

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ GIDA ÖRNEKLERİNDE
FENOLİK ASİTLERİN KROMATOĞRAFİK
TAYİN ÖNCESİ SULU İKİ FAZ-SİSTEMLİ
EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE
ZENGİNLEŞTİRİLMESİ**

Taşkın MUMCU

Temmuz, 2021

İZMİR

**ÇEŞİTLİ GIDA ÖRNEKLERİNDE
FENOLİK ASİTLERİN KROMATOĞRAFİK
TAYİN ÖNCESİ SULU İKİ FAZ-SİSTEMLİ
EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE
ZENGİNLEŞTİRİLMESİ**

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Taşkın MUMCU

Temmuz, 2021

İZMİR

DOKTORA TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

TAŞKIN MUMCU, tarafından **PROF. DR. SERAP SEYHAN BOZKURT** yönetiminde hazırlanan **“ÇEŞİTLİ GIDA ÖRNEKLERİNDE FENOLİK ASİTLERİN KROMATOĞRAFİK TAYİN ÖNCESİ SULU İKİ FAZ-SİSTEMLİ EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE ZENGİNLEŞTİRİLMESİ”** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Serap Seyhan BOZKURT

Yönetici

Prof. Dr. Nalan DEMİR

Tez İzleme Komite Üyesi

Prof. Dr. Müşerref ARDA

Tez İzleme Komite Üyesi

Prof. Dr. Şule AYTAŞ

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Cem GÖK

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Özgür ÖZÇELİK

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının konusunu öneren, çalışmanın her aşamasında benden desteğini esirgemeyen ve çalışmamı tamamlamamı sağlayan danışman hocam Prof. Dr. Serap Seyhan BOZKURT' a destek ve katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımıza 2017.KB.FEN.036 numaralı proje ile maddi destek sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi' ne teşekkürlerimi sunarım.

Taşkın MUMCU

ÇEŞİTLİ GIDA ÖRNEKLERİNDE FENOLİK ASİTLERİN KROMATOĞRAFİK TAYİN ÖNCESİ SULU İKİ FAZ SİSTEMLİ EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE ZENGİNLEŞTİRİLMESİ

ÖZ

Çalışmada öncelikle 1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, 1-allil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, 1-benzil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat ve polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakloroferrat iyonik sıvıları sentezlenmiştir. Bu iyonik sıvılar, fenolik asitlerin analiz öncesi sulu iki faz sistemli ekstraksiyonları için kullanılmıştır. Çalışmada iki farklı sulu iki faz sistemli ekstraksiyon yöntemi optimize edilmiştir. Katyonik grubu butil, allil ve benzil içeren iyonik sıvıların ekstraksiyon etkinliklerini karşılaştırmak için, bu iyonik sıvılar ile ayrı, polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakloroferrat iyonik sıvısının polimer/tuz sistemli sulu iki faza etkisini incelemek için bu iyonik sıvı ile ayrı yöntem geliştirilmiştir. Her iki yöntem ile en yüksek ekstraksiyon verimi için gerekli olan parametreler optimize edilmiştir. Fenolik asitler için analitik parametreler (çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, tayin sınırı, gün içi ve günler arası bağıl standart sapma) her iki yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemler, elma, armut, muz ve üzüm örneklerine başarıyla uygulanmıştır. Her iki yöntemde geliştirilen yöntemlerin doğruluğunu göstermek için gerçek örneklere eklenen standart fenolik asit derişimleri için yüksek geri geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Fenolik asit, sulu iki faz ekstraksiyon, iyonik sıvı, HPLC

ENRICHMENT OF PHENOLIC ACIDS BY AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM EXTRACTION METHOD BEFORE CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION IN VARIOUS FOOD SAMPLES

ABSTRACT

In the study, 1-butyl-3-methylimidazolium tetrachloroferrate, 1-benzyl-3-methylimidazolium tetrachloroferrate, 1-allyl-3-methylimidazolium tetrachloroferrate and polyethylene glycol bis (methylimidazolium) dithetrachloroferrate ionic liquids have been synthesized. These ionic liquids have been used for the aqueous two-phase extraction of phenolic acids prior to analysis. In the study, two different aqueous two-phase extraction methods have been optimized. To compare the extraction efficiency of ionic liquids containing cationic group butyl, allyl and benzyl, a separate method has been developed with these ionic liquids and the separate method has been developed with this ionic liquid to examine the effect of polyethylene glycol bis (methylimidazolium) ditetrachloroferrate on two aqueous phases with polymer/salt system. The parameters required for the highest extraction efficiency have been optimized with both methods. Analytical parameters for phenolic acids (linear range, limit of detection, limit of determination, relative standard deviation of intraday and inter day) have been determined using two methods. The developed methods have been successfully applied to apple, pear, banana and grape samples. To show the accuracy of the developed methods with two methods, high recovery values have been obtained for the standard phenolic acid concentrations added to the real samples.

Keywords: Phenolic acid, aqueous two phase extraction, ionic liquid, HPLC

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
DOKTORA TEZİ SINAV SONUÇ FORMU	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZ	iv
ABSTRACT.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ.....	xii

BÖLÜM 1 - GİRİŞ 1

1.1 Fenolik Asitler	1
1.2 Fenolik Asitlerin Analiz Yöntemleri.....	4
1.3 Zenginleştirme Yöntemleri.....	5
1.3.1 Katı Faz Ekstraksiyonu.....	5
1.3.2 Katı Faz Mikroekstraksiyon	6
1.3.3 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu	7
1.3.4 Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu	8
1.3.5 Dispersif Mikro-Katı Faz Ekstraksiyon.....	9
1.3.6 Sulu İki Faz Sistemli Ekstraksiyon.....	9
1.4 İyonik Sıvılar.....	11
1.5 Literatür Özeti	13
1.6 Çalışmanın Amacı	16

BÖLÜM 2 – MATERYAL VE YÖNTEM..... 17

2.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	17
2.2 Kullanılan Cihazlar.....	17
2.3 İyonik Sıvıların Sentezi	18
2.3.1 Butil, Allil ve Benzil Grubu İçeren İyonik Sıvıların Sentezi.....	18
2.3.2 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferat Sentezi	19

2.4 Fenolik Asitlerin HPLC ile Kromatografik Analizleri.....	21
2.5 Sulu İki Faz Ekstraksiyon Yöntemi.....	21
2.5.1 Butil, Allil ve Benzil Grubu İçeren İyonik Sıvılar ile Sulu İki Faz Sistemli Ekstraksiyon Çalışmaları	21
2.5.2 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat İyonik Sıvısı ile Sulu İki Faz Sistemli Ekstraksiyon Çalışması	22
2.6 Gerçek Örneklerin Hazırlanması.....	23
BÖLÜM 3 - SONUÇLAR.....	24
3.1 İyonik Sıvıların Karakterizasyonu.....	24
3.1.1 FTIR Analizleri.....	24
3.1.2 UV-Görünür Bölge Analizleri	25
3.1.3 TG/DTG Analizleri.....	26
3.2 Fenolik Asitlerin Standart Çözeltilerinin Kalibrasyon Denklemleri	27
3.3 Sulu İki Faz Ekstraksiyon Yönteminin Optimizasyonu	29
3.3.1 Butil Grubu İçeren İyonik Sıvıların Optimizasyon Sonuçları	29
3.3.2 Allil Grubu İçeren İyonik Sıvıların Optimizasyon Sonuçları.....	33
3.3.3 Benzil Grubu İçeren İyonik Sıvıların Optimizasyon Sonuçları.....	36
3.4 İyonik Sıvıların Ekstraksiyon Verimlerinin Karşılaştırılması.....	40
3.5 Butil Grubu İçeren İyonik Sıvı ile Analitik Performans Çalışma sonuçları....	41
3.6 Butil Grubu İçeren İyonik Sıvı ile Optimize Edilen Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması.....	43
3.7 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakloroferrat İyonik Sıvısı ile Sulu İki Faz Ekstraksiyon Sonuçları.....	56
3.8 Geliştirilen Yöntemin Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat İyonik Sıvısı ile Analitik Performansının Belirlenmesi.....	60
3.9 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakloroferrat İyonik Sıvısı ile Sulu İki Faz Ekstraksiyon Yönteminin Gerçek Örneklerle Uygulanması	62
BÖLÜM 4 - DEĞERLENDİRME	75

KAYNAKLAR	77
------------------------	-----------



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 Katyonik grubu butil, allil ve benzil içeren iyonik sıvıların sentezi	19
Şekil 2.2 Polietilen glikol diklorür sentezi	19
Şekil 2.3 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) diklorür sentezi	20
Şekil 2.4 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat sentezi	20
Şekil 2.5 Sulu iki faz sistemli ekstraksiyon yönteminin şematik gösterimi	22
Şekil 2.6 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat ile gerçekleştirilen ekstraksiyonun şematik gösterimi	23
Şekil 3.1 Sentezlenen iyonik sıvıların Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrumları a) 1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, b) 1-allil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, c) 1-benzil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, d) polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat	25
Şekil 3.2 Sentezlenen iyonik sıvıların asetonitril içerisindeki UV-Vıs spektrumları a) 1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, b) 1-allil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, c) 1-benzil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, d) polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat	26
Şekil 3.3 Sentezlenen iyonik sıvıların termal analiz sonucu TG/DTG eğrisi a) 1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, b) 1-allil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, c) 1-benzil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, d) polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat	27
Şekil 3.4 Derişimleri $100\mu\text{g L}^{-1}$ olan fenolik asit karışımının HPLC kromatogramı (1: GA, 2: PA, 3: KJA, 4: KA, 5: FA)	28
Şekil 3.5 Butil grubu içeren iyonik sıvının farklı miktarlarının sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): $200\mu\text{g L}^{-1}$, m(TritonX-100): 0,2 gram, m(Na_2CO_3): 0,5 gram, ekstraksiyon süresi 15 dakika, sıcaklık 40°C , pH 5,5)	30
Şekil 3.6 Butil grubunu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki fazlı ekstraksiyon yöntemine farklı TritonX-100 miktarlarının etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): $200\mu\text{g L}^{-1}$, V (iyonik sıvı): $200\mu\text{L}$, m(Na_2CO_3): 0,5 gram, ekstraksiyon süresi 15 dakika, sıcaklık 40°C , pH 5,5)	30

Şekil 3.7 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki fazlı ekstraksiyon yöntemine farklı Na_2CO_3 miktarlarının etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): $200 \mu\text{gL}^{-1}$, V (iyonik sıvı): $200\mu\text{L}$, m(TritonX-100): 0,2 gram, ekstraksiyon süresi 15 dakika, sıcaklık 40°C , pH 5,5)	31
Şekil 3.8 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki fazlı ekstraksiyon yöntemine farklı ekstraksiyon sürelerinin etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): $200 \mu\text{gL}^{-1}$, V (iyonik sıvı): $200\mu\text{L}$, m(TritonX-100): 0,2 gram, m(Na_2CO_3): 0,4 gram, sıcaklık 40°C , pH 5,5)	32
Şekil 3.9 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki fazlı ekstraksiyon yöntemine farklı pH' ların etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): $200 \mu\text{gL}^{-1}$, V (iyonik sıvı): $200\mu\text{L}$, m(TritonX-100): 0,2 gram, m(Na_2CO_3): 0,4 gram, ekstraksiyon süresi: 15 dakika, sıcaklık 40°C).....	32
Şekil 3.10 Allil grubu içeren iyonik sıvının farklı miktarlarının sulu iki faz sistemli ekstraksiyon yöntemine etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): $200 \mu\text{gL}^{-1}$, m(TritonX-100): 0,2 gram, m(Na_2CO_3): 0,5 gram, ekstraksiyon süresi 15 dakika, sıcaklık 40°C , pH 5,5)	33
Şekil 3.11 Allil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine farklı TritonX-100 miktarlarının etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): $200 \mu\text{gL}^{-1}$, V (iyonik sıvı): $200\mu\text{L}$, m(Na_2CO_3): 0,5 gram, ekstraksiyon süresi 15 dakika, sıcaklık 40°C , pH 5,5	34
Şekil 3.12 Allil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine farklı Na_2CO_3 miktarlarının etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): $200 \mu\text{gL}^{-1}$, V (iyonik sıvı): $200\mu\text{L}$, m(TritonX-100): 0,2 gram, ekstraksiyon süresi 15 dakika, sıcaklık 40°C , pH 5,5).....	34
Şekil 3.13 Allil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine farklı ekstraksiyon sürelerinin etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): $200 \mu\text{gL}^{-1}$, V (iyonik sıvı): $200\mu\text{L}$, m(TritonX-100): 0,2 gram, m(Na_2CO_3): 0,4 gram, sıcaklık 40°C , pH 5,5)	35
Şekil 3.14 Allil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine farklı pH' ların etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): $200 \mu\text{gL}^{-1}$, V (iyonik sıvı): $200\mu\text{L}$, m(TritonX-100): 0,2 gram, m(Na_2CO_3): 0,4 gram, ekstraksiyon süresi: 15 dakika, sıcaklık 40°C)	36

- Şekil 3.15 Benzil grubu içeren iyonik sıvının farklı miktarlarının sulu iki faz sistemli ekstraksiyon yöntemine etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): $200 \mu\text{gL}^{-1}$, m(TritonX-100): 0,2 gram, m(Na_2CO_3): 0,5 gram, ekstraksiyon süresi 15 dakika, sıcaklık 40°C , pH 5,5)..... 37
- Şekil 3.16 Benzil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine farklı TritonX-100 miktarlarının etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): $200 \mu\text{gL}^{-1}$, V (iyonik sıvı):200 μL , m(Na_2CO_3): 0,5 gram, ekstraksiyon süresi 15 dakika, sıcaklık 40°C , pH 5,5) 37
- Şekil 3.17 Benzil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine farklı Na_2CO_3 miktarlarının etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): $200 \mu\text{gL}^{-1}$, V (iyonik sıvı):200 μL , m(TritonX-100): 0,2 gram, ekstraksiyon süresi 15 dakika, sıcaklık 40°C , pH5,5) 38
- Şekil 3.18 Benzil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine farklı ekstraksiyon sürelerinin etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): $200 \mu\text{gL}^{-1}$, V (iyonik sıvı):200 μL , m(TritonX-100): 0,2 gram, m(Na_2CO_3): 0,4 gram, sıcaklık 40°C , pH 5,5) 39
- Şekil 3.19 Benzil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine farklı pH' ların etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): $200 \mu\text{gL}^{-1}$, V (iyonik sıvı):200 μL , m(TritonX-100): 0,2 gram, m(Na_2CO_3): 0,4 gram, ekstraksiyon süresi: 15 dakika, sıcaklık 40°C) 40
- Şekil 3.20 Butil, Allil ve Benzil grubu içeren iyonik sıvıların sulu iki faz ekstraksiyon etkinliklerinin karşılaştırılması 41
- Şekil 3.21 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki fazlı ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş yeşil elma örneği, b) $100 \mu\text{gL}^{-1}$, c) $50 \mu\text{gL}^{-1}$, d) $5 \mu\text{gL}^{-1}$ standart fenolik asit eklenmiş yeşil elma örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA 52
- Şekil 3.22 Butil grubu içeren iyonik sıvısı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş kırmızı elma örneği, b) $100 \mu\text{gL}^{-1}$, c) $50 \mu\text{gL}^{-1}$, d) $5 \mu\text{gL}^{-1}$ standart fenolik asit eklenmiş kırmızı elma örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA..... 52
- Şekil 3.23 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki fazlı ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş sarı armut örneği, b) $100 \mu\text{gL}^{-1}$,

- c) 50 μgL^{-1} , d) 5 μgL^{-1} standart fenolik asit eklenmiş sarı armut örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA 53
- Şekil 3.24 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki fazlı ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş yeşil armut örneği, b) 100 μgL^{-1} , c) 50 μgL^{-1} , d) 5 μgL^{-1} standart fenolik asit eklenmiş yeşil armut örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA..... 53
- Şekil 3.25 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki fazlı ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş ithal muz örneği, b) 100 μgL^{-1} , c) 50 μgL^{-1} , d) 5 μgL^{-1} standart fenolik asit eklenmiş ithal muz örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA 54
- Şekil 3.26 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki fazlı ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş yerli muz örneği, b) 100 μgL^{-1} , c) 50 μgL^{-1} , d) 5 μgL^{-1} standart fenolik asit eklenmiş yerli muz örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA 54
- Şekil 3.27 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki fazlı ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş yeşil üzüm örneği, b) 100 μgL^{-1} , c) 50 μgL^{-1} , d) 5 μgL^{-1} standart fenolik asit eklenmiş yeşil üzüm örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA..... 55
- Şekil 3.28 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki fazlı ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş kırmızı üzüm örneği, b) 100 μgL^{-1} , c) 50 μgL^{-1} , d) 5 μgL^{-1} standart fenolik asit eklenmiş kırmızı üzüm örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA 55
- Şekil 3.29 Sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferat' ın farklı miktarlarının etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): 200 μgL^{-1} , m(PEG600): 0,5gram, m(Na_2CO_3): 0,5gram, ekstraksiyon süresi: 15 dakika, sıcaklık: 30°C, pH ~5-5,5) 56
- Şekil 3.30 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferat içeren iyonik sıvı ile sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine PEG600 miktarının etkisi (Deney koşulları: C (fenolik asit): 200 μgL^{-1} , C (iyonik sıvı): %5(v/v), m(Na_2CO_3): 0,5 gram, ekstraksiyon süresi: 15 dakika, sıcaklık: 30°C, pH ~5-5,5)..... 57
- Şekil 3.31 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferat içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine Na_2CO_3 miktarının

etkisi (Deney koşulları: C (fenolik asit): 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, C (iyonik sıvı): %5(v/v), m(PEG600): 0,7 gram, ekstraksiyon süresi: 15 dakika, sıcaklık: 30°C, pH ~5-5,5).....	58
Şekil 3.32 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferat içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine ekstraksiyon süresinin etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, C (iyonik sıvı): %5 (v/v), m(PEG600): 0,7 gram, m(Na_2CO_3): 0,5 gram, sıcaklık: 30°C, pH ~5-5,5).....	58
Şekil 3.33 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferat içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine sıcaklığın etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, C (iyonik sıvı): %5 (v/v), m(PEG600): 0,7 gram, m (Na_2CO_3): 0,5 gram, ekstraksiyon süresi: 20 dakika, pH ~ 5-5,5)	59
Şekil 3.34 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferat içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine pH etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, C (iyonik sıvı): %5 (v/v), m(PEG600): 0,7 gram, m(Na_2CO_3): 0,5 gram, ekstraksiyon süresi: 20 dakika, sıcaklık: 40°C).....	60
Şekil 3.35 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferat içeren iyonik sıvı ile sulu iki faz ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş kırmızı üzüm örneği, b) 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, c) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, d) 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ derişimde standart fenolik asit eklenmiş kırmızı üzüm örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA	71
Şekil 3.36 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferat içeren iyonik sıvı ile sulu iki faz ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş yeşil üzüm örneği, b) 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, c) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, d) 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ standart fenolik asit eklenmiş yeşil üzüm örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA.....	71
Şekil 3.37 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferat içeren iyonik sıvı ile sulu iki faz ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş yerli muz örneği, b) 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, c) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, d) 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ standart fenolik asit eklenmiş yerli muz örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA.....	72

- Şekil 3.38 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferrat içeren iyonik sıvı ile sulu iki faz ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş ithal muz örneği, b) $5 \mu\text{gL}^{-1}$, c) $50 \mu\text{gL}^{-1}$, d) $100 \mu\text{gL}^{-1}$ standart fenolik asit eklenmiş ithal muz örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA 72
- Şekil 3.39 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferrat içeren iyonik sıvı ile sulu iki faz ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş yeşil elma örneği, b) $5 \mu\text{gL}^{-1}$, c) $50 \mu\text{gL}^{-1}$, d) $100 \mu\text{gL}^{-1}$ standart fenolik asit eklenmiş yeşil elma örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA 73
- Şekil 3.40 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferrat içeren iyonik sıvı ile sulu iki faz ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş kırmızı elma örneği, b) $5 \mu\text{gL}^{-1}$, c) $50 \mu\text{gL}^{-1}$, d) $100 \mu\text{gL}^{-1}$ derişimlerde standart fenolik asit eklenmiş kırmızı elma örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA 73
- Şekil 3.41 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferrat içeren iyonik sıvı ile sulu iki faz ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş yeşil armut örneği, b) $5 \mu\text{gL}^{-1}$, c) $50 \mu\text{gL}^{-1}$, d) $100 \mu\text{gL}^{-1}$ standart fenolik asit eklenmiş yeşil armut örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA 74
- Şekil 3.42 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferrat içeren iyonik sıvı ile sulu iki faz ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş sarı armut örneği, b) $5 \mu\text{gL}^{-1}$, c) $50 \mu\text{gL}^{-1}$, d) $100 \mu\text{gL}^{-1}$ standart fenolik asit eklenmiş sarı armut örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA 74

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1 Fenolik asitlerin HPLC ile analiz koşulları.....	21
Tablo 3.1 Fenolik asitlerin standart kalibrasyon verileri	28
Tablo 3.2 Sulu iki faz ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen parametreler	41
Tablo 3.3 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile yöntemin analitik performansı.....	42
Tablo 3.4 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile optimize edilen sulu iki fazlı ekstraksiyon yöntemi ile kırmızı elma örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)	44
Tablo 3.5 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile yeşil elma örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)	45
Tablo 3.6 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile sarı armut örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)	46
Tablo 3.7 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile yeşil armut örneğinde fenolik asitlerin sulu iki faz ekstraksiyon yöntemi ile analiz sonuçları (n=3).....	47
Tablo 3.8 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile ithal muz örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3).....	48
Tablo 3.9 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile yerli muz örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)	49
Tablo 3.10 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile yeşil üzüm örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)	50
Tablo 3.11 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile kırmızı üzüm örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)	51
Tablo 3.12 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferat iyonik sıvısı ile geliştirilen yöntemin analitik performansı	61
Tablo 3.13 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferat iyonik sıvısı ile kırmızı elma örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)	63
Tablo 3.14 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferat iyonik sıvısı ile yeşil elma örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)	64
Tablo 3.15 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferat ile sarı armut örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3).....	65

Tablo 3.16 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferrat ile yeşil armut örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)	66
Tablo 3.17 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferrat iyonik sıvısı ile ithal muz örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3).....	67
Tablo 3.18 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferrat iyonik sıvısı ile yerli muz örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)	68
Tablo 3.19 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferrat iyonik sıvısı ile yeşil üzüm örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)	69
Tablo 3.20 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferrat ile kırmızı üzüm örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3).....	70



BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Fenolik Asitler

“Fenolik asit” terimi, genellikle bir karboksilik asit grubuna sahip fenolik bileşikler temsil eder. Fenolik veya fenolkarboksilik asitler, bitki fenolik bileşiklerinin ana sınıflarından biridir ve tohum, meyve kabukları ve sebze yapraklarında yüksek derişimlerde bulunan bileşiklerdir. Tipik olarak amidler, esterler veya glikozitler gibi bağılı halde veya nadiren serbest formda bulunurlar. Fenolik asitler temel olarak hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asit olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. Bu asitler, iyi bilinen in vitro antioksidan vitaminlerden daha fazla antioksidatif aktiviteye sahiptir (Kumar ve Goel, 2019; Tsao ve Deng, 2004). Fenolik asitler, bir asidik grup taşıyan aromatik halka ve bir ya da daha fazla hidroksil grubu içeren, günlük gıda alımında yaygın olarak kullanılan fitokimyasallardır. Bu bileşikler, enzim aktivitesi, protein sentezi, fotosentez, hücre iskelet yapısı, tohum, yaprak ve köklerde besin alımı gibi çeşitli fizyolojik aktivitelerde yer alırlar. Bitki fenolik asitleri esas olarak şikimik asit yolu vasıtasıyla üretilir ve serbest ya da konjuge formdadır. Serbest fenolik asitler metanol, etanol ve aseton ile doğrudan ekstrakte edilebilirler. Konjuge fenolik asitler bir ester bağı yoluyla hücre duvarına bağlanır. Serbest fenolik asitler çözünür fenolik asitlerdir. Fenolik asitler meyve ve sebzelerde serbest veya çözünür konjugantlar olarak bulunur. Potansiyel sağlık yararları, antioksidan, antiviral, antikanserojenik gibi aktiviteleri göz önüne alındığında bu etkilerinden dolayı araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Fenolik asitler genellikle bitki kaynaklı gıdalarda bulunabilen ve günlük diyetimizin önemli bir bölümünü oluşturan ikincil metabolitlerdir. Bütün gıda, sebze ve meyvelerde doğal olarak oluşabilen zengin besin değeri nedeniyle insan sağlığı için önemlidir (Zhang ve diğer., 2019; Heleno, Martins, Queiroz, ve Ferreira, 2015; Sevgi, Tepe, ve Sarikurkcü, 2015). Aromatik halka üzerinde bir veya daha fazla hidroksil grubuna sahip fenolik asitler, antioksidan, antitümör ve hipoglisemik özelliklerinden dolayı da büyük ilgi görmüştür. Bu bileşikler bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunur. Fenolik asitler ayrıca indirgeyici ajanlar, hidrojen vericileri veya tekli oksijen söndürücüler olarak işlev gören metal şelatlama ve redoks özelliklerine sahip bir grup ikincil metabolit oluşturur. Bu

asitlerin, antioksidanlar olarak fenoliklere atfedilen vazoprotektif, antikanserojen, antiviral ve antialerjenik gibi çeşitli farmakolojik aktiviteler sergilediği bilinmektedir (Rao, Zhao, Li, ve Huang, 2018).

Fenolik asitler, bitkilerdeki ikincil metabolitlerdir. Hayvanlar ve insanlar bu bileşikleri sentezleyemezler ve bu nedenle sadece yiyecekler vasıtasıyla elde edebilirler. Meyveler, sebzeler ve tahıllar iyi birer fenolik asit kaynağıdır. Yüksek derişimlerde tüketilen fenolik asitler prooksidan aktiviteler sergileyebilirler. Yapılan çalışmalar yüksek fenolik asit alımlarının, özellikle protein sindirim oranlarının azalmasıyla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle birçok ülkede fenolik asit alımı üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Song ve diğer. 2020; Karabulut ve Yemiş, 2019). Fenolik asitler, elma, kahve, çay ve bira da dahil olmak üzere çok çeşitli meyve, sebze ve içeceklerde bulunur. Fenolik asitler, yiyecek ve içeceklerin tadını ve lezzetini iyileştirmede önemli bir rol oynar. Ek olarak, fenolik asitler son 20 yılda antioksidan, antikanser ve antimikrobiyal gibi çeşitli özelliklerinden dolayı araştırmacıların yoğun ilgisini çekmiştir. Bununla birlikte, fenolik asitler tripsin gibi enzimlerle etkileşerek besin emilimine engel olup negatif etkilere de yol açabilmektedir. Tüm bu özelliklerinden dolayı dünya genelinde yaygın olarak çalışılmaktadır (Zhang ve diğer., 2020; Husain ve Gupta, 2015). Fenolik asitler, ayrıca gıdaların lezzetini, tadını ve rengini de etkiler. Son yıllarda, fenolik bileşikler bazı önemli hücresel enzimatik fonksiyonlarını düzenleme kapasiteleri nedeniyle gıda ve tıp bilimcilerinin dikkatini çekmiştir. Karbonil ve hidroksil gruplarıyla fenolik asitler, hidrojen bağları veya kovalent bağlar yoluyla nişasta ve diğer polisakkaritler ile bağlanabilir, köprüler ve çapraz bağlar oluşturabilir (Yu, Vasanthan, ve Temelli, 2001). Fenolik bileşiklerin, kronik hastalıkların önlenmesinde önemli rol oynadığı ve bu nedenle insan sağlığına faydalı olduğu bilinmektedir. Fenolik bileşikler sadece birçok fizyolojik sürece katılmaz, aynı zamanda güçlü antioksidanlar olarak hareket ederler. Fenolik asitlerin antioksidan özelliği, tehlikeli serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltmaya olanak sağlar. Araştırmacılar, serbest radikal süpürücü özelliğe sahip olan bitki kaynaklı fenolik asitlerin, oksidatif strese bağlı hastalıklara karşı koruyucu ajanlar olarak işlev gördüklerini ve antioksidan olarak vitaminlerden daha etkili olduklarını bildirmiştir. Aynı zamanda fotosentez, protein sentezi ve enzim aktivitesi gibi birçok fonksiyonda düzenleyici olarak ve zararlı organizmalara ve patojenlere karşı doğal koruyucu

oldukları bildirilmiştir. Tüm bu özelliklerinin yanı sıra fenolik asitler insan vücudunun savunma sistemlerini güçlendiren ve sağlığın iyileşmesinde olumlu etkilere sahip bileşiklerdir (Husain ve Gupta, 2015, Çağlar ve Demirci, 2017). Fenolik asit ve türevleri gıda bitkilerinde yaygın olarak bulunan biyoaktif maddelerdir. Polifenoloksidaz enzimi tarafından katalizlenen fenolik asitlerin enzimatik esmerleşme reaksiyonu, istenmeyen renk ve lezzet oluşumuna, meyve ve sebzelerde besin kaybına neden olabilmektedir. Meyvelerdeki enzimatik esmerleşme reaksiyonunun fenolik asitlerin aktivitesinin sonucu olduğu düşünülmektedir. Fenolik asitler gıdalarda istenmeyen aroma ve tat oluşmasına doğrudan katkıda bulunabilir. Sonuç olarak fenolik bileşikler bitkisel gıdalarda çok yaygın bulunur ve günlük besin alımlarıyla önemli miktarda tüketilir. Taze ve işlenmiş gıdaların besleyicilik kalitesiyle yakından ilişkilidir. Bunun yanında fenolik asitlerin antioksidan aktiviteleri de onlarca yıldır bilinmektedir. Fenolik antioksidanları içeren doğal maddelerin ve gıda ürünlerinin kullanımı ile ilgili araştırmalar da büyük ilgi görmektedir (Oksana, Marian, Mahendra, ve Bo, 2012; Sukhonthara, Kaewka, ve Theerakulkai, 2016; Nirmal, Benjakul, Ahmad, ve Arfat, 2015).

Fenolik asitler, polifenollerin bir sınıfıdır ve meyveler, sebzeler, sert kabuklu bitkiler, yemişler, kahve ve çayda bulunan tüm fenolik bileşiklerin yaklaşık üçte birini oluşturur. Fenolik asitlerin antikanser, antimutajen ve antioksidan gibi birçok faydalı biyolojik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Daha önce yapılan araştırmalar, fenolik bileşikler bakımından zengin bitkisel gıdaların tüketiminin, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar, bazı kanser tipleri, tip 2 diyabet ve osteoporoz dahil olmak üzere çeşitli kronik hastalık riskinde azalma ile bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur. Fenolik asitlerin bu nedenle fonksiyonel gıdalarda ve diğer ürünlerde sağlığı geliştiren bileşenler olarak kullanılabileceği ortaya konmuştur (Li ve diğer., 2020).

Fenolik asitlerin bitkilerdeki aromatik amino asitlerin biyosentezinde substrat olarak önemleri, gıda maddelerinde fazla miktarlarının kalite kaybına neden olmaları ve insanların bu gıdaları tüketmeleri durumunda toksik etkilere neden olmasından dolayı, fenolik asitlerin tanımlanması ve kantitatif analizi gereklidir (Sukhonthara, Kaewka, ve Theerakulkai, 2016).

1.2 Fenolik Asitlerin Analiz Yöntemleri

Fenolik asitlerin sağlık için önemleri göz önüne alındığında gıda maddelerinde belirlenmeleri için doğru ve güvenilir metotlar gereklidir. Birçok bitki fenolik bileşiği iyi bir doğal antioksidan kaynağı olarak mutajen ve kanserojenler üzerinde inhibitör etkiye sahiptir. Geçtiğimiz yıllarda, çevresel örnekler ve bitki örneklerinde fenolik bileşiklerin ayrılması ve belirlenmesine yönelik geniş çaplı araştırmalar yapılmıştır. Fenolik asitlerin belirlenmesine yönelik başlıca teknikler UV-Vis spektroskopisi, ince tabaka kromatografisi (TLC), gaz kromatografisi (GC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kapiler elektroforez (CE) gibi yöntemlerdir (Esquivel ve diğer., 2020; Kozłowicz ve diğer., 2020; Farajzadeh ve Mogaddam, 2016). Fenolik asitlerin izolasyonu ve kantitasyonu bu bileşiklerin çok çeşitli türleri ve derişim seviyeleri nedeniyle zorluklar taşır. Bu nedenle, tanımlanması ve kantitasyonu için etkin yöntemlerin geliştirilmesi önemlidir. HPLC yöntemi, bitki ekstraktlarından ve diğer doğal ürünlerde fenolik asitlerin kompleks karışımlarının ayrılmasında ve tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Chen, Zuo, ve Deng, 2001; Nour, Trandafir, ve Cosmulescu, 2013). Karmaşık doğal matrislerdeki fenolik bileşiklerin belirlenmesi için güvenilir ve pratik yöntemler oldukça ilgi görmektedir. Çözücü ekstraksiyonunu içeren sıvı-sıvı ekstraksiyon ve kolon kromatografisi gibi geleneksel ayırma teknikleri bitki fenoliklerinin izolasyonu ve saflaştırılması için iyi bilinen prosedürlerdir. Son on yılda, otomasyona olanak sağlayan ve ekstraksiyon zamanı kısıtlamalarını ortadan kaldıran, organik çözücü tüketimini azaltan tekniklere artan bir talep olmuştur. Bitki materyali gibi, analiz edilen bileşiklere etki edebilecek çok çeşitli farklı bileşik içeren örnek matrislerinin analizinde HPLC tekniği hızlı ve tekrarlanır sonuç alma nedeniyle yaygın kullanılan tekniklerin başında gelmektedir (Sterbova, Matejicek, Matejicek ve Kuban, 2004). Biyoaktif fito bileşiklerin hızlı ve doğru tespiti, bitki örneklerinin fitokimyasal incelenmesinde önemlidir. Bitki materyallerinin hızlı şekilde taranması için verimli sistemler kullanılmalıdır. Kromatografik teknikler, doğal ürünler alanında, özellikle bitki kaynaklarından fenolik asitler gibi biyoaktif bileşiklerin tanımlanması, ayrılması ve karakterizasyonu konusunda önemli ölçüde katkıda bulunur. Bitki ekstraktlarının etkin analizi hem biyolojik deney hem de çeşitli tespit yöntemleri ile birlikte HPLC gibi kromatografik yöntemlerle gerçekleştirilebilir. HPLC, biyoaktif bileşiklerin hızlı analizi için güçlü bir tekniktir çünkü karmaşık bitki

örneklerinin sistematik olarak incelenmesine olanak sağlar ve özellikle tanımlanmış bileşiklerin tanımlanması ve değerlendirilmesine yöneliktir (Kumar, 2017).

Fakat karışım içerisinde bulunan tüm analitlerin ayrılmasının zor olduğu durumlarda nicel analizlerde eksiklikler olabildiği için, analiz öncesi bu analitlerin analitik matriksden ayrılması ve zenginleştirilmesi gerekebilmektedir. Ayırma ve zenginleştirme yöntemleri, analitik ve çevresel kimya alanlarında büyük önem taşımaktadır. Bu yöntemler, matris etkilerinin ve ortamda bulunan yabancı maddelerin ortadan kaldırılması veya en aza indirilmesini sağlayan yöntemlerdir. Geleneksel numune hazırlama yöntemleri zaman alıcı, yüksek miktarlarda çözücü gerektiren, çok miktarda atık oluşmasına neden olan ve reaktiflerde bulunan safsızlıklar nedeniyle sonuçlarda hatalara neden olabilen yöntemlerdir. Yeni geliştirilmeye başlanan numune hazırlama yöntemleri, yukarıda sayılan eksiklikleri gidermesinin yanı sıra kromatografik tekniklerle birleşme imkânı sağlaması, yüksek analiz hızı, yüksek etkinlik, düşük operasyon maliyeti, düşük organik çözügen kullanımı ve çevre dostu olmaları gibi bazı avantajlar sağlamaktadır (Jalili, Barkhordari, ve Ghiasvand, 2020).

1.3 Zenginleştirme Yöntemleri

1.3.1 Katı Faz Ekstraksiyonu

Katı faz ekstraksiyonu çevresel, farmasötik, klinik, gıda ve endüstriyel kimya gibi birçok alanda kullanılan bir örnek hazırlama tekniğidir. Katı faz ekstraksiyonu sadece kendi başına bir örnek hazırlama ve zenginleştirme yöntemi değil aynı zamanda kromatografik analiz gibi diğer analitik yöntemlerle de birlikte çalışma olanağı sağlayan bir yöntemdir. Analitik sürecin analiz süresini azaltma, analit kaybını önleme ve hassasiyeti artırma gibi birçok avantajları vardır (Chen ve diğer., 2009).

Geçtiğimiz yıllarda, numune hazırlama alanındaki gelişmeler kimyasal bileşiklerin ayrılması ve analizine yönelik geliştirilen araçların gerisinde kalmıştır. Numune hazırlama, analizin en çok zaman alan ve doğruluğunu etkileyen parametredir. Bu nedenle örnek hazırlama basamağı olarak katı faz ekstraksiyon kullanımında büyük bir artış olmuştur. Katı faz ekstraksiyonda temel ilke katı fazda tutulan bileşiklerin daha sonra analitler için daha fazla affiniteye sahip bir çözücü ile elüe edilerek analizlenmesine dayanır. Tutunma ve elüsyon mekanizması, analit ile sorbentin yüzeyi

üzerindeki aktif merkezler arasındaki çekim kuvvetlerinden kaynaklar. Deneysel prosedür olarak katı faz ekstraksiyonu;

- Sorbentin içinden katı maddenin yüzeyini şelatlandıran uygun bir çözücünün geçirilerek aktivasyonu
- Aktivasyon çözücüsünün, örnek matrisine benzer bir sıvı ile uzaklaştırılması
- Numunenin uygulanması
- Numune içindeki girişim yapan türlerin analit ile etkileşmeyen bir çözücü ile ortamdan uzaklaştırılması
- Analitlerin adsorbandan uygun bir çözücü ile elüsyonu ve analiz için toplanması

Olarak beş basamakta gerçekleşir. Ancak yüksek miktarlarda kullanılan organik çözücüler yüzünden katı faz ekstraksiyonu hem maliyetli hem de çevre dostu olmayan bir tekniktir (Berrueta, Gallo, ve Vicente, 1995).

Katı faz ekstraksiyon tekniği, hızlı ve seçici numune hazırlamaya olanak sağladığı için 1960' lı yıllarda yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanılan bir tekniktir. Bu tekniğin, saflaştırma, zenginleştirme, türevlendirme ve fraksiyonlama gibi birçok amaçla kullanılması çok yönlü çalışılmasına imkân verir. Katı faz ekstraksiyonun çalışma prensibi çözünen maddelerin iki faz arasında ayrılmasını içerdiği için sıvı-sıvı ekstraksiyona benzer. Ancak iki karışmayan sıvı faz yerine sıvı ve katı faz arasındaki bölünmeyi içerir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonun en büyük dezavantajlarından biri olan faz ayrımının tamamlanmaması gibi bir durum katı faz ekstraksiyonda ortadan kalmış olur (Zwir-Ferenc ve Biziuk, 2006).

1.3.2 Katı Faz Mikroekstraksiyonu

Katı faz mikroekstraksiyon, analitik kimyada numune hazırlamada kullanılan en popüler ve çevre dostu olan tekniklerden biridir. İlk olarak 1990 yılında Arthur ve Pawliszyn tarafından kullanılmıştır. O zamandan beri, dünya genelinde birçok araştırmacı bu tekniğin kullanım alanlarının arttırılması için yeni metodik çözümler geliştirmek için yoğun araştırmalar yapmaktadırlar. Katı faz mikroekstraksiyonu, bir çeşit katı faz ekstraksiyonudur ancak katı faz ekstraksiyonunun uzayan ekstraksiyon

zamanı ve daha da önemlisi yüksek miktarlarda organik çözücüler kullanımı gibi dezavantajlarını ortadan kaldıran bir tekniktir. Katı faz mikroekstraksiyonu;

- Analiz süresini önemli ölçüde kısaltması
- Analiti ppt düzeyinde yüksek duyarlılıkla belirleme olasılığı
- Küçük örnek hacimlerinde çalışmaya olanak vermesi
- Karmaşık ekipman, cihaz ve araçlara ihtiyaç duyulmaması ve analiz hızı
- Pahalı ve toksik organik çözücülerin kullanımını ortadan kaldırarak maliyeti düşürmesi
- Otomasyona imkân vermesi
- Diğer enstrümental tekniklerle birleşme olasılığı

gibi birçok avantaja sahiptir. Tüm bu özellikler katı faz mikroekstraksiyonu analitik kimyanın gelişmesinde, numune hazırlama ve analitin zenginleştirilmesi için en çok tercih edilen tekniklerden biri haline getirmektedir (Polatka-Wasyłka, Szczrpanska, ve Namiesnik, 2015; Arthur ve Pawliszyn, 1990).

Katı faz mikroekstraksiyon tekniği temel olarak analitin sorbente adsorpsiyonu ve analitin desorpsiyonu olmak üzere iki basamaktan oluşur. Kullanılan sorbentler genellikle polimerik materyallerdir ve bunlar organik çözücülerinkine benzer özelliklere sahiptir. Bu teknik, çözelti veya gaz halindeki örneklerle uygulanabilir (Sarafraz-Yazdi ve Razavi, 2015; Aulakh, Malik, Kaur, ve Schmitt-Kopplin, 2005).

1.3.3 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu

Bulutlama noktası ekstraksiyonunda analit çözeltisine çözeltiye yüzey aktif madde ilave edilerek analitin miseller içeresine hapsolması sağlanır. Eğer analit bir metal iyonu ise ortama kompleksleştirici reaktifde ilave edilir. Bu aşamada sıcaklık ya da basınç gibi parametreler değiştirilerek bulutlama noktasına ulaşılır ve sulu çözeltide bulanıklık oluşması sağlanır. Bulutlama noktasına ulaşılmasıyla yüzey aktif madde çözeltisi bulanıklaşır ve çözelti küçük hacimli bir yüzey aktif madde fazına ayrılır. Bu faz yüzey aktif madde bakımından zengin, misel yapılarla kaplanmış analit ile birlikte sulu bir fazdır. Son olarak çözeltinin içinde bulunduğu örnek tüpü santrifüjlenerek misel faz ayrılarak analiz edilir.

Bulutlama noktası ekstraksiyonu pahalı organik çözücüler yerine nispeten ucuz, toksik olmayan, uçucu olmayan ve tutuşma özelliği bulunmayan yüzey aktif maddelerin kullanılması, insan sağlığı ve çevre için toksik maddelerin kullanımını sınırlaması ve atık olarak üretilmesini azaltmaya veya ortadan kaldırmaya olanak sağladığı için çevre dostu bir teknik olarak tanımlanabilir (Bezerra, Arruda, ve Ferreira, 2005).

Bulutlama noktası ekstraksiyonu yüksek ekstraksiyon verimi ve yüksek derişim faktörü gibi nedenlerden dolayı geleneksel ekstraksiyon tekniklerine mükemmel bir alternatiftir. Ayırma ve ön deriştirmeye dayalı bu ekstraksiyon tekniğı çeşitli analitik metotların tespit limitlerini geliştirmede sahip analitik bir araçtır (Ojeda ve Rojas, 2009).

1.3.4 Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu

Dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyonu, Razaee ve arkadaşları tarafından geliştirilen bir mikroekstraksiyon tekniğıdir. Bu teknikte ekstraktan olarak bir organik çözücü ve bir dağıtıcı çözücü karışımı hızlı bir şekilde sulu çözelti halindeki numuneye enjekte edilir. Böylece oluşan sulu örnek boyunca dağılan küçük damlacıkların oluşmasına neden olur. Emülsiyon haline getirilmiş damlacıklar büyük bir geçiş alanına sahiptir ve sonuç olarak dengeye hızla ulaşır ve ekstraksiyon neredeyse anında gerçekleşir. Elde edilen yüksek ön deriştirme oranı bu tekniğın temel avantajıdır. Ekstraksiyondan sonra bulanık karışım santrifüjlenir ve ekstraktan fazın damlacıkları ekstraksiyon tüpünün altında toplanır. Sonuç olarak toplanan damlacıklar kromatografik sistemlere enjekte edilir ya da doğrudan ölçüme gönderilir. Dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyonu, su numuneleri gibi basit matrise sahip örneklerin analizi için uygun bir araçtır. Ancak, son yıllarda gıda analizi gibi diğer alanlardaki ilgi ve uygulama sayısı artmıştır (Vinas, Campillo, Lopez-Garcia, ve Hernandez-Cordoba, 2014).

Dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyonu, ekstraksiyon ve dağıtıcı çözeltinin uygun bir karışımının sulu örneğe hızlı bir şekilde enjekte edilmesiyle gerçekleşir. Dağıtıcı çözücü olarak genellikle aseton, metanol ve asetonitril kullanılırken ekstraksiyon çözücüsü olarak da klorobenzen, karbon tetraklorür ve tetrakloroetilen gibi klorlu organik çözücüler kullanılabilir. Ekstraksiyon sırasında ekstrakt karışımın toplam

hacminin %1-3'ünü oluşturur ve böylece bulutlu bir çözelti oluşur. Bunun sonucunda ekstraksiyon çözücüsünün numune çözeltisinde dağılan küçük damlacıkların oluşması gerçekleşir. Santrifüjden sonra küçük damlacıklar örnek tüpünün altında toplanır. Alt fazda toplanan analitlerin analizi, daha sonra enstrümental analiz ile gerçekleştirilebilir (Ojeda ve Rojas, 2009b). Yöntemin en büyük avantajı miktolitre düzeyinde organik çözücülerin kullanılmasıdır (Kocurova, Balogh, Sandrejova, ve Andruch, 2012).

1.3.5 Dispersif Mikro-Katı Faz Ekstraksiyonu

Sorbent fazında mikro miktarların kullanımına dayalı yeni bir zenginleştirme metodu olan dispersif mikro-katı faz ekstraksiyon metodu, katı faz ekstraksiyonu ile karşılaştırıldığında organik çözücü tüketimini azaltması, daha az miktarda adsorban kullanımı, kısa ekstraksiyon zamanı ve yüksek ekstraksiyon etkinliği gibi birçok avantaja sahiptir. Bu ekstraksiyon yönteminde sorbent malzeme yöntemin seçiciliği, analitik performansın artmasında ve hassasiyetinin iyileştirilmesinde önemli bir faktördür. Sorbent malzeme olarak yaygın bir şekilde manyetik nano partiküller kullanılmaktadır. Nano partiküller, daha küçük boyutlarda ve geniş yüzey alanlarıyla yüksek adsorpsiyon aktivitesi ve manyetik özellikleriyle de santrifüj ve filtrasyona gerek kalmadan hızlı faz ayrımı sağlayarak hedef materyalin karmaşık örnek matrisinden ayrılmasını sağlar (Chen, Liu, Yan, Wang, ve Lu, 2020).

1.3.6 Sulu İki Faz Sistemli Ekstraksiyon

Sulu iki faz sistemli ekstraksiyon yöntemleri, bir sıvı-sıvı fraksiyonlama yöntemidir. Yöntem, iki hidrofilik polimerin veya bir polimer ve bir tuzun sulu çözeltilerinin belirli bir eşik derişim değerinin üzerinde karıştırılmasıyla iki fazın birbirinden ayrılması ilkesine dayanır. Sulu iki faz sistemli ekstraksiyon yöntemleri, geri kazanım verimini ve saflaştırma oranını önemli ölçüde arttırabilen, hızlı saflaştırmanın yanı sıra toksik olmayan ve düşük maliyetli olması nedeniyle ayırma işlemleri için ideal bir teknoloji haline gelmiştir. Bu yöntem, girişim yapan türlerin ortamdan uzaklaştırılması ve aynı zamanda istenen hedef ürünleri ayıran tek adımlı bir işlem olarak ve hedef ürünlerin iki faz arasında seçici olarak ayrılmasını sağlayan bir yöntemdir (Yau ve diğer., 2015).

Sulu iki faz sistemleri, ayırma ve zenginleştirme işlemlerinde adım sayısı ve toplam maliyeti azaltan alternatif bir ekstraksiyon yöntemidir. Suda çözünür iki polimer veya bir polimer ve bir tuzdan oluşur. Faz oluşturan materyallerin işlem basitliği ve düşük maliyeti bu yöntemin ayırma işlemlerinde kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Oluşan her iki fazda da %80' den fazla miktarda su bulunması, hızlı ayırma ve kütle transferi, seçici ayırma gibi birçok avantaja sahiptir. Genel olarak iki ana tip sulu iki faz sistemli ekstraksiyon bulunur, birincisi polimer/polimer ve ikincisi de polimer/tuz sistemleridir. Sınırlayıcı derişimler aşıldığında, birbirini ile karışmayan iki sulu faz oluşur. Sınırlayıcı derişimler, faz oluşturan bileşenlerin tipine, çözeltinin pH' ına, iyonik kuvvetine ve sıcaklığa bağlıdır. Polietilen glikol sulu iki faz sistemli ekstraksiyon sistemlerinde faz oluşturan polimerlerden biri olarak yaygın kullanılmaktadır. Çünkü düşük maliyetli ve diğer nötr polimerlerin yanı sıra tuzlarla da iki fazlı bir sistem oluşturabilme özelliğine sahiptir. Polimer/polimer sistemin yüksek maliyeti ve yüksek viskozitesi nedeniyle, sulu iki fazlı polimer/tuz sistemleri daha çok tercih edilmektedir. Üstelik, polimer/tuz sistemleri daha büyük yoğunluk farkları, daha fazla seçicilik, daha düşük viskozite, düşük maliyet ve daha kolay ayrılabilir fazlar oluşturması gibi birçok avantaja sahiptir (Raja, Murty ve diğer., 2011). Alkol/tuz sisteminden oluşan iki fazlı sistemler, polimerler ile karşılaştırıldığında ucuzdur. Fakat bunun en büyük dezavantajı, birçok proteinin alkol açısından zengin faz ile uyumlu olmamasıdır. Sulu miseller iki fazlı sistemler ise, iyonik olmayan yüzey aktif maddeler bu sistemlerin oluşturulması için kullanılabileceğinden, iyonik çevreye duyarlı çözücüler için de faydalıdır. Bunun için de karışık misel sistemleri de iki fazlı sistemlerde kullanılmaktadır (Iqbal ve diğer., 2016). Sulu iki faz sistemli ekstraksiyon yöntemi, bitki kaynaklı yararlı bileşenlerin ayrılması ve değerli yan ürünlerin atıklardan geri kazanımı gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Raghavarao, Ranganathan, Srinivas, ve Barhate, 2003).

Geleneksel solvent ekstraksiyon yöntemleri çok sayıda işlem basamağı içeren, zaman alıcı ve maliyeti yüksek yöntemlerdir. Aynı zamanda saflaştırma basamağında verim kaybına neden olduklarından dolayı etkili, ekonomik, uygulama alanı geniş, yüksek saflık ve verim sağlayan yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Sulu iki faz sistemli ekstraksiyon yöntemleri tüm bu kriterleri sağlayan yeni bir saflaştırma yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Uygulama alanlarının genişliği, proses süresi,

yüksek zenginleştirme faktörü ve kompleks örnek matrisinden istenilen analitin saflaştırılmasındaki başarısı nedeniyle daha iyi bir alternatif durumundadır. Sulu iki faz sistemli ekstraksiyon yönteminde analizi yapılmak istenen türler bir fazda, girişim yapan türler diğer fazda toplanarak böylece analit fazların birinde zenginleştirilmiş olur (Patil ve Raghavarao, 2007). Son yıllarda iyonik sıvı bazlı sulu iki faz sistemli ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmektedir. İyonik sıvı kullanımı ile ekstraksiyon yönteminin etkinliğinin arttığı gözlenmiştir (McQueen ve Lai, 2019).

1.4 İyonik Sıvılar

Genel olarak “iyonik sıvılar” terimi iyonlardan oluşan sıvılar anlamına gelmektedir. 1990’lı yıllarda erime noktası 100°C’ nin altında olan iyonik sıvıların kimyasal reaksiyonlar için yeni ve eşsiz bir ortam oluşturduğu düşüncesi yaygınlaşmıştır. Geleneksel organik çözücüler ile karşılaştırıldığında, sentez ve ekstraksiyon için iyonik sıvılar, fiziksel özelliklerinin değiştirilmesine olanak sağlaması nedeniyle birçok avantaja sahiptir. Bu sıvılar ihmal edilebilir buhar basıncı ve suyunkinden daha yüksek bir yoğunluğa sahiptir. İyonik sıvılar çok çeşitli polaritelere sahip maddelerle karışabilir ve aynı anda organik ve inorganik maddeleri çözebilir. İyonik sıvıların bu özellikleri mevcut yeni ekstraksiyon proseslerinin geliştirilmesi için fırsat sunmaktadır (Marsh, Boxall, ve Lichtenthaler, 2004).

Son yıllarda iyonik sıvılara olan ilgi;

- Tespit edilemeyecek düzeyde düşük olan buhar basınçları nedeniyle geleneksel organik çözücülerin yerini alan ideal çözücüler olarak kullanılması,
- Sıvı haldeki iyonik sıvılardaki iyonlar arasında etkili olan coulomb kuvvetlerinin neden olduğu son derece yüksek polar karakterleri nedeniyle, homojen ve bifazik katalizde yeni uygulamalara zemin hazırlaması,
- Sıvı karışımlardaki belirli bileşenler için seçici çözünürlük göstermesi

nedeni ile artmıştır. İyonik sıvıların en çarpıcı özelliği ise ekstraksiyon ortamı olarak işlev görmeleri ve ayırma ve zenginleştirme işlemleri için uygun olmalarıdır (Heintz, 2005).

İyonik sıvılar yanıcı ve uçucu olmayan, geri dönüştürülebilir materyaller olmaları nedeniyle çevre dostu çözücüler olarak sınıflandırılırlar. Olağan üstü çözünme

potansiyelleri, termal kararlılık ve ayarlanabilir anyon ve katyon seçimleri gibi dikkate değer özellikleri nedeniyle, kimyasal sentezler için uygun ortam olarak kabul edilirler. İyonik sıvılar seçilen katyona göre alkilamonyum, dialkilimidazolyum, fosfonyum ve alkilpiridinyum olarak dört ana gruba ayrılır. İyonik sıvılar birçok reaksiyonda başarılı bir şekilde çözücü ve katalizör olarak kullanılmaktadır. Amonyum temelli iyonik sıvılar, yüksek katodik stabiliteleri, düşük erime noktaları ve düşük viskoziteleri nedeniyle elektrolit olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İmidazolyum bazlı iyonik sıvılar en yaygın çalışılan iyonik sıvılar arasındadır. Bir katyon olarak imidazolyum halkasının seçimi, genellikle oksidatif ve indirgeyici koşullar içerisindeki stabilitesi, düşük viskozite ve sentez kolaylığı sağlar. Aynı zamanda, birçok organik reaksiyonun reaksiyon süresi ve verimini geliştirmesi için katalizör olarak imidazolyum esaslı iyonik sıvılar yaygın olarak kullanılmaktadır. Piridinyum ve fosfonyum temelli iyonik sıvılar, imidazolyum ve amonyum bazlı akrabalarına göre daha yenidir ve organik sentezdeki kararlılıkları, reaktiviteleri ve katalitik rolleri üzerine çalışmalar devam etmektedir (Ghandi, 2014). İyonik sıvılar çok çeşitli polaritelere sahip maddelerle karışabilir ve aynı anda organik ve inorganik maddeleri çözebilir. İyonik sıvıların bu özellikleri mevcut yeni ekstraksiyon işlemlerinin geliştirilmesi için de fırsat sunmaktadır (Marsh, Boxall, ve Lichtenthaler, 2004).

1.5 Literatür Özeti

Literatür çalışmalarında, analiz öncesi fenolik asitlerin analitik matriksden ayrılması zenginleştirilmesi için geliştirilen sulu iki faz sistemli ekstraksiyon yöntemine ilişkin çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

do Rosario ve diğer. (2019) tarafından yapılan çalışmada fenolik bileşikler için polietilen glikol ve potasyum fosfat ile sulu iki faz sistemini oluşturmuştur. Çalışmada farklı molekül ağırlıklarına sahip polietilen glikol kullanılmıştır. Organik çözücülerin sulu iki faz sisteminde yardımcı maddeler olarak potansiyel uygulamalarını değerlendirmek için, bu çalışmada ilk kez asetonitrilin polimer/tuz sulu iki faz sisteminde yardımcı madde olarak etkisi incelenmiştir. Bu tür sistemlerin, düşük ara yüz gerilimi, hızlı ve yüksek faz ayırma oranları ve düşük maliyet gibi avantajlar nedeniyle, polimer/polimer sistemlerde kullanımın avantajlı olduğunu göstermiştir.

Neves ve diğer. (2019) çalışmasında polimer/tuz sisteminden oluşan sulu iki faz ekstraksiyon yöntemini kullanarak fenolik bileşikler, alkaloidler ve aminoasitler gibi biyomoleküllerin analizini gerçekleştirmiştir. Biyomolekülleri analiz öncesi sulu iki faz sistemli ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte etmişlerdir. Sulu iki faz PEG400/((NH₄)₂SO₄) sistemi ile oluşturulmuştur. Çalışmada 1-butil-3-metilimidazolyum klorür, 1-butil-1-metilpirrolidinyum klorür, 1-butil-3-metilpiperidinyum klorür, tetrabutilamonyum klorür ve tetrabutylfosfonyum klorür iyonik sıvıları adjuvant olarak kullanılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlarda iyonik sıvıların adjuvant olarak kullanıldığı sulu iki fazlı sistemlerde biyomoleküllerin ekstraksiyon verimlerinin arttığı sonucuna varılmıştır.

Dang ve diğer. (2014) tarafından yapılan çalışmada üzüm tohumlarındaki fenolik asitlerin belirlenmesi için mikrodalga destekli sulu iki faz ekstraksiyon yöntemini kullanmışlardır. Çalışmada sulu iki faz sistemi, kısa zincirli alkol, amonyum sitrat ve su kullanılarak oluşturulmuştur. Toz haline getirilmiş üzüm tohumlarının üzerine belirli miktarlarda kısa zincirli alkol ve amonyum sitrat eklenerek mikrodalga fırında bekletilmiştir. Mikrodalga işleminden sonra oda sıcaklığında bir saat bekletilerek faz ayırımının sağlanması için 5 dakika 2000 rpm' de karışım santrifüj edilmiş ve sonrasında HPLC' de analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda %97' nin üzerinde geri kazanım elde edilmiştir.

Claudio ve diğer. (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmada endüstriyel atık sulardan elde ettikleri gallik asit örneklerinin iyonik sıvı temelli sulu iki faz ekstraksiyon yöntemi ile ekstraksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Gallik asitin örnekten ayrılması için ekstraksiyon prosedürü olarak iyonik sıvı/inorganik tuz sistemi kullanılmıştır. İyonik sıvı olarak 1-butil-3-metilimidazolyum metilsülfat kullanılmış ve tuz olarak da Na_2SO_4 kullanılmıştır. Ekstraksiyon sonucunda gallik asit için %99 gerikazanım sonucu elde edilerek iyonik sıvı temelli sulu iki faz ekstraksiyon yönteminin endüstriyel sularda fenolik bileşiklerin ayrılması için yararlı bir teknik olduğu sonucuna varılmıştır.

Dhamole ve diğer. (2014) tarafından yapılan çalışmada surfaktant bazlı sulu iki faz sistemi kullanarak p-kumarik asit ve ferulik asit analiz öncesi ekstrakte etmiştir. Çalışmada Triton X-45, Triton X-114, Triton X-100 gibi surfaktantlar kullanılmış fakat en iyi sonuç Triton X-114 ile elde edilmiştir. Optimize edilen yöntem p-kumarik asit ve ferulik asit için mısır koçanı hidrolizatına uygulanmıştır.

Almeida ve diğer. (2014) çalışmasında iyonik sıvı temelli sulu iki faz ekstraksiyon sistemini kullanarak antioksidan özellik gösteren fenolik asit grubuna giren gallik, vanillik ve siringik asitin analizini gerçekleştirmiştir. Polimer/tuz/iyonik sıvı sistemini kullanarak ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. İyonik sıvı olarak 1-butil-3-metilimidazolyum tiyosiyanat, 1-butil-3-metilimidazolyum tosilat, 1-butil-3-metilimidazolyum disiyanamid, 1-butil-3-metilimidazolyum asetat, 1-butil-3-metilimidazolyum klorür, 1-butil-3-metilpiperidinyum klorür ve 1-butil-3-metilpirolidinyum klorür kullanılmıştır. Polimer olarak PEG (200-300-400-600), tuz olarak Na_2SO_4 kullanılmıştır. Sonuç olarak iyonik sıvıların ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanıldığı ekstraksiyonlarda iki faz oluşumunun daha belirgin olduğu ve ekstraksiyon veriminin ise %80' den %99' a çıktığı görülmüştür.

Claudio ve diğer. (2014) çalışmasında fenolik bir biyomolekül olan gallik asitin iyonik sıvı kullanılan ve kullanılmayan sulu iki fazlı ekstraksiyon tekniği ile Uv-Vis spektrofotometrik analizini gerçekleştirmiştir. Çalışmada iyonik sıvı olarak 1-butil-3-metilimidazolyum klorür, 1-butil-3-metilimidazolyum triflorometansülfonat, 1-butil-3-metilimidazolyum tiyosiyanat, 1-butil-3-metilimidazolyum metansülfonat, 1-butil-3-metilimidazolyum metilsülfat, 1-butil-3-metilimidazolyum tosilat, 1-butil-3-

metilimidazolyum bromür, 1-butil-3-metilimidazolyum disiyanamid, 1-butil-3-metilimidazolyum dimetilfosfat ve 1-butil-3-metilimidazolyum asetat, tuz olarak Na_2CO_3 ve Na_2SO_4 kullanılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlarda ekstraksiyon etkinliğinin iyonik sıvı kullanılmayan tekniğe göre %73' den %99' a çıktığı, gallik asitin geri kazanımının ise %94-95 olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak iyonik sıvı temelli sulu iki faz sistemli ekstraksiyon tekniğinin uçucu organik çözücü kullanılmasına gerek olmayan, ucuz, çevre dostu ve etkin bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Xavier ve diğer. (2017) tarafından yapılan çalışma ile okaliptüs ağaç yapraklarında toplam fenolik bileşiklerin tayini için polimer/tuz sisteminden oluşan sulu iki faz ekstraksiyon yöntemini kullanmışlardır. Ekstraksiyon sistemini PEG2000/ KH_2PO_4 - K_2HPO_4 ile oluşturmuşlardır. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda optimum değerler olarak hacimce %20 PEG2000/%17 K_2HPO_4 /%8 KH_2PO_4 /%55 su karışımı optimum değer olarak tespit edilmiş ve ekstraksiyon sonrası elde edilen örnekler HPLC' de analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlarla polimer/tuz sisteminden oluşan sulu iki faz ekstraksiyon yönteminin toplam fenolik bileşiklerin analizinde yararlı bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

1.6 Çalışmanın Amacı

Çalışmada, anyonu FeCl_4^- iyonu içeren farklı imidazolyum bazlı iyonik sıvılar hazırlanarak, bunların fenolik asitlerin analiz öncesi sulu iki faz sistemli ekstraksiyon yöntemiyle zenginleştirilmelerindeki kullanılabilirliklerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Çalışmada 4 iyonik sıvı sentezi gerçekleştirilmiştir. Bunlardan üç tanesi katyonik kısmında butil, benzil veya allil grubu içermektedir. Dördüncü iyonik sıvının katyonik kısmı ise tetra etilen glikolden oluşmaktadır. Katyonik kısmı butil, benzil veya allil olan iyonik sıvılar kendi içinde değerlendirilmiş, bu yüzden dördüncü iyonik sıvı ile çalışmalar, ilk üç iyonik sıvıdan sonra gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın aşamaları aşağıdaki gibidir:

1. 1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, 1-allil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, 1-benzil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat ve polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakloroferrat iyonik sıvılarının sentezi ve karakterizasyonu,
2. Fenolik asit standart çözeltilerinin HPLC ile analizlerinin optimizasyonu,
3. 1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, 1-allil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, 1-benzil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat iyonik sıvıları ile geliştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yönteminin optimizasyonu,
4. Üç iyonik sıvı ile gerçekleştirilen optimizasyon sonuçlarına göre ekstraksiyon verimliliği en yüksek iyonik sıvı ile yöntemin analitik performansının belirlenmesi,
5. Üç iyonik sıvı ile gerçekleştirilen optimizasyon sonuçlarına göre ekstraksiyon verimliliği en yüksek iyonik sıvı ile yöntemin gerçek örneklerle uygulanması,
6. Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat iyonik sıvısı ile sulu iki faz ekstraksiyon yönteminin optimizasyonu,
7. Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat iyonik sıvısı ile yöntemin analitik performansının belirlenmesi,
8. Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat iyonik sıvısı ile geliştirilen yöntemin gerçek örneklerle uygulanması.

BÖLÜM 2

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışma sırasında kullanılan kimyasallardan olan 1-butil-3-metilimidazolyum klorür, 1-benzil-3-metilimidazolyum klorür, 1-allyl-3-metilimidazolyum klorür, 1-metil imidazol, klorojenik asit, ferulik asit, protokateşik asit, gallik asit, kafeik asit, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 , TritonX-100, sodyum karbonat, etil asetat, asetik asit (HPLC saflıkta), metanol (HPLC saflıkta) Sigma Aldrich veya Merck firmasından temin edilmiştir. Polietilen glikol (PEG 600) Alfa Aesar firmasından, piridin Carlo Erba firmasından ve tiyonil klorür Acros Acros Organics firmasından satın alınmıştır. Stok standart fenolik asit çözeltileri $100\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak metanolde hazırlanmış ve 4°C ' de saklanmıştır. Çalışma çözeltileri stok çözeltinin metanol ile seyreltilmesiyle hazırlanarak kullanılmıştır. Meyve örnekleri İzmir' de yerel marketlerden temin edilmiştir. Örnekler analiz öncesi $0,45\mu\text{m}$ diskler (Millipore Millex-HV, Hydrophilic PVDF) kullanılarak filtre edilmiştir.

2.2 Kullanılan Cihazlar

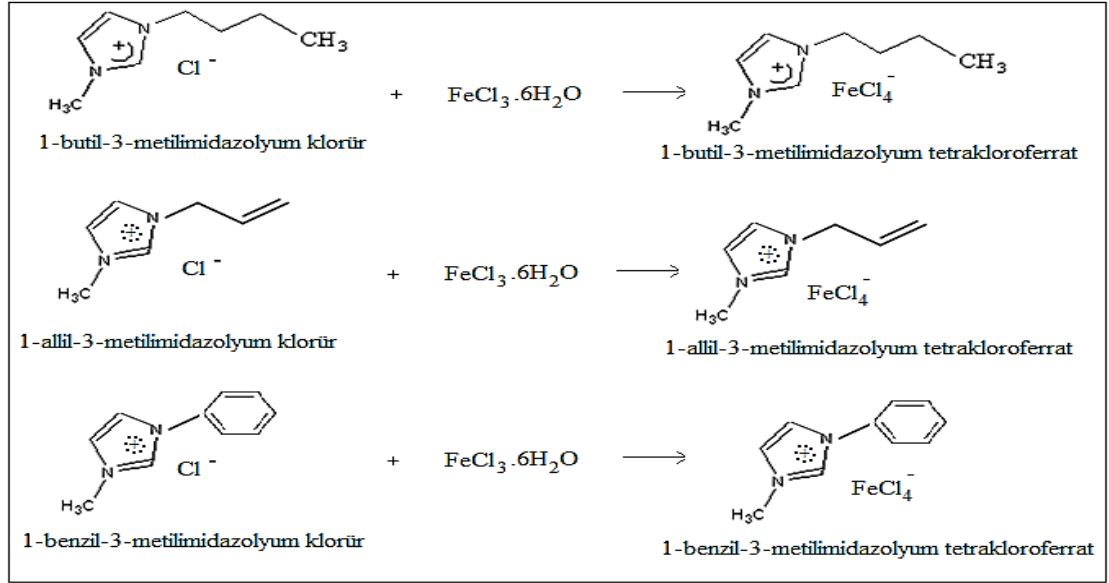
Fenolik asitlerin analizi Thermo Scientific marka Dionex Ultimate 3000 model HPLC cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen iyonik sıvıların karakterizasyonu için Perkin Elmer marka Spectrum Bx-II model Fourier Transfer Infrared Spektrometresi ve PG Instrument Ltd marka A T80 PG model PG Instrument marka UV-görünür bölge spektrofotometre kullanılmıştır. İyonik sıvıların termal kararlılığı Perkin Elmer marka Diamond model Termal Gravimetrik Analiz/Diferansiyel Termal Analiz (TG/DTG) cihazı ile incelenmiştir. Deneyde kullanılan ultra saf su Milli-Q su saflaştırma sistemi (Millipore) ile sağlanmıştır. Santrifüj işlemi için Nuve marka NF 200 model santrifüj cihazı, pH çalışmaları için Mettler Toledo model pH metre kullanılmıştır. Ekstraksiyon sırasında karışımın sonifikasyonu Bandelin Sonorex model ısıtılmalı ultrasonik banyo ile gerçekleştirilmiştir.

2.3 İyonik Sıvıların Sentezi

Çalışmada, 1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, 1-allil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, 1-benzil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat ve polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat olmak üzere 4 tane iyonik sıvı sentezi gerçekleştirilmiş ve karakterize edilmiştir. Katyonik kısmı butil, benzil veya allil grubu içeren iyonik sıvıların ekstraksiyon etkinliği üçü arasında değerlendirilmiştir. Bu yüzden çalışmada önce bu üç iyonik sıvı sentezlenerek, sulu iki faz ekstraksiyon yöntemi bu üç iyonik sıvı ile optimize edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ekstraksiyon etkinliği en yüksek olan iyonik sıvı ile yöntemin analitik performansı ve gerçek örneklerle uygulanması gerçekleştirilmiştir. Daha sonra polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat sentezi gerçekleştirilerek karakterize edilmiştir. Sonrasında bu iyonik sıvı ile de sulu iki faz ekstraksiyon yöntemi optimize edilmiştir. Elde edilen optimum koşullar altında yöntemin analitik performansı belirlenmiş ve yöntem gerçek örneklerle uygulanmıştır.

2.3.1 Butil, Allil ve Benzil Grubu İçeren İyonik Sıvıların Sentezi

Hazır olarak alınan 1-butil-3-metilimidazolyum klorür, 1-allil-3-metilimidazolyum klorür ve 1-benzil-3-metilimidazolyum klorürün 0,05 molü 100 mL' lik balonlarda 90°C' de bir saat ısıtılmıştır. Daha sonra balonların her birine 0,05 mol $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ilave edilerek, balonlar oda sıcaklığına soğuyana kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda karışım tüpe alınarak su fazı dekante edilmiştir (Jiang ve diğer., 2014; Hayashi, Saha, ve Hayashi, 2006; Klee ve diğer., 2012). 1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, 1-allil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat ve 1-benzil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat ~%85-90 verimle elde edilmiştir. Sentezlenen iyonik sıvıların yapıları Şekil 2.1' de verilmiştir.

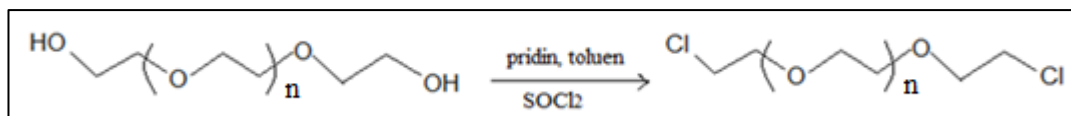


Şekil 2.1 Katyonik grubu butil, allil veya benzil içeren iyonik sıvıların sentezi

2.3.2 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat Sentezi

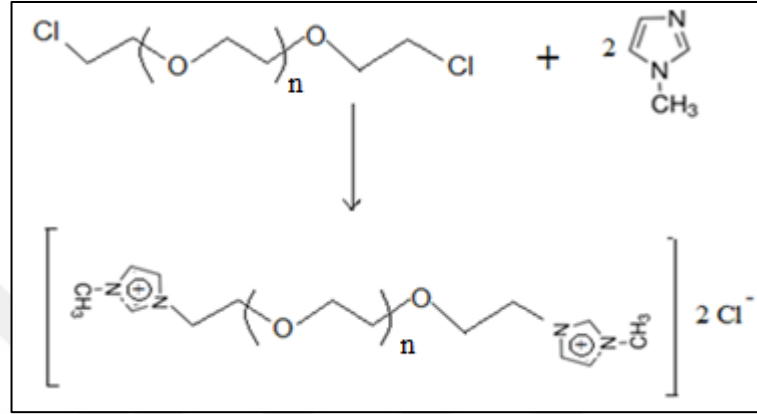
Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakloroferrat iyonik sıvısının sentezi aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak polietilen glikol, tiyonil klorür ile polietilen diklorüre dönüştürülmüştür. Daha sonra bu madde imidazolyum ile reaksiyona sokularak polietilen glikol bis (metilimidazolyum) diklorür iyonik sıvısı elde edilmiştir. Elde edilen bu iyonik sıvı FeCl₃ tuzu ile reaksiyona sokularak polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakloroferrat iyonik sıvısı sentezlenmiştir.

Polietilen glikol diklorür sentezi: PEG 600 ve pridin toluen içerisinde çözülmüş ve elde edilen karışım 87°C' ye ısıtılarak içerisine tiyonil klorür yavaş yavaş ilave edilmiştir. Oluşan karışım 87°C' de 15 saat karıştırılmıştır. Oluşan katı madde süzölmüş ve çözücü evaporatör ile karışımdan uzaklaştırılmıştır (Goodajdar ve Soleimani, 2016) (Şekil 2.2).



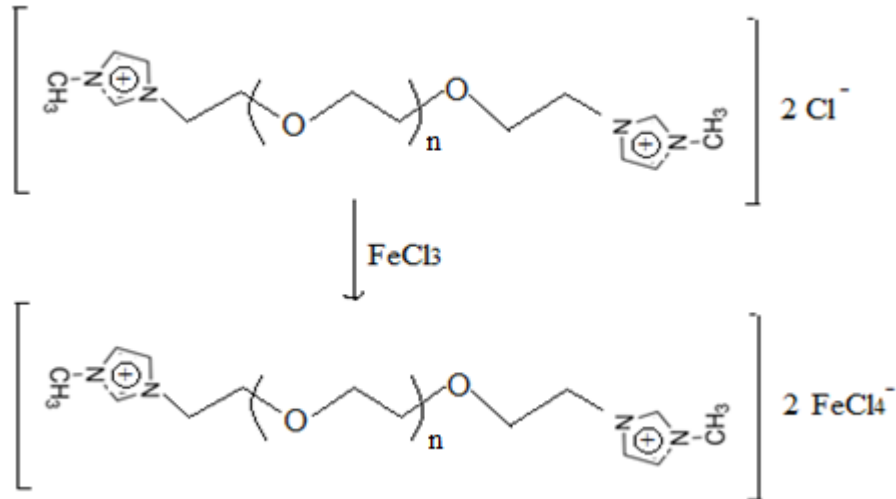
Şekil 2.2 Polietilen glikol diklorür sentezi

Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) diklorür sentezi: 1:2 mol sayısı oranında polietilen glikol diklorür ve 1-metilimidazolyum ile 80°C’ de 16 saat karıştırılmıştır. Daha sonra 1-metilimidazolyum fazlası etil asetat ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Ürün eter ve saf su ile yıkanarak etüvde ~60-65°C sıcaklıkta kurutulmuştur (Goodajdar ve Soleimani, 2016). (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) diklorür sentezi

Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat sentezi: Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) diklorür susuz FeCl₃ tuzu ile oda sıcaklığında 24 saat karıştırılmıştır ve daha sonra su yıkanarak polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat iyonik sıvısı elde edilmiştir (Jiang ve diğer., 2014; Hayashi ve Hamaguchi, 2004). (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat sentezi

2.4 Fenolik Asitlerin HPLC ile Kromatografik Analizleri

Gallik asit (GA), klorojenik asit (KJA), kafeik asit (KA), ferulik asit (FA), protokateşik asit (PA)'ın standart çözeltileri hazırlanarak HPLC ile analizleri için gerekli optimum koşulları belirlenmiştir (Tarnawski, Depta, Grejciun, ve Szelepin, 2006). Analiz için kolon olarak Thermo C18 kolon (15 cm x 4,6 mm x 3 µm i.d) ve dedektör olarak Diyot Array dedektör (DAD) kullanılmıştır. HPLC ile analiz koşulları aşağıdaki Tablo 2.1' de verilmiştir.

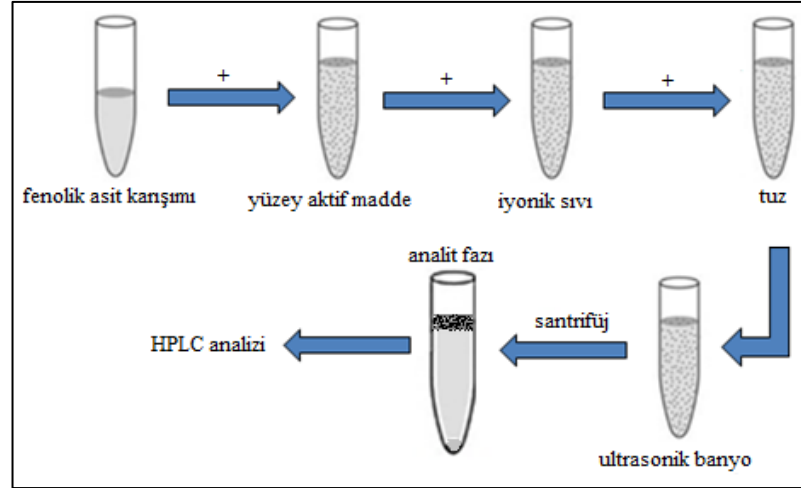
Tablo 2.1 Fenolik asitlerin HPLC ile analiz koşulları

Fenolik asit	Kolon	Sıcaklık (°C)	Mobil faz	Akış hız (mL/dak)	Dalga boyu (nm)	Dedektör	R _t (dak)
GA	C ₁₈	50	%2 (v/v) Asetik asit: Metanol (82:18)	1	280	DAD	2,05
PA							2,86
KJA							3,7
KA							5,08
FA							11,58

2.5 Sulu İki Faz Ekstraksiyon Yöntemi

2.5.1 Butil, Allil ve Benzil Grubu İçeren İyonik Sıvılar ile Sulu İki Faz Sistemli Ekstraksiyon Çalışmaları

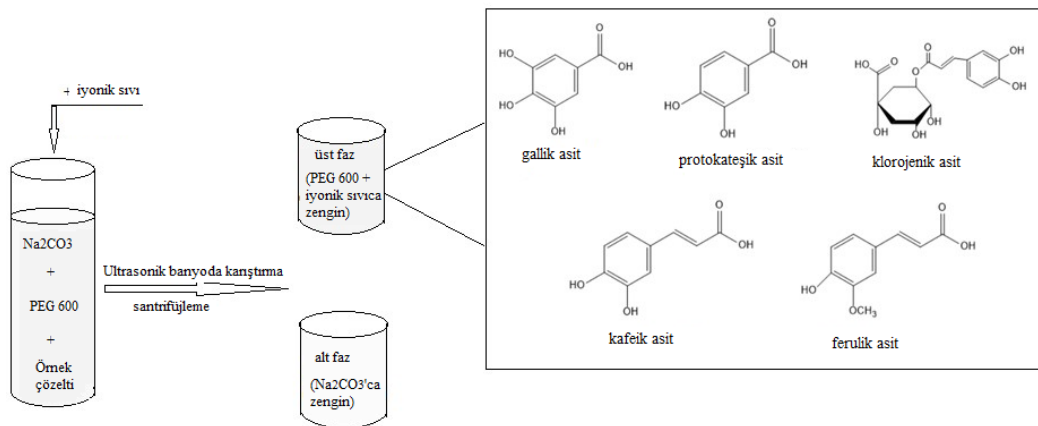
Bir santrifüj tüpüne, standart fenolik asit çözeltisi veya örnek çözeltinin 5 mL' si, 0,2 gram TritonX-100, 200 µL manyetik iyonik sıvı ve 0,5 gram Na₂CO₃ ilave edilmiştir. Bu karışım ~40-50°C' de 15 dakika ultrasonik banyoda karıştırılmıştır. Sentezlenen iyonik sıvıların manyetik gücü zayıf olduğu için bulutlu çözelti faz ayrımı için 5000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Analiti içeren üst faz alınmış ve 100 µL metanol ile seyreltildikten sonra 0,45 µm PTFE diskler ile filtre edilerek HPLC' de analiz edilmiştir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Sulu iki faz ekstraksiyon yönteminin şematik gösterimi

2.5.2 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat İyonik Sıvısı ile Sulu İki Faz Sistemli Ekstraksiyon Çalışması

Bir santrifüj tüpüne, 0,7 gram PEG 600 ve standart fenolik asit çözeltisi veya örnek çözeltinin 5 mL' si ilave edilmiştir. PEG 600 çözündükten sonra, %5 (v/v) manyetik iyonik sıvı ilave edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra karışıma 0,5 gram Na_2CO_3 ilave edilmiş ve tuz çözündükten sonra karışım, ultrasonik banyoda $\sim 40^\circ\text{C}$ ' de 20 dakika karıştırılmıştır. Sentezlenen iyonik sıvının örnek hacminden dolayı manyetik gücü zayıf olduğu için, ekstraksiyon sonrası faz ayrımı gerçekleşmemiştir. Bu yüzden karışım 5000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz alınarak 100 μL metanol ile seyreltilmiştir. 0,45 μm PTFE diskler ile filtre edilen analiti içeren çözelti HPLC' de analiz edilmiştir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat ile gerçekleştirilen ekstraksiyonun şematik gösterimi

2.6 Gerçek Örneklerin Hazırlanması

Elma, armut, üzüm ve muz örnekleri İzmir’ deki yerel marketlerden satın alınmış ve uygun koşullarda analize kadar saklanmıştır. Bütün örnekler iki çeşit olarak çalışılmıştır. Elma örneği kırmızı ve yeşil elma olarak, armut örneği sarı ve yeşil armut olarak, üzüm örneği kırmızı ve yeşil üzüm olarak muz örneği de ithal ve yerli muz örneği olarak çalışılmıştır.

Örnekler blender yardımıyla iyice öğütülmüştür ve suyu filtre kağıdıyla süzölmüştür. Süzöntüden 1 mL alınarak ultra saf su ile hacim 15 mL’ ye tamamlanmıştır. Ultrasonik banyoda 5 dk tutulduktan sonra 15 dakika 5000 rpm’ de santriföjlenmiştir. 15 mL süzöntü alınarak 15 mL etil asetatla 20 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra su fazı alınmış ve etil asetat evaporatörde uçurulmuştur. Kalan kısım 5 mL saf suda çözülmüştür (Tashakkori, Merdivan ve diğer. 2021; Wu ve diğer. 2007) ve belirlenen optimum pH ayarlanarak optimize edilen ekstraksiyon prosedürü uygulanmıştır.

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu göstermek için 1’ er mL örnek süzöntülerine 15 mL’ de derişim 5, 50 ve 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ olacak şekilde standart fenolik asit karışımı eklenmiştir ve hacimler saf su ile 15 mL’ ye tamamlanarak örnekler 3 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra tüm örnekler yukarıda verilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemlerine uygulanmış ve geri kazanımlar hesaplanmıştır.

BÖLÜM 3

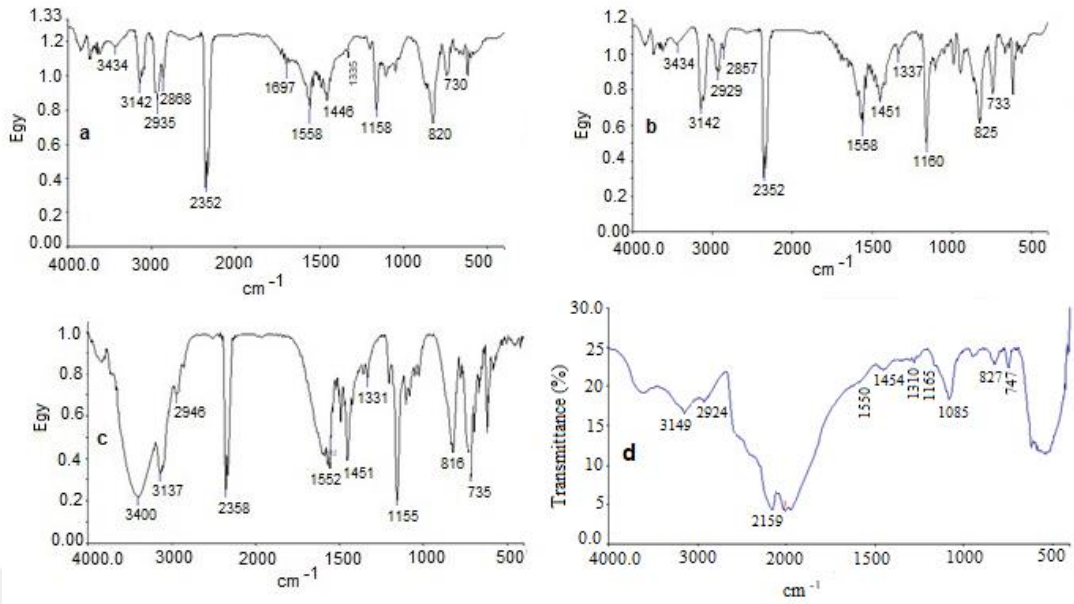
SONUÇLAR

3.1 İyonik Sıvıların Karakterizasyonu

Sentezlenen iyonik sıvıların karakterizasyonu FTIR, UV-görünür bölge spektrumları ile gerçekleştirilmiştir. TG/DTG eğrileri ile termal kararlılıkları incelenmiştir.

3.1.1 FTIR Analizleri

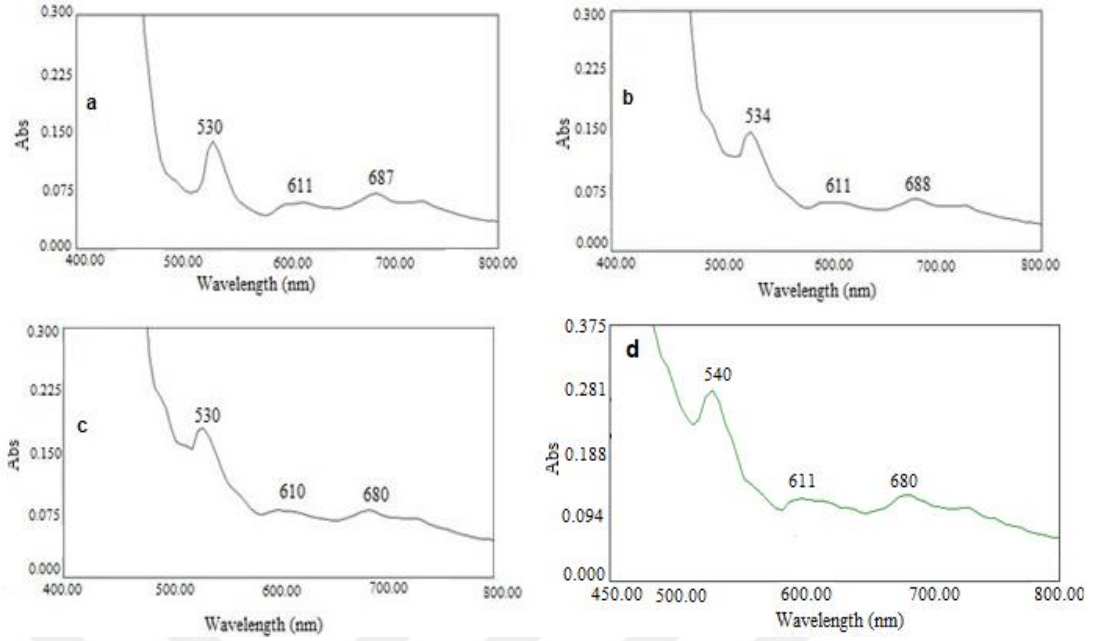
Sentezlenen iyonik sıvıların FTIR spektrumlarında (Şekil 3.1) dalga sayısı ~ 3149 - 3137 cm^{-1} de gözlenen pikler, aromatik =C-H gerilme titreşimlerini, ~ 2924 - 2868 cm^{-1} de gözlenen pikler, alifatik simetrik ve asimetrik -C-H gerilme titreşimlerini ifade etmektedir. ~ 2352 - 2159 cm^{-1} de gözlenen pikler imidazolyum halkasının titreşimini göstermektedir. ~ 1558 - 1550 cm^{-1} ve ~ 1454 - 1446 civarındaki pikler C=N ve C=C gerilme titreşimlerini ifade etmektedir. ~ 1337 - 1310 cm^{-1} civarındaki pikler -C-H eğilme titreşimlerini ve 1160 - 1085 cm^{-1} arasındaki pikler ise -C-C gerilme titreşimlerine ait olan piklerdir. Polietilen glikol bis(metilimidazolyum ditetrakloroferrat) iyonik sıvısının FTIR spektrumunda 1165 cm^{-1} deki pik C-O gerilme titreşimine ait olan piktir. 827 - 730 cm^{-1} arasındaki pikler ise aromatik =C-H düzlem dışı bükülme titreşimlerini göstermektedir (Jeon ve diğer., 2008; Gou, Yin, Xia, ve Guo, 2015).



Şekil 3.1 Sentezlenen iyonik sıvıların Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrumları a) 1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, b) 1-allil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, c) 1-benzil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, d) polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat

3.1.2 UV-Görünür Bölge Analizleri

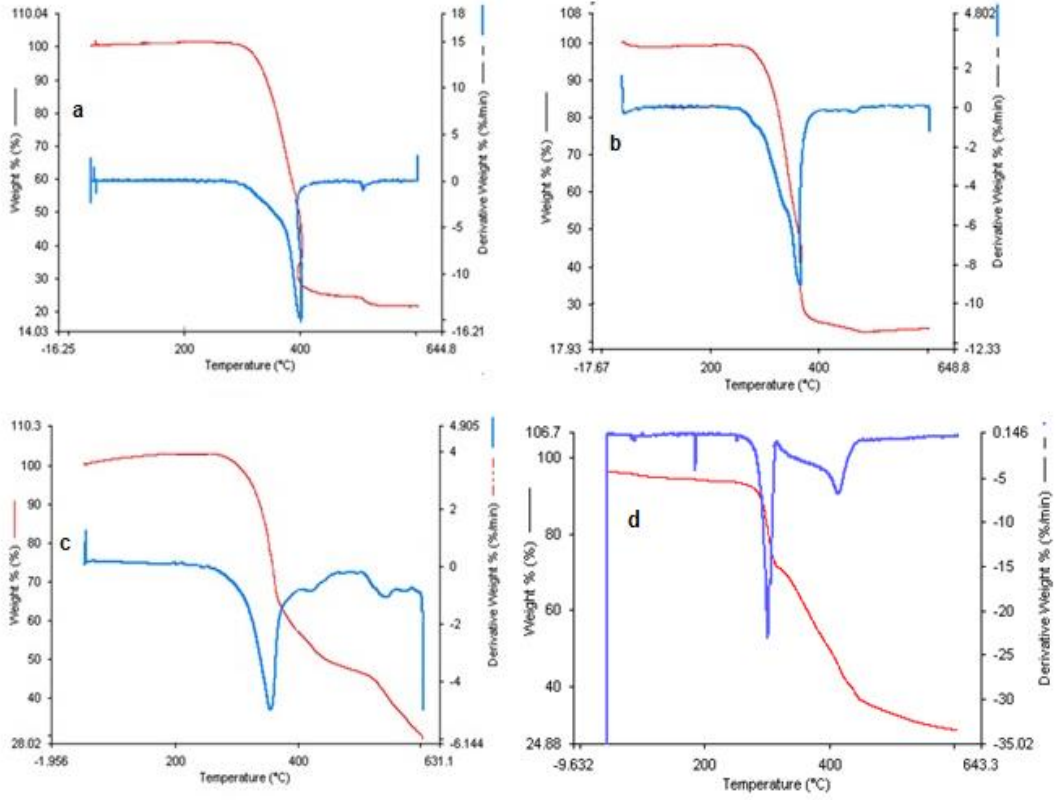
Sentezlenen iyonik sıvıların UV-görünür bölge spektrumları Şekil 3.2’ de verilmiştir. Butil gruplu iyonik sıvıda 530, 611 ve 687 nm dalga boylarında, allil gruplu iyonik sıvıda 534, 611 ve 688 nm dalga boylarında, benzil gruplu iyonik sıvıda 530, 610 ve 680 nm dalga boylarında ve polietilen glikol gruplu iyonik sıvıda 540, 611 ve 680 nm dalga boylarında gözlenen pikler FeCl_4^- iyonu için karakteristik piklerdir (Jiang ve diğer., 2014; Klee ve diğer., 2012).



Şekil 3.2 Sentezlenen iyonik sıvıların asetonitril içerisindeki UV-Vis spektrumları a) 1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, b) 1-allil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, c) 1-benzil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, d) polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat

3.1.3 TG/DTG Analizleri

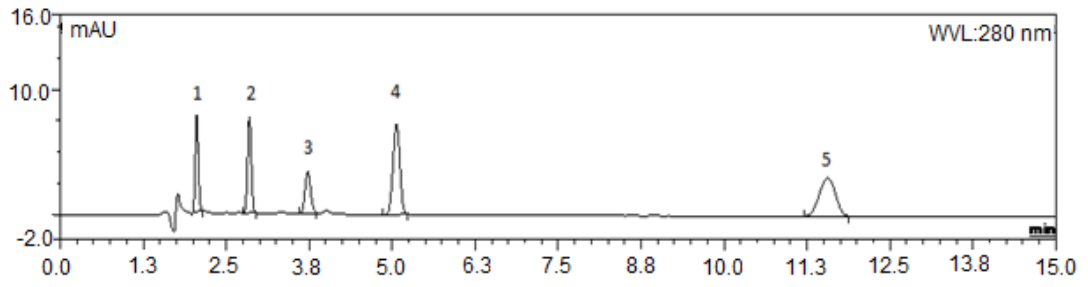
Sentezlenen iyonik sıvıların TG/DTG cihazı ile termal kararlılıkları, alüminyum kap içerisinde azot atmosferinde 25-600°C aralığında (sıcaklık artışı 5°C/dakika) incelenmiştir. Manyetik iyonik sıvıların termal bozunmalarının tek kademede gerçekleştiği görülmüştür. Bu bozunma sıcaklıkları 1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat için ~401°C, 1-allil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat için ~374°C, 1-benzil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat için ~392°C ve polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat için ~310°C olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.3). İyonik sıvıların oda sıcaklığında kararlı oldukları görülmüştür.



Şekil 3.3 Sentezlenen iyonik sıvıların termal analiz sonucu TG/DTG eğrisi a) 1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, b) 1-allyl-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, c) 1-benzil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, d) polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat

3.2 Fenolik Asitlerin Standart Çözeltilerinin Kalibrasyon Denklemleri

Fenolik asitlerin her biri için metanolde $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ 100 mL stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 4°C sıcaklıkta buzdolabında saklanmış ve stok çözeltiler her ay tekrar taze olarak hazırlanmıştır. Şekil 3.4’ de derişimi $200 \mu\text{g L}^{-1}$ olan fenolik asitlerin kromatogramı verilmiştir. Standart kalibrasyon eğrileri her bir fenolik asit için stok çözeltiden $5\text{-}1000 \mu\text{g L}^{-1}$ derişim aralığında hazırlanan çözeltilerle elde edilmiş ve her bir asit için elde edilen kalibrasyon eşitlikleri Tablo 3.1’ de verilmiştir.



Şekil 3.4 Derişimleri $100 \mu\text{g L}^{-1}$ olan fenolik asit karışımının kromatogramı (1: GA, 2: PA, 3: KJA, 4: KA, 5: FA)

Tablo 3.1 Fenolik asitlerin standart kalibrasyon verileri

Fenolik asit	Lineer aralık ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Kalibrasyon denklemleri	R^2
GA	5-1000	$y = 0,0064x - 0,2155$	0,9927
KJA	5-1000	$y = 0,0023x - 0,0525$	0,9942
KA	5-1000	$y = 0,0108x - 0,3462$	0,9905
FA	5-1000	$y = 0,0114x - 0,0808$	0,9997
PA	5-1000	$y = 0,0058x - 0,0656$	0,9993

3.3 Sulu İki Faz Ekstraksiyon Yönteminin Optimizasyonu

Yüksek ekstraksiyon verimi elde etmek için, sulu iki faz ekstraksiyon yöntemi aşağıda verilen parametreler için optimize edilmiştir. Ekstraksiyon sonrası geri kazanım değerleri Formül 3.1 (Qin ve diğer., 2017) kullanılarak belirlenmiştir.

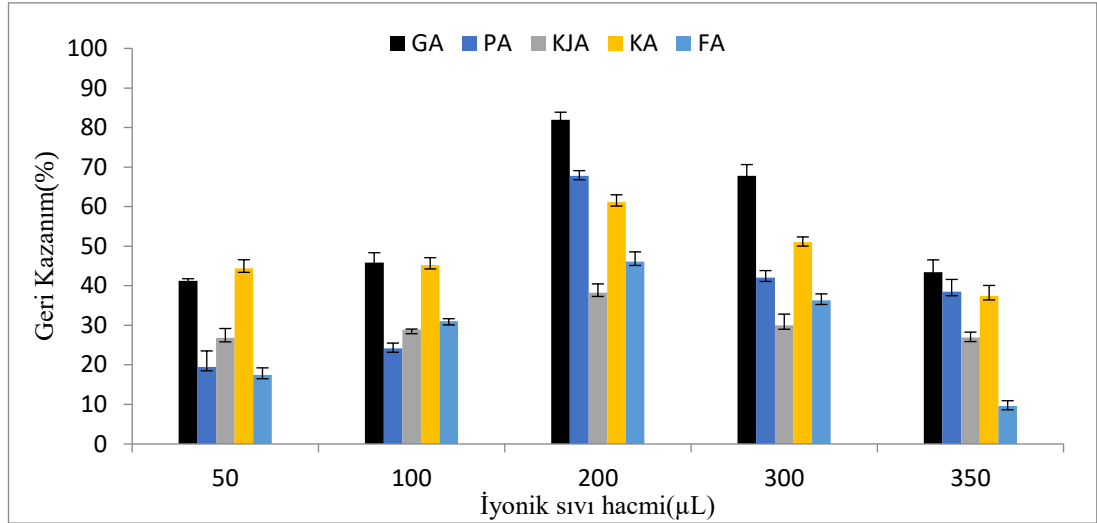
$$\text{Geri Kazanım}(\%) = \frac{100.C_t.V_t}{C_t.V_t + C_b.V_b} \quad (3.1)$$

Eşitlikteki C_t ekstraksiyon sonrası fenolik asitlerin üst fazdaki derişimini, C_b , alt fazdaki derişimini, V_t üst faz hacmini, V_b ise alt faz hacmini ifade etmektedir.

1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, 1-allil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat ve 1-benzil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat ile gerçekleştirilen ekstraksiyonda iyonik sıvı miktarı, yüzey aktif madde miktarı, tuz türü ve miktarı, ekstraksiyon süresi, sıcaklık ve pH optimize edilmiştir. Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat iyonik sıvısı ile gerçekleştirilen optimizasyonda ise iyonik sıvı miktarı, PEG 600 miktarı, tuz çeşidi ve miktarı, ekstraksiyon süresi, sıcaklık ve pH parametreleri belirlenmiştir.

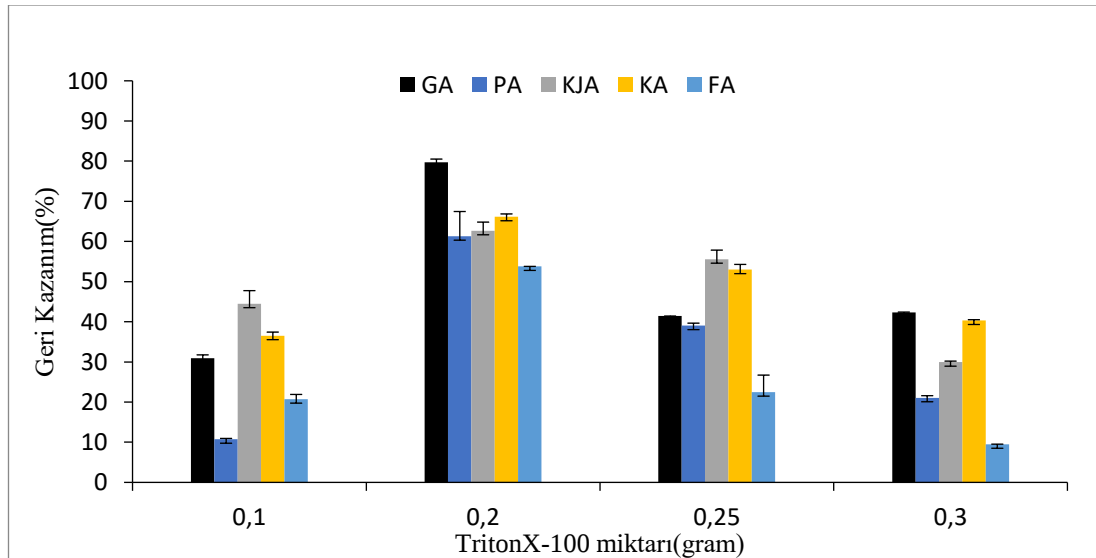
3.3.1 Butil Grubu İçeren İyonik Sıvıların Optimizasyon Sonuçları

Optimum iyonik sıvı hacminin belirlenmesi için deney tüpünün içerisine 5 mL 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ fenolik asit karışımı, 0,2 gram TritonX-100 ve 50/100/200/300/350 μL ' lerde 1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat iyonik sıvısı ve 0,5 gram Na_2CO_3 eklenmiştir. 15 dakika ultrasonik banyoda $\sim 40\text{-}50^\circ\text{C}$ ' de karıştırılmıştır. Daha sonra karışım faz farkı çok belirgin olmadığı için 5000 rpm' de 10 dakika santrüfj edilmiştir. Sonrasında üst faz alınıp üzerine 100 μL metanol eklenerek analiz edilmiştir. Şekil 3.5' de görüldüğü gibi optimum iyonik sıvı miktarı 200 μL olarak belirlenmiştir.



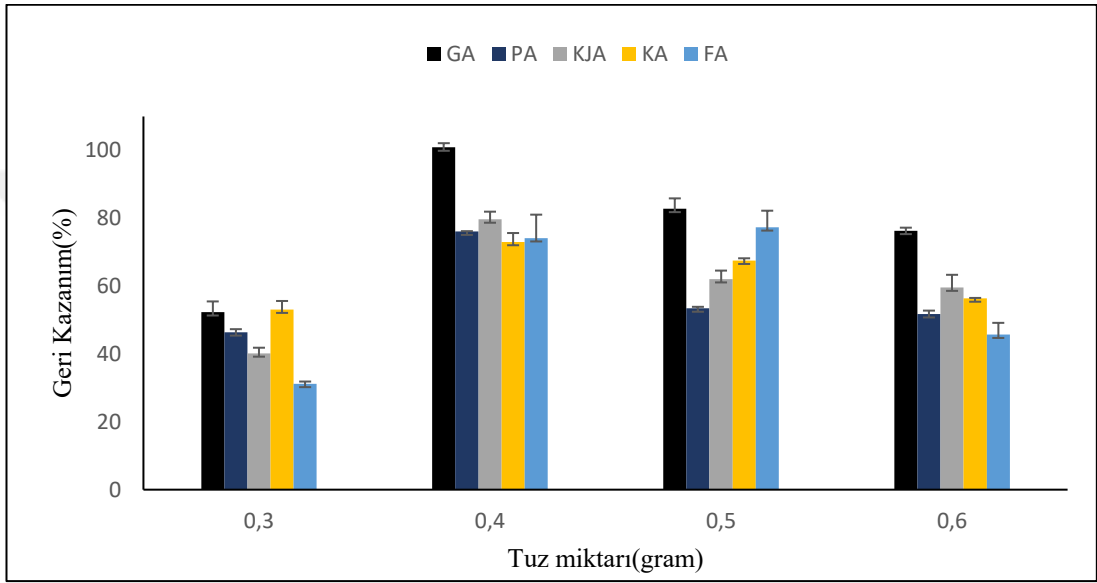
Şekil 3.5 Butil grubu içeren iyonik sıvının farklı miktarlarının sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): 200 μgL^{-1} , m(TritonX-100): 0,2 gram, m(Na_2CO_3): 0,5 gram, ekstraksiyon süresi 15 dakika, sıcaklık 40°C, pH 5,5)

Optimum yüzey aktif maddenin belirlenmesi için ekstraksiyon 0,05/0,1/0,2/0,25/0,3 gramlarda TritonX-100 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sonrasında 0,05 gram TritonX-100 ile faz oluşmadığı gözlemlenmiştir. 0,2 gram TritonX-100 ile en yüksek ekstraksiyon verimi elde edilmiştir (Şekil 3.6).



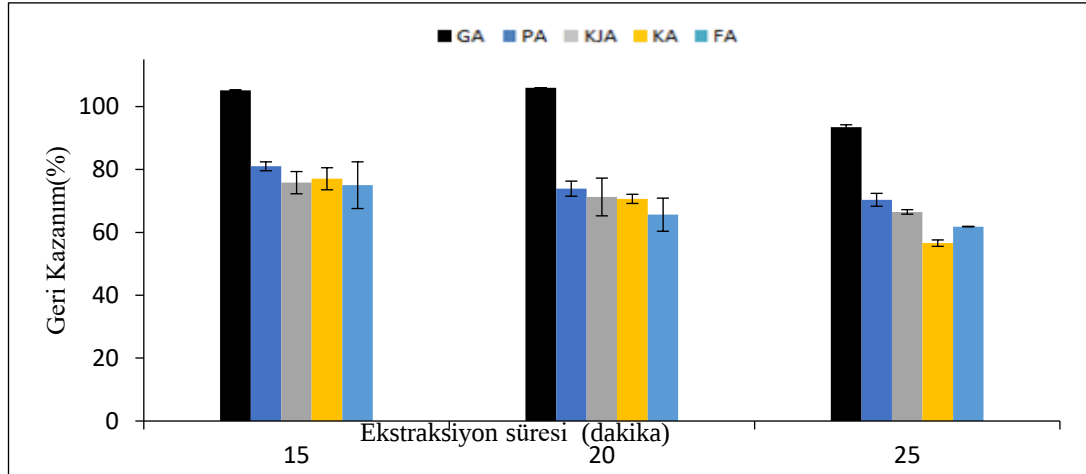
Şekil 3.6 Butil grubunu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki fazlı ekstraksiyon yöntemine farklı TritonX-100 miktarlarının etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): 200 μgL^{-1} , V (iyonik sıvı): 200 μL , m(Na_2CO_3): 0,5 gram, ekstraksiyon süresi 15 dakika, sıcaklık 40°C, pH 5,5)

Optimum tuz türünün belirlenmesi için, ekstraksiyon, Na_2CO_3 - K_2HPO_4 - KH_2PO_4 - Na_2SO_4 - NaHCO_3 tuzları ile gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sonrasında K_2HPO_4 - KH_2PO_4 - Na_2SO_4 - NaHCO_3 tuzları ile faz oluşmadığı gözlemlenmiştir. Bu yüzden optimum tuz türü olarak Na_2CO_3 seçilmiştir. Optimum Na_2CO_3 miktarının belirlenmesi için ekstraksiyon 0,05/0,1/0,2/0,3/0,4/0,5/0,6 gram Na_2CO_3 ile gerçekleştirilmiştir. 0,05/0,1/0,2 gram tuz için ekstraksiyon fazı elde edilememiştir. En iyi sonuç 0,4 gram Na_2CO_3 ile elde edilmiştir (Şekil 3.7).



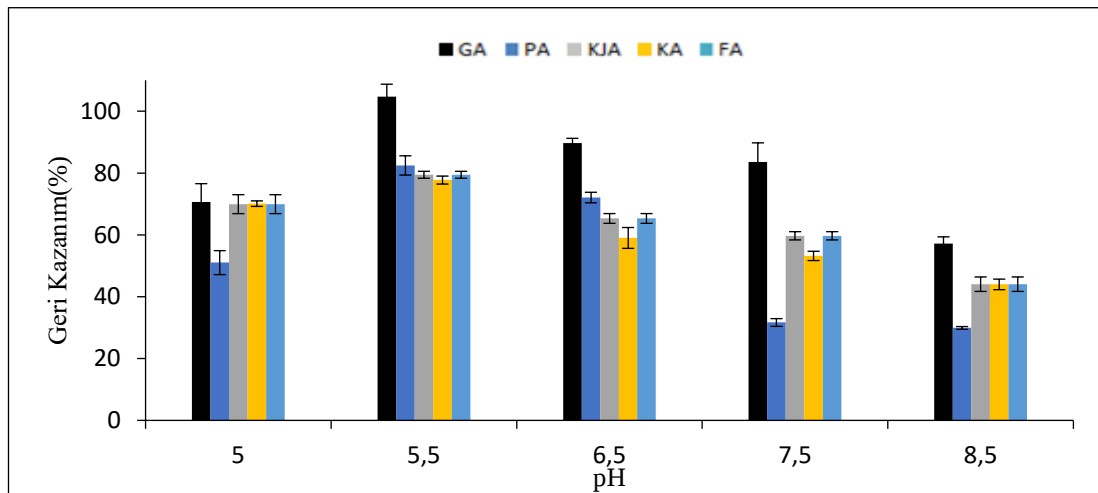
Şekil 3.7 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki fazlı ekstraksiyon yöntemine farklı Na_2CO_3 miktarlarının etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): $200 \mu\text{gL}^{-1}$, V (iyonik sıvı): $200 \mu\text{L}$, m(TritonX-100): 0,2 gram, ekstraksiyon süresi 15 dakika, sıcaklık 40°C , pH 5,5)

En iyi ekstraksiyon süresinin belirlenmesi için ekstraksiyon, 5/10/15/20 ve 25 dakika ultrasonik banyoda karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. 5 ve 10 dakika için ekstraksiyon fazı elde edilememiştir. Her bir fenolik asit için optimum ekstraksiyon süresi 15 dakika olarak belirlenmiştir (Şekil 3.8). Sıcaklığın ekstraksiyona olan etkisini incelemek için ekstraksiyon ultrasonik banyonun sıcaklığı $25, 30, 40, 50$ ve 60°C ' ye ısıtılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sonrasında 25°C ve 30°C ' de faz ayrımı gözlenmemiştir. 60°C ' de faz ayrımı olmasına rağmen analiz sonucunda analit pikine rastlanmamıştır. 40°C ve 50°C sıcaklıklarda benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu yüzden daha sonraki çalışmalarda ekstraksiyon bu sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.8 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki fazlı ekstraksiyon yöntemine farklı ekstraksiyon sürelerinin etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): 200 μgL^{-1} , V (iyonik sıvı): 200 μL , m(TritonX-100): 0,2 gram, m(Na_2CO_3): 0,4 gram, sıcaklık 40°C, pH 5,5)

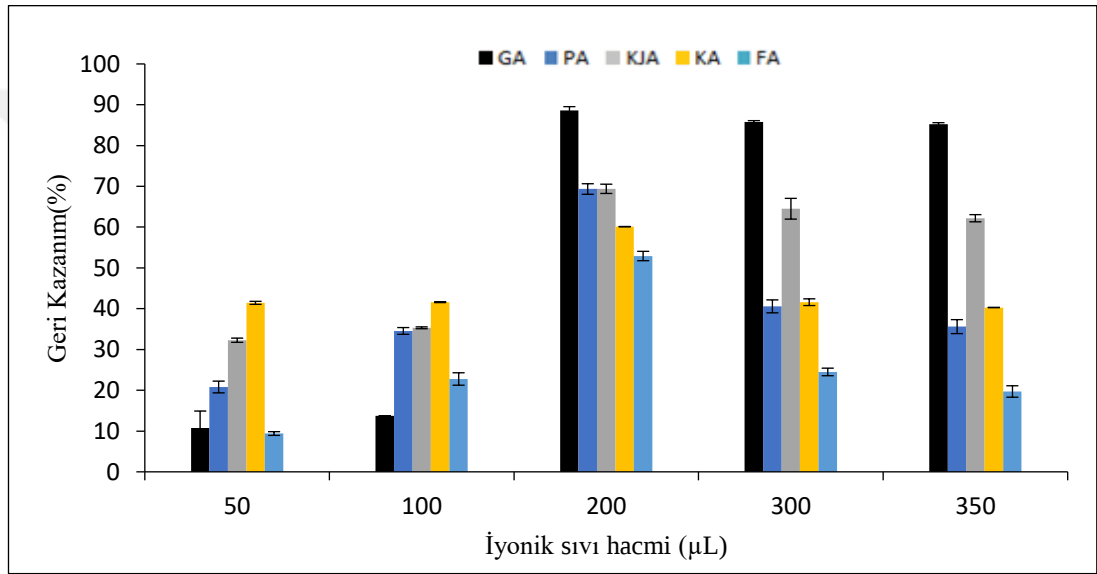
1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat ile gerçekleştirilen sulu iki faz sistemine pH etkisinin incelenmesi için fenolik asit karışımlarının pH' ı başlangıçta 0,1 M NaOH ve 0,1 M HCl ile pH 2,5/3,5/4,5/5,5/6,5/7,5/8,5' a ayarlanmıştır. Her bir pH' da gerçekleştirilen ekstraksiyon sonrasında pH 2,5 ve 3,5 ve 4,5 için ekstraksiyon fazı elde edilememiştir. Şekil 3.9' da görüldüğü gibi en yüksek ekstraksiyon verimine çözeltinin kendi pH değeri olan pH 5,5' de elde edilmiştir. Bu yüzden optimum pH olarak pH 5,5 seçilmiştir.



Şekil 3.9 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki fazlı ekstraksiyon yöntemine farklı pH' ların etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): 200 μgL^{-1} , V (iyonik sıvı): 200 μL , m(TritonX-100): 0,2 gram, m(Na_2CO_3): 0,4 gram, ekstraksiyon süresi: 15 dakika, sıcaklık 40°C)

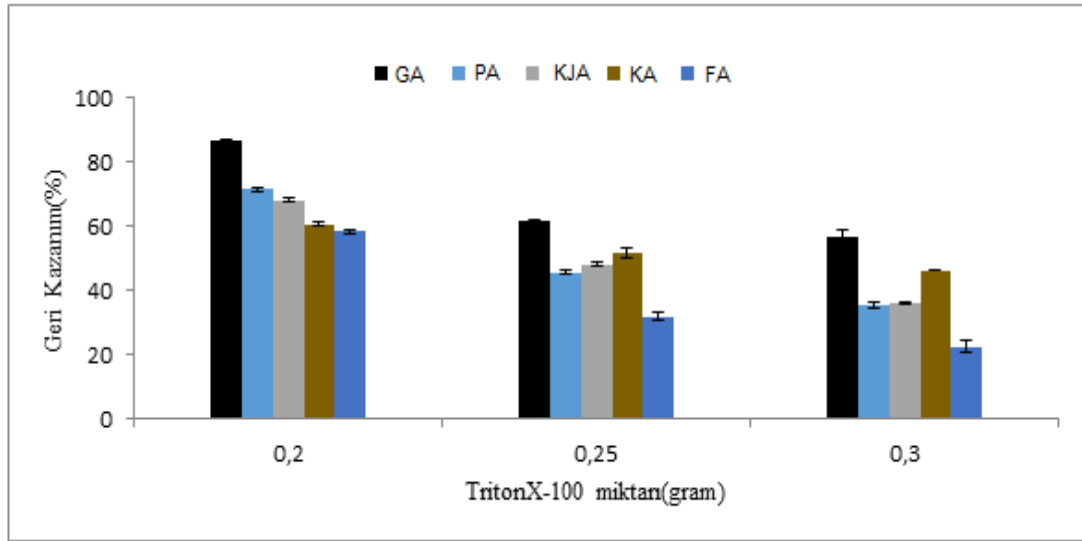
3.3.2 Allil Grubu İçeren İyonik Sıvıların Optimizasyon Sonuçları

Optimum iyonik sıvı hacmini belirlemek için deney tüplerine 5 mL 200 μgL^{-1} fenolik asit karışımı, 0,2 gram TritonX-100 ve 50/100/200/300/350 μL ’ lerde 1-allil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat iyonik sıvısı ve 0,5 gram Na_2CO_3 eklenmiştir. 15 dakika ultrasonik banyoda $\sim 40\text{-}50^\circ\text{C}$ ’ de karıştırıldıktan sonra 10 dakika 5000 rpm’ de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında üst faz 100 μL metanolde çözüldükten sonra analiz edilmiştir. Her bir fenolik asit için optimum iyonik sıvı miktarı 200 μL olarak belirlenmiştir (Şekil 3.10).



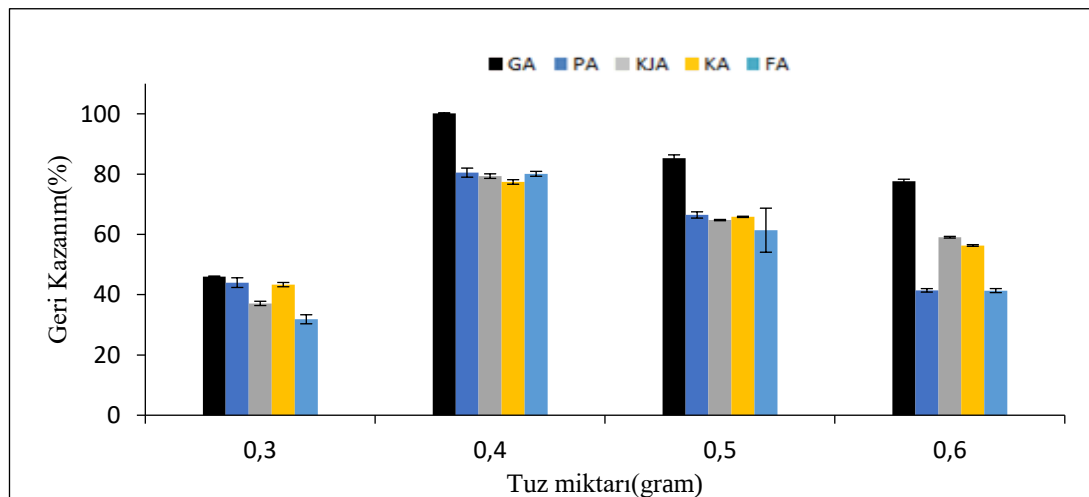
Şekil 3.10 Allil grubu içeren iyonik sıvının farklı miktarlarının sulu iki faz sistemli ekstraksiyon yöntemine etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): 200 μgL^{-1} , m(TritonX-100): 0,2 gram, m(Na_2CO_3): 0,5 gram, ekstraksiyon süresi 15 dakika, sıcaklık 40°C , pH 5,5)

Optimum TritonX-100 miktarının belirlenmesi için ekstraksiyon TritonX-100 ’ün 0,05/0,1/0,2/0,25/0,3 gramları ile gerçekleştirilmiştir. 0,05 gram TritonX-100 ile faz elde edilememiştir. 0,1 gram TritonX-100 ile ekstraksiyon sonrası analit piklerinin çok düzgün olmadığı gözlenmiştir. Şekil 3.11’ de görüldüğü gibi her bir fenolik asit için optimum TritonX-100 miktarı olarak 0,2 gram kabul edilmiştir.



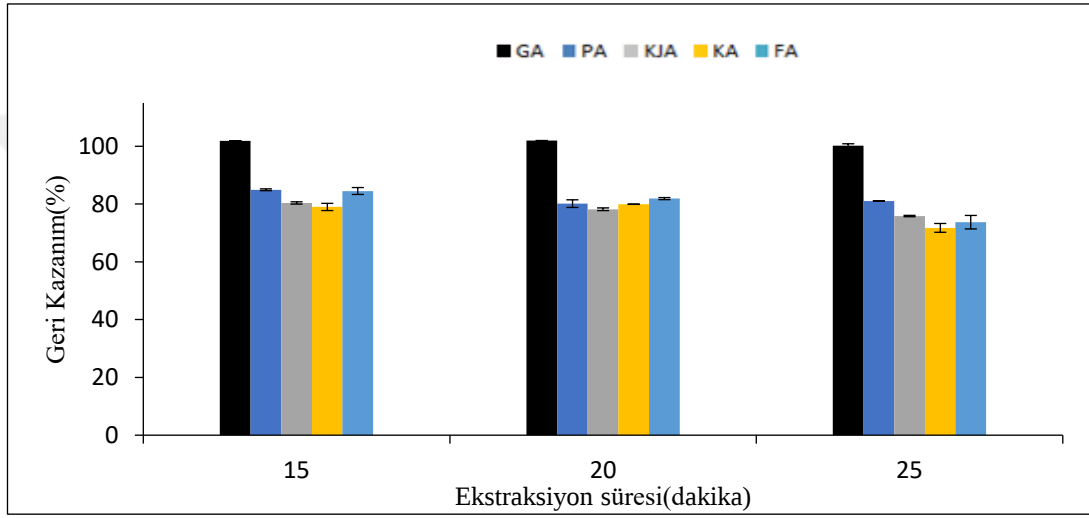
Şekil 3.11 Allil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine farklı TritonX-100 miktarlarının etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): $200 \mu\text{gL}^{-1}$, V (iyonik sıvı): $200 \mu\text{L}$, $m(\text{Na}_2\text{CO}_3)$: 0,5 gram, ekstraksiyon süresi 15 dakika, sıcaklık 40°C , pH 5,5

Ekstraksiyonda en uygun tuzu belirlemek için, Na_2CO_3 - K_2HPO_4 - KH_2PO_4 - Na_2SO_4 - NaHCO_3 tuzları kullanılarak ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Na_2CO_3 dışındaki tuzlar ile faz elde edilemediği için optimum tuz türü olarak Na_2CO_3 belirlenmiştir. Bu tuz için en iyi miktarı belirlemek için tuzun 0,05/0,1/0,2/0,3/0,4/0,5/0,6 gramı ile çalışılmıştır. Ekstraksiyon sonrasında 0,05/0,1/0,2 gram tuz için faz elde edilememiştir. Fenolik asitler için en iyi tuz miktarı 0,4 gram olarak belirlenmiştir (Şekil 3.12).



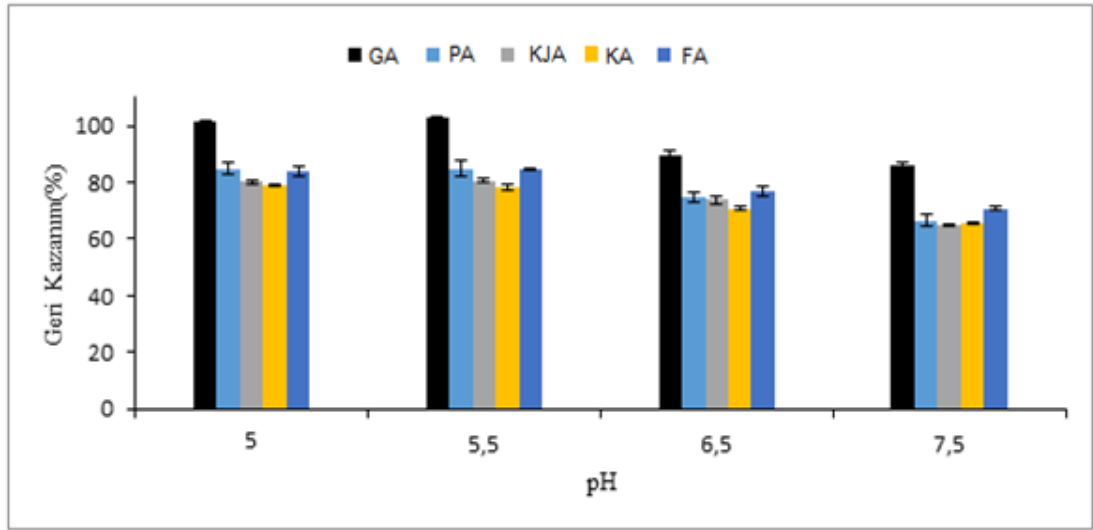
Şekil 3.12 Allil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine farklı Na_2CO_3 miktarlarının etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): $200 \mu\text{gL}^{-1}$, V (iyonik sıvı): $200 \mu\text{L}$, $m(\text{TritonX-100})$: 0,2 gram, ekstraksiyon süresi 15 dakika, sıcaklık 40°C , pH 5,5)

Optimum ekstraksiyon süresinin belirlenmesi için ekstraksiyon karışımı 5/10/15/20 ve 25 dakika karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. 5 ve 10 dakika için ekstraksiyon fazı elde edilememiştir. Şekil 3.13’ de görüldüğü gibi 15 dakika ekstraksiyon süresi optimum olarak kabul edilmiştir. Sıcaklık etkisi için ekstraksiyon 25,30,40,50 ve 60°C sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. 25°C ve 30°C’ de faz ayrımı gözlenmez iken 60°C’ de analiz sonucunda analit pikine rastlanmamıştır. 40°C ve 50°C sıcaklıklarda benzer ekstraksiyon sonuçları elde edilmiştir. Bundan dolayı sonraki çalışmalarda ekstraksiyon bu sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.13 Allil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine farklı ekstraksiyon sürelerinin etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): 200 μgL^{-1} , V (iyonik sıvı): 200 μL , m(TritonX-100): 0,2 gram, m(Na_2CO_3): 0,4 gram, sıcaklık 40°C, pH 5,5)

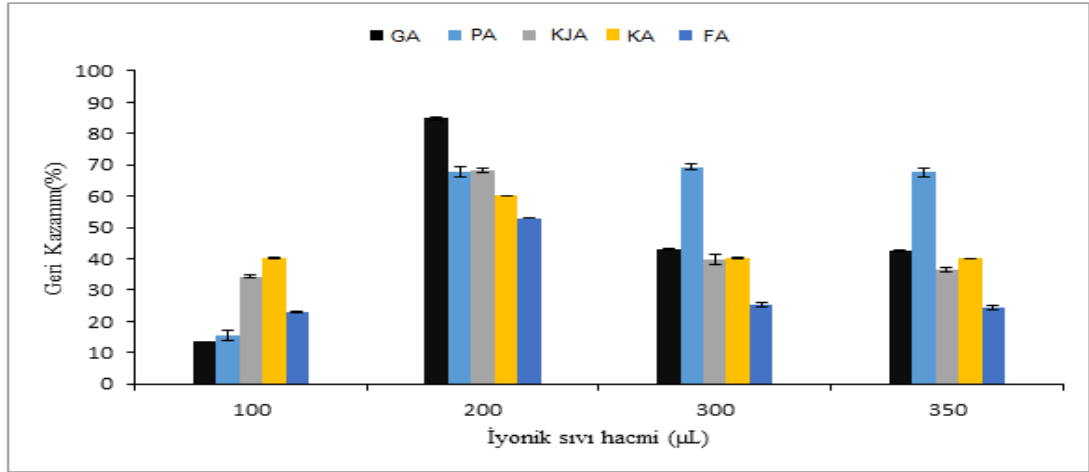
pH’ ın ekstraksiyona etkisinin incelenmesi için ekstraksiyon, pH’ ı 2,5/3,5/4,5, 5/5,5/6,5/7,5 olan fenolik asit çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. pH 2,5 ve 3,5’da ekstraksiyon sonrasında faz gözlenmemiştir. pH4,5’ de ise ekstraksiyon sonrası düzgün analit piki gözlenmemiştir. Sonuçlar Şekil 3.14’ de verilmiştir. Optimum pH değeri olarak fenolik asit karışımının kendi pH değeri olan 5,5 olarak kabul edilmiştir.



Şekil 3.14 Allil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine farklı pH' ların etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): 200 μgL^{-1} , V (iyonik sıvı): 200 μL , m(TritonX-100): 0,2 gram, m(Na_2CO_3): 0,4 gram, ekstraksiyon süresi: 15 dakika, sıcaklık 40°C)

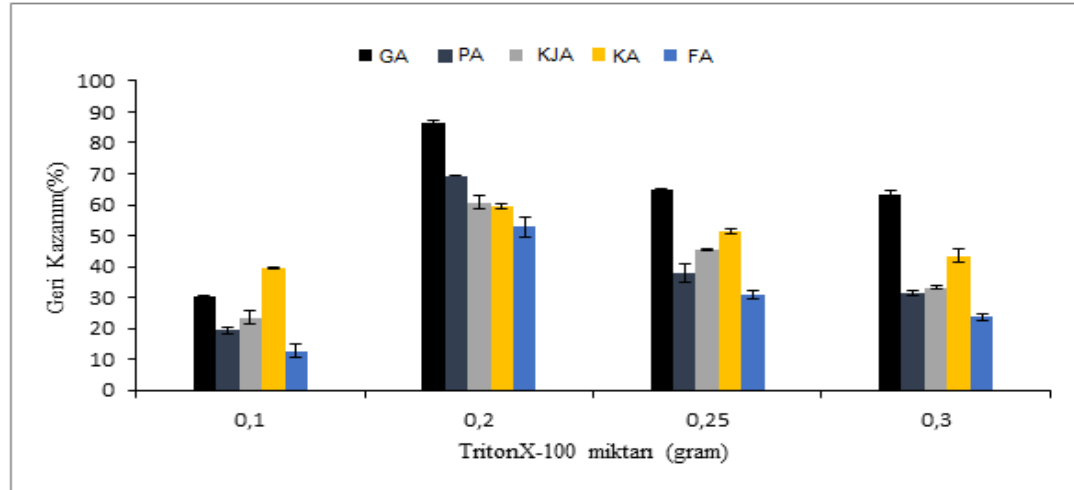
3.3.3 Benzil Grubu İçeren İyonik Sıvıların Optimizasyon Sonuçları

1-benzil-3-metilimidazolyum tetrakloroferratin optimum miktarının belirlenmesi için, 5 mL 200 μgL^{-1} fenolik asit karışımı, 0,2 gram TritonX-100, 50/100/200/300/350 μL ' lerde iyonik sıvı ve 0,5 gram Na_2CO_3 deney tüplerine eklenmiştir. 15 dakika ultrasonik banyoda ~40-50°C' de karıştırılmıştır. Santrifüjleme sonrasında üst faz alınıp üzerine 100 μL metanol eklenerek HPLC' de analiz edilmiştir. Her bir fenolik asit için elde edilen sonuçlar Şekil 3.15' de verilmiştir. Görüldüğü gibi her bir fenolik asit için optimum iyonik sıvı hacmi 200 μL olarak belirlenmiştir.



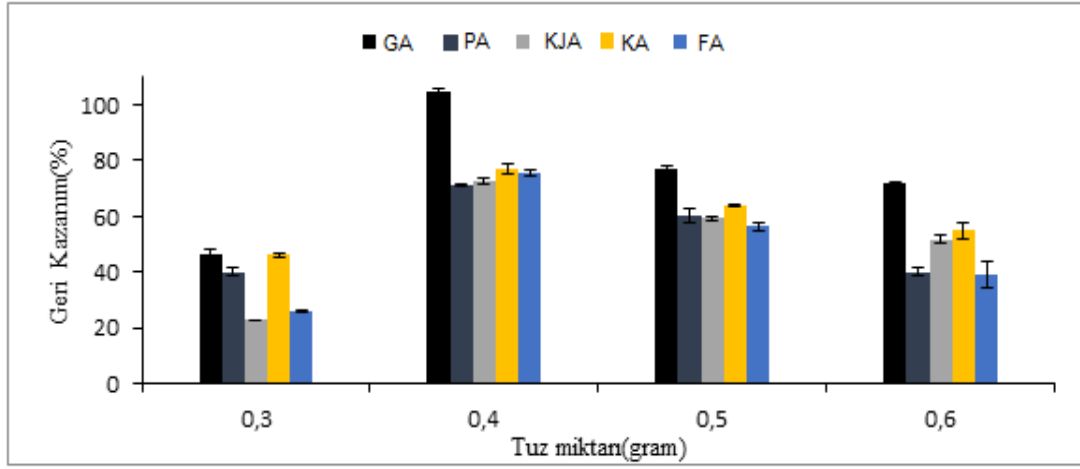
Şekil 3.15 Benzil grubu içeren iyonik sıvının farklı miktarlarının sulu iki faz sistemli ekstraksiyon yöntemine etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): 200 µg^L⁻¹, m(TritonX-100): 0,2 gram, m(Na₂CO₃): 0,5 gram, ekstraksiyon süresi 15 dakika, sıcaklık 40°C, pH 5,5)

Optimum TritonX-100 miktarını belirlemek için, ekstraksiyon 0,05/0,1/0,2/0,25/0,3 gram TritonX-100 ile gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sonrasında 0,05 gram TritonX-100 için faz oluşmadığı gözlemlenmiştir. Her bir fenolik asit için elde edilen sonuçlar Şekil 3.16’ da verilmiştir. 0,2 gram TritonX-100 miktarı her bir fenolik asit için optimum değer olarak kabul edilmiştir.



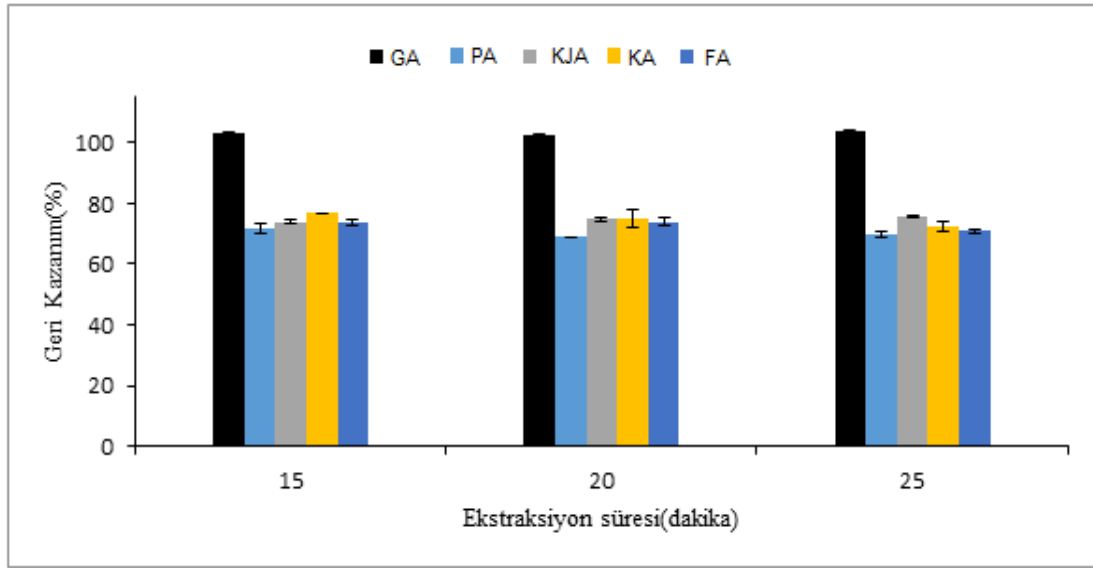
Şekil 3.16 Benzil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine farklı TritonX-100 miktarlarının etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): 200 µg^L⁻¹, V (iyonik sıvı): 200 µL, m(Na₂CO₃): 0,5 gram, ekstraksiyon süresi 15 dakika, sıcaklık 40°C, pH 5,5)

1-benzil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat ile yapılan ekstraksiyonda farklı tuzların etkisi incelenmiştir. K_2HPO_4 - KH_2PO_4 - Na_2SO_4 - $NaHCO_3$ ile yapılan ekstraksiyonda faz oluşmadığı gözlenmiştir. Na_2CO_3 ile yapılan ekstraksiyonda ise yüksek ekstraksiyon verimi elde edildiği için optimum tuz türü olarak Na_2CO_3 seçilmiştir. Bu tuzun miktarını belirlemek için 0,05/0,1/0,2/0,3/0,4/0,5/0,6 gram Na_2CO_3 ile ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.17). 0,05/0,1/0,2 gram Na_2CO_3 ile ekstraksiyon fazı elde edilmemiştir. En yüksek ekstraksiyon verimi 0,4 gram ile elde edildiği için optimum tuz miktarı 0,4 gram olarak belirlenmiştir.



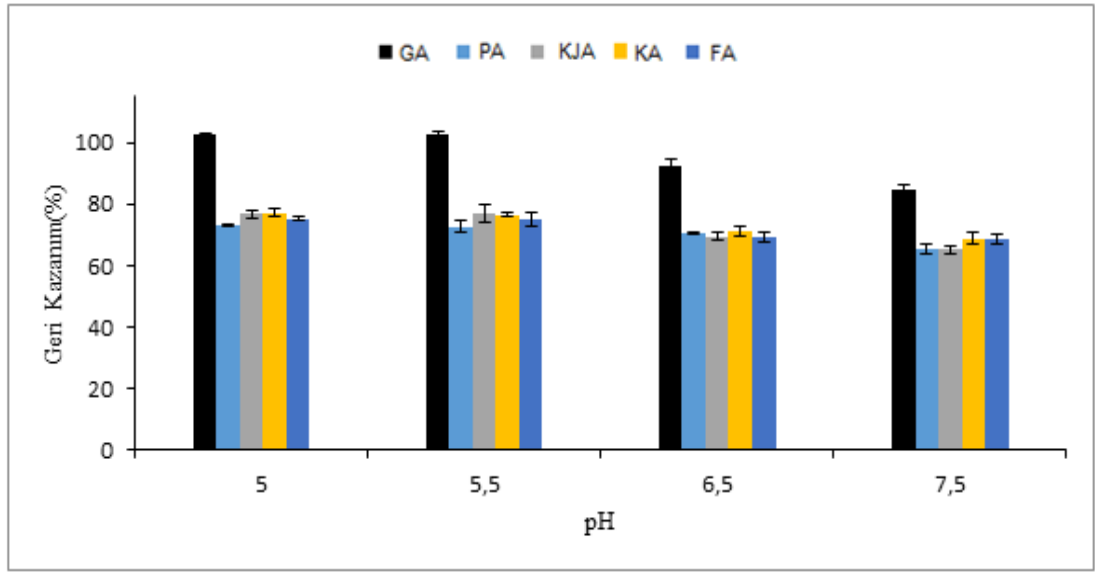
Şekil 3.17 Benzil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine farklı Na_2CO_3 miktarlarının etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): $200 \mu g L^{-1}$, V (iyonik sıvı): $200 \mu L$, m(TritonX-100): 0,2 gram, ekstraksiyon süresi 15 dakika, sıcaklık $40^\circ C$, pH5,5)

Optimum ekstraksiyon süresinin belirlenmesi için 5/10/15/20 ve 25 dakikalık sürelerde ekstraksiyon karışımı ultrasonik banyoda karıştırılmıştır. Ekstraksiyon sonrasında 5 ve 10 dakika için ekstraksiyon fazı elde edilmemiştir. Her bir fenolik asit için elde edilen sonuçlar Şekil 3.18’ de verilmiştir. Her bir fenolik asit için optimum ekstraksiyon süresi 15 dakika olarak belirlenmiştir. Ayrıca ekstraksiyona sıcaklık etkisini incelemek için $25, 30, 40, 50$ ve $60^\circ C$ sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. $25^\circ C$ ve $30^\circ C$ ’ de ekstraksiyon sonrasında faz gözlenmemiştir. $60^\circ C$ ’ de ise analit pikine rastlanmamıştır. $40^\circ C$ ve $50^\circ C$ sıcaklıklarda ise aynı ekstraksiyon verimleri elde edilmiştir (Şekil 3.18).



Şekil 3.18 Benzil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine farklı ekstraksiyon sürelerinin etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): 200 μgL^{-1} , V (iyonik sıvı): 200 μL , m(TritonX-100): 0,2 gram, m(Na_2CO_3): 0,4 gram, sıcaklık 40°C, pH 5,5)

Optimum pH için pH' ı 2,5/3,5/4,5/5/5,5/6,5/7,5 olan fenolik asit çözeltileri ile çalışılmıştır. pH 2,5 ve 3,5 için ekstraksiyon fazı elde edilmemiştir. pH 4,5' de ise ekstraksiyon sonrası düzgün analit piki gözlenmemiştir. Herbir fenolik asit için elde edilen sonuçlar Şekil 3.19' da verilmiştir. Fenolik asitler için optimum pH, çözeltinin kendi pH değeri olan 5,5 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.19 Benzil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine farklı pH' ların etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): 200 $\mu\text{g}\text{L}^{-1}$, V (iyonik sıvı): 200 μL , m(TritonX-100): 0,2 gram, m(Na_2CO_3): 0,4 gram, ekstraksiyon süresi: 15 dakika, sıcaklık 40°C)

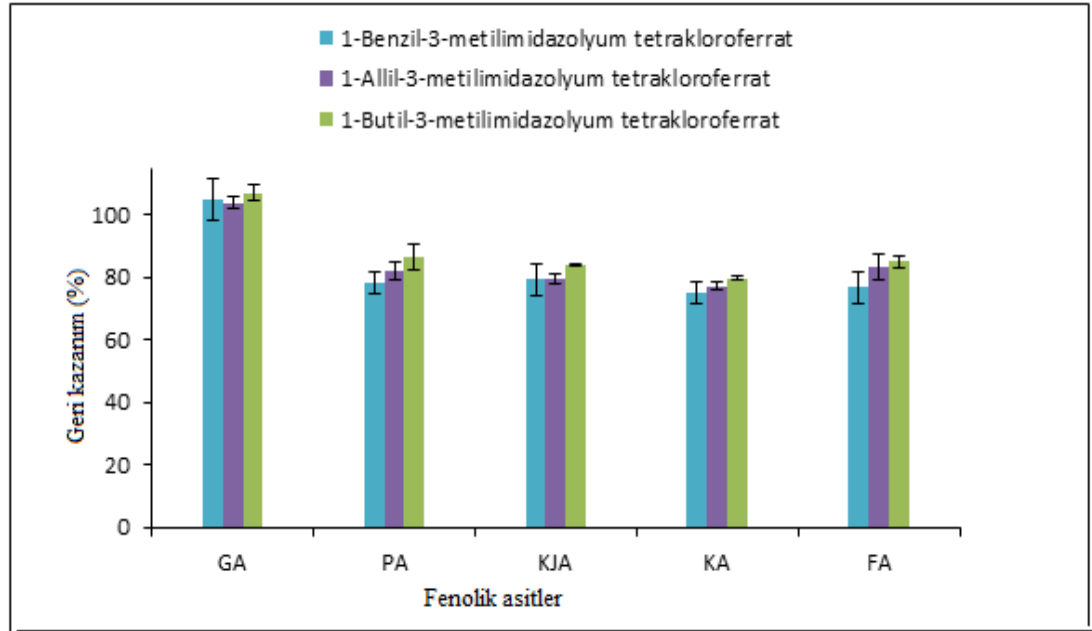
3.4 İyonik Sıvıların Ekstraksiyon Verimlerinin Karşılaştırılması

1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, 1-allil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat ve 1-benzil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat ile gerçekleştirilen optimum parametrelerinde aynı sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 3.2). Bu üç iyonik sıvının belirlenen optimum sonuçlardaki ekstraksiyon verimliliği karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat ile en yüksek ekstraksiyon veriminin elde edildiği gözlenmiştir (Şekil 3.20).

Üç iyonik sıvının optimum koşullarda elde edilen ekstraksiyon sonuçlarına bakıldığında 1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat iyonik sıvısı ile daha yüksek ekstraksiyon verimi elde edilmiştir. Bu yüzden optimize edilen yöntemin analitik performansı ve gerçek örnek çalışmaları 1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.2 Sulu iki faz ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen parametreler

Optimizasyon Türü	1-allil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat	1-benzil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat	1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat
İyonik sıvı miktarı(μL)	200	200	200
TritonX-100 miktarı(g)	0,2	0,2	0,2
Tuz türü	Na ₂ CO ₃	Na ₂ CO ₃	Na ₂ CO ₃
Tuz miktarı(g)	0,4	0,4	0,4
Ekstraksiyon süresi(dk)	15	15	15
pH	5,5	5,5	5,5



Şekil 3.20 Butil, Allil ve Benzil grubu içeren iyonik sıvıların sulu iki faz ekstraksiyon etkinliklerinin karşılaştırılması

3.5 Butil Grubu içeren iyonik sıvı ile Analitik Performans Çalışma sonuçları

Yeni olarak geliştirilen yöntemin analitik performansını belirleyen lineer aralık, gözlenebilme sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ), gün içi ve günler arası bağıl standart sapma gibi parametreler, 1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat ile belirlenen optimum koşullar altında çalışılmıştır.

LOD ve LOQ değeri; $3 S_b/m$ ve $10 S_b/m$ formülleri kullanılarak hesaplanmıştır. (S_b : fenolik asitler için belirlenen lineer aralığın en küçük derişimi ile 7 paralel olarak gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucundan elde edilen değerlerin standart sapması; m : lineer aralığı belirlemek için çizilen kalibrasyon doğrusunun eğimi). Yöntemin kesinliği 5 ve $25 \mu\text{g L}^{-1}$ fenolik asit karışımı ile gün içi ve günler arası çalışmayla % bağlı standart sapma olarak ifade edilmiştir. Elde edilen tüm sonuçlar Tablo 3.3 ile özetlenmiştir.

Tablo 3.3 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile geliştirilen yöntemin analitik performansı

Parametre	GA	PA	KJA	KA	FA
Lineer aralık ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5-500	5-500	5-500	5-500	5-500
Regresyon katsayısı (n=7)	0,9947	0,9956	0,9959	0,9967	0,9985
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,34	1,47	1,56	1,37	1,43
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	4,47	4,33	4,68	4,55	4,45
Gün içi kesinlik ($5 \mu\text{g L}^{-1}$, %BSS, n=5)	3,37	3,99	3,20	3,66	3,65
Gün içi kesinlik ($25 \mu\text{g L}^{-1}$, %BSS, n=5)	3,73	3,02	3,77	4,51	3,51
Günler arası kesinlik ($5 \mu\text{g L}^{-1}$, %BSS, n=5)	4,59	4,48	5,00	5,32	4,95
Günler arası kesinlik ($25 \mu\text{g L}^{-1}$, %BSS, n=5)	5,16	4,63	5,69	4,50	4,96

3.6 Butil Grubu İçeren İyonik Sıvı ile Optimize Edilen Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması

1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat iyonik sıvısı ile optimize edilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemi gerçek örneklerle uygulanmıştır. Bütün örnekler iki çeşit olarak çalışılmıştır. Analiz sonuçlarında örneklerin hiçbirinde fenolik asit kalıntısına rastlanmamıştır. Geliştirilen yöntemin doğruluğunu göstermek için örneklerle 5,50 ve 100 μgL^{-1} standart fenolik asit çözeltisi eklenerek yöntem uygulanmış ve geri kazanımlar hesaplanmıştır. Tüm sonuçlar Tablo 3.4-3.11’ de verilmiştir. Örnek koromatogramlar Şekil 3.21-3.28’ de gösterilmiştir.



Tablo 3.4 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile optimize edilen sulu iki fazlı ekstraksiyon yöntemi ile kırmızı elma örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)

Fenolik Asitler	Eklenen ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g L}^{-1}$) ($\bar{x}\pm s$)	Geri kazanım (%)
	-	-	-
GA	5	4,78 $\pm$ 1,17	95,63
	50	45,24 $\pm$ 1,17	90,48
	100	84,66 $\pm$ 0,84	84,66
	-	-	-
PA	5	4,57 $\pm$ 2,20	91,52
	50	40,20 $\pm$ 1,50	80,41
	100	76,54 $\pm$ 0,63	76,54
	-	-	-
KJA	5	3,86 $\pm$ 2,54	77,20
	50	44,23 $\pm$ 3,03	88,45
	100	77,95 $\pm$ 0,57	77,95
	-	-	-
KA	5	3,58 $\pm$ 0,74	71,61
	50	49,78 $\pm$ 0,55	99,56
	100	100,05 $\pm$ 3,62	100,05
	-	-	-
FA	5	3,99 $\pm$ 0,23	79,81
	50	37,24 $\pm$ 1,02	74,48
	100	84,27 $\pm$ 0,94	84,27

Tablo 3.5 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile yeşil elma örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)

Fenolik Asitler	Eklenen ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g L}^{-1}$) ($\bar{x}\pm s$)	Geri kazanım (%)
	-	-	-
GA	5	4,50 $\pm$ 0,71	90,01
	50	38,84 $\pm$ 0,32	77,68
	100	74,80 $\pm$ 0,82	74,80
	-	-	-
PA	5	4,22 $\pm$ 0,61	84,46
	50	35,95 $\pm$ 0,62	71,91
	100	71,69 $\pm$ 0,26	71,69
	-	-	-
KJA	5	3,65 $\pm$ 1,27	73,05
	50	36,66 $\pm$ 1,11	73,35
	100	82,07 $\pm$ 1,30	82,07
	-	-	-
KA	5	3,76 $\pm$ 0,49	75,24
	50	38,90 $\pm$ 1,71	77,80
	100	79,39 $\pm$ 1,07	79,39
	-	-	-
FA	5	3,99 $\pm$ 0,22	79,81
	50	35,39 $\pm$ 0,58	70,78
	100	79,26 $\pm$ 0,94	79,26

Tablo 3.6 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile sarı armut örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)

Fenolik Asitler	Eklenen ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g L}^{-1}$) ($\bar{x}\pm s$)	Geri kazanım (%)
	-	-	-
GA	5	4,55 $\pm$ 0,71	90,94
	50	43,01 $\pm$ 0,71	86,01
	100	82,12 $\pm$ 0,28	82,12
	-	-	-
PA	5	4,31 $\pm$ 1,61	86,23
	50	39,28 $\pm$ 1,06	78,59
	100	71,16 $\pm$ 0,73	71,16
	-	-	-
KJA	5	3,75 $\pm$ 0,83	74,98
	50	40,91 $\pm$ 1,01	81,81
	100	88,06 $\pm$ 0,72	88,06
	-	-	-
KA	5	3,77 $\pm$ 0,33	75,37
	50	42,57 $\pm$ 1,04	85,15
	100	81,54 $\pm$ 0,93	81,54
	-	-	-
FA	5	4,06 $\pm$ 0,23	81,25
	50	38,96 $\pm$ 0,67	77,93
	100	83,18 $\pm$ 0,78	83,18

Tablo 3.7 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile yeşil armut örneğinde fenolik asitlerin sulu iki faz ekstraksiyon yöntemi ile analiz sonuçları (n=3)

Fenolik Asitler	Eklenen ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g L}^{-1}$) ($\bar{x}\pm s$)	Geri kazanım (%)
	-	-	-
GA	5	4,66 $\pm$ 1,18	93,28
	50	46,75 $\pm$ 1,48	93,51
	100	90,54 $\pm$ 0,88	90,54
	-	-	-
PA	5	4,63 $\pm$ 2,21	92,59
	50	40,38 $\pm$ 2,26	80,76
	100	77,46 $\pm$ 0,85	77,46
	-	-	-
KJA	5	3,94 $\pm$ 1,28	78,86
	50	42,13 $\pm$ 0,98	84,26
	100	77,60 $\pm$ 0,61	77,60
	-	-	-
KA	5	3,56 $\pm$ 1,02	71,22
	50	47,27 $\pm$ 1,12	94,54
	100	92,91 $\pm$ 0,74	92,91
	-	-	-
FA	5	4,16 $\pm$ 0,45	83,31
	50	43,16 $\pm$ 0,96	86,33
	100	98,90 $\pm$ 0,78	98,90

Tablo 3.8 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile ithal muz örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)

Fenolik Asitler	Eklenen ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g L}^{-1}$) ($\bar{x}\pm s$)	Geri kazanım (%)
	-	-	-
GA	5	5,01 $\pm$ 1,96	100,20
	50	46,8 $\pm$ 0,81	93,60
	100	70,96 $\pm$ 0,30	70,96
	-	-	-
PA	5	4,63 $\pm$ 1,62	92,59
	50	41,4 $\pm$ 0,41	82,87
	100	72,58 $\pm$ 0,62	72,58
	-	-	-
KJA	5	3,56 $\pm$ 0,72	71,15
	50	49,11 $\pm$ 1,31	98,22
	100	78,6 $\pm$ 1,54	78,60
	-	-	-
KA	5	4,86 $\pm$ 1,51	97,35
	50	36,55 $\pm$ 0,75	73,12
	100	76,6 $\pm$ 0,23	76,6
	-	-	-
FA	5	4,77 $\pm$ 1,91	95,49
	50	35,53 $\pm$ 1,13	71,07
	100	71,12 $\pm$ 1,03	71,12

Tablo 3.9 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile yerli muz örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)

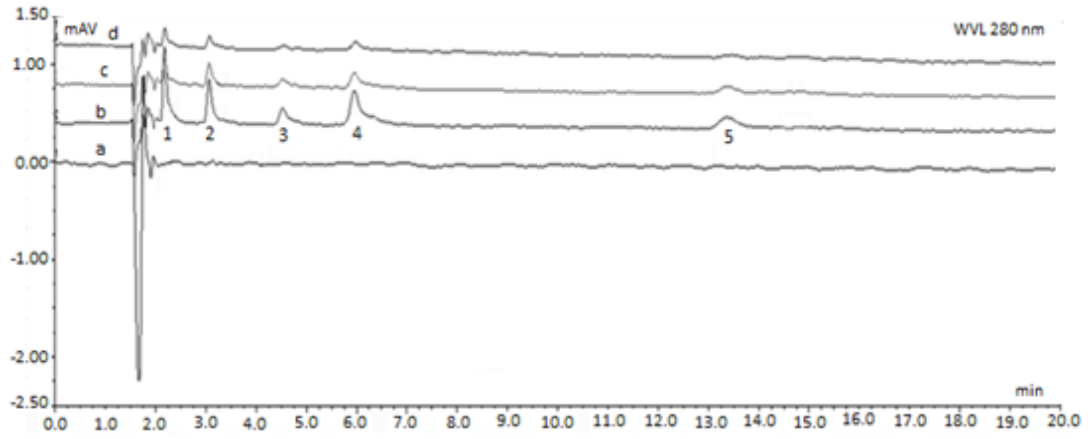
Fenolik Asitler	Eklenen ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g L}^{-1}$) ($\bar{x}\pm s$)	Geri kazanım (%)
	-	-	-
GA	5	4,70 $\pm$ 0,72	89,38
	50	39,35 $\pm$ 1,57	78,70
	100	78,81 $\pm$ 0,53	78,81
	-	-	-
PA	5	4,22 $\pm$ 1,62	84,46
	50	39,29 $\pm$ 1,29	78,59
	100	72,20 $\pm$ 1,45	72,20
	-	-	-
KJA	5	3,79 $\pm$ 1,66	75,82
	50	41,55 $\pm$ 1,75	83,11
	100	75,08 $\pm$ 1,39	75,08
	-	-	-
KA	5	4,08 $\pm$ 0,88	81,73
	50	39,44 $\pm$ 0,72	78,89
	100	72,88 $\pm$ 0,33	72,88
	-	-	-
FA	5	4,05 $\pm$ 0,39	81,12
	50	39,34 $\pm$ 1,23	78,69
	100	79,03 $\pm$ 1,00	79,03

Tablo 3.10 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile yeşil üzüm örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)

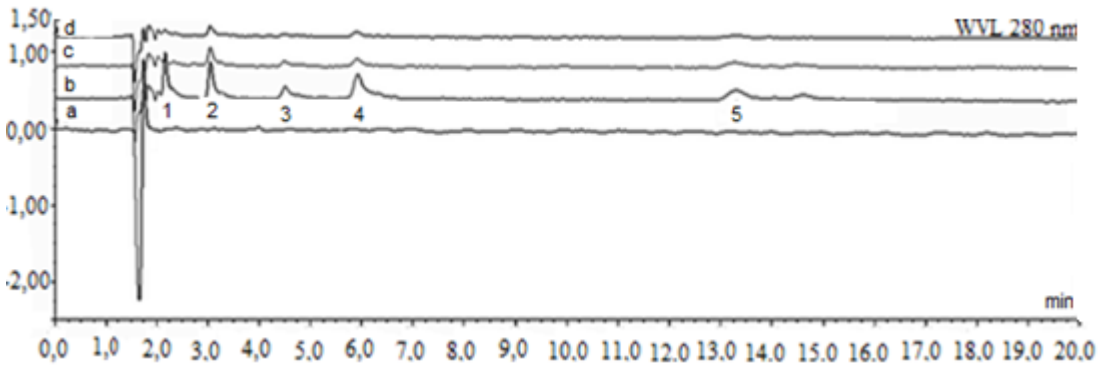
Fenolik Asitler	Eklenen ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g L}^{-1}$) ($\bar{x}\pm s$)	Geri kazanım (%)
GA	-	-	-
	5	4,35 $\pm$ 0,91	86,94
	50	38,8 $\pm$ 0,74	77,60
	100	77,84 $\pm$ 0,37	77,84
PA	-	-	-
	5	4,79 $\pm$ 3,05	95,82
	50	40,59 $\pm$ 0,33	81,19
	100	72,34 $\pm$ 1,15	72,34
KJA	-	-	-
	5	5,02 $\pm$ 1,08	100,45
	50	44,93 $\pm$ 0,98	89,86
	100	85,69 $\pm$ 0,50	85,69
KA	-	-	-
	5	4,37 $\pm$ 0,55	87,54
	50	39,56 $\pm$ 0,45	79,12
	100	86,82 $\pm$ 0,82	86,82
FA	-	-	-
	5	4,45 $\pm$ 1,45	88,97
	50	43,93 $\pm$ 0,46	87,86
	100	87,20 $\pm$ 0,57	87,20

Tablo 3.11 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile kırmızı üzüm örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)

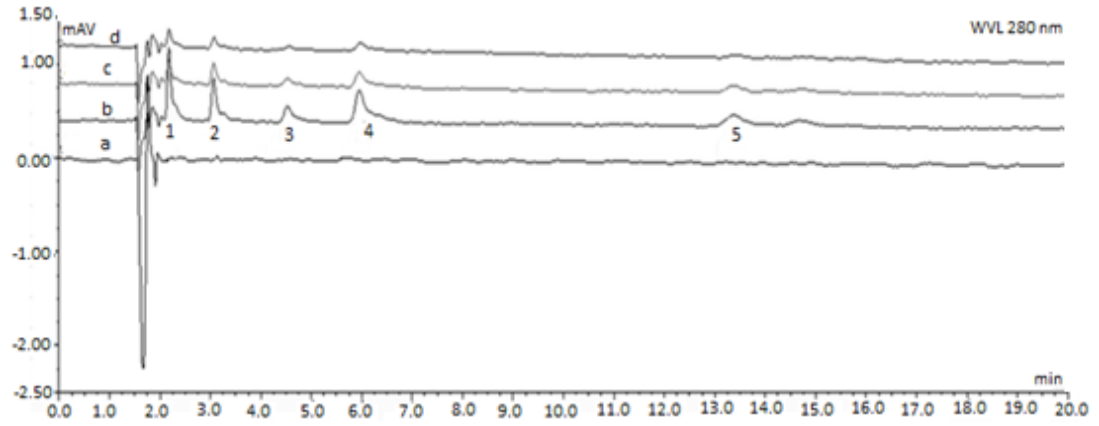
Fenolik Asitler	Eklenen ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g L}^{-1}$) ($\bar{x}\pm s$)	Geri kazanım (%)
GA	-	-	-
	5	4,39 $\pm$ 0,66	87,81
	50	43,43 $\pm$ 0,88	86,87
	100	84,39 $\pm$ 0,78	84,39
PA	-	-	-
	5	4,84 $\pm$ 1,15	96,97
	50	45,14 $\pm$ 0,86	90,28
	100	85,32 $\pm$ 0,83	85,32
KJA	-	-	-
	5	5,02 $\pm$ 1,08	100,44
	50	49,86 $\pm$ 1,86	99,73
	100	83,81 $\pm$ 0,86	83,81
KA	-	-	-
	5	4,29 $\pm$ 0,72	85,96
	50	50,05 $\pm$ 1,45	100,10
	100	99,95 $\pm$ 0,52	99,95
FA	-	-	-
	5	4,25 $\pm$ 0,81	84,92
	50	41,88 $\pm$ 0,71	83,77
	100	75,73 $\pm$ 0,64	75,73



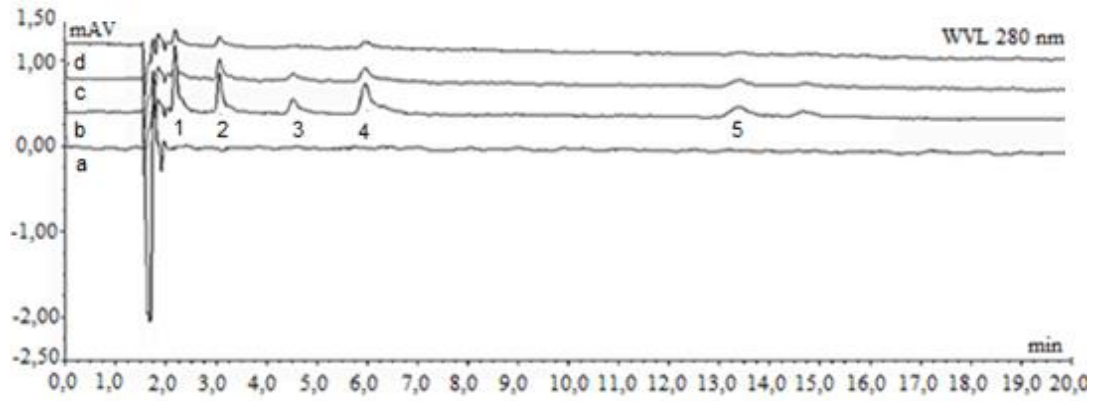
Şekil 3.21 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki fazlı ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş yeşil elma örneği, b) $100 \mu\text{gL}^{-1}$, c) $50 \mu\text{gL}^{-1}$, d) $5 \mu\text{gL}^{-1}$ standart fenolik asit eklenmiş yeşil elma örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA



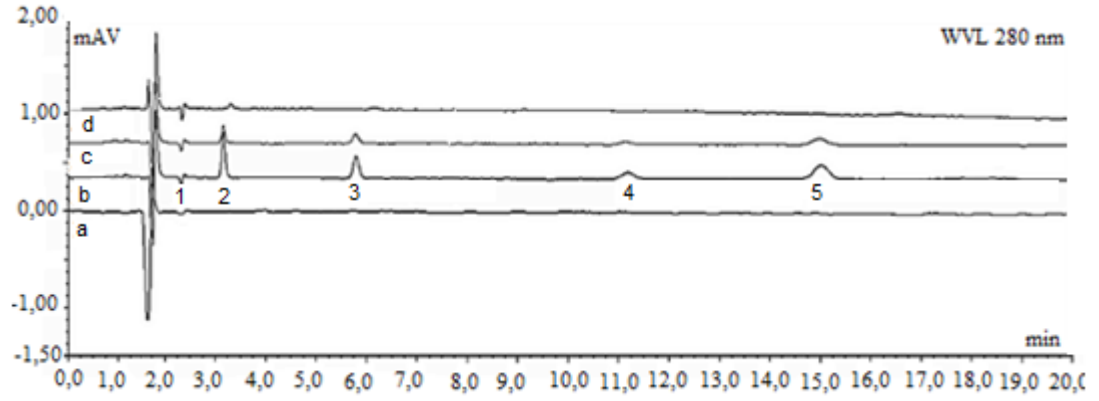
Şekil 3.22 Butil grubu içeren iyonik sıvısı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş kırmızı elma örneği, b) $100 \mu\text{gL}^{-1}$, c) $50 \mu\text{gL}^{-1}$, d) $5 \mu\text{gL}^{-1}$ standart fenolik asit eklenmiş kırmızı elma örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA



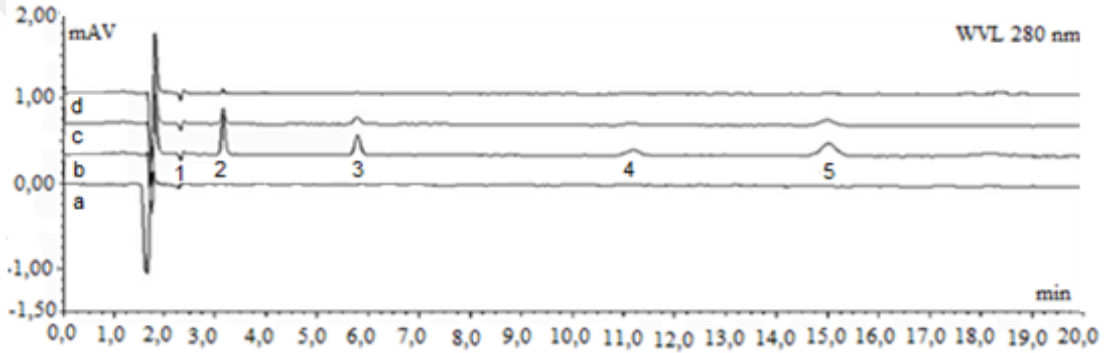
Şekil 3.23 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki fazlı ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş sarı armut örneği, b) $100 \mu\text{gL}^{-1}$, c) $50 \mu\text{gL}^{-1}$, d) $5 \mu\text{gL}^{-1}$ standart fenolik asit eklenmiş sarı armut örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA



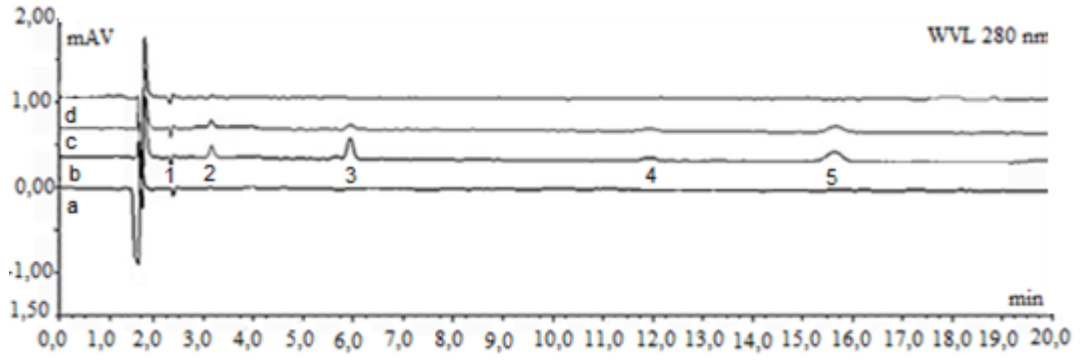
Şekil 3.24 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki fazlı ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş yeşil armut örneği, b) $100 \mu\text{gL}^{-1}$, c) $50 \mu\text{gL}^{-1}$, d) $5 \mu\text{gL}^{-1}$ standart fenolik asit eklenmiş yeşil armut örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA



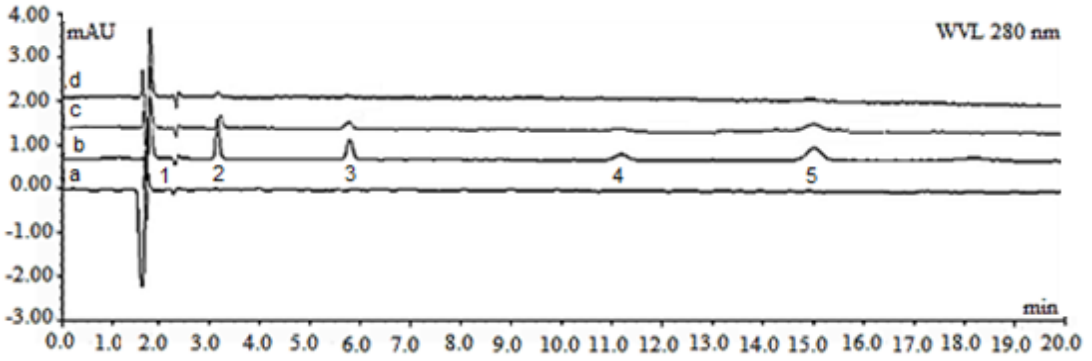
Şekil 3.25 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki fazlı ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş ithal muz örneği, b) $100 \mu\text{gL}^{-1}$, c) $50 \mu\text{gL}^{-1}$, d) $5 \mu\text{gL}^{-1}$ standart fenolik asit eklenmiş ithal muz örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA



Şekil 3.26 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki fazlı ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş yerli muz örneği, b) $100 \mu\text{gL}^{-1}$, c) $50 \mu\text{gL}^{-1}$, d) $5 \mu\text{gL}^{-1}$ standart fenolik asit eklenmiş yerli muz örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA



Şekil 3.27 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki fazlı ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş yeşil üzüm örneği, b) $100 \mu\text{gL}^{-1}$, c) $50 \mu\text{gL}^{-1}$, d) $5 \mu\text{gL}^{-1}$ standart fenolik asit eklenmiş yeşil üzüm örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA

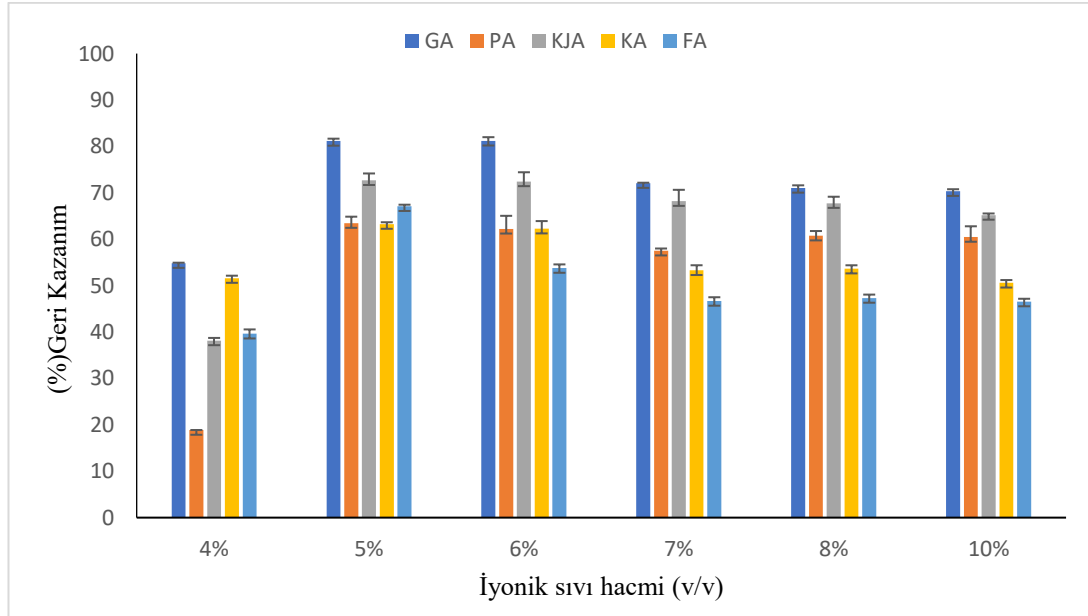


Şekil 3.28 Butil grubu içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki fazlı ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş kırmızı üzüm örneği, b) $100 \mu\text{gL}^{-1}$, c) $50 \mu\text{gL}^{-1}$, d) $5 \mu\text{gL}^{-1}$ standart fenolik asit eklenmiş kırmızı üzüm örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA

3.7 Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat İyonik Sıvısı ile Sulu İki Faz Ekstraksiyon Sonuçları

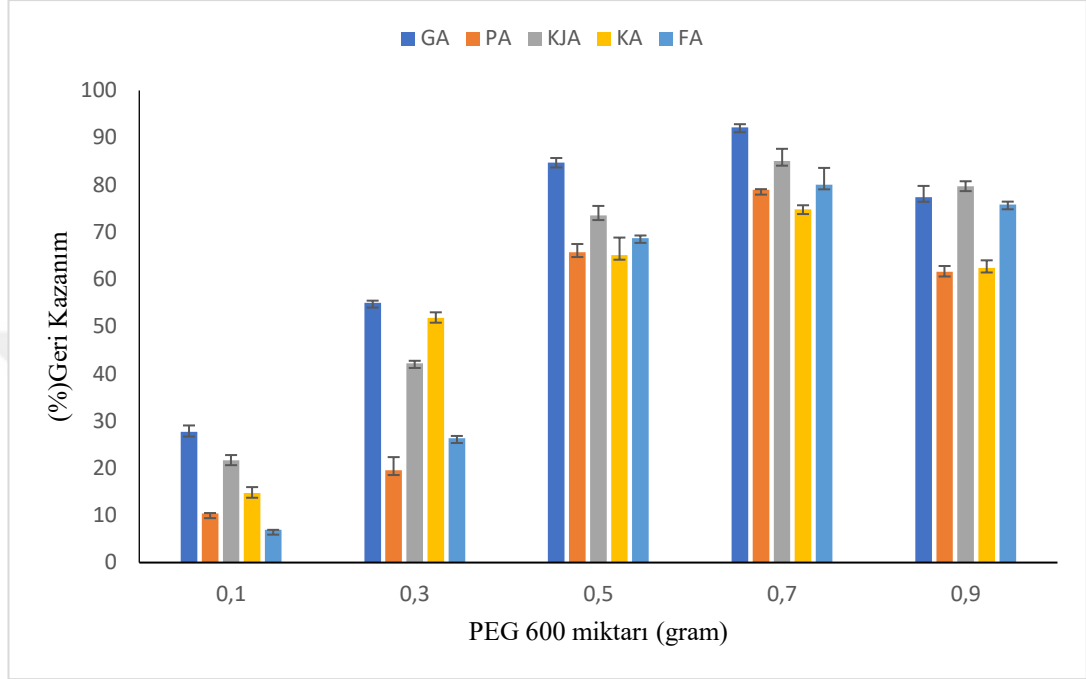
Son yıllarda iyonik sıvı bazlı sulu iki faz ekstraksiyonuna ilişkin yapılan çalışmalarda polimer ortamına iyonik sıvının eklenmesinin ekstraksiyon verimine olan etkisi incelendiği için, bu çalışmada da sentezlenen bu iyonik sıvının ekstraksiyona olan etkisi incelenmek istenmiştir. İyonik sıvı, çalışmada polimer/tuz bazlı sulu iki faz ekstraksiyonunda adjuvant olarak kullanılmıştır. Bunun için optimize edilen parametreler aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

Optimum iyonik sıvı miktarının belirlenmesi için deney tüplerinin içerisine 5 mL 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ fenolik asit karışımı ve 0,5 gram PEG 600 eklenmiştir. PEG 600 çözündükten sonra tüp içerisine 5 mL' de farklı yüzde derişimler de olacak şekilde iyonik sıvı konularak karıştırılmıştır. Bu karışıma 0,5 gram Na_2CO_3 eklenmiş ve tuz çözündükten sonra karışım 15 dakika ultrasonik banyoda 30°C sıcaklıkta karıştırılmıştır. Faz farkı çok belirgin olmadığı için 5000 rpm' de 10 dakika santrüfuj edilmiştir. Sonrasında üst faz alınıp üzerine 100 μL metanol eklenerek HPLC' de analiz edilmiştir. Her bir fenolik asit için elde edilen sonuçlar Şekil 3.29' da verilmiştir. Görüldüğü gibi her bir fenolik asit için optimum iyonik sıvı miktarı %5 (v/v) olarak belirlenmiştir.



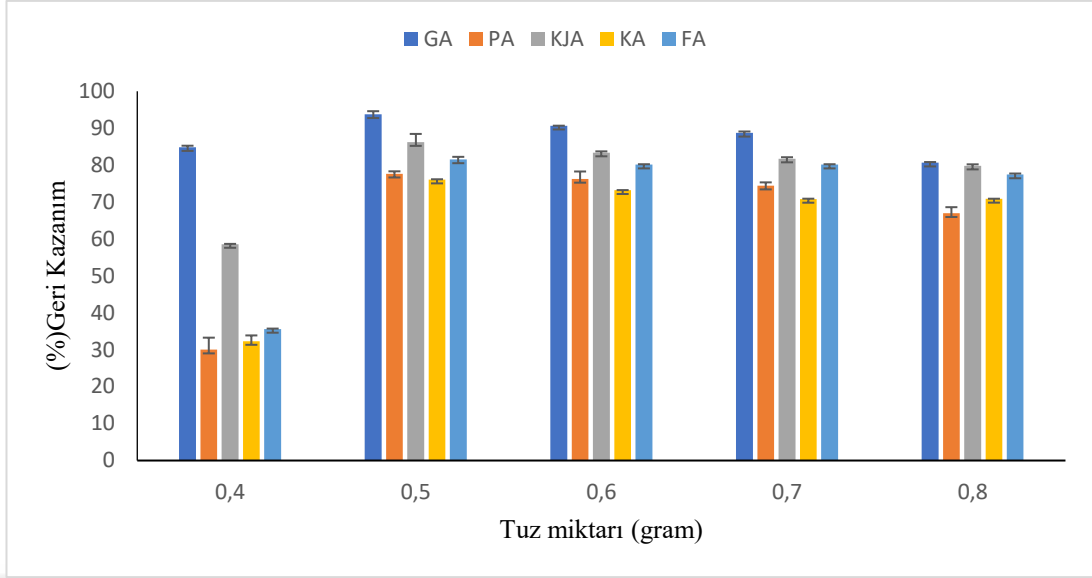
Şekil 3.29 Sulu iki faz sistemli ekstraksiyon yöntemine polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakloroferrat' ın farklı miktarlarının etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, m (PEG 600): 0,5 gram, m(Na_2CO_3): 0,5 gram, ekstraksiyon süresi: 15 dakika, sıcaklık: 30°C, pH ~5-5,5)

PEG 600 miktarının etkisini incelemek için 0,1/0,3/0,5/0,7/0,9 gram PEG 600 ile ekstraksiyonlar tekrarlanmıştır. Optimum PEG 600 miktarının tüm iyonik sıvılar için 0,7 gram olduğu gözlenmiştir. (Şekil 3.30).



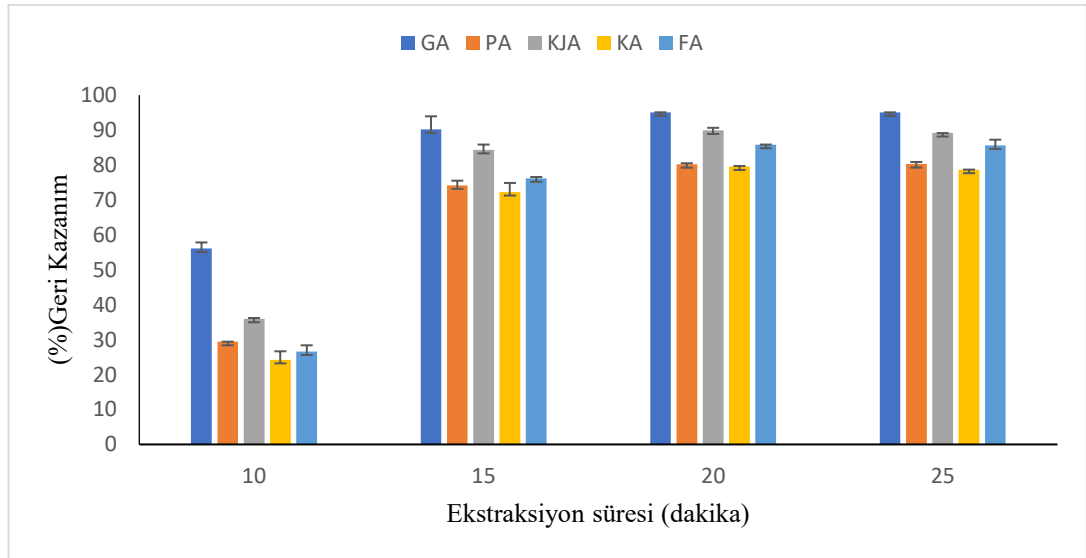
Şekil 3.30 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakroferat içeren iyonik sıvı ile sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine PEG 600 miktarının etkisi (Deney koşulları: C (fenolik asit): 200 μgL^{-1} , C (iyonik sıvı): %5(v/v), m(Na_2CO_3): 0,5 gram, ekstraksiyon süresi: 15 dakika, sıcaklık: 30°C, pH ~5-5,5)

Sulu iki faz ekstraksiyon yönteminde optimum tuz çeşidini belirlemek için Na_2SO_4 , K_2SO_4 , K_2CO_3 , Na_2CO_3 , $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ gibi tuzlar kullanılarak ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Fakat Na_2CO_3 dışında kullanılan diğer tuzlar ile belirgin bir faz farkı gözlenememiş, ya da faz farkı oluşsa bile HPLC’ de analit pikine rastlanmamıştır. Bu yüzden optimum tuz olarak Na_2CO_3 seçilmiş ve daha sonraki çalışmalarda ekstraksiyon Na_2CO_3 tuzu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Optimum Na_2CO_3 miktarının belirlenmesi için ekstraksiyon 0,4/0,5/0,6/0,7/0,8 gram Na_2CO_3 miktarları ile gerçekleştirilmiştir. Her bir fenolik asit için elde edilen sonuçlar Şekil 3.31’ de verilmiştir. Fenolik asitler için optimum tuz miktarı 0,5 gram olarak belirlenmiştir.



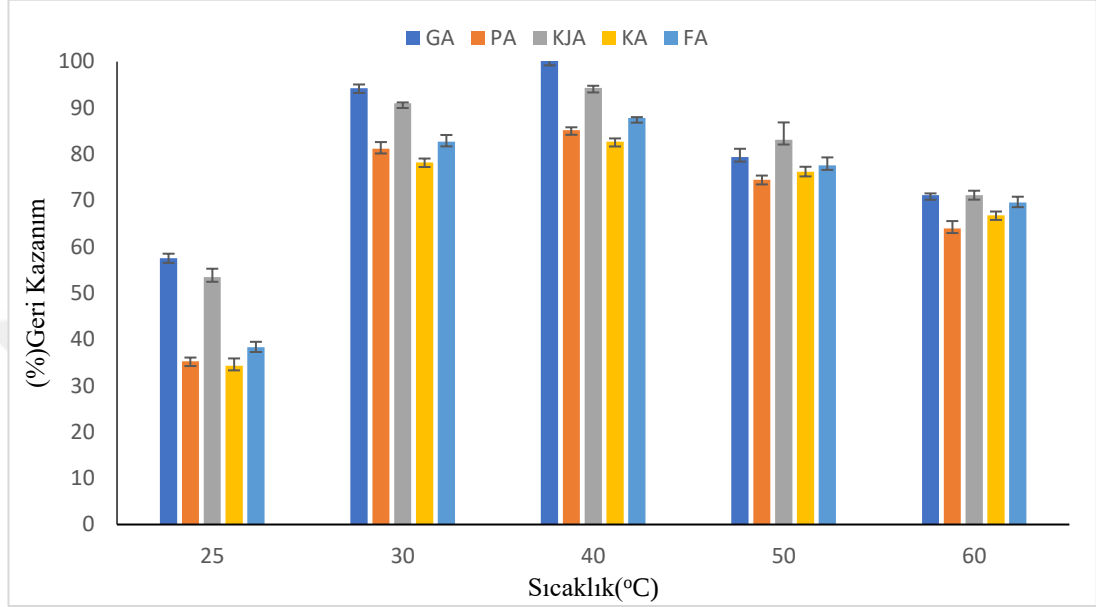
Şekil 3.31 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakoroferat içeren iyonik ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine Na_2CO_3 miktarının etkisi (Deney koşulları: C (fenolik asit): $200 \mu\text{gL}^{-1}$, C (iyonik sıvı): %5(v/v), m(PEG600): 0,7 gram, ekstraksiyon süresi: 15 dakika, sıcaklık: 30°C , pH ~5-5,5)

Optimum ekstraksiyon süresinin belirlenmesi için ekstraksiyon ultrasonik banyoda 10/15/20 ve 25 dakikada gerçekleştirilmiştir. Her bir fenolik asit için elde edilen sonuçlar Şekil 3.32’ de verilmiştir. Her bir fenolik asit için optimum ekstraksiyon süresi 20 dakika olarak belirlenmiştir.



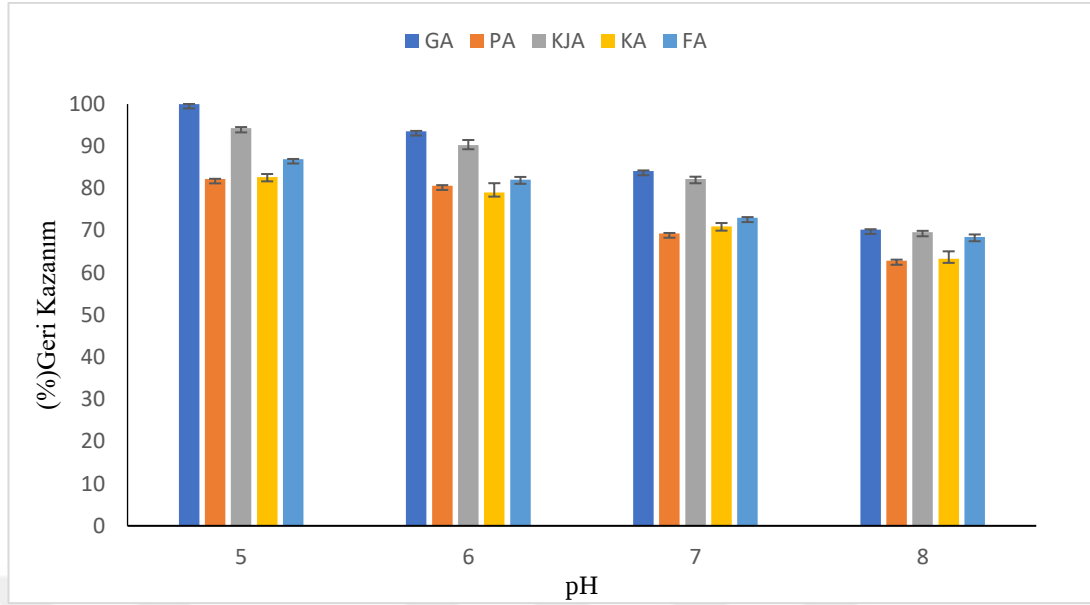
Şekil 3.32 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakoroferat içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine ekstraksiyon süresinin etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): $200 \mu\text{gL}^{-1}$, C (iyonik sıvı): %5 (v/v), m(PEG600): 0,7 gram, m(Na_2CO_3): 0,5 gram, sıcaklık: 30°C , pH ~5-5,5)

Sıcaklığın ekstraksiyona olan etkisini incelemek için ekstraksiyon 25/30/40/50 ve 60°C sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Her bir fenolik asit için elde edilen sonuçlar Şekil 3.33’ de verilmiştir. Her bir fenolik asit için optimum sıcaklık değeri 40°C olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.33 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakoroferat içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine sıcaklığın etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): 200 μgL^{-1} , C (iyonik sıvı): %5 (v/v), m(PEG600): 0,7 gram, m (Na_2CO_3): 0,5 gram, ekstraksiyon süresi: 20 dakika, pH ~ 5-5,5)

Optimum pH’ ın belirlenmesi için 5 mL 200 μgL^{-1} standart fenolik asit karışımlarının pH’ ı 0,1 M NaOH ve 0,1 M HCl ile pH 4-5-6-7-8 ve 9 olarak ayarlanarak ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. pH 4 ve pH 9’ da çok belirgin bir faz elde edilememiştir. Şekil 3.34’ de görüldüğü gibi en yüksek ekstraksiyon verimi pH 5’ de elde edilmiştir. Fenolik asit karışımının kendi pH değeri 5,3 idi. Bu yüzden sonraki çalışmalarda pH ayarı yapılmadan ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.34 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakloroferrat içeren iyonik sıvı ile gerçekleştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemine pH etkisi. (Deney koşulları: C (fenolik asit): 200 μgL^{-1} , C (iyonik sıvı): %5 (v/v), m(PEG600): 0,7 gram, m(Na_2CO_3): 0,5 gram, ekstraksiyon süresi: 20 dakika, sıcaklık: 40°C)

3.8 Geliştirilen Yöntemin Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakloroferrat İyonik Sıvısı ile Analitik Performansının Belirlenmesi

Polietilen glikol bis(metilimidazolyum ditetrakloroferrat) kullanılarak geliştirilen yöntemin analitik performansı belirlenen optimum koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Lineer aralık, LOD, LOQ, gün içi ve günler arası bağıl standart sapma değerleri belirlenerek Tablo 3.12’ de özetlenmiştir. LOD ve LOQ değerleri $3 S_b/m$ ve $10 S_b/m$ formülleri kullanılarak 7 paralel olarak gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucu hesaplanmıştır. Yöntemin kesinliği ise 5 ve 25 μgL^{-1} fenolik asit karışımı ile gün içi ve günler arası çalışmayla % bağıl standart sapma olarak verilmiştir.

Tablo 3.12 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakoroferat iyonik sıvısı ile geliştirilen yöntemin analitik performansı

Parametre	GA	PA	KJA	KA	FA
Lineer aralık ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5-1000	5-1000	5-1000	5-1000	5-1000
Regresyon katsayısı (n=7)	0,9988	0,9988	0,9972	0,9976	0,9995
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,19	1,37	1,29	1,47	1,28
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	3,98	4,57	4,30	4,91	4,25
Gün içi kesinlik ($5 \mu\text{g L}^{-1}$, %BSS, n=5)	2,41	3,43	1,85	2,43	3,53
Gün içi kesinlik ($25 \mu\text{g L}^{-1}$, %BSS, n=5)	2,74	2,51	2,78	3,06	3,81
Günler arası kesinlik ($5 \mu\text{g L}^{-1}$, %BSS, n=5)	3,25	3,70	4,15	3,23	4,39
Günler arası kesinlik ($25 \mu\text{g L}^{-1}$, %BSS, n=5)	4,57	4,11	4,82	4,12	5,20

3.9 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakoroferat ile Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması

Polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakoroferat ile optimize edilen yöntem elma, armut, muz ve üzüm örneklerine uygulanmıştır. Bütün örnekler iki çeşit olarak çalışılmıştır. Analiz sonuçlarında örneklerin hiçbirinde fenolik asit kalıntısına rastlanmamıştır. Yöntemin doğruluğunu göstermek için 5,50 ve 100 μgL^{-1} standart fenolik asit çözeltisi örneklerle uygulanarak geri kazanım değerleri hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 3.13-3.20' de gösterilmiştir. Örnek kromatogramlar Şekil 3.35-3.42' de verilmiştir.



Tablo 3.13 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakoroferrat iyonik sıvısı ile kırmızı elma örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)

Fenolik asitler	Eklenen ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g L}^{-1}$) ($\bar{x}\pm s$)	Geri kazanım (%)
GA	-	-	-
	5	5,00 $\pm$ 0,00	100,00
	50	49,53 $\pm$ 0,17	99,06
	100	97,75 $\pm$ 0,33	97,75
PA	-	-	-
	5	4,86 $\pm$ 0,06	97,20
	50	48,87 $\pm$ 0,92	97,74
	100	99,05 $\pm$ 1,15	99,05
KJA	-	-	-
	5	4,84 $\pm$ 0,16	96,80
	50	48,52 $\pm$ 1,47	97,04
	100	96,49 $\pm$ 1,51	96,49
KA	-	-	-
	5	4,91 $\pm$ 0,11	98,20
	50	44,87 $\pm$ 0,15	89,74
	100	84,30 $\pm$ 0,31	84,30
FA	-	-	-
	5	4,91 $\pm$ 0,12	98,20
	50	45,89 $\pm$ 0,11	91,78
	100	91,56 $\pm$ 0,18	91,56

Tablo 3.14 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakoroferrat iyonik sıvısı ile yeşil elma örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)

Fenolik Asitler	Eklenen ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g L}^{-1}$) ($\bar{x}\pm s$)	Geri kazanım (%)
GA	-	-	-
	5	4,89 $\pm$ 0,07	97,80
	50	44,35 $\pm$ 0,45	88,70
	100	90,80 $\pm$ 1,46	90,80
PA	-	-	-
	5	4,98 $\pm$ 0,03	99,60
	50	46,03 $\pm$ 2,29	92,06
	100	93,55 $\pm$ 0,99	93,55
KJA	-	-	-
	5	4,87 $\pm$ 0,21	97,40
	50	46,07 $\pm$ 2,88	92,14
	100	95,18 $\pm$ 2,62	95,18
KA	-	-	-
	5	4,76 $\pm$ 0,13	95,20
	50	47,34 $\pm$ 0,49	94,68
	100	92,62 $\pm$ 0,23	92,62
FA	-	-	-
	5	4,49 $\pm$ 0,21	89,80
	50	46,31 $\pm$ 0,29	92,62
	100	97,26 $\pm$ 0,47	97,26

Tablo 3.15 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakoroferrat ile sarı armut örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)

Fenolik Asitler	Eklenen ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g L}^{-1}$) ($\bar{x}\pm s$)	Geri kazanım (%)
GA	-	-	-
	5	4,60 $\pm$ 0,09	92,00
	50	47,01 $\pm$ 0,21	94,02
	100	99,16 $\pm$ 0,56	99,16
PA	-	-	-
	5	4,94 $\pm$ 0,11	98,80
	50	42,91 $\pm$ 1,19	85,82
	100	88,30 $\pm$ 4,33	88,30
KJA	-	-	-
	5	4,47 $\pm$ 0,31	89,40
	50	49,45 $\pm$ 2,25	98,90
	100	87,78 $\pm$ 1,87	87,78
KA	-	-	-
	5	4,69 $\pm$ 0,07	93,80
	50	45,32 $\pm$ 2,84	90,64
	100	96,03 $\pm$ 0,45	96,03
FA	-	-	-
	5	4,57 $\pm$ 0,08	91,40
	50	49,01 $\pm$ 0,48	98,02
	100	87,66 $\pm$ 0,19	87,66

Tablo 3.16 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakoroferrat ile yeşil armut örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)

Fenolik Asitler	Eklenen ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g L}^{-1}$) ($\bar{x}\pm s$)	Geri kazanım (%)
	-	-	-
GA	5	4,78 $\pm$ 0,11	95,60
	50	48,30 $\pm$ 0,55	96,60
	100	97,58 $\pm$ 0,52	97,58
	-	-	-
PA	5	4,65 $\pm$ 0,41	93,00
	50	47,71 $\pm$ 0,60	95,42
	100	98,83 $\pm$ 0,55	98,83
	-	-	-
KJA	5	4,96 $\pm$ 0,30	99,20
	50	47,86 $\pm$ 0,66	95,72
	100	93,85 $\pm$ 1,06	93,85
	-	-	-
KA	5	4,69 $\pm$ 0,13	93,80
	50	49,25 $\pm$ 0,77	98,50
	100	95,53 $\pm$ 1,13	95,53
	-	-	-
FA	5	4,49 $\pm$ 0,19	89,80
	50	45,41 $\pm$ 2,63	90,82
	100	95,50 $\pm$ 1,95	95,50
	-	-	-

Tablo 3.17 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakoroferrat iyonik sıvısı ile ithal muz örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)

Fenolik Asitler	Eklenen ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g L}^{-1}$) ($\bar{x}\pm s$)	Geri kazanım (%)
GA	-	-	-
	5	4,58 $\pm$ 0,07	91,60
	50	46,92 $\pm$ 0,16	93,84
	100	97,75 $\pm$ 0,329	97,75
PA	-	-	-
	5	4,96 $\pm$ 0,13	99,20
	50	48,87 $\pm$ 0,92	97,74
	100	99,05 $\pm$ 1,15	99,05
KJA	-	-	-
	5	4,61 $\pm$ 0,29	92,20
	50	48,04 $\pm$ 0,88	96,08
	100	89,60 $\pm$ 1,41	89,60
KA	-	-	-
	5	4,62 $\pm$ 0,10	92,40
	50	44,87 $\pm$ 0,15	89,74
	100	84,30 $\pm$ 0,30	84,30
FA	-	-	-
	5	4,83 $\pm$ 0,25	96,60
	50	41,68 $\pm$ 0,01	83,36
	100	91,56 $\pm$ 0,18	91,56

Tablo 3.18 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakoroferrat iyonik sıvısı ile yerli muz örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)

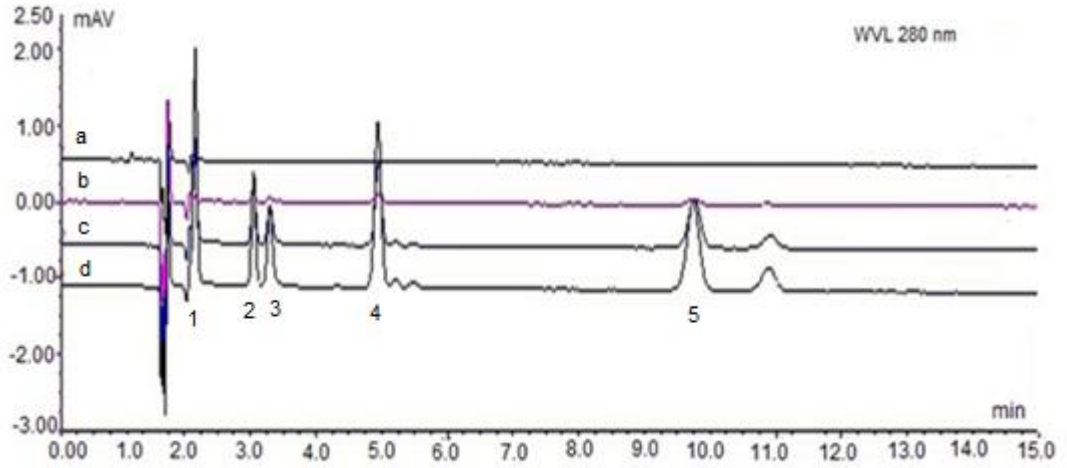
Fenolik Asitler	Eklenen ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g L}^{-1}$) ($\bar{x}\pm s$)	Geri kazanım (%)
	-	-	-
GA	5	4,88 $\pm$ 0,15	97,60
	50	47,06 $\pm$ 0,19	94,12
	100	97,42 $\pm$ 0,44	97,42
	-	-	-
PA	5	4,57 $\pm$ 0,21	91,40
	50	44,69 $\pm$ 0,73	89,38
	100	96,56 $\pm$ 0,38	96,56
	-	-	-
KJA	5	4,89 $\pm$ 0,25	97,80
	50	49,88 $\pm$ 2,62	99,76
	100	92,81 $\pm$ 2,83	92,81
	-	-	-
KA	5	4,49 $\pm$ 0,11	89,80
	50	47,38 $\pm$ 0,66	94,76
	100	97,39 $\pm$ 0,49	97,39
	-	-	-
FA	5	4,95 $\pm$ 0,15	99,00
	50	46,32 $\pm$ 0,21	92,64
	100	98,30 $\pm$ 0,33	98,30
	-	-	-

Tablo 3.19 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakoroferrat iyonik sıvısı ile yeşil üzüm örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)

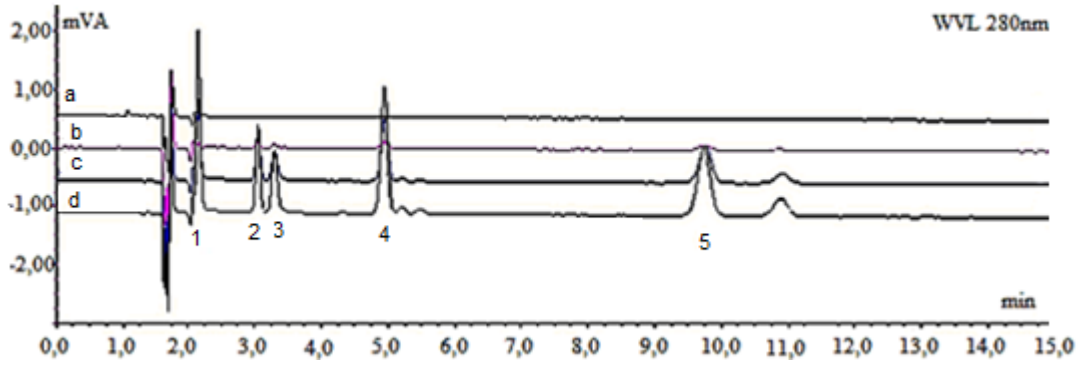
Fenolik Asitler	Eklenen ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g L}^{-1}$) ($\bar{x}\pm s$)	Geri kazanım (%)
	-	-	-
GA	5	4,73 $\pm$ 0,11	94,60
	50	49,75 $\pm$ 0,31	99,50
	100	99,94 $\pm$ 0,18	99,94
	-	-	-
PA	5	4,93 $\pm$ 0,11	98,60
	50	45,02 $\pm$ 0,64	90,04
	100	93,74 $\pm$ 0,58	93,74
	-	-	-
KJA	5	4,99 $\pm$ 0,01	99,80
	50	48,53 $\pm$ 1,19	97,06
	100	94,96 $\pm$ 1,44	94,96
	-	-	-
KA	5	4,64 $\pm$ 0,06	92,80
	50	44,45 $\pm$ 0,43	88,90
	100	91,05 $\pm$ 1,97	91,05
	-	-	-
FA	5	4,65 $\pm$ 0,09	93,00
	50	46,36 $\pm$ 0,67	92,72
	100	85,81 $\pm$ 0,11	85,81

Tablo 3.20 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakoroferrat ile kırmızı üzüm örneğinde fenolik asitlerin analiz sonuçları (n=3)

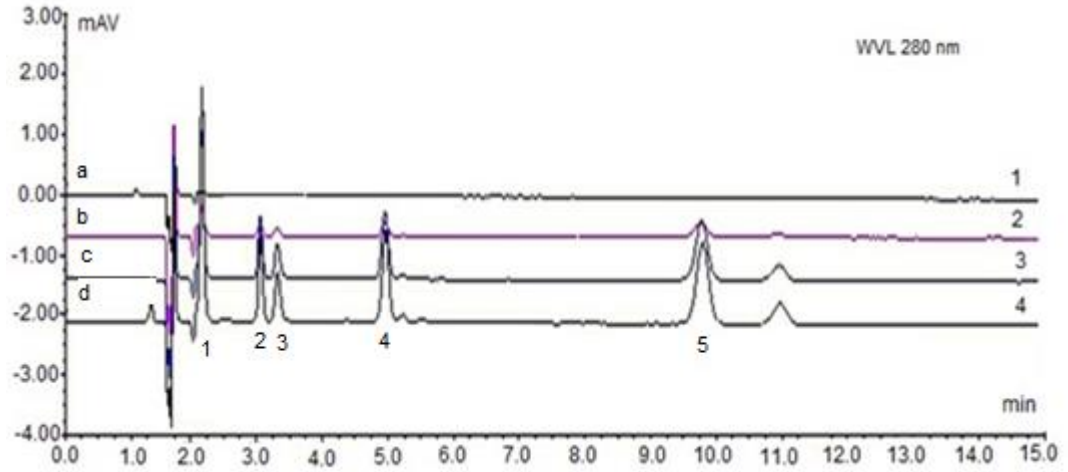
Fenolik Asitler	Eklenen ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g L}^{-1}$) ($\bar{x}\pm s$)	Geri kazanım (%)
	-	-	-
GA	5	4,94 $\pm$ 0,08	98,80
	50	48,75 $\pm$ 0,41	97,50
	100	95,71 $\pm$ 0,47	95,71
	-	-	-
PA	5	4,96 $\pm$ 0,060	99,20
	50	46,58 $\pm$ 0,56	93,16
	100	89,49 $\pm$ 1,37	89,49
	-	-	-
KJA	5	4,94 $\pm$ 0,089	98,80
	50	44,72 $\pm$ 0,85	89,44
	100	96,20 $\pm$ 1,62	96,20
	-	-	-
KA	5	4,64 $\pm$ 0,08	92,80
	50	44,55 $\pm$ 0,14	89,10
	100	93,67 $\pm$ 0,86	93,67
	-	-	-
FA	5	4,47 $\pm$ 0,14	89,40
	50	45,80 $\pm$ 0,63	91,60
	100	92,02 $\pm$ 0,07	92,02
	-	-	-



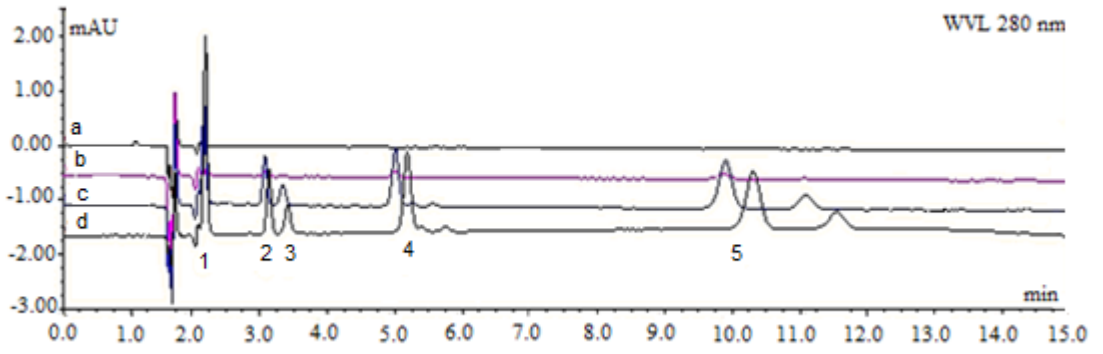
Şekil 3.35 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakoroferrat içeren iyonik sıvı ile sulu iki faz ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş kırmızı üzüm örneği, b) $5 \mu\text{gL}^{-1}$, c) $50 \mu\text{gL}^{-1}$, d) $100 \mu\text{gL}^{-1}$ derişimde standart fenolik asit eklenmiş kırmızı üzüm örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA



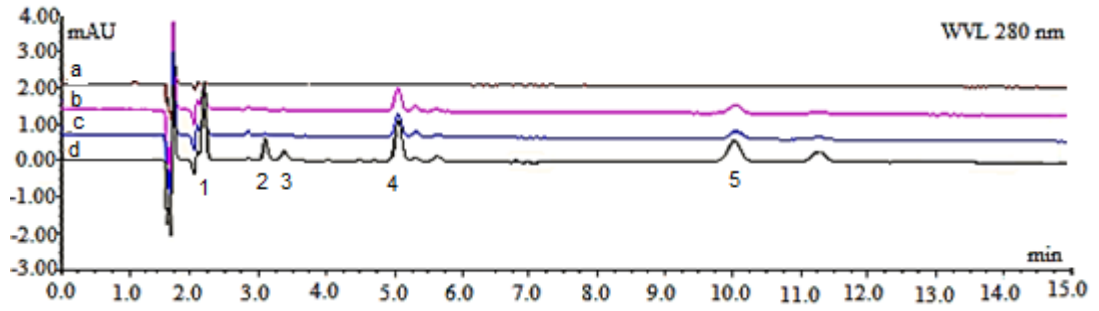
Şekil 3.36 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakoroferrat içeren iyonik sıvı ile sulu iki faz ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş yeşil üzüm örneği, b) $5 \mu\text{gL}^{-1}$, c) $50 \mu\text{gL}^{-1}$, d) $100 \mu\text{gL}^{-1}$ standart fenolik asit eklenmiş yeşil üzüm örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA



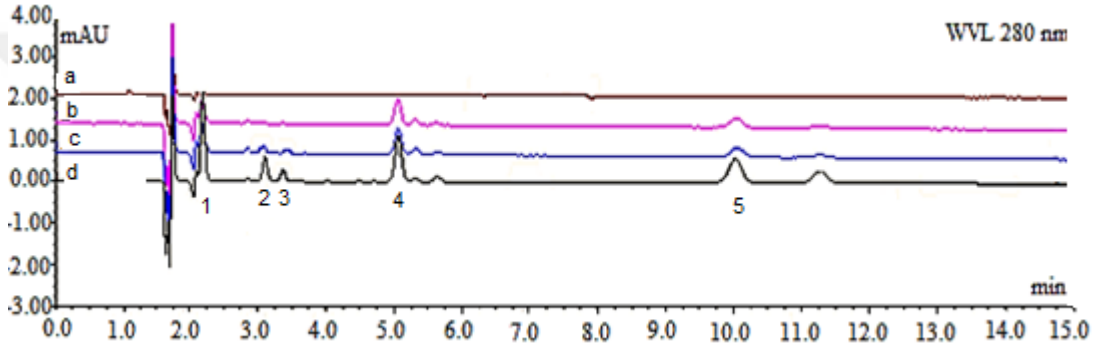
Şekil 3.37 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakoroferrat içeren iyonik sıvı ile sulu iki faz ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş yerli muz örneği, b) $5 \mu\text{gL}^{-1}$, c) $50 \mu\text{gL}^{-1}$, d) $100 \mu\text{gL}^{-1}$ standart fenolik asit eklenmiş yerli muz örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA



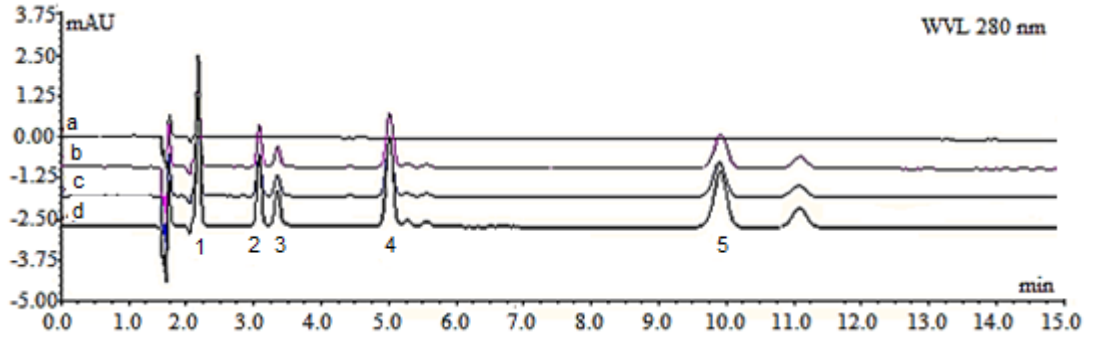
Şekil 3.38 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakoroferrat içeren iyonik sıvı ile sulu iki faz ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş ithal muz örneği, b) $5 \mu\text{gL}^{-1}$, c) $50 \mu\text{gL}^{-1}$, d) $100 \mu\text{gL}^{-1}$ standart fenolik asit eklenmiş ithal muz örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA



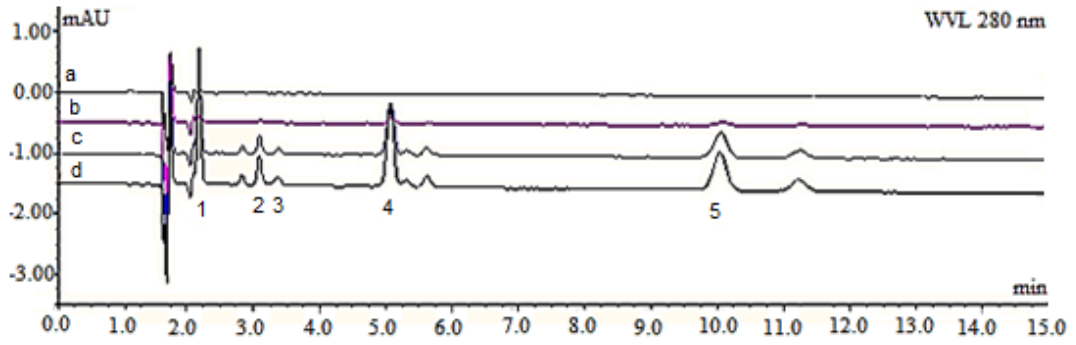
Şekil 3.39 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakoroferrat içeren iyonik sıvı ile sulu iki faz ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş yeşil elma örneği, b) $5 \mu\text{gL}^{-1}$, c) $50 \mu\text{gL}^{-1}$, d) $100 \mu\text{gL}^{-1}$ standart fenolik asit eklenmiş yeşil elma örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA



Şekil 3.40 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakoroferrat içeren iyonik sıvı ile sulu iki faz ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş kırmızı elma örneği, b) $5 \mu\text{gL}^{-1}$, c) $50 \mu\text{gL}^{-1}$, d) $100 \mu\text{gL}^{-1}$ derişimlerde standart fenolik asit eklenmiş kırmızı elma örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA



Şekil 3.41 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakoroferrat içeren iyonik sıvı ile sulu iki faz ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş yeşil armut örneği, b) 5 $\mu\text{g/L}^{-1}$, c) 50 $\mu\text{g/L}^{-1}$, d) 100 $\mu\text{g/L}^{-1}$ standart fenolik asit eklenmiş yeşil armut örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA



Şekil 3.42 Polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakoroferrat içeren iyonik sıvı ile sulu iki faz ekstraksiyon sonrası a) standart fenolik asit eklenmemiş sarı armut örneği, b) 5 $\mu\text{g/L}^{-1}$, c) 50 $\mu\text{g/L}^{-1}$, d) 100 $\mu\text{g/L}^{-1}$ standart fenolik asit eklenmiş sarı armut örneği; 1) GA, 2) PA, 3) KJA, 4) KA, 5) FA

BÖLÜM 4

DEĞERLENDİRME

Çalışmada fenolik asitlerin analiz öncesi analitik matrisden ayrılması ve zenginleştirilmesi için iyonik sıvı bazlı sulu iki faz ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiştir. Bu amaçla 1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, 1-allil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat, 1-benzil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat ve polietilen glikol bis(metilimidazolyum) ditetrakloroferrat olmak üzere 4 tane iyonik sıvı sentezlenmiştir. Sentezlenen iyonik sıvıların yapıları FTIR ve UV-görünür bölge spektrofotometresi ile karakterize edilmiştir. Termal kararlılıkları ise TG/DTA eğrileri ile incelenmiştir.

Katyonik grubu butil, allil ve benzil olan iyonik sıvıların ekstraksiyon verimliliklerini kendi aralarında karşılaştırmak için yöntem öncelikle üçü ile optimize edilmiştir. Bu üç iyonik sıvının ekstraksiyon verimlilikleri karşılaştırıldığında en yüksek verim 1-butil-3-metilimidazolyum tetrakloroferrat ile elde edilmiştir. Bu sonuç, iyonik sıvı ile fenolik asitler arasındaki etkileşimin hidrofobik olduğunu göstermiştir. Öte yandan iyonik sıvı ile fenolik asitler arasında hidrojen bağı- π - π etkileşimi gibi etkileşimlerin de olduğu söylenebilir. Fenolik asitler içinde en yüksek verim gallik asit ile elde edilmiştir. Fenolik asitlerin kimyasal yapıları benzer olduğu için ekstraksiyon verimleri de birbirine yakın olarak elde edilmiştir.

Son yıllarda yapılan iyonik sıvı bazlı sulu iki fazlı ekstraksiyon çalışmalarında iyonik sıvılar özellikle polimer/tuz sistemlerinde adjuvant olarak kullanıldığı için bu çalışmada da son iyonik sıvı olan polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakloroferrat aynı amaç için kullanılmıştır. Faz PEG 600 ve Na_2CO_3 ile oluşturulmuştur. Ortama bu iyonik sıvının eklenmesiyle ekstraksiyon veriminin arttığı gözlenmiştir. Bu iyonik sıvı ile farklı sulu iki faz ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiştir. Bu iyonik sıvının katyonik kısmında PEG varlığı, fenolik asitlerin polimer açısından zengin faza dağılımını artırmıştır. Bu olay, hidrojen bağı, dipol-dipol etkileşimleri nedeniyle daha yüksek ekstraksiyon verimliliğine yol açmıştır.

Sentezlenen iyonik sıvıların manyetizması faz ayrımı için yetersizdi, ancak bu problem santrifüj adımıyla çözülmüştür. Sonuç olarak hem 1-butil-3-

metilimidazolyum klorür hem de polietilen glikol bis (metilimidazolyum) ditetrakoroferat ile belirlenen analitik performans çalışmalarında, fenolik asitler için düşük lineer aralık, LOD ve LOQ değerleri elde edilmiştir. Yöntem her iki iyonik sıvı ile elma, üzüm, armut ve muz örneklerine başarı ile uygulanmış ve yüksek geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Sonuç olarak iyonik sıvılar ile geliştirilen sulu iki faz ekstraksiyon yöntemlerinin, uygulanabilir, basit ve özellikle çevre dostu olduğu gözlenmiştir.



KAYNAKLAR

- Almeida, M.R., Passos, H., Pereira, M.M., Lima, A.S., Coutinho, J.A.P. ve Freire, M.G. (2014). Ionic liquids as additives to enhance the extraction of antioxidants in aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, 128, 1-10.
- Arthur, C.L. ve Pawliszyn J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62(19), 2145-2148.
- Aulakh, J.S., Malik, A.K., Kaur, V. ve Schmitt-Kopplin, P. (2005). A Review on solid phase micro extraction-high performance liquid chromatography (SPME-HPLC) analysis of pesticides. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 35,71-85.
- Berrueta, L.A., Gallo, B. ve Vicente, F. (1995). A review of solid phase extraction: Basic principles and new developments. *Chromatographia*, 40(7-8), 474–483.
- Bezerra, M.D., Arruda, M.A.Z. ve Ferreira S.L.C. (2005). Cloud point extraction as a procedure of separation and pre-concentration for metal determination using spectroanalytical techniques: A review. *Applied Spectroscopy Reviews*, 40(4), 269-299.
- Çağlar, M.Y. ve Demirci, M. (2017). Phenolic compounds in berry fruits and their importance in nutrition. *European Journal of Science and Technology*, 7, 18-26.
- Chen, H., Zuo, Y. ve Deng, Y. (2001). Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 913(1-2), 387-395.
- Chen, L., Wang, H., Zeng, Q., Xu, Y., Sun, L., Xu, H., ve diğer. (2009). On-line coupling of solid-phase extraction to liquid chromatography-A review. *Journal of Chromatographic Science*, 47(8), 614-623.
- Chen, S., Liu, Y., Yan, J., Wang, C. ve Lu, D. (2020). Dispersive micro-solid phase extraction with fibrous TiO₂@gC₃N₄ nanocomposites coupled with ICP-MS for the determination of cobalt and nickel in environmental and biological samples. *Atomic Spectroscopy*, 41(4), 169-174.

- Claudio, A.F.M., Ferreira, A.M., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., Freire, M.G. ve Coutinho, J.A.P. (2012). Optimization of the gallic acid extraction using ionic-liquid based aqueous twophase systems. *Separation and Purification Technology*, 97, 142-149.
- Claudio, A.F.M., Marques, C.F.C., Boal-Palheiros, I., Freire, M.G. ve Coutinho, J.A.P. (2014). Development of back-extraction and recyclability routes for ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. *Green Chemistry*, 16(1), 259-268.
- Dang, Y.Y., Zhang, H. ve Xiu, Z.L. 2014. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of phenolics from grape (*Vitis vinifera*) seed. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 89(10), 1576-1581.
- Dhamole, P.B., Demanna, D. ve Desai, S.A. (2014). Extraction of p-coumaric acid and ferulic acid using surfactant-based aqueous two-phase system. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(2), 564-573.
- do Rosário, R.L.S.D., Souza, R.L., Farias, F.O., Mafra, M.R., Soares, C.M.F., Passos, H., ve diğ er. (2019). Acetonitrile as adjuvant to tune polyethylene glycol + K₃PO₄ aqueous twophase systems and its effect on phenolic compounds partition. *Separation and Purification Technology*, 223, 41-48.
- Esquivel, P., Vinas, M., Steingass, C.B., Gruschwitz, M., Guevara, E., Carle, R., ve diğ er. (2020). Coffee (*coffea arabica* L.) by-products as a source of carotenoids and phenolic compounds-evaluation of varieties with different peel color. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4.
- Farajzadeh, M.A. ve Mogaddam, M.R.A. (2016). Low-density-solvent-based air-assisted liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography with flame ionization detection for the determination of synthetic phenolic antioxidants in milk samples. *Journal of Separation Science*, 39(6), 1160-1167.
- Ghandi, K. (2014). A review of ionic liquids, their limits and applications. *Green and Sustainable Chemistry*, 4, 44-53.
- Goodajdar, B.M. ve Soleimani, S. (2016). One-pot and efficient synthesis of triazolo[1,2-a] indazole-triones catalyzed by poly (ethylene glycol) based magnetic dicationic ionic liquid. *Iranian Journal of Catalysis*, 6(1), 43-49.

- Gou, S., Yin, T., Xia, Q. ve Guo, Q. (2015). Biodegradable polyethylene glycol-based ionic liquids for effective inhibition of shale hydration. *RSC Advances*, 5(41), 32064-32071.
- Hayashi, S. ve Hamaguchi, H. (2004). Discovery of a magnetic ionic liquid [bmim]FeCl₄. *Chemistry Letters*, 33(12), 1590-1591.
- Hayashi, S., Saha, S. ve Hamaguchi, H. (2006). A new class of magnetic fluids: bmim [FeCl₄] and nbmim [FeCl₄] ionic liquids. *IEEE Transactions on Magnetics*, 42(1), 12-14.
- Heintz, A. (2005). Recent developments in thermodynamics and thermophysics of non-aqueous mixtures containing ionic liquids. A review. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 37(6), 525-535.
- Heleno, S.A., Martins, A., Queiroz, M.J.R.P. ve Ferreira, I.C.F.R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: a review. *Food Chemistry*, 173, 501-513.
- Husain, N. ve Gupta, S. (2015). A critical study on chemistry and distribution of phenolic compounds in plants, and their role in human health. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 1, 57-60.
- Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., ve diğer. (2016). Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. *Biological Procedures Online*, 18, 18.
- Jalili, V., Barkhordari, A. ve Ghiasvand, A. (2020). Solid-phase microextraction technique for sampling and preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. *Microchemical Journal*, 157, 104967.
- Jeon, Y., Sung, J., Seo, C., Lim, H., Cheong, H., Kang, M., ve diğer. (2008). Structures of ionic liquids with different anions studied by infrared vibration spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, 112(15), 4735-4740.
- Jiang, W., Zhu, W., Li, H., Xue, J., Xiong, J., Chang, Y., ve diğer. (2014). Fast oxidative removal of refractory aromatic sulfur compounds by a magnetic ionic liquid. *Chemical Engineering Technology*, 37(1), 36- 42.

- Karabulut, G. ve Yemiş, O. (2019). Fenolik bileşiklerin bağlı formları ve biyokararlılığı. *Akademik Gıda*, 17, 526-537.
- Klee, A., Prevost, S., Kunz, W., Schweins, R., Kiefer, K. ve Gradzielski, M. (2012). Magnetic microemulsions based on magnetic ionic liquids. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(44), 15355-15360.
- Kocurova, L., Balogh, I.S., Sandrejova, V. ve Andruch V. (2012). Recent advances in dispersive liquid–liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review. *Microchemical Journal*, 102, 11-17.
- Kozłowicz, K., Różyło, R., Gładyszewska, B., Matwijczuk, A., Gładyszewski, G., Chocyk, D., ve diğer. (2020). Identification of sugars and phenolic compounds in honey powders with the use of GC–MS, FTIR spectroscopy, and X-ray diffraction. *Scientific Reports*, 10.
- Kumar, B.R. (2017). Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7(6), 349-364.
- Kumar, N. ve Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 24, e00370.
- Li, T., Li, X., Dai, T., Hu, P., Niu, X., Liu, C., ve diğer. (2020). Binding mechanism and antioxidant capacity of selected phenolic acid - β -casein complexes. *Food Research International*, 129.
- Marsh, K.N., Boxall, J.A. ve Lichtenthaler, R. (2004). Room temperature ionic liquids and their mixtures-a review. *Fluid Phase Equilibria*, 219(1), 93-98.
- McQueen, L. ve Lai, D. (2019). Ionic liquid aqueous two-phase systems from a pharmaceutical perspective. *Frontiers in Chemistry*, 7.
- Neves, C.M.S.S., Sousa, R.C.S., Pereira, M.M., Freire, M.G. ve Coutinho, J.A.P. (2019). understanding the effect of ionic liquids as adjuvants in the partition of biomolecules in aqueous two-phase systems formed by polymers and weak salting-out agents. *Biochemical Engineering Journal*, 141, 239-246.
- Nirmal, N.P., Benjakul, S., Ahmad, M. ve Arfat, Y.A. (2015). Undesirable enzymatic

- browning in crustaceans: causative effects and its inhibition by phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 1992-2003.
- Nour, V., Trandafir, I. ve Cosmulescu, S. (2013). HPLC determination of phenolic acids, flavonoids and juglone in walnut leaves, *Journal of Chromatographic Science*, 51(9), 883-890.
- Ojeda, C.B. ve Rojas, F.S. (2009a). Separation and preconcentration by a cloud point extraction procedure for determination of metals: an overview. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(3), 759-782.
- Ojeda, C.B. ve Rojas, F.S. (2009b). Separation and preconcentration by dispersive liquid-liquid microextraction procedure: A review. *Chromatographia*, 69(11-12), 1149-1159.
- Oksana, S., Marian, B., Mahendra, R. ve Bo, S.H. (2012). Plant phenolic compounds for food, pharmaceutical and cosmetics production. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6, 2526-2539.
- Patil, G. ve Raghavarao, K.S.M.S. (2007). Aqueous twophase extraction for purification of C-phycocyanin. *Biochemical Engineering Journal*, 34(2), 156-164.
- Polatka-Wasyłka, Szczepanska, N., Guardia, M.L. ve Namiesnik, J. (2015). Miniaturized solid-phase extraction techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 73, 19-38.
- Qin, B., Liu, X., Cui, H., Ma, Y., Wang, Z. ve Han, J. (2017). Aqueous two-phase assisted by ultrasound for the extraction of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 47(9), 881-888.
- Raghavarao, K.S.M.S, Ranganathan, T.V., Srinivas, N.D. ve Barhate, R.S. (2003). Aqueous twophase extraction-an environmentally benign technique. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 5, 136-141.
- Raja, S., Murty, V. R., Thivaharan, V., Rajasekar, V. ve Ramesh, V. (2011). Aqueous twophase systems for the recovery of biomolecules - A review. *Science and Technology*, 1(1), 7-16.

- Rao, Y., Zhao, X., Li, Z. ve Huang, J. (2018). Phenolic acids induced growth of 3D ordered gold nanoshell composite array as sensitive SERS nanosensor for antioxidant capacity assay. *Talanta*, 190, 174-181.
- Sarafraz-Yazdi, A. ve Razavi, N. (2015). Application of molecularly-imprinted polymers in solid-phase microextraction techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 73, 81-90.
- Sevgi, K., Tepe, B. ve Sarikurkcü, C. (2015). Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 77, 12-21.
- Song, H., Zhang, L., Wu, L., Huang, W., Wang, M., Zhang, L., ve diğer. (2020). Phenolic acid profiles of common food and estimated natural intake with different structures and forms infive regions of China. *Food Chemistry*, 321, 126675.
- Sterbova, D., Matejicek, D., Vlcek, J. ve Kuban, V. (2004). Combined microwave-assisted isolation and solid-phase purification procedures prior to the chromatographic determination of phenolic compounds in plant materials. *Analytica Chimica Acta*, 513(2), 435-444.
- Sukhonthara, S., Kaewka, K. ve Theerakulkait, C. (2016). Inhibitory effect of rice bran extracts and its phenolic compounds on polyphenol oxidase activity and browning in potato and apple puree. *Food Chemistry*, 190, 922-927.
- Tarnawski, M., Depta, K., Grejciun, D. ve Szelepin, B. (2006). HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract - a natural immunomodulatory. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(1), 182-188.
- Tashakkori, P., Altınışik Tağaç, A. ve Merdivan, M. (2021). Fabrication of montmorillonite/ionic liquid composite coated solid-phase microextraction fibers for determination of phenolic compounds in fruit juices by gas chromatography and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1635, 461741.
- Tsao, R. ve Deng, Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant hytochemicals. *Journal of Chromatograpy B*, 812(1-2), 85-99.

- Vinas, P., Campillo, N., Lopez-Garcia, I. ve Hernandez-Cordoba, M. (2014). Dispersive liquid–liquid microextraction in food analysis. A critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(8), 2067-2099.
- Wu, J., Gao, H., Zhao, L., Liao, X., Chen, F., Wang, Z., ve diğer. (2007). Chemical compositional characterization of some apple cultivars. *Food Chemistry*, 103, 88-93.
- Xavier, L., Freire, M.S., Vidal-Tato, I. ve Gonzalez-Alvarez, J. (2017). Recovery of phenolic compounds from Eucalyptus globulus wood wastes using PEG/phosphate aqueous two-phase systems. *Waste and Biomass Valorization*, 8(2), 443-452.
- Yau, Y.K., Ooi, C.W., Ng, E.P., Lan, J.C.W., Ling, T.C. ve Show, P.L. (2015). Current applications of different type of aqueous two-phase systems. *Bioresources and Bioprocessing*, 2.
- Yu, J., Vasanthan, T. ve Temelli, F. (2001). Analysis of phenolic acids in barley by High-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4352-4358.
- Zhang, H., Wu, Z.Y., Wang, Y.Z., Zhou, D.D., Yang, F.Q. ve Li, D.Q. (2020) On-line immobilized trypsin microreactor for evaluating inhibitory activity of phenolic acids by capillary electrophoresis and molecular docking. *Food Chemistry*, 310, 125823.
- Zhang, L., Li, Y., Liang, Y., Liang, K., Zhang, F., Xu, T., ve diğer. (2019). Determination of phenolic acid profiles by HPLC-MS in vegetables commonly consumed in China. *Food Chemistry*, 276, 538-546.
- Zwir-Ferenc, A. ve Biziuk, M. (2006). Solid phase extraction technique-trends, opportunities and applications. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(5), 677-690.