüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi
LC	Sıvı kromatografisi
LOD	Belirleme limiti
LOQ	Nicel tayin limiti
SEC	Boyut eleme kromatografisi
SRM	Sertifikalı referans malzeme
HPLC-ICP-MS	Yüksek basınç sıvı kromatografisi-indüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.2.1	Türlendirme analizlerinin önemli olduğu uygulama alanları	4
Şekil 2.2.2	Kimyasal analiz alanı ile ilişkili türlendirme analizi çeşitleri	6
Şekil 2.2.3	Fraksiyonlamanın başlıca uygulanma nedenleri	7
Şekil 2.3.1	HPLC’de ayırma mekanizmaları ve türlendirme analizlerindeki bazı tipik uygulamaları	10
Şekil 2.3.2	HPLC-ICP-MS veya LC-ICP-MS ikili teknikleri ile ilgili yayın sayılarının yıllara bağlı değişimi	11
Şekil 2.3.3	Türlendirme analizlerinde kullanılan teknikler ve bu teknikler arası ilişkiler	11
Şekil 2.3.4	HPLC-ICP-MS ikili tekniğinin şekilsel gösterimi	12
Şekil 2.3.5	Türlendirme analizlerine çeşitli analitik tekniklerin katkısı ve bu teknikler arası ilişkiler	12
Şekil 2.3.1.1	HPLC-ICP-MS ikili tekniğinde cihazlar arasındaki çevirici valfin şematik gösterimi	14
Şekil 2.5.1	İnsan ve gıda zincirinde metal hareketliliği	16
Şekil 2.5.2	Biyoyararlılık ile ilgili terimlerin şematik gösterimi	17
Şekil 2.6.5.1	Katı faz ekstraksiyonunun şematik gösterimi	26
Şekil 2.6.6.1	2003-04-27 ve 2013-04-27 tarihleri arasında mangan veya bakır türlendirmesi ve fraksiyonlaması ile ilgili yayın sayıları	27
Şekil 2.7.1	ICP-MS cihazının temel bileşenleri	27
Şekil 2.7.2	Element analizi için analitik spektroskopik teknik seçimi	29
Şekil 2.7.3	Atomik spektroskopik yöntemlerdeki belirleme limitlerinin ICP-MS ile karşılaştırılması	30
Şekil 2.7.4	Elementel analiz için atomik spektroskopik teknik seçiminde önemli parametreler	30
Şekil 2.7.5	ICP-MS ile tayin edilebilen elementler ve belirleme limitleri	31
Şekil 2.8.1	HPLC cihazının temel bileşenleri	35
Şekil 2.10.1.1.1.	Mulder diyagramı	47
Şekil 3.2.7.5.1	Fraksiyonlama analiz şeması	86
Şekil 4.4.2.1	AAS’de Cu için standart çözeltiler ile elde edilen kalibrasyon eğrisi grafiği	96
Şekil 4.4.2.2	AAS’de Mn için standart çözeltiler ile elde edilen kalibrasyon eğrisi grafiği	97
Şekil 4.4.3.1.1	AAS’de yüzde geri kazanım çalışmalarında Cu için standart çözeltiler ile elde edilen kalibrasyon eğrisi grafiği	98
Şekil 4.4.3.1.2	AAS’de yüzde geri kazanım çalışmalarında Mn için standart çözeltiler ile elde edilen kalibrasyon eğrisi grafiği	98
Şekil 4.6.1.1.1	Mn (II) ve Cu (II) çözeltileri karışımı için HPLC-ICP-MS ile eş-zamanlı elde edilen kromatogram	131
Şekil 4.6.1.1.2	Mn (III) çözeltisi için HPLC-ICP-MS ile elde edilen kromatogram	132
Şekil 4.6.1.1.3	Mn (IV) çözeltisi için HPLC-ICP-MS ile elde edilen kromatogram	133

Şekil. 4.6.2.1.1.	A: 1. yağmur suyu; B: 2. yağmur suyu ve C: 3. yağmur suyu için HPLC-ICP-MS ile elde edilen kromatogramlar	134
Şekil 4.6.2.2.1	İkinci ıspanak örneği için HPLC-ICP-MS ile elde edilen kromatogram	135
Şekil 4.6.2.3.1	İkinci un örneği için HPLC-ICP-MS ile elde edilen kromatogram	136
Şekil 4.6.2.4.1	Üçüncü fındık örneği için HPLC-ICP-MS ile elde edilen kromatogram	137
Şekil 4.6.2.5.1	HPLC-ICP-MS sisteminde %1-5 arasında metanol kullanıldığında üçüncü fındık örneği için elde edilen kromatogramlar	138
Şekil 5.1	İspanak, un ve fındık matrislerinde kuru bazdaki makro bileşenler	146
EKLER		
Şekil 1	HPLC-ICP-MS cihazı	169
Şekil 2	Scott tip püskürme haznesi ve ryton karşı akış sisleştirci	169
Şekil 3	Siklonik (Cyclonic) püskürtme haznesi	170
Şekil 4	ICP-MS için organik çözügen iletim aparatı	170
Şekil 5	Düşük akış sisleştirci	171
Şekil 6	Meinhard sisleştirci	171
Şekil 7	Rheodyne çevirici valf	171

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 2.2.1	Temel türlendirme analiz çeşitlerinin kısa karakteristikleri	5
Çizelge 2.6.3.1	Derişik asitler ve kral suyunun atmosferik basınç ve 7×10^5 Pa basınçta kaynama noktaları	24
Çizelge 2.7.1.1.	ICP-MS'te karşılaşılan yaygın poliatomik girişimlere örnekler	32
Çizelge 2.9.3.1	Fındık çeşitlerinin elementel içeriği-1	40
Çizelge 2.9.3.2	Fındık çeşitlerinin elementel içeriği-2	41
Çizelge 2.10.1.1	Mangan ve bazı bileşiklerinin kimyasal özellikleri	46
Çizelge 3.2.4.6.1	Luff Scroll yöntemi için harcanan tiyosülfat hacmine karşı mg olarak invert şeker değeri	75
Çizelge 3.2.5.1	GC çalışma şartları	78
Çizelge 3.2.6.1	Mikrodalga programı	78
Çizelge 3.2.6.2	AAS çalışma şartları	79
Çizelge 3.2.6.3	Sertifikalı referans malzemeler ve Mn, Cu elementlerinin sertifika değerleri	79
Çizelge 3.2.7.1.1	ICP-MS çalışma şartları	80
Çizelge 3.2.7.2.1.1	Ispanak matriksi için merkezi kompozit dizayn	82
Çizelge 3.2.7.2.1.1.(a)	Kodlanmış faktörler ve seviyeleri	82
Çizelge 3.2.7.2.1.1.(b)	Ispanak matriksi için deneysel dizayn matriksi	82
Çizelge 3.2.7.2.1.2	Un matriksi için merkezi kompozit dizayn	83
Çizelge 3.2.7.2.1.2.(a)	Kodlanmış faktörler ve seviyeleri	83
Çizelge 3.2.7.2.1.2.(b)	Un matriksi için deneysel dizayn matriksi	83
Çizelge 3.2.7.2.1.3	Fındık matriksi için merkezi kompozit dizayn	84
Çizelge 3.2.7.2.1.3.(a)	Kodlanmış faktörler ve seviyeleri	84
Çizelge 3.2.7.2.1.3.(b)	Fındık matriksi için deneysel dizayn matriksi	84
Çizelge 3.2.7.12.1	HPLC-ICP-MS cihazı çalışma şartları	90
Çizelge 4.1.1	Ispanak örneklerinin makro bileşenleri ve bunların düzeyleri	92
Çizelge 4.1.2	Un örneklerinin makro bileşenleri ve bunların düzeyleri	92
Çizelge 4.1.3	Fındık örneklerinin makro bileşenleri ve bunların düzeyleri	93
Çizelge 4.2.1	1 numaralı fındık örneğinin metil esterlerine dayalı yağ asidi bileşimi	93
Çizelge 4.2.2	2 numaralı fındık örneğinin metil esterlerine dayalı yağ asidi bileşimi	94
Çizelge 4.2.3	3 numaralı fındık örneğinin metil esterlerine dayalı yağ asidi bileşimi	94
Çizelge 4.3.1	Fındıkta, iki farklı metot ile bulunan yağ yüzdelerinin karşılaştırılması	95
Çizelge 4.4.1.1	AAS analizleri için bazı metot validasyon parametreleri ve değerleri	95
Çizelge 4.4.2.1	AAS'de Cu analizinde standart çözeltiler ile elde edilen absorbans değerleri	96

Çizelge 4.4.2.2	AAS’de Mn analizinde standart çözeltiler ile elde edilen absorbands değerleri	96
Çizelge 4.4.3.1.1	AAS’de Cu analizinde geri kazanım çalışmaları için standart çözeltiler ile elde edilen absorbands değerleri	97
Çizelge 4.4.3.1.2	AAS’de Mn analizinde geri kazanım çalışmaları için standart çözeltiler ile elde edilen absorbands değerleri	98
Çizelge 4.4.3.2.1	AAS ile analizlerde matriksler için yüzde geri kazanım sonuçları	99
Çizelge 4.4.4.1	AAS ile doğruluk çalışmaları kapsamında analiz edilen SRM’ lerde belirlenen Mn ve Cu düzeyleri	99
Çizelge 4.4.5.1	Matrikslerde AAS analizleri sonucu bulunan element düzeyleri	100
Çizelge 4.5.1.1	Matrikslerde mikrodalga parçalama sonrası ICP-MS ile belirlenen metal düzeyleri, örneklere eklenen Mn ve Cu için bulunan yüzde geri kazanım değerleri	101
Çizelge 4.5.2.1	Açık sistem yaş yakmalı örnek hazırlama sonrası ICP-MS ile mangan ve bakır analizi sonuçları	101
Çizelge 4.5.3.1	Ispanak matriksi için 2 ³ +star merkezi kompozit dizayn (N=16)	103
Çizelge 4.5.3.2	Un matriksi için 2 ³ +star merkezi kompozit dizayn (N=16)	104
Çizelge 4.5.3.3	Fındık matriksi için 2 ³ +star merkezi kompozit dizayn (N=16)	105
Çizelge 4.5.3.4	Matrisler için optimum açık sistem yaş yakma koşulları	105
Çizelge 4.5.3.1.1	Optimum koşullarda açık sistem yaş yakma ile belirlenen metal düzeyleri	106
Çizelge 4.5.4.1	Açık sistem yaş yakma sonrası ICP-MS ile SRM analizleri	106
Çizelge 4.5.5.1	Nitrik asite geçen metal miktarları	107
Çizelge 4.5.6.1	Ispanak, un ve fındık matriksleri için yağı uzaklaştırılan örneklerdeki metal düzeyleri	107
Çizelge 4.5.7.1.1	Üç farklı ıspanak örneğinden organik çözümlere geçen mangan düzeyleri	108
Çizelge 4.5.7.1.2	Üç farklı ıspanak örneğinden organik çözümlere geçen bakır düzeyleri	109
Çizelge 4.5.7.2.1	Üç farklı un örneğinden organik çözümlere geçen mangan düzeyleri	109
Çizelge 4.5.7.2.2	Üç farklı un örneğinden organik çözümlere geçen bakır (⁶⁵ Cu) düzeyleri	110
Çizelge 4.5.7.2.3	Üç farklı un örneğinden organik çözümlere geçen bakır (⁶³ Cu) düzeyleri	110
Çizelge 4.5.7.3.1	Üç farklı fındık örneğinden organik çözümlere geçen mangan düzeyleri	111
Çizelge 4.5.7.3.2	Üç farklı fındık örneğinden organik çözümlere geçen bakır (⁶³ Cu) düzeyleri	111
Çizelge 4.5.8.1.1	Ispanak örneklerinin enzim çözeltileri, su, <i>n</i> -oktanol ile ekstrakte edilebilen veya aktif karbona adsorbe edilebilen fraksiyonlarındaki mangan düzeyleri	112

Çizelge 4.5.8.1.2	Ispanak örneklerinin enzim çözeltileri, su, <i>n</i> -oktanol ile ekstrakte edilebilen veya aktif karbona adsorbe edilebilen fraksiyonlarındaki bakır düzeyleri	113
Çizelge 4.5.8.1.3	Ispanaktaki manganın biyoyararlılığı	114
Çizelge 4.5.8.1.4	Ispanaktaki bakırın biyoyararlılığı	115
Çizelge 4.5.8.2.1	Un örneklerinin enzim çözeltileri, su, <i>n</i> -oktanol ile ekstrakte edilebilen veya aktif karbona adsorbe edilebilen fraksiyonlarındaki mangan düzeyleri	116
Çizelge 4.5.8.2.2	Un örneklerinin enzim çözeltileri, su, <i>n</i> -oktanol ile ekstrakte edilebilen veya aktif karbona adsorbe edilebilen fraksiyonlarındaki bakır (⁶⁵ Cu) düzeyleri	117
Çizelge 4.5.8.2.3	Un örneklerinin enzim çözeltileri, su, <i>n</i> -oktanol ile ekstrakte edilebilen veya aktif karbona adsorbe edilebilen fraksiyonlarındaki bakır (⁶³ Cu) düzeyleri	118
Çizelge 4.5.8.2.4	Undaki manganın biyoyararlılığı	119
Çizelge 4.5.8.2.5	Undaki bakırın (⁶⁵ Cu) biyoyararlılığı	120
Çizelge 4.5.8.2.6	Undaki bakırın (⁶³ Cu) biyoyararlılığı	121
Çizelge 4.5.8.3.1	Fındık örneklerinin enzim çözeltileri, su, <i>n</i> -oktanol ile ekstrakte edilebilen veya aktif karbona adsorbe edilebilen fraksiyonlarındaki mangan düzeyleri	122
Çizelge 4.5.8.3.2	Fındık örneklerinin enzim çözeltileri, su, <i>n</i> -oktanol ile ekstrakte edilebilen veya aktif karbona adsorbe edilebilen fraksiyonlarındaki bakır düzeyleri	123
Çizelge 4.5.8.3.3	Fındıktaki manganın biyoyararlılığı	124
Çizelge 4.5.8.3.4	Fındıktaki bakırın biyoyararlılığı	125
Çizelge 4.5.9.1	Mn için ıspanak matriksinde bazı metot validasyon parametreleri ve değerleri	126
Çizelge 4.4.9.2	Cu için ıspanak matriksinde bazı metot validasyon parametreleri ve değerleri	126
Çizelge 4.5.9.3	Mn için sertifikalı referans malzeme kullanılarak yapılan doğruluk çalışmaları	127
Çizelge 4.4.9.4	Cu için sertifikalı referans malzeme kullanılarak yapılan doğruluk çalışmaları	127
Çizelge 4.5.9.5	Mn ve Cu için un ve fındık matriksinde ilave metot validasyon parametreleri	127
Çizelge 4.5.10.1	Katı faz ekstraksiyon sonuçları	128
Çizelge 4.5.10.2	Katı faz ekstraksiyonu için yüzde geri kazanım sonuçları	129
Çizelge 4.5.11.1	Yağmur suyunda mangan ve bakır türlendirme/fraksiyonlama sonuçları	129
Çizelge 4.6.3.1	HPLC-ICP-MS ile elde edilen kalibrasyon eğrileri	139
Çizelge 4.6.3.2	HLPC-ICP-MS çalışmalarında Mn ve Cu türleri için belirleme ve nicel tayin limitleri	139
Çizelge 4.6.3.3	HLPC-ICP-MS çalışmalarında matrikslerde Mn ve Cu için belirlenen türlerin miktarları	140

1. GİRİŞ

Bir elementin fizikokimyasal formunun belirlenmesi, yani türlendirme çalışmaları neden önem teşkil etmektedir? Toplam element tayini; elementin taşınım, toksisite, biyoyararlılık etkilerini belirtmede yeterli görülebilir mi? Türlelendirmede hangi atomik spektroskopik teknikler ön plana çıkmaktadır?

Metallerin hem lüzumlu olmaları hem de toksik özellik göstermeleri nedeni ile tayinlerinde özel analitik şemaların geliştirilmesi güncel konular arasındadır. Günümüzde biyoyararlılık ve toksisitenin, metallerin belirli fizikokimyasal formları ile yakından ilgili olduğu bilinmektedir. Ele alınan bir matriks içinde elementler çeşitli formda ve yapıda bulunabilmektedir (Broekart ve ark. 1990). Bu nedenle etkilerinin tam olarak belirlenmesinde toplam element düzeyleri yerine türlendirme ve fraksiyonlama çalışmaları önemlidir.

Tez kapsamında incelenecek olan mangan (Mn) ve bakır (Cu) elementleri; hem lüzumlu hem toksik özellik göstermeleri, organizmada birbirlerinin etkilerini değiştirebilmeleri açısından çeşitli gıda örneklerinde (ıspanak, iç fındık, buğday unu) ve çevre örneği olarak da yağmur suyunda türlendirme ve fraksiyonlama çalışmaları açısından incelenmiştir. Bu kapsamda, farklı örnek hazırlama teknikleri ve analiz yöntemlerinin kullanılması üzerinde durulmuştur. İlgili elementlerin çok düşük düzeylerde bulunmaları halinde indüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi (ICP-MS) tekniği ile ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Asit karışımları ile yaş yakma işlemleri sonucu organik kısmın parçalanması ve toplam element tayini ile validasyonu yapılmıştır. Elementlerin bağlı buldukları yapıların aydınlatılmasına yönelik olarak farklı çözenler ile ekstraksiyona veya aktif karbon adsorpsiyonuna dayalı fraksiyonlama çalışmaları yapılmıştır. Organizmadaki yararlılıklarının belirlenmesi açısından *in-vitro* biyoyararlılık çalışmaları; yine tez kapsamında uygulanmıştır. Tüm bu çalışmalar Mn ve Cu elementlerinin taşınım özelliklerinin, bağlı buldukları yapıların aydınlatılmasında ve buna bağlı olarak da toksisite ve biyoyararlılık çalışmalarının değerlendirilmesinde

yararlı olacaktır. Buna ilaveten; yüksek basınç sıvı kromatografisi-indüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (HPLC-ICP-MS) kesiksiz ikili tekniğinin kullanılması da çalışmamızın çıktılarını oluşturacaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Çoğu gıda ve çevre örneklerinde eser elementlerin türlendirme ve fraksiyonlama çalışmalarında metotların duyarlılıklarının sınırlı olması sebebi ile fazla veri üretilmemiş; farklı matrikslerde, fraksiyonlama çalışmaları toplam element düzeyinde değerlendirilmiştir. Günümüzde hızlı ve örnek yapısını değiştirmeyen ikili tekniklerin kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır. Aşağıda bu bağlamda literatürden derlenen bilgiler özetlenmektedir.

2.1. Türlendirme ve Fraksiyonlama Çalışmalarının Önemi

Metabolik işlevlerde gerekli olan eser element analizleri halk sağlığı çalışmaları açısından önemlidir; fakat ilgili elementlerin toplam konsantrasyonları değişik formları hakkında bilgi vermez (Tokalioğlu ve ark. 2000, Tuzen ve Soylak 2007). Elementin toksisitesi, biyoyararlılığı ve taşınım özellikleri kimyasal formuna bağlıdır (Rosen ve Hieftje 2004, Gomez-Ariza ve ark. 2006). Ayrıca metal veya metaloidler biyomakromoleküllerin bir parçası olarak da bulunabilir ki bu da farklı etki ve davranışları açısından önemlidir. Bu nedenle biyolojik örnekler veya gıda örneklerindeki eser element türlendirmesi ile elde edilen bilgi metal ve yarı-metallerin biyokimyasını anlamada günümüzde önemli görülmektedir (Gomez-Ariza ve ark. 2006). Gıdalar açısından örnek verilirse, toplam element içeriğinin absorpsiyon ve kullanım hakkında çok az bilgi verdiği kabul görmüştür (Crews 1998). Zira gıdadaki mineralin besin değeri sadece element içeriğine değil; biyoyararlılığına veya biyoalınabilirliğine de bağlıdır (Ruzik 2012). Eser elementler ve organik bileşikler kimyasal olarak hemen etkileşir ve bu nedenle elementler; protein, enzim veya hormon gibi bir makromolekül parçası olarak ortaya çıkarak bu bağlı form ya da oksidasyon basamağına göre biyokimyasal etkilerini gösterirler (Michalke 2006).

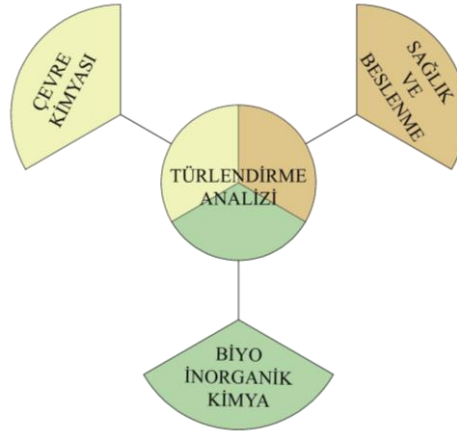
Elementlerin kimyasal formları toksisite ve biyoyararlılık açısından önemli olduğundan geçmişte potansiyel yarar-zarar belirlemede toplam element tayinleri kullanılırken; günümüzde pek çok araştırmacı tarafından bunun tek başına yetersiz olduğu ve yaşayan organizmalara etkilerinin tam olarak anlaşılmasında, türlerin tespit ve kantitatif tayinlerinin gerekli olduğu kabul görmüştür (Rosen ve Hieftje 2004).

2.2. Türlendirme/Fraksiyonlamanın Tanımı ve Analitik Kimyadaki Yeri

Türlendirmeye ilişkin temel kavramlar ve tanımlar aşağıda özetlenmiştir (Templeton ve ark. 2000):

- Türlendirme analizleri; örnekteki bir veya daha fazla kimyasal türün tespit veya kantitatif ölçümlerine ilişkin analitik işlemlerdir.
- Kimyasal tür; elementin, izotopik bileşim elektronik/oksidasyon durumu, ve/veya kompleks ya da moleküler yapısı ile tanımlanan özel formudur.
- Element türlendirmesi, türlendirme; ilgili elementin bir sistemde tanımlanan kimyasal türler arasındaki dağılımını ifade eder.

Türlendirme analizleri; kimyasal bileşiklerin biyojeokimyasal çevriminde, seçilen elementlerin toksisite ve ekotoksisitelerinin belirlenmesinde, gıda örneklerinin kalite kontrolünde, tıbbi ve farmakolojik ürünlerin kontrolünde, teknolojik süreç kontrolünde, sanayi kuruluşlarının çevreye etkilerinin araştırılmasında, meslek hastalıkları boyutunda maruz kalmaların değerlendirilmesinde ve klinik analizlerde kritik öneme sahiptir (Kot ve Namiesnik 2000). Türlendirmenin hitap ettiği temel alanlar aşağıda şematik olarak verilmiştir (Rosen ve Hieftje 2004).

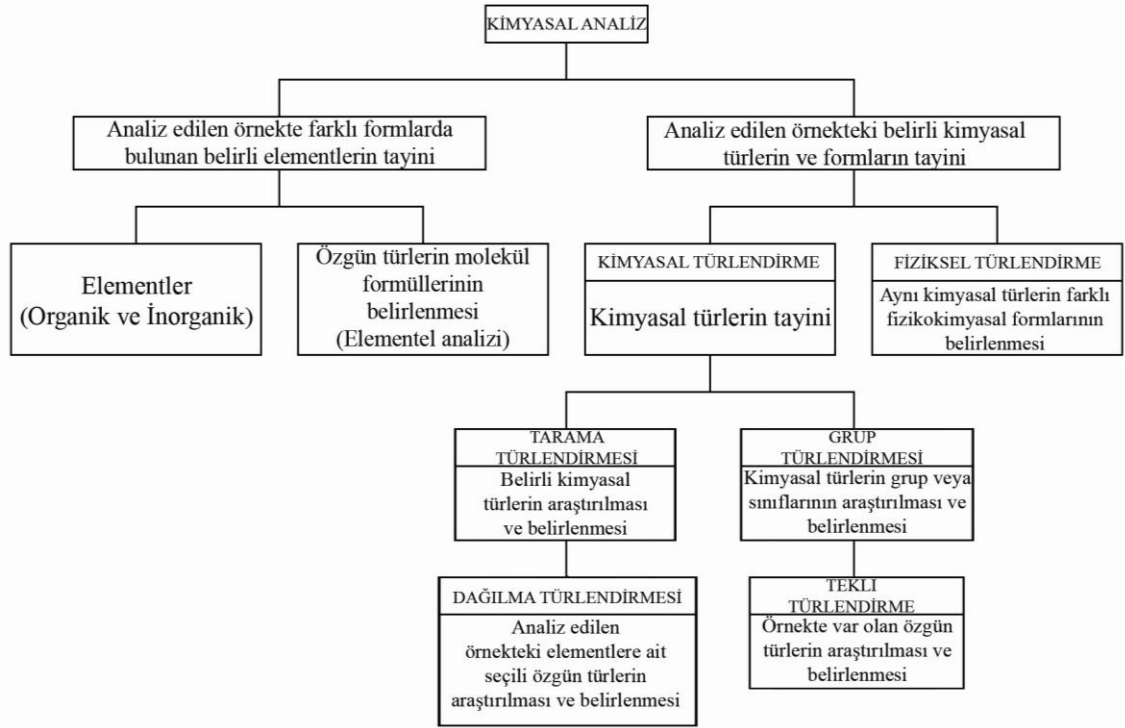


Şekil 2.2.1. Türlendirme analizlerinin önemli olduğu uygulama alanları (Rosen ve Hieftje 2004'den değiştirilerek alınmıştır)

Temel türlendirme analizleri dört şekilde uygulanabilmekte olup; bu alanlar Çizelge 2.2.1'de verilmiştir. Kimyasal analiz ile ilişkili kısım ise ayrıntılı olarak Çizelge 2.2.2'de görülmektedir (Kot ve Namiesnik 2000).

Çizelge 2.2.1. Temel türlendirme analiz çeşitlerinin kısa karakteristikleri (Kot ve Namiesnik 2000' den özetlenerek alınmıştır)

Türlendirme Analizi Çeşidi	Açıklamalar	Örnekler
Tarama Türlendirmesi	Türlerin, kirlilik boyutunda (toprak su veya hava) özellikle çevresel örneklerde fiziksel veya kimyasal olarak belirlenmesidir.	Eser element analizleri (çözünmüş veya askıda kalan fraksiyon) ve bunların farklı formlarının ardışık ekstraksiyon sonrası toprak veya çökellerde belirlenmesi, çökellerde, deniz suyunda tributil kalay tayini, dokuda metil cıva belirlenmesi
Grup Türlendirmesi	Belirli oksidasyon basamağında ve belirli bileşik yapısındaki elementin bağlı bulunduğu yapının belirlenmesi şeklindedir.	Elementel, inorganik veya organik cıva bileşiklerinin tayini
Dağılma Türlendirmesi	Genellikle biyolojik örneklerin analizi ile ilişkilidir.	Serumda eser element, bitkide ağır metal tayini
Bireysel Türlendirme	En zor türlendirme çalışmaları bu gruba girer. Fraksiyonlama ve ayırma teknikleri önemlidir. Kromatografi ve ikili teknikler ön plana çıkmaktadır.	Kimyasal türlerin moleküler, kompleks, elektronik veya nükleer yapılarının belirlenmesi



Şekil 2.2.2. Kimyasal analiz alanı ile ilişkili türlendirme analizi çeşitleri (Kot ve Namiesnik 2000)

Bazı durumlarda kimyasal türlerin belirtilmesinde türlendirme kelimesinin kullanımındaki sınırlılık söz konusudur veya çok fazla sayıda tür bulunmakta olup; bunların matrikteki toplam derişimi verecek şekilde tek tek belirlenmesi çok zordur (Templeton ve ark. 2000). Örneğin; metaller farklı ve kompleks gıda bileşenlerine bağlı olabilir, biyoligandlar ile kompleksleşmiş halde bulunabilir (Pohl 2007, Pohl ve Prusisz 2007). İlgili türlerin analitik prosedür veya ölçüm metodundan kaynaklanan kararsızlığı, pH değişimleri veya kompleksleşme gibi etkiler ile ölçüm metodunun duyarlılığındaki sınırlılık türlerin belirlenmesinde zorluğa neden olabilir. Belirlenmek istenilen tür kararlı olsa da inert olabilir. Bu durumda fraksiyonlama pratik bir uygulama olarak karşımıza çıkmaktadır. Fraksiyonlama; belirli bir örnekteki analit veya analit grubunun fiziksel (örneğin boyut veya çözünürlük) veya kimyasal (örneğin bağlanma ve reaktivlik) özelliklerine göre sınıflandırılması işlemidir (Templeton ve ark. 2000). Yukarıdaki veriler ışığında fraksiyonlama çalışmalarının pratik uygulamaya dönüşmesinin temel nedenleri tarafımızdan aşağıdaki şekile dönüştürülmüştür (Şekil 2.2.3).



Şekil 2.2.3. Fraksiyonlamanın başlıca uygulanma nedenleri

2.3. Türlelendirmede İkili Teknikler

Türlelendirmenin başarısı iki faktöre bağlıdır: seçicilik (sadece belirli bir türün belirlenmesi) ve duyarlılık (ölçüm metodunun analit seviyesini yakalayabilmesi). Bu iki faktörün sağlanması ile ilgili büyük bir yenilik; kromatografi veya elektroforez tekniğinin kesiksiz olarak element seçici bir dedektöre (atomik absorpsiyon, emisyon, floresans veya kütle spektrometri, indüktif eşleşmiş plazma veya mikrodalga indüklenmiş plazma gibi) bağlanmasıdır (Kot ve Namiesnik 2000).

Analitik kimyacılar, son otuz yıllık süreçte toplam element derişiminin; taşınım, biyoyararlılık ve bunun sonucunda elementin ekolojik sistem veya biyolojik organizmalar üzerindeki etkileri ile ilgili istenen bilgiye ulaşmada yetersiz kaldığını anlamışlardır. Element türlelendirme analizleri belirli bir örnekteki farklı elementlerin türlelendirmesine imkan verirken gerçek etkileşimlerini de yansıtmalıdır. Bu, kolay ulaşılır bir durum değildir. Bu nedenle ayırma ve ölçüm yöntemleri kadar; örnek alma, saklama ve hazırlama ile ilgili yeni yaklaşımlar da ortaya çıkmıştır. Son zamanlarda tek başına türlelendirmede gösterdikleri sorunlara karşı ayırma ve tespit yöntemlerinin birleştirildiği ve iyileştirildiği metotlar gündeme gelmektedir. Bu tekniklerin birleştirilmesinde ve kalite kontrol stratejilerinde yeni metodolojik gelişmeler de gerekli görülmektedir (Michalke 2003). Kompleks örnekler, bir ayırma tekniğinden yararlanmaksızın analiz edilemezken; ayırma metotları için yaygın olarak kullanılan pek

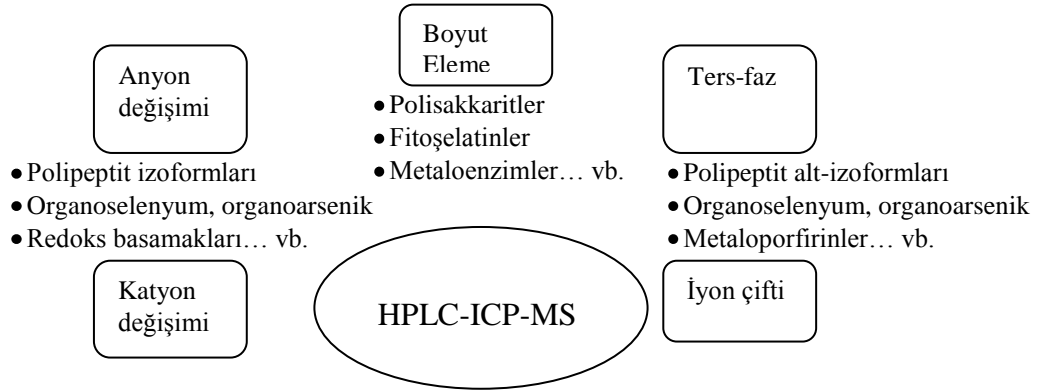
çok dedektör de elemente özgü bilgi vermemektedir. Bu nedenle farklı ikili teknikler geliştirilmiştir (Rosen ve Hieftje 2004). Bu tekniklerde türler mümkün olduğunca seçici olarak ayrılır ve sonrasında yine seçici olarak ölçülür (Michalke 2003).

İkili tekniklerin gelişim periyodu incelenecek olursa; 1970'lerin sonunda ilk kez Van Loon ve Suzuki tarafından gaz kromatografisi (GC) ve sıvı kromatografisi (LC)'nin elemente özgü dedektörler ile birlikte kullanılmasının öncülük ettiği çalışmalar, kromatografik ayırım ve duyarlı element seçici dedektörlerin birleştirilmesi ile türlendirmeye bir kapı açmıştır (Montes-Bayon ve ark. 2003, Rosen ve Hieftje 2004). Başlangıçta atomik absorpsiyon (AA), atomik floresans (AF) ve atomik emisyon (AE) teknikleri ile kombinasyonlar, yerini son yıllarda, kütle spektrometresinin kullanımına bırakmıştır. Özellikle HPLC-ICP-MS türlendirme çalışmalarında rutin olarak kullanılır hale gelmiştir. Ayrıca; ayırma tekniği olarak türevlendirme yapılmadığında sadece uçucu bileşiklere yönelik olan GC, ya da yüksek hızda ayırma etkinliği ve düşük örnek hacimlerine yönelik olarak avantaj sunan kapiler elektroforez (CE) de HPLC'ye alternatif olarak kullanılabilir. ICP-MS, HPLC veya CE ile birleştirilerek element seçici belirlemelerde yaygın olarak kullanılırken; moleküler seçici belirlemelerde de elektrosprey iyonlaştırma-kütle spektrometresinden (ESI-MS) yararlanılmaktadır (Rosen ve Hieftje 2004).

LC, ikili tekniklerden indüktif eşleşmiş plazma (ICP) torç sistemine belki de en kolay adapte edilebilenidir. Genellikle LC-ICP-MS'deki temel problemler mobil (hareketli) faz ile ilgilidir. LC hareketli fazındaki tuz ve organik çözügen içeriği minimum düzeyde tutulmalıdır. Belirleme limiti (veya nitel belirleme limiti, LOD) yeterince düşük olmayabilir ve LOD'yi artırmak için uygun sisleştirciler kullanılmalıdır. LC' den farklı olarak GC bağlantısı için tamamen ısıtılmış bir arayüz ve gaz örneğin iletimi açısından da uygun aparatlar gerekirken; arayüzde karbon birikiminin önlenmesi için de taşıyıcı bir gaza ihtiyaç olabilir. CE' de bağlantı GC veya LC ye göre daha zor olup düşük ölü hacimli arayüz gerekir; zira burada örnek akış hızı dakikada 0,5 µL' den genellikle az olmaktadır. Ticari arayüzeyler olsa da kurum içi tarzında geliştirilenler daha çok kullanılmıştır. CE'ye dayanan ikili teknikte mutlak LOD düşüktür. Metal veya

metalooidler tespit edilemezken metaloprotein gibi makromoleküler ölçümler hedeflenmektedir (Dressler ve ark. 2011).

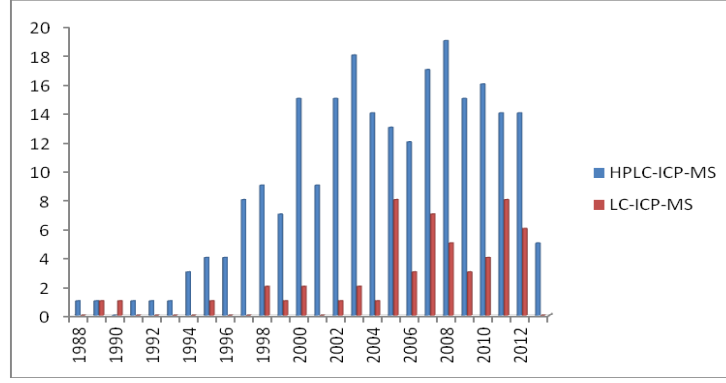
LC-ICP-MS ikili tekniğinin analiz boyutunda tarihçesi alevli atomik absorpsiyon spektrometresi (AAS), elektrotermal atomik absorpsiyon spektrometresi (ETAAS) ve indüktif eşleşmiş plazma-atomik emisyon spektrometresi (ICP-AES)' e uzanmaktadır; fakat ne HPLC-AAS; ne de HPLC-ICP-optik emisyon spektrometresi (OES), biyolojik ve çevresel örnekler açısından kıyaslandığında ICP-MS kadar gündeme gelmemiştir (Montes-Bayon ve ark. 2003). ICP-MS dışında atomik absorpsiyon spektroskopisi veya ICP-AES gibi optik spektrometrik teknikler kullanılabilir olsa da AA, eş zamanlı çoklu element tayinine imkan vermezken; ICP-AES' in duyarlılığı da ICP-MS'e ulaşamamaktadır. ICP-MS, düşük belirleme limitleri, makro ve eser bileşenlerin aynı seyreltme ile belirlenmesine imkan verecek geniş dinamik aralığı ve çoklu element tayin imkanı ile önemli bir ölçüm tekniği haline gelmiştir. (Rosen ve Hieftje 2004). Zira ICP-MS 1980' lerin ortalarında devreye girdiğinde, analitik veri karakteristikleri açısından performansının çok daha iyi olduğu görülmüştür. HPLC-ICP-MS' e yönelik ilk çalışmalar 1986'larda Houk ve ark. tarafından yayınlanmıştır. Günümüzde HPLC dolgu maddelerindeki çeşitlilikle de ters faz, boyut eleme, iyon değişimi ve kiral çalışmalar yapılabilmektedir (Montes-Bayon ve ark. 2003). HPLC'nin ayırma mekanizmaları çeşitliliği ile çok sayıda önemli çevresel ve biyolojik örneklere uygulanabilmesi ayrıca; duyarlılığı yüksek ve sağlam (çevre şartlarından az etkilenen) ticari ICP-MS cihazlarının bulunabilmesi ile HPLC-ICP-MS tekniği, ikili teknikler arasında en iyi kombinasyonlardan biri haline gelmiştir (Montes-Bayon ve ark. 2003). HPLC için ayırma mekanizmaları ve türlendirme analizlerinde bazı uygulamaları Şekil 2.3.1' de görülmektedir.



şekil 2.3.1. HPLC’de ayırma mekanizmaları ve turlendirme analizlerindeki bazı tipik uygulamaları (Szpunar 2000’ den değiştirilerek alınmıştır)

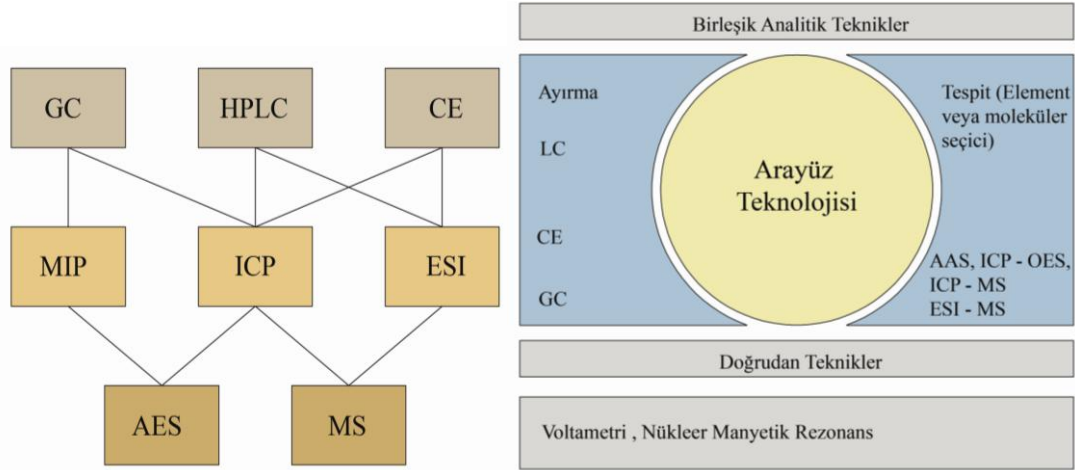
HPLC-ICP-MS ikili tekniğinde mangan açısından ve HPLC kısmında karşımıza yaygın olarak boyut eleme kromatografisi (SEC) ıkmaktadır (Quintana ve ark. 2005, Quintana ve ark. 2006, Michalke ve ark. 2007, Arias-Borrego ve ark 2008, Michalke ve ark. 2013, Rybak ve Ruzik 2013). İkili tekniklerde SEC, proteince zengin matrikslerde metaloprotein veya düşük molekül kütleli metal şelatları gibi sınırlı kararlılıktaki türlerin ayrılması için uygun grlmektedir. Diğer sıvı kromatografi tekniklerine göre ayırmada daha az etkili olsa da uygulama kolaylığı, hareketli faz bileşimine uygunluk ve element türlerinin molekül kütlelerinin tahminine imkan vermesi nedeni ile avantajlı grlmektedir. SEC ile, biyolojik sıvılar ve gıda matriksleri gibi örneklerde özellikle element türlerinin fraksiyonlama çalışmalarında önemli bilgiler elde edilebilmektedir (Koplik ve ark. 2002).

Turlendirmede HPLC veya LC’ nin ICP-MS ile birlikte kullanımına dayalı çalışmaların sayısal olarak yıllara göre değişim grafiği tarafımızdan çizilerek şekil 2.3.2’de verilmiştir.



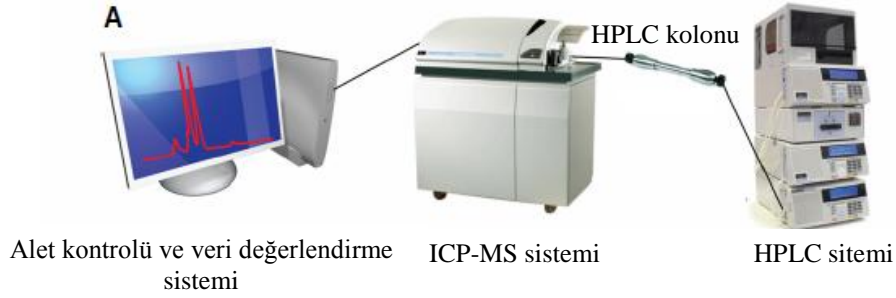
Şekil 2.3.2. HPLC-ICP-MS veya LC-ICP-MS ikili teknikleri ile ilgili yayın sayılarının yıllara bağlı değişimi

Element seçici ölçüm yöntemlerinin doğrudan ayırma metotlarına bağlanması sonucu ikili teknik halinde kullanımı; kesikli sistemlere göre daha kolay ve hızlı olarak sonuca götürmektedir (Michalke 2003). Şekil 2.3.3’ de türlendirme çalışmalarında yaygın olarak kullanılan ikili teknikler, bunlar arası ilişkiler ile arayüz şematik olarak özetlenmiştir (Michalke 2003, Anonim 2012).



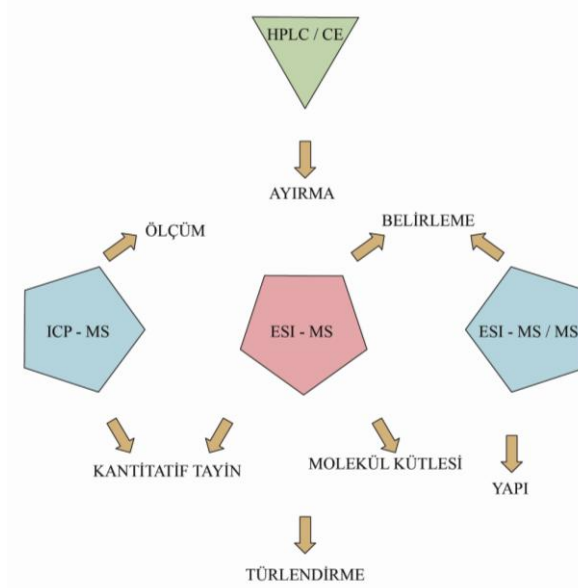
Şekil 2.3.3. Türlendirme analizlerinde kullanılan teknikler ve bu teknikler arası ilişkiler (Anonim 2012a (solda) ve Michalke 2003’den (sağda) değiştirilerek alınmıştır.

Şekil 2.3.4’ de HPLC’nin ICP-MS ile birleştirilmesine ilişkin şekilsel gösterim (Maher ve ark. 2012) verilmiştir.



Şekil 2.3.4. HPLC-ICP-MS ikili tekniğinin şekilsel gösterimi (Maher ve ark. 2012)

Çevre, sağlık-beslenme ve biyoorganik kimya alanları ile ayrı ayrı ilişkilendirilen türlendirme çalışmalarında farklı ikili tekniklerin sağladığı faydalar Şekil 2.3.5’de özetlenmiştir (Rosen ve Hieftje 2004).



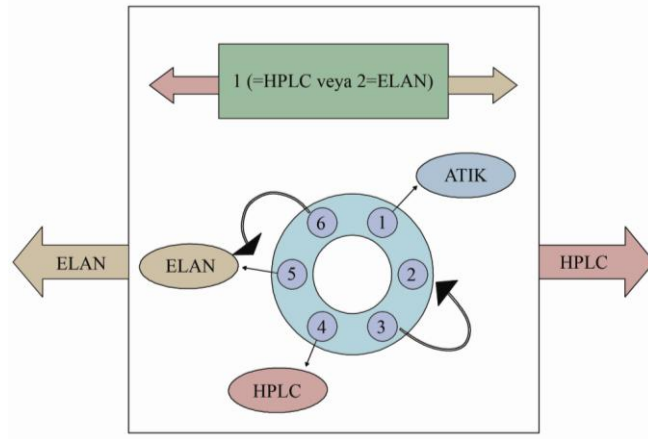
Şekil 2.3.5. Türlendirme analizlerine çeşitli analitik tekniklerin katkısı ve bu teknikler arası ilişkiler (Rosen ve Hieftje 2004’den değiştirilerek alınmıştır)

2.3.1. HPLC-ICP-MS kesiksiz bağlantısı ve “Chromera” yazılımı

HPLC veya LC-ICP-MS ikili tekniği; literatürde yaygın olarak bulunmaktadır. Bu bağlantı nispeten kolaydır; zira kolondan çıkan mL dk⁻¹ büyüklüğündeki akış hızları, ICP-MS geleneksel sisleştiricilerinin optimum koşullarda çalışması için gerekli sıvı alımına uygundur (Alvarez-Llamas ve ark. 2005). Bu amaçla; HPLC kolon çıkışından

dar bir politetrafloretillen veya benzer malzemeli inert bir materyal ile ICP-MS sisleştiricisine fiziksel olarak bağlanabilir (Larsen 1998). Buradaki sınırlılık organik çözen kullanımı ve gradiyent elüsyondur (Larsen 1998, Alvarez-Llamas ve ark. 2005). Özellikle terz fazda görülen yüksek organik içerik; plazma kararsızlığı ve torçun enjektör kanalında, sampler ve skimmer konilerinde karbon birikmesine yol açabilir. Aynı zamanda yüksek tuz içeriği de sisleştirici ve konilerde tuz birikmesine ve duyarlılık kaybına yol açabilir. Bu nedenle ayırım için gerekli hareketli faz kesiksiz bağlantıda ICP-MS dedektörüne uygun olmayabilir (Alvarez-Llamas ve ark. 2005). Ayrıca; organik çözen, püskürtme haznesi (sprey odası)' nin duvarlarına yapışabilir. İzokritik elüsyonda mobil faz bileşiminin örneğin her yerinde aynı olması avantaj olarak görülmektedir (Larsen 1998).

Kullandığımız "Chromera" yazılımı, türlendirme çalışmalarına özgüdür. HPLC ve ICP-MS arasındaki kesiksiz bağlantıyı sağlamakta ve iki cihaz da bu yazılım üzerinden çalıştırılabilmektedir. Ayrıca yazılım, ICP-MS ve HPLC arasındaki çevirici valfi de kontrol eder. Bu valf sayesinde ICP-MS analize hazırlanırken HPLC kolonu da şatlandırılabilir. Yani, doğrudan ICP-MS ya da doğrudan HPLC'den atığa geçme pozisyonları mevcuttur. Bununla birlikte analiz sonunda kolon temizlenirken; ICP-MS de ayrıca kapatmaya hazır hale getirilebilmektedir. Çevirici valfe ait şematik görünüm tarafımızdan çizilerek Şekil 2.3.1.1' de verilmiştir. Valfin iki konumu vardır. Bir konumunda HPLC'den atığa; iki konumunda ise HPLC'den ICP-MS'e iletim söz konusudur. Kullanılan yazılım ile ICP-MS ve HPLC şartları ayarlanabilir. Her iki cihaz da bu yazılımdan çalıştırılıp kontrol edilebilir, çalışılacak izotoplar seçilebilir ve bunlara ait türler belirtilebilir, analiz öncesi temel çizgi incelenebilir ve sonrasında analiz gerçekleştirilebilir.



Şekil 2.3.1.1. HPLC-ICP-MS ikili tekniğinde cihazlar arasındaki çevirici valfin şematik gösterimi

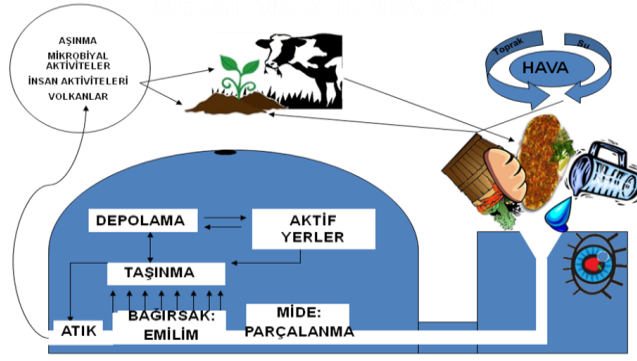
2.4. Kesiksiz (On-Line) Tekniklerin Avantajları ve Sınırlılıkları

Bir ayırma sisteminin doğrudan element seçici dedektöre bağlandığı kesiksiz birleşik tekniklerin avantajları şöyle özetlenebilir (Michalke 2002): Bu teknikler daha az zaman alıcıdır, kesikli sistemlere göre daha hızlı sonuç verir. Böylece daha az emek ve masraf gerektirir, otomasyona elverişlidir. Fraksiyonların toplanmasına ve saklanmasına gerek yoktur; böylece saklanma sırasındaki türlerin kararsızlığı veya kaybı, kirlilik problemleri, saklama kaplarına örnek adsorpsiyonu gibi tipik problemler egellenmiş olur. Sonuç olarak daha az kirlilik ve kayıp muhtemeldir. Bakteriyel oksidasyon ve parçalanma azalır. Genellikle, tekrar elde edilebilirliği yüksek sonuçlar elde edilir. Bununla birlikte bazı sınırlılıklar da söz konusudur: Kesikli modda toplanan fraksiyonlar ile kalite kontrol daha kolay uygulanır. Girişimlerden uzak optimum ayırma ve belirleme ile yeterli sinyal/gürültü oranı arasında uyum sağlanmalıdır. Genellikle ayırma veya belirleme bu nedenle optimize edilmez. Tampon derişimi, tuz yükü, organik matriks düzenleyici yüzdesi veya düşük akış hızları ile ilgili ayırma ve ölçüm ihtiyaçlarına cevap verecek uygun arayüz gereklidir. Hareketli fazın tuz yükü iyonizasyon değişimlerine yol açarken; organik düzenleyiciler de plazma kararsızlığı, karbon birikimi ve iyonizasyon karakteristikleri ile ilgili problemlere neden olabilmektedir. ICP-MS transfer arayüzünde pik genişlemesi ve akış hızları ile ilgili problemler ile de karşılaşılmaktadır. Bu nedenle kromatografik ayırımı sağlamak/korumak için arayüzün ölü hacmi yüksek olmamalıdır (Michalke 2002).

Montes-Bayon ve ark. (2003) tarafından yapılan bir araştırmada HPLC-ICP-MS ikili tekniğine dair avantaj ve dezavantajlar belirtilmiştir. Bu ikili teknikte hareketli faz bileşimi ve akış hızı oldukça önemlidir. Organometalik turlerin tayininde önemli olan sıvı kromatografi teknikleri; ters-faz (RP), ters faz iyon çifti (RP-IP), boyut eleme (SEC), iyon değişimi (IEC) ve kiral kromatografi (CC) olarak önerilmektedir. RP, dolgu maddesi kararlılığı ve basitliği nedeniyle avantajlı görölmektedir; pek çok organik düzenleyicilerin ICP-MS için uygun olmayışı problem teşkil etmektedir. Normalde sadece çok düşük yüzdelerdeki metanol ve etanol uygun görölmektedir; son zamanlarda kullanılan mikrosisleştiriciler ile asetonitril gibi organik düzenleyiciler verilebilmekte ve böylece bu sınırlılık aşılmaya çalışılmaktadır. RP-IP' nin avantajı çok yönlülüğüdür. Örneğin; tek bir kromatografik analizde kısa sürede ve iyi tekrar elde edilebilirlik ile yüklü ve yüksüz turlerin ayırımına imkan vermektedir. Sınırlılığı ise kullanılan bazı iyon çifti oluşturucu reaktifler için silika temelli kolonlarda degradasyon problemleri olabilmesidir. SEC'in (veya jel geçirgenlik kromatografide) temel dezavantajı ise kullanılan çözgenlerden kaynaklanan yüksek tuz içerikleridir. IEC, gradiyent çalışmalar söz konusu olduğunda kompleks ayırmalar için uygun görölse de zaman alıcı olmakla birlikte (bir analiz bititđinde kolonun yeni molil faz ile şartlanması gerekmektedir); ayrıca mobil faz bileşimindeki değişimler zemin sinyali ve duyarlılıkta değişimine neden olabilmektedir. Kiral çalışmalar farmakoloji endüstrisinde optik izomer ve enantiyomerlerin ayırımına imkan verse de literatürde çok az uygulama bulmuştur.

2.5. Türlendirme/ Fraksiyonlama ve Biyoyararlılık İlişkisi

Gıdalarda sağlık açasından risk değerlendirmesinde genellikle metalin toplam miktarı temel alınır; fakat bu miktarlar biyoyarar fraksiyonu her zaman yansıtmayabilir (Moreda-Pineiro ve ark. 2012). Böylece toplam element içeriği, biyoyararlılığı; yani sindirim sırasında absorbe edilip metabolik aktif türlere çevrimi hakkında bilgi vermez (Cabanero ve ark. 2004). Çevrim ile ilgili şematik gösterim şekil 2.5.1'de verilmiştir (Bernhard ve ark. 1986).

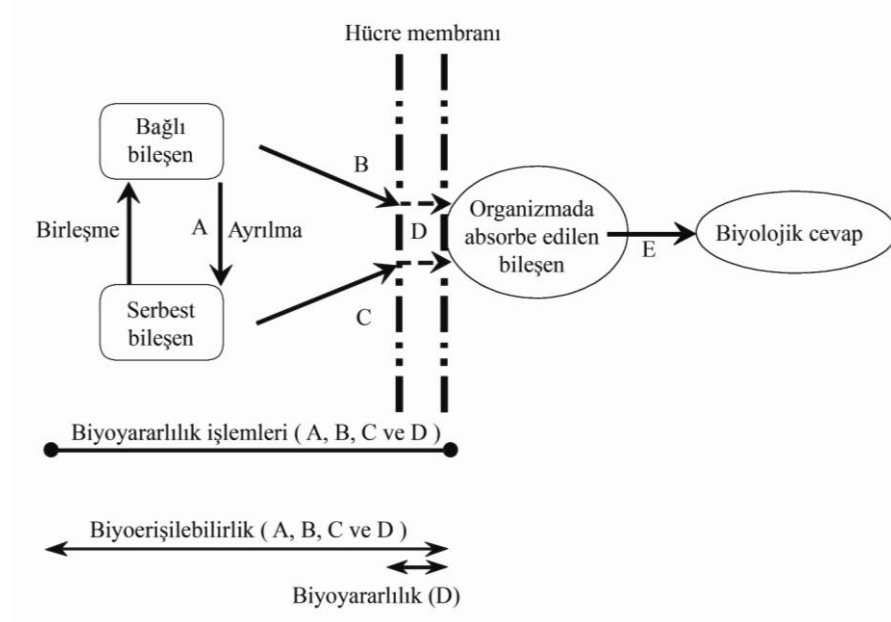


Şekil 2.5.1. İnsan ve gıda zincirinde metal hareketliliği (Bernhard ve ark. 1986' dan değiştirilerek alınmıştır)

Toksikolojik açıdan bakıldığında ise toplam metal derişimi değil; biyolojik ligandlar ile etkileşime girebilecek formlar önemlidir. Bu alandaki *in-vivo* çalışmalar pahalıdır, daha az yaygındır, uygulanması ve bazı parametrelerin deney sırasında ölçümü zordur; ayrıca etik olarak tartışma konusudur. *in-vitro* çalışmalar ise basit, hızlı, ucuz ve kesin yöntemler olup canlı sistemler üzerinde yapılan denemelere alternatif sunar. Bu metotlar mide veya bağırsak şartlarının simülasyonuna dayanır (sıcaklık, pH, enzim, kimyasal bileşim ve karıştırma gibi) ve çözünür sindirim ürünleri elde edilir (Cabanero ve ark. 2004, Moreda-Pineiro ve ark. 2012). Biyoyararlılık; gıdalar, gıda bileşenleri ve gastrointestinal şartlara bağlı olarak değişir; ayrıca sindirim, absorpsiyon, taşınım, kullanım ve atılma gibi süreçlere bağlıdır (Dominguez-Gonzalez ve ark. 2010)

Biyoyararlılığı belirten bir yol, mide ve bağırsaklarda parçalanma veya absorpsiyon sırasında ne kadar metal serbest kaldığının (gastrointestinal olarak gıdadan çözülmüş faza geçen metal miktarının) belirlenmesidir (Moreda-Pineiro ve ark. 2012). Bilimsel literatürde yaygın olarak kullanılan biyoyararlılık kavramı ile ilgili disiplinler arası farklılıkları önlemek için bazı tanımlamalar getirilmiştir. Buna göre; biyoyararlılık (veya mutlak biyoyararlılık) yeme, solunum veya deri yoluyla alınan ve sistematik döngüye giren ya da basitçe bağırsaktan absorbe edilen fraksiyonu tanımlarken; biyoerişilebilirlik ise *in-vitro* yaklaşımlarda başvuru olan bir terim olup gastrointestinal alanda çözülmüş ve absorpsiyona elverişli bileşik fraksiyonudur. Her ikisi de *in-vitro* ve *in-vivo* olarak çalışılabilir (Rostami ve Juhasz 2011, Moreda-Pineiro ve ark. 2012).

Biyoyararlılık-bioerişilebilirlik terimlerinin toprak veya çökel kirleticilerinden organizmaya uzanan süreçte şekilsel gösterimi Şekil 2.5.2’de belirtilmiştir (Naudi ve ark. 2008).



Şekil 2.5.2. Biyoyararlılık ile ilgili terimlerin şematik gösterimi (Naudi ve ark. 2008’ den özetlenerek alınmıştır)

Enzimatik *in-vitro* yaklaşımlarda, enzim etkisi ile meydana gelen parçalanma-çözünme işlemleri *in-vivo* şartlarına benzetilir. Hidrolaz ve proteaz (pepsin ve pankreatin) yardımı ile gıdaya uygulanan ardışık *in-vitro* işlemlerden sonra elementlerin çözünür miktarları ölçülür ve bu miktar bioerişilebilirliğin bir ölçüsüdür. Bu işlemlerde de validasyon önemlidir. Ayrıca *in-vitro* metotlar IUPAC tanımlamasına göre türlendirme metotları değildir; zira burada aslında herhangi bir tür tespit ve tayin edilmemektedir (Khouzam ve ark. 2012).

2.6. Gıdalarda Metal Analizleri

Metabolik işlevlerdeki rolleri ve dolayısı ile insan sağlığına etkileri bakımından çevre ve biyolojik örneklerdeki metal tayinleri önem arz etmektedir (Grotti ve ark. 2006).

Sağlık için gerekli vitamin ve mineral kaynağı olan gıdalar, geniş bir derişim aralığında lüzumlu veya toksik özellikteki metalleri içerebilmektedir (Demirel ve ark. 2008). Bu

açıdan kolay, hızlı ve doğru örnek hazırlama işlemleri; eser element tayininin duyarlı, hızlı ve rutin analize elverişli olması açısından önem arz etmektedir (Grotti ve ark. 2006).

Metabolik açıdan önemli elementlerden sadece birkaçı doğal olarak ve sabit düzeyde bulunurken; diğerleri farklı şekillerde ve farklı miktarlarda bulunmaktadır. Bunlardan oksijen, karbon, hidrojen ve azot en bol bulunan yani makro elementler olup vücut ağırlığının % 93' ünü oluştururken; kalsiyum, fosfor, kükürt, silisyum, stronsiyum gibi yapısal mikro elementler ve sodyum, potasyum, magnezyum, klorür gibi elektrolit görevli elementler toplam hücresel ağırlığın küçük bir miktarını (% 5) oluştururlar. Demir, bakır, çinko, mangan, kobalt, nikel, molibden, selenyum, iyodür, florür, kalay ve vanadyum gibi hücre içeriğinin % 1 ini oluşturan ve yaşam için gerekli elementler de bulunmaktadır. Arsenik, kadmiyum, krom, cıva ve kurşun gibi elementler çevresel kirlilik kaynaklı iken; antimon, bizmut, lityum, altın, platin gibi bir kısım element de sadece özel işlemler için vücuda alınmaktadır. Alüminyum, bor, baryum bromür gibi bazı elementlerin biyolojik aktiviteleri de araştırma konusudur (Burguera ve Burguera 2009).

Günümüzde kullanılan çoğu analitik ölçüm; analiz öncesi, gıda matriksinin parçalanmasına dayalıdır. Bu amaçla da kuru kül etme, yaş yakma veya mikrodalga parçalama basamaklarına gerek duyulmaktadır. Bu basamaklarda tek başına bir çözücü kullanılabildiği gibi; $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$, $\text{HNO}_3\text{-HCl}$, $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$ gibi reaktif karışımları da kullanılabilmektedir (Demirel ve ark. 2008).

Türlendirme çalışmaları açısından bakıldığında da gıda matriksinde en önemli sorun örnek hazırlama basamağındadır. Gıdalar da biyolojik matriksler gibi karmaşık yapıda olup; doğrudan analizleri zordur. Gıdanın katı, sıvı yapıda olması veya yağ içeriği önemlidir. Türlendirme için örnek hazırlama ve analiz sırasında kompleks türlerin kararlılığı önemlidir; fakat metilasyon, hidrolizasyon veya mikroorganizma etkileri ile oksidasyon basamakları değişebilir. Örneğin mikroorganizmalar, bazı kompleks bağları koparabilir; bu da materyal profilini değiştirir. Biyometilasyon da uçucu formlar oluşturabilir ve örnek hazırlama sırasında kayıplara neden olabilir. Seyreltme kararsız

formun oksidasyonuna neden olabileceği gibi; dondurma işlemi de protein denatürasyonuna yol açabilir. Katı örneklerde ekstraksiyon, çözme, çözünürleştirme veya katı sıvı ekstraksiyonu örnek hazırlama yöntemleri olarak kullanılabilir. Bitkisel kaynaklı gıdalarda en kullanışlı yöntem su veya tampon çözelti ile yapılan çözgen ekstraksiyonu ve sonrasında da santrifüjleme işlemidir. Sıvı örnekler de yağlı ve yağsız olarak sınıflandırılabilirken burada da sıvı sıvı ekstraksiyon, katı faz ekstraksiyon veya bulutlanma noktası ekstraksiyonu uygulanabilir (Ruzik 2012).

2.6.1. Metal analizleri için kullanılan örnek hazırlama ve analiz yöntemleri

Çoğu organik ve inorganik matrikslerde aletli analiz öncesi kısmi veya tam çözünürleştirme ile örnek hazırlama gereklidir (de Oliveira 2003); zira AAS, grafit fırınlı atomik absorpsiyon spektrometresi (GFAAS), ICP-OES veya ICP-MS' te örnekler sıvı formda ölçülür. Yaş ve kuru kül etme yöntemleri uzun ve yavaştır. Bu nedenle mikrodalga ile mineralizasyon daha çok kabul görmüştür (Tuzen 2002). Örnek hazırlama tüm analiz süresinin % 61–80' ini oluştururken toplam analiz hatasının yaklaşık % 30'unun da nedenidir (de Oliveira 2003, Buszewski ve Szultka 2012)

Gıdalarda metal tayininde örnek hazırlama için; kuru kül etme, yaş yakma, mikrodalga parçalama, ultrasonik ekstraksiyon, bulamaç oluşturma, doğrudan katı örnekleme gibi teknikler kullanılabilir (Korn ve ark. 2008). Seyreltme, çöktürme, filtrasyon, santrifüjleme gibi ön basamaklar ile en iyi ayırma; ayrıca belirleme yöntemleri kullanılsa da genellikle analiti matriksten ayırmak ve zenginleştirmek için ekstraksiyon gerekir. Bu bağlamda en yaygın kullanılan örnek hazırlama yöntemi sıvı sıvı ekstraksiyon (LLE) iken alternatif olarak katı faz ekstraksiyonundan da yararlanılabilmektedir (Buszewski ve Szultka 2012). Sıvı sıvı ekstraksiyon zaman alıcı ve fazla miktarda toksik organik çözgen kullanımı açısından oldukça zararlıdır. Özellikle kromatografik analizlerde daha hızlı, basit, ucuz ve çevre ile dost tekniklerin kullanımı önemlidir. Bu kapsamda yeni yaklaşımlar ise LLE' ye alternatif olarak ultrasonik ekstraksiyon (UAE), mikrodalga yardımcı ekstraksiyon (MAE), katı faz ekstraksiyon (SPE) ve mikroekstraksiyon tekniklerinin kullanılmasıdır (Cobzac ve Gocan 2011).

Yaş parçalama yöntemlerinde yükseltgen asitler kullanılarak organik yapı parçalanır ya da inorganik matriksten metal ekstrakte edilir. Genellikle derişik nitrik asit ve ısı uygulanır. Asidin gücü, oksitleyici veya kompleksleştirici etkisi, kaynama noktası, oluşan tuzların çözünürlüğü, kullanım güvenilirliğı ve saflığı önemlidir. Yaş yöntemlerde termal, ultrasonik veya radyasyon enerjisi (infrared, ultraviyole ve mikrodalga) kullanılabilir (de Oliveira 2003).

Örnek hazırlamada kullanılan asit tipi ölçümlerde de önemlidir. Yaygın olarak bilinen atomik spektroskopik tekniklerde nitrik asit en çok tercih edilen reaktiftir. Örnek ve standartlarda aynı derişimde olmak kaydıyla % 10 (v/v) nitrik asit derişimi ve bazen de daha yükseğine kadar nitrik asit içeriğı bile analitik bir probleme yol açmaz. Mineralizasyonda çoğunlukla kullanılan hidrojen peroksitin de analitik bir probleme yol açması nadiren görülür. Nitrik asit aromatik ve alifatik organik materyal ile reaksiyona girer. Oksidasyon, esterifikasyon, nitrasyon reaksiyonlarına yol açarak basit karboksilik asitler oluşturur. Bu asit yaklaşık 120 °C' de kaynar. Bu, hem ortamdan uzaklaşmasını kolaylaştıran hem de aynı zamanda etkinliğini kısıtlayan bir durumdur. Etkin oksidasyon için nitrik asit ile sülfürik asit (daha zor parçalanan materyal için), perklorik asit (nitrik asit uzaklaştırıldıktan sonra oksidasyonun devamı için) veya hidrojen peroksit kullanılabilir (Hoenig 2001).

Yaş örnekleme nin uygulanabilirliğı gıda tipine de bağılıdır. Karbonhidratlar nitrik asit ile 180 °C' de kolaylıkla mineralize olurken; yağ, protein ve amino asitler nitrik asidin oksidasyon gücünün az olması nedeni ile tam parçalanmazlar. Bu durumda sülfürik asit ve perklorik asit kullanılabilir. Nitrik asit bazen % 10 (v/v) derişimden fazlasında ve örnek-kalibrasyon çözeltilerinin derişiminde benzerlik olması kaydı ile analitik bir probleme yol açmadan kullanılabilirken; hidroklorik asit ICP-OES için problem yaratmasa da GFAAS' de analit klorürleri oluşabilmesi nedeni ile kullanımı sakıncalıdır. Sisleştiriciye dayanan ICP-OES, AAS veya ICP-MS'te ise sülfürik asit problem oluşturmaktadır (Korn ve ark. 2008). Yine ICP-MS' te izobarik girişimleri en aza indirmek için hidroklorik asit kullanımından kaçınılmaktadır (Hoenig ve Kersabiec 1996).

Örnek hazırlama sonrası analiz boyutunda öncelikle seçicilik olmalı ve belirleme limiti (dedektör duyarlılığı ve gürültü seviyesi) örnekteki düzeye uygun olmalıdır. İkili tekniklerde tür seçiciliğini sağlayan kısım kromatografi ya da elektroforez; element seçiciliğini sağlayan kısım ise atomik spektrometrik tekniktir. Tür seçici teknikler Mössbauer spektroskopisi, X-ışınları fotoelektron spektroskopisi veya elektron spin rezonans spektroskopisi ya da elektrokimyasal teknikler, ultraeser seviyeler için gerçek örneklerde yetersiz kalmakta ve böylece yaş örnek hazırlama tekniklerini takiben ikili teknikler önem arz etmektedir. İkili tekniklerde türlendirme analizleri için de etkin örnek hazırlama işlemleri gerekir. Kromatografiden önce analitler matriksten ayrılmalı, ön deriştirilmeli, veya çoğunlukla türevlendirilmelidir (GC için). Bazı klinik örnekler (serum, idrar gibi) ya da endüstriyel örnekler sadece seyrelme ile doğrudan analizlenebilir. Gaz ve sıvı örnekler genellikle 0,45 mikrometrelik filtreden süzülür; çözünen ve partiküle faz olarak ayrılır. Katı örneklerde analit, örnek matriksinden ayrılmalıdır. Çözünürleştirme gibi teknikler de belli matriksler için yeterli olabilmektedir (Lobinski 1998).

Türlendirme çalışmaları açısından ekstraksiyon tekniği, örnekte herhangi bir kirlilik ya da kayıp olmadan ve orijinal formu değişmeden analiti matriksten ayırmaya imkan vermelidir. Ekstraksiyon tekniği ve ekstraksiyon çözgeni seçilirken analitin kimyasal özellikleri, kimyasal formları, matriks ve analiz tekniği göz önüne alınmalıdır (Ruzik 2012).

Türlendirme çalışmalarında kompleks örneklerdeki elementlerin biyoerişilebilirliği duyar analitik tekniklere olan gereksinimi artırır. GFAAS, ICP-OES, ICP-MS gibi teknikler bu anlamda önemli iken; doğrudan gerçek örnekler için uygulamaları matriks etkileri nedeniyle sınırlıdır. Bu durumda GC ve HPLC ayırma tekniklerinin ICP-MS gibi dedektör işlevi gören cihazlar ile birlikte kullanılması da türlendirme çalışmalarında önemlidir (Burguera ve Burguera 2009). Günümüzde HPLC veya CE gibi ayırma tekniklerinin atomik spektrometrik teknikler (ETAAS veya GFAAS, ICP-OES veya ICP-MS) ile birlikte kullanıldığı birleşik teknikler görülmektedir. (Ruzik 2012).

2.6.2. Katı örneklerin çözünürleştirilmesi ve açık sistem örnek hazırlama

Doğrudan katı örnekleme müsaade eden lazer spektroskopik teknikler gibi (Sneddon ve ark. 2006) farklı analiz teknikleri bulunsa da (Hoenig ve Kersabiec 1996, Hoenig 2001, de Oliveira 2003) katı örnekler analiz gereksinimlerini karşılayamayacak kadar heterojendir (Srogi 2008). İyileştirilmiş kesinlik ve doğruluk katı matriksten ziyade çözülmüş, homojen örneklerde sağlanır (Sneddon ve ark. 2006) ve çözünürleştirme ile toplam analit geri kazanımı da artar (Hoenig ve Kersabiec 1996). Ayrıca metal tayinlerinde kullanılan çoğu ticari cihaz da optimum şartlarda, çözelti formu ile çalışmayı gerekli kılmaktadır. Bu nedenle atomik spektrometrik metotlarda (alev veya grafit fırınlı AAS, ICP-AES (çoğunlukla indüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometresi olarak da adlandırılır) ya da ICP-MS) genellikle katı örneklerin parçalanması veya çözünürleştirilmesi gerekir. Böylece atomik spektroskopide örnek hazırlama hala önemli bir kısım olarak görülmektedir (Sneddon ve ark. 2006).

Amaca yönelik olarak kullanılacak klasik metotlar arasında yaş veya kuru çözünürleştirme (kuru kül etme) metotları bulunmaktadır. Yaş yakma veya asit ile parçalama yöntemlerinde mineral asitler ile hidrojen peroksit gibi oksitleyiciler kullanılır. Ayrıca kullanılacak tekniğe göre asit seçimi de önemlidir (Sneddon ve ark. 2006).

Örnek hazırlamada uzun yıllardır kullanılagelen açık sistemler, gıda gibi nispeten daha kolay matriksler için elverişli olup; bir-yirmi dört saat gibi sürelerde tam olarak parçalanabilen örnekler için uygun değildir. Ayrıca zahmetli, zaman alıcı olabilir ve uçucu analitlerin buharlaşarak kaybı ile sonuçlanabilir. Kapalı sistemler yüksek basınç sağlar; bu da yüksek kaynama sıcaklıklarına ve sonuç olarak da çoğu örneğin tam çözünürleşmesine imkan verir. Kapalı sistemlerin en yaygın kullanılan şekli, mikrodalga parçalama metotlarıdır (Sneddon ve ark. 2006).

Klasik açık sistemlerde (atmosferik basınçta parçalama) çözünürleştirme işlemleri için genellikle cam veya PTFE (politetrafloretilen, teflon) bir kapta ve ısıtıcı üzerinde çalışılır. Bu amaç ile kurutulmuş veya yaş örnek mineralizasyonda kullanılacak kap

içine tartılarak, üzerine de reaktifler ilave edilir. Karışım kaynayınca dek ısıtılır. Isıtma süresi de örneğin tam parçalanmasına ve çözünmesine kadar devam eder. Soğutma sonrası çözelti bir balon jöjeye aktarılarak hacim çizgisine tamamlanır. Çözünmeyen partiküler yapı kalıyor ise süzme veya santrifüjleme ile ortamdan ayrılır. Eğer bileşimi konusunda şüphe var ise ayrılarak farklı bir analitik işlem ile ayrıca çözülüp yine ayrı olarak analiz edilebilir (Hoenig 2001).

2.6.3. Mikrodalga yöntemleri

Mikrodalga metotlarında elektromanyetik radyasyon ile parçalama gerçekleşir. Mikrodalgaların polar molekül ile etkileşmesi ile başlayan süreç sonunda; moleküllerdeki dönme hareketleri ve moleküller arası çarpışma ısı üretir. Mikrodalga parçalama hızı kullanılan asite de bağlıdır. Metot, açık sistem örnek hazırlamaya göre daha güvenlidir. Ayrıca programlanabilir ve pek çok örneğe de uygulanabilir (Sneddon ve ark. 2006) Mikrodalga parçalama yöntemlerinde genellikle HNO_3 , $\text{HNO}_3 + \text{HCl}$, $\text{HNO}_3 + \text{HCl} + \text{HF}$, $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$, $\text{HNO}_3 + \text{HF}$, $\text{HF} + \text{HCl}$, $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$, ve kral suyu (aqua regia) gibi asit karışımları kullanılır (Srogi 2008).

Mikrodalga tekniklerde mikrodalga radyasyonun örnek ile etkileşimi iyonik migrasyon ve dipol rotasyona neden olur. Bu da karışımın hızlı ısıtmayı takiben parçalanmasına yol açar. Yöntemin avantajı kısa süre gerektirmesi, örneğin ve reaktiflerin doğrudan ısıtılması (kaplar dolaylı olarak ısınmış çözelti ile ısınır), kirliliklerin en az düzeyde olması ve uçucu elementlerin kaybedilmemesi ya da kör örnek sinyalini düşürecek düzeyde az reaktif kullanımıdır. Bu teknikte sıcaklık ve güç programlaması yapılabilir. Kullanılan bazı asitlerin atmosferik basınçta ve 7×10^5 Pa basınçta kapalı kaplarda kaynama noktaları ve atmosferik basınçları Çizelge 2.6.3.1'de verilmektedir. Biyolojik veya gıda örneklerinde nitrik asit ile hidrojen peroksit; viskoz yağlarda, polivinil klorür çipler, polipropilen, poliamid, polyester ve bazı gıdalarda (ıspanak, fıstık türevi vb.) sülfürik asit-hidrojen peroksit; inorganik materyal alaşımı, toprak ve çökellerde ise nitrik asit- hidroklorik asit gibi asit karışımları kullanılabilir (de Oliveira 2003).

Çizelge 2.6.3.1. Derişik asitler ve kral suyunun atmosferik basınç ve 7×10^5 Pa basınçta kaynama noktaları (de Oliveira 2003' ten özetlenerek alınmıştır)

Asit	Derişim %, m/v	Atmosferik Basınçta Kaynama noktası	7×10^5 Pa Basınçta Kaynama noktası
HCl	37	110	140
HF	49	108	175
HNO ₃	70	120	190
HCl:HNO ₃ (3:1 v/v) (kral suyu)	-	112	146
H ₂ SO ₄	98,3	338	-
H ₃ PO ₄	85	150	-
HClO ₄	72,4	203	-

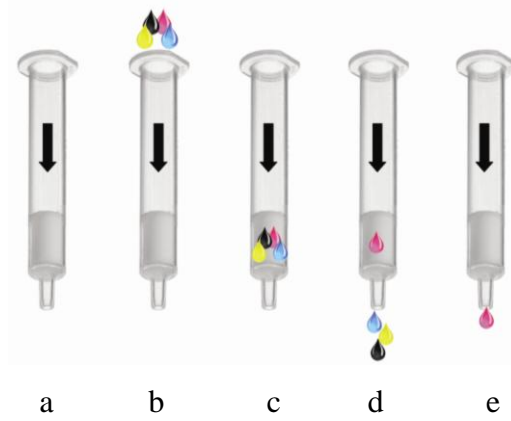
2.6.4. Ultrasonik banyoya dayalı ekstraksiyon teknikleri

Yaygın yaş yakma yöntemlerine alternatif yeşil analitik örnek hazırlama teknikleri olarak; bulamaç oluşturma, ultrasonik banyo veya ultrasonik prob ya da mikrodalgaya dayalı ekstraksiyon teknikleri ve enzimatik hidroliz teknikleri kullanılabilir. Bunlardan ultrasonik banyoda yapılan ekstraksiyon, sıcaklık kontrollü veya sıcaklık kontrollü olmayan bir tank içinde gerçekleştirilir. Genellikle tankın altındaki ultrasonik dönüştürücü, ultrasonik enerjiyi sıvıya (genellikle ultra saf suya) transfer eder. Örnek hücresinin yatay veya dikey konumda olması da önemlidir; zira her noktadaki ultrasonik enerji aynı olmamaktadır. Bu durum reaksiyon hücresinin içi için de geçerlidir. Ayrıca, ultrasonik frekans ve güç yukarıda değinilen ve farklı ticari ultrasonik banyolardaki dönüştürücülere de bağlı olduğundan deneysel şartların karşılaştırılmasını zorlaştırır. Metal kirliliğini azaltan yapıda olan ultrasonik problemler kullanıldığında yukarıda değinilen sorunlar ortadan kaldırılabilir. Prob, doğrudan reaksiyon hücresine daldırıldığından ultrasonik enerji de sadece reaksiyon ortamı tarafından absorbe edilir. Bu da etkinliği artırır. Ultrasonik banyoda metal geri kazanımını artırmak için sıcaklık da kullanılabilir. Bu teknikte katı bir matriksten metal geri kazanımı eser element ve örneğin doğasına bağlıdır. Ayrıca analit ve matriks bileşenleri arası bağlar ve kullanılan asit çözeltisine bağlı olup sıcaklık da gerekli olabilmektedir (Moreda-Pineiro ve ark 2009).

2.6.5. Katı faz ekstraksiyonu

Çevre, jeolojik veya biyolojik örneklerde yüksek miktarda olan ve girişim etkisi yaratan matriks bileşenleri yanında düşük derişimde bulun eser elementlerin analizi için çoğu kez matriksten ayırma ve zenginleştirme işlemleri gereklidir. Ayırma ve önderiştirme için de katı faz ekstraksiyon, sıvı sıvı ekstraksiyon, bulutlanma noktası ekstraksiyonu, sıvı membran, elektroanalitik teknikler, iyon değimi, mikrodalga ekstraksiyonu ya da birlikte çöktürme gibi yaklaşımların kullanılabilceğı belirtilmiştir (Srogi 2008). Bunlar arasında katı faz ekstraksiyonu örneklerdeki analitin matriksten ayrılması veya önderiştirilmesinde basitliğı yanında; düşük miktarda organik çözen kullanımını ve yüksek zenginleştirme faktörlerine ulaşılmasını sağladığından en yaygın kullanılan örnek hazırlama tekniklerinden biridir (Zhang ve ark. 2011, Ramos 2012). Ticari olarak mevcut pek çok dolgu maddesinin varlığı da farklı kimyasal yapı ve polaritedeki analitler için bu örnek hazırlama tekniğini uygun hale getirir (Ramos 2012) . Bununla birlikte; analitik duyarlığı, seçiciliğı ve kesinliğı artıracak nitelikte yeni katı faz ekstraksiyon materyali arayışları ve geliştirilmesi de süregelmiştir (Zhang ve ark. 2011).

Katı faz ekstraksiyonunda genellikle sıvı örnek hareketsiz durgun fazdan geçirilir. Sonrasında uygun bir çözen ile ekstrakte edilir. Analit durgun faz (dolgu maddesi) ve sıvı hareketli faz arasında dağılır. Bileşenin durgun faza afinitesi örnek matriksinden daha büyük olmalıdır. Yöntem genellikle kolonun şartlandırılması, örnek yüklenmesi, yıkama ve örnek geri alınması olmak üzere dört basamaktan oluşur. Yıkama basamağı istenmeyen bileşiklerin uzaklaştırılması için gereklidir (Buszewski ve Szultka 2012). Katı faz ekstraksiyonuna ilişkin bu temel basamaklar tarafımızdan Şekil 2.6.5.1' e dönüştürülmüştür.

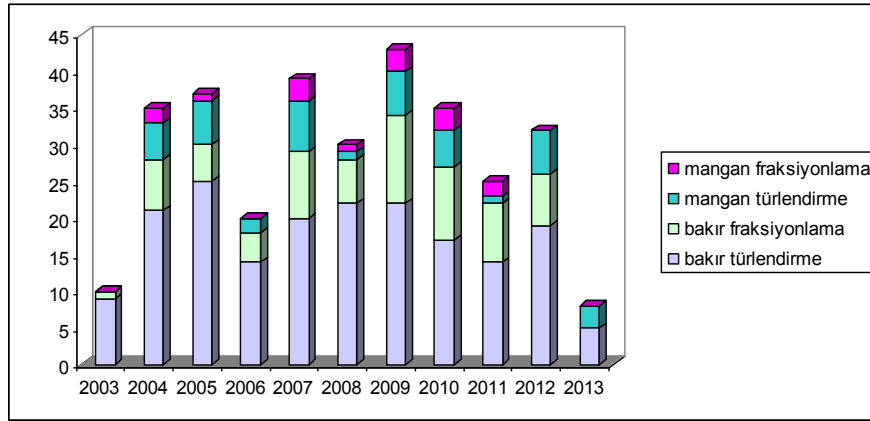


Şekil 2.6.5.1. Katı faz ekstraksiyonunun şematik gösterimi*

*a: şartlandırma, b, c: örnek yükleme, d: yıkama, e: elüsyon

2.6.6. Gıdalarda atomik spektroskopi ile türlendirme analizleri

Gıdalarda çeşitli miktarlarda ve tipik olarak altmıştan fazla element bulunabilir. Bu elementler genellikle iki gruba ayrılırlar: Temel tuz bileşenleri (K, Na, Ca, Mg, Cl, S, P ve C) ve eser elementler. Eser elementler genellikle 50 ppm'den azdır. Bunlar da besin değeri özelliği olanlar (Fe, Cu, I, Co, Mn, Zn, Cr, Ni, Si, F, Mo ve Se), besin değeri özelliği olmayan fakat toksik de olmayanlar (Al, B ve Sn) ya da besleyici olmayıp toksik olanlar (Hg, Pb, As, Cd ve Sb) olarak sınıflandırılabilirler. İlgili minerali içeren gıda maddesinin besin değeri özelliği sadece element içeriğine değil aynı zamanda ilgili elementin biyoyararlılığına da bağlıdır. Eser element türlendirmesi de biyolojik aktivitenin anlaşılmasında son derece önemlidir. Fakat lüzumlu/besleyici özellikteki elementler için türlendirme çalışmaları daha azdır (Ruzik 2012). Şekil 2.6.6.1' de mangan ve bakır için 2003–2013 yılları arasındaki yayın sayıları tarafımızdan çizilerek gösterilmiştir. Gıdalar söz konusu olduğunda bu sayılara ulaşmamaktadır.



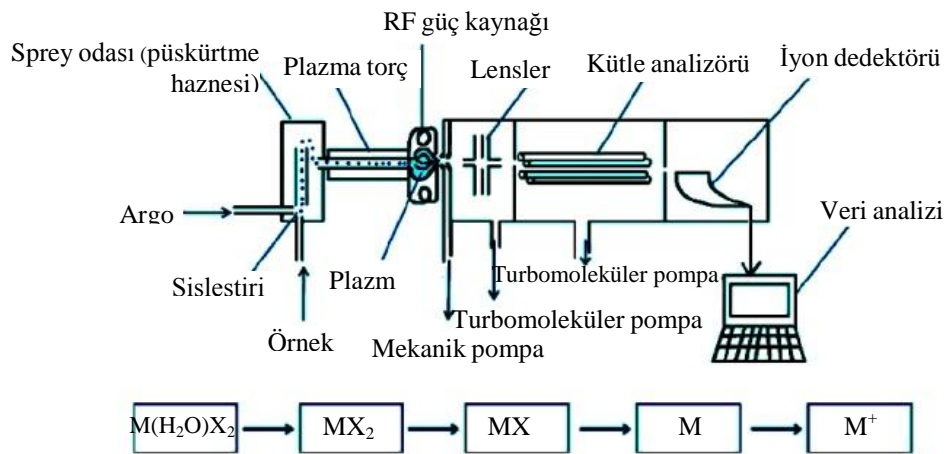
Şekil 2.6.6.1. 2003–04–27 ve 2013–04–27 tarihleri arasında mangan veya bakır türlendirilmesi ve fraksiyonlaması ile ilgili yayın sayıları*

* Web of Science verilerine göre elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: (başlıkta) manganese speciation/fractionation veya copper fractionation/speciation

2.7. ICP-MS

ICP-MS, farklı örnek matrislerinde eser ve ultra eser seviyede ve aynı anda pek çok ağır metalin hızlı tayinini sağlayan en duyarlı analitik tekniklerden biridir. (Rao ve Talluri 2007). 1983' lerde ticari olarak piyasaya sürülen ICP-MS cihazı; örnek enjeksiyon kısmı, ICP kısmı, arayüz, kütle ayırma ve belirleme kısmı olmak üzere beş temel parçadan oluşmaktadır ve bunlar da Şekil 2.7.1' de görülmektedir (Ha ve ark. 2011)



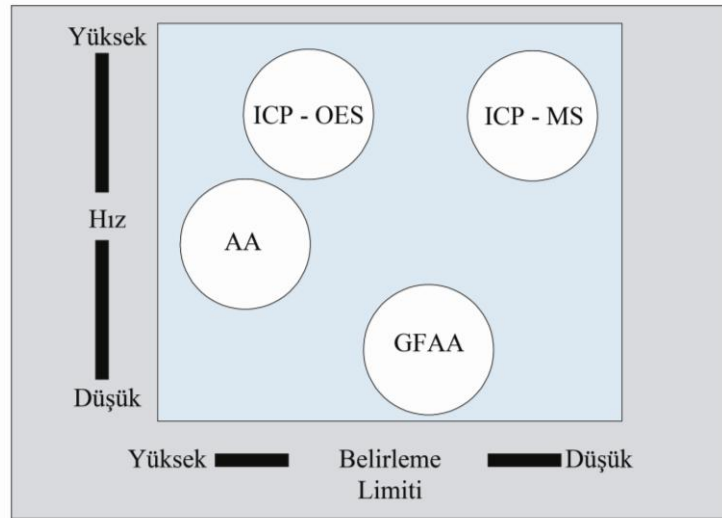
Örnek enjeksiyon kısmı sisleştirici ve püskürtme haznesinden oluşurken; bu kesim lazer ablasyon (LA), LC veya CE' ye bağlanabilir. Enjektör sistemi sıvı örnekler için tasarlanmıştır. Bu nedenle örnekler oldukça saf asitler kullanılarak çözünürleştirilmelidir. Yüze analizlerine olanak veren LA ile katı olarak analiz de mümkündür. Argon gazı ve radyofrekans (RF) güç ile plazma oluşturulur ve plazma sıcaklığı 6000-10000 K'e ulaşır. Burada örnek +1 yüklü iyonlarına çevrilir. Pozitif yüklü iyon oluşma mekanizması basitçe yukarıdaki şekilde (bkz. Şekil 2.7.1) verilmiştir. Pozitif yüklü iyon akışı ICP (1,000 mbar) ve MS (10^{-6} mbar) kısımlarını bağlayan arayüze yönelir. Bu yönelmede sampler ve skimmer konileri ile iyon optikleri önemlidir. İyon optikler de iyonik olmayan türlerin, foton ve nötral türlerin dedektöre ulaşmasını engeller. Vakum düşük düzeyde tutulur. Soğutma ICP sıcaklığından koruma amaçlıdır. Pozitif iyonlar Ar^+ ve O ile bazı girişimlerin oluşmasına da yol açabilir. ICP-OES ile kıyaslandığında girişim yapan moleküllerin ayrılması önemlidir. Bunun için dinamik reaksiyon veya çarpışma hücreleri ile analiz edilecek elementler girişimlerden ayrılır. Dedektörde, çok düşük (yaklaşık ppq (katrilyonda bir kısım) seviyesinde) ve nispeten çok yüksek (yaklaşık ppm (milyonda bir kısım seviyesinde)) derişimler arası tayin gerçekleştirmek için sinyal artırıcılar gereklidir. Bu amaçla ticari olarak farklı elektron çoğaltıcılar (dinod gibi) ve faraday kabı kullanılabilir (Ha ve ark. 2011).

Yaygın ICP-MS analizlerinde sıvı fazdaki örnekler, peristaltik pompa ile sürekli ve dakikada belirli mL' lik hacim değerinde akış hızları ile sisleştiriciye iletilirler. Burada yaklaşık 1 mL dk^{-1} argon gazı ile ince sis haline dönüştürülen örnekler (% 1-2 lik kısmı) daha büyük damlacıklardan bu haznede (sprey odası, püskürtme haznesi) ayrılarak atılır ve kalan kısım, sprej odasının çıkış tüpünden geçip enjektör vasıtası ile torç kısmına iletilir. Yatay olarak konumlandırılmış torç kısmında argon gazı radyofrekans güç ile plazma halinde çok yüksek sıcaklıklara ulaşır (yaklaşık 10000 K) (Thomas 2004). Bu sıcaklıklarda numunede atomlaşma sonucu pozitif yüklü iyonlar meydana gelir; aynı zamanda bu sıcaklıklarda kimyasal girişimler azalır (Anonim 2004a). Bu iyonlar mekanik pompa ile 1–2 torr'luk vakum altında tutulan arayüzden geçer (vakum aynı zamanda birçok Ar atomunu da ortamdan uzaklaştırır). Arayüz sampler ve skimmer konileri olarak adlandırılan ve 0,6–1,2 mm delikli iki metal koniden oluşur. Bu parçalar pozitif yüklü iyonların süzülerek iyon optiklere geçimini sağlar. Buradan kütle filtresi

olarak görev yapan iyon ayırıcı kuadropole iletilir. İyonlar “kütle/yük” oranlarına göre ayrılarak iyon dedektörünün aktif yüzeyine (dinod olarak bilinir) çarparlar ve elektron yayarak ölçülebilir bir elektronik sinyal oluştururlar (Thomas 2004).

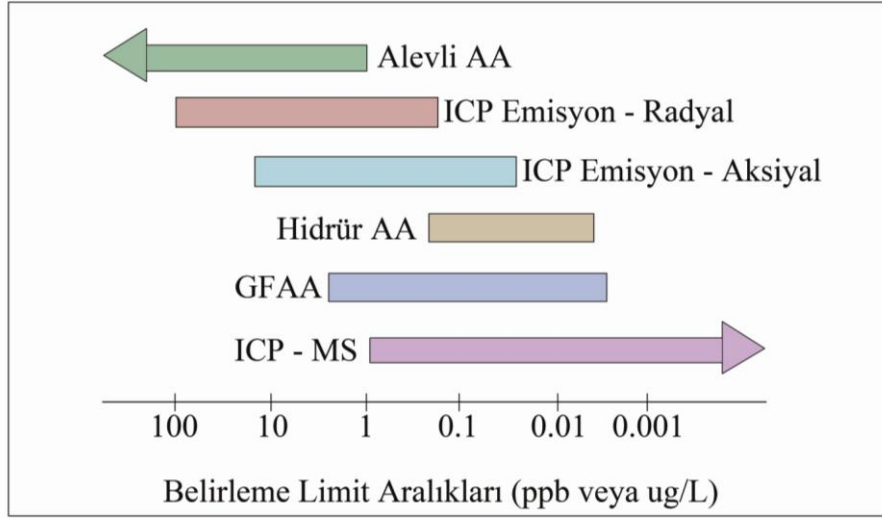
Gıda, çevre, jeolojik, yarı iletken, biyomedikal ve nükleer alandaki çalışmalarda uygulama alanı bulan ICP-MS (Thomas 2004), düşük belirleme limitleri, eş zamanlı çoklu element analizlerine imkan vermesi, geniş dinamik aralığa sahip olması, izotopik oranların ölçümüne olanak vermesi gibi nedenler ile çeşitli matrikslerde ve pek çok element analizinde oldukça önemli bir tekniktir (Nardi ve ark. 2009). Ayrıca türlendirme analizlerinde seçici ve duyarlı bir dedektör olarak ikili tekniklerde de yer almaktadır (Batista ve ark. 2011). Diğer elementel tayin imkanı veren teknikler ile karşılaştırılması aşağıda belirtilen şekillerde görülmektedir.

Şekil 2.7.2-Şekil 2.7.4'te ICP-MS'in diğer atomik spektroskopik teknikler ile farklı açılardan kıyaslanması ve Şekil 2.7.5'te ise ICP-MS ile tayin edilebilen elementler ve bu elementlerin belirlenme limitleri gösterilmiştir (Anonim 2004a).



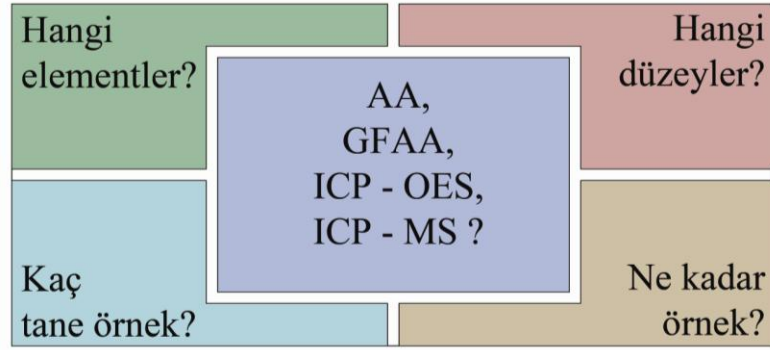
Şekil 2.7.2. Element analizi için analitik spektroskopik teknik seçimi (Anonim 2004a)*

* = PerkinElmer'in izni ile alınmıştır. (“©2004-2013 PerkinElmer, Inc. All rights reserved.”)



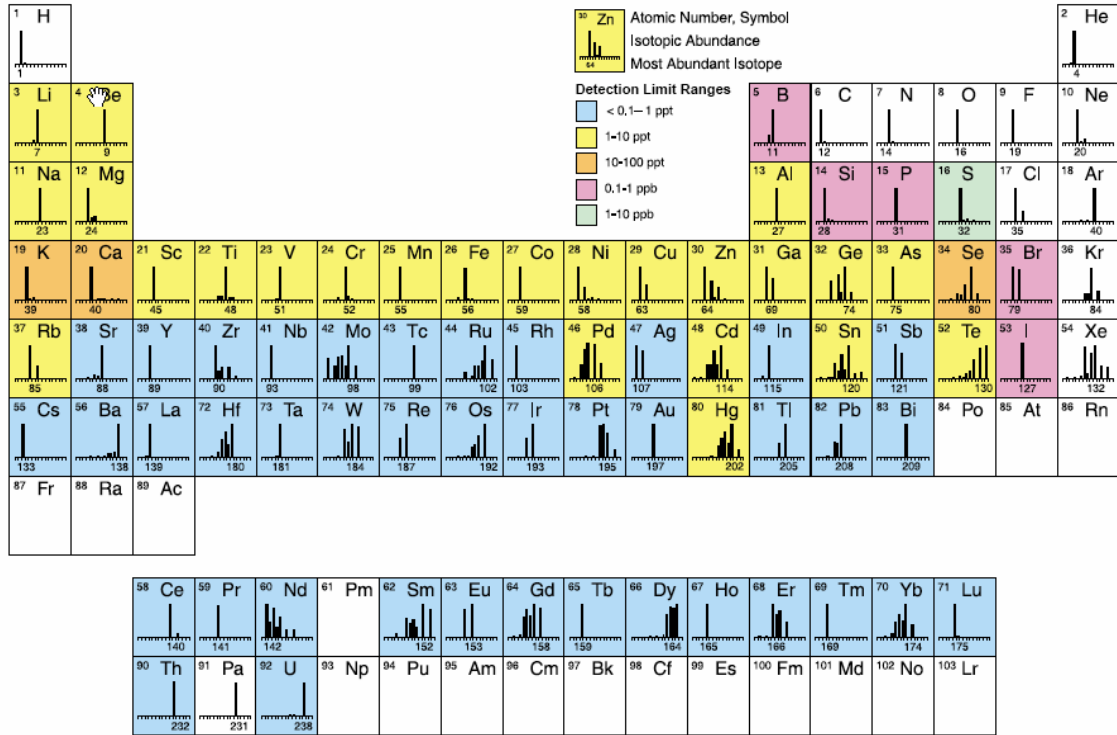
Şekil 2.7.3. Atomik spektroskopik yöntemlerdeki belirleme limitlerinin ICP-MS ile karşılaştırılması (Anonim 2004a)*

* = PerkinElmer'in izni ile alınmıştır. ("©2004-2013 PerkinElmer, Inc. All rights reserved.")



Şekil 2.7.4. Elementel analiz için atomik spektroskopik teknik seçiminde önemli parametreler (Anonim 2004a)*

* = PerkinElmer'in izni ile alınmıştır. ("©2004-2013 PerkinElmer, Inc. All rights reserved.")



Şekil 2.7.5. ICP-MS ile tayin edilebilen elementler ve belirleme limitleri (Anonim 2004a)*

* = PerkinElmer'in izni ile alınmıştır. ("©2004-2013 PerkinElmer, Inc. All rights reserved.")

2.7.1. ICP-MS analizlerinde girişimler ve türlendirme analizleri

ICP-MS eser ve ultra eser element analizlerinde pek çok element için yüksek duyarlılığı nedeni ile oldukça güçlü bir tekniktir. Bununla birlikte girişimlerden uzak değildir; özellikle spektroskopik girişimlere ve matris etkilerine dayalı girişimlere açıktır. Spektroskopik girişimler yüksek çözünürlüklü (HR) ICP-MS ve çarpışma/reaksiyon hücreleri kullanılarak en aza indirilebilir. Yine de bu teknikler pahalıdır ve örnekler doğrudan analiz edildiğinde matris etkilerine açıktır. Bu nedenle matris bileşenlerinden analiti ayıracak ve önderiştirecek örnek hazırlama metotlarına ihtiyaç vardır (Zhang ve ark. 2011).

ICP-MS' in temel sınırlılıklarından biri atomik veya poliatomik türlerden kaynaklanan ve analit ile aynı "kütle/yük, m/z " oranına sahip poliatomik girişimlerin varlığıdır

(D'Illo ve ark. 2006). ICP-MS'te görülen yaygın girişimlere örnekler Çizelge 2.7.1.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.7.1.1. ICP-MS'te karşılaşılan yaygın poliatomik girişimlere örnekler (Anonim 2004b)

Girişim yapan poliatomik tür	Belirlenen Analit	Girişim yapan poliatomik tür	Belirlenen Analit
$^{12}\text{C}^{15}\text{N}$, $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^1\text{H}$	^{27}Al	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$	^{52}Cr
$^{38}\text{Ar}^1\text{H}$	^{39}K	$^{38}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}$	^{55}Mn
^{40}Ar	^{40}Ca	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$	^{56}Fe
$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$	^{51}V	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}$	^{57}Fe
$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}$	^{52}Cr	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$	^{75}As
$^{36}\text{Ar}^{16}\text{O}$	^{52}Cr	ArAr	^{80}Se

* = PerkinElmer'in izni ile alınmıştır. ("©2004-2013 PerkinElmer, Inc. All rights reserved.")

İzobarik, çift yüklü veya poliatomik girişimler, spektral girişimlere örnek olarak verilebilir. Spektral olmayan girişimler iç standart kullanılarak ya da matrikse benzetilen kalibrasyon çalışmaları ile giderilebilirken; örnek matriksi ile argon plazma, hava ve su arası reaksiyonlar poliatomik girişimlere yol açabilir. Matriks girişimi, yüksek organik içerikten kaynaklanır. Kullanılan argon gazı, argon temelli bazı poliatomik iyonları oluşturarak poliatomik, girişimlere neden olabilir. Örneğin $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$, $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$, $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$, and $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ gibi türler ^{52}Cr , ^{56}Fe , ^{75}As , and ^{80}Se ile örtüşerek girişime neden olabilir. Bu nedenle kuadropol ICP-MS sistemi ile bu elementler için düşük belirleme limitlerine ulaşamaz. Geliştirilen teknolojiler ile poliatomik girişimler giderilmeye çalışılmıştır (Pick ve ark. 2010). Girişim varlığında, izobarik iyondan etkilenmeyen alternatif izotop seçimi (düşük duyarlılık ve arsenik, kobalt gibi tek izotoplu elementler bu stratejinin uygulanabilirliği sınırlandırır) veya matematiksel düzeltme eşitliklerinin kullanımı (bu yöntem basitliğine rağmen örnekte yüksek girişim etkisi yapan türler varsa ya da plazmada oluşuyorlarsa etkili değildir) önemli yaklaşımlardır (Amatis ve ark. 2011). Poliatomik girişimleri azaltmak için diğer teknolojik yaklaşımlar arasında soğuk plazma kullanımı, dinamik reaksiyon hücreli

(DRC) ICP-MS (ICP-DRC-MS), çarpışma reaksiyon arayüzü ve sektör alanlı ICP-MS bulunmaktadır (Pick ve ark. 2010). Örnek hazırlama basamağı açısından gıda gibi matrisler, yüksek karbon içeriğinin azaltılması için uygun metotlar ile parçalanmalıdır (Nardi ve ark. 2009).

Tez kapsamında incelenen elementler açısından irdelenirse; Mn tek izotoplu olup gürültü ve zemin çizgisi sinyali arttığından kompleks matrislerde analizi zor olabilmektedir; zira pikler kısmen de olsa girişim etkisi gösteren sinyallerin altında kalabilir. DRC tekniği kullanıldığında “sinyal/gürültü” oranında iyileşme ve daha büyük duyarlılık görülmektedir. Sonuç olarak zemin çizgisi sinyali düşmekte ve pikler yükselmektedir. Bu iyileşmeler girişimlerin azalması ile açıklanabilir (Quintana ve ark. 2005). ^{55}Mn için temel potansiyel girişimlerden bazıları özetle şöyle belirtilmiştir: $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^+\text{H}^+$, $^{39}\text{K}^{16}\text{O}^+$, $^{37}\text{Cl}^{18}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}^+$, $^{38}\text{Ar}^{17}\text{O}^+$, $^{36}\text{Ar}^{18}\text{O}^+\text{H}^+$, $^{38}\text{Ar}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$, $^{37}\text{Cl}^{17}\text{O}^+\text{H}^+$ ve $^{23}\text{Na}^{32}\text{S}^+$ (Quintana ve ark. 2005, D’llo ve ark. 2006). Buna ilave olarak; $^{14}\text{N} + ^{41}\text{K}$, $^1\text{H} + ^{54}\text{Cr}$, $^{15}\text{N} + ^{40}\text{Ar}$, $^{15}\text{N} + ^{40}\text{Ca}$, $^{12}\text{C} + ^{43}\text{Ca}$ ve $^1\text{H} + ^{54}\text{Fe}$ birleşimleri mangan elementinin izotop kütlesi ile aynı kütledeki potansiyel poliatomik interferensler olarak verilebilir. Dinamik reaksiyon veya çarpışma hücre teknolojileri, bu tip poliatomik girişimlerin duyarlılık kaybı olmadan giderilmesi alternatifini sağlar (Richardson ve ark. 2012).

ICP-MS’de klinik örnekler, deniz suyu, toprak ve bitki örneği gibi yüksek oranda alkali metal içeren örneklerin analizinde “kütle/yük” oranı 63 ve 65 olan argon temelli poliatomik girişimler önemlidir (Chrastny ve Komarek 2009). Böylece bakır izotopları $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$ ve $^{40}\text{Ar}^{25}\text{Mg}^+$ varlığından etkilenir. Yüksek oranda alkali metal içeren örneklerde bağıl bollukları sırası ile % 69,17 ve % 30,83 olan $^{63}\text{Cu}^+$ ve $^{65}\text{Cu}^+$ izotoplarının tayini; $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$, $^{44}\text{Ca}^{18}\text{OH}^+$, $^{40}\text{Ar}^{25}\text{Mg}^+$ ve $^{48}\text{Ca}^{16}\text{OH}^+$ poliatomik iyonlarının oluşumundan etkilenebilir. Bu izotoplar için genellikle matematiksel düzeltme eşitlikleri yoktur. Girişimlerin giderilmesi için farklı yaklaşımlar önem kazanır. Örneğin; Na^+ , Mg^+ ve Ca^{2+} , $\text{Mg}(\text{OH})_2$ gibi bir formda çöktürülmek sureti ile uzaklaştırılabilir, iyon değiştirici reçineler kullanılabilir ya da yüksek çözünürlüklü manyetik sektör ICP-MS gibi aletsel uygulamalara başvurulabilir (Fialho ve ark. 2011).

Elementin toksisite ve biyoyararlılığı kimyasal formuna bağılı olduğundan türlendirme çalışmaları özellikle toksik elementlerde risk değerlendirilmesi açısından önemlidir. ICP-MS'te tam iyonlaşma nedeni ile analit ile ilgili moleküler bilgi edinilemez yani bu teknik ile türden bağımsız bilgi edinilebilir. İlgili element için sadece bir elementel tür nicel tayin amacı ile kullanılabilir. Bilinmeyen türler varlığında ya da ilgili türlerin standartları mevcut olmadığında bu durum yararlı olarak görülebilir; zira türlerin ayrılması için LC, GC veya CE kullanıldığında farklı türler için pik genişlikleri farklı olacağından belirleme limitleri de farklılık gösterebilecektir (Dressler ve ark. 2011).

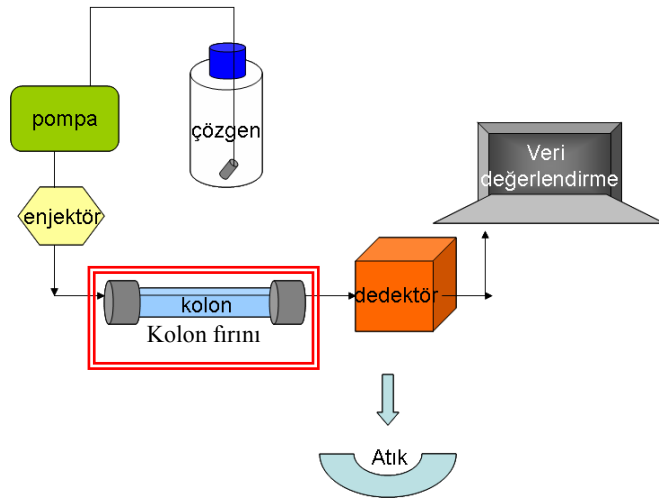
Çoğu türlendirme çalışmalarında kromatografik bir teknik (LC, GC, CE gibi) ile ICP-MS birleştirilerek farklı element türlerinin tayini için kullanılmaktadır. Yine de tür bilgileri ilgili türlerin standartları ile karşılaştırmak sureti ile elde edilir (Dressler ve ark. 2011).

2.8. HPLC

HPLC ilk kez 1969'larda ortaya çıktıktan sonra hızla gelişen bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. LC ayırmasının temelinde aynı şartlarda, bir karışımındaki bileşenlerin çevresinden farklı etkileşimleri yer almaktadır. Böylece karışımındaki bileşenlerin miktar ve saflık tayinleri yapılabilir. Diğer teknikler ile birleştirildiğinde ise karışımındaki bileşenlerin tespit edilmesini sağlar. Karışım çok kompleks yapıda ve bileşenlerin spektroskopik yöntemler gibi yöntemler ile doğrudan belirlenmesi mümkün değilse, analizlenecek bileşenler izomerler gibi çok benzer yapıda ise, yüksek saflıkta materyal hazırlanması ya da belirli bir bileşenin ölçümü söz konusu ise bir ayırma gereklidir ve HPLC bu anlamda kompleks karışımlara yönelik daha büyük kesinlik ve yüksek ayırma gücü ile basit sıvı kromatografik yöntemlere göre daha hızlı ve iyidir. Örneğin analizi öncesi gerekli parametrelerin belirlenmesi uzun zaman alabilir. Deneyim ve literatür bilgisi de bu aşamada önemlidir (Bidlingmeyer 1992).

HPLC bütün analitik teknikler arasında satışı ile en yaygın olanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri, duyarlılığı, doğru kantitatif tayinlere kolaylıkla uygulanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen

türlerin ayrılmasına uygun olması ve hepsinden de önemlisi sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci dereceden ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu gibi maddelere örnek olarak amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal-organik türler ve çeşitli inorganik bileşikler sayılabilir (Skoog ve ark. 1998a). Bir HPLC cihazının temel bileşenleri tarafımızca çizilerek Şekil 2.8.1' de belirtilmiştir.



Şekil 2.8.1. HPLC cihazının temel bileşenleri

HPLC tekniğinde örnek uygun bir çözücüde çözülür. Kolon girişine iletilir (enjekte edilir). Sonrasında örnek, içinde çözülebilen ve sürekli geçişi olan hareketli faz ile kolonda taşınır. Ayrılma işlemi, durgun faz olarak da adlandırılan ve partiküler yapı içeren kolonda gerçekleşir. Hareketli fazlar bileşenlerin matriksteki doğası gereği kompleks olmalı ve bileşimindeki değişiklikler ile ayırma sağlanabilmelidir (Bidingmeyer 1992).

HPLC kolonunun verimliliği tanecik boyutu azaldığında çarpıcı bir şekilde artmaktadır. Modern sıvı kromatografi sistemlerinde genel olarak kullanılan ve tanecik boyutu 2 ile 10 µm arasında olan dolgu maddeleri ile uygun sıvı akış hızları elde edebilmek için yüzlerce atmosferlik pompa basınçlarına gerek vardır. Bu yüksek basınçların bir sonucu olarak HPLC için gerekli donanım, diğer tip kromatografi sistemleri dikkate alındığında daha ince işçilik gerektirir ve daha pahalıdır. Modern bir HPLC cihazı, bir veya daha

fazla her biri 200-1000 mL çözücü içeren camdan veya çelikten yapılmış hazne içermektedir. Bu hazneler çoğu zaman kolonda ve dedektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sahip olan çözünmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır. Gaz gidericilerin bir HPLC sisteminin ana parçası olması gerekli değildir. Çözücüyü hazneye koymadan önce uygulanacak uygun bir yöntem ile de gaz giderimi gerçekleştirilebilir (Skoog ve ark. 1998a).

Sabit bileşimdeki tek bir çözücü kullanılarak yapılan ayırma izokritik elüsyon, polariteleri birbirinden farklı iki veya üç çözücü sistemi kullanılarak yapılan ayırma ise gradiyent elüsyon olarak adlandırılır. Modern HPLC cihazları çözücülerin hacimsel oranlarını doğrusal veya üstel olarak değiştirebilecek şekilde iki veya daha fazla hazneden aldığı çözücülerini bir karıştırma odasında sürekli olarak değişen hızlarda bir araya getiren sistemler ile donatılmıştır (Skoog ve ark. 1998a).

2.9. Tez kapsamında Seçilen Matriksler

2.9.1. Ispanak (*Spinacia oleracea L.*)

Diyetin önemli bir parçasını oluşturan sebzeler, karbonhidrat, protein, vitamin, mineral, lif içerirler ve bunlar da sağlık için gereklidir. Aynı zamanda yenilebilir veya yenilmeyen kesimlerinde genellikle kirli topraktan kaynaklanabilecek olan kadmiyum (Cd), bakır (Cu), krom (Cr), nikel (Ni), kurşun (Pb) ve çinko (Zn) gibi ağır metalleri de biriktirebilirler. Bunlardan bazıları; örneğin Cd, Cr, Pb, sağlık açısından zararlı iken; bazıları da; örneğin Zn, Ni, Cu, normal biyolojik fonksiyonlar için düşük derişimlerde lüzumlu olup; aşırısında sağlığı olumsuz yönde etkilemektedir (Hu ve ark. 2013).

Ispanak (*Spinacia oleracea L.*) gibi yeşil yapraklı sebzeler bitkisel gıdaların önemli bir grubunu oluştururlar (Lisiewska ve ark. 2011). Ispanak yüksek mineral bileşenleri, vitaminler, karotenoidler, organik asitler, alkali mineral bileşenler (Lisiewska ve ark. 2011) ve antioksidanlar (Lisiewska ve ark. 2011, Khanam ve ark. 2012) içerir. Çiğ veya pişmiş (Klein ve ark. 1981), donmuş ya da taze yaprakları kaynatılmış olarak (Lomnitski ve ark. 2003) ya da bebek ıspanak olarak (Huang ve Chen 2011) tüketimi

yapılabilmekte; ayrıca kimyasal bileşimi de ekilme-yetiştirme şartları ve gıda olarak kullanılan kısım gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Yapraklarının tazeliğine (yaşı) de bu açıdan önemli olabilecektir (Lisiewska ve ark. 2011).

Ispanağın besleyici değeri açısından bakıldığında, çiğ ıspanakta yüz gram yenilebilen kesimde mineral içeriği açısından potasyum, kalsiyum, magnezyum-sodyum (standart sapmalar dahilinde yaklaşık aynı düzeyde), fosfor fazla miktarda bulunurken (49-558 mg); bunları demir (2,71 mg), selenyum (1,0 mg), mangan (0,897 mg), çinko (0,53 mg) ve bakır (0,130 mg) izlemektedir. Ayrıca; A ve K vitamini ile folat içeriği açısından da zengin olup, C vitamini de (28,1 mg) yüksektir (Tang 2009).

Ispanak çok önemli antioksidan özelliği gösteren sebzelerden biri olmakla birlikte (Lomnitski ve ark. 2003); artan Cu (II) miktarının antioksidan içeriğine etkisine dair çalışmalar literatürde görülmektedir (Caldwell 2002). Ayrıca ıspanak eser mineralleri açısından değerlendirildiğinde, iyi bir mangan kaynağı olduğu söylenebilir (Tang 2009). Literatürde yer alan bazı çalışmaların sadece ıspanağın genel bileşiklerinin analizine yönelik olduğu belirlenmiştir ya da farklı yeşil yapraklı sebzelerdeki mangan belirlenmesi-türlendirmesi (Yaman 1997, Ozdemir ve Gucer, 1998, Vinas ve ark. 1993, Dugo ve ark. 2005) veya antioksidan içeriklerinin belirlenmesi üzerine yoğunlaşmıştır (Bergman ve ark. 2001, Kahanam ve ark. 2012). Yine literatürde ıspanakta artan bakıra tolerans etkisi (Tukendorf 1989), genel olarak eser ve makro bileşenlerinin analizi ya da içeriklerinin belirlenmesi (Tang 2009, Hokura ve ark. 2000, Durukan ve ark. 2011) veya amino asit profillerinin belirlenmesine (Lisiewska ve ark. 2011) ilişkin çalışmalar görülmekle birlikte tez kapsamında değerlendirilecek olan mangan ve bakır fraksiyonlaması veya biyoyararlılığına ilişkin çalışmalar bulunamamıştır.

2.9.2. Buğday (*Triticum aestivum L.*) unu

Tahıllar diyetteki temel gıda bileşenlerinden biridir ve çok iyi birer karbonhidrat, protein, belirli vitamin ve mineral kaynaklarıdır (Koplik ve ark. 2006). Tahıl unları, pek çok ülkede temel yiyecek maddelerinden biridir (Gonzalez ve ark. 1999). Bunlar arasında buğday da tüm dünyada en fazla tüketilen tahıl çeşididir (Arajuo ve ark. 2007) .

Buğday unu, ekmek, pasta, sos vb. yapımında sıklıkla kullanıldığından eser element içeriğinin analizi hem beslenme hem de toksikolojik açıdan önem arz etmektedir (Gonzalez ve ark. 1999).

Buğday ununun başlıca bileşenleri nişasta, su, protein, nişasta olmayan polisakkaritler ve lipidlerdir (Goesaert ve ark. 2005)

Beyaz un, buğday çekirdeğinin endosperminin öğütülmesi ile elde edilir. Buğdayda endosperm % 12 protein içerir. Protein iki sınıfa ayrılır. Bunlardan ilki, gluten olmayan proteinlerdir; bunlar albumin ve globulinden ibarettir. Albümin suda çözünürken; globulin suda çözünmez, seyreltik tuz çözeltilerinde çözünür. İkinci sınıf ise toplam buğday proteininin büyük kısmını oluşturan gluten proteinleri olup; bunlar da suda çözünmez. Gluten proteinleri gliadin ve gluteninlere ayrılır. Buğdayda en fazla bulunan bileşen nişasta, % 63–72 civarındadır ve endospermde bulunur. Nişasta; glikoz polimerleri, amiloz ve amilopektinden oluşur. Öğütme sırasında %5–8 nişasta granülleri fiziksel olarak zarar görür. Nişasta olmayan polisakkaritler de yapısı gereği suda çözünür veya çözünmez fraksiyonlara ayrılabilir. Polar veya polar olmayan türdeki yağ içeriği ise % 2 civarındadır (van der Borghet ve ark. 2005).

2.9.3. Fındık (*Corylus avellana L.*)

Fındık büyük ölçüde Karadeniz bölgesi-Türkiye, İtalya, İspanya, Portekiz ve Fransa' da; ayrıca Amerika Birleşik Devletlerinin bazı bölgelerinde üretilmektedir (Alasalvar ve ark. 2009). Bazı başka ülkelerde de üretimi görülmektedir (Avustralya, Yeni Zelanda, Çin, Azerbaycan gibi). Türkiye toplam üretimin ~% 74' ü ile ilk sırada yer alırken; bunu ~% 16 ile İtalya, ~% 4 ile Amerika Birleşik Devletleri ve ~% 3 ile İspanya izlemektedir. Diğer ülkeler de toplam üretime ~%3' lük katkı göstermektedir (Seyhan ve ark. 2007, Alasalvar ve ark. 2009). Türkiye'de yaklaşık on sekiz fındık türü bulunmakta olup; bunlar arasında Tombul, birinci kalitede ve başlıca Giresun ili kaynaklı olarak sınıflandırılmıştır (Alasalvar ve ark. 2009). Kara Fındık da yine yüksek kalitede tür olarak nitelendirilmiştir (Dundar ve Altundag 2004).

Fındık ekonomik değeri yanında gıda ürünlerinde katkı olarak da kullanılmakta; beslenme ve sağlık açısından da önemli rolü bulunmaktadır (Açkurt ve ark. 1999) Yağ asitleri profilleri, protein, karbonhidrat, vitamin, mineral, diyet lif, fitosterol, tokol, skualen, antioksidan, fenolik ve fitokimyasal içeriği ile beslenme ve sağlık açısından önemlidir (Seyhan ve ark. 2007). Çalışmalarda fındığın yağ ve mineral içeriğinin tür, coğrafi kaynak, hasat zamanı, mevsim ve üretim tekniğinden etkilendiği belirtilmiştir. Literatürde Türkiye’ de yetiştirilen fındık çeşitlerinin vitamin ve mineral içeriğine yönelik çalışmalar da mevcuttur (Açkurt ve ark. 1999).

Fındık, yüksek düzeyde yağ içeriğine sahiptir. Tekli ve çoklu doymamış yağ asitleri ile kan serum lipid profili ile ilgili sağlık açısından yararlılığı bulunmaktadır (Delgado ve ark. 2010). Yüksek yağ içeriği aynı zamanda bozulmaya-acılaşıma da yatkınlık nedenidir (Açkurt ve ark. 1999). Doymamış yağ asitleri ve α - tokoferol gibi antioksidanlar yanında; demir, mangan, bakır gibi mineral içeriği de yine acılaşıma ile ilişkilidir (Açkurt ve ark. 1999, Özdemir ve ark. 2001).

Doymamış yağca zengin aynı zamanda protein, fiber, mikro elementler, bitki sterolleri ve fitokimyasalları içeren fındık ve benzeri gıdalar yüksek kalori içeriğine rağmen yüksek tüketimleri ile oldukça popüler görülmektedir; ayrıca yine, yağ asidi profilleri nedeniyle koroner kalp hastalıklarına karşı koruyucu olduğu da belirtilmiştir (Wuilloud ve ark. 2004).

Fındıktan antioksidan madde ekstraksiyonunda etanol, metanol veya aseton kullanıldığı belirtilmiştir (Contini ve ark. 2008, Delgado ve ark. 2010). Ayrıca sadece gıda maddesi olarak değil; aynı zamanda kozmetik ve farmasotik alanlarında ürün geliştirmeye yönelik önemli özelliklerinin olabileceği de vurgulanmıştır (Delgado ve ark. 2010).

Fındık ve benzerleri açısından toplam element içeriğine yönelik çalışmaların az ve türlendirme çalışmaları açısından da selenyumun dışında çalışmanın geliştirilmediği (Wuilloud ve ark. 2004) belirtilmiştir. Fındığın kimyasal bileşimi kompleks olduğundan (içeriğindeki lipid % 50–70, protein % 10–20 ve karbonhidratlar % 10–20) eser element analizi zordur ve analiz öncesi uygun örnek hazırlama basamağı geliştirilmelidir. Farklı yaş yakma işlemleri ve ölçüm sistemleri toplam element

analizlerinde kullanılmış olmakla birlikte; bu çalışmalarda sonuçların düşük doğruluk ve tekrar elde edilebilirliklerinin temel nedeninin örneğin tam parçalanmamasından kaynaklandığı görülmüştür (Wuilloud ve ark. 2004).

Fındığın elementel bileşimi; coğrafi kaynak, hasat yılı, iklim toprak bileşimi, sulama, gübre kullanımı, yetiştirme metodu gibi nedenlerle değişmekte olup Türkiye’de yetiştirilen yaklaşık on sekiz çeşit fındıktan beşinin (tombul, yassı badem, sivri, karafındık, ham) AAS ile tespit edilen içerikleri Çizelge 2.9.3.1’de özetlenmiştir (Alasalvar ve ark. (2009). Yine literatürde Açkurt ve ark. (1999) tarafından farklı illerden elde edilen fındıklarda belirlenen elementel içerikler de Çizelge 2.9.3.2’de görülmektedir.

Çizelge 2.9.3.1. Fındık çeşitlerinin elementel içeriği-1 (Alasalvar ve ark. 2009)*

Mineral	Krom, Molibden ve Selenyum için µg/100g; diğerleri için mg/100 g				
	Tombul	Yassı Badem	Sivri	Karafındık	Ham
Kalsiyum	264 ± 9,9	161 ± 2,2	176 ± 4,1	202 ± 1,7	238 ± 5,7
Krom	10,8 ± 0,35	13,1 ± 0,61	9,93 ± 0,51	10,8 ± 0,80	17,5 ± 1,15
Bakır	1,59 ± 0,08	1,23 ± 0,05	1,36 ± 0,04	1,77 ± 0,01	0,94 ± 0,03
Demir	3,73 ± 0,08	4,28 ± 0,14	3,66 ± 0,08	3,67 ± 0,08	4,42 ± 0,14
Magnezyum	152 ± 2,2	140 ± 1,0	43,3 ± 0,6	149 ± 0,3	34,9 ± 2,5
Mangan	2,17 ± 0,02	5,98 ± 0,04	9,66 ± 0,01	2,17 ± 0,02	19,0 ± 0,16
Molibden	3,13 ± 0,32	3,77 ± 0,25	2,11 ± 0,11	3,27 ± 0,32	2,20 ± 0,10
Fosfor	314 ± 8,9	288 ± 4,2	256 ± 4,5	268 ± 1,4	260 ± 8,2
Potasyum	678 ± 6,5	857 ± 1,7	661 ± 2,0	676 ± 1,2	519 ± 0,2
Selenyum	8,11 ± 0,11	6,72 ± 0,07	7,43 ± 0,15	8,03 ± 0,06	5,52 ± 0,06
Sodyum	1,97 ± 0,01	1,24 ± 0,02	2,65 ± 0,01	1,70 ± 0,01	1,31 ± 0,01
Çinko	2,45 ± 0,02	1,86 ± 0,03	1,84 ± 0,04	2,45 ± 0,02	2,07 ± 0,02

* = Türler, Giresun kaynaklı olup; örnekler hasat zamanı başında (Eylül 2007’ de) alınmıştır.

Çizelge 2.9.3.2. Fındık çeşitlerinin elementel içeriği-2 (mg/100 g) (Açkurt ve ark. 1999).

Bölge	Çeşit	Demir	Çinko	Bakır	Magnzeyum
Akçakoca	Karafındık	2,30 ± 0,09	2,44 ± 0,04	0,10 ± 0,02	142,64 ± 3,96
	Çakıldak	2,05 ± 0,18	2,18 ± 0,08	0,86 ± 0,03	142,24 ± 4,39
	Mincane	2,60 ± 0,02	1,82 ± 0,04	0,90 ± 0,01	118,09 ± 9,36
	Foşa	2,23 ± 0,23	1,85 ± 0,22	0,62 ± 0,12	140,89 ± 5,54
Ordu	Çakıldak	2,15 ± 0,05	2,09 ± 0,06	0,74 ± 0,04	154,42 ± 12,00
	Palaz	2,54 ± 0,12	2,11 ± 0,02	0,77 ± 0,03	177,22 ± 15,42
Trabzon	Sivri	2,41 ± 0,07	2,06 ± 0,12	0,80 ± 0,03	140,82 ± 0,34
	Mincane	2,05 ± 0,05	1,81 ± 0,08	0,83 ± 0,18	140,42 ± 5,40
Giresun	Sivri	2,40 ± 0,13	1,63 ± 0,03	0,16 ± 0,01	143,33 ± 2,33
	Tombul	2,56 ± 0,08	1,77 ± 0,02	0,32 ± 0,01	137,51 ± 1,76
	Kalınkara	2,24 ± 0,12	1,71 ± 0,07	0,17 ± 0,01	141,96 ± 3,44
Ortalama		2,32 ± 0,21	1,95 ± 0,25	0,65 ± 0,29	143,59 ± 14,86

Bölge	Çeşit	Mangan	Kalsiyum	Potasyum	Sodyum
Akçakoca	Karafındık	1,99 ± 0,02	82,28 ± 1,17	686,24 ± 9,5	0,86 ± 0,04
	Çakıldak	2,92 ± 1,43	92,46 ± 3,30	735,26 ± 11,74	0,80 ± 0,04
	Mincane	15,85 ± 0,60	82,76 ± 5,52	624,27 ± 57,96	0,84 ± 0,01
	Foşa	11,22 ± 0,05	85,88 ± 7,58	611,77 ± 19,05	0,81 ± 0,05
Ordu	Çakıldak	1,77 ± 0,04	80,63 ± 2,81	894,72 ± 72,63	0,63 ± 0,02
	Palaz	5,90 ± 0,40	82,58 ± 1,37	602,07 ± 10,44	0,66 ± 0,03
Trabzon	Sivri	4,92 ± 0,33	89,53 ± 1,71	532,58 ± 4,63	0,62 ± 0,02
	Mincane	3,34 ± 0,28	79,06 ± 1,00	553,23 ± 22,67	0,62 ± 0,01
Giresun	Sivri	7,72 ± 0,24	80,86 ± 4,46	636,66 ± 8,45	0,61 ± 0,01
	Tombul	8,45 ± 0,02	78,83 ± 2,50	526,72 ± 11,55	0,62 ± 0,01
	Kalınkara	4,61 ± 0,28	83,76 ± 3,03	609,05 ± 14,04	0,61 ± 0,02
Ortalama		6,09 ± 4,17	83,51 ± 5,14	637,14 ± 105,33	0,70 ± 0,10

2.9.4. Yağmur suyu

Atmosferik taşınım ve birikim süreçleri eser elementlerin küresel çevriminde önemlidir (Baez ve ark. 2007). Eser elementler doğal veya antropojenik kaynaklıdır. Doğal kaynaklar arasında taş (akıntılardan dolayı), toprak, volkanlar göl ve nehir çökelleri, bitki örtüsü, orman yangınları gibi etmenler yer alırken; endüstriyel faaliyetlerden

dolayı oluşanlar ise antropojenik kaynaklıdır (Srogi 2008). Antropojenik kaynaklar atmosferik birikintilerdeki eser element derişimlerini büyük ölçüde artırır; bunu izleyen süreçte de eser elementler, yağmur-kar suları ve kuru serpintiler ile çökelerler. Bu nedenle atmosferik çökeltelerde çevresel ve sağlık etkileri nedeni ile eser metal düzeylerinin belirlenmesi çalışmaları son yıllarda artış göstermiştir. Yaş birikintilerdeki eser elementlerin % 80'den fazlası yağmur sularında çözünerek alınmaya uygun formda, bitkiye ulaşmaktadır (Baez ve ark. 2007).

Volkanik faaliyetler brom (Br), selenyum (Se) ve antimon (Sb) gibi çeşitli eser elementler için önemli bir kaynaktır. Çinko (Zn) da bu anlamda tek kaynağı volkanik faaliyetler olmamakla birlikte örnek olarak verilebilir; bunun dışında gübre üretimi, bitki örtüsü gibi pek çok farklı kaynaktan da gelebilmektedir. Bazı kimyasallar; örneğin fungusitler, pestisitler ve herbisitler bakır, çinko, mangan, demir ve arsenik içerirken; kadmiyum ve kurşun gibi bazı eser elementler de gübrede safsızlık olarak toprağa ulaşır. Böylece atmosferdeki eser elementleri belirli bir kaynağa dayandırmak çok zordur. Çevresel izleme amacı ile toplanan örnekler matriks kompleksliği ve derişim düzeyi ile ilgili olarak analitik zorluklarına göre farklı kategoriye ayrılırlar ve yağmur suları su kategorisindeki (içme, yüzey, yeraltı, yağmur suları ve atık sular) matrikslerden biridir (Srogi 2008).

Atmosfer, eser elementlerin biojeokimyasal çevriminde önemli bir çevre bileşenidir. Pek çok nedenden dolayı atmosferik eser elementler önem arz etmektedir. Küçük miktarlarda eser elementler besleyici özelliği veya toksik kirletici olduğu için ekolojik olarak önemlidir. Besleyici olanlar magnezyum, mangan, bakır ve çinko iken; bunlardan bazıları da yüksek derişimde toksik olabilmektedir. Endüstride yaygın olarak kullanılan ve toksik olan grupta ise civa, kadmiyum, arsenik ve kurşun gibi elementler yer alır (Srogi 2008). Kurşun, kadmiyum ve civa gibi bazı eser elementler biyosferde birikerek canlı sistemler için toksik olabilmektedir (Baez ve ark. 2007).

Mangan, biyolojik veya antropojenik kaynaklı olarak atmosferik sularda en çok bulunan eser elementlerden biridir. Yağmur sularında bu element Mn (II) ve Mn (IV) formunda olabilir. Termodinamik hesaplamalar, pH 4–6 arasında çözülmüş mangan için baskın

olarak Mn (II) formunu önermektedir. Mn (III) atmosferik şartlarda kararsız olup; Mn (IV)'e yükselgenebilir ya da Mn (II)'ye indirgenebilir. Kinetik model, yağmurda genellikle Mn (II) oksidasyon basamağının baskın olduğunu; çok az düzeyde ve gün ışığının olduğu saatlerde Mn (III)' ün de bulunabileceğini önermektedir (Willey ve ark. 2009).

Atmosferde oluşan türler ile ilgili çok az bilgi mevcut olup; kısmen hesaplamalara dayalıdır. Mangan atmosfere sadece partiküler formda ulaşır. Antropojenik partiküller atmosfere % 35 oranında Mn emisyonununun nedenidir. Mangan, S (IV)' ün oksijen ile yükseltgenmesini de katalizler ki bu durum asit yağmuru oluşum mekanizmalarında önemlidir. Kinetik ve mekanik araştırmalara ve model hesaplamalara göre mangan, Fe (III) iyonları ile birlikte bulutlu havalarda S (IV) yükseltgenmesinin önemli bir kısmı ile ilgilidir; gece hidrojen peroksit derişimi az olduğunda bu yükseltgenmenin % 29'a kadar olan kısmı ile ilişkilendirilebilir (Deutsch ve ark. 1997).

Literatürde, asitlendirilmiş ve filtre edilmemiş yağmur suyunda toplam manganın ölçüldüğü; türlendirme-dağılım çalışmaları açısından da çözünmüş, partiküle ve kolloidal Mn ölçümünün yapıldığı, fotokimyasal deneylerden yararlanıldığı (Willey ve ark. 2009); yine fotometrik ölçümler ve ayrıca iyon kromatografisinden yararlanıldığı (Deutsch ve ark. 1997) görülmektedir. Analizde kullanılan yaygın teknikler ise atomik spektroskopik tekniklerdir (Deutsch ve ark. 1997, Baez ve ark. 2007, Srogi 2008)

2.10. Tez kapsamında Seçilen Metaller

2.10.1. Mangan

Mangan lüzumlu eser element olarak fotosentezde ve solunumda önemlidir ve pek çok enzimin aktivatörüdür. Ayrıca; bitki sistemlerinde protein, açıl lipidler ve karbonhidratların sentezinde önemlidir. Hücresel düzeyde aşırısı vakuollerde, hücre duvarında ve kloroplast tilakoidinde depolanır (Boojar ve Goodarzi 2008).

Protein, karbonhidrat ve yağ metabolizması, sağlıklı sinir ve bağışıklık sistemleri, kan şekeri düzenlenmesi için gerekli olan Mn kofaktör olarak etki göstererek metabolik işlemlerde gerekli birçok enzimi aktive eder. (Michalke ve Schramel 2004, Dugo ve ark. 2005, Cıta ve ark. 2010, Ruzik 2012). Piruvat karboksilaz, süperoksit dismutaz, glikozil transferaz ve arginaz bu enzimlere örnek olarak verilebilir (Gomez-Ariza ve ark. 2006). Mangan, B1 ve E vitamininden yararlanması ile ilgili olduğu gibi normal kemik gelişiminde de gereklidir. Ayrıca Mn, diyetle uygun düzeyde alındığında lüzumlu bir elementtir. Bu bağlamda günlük 2–3 mg mangan gereklidir. Tipik olarak günlük alımı 5,4–12,4 mg arasındadır. Bu nedenle miktarı yeterli olup takviye gerektirmez. Ancak bu lüzumlu element kolaylıkla absorbe edilmez (Ruzik 2012). Mangan bitkilerde de azot metabolizmasının düzenlenmesi ve fotosentezde önemli rol oynar (Dugo ve ark. 2005).

Bitkisel kökenli gıdalarda; özellikle buğday ve pirinçte manganın derişimi çok fazla olmakla birlikte; ayrıca çay, soya fasülyesi, yumurta ve fındık gibi gıdalarda da fazla miktarda bulunur. Toksik ve toksik olmayan derişim aralıkları arasındaki sınır çok düşüktür bu nedenle de kesinliği ve doğruluğu yüksek analitik teknikler ile belirlenmesi gerekli görülmektedir (Ruzik 2012).

Matriks açısından literatürde en fazla mangan analizi yapılan gıda örnekleri; yeşil sebze, kabuklu yemiş, tahıl ve çay olarak görülmektedir. Mangan, beyinde plazmaya oranla yüz kattan daha fazla derişir. Bu nedenle de seçici bağlanma ve aktif taşınım mekanizmalarının anlaşılması önemlidir. Hücresel mangan türlemdirmesi de kan-beyin bariyerinde taşınımın anlaşılması açısından önem arz etmektedir. $MnCl_2 > KMnO_4 > MnSO_4$ sırasında mangan bileşiklerinin kanserojenliği azalmaktadır. Fakat bu etkiyi göstermesi için de yüksek dozlarda alınımı gerekmektedir. Bu nedenle günümüzde manganın deriştığı beyin ortamının oldukça önemli olduğu belirtilmiştir (Pearson ve Greenway 2005).

Mangan eksikliği sinir sistemini etkiler, epilepsi benzeri rahatsızlıklara neden olabilir. Epileptik hastalarda kan mangan derişimi normale göre düşük bulunmuştur (Dugo ve ark. 2005) Genellikle yetişkin organizmasında toksik olmamakla birlikte; nispeten

yüksek dozda veya kronik olarak aşırı doza maruz kalma durumunda manganizm olarak adlandırılan ve belirtileri Parkinson hastalığına benzeyen nörolojik bozukluğa neden olabilmektedir. Bu nörolojik rahatsızlık; titreme, hareket bozukluğu, kas sertliği, durumu ile kendini gösterir, uzun maruz kalma durumu ise bilişsel eksiklik, sanrı, uyku hali ve depresyona yol açabilir (Pearson ve Greenway 2005).

Mangan, glikosfingolipid biyosentezinde metal iyon aktivatör olarak önemlidir (Burczak ve ark. 1984); ayrıca yine literatürde glikolipid sentez aşamalarında magnezyum yerine etkinliği araştırılmış iki değerlikli katyonlardan biridir (Awai ve ark. 2006). Glikolipidler literatürde anti-kanser bileşikler olarak, ıspanak ise monogalaktozil diaçilgliserol (MGDG), digalaktozil diaçilgliserol (DGDG) ve sülfokuinovosil diaçilgliserol (SQDG) isimli üç glikolipid türü için iyi bir kaynak olarak önerilmiştir (Maeda ve ark. 2008).

Kimya endüstrisinde oksidasyon reaksiyonlarında, cam, seramik boya ve pigmentlerin renklendirilmesinde, toprak ve gıda takviyesi olarak veya tıbbi alanda ilaç olarak farklı bileşikler ile uygulama alanı bulan ve endüstride sıklıkla kullanılan metallere biri olan mangan, biyolojik sistemlerde önemli rolü olan lüzumlu elementlerden biridir. Mangan, yüksek dozda DNA işleyişini etkileyerek mutasyonlara neden olabilen bir elementtir. Sağlıklı bağışıklık sistemi için gereklidir. Serbest radikalleri düşürerek antioksidan etki gösteren Mn-süperoksit dismutaz yapısında yer alır ve hücre koruyucu” olarak da etki gösterir (Pearson ve Greenway 2005).

Genel bir çevre şartında atmosferik derişimleri $0,1 -10 \mu\text{g m}^{-3}$ arasında değişirken solunum ile alınması toksisitenin temel nedenidir. Manganın yaklaşık yarısı kemiklerde depolanırken; fazlası karaciğere atılır. İnsan karaciğeri ortalama $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ mangan içerir. Manganın fazlası karaciğere diğer organlara; özellikle de beyine iletilebilmektedir. Sağlıklı bir insanda serumda ve idrarda mangan düzeyleri sırası ile $0,5$ ve $1 \mu\text{g L}^{-1}$ dir. Sağlıklı diyetle yeterli düzeyde alındığından mangan eksikliği görülmemektedir (Pearson ve Greenway 2005). Mangan türleri açısından değerlendirecek olursak; taş toprak su ve gıdalarda doğal olarak bulunan manganın -3 ile $+7$ arasındaki onbir oksidasyon basamağı olduğu belirtilmiş olup; bunlar arasında en

kararlı olanları +2 ($MnCl_2$) +4 (örneğin MnO_2) ve +7 ($KMnO_4$) olarak verilmiştir. Çoğu tuzları suda çözünürken; fosfat ve karbonatları ile oksitlerinin çözünürlüğü düşüktür. Mangan, atmosferde toz benzeri küçük partiküllerin yapısında yer alabilir (Howe ve ark. 2004). Bir başka kaynakta ise 0 ile +7 arasında tüm oksidasyon basamaklarının bulunabileceği; fakat +2, +4 ve +7' nin en önemlileri olduğu ve iki değerlikli mangan tuzlarının en kararlıları olduğu, doğada da baskın olarak Mn(IV) (MnO_2) bulunduğu belirtilmiştir. Organizmada sadece iki değerlikli mangan absorbe edilebilirken, mangan açısından temel gıda kaynakları ise yeşil sebzeler, fındık ve türevleri, tahıllar ve çay olarak belirtilmiştir (Pearson ve Greenway 2005).

Manganın bazı temel bileşiklerine ait özellikler Çizelge 2.10.1.1'de ayrıntılı olarak verilmiştir (Howe ve ark. 2004).

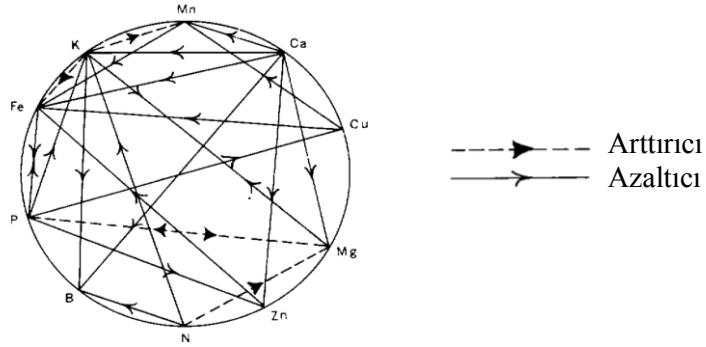
Çizelge 2.10.1.1. Mangan ve bazı bileşiklerinin kimyasal özellikleri (Howe ve ark. 2004'ten değiştirilerek alınmıştır)

Kimyasal Formül	Mn	$MnCl_2$	$MnSO_4$	Mn_3O_4	MnO_2	$KMnO_4$
CAS No.	7439-96-5	7773-01-5	7785-87-7	1317-35-7	1313-13-9	7722-64-7
Molekül Kütlesi (g/mol)	54,94	125,85	151,00	228,81	86,94	158,04
Renk	gri-beyaz	pembe	Soluk pembe	siyah	siyah	mor
Fiziksel Özellik	katı	katı	katı	katı	katı	katı
Erime Noktası	1244 °C	650 °C	700 °C	1564 °C	535 °C	<240 °C (parçalanır)
Kaynama Noktası	1962 °C	1190 °C	850 °C'de parçalanır	-	-	-
Çözünürlük	seyreltik mineral asitler	su (723 g/litre, 25 °C); alkol	su (520 g/litre, 5 °C); alkol	HCl Suda çözünmez	HCl Suda çözünmez	su (64 g/litre 20 °C), aseton ve sülfürik asit

2.10.1.1. Gıda bileşenlerinin mangan emilimine etkisi

Bitkide topraktan element alınmasına ilişkin olan Mulder diyagramının gıda bileşenlerinin mangan emilimine etkisinde de açıklayıcı etkisi öngörülebilir. Şekil 2.10.1.1.1' de Mulder'in bitki beslenmesi açısından, eser element bağımlılık şeması verilmiştir (Demir 1986).

Bu şemaya göre örneğin Mn dört element ile ilişkili olup; bunlar K, Ca, Fe ve Cu olarak görülmektedir ve K hariç diğerlerinin varlığında mangan emiliminin azalacağı öngörülebilir. Tez kapsamında incelenecek ikinci element olan bakır (Cu) ise üç element ile ilişkili olup bunlar Mn, P ve Fe'dir ve bunların varlığında Cu emiliminin azalacağı öngörülebilir.



Şekil 2.10.1.1.1. Mulder diyagramı (Demir 1986)

2.10.1.2. Metal türlendirme analizleri ve mangan

Alüminyum, antimon, arsenik, krom, iyot, kadmiyum, kurşun, fosfor, cıva, platin, selenyum ve aktinit serilerine ilişkin türlendirme çalışmaları literatürde yaygın olarak yer almakla birlikte (Kot ve Namiesnik 2000); mangan ile ilgili bazı çalışmalara aşağıda değinilmiştir:

Alasalvar ve ark. (2009), AAS ile çeşitli fındık türleri üzerinde AAS ile toplam mangan tayini yapmışlardır. Belirlenen Mn miktarları türe göre değişmekle birlikte; $2,17 \pm 0,02$ ile $19,0 \pm 0,16$ ("mg/100g") arasında bulunmuştur.

Dolan ve Capar (2002), mikrodalga parçalamalı örnek hazırlama işlemi ve ICP-AES ile mangan da dahil pek çok element için toplam miktar tayini yapmışlardır.

Abollino ve ark. (1998), sütte katı faz ekstraksiyonu, GFAAS ve ICP-AES ile Cu ve Mn türlendirmesi ilgili çalışmalar yapmış; kolonlarda tutunmasına göre bu elementlerin katyonik, anyonik formları, kolonda tutulmayan (nötral veya apolar) tür, proteine bağlı (kazein ile çöken) mangan şeklinde incelemeler yapmışlardır.

Ozdemir ve Gucer (1998) tarafından çay yapraklarında mangan fraksiyonlaması için ekstraktlarda anyon-katyon değiştiriciler ve birlikte çöktürmeye dayalı işlemlerden yararlanılmıştır. Ayrıca yaş yakmayı takiben toplam metal tayini yapılırken; dietil eter, etil asetat, kloroform gibi çözügen ekstraksiyonları ile organik bağlı metal fraksiyonları da elde edilmiştir. Bu fraksiyonlardaki elementel tayinlerde ise AAS kullanılmıştır.

Mangan türlendirmesinde yukarıda da bahsedilen elemente özgü tayinler yapılabildiği gibi, kromatografik ayırmanın element seçici tespit yöntemleri ile birleştiği ikili tekniklere dayalı moleküler belirleme imkanlarının da var olduğu görülmektedir (Michalke 2003, Pearson ve Greenway 2005).

Arias-Borrego ve ark. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada çam fıstığında biyomoleküllere bağlı manganın LC-ICP-MS ve ESI-MS ile tespit ve tayini yapılmıştır. Boyut eleme ve güçlü anyon değişim kolonları kullanılarak fraksiyonlar ICP-MS 'e gönderilmiş ve mangan içeren biyomoleküler fraksiyonlar analiz edilmiştir. Kullanılan matrikslerde kaynağına bağlı olarak 26–559 µg/g' a kadar değişen miktarlarda Mn belirlenmiştir. Bunun dışında farklı gıdalarda mangan içeriklerine dair literatürden örnekler verilmişken; en fazla oranda mangan bulunan gıdalara örnek olarak badem ve yer fıstığı verilmiştir. SEC-ICP-MS çalışmasında 7–10kDa, 2126–7000 Da, 1352–2126 Da arasında biyomoleküle bağlı üç mangan piki gözlenmiştir. Bunlar da mangan (II) klorür, ayrıca mangan sitrat kompleksi ve proteine bağlı mangan ile ilişkilendirilmiş; bazı doğrulama çalışmalarında elektrosprey iyonizasyon/kütle spektrometresi (ESI/MS) kullanılmıştır.

Wuilloud ve ark. (2004) kabuklu gıdalarda mangan da dahil birkaç elementin türlendirmesine dayanan çalışmalarında, moleküler büyüklük dağılımına dayalı SEC-ICP-MS'ten yararlanmışlardır. Fraksiyonlama için sodyum hidroksit (NaOH) ve hidroklorik asit (HCl)'den yararlanılmıştır. NaOH ile hem düşük hem de yüksek molekül kütleli elementel bileşikler ekstrakte edilebilirken; HCl ile düşük molekül kütleli olanlar ekstrakte edilebilmiştir. Çalışmada da görüleceği gibi farklı fındık türü gıdalarda 9 ile 4780 $\mu\text{g g}^{-1}$ aralığında mangan düzeyi olabilmektedir. Mangan bu anlamda fazlaca farklılık gösteren bir metaldir.

Benzer bir çalışmada Naozuka ve Oliveira (2007) tarafından fındık da dahil olmak üzere bazı kabuklu gıdalarda protein fraksiyonlarındaki element dağılımı katı-sıvı ekstraksiyonu ve ETAAS ile belirlenmiştir. Bakır (Cu (II)), demir (Fe (II)), mangan (Mn (II)), molibden (Mo (II)), ve çinko (Zn (II)) gibi geçiş metalleri ile, selenyum (Se (IV))' ün gıda matriksindeki kompleks yapılarla koordinasyon etkileşimleri yüksektir. Bu nedenle de çoğunlukla metalloprotein yapıları ile ilişkili görülmüştür. Lipid, albümin, globülin gibi moleküler yapıları ekstrakte etmek için metanol: kloroform (1:2, v/v), su, 0,5 mol L⁻¹ sodyum klorür (NaCl) çözeltisi, % 70 etanol ve 0,5 mol L⁻¹ NaOH çözeltilerinden yararlanılmıştır.

Quintana ve ark. (2005), manganın merkezi sinir sistemine etkileri nedeni ile kan-beyin bariyeri düzeyinde incelemelerini gerçekleştirmek amacı ile vücutta mangan depolama yeri olan karaciğer matriksini ele almışlardır. Kuvvetli anyon değişimine dayalı ayırmaların mangan türlerinin kararlılığına negatif olarak etki ettiği; bu anlamda CE-ICP-MS'in daha yararlı olduğu belirtilmiştir. Bu teknikte ise sadece bazı türler tespit edilebilmekte; bir kısmı da belirlenememektedir. Çalışmada toplam element tayini ICP-AES ile yapılırken; dinamik reaksiyon hücreli (DRC) ICP-MS de ikili teknikte kullanılmıştır. Çalışmada ayrıca DRC sisteminin etkisi DRC kullanılmayan matriks çalışmaları ile de gösterilmeye çalışılmıştır. Seçilen matriksteki (hayvan karaciğeri) toplam mangan düzeyi $1,8 \pm 0,08 \text{ mg kg}^{-1}$ olarak belirlenirken; manganın karaciğerde % 90'dan fazlasının yüksek moleküler yapılar ile, yaklaşık % 7' sinin de düşük moleküler yapılar ile ilişkili olduğu belirtilmiştir.

Quintana ve ark. (2006) tarafından yapılan benzer bir çalışmada farklı olarak CE-ICP-MS çalışmasına ilaveten SEC-ICP-MS çalışması da yapılmıştır. Önce boyut karakterizasyonu yapılmış ve toplanan fraksiyonların tayinine yönelik olarak CE-ICP-MS kullanılmıştır. Belirlenen Mn türleri baskın olarak Mn-enzim bileşikleridir. Tipik Mn taşıyıcısı Mn-albumin iken; Mn-transferrin, SEC ayrımı sırasında parçalanmaktadır. Bu da ilgili türün kararlı yapıda olmamasından kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada toplam metal tayini ICP-OES ile yapılırken; kullanılan DRC sisteminin “sinyal/gürültü” oranına etkisi ile girişim giderimindeki rolü belirtilmektedir.

Michalke (2004) tarafından yapılan çalışmada mangan türlendirmesinde CE-ICP-MS kombinasyonu ele alınmıştır. Çalışmada biyolojik fonksiyonu olan, karaciğerde biriken ve aşırısının baskın olarak beyine taşındığı belirtilen Mn türleri karaciğer ekstraktlarında incelenmiştir; Tekniğin kullanımındaki amaç, türlerin hızlı ve değişime uğramadan tayinlerini sağlamaktır. Herhangi bir durgun faz ile etkileşimin olmadığı ve böylece de tür kararlılığına katkıda bulunan CE, bu anlamda oldukça önemli bir teknik olarak ele alınmıştır. Manganın albumin veya transferin ile oluşturduğu kararsız kompleksler kuvvetli anyon değiştirici (SAX) ayrımı sırasında kolayca parçalandıkları için CE kombinasyonu önemli görülmektedir. İnorganik mangan, Mn-arginaz, Mn-transferrin, Mn-sitrat olabileceği belirtilen türler ilgili standartların elektrofereogramları ile karşılaştırılarak tespit edilmiştir.

Gomez-Ariza ve ark. (2007) tarafından Mn, Ni, Zn ve Cu elementlerine ilişkin molekül dağılım desenlerinden yararlanılarak yüksek protein içerikli ve önemli bir gıda katkı maddesi olan çam fıstığı matriksinde incelemeler yapılmıştır. Bu amaçla boyut eleme kromatografisinin (SEC), kesiksiz olarak ultraviyole spektrometresi (UV) ve ICP-MS ile birleştirilmesinden yararlanılmıştır.

Dou ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada yapraklardaki toplam manganın yaklaşık % 55–75 inin çözünür fraksiyonda olduğu, % 18’ inin de hücre duvarında, çok az miktarda Mn’in ise hücresel organeller ve hücre membran fraksiyonunda olduğu belirtilmiştir.

Çevre örneklerinde taşınım ve biyoyararlılık kimyasal forma bağlıdır (Krasnodebska-Ostrega ve ark. 2009) Elementler toprak, çökeller ve atıklarda kompleks, değişebilir anyon, organik bağlı, oksitleri-karbonatları veya fosfatları şeklinde çökebilen yapıda ya da kristal yapısında farklı fizikokimyasal formlarda bulunabileceğinden çevre örneklerinden metalurjik atıklarda Krasnodebska-Ostrega ve ark. (2009) tarafından ardışık ekstraksiyon yöntemleri ile Mn dahil pek çok element için değerlendirilmeler yapılmıştır.

2.10.2. Bakır

Bakır biyolojik sistemler ve yaşayan organizmalarda en az otuz önemli enzim için kofaktör olarak görev yapan lüzumlu bir eser elementtir; aynı zamanda hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda bulunan önemli bir biyoelementtir. Çoğu biyolojik sistemlere, derişim düzeyine bağlı olarak hem yararlı hem de toksik etki gösterebilmektedir. En fazla tolere edilebilir günlük alınımı vücut ağırlığı bazında $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ dir. Biyosistemlerde iki karakteristik formda bulunur; bunlar Cu (I) ve Cu (II) oksidasyon basamakları olup yükseltgenme-indirgenme işlemlerinde yer alırlar. Dikkate değer bir fonksiyonu da demir metabolizmasındaki etkisidir (Abbasi ve ark. 2010). Bakır ayrıca karbonhidrat ve lipid metabolizmalarında da önemlidir (Xiang ve ark. 2010). Mevsim, toprak kalitesi, coğrafya, su kaynağı ve gübre kullanımı gibi faktörler gıdadaki nihai bakır içeriklerini etkilemektedir. Gıda, içme suyu ve bakır içeren takviyeler bakırın temel kaynaklarıdır. Metalin solunum yolu ile veya deri üzerinden alımı ihmal edilebilir. Gıdalardaki doğal bakır içerikleri değiştiğinden diyetdeki bakır içeriği de büyük ölçüde değişir. (de Romana ve ark. 2011).

Sınırları ile ilgili başka kaynaklara göre; yetişkin insanlarda günlük bakır alımı 0,6 ile 1,6 mg arasında değişmektedir (Tapiero ve ark. 2003). Genellikle 1,5–2 mg bakır alımı zaruri olup en azından 40 ng mL^{-1} düzeyi pek çok yaşayan organizmada normal metabolik faaliyetler için gereklidir. Avrupa komisyonunca içme sularında bakır için $2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ limit önerilmiştir. Farklı standartlarda bu değer biraz daha az olabilmektedir ($1,3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ Amerika Birleşik Devletleri; $1,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ Kanada gibi) (Xiang ve ark. 2010). Günlük tavsiye edilen alımı 1 mg iken 1–3 mg arası güvenli seviye olarak kabul edilir (Ruzik 2012). Bu nedenlerle gıda örneklerindeki düşük bakır düzeylerinin dahi

kontrol edilmesi artan bir öneme sahiptir. Bu amaca yönelik olarak da oldukça hassas, basit, hızlı ve ucuz metotlar gereklidir (Xiang ve ark. 2010).

Bakır için birincil kaynaklar tohumlar, tahıllar, fındık, fasulye, kabuklu deniz ürünleri ve karaciğerdir. İnsanlarda normal sınırlarda alımda % 55–75'i gıdalardan absorbe edilmektedir (Ruzik 2012).

Bakır lüzumlu olmakla birlikte; bu elementin yüksek miktarları zararlı da olabilmektedir. Bitkide çok düşük düzeylerde gerekli olmakla birlikte; yüksek düzeylerde toksik etki gösterebilir. Yüksek düzeylerde, bitkide, hücre membranına bağlanabilir ve hücre duvarındaki taşınım sürecini engelleyebilir (Durukan ve ark. 2011). Böylece fitokimyasal işlemleri olumsuz etkileyebildiği belirtilmiştir. Bakır pek çok endüstride önemli bir elementtir; diğer taraftan yüksek düzeyde bakır alımı kusma, bulantı, ishal, karaciğer veya böbrek hasarı ve hatta ölüme bile neden olabilmektedir (Durukan ve ark. 2011).

Çeşitli örneklerdeki bakır seviyeleri de düşük olduğundan, gıda ve biyolojik örneklerdeki bakır düzeylerinin belirlenmesinde hassas ve seçici teknikler gereklidir. (Abbasi ve ark. 2010). Eser element analizinde kullanılacak tekniğin duyarlılığı yüksek olmalıdır. Girişimlerden uzak ve en az düzeyde reaktif kullanımı ile basit bir örnek hazırlama basamağı içermeli, hızlı element tayinine de imkan vermelidir (Silvestre ve ark. 2000). ICP-MS yüksek duyarlılığı ile bir ön deriştirme basamağına gerek kalmadan tayine imkan verir. Böylece bu basamak ile ilgili problemler de giderilmiş olur (Ciceri ve ark. 2008).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan analitik cihazlar ve parçaları

3.1.1.1. İndüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi

ICP-MS analizlerinde PerkinElmer marka ELAN 9000 model ve yazılım programı sürümü 3,4 olan ICP-MS (PerkinElmer SCIEX) kullanılmıştır. Cihazda PerkinElmer marka S10 model otomatik örnek verici ile türlendirme çalışmalarına imkan veren Chromera yazılımı kullanılmıştır. Chromera yazılımın sürümü, 1.2.254.0'dır. ICP-MS cihazına; scott, siklonik (cyclonic), ryton karşı akış, düşük akış ve meinhard tipi sisleştiri sistemleri ve parçaları takılabilmektedir. Cihaza ayrıca; 2°C ve -5°C' de çalışabilen PC3 model (Elemental Scientific) peltier soğutmalı siklonik sisleştirci odası aparatı da takılabilmektedir. Kullanılan cihaz, Ek-1'de gösterilmiştir.

3.1.1.2. Yüksek basınç sıvı kromatografisi

Çalışmada, PerkinElmer marka Series 200 model yüksek basınç sıvı kromatografi cihazı kullanılmıştır. Cihaz; Series 200 kolon fırını, Series 200 pompa, Series 225 otomatik örnek verici ve Series 200 EP foto diyod serili dedektörden oluşmaktadır. Ayrıca cihaza; 150 mm uzunluğunda, 4,6 mm iç çap ve 5 µm film kalınlığına sahip PerkinElmer marka Brownlee Analytical DB Aq C18 kolonu bağlanmıştır. Kullanılan cihaz Ek-1'de gösterilmiştir.

3.1.1.3. HPLC-ICP-MS arayüzü için çevirici valf

İkili teknikte, Rheodyne marka, altı kanallı ve iki pozisyonlu (PerkinElmer N8122251) çevirici valf kullanılarak HPLC-ICP-MS analizleri yapılmıştır.

3.1.1.4. Alevli atomik absorpsiyon spektrometresi ¹

Mangan ve bakır analizlerinde karşılaştırma tekniği olarak Varian marka, AA240FS model atomik absorpsiyon spektrometresi kullanılmıştır.

3.1.1.5. Gaz kromatografisi¹

Fındık örneklerinin yağ asitleri bileşimi analizlerinde Shimadzu marka, GC-17 A model, alev iyonlaşma dedektörüne sahip gaz kromatografisi kullanılmıştır. Cihaza; 30 m uzunluğunda, 0,25 mm iç çap ve 0,25 µm film kalınlığına sahip DB-WAX analitik kolonu bağlanarak kullanılmıştır.

3.1.2. Çalışmada kullanılan temel laboratuvar cihazları

3.1.2.1. Su banyosu

Biyoyararlılık çalışmalarında, Clifton marka NE1-22 model su banyosu kullanılmış olup; su banyosu sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanmıştır.

3.1.2.2. pH-Metre

Fraksiyonlama ve biyoyararlılık çalışmalarında, IQ Scientific Instruments marka Minilab IQ125 model pH-metre kullanılmıştır.

3.1.2.3. Ultrasonik karıştırıcı

Örnek hazırlama basamaklarında, ELMA marka LC-30H model ultrasonik karıştırıcı kullanılmıştır. Bu karıştırıcı için ultrasonik frekans 35 kHz ve güç 240 W değerindedir.

¹ İlgili analitik cihazlar ile ilgili deneysel işlemler; Tübitak Bursa Test ve Analiz Laboratuvarı'nda hizmet alımı kapsamında, uygulamalı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.2.4. Etüv

Örnek hazırlama basamaklarında, Thermo Scientific marka Heraeus model etüv¹ ve Nüve marka EN 500 model etüv kullanılmıştır.

3.1.2.5. Terazı

Deneysel işlemler sırasında, $\pm 0,0001$ g duyarlıklı Gec Avery marka analitik terazi ile $\pm 0,001$ g duyarlıklı Sartorius BP310S¹ kullanılmıştır.

3.1.2.6. Santrifüj aleti

Fraksiyonlama ve biyoyararlılık çalışmalarında, MSE MISTRAC marka 2000 model santrifüj cihazı kullanılmıştır. Cihaz, deneysel ayırmalar sırasında 4000 “devir/dakika” hızda çalıştırılmıştır.

3.1.2.7. Soxhlet ekstraksiyon sistemi¹

Örneklerdeki yağ içeriklerinin ekstraksiyonunda altı hazneli Gerhardt soxhlet ekstraksiyon sisteminden yararlanılmıştır.

3.1.2.8. Vorteks cihazı¹

Fındık örneklerinin yağ asitleri metil esterlerinin hazırlanmasında, VELP Scientifica marka ZX Classic model vorteks karıştırıcı kullanılmıştır.

3.1.2.9. Kül fırını¹

Makro bileşen analizlerinde, Nabertherm marka L3-12/S27 model kül fırını kullanılmıştır.

¹ İlgili analitik cihazlar ile ilgili deneysel işlemler; Tübitak Bursa Test ve Analiz Laboratuvarı'nda hizmet alımı kapsamında, uygulamalı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.2.10 Kjeldahl aparatı¹

Toplam azot ve protein analizlerinde, Foss marka Tecator 2006 model Kjeldahl ilkesine dayanan aparat kullanılmıştır.

3.1.2.11. Otomatik destilasyon ünitesi¹

Toplam azot ve protein analizlerinde, Foss marka Kjeltec 2200 model otomatik destilasyon ünitesi kullanılmıştır.

3.1.2.12. Diyet lif/ham selüloz tayin cihazı¹

Diyet lif ve ham selüloz tayinlerinde Velp Scientifica marka Fiwe model ekstraktör kullanılmıştır.

3.1.2.13. Döner vakumlu buharlaştırıcı¹

Örneklerden organik çözügen uzaklaştırılması amacı ile Buchi marka R-3000 model, döner vakumlu buharlaştırıcı kullanılmıştır.

3.1.2.14. Mikrodalga parçalama sistemi¹

Örneklerin çözünürleştirilerek homojenleştirilmesi amacı ile Milestone marka MLS 1200 mega model mikrodalga parçalama sisteminden yararlanılmıştır.

3.1.2.15. Liyofilizatör (dondurarak kurutma cihazı)¹

Ispanak örnekleri ile ıspanak ve un sertifikalı referans malzemelerinin (SRM) kurutulmasında Labconco FreeZone 1 liyofilizasyon cihazı kullanılmıştır.

¹ İlgili analitik cihazlar ile ilgili deneysel işlemler; Tübitak Bursa Test ve Analiz Laboratuvarı'nda hizmet alımı kapsamında, uygulamalı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.2.16. Saf su cihazı

Çalışmalarda kullanılan çözeltilerin hazırlanmasında Human firmasının Zeneer Power I model ve Scholar UV tip ultra saf su düzeneği (Human Corporation) kullanılmıştır. Su kalitesi ise $18,3 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ' dir.

3.1.2.17. Katı faz ekstraksiyon sistemi

Katı faz ekstraksiyon çalışmaları için Agilent marka aynı anda on iki ekstraksiyon yapılabilen vakum manifoldu kullanılmıştır. Sisteme KNF marka ve N 022 AN.18 model vakum pompası bağlanmıştır.

3.1.2.18. Süzme düzeneği

Süzme işlemleri için Sartorius marka 16307 model, cam ve vakumda süzme sağlayan aparat kullanılmıştır. Sisteme KNF marka ve N 022 AN.18 model vakum pompası bağlanarak kullanılmıştır.

3.1.2.19. Manyetik karıştırıcılı ısıtıcı

Örnek hazırlama işlemleri sırasında, Chiltern Scientific marka HS31 model manyetik karıştırıcılı ısıtıcı kullanılmıştır.

3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar, sarf malzemeler, numuneler ve çözeltiler

3.1.3.1. Analitik saflıktaki kimyasallar ve sarf malzemeler

- $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ Mn (II) stok çözeltisi, % 3 (v/v) HNO_3 içinde, sertifika konsantrasyonu: $1,006 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ ve sertifika yoğunluğu $1,020 \text{ g mL}^{-1}$ ($20 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de) (Inorganic Ventures)

- 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Cu (II) stok çözeltisi, % 3 (v/v) HNO_3 içinde, sertifika konsantrasyonu: $999 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ ve sertifika yoğunluğu $1,016 \text{ g mL}^{-1}$ ($20 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de) (Inorganic Ventures)
- 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ İndiyum (In) (II) stok çözeltisi, , % 2 (v/v) HNO_3 içinde, sertifika konsantrasyonu: $999 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ ve sertifika yoğunluğu $1,010 \text{ g mL}^{-1}$ ($20 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de) (Inorganic Ventures)
- ICP-MS multi-element kalibrasyon standart çözeltisi VI, Merck 110580, 30 element içerikli, % 5 (v/v) HNO_3 içinde, Certipur® (Merck)¹
- PerkinElmer N8125032 “ELAN 6100/Dual detector” çözeltisi (PerkinElmer SCIEX)¹
- PerkinElmer N8125030 “ELAN 6100/Setup/Stab/Masscal” çözeltisi (PerkinElmer SCIEX)¹
- PerkinElmer N8125031 “ELAN 6100/Detection Limit” çözeltisi (PerkinElmer SCIEX)¹
- PerkinElmer N8125040 “Smart Tune” çözeltisi (PerkinElmer SCIEX)¹
- Amonyak, Merck 105432, (NH_3 , % 25, proanalysi) (Merck)
- Aseton, Merck 100020, (CH_3COCH_3 , LC saflıkta, LiChrosolv) (Merck)
- Dietil Eter, Merck 100921, ($(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$, EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur (Merck)
- Etanol, Sigma-Aldrich 34870, ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, CHROMASOLV®, HPLC saflıkta (Sigma-Aldrich)
- Hidrojen peroksit, Merck 107209, (%30, EMSURE® ISO) (Merck)
- Hidrojen peroksit, suprapur, Merck 107298, (H_2O_2 , %30, 1L=1,11 kg) (Merck)
- Hidroklorik asit, suprapur, Merck 100318, (HCl , %30, 1L=1,15 kg) (Merck)
- izobütil metil keton, Merck 820820, ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}$, EMPLURA®) (Merck)
- Kloroform, Merck 102444, (CHCl_3 , LC saflıkta, LiChrosolv) (Merck)
- Metanol, Merck 106007, (CH_3OH , LC saflıkta, LiChrosolv) (Merck)
- Metanol, Merck 106035, (LC-MS saflıkta, LiChrosolv) (Merck)
- *n*-hekzan, Merck 104391, ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, LC saflıkta, LiChrosolv) (Merck)
- Nitrik asit, suprapur, Merck 100441, (HNO_3 , % 65, 1L=1,39 kg) (Merck)

¹ İlgili çözeltiler, ICP-MS cihazının analize hazırlanması için kullanılmıştır.

- 1-oktanol (*n*-oktanol), Merck 100991, (C₈H₁₈O, EMPLURA) (Merck)
- Sülfürik Asit, Merck 100731, (H₂SO₄, 95–97%, d=1,84 g cm⁻³ (20 °C), EMSURE® ISO) (Merck)
- Aktif Karbon (toz form, AOX Batch, PPTRE0049 (Euroglass, UK)
- Mangan (IV) oksit, Merck 805958 (MnO₂) (Merck)
- Mangan (III) asetat dihidrat, Aldrich 215880, (C₆H₉MnO₆·2H₂O, % 97) (Sigma-Aldrich)
- Sodyum hidrojen karbonat, Carlo Erba 478537 (NaHCO₃) (Carlo Erba RPE)
- Pepsin, Sigma P7000 (Sigma-Aldrich)
- Pankretain, Sigma P1750 (Sigma-Aldrich)
- Safra Tuzları, Sigma B8631 (Sigma-Aldrich)
- Yüksek saflıkta Argon gazı (%99,999 saflıkta), (Orsez (Bursa-Türkiye))
- Saf Oksijen gazı (Habaş-Türkiye)
- Azot gazı, %99,995 saflıkta, (Orsez (Bursa-Türkiye))
- 1000 mg L⁻¹ Mn (II) stok çözeltisi, Merck 119789, HNO₃ içinde Mn(NO₃)₂ (Merck)¹
- 1000 mg L⁻¹ Cu (II) stok çözeltisi, Merck 119786, HNO₃ içinde Cu(NO₃)₂, (Merck)¹
- Asetik asit, Sigma 27225 (CH₃CO₂H, %98,5-100,5 (Sigma-Aldrich)¹
- Aseton, Merck 100014, LC saflıkta, LiChrosolv (Merck)¹
- Borik asit, J.T. Baker – 0501 (H₃BO₃) (J.T.Baker)¹
- Carez I çözeltisi, 102050, Bursa teknik Kimya test kitleri ve ayarlı çözeltileri, Bursa¹
- Carez II çözeltisi, 102060, Bursa teknik Kimya test kitleri ve ayarlı çözeltileri, Bursa¹
- Dietil eter, Sigma 31700 (Sigma-Aldrich)¹
- Di-sodyum hidrojen fosfat, Merck 106586 (Na₂HPO₄, susuz, EMSURE® ACS,Reag. Ph Eur) (Merck)¹
- Etanol, Merck, 100983, (EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur (Merck)¹
- F.A.M.E. karışım C4-C24 standardı, Supelco 18919-1AMP (Supelco, Sigma-Aldrich)¹
- Fenoltalein, Carlo Erba 451154 (Carlo Erba Reagents)¹

¹ İlgili kimyasallar; Tübitak Bursa Test ve Analiz Laboratuvarı'nda hizmet alımı kapsamında uygulamalı olarak gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda, kurumun deposundan alınarak kullanılmıştır.

- Hidrojen peroksit çözeltisi, Sigma-Aldrich 18304, % 34,5-36,5 (Sigma-Aldrich)¹
- Hidroklorik asit, Merck 100317 (dumanlı, %37, d=1,19 g cm⁻³ (20 °C), EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur) (Merck)¹
- İzooktan, Labscan C21C11X, 2,2,4-trimetil pentan, HPLC saflıkta (Labscan)¹
- Kjeldahl tableti, Foss 15270003 Kjeltabs S-3.5 (Foss)¹
- Kuvartz kum, Merck 107536 (Kuvartz ince granüllü, yıkanmış ve kalsine edilmiş) (Merck)¹
- Luff çözeltisi, 111030, Bursa teknik Kimya test kitleri ve ayarlı çözeltileri, Bursa¹
- Metanol, Sigma 34885 (Sigma-Aldrich)¹
- Nişasta, Merck 101252 (Merck)¹
- Nitrik Asit, Sigma-Aldrich 07006, % 64-66 (Sigma-Aldrich)¹
- 2-oktanol, Merck 820925 (CH₃(CH₂)₅CH(OH)CH₃, sentez saflıkta) (Merck)¹
- Potasyum hidroksit, Merck 105033 (KOH, EMSURE®) (Merck)¹
- Potasyum iyodür, Merck 105043 (KI, EMSURE® ISO,Reag. Ph Eur) (Merck)¹
- Potasyum iyodür, Sigma 03124 (%99,0–100,5) (Sigma-Aldrich)¹
- Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat, Merck 106349 (NaH₂PO₄.H₂O, EMPROVE®) (Merck)¹
- Sodyum hidrojen sülfat monohidrat, Merck 106350 (NaHSO₄.H₂O) (Merck)¹
- Sodyum hidroksit, Sigma 06203 (NaOH, %98-100,5) (Sigma-Aldrich)¹
- Sodyum tiyosülfat çözeltisi, Merck 109950 0,1 mol L⁻¹ (0,1 N) Titrisol® (Merck)¹
- Sülfürik asit, Merck 100731 (% 95-97, d=1,84 g cm⁻³, EMSURE® ISO) (Merck)¹
- Toplam Diyet Lif Analiz Kiti, TDF100A (Sigma-Aldrich)¹

3.1.3.2. Sertifikalı Referans Malzemeler

- NIST 1570a ıspanak yaprakları (NIST (National Institute of Standards and Technology))
- NIST 1567a buğday unu (NIST)

¹ İlgili kimyasallar; Tübitak Bursa Test ve Analiz Laboratuvarı'nda hizmet alımı kapsamında uygulamalı olarak gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda, kurumun deposundan alınarak kullanılmıştır.

- LGC7162 ilek yaprakları (LGC Standards)¹
- NCS ZC73014 ay (National Analysis Center for Iron and Steel)¹
- IAEA-359 lahana (International Atomic Energy Agency)¹

3.1.3.3. Diğer sarf malzemeler

- 2 ml hacminde ve 9 mm genişlikte screw cap şeffaf vial (PerkinElmer N9306201)
- 9 mm genişlikte PTFE tek yarıklı ve silikon septumlu şeffaf vial kapağı (PerkinElmer N9306203)
- 20 ml hacminde, vida kapaklı şeffaf vial (Supelco, Sigma Aldrich)
- 40 mL hacminde, vida kapaklı şeffaf vial (Supelco, Sigma Aldrich)
- Double Rings 103 (12,5 cm) marka ve model mavi bant süzgeç kağıdı
- Millipore 0,45  m şırınga tipi tek kullanımlık hidrofilik PVDF filtre(Millex-HV, Millipore)
- AIM marka 0,22  m ve 25 mm şırınga tipi tek kullanımlık hidrofilik PVDF filtre
- 0,22  m PVDF, Hidrofilik, 100 mm, Durapore membran filtre (Millipore)
- 0,45  m PVDF, Hidrofobik, 90 mm, Durapore membran filtre (Millipore)
- 0,5–10  L hacim aralığında çalışılabilen Eppendorf mikropipet ve pipet uçları
- 10–100  L hacim aralığında çalışılabilen Eppendorf mikropipet ve pipet uçları
- 100–1000  L hacim aralığında çalışılabilen Eppendorf mikropipet ve pipet uçları
- 500–5000  L hacim aralığında çalışılabilen Eppendorf mikropipet ve pipet uçları
- 15 mL hacminde vida kapaklı polipropilen santrifüj tüpü (falkon tüpü) (steril ve steril olmayan)
- 50 mL hacminde vida kapaklı polipropilen santrifüj tüpü (falkon tüpü) (steril ve steril olmayan)
- Kapaklı, 100 mL hacimli polipropilen saklama kapları
- Porselen havan ve tokmağı
- Kalaycı pamuğu, kaynama taşı, kaba süzgeç kağıdı

¹ İlgili Sertifikalı Referans Malzemeler; Tübitak Bursa Test ve Analiz Laboratuvarı'nda hizmet alımı kapsamında uygulamalı olarak gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda, kurumun deposundan temin edilerek kullanılmıştır.

- Gooch krozeleri
- Agilent marka SampliQ SCX kartuş tipi kuvvetli kation değiştirici kolonlar (sülfonik asit-modifiye divinil benzen yapılı 30 mg polimerik dolgu maddeli ve 3 mL kartuş hacimlidir)

3.1.3.4. Numuneler

Biri Karadeniz bölgesinden (Giresun) temin edilmiş, diğeri yine Karadeniz bölgesi kaynaklı olup paketlenmiş, satışa sunulan ve sonuncusu da iç pazardan ve pazarı yansıtması için değişik yerlerden elde edilerek eşit kütlede karıştırılan üç farklı iç fındık örneği ayrı ayrı ve homojen olarak öğütülmüştür. Ispanak için kış mevsiminde birer hafta ara ile pazardan (Bursa) elde edilen ıspanak örneklerinin yaprakları alınarak dondurarak kurutma işleminde sonra kullanılmıştır. Buğday unu örnekleri için marketten (Bursa) elde edilen, etiketinde İç Anadolu kaynaklı olduğu belirtilen ve paketlenmiş üç farklı numune ayrı ayrı homojenize edilerek deney numuneleri olarak kullanılmıştır. Yağmur suyu örnekleri olarak Bursa'da Şubat-Mart 2013 tarih aralığında farklı zamanlarda aynı bölgeden toplanan yağmur suları kullanılmıştır.

3.1.3.5. Deneysel işlemlerde kullanılacak çözeltilerin hazırlanması

3.1.3.5.1. ICP-MS çalışmaları ve örnek hazırlamada kullanılmak üzere yaklaşık 0,1 N, 1 N ve 2 N nitrik asit çözeltilerinin hazırlanması

Yaklaşık 0,1 N nitrik asit çözeltisi, 1 mL (1,39 g) nitrik asit (suprapur) alınarak balon jodede 100 mL'ye ultra saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır. (çözelti derişimi 0,1434 N' dir). 10 mL nitrik asit balon jodede 100 mL'ye tamamlanarak da yaklaşık 1 N nitrik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Aynı şekilde 20 mL nitrik asit, 100 mL' ye tamamlanarak 2 N nitrik asit çözeltisi hazırlanmıştır.

3.1.3.5.2. Biyoyararlılık çalışmaları için gerekli çözeltilerin hazırlanması

3.1.3.5.2.1. Yaklaşık 0,1 N HCl çözeltisinin hazırlanması

Suprapur HCl çözeltisinden 1058 μL alınarak balon jodede 100 mL'ye ultra saf su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

3.1.3.5.2.2. Yaklaşık 0,1 N NaHCO₃ çözeltisinin hazırlanması

NaHCO₃ katısından 0,4573 gram alınarak bir miktar suda çözüldükten sonra balon jodede 50 mL'ye ultra saf su ile seyreltilerek hazırlanmıştır (0,1089 N NaHCO₃ çözeltisi hazırlanmıştır)

3.1.3.5.2.3. Pepsin çözeltisinin hazırlanması

0,4069 g pepsin, 10 mL 0,1 M HCl çözeltisinde çözünerek pepsin enzim çözeltisi hazırlanmıştır.

3.1.3.5.2.4. Pakreatin çözeltisinin hazırlanması

0,4584 g safra tuzu ve 0,0751 g pankreatin, 37,5 mL yaklaşık 0,1 N NaHCO₃ çözeltisinde çözülerek pankreatin/safra tuzları enzim çözeltisi hazırlanmıştır.

3.1.3.5.3. Örneklerdeki temel bileşenlerin analizleri için gerekli çözeltilerin hazırlanması

3.1.3.5.3.1. Ham selüloz tayini için gerekli sülfürik asit ve sodyum hidroksit çözeltilerinin hazırlanması

Yaklaşık % 1,25 (m/v) sülfürik asit ve sodyum hidroksit çözeltilerinin hazırlanması için; 12,5 g NaOH bir miktar suda çözüldükten sonra balon jode 1 L'ye tamamlanmıştır. Sülfürik asitten ise yoğunluk değeri olan 1,84 g mL⁻¹ kullanılarak

hesaplama yapıldığında % 1,25 (m/v) için derişik asitten yaklaşık 6,79 mL sülfürik asit (derişik asit yaklaşık % 100'lük kabul edildiğinde) alınarak balon jøjede 1 L'ye tamamlanarak hacimde kütlece yüzdesi 1,25 olan çözeltiler hazırlanmıştır.

3.1.3.5.3.2. Protein tayini için gerekli çözeltilerin hazırlanması

% 4'lük borik asit için 4 g borik asit bir miktar suda çözüldükten sonra saf su ile balon jøjede 100 mL'ye tamamlanmıştır. 0,02 N HCl ise derişik HCl' den (% 37'lik $d=1,19 \text{ g cm}^{-3}$) 1,68 mL alınarak balon jøjede 1000 mL'ye saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

3.1.3.5.3.3. Şeker tayini için gerekli çözeltilerin hazırlanması

% 20'lik (m/v) potasyum iyodür (KI) veya potasyum hidroksit (KOH) çözeltileri için 20 g KI (veya KOH) saf suda çözümlenerek son hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır. Nişasta çözeltisi de aynı şekilde 1 g nişasta alınarak son hacmi 100 mL olacak şekilde hazırlanmıştır. %1'lik fenolftalein indikatör çözeltisi için benzer yaklaşım ile 1 gram fenolftalein alınıp çözümlenerek etil alkolde ve balon jøjede 100 mL'ye tamamlanmıştır. Yaklaşık % 25 sülfürik asit (m/v) için; 25 gram sülfürik asitin hacim olarak karşılığı yoğunluk değerinden ($1,84 \text{ g mL}^{-1}$) belirlenmiş; derişik asitten 13,59 mL alınarak (derişik asit yaklaşık %100'lük kabul edildiğinde) balon jøjede 100 mL'ye tamamlanıp hacimde kütlece yüzdesi yaklaşık % 25 olan çözeltiler hazırlanmıştır.

3.1.3.5.3.4. Diyet lif tayini için gerekli çözeltilerin hazırlanması

Çözeltiler AOAC 985.29 standardına göre hazırlanmıştır. Yaklaşık % 78 etanol çözeltisi için 207 mL su 1 L balon jøjeye konur ve % 95 lik etil alkol ile 1 L'ye seyreltilir. 1 hacim su 4 hacim etil alkol ile karıştırıldığında da yaklaşık aynı yüzdede çözeltiler hazırlanmış olur. Standartta önerilen fosfat tamponu (0,08M yaklaşık pH=6; 1,400 g susuz disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) ve (veya 1,753g dihidratı) 9,68 g sodyum dihidrojen fosfat mono hidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (veya 10,94 g dihidratı) 700 mL suda çözülür, 1 L'ye tamamlanır ve yaklaşık pH değeri ayarlanır. Yaklaşık 0,275M NaOH çözeltisi için 11 g NaOH ACS (Amerikan Chemical Society) katısı yaklaşık 700 mL saf

suda çözülerek 1 L' ye tamamlanır. 0,325 M HCl çözeltisi ise 1 M HCl çözeltisinden 325 mL alınıp 1 L'ye tamamlanarak hazırlanır (AOAC 985.29)¹. 1M HCl çözeltisi hazırlamak için de % 37'lik $d=1,19 \text{ g cm}^{-3}$ olan hidroklorik asitten 82,99 mL alınarak balon jofede saf su ile 1000 mL' ye tamamlanır.

3.1.3.5.4. Yağ asidi metil esterleri oluşturmak için metanolik potasyum hidroksit çözeltisinin hazırlanması

İlgili çözelti 100 mL metanol ve 13,1 g KOH kullanılarak hazırlanmıştır.

3.1.3.5.5. Katı faz ekstraksiyonu için gerekli çözeltilerin hazırlanması

3.1.3.5.5.1. Metanolde % 0,1 (v/v) formik asit çözeltisinin hazırlanması

100 µL formik asit alınarak metanol ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti, katı faz kartuş kolonların şartlandırılması için kullanılmıştır.

3.1.3.5.5.2. Suda % 2 (v/v) formik asit çözeltisinin hazırlanması

2 mL formik asit alınarak ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti, katı faz kartuş kolonların şartlandırılması için kullanılmıştır.

3.1.3.5.5.3. Suda % 0,5 (v/v) amonyak çözeltisinin hazırlanması

2 mL amonyak ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak katı faz kartuş kolondan elüsyon için kullanılan çözelti hazırlanmıştır. Elüsyon için literatürde önerilen çözelti (Anonim 2010) ICP-MS şartlarına göre uyarlanarak kullanılmıştır.

¹ AOAC 985.29: Total Dietary Fibre in Foods Enzymatic-Gravimetric Method' unu göre hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin analize hazırlanması

3.2.1.1. Ispanak örneklerinin liyofilizasyon işlemine tabi tutulması

Ispanak yaprakları köklerden ve saplardan ayıklanarak makro kirliliklerin uzaklaştırılması için önce çeşme suyu ile daha sonra da ultra saf su ile birkaç kez yıkanmıştır. Yapraklar el yardımı ile küçük parçalara ayrılmış; en az 24 saat süre ile kapaklı cam viallerde $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda tutulmuştur ve daha sonra $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve 0,057 mBar şartlarında liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Kurutulan örnekler porselen havanda öğütülerek homojenize edilmiş ve kapaklı polipropilen kaplarda muhafaza edilmiştir. Buğday unu örnekleri homojenize edilmiş; iç fındık örnekleri ise önce porselen havanda öğütülerek belirli tanecik boyutuna getirildikten sonra homojenize edilmiş ve her iki örnek de ıspanak örnekleri gibi kapaklı polipropilen kaplarda muhafaza edilmiştir.

3.2.1.2. Örneklerinin mikrodalga parçalama yöntemi ile AAS analizine hazırlanması

Numunelerin mikrodalga parçalama ve sonrasında AAS ile analizi DS/EN 14084 standardı¹ temel alınarak ve bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaç ile homojenize edilmiş örneklerden 0,5'er g alınmış; 6 mL HNO₃ ve 1 mL H₂O₂ kullanılarak parçalanmıştır. Parçalanmış örnekler oda sıcaklığına soğutulduktan sonra polipropilen santrifüj tüplerine alınarak 25 mL hacim değerine seyreltilmişlerdir. Sertifikalı referans malzemeler, standart katmalı örnekler veya çözgen kör örnekleri de aynı şekilde hazırlanmıştır. Standart katma işlemi matrislere parçalama işlemi öncesi 0,1 mg L⁻¹ Mn ve Cu standardı eklenerek gerçekleştirilmiştir.

¹ “DS/EN 14084: Foodstuffs - Determination of trace elements - Determination of lead, cadmium, zinc, copper and iron by atomic absorption spectrometry (AAS) after microwave digestion” (TS EN 14084: Gıdalar - Eser elementlerin tayini - Mikrodalga ile parçalama işleminden sonra kurşun, kadmiyum, çinko, bakır ve demirin atomik absorpsiyon spektrometri (AAS) ile tayini)

Uygun standart çözeltiler ile kalibrasyon eğrisi çizildikten sonra örnekteki metal derişiminin belirlenmesi için aşığıdaki eşitlikten yararlanılmıştır.

$$w=[(a-b)/m].v \quad (3.2.1.2)$$

w: örnekteki mg kg⁻¹ olarak metal miktarı

a: mg L⁻¹ olarak örnekteki metal derişimi

b: mg L⁻¹ olarak çözen kör örneğindeki metal derişimi

v: örnek hacmi, mL

m: örnek miktarı, g

Belirleme ve tayin limiti belirlenirken de standart sapmalar temel alınmıştır. DS/EN 14084, bu amaç ile EN 13804 standardına yönlendirmektedir¹.

3.2.1.3. Örneklerinin ICP-MS analizine hazırlanması

ICP-MS analizinde kullanılacak tüm deneysel malzemeler %10 (v/v) nitrik asit çözeltilerinde tutulmuş, sonra ultra saf su ile birkaç kez yıkanıp etüvde kurutulmuştur. Mangan ve bakır standart çözeltileri, stok çözeltilerden günlük olarak seyreltilerek hazırlanmış ve kalibrasyon çözeltileri elde edilmiştir. İndiyum iç standart çözeltisi tüm örnekler ve standartlara son derişim 10 µg L⁻¹ olacak şekilde eklenmiştir. Kalibrasyon eğrileri 0,5 ve 40 µg L⁻¹ arasında sekiz noktalı olacak şekilde hazırlanmıştır. Standartlar da dahil tüm çözeltiler 0,45 µm PVDF filtrelerden süzölmüş ve analiz edilinceye kadar +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır. Mikrodalga parçalama işlemine tabi tutulan örnekler uygun seyreltme işlemleri yapıldıktan sonra ICP-MS cihazı ile de analiz edilmiştir. Tüm örnekler, standart malzemeler veya kör örnekler en az üç tekrarlı olarak çalışılmış ve analiz edilmiştir.

¹ “EN 13804: Foodstuff - Determination of trace elements - Performance criteria, general considerations and sample prepatration” (TS EN 13804: Gıdalar - Eser elementlerin tayini - Performans ölçütleri, genel hususlar ve numune hazırlama)

3.2.2. ICP-MS için kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

1000 mg kg⁻¹ stok mangan, bakır ve indiyum çözeltileri kullanılarak kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Stok çözeltiden 1 mg kg⁻¹ ara stok çözeltisi hazırlanmış ve bu ara stok çözeltileri de seyreltilerek 0,5–1,0–3–5–10–20–40–80 µg kg⁻¹ mangan ve bakır çözeltileri hazırlanmıştır. İndiyum ise gerekli olan tüm hallerde ve tüm çözeltilere 10 µg kg⁻¹ olacak şekilde iç standart olarak eklenmiştir.

3.2.3. Fraksiyonlama çalışmaları için örneklerin hazırlanması

Ispanak örneklerinden yaklaşık 0,01 gram; un örneklerinden yaklaşık 0,5 gram ve fındık örneklerinden 0,1–0,5 gram alınarak farklı çözümler ile ekstraksiyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Tüm örnekler en az üç tekrarlı olarak çalışılmıştır.

3.2.4. Ispanak, un ve fındık örneklerindeki temel bileşenlerin belirlenmesi

3.2.4.1. Ispanak, un ve fındık örneklerindeki nem içeriğinin belirlenmesi

Örneklerdeki nem içeriği ISO 771:1977, TS 3075 ve EN ISO 712¹ standartları temel alınarak ve bu standartlardan aşağıda özetlendiği şekilde uyarlanarak belirlenmiştir. Yöntemde örnekler sabit kütleye ulaşıncaya dek, 105 ± 2 °C'de etüvde kurutulmuştur. Bu amaç ile homojen hale getirilmiş ıspanak için yaklaşık 5 g, fındık için yaklaşık 10 g ve un için yaklaşık 5 g örnekler alınarak etüvde en az iki saat tutulmuştur. Fındık örnekleri için bu süre altı saat olarak uygulanmıştır. Desikatörde soğutulan örnekler tartılarak tekrar etüvde tutulmuş; sabit tartıma gelince bu tartım değerleri alınarak hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır. Örnekler üçer tekrarlı olarak çalışılarak her biri için hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmış ve ortalama belirlenmiştir.

$$U=\text{Nem yüzdesi}=\frac{(m_1-m_2)}{(m_1-m_0)}\times 100 \quad (3.2.4.1)$$

¹ “ISO 771:1977: Oilseed residues; Determination of moisture and volatile matter content” (TS ISO 771: Yağlı tohum kalıntıları - Rutubet ve uçucu madde içeriği tayini); TS 3075: İç fındık; “EN ISO 712: Cereals and cereal products - Determination of moisture content -Reference method” (TS EN ISO 712: Tahıl ve tahıl ürünleri-Rutubet muhtevası tayini- Referans yöntem)

U=örnekteki nem (veya uçucu madde) yüzdesi

m_0 = Kapların kütlesi, (g)

m_1 =Kap+numune kütlesi, kurutmadan önce (g)

m_2 =Kap+numune kütlesi, kurutmadan sonra (g)

3.2.4.2. Ispanak, un ve fındık örneklerindeki ham selüloz içeriğinin belirlenmesi

Örneklerdeki ham selüloz içeriği ISO 5498:1981¹ standardı temel alınarak ve bu standarttan aşağıda özetlendiği şekilde uyarlanarak belirlenmiştir. Yöntem, homojen hale getirilen ve gerekirse ön kurutma yapılan ve yağı uzaklaştırılan örneklerin standart derişimde önce sülfürik asit sonra da sodyum hidroksit kaynatılması, kurutulması ve kalıntının kütesinin belirlenmesine dayanır. Bu amaç ile homojen hale getirilmiş ıspanak, un ve fındık örneklerinden yaklaşık birer gram alınarak uygun cam krozeyle yerleştirilmiş ve krozelere tartılmıştır. Yaklaşık 1 g kadar kuvarz kum da krozelere alınmıştır. Krozeler sıcak ekstraktöre (Fibertec cihazına) yerleştirilerek 150 mL % 1,25'lik (m/v) sülfürik asit çözeltisi ilave edilmiştir. Köpürmeyi önlemek için 2–4 damla arası 2-oktanol eklenmiş ve sülfürik asit ile kaynama başladıktan sonra 30 dakika süre ile sıcak ekstraksiyon uygulanmıştır. Örnekler 3×30 mL sıcak su ile yıkanmış ve kalıntıya 150 mL % 1,25'lik (m/v) sodyum hidroksit çözeltisi ilave edilerek ilk basamakta sülfürik asit için yapılan işlemler tekrarlanmıştır. Aynı şekilde yıkama işlemleri de bittikten sonra; krozeler, 130 ± 2 °C'ye ısıtılmış etüvde en az üç saat tutulmuş, desikatörde oda sıcaklığına soğutulup sabit tartıma getirildikten sonra 525 ± 25 °C'de en az üç saatlik kül etme işlemi uygulanmıştır. Örnekler üçer tekrarlı olarak çalışılmış ve her biri için hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılarak ortalama alınmıştır.

$$\% \text{ Ham selüloz} = (m_1 - m_2) \times (100/m_0) \quad (3.2.4.2)$$

¹ "ISO 5498:1981: "Agricultural food products-Determination of crude fibre content-General method"

m_0 = test edilen numune kütlesi (g)

m_1 = Etüvde 130 °C’de sabit tartıma getirilen cam kroze + kuvarz kum + numune kütlesi (g)

m_2 = 525°C’de kül fırınından çıktıktan sonra sabit tartıma getirilen cam kroze + kuvarz kum + kalıntı kütlesi (g)

Fındık örneklerinde yaklaşık beşer gram numune alınarak dietil eter ile soxhlet ekstraksiyonu sonrası yağı uzaklaştırılmıştır (bkz. Bölüm 3.2.4.5). Kalan posa miktarı (yağsız kısım), alınan numune miktarına bölünerek düzeltme faktörü elde edilmiş ve yukarıdaki formüle göre (bkz. 3.2.4.2) bulunan ortalama ham selüloz miktarı, bu düzeltme faktörüne bölünerek de düzeltilmiş ham selüloz miktarı elde edilmiştir.

3.2.4.3. Ispanak, un ve fındık örneklerindeki kül içeriğinin belirlenmesi

Örneklerdeki kül içeriği ISO 5984:2002 ve EN ISO 2171, TS 921:1971¹ standartları temel alınarak ve aşağıda özetlendiği şekilde matrislere uyarlanarak belirlenmiştir. Yöntem örneklerin kül fırınında yakılması ve kalıntının kütlesinin belirlenmesine dayanır. Bu amaç ile homojen hale getirilmiş ıspanak ve un yaklaşık 5 g, fındık için yaklaşık 3 g örnekler alınarak 550 °C’de en az altı saat tutulmuş; kalıntı beyaz ya da beyaza yakın renk alıncaya dek işlem sürdürülmüştür. Daha sonra örnekler desikatörde soğutularak tartılmıştır. Örnekler üçer tekrarlı olarak çalışılmış ve ortalama alınmıştır. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır:

$$W=\text{Kül yüzdesi}=[(m_2-m_0)/(m_1-m_0)] \times 100 \quad (3.2.4.3)$$

m_0 = Boş kabın kütlesi (dara) (g)

m_1 = numune kütlesi + kabın kütlesi (g)

m_2 =küllandirme işlemi sonrası numune kütlesi + kabın kütlesi (g)

¹ “ISO 5984:2002: Animal feeding stuffs-Determination of crude ash” (TS ISO 5984: Hayvan yemleri- Ham kül tayini); TS EN ISO 2171 Tahıllar, baklagiller ve yan ürünleri- Yakılarak kül veriminin tayini; TS 921: 1971: Yağlı tohum küspelerinde toplam kül tayini

3.2.4.4. Ispanak, un ve fındık örneklerindeki protein içeriğinin belirlenmesi

Örneklerdeki protein içeriği ISO 1871:1975¹ standardı temel alınarak ve matrislere uyarlanarak belirlenmiştir. Yöntem özetle; organik yapının sülfürik asit ile parçalanması, destilasyonu ve serbest amonyanın titre edilmesine dayanır. Bu amaç ile homojen hale getirilmiş ıspanak örneklerinden yaklaşık 2 g, un ve fındık örneklerinden ise yaklaşık 0,3' er gram 250 mL'lik kjeldahl tüplerine alınarak 15 mL derişik sülfürik asit ve ikişer tane katalizör (kjeldahl tableti Cu/3,5)eklenmiştir. Örnekler; 100, 200 ve 300 °C'de onar dakika ve son olarak da 420 °C'de 1 saat süre ile yakma ünitesinde yakılmıştır. Örneklerin rengi yeşilimsi sarı olunca yakma işlemine son verilerek oda sıcaklığına soğutulmuş ve soğuyan örnekler Foss Kjeltac 2200 damıtma ünitesine yerleştirilerek buhar fazı % 4'lük borik asit içerisine toplanmıştır. Toplama kabındaki borik asit, 0,02 N HCl ile yeşilden gri-mor renge dek titrasyon yapılmıştır. Sonuçlar azot cinsinden hesaplanmakta olup; protein ifadesi için faktör kullanımı gerekliliği de standartta belirtilmiştir. Örnekler üçer tekrarlı olarak çalışılarak ortalama alınmıştır. Azot yüzdesi için aşağıdaki formüle göre hesaplama yapılmıştır:

$$\% \text{ Azot} = ((M - \text{blank}) \times N \times 14,007 \times 100) / (m \times 1000) \quad (3.2.4.4)$$

M = Titrasyonda, numune için HCl sarfiyatı (mL)

Blank = Titrasyonda, çözgen kör örneği (şahit) için HCl sarfiyatı (mL)

N= Titrasyonda kullanılan HCl çözeltisinin derişimi (0,02 N)

m= numune kütlesi (g)

14,007=Azotun atom kütlesi (g/mol)

Azot için bulunan değer 6,25 faktörü ile çarpıldığında örnekteki protein yüzdesi belirlenmiş olur. AOAC 985.29² metodunda da proteindeki azot yüzdesi bilinmiyor ise protein miktarının belirlenmesi için 6,25 faktörünün kullanılması önerilmektedir.

¹ ISO 1871:1975: Agricultural food products -General directions for the determination of nitrogen by the Kjeldahl method

² AOAC 985.29: Total Dietary Fibre in Foods Enzymatic-Gravimetric Method

3.2.4.5. Ispanak, un ve fındık örneklerindeki yağ içeriğinin belirlenmesi

Örneklerdeki yağ içeriği TS 765:1971¹ temel alınarak belirlenmiştir. Dietil eter ile ekstraksiyon sonucu yağın eldesi prensibine dayanan bu metot, un ve ıspanak örneklerine de uyarlanarak kullanılmıştır. Bu amaç ile homojenize edilmiş örneklerden ıspanak için 10 g, fındık için 3 g ve un için 5 g örnekler alınarak ekstraksiyon kartuşuna aktarılmıştır. Kartuşun ağız kısmı pamuk tıkaç (kalaycı pamuğu) ile kapatılarak daha önce etüvde kurutularak sabit tartıma getirilen ve içine yeterli miktarda dietil eter ve ayrıca kaynama taşı konulan ekstraksiyon balonu ile birlikte altı saat süre ile soxhlet sisteminde ekstraksiyona tabi tutulmuştur. İlgili işlem için sifon sayısı “1 sifon/2dk” şeklindedir. Ekstraksiyon sonunda ortamdaki dietil eter 60 °C’de döner vakumlu buharlaştırıcıda uzaklaştırılmış ve ekstraksiyon balonu etüvde 105 °C’de 4–5 saat kurutularak sabit tartıma getirilip tartılmıştır. Örnekler üçer tekrarlı olarak çalışılmış ve her biri için hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılarak ortalama belirlenmiştir.

$$\% \text{ Dietil eter ekstraktı} = [(m_1 - ((m_1 + m_0) - m_2)) / m_1] \times 100 \quad (3.2.4.5)$$

m_1 = Numunenin kütlesi (g)

m_2 = Ekstraksiyon balonunun en son basamakta (105 °C sonrası) tartılan kütlesi, (dara+numune kütlesi) (g)

m_0 = Ekstraksiyon balonunun kütlesi (dara) (g)

m_1 bulunurken Sabit tartıma getirilmiş balonun kütlesi + kalıntı kütlesi (g)- Sabit tartıma getirilmiş balonun kütlesi (g) eşitliği kullanılmıştır.

¹ TS 765: Yağlı tohum küspelerinde dietil eter ile ekstrakte edilebilen yağın tayini

3.2.4.5.1. Kloroform:metanol karışımı ile fındık örneklerinin yağ içeriklerinin belirlenmesi

Fındık örneklerinden ikişer gram alınarak 3×15 mL 2:1 (v/v) kloroform:metanol karışımı ile otuzar dakika ultrasonik ekstraksiyon uygulanarak örneklerden yağ uzaklaştırılmıştır. Her defasında santrifüгат atılarak örneklere 15 mL çözügen eklemesi yapılmıştır. Elde edilen son örnek mavi bant süzgeç kağıdından süzülerek açık havada bir gün süre ile kurutulmuş, kalıntı tartılmış ve kütle azalmasından yağ yüzdesi belirlenmiştir. İşlem beş tekrarlı deneme şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.5.2. Fındık örneklerinin yağ asitleri bileşimin belirlenmesi

Fındık örneklerinde yağ içeriğinin belirlenmesinden sonra (bkz. bölüm 3.2.4.5) elde edilen kalıntıdaki yağ asitleri TS 4664 EN ISO 5508¹ standardı temel alınıp gerekli şekilde uyarlanarak gaz kromatografisi ile analiz edilmiştir. Yağ asitleri metil esterlerinin hazırlanmasında ise TS 4504 EN ISO 5509² standardından yararlanılarak metanollü potasyum hidroksit çözeltisi ile transesterleşme işlemi uygulanmıştır.

Fındık örnekleri altı saat süre ile dietil eter ile soxhlet ekstraksiyonuna tabi tutulduktan sonra oluşan yağ örneklerinden 0,1 g örnek alınıp, 4 mL izooktan eklenerek vortekslendikten sonra 0,8 mL metanollü KOH çözeltisi ilave edilip deney tüpü kapatılarak 30 s süre ile hızlıca çalkalanmıştır. Daha sonra yaklaşık 1 g sodyum hidrojen sülfat monohidrat çözeltiye ilave edilerek yine şiddetli bir şekilde çalkalanmış ve metil esterleri içeren izooktanlı üst faz başka bir vialle alınmıştır. Yağ asidi metil esterlerinin gaz kromatografisi ile analizinde Supelco F.A.M.E. karışım C4-C24 standardı cihaza enjekte edilerek yağ asitleri metil esterleri % olarak doğrulanmıştır.

¹ TS 4504 EN ISO 5509: Hayvansal ve bitkisel katı ve sıvı yağlar- Yağ asitleri metil esterlerinin hazırlanması;

² TS 4664 EN ISO 5508: Hayvansal ve bitkisel katı ve sıvı yağlar-Yağ asitleri metil esterlerinin gaz kromatografisiyle analizi

Bu işlemde kalitatif analizde yararlanılırken; kantitatif analiz için standarda göre örneğin kromatogramı üzerinde numuneyi meydana getiren bileşenlerin tümünün görüldüğü varsayılarak pikler altında kalan toplam alan bileşenlerin %100' üne karşılık gelecek şekilde göz önüne alınmış ve hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır:

Metil Esteri Kütlece Yüzdesi=(İlgili metil esteri pik alanı/toplam pik alanı)× 100
(3.2.4.5.2)

3.2.4.6. Ispanak, un ve fındık örneklerindeki şeker içeriğinin Luff-Schoorl yöntemi ile belirlenmesi

Örneklerdeki şeker içeriği Türk Gıda Kodeksi Tebliğ No: 2002/26'ya¹ göre Luff Schoorl yöntemi temel alınarak ve matrislere gerekli uyarlamalar yapılarak belirlenmiştir (Anonim 2002a). Yöntemin prensibi, örnekteki indirgen şekerin, belirli koşullarda kaynama noktasına kadar Cu (II) çözeltisi ile ısıtılması, Cu (II) iyonlarının bir kısmının Cu (I) iyonlarına indirgemesi ve çözültide kalan Cu (II) iyonlarının iyodimetrik olarak tayini esasına dayanır (Anonim 2002b)

Ispanak, fındık ve un örneklerinden yaklaşık 5 g alınarak üzerlerine bir miktar saf su ilave edilmiş, 5 mL Carez I ve 5 mL Carez II çözeltilerinden eklenerek iyice karıştırılıp 200 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. Çökmenin gerçekleşmesi için 10–15 dk bekletilen örnekler kaba süzgeç kağıdından süzölmüştür. Süzütüden 25 mL alınarak üzerine 50 mL su eklenmiştir. Su banyosuna konulan örneklere, sıcaklık 67–70 °C' ye ulaştığında 5 mL derişik hidroklorik asit eklenerek 5 dk daha bekletilmiştir. Soğutulan çözültiye bir damla fenolftalein indikatörü eklenerek % 30'luk KOH çözeltisi ile hafif pembe renk gözlenene kadar nötrale edilmiştir. Örnekler birkaç damla asetik asit eklenerek pembe renk giderilip 100 mL'ye tamamlanmıştır. Örnekten 25 mL alınıp üzerine 25 mL Luff çözeltisi ve birkaç tane kaynama taşı konularak geri soğutucuya bağlanmıştır.

¹ Türk Gıda Kodeksi İnsan Tüketimine Sunulan Şekerlerin Analiz Yöntemleri Tebliği (Tebliğ No: 2002/26) temel alınmıştır. Örnek hazırlama ve hesaplama basamakları Tübitak Bursa Test ve Analiz Laboratuvarı'nda hizmet alımı kapsamında uygulandığı şekli ile belirtilmiştir.

Örnekler 10 dakika kaynatılarak hızlı bir şekilde su altında soğutulup üzerlerine 10 mL % 20 lik potasyum iyodür çözeltisi eklenmiştir. Örneklerle çok yavaş bir şekilde 25 mL % 25'lik H₂SO₄ ve sonra 2 mL nişasta indikatör çözeltisi eklenip; 0,1 N tiyosülfat çözeltisi ile renk maviden krem rengine dönünceye kadar titre edilmiştir. Harcanan tiyosülfat çözeltisi hacmi kaydedilip aynı işlemler örnek çözeltisi yerine 25 mL su alınarak geri soğutucu basamağından itibaren kör örneğe de (şahit) uygulanmış ve harcanan tiyosülfat çözeltisi kaydedilmiştir (Anonim 2012b) Her numune için iki paralel test ve her test için de iki paralel titrasyon yapılmıştır. Toplam dört titrasyon sonucunun ortalaması alınmıştır. Seyrelmelerdeki hacim değerleri göz önüne alınarak (200→25→100→25 mL değerleri) titre edilen numune faktörü belirlenmiştir. Bunun için hesaplama aşağıdaki gibi yapılmıştır:

$$\text{Titre edilen numune faktörü} = [25 \times \text{numune kütlesi (g)/200}] \times [25 (\text{geri soğutucudan alınan örnek})/100] \quad (3.2.4.6.1)$$

Şahit ve numune sarfiyatları arasındaki farka göre Çizelge 3.2.4.6.1' deki tablodan mg olarak invert şeker miktarı belirlenmiştir.

Çizelge 3.2.4.6.1. Luff Scroll yöntemi için harcanan tiyosülfat hacmine karşı mg olarak invert şeker değeri (Anonim 2012b)

V*	0,1 N Sodyum tiyosülfat çözeltisinin mL sayısı									
	0	1 ^b	2	3	4	5	6	7	8	9
	miligram invert şeker									
0	0,00	0,24	0,48	0,72	0,96	1,20	1,44	1,68	1,92	2,16
1 ^a	2,40	2,64	2,88	3,12	3,36	3,60	3,84	4,08	4,32	4,56
2	4,80	5,04	5,28	5,52	5,76	6,00	6,24	6,48	6,72	6,96
3	7,20	7,45	7,70	7,95	8,20	8,45	8,70	8,95	9,20	9,45
4	9,70	9,95	10,20	10,45	10,70	10,95	11,20	11,45	11,70	11,95
5	12,20	12,45	12,70	12,95	13,20	13,45	13,70	13,95	14,20	14,45
6	14,70	14,95	15,20	15,45	15,70	15,95	16,20	16,45	16,70	16,95
7	17,20	17,46	17,72	17,98	18,24	18,50	18,76	19,02	19,28	19,54
8	19,80	20,06	20,32	20,58	20,84	21,10	21,36	21,62	21,88	22,14
9	22,40	22,66	22,92	23,18	23,44	23,70	23,96	24,22	24,48	24,74
10	25,00	25,26	25,52	25,78	26,04	26,30	26,56	26,82	27,08	27,34
11	27,60	27,87	28,14	28,41	28,68	28,95	29,22	29,49	29,76	30,03
12	30,30	30,57	30,84	31,11	31,38	31,65	31,92	32,19	32,46	32,73

Dört paralel test yapılmıştır. İki protein; ikisi kül tayini için kullanılmıştır. Yaklaşık 1 g homojenize edilmiş ve öğütülmüş numune tartılarak erlene alınmıştır. Önce 50 mL fosfat tamponu eklenerek pH değeri $6,0 \pm 0,2$ değerine ayarlanmıştır. Daha sonra 0,1 mL α -amilaz eklenmiştir. Karıştırılarak üzeri alüminyum folyo ile kapatılan örnekler kaynayan sıcak su banyosuna (100 °C) yerleştirilip 5 dk aralıklarla karıştırılmıştır. Erlenlerin iç sıcaklığı 95 °C'ye gelince yarım saat tutulup oda sıcaklığına soğutulmuş ve pH $7,5 \pm 0,2$ 'ye 10 mL 0,275 M NaOH çözeltisi ile ayarlanmıştır. Örnekler fosfat tamponunda, kullanmadan hemen önce hazırlanmış 50 mg mL^{-1} derişimde hazırlanmış proteaz çözeltisinden 0,1 mL eklenip alüminyum folyo ile üzeri tekrar kapatılarak 60 °C su banyosunda iç sıcaklık 60 °C olunca yarım saat daha tutulmuştur. Oda sıcaklığına soğutulan örneklerin pH değeri 4–4,6'ya, 10 mL 0,325 M HCl ile ayarlanmıştır. Örnekler 0,1 mL amiloglukozidaz eklenip alüminyum folyo ile üzerleri kapatılarak 60 °C su banyosunda bir saat tutulmuştur. 200 mL ve 60 °C'de ön ısıtılmış % 95'lik etanol çözeltisi eklenerek bir gece oda sıcaklığında çökmenin tamamlanması için bekletilmiştir. Uygun Gooch krozelerinden 3 kez 20 mL % 78 etanol, 2 kez 10 mL % 95 etanol ve 2 kez 10 mL aseton ile yıkanmıştır. 105 °C' de etüvde bir gece kurutulup desikatörde soğutularak kalıntı + kuvarz kum + kroze kütlesi (w_2) yaklaşık 0,1 mg değerinde sabit tartıma getirilip belirlenmiştir. İki örnekte Kjeldahl protein analizi yapılmıştır (bkz. Bölüm 3.2.4.4). Protein miktarını belirlemek için azot içeriği 6,25 faktörü ile çarpılmıştır. İki örnek ise 525 °C'de 5 saat tutulmuş ve desikatörde soğutularak sabit tartımı tartımı alınıp kül miktarı belirlenmiştir (bkz. Bölüm 3.2.4.3) (kalıntı + kuvarz + kroze kütlesi = w_3). Özetle 130, 105 ve 525 °C sonrası kroze+numune kütleleri sırası ile w_1 , w_2 ve w_3 olarak kaydedilerek hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır:

$$\% \text{ toplam diyet lif (TDF)} = \frac{[(w_2 - w_1) - (w_3 - w_1)] - \text{ortalama protein kütlesi}}{\text{numune kütlesi}} \times 100 \quad (3.2.4.7)$$

3.2.5. Yağ asitleri metil esterlerinin GC ile analizi

Fındık örneklerinin yağ asitleri bileşimini belirlemek için yararlanılan GC şartları Çizelge 3.2.5.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.2.5.1. GC çalışma şartları

Deneysel parametreler	Değer
Kolon sıcaklığı	210 °C, izotermal
Akış hızı	1 mL dk ⁻¹
Split oranı	1/20
FID sıcaklığı	250 °C
Enjektör sıcaklığı	250 °C
Enjeksiyon hacmi	1 µL
En düşük tayin sınırı	% 0,1
Kullanılan gazlar	Hidrojen jeneratörü tarafından üretilen hidrojen gazı ile Yüksek saflıkta helyum gazı ve yüksek saflıkta kuru hava (Linde Gaz A.Ş'den temin edilmiştir.)

3.2.6. AAS ile metal analizleri

Mikrodalga ile parçalanmış örneklerin Mn ve Cu içerikleri AAS ile analiz edilmiştir. Mikrodalga parçalama programı ve AAS şartları sırası ile Çizelge 3.2.6.1 ve Çizelge 3.2.6.2'de verilmiştir. AAS analizinde ayrıca, Çizelge 3.2.6.3'de gösterilen sertifikalı referans malzemelerden (SRM) de yararlanılmıştır. SRM sertifika değerleri ilgili çizelgede görüldüğü gibidir. Örnekler üzerine uygulanan parçalama işlemleri SRM'lere de uygulanarak mangan ve bakır içerikleri sertifikada verilen değerler ile karşılaştırılmıştır. Örnekler üzerine ayrıca; 0,1 mg L⁻¹ olacak şekilde Mn ve Cu standardı da eklenerek yüzde geri kazanım değerleri incelenmiştir.

Çizelge 3.2.6.1. Mikrodalga programı

Zaman (dk)	Basınç (Bar)
2	250
2	0
6	250
5	400
5	600

Çizelge 3.2.6.2. AAS çalışma şartları

	Akım	Dalgaboyu (nm)	Slit aralığı (mm)	Lamba	Alev yüksekliği	Gaz ve akış hızı
Mn	10 mA	279,5 nm	0,2	BGC-D ₂ *	7 mm	2,0 L dk ⁻¹ hava-asetilen
Cu	6 mA	324,8 nm	0,5	BGC-D ₂	7 mm	1,8 L dk ⁻¹ hava-asetilen

*BGC-D₂=zemin düzeltme-döteryum

Çizelge 3.2.6.3. Sertifikalı referans malzemeler ve Mn, Cu elementlerinin sertifika değerleri

	Bakır (mg kg ⁻¹)	Mangan (mg kg ⁻¹)
Lahana IAEA-359, Cabbage	5,67 ± 0,25 (%95 güven aralığı)	31,9 ± 1,2 (%95 güven aralığı)
Çilek Yaprağı (LGC 7162), Strawberry Leaves	10 (homojen değil)	171 ± 10
Çay NCS ZC73014, Tea	18,6 ± 0,7	500 ± 20
İspanak Yaprağı NIST 1570a, Spinach leaves	12,2 ± 0,6	75,9 ± 1,9
Buğday Unu NIST 1567a, Wheat Flour	2,1 ± 0,2	9,4 ± 0,9

3.2.7. ICP-MS ile metal analizleri

3.2.7.1. AAS ile karşılaştırma analizleri

AAS için mikrodalga sisteminde hazırlanan ve analiz edilen örnekler kalibrasyon eğrisine uygun seyreltilerek ICP-MS cihazı ile de analiz edilmiştir. ICP-MS şartları Çizelge 3.2.7.1.1’de belirtildiği gibidir.

Çizelge 3.2.7.1.1. ICP-MS çalışma şartları

Deneysel parametreler	Değer
RF güç	1000 W
Plazma argon akış hızı	17,0 L dk ⁻¹
Sisleştirici gaz akış hızı	0,85 L dk ⁻¹
Yardımcı gaz akış hızı	1,2 L dk ⁻¹
Sisleştirici	Ryton karşı akış
Sprey odası (püskürtme haznesi)	Scott
Samplere ve skimmer koniler	Ni, iç çap: 1,1 mm Ni, iç çap: 0,9 mm
Örnek alma hızı	1,5 mL dk ⁻¹
Okuma/tekrar	1
Tekrar sayısı	3
Görüntüleme zamanı, ms	50
Tarama modu	Peak hopping
Dedektör modu	Dual
Ölçülen izotoplar	⁵⁵ Mn (% 100,0000), ⁶³ Cu (% 69,2), ⁶⁵ Cu (% 30,8)

3.2.7.2. Açık sistem yaş yakma ile toplam metal analizleri

Açık sistem yaş yakmanın etkinliğini araştırmak için öncelikle mikrodalga parçalama işleminde kullanılan çözen miktarları temel alınarak yaş yakma işlemi yapılmıştır. 0,5'er gram tartılan örnekler 6 mL nitrik asit ve 1 mL hidrojen peroksit ile 100 mL hacimli, ağzı saat camı ile kapatılmış cam beherlerde ve ısıtıcı üzerinde parçalama işlemine tabi tutulmuştur. Parçalan örnekler soğutulmuş ve polipropilen santrifüj tüpünde 50 mL' ye saf su ile tamamlanmıştır. PVDF filtreden süzülen örnekler seyreltilerek ICP-MS ile analiz edilmiştir. Örneklere uygulanan işlemler aynı şekilde SRM'lere de uygulanmış; ayrıca standart katma analizleri de yapılmıştır.

3.2.7.2.1. Açık sistem yaş yakma işleminin optimizasyonu

Açık sistem yaş yakma işleminin optimizasyonu için merkezi kompozit dizayndan (CCD) yararlanılmıştır (Brereton 2007). Her bir matriks ile ön denemeler yapılarak ıspanak ve un için kütle, nitrik asit hacmi ve peroksit hacminin etkili parametreler olduğuna karar verilmiştir. Fındık matriksi yağlı olduğu için yağ bileşenlerinin tam parçalamasına yönelik olarak sülfürik asitten yararlanılmış ve ilgili parametreler fındık miktarı, nitrik asit hacmi ve sülfürik asit hacmi olarak seçilmiştir. Peroksit miktarı ön çalışmalar sonrası 2,0 mL değerinde sabit tutulmuştur. Parçalamada etkili faktörlerin optimizasyonu için ikinci dereceden üç faktörlü CCD kullanılmıştır. Deney sayısı $N=2^k+2k+1$ (k=faktör sayısı) formülüne göre hesaplanmıştır (Brereton 2007, Erdemir ve ark. 2013). Ispanak ve un örnekleri için optimizasyon çalışmalarında mangan ve bakır elementlerine ilişkin okunan sinyaller temel alınmıştır. Fındık örnekleri için $\mu\text{g L}^{-1}$ olarak belirlenen metal düzeyleri temel alınarak optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Tüm hesaplamalar Microsoft Office Excel 2003 programı ile gerçekleştirilmiştir.

$$y = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (3.2.7.2.1)$$

İkinci dereceden polinom denkleminin x_1 , x_2 ve x_3 ' e göre türevleri alınıp sıfıra eşitlendiğinde belirtilen değişkenlerin teorik değerleri bulunmuş; gerçek değerlerin belirlenmesi için ayrı ayrı $x_1=(x_{1(\text{gerçek})}-0 \text{ değeri(orta değer)})/(0 \text{ değeri ile } \pm 1 \text{ arasındaki fark})$, $x_2=(x_{2(\text{gerçek})}-0 \text{ değeri})/(0 \text{ değeri ile } \pm 1 \text{ arasındaki fark})$ ve $x_3=(x_{3(\text{gerçek})}-0 \text{ değeri})/(0 \text{ değeri ile } \pm 1 \text{ arasındaki fark})$ denklemlerinden yararlanılmıştır (Erdemir ve ark. 2013).

Çizelge 3.2.7.2.1.1, Çizelge 3.2.7.2.1.2 ve Çizelge 3.2.7.2.1.3'de her üç matriks için de kodlanmış faktörler ve seviyeleri ile gerçek değerlerin yer aldığı deneysel dizayn matriksleri gösterilmiştir. On altıncı deneme, on beşinci denemenin tekrarı niteliğindedir.

Çizelge 3.2.7.2.1.1. Ispanak matriksi için merkezi kompozit dizayn*

* (a-kodlanmış değerler ve b-gerçek değerler)

Çizelge 3.2.7.2.1.1.(a) Kodlanmış faktörler ve seviyeleri

	-1,68	-1	0	+1	+1,68
x_1 (HNO ₃ (mL))	2,5	3	4	5	5,5
x_2 (H ₂ O ₂ (mL))	0,3	0,5	1	1,5	1,7
x_3 (Kütle (g))	0,3	0,5	0,75	1	1,2

Çizelge 3.2.7.2.1.1.(b) Ispanak matriksi için deneysel dizayn matriksi

Deney	Kodlanmış Değerler			Gerçek Değerler		
	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3
1	+1	+1	+1	5	1,5	1
2	+1	+1	-1	5	1,5	0,5
3	+1	-1	+1	5	0,5	1
4	+1	-1	-1	5	0,5	0,5
5	-1	+1	+1	3	1,5	1
6	-1	+1	-1	3	1,5	0,5
7	-1	-1	+1	3	0,5	1
8	-1	-1	-1	3	0,5	0,5
9	+1,68	0	0	5,5	1	0,75
10	-1,68	0	0	2,5	1	0,75
11	0	+1,68	0	4	1,7	0,75
12	0	-1,68	0	4	0,3	0,75
13	0	0	+1,68	4	1	1,2
14	0	0	-1,68	4	1	0,3
15	0	0	0	4	1	0,75
16	0	0	0	4	1	0,75

Çizelge 3.2.7.2.1.2. Un matriksi için merkezi kompozit dizayn (a-kodlanmış değerler ve b-gerçek değerler)

Çizelge 3.2.7.2.1.2.(a) Kodlanmış faktörler ve seviyeleri

	-1,68	-1	0	+1	+1,68
x_1 (HNO ₃ (mL))	2,5	3	4	5	5,5
x_2 (H ₂ O ₂ (mL))	0,3	0,5	1	1,5	1,7
x_3 (Kütle (g))	0,28	0,3	0,4	0,5	0,52

Çizelge 3.2.7.2.1.2. (b) Un matriksi için deneysel dizayn matriksi

Deney	Kodlanmış Değerler			Gerçek Değerler		
	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3
1	+1	+1	+1	5	1,5	0,5
2	+1	+1	-1	5	1,5	0,3
3	+1	-1	+1	5	0,5	0,5
4	+1	-1	-1	5	0,5	0,3
5	-1	+1	+1	3	1,5	0,5
6	-1	+1	-1	3	1,5	0,3
7	-1	-1	+1	3	0,5	0,5
8	-1	-1	-1	3	0,5	0,3
9	+1,68	0	0	5,5	1	0,4
10	-1,68	0	0	2,5	1	0,4
11	0	+1,68	0	4	1,7	0,4
12	0	-1,68	0	4	0,3	0,4
13	0	0	+1,68	4	1	0,52
14	0	0	-1,68	4	1	0,28
15	0	0	0	4	1	0,4
16	0	0	0	4	1	0,4

Çizelge 3.2.7.2.1.3. Fındık matriksi için merkezi kompozit dizayn (a-kodlanmış değerler ve b-gerçek değerler)

Çizelge 3.2.7.2.1.3.(a) Kodlanmış faktörler ve seviyeleri

	-1,68	-1	0	+1	+1,68
x_1 (HNO ₃ (mL))	5,5	6,0	7,0	8,0	8,5
x_2 (H ₂ SO ₄ (mL))	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
x_3 (Kütle (g))	0,1	0,15	0,12	0,25	0,30

Çizelge 3.2.7.2.1.3. (b) Fındık matriksi için deneysel dizayn matriksi

Deney	Kodlanmış Değerler			Gerçek Değerler		
	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3
1	+1	+1	+1	8	2,5	0,25
2	+1	+1	-1	8	2,5	0,15
3	+1	-1	+1	8	1,5	0,25
4	+1	-1	-1	8	1,5	0,15
5	-1	+1	+1	6	2,5	0,25
6	-1	+1	-1	6	2,5	0,15
7	-1	-1	+1	6	1,5	0,25
8	-1	-1	-1	6	1,5	0,15
9	+1,68	0	0	8,5	2	0,12
10	-1,68	0	0	5,5	2	0,12
11	0	+1,68	0	7	3	0,12
12	0	-1,68	0	7	1	0,12
13	0	0	+1,68	7	2	0,3
14	0	0	-1,68	7	2	0,1
15	0	0	0	7	2	0,12
16	0	0	0	7	2	0,12

3.2.7.2.2. Optimum koşullarda Mn, Cu analizleri; SRM analizi ve yüzde geri kazanım alışmaları

Merkezi kompozit dizayna göre elde edilen optimum parçalama koşullarında örnek ve standart referans malzemeler analize hazırlanmış; ayrıca yüzde geri kazanım çalışmaları yapılmıştır.

3.2.7.3. Seyreltik nitrik asit ve ultrasonik ekstraksiyonun etkinliğinin araştırılması

Nitrik asit ozeltisi ile doğrudan parçalanmada ultrasonik ekstraksiyonun etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla örneklerden kapaklı viallere belirli miktarlarda (ıspanak örnekleri için yaklaşık 0,01 g, un örnekleri için yaklaşık 0,5 g ve fındık örnekleri için yaklaşık 0,1'er g) alınmıştır. Daha sonra 15'er mL yaklaşık 0,1 N nitrik asit ozeltisinde, ıspanak örnekleri için birer saat; un ve fındık örnekleri için 1,5 saat süre ultrasonik banyoda ekstraksiyon uygulanmıştır. Örnekler süzölmüş ve kalibrasyon eğrisine uygun düzeyde seyreltilerek analiz edilmiştir.

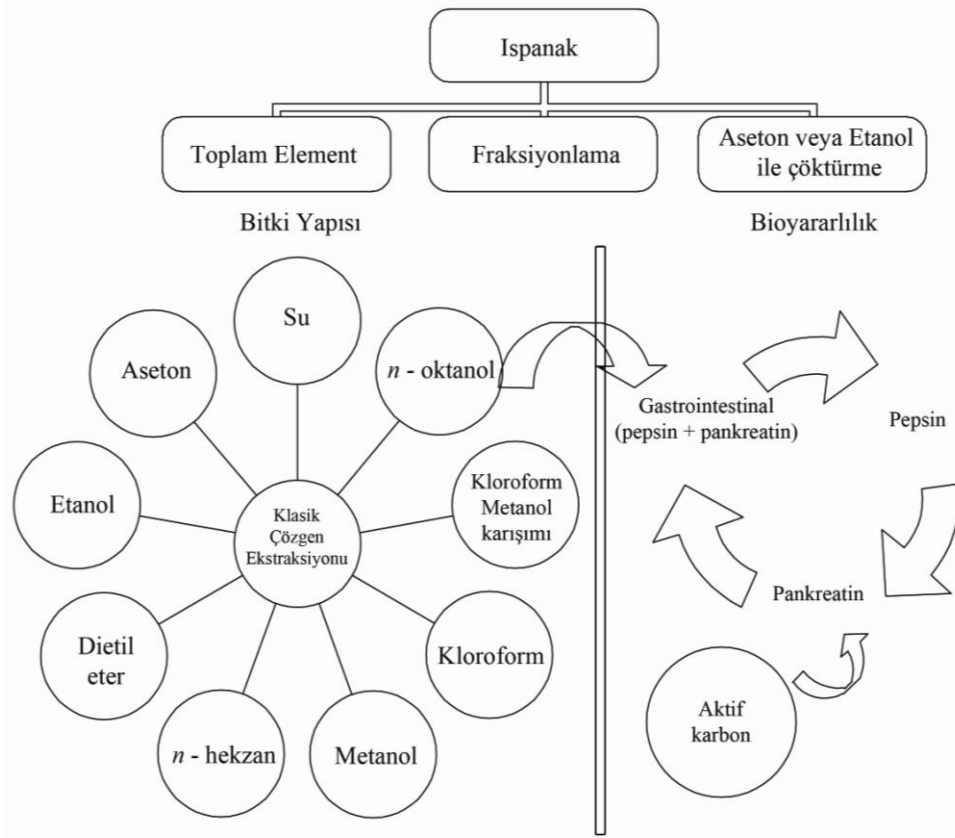
3.2.7.4. Matrikslerin yağsız kısmının eldesi ve metal analizi

Yağ yüzdesinin belirlenmesinde matrikslerden dietil eter ile yağın uzaklaştırılmasından sonra geriye kalan kısımlar alınarak kuru kısım olarak değerlendirilmiştir. Bu kısımlarda, optimum koşullarda belirlenen şartlarda veya mikrodalga şartlarında parçalama işlemi yapılmış; böylece kuru kısma ve yağlı kısma geçen metal miktarları incelenmiştir.

3.2.7.5. Ispanak, un ve fındık örneklerinde ozgen ekstraksiyonuna dayalı fraksiyonlama alışmaları

Ispanak, un ve fındık örneklerine her biri 15 mL olan su, aseton, kloroform, dietil eter, etanol, *n*-hekzan, metanol, kloroform/metanol (2:1, v/v veya 1:2 v/v) veya 0,1 N nitrik asit ile ayrı ayrı ve ultrasonik banyoda ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Ekstraksiyonlar 22 veya 40 mL kapaklı cam viallerde gerçekleştirilmiştir. İlgili

ekstraksiyon süresi ıspanak örnekleri için 1 saat; un ve fındık örnekleri için 1,5 saat uygulanmıştır. Ekstraktlar mavi bant süzgeç kağıdından süzölmüş ve kuruluğa dek uçurulmuştur. Çözgenlerin kuruluğa dek uçurulmasında genellikle azot gazı kullanılmıştır. Kalıntılar ıspanak için 15'er mL, un için 7,5'ar mL ve fındık için 10'ar mL yaklaşık 0,1 N nitrik asit çözeltisinde çözölerek 0,45 veya 0,22 µm şırınga tipi PVDF filtrelerden süzölmüş ve ICP-MS ile analiz edilmiştir. Çözgen kör örnekleri de aynı şekillerde hazırlanmıştır. Bir çözgen için tüm işlemler en az üç veya dört kez (un örnekleri için) tekrarlanmıştır. Ekstraksiyona yönelik analitik şema Şekil 3.2.7.5.1'de görölmektedir.



Şekil 3.2.7.5.1. Fraksiyonlama analiz şeması*

- *Literatür kaynaklarına örnekler: Aktif karbon adsorpsiyonu (biyoyararlılık çalışmaları; Kowalewska ve ark. 2005)
Aseton ekstraksiyonu (glikolipid ekstraksiyonu veya protein çöktürme; Rouser ve ark. 1967, Karadjova ve ark. 2002)
Etanol ekstraksiyonu (polisakkarit çöktürme; Karadjova ve ark. 2002)
Hekzan ekstraksiyonu (serbest lipid; Eller ve King 1996)
Kloroform:metanol (2:1, v/v) ekstraksiyonu (toplam lipid; Folch ve ark. 1957, Ferraz ve ark. 2004)
Kloroform, eter ekstraksiyonu (nötral lipid; Ferraz ve ark. 2004)
Metanol ekstraksiyonu (polar lipid; Akoh ve Min 2002)
n-oktanol ekstraksiyonu (biyoyararlılık çalışmaları; Yaşar ve Güçer 2004, Shun-xing ve ark. 2005)
Pepsin ve/veya pankreatin ekstraksiyonu (biyoyararlılık çalışmaları; Liu ve ark. 2004)

3.2.7.6. “*in-vitro*” mide ve bağırsak sindirim simülasyon işlemleri ile biyoyararlılık çalışmaları

Biyoyararlılık çalışmaları için gerekli çözeltilerin hazırlanması (bkz. sayfa 63) ve *in-vitro* biyoyararlılık çalışmaları Liu ve ark. 2004'den uyarlanarak yapılmıştır. Mide enzimleri ile parçalama işleminin simülasyonu ıspanak için 0,01 g liyofilize örneklere 1 mL pepsin çözeltisinin eklenmesi ile başlatılmıştır. 15 mL ultra saf su eklenen örneklerin pH değeri 0,1 N HCl ile 1,9 değerine ayarlanmıştır. Örnekler daha sonra 37 °C su banyosunda 1 saat süre ile inkübe edilmiştir. Bağırsak enzimleri ile parçalama işleminin simülasyonu için safra tuzlarından ve pankreatin enziminden yararlanılmıştır. 0,01 g liyofilize örneklere 2,5 mL pankreatin/safra tuzları çözeltisi eklenmiş ve 15 mL ultra saf su eklenen örneklerin pH değeri 0,1 N HCl veya 0,1 N NaHCO₃ ile 6,9 değerine ayarlanmıştır. Örnekler 37 °C su banyosunda 2 saat süre ile inkübe edilmiştir. Enzim içeren çözeltiler santrifüjlenerek, santrifüjatlari 0,45µm PVDF tipi şırınga filtreden süzölmüştür.

Ardışık mide ve bağırsak sindirim işleminin simülasyonu için önce pepsin ile parçalama işlemleri yukarıda belirtildiği gibi uygulanmış, 3 mL pepsin ekstraktına 4,5 mL ultra saf su eklenerek pH ayarlanmasından sonra 2,5 mL pankreatin/safra tuzları çözeltisi eklenmiştir. Örnekler 37 °C su banyosunda 2 saat süre ile inkübe edilmiş ve santrifüjatlari 0,45µm PVDF tipi şırınga filtreden süzölmüştür. Tüm işlemler için de en az üç tekrarlı çözgen kör örnekleri hazırlanmıştır.

3.2.7.7. Biyoyararlılık değerlendirmeleri için *n*-oktanol ekstraksiyonu çalışmaları

n-oktanol ekstraksiyonu Yaşar ve Güçer 2004'den uyarlanarak çalışılmıştır. Örnek miktarları *in-vitro* biyoyararlılık çalışmasında belirtildiği gibi alınarak 15 mL *n*-oktanol ile ultrasonik banyoda bir saat süre ile ekstraksiyon uygulanmıştır. Örnekler üç kez 5'er mL yaklaşık 0,1 N nitrik asit eklenerek geri sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemleri uygulanmıştır. Ekstraksiyon işleminin etkinliğini değerlendirmek için ise iki seviyede standart katmalı örnekler hazırlanarak yüzde geri kazanım değerleri belirlenmiştir.

3.2.7.8. Aktif karbon ile adsorpsiyon çalışmaları

Kowalewska ve ark. (2005) tarafından önerilen metot, matrisler için gerekli değişiklikler yapılarak kullanılmıştır. Yaklaşık 0,01 g liyofilize örneklere 50 mL ultra saf su, 2,5 mL metil izobutil keton ve 0,5 g toz aktif karbon eklenmiştir. Örneklere, ultrasonik banyoda bir saat süre ile ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Örnekler mavi bant süzgeç kağıdından süzölmüş ve 60 °C'de kurutulduktan sonra 10 mL yaklaşık 1 N nitrik asit çözeltisi ile metal fraksiyonları geri alınmıştır. Örnekler on kat seyreltilerek ICP-MS ile analiz edilmiştir.

3.2.7.9. AAS ve ICP-MS'de metot validasyon parametrelerinin belirlenmesi

Enstrümantal belirleme ve nicel tayin limitleri, çözgen körü (blank) değerine yakın ve çözgen körü sinyalinden belirli güven seviyesinde ($k=3$, % 99,86 güven aralığı) farkedilebilen en küçük derişime dayalı olarak belirlenmiştir (Corley 2003). İlgili derişim biriminin standart sapmasının üç ve on katı alınarak ayrıca örnek kütlesi ve seyreltme faktörü de kullanılarak metot belirleme ve nicel tayin limitleri hesaplanmıştır. ICP-MS için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerleri ilgili standardın tekrarlanabilir ve tekrar elde edilebilir sinyalinin standart sapmasına göre belirlenirken; metodun doğruluğu da sertifikalı referans malzemeler ile incelenmiştir.

3.2.7.10. Katı faz ekstraksiyon çalışmaları

Her üç örnek matrisi için aşağıda anlatılan işlemler uygulanmıştır: Yaklaşık 0,01'er gram ıspanak; 0,5'er gram un ve yağı dietil eter ile uzaklaştırılmış 0,05'er gram fındık örneklerinden alınarak 15 mL ultra saf su ile 1,5 saat ultrasonik banyoda ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Örnekler, 0,22 µm PVDF filtreden süzölerek katı faz ekstraksiyonuna hazır hale getirilmiştir (aynı örneklerden 10 kat seyreltilip ICP-MS ile Mn ve Cu düzeyleri de tayin edilmiştir; ayrıca bir miktar örnek de vialle alınarak HPLC-ICP-MS ile analizi gerçekleştirilmiştir). Katı faz kartuş kolonlar önce 3 mL, metanolde % 0,1 formik asit ile; sonra 3 mL, suda % 2 formik asit ile şartlandırılmış ve katı faz ekstraksiyonu için hazırlanan örneklerden üçer mL, kartuş kolonlara yüklenerek

kolonların kuruması sağlanmıştır. Son basamakta örnekler 4 mL, suda % 2 amonyak çözeltisi ile kolondan geri alınmıştır. Hazırlanan örneklere 10 mL ultra saf su eklenerek seyreltilip; ICP-MS ile analizi gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyonun etkinliğinin araştırılması için şartlandırma işlemi sonrası oluşan formik asit atıkları atıldıktan sonra 4 mL örnek yüklenmesi sırasında atığa geçen süzüntüden doğrudan seyreltme sonrası metal tayini yapılmış; ayrıca kolonlara uygun derişimde ve örnekler gibi suda hazırlanmış Mn ve Cu stok çözeltileri de yüklenerek kolonda ne kadar tutulabildiğine bakılmıştır.

3.2.7.11. Yağmur suyunda mangan ve bakır türlendirme analizleri

4 mL yağmur suyu örneği alınarak 2 mL derişik nitrik asit ve 1 mL hidrojen peroksit ile açık sistem yaş yakma işlemine tabi tutulmuştur. Örnekler polipropilen santrifüj tüplerinde 25 mL'ye ultra saf su ile tamamlanarak analize hazırlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan örneklerdeki element düzeyleri ile 0,22 µm membran filtreden doğrudan süzölmüş örneklerdeki element düzeyleri arasındaki fark partiküle mangan ve bakır olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmede doğrudan analiz edilen yağmur suları da kullanılarak bulunan sonuçlar karşılaştırılmıştır. İkinci basamakta 0,45 ve 0,22 µm membran filtrelerden süzölen örneklerden elde edilen metal düzeyleri arasındaki fark ise kolloidal mangan ve bakır olarak belirlenmiştir. Kullanılan en küçük gözenekli 0,22 µm membran filtreden süzölen örneklerdeki metal düzeyleri de çözönmüş mangan ve bakır olarak tanımlanmıştır (Willey ve ark 2009). Tüm işlemler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.7.12. HPLC-ICP-MS ikili tekniğine yönelik çalışmalar

HPLC cihazına dedektör olarak ICP-MS cihazı bağlanarak HPLC-ICP-MS ikili tekniğinde çalışmalar yapılmıştır. İkili teknik için çalışma şartları Çizelge 3.2.7.12.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.2.7.12.1. HPLC-ICP-MS cihazı çalışma şartları

HPLC ŞARTLARI	
HPLC	Perkin Elmer Series 200
Yazılımı	Total chrom nav.6.3.2
Otomatik örnek verici	Perkin Elmer Series 225
Kolon	PerkinElmer Brownlee Analytical DB Aq. C-18 5µm, 150 × 4,6 mm
Enjeksiyon hacmi	30 µL
Kolon sıcaklığı	26 °C
Hareketli faz	1. hareketli faz olarak su/metanol (100:0, v/v) ile başlayan su/metanol (95:5, v/v) ye ulaşan ve su/metanol (100:0, v/v) ile biten gradiyent sistem kullanılmıştır. 2. hareketli faz olarak %100 ultra saf su kullanılmıştır.
Analiz süresi	10 dk
Kromatografik veri sistemi	Chromera (sürüm, 1.2.254.0 (2005))

3.2.7.12.1. HPLC-ICP-MS ikili tekniğine yönelik püskürtme haznesi karşılaştırılması

Scott tipi ve siklonik püskürtme hazneleri (sprey odaları) aynı örnek analizi ve mangan (II) çözeltisinden elde edilen sinyal şiddeti değerine göre karşılaştırılmıştır. İlgili aparatlar Ek-1'de gösterilmiştir.

3.2.7.12.2. HPLC-ICP-MS ikili tekniğine yönelik uygun sisleştircinin belirlenmesi

Cihazda; ryton karşı akış, düşük akış ve meinhard sisleştirciler kullanılabilmekte olup bunlar Ek-1'de görülmektedir. Sisleştircilerin etkinlikleri aynı örnek analizi ile ve mangan (II) çözeltisinden elde edilen sinyalin şiddet değerine göre karşılaştırılmıştır.

3.2.7.12.3. HPLC-ICP-MS ikili tekniğine yönelik peltier soğutmalı siklonik püskürtme haznesi etkinliğinin belirlenmesi

PC3 model peltier soğutmalı püskürtme haznesinin etkinliği, metanol fraksiyonlarından doğrudan analizler yapılmak sureti ile değerlendirilmiştir.

3.2.7.12.4. HPLC-ICP-MS ikili tekniği ile türlendirme/fraksiyonlama çalışmaları

Belirli konsantrasyon aralığında (136–595) $\mu\text{g L}^{-1}$ Mn ve on kat fazla derişimde Cu ile ultra saf suda hazırlanan mangan ve bakır karışım standartları analiz edilerek standartlara ait alıkonma zamanları (t_R) belirlenmiştir. Tek bir derişim için tekrarlı analizler sonucu mobil faz olarak su seçilmiş ve bu seçim, matriks çalışmalarında da tekrar değerlendirilmiştir. Ispanak, un ve fındık örneklerinin su ekstraktları bkz. Bölüm 3.2.3 ve Bölüm 3.2.7.5’de anlatıldığı gibi hazırlanarak 0,22 μm PVDF tipi şırınga filtreden süzölmüş ve HPLC sistemine enjekte edilerek ICP-MS dedektöründe analiz edilmiştir. Yağmur suyu için ise 0,22 μm membran filtereden süzölen örnekler doğrudan viallere alınmıştır. Örnekler iki farklı mobil fazda, iyon çifti eklenerek-eklenmeden analiz edilerek mobil faz olarak su kullanımına karar verilmiştir. Ayrıca örnekler bazında fazla farklılık getirmemesi nedeni ile özellikle kantitatif çalışmalar her matriksten birer örneğin tekrarlı analizlerine uygulanmıştır (2 numaralı ıspanak, 2 numaralı un, 3 numaralı fındık ve tüm yağmur suları analiz edilmiştir).

4. BULGULAR

4.1. Ispanak, Un ve Fındık Örneklerindeki Temel Bileşenler

Ispanak, un ve fındık örneklerindeki temel bileşenler ve miktarları sırası ile Çizelge 4.1.1, Çizelge 4.1.2 ve Çizelge 4.1.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.1.1. Ispanak örneklerinin makro bileşenleri ve bunların düzeyleri

Ispanak Örneği	Nem (%)	Diyet Lif (%)	Ham Selüloz (%)	Protein (%)
1	87,7 ± 0,2	3,13 ± 1,05	1,88 ± 0,08	2,29 ± 0,06
2	90,1 ± 0,3	3,30 ± 0,75	1,98 ± 0,03	2,45 ± 0,15
3	91,0 ± 0,3	2,96 ± 0,28	2,07 ± 0,02	3,30 ± 0,15

Ispanak Örneği	Yağ (%)	Şeker (%)	Kül (%)
1	0,12 ± 0,01	0,49 ± 0,08	2,31 ± 0,09
2	-	-	1,37 ± 0,10
3	-	-	1,89 ± 0,13

Çizelge 4.1.2. Un örneklerinin makro bileşenleri ve bunların düzeyleri

Un Örneği	Nem (%)	Diyet Lif (%)	Ham Selüloz (%)	Protein (%)
1	11,9 ± 0,1	3,39 ± 0,70	0,43 ± 0,06	11,4 ± 0,1
2	11,40 ± 0,02	3,94 ± 0,64	0,43 ± 0,06	9,77 ± 0,14
3	13,8 ± 0,1	2,28 ± 0,71	0,46 ± 0,02	10,1 ± 0,1

Un Örneği	Yağ (%)	Şeker (%)	Kül (%)
1	0,82 ± 0,10	1,66 ± 0,19	0,53 ± 0,03
2	1,04 ± 0,11	-	0,51 ± 0,01
3	1,07 ± 0,07	-	0,55 ± 0,01

Çizelge 4.1.3. Fındık örneklerinin makro bileşenleri ve bunların düzeyleri

Fındık Örneği	Nem (%)	Diyet Lif (%)	Ham Selüloz (%)	Protein (%)
1	2,03 ± 0,01	11,90 ± 0,41	5,45 ± 0,24	18,2 ± 0,8
2	1,65 ± 0,02	10,48 ± 0,45	5,97 ± 0,42	18,3 ± 0,2
3	1,89 ± 0,03	10,29 ± 1,05	5,95 ± 0,40	17,0 ± 0,2

Fındık Örneği	Yağ (%)	Şeker (%)	Kül (%)
1	64,6 ± 0,7	2,22 ± 0,24	2,20 ± 0,18
2	61,2 ± 0,7	-	2,13 ± 0,17
3	64,7 ± 0,6		2,33 ± 0,07

4.2. Fındık Örneklerindeki Yağ Asitlerinin Karakterizasyonu

Fındık örneklerinin yağ asiti içeriklerine yönelik sonuçlar; Çizelge 4.2.1, Çizelge 4.2.2 ve Çizelge 4.2.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.2.1. 1 numaralı fındık örneğinin metil esterlerine dayalı yağ asidi bileşimi ^a

Yağ asidi (metil esteri)	Ortalama (%)	Standart Sapma	Limit Değer ^b (en az)	Limit Değer ^b (en çok)
Miristik (C14:0)	<0,1			
Palmitik (C16:0)	5,02	0,04	3,06	10
Palmitoleik (C16:1)	0,13	0,01	Eser	1,92
Stearik (C18:0)	2,52	0,01	Eser	3,2
Oleik (C18:1) ^c	84,2	0,1	71,00	91,00
Linoleik (C18:2)	7,95	0,05	2,87	21,42
Linolenik (C18:3)	<0,1			
Araşidik (C20)	0,11	0,01		
Ekosenoik (C20:1)	<0,1			
Behenik (C22:0)	<0,1			
Erusik (C22:1)	<0,1			
TOPLAM	100,00			

^a : Enjeksiyon sayısı = 4

^b : TS 6581 “yemelik rafine fındık yağı standardı”na göre verilmiştir.

^c : Numunede en fazla bulunan yağ asidi

Çizelge 4.2.2. 2 numaralı findık örneğinin metil esterlerine dayalı yağ asidi bileşimi ^a

Yağ asidi (metil esteri)	Ortalama (%)	Standart Sapma	Limit Değer ^b (en az)	Limit Değer ^b (en çok)
Miristik (C14:0)	<0,1			
Palmitik (C16:0)	5,03	0,02	3,06	10
Palmitoleik (C16:1)	0,13	0,01	Eser	1,92
Stearik (C18:0)	2,45	0,01	Eser	3,2
Oleik (C18:1) ^c	83,9	0,1	71	91
Linoleik (C18:2)	8,29	0,03	2,87	21,42
Linolenik (C18:3)	<0,1			
Araşidik (C20)	0,11	0,01		
Ekosenoik (C20:1)	<0,1			
Behenik (C22:0)	<0,1			
Erusik (C22:1)	<0,1			
TOPLAM	100,00			

^a : Enjeksiyon sayısı = 4

^b : TS 6581 “yemelik rafine findık yağı standardı”na göre verilmiştir.

^c : Numunede en fazla bulunan yağ asidi

Çizelge 4.2.3. 3 numaralı findık örneğinin metil esterlerine dayalı yağ asidi bileşimi ^a

Yağ asidi (metil esteri)	Ortalama (%)	Standart Sapma	Limit Değer ^b (en az)	Limit Değer ^b (en çok)
Miristik (C14:0)	<0,1			
Palmitik (C16:0)	5,04	0,01	3,06	10
Palmitoleik (C16:1)	0,14	0,01	eser	1,92
Stearik (C18:0)	2,20	0,01	eser	3,2
Oleik (C18:1) ^c	84,1	0,1	71	91
Linoleik (C18:2)	8,34	0,01	2,87	21,42
Linolenik (C18:3)	0,11	0,01		
Araşidik (C20)	0,10	0,01		
Ekosenoik (C20:1)	<0,1			
Behenik (C22:0)	<0,1			
Erusik (C22:1)	<0,1			
TOPLAM	100,00			

^a : Enjeksiyon sayısı = 4

^b : TS 6581 “yemelik rafine findık yağı standardı”na göre verilmiştir.

^c : Numunede en fazla bulunan yağ asidi

4.3. Fındıkta Yağ İçeriğinin Standart Metot ve Kloroform:Metanol Ekstraksiyonu ile Karşılaştırılması

Fındıkta, literatürde belirtilen (Gomez-Ariza ve ark. 2006, Gomez-Ariza ve ark. 2007) kloroform:metanol (2:1, v/v) ekstraksiyonu ile bulunan sonuç ve standart metot (TS 765/1971' den yararlanılan soxhlet ekstraksiyonu metodu, bkz. Çizelge 4.1.1., Çizelge 4.1.2 ve Çizelge 4.1.3) ile bulunan sonuç birinci fındık örneği açısından kıyaslandığında; Çizelge 4.3.1'deki sonuçlara ulaşılmıştır.

Çizelge 4.3.1. Fındıkta, iki farklı metot ile bulunan yağ yüzdelerinin karşılaştırılması

Fındık	Yağ (%) (Sohxlet ekstraksiyonu)	Yağ (%) (Kloroform:metanol ekstraksiyonu)
1 numaralı örnek	64,6 ± 0,7	61,8 ± 5,6

4.4. AAS ile Metal Analizleri

4.4.1. AAS ile bazı metot validasyon parametrelerinin belirlenmesi

AAS metot validasyon parametreleri olarak kullanılan faktörler ve değerleri bundan sonraki kısımda özetlenmektedir. Çizelge 4.4.1.1'de metot belirleme ve nicel tayin limitleri görülmektedir.

Çizelge 4.4.1.1. AAS analizleri için bazı metot validasyon parametreleri ve değerleri

Parametre	Cu	Mn
LOD ^a kör (çözgen)(mg L ⁻¹)	0,01	0,01
LOQ ^b kör (mg L ⁻¹)	0,04	0,03
MLOD ^c (mg kg ⁻¹)	0,64	0,44
MLOQ ^d (mg kg ⁻¹)	2,13	1,48

^a : Belirleme limiti

^b : Nicel tayin limiti

^c : Metot belirleme limiti

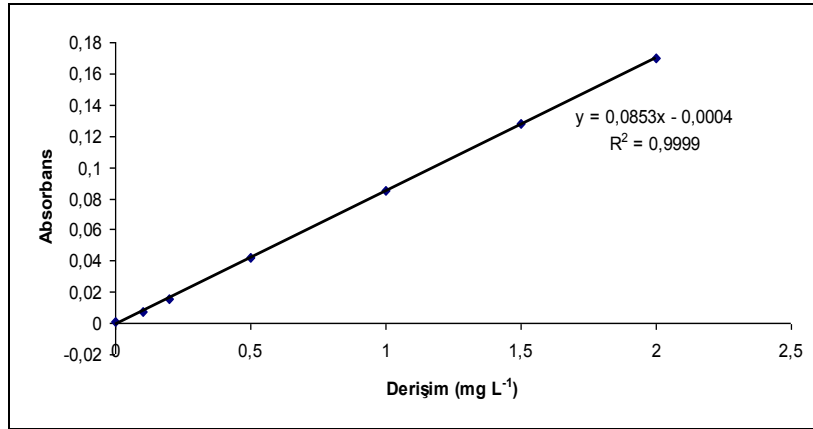
^d : Metot nicel tayin limiti

4.4.2. AAS' de standart çözeltiler ile elde edilen kalibrasyon eğrileri

Cu ve Mn için standart çözeltiler kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi grafikleri ve okunan absorbanslar Çizelge 4.4.2.1, Şekil 4.4.2.1; Çizelge 4.4.2.2 ve Şekil 4.4.2.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.4.2.1. AAS'de Cu analizinde standart çözeltiler ile elde edilen absorbans değerleri

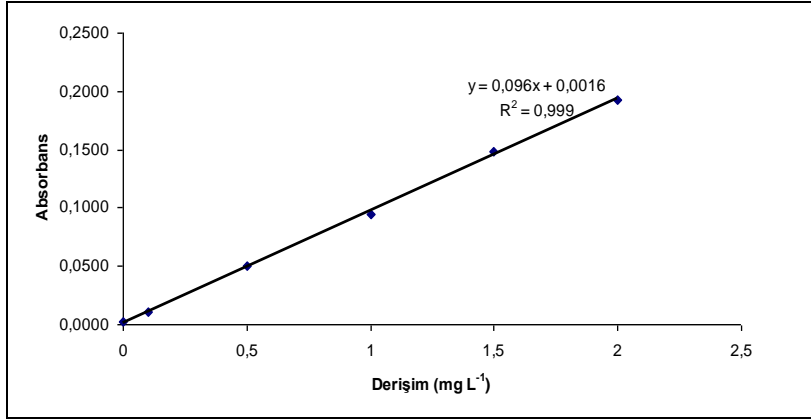
Derişim (mg L ⁻¹)	Absorbans
0	0,001
0,1	0,007
0,2	0,016
0,5	0,042
1	0,085
1,5	0,128
2	0,170



Şekil 4.4.2.1. AAS'de Cu için standart çözeltiler ile elde edilen kalibrasyon eğrisi grafiği

Çizelge 4.4.2.2. AAS'de Mn analizinde standart çözeltiler ile elde edilen absorbans değerleri

Derişim (mg L ⁻¹)	Absorbans
0	0,003
0,1	0,010
0,5	0,051
1	0,094
1,5	0,148
2	0,193



Şekil 4.4.2.2. AAS’de Mn için standart çözeltiler ile elde edilen kalibrasyon eğrisi grafiği

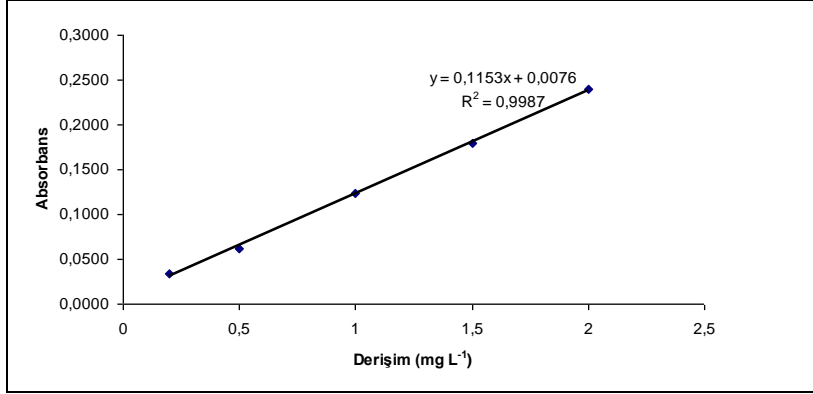
4.4.3. AAS ile yüzde geri kazanım çalışmaları

4.4.3.1. Kalibrasyon eğrileri

Yüzde geri kazanım çalışmalarında yeni standart çözeltilere karşı belirlenen absorbanslar ve kalibrasyon eğrisi grafikleri Çizelge 4.4.3.1.1, Şekil 4.4.3.1.1, Çizelge 4.4.3.1.2 ve Şekil 4.4.3.1.2’de görülmektedir.

Çizelge 4.4.3.1.1. AAS’de Cu analizinde geri kazanım çalışmaları için standart çözeltiler ile elde edilen absorbans değerleri

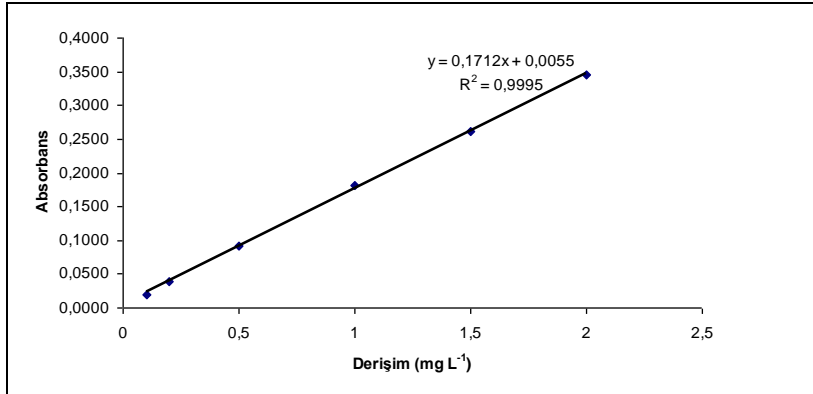
Derişim (mg L ⁻¹)	Absorbans
0,2	0,034
0,5	0,061
1	0,123
1,5	0,179
2	0,240
0,2	0,034



Şekil 4.4.3.1.1. AAS’de yüzde geri kazanım çalışmalarında Cu için standart çözeltiler ile elde edilen kalibrasyon eğrisi grafiği

Çizelge 4.4.3.1.2. AAS’de Mn analizinde geri kazanım çalışmaları için standart çözeltiler ile elde edilen absorbans değerleri

Derişim (ppm)	Absorbans
0,1	0,020
0,2	0,038
0,5	0,092
1,0	0,182
1,5	0,261
2	0,346



Şekil 4.4.3.1.2. AAS’de yüzde geri kazanım çalışmalarında Mn için standart çözeltiler ile elde edilen kalibrasyon eğrisi grafiği

4.4.3.2. Yüzde geri kazanım çalışmaları

Matrikslere mikrodalga parçalama işlemi öncesi $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (5 mg kg^{-1}) Mn ve Cu standartları katıldığında AAS analizi sonucu belirlenen yüzde geri kazanım değerleri Çizelge 4.4.3.2.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.4.3.2.1. AAS ile analizlerde matriksler için yüzde geri kazanım sonuçları

Örnekler	% Geri kazanım, Mn	% Geri kazanım, Cu
1 numaralı Ispanak	96,63	92,81
2 numaralı Ispanak	82,70	100,00
3 numaralı Ispanak	100,00	117,50
1 numaralı Un	98,40	102,90
2 numaralı Un	103,20	93,40
3 numaralı Un	93,20	101,30
1 numaralı Fındık	100,00	104,20
2 numaralı Fındık	94,70	89,70
3 numaralı Fındık	102,40	100,0

4.4.4. AAS’ de sertifikalı referans malzeme ile yapılan çalışma sonuçları

Metotta doğruluk çalışmaları kapsamında analiz edilen beş farklı SRM için elde edilen sonuçlar ve sertifika değerleri standart sapmaları ile birlikte Çizelge 4.4.4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.4.4.1. AAS ile doğruluk çalışmaları kapsamında analiz edilen SRM’ lerde belirlenen Mn ve Cu düzeyleri

SRM	Ölçülen Mangan (mg kg^{-1})	Ölçülen Bakır (mg kg^{-1})	Mangan (Sertifika Değeri) (mg kg^{-1})	Bakır (Sertifika Değeri) (mg kg^{-1})
Ispanak Yaprığı	$66,7 \pm 1,7$	$12,2 \pm 0,3$	$75,9 \pm 1,9$	$12,2 \pm 0,6$
Buğday Unu	$8,8 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,1$	$9,4 \pm 0,9$	$2,1 \pm 0,2$
Çay	$508,0 \pm 0,1$	$18,6 \pm 0,1$	500 ± 20	$18,6 \pm 0,7$
Çilek	$185,20 \pm 0,11$	-	$171,0 \pm 10,0$	Homojen değil
Lahana	-	$5,65 \pm 0,04$	$31,9 \pm 1,2$	$5,67 \pm 0,25$

4.4.5. AAS ile metal analizleri

Mikrodalga parçalama yöntemi ile analize hazırlanan ıspanak, un ve fındık örneklerinde belirlenen mangan ve bakır düzeyleri Çizelge 4.4.5.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.4.5.1. Matrikslerde AAS analizleri sonucu bulunan element düzeyleri

	Numunedeki Mangan (mg kg ⁻¹)	Standart sapma	Numunedeki Bakır (mg kg ⁻¹)	Standart sapma
1 numaralı Ispanak	36,3	0,3	11,7	0,3
2 numaralı Ispanak	43,3	0,9	14,2	0,6
3 numaralı Ispanak	50,4	0,1	16,3	0,6
1 numaralı Un	7,5	0,2	2,0	0,1
2 numaralı Un	7,7	0,1	2,6	0,3
3 numaralı Un	11,1	0,9	2,6	0,6
1 numaralı Fındık	74,6	1,0	14,2	0,8
2 numaralı Fındık	85,8	2,8	21,3	1,3
3 numaralı Fındık	65,5	10,9	18,3	0,5

4.5. ICP-MS ile Metal Analizleri

4.5.1. AAS ile analiz edilen örneklerin ICP-MS ile karşılaştırılması

AAS ile analiz edilen ve mikrodalga parçalama ile hazırlanan örnekler kalibrasyon eğrilerine uygun düzeyde seyreltilerek ICP-MS ile analiz edildiğinde mangan ve bakır düzeylerine ilişkin bulunan sonuçlar Çizelge 4.5.1.1’de verilmiştir. Ayrıca verim tayini için; ıspanak, un ve fındık örneklerine 0,1 mg L⁻¹ olacak şekilde Mn ve Cu eklenmiştir. ICP-MS ile bulunan değerlerden hesaplanan yüzde geri kazanım değerleri de yine Çizelge 4.5.1.1’de görülmektedir.

Çizelge 4.5.1.1. Matrislerde mikrodalga parçalama sonrası ICP-MS ile belirlenen metal düzeyleri, örneklere eklenen Mn ve Cu için bulunan yüzde geri kazanım değerleri

	Mangan (mg kg ⁻¹)	Standart sapma	Bakır (mg kg ⁻¹)	Standart sapma	% Geri kazanım, Mn	% Geri kazanım, Cu
1 numaralı ıspanak	37,9	0,8	10,8	0,2	96,5	92,7
2 numaralı ıspanak	44,5	1,0	9,4	0,3	99,5	96,2
3 numaralı ıspanak	53,2	1,4	9,7	0,2	98,2	96,5
1 numaralı un	7,7	0,1	2,0	0,1	103,8	103,3
2 numaralı un	5,1	0,1	1,8	0,1	103,9	99,4
3 numaralı un	8,4	0,4	2,2	0,1	87,4	98,7
1 numaralı fındık	79,9	1,3	13,7	0,5	100,3	103,7
2 numaralı fındık	95,5	1,9	16	1,6	96,5	96,7
3 numaralı fındık	76,7	9,3	14,2	0,6	95,3	97,8

4.5.2. Mikrodalga parçalama ile açık sistem yaş yakmanın karşılaştırılması

Matriksler için açık sistem yaş yakma ve mikrodalga parçalama örnek hazırlama yöntemlerinin etkinliklerinin mangan ve bakır elementel düzeyleri açısından karşılaştırılması kapsamında açık sistem yaş yakma sonrası ICP-MS ile belirlenen Mn ve Cu düzeyleri Çizelge 4.5.2.1’de verilmiştir. Mikrodalga parçalama örnek hazırlama sonrası AAS ile belirlenen element düzeyleri bkz. Çizelge 4.4.5.1 ve AAS’de çalışılan aynı örnekler için ICP-MS ile belirlenen element düzeyleri ise bkz. Çizelge 4.5.1.1’ de verilmiştir.

Çizelge 4.5.2.1. Açık sistem yaş yakmalı örnek hazırlama sonrası ICP-MS ile mangan ve bakır analizi sonuçları

Örnekler	Mangan (mg kg ⁻¹)	Standart sapma	Bakır (mg kg ⁻¹)	Standart sapma
1 numaralı Ispanak	31,0	1,1	9,9	0,6
2 numaralı Ispanak	42,1	0,8	10,6	1,3
3 numaralı Ispanak	52,6	4,2	12,5	3,3
1 numaralı Un	8,7	1,6	2,9	1,0

Çizelge 4.5.2.1. Açık sistem yaş yakmalı örnek hazırlama sonrası ICP-MS ile mangan ve bakır analizi sonuçları (devam)

Örnekler	Mangan (mg kg ⁻¹)	Standart sapma	Bakır (mg kg ⁻¹)	Standart sapma
2 numaralı Un	6,3	0,5	2,2	0,3
3 numaralı Un	8,8	1,0	2,11	0,1
1 numaralı Fındık	84,2	11,6	12,4	0,1
2 numaralı Fındık	88,0	1,2	14,1	0,1
3 numaralı Fındık	74,6	6,1	13,5	2,1

4.5.3. Merkezi kompozit dizayn yöntemi ile optimizasyon çalışmaları

Merkezi kompozit dizayn (CCD) ile optimizasyona ilişkin kodlanmış değerler, gerçek değerler, ICP-MS cihazında ilgili metaller için elde edilen sinyaller veya metal düzeyleri ve polinom denklemler için hesaplanan katsayılar Çizelge 4.5.3.1, Çizelge 4.5.3.2 ve Çizelge 4.5.3.3'de verilmiştir. Katsayıların önemli olup olmadığı; Microsoft Office Excel ile optimum şartların belirlenmesinden sonraki matematiksel işlemlere dayandırılmıştır. Ispanak ve un örnekleri için optimizasyon çalışmalarında temel alınan mangan ve bakır elementlerine ilişkin okunan sinyaller ile fındık örnekleri için $\mu\text{g L}^{-1}$ olarak belirlenen metal düzeyleri de ilgili çizelgelerde gösterilmiştir.

Çizelge 4.5.3.1. Ispanak matrisi için 2³+star merkezi kompozit dizayn (N=16)

Deney	Kodlanmış Değerler			Gerçek Değerler			Cevap (sinyal)		
	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3	$\times 10^5$ ⁶³ Cu	$\times 10^5$ ⁶⁵ Cu	$\times 10^6$ ⁵⁵ Mn
1	+1	+1	+1	5	1,5	1	2,97	1,38	1,76
2	+1	+1	-1	5	1,5	0,5	1,83	0,86	1,40
3	+1	-1	+1	5	0,5	1	2,76	1,30	1,54
4	+1	-1	-1	5	0,5	0,5	1,66	0,77	1,34
5	-1	+1	+1	3	1,5	1	3,11	1,46	1,52
6	-1	+1	-1	3	1,5	0,5	1,86	0,87	1,33
7	-1	-1	+1	3	0,5	1	2,99	1,41	1,62
8	-1	-1	-1	3	0,5	0,5	1,74	0,82	1,25
9	+1,68	0	0	5,5	1	0,75	1,10	0,52	0,81
10	-1,68	0	0	2,5	1	0,75	2,35	1,11	1,62
11	0	+1,68	0	4	1,7	0,75	2,78	1,31	1,88
12	0	-1,68	0	4	0,3	0,75	3,08	1,44	1,55
13	0	0	+1,68	4	1	1,2	0,02	0,01	0,02
14	0	0	-1,68	4	1	0,3	1,43	0,67	0,99
15	0	0	0	4	1	0,75	3,02	1,42	1,67
16	0	0	0	4	1	0,75	2,85	1,33	1,54
Faktör				Katsayı					
x_1				-77963,903					
x_2				59098,467					
x_3				-37521,308					
x_1^2				480929,612					
x_2^2				659590,974					
x_3^2				229643,132					
$x_1 x_2$				37895,181					
$x_1 x_3$				- 1630,409					
$x_2 x_3$				- 2246,174					

Çizelge 4.5.3.2. Un matrisi için 2³+star merkezi kompozit dizayn (N=16)

Deney	Kodlanmış Değerler			Gerçek Değerler			Cevap (sinyal)		
	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3	$\times 10^5$ ⁶³ Cu	$\times 10^5$ ⁶⁵ Cu	$\times 10^6$ ⁵⁵ Mn
1	+1	+1	+1	5	1,5	0,5	0,51	0,24	5,25
2	+1	+1	-1	5	1,5	0,3	0,32	0,15	2,90
3	+1	-1	+1	5	0,5	0,5	0,54	0,26	4,53
4	+1	-1	-1	5	0,5	0,3	0,28	0,13	2,19
5	-1	+1	+1	3	1,5	0,5	0,50	0,24	3,76
6	-1	+1	-1	3	1,5	0,3	0,20	0,10	1,51
7	-1	-1	+1	3	0,5	0,5	0,50	0,24	4,06
8	-1	-1	-1	3	0,5	0,3	0,31	0,15	2,26
9	+1,68	0	0	5,5	1	0,4	0,43	0,20	3,66
10	-1,68	0	0	2,5	1	0,4	0,41	0,19	3,27
11	0	+1,68	0	4	1,7	0,4	0,45	0,22	3,47
12	0	-1,68	0	4	0,3	0,4	0,44	0,21	3,23
13	0	0	+1,68	4	1	0,52	0,59	0,28	4,77
14	0	0	-1,68	4	1	0,28	0,33	0,16	2,52
15	0	0	0	4	1	0,4	0,47	0,23	3,73
16	0	0	0	4	1	0,4	0,48	0,23	3,83
Faktör				Katsayı					
x_1				288614,1663					
x_2				56313,67738					
x_3				918654,1884					
x_1^2				1147674,401					
x_2^2				1106790,35					
x_3^2				1211868,453					
$x_1 x_2$				308210,2852					
$x_1 x_3$				57624,57768					
$x_2 x_3$				79722,82257					

Çizelge 4.5.3.3. Fındık matrisi için 2³+star merkezi kompozit dizayn (N=16)

Deney	Kodlanmış Değerler			Gerçek Değerler			Cevap (metalmiktarı) (µg/L)	Faktör	Katsayı
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁	x ₂	x ₃			
							⁵⁵ Mn		
1	+1	+1	+1	8	2,5	0,25	69,45	x ₁	-4,061
2	+1	+1	-1	8	2,5	0,15	43,06	x ₂	4,666
3	+1	-1	+1	8	1,5	0,25	69,90	x ₃	10,034
4	+1	-1	-1	8	1,5	0,15	63,61	x ₁ ²	19,666
5	-1	+1	+1	6	2,5	0,25	39,84	x ₂ ²	19,026
6	-1	+1	-1	6	2,5	0,15	43,23	x ₃ ²	17,728
7	-1	-1	+1	6	1,5	0,25	68,99	x ₁ x ₂	0,396
8	-1	-1	-1	6	1,5	0,15	38,25	x ₁ x ₃	0,665
9	+1,68	0	0	8,5	2	0,12	58,08	x ₂ x ₃	-1,753
10	-1,68	0	0	5,5	2	0,12	58,25		
11	0	+1,68	0	7	3	0,12	50,85		
12	0	-1,68	0	7	1	0,12	61,88		
13	0	0	+1,68	7	2	0,3	75,58		
14	0	0	-1,68	7	2	0,1	29,81		
15	0	0	0	7	2	0,12	40,45		
16	0	0	0	7	2	0,12	56,11		

İspanak, un ve fındık örnekleri için Çizelge 4.5.3.1, Çizelge 4.5.3.2. ve Çizelge 4.5.3.3'te verilen deneysel dizayn yöntemlerine göre belirlenen optimum koşullar Çizelge 4.5.3.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.5.3.4. Matrisler için optimum açık sistem yaş yakma koşulları

Matris	HNO ₃ (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	H ₂ SO ₄ (mL)	Kütle (g)
Un	3,89	1,00	-	0,3625
İspanak	4,08	0,97	-	0,7705 (yaş örnek)
Fındık	6,90	2 (sabit)	2,06	0,1862

4.5.3.1. Optimum koşullarda ICP-MS ile metal düzeylerinin belirlenmesi

Merkezi kompozit dizayn yöntemi ile belirlenen optimum koşullardaki metal düzeyleri Çizelge 4.5.3.1.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.5.3.1.1. Optimum koşullarda açık sistem yaş yakma ile belirlenen metal düzeyleri

Örnekler	Mangan (mg kg ⁻¹)	Standart Sapma	Bakır (mg kg ⁻¹)	Standart Sapma
1 numaralı Ispanak	33,0	2,0	13,5	1,6
2 numaralı Ispanak	43,6	3,8	15,5	3,8
3 numaralı Ispanak	52,2	4,9	7,2	0,4
1 numaralı Un	7,5	0,9	1,9	0,3
2 numaralı Un	4,5	0,2	1,5	0,2
3 numaralı Un	8,0	0,6	2,0	0,1
1 numaralı Fındık	60,4	3,5	11,7	5,0
2 numaralı Fındık	67,0	3,8	10,8	1,3
3 numaralı Fındık	50,1	3,5	8,1	0,4

4.5.4. Serifikalı referans malzemelerin açık sistem yaş yakmalı örnek hazırlama sonrası ICP-MS ile analizleri

AAS ile karşılaştırma amacı ile mikrodalga şartlarında (6 mL HNO₃ ve 1 mL H₂O₂ ile) açık sistem örnek hazırlama yapıldığında SRM için elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5.4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.5.4.1. Açık sistem yaş yakma sonrası ICP-MS ile SRM analizleri

SRM	Mangan (mg kg ⁻¹)	Standart Sapma	Bakır (mg kg ⁻¹)	Standart Sapma
Ispanak Yaprağı	76,9	2,1	12,1	1,2
Buğday Unu	12,2	3,4	3,01	0,5
Çay	507	22,5	21,6	0,6
Çilek	166,3	3,5	-	-
Lahana	32,6	2,0	6,6	0,3

4.5.5. 0,1 N nitrik asit ile ultrasonik banyoda doğrudan parçalama yöntemi ile toplam metal analizleri

Fraksiyonlama çalışmalarında kalıntıdan yüzde metal geri kazanımını belirtecek olan; ayrıca matrikslerin doğrudan parçalanabilme özelliklerini de yansıtacak olan yaklaşık 0,1 N nitrik asit ile ultrasonik banyoda ekstraksiyona ilişkin sonuçlar Çizelge 4.5.5.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.5.5.1. Nitrik asite geçen metal miktarları

	Mangan (mg kg ⁻¹)	Standart sapma	Bakır (mg kg ⁻¹)	Standart sapma
1 numaralı ıspanak	30,6	1,3	10,6	0,1
2 numaralı ıspanak	41,1	2,0	10,2	0,4
3 numaralı ıspanak	47,5	2,0	9,2	0,3
1 numaralı un	1,4	0,4	2,0	0,7
2 numaralı un	1,8	0,5	1,4	0,4
3 numaralı un	6,2	2,4	3,3	1,6
1 numaralı fındık	44,9	0,9	14,5	0,3
2 numaralı fındık	44,4	3,3	11,5	4,9
3 numaralı fındık	44,7	2,3	7,6	2,2

4.5.6. Matrislerin kuru kısımlarında (yağı alınan örneklerde) metal analizleri

TS 765:1971 temel alınarak uygulanan dietil eter ile soxhlet ekstraksiyonu sonucu yağı uzaklaştırılan örneklerin kuru kısımlarındaki metal düzeyini belirlemek amacı ile örnekler mikrodalga parçalama şartlarında fakat açık sistem yağ yakma ile parçalanarak analize hazırlanmıştır. Örnekler ICP-MS ile analiz edildiğinde Çizelge 4.5.6.1'deki sonuçlara ulaşılmıştır.

Çizelge 4.5.6.1. Ispanak, un ve fındık matrisleri için yağı uzaklaştırılan örneklerdeki metal düzeyleri

	Mangan (mg kg ⁻¹)	Standart sapma	Bakır (mg kg ⁻¹)	Standart sapma
1 numaralı ıspanak *	13,7	2,5	5,2	1,0
1 numaralı un	4,6	0,3	1,9	0,2
2 numaralı un	6,5	1,0	1,5	0,1
3 numaralı un	9,2	2,3	2,4	0,2
1 numaralı fındık	49,0	4,8	13,7	4,2
2 numaralı fındık	43,0	8,9	10,0	0,9
3 numaralı fındık	65,6	10,2	13,6	1,0

* Yağ içeriği düşük olduğundan sadece bir numaralı ıspanakta bu işlem uygulanmıştır.

4.5.7. Fraksiyonlama Sonuçları

Fraksiyonlama sonrası farklı çözümlere geçen metal miktarları her üç matris için de çalışılmıştır. Organik çözümleri uçurulan ve yaklaşık 0,1 N nitrik asitte çözümlenen kalıntılar ICP-MS ile mangan ve bakır düzeyleri açısından analiz edilmiştir. Ispanak matrisi için mangan ve bakır düzeyleri Çizelge 4.5.7.1.1 ve Çizelge 4.5.7.1.2’de verilmiştir. Un için ilgili sonuçlar Çizelge 4.5.7.2.1, Çizelge 4.5.7.2.2 ve Çizelge 4.5.7.2.3’de ve fındık matrisi için de sonuçlar Çizelge 4.5.7.3.1 ve Çizelge 4.5.7.3.2’de görülmektedir. Tüm matris analizlerinde aksi belirtilmedikçe bakır için ⁶³Cu izotopu ölçülmüştür.

4.5.7.1. Ispanak örnekleri için fraksiyonlama çalışmaları

Çizelge 4.5.7.1.1. Üç farklı ıspanak örneğinden organik çözümlere geçen mangan düzeyleri*

Ispanak	Su	Kloroform	Kloroform: metanol (2:1 (v/v))	Dietil eter	Etanol
1	24,25 ± 0,61	1,04 ± 0,28	2,52 ± 0,10	0,84 ± 0,16	6,79 ± 2,51
2	30,10 ± 2,43	1,31 ± 0,46	1,38 ± 0,24	0,64 ± 0,14	5,97 ± 3,29
3	33,02 ± 1,81	1,31 ± 0,65	1,73 ± 0,10	0,77 ± 0,18	7,72 ± 2,73
Ispanak	Aseton	Aseton ile çöken kalıntı	Etanol ile çöken kalıntı	<i>n</i> -hekzan	Metanol
1	0,87 ± 0,02	32,13 ± 8,12	36,99 ± 6,68	1,38 ± 0,28	6,89 ± 0,23
2	2,34 ± 0,87	30,08 ± 5,04	38,35 ± 9,34	1,11 ± 0,41	4,18 ± 0,79
3	1,47 ± 0,28	28,11 ± 1,88	27,08 ± 2,75	1,23 ± 0,28	4,40 ± 0,50

* Ortalama ± standart sapma, (N=3) ve kuru kütle üzerinden mg kg⁻¹ olarak sonuç verilmiştir.

Çizelge 4.5.7.1.2. Üç farklı ıspanak örneğinden organik çözümlere geçen bakır düzeyleri*

Ispanak	Su	Kloroform	Kloroform: metanol (2:1 (v/v))	Dietil eter	Etanol
1	6,40 ± 0,32	0,37 ± 0,10	3,51 ± 0,87	0,46 ± 0,20	2,98 ± 0,65
2	5,21 ± 0,52	0,34 ± 0,05	3,17 ± 0,55	0,61 ± 0,16	1,91 ± 0,68
3	6,52 ± 0,64	0,24 ± 0,07	3,88 ± 0,65	0,60 ± 0,20	2,46 ± 0,50
Ispanak	Aseton	Aseton ile çöken kalıntı	Etanol ile çöken kalıntı	<i>n</i> -hekzan	Metanol
1	0,92 ± 0,33	4,76 ± 1,41	5,06 ± 1,21	0,51 ± 0,10	6,86 ± 0,44
2	1,06 ± 0,50	6,21 ± 1,12	6,85 ± 0,64	0,63 ± 0,20	6,25 ± 0,79
3	1,95 ± 0,24	7,30 ± 0,52	6,93 ± 0,43	0,45 ± 0,02	6,48 ± 0,48

* Ortalama ± standart sapma, (N=3) ve kuru kütle üzerinden mg kg⁻¹ olarak sonuç verilmiştir; ⁶³Cu izotopu kullanılmıştır.

4.5.7.2. Un örnekleri için fraksiyonlama çalışmaları

Çizelge 4.5.7.2.1. Üç farklı un örneğinden organik çözümlere geçen mangan düzeyleri*

Un	Su	Kloroform: metanol (2:1 (v/v))	Kloroform: metanol (1:2 (v/v))	Dietil eter
1	4,42 ± 0,72	0,094 ± 0,009	0,122 ± 0,018	0,04 ± 0,01
2	2,86 ± 0,40	0,083 ± 0,009	0,076 ± 0,044	0,05 ± 0,01
3	5,04 ± 0,32	0,088 ± 0,024	0,126 ± 0,046	0,07 ± 0,02
Un	Aseton	<i>n</i> -hekzan	Metanol	
1	0,005 ± 0,001	0,044 ± 0,002	0,195 ± 0,038	
2	0,008 ± 0,003	0,042 ± 0,005	0,115 ± 0,016	
3	0,009 ± 0,004	0,076 ± 0,005	0,129 ± 0,002	

* Ortalama ± standart sapma, (N=3) ve yaş kütle üzerinden mg kg⁻¹ olarak sonuç verilmiştir.

Çizelge 4.5.7.2.2. Üç farklı un örneğinden organik çözümlere geçen bakır (⁶⁵ Cu) düzeyleri*

Un	Su	Kloroform: metanol (2:1 (v/v))	Kloroform: metanol (1:2 (v/v))	Dietil eter
1	0,29 ± 0,07	0,024 ± 0,013	0,232 ± 0,056	0,017 ± 0,005
2	0,40 ± 0,02	0,039 ± 0,021	0,100 ± 0,016	0,003 ± 0,001
3	0,32 ± 0,06	0,026 ± 0,010	0,110 ± 0,038	0,003 ± 0,002
Un	Aseton	<i>n</i> -hekzan	Metanol	
1	0,006 ± 0,001	0,006 ± 0,002	0,370 ± 0,093	
2	0,040 ± 0,012	0,010 ± 0,002	0,262 ± 0,065	
3	0,009 ± 0,005	0,008 ± 0,003	0,283 ± 0,050	

* Ortalama ± standart sapma, (N=3) ve yaş kütle üzerinden mg kg⁻¹ olarak sonuç verilmiştir.

Çizelge 4.5.7.2.3. Üç farklı un örneğinden organik çözümlere geçen bakır (⁶³ Cu) düzeyleri*

Un	Su	Kloroform: metanol (2:1 (v/v))	Kloroform: metanol (1:2 (v/v))	Dietil eter
1	0,29 ± 0,08	0,026 ± 0,014	0,230 ± 0,057	0,017 ± 0,004
2	0,44 ± 0,02	0,040 ± 0,020	0,100 ± 0,017	0,004 ± 0,001
3	0,31 ± 0,06	0,025 ± 0,009	0,110 ± 0,036	0,004 ± 0,002
Un	Aseton	<i>n</i> -hekzan	Metanol	
1	0,006 ± 0,001	0,006 ± 0,002	0,366 ± 0,094	
2	0,040 ± 0,012	0,009 ± 0,002	0,260 ± 0,065	
3	0,010 ± 0,004	0,007 ± 0,002	0,275 ± 0,049	

* Ortalama ± standart sapma, (N=3) ve yaş kütle üzerinden mg kg⁻¹ olarak sonuç verilmiştir. Seyreltme işlemi sonrası ICP-MS analizinde girişim etkisi olup olmadığını görmek için unda her iki bakır izotopuna ait sonuçlar verilmiştir.

4.5.7.3. Fındık örnekleri için fraksiyonlama çalışmaları

Çizelge 4.5.7.3.1. Üç farklı fındık örneğinden organik çözümlere geçen mangan düzeyleri*

Fındık	Su	2N HNO ₃	Dietil eter	<i>n</i> -hekzan	Metanol
1	10,89 ± 2,62	51,03 ± 0,86	0,78 ± 0,15	0,36 ± 0,03	0,15 ± 0,05
2	13,38 ± 0,02	45,13 ± 2,35	0,79 ± 0,24	0,67 ± 0,02	0,23 ± 0,01
3	7,33 ± 0,32	47,39 ± 2,65	0,67 ± 0,05	0,40 ± 0,02	0,42 ± 0,04

* Ortalama ± standart sapma, (N=3) ve yaş kütle üzerinden mg kg⁻¹ olarak sonuç verilmiştir.

Çizelge 4.5.7.3.2. Üç farklı fındık örneğinden organik çözümlere geçen bakır (⁶³ Cu) düzeyleri*

Fındık	Su	2N HNO ₃	Dietil eter	<i>n</i> -hekzan	Metanol
1	6,64 ± 1,19	7,80 ± 0,50	0,07 ± 0,03	0,10 ± 0,05	0,51 ± 0,05
2	11,19 ± 1,06	9,78 ± 0,90	0,04 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,26 ± 0,05
3	6,64 ± 0,09	9,53 ± 0,79	0,04 ± 0,03	0,05 ± 0,03	0,32 ± 0,06

*Ortalama ± standart sapma, (N=3) ve kuru kütle üzerinden mg kg⁻¹ olarak sonuç verilmiştir. Seyreltme işlemi sonrası ICP-MS analizinde ⁶³Cu ve ⁶⁵Cu düzeyleri yaklaşık aynı bulunduğundan sadece bir izotopa ait sonuçlar verilmiştir.

4.5.8. Biyoyararlılık çalışmaları

Biyoyararlılık çalışmaları farklı yöntemlere dayanılarak yapılmış ve sonuçlar birbirleri ile kıyaslanmıştır. Ispanak örneklerinin pepsin ve pankreatin enzimleri ile ayrı ayrı veya ardışık (mide ve bunu takiben bağırsakta) parçalanmaları sonucu serbest kalan, *n*-oktanol ile ekstrakte edilebilen veya aktif karbon üzerine adsorbe edilebilen element miktarları mangan ve bakır için ayrı ayrı Çizelge 4.5.8.1.1 ve 4.5.8.1.2'de görülmektedir. İlgili matriks için hem mangan hem de bakır düzeyinde biyoyararlılık değerlendirilmesi ise Çizelge 4.5.8.1.3 ve Çizelge 4.5.8.1.4'de verilmiştir. Un örnekleri için benzer şekilde elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5.8.2.1, Çizelge 4.5.8.2.2, Çizelge 4.5.8.2.3, Çizelge 4.5.8.2.4, Çizelge 4.5.8.2.5 ve Çizelge 4.5.8.2.6'da verilmiştir. Fındık

örnekleri için elde edilen sonuçlara dayanan tablolar ise Çizelge 4.5.8.3.1, Çizelge 4.5.8.3.2, Çizelge 4.5.8.3.3 ve Çizelge 4.5.8.3.4'de gösterilmiştir. Tüm matriks analizlerinde aksi belirtilmedikçe bakır için ⁶³Cu izotopu ölçülmüş; pankreatin enzimine dayalı ve ardışık biyoyararlılık çalışmaları için ⁶⁵Cu izotopu değerlendirilmiştir.

4.5.8.1. Ispanak için biyoyararlılık çalışmaları

Çizelge 4.5.8.1.1. Ispanak örneklerinin enzim çözeltileri, su, *n*-oktanol ile ekstrakte edilebilen veya aktif karbona adsorbe edilebilen fraksiyonlarındaki mangan düzeyleri*

Ispanak	Pepsin		Su		Pankreatin	
	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%
1	23,86 ± 2,41	66,23	24,25 ± 0,61	63,98	10,65 ± 0,80	28,10
2	28,75 ± 0,46	64,61	30,10 ± 2,43	67,64	17,26 ± 2,17	38,80
3	33,85 ± 0,20	63,63	33,02 ± 1,81	62,07	28,11 ± 1,37	52,84
Ispanak	Pepsin+Pankreatin (Gastrointestinal)		<i>n</i> -oktanol		Aktif karbon	
	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%
1	11,25 ± 2,13	29,68	3,53 ± 0,27	9,31	10,58 ± 2,01	27,92
2	14,16 ± 0,32	31,82	5,16 ± 1,36	11,59	17,34 ± 0,89	38,97
3	14,82 ± 1,11	27,85	9,84 ± 0,33	18,50	21,57 ± 2,10	40,54

* Ortalama ± standart sapma, (N=3) ve kuru kütle üzerinden mg kg⁻¹ olarak sonuç verilmiştir.

Çizelge 4.5.8.1.2. Ispanak örneklerinin enzim çözeltileri, su, *n*-oktanol ile ekstrakte edilebilen veya aktif karbona adsorbe edilebilen fraksiyonlarındaki bakır düzeyleri*

Ispanak	Pepsin		Su		Pankreatin	
	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%
1	8,92 ± 0,30	82,6	6,40 ± 0,32	59,3	7,66 ± 0,37	70,9
2	7,51 ± 0,17	79,9	5,21 ± 0,52	55,4	7,42 ± 0,10	78,9
3	7,93 ± 0,24	81,7	6,52 ± 0,64	67,2	6,60 ± 0,25	68,0
Ispanak	Pepsin+Pankreatin (Gastrointestinal)		<i>n</i> -oktanol		Aktif karbon	
	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%
1	5,35 ± 0,30	49,5	1,75 ± 0,14	16,2	7,59 ± 0,44	70,3
2	5,39 ± 0,39	57,3	2,52 ± 0,34	26,8	5,99 ± 0,72	63,7
3	5,19 ± 0,23	53,5	2,13 ± 0,31	33,2	7,68 ± 0,60	79,2

* Ortalama ± standart sapma, (N=3) ve kuru kütle üzerinden mg kg⁻¹ olarak sonuç verilmiştir.

Çizelge 4.5.8.1.3. Ispanaktaki manganın biyoyararlılığı*

Ispanak	Biyoyararlılık ^a (%)	<i>n</i> -oktanol ile ekstrakte edilebilen miktar ^b (%)	Pankreatin ile ekstrakte edilebilen mangan miktarı (mg kg ⁻¹)	<i>n</i> -oktanol ile ekstrakte edilebilen mangan miktarı (Düzeltilmiş) ^c (mg kg ⁻¹)
1	46,39	14,56	10,65 ± 0,80	10,71 ± 0,81
2	47,04	17,14	17,26 ± 2,17	11,48 ± 3,02
3	44,88	29,80	28,11 ± 1,37	28,12 ± 0,94

Ispanak	Aktif karbona adsorbe edilebilen mangan miktarı ^d (%)	Suda çözünen mangan miktarı (mg kg ⁻¹)	Toplam miktar (mg kg ⁻¹)
1	43,63	24,25 ± 0,61	37,9 ± 0,8
2	57,61	30,10 ± 2,43	44,5 ± 1,0
3	65,32	33,02 ± 1,81	53,2 ± 1,4

* Ortalama ± standart sapma, (N=3) ve kuru kütle üzerinden mg kg⁻¹ olarak sonuç verilmiştir

^a: *in-vitro* pepsin+pankreatin ile (gastrointestinal olarak) sindirilebilen element içeriğinin suya geçen element düzeyine oranı ile elde edilmiştir.

^b: *n*-oktanol ile ekstrakte edilebilen element düzeyinin suya geçen element düzeyine oranı ile elde edilmiştir.

^c: ^b×düzeltme faktörü ile elde edilmiştir.

^d: Aktif karbon tarafından adsorbe edilen element düzeyinin suya geçen element düzeyine oranı ile elde edilmiştir.

Çizelge 4.5.8.1.4. Ispanaktaki bakırın biyoyararlılığı*

Ispanak	Biyoyararlılık ^a (%)	<i>n</i> -oktanol ile ekstrakte edilebilen miktar ^b (%)	Pepsin+pankreatin ile ekstrakte edilebilen bakır miktarı (mg kg ⁻¹)
1	83,6	16,2	5,35 ± 0,30
2	103,4	26,8	5,39 ± 0,39
3	79,6	33,2	5,19 ± 0,23

Ispanak	<i>n</i> -oktanol ile ekstrakte edilebilen bakır miktarı (Düzeltilmiş) ^c (mg kg ⁻¹)	Aktif karbona adsorbe edilebilen bakır miktarı ^d (%)	Toplam miktar (mg kg ⁻¹)
1	5,35 ± 0,43	70,3	10,8 ± 0,2
2	4,96 ± 0,67	63,7	9,4 ± 0,3
3	5,66 ± 0,82	79,2	9,7 ± 0,2

* Ortalama ± standart sapma, (N=3) ve kuru kütle üzerinden mg kg⁻¹ olarak sonuç verilmiştir

^a: *in-vitro* pepsin+pankreatin ile (gastrointestinal olarak) sindirilebilen element içeriğinin suya geçen element düzeyine oranı ile elde edilmiştir.

^b: *n*-oktanol ile ekstrakte edilebilen element düzeyinin suya geçen element düzeyine oranı ile elde edilmiştir.

^c: ^b×düzeltme faktörü ile elde edilmiştir.

^d: Aktif karbon tarafından adsorbe edilen element düzeyinin suya geçen element düzeyine oranı ile elde edilmiştir.

4.5.8.2. Un için biyoyararlılık çalışmaları

Çizelge 4.5.8.2.1. Un örneklerinin enzim çözeltileri, su, *n*-oktanol ile ekstrakte edilebilen veya aktif karbona adsorbe edilebilen fraksiyonlarındaki mangan düzeyleri*

Un	Pepsin		Su		Pankreatin	
	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%
1	7,60 ± 0,30	98,7	4,42 ± 0,72	57,4	2,75 ± 0,26	35,7
2	4,87 ± 0,22	95,5	2,86 ± 0,40	56,1	2,21 ± 0,60	43,3
3	5,13 ± 0,82	61,1	5,04 ± 0,32	60,0	2,45 ± 0,84	29,2
Un	Pepsin+Pankreatin (Gastrointestinal)		<i>n</i> -oktanol		Aktif karbon	
	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%
1	6,19 ± 0,36	80,4	0,34 ± 0,06	4,4	1,61 ± 0,42	20,9
2	4,42 ± 0,15	86,7	0,18 ± 0,06	3,5	0,77 ± 0,30	15,1
3	3,96 ± 0,19	47,1	0,42 ± 0,08	5,0	1,29 ± 0,14	15,3

* Ortalama ± standart sapma, (N=3) ve yaş kütle üzerinden mg kg⁻¹ olarak sonuç verilmiştir.

Çizelge 4.5.8.2.2. Un örneklerinin enzim çözeltileri, su, *n*-oktanol ile ekstrakte edilebilen veya aktif karbona adsorbe edilebilen fraksiyonlarındaki bakır (⁶⁵Cu) düzeyleri ^a

Un	Pepsin		Su		Pankreatin	
	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%
1	1,47 ± 0,61	66,8	0,29 ± 0,07	13,2	2,07 ± 0,28	94,1
2	1,72 ± 0,20	95,5	0,40 ± 0,02	22,2	1,70 ± 0,90	94,4
3	1,34 ± 0,42	61,0	0,32 ± 0,06	14,5	2,18 ± 0,69	99,1
Un	Pepsin+Pankreatin (Gastrointestinal)		<i>n</i> -oktanol		Aktif karbon	
	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	
1	1,62 ± 0,29	73,6	0,08 ± 0,03	3,6	<LOD ^b	
2	1,55 ± 0,17	86,1	0,10 ± 0,02	5,5	<LOD	
3	2,09 ± 0,14	95,0	0,14 ± 0,04	6,4	<LOD	

^a : Ortalama ± standart sapma, (N=3) ve yaş kütle üzerinden mg kg⁻¹ olarak sonuç verilmiştir.

^b : Belirleme limitinden küçüktür.

Çizelge 4.5.8.2.3. Un örneklerinin enzim çözeltileri, su, *n*-oktanol ile ekstrakte edilebilen veya aktif karbona adsorbe edilebilen fraksiyonlarındaki bakır (⁶³Cu) düzeyleri ^a

Un	Pepsin		Su		Pankreatin	
	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%
1	1,46 ± 0,60	66,4	0,29 ± 0,08	13,2	2,05 ± 0,29	93,2
2	1,71 ± 0,19	95,0	0,44 ± 0,02	24,4	1,67 ± 0,94	92,8
3	1,34 ± 0,44	61,0	0,31 ± 0,06	14,1	2,12 ± 0,67	96,4
Un	Pepsin+Pankreatin (Gastrointestinal)		<i>n</i> -oktanol		Aktif karbon	
	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	
1	1,72 ± 0,31	78,2	0,08 ± 0,03	3,6	<LOD ^b	
2	1,64 ± 0,17	91,1	0,10 ± 0,02	5,5	<LOD	
3	2,19 ± 0,13	99,5	0,14 ± 0,04	6,4	<LOD	

^a: Ortalama ± standart sapma, (N=3) ve yaş kütle üzerinden mg kg⁻¹ olarak sonuç verilmiştir

^b: Belirleme limitinden küçüktür.

Çizelge 4.5.8.2.4. Undaki manganın biyoyararlılığı*

Un	Biyoyararlılık ^a (%)	<i>n</i> -oktanol ile ekstrakte edilebilen miktar ^b (%)	Pepsin+pankreatin ile ekstrakte edilebilen mangan miktarı (mg kg ⁻¹)
1	16,1	7,7	6,19 ± 0,36
2	14,3	6,3	4,42 ± 0,15
3	8,9	8,3	3,96 ± 0,19

Un	<i>n</i> -oktanol ile ekstrakte edilebilen mangan miktarı (Düzeltilmiş) ^c (mg kg ⁻¹)	Aktif karbona adsorbe edilebilen mangan miktarı ^d (%)	Toplam miktar (mg kg ⁻¹)
1	0,66 ± 0,12	20,9	7,7 ± 0,1
2	0,52 ± 0,17	15,1	5,1 ± 0,1
3	1,36 ± 0,27	15,3	8,4 ± 0,4

* Ortalama ± standart sapma, (N=3) ve yaş kütle üzerinden mg kg⁻¹ olarak sonuç verilmiştir
^a: *in-vitro* pepsin+pankreatin ile (gastrointestinal olarak) sindirilebilen element içeriğinin suya geçen element düzeyine oranı ile elde edilmiştir.

^b: *n*-oktanol ile ekstrakte edilebilen element düzeyinin suya geçen element düzeyine oranı ile elde edilmiştir.

^c: ^b×düzeltme faktörü ile elde edilmiştir.

^d: Aktif karbon tarafından adsorbe element düzeyinin suya geçen element düzeyine oranı ile elde edilmiştir.

Çizelge 4.5.8.2.5. Undaki bakırın (⁶⁵Cu) biyoyararlılığı*

Un	Biyoyararlılık ^a (%)	<i>n</i> -oktanol ile ekstrakte edilebilen miktar ^b (%)	Pepsin+pankreatin ile ekstrakte edilebilen bakır miktarı (mg kg ⁻¹)
1	124	27,6	1,62 ± 0,29
2	45,0	25,0	1,55 ± 0,17
3	74,0	43,7	2,09 ± 0,14
		<i>n</i> -oktanol ile ekstrakte edilebilen bakır miktarı (Düzeltilmiş) ^c (mg kg ⁻¹)	Toplam miktar (mg kg ⁻¹)
Un			
1		0,11 ± 0,04	2,2 ± 0,1
2		0,36 ± 0,09	1,8 ± 0,1
3		0,33 ± 0,09	2,2 ± 0,1

* Ortalama ± standart sapma, (N=3) ve yaş kütle üzerinden mg kg⁻¹ olarak sonuç verilmiştir

^a : *in-vitro* pepsin+pankreatin ile (gastrointestinal olarak) sindirilebilen element içeriğinin suya geçen element düzeyine oranı ile elde edilmiştir.

^b : *n*-oktanol ile ekstrakte edilebilen element düzeyinin suya geçen element düzeyine oranı ile elde edilmiştir.

^c : ^b×düzeltme faktörü ile elde edilmiştir.

Çizelge 4.5.8.2.6. Undaki bakırın (^{63}Cu) biyoyararlılığı*

Un	Biyoyararlılık ^a (%)	<i>n</i> -oktanol ile ekstrakte edilebilen miktar ^b (%)	Pepsin+pankreatin ile ekstrakte edilebilen bakır miktarı (mg kg ⁻¹)
1	127	27,6	1,72 ± 0,31
2	43,2	22,7	1,64 ± 0,17
3	83,9	45,2	2,25 ± 0,13
		<i>n</i> -oktanol ile ekstrakte edilebilen bakır miktarı (Düzeltilmiş) ^c (mg kg ⁻¹)	Toplam miktar (mg kg ⁻¹)
Un			
1		0,11 ± 0,04	2,2 ± 0,1
2		0,36 ± 0,09	1,8 ± 0,1
3		0,33 ± 0,10	2,2 ± 0,1

* Ortalama ± standart sapma, (N=3) ve yaş kütle üzerinden mg kg⁻¹ olarak sonuç verilmiştir
^a: *in-vitro* pepsin+pankreatin ile (gastrointestinal olarak) sindirilebilen element içeriğinin suya geçen element düzeyine oranı ile elde edilmiştir.

^b: *n*-oktanol ile ekstrakte edilebilen element düzeyinin suya geçen element düzeyine oranı ile elde edilmiştir.

^c: ^b×düzeltme faktörü ile elde edilmiştir.

4.5.8.3. Fındık için biyoyararlılık çalışmaları

Çizelge 4.5.8.3.1. Fındık örneklerinin enzim çözeltileri, su, *n*-oktanol ile ekstrakte edilebilen veya aktif karbona adsorbe edilebilen fraksiyonlarındaki mangan düzeyleri*

Fındık	Pepsin		Su		Pankreatin	
	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%
1	47,57 ± 0,42	59,5	10,89 ± 2,62	13,6	30,80 ± 4,50	38,5
2	44,79 ± 3,15	46,9	13,38 ± 0,02	14,0	25,86 ± 3,01	27,1
3	65,68 ± 4,06	85,6	7,33 ± 0,32	9,6	26,13 ± 2,12	34,1
Fındık	Pepsin+Pankreatin (Gastrointestinal)		<i>n</i> -oktanol		Aktif karbon	
	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%
1	46,03 ± 2,25	57,6	1,11 ± 0,43	1,4	27,33 ± 0,50	34,2
2	30,55 ± 3,00	32,0	1,54 ± 0,86	1,6	21,73 ± 2,30	22,8
3	47,60 ± 4,81	62,1	1,25 ± 0,21	1,6	21,65 ± 3,05	28,2

* Ortalama ± standart sapma, (N=3) ve yaş kütle üzerinden mg kg⁻¹ olarak sonuç verilmiştir.

Çizelge 4.5.8.3.2. Fındık örneklerinin enzim çözeltileri, su, *n*-oktanol ile ekstrakte edilebilen veya aktif karbona adsorbe edilebilen fraksiyonlarındaki bakır düzeyleri*

Fındık	Pepsin		Su		Pankreatin	
	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%
1	5,86 ± 1,32	42,8	6,64 ± 1,19	48,5	5,28 ± 0,92	38,5
2	6,62 ± 1,05	41,4	11,19 ± 1,06	69,9	6,54 ± 0,61	40,9
3	9,13 ± 0,86	64,3	6,64 ± 0,09	46,8	5,39 ± 0,93	38,0
Fındık	Pepsin+Pankreatin (Gastrointestinal)		<i>n</i> -oktanol		Aktif karbon	
	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%
1	3,19 ± 0,64	23,3	0,13 ± 0,01	0,9	0,020 ± 0,004	0,1
2	2,64 ± 1,50	16,5	0,16 ± 0,02	1,0	0,01 ± 0,005	0,1
3	4,36 ± 2,51	30,7	0,21 ± 0,04	1,5	0,01 ± 0,008	0,1

* Ortalama ± standart sapma, (N=3) ve yaş kütle üzerinden mg kg⁻¹ olarak sonuç verilmiştir.

Çizelge 4.5.8.3.3. Fındıktaki manganın biyoyararlılığı*

Fındık	Biyoyararlılık ^a (%)	<i>n</i> -oktanol ile ekstrakte edilebilen miktar ^b (%)	Pankreatin ile ekstrakte edilebilen mangan miktarı (mg kg ⁻¹)	<i>n</i> -oktanol ile ekstrakte edilebilen mangan miktarı (Düzeltilmiş) ^c (mg kg ⁻¹)
1	57,6	1,4	30,80 ± 4,50	0,35 ± 0,14
2	32,0	1,6	25,86 ± 3,01	0,75 ± 0,42
3	62,1	1,6	26,13 ± 2,12	0,46 ± 0,08

Fındık	Aktif karbona adsorbe edilebilen mangan miktarı ^d (%)	Suda çözünen mangan miktarı (mg kg ⁻¹)	Toplam miktar (mg kg ⁻¹)
1	34,2	10,89 ± 2,62	79,9 ± 1,3
2	22,8	13,38 ± 0,02	95,5 ± 1,9
3	28,2	7,33 ± 0,32	76,7 ± 9,3

* Ortalama ± standart sapma, (N=3) ve yaş kütle üzerinden mg kg⁻¹ olarak sonuç verilmiştir

^a: *in-vitro* pepsin+pankreatin ile (gastrointestinal olarak) sindirilebilen element içeriğinin toplam element düzeyine oranı ile elde edilmiştir.

^b: *n*-oktanol ile ekstrakte edilebilen element düzeyinin toplam element düzeyine oranı ile elde edilmiştir.

^c: ^b×düzeltme faktörü ile elde edilmiştir.

^d: Aktif karbon tarafından adsorbe edilen element düzeyinin toplam element düzeyine oranı ile elde edilmiştir.

Çizelge 4.5.8.3.4. Fındıktaki bakırın biyoyararlılığı*

Fındık	Biyoyararlılık ^a (%)	<i>n</i> -oktanol ile ekstrakte edilebilen miktar ^b (%)	Pepsin+pankreatin ile ekstrakte edilebilen bakır miktarı (mg kg ⁻¹)
1	48,0	2,0	3,19 ± 0,64
2	23,6	1,4	2,64 ± 1,50
3	65,7	3,2	4,36 ± 2,51

Fındık	<i>n</i> -oktanol ile ekstrakte edilebilen bakır miktarı (Düzeltilmiş) ^c (mg kg ⁻¹)	Aktif karbona adsorbe edilebilen bakır miktarı ^d (%)	Toplam miktar (mg kg ⁻¹)
1	0,029 ± 0,002	0,1	13,7 ± 0,5
2	0,032 ± 0,004	0,1	16,0 ± 1,6
3	0,023 ± 0,004	0,1	14,2 ± 0,6

* Ortalama ± standart sapma, (N=3) ve yaş kütle üzerinden mg kg⁻¹ olarak sonuç verilmiştir

^a: *in-vitro* pepsin+pankreatin ile (gastrointestinal olarak) sindirilebilen element içeriğinin suya geçen element düzeyine oranı ile elde edilmiştir.

^b: *n*-oktanol ile ekstrakte edilebilen element düzeyinin suya geçen element düzeyine oranı ile elde edilmiştir.

^c: ^b×düzeltme faktörü ile elde edilmiştir.

^d: Aktif karbon tarafından adsorbe edilen element düzeyinin suya geçen element düzeyine oranı ile elde edilmiştir.

4.5.9. ICP-MS ile metot duyarlılık parametrelerinin belirlenmesi

İspanak matriksi için ilgili parametreler Çizelge 4.5.9.1, Çizelge 4.5.9.2’de ve doğruluk çalışmalarına yönelik sonuçlar ise Çizelge 4.5.9.3 ve Çizelge 4.5.9.4’de ayrıntılı olarak görülmektedir. Un ve fındık matriksi için validasyona ilave parametreler Çizelge 4.5.9.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.5.9.1. Mn için ıspanak matriksinde bazı metot validasyon parametreleri ve değerleri

Element	Kalibrasyon Grafiği Eşitliği	Korelasyon Katsayısı (R^2)	LOD ^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOQ ^b ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Günler arası kesinlik ^{c, d}	Gün içi kesinlik ^{e, f}
Mn	$y=28458x$	0,999985	0,046	0,154	3,7	2,4

^{a, b} : Mikrodalga parçalamada 0,5 g örnek ve 25 mL tamamlama hacmi ile seyreltme faktörü göz önüne alınarak metot belirleme ve nicel tayin limitleri hesaplanmıştır.

^{c, e} : Gün içi ve günler arası % RSD değerine dayalı olarak hesaplanmıştır (N=10)

^d : Günler arası kesinlik bir haftalık periyotta ölçülen beş farklı çözeltiyi karakterize etmektedir.

^f : Ayrı hazırlanmış ve aynı gün ölçülmüş aynı konsantrasyondaki altı farklı mangan çözeltisini karakterize etmektedir.

Çizelge 4.5.9.2. Cu için ıspanak matriksinde bazı metot validasyon parametreleri ve değerleri

Element	Kalibrasyon Grafiği Eşitliği	Korelasyon Katsayısı (R^2)	LOD ^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOQ ^b ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Gün içi kesinlik ^{c, d}	Günler arası kesinlik ^{e, f}
⁶³ Cu	$y=15379x$	0,999891	0,07	0,233	3,0	4,8
⁶⁵ Cu	$y=7202x$	0,999874	0,09	0,300	3,8	6,7

^{a, b} : Mikrodalga parçalamada 0,5 g örnek ve 25 mL tamamlama hacmi ile seyreltme faktörü göz önüne alınarak metot belirleme ve nicel tayin limitleri hesaplanmıştır.

^{c, e} : Gün içi ve günler arası % RSD değerine dayalı olarak hesaplanmıştır (N=10)

^d : Günler arası kesinlik bir haftalık periyotta ölçülen beş farklı çözeltiyi karakterize etmektedir.

^f : Ayrı hazırlanmış ve aynı gün ölçülmüş aynı konsantrasyondaki dört farklı bakır çözeltisini karakterize etmektedir.

Çizelge 4.5.9.3. Mn için sertifikalı referans malzeme kullanılarak yapılan doğruluk çalışmaları*

Element	Sertifika değeri (mg kg ⁻¹)	Ölçülen değer (mg kg ⁻¹)
Mn (ıspanakta)	75,9 ± 1,9	76,9 ± 2,1
Mn (unda)	9,4± 0,9	12,2± 3,4

* (NIST 1570a ve NIST 1567a (N=3)) kullanılmıştır. Ortalama ± standart sapma, genişletilmiş belirsizlik değeri ile verilmiştir.

Çizelge 4.5.9.4. Cu için sertifikalı referans malzeme kullanılarak yapılan doğruluk çalışmaları*

Element	Sertifika değeri (mg kg ⁻¹)	Ölçülen değer (mg kg ⁻¹)
Cu (ıspanakta)	12,2 ± 0,6	12,1 ± 1,2
Cu (unda)	2,1± 0,2	3,01± 0,5

* (NIST 1570a ve NIST 1567a (N=3)) kullanılmıştır. Ortalama ± standart sapma, genişletilmiş belirsizlik değeri ile verilmiştir.

Çizelge 4.5.9.5. Mn ve Cu için un ve fındık matrisinde ilave metot validasyon parametreleri

Element	Kalibrasyon Grafiği Eşitliği	Korelasyon Katsayısı (R ²)
Mn	y=38593x	0,999960
⁶⁵ Cu	y=7207x	0,999903
⁶³ Cu	y=15377x	0,999918
	LOD ^a (µg g ⁻¹)	LOQ ^b (µg g ⁻¹)
Un	0,0006	0,0021
Fındık	0,0308	0,1026

^{a,b} : örnek miktarı, toplam hacim ve seyreltme faktörü göz önüne alınarak metot belirleme ve nicel tayin limitleri hesaplanmıştır.

4.5.10. Katı faz ekstraksiyonu sonuçları

Kuvvetli kation değiştirici katı faz ekstraksiyon kartuş kolonları temelde matriksin analitten ayrılması amaçlı kullanılmıştır. Yöntemin etkinliğine dair sonuçlar Çizelgede 4.5.10.1’de görölmektedir. Çizelge 4.5.10.2’de ise yüzde geri kazanım değerleri görölmektedir.

Çizelge 4.5.10.1. Katı faz ekstraksiyonu sonuçları

Suya geçen element düzeyleri (mg kg ⁻¹)						
Örnek	Mn	Standart sapma	⁶⁵ Cu	Standart sapma	⁶³ Cu	Standart sapma
1 numaralı ıspanak	16,60	1,12	5,40	0,72	5,44	0,81
2 numaralı ıspanak	19,84	1,46	4,43	0,46	4,36	0,45
3 numaralı ıspanak	21,78	0,91	4,93	0,10	5,03	0,18
1 numaralı un	2,09	0,08	0,20	0,07	0,20	0,06
2 numaralı un	1,30	0,25	0,19	0,04	0,19	0,04
3 numaralı un	2,25	0,28	0,24	0,01	0,24	0,01
1 numaralı fındık	11,29	2,62	15,92	3,38	15,81	3,42
2 numaralı fındık	51,96	0,59	14,12	1,14	14,03	1,12
3 numaralı fındık	55,51	8,59	17,10	2,25	16,96	2,39
Katı faz ekstraksiyonu sonuçları (µg L ⁻¹)						
Örnek	Mn	Standart sapma	⁶⁵ Cu	Standart sapma	⁶³ Cu	Standart sapma
1 numaralı ıspanak	0,21	0,03	0,49	0,10	0,49	0,10
2 numaralı ıspanak	0,24	0,06	0,47	0,12	0,47	0,12
3 numaralı ıspanak	0,33	0,04	0,54	0,02	0,55	0,02
1 numaralı un	0,28	0,07	0,20	0,05	0,20	0,05
2 numaralı un	0,17	0,06	0,18	0,08	0,18	0,08
3 numaralı un	0,40	0,05	0,52	0,02	0,51	0,03
1 numaralı fındık	7,73	0,19	52,0	0,69	52,1	0,66
2 numaralı fındık	1,26	0,05	9,0	0,29	8,94	0,32
3 numaralı fındık	1,94	0,04	7,6	0,31	7,45	0,39

Çizelge 4.5.10.2. Katı faz ekstraksiyonu için yüzde geri kazanım sonuçları

Yüzde geri kazanım değerleri (%)			
Örnek	Mn	⁶⁵ Cu	⁶³ Cu
1 numaralı ıspanak	3,70	5,91	5,83
2 numaralı ıspanak	3,35	6,27	6,39
3 numaralı ıspanak	5,8	8,98	9,00
1 numaralı un	1,25	1,88	1,88
2 numaralı un	1,18	1,82	1,77
3 numaralı un	1,54	4,04	3,97
1 numaralı fındık	20,75	21,14	21,31
2 numaralı fındık	2,17	12,23	12,23
3 numaralı fındık	2,96	8,05	7,98

4.5.11. Çevre örneklerinden yağmur suyunda mangan ve bakır türlendirme/fraksiyonlama analizleri

Yağmur suyunda yapılan çalışmalar sonucu belirlenen, fraksiyonlardaki Mn ve Cu düzeyleri Çizelge 4.5.11.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.5.11.1. Yağmur suyunda mangan ve bakır türlendirme/fraksiyonlama sonuçları

metal düzeyleri ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1. yağmur suyu	2. yağmur suyu	3. yağmur suyu
Toplam mangan (yaş yakma)	0,86 \pm 0,45	5,03 \pm 1,00	3,63 \pm 0,46
Toplam ⁶⁵ Cu (yaş yakma)	6,70 \pm 1,00	3,50 \pm 0,63	7,03 \pm 0,04
Toplam ⁶³ Cu (yaş yakma)	6,66 \pm 0,86	3,50 \pm 0,59	7,09 \pm 0,10
Toplam mangan (direkt örnek analizi)	0,45 \pm 0,01	0,90 \pm 0,03	1,35 \pm 0,08
Toplam ⁶⁵ Cu (direkt örnek analizi)	3,08 \pm 0,06	2,69 \pm 0,04	4,83 \pm 0,40
Toplam ⁶³ Cu (direkt örnek analizi)	3,05 \pm 0,08	2,66 \pm 0,02	4,62 \pm 0,05
Kolloidal mangan	0,06 \pm 0,01	0,24 \pm 0,17	1,33 \pm 0,89

Çizelge 4.5.11.1. Yağmur suyunda mangan ve bakır türlendirme/fraksiyonlama sonuçları (devam)

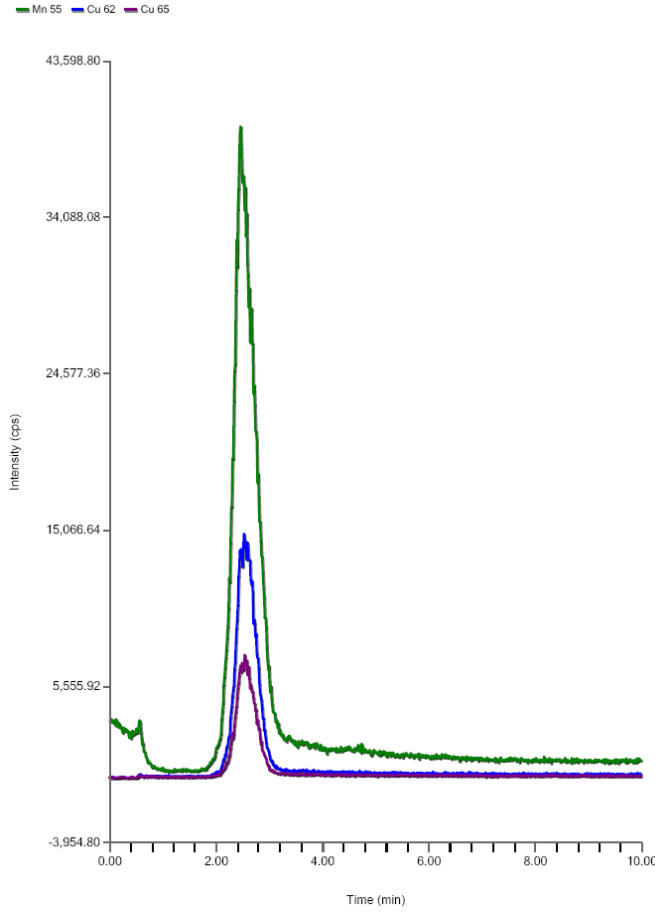
metal düzeyleri ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1. yağmur suyu	2. yağmur suyu	3. yağmur suyu
Kolloidal ^{65}Cu	$0,34 \pm 0,04$	$0,58 \pm 0,14$	$1,68 \pm 0,10$
Kolloidal ^{63}Cu	$0,31 \pm 0,13$	$0,69 \pm 0,08$	$1,68 \pm 0,92$
Partiküle mangan	$0,10 \pm 0,45$	$4,30 \pm 1,02$	$2,98 \pm 0,46$
Partiküle ^{65}Cu	$3,27 \pm 1,00$	$0,14 \pm 0,07$	$2,40 \pm 0,08$
Partiküle ^{63}Cu	$3,27 \pm 0,87$	$0,20 \pm 0,14$	$2,51 \pm 0,92$
Çözünmüş Mangan	$0,76 \pm 0,01$	$0,73 \pm 0,21$	$0,65 \pm 0,03$
Çözünmüş ^{65}Cu	$3,43 \pm 0,04$	$3,36 \pm 0,14$	$4,63 \pm 0,07$
Çözünmüş ^{63}Cu	$3,39 \pm 0,09$	$3,30 \pm 0,08$	$4,58 \pm 0,92$

4.6. HPLC-ICP-MS İkili Tekniğine Dayanan Türlendirme Çalışmaları Sonuçları

4.6.1. Kalitatif analiz sonuçları

4.6.1.1. Standart çözeltiler ile yapılan çalışmalar

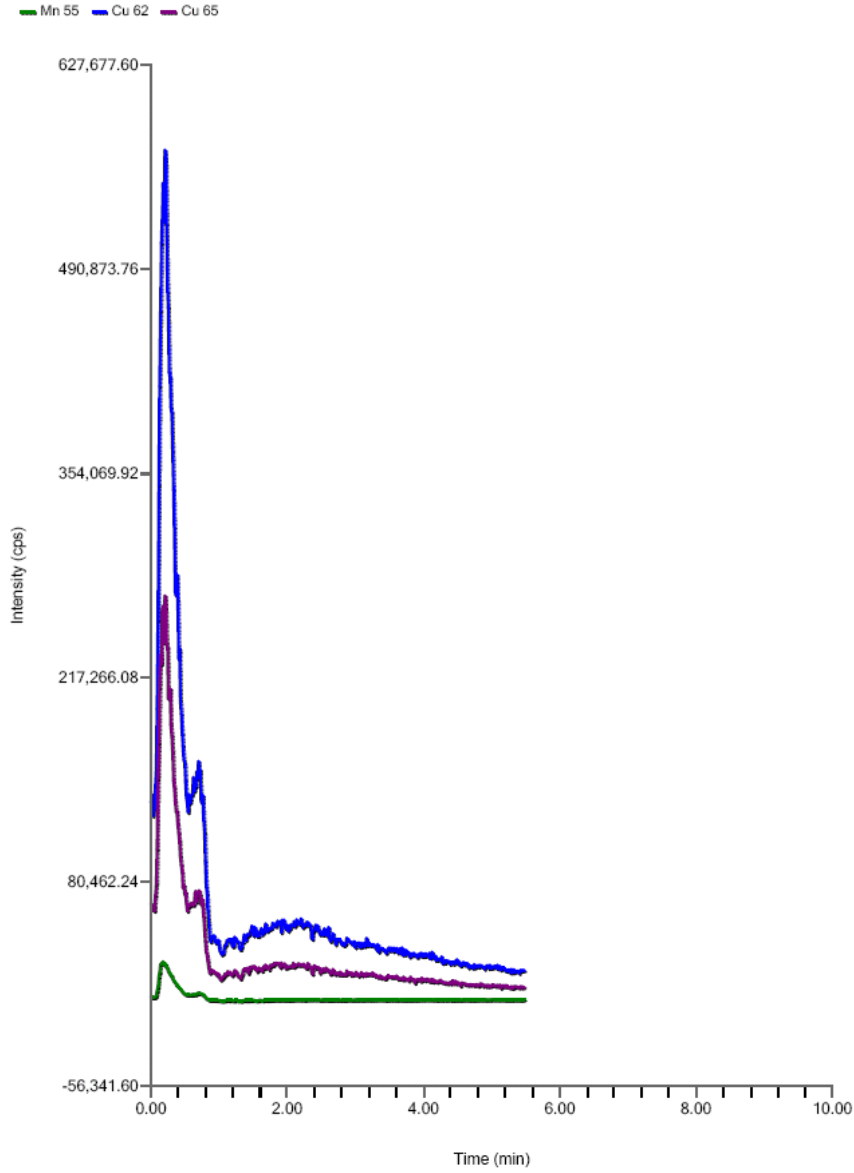
Hareketli faz olarak su kullanıldığında HPLC-ICP-MS tekniği ile Mn (II), Mn(III) ve Mn (IV) çözeltilerine ait elde edilen kromatogramlar Şekil 4.6.1.1.1, Şekil 4.6.1.1.2 ve Şekil 4.6.1.1.3’de verilmiştir. Mn ve Cu izotopları için alıkonma zamanı $t_R = 2-2,5$ dk arasında değişmektedir. Fındık örneklerinde gözlenen ikinci Mn piki için alıkonma zamanları ise 3-3,5 dk arasında değişmektedir.



Şekil 4.6.1.1.1. Mn (II) ve Cu (II) çözeltileri karışımı için HPLC-ICP-MS ile eş-zamanlı elde edilen kromatogram*

*(Mn ve Cu stok çözeltilerinden, 278 ppb Mn ve 2,78 ppm Cu karışım halinde hazırlanarak enjekte edilmiştir.)

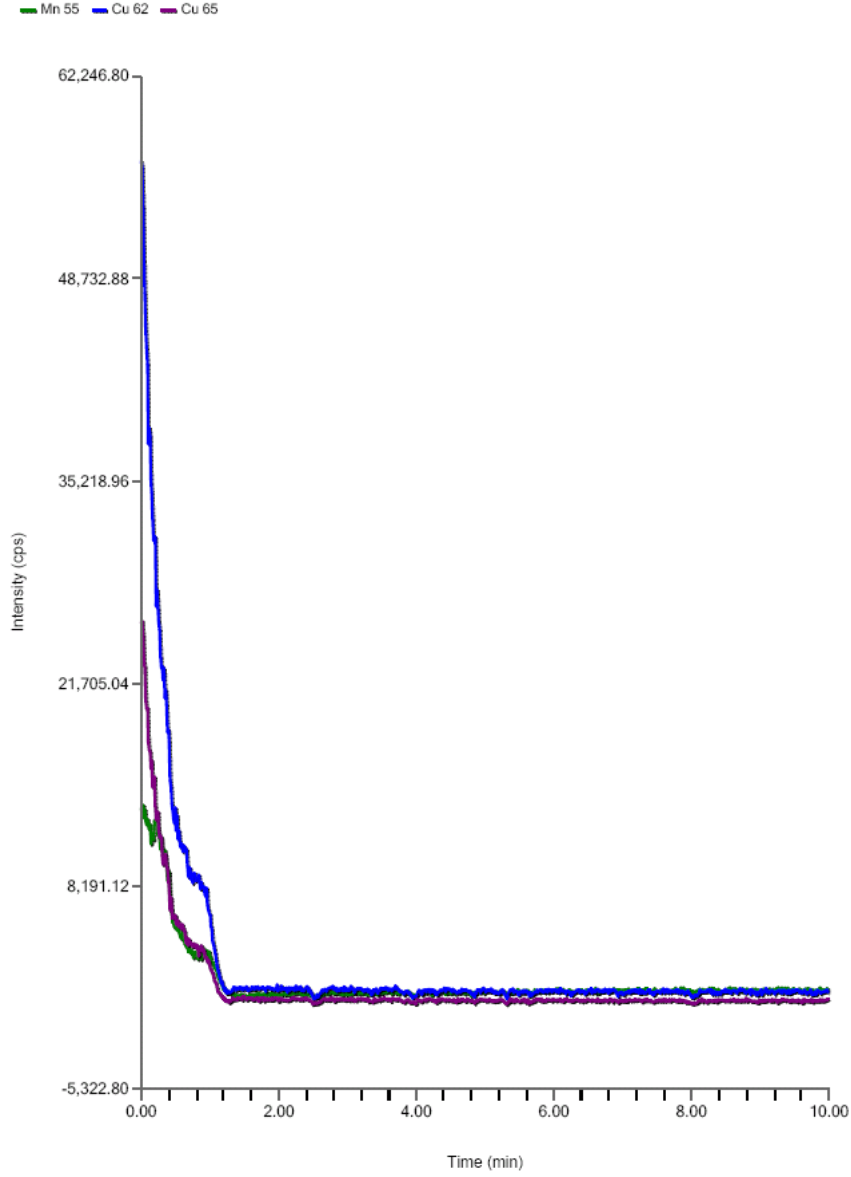
Kromatogramdaki x eksenini zamanı (dk), y eksenini ise sinyal şiddetini (cps) temsil etmektedir.



Şekil 4.6.1.1.2. Mn (III) çözeltisi için HPLC-ICP-MS ile elde edilen kromatogram*

* Mn (III) standart çözeltisi Mangan (III) asetat dihidrat katısından suda yaklaşık $513 \mu\text{g L}^{-1}$ derişimde hazırlanmıştır. Mn(III) çözeltisi yaklaşık $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ mangan değerine kadar analiz edilmiş; kromatogramda pik gözlenmemiştir.

Kromatogramdaki x eksenini zamanı (dk), y eksenini ise sinyal şiddetini (cps) temsil etmektedir.



Şekil 4.6.1.1.3. Mn (IV) çözeltisi için HPLC-ICP-MS ile elde edilen kromatogram*

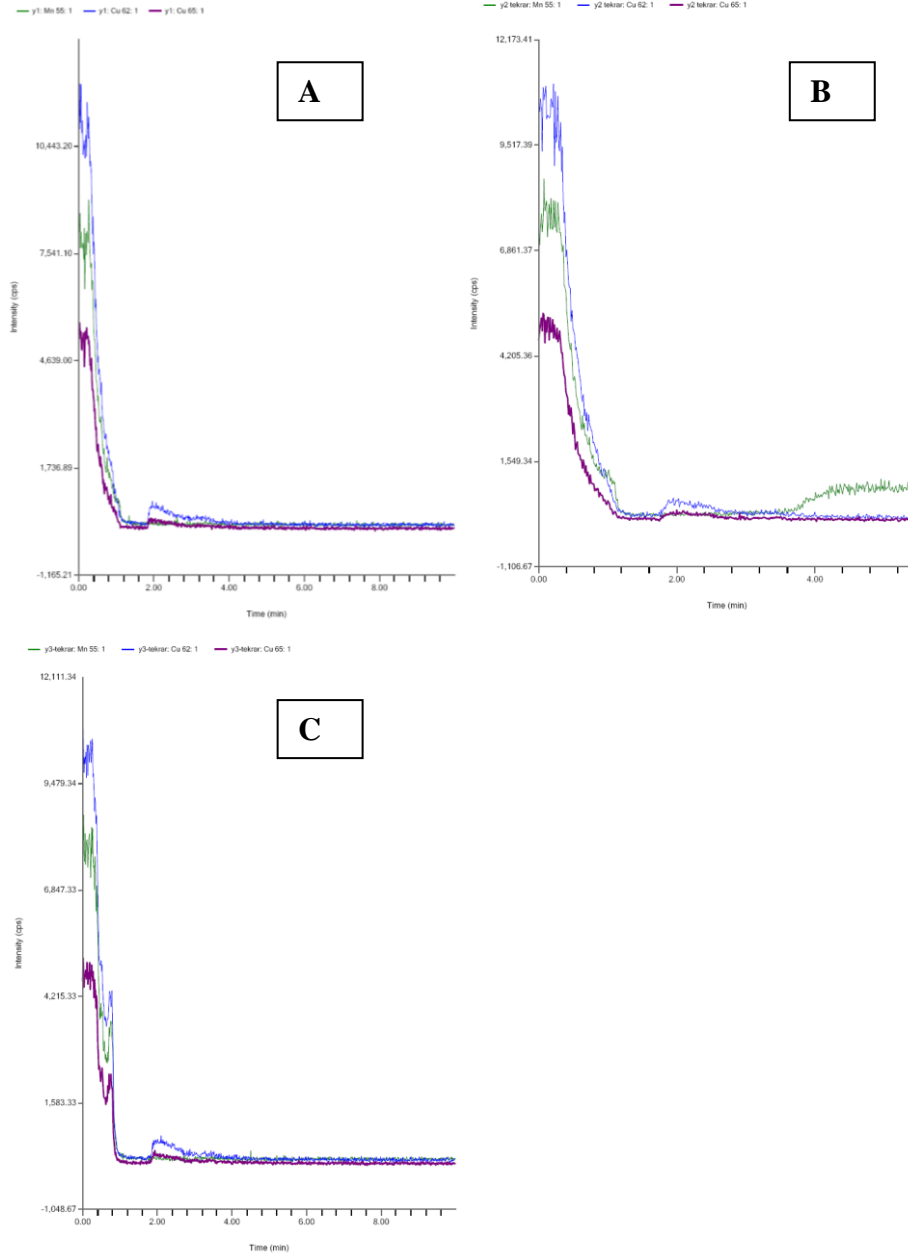
* Mn (IV) standart çözeltisi Mangan (IV) oksit katısından suda yaklaşık $513 \mu\text{g L}^{-1}$ derişimde hazırlanmıştır. Mn(IV) çözeltisi yaklaşık $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ mangan değerine kadar analiz edilmiş; kromatogramda pik gözlenmemiştir.

Kromatogramdaki x eksenini zamanı (dk), y eksenini ise sinyal şiddetini (cps) temsil etmektedir.

4.6.2. Matrislerden elde edilen kalitatif analiz sonuçları

4.6.2.1. Yağmur suyunda kalitatif analiz sonuçları

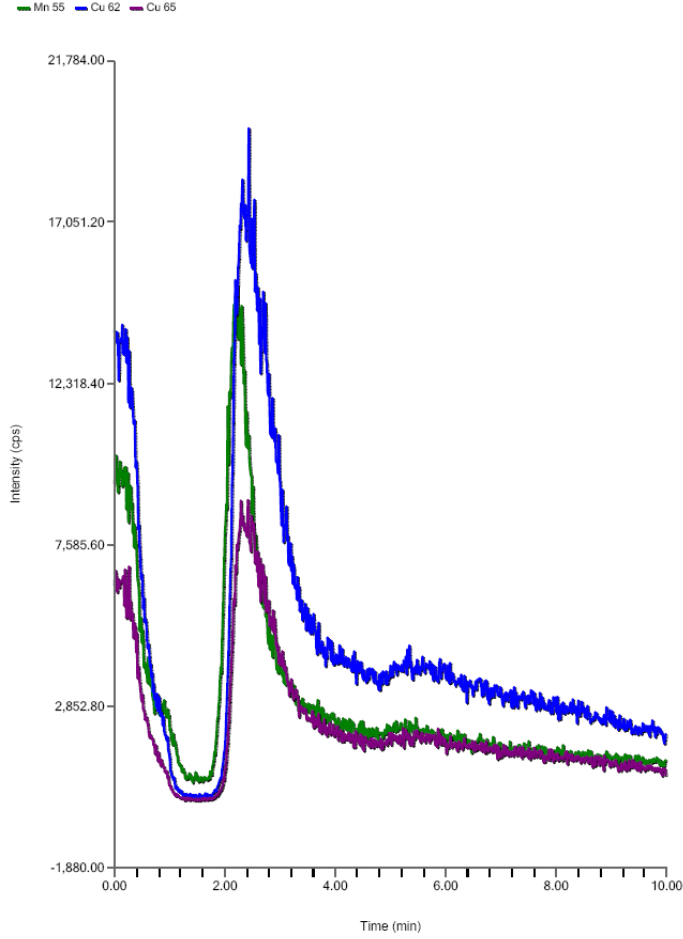
Hareketli faz olarak su kullanıldığında HPLC-ICP-MS tekniği ile üç farklı yağmur suyu için elde edilen kromatogramlar Şekil 4.6.2.1.1' de verilmiştir.



Şekil. 4.6.2.1.1. A: 1. yağmur suyu; B: 2. yağmur suyu ve C: 3. yağmur suyu için HPLC-ICP-MS ile elde edilen kromatogramlar (Kromatogramlardaki x eksenini zamanı (dk), y eksenini ise sinyal şiddetini (cps) temsil etmektedir.)

4.6.2.2. Ispanak örneği için kalitatif analiz sonuçları

Hareketli faz olarak su kullanıldığında 2. Ispanak örneği için elde edilen kromatogram Şekil 4.6.2.2.1' de belirtilmiştir.

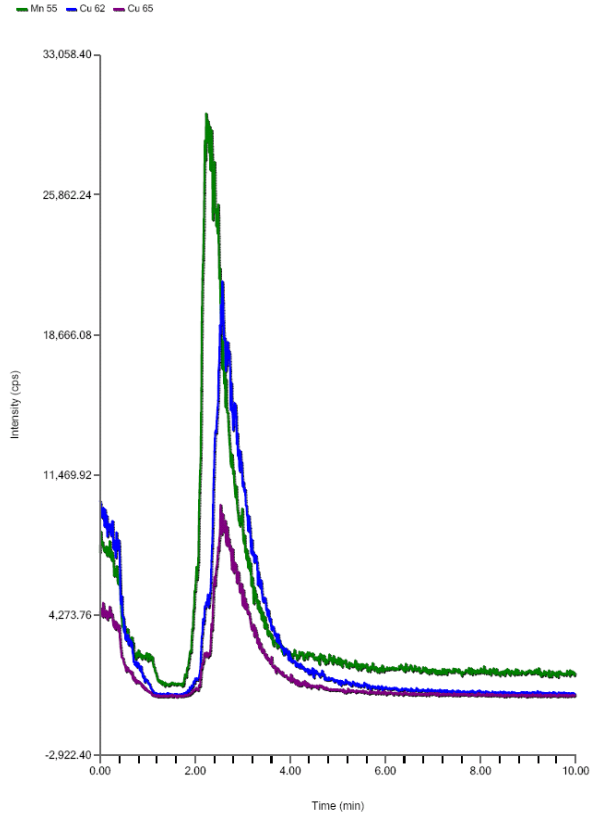


Şekil 4.6.2.2.1. İkinci ıspanak örneği için HPLC-ICP-MS ile elde edilen kromatogram*

* Kromatogramdaki x eksenı zamanı (dk), y eksenı ise sinyal şiddetini (cps) temsil etmektedir.

4.6.2.3. Un örneği için kalitatif analiz sonuçları

Hareketli faz olarak su kullanıldığında HPLC-ICP-MS tekniği ile ikinci un örneği için elde edilen kromatogram Şekil 4.6.2.3.1' de verilmiştir.

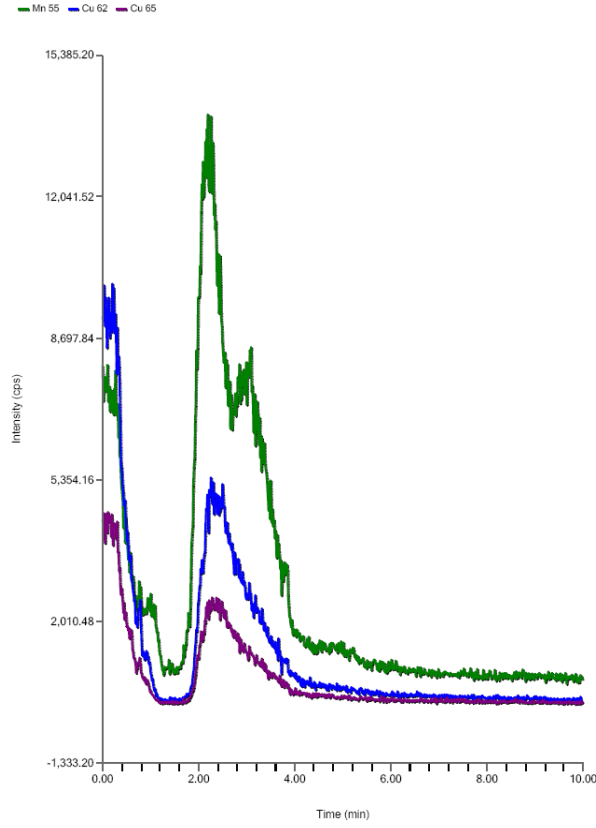


Şekil 4.6.2.3.1. İkinci un örneği için HPLC-ICP-MS ile elde edilen kromatogram *

* Kromatogramdaki x eksenini zamanı (dk), y eksenini ise sinyal şiddetini (cps) temsil etmektedir.

4.6.2.4. Fındık örneği için kalitatif analiz sonuçları

Hareketli faz olarak su kullanıldığında HPLC-ICP-MS tekniği ile üçüncü fındık örneği için elde edilen kromatogram Şekil 4.6.2.4.1’de verilmiştir.

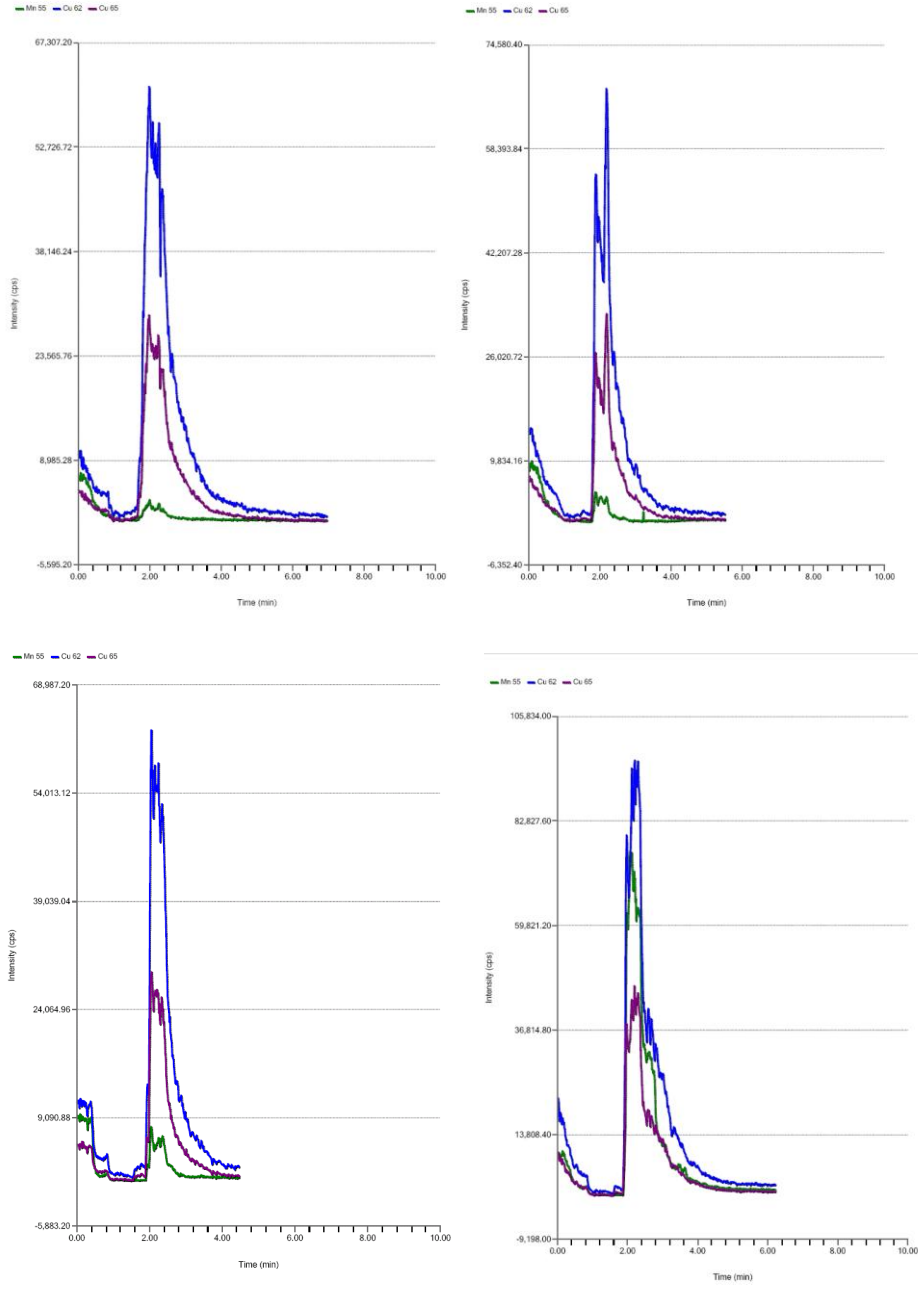


Şekil 4.6.2.4.1. Üçüncü findık örneği için HPLC-ICP-MS ile elde edilen kromatogram*

* Kromatogramdaki x eksenini zamanı (dk), y eksenini ise sinyal şiddetini (cps) temsil etmektedir.

4.6.2.5. Metanol içeren mobil fazın ayırmaya etkisi

Mobil faz olarak %1-5 arasında değişen gradiyent elüsyon programları uygulandığında metanol içeren hareketli fazın, kromatogramında iki pik gözlenen üçüncü findık örneğinde ayırmaya etkisine ilişkin elde edilen kromatogramlar Şekil 4.6.2.5.1'de verilmiştir.



Şekil 4.6.2.5.1. HPLC-ICP-MS sisteminde % 1-5 arasında metanol kullanıldığında üçüncü fıındık örneği için elde edilen kromatogramlar

(Kromatogramlardaki x eksenini zamanı (dk), y eksenini ise sinyal şiddetini (cps) temsil etmektedir.)

4.6.3. Matrislerden elde edilen kantitatif analiz sonuçları

Hareketli faz olarak su kullanıldığında HPLC-ICP-MS ile elde edilen kalibrasyon eğrileri Çizelge 4.6.3.1’de verilmiştir. Analiz ile ilgili LOD ve nicel tayin limiti (LOQ) değerleri, Çizelge 4.6.3.2’de ve matrislerde belirlenen türlere ilişkin miktarlar da Çizelge 4.6.3.3’de görülmektedir.

Çizelge 4.6.3.1. HPLC-ICP-MS ile elde edilen kalibrasyon eğrileri

Kalibrasyon eğrisi	Kalibrasyon eğrisi oluşturmada temel alınan pik özelliği
⁵⁵ Mn, $y = 1181x - 13609$; $R^2 = 0,975$	Yüksekliğe göre
⁵⁵ Mn, $y = 34229x - 5E+6$; $R^2 = 0,887$	Alana göre
⁶³ Cu, $y = 47,0x - 13569$; $R^2 = 0,959^*$	Yüksekliğe göre
⁶³ Cu, $y = 389,6x - 1E+6$; $R^2 = 0,951$	Alana göre
⁶⁵ Cu, $y = 14,5x - 29251$; $R^2 = 0,953^*$	Yüksekliğe göre
⁶⁵ Cu, $y = 357,7x - 71773$; $R^2 = 0,971$	Alana göre

* Cu ve Mn kalibrasyon eğrileri oluşturulurken standart konsantrasyonları, $\mu\text{g L}^{-1}$ derişiminde alınmıştır.

Çizelge 4.6.3.2. HLPC-ICP-MS çalışmalarında Mn ve Cu türleri için belirleme ve nicel tayin limitleri

	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
⁵⁵ Mn	3,6	12,0
⁶³ Cu	98,9	329,6
⁶⁵ Cu	438,1	1460,4

Çizelge 4.6.3.3. HLPC-ICP-MS çalışmalarında matrislerde Mn ve Cu için belirlenen türlerin miktarları

Matriks (Örnek numarası)	Örnekten sulu çözeltiye geçen miktar ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bulunan Mn miktarı ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Standart sapma	Bulunan Mn yüzdesi (%)
Ispanak (2)	33,40	17,29	7,49	51,79
Un (2)	68,86	41,70	5,79	60,56
Fındık (3)	305,47	20,13	4,73	6,59
Fındıkta bağlı mangan düzeyi		15,77	2,16	5,16
Yağmur suyu (1,2,3)		<LOD*		
	Örnekten sulu çözeltiye geçen miktar ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bulunan ^{63}Cu miktarı ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
Ispanak (2)	7,47	<LOQ**		
Un (2)	9,86	<LOQ**		
Fındık (3)	94,05	<LOQ**		
Yağmur suyu (1,2,3)	3,50	<LOQ**		

* : Belirleme limiti altındadır.

** : Nicel tayin limitinin altındadır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mangan (II) bitkiler tarafından alınabilen tek form olmasına rağmen okzalit veya sitrat gibi ligandlar ile kompleks halinde ya da protein gibi belirli yapılara bağılı halde bulunabilir; ayrıca fotosentez redoks sisteminde önemli bir rol oynar. Aşırı mangan (stres şartlarını örnek olarak verebiliriz) vakuollerde, hücre duvarlarında ve kloroplast tilakoid membranında birikir, klorofil biyosentezini inhibe ederek yüksek derişimlerde de fitotoksik olmaya başlar (Marschner 1989, Millaleo ve ark. 2010, Srivastava ve Dubey 2011). Bitkilerde ve insanlarda mangan mobilitesini anlamak için fraksiyonlama çalışmaları gereklidir ve buna yönelik analitik stratejiler geliştirilmelidir. Örneğin, ıspanak için geliştirilen ve diğer matrikslere de uygulanan fraksiyonlama şeması bkz. Şekil 3.2.7.5.1' de görülmektedir. Ispanakta toplam mangan miktarı 38–55 mg kg⁻¹ arasında bulunmuştur. Bu miktarlar; çeşit, toprak karakteristikleri ve çevre şartlarına bağılı olabilecektir.

Farklı polaritede çözümler seçilerek fraksiyonlama şeması uygulandığında elde edilen fraksiyonlardaki mangan düzeyi µg L⁻¹ düzeyinde olduğundan ICP-MS hassas bir teknik olarak önem kazanmaktadır. ICP-MS pek çok avantajına karşın bazı istenmeyen özelliklere de sahiptir. Matriksin yüksek organik içeriği matriks interferensine/spektral interferenslere ve/veya poliatomik interferenslere yol açabilir. Bu nedenle farklı izotopların kullanılması veya matematiksel düzeltme sağlayan eşitlikler önem kazanmaktadır. Mangan bağılı bolluğu % 100 olan tek izotopa sahip olduğu için plazmadaki ArNH⁺ vb. den kaynaklanan girişimler için ikinci strateji daha anlamlıdır (Quintana ve ark. 2005, Nardi ve ark. 2009, Amais ve ark. 2011). Tez çalışmamızda ilave bir validasyon parametresi olarak matrikslerde ICP-MS ile metal analizlerine ilişkin sonuçlar AAS ile de karşılaştırılmıştır. Ayrıca mikrodalga parçalamaya alternatif olarak 0,1 N nitrik asitte doğrudan parçalanma ya da açık sistem yaş yakma işlemlerinin etkinlikleri de incelenmiş ve karşılaştırılmıştır.

Ispanaktaki temel bileşen analizleri fraksiyonlama çalışmalarına ışık tutacak ilk basamak olmuştur. Ispanaktaki yağ ve şeker içerikleri sadece ilk ıspanak için incelenmiş ve yeterince küçük olduğu belirlenmiştir. Manganın bağılı olduğu yapılar farklı polaritede olabileceğinden farklı organik çözümler ile fraksiyonlama çalışmaları

yapılmıştır. Ispanak matriksinde suya geçebilen mangan düzeyi 24–33 mg kg⁻¹ düzeyinde olup yüzde olarak % 62–68 arasındadır. Bu da manganın çoğunlukla suda çözünür olduğunu göstermektedir. Bu fraksiyon serbest Mn(II) den kaynaklanabileceği gibi çözünür fitoşelatin komplekslerinden, hidrolizlenebilir lipid, şeker, polisakkarit, protein gibi muhtemel yapılara bağlı Mn türlerinden de kaynaklanabilecektir (Marschner 1989, Akoh ve Min 2002, Szpunar ve Lobinski 2003, Prasad 2004). Sıcak ekstraksiyon da uygulanarak pişirme şartları simüle edilmeye çalışılmıştır. Kaynama noktasına yakın sıcaklıklarda Mn seviyesinin % 8–25 arasında artabildiği görülmüştür. Bu da bitki membranından çözültüye geçişin sıcaklıkla arttığını göstermiştir.

Yağ ve lipid kavramları birbiri yerine kullanılabilse de lipidler doğal olarak var olan, heterojen ve apolar çözücülerde çözülen molekülleri karakterize eder (Eller ve King, 1996). Lipidler bitki hücre membranının % 60'ını oluştururken kalan % 40 ise proteinlerdir. Plazma membranındaki temel lipidler ise fosfolipidler (% 65), glikolipidler (% 20) ve sterollerden oluşur (% 5). Lipidler genellikle fiziksel özellik, polarite, yararlılık veya yapılarına göre sınıflandırılırlar. Polarite veya yapılarına göre nötral lipid-polar lipid, serbest veya bağlı olarak değerlendirilebilirler (Marschner 1989, Prasad 2004, Akoh ve Min, 2002). Dolayısı ile lipid değişkenliğine bağlı olarak fraksiyonlama çalışmalarında çözgen seçimi de kritik öneme sahiptir. Çoğu organik çözgen hücre duvarını dağıtarak lipidlerin çözüne geçmesini sağlar; ayrıca ultrasonik banyo da ekstraksiyon etkinliğini artırır (Eller ve King 1996, Araujo ve ark 2013). Literatüre göre düşük lipid içeren örneklerde ekstraksiyon süresi çok az bir etkiye sahiptir (Mandigo ve ark. 1967). Bu stratejiler çalışma sırasında dikkate alınmıştır.

Literatürde farklı lipid türlerinin ekstraksiyonu için kloroform, aseton, metanol, kloroform:metanol (2:1 (v/v) veya 1:2 (v/v)) gibi farklı organik çözgenler kullanılabilir. Nötral yağ, serbest lipidleri belirtir ve bunlar daha az polariteye sahip çözgenlere alınabilirken bağlı lipidler için metanol gibi daha polar çözgenler gerekmektedir. Diyet ile alınan lipidler çoğunlukla (> % 95) triaçilgliserolden oluştuğu için gıdalardan lipid ekstraksiyonunda polar olmayan çözgenler daha etkindir. Yine de polaritesi düşük olan çözgenler ile istenmeyen yapılar da lipid ile ekstrakte edilebilir. Yaygın olarak kullanılan Folch metoduna göre lipidler kloroform ve metanol ile

ekstrakte edilebilmektedir (Folch ve ark. 1957, Rouser ve ark. 1967; Leray ve Pelletier 1987; Eller ve King 1996, Akoh ve Min 2002, Ferraz ve ark. 2004, Maeda ve ark. 2005; Bonfils ve ark. 2007, Akoh ve Min. 2008).

Ispanaktaki % 0,12 lik yağ içeriği, eter ile ekstrakte edilebilen ham yağı belirtir ve bu yapıya bağlı olan mangan ise 0,6–0,8 mg kg⁻¹ arasındadır. Çalışmamızda *n*-hekzan serbest lipit ve trigliseritler için kullanılmış ve eter ile karşılaştırılmıştır. *n*-hekzan aromatik yapıları da ekstrakte edebileceğinden miktarı daha fazla bulunmuştur. Toplam yağ da Folch metoduna göre kloroform:metanol (2:1, v/v) ekstraksiyonu ile belirlenmiştir (Folch ve ark. 1957; Akoh ve Min 2002; Ferraz ve ark. 2004; Emek ve ark. 2011). Bağlı veya serbest lipidlere bağlı mangan düzeyleri 1,4–2,5 mg kg⁻¹ ve 1,1–1,4 mg kg⁻¹ arasındadır. Fraksiyonlama çalışmalarında kloroform da nötral veya kovalent bağlı bileşenler; özellikle nötral lipidler için kullanılmıştır (Ozdemir ve Gucer, 1998; Ferraz ve ark. 2004, Yaşar ve Güçer 2004). Kloroforma geçen yapıların mangan içeriği 1,0–1,3 mg kg⁻¹ arasında belirlenmiştir. Toplam lipidlere, nötral lipidlere veya serbest lipidlere bağlı Cu düzeyleri ise sırası ile 3,17–3,88 mg kg⁻¹, 0,46–0,61 mg kg⁻¹ ve 0,45–0,63 mg kg⁻¹ arasında belirlenmiştir. Ayrıca glikolipid içeren yapılar da aseton ile ekstrakte edilmiştir. Metanol polifenol de dahil olmak üzere pek çok polar bileşeni matristen alabilecektir. Çalışmada metanol ve etanol de etkinlik açısından birbirleri ile kıyaslanmış ve etkinlikleri hemen hemen aynı bulunmuştur; fakat standart sapması daha küçük ve kesinliği daha iyi olan metanol ekstraktı temel alınmıştır.

Literatürde etanol ve aseton sırası ile gıda matriksinden karbonhidrat ve protein çöktürmelerinde önerilmiştir (Karadjova ve ark. 2002). Bizim elde ettiğimiz sonuçlardan ise ikisinin de glikoprotein yapıları ile ilgili olabileceği gözlemine ulaşılmıştır. Sadece, etanol ile çöken yapıdaki element miktarı daha fazla olarak belirlenmiştir ki bu da ıspanağın daha yüksek glikolipid veya karbonhidrat içeriği ile ilgili olabilir. Sonuçlar yorumlandığında, manganın büyük bir kısmı (% 51–97) glikoproteine bağlı olup kalan % 3–7'si lipidlere bağlıdır. Cu için glikoproteine bağlı düzey ise % 44–75 arasındadır. Üçüncü ıspanakta muhtemelen yapısal bir özellikten dolayı % 49 civarında toplam mangan kaybı olmaktadır. Su ekstraktları da bunu doğrulayıcı niteliktedir.

Kullanılan organik çözenler yeterince seçici davranmazlar bu nedenle de tek tek çözenler ile yapılabilecek validasyon çalışmaları fraksiyonlardaki türler kesin olarak aydınlatılmadığı sürece anlamlı değildir.

Gıdalardaki toplam metal düzeyleri biyoyararlılıkları ile ilişkili değildir. Biyoyararlılığı tespit etmede mide veya bağırsak şartlarında ne kadar metal ayrıldığına belirlenmesi önemlidir. Ispanak tilakoid membranı lipid ve protein içerdiğinden *in-vitro* gastrointestinal sindirim çalışmaları yapılmıştır (Emek ve ark. 2011; Moreda-Pineiro ve ark. 2012). Diğer matrikslere de makro bileşen analizinden görüldüğü üzere; farklı düzeyde lipid ve protein içerikleri nedeni ile uygulanmıştır. Protein sindirimi midede başlamaktadır. Zayıf bağlı proteinlerin çoğu burada parçalanmakta (Emek ve ark. 2011); parçalanmış proteinler de bağırsağa iletilmektedir. Safra tuzları yağlı parçalar üzerine adsorbe olarak protein, emulsifier gibi diğer materyalleri lipid yüzeyinden uzaklaştıran bir bio-yüzey aktif madde olarak davranır; yağda çözünebilen besinlerin çözünme ve bağırsak mukozasına taşınımını kolaylaştırır (Maldonado-Valderrama ve ark. 2011). Böylece safra tuzları emulsifier etki göstererek (Chun ve ark. 2012) yağların pankreatin ile sindirime yardımcı olmaktadır (Alava ve ark. 2013). Pepsin ve pankreatine ilaveten *n*-oktanol de bağırsaktan geçen miktarı karakterize eden bir çözügendir ve bu amaçla da uygulanarak bağırsaktan geçen mangan kompleksleri, pankreatin ile parçalanmış kısım ile karşılaştırılmıştır (Shun-xing ve ark. 2004, Feng-Ying ve ark. 2007).

Aktif karbon da suda veya organik çözügende çözülebilen bağlı mangan-bakır türlerinin adsorplanabilme özelliklerini araştırmak için uygulanmıştır. Suya geçen miktar pepsine geçen miktara yakın bulunmuştur. Bu nedenle suya geçen miktar toplam mangan olarak ele alınarak biyoyararlık hesaplamalarında kullanılmıştır.

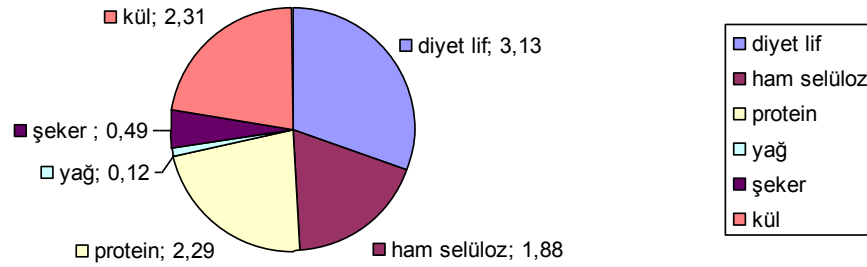
Toplam metal miktarı (suda çözünen kısım ya da toplam element içeriği temel alınmıştır.) ile pepsin (ya da pepsin+ pankreatin) tarafından parçalanmış miktarlar arasındaki fark ya da pepsin ve pankreatin tarafından parçalanmış miktarlar arasındaki fark, sırası ile kalıntıdaki manganı-bakırı ya da yüklü ve/veya serbest Mn (II) ya da Cu (II)'yi karakterize edecektir. Bu miktar biyoyararlı olmayan kısımdır. Deneysel

sonuçlarda ıspanak üzerinde kanıtlandığı üzere, uygun bir faktörle çarpılmadığı sürece *n*-oktanol ekstraksiyonu, *in-vitro* yöntemlere alternatif olamamaktadır. Bu faktörü belirlemek için iki seviyeli standart katma çalışmaları yapılmıştır. Belirlenen yüzde geri kazanımlar Mn için % 32,5, % 45,2 ve % 35,3 iken Cu için % 32,7, % 50,8 ve % 37,6 olup bu oranlar kompleksleşme olasılığını gösterecektir. Benzer faktör, *n*-oktanol fraksiyonundan elde edilen sonucun Mn için pankreatinden elde edilen sonuca; Cu için de pepsin+pankreatinden elde edilen sonuca bölünmesi ile de çıkarılmaktadır. Bu düzeltme faktörleri göz önüne alınarak biyoyararlılık karşılaştırılması da yapılmıştır. Aktif karbon da pankreatin sıvısı ile benzer sonuçlar vermektedir. Aktif karbon, adsorbe olan kompleks yapıları ya da aromatik yapıları karakterize etmekte olup; biyoyararlılık çalışmalarında alternatif olarak kullanılabilir. Fakat bakır için aktif karbon alternatif bir yöntem olarak kullanılamamaktadır; bu da ilgili metallerin kompleksleşme özellikleri arasındaki farka dayandırılabilir. Ispanak için ayrıntılı olarak yapılan yorumlamalar diğer matriks-metal analizleri için de benzer şekilde açıklanabilir, benzer yorumlamalar yapılabilir. İlgili sayısal değerler un için bkz. Çizelge 4.5.7.2.1-Çizelge 4.5.7.2.3 arasında görülmektedir. Un için hem ⁶³Cu hem de ⁶⁵Cu analizi yapılmış olup; fraksiyonlama çalışmaları açısından aralarında bir fark görülmemiştir. Temel bileşenlerdeki farklılıklar nedeni ile ıspanak ve unun fraksiyonlama analizlerinde sonuçlar bazında farklılık beklenmelidir. Fındık için ilgili sayısal değerler de bkz. Çizelge 4.5.7.3.1 ve Çizelge 4.5.7.3.2' de görülmektedir.

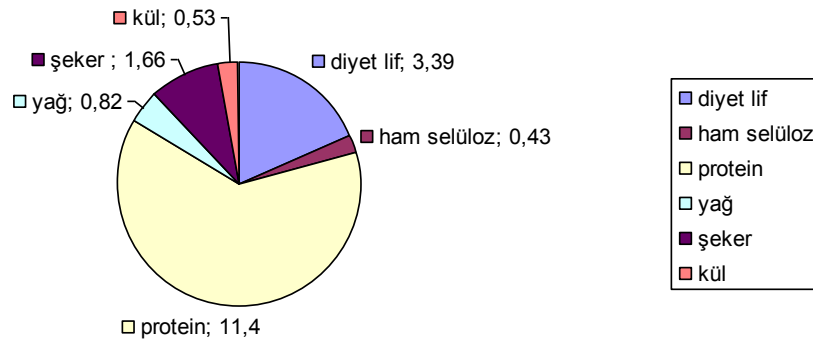
Ispanak, un ve fındık örneklerinin makro bileşenleri bkz. Çizelge 4.1.1, Çizelge 4.1.2 ve Çizelge 4.1.3'ten alınarak kuru bazda ve her matriksin birinci örneği için yüzdesel içerikleri de sayısal olarak görülecek bir şekile dönüştürülmüştür (Şekil 5.1). Matriksin makro bileşenleri kendine özgüdür. Bu durum, bitki/hücre yapıları ve gıda olarak kullanılan kısımlarının yapılarına bağımlı olarak kimyasal yapıtaşlarının farklılığından ileri gelmektedir (Marschner 1989, Prasad 2004). İlk basamakta yapılacak basit bir yaklaşım ile mangan ve bakır türleri organik yapıya bağlı olmaları durumunda bu makro bileşenlerden birinin yapısında olabilecektir. Bunlar dışında eser olarak bulunabilecek yapıların varlığı da göz ardı edilmemelidir. Belirli bir makro bileşen açısından değerlendirildiğinde, örneğin yağ içeriği incelendiğinde, bu içeriğin azalma sırasının fındık, un, ıspanak şeklinde olduğu görülmektedir. Buna göre mangan ve bakır

elementlerinin yağlı organik yapıya bağlı olma olasılığında fındık matrisinde bu oranın potansiyel olarak en fazla olması beklenebilir. Fındık örneklerinin metil esterlerine dayalı yağ asidi kompozisyonu çalışması örneklerde başlıca oleik, linoleik, palmitik ve stearik asit olduğunu belirtmektedir. Bu bileşenlere ait değerlerin “yemeklik rafine fındık yağı standardı (TS 6581)”nın belirttiği limit değerlere uygun olduğu görülmüştür. Literatüre göre lipid kompozisyonu membrandan metal taşınımını etkileyen önemli bir değişken olabilmektedir (Marschner 1989). Standarda dayalı soxhlet ve kloroform:metanol ekstraksiyonu ile fındıktan yağ uzaklaştırılması metotları uyumlu olup; kloroform metanol ekstraksiyonunda standart sapma yüksektir. İspanaktaki yağ ve şeker içerikleri sadece ilk ıspanak için incelenmiş ve yeterince küçük olduğu belirlenmiştir.

1 numaralı ıspanak örneğinin makro bileşenleri

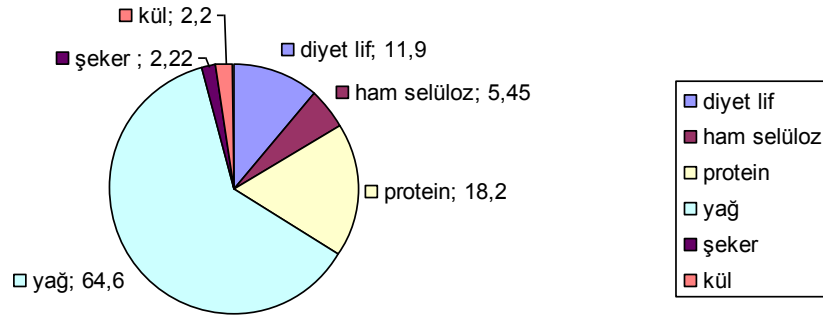


1 numaralı un örneğinin makro bileşenleri



Şekil 5.1. İspanak, un ve fındık matrislerinde kuru bazdaki makro bileşenler

1 numaralı fındık örneğinin makro bileşenleri



Şekil 5.1. Ispanak, un ve fındık matrislerinde kuru bazdaki makro bileşenler (devam)

Örneklerdeki metal içeriklerinin belirlenmesi için mikrodalga yöntemi ile standart olarak uygulanan örnek hazırlama işlemleri sonrası AAS ile mangan ve bakır analizleri yapılmıştır. Metodun validasyonuna ait parametreler kalibrasyon eğrileri, belirleme ve nicel tayin limitleri, yüzde geri kazanım ve standart referans malzemeler kullanılarak incelenmiştir. Standart referans malzeme varlığında validasyon çalışmaları açısından yüzde geri kazanım çalışmaları yapılmasına gerek olmasa da hem fındık için standart referans malzeme olmadığından hem de geri kazanım çalışmaları ilgili metallerin diğer matris bileşenleri ile etkileşimini göstereceğinden önem arz edecektir. Örneğin; matrislerde Mn ve Cu için % 100' den düşük veya bazı hallerde de büyük yüzde geri kazanım görülmesi (ICP-MS sonuçları için bkz. Çizelge 4.5.1.1 ve AAS sonuçları için bkz. Çizelge 4.4.5.1) muhtemel girişim etkileri ile açıklanabilir. Ispanak sertifikalı referans malzemesinde de düşük doğruluk görülmesi ($66,7 \pm 1,7$ değeri, bkz. Çizelge 4.4.4.1) örnek hazırlamada tam parçalanmama veya partiküle türlerin oluşmasına (örneğin kalsiyum fosfat gibi suda çözünmeyen türler) dayandırılabilir. Standart sapmanın küçük olması ikinci olasılığı azaltmaktadır. Bu etkinin her üç ıspanak matrisinde de aynı olmaması ise matrisin yapısındaki değişikliklere veya örneğin analiz için parçalanması işleminin yeterli olmamasına bağlanabilir.

Sonuç olarak validasyon çalışmaları kalibrasyon metodunun seçimi açısından da önem arz eder ve bu anlamdaki hataların giderilmesinde önemlidir. Sulu standartlar ile çalışmak matris etkisinin yok olduğunun kabullenilmesi veya gerçekten bu etkinin

gözlenmesi ile gerçekleştirilebilecekken; matriks etkisi varlığında standart katma metodu ile çalışmak daha doğru olacaktır. Yine bu metotta da bileşenin hangi kimyasal formda olduğu da önem arz eder. Hangi kalibrasyon metodunun kullanılacağı her iki kalibrasyon yönteminin eğim değerlerinden çıkarılabilmektedir. Eğer doğru değeri bilinen standartlar varsa bunlardan elde edilen sonuçlar ile ölçü metodunun sonuçları karşılaştırılarak sistematik hata varsa belirlenebilir (Skoog ve ark. 1998b).

ICP-MS ve AAS sonuçlarına t-testi uygulanmıştır (Hadjiioannou ve ark. 1988). Elde edilen veriler şu şekildedir: Ispanak matriksi için $t_{\text{deneysel}} = 3,164 < t_{\text{kuramsal}} = 4,303$; un matriksi için $t_{\text{deneysel}} = 1,227 < t_{\text{kuramsal}} = 4,303$; fındık matriksi için $t_{\text{deneysel}} = 1,356 < t_{\text{kuramsal}} = 4,303$ olup; % 95 güven seviyesinde iki metot birbiri ile istatistiksel açıdan uyumludur; bununla birlikte iki fındık örneği için ancak % 99 güven seviyesinde uyum gözlenmiştir. Benzer şekilde Cu için de birer örnekle test uygulandığında uyumlu sonuçlar gözlenmiştir. Mikrodalga parçalamada kullanılan reaktif miktarları açık sisteme uyarlandığında ve iki yöntem karşılaştırıldığında üç matriks için de %95 güven seviyesinde Mn açısından uyumlu sonuçlar bulunmuştur. Mikrodalga parçalama-ICP-MS analizi sonrası bulunan Mn değerleri, optimum şartlar-ICP-MS analizi sonucu bulunan Mn değerleri ile % 95 güven aralığında uyumludur. Sadece iki fındık örneğinde % 95 güven aralığına uyumsuzluk belirlenmiştir (% 99 seviyesinde ancak uyum gözlenebilmiştir). Bakır örnekleri için optimum koşullar sadece bir fındık örneği için % 95 güven seviyesinde uyumlu değildir. Referans standart malzemelerin sertifika değeri ile bulunan değerlerin kıyaslanmasında da % 95 güven seviyesinde her iki element için de çoğunlukla uyumlu olduğu belirlenmiştir. Tez çalışmamızda ilave bir validasyon parametresi olarak metal analizleri AAS ile de karşılaştırıldığı gibi; ayrıca mikrodalga parçalamaya alternatif olarak yaklaşık 0,1 N nitrik asitte doğrudan parçalanma ya da açık sistem yaş yakma işlemleri de incelenmiş ve karşılaştırılmıştır. bkz. Çizelge 4.5.5.1 ve Çizelge 4.5.3.1.1 karşılaştırıldığında optimum koşullarda, ıspanak örnekleri için % 91–94 arası, un örnekleri için % 20–78 aralığında fındık örnekleri için ise % 66–89 aralığında metalin serbest kaldığı ve yaklaşık 0,1 N nitrik asitte çözüldüğü belirlenmiştir. İkinci olarak mikrodalga parçalama işlemini takiben ICP-MS analizi temel alınarak nitrik asite geçen miktarlar belirlenirse bu oran ıspanak için % 80–92, un örnekleri için % 18–74 ve fındık örnekleri için % 46–58 olup; daha

düşük düzeyde serbest kalma yüzdesi gözlenmiştir. Bu durumda optimum şartların başarı ile uygulanabileceği ve açık sistemde ultrasonik banyoda gerçekleştirilen ekstraksiyonun da etkili olduğu görülmektedir.

Bkz. Çizelge 4.5.6.1' de matrikslerde yağın uzaklaştırılmasından sonra kuru kısımda kalan metal miktarları incelendiğinde ve bkz. Çizelge 4.5.3.1.1'deki optimum değerler ile kıyaslandığında; toplam mangan ve bakır içeriğinin ıspanak için % 40' a yakın oranda kuru kısımda kaldığı, diğer matriksler için ise daha büyük oranda (%50' den büyük) kuru kısımda kaldığı belirlenmiştir. Bakır için bu oranın ıspanak matriksinde yine yaklaşık olarak %40 civarında olduğu; diğer matrikslerde yaklaşık %100 olduğu belirlenmiştir. Bu oran da yağlı kısma geçişin pratikçe olmadığını göstermiştir. Bu durumda kuru kısımda kalabilecek fraksiyonlar düşünüldüğünde ilgili elementlerin protein yapılarına bağlı olduğu öngörülebilir.

Unda suya geçiş ıspanağa göre yaklaşık dörtte bir oranındadır. Bununla birlikte yağ temel bileşeni açısından sekiz kat daha fazla olmasına rağmen ıspanakta kloroform:metanol ekstraktına geçen metal miktarı undan onlarca kat daha fazladır. Bu durum temel bileşen sonucununun daha önce de belirttiğimiz gibi ilk basamak olarak sadece belirli öngörüler yapmada geçerli olabileceğini, her zaman doğrusal bir korelasyon olmayabileceğini göstermektedir. Dolayısı ile örneğin yağ miktarı az ise bu yapılara bağlı metal miktarı da azdır sonucuna ulaşamayacaktır. Bununla birlikte unda beş kat fazla protein olması asetona geçen miktarının azlığı ile uyumludur. Daha önce de belirtildiği gibi aseton protein çöktürülmesi amacı ile kullanılabilir. Bu durumda yapının aseton ile çökmüş olma ihtimali fazladır. Yine bu durum da daha önce belirtilen kuru kısım analizlerini doğrulamaktadır. Zira orada da un matriksi için ilgili elementlerin yaklaşık tamamının kuru kısımda kaldığı belirtilmiştir. Unda kloroform metanol (2:1, v/v) ve (1:2, v/v) analizleri sonucu arada fark bulunamamıştır. Bu durum daha önce de belirtildiği gibi literatür kaynakları ile uyumludur. ıspanakta bu çözügene geçen metal miktarının fazla olması sonucu, glikolipid fraksiyonlarına bağlı olma olasılığının fazla olduğu öngörülebilir. ıspanakta % 40 dışında kalan kısmın yağa geçtiği de daha önceki kuru kısım analizlerinde belirtilmiştir. Sonuç, bunu da doğrulayıcı niteliktedir. ıspanakta klorofil yapısından dolayı kloroforma geçen metal

düzeyleri fazla olabilir. Bu da manganın fotosentezdeki rolünü göstermesi açısından önemli olabilir. Bakır analizlerinden elde edilen sonuçlar da fraksiyonlara geçen düzeyler açısından mangana benzemektedir. Ancak suda çözünen formlar ıspanak-un karşılaştırması yapıldığında; hem su hem aseton açısından ilgili fraksiyona geçen bakır düzeyleri en az 20 kat fazla olup bu durumda bakırın da proteinlerle ilişkili olduğu sonucuna ulaşılabilir. Örneğin un matriksi için asetona geçen mangan ve bakır düzeyleri irdelendiğinde; belirli bir elementin daha çok protein ile ilişkili olduğu sonucuna ulaşamamaktadır. Fındıkta yağ miktarı yaklaşık % 60 düzeyinde ve bu düzeyden de fazla olmasına rağmen dietil etere geçen mangan ve bakır miktarının az olması bu matrikste de Mn ve Cu elementlerinin büyük oranda proteine bağlılığı ile ilişkilendirilebilir. Nitrik asit derişimi yaklaşık 2 N' e artırıldığında mangan ve bakırın serbest kalma oranı açısından 0,1 N nitrik asite göre belirgin bir değişiklik görülmemiştir. Bu da fraksiyonlama çalışmalarında kalıntının çözülmesinde 0,1 N nitrik asit derişiminin yeterli olacağını ve serbest kalan metal miktarının nitrik asit derişimi arttığında değişmeyeceğini göstermektedir. Fındıktaki mangan içeriği ıspanağın yaklaşık iki katı olmasına rağmen biyoyararlılık açısından ıspanak ve fındık, mangan kapsamında aynı düzeydedir. Bakırın biyoyararlılığı ise ıspanakta en fazla; fındıkta ise en az düzeydedir. Aktik karbon ekstraksiyonu çöken veya aromatik yapıda olan türler ile ilişkili olup, Mn açısından her üç matriks de hemen hemen aynı özellik gösterirken; Cu açısından aktik karbon adsorpsiyonu un ve fındık için uygun değilken; ıspanak için % 70 düzeyleri ile oldukça uygundur. *n*-oktanol çalışmaları her üç matriks için de biyoyararlılığı belirtmede yetersiz kalmaktadır. *n*-oktanolde ekstraksiyon veriminin pH' a bağlı olması ve oktanolün yüksüz türleri alabilmesi sebebi ile sınırlılık görülmektedir. Ayrıca matriks etkileşiminin olduğu yapılan çalışmalar ile yüzde geri kazanım anlamında doğrulanmıştır. Yine de unda ve ıspanakta Cu için *n*-oktanol sonuçları Mn' a göre daha iyi olup bu da bakırın yüksüz ve bağlı olduğunu gösteren diğer bir delildir. Biyoyararlılık çalışmalarından elde edilen sonuçlar ise; mide ve bağırsak şartlarının simülasyonu derecesinde belirlenebilmiştir. Suyu geçen düzeyler biyoyararlılık açısından ilişkilendirildiğinde; matriksler açısından suya geçiş az olup elementin biyoyararlılığı fazla da olabilmektedir. Buradan metalin suda çözünmesinin gerekli; fakat tek başına biyoyararlılık ile ilişkilendirmede yeterli olmadığı sonucuna ulaşılabilir. ICP-MS çalışmalarının doğruluğunu gösteren validasyon çalışmaları da bkz. Çizelge

4.5.9.1 ve Çizelge 4.5.9.5 arasında verilmiştir. Katyon değiştirici kartuş kolonlar ile kesikli olarak matriks ayırma amaçlı olarak yapılan analizler sonucu matrikslerden katyonik formda Mn' in çok düşük düzeyde elüe edilebildiği belirlenebilmiştir. Atığa geçen element fraksiyonu ICP-MS ile değerlendirilse de bu oran çok fazla artmamış olup; ıspanak matriksi için %3–6 arasında, un matriksi için %1–1,5 arasında ve fındık matriksi için de %2–21 arasında değişmektedir. Ispanak için atığa geçen miktar da değerlendirildiğinde yüzde geri kazanımda ancak % 8 e kadar artış olabilmektedir. Bu durumda, matriksin zayıf baz özelliği gösterip kolondan elüe edilebilecek katyonik formları dışındaki yapısının daha fazla olduğu ve bu nedenle de kolonda tutulduğu değerlendirmesine ulaşılmıştır. Üretici firmanın şartlandırma-elüsyon için önerdiği çözenler (Anonim 2010) elüsyon bazında ICP-MS'e uyarlanmaya çalışılmıştır. Buradaki değişiklik elüsyonda metanolik amonyum hidroksit kullanımı yerine suda ve yüzdesi daha az olan amonyaklı elüsyon çözeni kullanılmasıdır. Bu durum, ICP-MS' te azot yüzdesi artırılmayarak girişimlerin de bunun doğal sonucu olarak artırılmamasına göre ayarlanmıştır. Deneysel sonuçlar açısından ikinci bir olasılık da bu elüsyonun yetersiz olabileceğidir. Birinci fındık örneğinde katı faz ekstraksiyonunda yüzde geri kazanımın yüksek olmasına; matrikste muhtemel mikroorganizma faaliyetlerinin elementel yapının bağlı olduğu makromoleküler yapıyı parçalaması şeklinde öngörü getirilebilir. Zira bu fındık örneği matriksinde ekstraksiyon öncesi gözle görülür düzeyde küf oluşumu saptanmıştır.

HPLC-ICP-MS sonuçlarına bakılacak olursa ilk yapılan işlem bu çalışmalar için kullanılan aparatların optimizasyonu; yani uygun püskürtme haznesi ve sisleştirici belirlenmesi olmuştur. Sisleştirici, sisleştirici gaz akış hızı ve püskürtme haznesi parçaları standart olarak verilmiştir (bkz. Çizelge 3.2.7.1.1). Ancak bu kısımlar sulu veya seyreltik nitrik asitli ortamda çalışmaya uygundur ve doğrudan organik çözen ile çalışılmak isteniyorsa bu parçaların değiştirilmesi gerekmektedir. Sadece bu değişim de yeterli olmamaktadır; aynı zamanda organik çözen iletim kiti de kullanılmalıdır. Bu kit, belirli sıcaklık koşullarında organik çözgenin ikincil bir gaz yardımı ile (oksijen) doğrudan sisteme verilmesi ve organik içeriğin bu ikincil gaz ile parçalanmasının artırılmasını sağlar. Bu kit, içinde, standart olarak siklonik püskürtme haznesi de barındırmakta; üzerine meinhard ya da düşük akış sisleştiriciler sonradan

takılabilmektedir. Literatürde ortama inert veya reaktif gazın verildiği çarpışma veya reaksiyon modlarında ICP-MS cihazları mevcuttur. Sistemimize ise ESI peltier soğutmalı siklonik püskürtme haznesi aksesuarı takılarak organik çözümler ile doğrudan çalışma imkanı incelenmiştir. ICP-MS plazma kararlılığı metanol ile sağlanmakta olup; diğer çözümlerde bu kararlılığın olmadığı görülmüştür. Diğer çözümler ile yapılan denemelerde tüm örnek ve standartlara eklenen iç standart okumaları tutarsızdır veya plazma kararlı yanmamakta ya da sık sık sönmektedir. Bu nedenle sadece metanollü örneklerde sonuç alınabildiği görülmüştür. Türleştirme çalışmalarında siklonik püskürtme haznesi kullanımı daha çok tercih edilebilir. Çünkü ilgili aparatın yüksek taşıma hızı, etkin yıkama gibi avantajlar sunduğu bilinmektedir. Organik çözümler çalışmalarında standart ryton karşı akış yerine düşük akış veya meinhard sisleştirici de kullanılabilir. Düşük belirleme limitlerine ulaşmak açısından meinhard sisleştirici daha uygun görülmüştür. (İlgili parametre Mn(II) sinyal okuma değeridir. HPLC-ICP-MS tekniğinde 1 mg L^{-1} Mn (II) çözeltisi için ICP-MS'de düşük akış sisleştiricide ve ilk çalışmalarda şiddet değeri 900 000 iken meinhard sisleştiricide bu değer 1 900 000 olarak belirlenmiştir. Denemelerde siklonik püskürtme haznesi aparatı sabit tutulmuştur.

Ispanak, un, fındık ve yağmur suyu matrikslerinde Mn için $\mu\text{g L}^{-1}$ düzeyinde, bakır için mg L^{-1} düzeyinde standartlar, scott-ryton karşı akış kombinasyonu ile yüksek sinyal şiddetinde görülebilmüş olup bu birleşim örnek analizlerinde kullanım kolaylığı açısından sonraki tüm çalışmalarda kullanılmıştır. Türleştirme çalışmalarında meinhard sisleştirici ve siklonik püskürtme haznesi kullanımı tercih edilse de meinhard sisleştiricinin yapısı itibari ile tıkanmalar her ihtimalde daha fazla olabilecek ve daha uzun süreli sistem yıkamalarını gerektirebilecektir. Çalışmalarımızda da görüldüğü üzere meinhard nebulizer tıkanmalara daha açık olduğundan duyarlılığı Mn için yeterli gelen scott aparatının kullanılmasına karar verilmiştir. Organik çözümler ile yapılan çalışmalar ise sinyal kararlılığı ve tekrarlanabilir sonuçlar açısından daha zor olup organik çözümler iletim aparatının yine de metanol ile çalışmaya uygun olduğu ve bu fraksiyonlarda doğrudan metal analizleri de yapılabilmesine imkan sağlayacağı belirlenmiştir.

HPLC-ICP-MS analizleri ile yüklü ve bağı Mn/Cu türleri ile serbest ve yüklü Mn/Cu türlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Kolondan hızlıca çıkabilecek bileşenler serbest Mn/Cu veya yüklü ve bağı Mn/Cu bileşenleri olabilecektir. Standart çözeltiler ile alan ve yüksekliğe göre kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Gerek kesiksiz analizde ICP-MS tarafında belirlenebilirlik açısından numunenin derişik verilme zorunluluğu; gerekse teknikler arası bağlantıdan kaynaklanan gecikmelere dayandırılabilcek olan pik genişlikleri nedeni ile alana göre değil yüksekliğe göre olan kalibrasyon eğrileri grafikleri değerlendirilmiş ve matrikslerde ıspanak için % 51,8, un için % 60,6 ve findık için % 6,6 oranında serbest veya moleküler yapıda ayrıca yüklü mangan belirlenirken; findıkta buna ilaveten % 5,2 oranında bağı fakat yüklü mangan türü de öngörölmüştür. Cu sonuçlarında tekrarlanabilirlik sağlanamamış olup; genellikle nicel tayin limitinden düşük olmakla birlikte; bazen toplam metal miktarından çok daha yüksek sonuçlar da gözlenebilmiştir. Kalibrasyon eğrisi çalışmalarında optimizasyon yapıldığı ve düşük belirleme limitleri elde edildiğinde; en iyi ihtimal ile ıspanak, un ve findık matriksleri için sırası ile % 10,47, % 4,46 ve % 0,34 serbest veya moleküler yapıda ayrıca yüklü ⁶³Cu düzeyleri belirlenmiş olup; bunlar da ilgili elementin daha çok bağı formda olduğunu göstermektedir. Ancak bakır analizlerinde tekrar elde edilebilirlik sağlanamadığından matrikslerdeki bakırın HPLC-ICP-MS tekniği ile analizinde en çok tekrar elde edilebilirlik düzeyine ve bu şartlardaki kalibrasyon eğrilerine dayanılarak nicel tayin limitinden daha düşük düzeyde bakır olduğu şeklinde değerlendirilmeye varılmıştır. Sistemde yüklü ve serbest türler belirlenebileceğinden, numunedeki toplam metal derişimi kesiksiz sistem analizinde önemli olduğundan ve bakır için fraksiyonlama çalışmalarından da büyük ölçüde bağı formlar öngöröldüğünden bu beklenen bir sonuç olabilecektir. Bakırın hem çok düşük hem de matriks içeriğinden de büyük belirlenmesinin; örneğin alkali metal girişimi gibi girişim etkileri nedeni ile ya da kolon ile etkileşen bağı bakır türlerinin fazlalığından olabileceği öngörülebilir. Bu durumda analizler arası daha etkin yıkama ve kolondan desorpsiyonu sağlayacak metodolojik yaklaşımlar uygulanmalıdır. Yağmur sularında da bakır için yukarıda anlatılan durumun aynısı söz konusudur. Yağmur suyunda mangan düzeyleri ise belirleme limitinin altındadır. Toplam element düzeyine göre de bu beklenen bir sonuçtur. Yine de fraksiyonlama çalışmalarındaki kolloidal, çözünmüş, partiküle mangan gibi tanımlamalar bağı yapıların önerilebilmesine ışık tutacaktır.

Bakır için tekrar elde edilebilirliğin olmaması, aynı matriks ve aynı örnek için dahi hem toplam düzeyden daha az hem de daha çok serbest/yüklü bakır düzeyinin gözlenebilmesi nedeni ile bu element için ön deriştirme basamağı da uygulanmamıştır. Katı faz ekstraksiyonu ise uygun düzeyde sonuçlar vermediğinden özellikle yağmur suyu örnekleri için Mn açısından deriştirme söz konusu olamamıştır. Mangan için ıspanak, un ve fındık matrikslerinden elde edilen HPLC-ICP-MS sonuçları, seçiciliği sınırlı olsa da aseton ile çöktürülen fraksiyonlarda glikoproteinlere bağlı olabileceği belirlenmiş mangan düzeyleri ile uyumlu olup standart sapmalar dahilinde yaklaşık bütünü (toplam element düzeyini) karakterize etmektedir.

Yukarıda açıklanan pik genişlemesine neden olabilecek üçüncü olasılık girişimler olabilecektir. Literatürde arsenik çalışmalarında bu yönde açıklamalar da görülmüştür (Akter ve ark. 2005). Yine literatürde sütte yapılan çalışmalarda Chelex 100 ve AG-1 X-8 dolgu maddeleri ile çalışıldığında bakırın katyonik formda veya bağlı olduğu, enzim ve protein yapılarında olduğu; ayrıca protein yapılarında daha çok bulunduğu belirtilmiştir. Katyonik tür dışında nötral veya anyonik türler de olabilmektedir (Abollino ve ark. 1998). Kısaca; matriks etkisi fazla olsa da bağlı yapıların aydınlatılmasına yönelik çalışmalarda literatür ile uyumlu öngörüler de ortaya konmaya çalışılmıştır.

Sonuç olarak; fraksiyonlama çalışmalarının, çalışılan örneklerin yapılarının ve bu yapılardaki taşınım olaylarının anlaşılmasında kilit basamak olacağı; ayrıca biyoyararlılık çalışmalarının değerlendirilmesinde de yararlı olabileceği görülmüştür. Bununla birlikte fraksiyonlama basamaklarının seçimi de matriks bileşenlerinin dağılımları ile ilişkili olacaktır. Türlendirme çalışmalarına geçilebilmesi için de bu dağılımlar önem gösterecektir. Türlendirme çalışmalarında metale bağlı yapıların genel anlamda kararlılıkları ve inert olup olmamaları önemlidir. HPLC-ICP-MS tekniğinin kullanılabilirliği açısından bakıldığında mobil faz yapısının getirdiği sınırlayıcı etkiler yanında; örnekte bulunan bileşenlerin tayinlerinde seyrelme problemleri nedeni ile zorluklar yaşanabilmektedir. Bu açıdan bakıldığında, sisleştirme düzeneklerinde ve taşınım yolunda optimizasyonlar yapılarak özellikle duyarlılık açısından bir takım iyileştirmeler gerçekleştirilse de plazma şartlarına eklenen mobil fazın girişim

etkilerinden ve plazma şartlarının değişiminden kurtulmak için yine ilave iyileştirmeler gerekmektedir. Ayrıca seçilen mangan ve bakır elementleri türlendirme çalışmalarıdan, bitkilerdeki stres çalışmalarının aydınlatılması ile uygun ligandların saptanması sonucu geliştirilecek metotlar ile de daha başarılı sonuçlar alınabileceği söylenebilir.

KAYNAKLAR

- Abbasi, S., Khani, H., Tabaraki, R. 2010.** Determination of ultra trace levels of copper in food samples by a highly sensitive adsorptive stripping voltammetric method. *Food Chemistry*, 123: 507–512.
- Abollino, O., Aceto, M., Bruzzoniti, M.C., Mentasti, E., Sarzanini, C. 1998.** Speciation of copper and manganese in milk by solid-phase extraction/inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 375: 299–306.
- Açkurt, F., Özdemir, M., Biringen, G., Löker, M. 1999.** Effects of geographical origin and variety on vitamin and mineral composition of hazelnut (*Corylus avellana L.*) varieties cultivated in Turkey. *Food Chemistry*, 65: 309–313.
- Akter, K.F., Chen, Z., Smith, L., Davey, D., Naidu, R. 2005.** Speciation of arsenic in ground water samples: A comparative study of CE-UV, HG-AAS and LC-ICP-MS. *Talanta*, 68: 406–415.
- Akoh, C.C., Min, D.B. 2002.** Food Lipids, Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, Second Edition. Marcel Dekker, USA, 1005 pp.
- Akoh, C.C., Min, D.B. 2008.** Food Lipids, Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, Third Edition. CRC Press, USA, 928 pp.
- Alasalvar, C., Amaral, J.S., Satır, G., Shahidi, F. 2009.** Lipid characteristics and essential minerals of native Turkish hazelnut varieties (*Corylus avellana L.*). *Food Chemistry*, 113: 919–925.
- Alava, P., Du Laing G., Odhiambo, M., Verliefde, A., Tack, F., Van De Wiele, T.R. 2013.** Arsenic bioaccessibility upon gastrointestinal digestion is highly determined by its speciation and lipid-bile salt interactions. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 48: 656–665.
- Alvarez-Llamas, G., Fernández de la Campa, M.R., Sanz-Medel, A. 2005.** ICP-MS for specific detection in capillary electrophoresis. *Trends in Analytical Chemistry*, 24 (1): 28–36.
- Amais, R.S., Donati, G.L., Nóbrega, J.A. 2011.** Application of the interference standard method for the determination of sulfur, manganese and iron in foods by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 706: 223–228.
- Anonim 2002a.** Yem maddeleri ve karma yemlerin bileşiminin kontrol edilmesinde kullanılan analiz metotları. [http://www.tarim.gov.tr/GKGM_Belgeler/Gıda ve Yem Hizmetleri/Konular/yem_hizmetleri/analiz_metotlari.doc](http://www.tarim.gov.tr/GKGM_Belgeler/Gıda_ve_Yem_Hizmetleri/Konular/yem_hizmetleri/analiz_metotlari.doc)-(Erişim tarihi: 01.06.2013)
- Anonim 2002b.** Türk Gıda Kodeksi, İnsan Tüketimine Sunulan Şekerlerin Analiz Yöntemleri Tebliği. http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/mev/mev_tibl/tebl_temel_saglik/insan_tuketimine_sunulan.pdf-(Erişim tarihi:12.04.2013).

Anonim 2004a. Guide to inorganic Analysis (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, USA), 2004, USA.

Anonim 2004b. The 30-Minute Guide to ICP-MS (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, USA), 2004, USA.

Anonim 2010. Agilent SampliQ Products for Sample Preparation (Agilent Technologies, Inc., USA). <http://www.chem.agilent.com/Library/brochures/5989-9334EN.pdf>-(Erişim tarihi: 03.06.2013)

Anonim, 2012a. Tools for elemental speciation analysis, (© 2003 - 2010 by European Virtual Institute for Speciation Analysis (EVISA), last time updated: December 13, 2012) <http://www.speciation.net/Public/Document/2003/09/11/503.html>-(Erişim tarihi: 05.06.2013),

Anonim 2012b. Gıdalarda şeker analizi. 2012. <http://gidatayinleri.files.wordpress.com/2012/02/gidalarda-seker-analizi.pdf>-(Erişim tarihi: 12.04.2013)

Arias-Borrego, A., Garcia-Barrera, T., Gomez-Ariza, JL. 2008. Speciation of manganese binding to biomolecules in pine nuts (*Pinus pinea*) by two-dimensional liquid chromatography coupled to ultraviolet and inductively coupled plasma mass spectrometry detectors followed by identification by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, 22: 3053–3060.

Araujo, R.G.O., Dias, F.D.S., Macedo, S.M., dos Santos, W. N.L., Ferreira, S.L.C. 2007. Method development for the determination of manganese in wheat flour by slurry sampling flame atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, 101: 397–400.

Araujo, G.S., Matos, L.J.B.L., Fernandes, J.O., Cartaxo, S.J.M., Gonçaves, L.R.B., Fernandes, F.A.N., Farias, W.R.L. 2013. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospecction of the optimal extraction method. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20: 95–98.

Awai, K., Kakimoto, T., Awai, C., Kaneko, T., Nakamura, Y., Takamiya, K., Wada, H., Ohta, H. 2006. Comparative genomic analysis revealed a gene for monoglucosyldiacylglycerol synthase, an enzyme for photosynthetic membrane lipid synthesis in Cyanobacteria. *Plant Physiology*, 141: 1120–1127.

Baez, A., Belmont, R., García, R., Padilla, H., Torres, M.C. 2007. Chemical composition of rainwater collected at a southwest site of Mexico City, Mexico. *Atmospheric Research*, 86: 61–75.

Batista, B.L., Rodrigues, J.L., de Souza, S.S., Souza, V.C.O., Barbosa Jr., F. 2011. Mercury speciation in seafood samples by LC–ICP-MS with a rapid ultrasound-assisted extraction procedure: Application to the determination of mercury in Brazilian seafood samples. *Food Chemistry*, 126: 2000–2004.

Bergman, M., Varshavsky, L., Gottlieb, H.E., Grossman, S. 2001. The antioxidant activity of aqueous spinach extract: chemical identification of active fractions. *Phytochemistry*, 58: 143–152.

Bernhard, M., Brinckman, F.E., Sadler, P.J. 1986. Importance and Determination of Chemical Species in Biological Systems: The importance of chemical “speciation” in environmental processes, Dahlem Konferenzen-Workshop Reports, Ed.: Bernhard, S., Springer-Verlag, Germany, p.18.

Bhandari S.A., Amarasiriwardena, D. 2000. Closed-vessel microwave acid digestion of commercial maple syrup for the determination of lead and seven other trace elements by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 64: 73–84.

Bidlingmeyer, B.A. 1992. Practical HPLC Methodology and Applications. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA, 452 pp.

Bonfils, F., Ehabe, E. E., Aymard, C., Vaysse, L., Sainte-Beuve, J. 2007. Enhanced solvent extraction of polar lipids associated with rubber particles from *Hevea brasiliensis*. *Phytochem. Anal.*, 18, 103–108.

Boojar, M.M.A, Goodarzi, F. 2008. Comparative evaluation of oxidative stress status and manganese availability in plants growing on manganese mine. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71: 692–699.

Brereton, R.G. 2007. Applied Chemometrics for Scientists. John Wiley & Sons Inc, USA, 396 pp.

Broekaert, J.A.C., Gücer, S., Adams, F. 1990. Metal Speciation in the Environment. Springer-Verlag, Berlin, 645 pp.

Burczak, J. D., Soltysiak, R.M., Sweeley, C.C. 1984. Regulation of membrane-bound enzymes of glycosphingolipid biosynthesis. *Journal of Lipid Research*, 25: 1541–1547.

Burguera, J.L., Burguera, M. 2009. Recent on-line processing procedures for biological samples for determination of trace elements by atomic spectrometric methods. *Spectrochimica Acta Part B*, 64: 451–458.

Buszewski, B., Szultka, M. 2012. Past, present, and future of solid phase extraction: A review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42: 198–213.

Cabanero, A.I., Madrid, Y., Camara, C. 2004. Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro digestion method. *Analytica Chimica Acta*, 526: 51–61.

Caldwell, C.R. 2002. Effect of elevated copper on phenolic compounds of spinach leaf tissues. *Journal of Plant Nutrition*, 25(6): 1225–1237.

Chun, I.K., Lee, K.M., Lee, K.E., Gwak, H.S. 2012. Effects of bile salts on gastrointestinal absorption of Pravastatin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101 (7): 2281–2287.

Ciceri, E., Recchia, S., Dossi, C., Yang, L., Sturgeon, R.E. 2008. Validation of an isotope dilution, ICP-MS method based on internal mass bias correction for the determination of trace concentrations of Hg in sediment cores. *Talanta*, 74: 642–647.

Citak, D., Tuzen, M., Soylak, M. 2010. Speciation of Mn(II), Mn(VII) and total manganese in water and food samples by coprecipitation–atomic absorption spectrometry combination. *Journal of Hazardous Materials*, 173: 773–777.

Cobzac, S. C., Gocan, S. 2011. Sample preparation for high performance liquid chromatography: recent progress. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 34: 1157–1267

Contini, M., Baccelloni, S., Massantini, R., Anelli, G. 2008. Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana L.*) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. *Food Chemistry*, 110: 659–669.

Corley, J. 2003. Best Practices in Establishing Detection and Quantification Limits for Pesticide Residues in Foods: Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals, Volume 1, Ed.: Lee, P.W., Aizawa, H., Barefoot, A.C., Murphy, J.J., John Wiley & Sons Ltd., UK, pp 59-75.

Crews, H.M. 1998. Speciation of trace elements in foods, with special reference to cadmium and selenium: is it necessary?. *Spectrochimica Acta Part B*, 53: 213–219.

Chrastny, V., Komarek, M. 2009. Copper determination using ICP-MS with hexapole collision cell. *Chemical Papers*, 63 (5): 512–519.

Delgado, T., Malheiro, R., Pereira, J.A., Ramalhosa, E. 2010. Hazelnut (*Corylus avellana L.*) kernels as a source of antioxidants and their potential in relation to other nuts. *Industrial Crops and Products*, 32: 621–626.

Demir, M. 1986. Toprak örneklerinde bazı eser elementlerin (Bi, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn) atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile tayinlerinde halka tekniğinin yeri. *Doktora Tezi*, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Malatya.

Demirel, S., Tuzen, M., Saracoglu, S., Soylak, M. 2008. Evaluation of various digestion procedures for trace element contents of some food materials. *Journal of Hazardous Materials*, 152: 1020–1026.

de Oliveira E. 2003. Sample preparation for atomic spectroscopy: Evolution and Future Trends. *J. Braz. Chem. Soc.*, 14 (2): 174-182.

de Romana, D.L., Olivares, M., Uauy, R., Araya, M. 2011. Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 25: 3–13.

Deutsch, F., Hoffmann, P., Ortner, H.M. 1997. Analytical characterization of manganese in rainwater and snow samples. *Fresenius J Anal Chem*, 357: 105–111.

D'Ilio, S., Violante, N., Caimi, S., Di Gregorio, M., Petrucci, F., Senofonte, O. 2006. Determination of trace elements in serum by dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry Developing of a method with a desolvating system nebulizer. *Analytica Chimica Acta*, 573–574: 432–438.

Dolan, S.P., Capar, S.G. 2002. Multi-element analysis of food by microwave digestion and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15: 593–615.

Dominguez-Gonzalez, R., Romaris-Hortas, V., Garcia-Sartal, C., Moreda-Pineiro, A., Barciela-Alonso, M.D.J. Bermejo-Barrera, P. 2010. Evaluation of an in vitro method to estimate trace elements bioavailability in edible seaweeds. *Talanta*, 82: 1668–1673.

Dou, C., Fu, X., Chen, X., Shi, J., Chen, Y. 2009. Accumulation and interaction of calcium and manganese in *Phytolacca americana*. *Plant Science*, 177: 601–606.

Dressler, V.L., Antes, F.G., Moreira, C.M., Pozebon, D., Duarte, F.A. 2011. As, Hg, I, Sb, Se and Sn speciation in body fluids and biological tissues using hyphenated-ICP-MS techniques: A review. *International Journal of Mass Spectrometry*, 307: 149–162.

Dugo, G., Pera, L.L., Turco, V.L., Palmieri, R.M., Saitta, M. 2005. Effect of boiling and peeling on manganese content of some vegetables determined by derivative anodic stripping chronopotentiometry (dASCP). *Food Chemistry*, 93: 703–711.

Dundar, M.S., Altundag, H. 2004. Selenium content of Turkish hazelnut varieties: Kara Fındık, Tombul and Delisava. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17: 707–712.

Durukan, İ., Şahin, Ç.A., Şatıroğlu, N., Bektaş, S. 2011. Determination of iron and copper in food samples by flow injection cloud point extraction flame atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal*, 99: 159–163.

Eller, F.J., King, J.W. 1996. Determination of fat content in foods by analytical SFE. *Seminars in Food Analysis*, 1: 145–162.

Emek, S. C., Åkerlund, H. E., Clausén, M., Ohlsson, L., Weström, B., Erlanson-Albertsson, C., Albertsson, P. A. 2011. Pigments protect the light harvesting proteins of chloroplast thylakoid membranes against digestion by gastrointestinal proteases. *Food Hydrocolloids*, 25: 1618–1626.

Erdemir, U.S., Izgi, B., Gucer, S. 2013. An alternative method for screening of Sudan dyes in red paprika paste by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Methods*, 5 (7): 1790–1798.

Fen-Ying, Z., Shun-Xing, L., Lu-Xiu, L. 2007. Assessment of bioavailability and risk of iron in phytomedicines *Aconitum carmichaeli* and *Paeonia lactiflora*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21: 77–83.

Ferraz, T.P.L., Fiuza, M.C., dos Santos, M.L.A., Pontes de Carvalho, L., Soares, N.M. 2004. Comparison of six methods for the extraction of lipids from serum in terms of effectiveness and protein preservation. *J.Biochem. Biophys. Methods*, 58: 187–193.

Fialho, L.L., Pereira, C.D., Nóbrega, J.A. 2011. Combination of cool plasma and collision-reaction interface for correction of polyatomic interferences on copper signals in inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 66: 389–393.

Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226 (1): 497–509.

Goesaert, H., Brijs, K., Veraverbeke, W.S., Courtin, C.M., Gebruers, K., Delcour, J.A. 2005. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 12–30.

Gomez-Ariza, J.L., Arias-Borrego, A., Garcia-Barrera, T. 2006. Multielemental fractionation in pine nuts (*Pinus pinea*) from different geographic origins by size-exclusion chromatography with UV and inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1121: 191–199.

Gomez-Ariza, J.L., Arias-Borrego, A., Garcia-Barrera, T. 2007. Combined use of total metal content and size fractionation of metal biomolecules to determine the provenance of pine nuts (*Pinus pinea*). *Anal Bioanal Chem*, 388: 1295–1302.

Gonzalez, M., Gallego, M., Valcarcel, M. 1999. Determination of nickel, chromium and cobalt in wheat flour using slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 48: 1051–1060.

Grotti, M., Lagomarsino, C., Magi, E. 2006. Simultaneous determination of Arsenic, Selenium And Mercury in foodstuffs by chemical vapour generation inductively coupled plasma optical emission spectroscopy. *Annali di Chimica*, 96: 751–764.

Ha, Y., Tsay, O.G., Churchill, D.G. 2011. A tutorial and mini-review of the ICP-MS technique for determinations of transition metal ion and main group element concentration in the neurodegenerative and brain sciences. *Monatsh Chem*, 142: 385–398.

Hadjiioannou, T.P., Christian, G.D., Efstathiou, C.E., Nikolelis, D.P. 1988. **Mathematical calculations and statistical treatment of analytical data:** Problem

Solving in Analytical Chemistry, Ed.: Hadjiioannou, T.P., Christian, G.D., Efstathiou, C.E., Nikolelis, D.P., Pergamon Press, UK, pp:1-33.

Hoenig, M., de Kersabiec, A-M. 1996. Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: present status. *Spectrochimica Acta Part B*, 51: 1297–1307.

Hoenig, M. 2001. Preparation steps in environmental trace element analysis—facts and traps. *Talanta*, 54: 1021–1038.

Hokura, A., Oguri, S., Matsuura, H., Haraguchi, H. 2000. Multielement determination of major-to-ultratrace elements in vegetable samples by ICP-MS and ICP-AES after acid digestion. *Bunseki Kagaku*, 49(6): 387–396., <http://ci.nii.ac.jp/naid/110002905869/>-(Erişim tarihi: 04.06.2013)

Howe, P.D., Malcolm, H.M., Dobson, S. 2004. Manganese and Its Compounds: Environmental Aspects, Concise International Chemical Assessment Document Series , 63, WHO Regional Office for the Western Pacific, World Health Organization Geneva, 2004, pp. 66. http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/cicad63_rev_1.pdf-(Erişim tarihi: 12.04.2013)

Hu, J., Wu, F., Wu, S., Cao, Z., Lin, X., Wong, M.H. 2013. Bioaccessibility, dietary exposure and human risk assessment of heavy metals from market vegetables in Hong Kong revealed with an *in vitro* gastrointestinal model. *Chemosphere*, 91: 455–461.

Huang, Y., Chen, H. 2011. Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of Escherichia coli O157:H7 on baby spinach. *Food Control*, 22: 1178–1183.

Karadjova, I., Izgi, B., Gucer, S. 2002. Fractionation and speciation of Cu, Zn, and Fe in wine samples by atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 57: 581–590.

Khanam, U.K.S., Oba, S., Yanase, E., Murakami, Y. 2012. Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. *Journal of Functional Foods*, 4: 979–987.

Khouzam, R.B., Szpunar, J., Holeman, M., Lobinski, R. 2012. Trace element speciation in food: State of the art of analytical techniques and methods. *Pure Appl. Chem.*, 84 (2): 169–179.

Klein, B.P., Kuo, C.H.Y., Boyd, G. 1981. Folic acid and ascorbic acid retention in fresh raw, microwave, and conventionally cooked spinach. *Journal of Food Science*, 46 (2): 640–641.

Koplik, R., Borkova, M., Mestek, O., Kominkova, J., Suchanek, M. 2002. Application of size-exclusion chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry for fractionation of element species in seeds of legumes. *Journal of Chromatography B*, 775: 179–187.

- Koplik, R., Borkova, M., Bicanova, B., Polak, J., Mestek, O., Kominkova, J. 2006.** Speciation analysis of elements in cereal flours by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Food Chemistry*, 99: 158–167.
- Korn, M.G.A., Morte, E.S.B., dos Santos, D.C.M.B., Castro, J.T., Barbosa, J.T.P., Teixeira, A.P., Fernandes, A.P., Welz, B., dos Santos, W.P.C., dos Santos, E.B.G.N., Korn, M. 2008.** Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods—A review. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43: 67–92.
- Kot, A., Namiesnik, J. 2000.** The role of speciation in analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, 19: 69–79.
- Kowalewska, Z., Izgi, B., Saracoglu, S., Gucer, S. 2005.** Application of liquid-liquid extraction and adsorption on activated carbon to the determination of different forms of metals present in edible oils. *Chem. Anal. (Warsaw)*, 50 (6) 1007–1019.
- Krasnodebska-Ostrega, B., Paldyna, J., Kowalska, J., Jedynek, L., Golimowski, J. 2009.** Fractionation study in bioleached metallurgy wastes using six-step sequential extraction. *Journal of Hazardous Materials*, 167: 128–135.
- Larsen, E. H. 1998.** Method optimization and quality assurance in speciation analysis using high performance liquid chromatography with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 53: 253–265.
- Leray, C., Pelletier, X. 1987.** Thin-layer chromatography of human platelet phospholipids with fatty acid analysis. *Journal of Chromatography B*, 420: 411–416.
- Lisiewska, Z., Kmiecik, W., Gebczynski, P., Sobczynska, L. 2011.** Amino acid profile of raw and as-eaten products of spinach (*Spinacia oleracea L.*). *Food Chemistry*, 126: 460–465.
- Liu, C-S., Glahn, R.P., Liu, R.H. 2004.** Assessment of carotenoid bioavailability of whole foods using a Caco-2 cell culture model coupled with an in vitro digestion. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 4330-4337.
- Lobinski, R. 1998.** Speciation targets, analytical solutions and markets. *Spectrochimica Acta Part B*, 53: 177–185.
- Lomnitski, L., Bergman, M., Nyska, A., Ben-Shaul, V., Grossman, S. 2003.** Composition, efficacy, and safety of spinach extracts. *Nutrition and Cancer*, 46 (2): 222–231.
- Maeda, N., Hada, T., Murakami-Nakai, C., Kuriyama, I., Ichikawa, H., Fukumori, Y., Hiratsuka, J., Yoshida, H., Sakaguchi, K., Mizushima, Y. 2005.** Effects of DNA polymerase inhibitory and antitumor activities of lipase-hydrolyzed glycolipid fractions from spinach. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16: 121–128.

Maeda, N., Kokai, Y., Ohtani, S., Sahara, H., Kumamoto-Yonezawa, Y., Kuriyama, I., Hada, T., Sato, N., Yoshida, H., Mizushima, Y. 2008. Anti-tumor effect of orally administered spinach glycolipid fraction on implanted cancer cells, Colon-26, in Mice. *Lipids*, 43, 741–748.

Maher, W., Krikowa, F., Ellwood, M., Foster, S., Jagtap, R., Raber, G. 2012. Overview of hyphenated techniques using an ICP-MS detector with an emphasis on extraction techniques for measurement of metalloids by HPLC–ICPMS. *Microchemical Journal*, 105: 15–31.

Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P., Macierzanka, A., Mackie, A. 2011. The role of bile salts in digestion. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165: 36–46.

Mandigo, R.W., Munson, A.W., Henrickson, R.L., Whiteman, J.V. 1967. Some sources of variation associated with ether extraction. *J Anim Sci*, 26(2): 302-306.

Marschner, H. 1989. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, San Diego, USA. 674 pp.

Michalke, B. 2002. The coupling of LC to ICP-MS in element speciation: I. General aspects. *Trends in analytical chemistry*, 21 (2): 142–153.

Michalke, B. 2003. Element speciation definitions, analytical methodology, and some examples. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 122–139.

Michalke, B. 2004. Manganese speciation using capillary electrophoresis–ICP-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1050: 69–76.

Michalke, B., Schramel, P. 2004. Manganese speciation in human milk using size exclusion chromatography combined with strong anion Exchange chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Journal of Analytical Atomic spectrometry*, 19 (1): 121 – 128.

Michalke, B. 2006. Trace element speciation in human milk. *Pure Appl. Chem.*, 78 (1): 79–90.

Michalke, B., Berthele, A., Mistrionis, P., Ochsenkühn-Petropoulou, M., Halbach, S. 2007. Manganese speciation in human cerebrospinal fluid using CZE coupled to inductively coupled plasma MS. *Electrophoresis*, 28: 1380–1386.

Michalke, B., Lucio, M., Berthele, A., Kanawati, B. 2013. Manganese speciation in paired serum and CSF samples using SEC-DRC-ICP-MS and CE-ICP-DRC-MS. *Anal Bioanal Chem*, 405: 2301–2309.

Millaleo, R., Reyes-Díaz, M., Ivanov, A.G., Mora, M.L., Alberdi, M. 2010. Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, 10 (4): 476–494.

Montes-Bayon, M., DeNicola, K., Caruso, J.A. 2003. Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1000: 457–476.

Moreda-Pineiro, J., Moreda-Pineiro, A., Romaris-Hortas, V., Dominguez-Gonzalez, R., Alonso-Rodriguez, E., Lopez-Mahia, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodriguez, D., Bermejo-Barrera, P. 2012. Trace metals in marine foodstuff: Bioavailability estimation and effect of major food constituents. *Food Chemistry*, 134: 339–345.

Moreda-Pineiro, A., Barciela-Alonso, M.D., Dominguez-Gonzalez, R., Pena-Vazquez, E., Herbello-Hermelo, P., Bermejo-Barrera, P. 2009. Alternative Solid Sample Pretreatment Methods in Green Analytical Atomic Spectrometry. *Spectroscopy Letters*, 42: 394–417.

Nardi, E.P., Evangelista, F.S., Tormen, L., SaintPierre, T.D., Curtius, A.J., de Souza, S.S., Barbosa Jr, F. 2009. The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. *Food Chemistry*, 112: 727–732.

Naozuka, J., Oliveira, P.V. 2007. Cu, Fe, Mn and Zn Distribution in Protein Fractions of Brazil-Nut, Cupuassu Seed and Coconut Pulp by Solid-Liquid Extraction and Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.*, 18(8): 1547–1553.

Naudi, R., Semple, K.T., Megharaj, M., Juhasz, A.L., Bolan, N.S., Gupta, S.K., Clothier, B.E., Schulin, R. 2008. Bioavailability: definition, assessment and implications for risk assessment: Developments in Soil Science, volume 32, Ed.: Naidu, R., Elsevier B.V., Netherlands, pp: 39–51.

Ozdemir, Y., Gucer, S. 1998. Speciation of manganese in tea leaves and tea infusions. *Food Chemistry*, 61 (3): 313–317.

Özdemir, M., Açıkturk, F., Kaplan, M., Yıldız, M., Löker, M., Gürcan, T., Biringen, G., Okay, A., Seyhan, F.G. 2001. Evaluation of new Turkish hybrid hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties: fatty acid composition, α -tocopherol content, mineral composition and stability. *Food Chemistry*, 73: 411–415.

Pearson G.F., Greenway, G.M. 2005. Recent developments in manganese speciation. *Trends in Analytical Chemistry*, 24(9): 803–809.

Pick, D., Leiterer, M., Einax, J.W. 2010. Reduction of polyatomic interferences in biological material using dynamic reaction cell ICP-MS. *Microchemical Journal*, 95: 315–319.

Prasad, M.N.V. 2004. Heavy Metal Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems. Springer-Verlag, Berlin. 462 pp.

Pohl, P. 2007. Manganese and zinc operational fractionation in beer by means of tandem ion exchange column assemblage and flame atomic absorption spectrometry. *Microchim Acta*, 159: 325–332.

Pohl, P., Prusisz, B. 2007. Fractionation analysis of manganese and zinc in tea infusions by two-column solid phase extraction and flame atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, 102: 1415–1424.

Quintana, M., Klouda, A.D., Ochsenkuhn-Petropoulou, M., Michalke, B. 2005. Size characterization of manganese species from liver extracts using size exclusion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 554: 130–135.

Quintana, M., Klouda, A.D., Gondikas, A., Ochsenkühn-Petropoulou, M., Michalke, B. 2006. Analysis of size characterized manganese species from liver extracts using capillary zone electrophoresis coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (CZE-ICP-MS). *Analytica Chimica Acta*, 573-574: 172–180.

Ramos, L. 2012. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1221: 84– 98.

Rao, R.N., Talluri, M.V.N.K. 2007. An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43: 1–13.

Richardson, C., Roberts, E., Nelms, S., Roberts, N.B. 2012. Optimisation of whole blood and plasma manganese assay by ICP-MS without use of a collision cell. *Clin Chem Lab Med*, 50 (2): 317–323.

Rosen, A.L., Hieftje, G.M. 2004. Inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry for speciation analysis: applications and instrumentation. *Spectrochimica Acta Part B*, 59: 135–146.

Rostami I., Juhasz, A.L. 2011. Assessment of persistent organic pollutant (POP) bioavailability and bioaccessibility for human health exposure assessment: A critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41: 623–656.

Rouser, G., Kritchevsky, G., Simon, G., Nelson, G.J. 1967. Quantitative analysis of brain and spinach leaf lipids employing silicic acid column chromatography and acetone for elution of glycolipids. *Lipids*, 2: 37–40.

Ruzik, L. 2012. Speciation of challenging elements in food by atomic spectrometry. *Talanta*, 93: 18– 31.

Rybak, J. Ruzik, L. 2013. Application of chromatography and mass spectrometry to the characterization of cobalt, copper, manganese and molybdenum in *Morinda Citrifolia*. *Journal of Chromatography A*, 1281: 19–25.

Seyhan, F., Ozay, G., Saklar, S., Ertas, E., Satır, G., Alasalvar, C. 2007. Chemical changes of three native Turkish hazelnut varieties (*Corylus avellana L.*) during fruit development. *Food Chemistry*, 105: 590–596.

Shun-xing, L., Feng-ying, Z., Xian-li, L., Wen-lian, C. 2005. Speciation analysis and the assessment of bioavailability of manganese in phytomedicines by extraction with octanol and determination by flame atomic absorption spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 16: 405–410.

Silvestre, M.D., Lagarda, M.J., Fare, R., Martinez-Costa, C., Brines, J. 2000. Copper, iron and zinc determinations in human milk using FAAS with microwave digestion. *Food Chemistry*, 68: 95–99.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. 1998a. Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografi: Enstrümantal Analiz İlkeleri, Editörler: Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., Bilim Yayıncılık, s.725-766.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. 1998b. Enstrümantal Analiz İlkeleri. Bilim Yayıncılık, Ankara, 849 s.

Sneddon, J., Hardaway, C., Bobbadi, K.K., Reddy, A.K. 2006. Sample preparation of solid samples for metal determination by atomic spectroscopy—An overview and selected recent applications. *Applied Spectroscopy Reviews*, 41: 1–14.

Srivastava, S., Dubey, R.S. 2011. Manganese-excess induces oxidative stress, lowers the pool of antioxidants and elevates activities of key antioxidative enzymes in rice seedlings. *Plant Growth Regul*, 64: 1–16.

Srogi, K. 2008. Developments in the determination of trace elements by atomic spectroscopic techniques. *Analytical Letters*, 41: 677–724.

Szpunar, J. 2000. Trace element speciation analysis of biomaterials by high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection. *Trends in Analytical Chemistry*, 19: 127–137.

Szpunar, J., Lobinski, R. 2003. Hyphenated Techniques in Speciation Analysis, The Royal Society of Chemistry, UK, 220 pp.

Tang, G. 2009. Spinach and carrots: vitamin A and health: Bioactive Foods in Promoting Health: Fruits and Vegetables, Ed.; Watson, R., Preedy, V., London, UK: Elsevier, pp: 381–392.

Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D. 2003. Trace elements in human physiology and pathology. Copper, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57: 386–398.

Templeton, D. M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L-G., Muntau, H., Leeuwen, H. P. V., Lobinski, R. 2000. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *Pure Appl. Chem.*, 72 (8): 1453–1470.

Thomas, R. 2004. Practical Guide to ICP-MS. Marcel Dekker Inc. New York, USA, 324 pp.

Tokalioglu, S., Kartal, S., Elci, L. 2000. Determination of heavy metals and their speciation in lake sediments by flame atomic absorption spectrometry after a four-stage sequential extraction procedure. *Analytica Chimica Acta*, 413: 33–40.

Tukendorf, A. 1989. Characteristics of copper-binding proteins in chloroplasts of spinach tolerant to excess copper. *Journal of Plant Physiology*, 135(3): 280–284.

Tüzen M. 2002. A comparison of sample preparation procedures for the determination of heavy metals in Lichen samples by GFAAS. *Analytical Letters*, 35(10): 1667–1676.

Tuzen, M., Soylak M. 2007. Evaluation of trace element contents in canned foods marketed from Turkey. *Food Chemistry*, 102: 1089–1095.

Van der Borgh, A., Goesaert, H., Veraverbeke, W.S., . Delcour, J.A. 2005. Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved. *Journal of Cereal Science*, 41: 221–237.

Vinas, P., Campillo, N., Lopez Garcia, I., Hernandez Cordoba M. 1993. Flow-injection flame atomic absorption spectrometry for slurry atomization. Determination of calcium, magnesium, iron, zinc and manganese in vegetables. *Analytica Chimica Acta*, 283 (1): 393–400.

Wiley, J. D., Inscore, M.T., Kieber, R.J., Skrabal, S.A. 2009. Manganese in coastal rainwater: speciation, photochemistry and deposition to seawater. *J Atmos Chem*, 62: 31–43.

Wuilloud, R.G., Kannamkumarath, S.S., Caruso, J.A. 2004. Speciation of nickel, copper, zinc, and manganese in different edible nuts: a comparative study of molecular size distribution by SEC–UV–ICP–MS. *Anal Bioanal Chem*, 379: 495–503.

Xiang, G., Zhang, Y., Jiang, X., He, L., Fan, L., Zhao, W. 2010. Determination of trace copper in food samples by flame atomic absorption spectrometry after solid phase extraction on modified soybean hull. *Journal of Hazardous Materials*, 179: 521–525.

Yaman, M. 1997. Determination of manganese in vegetables by atomic absorption spectrometry with enrichment using activated carbon. *Chemia Analityczna*, 42: 79–86.

Yaşar, S.B., Güçer, Ş. 2004. Fractionation analysis of magnesium in olive products by atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 505: 43–49.

Zhang, N., Peng, H., Wang, S., Hu, B. 2011. Fast and selective magnetic solid phase extraction of trace Cd, Mn and Pb in environmental and biological samples and their determination by ICP-MS. *Microchim. Acta*, 175:121–128.

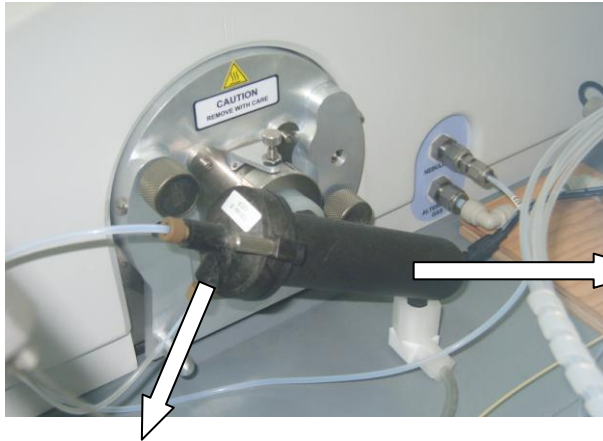
EKLER

EK-1

HPLC-ICP-MS çalışmalarında kullanılan cihazlar ve cihaz parçaları



Şekil 1. HPLC-ICP-MS cihazı (ICP-MS solda, ve HPLC sağda)



Ryton karşı akış sisleştirci

Scott püskürtme haznesi

Şekil 2. Scott tip püskürtme haznesi (çift yarıklı, sağda) ve ryton karşı akış sisleştirci (solda)



Şekil 3. Siklonik (Cyclonic) püskürtme haznesi



Şekil 4. ICP-MS için organik çözügen iletim aparatı



Şekil 5. Düşük akış sisleştirci(PFA-ST μFlow)



Şekil 6. Meinhard sisleştirci



Şekil 7. Rheodyne çevirici valf

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ümran SEVEN ERDEMİR
Doğum Yeri ve Tarihi : Kelkit/Gümüşhane-01.01.1982
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Yabancı Dil Ağırlıklı Aliğa Lisesi,
Aliğa/İZMİR ,1999

Lisans : Uludağ Üniversitesi-Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya
Bölümü, 2003

Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi-Fen Bilimleri Enstitüsü, 2006
Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya
Bölümü (2005- günümüze)

İletişim (e-posta) : useven@uludag.edu.tr

Yayımları : Seven Erdemir, U., Izgi, B., Gucer, S. 2013. An
alternative method for screening of Sudan dyes in
red paprika paste by gas chromatography-mass
spectrometry. *Analytical Methods*, 5 (7) 1790–1798.

Arslan, H., Guleryuz, G., Akpınar, A., Kirmizi, S.,
Seven Erdemir, U., Gucer, S. 2013. Responses of
ruderal *Verbascum olympicum* Boiss.
(Scrophulariaceae) growing under cadmium (Cd)
stres. *Clean - Soil, Air, Water*, DOI:
10.1002/clen.201300219. (yayına kabul edildi.)