

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

**KARMİNİK ASİDİN DİFERANSİYEL PULS
POLAROGRAFİSİ İLE TAYİNİ İÇİN YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULANMASI**

**Tezi Hazırlayan
Fevzi ERGÜN**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Ümmihan T. YILMAZ**

**Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Ekim 2013
NEVŞEHİR**

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

**KARMİNİK ASİDİN DİFERANSİYEL PULS
POLAROGRAFİSİ İLE TAYİNİ İÇİN YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULANMASI**

**Tezi Hazırlayan
Fevzi ERGÜN**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Ümmihan T. YILMAZ**

**Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Ekim 2013
NEVŞEHİR**

Doç. Dr. Ümmihan T. YILMAZ danışmanlığında Fevzi ERGÜN tarafından hazırlanan “Karminik Asidin Diferansiyel puls polarografisi ile tayini için yöntem geliştirilmesi ve uygulanması” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından Nevşehir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

28/10/2013

JÜRİ

Başkan : Prof. Dr. Güler Ekmekeş *Güler Ekmekeş*

Üye : Doç. Dr. Olcay Sındırlı *Olcay Sındırlı*

Üye : Doç. Dr. Ümmihan T. YILMAZ *Ümmihan T. YILMAZ*

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun...30.10.2013...tarih ve...2013/28-07 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada yer alan bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.



Fevzi ERGÜN

TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarım sırasında benden bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, her tŒrlŒ maddi ve manevi desteği veren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Œmmihan T. Yılmaz'a sevgi ve saygılarımı sunarım.

ÇalıŐmalarım sırasında bilgi ve tecrŒbeleriyle bana destek olan Kimya BŒlŒmŒ Anabilim Dalı baŐkanımız Sayın Prof. Dr. HaŐım Yılmaz'a teŐekkŒrlerimi sunarım.

Her tŒrlŒ fedarkarlığı esirgemeyen aileme sonsuz sevgi ve saygılarımla.

KARMINİK ASİDİN DİFERANSİYEL PULS POLOGRAFİSİ İLE TAYİNİ İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULAMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Fevzi ERGÜN

NEVŞEHİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ekim 2013

ÖZET

Karminik asitin (KA) damlayan cıva elektrot üzerinde indirgenmesinden yararlanılarak difrensiyel puls polarografisi (DPP) ile karmin gıda boyalarının tayini için duyarlı bir metot geliştirilmiştir. DPP ile pH 2 Britton-Robinson (B-R) elektroliti ortamında -489 mV'daki pikinden yararlanılarak yapılan tayinde pik akımı ile derişim arasında doğrusal olarak çalışılabilen aralık 1×10^{-6} mol/L - 9×10^{-5} mol/L olarak tespit edilmiş olup gözlenebilme sınırı $1,6 \times 10^{-7}$ mol/L'dır. Önerilen elektrokimyasal tayin yöntemi karmin boyası katılan gıdalardan çilekli süte ve meyveli şekere uygulanmıştır. Meyveli şekerdeki KA'nın tayini hem DPP hemde spektrofotometrik yöntemle yapılarak iki metot karşılaştırılmıştır. KA'nın pH 2 BR elektroliti ortamında asılı cıva damlası üzerinde Ag/AgCl elektroda karşı 0,0 – 1000 mV aralığında dönüşümlü voltamogramları (DV) alınmıştır. Alının DV'de -500 mV'da bir katodik ve tarama hızı ile belirginleşen üç anodik pik gözlenmiştir. Ayrıca KA'nın tayinine bazı organik ve inorganik maddelerin girişim etkileri incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: Elektrokimyasal tayin, eser, polarografi, karminik asit

Tez Danışman: Doç. Dr. Ümmihan T. YILMAZ

Sayfa Adeti: 59

**DIFFERENTIAL PULSE POLAROGRAPHIC METHOD FOR THE
DETERMINATION OF CARMINIC ACID AND ITS APPLICATION**

(M. Sc. Thesis)

Fevzi ERGÜN

**NEVŞEHİR UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

October 2013

ABSTRACT

As basis for the development of a sensitive analytical method for the determination of carmine food dye, a study of the differential pulse polarographic (DPP) reduction of carminic acid (CA) on a dropping mercury electrode (DME) was performed. For the analytical DPP method running at pH 2.0 Britton-Robinson (B-R) buffer (peak at -489 mV), the relationship between the peak current and CA concentration was linear in the range of 1×10^{-6} to 9×10^{-5} mol/L with a detection limit of $1,6 \times 10^{-7}$ mol/L. The proposed electrochemical procedure was successfully applied to the determination of carmine food dye in spiked commercially available strawberry flavored milk. The method was extended to the determination of CA in candies and results were in agreement with that obtained by spectrophotometric comparison method. Cyclic voltammogram of CA in 2.0 B-R buffer electrolyte was obtained on HMDE at pH 2.0 during the potential scan from 0.00 mV to 1000 mV vs. Ag/AgCl. From repetitive cyclic voltammograms, one cathodic peak at about -500 mV and three anodic peaks on the reverse scan at about between -340 mV - -460 mV were recorded. The influences of some other commonly found inorganic and organic salts on the determination of CA were also examined.

Keywords: Electrochemical determination, trace, polarography, carminic acid

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ümmihan T. YILMAZ

Page Number: 59

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
TEZ BİLDİRİM SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
1. BÖLÜM	
GİRİŞ GENEL BİLGİLER.....	1
2. BÖLÜM	
ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLERİN TEORİSİ	8
2.1. Polarografi.....	8
2.1.1. Doğru akım polarografisi	10
2.1.2. Normal puls polarografisi	12
2.1.3. Diferansiyel puls polarografisi.....	13
2.1.4. Polarografide nitel analiz	17
2.1.5. Polarografide nicel analiz	18
2.2. Dönüşümlü Voltametri (DV).....	20
3. BÖLÜM	
DENEYSEL ÇALIŞMALAR	26
3.1. Polarografi Cihazı	26

3.2.	Hücre Ve Elektrotlar	26	
3.2.1.	Damlayan cıva elektrot	27	
3.2.2.	Ag /AgCl elektrot.....	27	
3.2.3.	Karşıt elektrot.....	27	
3.2.4.	Azot gazı	27	
3.3.	pH Metre	27	
3.4.	Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrometresi.....	28	
3.5.	Cıvanın Temizlenmesi	28	
3.6.	Reaktifler Ve Özellikleri.....	28	
3.6.1.	Çözeltilerin hazırlanması	30	
4. BÖLÜM			
DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA.....			34
4.1.	Karminik asidin Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi, Tayini ve Analitik Uygulamaları.....	34	
4.1.1.	Destek elektrot seçimi.....	34	
4.1.2.	pH etkisi	35	
4.1.3.	Karminik asidin destek elektrolitteki tayini	38	
4.1.4.	Girişim etkisi.....	40	
4.1.4.1.	Elektroaktif iyonların girişim etkilerinin incelenmesi	40	
4.1.4.2.	Elektroaktif olmayan iyonların girişim etkilerinin incelenmesi	43	
4.1.5.	Meyveli şeker ve çilekli sütteki karminik asit tayini	44	
4.1.5.1.	Meyveli şeker numunelerinde karminik asit tayini.....	45	
4.1.5.2.	Çilekli sütte karminik asit tayini	45	
4.1.5.3.	Karminik asidin spektrometrik tayini	46	
4.1.6.	Karminik asidin dönüşümlü voltametri çalışmaları	47	

5. BÖLÜM

SONUÇLAR	52
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	59

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Gıdalarda kullanılan renklendiriciler tebliği'ne göre karmin koşienal ve karminik asit kullanımına izin verilen ürünler ve maksimum kullanım miktarları	4
Tablo 1.2. Bazı gıda boyalarının kaynakları özellikleri günlük alınabilecek miktarları ve bazı zararlı etkileri	4
Tablo 4.1. 2×10^{-5} mol/L karminik asidin Britton-Robinson tamponunda polarografik davranışının incelenmesi	37
Tablo 4.2. pH 2 B-R tamponunda 1×10^{-5} mol/L karminik asit miktar tayini	38
Tablo 4.3. pH 2 B-R tamponunda 1×10^{-5} mol/L karminik aside bazı iyonların girişim etkilerinin incelenmesi	44
Tablo 4.4. DPP ve UV spektrofotometresi ile yapılan tayin sonucunda çilekli süt ve meyveli şeker numunelerinde bulunan karminik asit miktarları	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Karminik asidin kimyasal formülü.....	2
Şekil 2.1.	Normal polarografide gözlenen akım-potansiyel eğrisi	12
Şekil 2.2.	Diferansiyel puls polarografisinde kullanılan uyarma sinyali	13
Şekil 2.3.	Diferansiyel puls polarografisinde her damla için potansiyel polarogramı .	14
Şekil 2.4.	Diferansiyel puls polarografisinde tek bir damlanın gelişimi	15
Şekil 2.5.	Damlayan cıva elektrodunda damla ömrüne göre faradayik ve kapasitif akımın kıyaslaması	16
Şekil 2.6.	Örnek DV voltamogramı.....	20
Şekil 2.7.	Ürün ve reaktantın adsorpsiyonunda gözlenen pikler	25
Şekil 4.1.	2×10^{-5} mol/L karminik asidin pH 1-9 aralığındaki diferansiyel puls polarogramları	36
Şekil 4.2.	Karminik asidin farklı derişimlerdeki diferansiyel puls polarogramları.....	39
Şekil 4.3.	Zn^{2+} iyonunun karminik asit tayinine girişim etkisi	41
Şekil 4.4.	Pb^{2+} iyonunun karminik asit tayinine girişim etkisinin önlenmesi.....	42
Şekil 4.5.	NO_3^- iyonunun karminik asit tayinine girişim etkisi	43
Şekil 4.6.a.	Meyveli şekerdeki karminik asit tayini	46
Şekil 4.6.b.	Çilekli sütte karminik asit tayini	46
Şekil 4.7.	Karminik asidin pH 2 B-R tamponunda dönüşümlü voltamogramları	48
Şekil 4.8.	1×10^{-5} mol/L karminik asidin farklı tarama hızlarında voltamogramları	49
Şekil 4.9.	1×10^{-5} mol/L karminik asidin pH 2 B-R tamponunda pik akımlarının tarama hızına karşılık incelenmesi	51
Şekil 4.10.	1×10^{-5} mol/L karminik asidin pH 2 B-R tamponunda tarama hızının logaritmasına karşılık pik akımlarının logaritmasının incelenmesi	51

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
C	Madde derişimi ,(mmol/L)
E	Uygulanan potansiyel, (V)
E_p	Pik potansiyeli, (V)
$E_{1/2}$	Yarı dalga potansiyeli, (V)
E^0	Standart potansiyel, (V)
E_{pa}	Anodik pik potansiyeli, (V)
E_{pk}	Katodik pik potansiyeli, (V)
I_{pk}	Katodik pik akımı (A)
I_{pa}	Anodik pik akımı (A)
I_d	Difüzyon akımı (A)
I	Damla ömrü sonundaki akım, (A)
A	Elektrodun yüzey alanı, cm^2
D	Difüzyon katsayısı (cm^2/s)
n	Transfer edilen elektron sayısı, (eg/mol)
F	Faraday sabiti, (C/eg)
N	Elektrolizlenen maddenin mol sayısı, (mol)
t	Damla ömrü
m	Damla akış hızı (mg/s)
R	İdeal gaz sabiti, (J/K mol)
T	Sıcaklık, (K)
ΔE	Puls genliğı (V)
k	Randles-Sevcik sabiti
α	Elektrot reaksiyonunun transfer katsayısı
v	Tarama hızı (mV/S)
M	Mol kütlesi
Ag /AgCl	Gümüş / Gümüş Klörür

Kısaltmalar**Açıklama**

FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
UV -GB	Ultraviyole-Görünür bölge spektrometresi
BRT	Britton-Robinson tamponu
DCE	Damlayan cıva elektrodu
HMDE	Asılı cıva damlası elektrot
DKE	Doymuş kalomel elektrot
NPP	Normal Puls Polarografisi
DPP	Diferansiyel Puls Polarografisi
DV	Dönüşümlü Voltametre
AdSV	Adsorptif sıyırma voltametrisi
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
Hac-NaAc	Asetik asit-Sodyum asetat
KA	Karminik asit

1. BÖLÜM

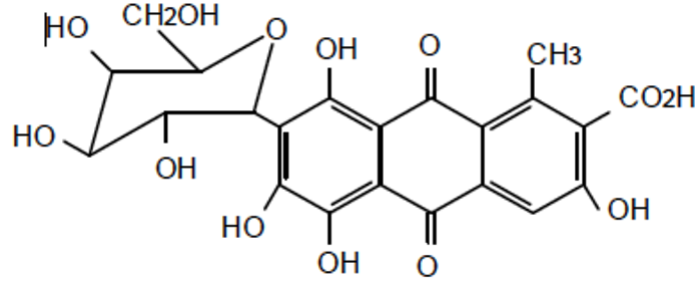
GİRİŞ

Karminik asit *Homoptera* sınıfının *Coccoidea* familyasından Koşinil (*Dactylopius coccus* Costa) böceklerinin dişi olanlarından elde üretilen önemli bir kırmızı renkli boyar maddedir [1]. KA'nın rengi pH'a göre değişmektedir. KA, pH 3-3,5'da rengi turuncu, pH 5-5,5'da kırmızı ve pH 7-7,5'da mor renklidir. Al/Ca kompleksleri koyu kırmızı renklidir. Bu koyu kırmızı renkli kompleks Carmine ismini alır [2].

Koşineal ($C_{22}H_{20}O_{13}$), (CI Natural Red 4), 7-D-glukopiranozil-3,5,6,8-tetrahidroksi-1-metil-9,10-dioksoantrasen-2-karboksilik asit yapısında olup antrakinon sınıfından bir renklendiricidir. Koşineal ekstraktı, koşinealin alkollü ekstraktından alkolün uzaklaştırılmasından sonra elde edilen konsantre bir çözeltilerdir. Başlıca renk maddesi karminik asittir.

Koşineal, zamanla bozulmaya karşı dayanıklı, doğal ve suda çözünebilen bir renklendiriciye verilen addır. Koşineal, ışığa ve ısıya karşı oldukça stabil olup, bütün doğal boya maddeleri içerisinde oksidasyona en dayanıklı ve bazı sentetik gıda boyalarından daha fazla kararlıdır [3].

Kimyasal ismi:7- α -D-Glukopiranozil-9,10-dihidro-3,5,6,8-tetrahidroksi-1-metil-9,10 dioksoanthrasen karboksilik asidir (Şekil 1.1). Kapalı formülü $C_{22}H_{20}O_{13}$, molekül kütlasi 492,38 g/mol, erime noktası 120 °C karminik asit suda, alkolde, eterde çözünebildiği gibi asit ve alkali çözeltilerde de çözünür. Sudaki çözünürlüğü 0,13g/100 cm^3 , piridindeki 3,34 g/100 cm^3 dür. 135 °C nin üstündeki sıcaklıklarda stabil değildir, bozunur.



Şekil 1.1. Karminik asidin kimyasal formülü [5]

Karminik asidden önceleri koşinil olarak sadece boyarmadde olarak yün ve ipek boyamasında yararlanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak Orta ve Kuzey Amerika'daki Aztek ve Maya toplumları tarafından doğal boya olarak kırmızı rengi vermek için kullanılmıştır [4]. Ülkemizde kullanılan karminik asidin tamamı ithal edilmektedir. Tekstil boya maddesi olarak kullanılmasının yanı sıra karminik asit gıdalarda da yaygın olarak kullanılmaktadır. Et ürünleri (salam, sosis, sucuklarda), işlenmiş kanatlı ürünlerinde, deniz ürünlerinde (surumi), içeceklerde (alkollü ve alkolsüz içecekler, sodalar, kokteyl şurupları, kolalar, fonksiyonel içecekler), unlu mamullerde (bisküviler, kekler, börekler), reçeller ve marmelatlarda, dondurmalarda, meyve suları ve meyve prepatlarında, şekerlemelerde (aromalı şekerler, jelibonlar, lokumlar), kırmızı meyveli yoğurtlarda, bazı soslarda, jelâtinli tatlılar ve elma şarabında kullanılmaktadır. Ayrıca maraska kirazı ve domates ürünleri karminik asit ile parlatılır. Karminik asit; sakız, hap ve öksürük pastilinde kullanılır. Kozmetik ruj, ana katkı maddesi olarak koşineal yaygın olarak kozmetikte kullanılmaktadır. Ayrıca bu pigment, hala organik bir sinek kovucu olarak kullanılmaktadır [6]. Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu renklendiricileri gıdanın rengini düzelten veya renk vermek amacıyla katılan madde olarak tanımlamaktadır. Renklendiriciler elde edilış şekillerine göre; doğal renklendiriciler yapay renklendiriciler olmak üzere iki temel gruba ayrılır. Doğal bir boyar madde olan karminik asit kullanımı günümüzde yaygınlaşmıştır.

Gıda katkı maddeleri içerisinde önemli bir grubu oluşturan gıda boyaları, endüstrisinde istenen ve tipik mevcut rengi korumak, artırmak veya modifiye etmek, renk değişiminin, bozulmasını kontrol ederek görünüşü standart kılmak, süsleyici özellik

kazandırmak, yeni ürünler oluşturmak gibi çeşitli amaçlarla kullanılırlar. Gıda boyaları, düşük kaliteyi yükseltmek ve tüketiciyi yanıltmak için kullanılmamalı ve sağlığa zararlı olmamalıdır. Bu ve benzeri amaçlarla kullanım, yasal düzenlemeler yoluyla kontrol altına alınmıştır. Gıda boyaları, şekerlemelerde, yemek arası yenen gıdalarda, alkolsüz içeceklerde, pastalarda, jelâtinli tatlılar gibi birçok gıdalarda kullanılan katkı maddeleridir. Gıda endüstrisinde, teknolojinin gereği olarak, sentetik ve doğal boya maddeleri kullanılmaktadır. Ancak sentetik gıda boyalarının yasalara uygun sınırlamalar içinde kullanılmaması toksik etkilerinin ortaya çıkmasına ve halk sağlığını etkileyebilecek risklerin doğmasına yol açabilmektedir [7]. Deney hayvanları üzerinde yapılan toksisite çalışmaları ve epidemiyolojik kanıtlar, belirli şartlar altında boyaların karsinogenik olabileceğini ileri sürmektedir [8].

Türk Gıda Kodeksi Gıdalarda Kullanılan Renklendiriciler Tebliği'nde koşineal, karminik asit ve karminler, E-120 Kodu ile izin verilen gıda renklendiricileri arasında yer almaktadır. Gıdalarda kullanılan renklendiriciler tebliği'ne göre karmin koşineal ve karminik asit kullanımına izin verilen ürünler ve maksimum kullanım miktarları [9] Tablo 1.1' de verilmiştir.

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde 300 gıda katkı maddelerinin tüketimi arttıkça, bazı rahatsızlıklarla olan bağlantılara yönelik bulgular da ortaya çıkmıştır. Bunların içinde en sıkça görülenleri egzema, astım, baş ağrısı, alerjik kaşıntılar, gastrik rahatsızlıklar, ishal, özellikle çocuklarda hiperaktivite ve aşırı duyarlılık (hypersensitivity) vb.'dir [10]. Günümüzde gıda katkı maddeleri düzenlemeleri ulusal bir kavram olmaktan çıkıp, uluslararası boyut kazanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Gıda Tarım Örgütü'nün (Food and Agriculture Organization-FAO) ortak çalışmaları ile Uluslar arası Gıda Kodeks Komisyonu (Codex Alimentarius Commission-CAC) oluşturulmuştur. CAC'nin alt kuruluşu olan Gıda Katkı Maddeleri Ekspert Komitesi; (JECFA- Joint Expert Commiteeon Food Additives) her yıl Gıda katkı maddeleri ile ilgili yaptıkları toplantılarda, tüm ülkelere öneri niteliğinde bazı standartlar getirmektedirler [11]. Yapılan araştırmalar doğrultusunda Gıda Katkıları Ortak Uzmanlar Komitesi (JoinExpert Committe on Food Additives (JECFA) koşineal ekstraktının ve karminin kabul edilebilir günlük alım dozunu (ADI değeri) 5 mg/ kg olarak vermiştir.

Tablo 1.1. Gıdalarda kullanılan Renklendiriciler Tebliği'ne göre karmin koşinal ve karminik asit kullanımına izin verilen bazı ürünler ve maksimum kullanım miktarları

Gıda Maddesi	(mg/kg)	Gıda Maddesi	(mg/kg)
Meyve aromalı kahvaltılık hububat	200	Aromalandırılmış süt ürünleri dahil tatlılar	150
Reçel jöle ve marmelat	100	Aromalandırılmış işlenmiş peynir	100
Sosis, salam ve et ezemeleri	100	Surumi	500
Pastırma yerinilebilir dış kaplamalar	-----	Füme balık	100
Meyve ve sebze şekerlemeleri	200	Kuru patates, hububat veya nişasta bazlı çerezler	200
Şekerlemeler	300	Diğer çerezler	100
Süsleme ve kaplama maddeleri	500	Alkolsüz aromalı içecekler	100 mg/L
Hafif fırıncılık ürünleri	200	Aromalandırılmış işlenmiş peynir	100

Tablo 1.2. Bazı gıda boyalarının kaynakları özellikleri günlük alınabilecek miktarları ve bazı zararlı etkileri [12]

Katkı Maddesi	E Kodu	Kaynağı	Çözünürlük	Kabul edilebilir günlük alım miktarı	Yan etkileri
Eritrosin	E127	Sentetik iyodin İçeren kırmızı boya	Suda çözünür	0.1 mg/kg.	Hiperaktivite, Güneş ışığına Duyarlılık
PatentMavi V	E131	Sentetik mavi renk	Suda çözünür	5 mg/kg.	Alerjik reaksiyonlar
Karmin, Karminik asit Koşinal	E120	Doğal kırmızı gıda boyası Dactylopius coccus böceklerden ekstrakte edilir	Suda çözünür	5 mg/kg	Hiperaktivite, Alerjik reaksiyonlar

Karminik asit ile yapılan çalışmalar sonucunda Lucas ve arkadaşlarının yapmış olduğu bazı çalışmalar sonucunda karminik asidin alerjen olduğunu tespit etmişlerdir [13]. Yapılan bir diğer çalışmada karminik asitin canlı DNA'sı ile etkileşerek kanser hücrelerinin gelişmesine sebep olduğu belirtilmektedir [14-15]. Bazı çalışmalarda ise yiyeceklerde bulunan karmin ve Karminik asitin bazı alerjik (anaflaktik) reaksiyonları hızlandırdığı ve hiperaktivitenin bir sebebi olabileceği belirtilmiştir [16-18].

Yapılan literatür araştırmasına göre karminik asitin tayini florimetrik [19], spektrofotometrik [20-21] ve kromatografik [22-23] metotlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Yapılan bir çalışmada karminik asitin tayini için florimetrik yöntem kullanılmıştır. Tayin aralığı $1,23 \times 10^{-3}$ - $1,23 \times 10^{-1}$ µg/mL olarak tespit edilmiştir. Tayin sınırı 10.92 ng mL⁻¹ olarak bulunmuştur [19]. Karminik asitin spektrofotometrik tayini için yöntem geliştirilmiş ve geliştirilen yöntem kan plazması ve meyve sularına uygulanmıştır. Geliştirilen yöntemin konsantrasyon aralığı 1.5×10^{-6} - 14×10^{-5} mol/L olarak tespit edilmiştir [20]. Nevado ve arkadaşları ard arda üç gıda boyasının (E-123 (Amaranth), E-124 (Ponceau 4R) ve E-120 (karminik asit) tayinini spektrofotometrik yöntem kullanarak gerçekleştirmişlerdir [21]. Karminik asit için kalibrasyon grafiği en yüksek 64 mg/L 'ye kadar alınabilmiştir. Bener ve arkadaşları HPLC ve spektrofotometrik yöntem kullanarak doğal boyalarda bulunan fenolik bileşiklerin (alizarin, karminik asit gibi) tayinini gerçekleştirmişlerdir [22]. Gonzalez, M ve arkadaşları koşinaldeki pigmentlerin ekstraksiyonu ve tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve UV GB yöntemlerini kullanmışlardır [23]. HPLC ile yapılan başka bir çalışmada süt ve yoğurttaki KA tayini gerçekleştirilmiştir. Süt ve yoğurt numuneleri 5'er dakika 1 mL of 8 mol/L NH₄OH çözeltisi ile muamele edilmiş 6 mol/L HCl eklenerek santrifüj yapıldıktan sonra LiChroCART RP18 kolonu kullanılarak KA'nın tayini gerçekleştirilmiştir [24].

Bugüne kadar yapılmış literatür çalışmasında karminik asitin elektrokimyasal tayinine ait iki çalışmaya rastlanmıştır. Alghamdi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kare dalga adsorptif sıyırma voltametri kullanılarak pH 3 asetat tamponu ortamında asılı civa elektrot üzerinde karminik asidin (E-120) tayinini gerçekleştirilmiştir [25]. Gözlenebilme sınırı 1.43×10^{-9} mol/L ve kalibrasyon grafiği 5×10^{-8} - 1.25×10^{-7} mol/L olarak tespit edilmişlerdir. Geliştirilen metodun uygulamasında karminik asit katılmış dondurma ve alkolsüz içeceklerden geri kazanımı gerçekleştirilmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada ise diferansiyel puls polarografisi kullanılmış ve gözlenebilme sınırı $5,5 \times 10^{-7}$ µg/mL olarak bulunmuştur [26].

Elektrokimyasal metotlar hem inorganik hem de organik inorganik elektroaktif özelliklerin incelenmesinde kullanılmaktadır. Elektroanalitik yöntemlerle elektroaktif maddelerin kantitatif ve kalitatif analizi yapılabildiği gibi elektroaktif olmayan maddelerin dolaylı yolla analizleri yapılabilmektedir. Elektroanalitik tekniklerle çok küçük konsantrasyonlarda madde tayinleri yapılabilmekte ve elektrokimyasal yöntemlerin uygulanabildiği sistemler hakkında, ara yüzeylerdeki yük aktarımının stokiyometrisi ve hızı, kütle aktarım hızı, adsorpsiyon ve kemisorpsiyonun derecesi, kimyasal reaksiyonların hız ve denge sabitleri gibi bilgileri de içeren ve sistemi karakterize eden çok fazla sayıda bilgiye sahip olmaktadır. Elektroanalitik yöntemlerden en çok kullanılanlar polarografi, potansiyometri, voltametri, kulometri ve elektrogravimetri yöntemleridir.

Spektroskopik ya da Kromatografik yöntemlerde girişim problemlerini azaltmak için çözücü ekstraksiyonu, iyon değişimi gibi zahmetli ve ekonomik olmayan ön hazırlıklar gerektirmektedir. Bu işlemler zaman alıcıdır ve madde kayıpları da olabilmektedir. Polarografide kullanılan cihazlar kromatografi (HPLC), kütle spektroskopisi (MS) gibi yöntemlerde kullanılan cihazlardan çok daha ucuzdur. Özellikle damlayan cıva elektrodu (DCE) kullanılarak yapılan polarografik metotlarla, daha ucuz, daha hızlı ve daha güvenilir analizler yapılabilmektedir. Validasyon farklı pH' larda ve farklı elektrolitlerle çalışılarak yapılabilmektedir. Her kullanımdan sonra zahmetli ve uzun elektrot hazırlama işlemlerine gerek yoktur. DCE'un davranışı geçmişinden bağımsızdır. DPP ile yapılan çalışmalarda kullanılan damlayan cıva elektrodunda yüzeyi sürekli yenilediği için tekrarlanabilirliği çok yüksektir. DPP'de tayin sınırları 10^{-8} mol/L sıyırma analizlerinde 10^{-10} - 10^{-11} mol/L'ye kadar ininelebilmektedir [27].

DPP yönteminin bu özelliklerinden dolayı maddelerin kantitatif ve kalitatif analizlerinin yapılmasında diğler yöntemlere göre daha avantajlı olmaktadır.

Bu çalışmanın amacı karminik asidin elektrokimyasal özelliklerini incelemek; karminik asitdin tayini için DPP yöntemi ile metot geliştirmek ve çeşitli ortamlarda (meyveli şeker, çilekli süt) polarografik ve spektrometrik tayinlerini gerçekleştirmektir.

2. BÖLÜM

ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLERİN TEORİSİ

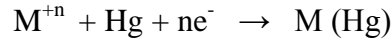
Elektrokimya, maddenin elektriksel davranışını ve elektrik enerjisi ile kimyasal tepkime arasındaki ilişkiyi araştıran bilim dalıdır. Elektrokimyasal tepkimeler, elektronların bir yerden başka bir yere geçişiyle, elektrokimyasal hücre adı verilen bir hücrede oluşur. Elektrokimyasal tepkimelerin oluşabilmesi için; analizi yapılacak maddeyi içeren bir çözelti (elektriksel iletkenliği sağlamak amacıyla iletken çözelti gereklidir), maddenin kimyasal dönüşüme uğradığı genellikle üçlü olan elektrot sistemi, elektrotları birbirine bağlayan çevirim sistemi, olmalıdır. Maddelerin elektrokimyasal özelliklerinden yararlanarak kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapıldığı yöntemlere elektroanalitik yöntemler adı verilir. Elektroanalitik yöntemler, değişik yükseltgenme basamağına sahip türlerin kolayca bulunabilmesi bu yöntemlerin uygulanmasını sağlayan ticari cihazların kromatograflara ve spektrofotometrelere göre çok daha ucuzdur. Genellikle kimyasal türlerin analitik derişimini belirtmesi gibi ayrıcalıklara sahiptir [28].Elektroanalitik teknikler çok düşük tayin sınırlarında uygulanabilir. Elektrokimyasal yöntemlerin kullanılabilirdiği sistemler hakkında, ara yüzeylerdeki yük aktarımının stokiyometrisi ve hızı, adsorpsiyon ve kemisorpsiyonun mertebesini, kimyasal reaksiyonların hız ve denge sabitleri gibi bilgileri de bulunduran, çok fazla sayıda sistemi karakterize eden bilgileri içerir [29].

2.1. Polarografi

Polarografi, çalışma elektrodu damlayan cıva elektrodu (DCE) olan voltametrinin bir alt birimidir. DCE' nin yenilenebilir yüzeyi ve geniş katodik potansiyel aralığından dolayı polarografide birçok indirgenebilir ya da yükseltgenebilir türün tayini yapılabilir. Polarografi tekniği ile kalitatif, kantitatif analizlerde ve kinetik çalışmalarda kullanılabilir. Bu teknikle birçok elementin yanı sıra yükseltgenebilir veya indirgenebilir fonksiyonel grubu bulunan organik bileşiklerin analizi de uygulanabilir. Bu klasik teknik 1922'de Çekoslovak Jaroslav Heyrovsky tarafından bulunmuştur. Polarografide kullanılan damlayan cıva elektrodunda herhangi bir potansiyelde, bu potansiyele ister

yüksek, isterse düşük potansiyellere ulaşılmış olsun, anında tekrarlanabilir ortalama akımlar yapılabilir. DCE’de her damla ile yeni bir elektrot yüzeyi oluşturduğundan elektrodun davranışı daha önceki durumdan ilişkisiz olur. DCE’ nin aksine diğer katı metal elektrotları, adsorplanmış veya birikmiş safsızlıklardan dolayı son derece karasızdır [30].

Bir çözelti içindeki M^{+n} iyonlarının damlayan cıva elektrodunda indirgenmesi;



Şeklinde belirtilir. Çözelti içindeki M^{+n} iyonlarının elektroda taşınması 3 yolla gerçekleşir.

- Konveksiyon yoluyla taşınma; Termik ve mekanik karıştırmadan meydana gelir. Polarogram, çözelti durgun halde iken ve sabit sıcaklıkta alınır bu yolla taşınma önlenmiş olur.
- İyonik göç (migrasyon); Bu çeşit akımların analitik açıdan bir önemi yoktur. Çalışılan bir çözelti ortamında eğer yeterli miktarda taşıyıcı elektrolit olmazsa, elde edilen toplam akımın bir de göç bileşeni vardır. Bu göç bileşeninin kaynağı sistemdeki elektrotlar arasındaki elektriksel alanda iyonların kendi yük cinslerine göre elektrotlara doğru hareket etmeleridir. Çalışma ortamına elektroaktif madde konsantrasyonunun 10-100 katı arasında destek elektrolit ilavesiyle göç akımı bileşeni en aza indirilir.
- Difüzyon; İyonların difüzyon yoluyla elektrot yüzeyine taşınması, elektrot yüzeyi ile çözelti arasındaki net derişim farkından meydana gelir. Çözeltiye daldırılan çalışma elektrodunun yüzeyindeki madde, bozunma potansiyeline gelindiğinde indirgenme veya yükseltgenme yoluyla tükenir. Elektrot yüzeyine yakın bölgedeki elektroaktif maddeler elektrot yüzeyine hızla difüzlenir. Böylece çözelti içinden elektrot yüzeyine doğru bir kütle aktarımı olur ve akım şiddeti artar (difüzyon akımı). Belirli bir süre sonra elektrot yüzeyi civarında sabit kalınlıkta bir difüzyon tabakası meydana gelir. Bu noktadan itibaren elektrot yüzeyinde tepkimeye giren türler ancak difüzyonla

taşınacağı için akım difüzyon kontrollü olur ve sabit kalır. Bu nedenle yukarıda belirtilen şartlar oluşturularak konveksiyon ve iyonik göç yoluyla kütle aktarımı önlenmiş olur. Difüzyon yolu ile taşınıp elektrot yüzeyinde indirgenen ya da yükseltgenen bir madde için elde edilen potansiyel akım eğrileri polarogram olarak adlandırılır. Polarografide akım, çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucunda meydana gelir. İndirgenmeden dolayı oluşan akıma *katodik akım*, yükseltgenmeden dolayı oluşan akıma ise *anodik akım* adı verilir. Belli bir potansiyelden sonra akımın sabit kaldığı bir plato bölgesine ulaşılır. Bu akıma *sınır akımı* adı verilir. Elektrot üzerinde reaksiyon olmadığı zamanda küçük de olsa bir akım gözlenir. Bu akıma da *artık akım adı verilir*. Sınır akımı ile artık akım arasındaki yükseklik dalga yüksekliğidir. Dalga yüksekliği, elektroaktif maddenin konsantrasyonu ile doğrusal olarak artar. Bu özellik nedeniyle polarografi kantitatif analizlerde de uygulanabilmektedir. Akımın, sınır akımı değerinin yarısına eşit olduğu potansiyel *yarı dalga potansiyeli* olarak adlandırılır. Yarı dalga potansiyeli $E_{1/2}$ ile gösterilmektedir. $E_{1/2}$ değeri genellikle elektroaktif maddenin konsantrasyonu ile ilişkili olmamasına karşın standart yarı hücre potansiyeli ile yakından ilişkilidir. Yarı dalga potansiyelinin her madde için karakteristik olmasından dolayı polarografi kalitatif analizlerde de uygulanabilmektedir. Polarografide difüzyon kontrollü sınır akımından başka kinetik ve adsorpsiyon kontrollü akımlara da gözlenir. Kinetik akım, elektroaktif maddenin bir kimyasal reaksiyon sonucu oluşması ile oluşur. Elektroaktif maddenin konsantrasyonu kimyasal reaksiyonunun hızı ile kontrol edildiği için bu akıma *kinetik akım* olarak adlandırılır. Bazen de akım, elektrot yüzeyine elektroaktif maddenin, ürünün veya ortamda bulunan diğer maddelerin adsorpsiyonu ile kontrol edilir. Bu akımda *adsorpsiyon akımı* olarak adlandırılır [31].

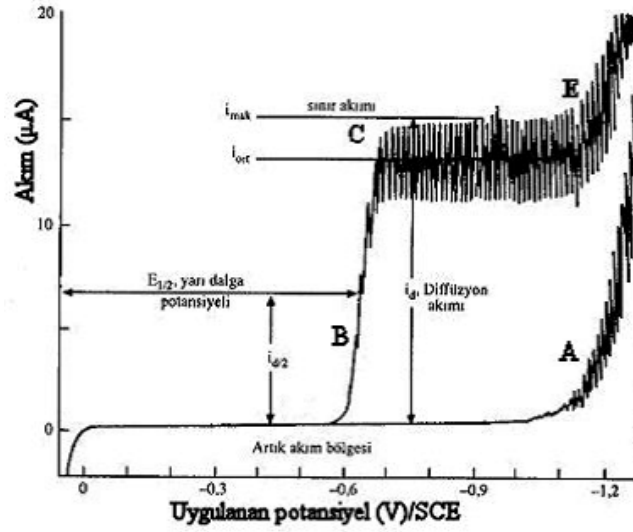
2.1.1. Doğru akım polarografisi

Önceleri normal polarografi; çok sayıda inorganik ve organik türün kantitatif tayininde kullanılabiliyordu. Ancak 1960' larda spektroskopik yöntemlerin ortaya çıkması bu tekniğin geliştirilmesi zorunluluğunu getirmiştir. Yapılan birkaç temel gelişme sayesinde bu metodun duyarlılığı ve seçiciliği büyük oranda yükseltmiştir. Polarografide üçlü elektrot sistemi kullanılır:

- Çalışma elektrodu; damlayan cıva elektrot (DCE)
- Referans elektrot; doymuş kalomel elektrot (DKE) veya Ag /AgCl elektrot
- Karşıt elektrot; platin elektrot (Pt)

Polarografik analizin temelinde analiz edilecek olan çözeltideki indirgen ve yükseltgen maddelerin uygulanan gerilim taraması karşısında akım değerindeki değişim vardır. Aynı sisteme hem gerilim uygulamak ve aynı zamanda oluşan akımı ölçmek için ikili (DCE - DKE) veya üçlü elektrot sistemi uygulanabilir. Çalışma elektrodu damlayan cıva elektrodu (DCE) polarize ve üzerindeki hidrojen aşırı gerilimi oldukça yüksek olan bir elektrottur. Bu elektrodun potansiyeli zamanla doğrusal olarak değiştirilir. Referans elektrot olarak çoğunlukla doymuş kalomel elektrot (DKE) kullanılır. Potansiyeli deney süresince sabit kalır. Bu elektrodun direnci yüksektir ve üzerinden akım geçmez. Bütün akım karşıt elektrot üzerinden çalışma elektroduna (DCE) taşınır. Karşıt elektrot olarak ise genellikle platin elektrot kullanılır. Karşıt elektrot, kaynaktan gelen akımı çözelti üzerinden çalışma elektroduna taşınır. Üçlü elektrot sisteminde; potansiyel çalışma elektrodu ile referans elektrot arasına uygulanır, akım ise çalışma elektrodu ile karşıt elektrot arasında ölçülür. Böylece çalışma ile referans elektrot arasında akım oluşmaz. Çünkü referans elektrodun potansiyeli küçük akımlarda sabittir ancak akım arttığında potansiyel sabit kalmaz. Üçlü elektrot sisteminin kullanılması ile aynı sistemde hem gerilim uygulanabilir hem de oluşan akım gözlenebilir.

Polarize elektrot (DCE) uygulanan potansiyeli elektrot reaksiyonu hızında bir değişiklik olmadan takip eder. Polarize olmayan elektrodun (DKE) potansiyeli değişmez, akımdan ve uygulanan potansiyelden etkilenmez. Eğer polarografi hücresinde bulunan elektrotlardan biri polarize olabilen, diğeri polarize olmayan elektrot ise hücre potansiyeli uygulanan potansiyel kadar değişir. Polarografide bu iki elektrot arasına sabit bir hızla artan potansiyel uygulanırken, elektroaktif türün indirgenme potansiyelinde (veya yükseltgenme) oluşan akım ölçülür. Gözlenen bu akım elektroaktif türün derişimiyle orantılı olduğundan kantitatif tayine olanak verir. Bu akım-potansiyel ilişkisi Şekil 2.1’de gösterilmiştir. Bu eğriye polarogram adı verilir.



Şekil 2.1. Normal polarografide gözlenen akım-potansiyel eğrisi [32]

2.1.2. Normal puls polarografisi

Normal puls polarografisinde elektroda uygulanan potansiyel pulsları faradayik akımın olmadığı başlangıç potansiyelinden itibaren artan genliklerle uygulanır. Pulsar arasında elektrot, analitin reaksiyonunun olmadığı sabit bir potansiyelde tutulur. Pulsun genliği her bir damlada doğrusal olarak artırılır, puls uygulandıktan 40 ms sonra akım ölçülür ki bu anda yükleme akımı yaklaşık 0' dır dır. Ek olarak kısa puls süresinden dolayı difüzyon tabakası doğru akım polarografisindekinden (DC) daha incedir ve böylece faradayik akım en yüksektir Alınan polarogram sigmodal şeklindedir ve sınır akım Cottrell eşitliğindeki gibidir (Eşitlik 2.1) [33].

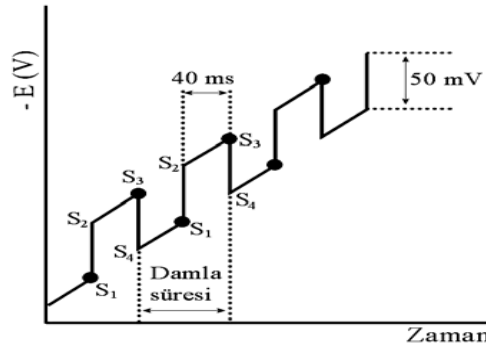
$$i_p = nFAD^{1/2}C \quad (2.1)$$

Normal puls polarografisi DC'den 5-10 kat daha hassastır. Normal puls polarografisinin katı elektrotlarda kullanımı daha avantajlı olabilir. Bu polarografide taramanın büyük kısmı boyunca düşük başlangıç potansiyeli kullanılması, elektrot yüzeyini kirletici problemleri azaltır (adsorblanmış reaksiyon ürünlerine rağmen). Ayrıca Barker ve Gardner [34] tarafından gerçekleştirilen çalışmaya göre normal puls polarografisinin polarografik olmayan (Pt disk gibi) elektrotlara da uygulanabileceğini

bulunmuştur. Normal puls polarografisi özellikle çevresel örneklerdeki düşük derişimlerdeki organik maddelerin ve ağır metallerin ölçümü için analitik araç olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır [35].

2.1.3. Diferansiyel puls polarografisi

1960' larda normal polarografi, birçok laboratuarda analitik bir araç olarak önemini yitirmiştir. Bunun en önemli nedeni, oldukça düşük miktarlardaki tayinlerin gerçekleştirilebildiği spektroskopik tekniklerin ortaya çıkmasıyla bu yöntemin geri planda kalmasıydı. Normal polarografi ile yapılan analizlerde tayin sınırının yeterince iyi olmamasının nedeni; elektrottaki elektriksel çift tabakanın yüklenmesinden oluşan yükleme akımının, faradayik akıma göre oldukça büyük olmasıdır. Eğer yükleme akımının ölçülen toplam akım içindeki katkısı azaltılırsa, daha küçük değerdeki faradayik akımlar ölçülebilir hale gelebilir ve böylece yöntemin hassasiyeti artırılabilir. Polarografik yöntemlerin duyarlılığını geliştirmek amacıyla puls ve diferansiyel puls teknikleri geliştirilmiştir [36] (Şekil 2.2). Diferansiyel puls polarografi cihazlarında kullanılan uyarma işlemini göstermektedir. Burada her bir damlaya belli genlikte potansiyel pulsarı uygulanarak faradayik akım oranı artırılmaktadır. Cıva damlasının ömrünün son 50 ms'si içinde 50 mV' luk bir puls uygulanır. Burada damla ile puls arasında uyum sağlamak için, damla önceden belirlenen anlarda mekanik olarak azaltılır.

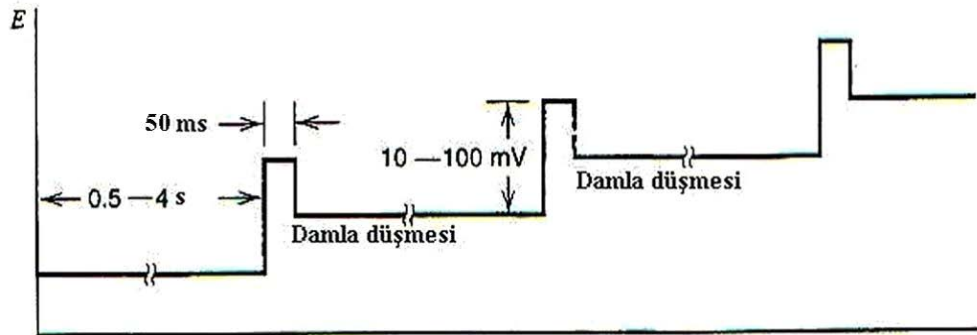


Şekil 2.2. Diferansiyel puls polarografisinde kullanılan uyarma sinyali [32]

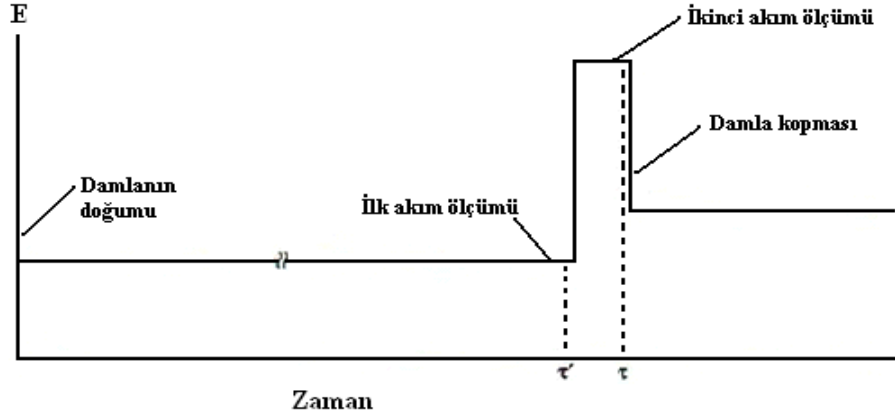
Şekil 2.2' te görüldüğü gibi potansiyel taraması süresince, cıva damlasına uygulanan sabit genlikteki pulstan iki tane akım ölçümü yapılmaktadır. Bunlardan birincisi, doğru akım pulstundan 16,7 ms önce (S_1), diğeri ise puls bitiminden 16,7 ms önce (S_4) yapılır. Puls başına akımdaki fark (Δi) doğrusal olarak artan (taranan) potansiyelin fonksiyonu olarak kaydedilir. Elde edilen diferansiyel eğri pik şeklinde olup yüksekliği derişimle orantılıdır. Normal polarografide S eğrisi elde edilirken diferansiyel puls polarografisinde pik bulunur. Bunun nedeni S eğrisinin yükselen kısmında Δi artarken, plato bölgesinde akımın sabit olması dolayısıyla $\Delta i = 0$ olmasıdır.

DPP normal puls polarografisine benzerdir, ancak farklı yönleri de vardır.

- Damlanın büyümesi boyunca uygulanan temel potansiyel, damladan damlaya değışkendir, doğrusal olarak artış gösterir.
- Doğrusal olarak artan potansiyele bindirilen puls yüksekliğı 10-100 mV arasında değışebilen, ancak her damlaya aynı olarak uygulanan bir değıerdir (Şekil 2.3).
- Her bir damlanın yaşam ömrü boyunca iki akım ölçülür. İlki puls uygulamadan önce ikincisi ise damla maksimum büyüklüğünde iken düşmeden hemen önce ölçülür (Şekil 2.4).
- Ölçülen bu iki akım arasındaki fark [$\delta i = i(t) - i(t')$] potansiyele karşı grafiğe geçirilir. Yönteme verilen ad diferansiyel akım ölçümlerinden türetilmiştir. Puls genliğı (yaklaşık 50 ms) ve damlanın büyümesi için bekleme periyodu (0,5-4s) normal puls metodundaki ile eşittir.



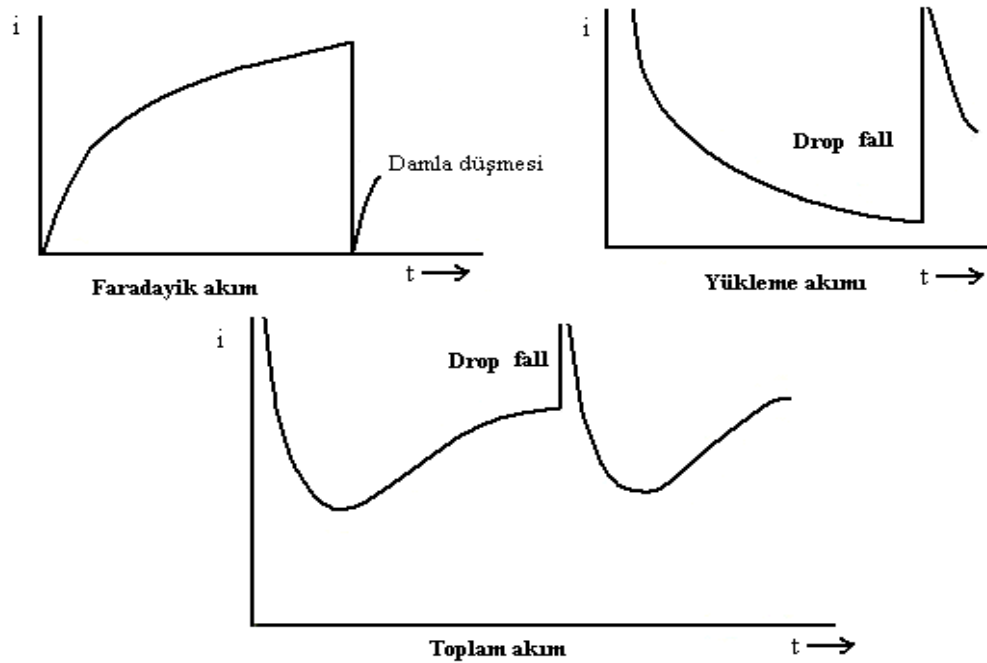
Şekil 2.3. Diferansiyel puls polarografisinde her damla için potansiyel polarogramı [27]



Şekil 2.4. Diferansiyel puls polarografisinde tek bir damlanın gelişimi [27]

Diferansiyel puls polarogramının bir ayrıcalığıda, yarı dalga potansiyelleri 0,04 V ile 0,05 V kadar farklı olan maddeler için bile pik maksimumları elde edilmesidir. Oysaki klasik ve normal puls polarografisi için dalga potansiyel farkı en az 0,2 V olmalıdır, aksi takdirde dalgalarda iyi bir çözüm elde edilemez. Ancak daha da önemlisi, diferansiyel puls polarografisi yöntemin hassasiyetini artırır. Diferansiyel puls polarografisinin yüksek duyarlılığı iki sebebi vardır. Bunlardan birincisi, faradayik akımın artması, ikincisi ise kapasitif akımın artmamasıdır. Birincisini açıklamak için, potansiyel aniden 50 mV arttırıldığında elektrodu çevreleyen yüzey tabakasında meydana gelen olayları inceleyelim. Bu tabakada elektroaktif bir tür var ise, analit derişimini yeni potansiyel tarafından istenen seviyeye azaltacak bir akım artışı gözlenir. Fakat bu potansiyel için gerekli olan denge derişimine ulaşılnca, akım difüzyonu karşılayacak bir seviyeye düşer ki, buna difüzyon kontrollü akım denir. Klasik polarografide başlangıçtaki bu akım artışı gözlenmez, çünkü ölçümün yapıldığı süre, bu anlık akımın süresinden büyüktür. Diğer taraftan puls polarografisinde akım ölçümü, bu akım artışı tamamen sona ermeden önce yapılır. Böylece ölçülen akım hem difüzyon kontrollü bir bileşeni hem de yüzey tabakasındaki derişimi Nerst Eşitliği'nin gerektirdiği bir değere indirecek bir bileşeni içerir. Yani toplam akım difüzyon akımından birkaç kat daha büyüktür. Damla düşünce, çözeltinin yeniden analit yönünden homojen hale geldiğine dikkat edilmelidir. Dolayısı ile verilen herhangi bir potansiyel değerinde, her bir potansiyel pulsuna eşlik eden benzer bir akım artışı olur. Elektroda potansiyel pulsı ilk uygulandığında, damla üzerindeki yük arttığı için

faradayik olmayan akımda da bir dalgalanma gözlenir. Bu akım zamanla üstel olarak azalır ve yüzey alanının çok az değiştiği damla ömrünün sonuna doğru sifira yaklaşır. Dolayısıyla akımı bu anda ölçmek sureti ile faradayik olmayan artık akım büyük oranda azaltılır ve sinyal/gürültü oranı da artar. Bunun sonucunda duyarlılık artar. Diferansiyel puls polarografisinde tersinir elektrot reaksiyonlarında 1×10^{-8} mol/L, tersinmez elektrot reaksiyonlarında ise 5×10^{-8} mol/L madde tayini yapılabilmektedir. Destek elektrolit derişimi normal puls polarografisine göre daha az olup 1×10^{-2} mol/L yeterlidir. Diferansiyel puls polarografisi tekniğinin normal puls polarografisinden farkı burada puls genliğinin sabit olmasıdır ve belli bir sürede doğrusal olarak artan bir potansiyel üzerine bindirilmiştir. Puls genliği 50-100 mV olabilir. Diferansiyel puls polarografisinde puls uygulamasının damla sonuna doğru yapılmasının nedeni damla büyüklüğünün maksimum olduğu anda faradayik akımın da maksimum, kapasitif akımın ise minimum olmasıdır (Şekil 2.5). Ayrıca pulslar damlayan cıva elektroduna damlama süresinin sonuna doğru uygulandığı için puls süresi içinde elektrodun alanı çok az değişir.



Şekil 2.5. Damlayan cıva elektrodunda damla ömrüne göre faradayik ve kapasitif akımın kıyaslaması [27]

2.1.4. Polarografide nitel analiz

Polarografi çalışmalarında uygulanan potansiyele karşı ölçülen akım grafiğe geçirildiğinde elde edilen S-dalgasından nitel analiz yapılır. Dalga yüksekliğinin yarısına karşılık gelen potansiyele ($I_{d/2}$ 'ye karşılık gelen potansiyel) yarı dalga potansiyeli adı verilir ve $E_{1/2}$ ile gösterilir. Polarogramlardan ölçülen $E_{1/2}$ değerleri, belirli bir ortamda her elektroaktif madde için nitel bir özellik taşır. Eğer iki ayrı türün $E_{1/2}$ 'leri aynı ortamda aynı ise, yani pikleri örtüşüyorsa, destek elektrolit ya da pH'nın değiştirilmesiyle veya kompleksleştirici ilavesiyle bu pikler birbirinden ayrılabilir. Voltametrde akım potansiyel ilişkisi ilk kez İlkoviç ve Heyrovsky tarafından türetilmiştir ve bu eşitlik "Heyrovsky-İlkoviç Eşitliği" olarak bilinir:

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{i_d - i}{i} \quad (2.2)$$

Burada;

E : Uygulanan potansiyel (mV)

$E_{1/2}$: Yarı dalga potansiyeli (mV)

i : Akım şiddeti (μ A)

i_d : Difüzyon akımı (μ A)

n : Aktarılan elektron sayısı

F : Faraday sabiti (96500 C/mol)

Ölçülen akım şiddeti i , difüzyon akımının yarısına eşit olduğunda yani $i = i_{d/2}$ olduğunda; $\log[(i_d - i) / i] = 0$ olur. Bunun sonucunda da $E = E_{1/2}$ olur. Yarı dalga potansiyeli $E_{1/2}$ belirli bir tür için sadece ortamın pH'ına ve destek elektrolitin cinsine bağlı iken. Elektroaktif maddenin derişimine bağlı değildir. İki elektroaktif maddenin birbirinden ayırık polarografik dalga verebilmeleri için bunların $E_{1/2}$ değerleri arasında 100 mV' tan fazla bir farkın olması gerekir. Bu farkın 100 mV' tan daha az olduğu durumlarda iki dalga birbiri ile örtüşür. Örtüşen dalgalar ortamın pH'ını veya destek elektrolit türünü değiştirerek ya da ortama analizi yapılacak maddelerden biri ile kompleks oluşturabilen bir ligand ekleyerek birbirinden ayrılabilir.

2.1.5. Polarografide nicel analiz

“Polarografide difüzyon akımı, sınır akımı ile artık akım arasındaki farktır ve büyüklüğü elektroaktif türün derişimi ile doğru orantılıdır. Ayrıca polarografik ve voltametrik analizlerde analitin ihmal edilecek kadar az kısmı elektrolizlendiğinden, madde tüketimi söz konusu değildir. Bu yüzden difüzyon akımı nicel analizde kullanılır. İlkoviç difüzyon akımının nelere bağlı olduğunu incelemiş ve

$$I_d = 607 n D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} C \quad (2.3)$$

denklemini türetmiştir. Burada;

I_d : Difüzyon akımı (μA)

D : Difüzyon katsayısı (cm^2 / s)

m : Cıva akış hızı (mg/s)

t : Bir damlanın kopma süresi (s)

C : İndirgenen maddenin derişimi ($mmol/L$)

n : Aktarılan elektron sayısı

Belirli bir analit için sabit şartlarda (sıcaklık, cıva akış hızı, damla ömrü)

$k = 607 n D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6}$ olup akım sadece derişime bağlı olur ve derişimle akım arasındaki ilişki aşağıdaki formülde verildiği gibi sadeleştirilebilir.

$$I_d = I_d = k \cdot C \quad (2.4)$$

Polarografide nicel analiz için aşağıdaki yöntemler kullanılır;

Doğrudan karşılaştırma yöntemi: Tayini yapılmak istenen analitin bilinen derişimde bir çözeltisi hazırlanır (standart çözeltisi) ve polarogramı alınır. Daha sonra derişimi hesaplanmak istenen çözeltinin polarogramı alınır. Her iki polarogramdan elde edilen difüzyon akımları karşılaştırılır ve orantı yolu ile bilinmeyen derişim hesaplanır.

Kalibrasyon grafiği yöntemi: Tayini yapılmak istenen analitin saf hali alınıp bundan bilinen derişimlerde standart çözeltiler hazırlanır. Daha sonra her birinin polarogramı alınır ve difüzyon akımları ölçülür. Derişimlere karşılık gelen difüzyon akımları grafiğe

geçirilerek kalibrasyon doğrusu elde edilir. Bilinmeyen derişimdeki çözeltilinin de polarogramı alınarak difüzyon akımı ölçülür ve elde edilen bu akım değerine karşılık gelen derişim kalibrasyon doğrusundan hesaplanır.

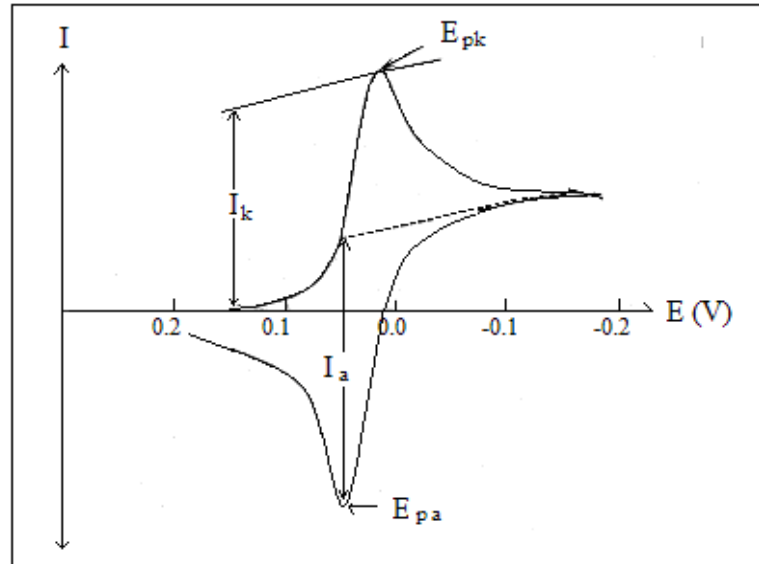
Standart ilave yöntemi: Tayini yapılmak istenen analit çözeltilisinin polarogramı alınıp difüzyon akımı ölçülür. Daha sonra bu analit çözeltilisine, aynı maddenin bilinen derişimdeki çözeltilisinden bilinen hacimlerde ilaveler yapılarak her ilaveden sonra polarogramlar alınır. Difüzyon akımları ölçülerek derişime karşı grafiğe geçirilir. Elde edilen doğrunun derişim eksenini kestiği noktanın akım eksenine olan uzaklığı bilinmeyen derişimine karşılık gelir [37].

İç standart ilave yöntemi: İç standart, bir analizde belirli miktarda numuneye ve kalibrasyon standartlarına ilave edilen maddedir. Bu yöntemle hem sistematik hem de rastgele hataların giderilmesi mümkündür. Gerek kalibrasyon doğrusu yöntemi ile çalışırken, gerek standart ekleme yöntemi kullanılırken cıva kolonunun yüksekliği, yani cıvanın kapilerden akış hızı değiştirilmemelidir. Kalibrasyon doğrusu oluşturulurken ortamın aynı iyonları içermesine dikkat edilmelidir. Standart ekleme yöntemi kullanılırken bazen ortama derişimi bilinen başka bir iyon eklenir ve bu iç standardın difüzyon akımı ile bilinmeyen derişimdeki maddenin difüzyon akımları birbiriyle karşılaştırılır. İç standart ekleme yöntemi ile iki kez polarogram elde etmek yeterlidir. Özellikle karışımların analizinde, iç standart ekleme yöntemi kullanmak daha uygundur. Sabit miktarda iç standart ve değişen miktarda analizi yapılacak madde içeren bir dizi çözelti ile kalibrasyon doğrusu da oluşturulabilir. Bu doğrunun analizde kullanılabilmesi için iç standardın kantitatif analizin yapılacağı çözeltiliye de aynı miktarda eklenmesi gerekir. Bu tür bir yöntemin kullanılması ile yapılan ölçümlerin ortamın sıcaklığında ve viskozitesinde olabilecek değişimlerden oluşan etkiler önlenmiş olur.

2.2. Dönüşümlü Voltametri (DV)

Dönüşümlü voltametri, elektroaktif maddelerin çalışılmasında en sık kullanılan metotlardan biridir. Bu metot genellikle bir bileşiğin, bir biyolojik materyalin veya bir elektrot yüzeyinin elektrokimyasal çalışmasında ilk başvurulan metottur. Dönüşümlü voltametri sonuçlarının geçerliliği, geniş bir potansiyel aralığında indirgenme-yükseltgenme olaylarının hızlı bir şekilde gözlenebilmesidir.

Bir dönüşümlü voltamogram, potansiyel taraması süresince çalışma elektrodunda akımın ölçülmesiyle bulunur.



Şekil 2.6. Örnek DV voltamogramı [38]

Dönüşümlü voltametri de ileri yönde tarama yapılırken madde indirgenirse katodik bir pik (E_{pk}), geri yöndeki potansiyel taramasında da bu indirgenmiş maddenin elektrotta tekrar yükseltgenmesinden dolayı anodik bir pik (E_{pa}) oluşabilir (Şekil 2.6).

Dönüşümlü voltametri de kapasitif akımın en az olduğu bölgede çalışılır. Duyarlılık 10^{-5} ile sınırlıdır. Yapılan taramanın hızı değiştirilebilir. Bunun sonucunda oluşan pik maksimumlarında, kaymalar ve şekil değişikliği oluşabilir. Voltamogramlarda gözlenen pik şekillerinden, çalışılacak maddenin hangi potansiyelde en uygun cevabı vereceği

anlaşılır. Dönüşümlü voltamogramların şekli ve yapısında seçilen potansiyel aralığının yanı sıra seçilen tarama hızı ile yapılan tarama sayısının da etkisi vardır. Bir dönüşümlü voltamogramdaki indirgenme yükseltgenme arasındaki gerilim farkı ΔE_p ile ifade edilir. ΔE_p bu değere yakın ise dönüşümlü (tersinir), uzak ise dönüşümsüz (tersinmez) olarak tanımlanır.

Bu yöntem prensip olarak redoks tepkimelerinin mekanizmalarını araştırmak ve bileşiklerin redoks özelliklerini karakterize etmek için kullanılır. Ayrıca; biyosentetik reaksiyonların incelenmesinde ve elektrokimyasal olarak sentezlenen serbest radikallerle ilgili çalışmalarda, çeşitli komplekslerde ve organo metalik bileşiklerde ligandın veya metal iyonunun özelliklerini açıklamak için kullanılmaktadır [39].

Dönüşümlü voltamogramların ayrıntılı incelenmesi ile bir sistemin hangi potansiyellerde ve kaç adımda yükseltgenip indirgendiğini, elektrokimyasal açıdan tersinir olup olmadığını, indirgenme ya da yükseltgenme ürünlerinin kararlı olup olmadığını, elektrot tepkimesinde rol alan maddelerin yüzeye tutunup tutunmadıklarını kolayca tespit etmek mümkündür ΔE_p değerleri elektrot tepkimesinin hız sabitinin bir ölçüsüdür.

Tersinir Sistemler

Elektroaktif madde ile ürün arasında dengenin hızlı kurulduğu sistemlere tersinir sistemler olarak adlandırılır. Elektrot tepkimesinin hızını belirleyen iki unsur vardır. Bunlar; elektron transferi ve kütle taşınmasıdır. Bir elektrot tepkimesinin tersinir olup olmadığını belirleyen en temel unsur, elektron transfer işleminin hızıdır [40].

Tersinir sistemlerde potansiyel tarama hızı ileri yönde artırılarak, belli bir potansiyelden sonra sınır akımına ulaşılır. Bu noktadan sonra akım potansiyel ile değişmez. Potansiyel taraması ters yönde yapıldığında anodik pik gözlenir [41]. DV verileri ile tepkimenin tersinirlik testi yapılabilir. DV' de tersinir tepkimeler için pik akımı Randles-Sevcik eşitliği ile bulunur;

$$I_p = 2,69 \times 10^5 n^{2/3} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (2.5)$$

Bu eşitlikte, I_p , pik akımı (amper); n , alınan-verilen elektron sayısı; A , elektrot yüzey alanı (cm^2); D , difüzyon katsayısı (cm^2/s); C , konsantrasyon (mol/cm^3); v , tarama hızı (V/s) olarak verilir [31]. Bu eşitliğe göre çizilen $I_p - v^{1/2}$ grafiği doğrusal ve orjinenin geçiyorsa sistem tersinirdir. Tersinir bir reaksiyonda anodik ve katodik pik akımları yaklaşık olarak birbirine eşittir. Gerçekte ise tersinir bir reaksiyonda katodik pik akımı anodik pik akımından biraz yüksektir. Bunun nedeni de elektroliz sırasında elektrodun yüzeyinde indirgenmiş olan elektroaktif maddenin bir kısmının çözeltiliye doğru difüzyonudur [39]. Tersinir sistemlerin birçoğunda eğer transfer edilen elektron sayısı (n) biliniyorsa, bir dönüşümlü voltamogramdan birçok bilgi elde edilebilir. Eğer çalışılan ortam içinde iki elektroaktif tür bulunuyorsa veya elektroaktif madde iki basamakta yükseltgeniyor veya indirgeniyorsa, indirgenme ve yükseltgenmeye ait tarama bölgesinde iki pik görülür. Böyle bir sistem tersinir ve her bir elektron transfer basamağındaki n değerleri aynı ise pik akımları eşit yükseklikte olur. Normal polarografik ve voltametrik sonuçları kullanarak hızlı bir elektron transferinden sonra nispeten yavaş tersinir veya tersinir olmayan bir kimyasal reaksiyonun varlığını fark etmek mümkün değildir. Dönüşümlü voltamogram ise böyle eşleşmiş bir kimyasal reaksiyonun varlığını ilk bakışta gösterir. Çünkü eğer böyle bir durum varsa ve başlangıç maddesi de elektroaktif çiftin yükseltgenmiş türü ise, anodik pikin yüksekliğinden bir miktar daha azdır ya da anodik pik gözlenmez. Yine aynı şekilde dönüşümlü bir voltamogramdan, hızlı bir elektron transfer reaksiyonundan önce gerçekleşen nispeten yavaş bir kimyasal reaksiyonun varlığı da fark edilebilir [40-41].

Tersinmez Sistemler

Eğer madde elektrotta tersinmez olarak indirgenir veya yükseltgenirse, elektrot yüzeyindeki elektron transfer mekanizması, yüksek bir aktivasyon enerjisine sahip yavaş bir basamağı içerir. Bu nedenle, elektrolizin meydana gelebilmesi için elektroda fazladan bir potansiyel uygulanmalıdır. Tersinmez sistemlerde elektron aktarım hızı yavaş olduğu için Nerst eşitliği kullanılmaz. Bu durumda ters tarama yönünde yükseltgenme piki oluşmaz. Aynı durum, elektron aktarım basamağını takip eden çok

hızlı bir kimyasal tepkime için de geçerlidir. Oluşan ürün hızlı bir şekilde başka bir maddeye dönüşeceği için anodik pik gözlenmeyebilir.

Dönüşümlü Voltametri de Tersinirlik Testleri

DV' de bir elektrot reaksiyonunun tersinir olup olmadığını belirlemek için bazı kriterler vardır [42]. Bunlar aşağıda özetlenmiştir:

Tersinir elektrot reaksiyonları için kriterler ;

1. $\Delta E_p = | I_{pa} / I_{pk} | = 1$
2. $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pk} = 0,059 / n \text{ V}$
3. E_{pk} veya E_{pa} v' dan bağımsızdır.
4. I_{pk} veya I_{pa} , $v^{1/2}$ ile doğrusal olarak değişir.

Bir sistemin tersinir olması için yukarıdaki kriterlerin hepsinin geçerli olması gereklidir. I_p ve E_p ' nin v ile ilişkisi yeteri kadar geniş bir tarama hızı aralığında test edilmelidir. Yukarıdaki kriterlerden biri veya birkaçı geçerli değilse elektrot reaksiyonu ya tersinmez ya da kabul edilenden daha kompleks bir mekanizmaya sahiptir.

Tersinmez elektrot reaksiyonları için kriterler;

1. I_{pk} , $v^{1/2}$ ile doğrusal olarak değişir
2. Anodik pik gözlenmez.
3. $E_p - E_{p/2} = 0,048 / \alpha n \text{ V}$ tur
4. E_{pk} , 25°C ' de tarama hızındaki 10 birimlik artmada $-30/n \text{ mV}$ 'a kadar kayar

Tersinmez sistemlerde yukarıdaki kriterlerin tümünün sağlanması gereklidir.

Yarı - tersinir elektrot reaksiyonları için kriterler;

1. I_p , $v^{1/2}$ ile artar ancak doğrusal değildir.
2. $I_{pa} / I_{pk} = 1$ ' dir (eğer $\alpha_k = \alpha_a = 0,5$ ise).
3. ΔE_p , $0,059/n$ değerinden oldukça büyüktür ve tarama hızının artışı ile artar.
4. E_{pk} , v' nin artması ile negatif değerlere kayar.

Bazı durumlarda bir elektrot tepkimesini izleyen çözelti tepkimesinin ürünleri de elektroaktif ise dönüşümlü voltamogramlarda bunlara ait pikler de gözlenir ve böylece elektron aktarımına ait olayın mekanizması aydınlatılabilir.

DV’de Elektrot Yüzeyindeki Adsorpsiyonun İncelenmesi

Çözünmüş ve Adsorbe Olmuş Türlerin Elektroaktif Olduğu Durumlar

Bu durum için kütle transferiyle ilgili kısmi diferansiyel denklemler kullanılacağı için matematiksel türetmeler oldukça karmaşıktır. Burada ya sadece adsorbe olmuş reaktantın (O) veya sadece adsorbe olmuş ürünün (R) tersinir elektron transfer reaksiyonu durumları incelenmektedir.

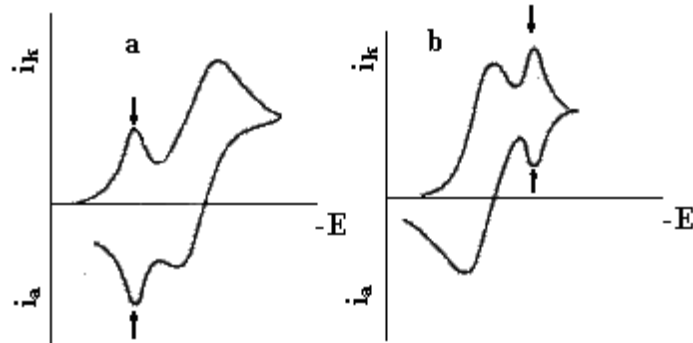
a) Reaktantın (O) Kuvvetli Adsorpsiyonu:

Adsorbe olmuş O’ dan dan dolayı reaktan sonra arka pik gözlenir [43]. Bu arka pikin ortaya çıkma sebebi, adsorbe olmuş türün çözültideki türe göre daha kararlı olmasıdır. Bu durumun genel tartışması ürünün (R) adsorpsiyonunda yapıldığı gibidir. İleri taramadaki difüzyon piki, O’ nun adsorpsiyonundan etkilenmez. Çünkü tarama başlamadan önce elektrot yüzeyinden her uzaklıkta $C_0(x,t)=C_0^*$ dur ve adsorpsiyon dengesine ulaşıldığı kabul edildiği için difüzyon dalgası değişmez. Çözünmüş “O” nun indirgenmesi muhtemelen hem serbest yüzeyde hem de adsorpsiyon tabakasında meydana gelir. Bu arka pikin şekli paraboliktir ve bir önceki bölümde tartışılan adsorpsiyon dalgasının özelliğini gösterir.

Adsorpsiyonun şiddetli olmaması halinde ise, adsorpsiyon piki, difüzyon piki ile çakışacağından dolayı, adsorpsiyon olup olmadığını anlamak için başka bir yöntemle başvurulur. Bu yöntemle göre, $\log i_p$ değerleri, $\log v'$ ye karşı grafiğe geçirilir. Ürün veya analit, elektrot yüzeyine adsorbe oluyorsa, DV’ de pik akımı tarama hızının karekökü ile orantılı olarak değişmez ve $\log i_p$ ’nin $\log v$ ile değişiminin eğimi 0,5’ten farklı olur [31].

b) Ürünün (R) Kuvvetli Adsorbsiyonu:

Başlangıçta elektrot yüzeyindeki konsantrasyon, ana çözelti konsantrasyonu ile aynıdır ve R' nin adsorpsiyonu sıfırdır. Bu durumda, O ve R'nin difüzyon eşitlikleri, toplam madde göçü eşitliği, adsorpsiyon izotermi ve adsorpsiyon tersinir kabul edildiği için Nernst eşitliği ile çözülür. Bu çözümlerden elde edilen sonuçlar şöyle özetlenebilir. Bir ön dalga veya ön pik gözlenir ki bu pikin davranışı yalnız adsorbe olmuş türlerin elektroaktif olduğu durumda gözlenen pikin davranışı ile aynıdır [44]. Bu pik difüzyon kontrollü pikten daha pozitif potansiyellerde gözlenir. Çünkü R' nin adsorpsiyon serbest enerjisi, O'nun adsorbe olmuş R' ye indirgenmesini, çözünmüş R' ye indirgenmesine göre kolaylaştırır. Adsorpsiyon olmadığı durumdaki dalgaya benzemesine rağmen difüzyon dalgasının şekli değişir (Şekil 2.7). Bu ön pikin yüksekliği tarama hızıyla doğru orantılı olduğu için ve difüzyon pikinin akımı ise tarama hızının karekökü ile arttığı için $(i_p)_{ads}/(i_p)_{dif}$ oranı tarama hızı arttıkça artar.



Şekil 2.7. a) Ürünün kuvvetli adsorpsiyonunda gözlenen ön pik [36]
b) reaktantın kuvvetli adsorpsiyonunda gözlenen arka pik

3.BÖLÜM

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Polarografi Cihazı

Diferansiyel puls polarografisi (DPP) ve dönüşümlü voltametri (DV) ölçümleri için BAS model elektrokimyasal analizör (Bioanalytical Systems, epsilon potentiostat/galvanostat, USA) kullanılmıştır.

Cihazının ana kısımları Resiml 3.1' de görülmektedir.



Resiml 3.1. BAS model elektrokimyasal analizör

3.2. Hücre Ve Elektrotlar

Çalışmada üç elektrotlu bir sistem kullanılmıştır. Çalışma elektrodu olarak damlayan cıva elektrodu, referans elektrot olarak Ag/AgCl (3 M NaCl) elektrot kullanılmıştır.

3.2.1. Damlayan cıva elektrot

Diferansiyel puls polarografisi çalışmalarında, çalışma elektrodu olarak kullanılan damlayan cıva elektrodu ile dönüşümlü voltametri çalışmalarında yer alan asılı cıva damla elektrodunda kullanılan cıva Merck' ten sağlanmıştır. Damlayan cıva elektrot cam hücreye yerleştirilir. Damlayan cıva elektrotta damla büyüklüğü, cıva hazne yüksekliği ve kapiler çapına bağlıdır. Damla hızı zaman ayarlı mekanik bir vurucu ile ayarlanır. Bu şekilde 0,5, 1 ve 2 saniye ömrü olan damlalar oluşturulabilir. Tüm çalışmalarda kolon yüksekliği ve cıva haznesi sabit bir yükseklikte tutulmuştur.

3.2.2. Ag /AgCl elektrot

Diferansiyel puls polarografisi ve dönüşümlü voltametri çalışmalarında referans elektrot olarak Ag/AgCl (3 M NaCl) kullanılmıştır ve cam hücre içerisinde bulunan analit çözeltisine temas edecek şekilde hücreye bağlanmıştır.

3.2.3. Karşıt elektrot

Platin tel karşıt elektrot olarak kullanılmış ve cam hücre içerisinde bulunan analit çözeltisine temas edecek şekilde hücreye bağlanmıştır.

3.2.4. Azot gazı

Polarogramlarda oksijenin indirgenmesine ait dalgalar gözlenebilir. Bundan dolayı bir maddenin polarogramı alınmadan önce, ortamda çözünmüş olan oksijenin uzaklaştırılması gerekir. Bunun için maddenin çözeltisinden inert bir gaz olan azot gazı geçirilmiştir.

3.3. pH Metre

pH ölçümleri WTW pH/ION 735 (WTW Instruments, Germany) model dijital pH metre kullanılarak yapılmıştır.

3.4. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrometresi

Spektroskopide tayin çalışmaları UV-VİS Spektrometresi (Perkin Elmer, Lambda 25 USA.) model UV-GB kullanılarak yapılmıştır.

3.5. Cıvanın Temizlenmesi

Damlayan cıva elektrodunda kullanılan cıva yüksek saflıkta olup Merck'ten temin edilmiştir. Puls polarografisi tekniği ile 1×10^{-6} - 1×10^{-7} mol/L madde tayini yapıldığından kullanılan cıvanın oldukça saf olması gerekmektedir. Bu sebepten dolayı yüksek saflıkta cıva kullanılmış ve kirlenen cıva aşağıda açıklandığı gibi temizlenmiştir. Kirlenen cıva bir behere alındıktan sonra bagele karıştırılarak üzerinden bir süre çeşme suyu geçirilmiştir. Bir litrelik cam mezüre çeşme suyu konmuş ve üzerindeki çeşme suyu uzaklaştırılan cıva, mezürün üst kısmında tutulan ince platin tel süzgeçten geçirilerek yıkanmıştır. Mezürdeki çeşme suyu uzaklaştırılıp, süzülen cıva behere aktarıldıktan sonra çeşme suyu ile yıkama işlemi aynı şekilde dört defa tekrarlanmıştır. Daha sonra bir litrelik mezür, 15 mol/L'lık derişik HNO₃ çözeltisinden 1:5 oranında (HNO₃:H₂O) seyreltilerek hazırlanmış olan 3 mol/L HNO₃ çözeltisi (cıva yıkama suyu) ile doldurulmuş ve cıva platin tel süzgeçten mezür boyunca zerrecikler halinde süzölmüştür. Cıva yıkama suyu ile yıkama işlemi dört kez tekrarlanmıştır. Temizlenen cıva, platin tel süzgeçten geçerek içine saf su konmuş olan mezür boyunca zerrecikler halinde süzölmüştür. Bu işlem cıvanın asitliğı giderilinceye kadar tekrarlanmıştır. Asitliğı giderilen temiz cıva bir behere alınmış ve süzgeç kâğıdı ile iyice kurutulmuştur. Kurutulan cıva, cıva haznesine alındıktan sonra herhangi bir safsızlık içerip içermediğı alınan polarogramlar incelenerek kontrol edilmiştir.

3.6. Reaktifler Ve Özellikleri

Deneylerde kullanılan çözeltilerin hazırlanmasında ve bütün çalışma boyunca saf su kullanılmıştır. Bütün reaktifler analitik saflıktadır. Damlayan cıva elektrodunda kullanılan cıva yüksek saflıkta olup Merck' ten sağlanmıştır. Kullanılan reaktifler ve özellikleri aşağıda verilmiştir:

- Karminik asit: (C₂₂H₂₀O₁₃), 492,38 g/mol, Merck
- Perklorik asit: (HClO₄), d=1,60 kg/L, %60, 100, 46 g/mol, Merck
- Hidroklorik asit: (HCl), d=1,19 kg/ L; %37; 36,46 g/mol, Sigma-Aldrich
- Asetik asit: (CH₃COOH), d=1,05 kg/ L; %100'lik; 60,05 g/mol, Sigma-Aldrich
- Fosforik asit: (H₃PO₄), d=1,71 kg/L; 98 g/mol, %85, Riedel
- Borik asit: (H₃BO₃), 61,83 g/mol, Sigma
- Sodyum hidroksit: (NaOH), 40 g/mol, Sigma-Aldrich
- EDTA: (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈.2H₂O), 372,24 g/mol, %99-100 saflıkta, Sigma
- Demir(III)klorür heksahidrat: (FeCl₃.6H₂O), 270,30 g/mol, Merck
- Krom(III)klorür heksahidrat: (CrCl₃.6H₂O), 266,45 g/mol, Merck
- Kurşun(II)nitrat: (Pb(NO₃)₂) , 331,20 g/mol, Merck
- Çinko nitrat heksahidrat: (Zn(NO₃)₂.6H₂O), 297,4 g/mol, Merck.
- Kadmiyum nitrat tetrahidrat: (CdN₂O₆. 4H₂O), 308,47 g/mol, Sigma-Aldrich
- Kobalt (II) nitrat heksahidrat: (CoN₂O₆.6H₂O), 291,03 g/mol, Sigma-Aldrich
- Nikel sülfat heksahidrat: (NiSO₄. 6H₂O), 262,85 g/mol, Sigma-Aldrich
- Sodyum sülfid: (Na₂SO₃), 126,04 g/mol, Sigma-Aldrich
- Magnezyum nitrat heksahidrat: (Mg(NO₃)₂. 6H₂O), 256,41 g/mol, Sigma
- Asetonitril: (C₂H₇N), d=0,78 kg/ L, 41,05 g/mol, Sigma-Aldrich
- Etanol: (C₂H₆O), d=0,788 kg/ L, 46,07 g/mol, Sigma-Aldrich
- Mangan sülfat monohidrat : (MnSO₄.H₂O), 169,02 g/mol, Sigma
- Kobalt(II)nitrat heksahidrat: (Co(NO₃)₂. 6 H₂O) , 291,03 g/mol, Merck
- Kalsiyum nitrat tetrahidrat: (Ca(NO₃)₂. 4H₂O), 236,15, Sigma
- Bakır (II)nitrat monohidrat: (Cu(NO₃)₂. H₂O), 232,5 g/mol, Merck
- Cıva(II)nitrat heksahidrat: (HgN₂O₆. 6H₂O), 342,62 g/mol, Sigma-Aldrich
- Sodyum klorür: (NaCl), 58,44 g/mol, Sigma
- Sodyum nitrit : (NaNO₂), 68,99 g/mol, Merck
- Baryum klorür dihidrat: (BaCl₂.2H₂O), 244,263 g/mol, Merck
- Alüminyum klorür heksahidrat: (AlCl₃.6H₂O), 241,431 g/mol, Merck
- Selenyum dioksit: (SeO₂),110,959. g/mol, Sigma
- Tannik asit: (C₇₆H₁₅O₆), 1701,2. g/mol, Merck.
- Gallik asit: (C₇H₆O₅), 170,12. g/mol, Merck.

3.6.1. Çözeltilerin hazırlanması

0,01 mol/L Karminik asit stok çözeltisi

0,49 g KA katısı tartılmış ve saf su ile çözüldükten sonra 100 mL' lik balon jodede saf su ile 100 mL' ye tamamlanmıştır.

0,1 mol/L Gallik asit stok çözeltisi

1,70 g Gallik asit katısı tartılmış ve saf su ile çözüldükten sonra 100 mL' lik balon jodede saf su ile 100 mL' ye tamamlanmıştır.

0,01 mol/L Tannik asit stok çözeltisi

1,70 g Tannik asit tartılmış ve saf su ile çözüldükten sonra 100 mL' lik balon jodede saf su ile 100 mL' ye tamamlanmıştır.

0,1 mol/L HCl (%37 'lik $d=1,19$ g/mL)

HCl çözeltisinden 0,83 mL ölçülü balona alınarak saf su ile 100 mL' ye tamamlanmıştır.

Britton-Robinson (BR) tamponunun hazırlanması

Britton-Robinson tampon çözeltisinin hazırlanması için 2,3 mL saf asetik asit, 2,7 mL %85' lik fosforik asit ve 2,5 g borik asit karıştırılıp saf su ile 1 L' ye tamamlanmıştır. Hazırlanan B-R tamponu 0,1 M NaOH veya 0,1 M HCl çözeltisinden damla damla ilave edilerek pH' sı istenilen değerlere ayarlanmıştır.

0,1 mol/L EDTA çözeltisi

3,7724 g EDTA' nın sodyum tuzu tartılmış ve bir miktar saf su ilave edildikten sonra ısıtılarak çözülmüştür. Daha sonra ölçülü balona alınıp 100 mL'ye tamamlanmıştır.

0,1 mol/L NaOH çözeltisi

0,40 g NaOH katısı tartılmış ve saf su ile çözüldükten sonra 100 mL' lik balon jodede saf su ile 100 mL' ye tamamlanmıştır.

Çeşitli iyonların stok çözeltilerinin hazırlanması

Öncelikle deneylerde kullanılan iyonların 0,01 mol/L' lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. 1×10^{-3} , 1×10^{-4} 'lık çözeltiler stok çözeltilerin seyreltilmesiyle günlük olarak hazırlanmıştır. Çünkü seyreltik çözeltilerin derişimleri zamanla değışebilmektedir. Çalışmalarda kullanılan bütün stok çözeltiler aşağıda açıklandığı gibi hazırlanmıştır.

0,01 mol/L Cr(III) çözeltisi: 0,1332 g $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılıp saf su ile çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 50 mL' ye tamamlanmıştır.

0,01 mol/L Pb(II) çözeltisi: 0,331 g $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ tartılıp saf su ile çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 100 mL' ye tamamlanmıştır.

0,01 mol/L Zn çözeltisi: 0,1487 g $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılıp saf su ile çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 50 mL' ye tamamlanmıştır.

0,01 mol/L Cd(II) çözeltisi: 0,308 g $\text{CdN}_2\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ tartılıp saf suyla çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 100 mL' ye tamamlanmıştır.

0,01 mol/L Hg(II) çözeltisi: 0,857 g $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılıp saf suyla çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 250 mL' ye tamamlanmıştır.

0,01 mol/L Co(II) çözeltisi: 0,1455 g $\text{CoN}_2\text{O}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılıp saf suyla çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 50 mL' ye tamamlanmıştır.

0,01 mol/L Ni(II) çözeltisi: 0,066 g $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılıp saf suyla çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 25 mL' ye tamamlanmıştır.

0,01 mol/L Cd çözeltisi: 0,308 g $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ tartılıp saf su ile çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 100 mL' ye tamamlanmıştır.

0,01 mol/L Mg çözeltisi: 0,128 g $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılıp saf su ile çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 50 mL' ye tamamlanmıştır.

0,01 mol/L Fe(III) çözeltisi: 0,135 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılıp saf su ile çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 50 mL' ye tamamlanmıştır.

0,01 mol/L Mn(II) çözeltisi: 0,084 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ tartılıp saf su ile çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 50 mL' ye tamamlanmıştır.

0,01 mol/L Ca çözeltisi: 0,236 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ tartılıp saf su ile çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 100 mL' ye tamamlanmıştır.

0,01 mol/L Cu(II) çözeltisi: 0,232 g $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ tartılıp saf su ile çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 100 mL' ye tamamlanmıştır.

0,01 mol/L NO_3^- çözeltisi: 0,236 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, tartılıp saf su ile çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 100 mL' ye tamamlanmıştır.

0,01 mol/L Cl^- çözeltisi: 0,5844 g NaCl, tartılıp saf su ile çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 100 mL' ye tamamlanmıştır.

0,01 mol/L SO_3^{2-} çözeltisi: 0,126 g Na_2SO_3 , tartılıp saf su ile çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 100 mL' ye tamamlanmıştır.

0,01 mol/L NO_2^- çözeltilisi: 0,069 g NaNO_2 tartılıp saf su ile çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 100 mL' ye tamamlanmıştır.

0,01 mol/L Ba çözeltilisi: 0,122 g $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılıp saf su ile çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 50 mL' ye tamamlanmıştır.

0,01 mol/L Al çözeltilisi: 0,121 g $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, tartılıp saf su ile çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 25 mL' ye tamamlanmıştır.

0,01 mol/L Se(IV) çözeltilisi: 0,055 g SeO_2 tartılıp saf su ile çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 50 mL' ye tamamlanmıştır.

4. BÖLÜM

DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Karminik Asidin Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi, Tayini Ve Analitik Uygulamaları

Çalışmanın ilk kısmında karminik asidin polarografik tayini için en uygun destek elektrolit ortamı belirlenmiştir. Ardından karminik asidin tayinine pH'nın etkisi incelenmiştir. Bazı iyonların karminik asit tayinine girişim etkileri incelenmiş, şeker ve süt numunelerindeki karminik asidin tayini polarografik yöntemle yapılmıştır. Şeker numunesindeki karminik asit tayini hem polarografik hem de spektrofotometrik yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca karminik asidin voltametrik davranışını incelemek için dönüşümlü voltametri (DV) kullanılmıştır.

4.1.1. Destek elektrolit seçimi

Karminik asidin tayini için, pH 2-13 aralığında Britton-Robinson tamponu (BRT) kullanılmıştır. Yukarıda bahsedilen destek elektrolitten polarografi hücresine 10,0'ar mL alınmış ve çözelti içinde çözünmüş halde bulunan oksijeni uzaklaştırmak için içerisinde 5 dakika % 99,999 saflıkta azot gazı geçirilmiş polarogramı kaydedilmiştir. Karminik asidin standart çözeltisinden polarografi hücresine ard arda yapılan her ilaveden sonra hücreden tekrar azot gazı geçirilmiş ve polarogramlar kaydedilmiştir. Polarogramlar 5 mV/s potansiyel tarama hızı ve 50 mV/s puls genliği uygulanarak alınmıştır.

Karminik asidin tayini için yapılan çalışmalar neticesinde pH 2 B-R tamponunda standart karminik asit ilaveleriyle pik akımlarındaki artışların orantılı olduğundan tayin için uygun ortam olduğuna karar verilmiştir.

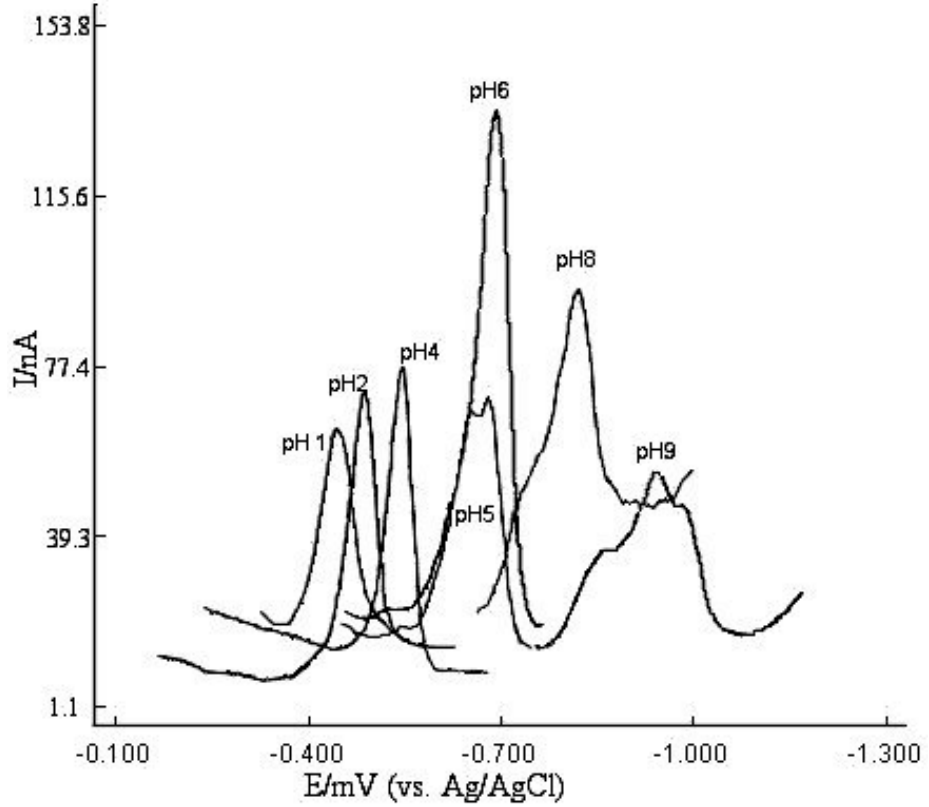
4.1.2. pH etkisi

B-R tamponu ile yapılan pH taraması neticesinde karminik asidin indirgenmesinin pH'ya bağlı olduğu tespit edilmiştir. Bunun sonucunda pH=1 den pH=12'ye kadar geniş B-R tampon aralığında çalışılmıştır (Şekil 4.1). pH etkisi incelemek için hücreye 10 mL B-R tamponu konulduktan sonra hücreden azot gazı beş dakika süreyle geçirilmiş ardından hücreye 0,1 mL 1×10^{-3} mol/L standart karminik asit çözeltileri ard arda ilave edilerek polarogramlar alınmıştır.

Karminik asit tayini için kaydedilen pH 1 B-R tampon çözeltisi içerisinde alınan diferansiyel puls polarogramda -436 mV'ta keskin ve standart eklemelerde düzensiz artış gösteren bir pik görülmüştür. pH 2 elektroliti ortamında alınan polarogramda -489 mV'ta keskin ve standart eklemelerde düzenli artış gösteren bir pik tespit edilmiştir. pH 3 ortamında alınan polarogramda -515 mV'ta ilk altı standart eklemede artış gösteren sonraki eklemelerde artış göstermeyen keskin bir pik gözlenmiştir. pH 4'te ise -190 mV ve -580 mV'ta iki ayrı pik gözlenmiş. Bu piklerden -190 mV'taki ilk üç standart eklemede artış gösterirken sonraki eklemelerde artış göstermeyen yayvan bir pik elde edilmiş; -580 mV'taki pik ilk beş standart eklemede artış gösterirken diğer eklemelerde artış göstermeyen keskin bir pik tespit edilmiştir. pH 5'te alınan polarogramda -250 mV, -667 mV, -1110 mV'ta olmak üzere üç potansiyelde üç ayrı pik gözlenmiştir. -250 mV'taki pik ilk standart eklemede artış gösterirken diğer standart eklemelerde artış göstermeyen yayvan bir pik olarak tespit edilmiştir. -667 mV'taki pik standart eklemelerde düzensiz artış göstermekte,-1110 mV 'taki pik ise standart eklemelerde küçük artış gösteren yayvan bir pik olarak gözlenmiştir. pH 6 da ise -180 mV,-700 mV' ta iki ayrı pik gözlenmiş bunlardan -180 mV'ta gözlenen pik standart eklemelerde pik artışı az olan yayvan bir pik iken -700 mV 'taki pik ilk beş standart eklemede düzensiz bir artış göstermekle beraber sonraki eklemelerde artış göstermeyen keskin bir piktir. pH 8 de alınan polarogramda -180mV,-830mV'ta standart eklemelerde düzensiz artış gösteren iki pik gözlenmiştir. pH 9'da alınan polarogramda -498 mV, -942 mV'ta yayvan ve standart artışları düzensiz iki yayvan pik gözlenmiştir. pH 10 da alınan polarogramda -527 mV , -975 mV' ta standart eklemelerde düzensiz artış gösteren yayvan iki pik gözlenmiştir. pH 12 polarogramda -810 mV, -1106 mV' ta standart

eklemelerde düzensiz artış gösteren iki yayvan pik gözlenmiştir. Bu yapılan çalışmalar sonucunda pH 1 - 12 BR tamponu elektroliti ortamında karminik asitin indirgenmesine ait piklerden, tayin için en uygun olabilecek pikler Şekil 4.1 'de gösterilmiş çalışmaların verileri tablo 4.1 'de özetlenmiştir.

Sonuç olarak pH 2 B-R tamponundaki karminik asitin indirgenmesine ait -489 mV'taki pikin hücreye ard arda standart karminik asit çözeltilisinin eklemesi ile pik akımları derişimle doğrusal bir artış göstermiş ve pik şeklinin düzgün-keskin olduğu tespit edilmiştir.



Şekil.4.1. 2×10^{-5} mol/L karminik asidin pH 1-9 aralığında B-R tamponundaki diferansiyel puls polarogramları (5 mV/s potansiyel tarama hızı ve 50 mV/s puls genliği)

Tablo 4.1. 2×10^{-5} mol/L karminik asidin Britton-Robinson tamponunda polarografik davranışının incelenmesi (5 mV/s potansiyel tarama hızı ve 50 mV/s puls genliği)

İyon	pH	E-pik(mV)	İpik(nA)	Pik şekli	Pik davranışı
Karminik Asit	pH=1	-436	75	Keskin	Standart eklemelerde artışlar orantısız
	pH=2	-489	77	Keskin	Standart eklemelerde artışlar orantılı
	pH=3	-515	74	Keskin	Standart eklemelerde artışlar altı eklemeye kadar düzenli sonraki eklemelerde artışlarda artma gözlenmemekte
	pH=4	-190	10	Yayvan	Standart eklemelerde artışlar orantısız
		-580	79	Keskin	Standart eklemelerde ilk beş eklemeye düzenli artış sonraki eklemelerde artış düzensiz artmakta
	pH=5	-250	5	Yayvan	İlk standart eklemeye artış gözlenirken sonraki eklemelerde artış gözlenmemekte
		-667	65	Yayvan	Standart eklemelerde artışlar düzensiz
		-1110	10	Yayvan	Standart eklemelerde artışlar küçük ve düzensiz
	pH=6	-180	15	Yayvan	Standart eklemelerde artışlar küçük ve düzensiz
		-700	140	Keskin	İlk beş standart eklemelerde artışlar düzenli
	pH=8	--180	15	Yayvan	Standart eklemelerde artışlar orantısız
		-830	95	Keskin	Standart eklemelerde artışlar orantısız
	pH=9	-498	10	Yayvan	Standart eklemelerde artışlar orantısız
		-942	45	Yayvan	Standart eklemelerde artışlar orantısız
	pH=10	-527	20	Yayvan	Standart eklemelerde artışlar orantısız
		-975	15	Yayvan	Standart eklemelerde artışlar orantısız
	pH=12	-810	10	Yayvan	Standart eklemelerde artışlar orantısız
		-1106	15	Yayvan	Standart eklemelerde artışlar orantısız

4.1.3. Karminik asidin destek elektrolitteki tayini

Karminik asidin tayini için çalışma ortamı olarak pH 2 B-R tamponu belirlendikten sonra karminik asidin kantitatif tayini çalışılmıştır. Potansiyel taraması 0,0 mV ile -1000mV aralığında yapılmıştır. Hücreye 10 mL B-R tamponu eklendikten sonra hücreden azot gazı beş dakika süreyle geçirilmiş sonra hücreye 0,1 mL 1×10^{-3} mol/L standart karminik asit çözeltisinden ard arda ilave edilerek karminik asit tayini yapılmıştır. pH 2 B-R tamponu elektrolitindeki derişimi 1×10^{-5} mol/L olan karminik asit miktarı; standart ekleme yöntemiyle, %95 güven seviyesinde, deney 6 kez tekrarlandığında $(1,01 \pm 0,02) \times 10^{-5}$ mol/L olarak bulunmuştur.

Tablo 4.2. pH 2 B-R tamponunda 1×10^{-5} mol/L (hücre içindeki derişim) karminik asit miktar tayini

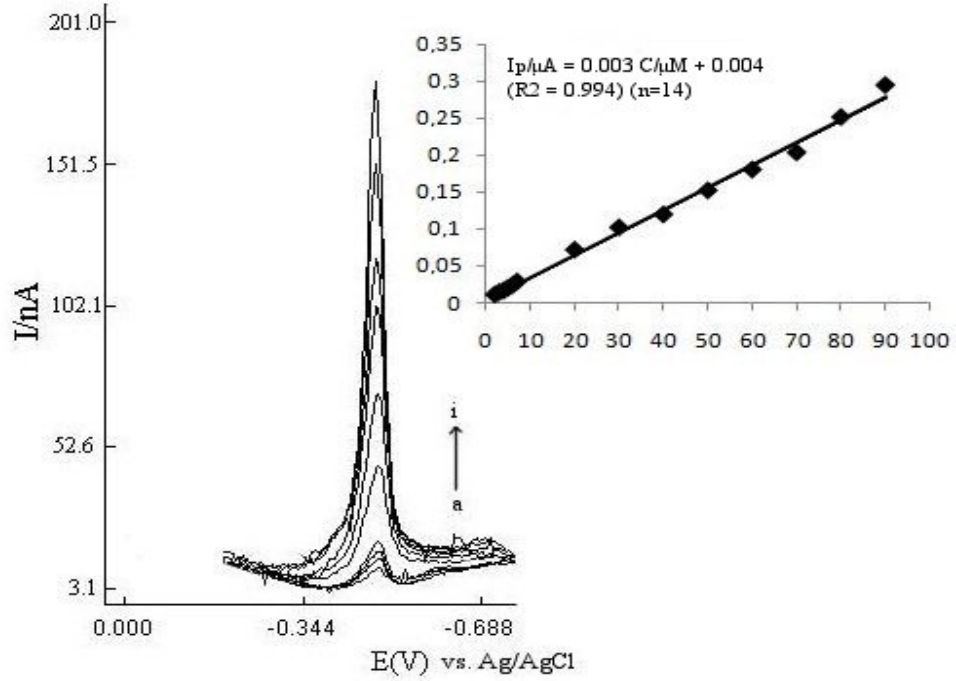
Eklenen Karminik asit derişimi (mol/L)	Bulunan Karminik asit derişimi (mol/L) \bar{X}	s	$\bar{X} \pm ts/\sqrt{N}$ (mol/L)
1×10^{-5}	$1,01 \times 10^{-5}$	$1,01 \times 10^{-7}$	$(1,01 \pm 0,02 \times 10^{-5})$

%95 GS, N=6

Karminik asit tayin edilebilir aralığını belirlemek için kalibrasyon çalışmaları yapılmıştır. Karminik asidin 1×10^{-5} , 1×10^{-4} ve 1×10^{-3} mol/L'lık çözeltileri hazırlanmıştır. Karminik tayin sınırını belirlemek için ilk olarak 1×10^{-5} 'lık mol/L' karminik asit çözeltisinden 10,0 mL B-R tamponu bulunan elektrolit içine 0,1'er mL'lik ilaveler yapılmış, fakat bu derişimdeki karminik asit piki DPP ile gözlenememiştir. Tayin aralığını belirlemek için 1×10^{-4} ve 1×10^{-3} mol/L'lık karminik asit çözeltilerinden de standart ilaveler yapılarak polarogramlar kaydedilmiş ve kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Şekil 4.2'de karminik asidin bazı derişimlerde alınan polarogramları gösterilmiştir. Yapılan çalışmalardan pH 2 B-R tamponu ortamında hücreye farklı derişimlerdeki karminik asit çözeltisinin standart eklemeleriyle 1×10^{-6} mol/L – 9×10^{-5} mol/L aralığında pik akımı ve derişim arasında doğrusal bir ilişki tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda gözlenebilir sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırası ile $1,6 \times 10^{-7}$ ve $5,5 \times 10^{-7}$ mol/L olarak tespit edilmiştir. $10Sb/m$ ve $3Sb/m$ formülleri

kullanılarak bulunmuştur. m kalibrasyon grafiğinin eğimi, Sb ise elektrolit çözeltinin akımının standart sapmasıdır. DPP' nin yüksek duyarlılığıyla çok iyi bir tekrarlanabilirlik elde edilmiştir.



Şekil 4.2. Karminik asidin farklı derişimlerdeki diferansiyel puls polarogramları.

(5 mV/s potansiyel tarama hızı ve 50 mV/s puls genliğinde)

- 10,0 mL pH 2 B-R tampon çözeltisi
- a + 0,2 mL 1×10^{-4} mol/L karminik asit
- b + 0,3 mL 1×10^{-4} mol/L karminik asit
- c + 0,4 mL 1×10^{-4} mol/L karminik asit
- d + 0,5 mL 1×10^{-4} mol/L karminik asit
- e + 0,1 mL 1×10^{-3} mol/L karminik asit
- f + 0,1 mL 1×10^{-3} mol/L karminik asit
- g + 0,1 mL 1×10^{-3} mol/L karminik asit
- h + 0,1 mL 1×10^{-3} mol/L karminik asit
- i + 0,1 mL 1×10^{-3} mol/L karminik asit

Bu grafiğe ait denklem ile verilmiştir.

$$I_p (\mu A) = 0,03C (\mu mol/L) + 0,004 (R^2 = 0,994) (n=14) \quad (4.1)$$

4.1.4. Girişim etkisi

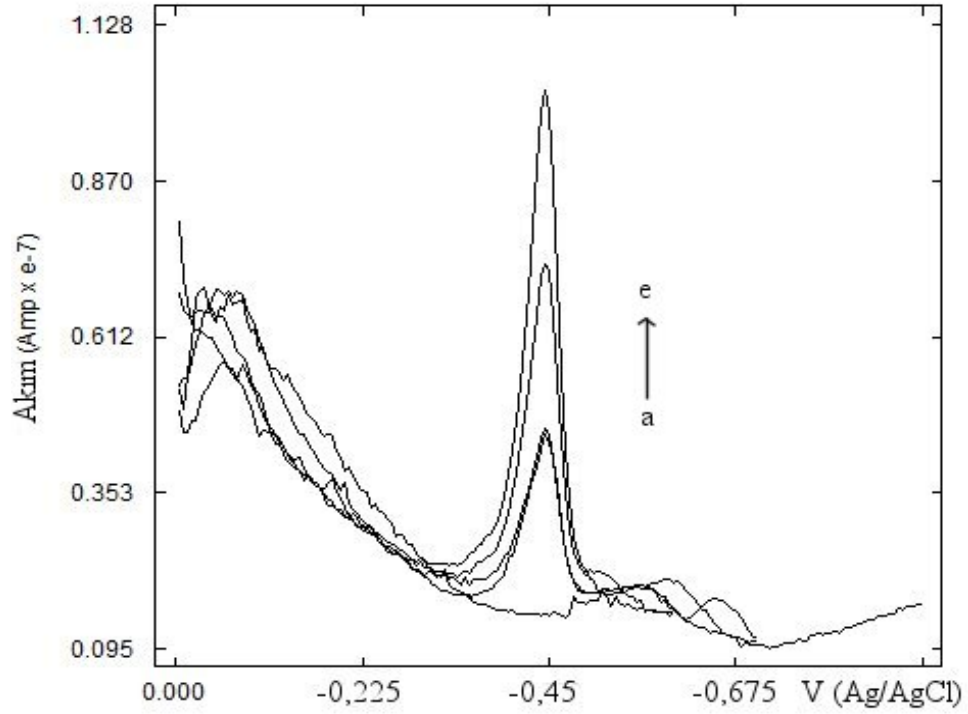
4.1.4.1. Elektroaktif iyonların girişim etkilerinin incelenmesi

Karminik asit tayini için geliştirilen yöntemin seçiciliğini belirlemek amacıyla, şeker ve sütte bulunabilecek bazı iyonlar (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^+ , K^+ , Fe^{+3} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Hg^{+2} , Mn^{+2} , Se^{+4} , Al^{+3} , Ba^{+2} , NO_2^- , SO_4^{2-} , Cl^-) ve (gallik asit, tannik asit) gibi organik maddelerin karminik asit tayinine girişim etkileri incelenmiştir.

Öncelikle çalışılan ortamda girişim etkileri incelenecek iyonların, piklerinin olup olmadığını öğrenmek için iyonların 0-1000 mV aralığında ayrı ayrı polarogramları kaydedilmiştir. Daha sonra temizlenen polarografi hücresine 10,0 mL destek elektrolit ilave edilip. İçine sırasıyla; 0,1 mL 1×10^{-3} mol/L'lık standart karminik asit çözeltisinden, ardından 0,1 mL 1×10^{-2} mol/L girişim etkisi incelenecek iyondan, ilave edildikten. Sonra da ard arda 3 kez standart karminik asit 0,1 mL 1×10^{-3} mol/L çözeltisinden ilave edilmiş ve geri kazanım hesaplamaları yapılmıştır.

pH 2 B-R tamponunda, Se^{4+} (-680 mV), Cd^{2+} (-675 mV) iyonlarına ait pikler belirtilen potansiyellerde kaydedilmiştir. Bu iyonların pik potansiyelleri karminik asidin -489 mV' taki pikinden farklı potansiyellerde olduğundan karminik asit piki ile üst üste çakışmamıştır. Tablo 4.3'te belirtilen elektroaktif iyonların pik potansiyelleri karminik asit potansiyelinden farklı yerde olduğu ve karminik asit bu iyonlarla herhangi bir etkileşmesinin olmadığı karminik asitin pik akımlarının değişmemesinden anlaşılmıştır.

Elektroaktif iyonlardan Zn^{2+} nin karminik asitle girişimi örnek olarak aşağıda verilmiştir. Hücreye karminik asit ilavesinden sonra Zn^{2+} ilavesiyle -489 mV'taki karminik asit pik yüksekliğinde herhangi bir değişme olmamış (Şekil 4.3.) Zn^{2+} varlığında karminik asit geri kazanımı %105 olarak hesaplanmıştır. Tayinin gerçekleştirileceği ortamda, karminik asit ve Zn^{2+} iyonları arasında herhangi bir reaksiyonunun gerçekleşmediği, yani girişim yapmadıkları tespit edilmiştir.

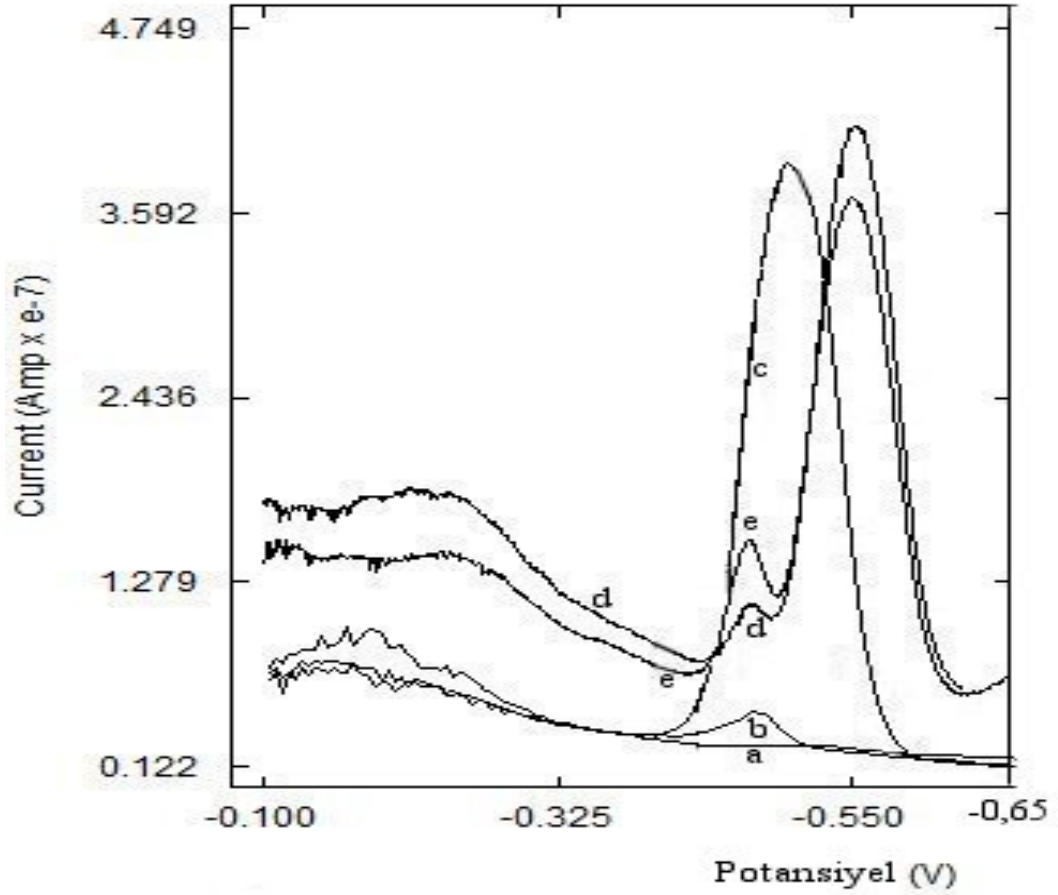


Şekil 4.3. Zn^{2+} iyonunun karminik asit tayinine girişim etkisinin incelenmesi. (5 mV/s potansiyel tarama hızı ve 50 mV/s puls genliğinde)

- 10,0 mL pH 2 B-R tampon çözeltisi
- a + 0,1 mL 1×10^{-3} mol/L karminik asit
- b + 0,1 mL 1×10^{-2} mol/L Zn^{2+}
- c + 0,1 mL 1×10^{-3} mol/L karminik asit
- d + 0,1 mL 1×10^{-3} mol/L karminik asit

Karminik asit derişiminin 10 katı derşime sahip Pb^{2+} iyonları ortama katıldığında ise karminik asite ait olan pik akımının değiştii gözlemiştir. Bu nedenle önce Pb^{2+} 'nin girişim etkisini ortadan kaldırmak için ortama Pb^{2+} ile kararlı bir kompleks veren, EDTA ilaveleri yapılarak kurşun iyonları kompleks oluşturmuş ve bu kompleksin karminik asitin tayinine engel olup olmayacağı araştırılmıştır. Polarografi hücresine 0,1 mL 1×10^{-3} mol/L karminik asit ilavesi ile karminik asitin piki gözlemlendikten sonra ortama 10 kat olacak miktarda Pb^{2+} ilavesi yapılmıştır. -498 mV'da Pb^{2+} iyonlarına ait pik gözlenmiştir. Karminik asit piki ile Pb^{2+} iyonlarının indirgenme piki aynı potansiyeldedir. Bu girişimi ortadan kaldırmak amacı ile ortama ard arda EDTA çözeltisinden toplam 1,0 mL 1×10^{-2} M ilave edilerek Pb iyonlarının komplekse alınması sağlanmıştır. Oluşan Pb-EDTA kompleksinin piki karminik asidin pikinden daha negatif potansiyele kaymıştır. Sonuç olarak Pb^{2+} iyonlarının girişimi etkisi

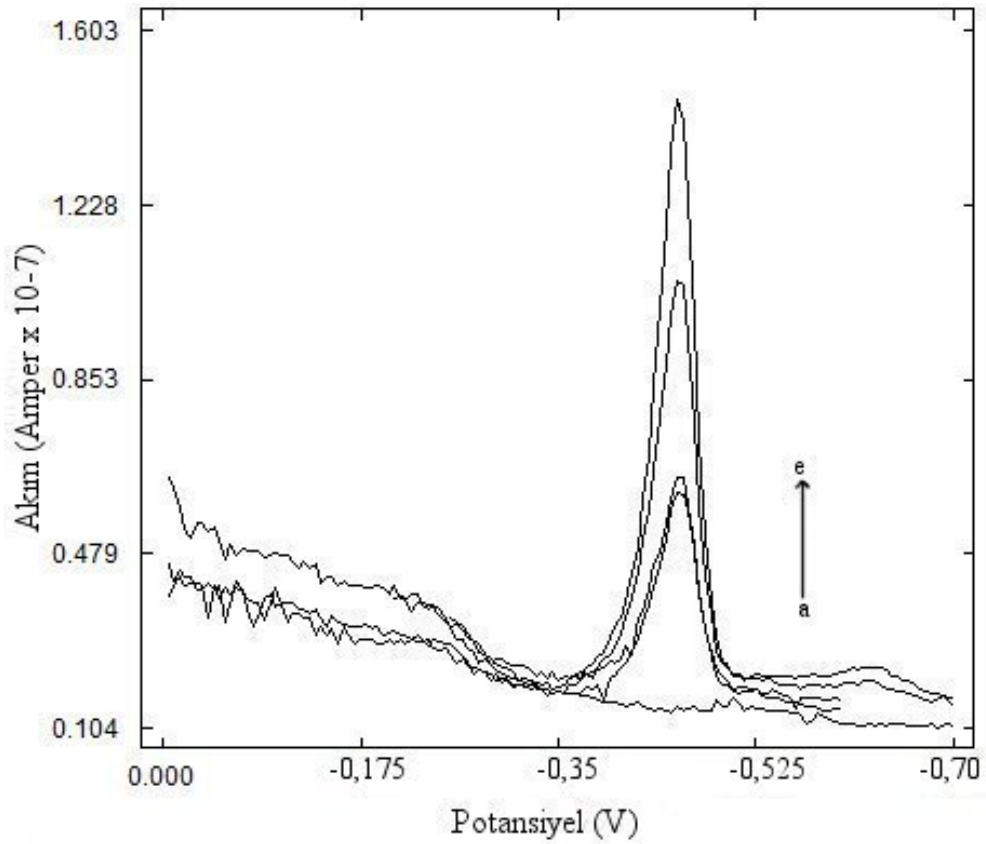
engellenmiştir (Şekil 4.4.). Ardından hücreye standart karminik asit çözeltisi ilaveleri yapılarak karminik asitin geri kazanımı hesaplanmıştır (Tablo.4.3).



Şekil 4.4. Pb^{+2} iyonun karminik aside girişim etkisinin giderilmesi
(5 mV/s potansiyel tarama hızı ve 50 mV/s puls genişliğinde)
a) 10,0 mL pH 2 B-R tampon çözeltisi
b) 0,1 ml 1×10^{-3} mol/L karminik asit
c) 0,1 ml 1×10^{-2} mol/L Pb^{2+}
d) 0,3ml 1×10^{-2} mol/L EDTA
e) 0,1 ML 1×10^{-3} mol/L karmimnik asit

4.1.4.2. Elektroaktif olmayan iyonların girişim etkilerinin incelenmesi

Bazı elektroaktif iyonların girişim etkileri incelendikten sonra elektroaktif olmayan Al^{+3} , K^+ , Ba^{+2} , Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , NO_3^- , SO_4^{2-} ve Cl^- iyonlarının da girişim etkileri incelenmiştir. Deneyler elektroaktif iyonların girişim etkilerinin incelenmesinde anlatıldığı gibi yapılmıştır. Şekil 4.5' te örnek olarak NO_3^- iyonu için elde edilen polarogram verilmiştir. NO_3^- varlığında karminik asit geri kazanımı % 100 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.5. NO_3^- iyonunun girişim etkisinin incelenmesi
(5 mV/s potansiyel tarama hızı 50 mV/s puls genişliğinde)
a) 10,0 mL pH 2 B-R tampon çözeltisi
b) a + 0,1 mL 1×10^{-3} mol/L karminik asit
c) b + 0,1 mL 1×10^{-2} mol/L NO_3^-
d) c + 0,1 mL 1×10^{-3} mol/L Karminik asit
e) d + 0,1 mL 1×10^{-3} mol/L Karminik asit

Diğer elektroaktif olmayan iyonlar (Al^{+3} , K^+ , Ba^{+2} , Na^+ , Mg^{+2} , NO_3^- , SO_4^{2-} ve Cl^-) için de benzer yolla elde edilen polarogramlardan yararlanarak, girişim etkisi incelenen iyonun bulunduğu ortamda karminik asit geri kazanımı hesaplanmıştır. Polarografik

olarak inaktif olan Al^{+3} , K^+ , Ba^{+2} , Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , NO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- iyonları ve gallik asit, tannik asitin karminik asit indirgenme pikine önemli bir girişim etkilerinin olmadığı tespit edilmiştir. Karminik asidin incelenen iyonlar varlığında geri kazanım sonuçları Tablo.4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3. pH 2 B-R tamponunda 1×10^{-5} mol/L karminik asite bazı iyonların girişim etkilerinin incelenmesi (5 mV/s potansiyel tarama hızı ve 50 mV/s puls genliğinde)

Girişim etkisi incelenen iyonlar 1×10^{-4} mol/L	Karminik asitin % geri kazanımı	Girişim etkisi incelenen iyonlar 1×10^{-4} mol/L	Karminik asitin % geri kazanımı
Pb^{2+}	93	Al^{+3}	95
Ni^{2+}	99	K^+	87
Cd^{2+}	96	Ba^{2+}	102
Fe^{3+}	85	Mg^{2+}	88
Zn^{2+}	105	Ca^{2+}	96
Co^{2+}	90	NO_3^-	100
Cu^{2+}	94	SO_4^{2-}	87
Tannik asit	100	Se^{+4}	98
Mn^{2+}	98	Gallik asit	91
Cl^-	85	Hg^{+2}	105
SO_3^{2-}	100		

Tablo 4.3'te görüldüğü gibi incelenen iyonların varlığında karminik asidin geri kazanımı % 85 - 105 arasındadır. İncelenen iyonlar varlığında karminik asit için yüksek geri kazanım değerleri elde edilmiştir ve bu yüzden bu iyonların karminik asit tayinine önemli bir girişim etkileri olmadığı belirlenmiştir.

4.1.5. Meyveli şeker ve çilekli süttteki karminik asitin tayini

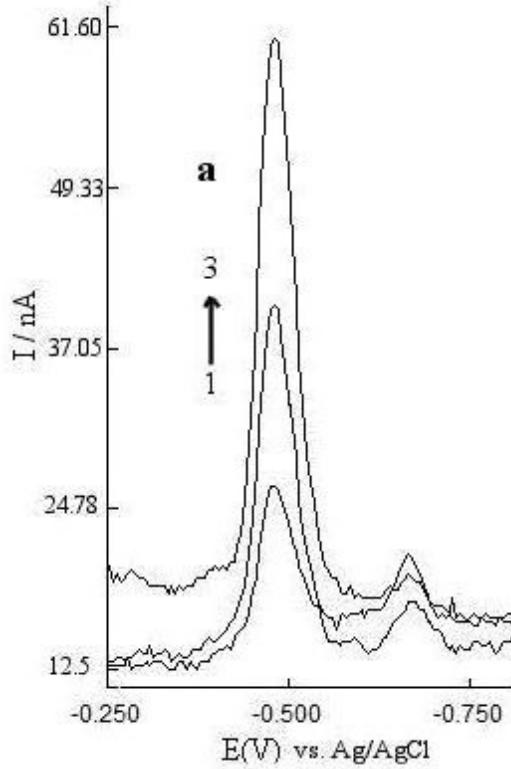
Karminik asit tayini için DPP ile geliştirilen yöntemin gerçek numunelere uygulamasını test etmek için, önerilen metot meyveli şeker ve çilekli süt numunelerine uygulanmıştır. Yeni geliştirilen metodun başlıca avantajları daha yüksek duyarlılığa sahip olması ve matriks etkisinin en az olmasıdır. Buna ek olarak metot basit, hızlı ve ucuz olduğu için şeker, çilekli süt numunelerindeki karminik asitin hızlı tayini için mükemmel alternatif bir araçtır. Metot; temizleme, ön deriştirme gibi zahmetli, zaman alan ve kirliliğe sebep olan basamaklar gerektirmemektedir.

4.1.5.1. Meyveli şeker numunelerindeki karminik asitin tayini

Şeker numunesinin hazırlanması: 12,1 g meyveli şeker örneği üzerine 8,0 mL pH 2 BR tampon çözeltisi ilave edilerek son hacim 10 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan bu numuneden, içerisinde 8 mL pH 2 BR tampon çözeltisi bulunan hücreye 2 mL ilave edilerek hacim 10 mL'ye tamamlandıktan sonra hücreden 5 dakika süreyle azot gazı geçirildikten sonra polarogramı alındı. Ardından hücreye 1×10^{-3} mol/L karminik asit çözeltisinden 0,1 mL ilave edilip polagramı alındı (Şekil 4.6.a) . Bu ilaveler ard arda 2 defa yapıldıktan sonra numunede bulunan karminik asit miktarı standart karminik asit eklenmesi sonucu oluşan pik akımlarının artışı yardımıyla hesaplandı. Bu işlem 5 kez daha yapılarak şeker numunesindeki karminik miktarı 28,4 $\mu\text{g KA/g}$ şeker olarak bulunmuştur (Tablo 4.4).

4.1.5.2. Çilekli sütte karminik asit tayini

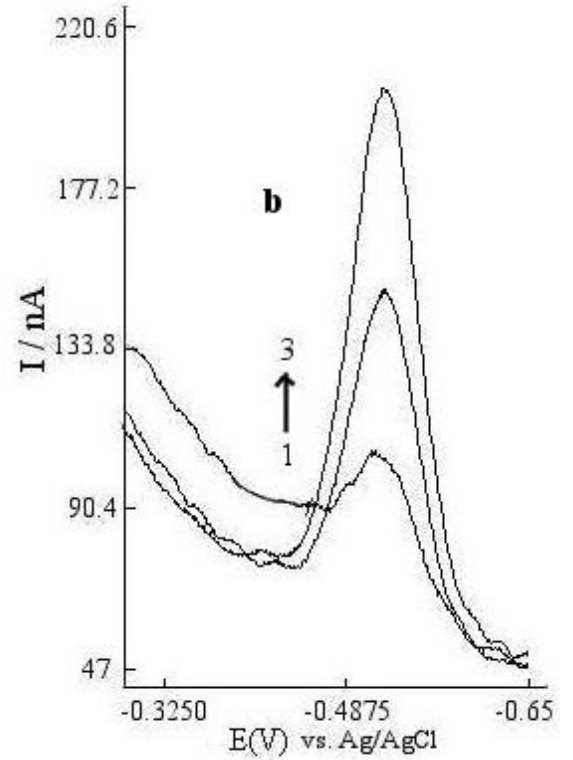
Çilekli sütte karminik asit tayini için 2,0 mL çilekli süt örneği üzerine çilekli sütteki proteinleri çöktürmek amacıyla 8,0 mL asetonitril çözeltisi ilave edilmiştir. Ardından numunenin homojen hale gelmesi için bir süre beklendikten sonra, 9000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilip berrak kısım alınmış ve süt proteininin artıkları atılmıştır. Bu şekilde hazırlanan örnekten hücreye 4 mL alınarak üzerine pH 2 B-R tampon çözeltisinden 6 mL ilave edilerek hacim 10 mL'ye tamamlanmış 5 dakika süreyle azot gazı geçirildikten sonra polarogramı alınmıştır. Hücreye 1×10^{-3} mol/L karminik asit çözeltisinden 0,1 mL ilave edilip polagramı alındı (Şekil.4.6.b) . Bu ilaveler ard arda 2 defa yapıldıktan sonra numunede bulunan karminik asit miktarı standart karminik asit eklenmesi sonucu oluşan pik akımlarının artışı yardımıyla hesaplandı. Bu işlem 5 kez daha yapılarak süt numunesindeki karminik miktarı 112 $\mu\text{g KA/mL}$ çilekli süt olarak bulundu.



Şekil.4.6. a. Meyveli şekerdeki karminik asit tayini

- 1) 8 mL BR tamponu (pH=2) + 2.0 mL meyveli şeker
- 2) 1 + 0.1 mL 1×10^{-3} mol/L KA
- 3) 2 + 0,1 mL 1×10^{-3} mol/L KA

(5 mV/s potansiyel tarama hızı ve 50 mV/s puls genliğinde)



Şekil .4.6. b. Çilekli sütte karminik asit tayini

- 1) 6 mL BR tamponu (pH=2) + 4.0 mL çilekli süt örneği
- 2) 1 + 0.1 mL 1×10^{-3} mol/L KA
- 3) 2 + 0.1 mL 1×10^{-3} mol/L KA

4.1.5.3. Karminik asidin spektrofotometrik tayini

UV spektrometrik metodu hem karminik asit tayini hemde meyveli şekerdeki KA tayin çalışmalarının doğruluğunu anlaşılması için kullanılmıştır. İlk olarak pH 12 BR tampon çözeltisinde hazırlanan karminik asit çözeltisinin dalga boyu taraması yapılmıştır ve karminik aside ait 235, 292, 567 nm'de absorpsiyon bantları görülmüştür maksimum absorpsiyonun gözlemlendiği 567 nm'de tayin çalışmaları yapılmıştır [20]. 1×10^{-7} - 2×10^{-8} mol/L KA ile yapılan çalışma sonucunda bir kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrusu denklemi $A = 1.2 \times 10^5 (C) + 0.055$ olarak bulunmuştur. Meyveli şekerdeki karminik asidin spektrofotometrik tayini için $4,56 \times 10^{-1}$ g şeker

numunesi üzerine pH 12 B-R tampon çözeltisi ilave edilmiş ve absorbanları okunmuştur. Bu derişimler için absorbans değerleri saf karminik asit için elde edilen kalibrasyon dekleminde yerinde kullanılarak meyveli şekerdeki karminik asit derişimi hesaplanmıştır (Tablo4.4).

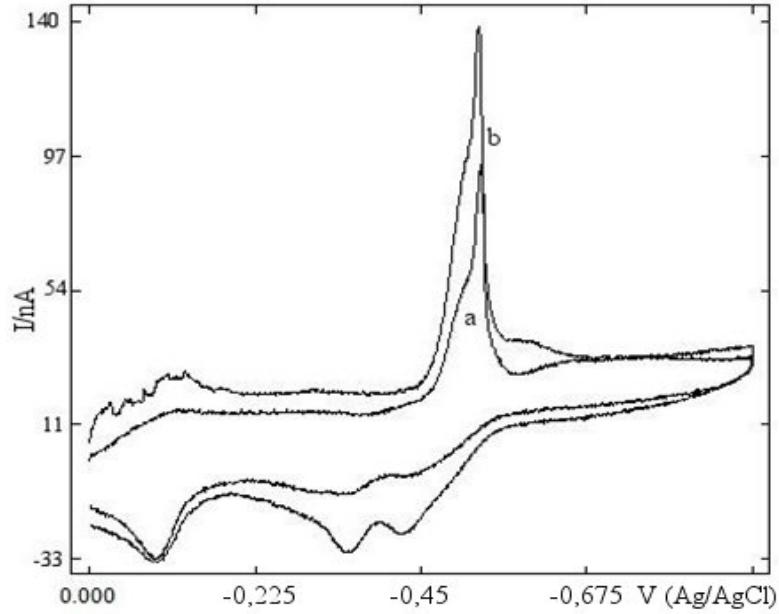
Tablo 4.4. DPP ve UV-spekrofotometresi ile yapılan tayin sonucunda çilekli süt ve meyveli şeker numunelerinde bulunan karminik asit miktarları

Teknik	örnek	n	Bulunan KA miktarı $\bar{X} \pm ts/\sqrt{N}$	BSS(%)
DPP	Süt	5	121 ± 4 (µg KA mL ⁻¹ Süt)	2
	Şeker	5	28.4 ± 1.5 (mgKA g ⁻¹ şeker)	4
UV	Süt	-	-	-
	Şeker	4	27.1 ± 2.5 (mgKA g ⁻¹ şeker)	7

95% GS

4.1.6. Karminik asitin dönüşümlü voltametri çalışmaları

Karminik Asitin voltametrik davranışını incelemek için dönüşümlü voltametri (DV) çalışmaları yapılmıştır. Bunun için 10,0 mL B-R tamponu içeren hücreden 5 dakika boyunca azot gazı geçirilmiştir. Sonra hücreye 0,1 mL 1×10^{-3} mol/L'lık standart karminik asitin çözeltisinden ilave edilerek polarogramı alınmıştır. Daha sonra tekrar aynı standart karminik asit çözeltisinden 0,1 mL'lik karminik asit ilaveleri yapılarak, karminik asitin pik akımındaki artışlar takip edilmiştir. Dönüşümlü voltamogramların alınması için geniş bir aralıkta (0 V'tan başlanarak -2000 V'a kadar) önce negatif yönde daha sonra da pozitif yönde potansiyel taraması yapılmıştır. Dönüşümlü voltamogramda geniş aralıkta yapılan potansiyel taramasında herhangi yeni bir pik kaydedilmediği için, sonraki çalışmalarda pik şekillerinin daha düzgün elde edildiği 0 V ile -900 mV aralığında potansiyel taraması yapılarak voltamogramlar kaydedilmiştir (Şekil 4.7).

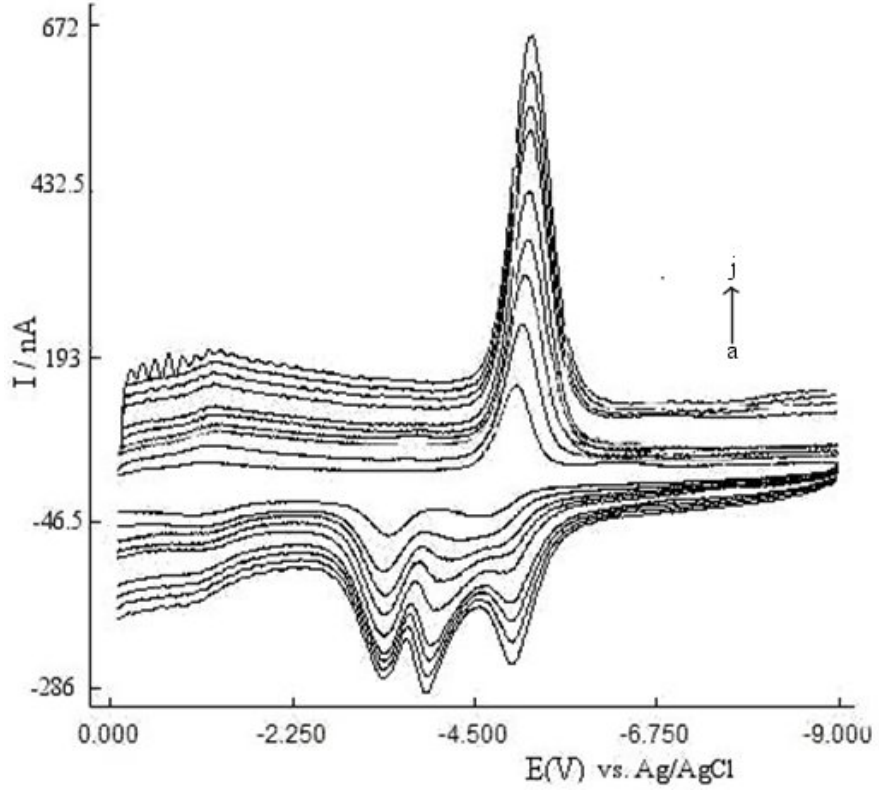


Şekil 4.7. Karminik asitin pH 2 B-R tamponundaki dönüşümlü voltamogramı
a) 10mL BRT elektroliti + 0,1 mL 1×10^{-3} mol/L KA (Tarama hızı; 25 mV s^{-1})
b) a + 0,1 mL 1×10^{-3} KAmol/L (Tarama hızı; 50 mV s^{-1})

Karminik asitin pH 2 B-R tamponundaki dönüşümlü voltamogramında yaklaşık -500 mV'ta bir katodik pik, yapılan geri tarama sonucunda tarama hızının artması ile belirgin hale gelen -500 ile -300 mV arasında 3 tane anodik pik gözlenmiştir. -500 mV'taki katodik pik kantitatif tayin için uygun olduğundan tayin çalışmalarında kullanılmıştır (Şekil 4.7).

DV verilerinden yararlanarak KA'nın indirgenme reaksiyonunun tersinirliği incelenebilir. Tersinir bir elektrokimyasal tepkimede anodik pik potansiyeli (E_{pa}) ile katodik pik potansiyeli (E_{pk}) arasında en fazla $59/n$ mV'luk bir gerilim farkı olmalı ve aynı zamanda anodik pik akımı (I_{pa}) katodik pik akımına (I_{pk}) eşit olmalıdır. Buradaki n aktarılan elektron sayısıdır. Elektrot tepkimesinin tersinirliği azaldıkça anodik ve katodik pikler birbirinden daha farklı gerilimlerde ve daha yayvan olarak gözlenir. Tam tersinmez bir elektrot tepkimesinde ise ürünün çok hızlı bir şekilde tüketilmesinden ötürü geri pik tamamen kaybolur [45]. Karminik asitin artan tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramlarında tarama hızı arttıkça pik akımlarının arttığı ve pik potansiyellerinin negatife kaydığı gözlenmiştir (Şekil 4.8). Katodik potansiyelinin

yüksek tarama hızlarında negatife kayması sistemin tersinmezliğinin bir göstergesidir (Şekil 4.8) [29,44,46].



Şekil 4.8. 1×10^{-5} mol/L KA çeşitli tarama hızlarındaki voltamogramları a) 100 mV s^{-1} , b) 200 mV s^{-1} , c) 300 mV s^{-1} , d) 400 mV s^{-1} , e) 500 mV s^{-1} f) 600 mV s^{-1} , g) 700 mV s^{-1} h) 800 mV s^{-1} ve j) 900 mV s^{-1}

Karminik asitin dönüşümlü voltamogramları pH 2 B-R tamponunda farklı tarama hızlarında kaydedilmiştir. KA'nın Şekil 4.7'de alınan dönüşümlü voltamogramında görülen ön pikler KA'nın indirgenmesi sonucu oluşan ürünün kuvvetle adsorplandığını göstermektedir [31]. Tarama hızı ile pik yüksekliğinin değişimi incelendiğinde difüzyon, adsorpsiyon ve elektron aktarımına eşlik eden kimyasal reaksiyonlarla ilgili birçok bilgi edinilebilir. Bu nedenle KA'nın pH 2 B-R tamponunda farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltamogramları kaydedilmiştir. Potansiyel taramaları 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ve 900 mV/s' lik tarama hızlarında yapılmıştır. Şekil 4.8'de pH 2 BRT' de 25-1000 tarama hızı aralığında 1×10^{-5} mol/L KA'nın -500

mV'daki indirgenme piki için (tayin amaçlı kullanılan pik) tarama hızı ile pik potansiyelleri ve pik akımlarındaki değişimi gösteren voltamogramlar verilmiştir.

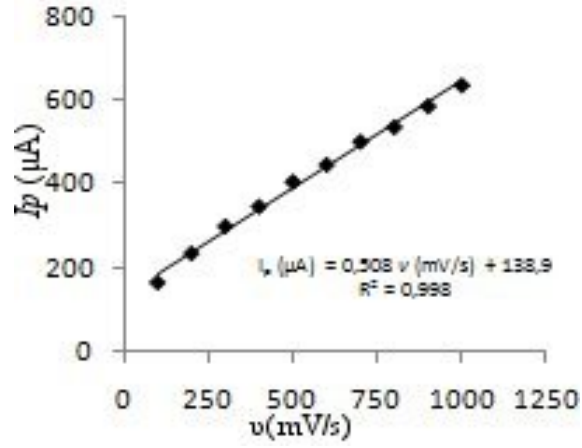
KA'nın indirgenme mekanizmasının difüzyon ya da adsorpsiyon kontrollü olup olmadığı yapılan DV çalışmalarıyla anlaşılabilir. Bu nedenle KA'nın indirgenme mekanizmasında adsorpsiyonun etkili olup olmadığı araştırılmıştır. Dönüşümlü voltametri tekniğinden elde edilen voltamogramlara ilk bakışta adsorpsiyon testi yapılabilir. Elektrot yüzeyine kuvvetli bir şekilde adsorplanma özelliğine sahip olan bir moleküle ait voltamogramda, adsorplanan türe bağlı olarak difüzyon pikinden daha negatif veya daha pozitif potansiyellerde farklı bir pik gözlenir. Bu pike adsorpsiyon piki denir. Ayrıca difüzyon pikine göre bulunduğu konumdan hangi türün adsorbe olduğu anlaşılabilir. Fakat adsorplanma zayıf bir şekilde gerçekleşiyorsa bu pik gözlenmez [29].

KA'nın dönüşümlü voltamogramında kuvvetli adsorpsiyonun varlığını gösteren adsorpsiyon piki kaydedilmiştir (Şekil.4.7). Tarama hızına karşı pik akımlarının değişimi grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.9). KA'nın pik akımıyla tarama hızı arasında doğrusal bir ilişki görülmektedir Eşitlik 4.2'deki R^2 değeri, doğrusal ilişkinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir.

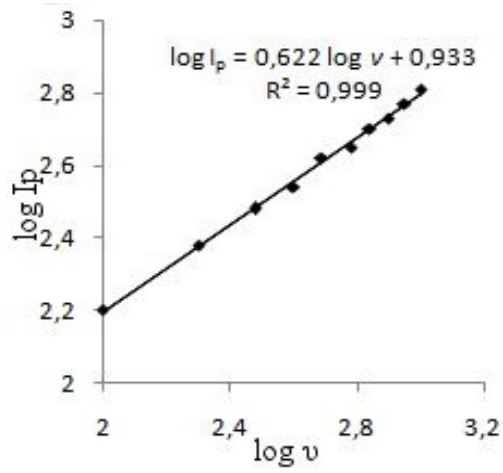
$$I_{pk} (\mu A) = 0,508 v (mV/s) + 138,9 \quad (R^2 = 0,998) \quad (4.2)$$

I_{pk} - v arasında doğrusal ilişki gözlenmesi adsorpsiyon kontrollü bir sürecin varlığını göstermiştir [30]. Ayrıca tarama hızının logaritmasına karşı pik akımının logaritması grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.10). Bilindiği gibi, difüzyon dikkate alınarak türetilen ve dönüşümlü voltamogramdaki pik akımını veren Randless-Sevcik eşitliğinden, $\log I_p$ ve $\log v$ arasında, eğimi 0,5 olan bir doğru elde edilir. Maddenin elektrot yüzeyinde adsorpsiyonu söz konusu ise, bu bağıntıdan ve dolayısıyla 0,5'den sapmalar meydana gelir ve genellikle bu durumda grafiklerin eğimi 0,5'den büyük olur [31]. KA'nın $\log I - \log v$ grafiğinin eğimi 0,622 olarak bulunmuştur (Şekil 4.10). KA için elde edilen $\log I_p - \log v$ grafiklerinin eğimlerinin 0,5'den büyük olması maddenin elektrot yüzeyine adsorbe olabileceğini göstermiştir.

$$\log I_{pk} (\mu A) = 0,622 \log v (mV/s) + 0,933 \quad (R^2 = 0,999) \quad (4.3)$$



Şekil 4.9. 1×10^{-5} mol/L KA pH 2 BRT de pik akımının tarama hızına karşılık incelenmesi



Şekil 4.10. KA'nın pH 2 BRT'de $\log v$ ' ye karşılık $\log I_{pk}$ 'nın değişiminin incelenmesi

5. BÖLÜM

SONUÇLAR

Bu çalışmada karminik asidin (KA) diferansiyel puls polarografisiyle (DPP) tayini için yöntem geliştirilmiş ve bu yöntem UV-GB spektrofotometrik yöntem ile desteklenmiştir. Geliştirilen bu yöntem çilekli süt ve meyveli şeker numunelerine uygulanmıştır. Karminik asidin elektrokimyasal davranışları DPP ve DV teknikleri kullanılarak incelenmiştir.

Karminik asidin tayini için destek elektrolit olarak B-R tampon çözeltisi (pH 1-12) ile çalışılmış ve en uygun çalışma ortamı olarak pH 2 B-R tamponu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda karminik asidin indirgenmesinin pH'ya bağlı olduğu tespit edilmiştir. Karminik asit tayini için pH 2 B-R tampon çözeltisi içerisinde alınan polarogramlarda -489 mV'ta gözlenen indirgenme piki derişimle doğrusal bir artış gösterdiği ve pik şekilleri düzgün olduğu için tayin amaçlı kullanılmıştır.

Karminik asidin destek elektrolitteki tayini için standart ekleme yöntemi kullanıldığında, % 95 güven seviyesinde 1×10^{-5} mol/L karminik asidin pH 2 BRT elektrolitindeki derişimi, $(1,01 \pm 0,02) \times 10^{-5}$ mol/L olarak bulunmuştur. Kalibrasyon grafiğiyle yapılan çalışmada karminik asidin tayin aralığı $1, \times 10^{-6}$ mol/L – 9×10^{-5} mol/L olarak hesaplanmıştır. Bu doğrusallık KA'nın DPP yöntemiyle tayin edilebileceğini göstermiştir. Gözlenebilme sınırı $1,6 \times 10^{-7}$ mol/L ve tayin sınırı da $5,5 \times 10^{-7}$ mol/L olarak hesaplanmıştır.

Karminik asit için önerilen metodun seçiciliği meyveli şeker veya çilekli sütte bulunabilecek bazı inorganik iyonların varlığında araştırılmıştır (Tablo 4.3). Girişim etkileri araştırılan iyonlardan Fe^{+3} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Mn^{+2} , Se^{+4} , SO_3^{2-} , NO_2^- , K^+ , Ba^{+2} , Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , SO_4^{2-} , Cl^- , Hg^{+2} iyonları için girişim etkisi gözlenmezken Pb^{+2} iyon derişiminin karminik asidin derişiminin 10 katı kadar ilave edildiğinde girişim yaptığı tespit edilmiştir. Pb^{+2} nin girişimi toplamda 1,0 mL 1×10^{-2} mol/L EDTA ilave edilerek giderilebilmiş ve geri kazanımları hesaplanmıştır (Şekil.4.4). İncelenen

iyonların varlığında karminik asidin geri kazanımının % 85 - 105 aralığında olduğu belirlenmiştir. Karminik asit için yüksek geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Bu da KA tayini için geliştirilen yöntemin seçiciliğinin iyi olduğunu göstermektedir.

Gerçek numunelerde karminik asit tayin için meyveli şeker ve çilekli süt numuneleri kullanılarak polarografik yapılan tayinler sonucunda meyveli şeker numunesinde %95 güven seviyesinde 28.4 ± 1.5 (mgKA g⁻¹şeker) karminik asit bulunurken UV-GB spektrometresi ile yapılan tayinde 27.1 ± 2.5 (mgKA g⁻¹şeker) karminik asit bulunmuştur. Çilekli süt numunesinde DPP ile yapılan tayinde %95 güven seviyesinde 121 ± 4 (µg KA mL⁻¹) süt olarak bulunmuştur. Yapılan tayin sonuçları her iki yöntemde birbirine yakın çıkmış olması geliştirilen metodun doğruluğunu göstermiştir (Tablo 4.4).

Karminik asitin pH 2 B-R tamponundaki dönüşümlü voltamogramında yaklaşık -500 mV'ta bir katodik pik, yapılan geri tarama sonucunda tarama hızının artması ile belirgin hale gelen -500 ile -300 mV arasında 3 tane anodik pik gözlenmiştir. -500 mV'taki katodik pik kantitatif tayin için uygun olduğundan tayin çalışmalarında kullanılmıştır.

Karminik asidin 100-900 mVs⁻¹ aralığında dönüşümlü voltamogramları alınmış ve tarama hızına (ν) karşı pik akımları (I_p) grafiğe geçirilmiştir. Karminik asit I_p ile ν arasında doğrusal ilişki gözlenmiştir (Şekil 4. 9). $I - \nu$ arasında doğrusal ilişki gözlenmesi adsorpsiyon kontrollü bir sürecin varlığını göstermiştir. Ayrıca $\log I - \log \nu$ grafiği çizilmiş ve grafiğinin eğimi 0,622 olarak bulunmuştur. KA için elde edilen $\log I_p - \log \nu$ grafiklerinin eğimlerinin 0,5'den büyük olması maddenin elektrot yüzeyine adsorbe olabileceğini göstermiştir. DV verilerinden yararlanarak karminik asitin indirgenme reaksiyonunun tersinirliği incelendiğinde artan tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramlarda tarama hızı artıkça pik akımlarının arttığı ve pik potansiyellerinin negatife kaydığı gözlenmiştir. Katodik potansiyelinin yüksek tarama hızlarında negatife kayması sistemin tersinmezliğinin bir göstergesidir.

Sonuç olarak; karminik asidin tayini için hızlı, kolay, doğru, kesin, duyarlı, seçici ve herhangi bir ayırma işlemine gerek duyulmayan polarografik teknik geliştirilmiş ve bunların karminik asit için çilekli süt ve meyveli şeker örneklerine, uygulanabilirliği

gösterilmiştir. Geliştirilen yöntemin basit ve hızlı olması nedeniyle kaynaklardaki karminik asit tayini için geliştirilmiş yöntemlere alternatif bir metot olarak sunulmuştur.

KAYNAKLAR

1. Cardon, D., "Natural Dyes", Archetype Publications Ltd, London, s.607-666, 2007.
2. Meloan, S. N., Valentine, L. S., Puchtler, H., "On the structure of carminic acid and carmine", *Histochemistry and Cell Biology*, 27, 87. 1971.
3. Küçüköner, E., "Koşinal ve şellak üretimi", *1. Ulusal Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi*, s 95-101, Ankara 2011.
4. Karabulut S., "Koşinilden Karminik asit pigmenti üretimi ", *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ,Yüksek Lisans Tezi, s.7, İstanbul,2009*
5. Zıvıdır H., "Potansiyometrik titrasyon yöntemi ile karminik asit bileşiğinin asitlik sabitlerinin farklı sıcaklıklar ve iyonik şiddetlerde belirlenmesi", *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, s.2,Tokat,2009*
6. Food Colours. "Food Technology", Vol. 40 (7) 49-56.r,2 (2),s.85-92,1996.
7. Yentür G., Ekşi A., Bayhan A., "Ankara piyasasından sağlanan pasta süsleri ve bazı şekerlerde sentetik boya miktarlarının araştırılması", *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 43: s.479-484, 1996.
8. Mısra N.R., Mısra B., "Genetic Toxicological Testing of Some Dyes by the Micronucleus Test", *Mutation Research*, 170: s.75-88, 1986.
9. İnternet: T.C. Gıda Tarım Ve Hayvancılık Bakanlığı "Türk Gıda Kodeksi Gıdalarda Kullanılan Renklendiriciler Tebliği Tebliğ No:2002/55", http://www.ism.gov.tr/indir/mevzuat/tebligler/T_25082002_1.pdf
10. Doğruyol H., "Gıdalardaki Katkı Maddeleri ve Zararları Çocukluk hiperaktivitesi", *Güncel Pediatri*, 2 s.42-48, 2006.
11. Çalışır E.Z, Çalışkan D., "Gıda Katkı Maddeleri ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri", *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32 (3), s.193-206, 2003.
12. Sarıkaya, Selvi, .Akkaya, ,Acar, Erkoç., "Farklı Konsantrasyonlardaki Gıda Boyalarının *Drosophila melanogaster (mwh x flr)*'de Yaşama Yüzdesi Üzerine Etkisi", *SDÜ Fen Dergisi (E-Dergi)*, 5 (1), s. 38-46, 2010.
13. Lucas, C.D., Hallagan, J.B. Taylor, S.L., "The role of natural color additives in food allergy",*Advances in Food and Nutrition Research*, 43:195-215,2001.

14. X. Qu, J.O. Trent, I. Fokt, W. Priebe, J.B. Chaires., “Allosteric, chiral-selective drug binding to DNA”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (22), 12032–12037, 2000.
15. A. H. Wang, G. Ughetto, G. J. Quigley, A. Rich., “Interactions between an anthracycline antibiotic and DNA: molecular structure of daunomycin complexed to d(CpGpTpApCpG) at 1.2-Å resolution”, *Biochemistry*, 26, 1152–63, 1987.
16. K. Chung, A. Chou, J. Baker, J. Baldwin., “ Identification of carmine allergen among three carmine allergy patients”, *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 105, 132, 2000.
17. . M. C. DiCello, A. Myc, J. R. Baker., “Anaphylaxis after ingestion of carmine colored foods: two case reports and a review of the literature.”, *Allergy Asthma Proceeding*, 20, 377–382, 1999.
18. D. A. Moneret-Vautrin, M. Morisset, P. Lemerdy., “Food allergy and IgE sensitization caused by spices: CICBAA data (based on 589 cases of food allergy)”, *Allergy Immunology*, 34, 135–140, 2002.
19. W. Feng, H. Wei, L. Kexiang, L. Aihua, G. Wei, T. Bo., “Study on the fluorescence enhancement in Lanthanum(III)–carminic acid–cetyltrimethylammonium bromide system and its analytical application”, *Spectrochimica Acta A*, 79, 1946– 1951, 2011.
20. F. Samari, B. Hemmateenejad, M. Shamsipur., “Spectrophotometric determination of carminic acid in human plasma and fruit juices by second order calibration of the absorbance spectra–pH data matrices coupled with standard addition method”, *Analytica Chimica Acta*, 667, 49–56, 2010
21. J. J. B. Nevado, C. G. Cabanillas, A. M. C., Salcedo, ”Simultaneous spectrophotometric determination of three food dyes by using the first derivative of ratio spectra”, *Talanta*, 42, 2043–51, 1995.
22. M. Bener, M. Ozyurek, K. Guclu, R. Apak., ”Polyphenolic contents of natural dyes produced from industrial plants assayed by HPLC and novel spectrophotometric methods”, *Industrial Crops and Products*, 32 (3), 499–506, 2010.
23. M. Gonzalez, J. Mendez, A. Carnero, M.G. Lobo, A. Afonso., ”Optimizing conditions for the extraction of pigments in cochineals (*Dactylopius coccus*

- Costa) using response surface methodology”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6968-6974, 2002.
24. R. N. Carvalho, C. H. Collins., ”HPLC Determination of Carminic Acid in Foodstuffs and Beverages Using Diode Array and Fluorescence Detection”, *Chromatographia*, 45, 63-66.1997
25. A. H. Alghamdi, H. M. Alshammery, M. A. Abdalla., A. F. Alghamdi, ”Determination of carmine food dye (E120) in foodstuffs by stripping voltammetry”, *Journal of AOAC International*, 92, 1454-1459,2009.
26. Reyes-Salas, Octavio; Juarez-Espino, Marcos; Manzanilla-Cano, Jose; Barcelo-Quintal, Manuel; Reyes-Salas, Adela; Rendon-Osorio, Reyna., ”Titrimetric and polarographic determination of carminic acid and its quantification in cochineal (*Dactylopius coccus*) extracts”, *Journal of the Mexican Chemical Society*,55(2),89-93, (2011)
27. Yazar, Z., “Melamin, Siyanürük asit ve Ammelaminnin Diferansiyel Puls Polarografisi İle Tayini İçin Yöntem Geliştirilmesi Ve Uygulanması ”, *Nevşehir Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, s.11-23, Nevşehir, 2010.
28. Baycan, F., “Zopiklon’un Voltametik Metotlar ile Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi ve İlaçlarda Kantitatif Tayini”,*Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü* ,Yüksek Lisans Tezi,Çanakkale, 2006.
29. Bard, A.J., Faulkner L. R., “Electrochemical Methods”, *John Wiley and Sens. Inc.*,s. 572, New.York 2001
30. Yılmaz, T, Ü., “Bazı İyonların Çeşitli Ortamlarda Diferansiyel Puls Polarografisi İle Tayini İçin Yöntem Geliştirilmesi”, *Gazi Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü*,Doktora Tezi, Ankara, Ankara, 2008.
31. Gökmeşe, F., “Bazı Naftaldimin ve Salisildiminlerin Çeşitli Voltametik Tekniklerle Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi”, *Ankara Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü*,Doktora Tezi, Ankara, 2004
32. Skoog, D.,A., Holler, F., J., West, D., M., Crouch, R., S., “Analytical Chemistry first ed.”, Kılıç E., Yılmaz H., *Bilim Yayıncılık*, s. 665-704, Ankara, 2004
33. .Wang, J., “Analytical Electrochemistry Second Eddition”, A division of John Wiley & Sons, New York, s.67, 2001.

34. Bard, A.J., Faulkner L. R., “Electrochemical Methods”, *John Wiley and Sons*, Inc, s. 572, New York 2001
35. Barker, G. C, Gardner, A. W., “Pulse polarography, Fresenius'Zeitschrift fuer”, *Analytische Chemie*, 173, 79-83, 1960.
36. Sarıgöl, T., “Triflumizol Pestisitinin Diferansiyel Puls Polarografisi ile Tayini”, *Gazi Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*, s30-35, Ankara, 2006.
37. Erik, E.Z., “Tifensülfüron-Metil Herbisitinin Diferansiyel Puls Polarografisi ile Tayini”, *Gazi Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*, Ankara, 2007
38. Mercan, H., “Moksifloksasinin polarografik tayini ve moksifloksasin kullanılarak Co(II) tayini”, *Gazi Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, s.33-38, Ankara, 2005.
39. Genç. Vedat., “Bazı Kumarin Türevlerinin Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi”, *Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, İstanbul, 2003.
40. Sawyer, D.T., Robert J.L.JR., “Experimental Electrochemistry for Chemis”, *John WileySons*, New York, 1974.
41. Headridge, J.B., “Electrochemical Techniques of Electrochemistry”, *Wiley-Interscience*, New York, 1972.
42. Canbaz, D., “Zolmitriptan’ın Elektroanalitik İncelenmesi ve Tayini”, *Ankara Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi*, Ankara, 2008.
43. Wopschall, R. H., Shain, I., “Adsorption effect in Stationary Electrode Polarography with a Chemical Reaction Following Charge Transfer”, *Anal. Chem*, 39, 1535, 1967.
44. Greef, R., et al., “Instrumental Methods in Electrochemistry”, Ellis Harwood Limited, New York, s.179-228, 1990.
45. Wang, J., “Analytical Electrochemistry”, *John Wiley & Sons, Inc. 2nd ed*, ISBN 0-471-28272-3,s.110-115, 2000.
46. Öztürk,Ö,F.,“Bazıbenzo[c]sinnolin Türevlerinin Spektroskopik ve Elektrokimyasal özelliklerinin İncelenmesi”, *Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, s.70, Ankara, 2008.

ÖZGEÇMİŞ

Fevzi ERGÜN 1979 yılında Nevşehir’de doğdu. İlk orta ve lise eğitimini Nevşehir’de tamamladı.1998 yılında Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nü kazandı ve 2002 yılında bu bölümden mezun oldu 2009 yılında Nevşehir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya bölümü’nde yüksek lisans eğitimine başladı. 2013 yılında Nevşehir Üniversitesi Eğitim fakültesi’nden Pedagojik Formasyon sertifikası aldı.

Adres: Nevşehir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü

e-posta:fvzrgn@gmail.com