




**T.C.**

**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# HÜMİK MADDELERİN BAZI BİYOKİMYASAL KAYNAKLARDAN EKSTRAKSİYONU VE AKIŞ ENJEKSİYON SİSTEMLERİYLE TAYİN METOTLARININ GELİŞTİRİLMESİ

**İsmail TARHAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Aralık-2011**
**KONYA**
**Her Hakkı Saklıdır**

# ÖZET

## YÜKSEK LİSANS TEZİ

## HÜMİK MADDELERİN BAZI BİYOKİMYASAL KAYNAKLARDAN EKSTRAKSİYONU VE AKIŞ ENJEKSİYON SİSTEMLERİYLE TAYİN METOTLARININ GELİŞTİRİLMESİ

**İsmail TARHAN**

**Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**
**Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Hüseyin KARA**

**2011, 138 Sayfa**

**Jüri**

**Prof. Dr. Mehmet SEZGİN**
**Prof. Dr. Hüseyin KARA**
**Doç. Dr. Mustafa TABAKÇI**

Sunulan bu çalışmada, bazı biyokimyasal kaynaklardan hümik maddelerin (HM) eldesi için yüksek verimli bir ekstraksiyonu metodu oluşturulmuş, bu kaynakların hümik madde içeriği tespit edilmeye çalışılmış ve hümik asitlerin (HA) miktarının tayini için standart metotlara alternatif olması beklenilen yeni bir akış enjeksiyon metodu (FIA) geliştirilmiştir.

Hümik maddelerin ekstraksiyonu için farklı ekstraksiyon metotları denenmiş ve en yüksek hümik madde verimi, $HNO_3$ ön yükseltgemeli KOH ekstraksiyon metodundan elde edilmiştir.

Hümik asitlerin miktar tayini için HPLC sistemi modifiye edilerek kemometrik yaklaşımlarla yeni, hızlı, hassas ve seçici bir akış enjeksiyon metodu geliştirilmiştir. Yüzey grafikleri kullanılarak, kısmi faktöriyel tasarım ile sistemin numune hacmi, sıcaklık, hareketli fazın akış hızı ve pH gibi parametrelerinin optimum değerleri tespit edilmeye çalışılmıştır. Cevap değeri olarak kullanılan regresyon katsayılarına ($R^2$) ve normal dağılım grafiklerine göre parametreler içerisinde en anlamlı etkiyi akış hızının yaptığı belirlenmiştir. Önerilen FIA metodu, sahip olduğu geniş kalibrasyon aralığı ile (0-2000 mg/L) daha az seyreltme işlemine ihtiyaç duymakta, farklı konsantrasyonlara sahip hümik asit numunelerini tayin edebilmekte ve saatte 60 analiz yapabilmektedir. Tayin limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) sırasıyla 9,18 g/mL ve 30,6 g/mL olarak tespit edilmiştir. FIA metodu ile hümik asitlerin tayininde kullanılan standart spektrofotometrik metot sonuçları arasında mükemmel bir uyum tespit edilmiştir. Önerilen FIA metodu, hümik asitlerin sürekli ve otomatik miktar tayini için çok kolay, hızlı ve uygulanabilir bir metot olduğu görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Akış enjeksiyon analizi, Ekstraksiyon, Hümik asit, Hümik maddeler, Kemometri, Optimizasyon, Yükseltgenme, Validasyon

# ABSTRACT

## MS THESIS

## EXTRACTION OF HUMIC SUBSTANCES FROM SOME BIOCHEMICAL RESOURCES AND TO IMPROVE DETERMINATION METHODS BY FLOW INJECTION SYSTEMS

**İsmail TARHAN**

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY**
**THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN CHEMISTRY**

**Advisor: Prof. Dr. Hüseyin KARA**

**2011, 138 Pages**

**Jury**

**Prof. Dr. Mehmet SEZGİN**
**Prof. Dr. Hüseyin KARA**
**Assoc. Prof. Dr. Mustafa TABAKÇI**

In this study, a highly efficient extraction method was created in order to obtain humic substances (HS) from some biochemical sources, Humic matter content of these sources was attempted to identify and new flow injection analysis (FIA) methods expected to be an alternative to standard methods have been developed for quantification of humic acids (HAs).

For extraction of HA, different extraction methods were tested and the highest yield of humic substances is determined by the pre-oxidation $HNO_3$-KOH extraction method.

For HA analysis, a new, rapid, sensitive and specific flow injection analysis (FIA) method for quantification of HA was developed within the framework of chemometric approach by modifying HPLC system. Fractional factorial design (FFD) was used to determine the optimum values of system parameters such as sample amount, temperature, flow rate and pH value of mobile phase using response surface methodology (RSM). Among these parameters, the flow rate was found to be the most effective with respect to the normal distribution graphs and correlation coefficient ($R^2$) values was used as a response in this evaluation. The proposed FIA method needs less dilution process, able to determine HA samples which are different concentration and allows to determine of 60 samples per hour with linear calibration curve over a wide range (0-2000 mg $L^{-1}$). The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated as 9,18 mg $L^{-1}$ and 30,6, respectively. Excellent agreement between the results of the proposed method and spectrophotometric method general used for HAs determination was obtained. It was found that the proposed FIA method very simple, fast and suitable for automatic and continuous HA quantification analysis.



**Keywords:** Chemometrics, Extraction, Flow injection analysis, Humic substances, Optimization, Oxidation, Validation

# ÖNSÖZ

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Hüseyin KARA danışmanlığında tamamlanarak, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Yükseklisans Tezi olarak sunulmuştur.

Bu çalışmanın hazırlanmasında, kaynak araştırmasında ve seminerinin sunulmasında her türlü bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hüseyin KARA' ya teşekkür ederim.

Desteklerinden ötürü, başta Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nden Prof. Dr. Adnan KENAR beyefendiye, Analitik Kimya Araştırma Grubumuzda yer alan Yrd. Doç. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI, Yrd. Doç Dr. Fatih DURMAZ, Yrd. Doç. Dr. Orhan GEZİCİ, Arş. Gör. Dr. H. Filiz AYYILDIZ, Uzm. Mustafa TOPKAFA, Arş. Gör. Fatmanur ARSLAN, Yükseklisans Öğrencileri Huriye ÇAKIR ve Polat KILIÇ olmak üzere, tüm arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Çalışmaların yürütülebilmesi için gerekli mali kaynağı, BAP 11101002 nolu proje ile sağlayan S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğüne de teşekkür ederim.

Ayrıca; bugünlere gelebilmem için büyük emek, umut ve cesaret veren iki muhterem insan sevgili anne ve babam, Seyhan ve Şakir TARHAN'a hassaten teşekkür eder, sonsuz şükran ve minnetlerimi sunarım.

İsmail TARHAN
KONYA-2011

# İÇİNDEKİLER

**ÖZET** ..... **iv**

**ABSTRACT** ..... **v**

**ÖNSÖZ** ..... **vi**

**İÇİNDEKİLER** ..... **vii**

**ŞEKİLLER DİZİNİ** ..... **ix**

**ÇİZELGELER DİZİNİ** ..... **xii**

**SİMGELER VE KISALTMALAR** ..... **xiv**

**1 GİRİŞ** ..... **1**

**2 HÜMİK MADDELER** ..... **3**

*2.1 Hümik Maddelerin Oluşumu ve Kaynakları* ..... *4*

*2.2 Hümik Maddelerin Sınıflandırılması* ..... *6*
2.2.1 Hümik asit ve fülvik asit arasındaki farklar ..... 7

*2.3 Hümik Asitlerin Yapısal Özellikleri ve Fonksiyonları* ..... *7*
2.3.1 Hümik asitlerin FTIR titreşim bantlarının incelenmesi ..... 9
2.3.2 Hümik asitlerin kimyasal türlerle etkileşmesi ..... 10
2.3.3 Katı/sabit faz olarak hümik asitler ..... 12

*2.4 Biyokimyasal Kaynaklardaki Hümik Madde İçeriği* ..... *13*

*2.5 Hümik Asitlerin Kullanım Alanları* ..... *14*
2.5.1 Toprak yapısını düzenlemede hümik asitler ..... 14
2.5.2 Bitki gelişimini biyolojik yönden desteklemede hümik asitler ..... 15

**3 EKSTRAKSİYON** ..... **17**

*3.1 Sıvı – Sıvı Ekstraksiyon* ..... *17*

*3.2 Sıvı – Katı Ekstraksiyonu* ..... *17*

*3.3 Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE)* ..... *18*
3.3.1 Kesikli yöntem ..... 18
3.3.2 Sürekli yöntem ..... 19

**4 AKIŞ ENJEKSİYON ANALİZLERİ (FIA)** ..... **20**

*4.1 Akış Enjeksiyon* ..... *20*

*4.2 Akış Enjeksiyon Sistemlerinin Gelişimi* ..... *21*

*4.3 FIA`ya Etki Eden Önemli Faktörler* ..... *23*
4.3.1 Numune enjeksiyon hacmi ..... 23
4.3.2 Numunenin kontrollü dağılımı ..... 24
4.3.3 Sistem bağlantılarının çapı ..... 26

*4.4 FIA`da Dedeksiyon* ..... *26*

*4.5 FIA`nın Avantajları* ..... *27*

*4.6 FIA`nın Uygulamaları* ..... *27*

**5 KAYNAK ARAŞTIRMASI** ..... **29**

*5.1 Kemometri ve Faktöriyel Tasarım* ..... *29*

5.1.1 Normal dağılım grafikleri ... 31
5.1.2 Cevap yüzeyleri metodolojisi ... 33
5.1.3 Model eşitliği ve cevap değeri ... 36

*5.2 Hümik Maddelerin Ekstraksiyon Metotları ... 37*

*5.3 Biyokimyasal Kaynaklardan Hümik Maddelerin Eldesi ... 39*

*5.4 Hümik Maddelerin Tayininde FIA Sistemlerinin Kullanımı ... 42*

*5.5 Çalışmanın Amacı ... 44*

**6 MATERYAL VE YÖNTEM ... 45**

*6.1 Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar ... 45*

*6.2 Biyokimyasal Kaynaklara Uygulanan Ön İşlemler ... 47*

*6.3 Hümik Madde Eldesi İçin Seçilen Biyokimyasal Kaynaklar ... 47*

*6.4 Biyokimyasal Kaynaklardan Hümik Maddelerin Ekstraksiyonu ... 51*

*6.5 Biyokimyasal Kaynaklardan Ekstrakte Edilen Hümik Madde Miktarının Hesaplanması ... 54*

*6.6 FT-IR Analizleri ... 55*

*6.7 Akış Enjeksiyon Analizleri ... 55*

*6.8 Deneysel Tasarım Uygulamaları ... 57*
6.8.1 Kısmi faktöriyel tasarım ... 57
6.8.2 Cevap değerinin seçimi ve model eşitliğinin oluşturulması ... 62

*6.9 İstatistiksel Analiz ... 63*

**7 ARAŞTIRMA SONUÇLARI ... 65**

*7.1 Biyokimyasal Kaynaklardan Hümik Maddelerin Eldesi ... 65*
7.1.1 Nem miktarları ... 65
7.1.2 Ekstraksiyon metodunun seçimi ... 65
7.1.3 FTIR analizleri ... 81

*7.2 Akış Enjeksiyon Analizleri Ön Denemeleri ... 84*
7.2.1 Hareketli faz denemeleri ... 84
7.2.2 Sistem bağlantılarının etkisi ... 88
7.2.3 Enjektör yıkama etkisi ... 89
7.2.4 Dedektör dalga boyunun etkisi ... 91

*7.3 Kısmi Deneysel Tasarım İle FIA Sisteminin Optimizasyonu ... 92*
7.3.1 Birinci aşama: Akış hızı, pH ve sıcaklık faktörlerinin optimizasyonu ... 92
7.3.2 İkinci aşama: Numune hacmi ve sıcaklık parametrelerinin optimizasyonu ... 98

*7.4 Hareketli Faz Çözeltisindeki DTPA'nın Etkisi ... 104*

*7.5 Hareketli Faz Çözeltisi Olarak $NH_3/NH_4Cl$ Tamponunun Etkisi ... 105*

*7.6 İstatistiksel Analiz Sonuçları ve Değerlendirilmesi ... 110*

**8 SONUÇLAR ve TARTIŞMA ... 116**

**9 KAYNAKLAR ... 118**

**ÖZGEÇMİŞ ... 122**

# ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Lignin teorisine göre hümik maddelerin meydana gelişi ..... 5

Şekil 2. 2. Hümik maddelerin farklı pH değerlerindeki çözünme kabiliyetlerine göre sınıflandırılması ..... 6

Şekil 2. 3. Hümik maddeleri oluşturan üç ana fraksiyonun renk tonları ..... 7

Şekil 2. 4. Hümik asitlerin başlıca etkileşim bölgeleri ve fonksiyonları ..... 8

Şekil 2. 5. Fonksiyonel grup içeriği bakımından fülvik asit ve hümik asit ..... 8

Şekil 2. 6. Cu (II) için pH=7'deki Log K Değerleri ..... 9

Şekil 2. 7. Hümik asit için örnek bir FTIR spektrumu ..... 10

Şekil 2. 8. Hümik maddelerin besin ve suyla etkileşimleri ..... 15

Şekil 2. 9. Hümik maddelerin kompleksleşmesine örnek olarak Metal-EDTA kompleksi ..... 16

Şekil 4. 1. Akış enjeksiyon (FI) sistemi ..... 21

Şekil 4. 2. Akış enjeksiyon (FI) sistemlerinin çalışma prensibinin şematik gösterimi ..... 22

Şekil 4. 3. Akış enjeksiyon (FI) sistemlerinde türevlendirme reaktifinin kullanımı ..... 22

Şekil 4. 4. Akış enjeksiyon analizlerinde (FIA) numune hacminin etkisi ..... 24

Şekil 4. 5. Akış enjeksiyon (FI) sistemlerinde numunenin dağılımı (a) Dağılıma uğramayan numune bölgesi (Initial Concentration) (b) Dağılmaya uğramaya başlayan numune bölgesi (c) Dağılıma uğrayan numune bölgesi (Gauss Şekli) ..... 25

Şekil 5. 1 Kemometrinin ilişkili olduğu disiplinler (Dinç, 2007) ..... 30

Şekil 5. 2. Etkilerin normal dağılım grafiği ..... 33

Şekil 5. 3. İki değişkenli bir sistemin optimizasyonunda kullanılan kuadratik modelden elde edilen yüzey grafiklerinin bazı profilleri: (a) maksimum, (b) plato, (c) maksimum nokta deneysel alanın dışarısında, (d) minimum ve (e) eğri yüzey (Bezerra ve ark., 2008). ..... 35

Şekil 6. 1. Akış enjeksiyon analizlerinde kullanılan HPLC sistemi ..... 46

Şekil 6. 2. Leonardit madeni ..... 48

Şekil 6. 3. Deniz yosunu ..... 48

Şekil 6. 4. Linyit madeni ..... 49

Şekil 6. 5. Toprak ..... 49

Şekil 6. 6. Üzüm Cibresi ..... 50

Şekil 6. 7. Çay atığı ..... 50

Şekil 6. 9. Örnek olarak verilmiş olan bir hümik asit çözeltisi UV spektrumu ..... 54

Şekil 6. 10. Standart hümik asit çözeltilerinin absorbansları ile elde edilmiş olan kalibrasyon grafiği ..... 54

Şekil 6. 11. Hümik asitlerin tespiti için kullanılan akış enjeksiyon sisteminin şematik gösterimi: ..... 56

Şekil 6. 12. Belirli bir deneysel koşula göre enjekte edilen 3 hümik asit standardının (62,5, 125 ve 250 mg/L) ardı ardına 3 tekrarlı analizden elde edilen 9 pik alanının bir grafikte gösterimi ve regresyon katsayısı ..... 63

Şekil 7. 1. Biyokimyasal kaynaklardan elde edilen hümik asitlerin IR spektrum bölgeleri: (a) 2920-2858 $cm^{-1}$, (b) 1600-650 $cm^{-1}$ ..... 83

Şekil 7. 2. n-propanol hareketli fazında sisteme enjekte edilen 3 HA standardı pikinin bir arada gösterilişi ..... 84

Şekil 7. 3. DTPA molekülü ..... 85

Şekil 7. 4 Sitrat/Fosfat tamponu hareketli fazında sisteme enjekte edilen 3 HA standardı pikinin bir arada gösterilişi ..... 86

Şekil 7. 5. DTPA çözeltisi hareketli fazında sisteme enjekte edilen 3 HA standardı pikinin bir arada gösterilişi ..... 87

Şekil 7. 6. Sistem bağlantılarının değişiminin pikler üzerindeki etkisi: (a) Eski sistemle elde edilen HA pikleri (iç çapı: 0,50 mm), (b) yeni sistemle elde edilen HA pikleri (iç çapı: 0,18mm) ..... 88

Şekil 7. 7. Enjektör yıkanmadan yapılan analizlerden elde edilen 3 HA standardın sisteme verilmesiyle elde edilen 9 pik alanının bir arada gösterimi ..... 90

Şekil 7. 8. Enjektör yıkanarak yapılan analizlerden elde edilen 3 HA standardın sisteme verilmesiyle elde edilen 9 pik alanının bir arada gösterimi ..... 90

Şekil 7. 9. 410, 450 ve 550 nm dalga boylarında HA standartlarının verdiği pik alanları ..... 91

Şekil 7. 10. Akış hızı, pH ve sıcaklık faktörlerinin cevap değerine olan tesirlerini gösteren normal dağılım grafiği ..... 95

Şekil 7. 11. Değişen akış hızı ve pH değerlerinde $R^2$'de meydana gelen değişimi gösteren 3 boyutlu yüzey grafiği ..... 96

Şekil 7. 12. Değişen pH ve sıcaklık değerlerinde $R^2$'de meydana gelen değişimi gösteren 3 boyutlu yüzey grafiği ..... 97

Şekil 7. 13. Değişen akış hızı ve sıcaklık değerlerinde $R^2$'de meydana gelen değişimi gösteren 3 boyutlu yüzey grafiği ..... 98

Şekil 7. 14. Sıcaklık ve numune hacmi faktörlerinin cevap değerine olan tesirlerini gösteren normal dağılım grafiği ..... 102

Şekil 7. 15. Şekil 7.10.'da verilmiş olan normal dağılım grafiğinin skalasında çizilen numune hacmi ve sıcaklık faktörlerinin normal dağılım grafiği..... 102

Şekil 7. 16. Değişen sıcaklık ve numune hacmi değerlerinde $R^2$'de meydana gelen değişimi gösteren 3 boyutlu yüzey grafiği..... 103

Şekil 7. 17. Farklı konsantrasyonlarda DTPA içeren DTPA çözeltileriyle yapılan analizlerin sonuçları..... 104

Şekil 7. 18. $NH_3/NH_4Cl$ pH: 9,24; saf su pH: 8 ve DTPA hareketli fazları ile FIA sistemine enjekte edilen 62,5; 125 ve 250 mg/L'lik HA standartlarının pik alanlarının karşılaştırılması 105

Şekil 7. 19. Saf su pH: 8 hareketli fazı ile FIA sistemine enjekte edilen 0-2000 mg/L'lik HA standartlarının kalibrasyon grafiği ..... 106

Şekil 7. 20. $NH_3/NH_4Cl$ pH: 9,24 hareketli fazı ile FIA sistemine enjekte edilen 0-2000 mg/L'lik HA standartlarının kalibrasyon grafiği ..... 106

Şekil 7. 21. $NH_3/NH_4Cl$ pH: 9,24 ve saf su pH: 8 hareketli fazları ile FIA sistemine enjekte edilen 0-2000 mg/L'lik HA standartlarının pik alanlarının karşılaştırılması ..... 106

Şekil 7. 22. Parametreleri optimize edilmiş FIA sistemi ile enjeksiyonu yapılan 125 – 2000 mg/L aralığındaki hümik asit standartlarının sırasıyla küçükten büyüğe pikleri ..... 108

Şekil 7. 23. FIA metoduyla elde edilen kalibrasyon grafiği..... 113

Şekil 7. 24. Spektrofotometrik metotla elde edilen kalibrasyon grafiği..... 113

# ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Başlıca kullanılan doğal hümik asit kaynakları ..... 6

Çizelge 2. 2. Bazı biyokimyasal atıklardaki hümik asit miktarları (Unsal, ve ark., 2001) ..... 14

Çizelge 5. 1. Normal dağılım grafiği verileri ..... 32

Çizelge 5. 2. Hümik maddelerin izolasyonu için kullanılan ekstraksiyon metotları (Shirshova ve ark., 2006) ..... 38

Çizelge 5. 3. Bazı biyolojik atıklardan elde edilen hümik asit yüzdeleri (Unsal ve ark., 2001) . 41

Çizelge 6. 1. Kullanılan cihazlar ve modelleri ..... 45

Çizelge 6. 2. Akış enjeksiyon analizlerinde kullanılan HPLC sistemini oluşturan birimler ..... 46

Çizelge 6. 3. Optimizasyonu yapılacak olan FIA sisteminin parametreleri ve kodlanmış seviye değerleri ..... 57

Çizelge 6. 4. İlk üç parametre için seçilen seviye kodları ve değerleri ..... 59

Çizelge 6. 5. İlk üç parametre için seçilen deneysel tasarım ve her bir deneyde parametrelerin sahip olduğu seviye kodları (Brereton, 1997) ..... 59

Çizelge 6. 6. Değiştirilmiş analiz sıraları ve kodları ..... 60

Çizelge 6. 7. Sıcaklık ve numune hacmi parametreleri için seçilen seviye kodları ve değerleri 61

Çizelge 6. 8. Sıcaklık ve numune hacmi parametreleri için seçilen deneysel tasarım ve her bir deneyde parametrelerin sahip olduğu seviye kodları (Brereton, 1997)..... 61

Çizelge 6. 9. Değiştirilmiş analiz sıraları ve kodları ..... 62

Çizelge 7. 1. Numunelerin nem içerikleri ..... 65

Çizelge 7. 2. Uygulanmış olan ekstraksiyon metotları ve bu metotlarla leonardit numunesinden elde edilen hümik madde miktarlarının değişimi ..... 73

Çizelge 7. 3. Biyokimyasal numunelerin hümik madde miktarları..... 80

Çizelge 7. 4. Hümik asit FTIR spektrumunun bant titreşim bölgeleri (Tatzber ve ark., 2007)... 82

Çizelge 7. 5. Kısmi deneysel tasarımın ilk bölümünde analizleri yapılan değişkenlerin seviye değerleri ve elde edilen cevap değerleri ..... 93

Çizelge 7. 6. Normal dağılım grafiği verileri ..... 94

Çizelge 7. 7. Kısmi deneysel tasarımın ikinci bölümünde analizleri yapılan değişkenlerin seviye değerleri ve elde edilen cevap değerleri ..... 100

Çizelge 7. 8. Normal dağılım grafiği verileri ..... 101

Çizelge 7. 9. İki hareketli faz çözeltisiyle yapılan analizlere ait kalibrasyon grafiklerinin farklı HA konsantrasyonu bölgelerine ait $R^2$ değerleri (Aynı aralıkta daha büyük olan $R^2$ değeri koyu yazılmıştır) ..... 107

Çizelge 7. 10. FIA metodunun istatistiksel parametreleri ..... 111

Çizelge 7. 11. FIA metodunun LOD ve LOQ değerleri ..... 111

Çizelge 7. 12. FIA ve spektrofotometrik metot kullanılarak 62,5 mg/L HA standardı için gerçekleştirilen analizlerden hesaplanan değerler ..... 114

Çizelge 7. 13. P: 0,05 ihtimaliyet seviyesi için kritik $T_d$ değerleri ..... 114

Çizelge 7. 14. P: 0,05 ihtimaliyet seviyesi için iki yanlı $F_R$ değerleri ..... 115

# SİMGELER VE KISALTMALAR

## Simgeler

- $x_i$ : Ölçülen değer
- $X_t$ : Gerçek değer, kabul edilen değer
- $\overline{x}$ : Ortalama değer
- $\sum$ : Toplam
- **CV** : Varyasyon katsayısı
- $E_r$ : Bağıl hata
- **N** : Ölçüm sayısı
- **P** : Olasılık fonksiyonu
- **R** : Tekrar yapılabilirlik
- $s^2$ : Varyans
- **w** : Yayılma
- S : Standart sapma

## Kısaltmalar

- **A** : Absorbans
- **FIA** : Akış enjeksiyon analiz
- **LOD** : Tayin limiti
- **LOQ** : Ölçüm limiti
- **mAU** : Mili absorbans unit
- **HA** : Hümik asit
- **HM** : Hümik madde
- **RSD** : Bağıl standart sapma

# 1 GİRİŞ

Sentetik kimyasal girdilerin kullanımındaki artış ve çevre kirliliği; doğal dengenin bozulmasının yanında besin zincirleriyle tüm canlılara ulaşan hayati bir tehlike yaratmaya başlamıştır. Bunun sonucu olarak, başta gelir düzeyi yüksek ülkelerde olmak üzere birçok ülkede üretici ve tüketiciler örgütlenerek insanlarda toksik etki yapmayan, doğayı tahrip etmeyen yöntemlerle üretilen tarımsal ürünleri tercih etmeye başlamışlardır. Bu amaçla, insana ve çevreye dost üretim sistemlerini içeren; kimyasal gübre ve ilaçların kullanımını yasaklayan; organik gübreleme ile ekim nöbeti uygulamayı, parazit ve yırtıcılar gibi doğal kaynaklardan yararlanmayı tavsiye eden ve üretimde ürünün kalitesinin yükselmesini amaçlayan bir üretim şekli olan organik tarım ortaya konmuştur. Yukarıda saydığımız yararlı etkilerinden dolayı, doğal bir kaynak olan hümik asitler de organik tarımda geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Bu gün hümik asitler birçok bilim adamı ve ziraat mühendisi tarafından toprak verimini arttırmada ve sağlıklı bitki yetiştirmede en önemli madde olarak kabul edilmektedir.

Hümik asitler çoğunlukla, yüzyıllardan beri süregelen doğal toprak ekosisteminin çok yönlü ve önemli bileşenlerindendir. Hümik asitler, dünyanın yüzeyinde süregelen biyosentez organik ürünlerini, bir yaklaşıma göre de yaşayan tüm organizmalardaki organik karbonu yayıcı bir vasıta olarak geniş bir kullanım alanı bulmuşlardır. Organik maddenin yoğunlaşmış ve ekonomik bir formu olan hümik asitler, topraktaki humus tüketiminin sebebi olan geleneksel gübreleme metotlarının yerini alabilecek bir şekilde toprak yapısını desteklerler. Toprağa hümik asitlerin ilavesi, mineral besleyicilerin tek başına etkisinin ötesinde bitkilerin büyümesini uyarabilir. Hümik asitler tüm dünyada, özellikle düşük miktarda organik madde içeren topraklarda, tarımsal topraklardaki yararlarından dolayı yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Hümik asitler, besleyici maddelerin ve karbonun küresel döngüsünde önemli bir rol oynadığı için ekosistemin ayrılmaz bir parçasıdır.

Ülkemizde senede 15 milyon ton civarında atık açığa çıkmaktadır. Bu atıkların ise yaklaşık 80 bin tonu yakma veya depolama yoluyla bertaraf edilebilmektedir. Bu yolla atıkların bertaraf edilme oranının çok düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca yakma ve depolama esnasında ortaya çıkan maliyetler de aşikârdır. Bu sebeple atıklar elden geldiğince geri dönüşüm alanında değerlendirilmelidir. Bu sayede hem atık oranı

azaltılabilecek hem de zararlı atıklar geri dönüşüm ile faydalı ürünlere dönüştürülerek ülke ekonomisine katkı sağlanabilecektir.

Yüksek organik madde içeriğine sahip çeşitli biyolojik atıklar ve kaynaklar bir hümik asit kaynağı olarak değerlendirilebilmektedir. Son yıllarda biyolojik atıkların bu büyük avantajı anlaşıldığı halde; çok sayıdaki biyolojik atıkların hangisinin hümik madde yapımı için uygun olduğu, ekstraktların nasıl kullanılacağı, aktif bileşenlerinin ne olduğu ve standardizasyon konularında birçok bilgiye ihtiyaç vardır. Bu nedenle bu konudaki yeni çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

Tüm hümik asit kaynaklarında da olduğu gibi biyolojik kaynakların da bir hümik asit kaynağı olarak değerlendirilmesinde en önemli parametrelerden biri kaynağın hümik asit miktarıdır. Bu sebeple bu kaynaklardan hümik asit elde edilmesinde ve elde edilen hümik asitlerin tarımda kullanıma uygun ürünler haline getirilmesinde hümik asit miktarının tayini büyük bir öneme sahiptir. Ayrıca, gittikçe büyüyen bir pazar payına sahip olan bu ürünleri kullanan tüketicilerin haklarını korumak amacıyla, bu ürünlerde yapılacak kalite ve kontrol analizlerinde hümik asitlerin miktarı, tayini ve tespiti için kesin ve güvenilir bir metoda ihtiyaç duyulmaktadır. Çünkü tüketiciler tarafından rağbet gören her üründe olduğu gibi, içinde bulunduğumuz zaman diliminde de büyük öneme sahip olmaya başlayan hümik asit tabanlı organik tarım ürünleri değişik isimler ve markalarla tüketiciye ulaştırılmaktadır.

Bu tezin amacı; yüksek verime sahip bir hümik madde ekstraksiyon metodu oluşturmak, bazı biyolojik kaynakların ihtiva ettiği hümik madde miktarlarını incelemek ve çevre yönetimi açısından atıkların değerlendirilebilmesiyle ülke ekonomisine katkı sağlayabilmektedir. Çeşitli kaynaklardan hümik asit üretiminde en önemli parametrelerden biri olan kaynağın hümik asit içeriğinin tespitinde ve tüketicilerin kullanımına uygun hale getirilen hümik asit tabanlı organik ürünlerin kalite kontrol analizlerinde kullanılmak amacıyla akış enjeksiyon analiz (FIA) sistemleri kullanılarak kemometrik yaklaşımlarla yüksek kesinliğe, tekrarlanabilirliliğe ve duyarlılığa sahip bir hümik asit tayin metodu oluşturmaktır.

# 2 HÜMİK MADDELER

Hümik maddeler, başlıca karboksil ve fenolik olmak üzere çeşitli asidik fonksiyonel grupları içeren kompleks ve çok fonksiyonlu makro moleküllerdir (Janos ve ark., 2008; Perdue, 1985; Jones ve ark., 1998). Hümik maddeler, doğal organik materyallerin parçalanma ürünlerinin kompleks heterojen karışımlarıdır (Szabo, 2004; Tombcaz ve ark., 2001). Hümik maddeler toprak organik maddesinin büyük bir hacmini oluşturmaktadır ve amorf, siyah renkli, kısmen aromatik, genelde hidrofilik, kimyasal olarak kompleks, birkaç yüzden birkaç bine doğru değerler alan moleküler ağırlığa sahip polielektrolit tipi materyaller olarak karakterize edilmişlerdir (Szabo, 2004). Hümik maddeler topraktaki, çökeltilerdeki, yüzey ve yer altı sularındaki doğal organik materyalin önemli bileşenleridir (Szabo, 2004).

Hümik maddeler organik ve inorganik kirleticilerin çözünmesinde ve taşınmasında tanındığından dolayı çevresel öneme sahiptir (Szabo, 2004). Hümik asitlerin asidik fonksiyonel grupları bazı organik kirleticilerin toprakta yok edilmesi yoluyla ekinlerin onları alabilmesine ve çevrede taşınmasına yardım ettiği kadar metal iyonlarıyla yaptığı etkileşimlerde de önemli bir rol oynamaktadırlar (Janos ve ark., 2008).

Hümik maddelerin sınıflandırılması, alkali ve asidik ortamlardaki çözünürlük farkına göre 3 ana sınıfta temellendirilmiştir (Szabo, 2004; Stevenson, 1982).

- Hümik asitler (hümik asitler, hümik maddelerin sulu alkali çözeltilerde çözünebilen fakat alkali ekstraktın asidifikasyonunda koagüleşebilen fraksiyonudurlar)

- Fülvik asitler (fülvik asitler, hümik maddelerin hem alkali hem de asitli çözeltilerde çözünebilen fraksiyonudur)

- Hümin (hümik maddelerin katı örneklerinden sulu, baz ya da asit çözeltileriyle ekstrakte edilemeyen fraksiyonudur)

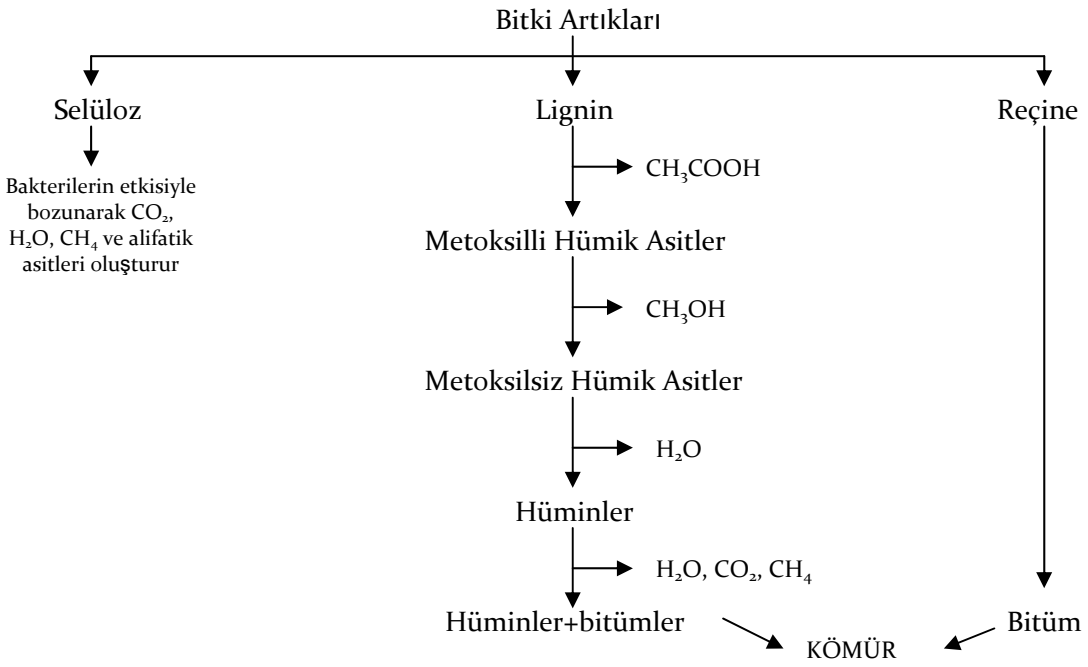
Hümik ve fülvik asit, su ekosistemindeki ve topraktaki organik karbonun baskın formundan sorumludur ve çevredeki koloidal ve iyonik türlerin, organik kirleticilerin ve besleyici maddelerin birikmesinde, çevrilmesinde ve taşınmasında aktif olarak bu rolünü sürdürmektedir (Bratskaya ve ark., 2008). Hümik asit çözelti kimyasının karakteristik yapısı, hümik maddelerin hümifikasyonunun orjini ve ekolojik şartlarına bağlı olarak geniş bir aralıkta olan moleküler ağırlık dağılımının ve fonksiyonel gruplarının yüksek heterojenetikliğiyle tanımlanmaktadır. (Bratskaya ve ark., 2008; Stevenson, 1982).

Hümik asitler, topraktaki parçalanma sürecinin çeşitli kısımlarında organik materyal, hayvan ve bitki kalıntılarının bir karışımıdır. Topraktaki organik maddeler, kimyasal ve biyolojik olarak mikroorganizmaların ve küçük hayvanların aktiviteleri sonucu oluşan parçalanma ürünlerinden sentezlenmektedir (Ribeiro ve ark., 2001).

20. yüzyılda Hayes (1985) ve Levinsky (2005) bitkileri büyütmede hümik asit eklenmiş mineral besleyici çözeltilerin kullanılmasının, besleyici çözeltileri kendi başına kullanmaktan daha ucuz olduğunu ispat etmişlerdir (Mema, 2006). Öte yandan hümik maddeleri içeren ürünler ekonomik ve ekolojik olarak artan ekin besleyicilerine dostça çözümleri ve geleneksel gübrelerin kullanımının azalmasına neden olmuştur (Mema, 2006).

## 2.1 Hümik Maddelerin Oluşumu ve Kaynakları

Fischer ve Schrader'in teorilerine lignin teorisi ismi verilir ve bu teoriye göre hümik maddelerin ve sonrasında nihai ürün olan kömürün meydana gelişi **Şekil 2.1.**'de gösterilmiştir.




**Şekil 2. 1.** Lignin teorisine göre hümik maddelerin meydana gelişi

Hümik asitleri, doğada bulundukları kaynaklara göre iki alt sınıfta incelemek mümkündür:

- Toprak kaynaklı hümik asitler
- Su kaynaklı hümik asitler

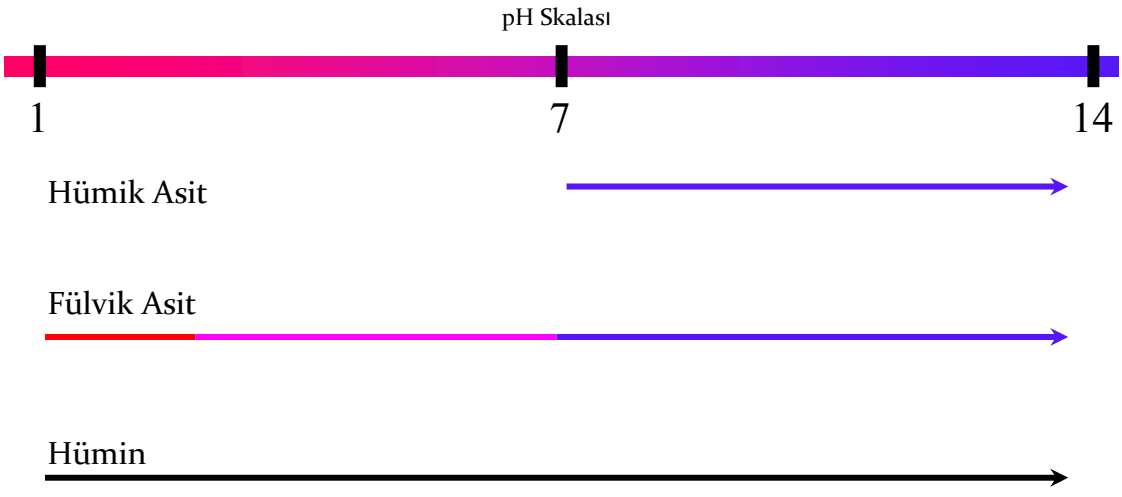
Toprak kaynaklı hümik asitler, yapı itibariyle oldukça aromatik bir yapıya sahiptir. Yani; benzen ve fenole benzeyen birçok bileşen birbirlerine karmaşık olarak kondanse olmuştur. Su kaynaklı hümik asitlerde ise, aromatik yapılar bulunmakla birlikte, toprak kaynaklı hümik asitlerdeki kadar fazla değildir. Su kaynaklı hümik asitlerin yapılarında alifatik gruplar oldukça fazladır. Hümik asitler çeşitli doğal kaynaklardan elde edilebilirse de, "linyit" ve "leonardit" en yaygın hümik asit kaynakları olarak bilinmektedir (Kutluca, 2007). Başlıca doğal hümik asit kaynakları ve hümik asit yüzdeleri **Çizelge 2.1.**'de verilmiştir.

**Çizelge 2. 1.** Başlıca kullanılan doğal hümik asit kaynakları

| Kaynak | Hümik asit yüzdesi (w/w) |
|---|---|
| Taş kömürü | 0-1 |
| Toprak | 1-5 |
| Hayvan gübresi | 5-15 |
| Linyit katmanları | 10-30 |
| Torf | 10-30 |
| Deniz yosunu | 20-40 |
| Leonardit | 40-90 |

## 2.2 Hümik Maddelerin Sınıflandırılması

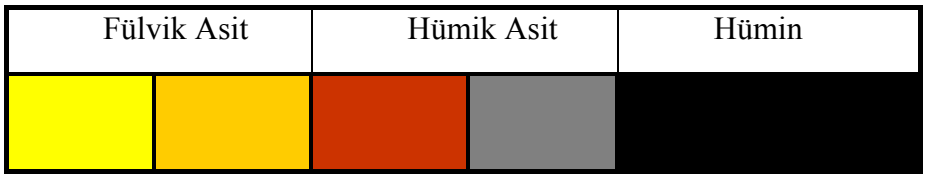
Hümik maddeleri incelemek, kompleks yapıları nedeniyle oldukça zor olmaktadır. Kimyacılar ve biyokimyacılar tarafından geliştirilen neredeyse tüm ayırma teknikleri hümik maddelere de uygulanmıştır. Ayırma amaçlı bu girişimlerin çoğu, numunenin heterojenlik derecesini azaltmıştır, ancak "saf hümik madde" olarak tanımlanabilecek bir materyal izole edilememiştir (Kutluca, 2007). Tüm bu dezavantajlara rağmen hümik maddeleri farklı pH değerlerine sahip ortamlardaki çözünme yeteneklerine göre üç ana fraksiyonda sınıflandırmak mümkündür. Bunlar tüm pH değerlerinde çözünme yeteneğine sahip olan fülvik asit, sadece alkali pH değerlerinde çözünebilen hümik asit ve iki pH bölgesinde de çözünme özelliği göstermeyen hümindir (**Şekil 2.2.** ve **Şekil 2.3.**).




**Şekil 2. 2.** Hümik maddelerin farklı pH değerlerindeki çözünme kabiliyetlerine göre sınıflandırılması

Hümik asit, hümik maddelerin sadece bazik pH'ya sahip ortamlarda çözünebildiği, asidik pH değerlerinde çözünemediği fraksiyonudur.

Fülvik asit, hümik maddelerin tüm pH değerlerinde çözünme yeteneğine sahip fraksiyonudur ve hümik madde içerisinde, başlıca fenolik ve karboksilik formda bulunan oksijen miktarının büyük kısmından sorumludur. Üç ana fraksiyon içerisinde en yüksek çözünürlük ve iyon değiştirme kapasitesine sahip iken en düşük ortalama molekül ağırlığına ve en düşük karbon miktarına sahip bileşendir.




**Şekil 2. 3.** Hümik maddeleri oluşturan üç ana fraksiyonun renk tonları

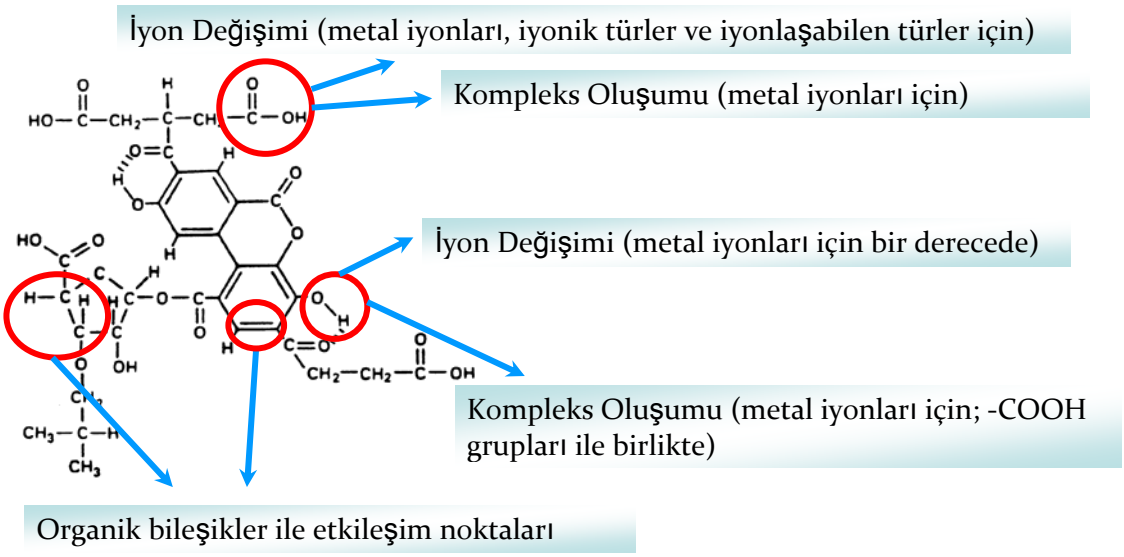
Hümin, hümik maddelerin, asidik ve bazik her iki pH bölgesinde de çözünme özelliği göstermeyen fraksiyonudur. Üç ana fraksiyon içerisinde en düşük çözünürlük ve iyon değiştirme kapasitesine sahip iken en yüksek ortalama molekül ağırlığına ve en yüksek karbon miktarına sahip bileşendir.

### 2.2.1 Hümik asit ve fülvik asit arasındaki farklar

Yukarıda da değinildiği gibi bitki kalıntıları çürüdükleri zaman fülvik ve hümik asitlerin her ikisi de oluşur. Her iki asitte toprak ve topraktaki mikro organizmalar için yaralıdır. Fülvik asit hümik aside göre daha küçük bir moleküler yapıya sahiptir. Bunun sonucu olarak kalıcılığı daha azdır ve daha kolay parçalanır. Ancak yaprak uygulamalarında bitkiye giriş hızı daha yüksektir. Hümik asit ise toprakta uzun süre kalır ve zaman içerisinde yavaş parçalanır. Genel olarak topraktaki organik madde miktarını arttırmada uzun süreli etkilerinden dolayı hümik asitlerden faydalanılır.

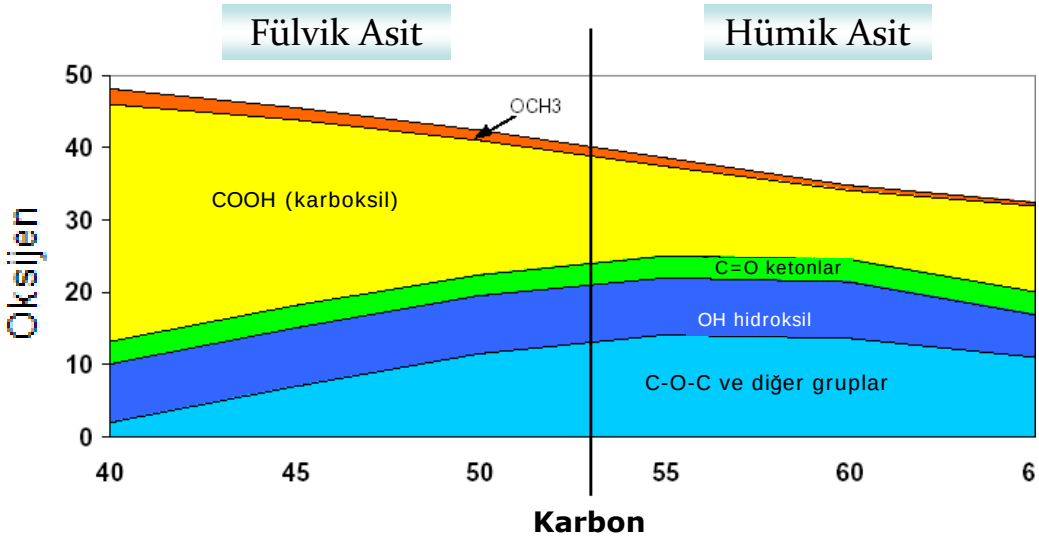
## 2.3 Hümik Asitlerin Yapısal Özellikleri ve Fonksiyonları

Hümik asitlerin yapılarında çok sayıda fonksiyonel grup bulunmaktadır. Bu grupların sayesinde diğer maddelerle etkileşebilme olanağına sahiplerdir. Yapılarındaki bu gruplarla hümik asitler diğer maddelerle aşağıdaki şekillerde etkileşebilirler (**Şekil 2.4.**):




**Şekil 2. 4.** Hümik asitlerin başlıca etkileşim bölgeleri ve fonksiyonları

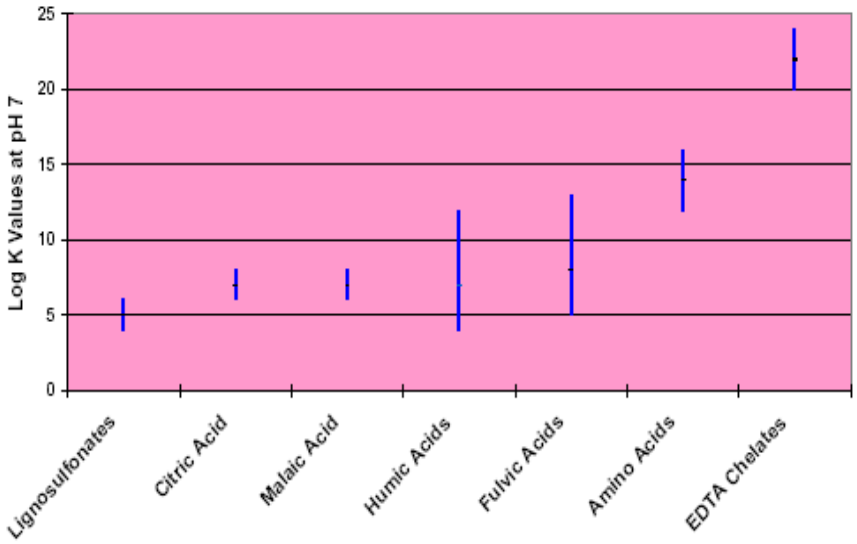
Hümik asitlerin ihtiva ettiği asidik karboksil grupları, metal iyonlarının elektrostatik olarak bağlanabileceği bölgelerdir. Bu işlemdeki başlıca yürütücü güç; elektorstatik etkileşmeler ve metal iyonlarının dehidratasyonudur. Karboksil grupları, hümik asit molekülündeki zayıf, orta ve kuvvetli olmak üzere iyon değiştirici bölgeleri teşkil etmektedir (**Şekil 2.5.**).




**Şekil 2. 5.** Fonksiyonel grup içeriği bakımından fülvik asit ve hümik asit

Metallerin hümik asitlere tutunabileceği bir diğer yol ise kompleks oluşumudur. Metaller, hümik asitlerin yapısında bulunan gruplarla o-fitalat da olduğu gibi iki COOH

grubu arasına ya da salisilatta olduğu gibi bir -COOH ve bir -OH grupları arasına bağlanabilirler. Metal iyonları bu bölgelere koordine kovalent bağlarla bağlanırlar. Yine metaller hümik asitlere karboksil ve fenolik hidroksil grupları arasında metal iyonunun şelatlaşması, bir karboksil grubuyla metal iyonunun kompleksleşmesi veya fenolik hidroksil ve fenolik eter grupları ile metal iyonunun kompleksleşmesi şeklinde de bağlanabilirler.

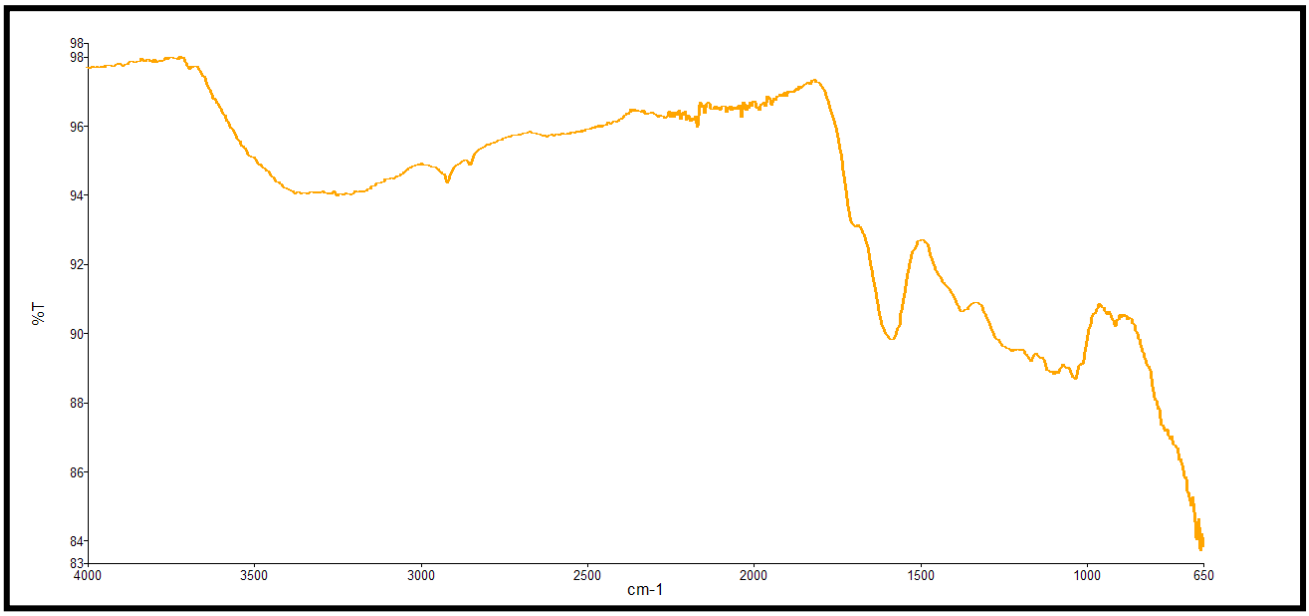



**Şekil 2. 6.** Cu (II) için pH=7'deki Log K Değerleri

**Şekil 2.6.**'da örnek olarak çeşitli ligantların Cu(II) ile kompleks oluşturma sabitleri verilmiştir. Görüldüğü gibi hümik ve fülvik asidin pKff değerlerinin orta seviyelerde olması, metal iyonlarının hem adsorpsiyonunu hem de desorpsiyonunu kolaylaştırırken geniş bir konsantrasyon aralığına sahip olması ise faklı metal iyonu konsantrasyonlarında bile aktif bir etkileşime olanak sağlamaktadır.

### 2.3.1 Hümik asitlerin FTIR titreşim bantlarının incelenmesi

Hümik maddelerin karakterizasyonunda nispeten ucuz ve basit olan FTIR (Forier Transformlu Infra Red) spektroskopisi yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Tatzber ve ark., 2007; Ellerbrock ve Kaiser, 2005; Kaiser ve Ellerbrock, 2005). FTIR spektroskopisinin avantajı, analiz edilen hümik maddedeki fonksiyonel gruplar hakkında doğrudan bilgi vermesidir (Tatzber ve ark., 2007) (**Şekil 2.7.**).




**Şekil 2. 7.** Hümik asit için örnek bir FTIR spektrumu

### 2.3.2 Hümik asitlerin kimyasal türlerle etkileşmesi

Doğal ortamda hümik asit ister çözünmüş, ister katı halde bulunsun, birçok kimyasal türün taşınımı ve bitkiler tarafından kullanımı üzerinde önemli etkilere sahiptir. Yapısında bulunan hidrofobik, hidrofilik ve iyonlaşabilen gruplar nedeniyle hümik asit, apolar, polar ve iyonik türlerle kompleksleşme, yük-transfer etkileşmeleri, hidrofobik etkileşmeler dipol-dipol etkileşmeleri, iyon-değişimi ve hidrojen bağı oluşumu gibi farklı mekanizmalar üzerinden etkileşebilir. Hümik asidin kimyasal türlerle etkileşme özellikleri ya hümik asidin çözünmüş halde bulunduğu bir çözelti ortamında veya hümik asidin katı halde bulunduğu katı-sıvı ara yüzeylerinde incelenebilmektedir.

Hümik asit ile etkileşme özellikleri en çok incelenen kimyasal türler hiç kuşkusuz metal iyonlarıdır. Moleküler yapısında, metal iyonlarının bağlanabileceği fonksiyonel gruplar içeren hümik asit, hem çözünmüş hem de katı halde metal iyonlarıyla farklı düzeylerde etkileşebilmektedir.

Hümik asidin metal iyonlarıyla etkileşmesinde en çok –COOH ve aromatik –OH grupları rol almaktadır. Makromoleküler yapıda fazla sayıda bulunan ve belirli bir dağılım sergilemeyen bu gruplar nedeniyle hümik asit geniş bir aralıkta değişebilen p*K*a değerleri sergiler. p*K*a değerlerinin geniş bir aralıkta olması, hümik asitlerin zayıf ve kuvvetli iyon değiştirici olarak davranabilmesine imkan tanır. Ayrıca; doğal

polielektrolitik yapısı da, yüklü parçacıklar etrafında çift katmanlı bir difüzyon tabakasının oluşmasını sağlar. Hümik asitteki kuvvetli asidik gruplar, aromatik halkaya fenolik –OH grubuna göre (genellikle) "orto" pozisyonunda bağlı olan karboksilatlardır. Bu karboksilatların kümelenmesi, elektrostatik alan etkisini doğurur ve bu etkinin sonucu olarak da, metal iyonlarının çok dişli mekanizmaya göre kuvvetle bağlanabileceği bölgeler oluşur. Kümelenmemiş karboksilatlar ile fenolik –OH grupları ise daha zayıf asidik gruplar olarak davranır. O halde; hümik asitlerde metal iyonlarıyla kompleks oluşturabilecek üç gruptan söz etmek mümkündür (Gezici, 2010):

**a)** Kümelenmiş karboksilat grupları (kuvvetli asidik bölgeler)
**b)** Kümelenmemiş karboksilat grupları (zayıf asidik bölgeler)
**c)** Fenolik ve alifatik –OH grupları (daha zayıf asidik bölgeler).

Metal iyonları hümik asitteki bu fonksiyonel gruplarla iyon değişimi ve kompleks oluşumu mekanizmaları üzerinden etkileşebilir. Bu iki mekanizmadan hangisinin daha etkili olduğu ortam şartlarına, hümik asidin yapısal özelliklerine ve metal iyonunun kimyasına ve çözeltideki konsantrasyonuna bağlı olarak değişir. Bununla birlikte; her iki mekanizmada da en büyük rolü karboksil gruplarının oynadığı söylenebilir. İyon değişimine göre daha kuvvetli bir etkileşme olan kompleks oluşum mekanizması için aşağıdaki etkileşme tiplerinden söz edilebilir.

Hümik asidin metal iyonlarıyla etkileşmesinde, yapıdaki fonksiyonel gruplar kadar, molekül büyüklüğü de etkilidir. Yapılan bazı spektroskopik çalışmalar, hümik asidin molekül büyüklüğünün artmasıyla, metal iyonlarının hümik aside bağlanma sabitinin de arttığını göstermiştir. Aslında, moleküler yapının büyümesiyle yapıdaki karboksil grubu sayısının azalması ve dolayısıyla metal iyonlarının hümik asitle daha zayıf etkileşmeye girmesi beklenirdi. Bu beklenmeyen durum, molekül büyüklüğüne bağlı olarak hümik asit fraksiyonlarındaki fonksiyonel gruplardaki farklılaşmalar ve hümik asit fraksiyonlarının üç boyutlu yapılarındaki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir.

Sudaki ve topraktaki organik maddelerin taşınımı, biyolojik olarak faydalı olabilirliği ve akıbeti, suda ve toprakta bulunan hümik madde içeriğine bağlıdır. Hümik asitlerin karmaşık moleküler yapısı ve heterojenliği nedeniyle organik türler ile etkileşme özelliklerini detaylı bir şekilde belirlemek zordur. Bununla birlikte; hümik maddelerin organik kirleticiler ile etkileşmesinde, hümik maddenin yapısal özelliklerinin etkili olduğu bilinmektedir. Hümik maddedeki O/C ve H/C oranlarındaki

farklılaşmaların bir sonucu olarak, organik kirleticilerin hümik maddeler ile etkileşmesinde rol alan mekanizmalarda farklılaşmaların gözlenebileceği belirtilmiştir. Örneğin; hümik maddedeki O/C oranının azalması ve H/O oranının artmasıyla pirenin hümik maddelere bağlanmasında rol alan mekanizma "dağılma"dan "adsorpsiyon"a doğru kaymaktadır. Hümik asitle poliaromatik hidrokarbonlar arasındaki etkileşmelerin ise büyük oranda yük transferi ve hidrofobik etkileşmelere dayandığı bildirilmiştir (Gezici, 2010).

Hümik maddelerin su saflaştırma proseslerinde, suyun koku, tat ve renk şiddetlerinin artmasına neden olduğu da bilinmektedir. Ayrıca; suyun dezenfeksiyonu amacıyla kullanılan klorlama işlemi sırasında hümik asidin trihalometan oluşumunda rol aldığı bildirilmiştir.

Hümik asit, yapısında bulunan kinhidron grupları aracılığıyla serbest radikaller oluşturabilmekte ve bu nedenle redoks tepkimelerine yatkın bir özellik sergilemektedir. Ayrıca; yeryüzü sularında bulunan hümik asitlerin, ışığın etkisiyle fotolize uğradığı ve mikromolar düzeyinde $H_2O_2$ açığa çıkardığı bildirilmiştir (Gezici, 2010).

### 2.3.3 Katı/sabit faz olarak hümik asitler

Hümik asidin sulu ortamda metal iyonlarını tutabilme ve tutulan iyonları düşük pH'larda bırakabilme özelliği, metal iyonlarının giderimi ve geri kazanımı amacıyla yapılacak işlemlerde faydalı bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır. Fakat; hümik madde kaynaklarından alkali ekstraksiyonu yoluyla elde edilen hümik ve fulvik asitler, pH>3 olan bütün sulu çözeltilerde az veya çok çözünürler ve bu özellik, doğrudan katı/sabit faz olarak kullanılmalarına önemli bir kısıtlama getirmektedir.

Hümik asidin katı/sabit faz olarak kullanımı ile ilgili bir diğer kısıtlama ise, katı hümik asidin parçacık ebadının makul bir şekilde ayarlanamaması ve katı partiküllerin çözelti ortamından kolayca ayrılamamasıdır. Ayrıca; katı hümik asidin kolonlara doldurulmasında da bir takım güçlüklerle karşılaşılmaktadır.

Sonuç olarak; hümik asidin katı/sabit faz olarak kullanılmasını kısıtlayan iki ana nedenden söz edilebilir:

a) Hümik asidin çözünebilme özelliği
b) Hümik asit partiküllerinin parçacık ebadının kolayca ayarlanamaması

Hümik asidin düşük çözünme özelliği sergileyen ve uygun parçacık ebadına sahip bir şekle dönüştürülmesi amacıyla literatürde kullanılan metotlardan en bilinenleri *çözünürsüzleştirme* (insolubilization) ve *immobilizasyondur*.

Çözünürsüzleştirmede, katı hümik asit 330 $^{o}$C'ta 1.0 saat süreyle ısıl işleme tâbi tutulur ve ısının etkisiyle yapıda meydana gelen bazı değişikliklerin bir sonucu olarak düşük çözünme özelliği sergileyen bir şekle dönüştürülür. Çözünürsüzleştirme işlemiyle elde edilen materyalin en büyük dezavantajı, partikül ebadının makul bir şekilde ayarlanamaması, elde edilen katı partiküllerin süspansiyonlarından kolayca ayrılamaması ve kolon şartlarında yürütülecek işlemlerde kolonlara kolayca doldurulamamasıdır.

İmmobilizasyonda ise, hümik asit, uygun bir katı destek maddesine fiziksel ve/veya kimyasal etkileşmelerle tutturulur. Katı destek maddesi olarak genellikle yüzeyi uygun fonksiyonel gruplarla modifiye edilmiş silika ve bazı polimerik maddeler kullanılmaktadır. Yapısal özelliklerinin iyi bir şekilde kontrol edilebilmesi, sergilediği yüksek mekanik dayanım ve kimyasal kararlılık nedeniyle silika, kromatografik işlemlerde tercih edilen bir katı destek maddesidir (Gezici, 2010).

## 2.4 Biyokimyasal Kaynaklardaki Hümik Madde İçeriği

Son günlerde gündeme gelen diğer bir kaynak ise hümik madde içeriği öne çıkan biyokimyasal kaynaklardır. Artan atık üretimi sebebiyle geri dönüşüm günümüzde büyük bir öneme sahip olmaya başlamıştır. Bu amaçla bazı biyokimyasal atıkların hümik asit kaynağı olup olamayacağı son günlerde geniş bir araştırma konusu haline gelmiştir. Bu atıklardan elde edilen hümik maddelerin kimyasal özellikleri ve oranları elde edildikleri kaynağa göre değişmektedir (Unsal ve ark., 2001). Bazı biyokimyasal atıklardaki hümik madde miktarları **Çizelge 2.2.**'de verilmiştir.

**Çizelge 2. 2.** Bazı biyokimyasal atıklardaki hümik asit miktarları (Unsal, ve ark., 2001)

| Kaynak | Hümik asit yüzdesi (w/w) |
|---|---|
| Atık su arıtma çamuru | 11 |
| Bira atık su arıtma çamuru | 13 |
| Ham çay atığı | 17 |
| Tütün tozu | 8 |
| Kompost cibre | 19 |
| Kompost ağaç kabuğu | 31 |

## 2.5 Hümik Asitlerin Kullanım Alanları

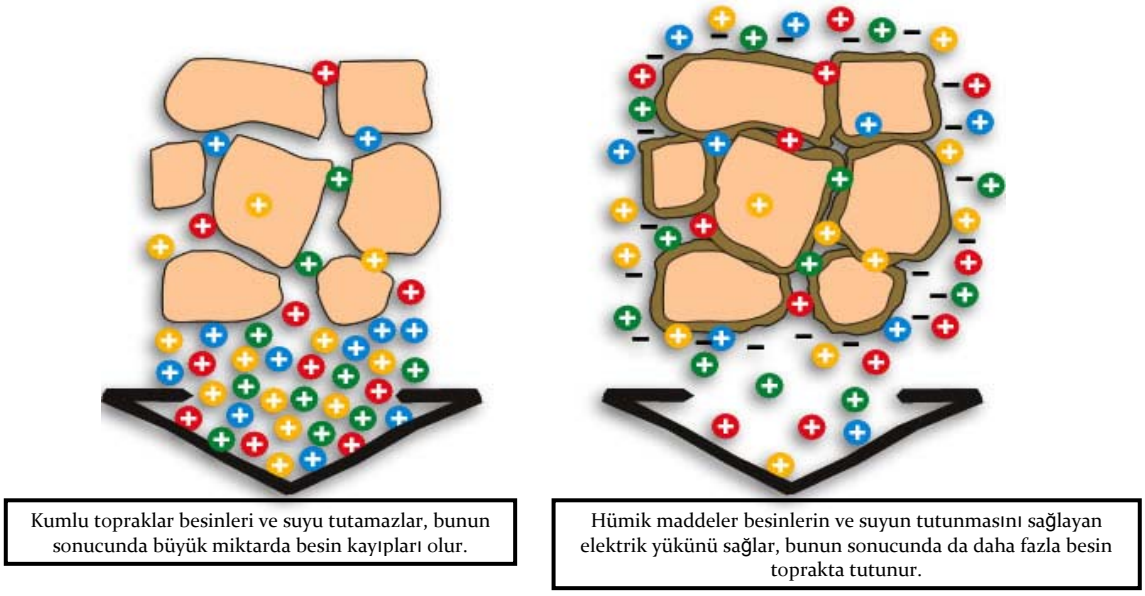
Hümik asitler, sentetik gübrelere alternatif olarak geniş bir kullanım alanı bulmaktadırlar. Toprak yapısını düzenlemek, bitki gelişimini biyolojik yönden desteklemek ve dolayısıyla ülke ekonomisine katkıda bulunabilmek için yaygın olarak kullanılmaktadırlar.

### 2.5.1 Toprak yapısını düzenlemede hümik asitler

Tüm kumlu toprakların çok aralıklı bir yapısı vardır. Aralıklı yapı ve kolay drenaj besinlerin toprak içinde aşağı doğru ilerlemesini sağlar. Bu durum üretici için ekonomik kayıplara neden olur. Verimli topraklar organik madde miktarı bakımından zengindir. Organik maddeler yani hümatlar, toprağın besin maddelerini tutmasını ve bitkinin bunlardan daha rahat faydalanmasını sağlar. Hümat moleküllerinin etrafı negatif yüklüdür ve uygulanan gübrelerdeki besin maddelerini tutabilme yeteneğine sahiptirler. Toprak organik maddesi olan hümik maddeler aynı zamanda su tutumunu da sağlamakta, kendi ağırlıklarının 20 katı fazla ağırlıktaki suyu tutabilmekte ve daha az su ile daha verimli bir sulama için zemin hazırlamaktadırlar (**Şekil 2.8.**).

Hümik maddeler sıkı yapıya sahip, su geçirmeyen, ağır ve killi topraklar için çok faydalıdır. Bu tipteki topraklar soğuk ve nemli hava koşullarında suyu tutar, sıcak havalarda ise büzülür ve küçülürler. Her iki koşul da bitki gelişimi için uygun değildir. Toprak kurumaya başladığı zaman su molekülleri kil parçalarının arasından uzaklaşır. Suyun bu hareketi kil parçalarının birbirlerine çok yaklaşmasına, hacimlerinin küçülmesine ve yüzeyde çatlamalara neden olur. Yüzeyde görülen çatlamalar organik

madde eksikliği olan killi toprakların ortak özelliğidir. Bu tip topraklara hümik madde eklenmesi toprak yapısını iyileştirmektedir. Hümik asit kil parçalarının arasına girerek kuru ve sıcak havalarda sıkı bir şekilde birleşmelerini ve yapışmalarını engellemektedirler. Büyük hümik asit molekülleri kil parçalarını ayrı ayrı tutabilmekte ve bunun sonucunda da su ve besin maddeleri kolaylıkla bu alanlara yerleşebilmektedir.




**Şekil 2. 8.** Hümik maddelerin besin ve suyla etkileşimleri

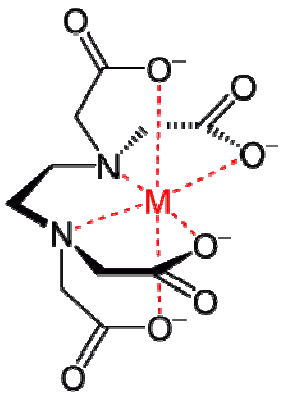
Hümik asitlerin toprak yapısını düzeltmede öne çıkan diğer özellikleri ise şöyle sıralanabilmektedir:

- Toprağın rengini koyulaştırarak daha fazla güneş enerjisinin emilmesini sağlar,
- Toprağın havalanma özelliğini arttırır,
- Uygun tohum yatağı şartları hazırlar,
- Toprak erozyonunu önler,
- Asidik ve bazik özelliklerdeki toprakları nötralize eder.

### 2.5.2 Bitki gelişimini biyolojik yönden desteklemede hümik asitler

Hümik maddeler birçok elementin bitki tarafından kolay alınabilir forma dönüşmesini sağlar. Hümik maddeler tarafından hümik asitlerin demiri alınabilir forma dönüştürmesinin bitkileri klorozdan koruyan bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir.

Ayrıca topraktaki demir kompleksinin bitkilerce alınabilecek hale gelmesine ve yapraklarda klorofil oluşumuna da yardımcı olduğu bilinmektedir (**Şekil 2.9.**).




**Şekil 2. 9.** Hümik maddelerin kompleksleşmesine örnek olarak Metal-EDTA kompleksi

# 3 EKSTRAKSİYON

Termodinamiğin ikinci kanunu, tüm doğal olayların evrenin entropisini arttıracak şekilde meydana geldiğini belirtir. Bu açıdan, "karışma" olayı kendiliğinden meydana gelen doğal bir işlem olup, bu işlem sonucunda entropi artmaktadır. Ayrılma ise, karışma olayının tersidir. Bu nedenle ayırma, aynı zamanda insanoğlunun entropiye karşı verdiği bir savaş olarak düşünülebilir.

Ayırma; istenen maddenin içinde bulunduğu karışımdan çevreye zarar verilmeksizin ekonomik bir şekilde saf olarak elde edilmesi için kullanılan yöntemlerin bütünüdür.

Ekstraksiyon, birbiri ile etkileşmeyen iki faz arasında madde transferi esasına dayanan bir ayırma ve saflaştırma yöntemidir. Günümüzde yaygın olarak kullanılan ekstraksiyon yöntemleri şu şekilde sınıflandırılabilir:

- Sıvı-sıvı ekstraksiyonu
- Sıvı-katı ekstraksiyonu
- Katı-sıvı (katı faz) ekstraksiyonu (SPE)

## 3.1 Sıvı – Sıvı Ekstraksiyon

Birbiri ile karışmayan iki sıvı arasındaki dağılma derecelerinin birbirinden önemli ölçüde farklı olması esasına dayanan bir ayırma ve saflaştırma metodudur. Sıvı - sıvı ekstraksiyonunda, büyük hacimde çözücü ile bir tek ekstraksiyon yerine çözücünün küçük hacimlerini birkaç defa kullanarak daha etkin bir ekstraksiyon yapılabilmektedir.

## 3.2 Sıvı – Katı Ekstraksiyonu

Katı fazda bulunan bir ya da daha fazla bileşenin farklı çözünürlük özellikleri kullanılarak sıvı faza alınması esasına dayanan ekstraksiyon yöntemidir. Bu yönteme en basit örnek olarak çayın demlenmesi verilebilir. Bu yükseklisans çalışmasında da hümik maddelerin kaynaklarından ekstraksiyonu bu yöntemle gerçekleştirilmiştir.

## 3.3 Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE)

SPE yöntemi, temel olarak yüzeyine organik grupların bağlı olduğu silika türevleri veya organik polimerik tutucu maddelerin (adsorban) ekstraksiyon kolon veya disklerine doldurulması ve sıvı numunelerin istenmeyen bileşenlerden ayırma (temizleme), yoğunlaştırma ve ileriki analiz aşamaları için örnek matriks yapısının değiştirilmesi amaçlarıyla hazırlanmış olan kolon ve disklerden geçirilmesi esasına dayanmaktadır. Katı faz ekstraksiyonu, günümüzde etkili bir numune hazırlama yöntemi olarak birçok laboratuarda kullanılmaktadır. Katı faz ekstraksiyon metodu, klasik sıvı-sıvı ekstraksiyon ile karşılaştırıldığında daha hızlı, az çözücüye ihtiyaç duyan, emülsiyon oluşumun şekillenmediği, çok daha ucuz bir tekniktir. Bunun yanında katı faz ekstraksiyonu ile daha temiz ekstrakt ve yüksek geri kazanım (recovery) oranları elde edilebilmektedir.

SPE metodunda kolondan geçirilme sırasında örnek molekülleri ile tutucu madde arasında kimyasal bir etkileşim meydana gelir. Bu etkileşimden faydalanarak maddelerin ayrılma işlemi başlıca üç yolla gerçekleştirilir. Birinci yöntemde ilk aşamada, analiz edilecek bileşik tutucu maddeye bağlanarak kolon içinde tutulurken, çözelti ve istenmeyen bileşenler bu madde ile herhangi bir etkileşime girmezler. Daha sonra istenmeyen bileşenler uygun yıkama çözeltisi ile uzaklaştırılır ve analiz edilecek bileşen tutucu maddeden uygun bir çözelti yardımıyla çözdürülerek alınmaktadır (Topkafa, 2006).

Katı faz ile sıvı fazın birbiriyle etkileştirilme tarzına göre 2 tür SPE yönteminden söz edilebilmektedir:

1) Kesikli Yöntem
2) Sürekli Yöntem

### 3.3.1 Kesikli yöntem

Bu yöntemde katı faz, sıvı numune ile aynı kap içerisinde iyice karıştırılır. Numunede bulunan maddelerin her iki faza karşı gösterdiği ilginin farklı olması, fazlar arasında madde transferini sağlayan temel etmendir. Maddelerin iki faz arasında dağılmasına (daha doğru bir ifadeyle “bulunmasına”) ilişkin denge oluşuncaya kadar

sıvı fazdan katı faza madde geçişi devam eder. Denge kurulunca, birim zamanda fazlar arasında aktarılan madde miktarları eşitlenmektedir.

### 3.3.2 Sürekli yöntem

Bu yöntemde; sıvı numune katı bir madde ile doldurulmuş bir kolondan akıtılır ve bu esnada sıvı fazdan katı faza doğru madde geçişi olur. Kolondaki katı faz ile etkileşen sıvı numune kolondan hareket ettikçe içerdiği madde miktarı giderek azalır. Bu yöntemde; sıvı fazın katı faz ile etkileşmesi genelde kısa sürdüğünden, katı faza madde transfer etmiş çözelti kısmı ile katı faz arasında madde geçişine ilişkin dengenin oluşması için yeterli süre yoktur. Sürekli yöntemdeki denge kesikli yöntemdekinden farklıdır. Çünkü kesikli yöntemde tekli bir denge söz konusu iken, sürekli yöntemdeki denge, çoklu bir dengedir. Bunun sebebi, çözünenlerin kolonda ilerlerken sürekli olarak yeni katı parçacıklar ile ve aynı şekilde katı parçacıkların da sürekli olarak yeni çözelti kısımları ile etkileşmesidir.

***SPE Metodunun Üstünlükleri***

- SPE metodu klasik sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemine göre 2/3 daha hızlı sonuç verir ve örnek hazırlama süresinin oldukça kısalmasını sağlamaktadır
- İstenen türün ayrılması sıvı-sıvı ekstraksiyon sistemlerine göre daha spesifiktir
- SPE ile analit, minimum veya hiç buharlaşma kaybı olmadan ekstrakte edilebilir
- SPE ile elde edilen sonuçların tekrarlanabilirliği daha yüksektir
- Çözücü ve örneklerin az miktarlarda kullanılmasından dolayı zehirli maddelerle temas daha azdır ve ayrıca daha az cam malzeme kullanılması nedeniyle analizi yapanlar için oldukça güvenli bir metottur. Ayrıca çevreyi kirletme riski daha düşüktür
- Sıvı-sıvı ekstraksiyonunda sıkça karşılaşılan emülsiyonun ayrılmaması problemi SPE'de yoktur
- Bu yöntemde daha az çözücü ve ayıraç madde kullanıldığından daha ekonomik bir örnek hazırlama yapılabilir (Topkafa, 2006).

# 4 AKIŞ ENJEKSİYON ANALİZLERİ (FIA)

Akış enjeksiyon analizi (FIA); akış esaslı teknikler kategorisinde yer alan dört teknikten biridir. Kategorideki diğer teknikler; hava bölmeli, sürekli akışlı ve sıralı enjeksiyonlu olmak üzere sıralanabilmektedir.

FIA, fizikokimyasal özellikleri ile doğrudan tayin edilebilecek analitlerin enstrümental analizleri için çeşitli olanaklar sunan, dolaylı olarak seçicilik ve duyarlılık geliştirilmesi gereken diyaliz, gaz difüzyon, sıvı-sıvı ekstraksiyon, damıtma, iyon değiştirme, çöktürme gibi kromatografik ayırma dışında yer alan tekniklerin uygulanması için bir yol olan, kimyasal reaksiyonlar içeren sürekli ayırma prosesleri için bir araç olan ya da ölçülen enstrüman içindeki reaksiyon ürünlerinin kimyasal reaksiyon gelişimini tanımlamada otomatik gelişim sağlayan bir araç olarak geliştirilmiştir (Ayyıldız, 2010).

## 4.1 Akış Enjeksiyon

Akış enjeksiyon analiz, geniş uygulaması olan tekniklerden biri olup, şimdiye kadar çok çeşitli aletlerle farklı amaçlar için kullanılmıştır. Sadece farklı aletlerle değil, aynı zamanda birçok ayırma ve zenginleştirme yöntemiyle de kombine edilerek kullanıldığı için FIA için sürekli değişen tanımlamalar yapılmıştır.

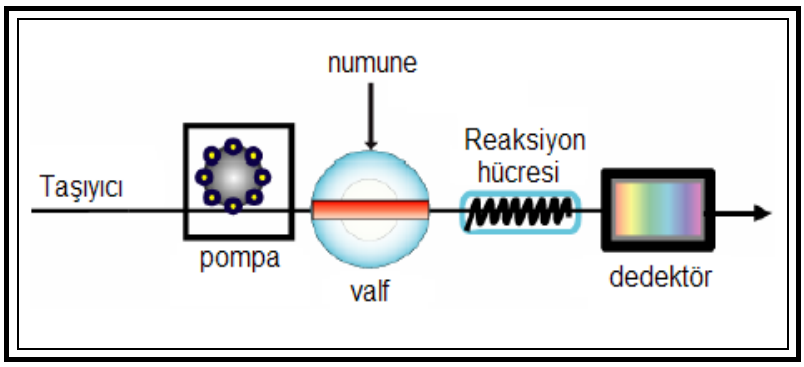
Akış enjeksiyon analiz (FIA) için ilk tanımlama Ruzicka (1981) tarafından yapılmıştır. Bu tanıma göre; FIA, uygun bir hareketli faz içine bir sıvı örneğinin enjeksiyonunu esas almaktadır (Ruzicka, 1975). Enjekte edilen numune, hareketli faz içinde bir bölge (zone) oluşturur ve bu bölge numunenin akış hücresi içinden geçmesinin bir sonucu olarak absorbans, elektrot potansiyeli veya herhangi diğer bir fiziksel parametre cinsinden sürekli kaydedilir. Enjeksiyon teriminin tekniğin adına dahil oluşu, tekniğin bir reaktif akışı içine bir septum aracılığıyla numune enjeksiyonunda bir şırınga kullanımını gerektirmesindendir. Şimdilerde bu amaç için yönlendirme valfleri kullanılmaktadır.

Bilindiği gibi klasik analitik kimyada kullanılan analiz ve ayırma yöntemleri dengeyi esas almaktadır. Örneğin; gravimetri çökelme dengesini esas alırken, ekstraksiyon dağılma dengesine dayanır. FIA, yüksek performanslı sıvı

kromatografisine (HPLC) çok benzemekle beraber, denge olayına dayanmaması bakımından HPLC`den ayrılmaktadır. Bunların yanı sıra; FIA çözme, reaksiyon oluşturma gibi kimyadaki temel işlemlerin yerini aldığı için bir çözelti hazırlama tekniği olarak da kullanılmaya başlanmıştır (Ayyıldız, 2010).

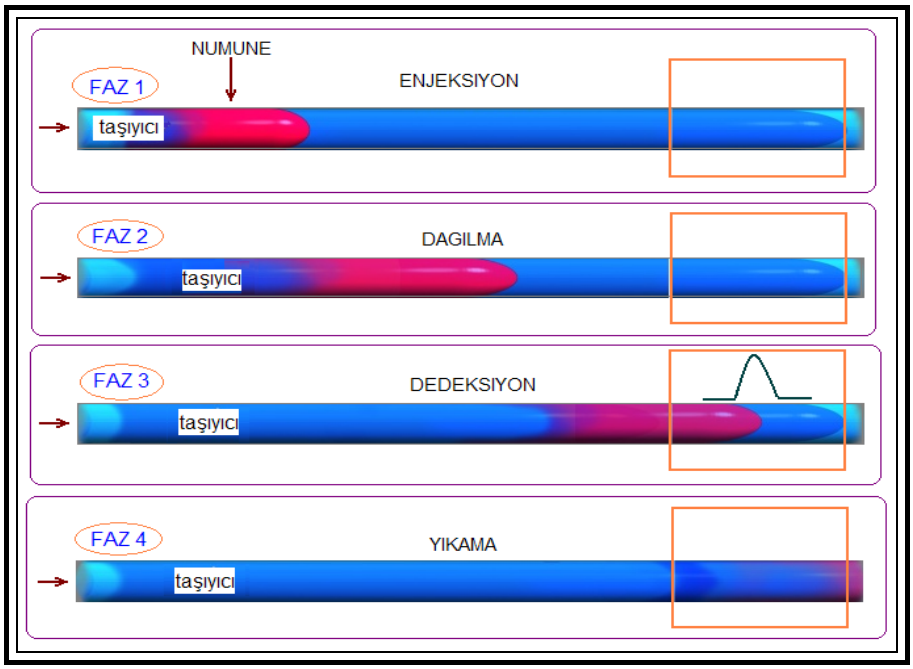
## 4.2 Akış Enjeksiyon Sistemlerinin Gelişimi

Basit bir akış analizörü; dar bir tüp aracılığıyla taşıyıcı faz akışını sağlamak için kullanılan bir pompa, bir enjeksiyon valfi, numune bölgesinin dağıldığı ve taşıyıcı fazın bileşenleri ile reaksiyona girdiği bir mikro reaktör ve oluşan türlerin kaydedildiği bir dedektörden oluşmaktadır. FIA tekniği, dedeksiyon anında hiçbir zaman fiziksel dengeye ulaşmaz (akış homojenizasyonu). Günümüzde kullanılan en basit akış enjeksiyon analiz sistemi ise **Şekil 4.1.**`de görülmektedir.



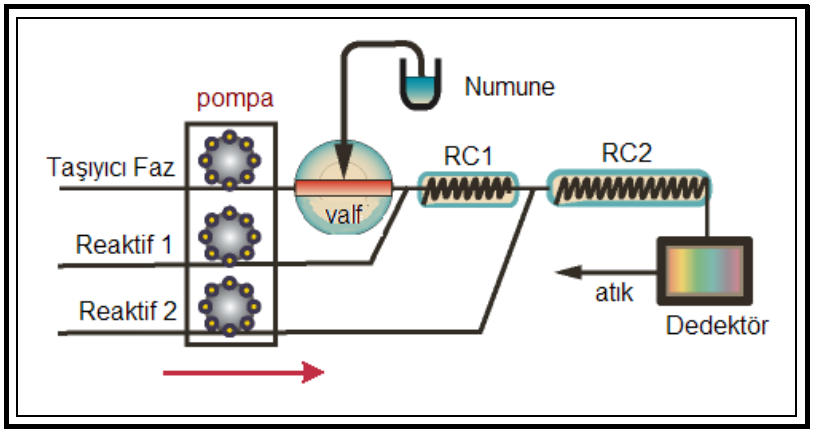

**Şekil 4. 1.** Akış enjeksiyon (FI) sistemi

Bu sistemlerde; (i) bir taşıyıcı sıvı içine numune enjekte edilir, (ii) numune akış yönünde ilerlerken, taşıyıcı faz içinde dağılır ve istenen ürün taşıyıcı faz-numune arasındaki ara yüzeyde oluşmaya başlar, (iii) oluşan ürün, taşıyıcı faz yardımıyla dedektöre iletilir, (iv) dedektör analitin içeriğine bağlı olarak değişimleri kaydeder (**Şekil 4.2.**).




**Şekil 4. 2.** Akış enjeksiyon (FI) sistemlerinin çalışma prensibinin şematik gösterimi

Eğer analitimiz dedektör tarafından dedekte edilebilir bir formda değilse; taşıyıcı faz yardımıyla ilerleyen numuneye reaktif ilavesi yapılarak istenilen reaksiyonun oluşması sağlanır (**Şekil 4.3.**).




**Şekil 4. 3.** Akış enjeksiyon (FI) sistemlerinde türevlendirme reaktifinin kullanımı

Bu durumda; (i) bir taşıyıcı içine numune enjekte edilir, (ii) numune akış yönünde ilerlerken ortama reaktif ilavesi yapılır ve istenen ürün reaktifle-numune arasındaki ara yüzeyde oluşmaya başlar, (iii) oluşan ürün hareketli faz yardımıyla dedektöre iletilir, (iv) dedektör analitin içeriğine bağlı olarak kolorimetrik absorbans ya da floresans gibi fiziksel parametre değişimlerini kaydeder.

## 4.3 FIA`ya Etki Eden Önemli Faktörler

Akış Enjeksiyon Analiz (FIA) kavramı beş faktörün bileşimine bağlıdır (Ayyıldız, 2010):

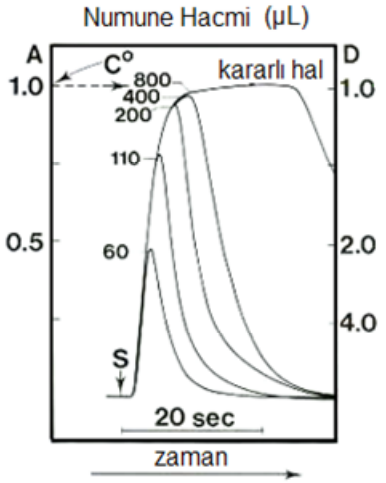
- Tekrarlanabilir numune enjeksiyon hacmi,
- Kontrol edilebilir numune dağılımı,
- Akış sistemi aracılığıyla enjekte edilen numunenin tekrar üretilebilir zamanlaması,
- Sistemin bağlantılarının çapı,
- Sıcaklık.

Bu işlemlerin kombinasyonuyla FIA`da kimyasal bir dengeye ulaşılmadan numunenin geçişindeki analite ait derişim değişimleri dedektörde sürekli gözlenebilen bir sinyal oluşturur.

### 4.3.1 Numune enjeksiyon hacmi

Akış enjeksiyon metodunu diğer metotlardan ayıran en önemli özelliklerinden biri numune enjeksiyonudur. Mikro seviyelerde numune enjeksiyonun yapıldığı FIA`da, elde edilen pik yüksekliğinin ve ölçümdeki hassaslığın artmasında numune hacmi oldukça etkili bir faktördür. **Şekil 4.4.**`te görüldüğü gibi enjeksiyon hacmi artırıldıkça, kararlı bir hal oluşmaya başlamış, bu da hassasiyetin artmasını sağlamıştır (Ruzicka and Hansen, 1998).

FIA`daki daha sonraki gelişmeler; numune enjeksiyonunun çok daha geniş bir çerçevede değerlendirilmesi gerektiğini ve FIA`nın temel konusunun; dengenin olmadığı şartlar altında analitiksel verilerin çıkarılması için başvurulan dağılım kontrolü olduğunu ortaya koymuştur (Ayyıldız, 2010).




- Enjeksiyon hacmi 60 µL olan bir sistemde absorbans A= **0,5** iken,
- 800 µL lik bir numune enjeksiyonunda absorbans A= **1**`e yükselmektedir.

Yani; numune hacmi arttıkça pik yüksekliği, dolayısıyla hassasiyet artmaktadır.

**Şekil 4. 4.** Akış enjeksiyon analizlerinde (FIA) numune hacminin etkisi

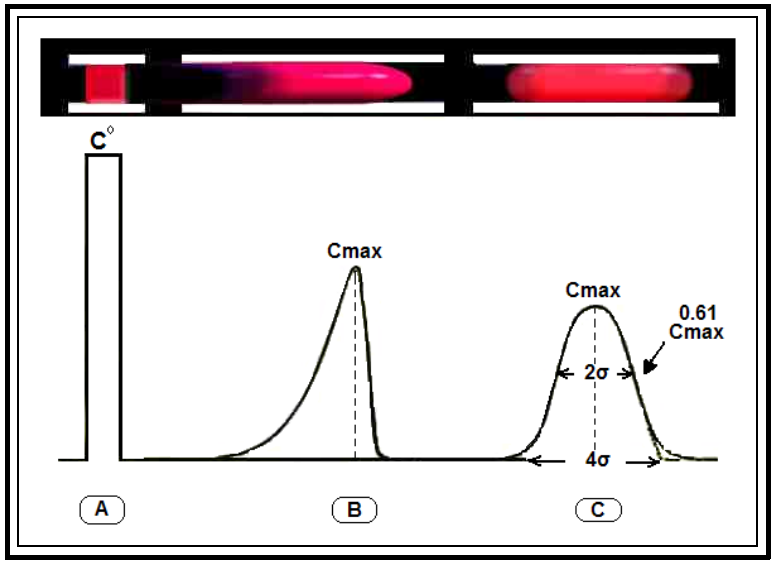
### 4.3.2 Numunenin kontrollü dağılımı

Akış enjeksiyon (FI) sistemlerinin en önemli yönü olan kontrollü dağılma, numune bandının taşıyıcı akış içinde taşınması sırasında meydana gelir. Sürekli bir akış içine gönderilen numune bölgesinin dedektöre taşınması boyunca meydana gelen dağılımın tekrarlanabilirliği, tüm FI sistemlerindeki en önemli fiziksel olgudur. Gerçekleştirilen bir analizi optimize etmek için, FI sisteminde ne kadar numunenin seyrelmiş olduğunu ve kimyasal reaksiyonların meydana gelmesi için gerekli zamanın ne kadar olduğunu bilmekte fayda vardır.

FIA`da dağılımın spesifik özellikleri, akış parametrelerinin ve akış kanallarının geometrik boyutlarının düzenlenmesi ile tekrar üretilebilir ve kontrol edilebilir olmasıdır. Taşıyıcı faz içine enjekte edilen bölgenin dağılımında aktif olan itici güçler moleküler difüzyon ve konveksiyondur. Fakat konveksiyon etkisi hakim olduğundan, moleküler difüzyon etkileri çoğu zaman ihmal edilebilir. Konveksiyon, hem kanalın radyal ekseni boyunca farklı noktalarda bulunan sıvı elemanların doğrusal akış hızlarındaki farklılıkların, hem de düz olmayan kanallar içinde akış yönüne dik merkezkaç kuvvetlerinin yarattığı ikincil akışın bir sonucu olarak meydana gelmektedir. Enjekte edilen bölgenin bir içbükey parabolik yüzü ve bir dışbükey parabolik kuyruk kenarı, taşındığı uzaklıkla artan bir ölçüde taşıyıcı faz içine nüfuz ederek gelişmektedir. Böylece, sabit bir kanalla spesifik şartlar altında gerçekleşen FIA`da, rol oynayan

kuvvetler iyi bir şekilde kontrol altındadır, bu sebeple rastgele türbülans hiç meydana gelmez. Konsantrasyon-zaman ilişkileri için mükemmel tekrarlanabilirliğe sahip olan sonuçlar üst üste kaydedildiği zaman tek bir eğri oluşturmak üzere diğerleri çakışır. Bu, hem fiziksel hem de kimyasal dengenin olmadığı durumlarda, tekrarlanabilir okumanın sağlanmasına temel oluşturur. FIA`nın tipik dağılım prosesi **Şekil 4.5**.'te görülmektedir. Sürekli bir akış içine enjekte edilen akım bölgesi, değişik derecelerde dağılım meydana getirmek için tekrarlanabilir bir şekilde uygulanabilir. Dağılmanın ölçüsünü belirleyen kantitatif bir kriter sağlamak için, dağılım katsayısı (D) terimi kullanılmakta ve enjekte edilen bölgenin dağılımdan önce ve sonra sıvı içinde meydana getirdiği konsantrasyonunun bir oranı olarak $D=C_0/C_{max}$ eşitliği ile tanımlanmaktadır (Ruzicka ve Hansen, 1998).

Burada; $C_o$ orijinal analit çözeltisinin taşıyıcı faz içine enjekte edildiği ve henüz dağılmanın gerçekleşmediği analit konsantrasyonudur. $C_{max}$ ise; enjekte edilen analit çözeltisinin taşıyıcı sistem içinde ilerlemesi sırasında meydana gelen, dağılma devam ettiği sürece konsantrasyonu devamlı surette artan ve pikin tepe noktasında da maksimum konsantrasyonuna ulaşan analit konsantrasyonudur. Yani; $C_o$ analitin başlangıç konsantrasyonunu, $C_{max}$ ise taşıyıcı faz içinde dağılan ve maksimum bir pik veren analit konsantrasyonunu göstermektedir.




**Şekil 4. 5.** Akış enjeksiyon (FI) sistemlerinde numunenin dağılımı (a) Dağılıma uğramayan numune bölgesi (Initial Concentration) (b) Dağılmaya uğramaya başlayan numune bölgesi (c) Dağılıma uğrayan numune bölgesi (Gauss Şekli)

Dağılma katsayısı; $C_0$ derişimi bilinen bir çözeltinin sisteme enjekte edilmesi ve daha sonra bu çözeltinin akış hücresi içindeki absorbansının ölçülmesi ile kolaylıkla hesaplanabilir. Numune hacmi, akış hızı, sistem bağlantılarını oluşturan borular (tubing) ve reaksiyon hücrelerinin iç çapları ve uzunlukları dağılımı etkileyen faktörlerdir:

| | | |
|---|---|---|
| Fazla numune hacmi | → | D= 1.0 (analit, taşıyıcı içinde dağılmaz) |
| Az numune hacmi | → | D > 1.0 (analit, taşıyıcı içinde dağılır) |
| Kısa borular | → | difüzyon için kısa zaman = az dağılım |
| Uzun borular | → | difüzyon için uzun zaman = çok dağılım |

Bir FIA sistemini oluşturan bileşenlerin geometrik boyutları ve yapılandırmaları dağılımı etkileyen önemli faktörlerdir. Numune bölgesinin dağılımı, açık dar bir tüp boyunca uzanan mesafenin karekökü ile artar. Bu kural sadece düz tüpler için geçerlidir. Tüpler, düzen oluşturmak için sarıldığı veya radyal karıştırma oluşturmak için düğümlendiği zaman, dağılım yoğunluğu sarmal ya da düğümün yarıçapına bağlı olarak farklı derecelerde azalmaktadır. Bu, radyal dağılımı destekleyen aksiyal dağılımı sınırlayan ikincil akışlardan kaynaklanmaktadır.

### 4.3.3 Sistem bağlantılarının çapı

Akış enjeksiyon yöntemlerinde temel prensip, enjekte edilen numunenin bant genişlemesine uğramadan detektörde okunmasıdır. Sistem bağlantılarının iç çapı küçüldükçe, azalan iç hacim sebebiyle ilerleyen hareketli fazın hızı artmaktadır. Artan bu hız piklerin daha erken çıkmasına, numunenin hareketli fazla daha az etkileşerek daha az bant genişlemesine uğramasına, simetrik ve keskin pikler elde edilmesine imkan vermektedir.

## 4.4 FIA`da Dedeksiyon

FIA kanallarının genel konumu on-line`dır ve sürekli bir modda gelişen adımlardan sonra oluşan türlerin uygun bir şekilde izlenmesi için bir dedektör sistemi önüne yerleştirilmiştir.

Bir akış enjeksiyon (FI) sistemi ve bir dedektör arasındaki ara yüzey, ticari ya da laboratuar yapımı bir akış hücresi iken, yüksek çözünürlüğe sahip dedektör için ara yüzey, tekrarlanabilirlik, doğruluk, duyarlılık ve seçicilik gibi analitiksel kalite parametreleri bağlantının nasıl gerçekleştiğine son derece bağlı olduğu için, birleştirilmiş bir sistemin performansı üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Bir akış enjeksiyon (FI) sistemi, amaca uygun bir dedektöre veya dedektör olarak kullanılabilen birçok cihazla birleştirilerek kullanılmaktadır (Ayyıldız, 2010).

## 4.5 FIA`nın Avantajları

FIA, kimyasal analizlerin basitleştirilmesinde oldukça başarılı olmuştur. Bu başarının başlıca sebepleri, geleneksel manuel teknikler üzerinde FIA`nın şu avantajlara sahip olmasıdır:

- Otomasyon nedeniyle düşük işçilik maliyeti,
- Basitlik ve düşük maliyetli enstrümantasyon,
- Fazla miktarda numunenin analizlenmesi için düşük analiz maliyeti,
- Yüksek numune verme hızı,
- Numune hazırlama ve dedeksiyonda otomasyon,
- Mekaniksel performans nedeniyle yüksek hassasiyet,
- Kesikli sistemlere kıyasla yüksek kesinlik,
- Daha az numune, reaktif tüketimi ve daha az atık üretimi,
- Hemen hemen tüm laboratuvarlarda kullanılabilen enstrümantasyon imkanı (Ruzicka ve Hansen, 2002).

## 4.6 FIA`nın Uygulamaları

Birçok analiz için düzenleme organları tarafından düzenlenen spesifik metodolojilerin yanı sıra, numunelerin farklı doğası FIA metotlarının çok yönlü olmasını gerektirmektedir. Şimdiye kadar FIA metodu kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde; FIA`nın endüstri (toprak, gübre, alaşım), klinik (serum,

plazma, tam kan, üre), çevre (deniz suyu, atık su, sedimentler), tarım (bitkiler), metalürji, jeoloji, gıda (meyve suyu, şarap, süt ve süt ürünleri), ilaç ve biyoteknoloji (proteinler, amino asitler, amonyak, glikoz) alanlarında birçok uygulaması olduğu görülmektedir (Ruzicka ve Hansen, 1975; Ruzicka ve Hansen, 1981; Fang ve ark. 1991).

FIA tekniğinin, rutin analizler için uygunluğunu ve basitliğini doğrulayan birçok çalışma yayınlanmıştır.

- Uygulamaların kalitesi oldukça kabul edilebilir bir düzeydedir.
- Uygulamaların çoğu inorganik analizlerle ve fotometrik dedeksiyonla ilgilidir.
- Yakın gelecekte, FIA metodu ile gerçekleştirilen analizlerin kontrol laboratuvarlarında çok daha büyük bir uygulama kazanacağı beklenmektedir.
- Bu alandaki eğilimler, özellikle su analizlerinde bir ya da iki bileşiğin izlenmesi amacıyla organik analiz odaklı olmalıdır.
- FIA tekniği, ilaç analizlerinde otomasyonun gelişimine ciddi katkıları olan çok yönlü bir enstrümantal araç haline gelmiştir.

# 5 KAYNAK ARAŞTIRMASI

## 5.1 Kemometri ve Faktöriyel Tasarım

Gün geçtikçe araştırma geliştirme giderlerini en düşük seviyede tutmak için, en az deneyle sonuca gitme ilkesine dayanan birçok deney tasarım modeli geliştirilmiş ve geniş uygulama alanı bulmuştur. Bilime katkıda bulunmak ya da günlük yaşantıda karşılaşılan bilgi eksikliğini gidermek amacıyla pek çok bilimsel araştırma yapılmaktadır. Yapılan araştırmalarda; ülke ekonomisi, kaynak, süre gibi faktörler göz önüne alındığında araştırmanın geniş çerçevede yapılabilmesinin zor olduğu ortaya çıkmıştır. Bu açıdan deney tasarımı zorunlu hale gelmiştir (Havuz, 2007).

Deneysel çalışmanın etkin bir şekilde yapılabilmesi için deneyleri planlarken bilimsel yaklaşımın kullanılması da gerekmektedir. İstatistiksel deney tasarımı ile analiz edilebilecek uygun verilerin toplanmasını sağlayacak deneylerin planlanması ve bu deneylerden geçerli sonuçlar çıkarılabilmesi amaçlanmaktadır. Burada asıl amaç, en az sayıda deneyle çok fazla sayıda doğru bilgi elde etmektir (Havuz, 2007).

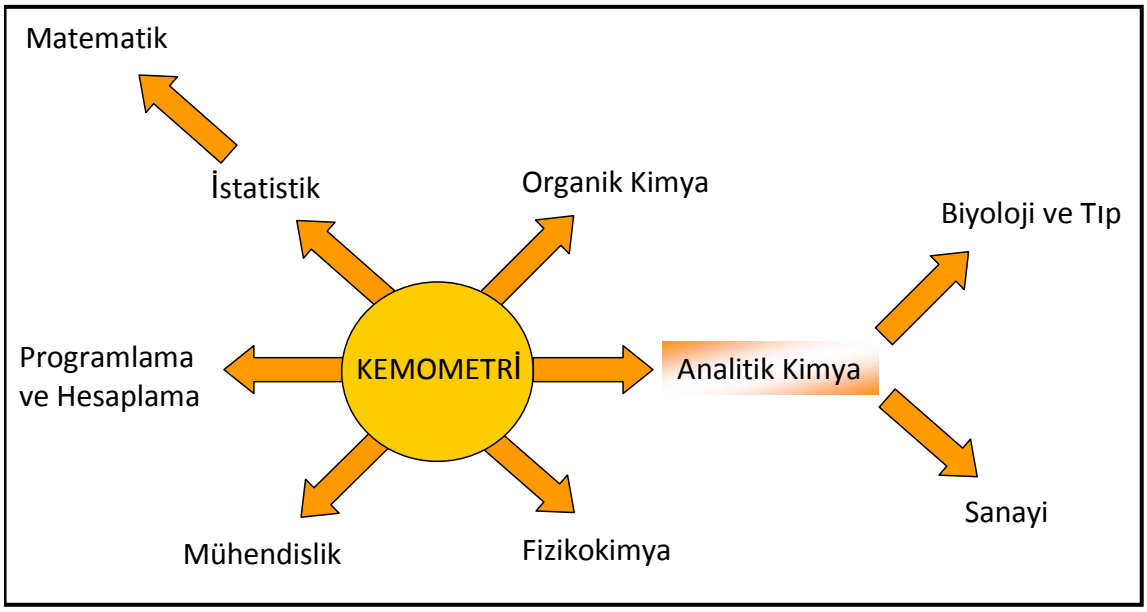
Günümüzde bilgisayar, yazılım, istatistik ve uygulamalı matematik alanlarındaki gelişmeler, kimya alanında, özellikle de analitik kimyada kompleks sistemlerin çözümü için kemometri adı verilen yeni bir disiplinin doğuşuna neden olmuştur. Bu gelişmeler, analitik kimya ve komşu branşlardaki araştırmacılara, analitik problemlerin çözümünde yeni olanaklar sağlayan çok boyutlu ve çok değişkenli parametrelerin kullanıldığı kemometrik yöntemlerle yeni çalışma alanları doğurmuştur. Kemometri, istatistik ve matematik ile birlikte bilgisayar kullanarak kimyasal verilerin işlenmesini kapsayan bir kimya disiplinidir. Kemometri, kimyasal analizlerde, kimyasal verilerden gerçek bilginin ektraksiyonunu veya saklı bilgilerin açığa çıkarılmasına olanak tanıyan güçlü bir araçtır. Kemometrinin temel uygulama alanlarından biri analitik kimyadır (Dinç, 2007).

Kemometri kelimesi ilk olarak 1970'li yılların ortalarında İsveçli organik kimyacı Svante Wold tarafından kullanılmaya başlanmış bir kelimedir. Bu kelime, bilgisayar teknolojisinin gelişmesi ile birlikte gündeme gelmeye başlayan ve İngilizcede "Computational chemistry" olarak adlandırılan ve bilgisayar destekli kimya olarak adlandırılabilen bilim dalındaki gelişmelerin sonucu ortaya çıkan bir kelimedir. Bu kelime İngilizcede kimya ve ölçme kelimelerinin bir araya gelmesinden meydana

gelmiştir ve kimyada uygulanan çeşitli ölçme ve değerlendirme işlemlerine bilimsel bir yaklaşımı ifade etmekte ve içermektedir (Morgan, 1991).

Bilgisayar desteğinin çok büyük olduğu bu konuda, bilgi edinmeye başlamanın en akıllıca yolu bu konu ile ilgili internet ortamındaki web sayfalarından yararlanmaktır. Yapılan ilk internet konferansının konusu bile kemometri olmuştur. Dünyada kemometri uygulamaları ile ilgili olarak çok sayıda makale çeşitli dergilerde yayınlanmıştır. Ancak 1980'li yılların sonunda Wiley's yayınevi tarafından "Journal of Chemometrics" ve Elsevier's yayınevi tarafından "Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems" isimli dergiler, sadece kemometri ile ilgili makaleleri yayınlamaya başlamışlardır (Morgan, 1991).

Kemometrik yöntemlerin en büyük kullanıcısı analitik kimyacılar olmakla birlikte, laboratuar ve analiz çalışması yapan diğer branşlarda da kullanıldığı yayınlanan eğitici notlardan ve yayınlanan bilimsel makalelerden gözlenmektedir. Kemometrinin farklı disiplinler ile ilişkileri **Şekil 5.1.**'de sunulmaktadır (Dinç, 2007).




**Şekil 5. 1** Kemometrinin ilişkili olduğu disiplinler (Dinç, 2007)

Yukarıdaki şekilden de görüldüğü gibi kemometrik çalışmalarda, analitik kimyacıların ve diğer ilgili disiplinlerin ihtiyaçları ölçüsünde uygulamalı matematik ve istatistik bilgisine sahip olmaları gerektiği açıktır. Burada programlama ve hesaplama çok önemlidir. Kemometrik uygulamaların çoğu kompleks hesaplamalar içermektedir. Bu hesaplamaları elle veya basit hesap makineleriyle gerçekleştirmek mümkün

olmadığı için bilgisayar programlarına ihtiyaç vardır. Kemometrik hesaplamalarda genellikle EXCEL, MATLAB ve diğer paket programlar kullanılmaktadır (Dinç, 2007).

Kemometri; analitik kimya, adli tıp, biyoloji, gıda kimyası, çevre kimyası, arkeoloji gibi alanlarda kullanılmaktadır. Fizikokimyacılar ve madde bilimcilerin, sinyal işleme ve çok değişkenli verilerin analizinde kemometrik yöntemleri uyguladıkları görülmektedir. Organik kimyacılar ve farmasötik kimyacılar, reaksiyon koşullarının optimizasyonunda deneysel tasarım ve ilaç tasarımında yapı etki ilişkisi çalışmalarında kemometriyi kullanmaktadırlar (Dinç, 2007).

### 5.1.1 Normal dağılım grafikleri

İstatistiksel dağılımlar, deneysel hataların bağımsız bir tahmini yapılmak istediğinde (örneğin, tekrarlı yapılan bir deneyin standart sapmasının tespitinde), deneysel hatalarla birlikte farz edilen etkilerin karşılaştırılmasında kullanılabilmektedir. Bu çeşit bir karşılaştırma serbestlik derecesi genellikle düşük olduğu için çok verimli olmamaktadır. Çünkü görselleştirme çalışmalarında deneylerin tekrar sayısının az olması güven seviyelerinin tespit edilememesi anlamına gelmektedir.

Deneysel hataların tespitinde kullanılan diğer bir metot normal dağılım grafiklerinin kullanılmasıdır. Bu grafiklerin kullanılması, normal dağılımdan önemli bir şekilde sapan etkiler varsa bunların hakkında bilgiler veren hızlı ve basit bir metottur (Lundstedt ve ark., 1998).

Normal dağılım kağıtları, etki değerine (X) karşı toplam ihtimaliyet (P) grafiğe geçirildiğinde, normal eğrinin düz bir çizgi oluşturmasına yardımcı olur. Herhangi bir anlamlı etki, bu doğrudan sapmalara yol açar. Bu şekilde normal dağılım grafikleri, modellerdeki değişken terimlerinden etkili olanların ve etkili olmayanların (artıkların) tespitinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu teknik özellikle çok sayıda faktör içeren deneylerin izlenmesi için özellikle uygundur. Burada aşılması gereken problem, bu değerleri uygun şekilde sıralanmış normal dağılım kağıdında yerine koymaktır. Elde edilen sonuçların bilgisayar ortamında değerlendirilmesi amacıyla grafikler excel ortamında da oluşturulabilmektedir.

İşlemler bir örnek üzerinde gösterilmek istenirse,

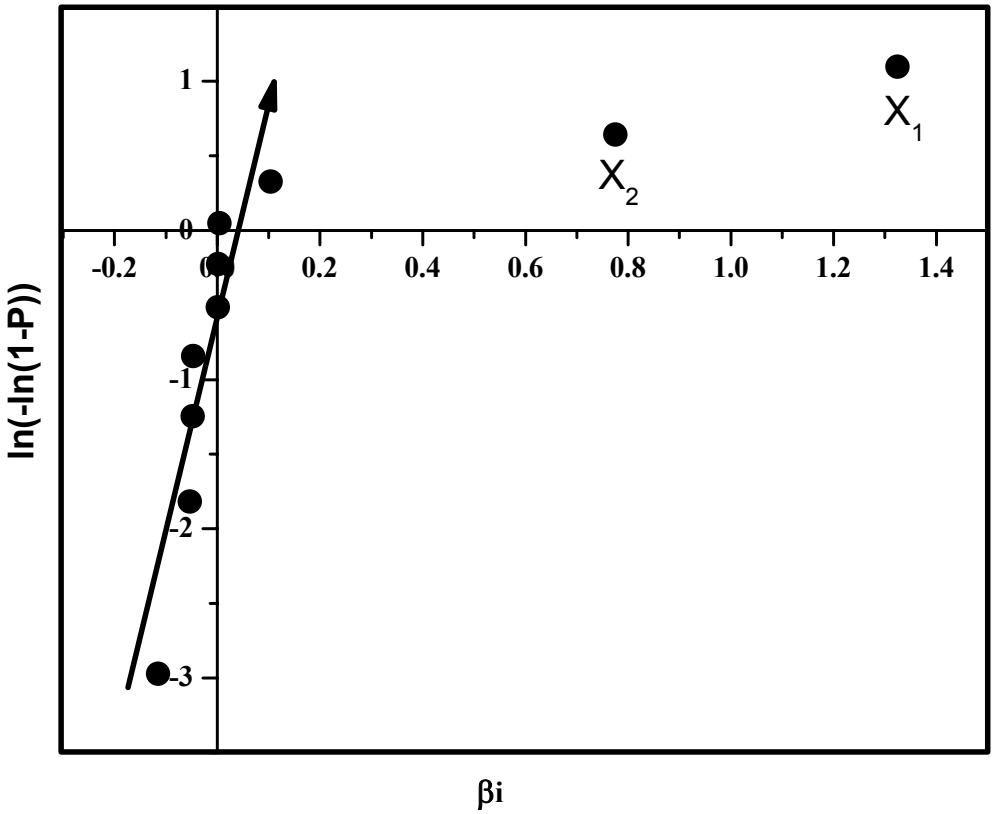
$$Y= -2.0810 + 1.3245X_1 + 0.7749X_2 – 0.0532X_3 + 0.1039X_1^2 – 0.0470X_2^2 + 0.0007X_3^2 – 0.1152X_1X_2 + 0.0020X_2X_3 – 0.0481X_1X_3 + 0.0044X_1X_2X_3 \quad (5.1)$$

Üç faktörden oluşan kuadratik bir modelde, **Eşitlik 5.1**'de de görüleceği gibi 10 tane etki olmaktadır. Bu etkilerin katsayıları ($\beta_i$) küçükten büyüğe sıralanıp aşağıdaki **Çizelge 5.1.** oluşturulmaktadır (Morgan, 1991):

**Çizelge 5. 1.** Normal dağılım grafiği verileri

| **Sıra** | **$\beta_i$** | **P** ((Sıra – 0.5)/10) | **ln[-ln(1-P)]** |
|---|---|---|---|
| 1 | -0.11523 | 0.05 | -2.9702 |
| 2 | -0.05324 | 0.15 | -1.81696 |
| 3 | -0.04806 | 0.25 | -1.2459 |
| 4 | -0.047 | 0.35 | -0.84215 |
| 5 | 0.000665 | 0.45 | -0.51444 |
| 6 | 0.001948 | 0.55 | -0.22501 |
| 7 | 0.004457 | 0.65 | 0.048621 |
| 8 | 0.103864 | 0.75 | 0.326634 |
| 9 | 0.774936 | 0.85 | 0.640337 |
| 10 | 1.324511 | 0.95 | 1.097189 |

Bu çizelgedeki verilerden $\beta_i$'ye karşılık ln[-ln(1-P)] değerleri bir grafiğe geçirilirse normal dağılım grafiği elde edilmiş olur (**Şekil 5.2.**).




**Şekil 5. 2.** Etkilerin normal dağılım grafiği

**Şekil 5.2.**'de görüleceği gibi $X_1$ ve $X_2$ etkileri normal dağılımdan sapma göstermiştir. Bu grafiğe göre 10 tane etkiden $X_1$ ve $X_2$'nin diğerlerine göre daha anlamlı bir etki sergiledikleri ve $X_1$ faktörünün en anlamlı etkiye sahip olduğu söylenebilmektedir.

### 5.1.2 Cevap yüzeyleri metodolojisi

Cevap yüzeyleri metodolojisi, bir diğer adıyla yüzey grafikleri (RSM) 1950'li yıllarda Box ve meslektaşları tarafından geliştirilmiştir. Bu terim matematiksel modellerin oluşturulmasından sonra meydana gelen grafiksel görüşten kaynaklanmıştır ve kullanımı kemometri üzerine yayınlanan makalelerde geniş yer bulmuştur. RSM, deneysel tasarımlardan elde edilen deneysel dataların deneysel modellere uydurulmasıyla temellendirilmiş matematiksel ve istatistiksel tekniklerin bir bileşimidir.

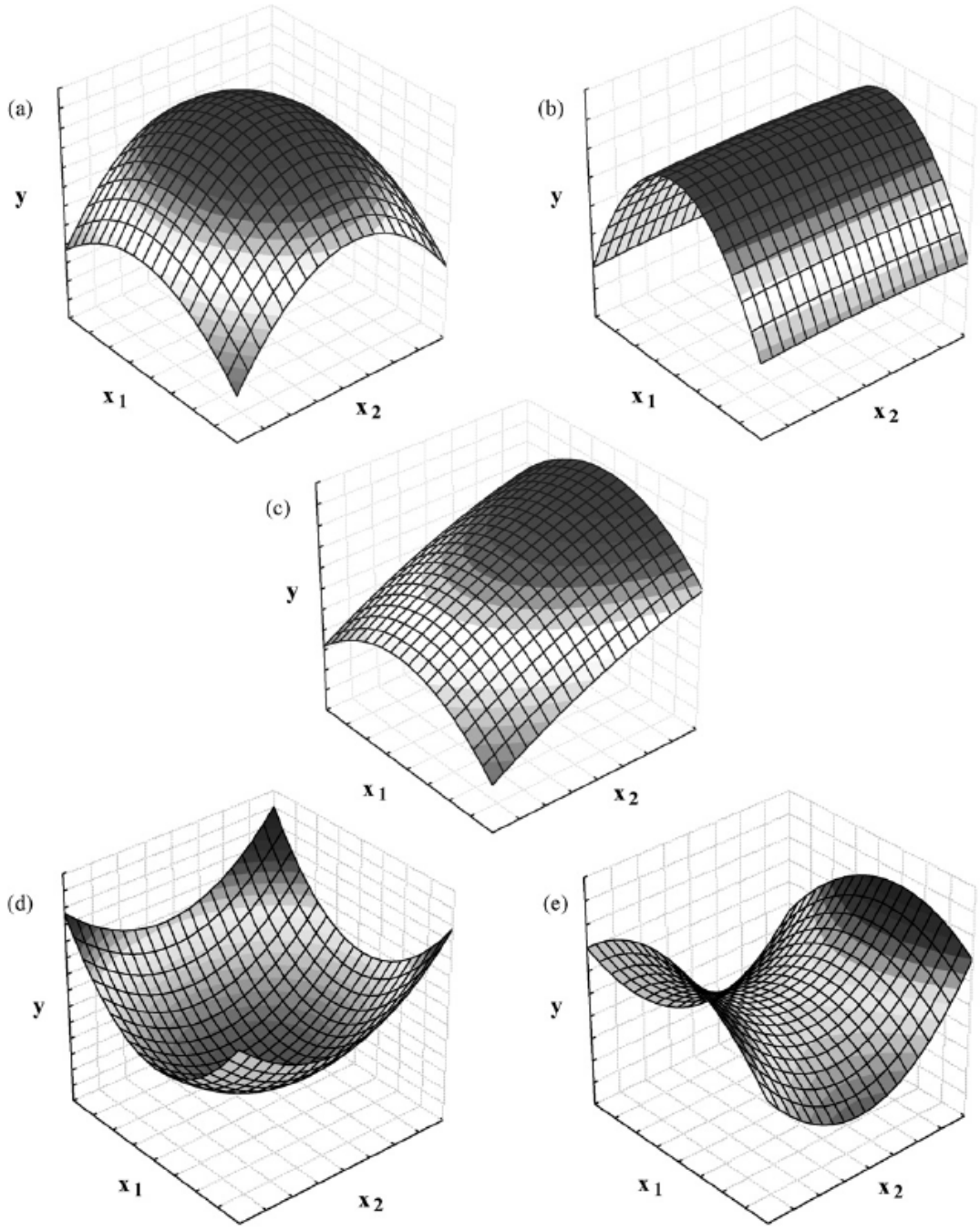
Lineer model ile meydana getirilmiş yüzeyler optimum şartları tespit etmek ve orijinal tasarımın hangi yöne doğru ilerleyeceğini göstermek için kullanılabilmektedir. Fakat deneysel alan fiziksel veya enstrümental sebeplerden dolayı yer değiştiremeyecekse araştırma görsel grafiklerle, çalışılan bu deneysel alandaki en iyi

şartları belirlemek durumundadır. İşte bu noktada RSM, bir diğer adıyla yüzey grafikleri kullanılmaktadır. RSM, optimum değerlerin noktasal tespiti için kullanılmaktadır. Ayrıca faklı deneysel değişkenler ve cevap değerleri arasındaki ilişkiyi grafiksel olarak görselleştirmek için iyi bir yöntemdir. Optimum noktaların bu metotla tespit edilebilmesi için polinomal fonksiyonun kuadratik terimleri içermesi gerekmektedir (Bezerra ve ark., 2008).

Kuadratik model için kritik nokta maksimum, minimum ya da ara seviyede olarak karakterize edilebilmektedir. Bu amaçla iki değişken için elde edilen kuadratik fonksiyon aşağıda verilmiştir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \qquad (5.2)$$

Öngörülen bu model eşitliğini görselleştirmek için yüzey grafikleri elde edilmelidir. Model eşitliklerinin bu şekilde görsel grafiklerle temsili, ($n$+1) boyutlu uzayda $n$ sayıda değişkenle gerçekleşmektedir. Bu sebeple de genellikle iki değişkene ait üç boyutlu yüzey grafikleri çizilmektedir ve eğer ikiden fazla değişken varsa yüzey grafiklerinin çizimi ancak fazla sayıda olan değişken değerlerinin $\beta_0$'a ilave edilmesiyle gerçekleşebilmektedir. Bu fonksiyonlarda $\beta_i$ değerleri değiştikçe $X_1$ ve $X_2$ değişkeni için elde edilen yüzey grafikleri de değişmektedir. İki değişkenli sistemlerin optimizasyonunda kullanılan bazı kuadratik yüzey grafikleri **Şekil 5.3.**'te verilmektedir (Bezerra ve ark., 2008).




**Şekil 5. 3.** İki değişkenli bir sistemin optimizasyonunda kullanılan kuadratik modelden elde edilen yüzey grafiklerinin bazı profilleri: (a) maksimum, (b) plato, (c) maksimum nokta deneysel alanın dışarısında, (d) minimum ve (e) eğri yüzey (Bezerra ve ark., 2008).

**Şekil 5.3. (a)**'da maksimum yüzeyin deneysel alan içersinde bulunduğu bir yüzey grafiği görülmektedir. **Şekil 5.3. (b)**'de ise çalışılan sisteme $X_2$ faktörünün bir etkisinin olmadığı fakat $X_1$ faktörünün oldukça etkili olduğu görülmektedir. **Şekil 5.3. (c)**'deki yüzey grafiğinde ise maksimum noktanın deneysel alan dışarısında olduğu ve mümkünse başlangıç tasarımının seviyelerinin değiştirilmesi gerektiği görülmektedir. **Şekil 5.3. (d)**'deki yüzey grafiği minimum noktayı göstermekte ve **Şekil 5.3. (e)**'deki

yüzey grafiği ise kritik noktayı göstermektedir. Kritik nokta, bağıl maksimum ve minimum nokta arasındaki bir kıvrılma noktasıdır. Eğer çalışılan sistemde amaç maksimum ya da minimum cevabı tespit etmekse, kritik nokta koordinatları optimum değer olarak kabul edilememektedir. Bu durumda optimum alanı tespit etmek için yüzey grafiği görsel olarak kontrol edilmekte ve buna göre karar verilmektedir (Bezerra ve ark., 2008).

### 5.1.3 Model eşitliği ve cevap değeri

Sistemlerin optimizasyonu için kullanılan ve etki-cevap ilişkisinin yorumlanmasına imkan tanıyan polinomal modeller 3 ana başlık altında incelenmektedir:

- Lineer model,
- İkinci derece etkileşim modeli ve
- Kuadratik model

En basit polinomal model sadece lineer terimleri ve değişkenlerle cevap değerleri arasındaki lineer ilişkiyi içermektedir. Bir lineer model, $X_1$, $X_2$ ve $X_3$ ile tanımlanmış üç değişkenle aşağıdaki gibi ifade edilebilmektedir:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 \quad (5.3)$$

Polinomal modellerin bir diğeri olan ikinci derece etkileşim modeli, sadece değişkenlerle cevap değerleri arasındaki etkileşimleri ifade etmemekte ayrıca değişkenlerin birbiri ile etkileşimlerini de ifade eden ilave terimleri içermektedir. Bu sebepten dolayı ikinci derece etkileşim modelleri aşağıdaki terimleri içermektedir :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (5.4)$$

Yukarıda verilen bu iki model başlıca sağlamlık, görselleştirme çalışmaları gibi deneysel sistemlerin araştırılması amacıyla kullanılmaktadır.

Optimum (maksimum ya da minimum) kuadratik terimleri elde edebilmek ve bunların görselleştirilmesi için bu terimlerin modelde verilmesi gerekmektedir. Değişkenlerle cevap değerleri arasındaki lineer olmayan etkileşimler, bu terimlerin

model içersinde verilmesiyle mümkün olabilmektedir. Bu sebeple bir kuadratik model aşağıdaki polinomal fonksiyon ile tanımlanmaktadır (Lundstedt ve ark., 1998):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3 \quad (5.5)$$

## 5.2 Hümik Maddelerin Ekstraksiyon Metotları

Hümik asitlerin yüksek bir verimle kaynağından izole edilmesi büyük bir önem arz etmektedir. Bu sebeple de hümik asitlerin izolasyonu için kullanılan ekstraktörler ve ekstraksiyon metotları üzerine birçok çalışma yapılmıştır.

Hümik asitlerin eldesi için en çok kullanılan metotlardan bir tanesi alkali ekstraksiyonu metodu olup, bu metodun verimliliği çeşitli yöntemlerle artırılabilmektedir. Yükseltgeme prosesi bu amaçla kullanılan uygun metotlardan bir tanesidir. Bu proses, hümik asit kaynağının yükseltgen bir madde ile belirli bir süre etkinleştirilip ardından alkali ekstraksiyonuna tabi tutulmasını kapsar. Böylece, alkali çözeltilerde çözünme özelliğini kaybetmiş hümik asitlere yeniden çözünme özelliği kazandırılabilmekte ve elde edilecek hümik asit miktarı artırılabilmektedir (Tarhan, 2010).

Farander, yaptığı deneyler sonucu, düşük derecelerdeki yükseltgemenin üç aşamada olduğunu bulmuştur. İlk aşamada tepkimeye giren oksijen, gaz ürünleri ile kömürün bünyesine giren miktar, eşit olarak bölünmektedir. İkinci aşamada, alkalide çözünen miktar hızla, suda çözünen miktar ise yavaş artmaktadır. Üçüncü aşamada suda çözünen miktar artmakta, buna karşılık alkalide çözünen miktar azalmaktadır. Maksimum hümik asit miktarı, ikinci aşamanın sonunda ortaya çıkmaktadır. Kömürün yükseltgemesi sırasında çıkan gaz ürünleri karbondioksit, karbonmonoksit ve sudur. Yükseltgeme sonucu ortaya çıkan ürünlere kömürün yapısı, külü, tane büyüklüğü, nem miktarı, kömürün içindeki yabancı maddeler ve sıcaklık etki etmektedir. Kömürün sıcaklık değeri düştükçe yükseltgemenin kolaylaştığı bilinmektedir. Yükseltgeme hızı, tane büyüklüğü küçüldükçe belli bir limite kadar artmaktadır (Özkan, 2007).

Kanada'da yapılan bir deneyde, kapalı sistemde sıcaklık 180-200 $^{o}$C ve oksijen oranı %10-90 arasında tutulup, 100 saat süreyle kuru yükseltgeme yapılmıştır.

İspanya'da, yükseltgeme sırasında oluşan kimyasal değişmeleri ve asidik, bazik ortamlarını belirtmek için yapılan bir deneyde sürecin sıcaklığı çok sınırlı tutulmasına rağmen bir sonuç elde etmek mümkün olmamıştır (Özkan, 2007).

Shirshova ve arkadaşları (2006), farklı ekstraksiyon prosedürleri ile elde edilen hümik asit fraksiyonlarının spektroskopik özelliklerinden faydalanarak ekstraksiyon prosedürlerinin birbirine olan üstünlüklerini araştırmıştır. Bu amaçla hümik madde kaynağı olarak seçtikleri bataklık toprağını, 3 protokolden oluşan 5 farklı ekstraksiyon metoduna tabi tutmuşlardır. Bu metotlar **Çizelge 5.2.**'de verilmiştir.

**Çizelge 5. 2.** Hümik maddelerin izolasyonu için kullanılan ekstraksiyon metotları (Shirshova ve ark., 2006)

| Protokol Numarası | İzolasyon Prosedürü Basamakları | |
|---|---|---|
| | Ön muamele | Ekstraksiyon |
| Protokol 1 (1.Ekstraksiyon metodu) | Benzen/metanol, 2:1 (V/V); 0,1 M HCl | 0,1 M NaOH |
| Protokol 2 (2. Ekstraksiyon metodu) | $RSO_3Na$ | RCOONa |
| Protokol 2 (3. Ekstraksiyon metodu) | $RSO_3Na$, RCOONa | 0,1 M NaOH |
| Protokol 3 (4. Ekstraksiyon metodu) | Benzen/metanol, 2:1 (V/V); $RSO_3Na$ | RCOONa |
| Protokol 3 (5. Ekstraksiyon metodu) | Benzen/metanol, 2:1 (V/V); $RSO_3Na$, RCOONa | 0,1 M NaOH |

Elde edilen hümik maddelerin UV-Vis, FTIR ve floresans absorbanslarından yararlanılarak yorumlamalar yapmışlardır. Tüm parametrelerin karakterizasyon için

geniş bir kullanım alanı bulduğunu, reçine ön muameleli ekstraksiyon metotlarının klasik alkali ekstraksiyona göre daha avantajlı olduğunu görmüşlerdir.

Tatzber ve arkadaşları (2007), NaOH, $Na_4P_2O_7$ ve $Na_2CO_3$ çözeltileri ile yapılan ekstraksiyon prosedürlerine göre elde edilen hümik asit ve hümin fraksiyonlarını incelemişlerdir. Üç ekstraksiyon sonucu elde edilen ürünler, FTIR spektrumlarına göre incelenmiş ve yorumlanmıştır. Özellikle aromatik ve alifatik bantları içeren önemli bölgeler de dahil olmak üzere NaOH ile yapılan ekstraksiyonlar sonucu alınan spektrumların daha net olduğunu belirlemişlerdir.

Yukarıdaki çalışmalar incelendiğinde hümik asitlerin, kaynaklarından yüksek verimle izolasyonu için yükseltgeme işlemine tabi tutulduğu görülmektedir. Fakat hümik asitlerin ekstraksiyonu için farklı ekstraksiyon metotlarının, elde edilen hümik asitlerin verimi üzerine etkisi kapsamlı olarak incelenmemiştir.

## 5.3 Biyokimyasal Kaynaklardan Hümik Maddelerin Eldesi

Dünya üzerindeki birçok doğal kaynakta olduğu gibi, başlıca hümik madde kaynakları da bir gün tükenecek olan fosil kaynaklardır. Bu durum araştırmacıları alternatif hümik madde kaynağı arayışına itmiş ve biyolojik atıkların bu açıdan değerlendirilmesi ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bu atıklardan elde edilen hümik maddelerin kimyasal özelliklerinin ve oranlarının, kaynaklarına göre değişim gösterdiği görülmüştür. Literatürde, hümik madde kaynağı olarak kullanılması düşünülen atıkların çoğu kompostlama işlemine tabi tutulmuştur.

Manos ve Tsai (1980), Barberton lağımından ekstrakte edilen hümik materyallerin kromatografik davranışlarını incelemek amacıyla lağım atıklarının ve dolayısıyla onlardan elde edilen hümik maddelerin toprakta ağır metallerin taşınmasında oynadığı rolü araştırmış ve bu hümik materyallerin kromatografik ve spektrofotometrik karakterizasyonunu yapmışlardır. Bu amaçla boyut eleme kromatografisi yani jel permasyon kromatografisi ve $E_4/E_6$ oranlarını kullanarak analizlerini yapmışlar ve moleküler ağırlıklarına dayalı yorumlamalar yapmışlardır. Sonuç olarak bu atıktan elde edilen hümik maddelerin topraktaki hümik maddelere benzer olduğunu, $E_4/E_6$ oranlarından yeni oluşum aşamasında olduklarını, moleküler ağırlığı 30.000 g/mol'den düşük olan bu hümik maddelerin toprağa uygulanmasıyla toprağa ağır metal aktarımının

artacağını ve 30.000 g/mol'den büyüklerin ise toprak yapısında kolayca adsorbe olacağını görmüşlerdir.

Garcia ve arkadaşları (1992), yükseltgemeli ve yükseltgemesiz teknikler kullanarak kompost ve kompost olmayan atıksu arıtma çamurundan elde edilen hümik asitlerin, FTIR ve $^{13}$C-NMR kullanarak yapılarını incelemişlerdir. GC-MS sonuçlarına göre, hümik asit oksidasyon ürünlerindeki alifatik yapıların aromatik yapılara göre baskın olduğunu gözlemlemişlerdir. FT-IR sonuçlarına göre ise kompostlama işlemine tabi tutulan çamurun, kompostlama işlemine tabi tutulmayan çamura göre alifatik, amit ve karbonhidrat absorpsiyon piklerinde bir azalma olduğu görülmüştür.

Inbar ve arkadaşları (1992), üzümcülük endüstrisinde ortaya çıkan biyolojik atıklardan elde edilen hümik maddelerin yapılarını ve özelliklerinin açığa çıkarılması amacıyla "cibre" denilen ve üzümün suyu elde edildikten sonra geriye kalan kısmı olan posayı kompost etmişlerdir. Bu kompostlama sonucunda cibrede meydana gelen değişimleri $^{13}$C-NMR, CP-MAS ve FT-IR tekniklerini kullanarak izlemişlerdir ve kompostlama süresince elde edilen hümik maddelerin hümik asit ve fülvik asit miktarlarında değişim olmadığını, alifatik C ve karboksil gruplarında artma fakat hümik olmayan kısımlarında ve fenolik OH, toplam aromatiklik ve polisakkarit kısımlarında azalmalar olduğunu ortaya koymuşlardır.

Davies ve arkadaşları (1997), karasal bir bitki olan *Brugmansia sanguinea* bitkisinden alginik asit elde edilirken geriye kalan kahverengi çökeltinin hümik asit olup olmadığının belirlenmesi ve eğer hümik asit ise kalitesinin aydınlatılması için çalışmalar yapmışlardır. Numuneden ilk önce hümik olmayan maddeleri belli ekstraksiyonlarla uzaklaştırmışlar ve $Na_2CO_3$ ile hümik asitleri çöktürmüşlerdir. ICP-MS, UV-Vis, FT-IR kullanarak sonuçları yorumlamışlar ve bu bitkiden hümik asit elde edilebileceği ve elde edilen hümik asitlerin IHSS hümik asitleri kadar kaliteli olabileceğini göstermişlerdir.

Silva ve arkadaşları (1997), kompost lağımdan ve muamele edilmiş lağım atığından ekstrakte edilen fülvik asitlerin asit-baz özelliklerini incelemek amacıyla değişik metot ve modellemelerle çalışmışlardır. Bu amaçla potansiyometrik titrimetri, FT-IR ve eşzamanlı moleküler floresans spektrofotometresinden faydalanmışlardır. Sonuçta, bu konuda daha çok çalışılması gerektiğini, bu kaynakların normalden çok

faklı olduğunu, normal numunelerden daha az azot içeren fonksiyonel grup içerdiğini bulmuşlardır.

Veeken ve arkadaşları (2000), bir biyoatığın kompostlanması esnasında an be an atık içersindeki bileşenlerin miktarında oluşan değişimleri incelemişlerdir. Bu amaçla kompostlama işleminin değişik safhalarından numuneler alarak UV, $^{13}$C-NMR ve piroliz-GC-MS analizleri ile sonuçlarını değerlendirmişler ve $^{13}$C-NMR ve piroliz-GC-MS analizlerinin, hümik asitlerin bileşenleri hakkında hem kalitatif hem de kantitatif bilgi verebildiğini görmüşlerdir.

Ferrer ve arkadaşları (2001), yine aynı şekilde üzüm endüstrisinde meydana gelen atıkların toprak düzenleyicisi olarak kullanılmasını araştırmışlar ve bu amaçla üzüm atıklarının farklı miktarlarını farklı kompostlama metotlarına tabi tutarak mısır toprağına uygulamış ve sonuçlarını değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak çeşitli şartlarda kompost edilen bu atıkların toprak düzenleyicisi olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Unsal ve Ok (2001), farklı atık materyallerinden elde edilen hümik maddelerin karakteristiklerinin teşhisini yapmak amacıyla organik atık örneği olarak; lağım, bira fabrikası, ham çay, kompost üzüm cibresi, çürümüş mantar, kompost ağaç kabuğu ve tütün tozu atıklarından hümik maddeleri ekstrakte ederek incelemişlerdir. Sonuçları, hümik asitlerin kimyasal yapılarının orijinlerine göre faklılıklar gösterdiğini ve en büyük hümik asit yüzdesinin kompost ağaç kabuğunda olduğunu göstermiştir (**Çizelge 5.3.**).

**Çizelge 5. 3.** Bazı biyolojik atıklardan elde edilen hümik asit yüzdeleri (Unsal ve ark., 2001)

| ***Atık*** | Hümik Asit Verimi (% W/W) |
|---|---|
| Ham çay tozu | 17 |
| Tütün tozu | 8 |
| Kompost ağaç kabuğu | 31 |
| Bira fabrikası atıksu arıtma çamuru | 13 |
| Şehir atıksu arıtma çamuru | 11 |
| Kompost cibre | 19 |

Romero ve arkadaşları (2007), üzüm ve distilleme atıklarındaki hümik asit türevlerinin vermikompostlama işlemi ile ne derece faklılığa uğradığını araştırmışlardır. Bu amaçla üzüm cibresi, üzüm cibresi-lees kek karışımı ve biyokatı vinas numunelerinin ilk önce ham olarak hümik asit miktarlarını daha sonra da vermicompost edilerek hümik asit miktarlarını tespit etmişler ve hümik asit içeren ham atık posalarının, vermikompostlama prosesi ile doğada katı halde bulunan leonardit kadar hümik asit içerebileceğini göstermişlerdir.

Vieyra ve arkadaşları (2009), şehir katı atıklarının kompostlanma sürecinin karakterizasyonu için, ekstrakte edilmiş hümik tipi maddelerin toplanmış floresans ve UV-Vis özelliklerini incelemişlerdir. Bu amaçla UV-Vis ve floresans özelliklerine dayalı ölçümleri, kompostlama işleminin çeşitli zamanlarından (20., 30., 45., 75., 120. ve 150. gün) numuneler alarak analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Sonuç olarak $E_4/E_6$ (465 nm/665 nm) oranının, hümifikasyon sürecinin izlenmesinde çok iyi bir araç olduğunu öngörmüşlerdir.

Yapılmış olan çalışmalar incelendiğinde hümik maddeler için alternatif bir kaynak arayışı olduğu ve bu kaynakların, genellikle atıkların değerlendirilmesi amacıyla organik madde içeriği yüksek olduğu düşünülen biyokimyasal kaynaklardan seçildiği görülmektedir. Bu kaynakların bir hümik asit kaynağı olarak değerlendirilmesinden önce kompostlama işlemine tabi tutularak organik madde miktarı artırılmıştır. Uygun bir atık kaynağı ve kompostlama prosesi seçildiğinde bu atıklardan elde edilen hümik asitlerin yapısı, doğal olarak bulunan hümik asitlerin yapılarına çok benzemektedir.

## 5.4 Hümik Maddelerin Tayininde FIA Sistemlerinin Kullanımı

Mevcut sistemlerde, çeşitli ayırma teknikleriyle matrisinden izole edilen hümik asitler yıkama ve saflaştırma işlemlerinden geçmekte ve ardından çeşitli analitik metotlarla (gravimetrik, titrimetrik ve spektrofotometrik) yüzdeleri belirlenmektedir (TSE, 2003; Schnitzer, 1972; Hiradatea, 2006). Bunlardan en öne çıkanı spektrofotometrik metottur ve bu metodun güvenilirliği ve doğruluğu, yüksek hassasiyete ve hıza sahip olan akış enjeksiyon analiz ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi sistemleriyle artırılabilmektedir. Bu sistemler, bazı modifikasyonlar ve optimizasyonlar ile hümik asit analizine uygun hale getirilebilmektedirler. Fakat

şimdiye kadar bu sistemler sadece doğal sularda az miktarlarda bulunan hümik asitlerin tespiti için kullanılmışlardır (Michalowski ve ark., 2001; Wu ve ark., 2007).

Michalowski ve arkadaşları (2001), doğal sulardaki hümik asitlerin kemilüminesans dedeksiyonu ile akış enjeksiyon analizlerini yapmak amacıyla NBS (N-bromosüksinimid) kullanarak, oksidasyon temelli, hızlı, hassas ve seçici bir direkt kemilüminesans tespit prosedürü oluşturmuşlardır. Çalışmalarında hümik asitleri NBS ile oksidasyona uğratmışlar, glisin kullanarak oluşan absorbansı 100 kez artırmışlar ve lüminometre ile ölçümlerini almışlardır. Sonuç olarak çalıştıklarını metodun hızlı ve basit olduğunu, sofistike reaktiflere ihtiyaç duymadığını ve hassasiyetinin spektrofotometrik metotlardan fazla olduğunu göstermişlerdir.

Wu ve arkadaşları (2007), doğal sulardaki hümik ve fülvik asitlerin HPLC ile seri bir biçimde belirlenmesi amacıyla, boyut eleme kromatografisi ile sularda çözünen organik materyalleri ayırmışlar ve karakterize edip miktarlarını hesaplamışlardır. Bu amaçla ayırma için boyut eleme kromatografisini, ayrılan fraksiyonların miktarının tespiti için de UV-Vis ve 3 boyutlu uyarım emisyon matriks floresans spektrofotometrik tekniklerini (3DEEM) kullanmışlardır. Bu çalışmalarının, ırmaklardaki hümik ve fülvik asitlerin tayini için uygun olduğunu söylemişlerdir.

Literatürdeki birçok çalışmadan bazıları olan yukarıdaki araştırmalara göre akış enjeksiyon analiz sistemleri, hümik asitlerin tespiti için kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Fakat bu sistemler sadece doğal sularda az miktardaki hümik asitlerin tespiti için kullanıldığı için yüksek konsantrasyonlardaki hümik asitlerin tayinine imkan vermemektedir. Ayrıca bu çalışmalar yüksek akış hızlarına, büyük hacimlerde numune miktarlarına ihtiyaç duymuş ve akış enjeksiyon analiz sistemi olarak HPLC sistemlerinin hümik asitlerin tespitinde kullanılmasıyla sağlayacağı avantajlar kapsamlı olarak araştırılmamıştır.

## 5.5 Çalışmanın Amacı

Yapılan bu çalışmada:

- Geliştirilecek uygun bir ekstraksiyon metodu ile bazı biyokimyasal kaynaklardan elde edilen hümik madde miktarlarının ve özelliklerinin incelenmesi,

- FIA sistemleri kullanılarak kemometrik yöntemlerle, akış hızı, sıcaklık, numune hacmi ve pH gibi parametrelerinin optimizasyonunun yapılması ve hızlı, güvenilir ve geniş bir konsantrasyon aralığında kullanılabilecek yeni bir hümik asit tayin metodunun geliştirilmesi amaçlanmıştır.

# 6 MATERYAL VE YÖNTEM

## 6.1 Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Kullanılmış olan kimyasallar başlıca, Merck, Fluka, Sigma-Aldrich, LabScan ve Tekkim firmalarından temin edilmiştir. Akış enjeksiyon analiz sisteminde kullanılan tüm kimyasallar HPLC saflıkta seçilmiştir. Standart hümik asit çözeltilerinin hazırlanmasında, sodyum formundaki Aldrich hümik asit (NaA) kullanılmıştır. Tüm sulu çözeltilerin hazırlanmasında ultra saf su kullanılmıştır. Kullanılan cihazlar ve modelleri **Çizelge 6.1.**'de verilmiştir.

**Çizelge 6. 1.** Kullanılan cihazlar ve modelleri

| **Cihazın Adı** | **Markası ve Modeli** |
|---|---|
| Etüv | MIDO/2/AL, Termostatlı |
| Manyetik Karıştırıcı | IKA RCT Classic, Termostatlı ve Isı Kontrollü |
| pH Metre | JENWAY 3010 pH Meter, Kombine |
| Mikropipet | Medispec Plus, 100-1000 µL |
| Analitik Terazi | GEC AVERY |
| Su Banyosu | Clifton, Termostatlı |
| Ultra Saf Su Cihazı | TKA-GenPure |
| Santrifüj Cihazı | MSE MISTRAL 2000 |
| IR Spektrofotometresi | Perkin Elmer FT-IR Spectrum 100 |
| UV-Visible Spektrofotometresi | Perkin Elmer Lambda 25 |

Akış enjeksiyon analizleri için kullanılan HPLC sistemini (**Şekil 6.1.**) oluşturan birimler ve modelleri **Çizelge 6.2.**'de verilmiştir.

**Çizelge 6. 2.** Akış enjeksiyon analizlerinde kullanılan HPLC sistemini oluşturan birimler

| **Cihazın Adı** | **Markası ve Modeli** |
|---|---|
| Degazör | Agilent 1100 Series Degasser |
| 4'lü Pompa | Agilent 1100 Series Quadratic Pump |
| Otomatik Enjektör | Agilent 1200 Series Auto Sampler |
| Kolon Fırını | Agilent 1100 Series Column Oven |
| Dedektör | Agilent 1200 Series Diod Array Detector (DAD) |



**Şekil 6. 1.** Akış enjeksiyon analizlerinde kullanılan HPLC sistemi

## 6.2 Biyokimyasal Kaynaklara Uygulanan Ön İşlemler

Biyokimyasal kaynaklardan hümik maddelerin eldesinde kullanılan numuneler ilk önce agad havan yardımı ile uygun parçacık büyüklüğüne getirilmiştir.

Biyokimyasal numunelerin ihtiva ettiği nem miktarını tespit etmek amacıyla, belli miktar uygun parçacık büyüklüğüne getirilmiş numune hassas terazide tartılmış ve petri kabına alınarak etüvde, 105 $^{o}$C'de 3 saat bekletilmiştir. Bu süre zarfı sonunda petri kabı desikatöre alınarak numunenin nem absorplamadan soğuması sağlanmıştır. Soğuduktan sonra, darası belli olan petri kabı hassas terazide tartılarak numunenin nem miktarı tespit edilmiştir. Numunenin içerdiği nem miktarı şu şekilde hesaplanmıştır:

**A**: Numune miktarı g

**B**: Petri kabının darası g

**C**: Etüvde bekletildikten sonra numune ve petri kabının ağırlığı g

$$\%\ \text{Nem Miktarı} = \frac{A-(C-B)}{A} x100 \tag{6.1}$$

## 6.3 Hümik Madde Eldesi İçin Seçilen Biyokimyasal Kaynaklar

Hümik madde eldesi için seçilen biyokimyasal kaynaklar şunlardır:

- Leonardit
- Deniz Yosunu
- Linyit
- Toprak
- Cibre
- Çay

Leonardit, doğal maden olarak üretilen, hümik asit, fülvik asit, organik madde içeriği yüksek olan ve toprak tansiyonunu (pH) dengeleyen bir toprak düzenleyicisidir (**Şekil 6.2.**). İçerdiği yüksek orandaki hümik asitlerden dolayı önemli bir ekonomik

değere sahiptir. Bu çalışmada kullanılan leonardit numunesi ticari olarak elden temin edilmiştir.



**Şekil 6. 2.** Leonardit madeni

Deniz yosunlarının bilinen en eski kullanım sahası gübre olup en çok uzak doğuda kullanılmıştır (**Şekil 6.3.**). Deniz kıyısı uzun ve deniz yosunu bol olan Norveç, İrlanda, Fransa ve Amerika gibi ülkelerde gübre olarak fakir toprakların değerlendirilmesinde kullanılmalarına yönelinmiştir. Yosun özleri; meyve depo kayıplarının azaltılması, ürün miktarının, topraktan inorganik besin maddelerinin alınımının, tohum çimlenmesinin ve stres koşullarına direncin arttırılması gibi alanlarda özellikle gelişmiş ülkelerde organik tarımda daha fazla değerlendirilmektedir. Bu çalışmada kullanılan deniz yosunu, yerel bir firma olan Koyuncular Madencilik'ten işlenmiş olarak temin edilmiştir.



**Şekil 6. 3.** Deniz yosunu

Linyit, bitki kökenli bir maddedir ve bitkilerin, zamanla, sıcaklık ve basınç altında, değişim geçirmesi sonunda oluşmuştur (**Şekil 6.4.**). İnsan yaşamında ve enerji hammaddeleri içinde çok önemli bir yere sahip olan linyit, dünyada geniş rezervlere ve vazgeçilmez yaygın tüketim alanlarına sahip olup, emniyetli, üretimi kolay ve ucuz bir fosil yakıttır. Ancak, düşük kaliteli linyit kömürleri ve bazı turbalar enerji üretimi amacı dışında da, örneğin içerdikleri yüksek orandaki azot ve hümik asit dolayısıyla son yıllarda tarım endüstrisinde gübre eldesi amacı ile de kullanılagelmektedir (Özkan, 2007). Bu çalışmada kullanılan linyit, Konya Ilgın yöresindeki Türkiye Kömür İşletmeleri'nden temin edilmiştir.



**Şekil 6. 4.** Linyit madeni

Toprak, Konya bölgesinde bulunan bazı tarlalardan elde edilen ve hümik asit içeriği yüksek olduğu düşünülen toprak numuneleri üzerinde bu tez kapsamında denemeler yapılmıştır (**Şekil 6.5.**).



**Şekil 6. 5.** Toprak

Cibre, şarap, rakı, pekmez, kanyak ve şıra yapımından sonra üzümden arta kalan kısma denmektedir (**Şekil 6.6.**). Tartarat, alkol, tanen ve içerdiği çekirdek yağı bakımından çok zengin olmakla birlikte henüz değerlendirme olanağı olmayan bir

maddedir. İçerdiği yüksek organik madde miktarı sebebiyle bir hümik asit kaynağı olarak değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Bu çalışmada kullanılan cibre numunesi, Mersin'de bulunan bir meyve suyu firmasından temin edilmiştir.



**Şekil 6. 6.** Üzüm Cibresi

Çay atığından hümik asit eldesi ile ilgili literatürde çalışmalar yapılmıştır. Bu tezde ise demlenmiş çaydan geriye kalan posadaki hümik asit miktarı incelenmiştir (**Şekil 6.7.**).



**Şekil 6. 7.** Çay atığı

## 6.4 Biyokimyasal Kaynaklardan Hümik Maddelerin Ekstraksiyonu

Seçilen biyokimyasal kaynaklardan (Leonardit, linyit, deniz yosunu, cibre, çay atığı ve toprak) hümik maddelerin (hümik asit + fülvik asit) eldesi 2 basamakta gerçekleştirilmiştir:

1. Ön yükseltgenme basamağı,
2. Ekstraksiyon basamağı.

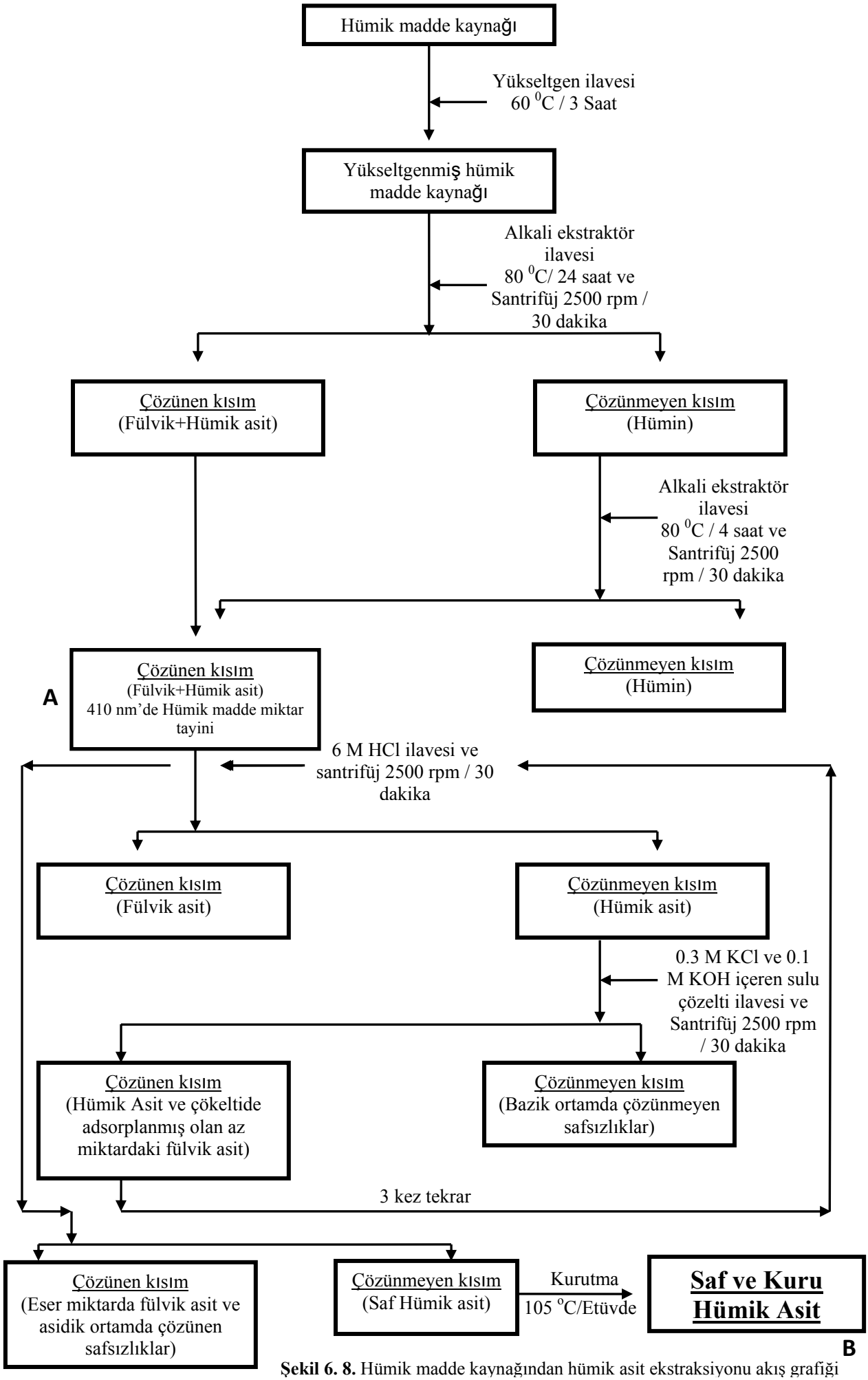
Numuneler ilk önce aşağıda konsantrasyonu ve cinsi verilen yükseltgen sulu çözeltilerle muamele edilmiştir.

- 6 N $HNO_3$
- 0,2 M $KMnO_4$
- % 2'lik (W/W) $H_2O_2$
- 0,2 M $Na_4P_2O_7$

Daha sonra 1 M sulu KOH ile ekstrakte edilmişlerdir. Bazik çözeltiye geçen hümik ve fülvik asitler, çözünmeden kalan hüminlerden 2500 rpm'de 30 dakika santrifüjlenerek ayrılmıştır. Çözünmeden kalan kısım üzerinden aynı ekstraksiyon işlemi ikinci kez gerçekleştirilip, hümin kısmında kaldığı düşünülen hümik ve fülvik asitlerin geri kazanımı sağlanmıştır. Ardından santrifügatlar birleştirilmiştir. Bu işlemden sonra, toplam ekstrakte edilebilen organik madde miktarını temsilen hümik madde miktarı (hümik asit + fülvik asit) standart spektrofotometrik metotla hesaplanmıştır (Schnitzer, 1972; Hiradate ve ark., 2006; Sorouradin ve ark., 1993).

Hümik asitlerin fülvik asitlerden ayrılması ve elde edilen hümik asitlerin saflaştırılması ise şu şekilde gerçekleştirilmiştir (Romero ve ark., 2007): Bazik olan santrifügat çözeltisi sulu 6 M HCl ile asitlendirilerek siyah yumaklar halinde hümik asitler çöktürülmüş ve fülvik asitler çözeltide bırakılmıştır. Çözeltideki karbonatların $CO_2$ çıkışı bittikten sonra santrifüj ile ayrılan hümik asit çökeltisi, 0,3 M KCl ve 0,1 M KOH içeren sulu çözeltinin minimum miktarıyla tekrar çözülmüştür. Santrifüjlenen çözeltiden çözünmeyen safsızlıklar uzaklaştırıldıktan sonra tekrar sulu 6 M HCl ile asitlendirilerek hümik asitlerin çökmesi sağlanmıştır. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrar edilip, hümik asit çökeltisinde adsorplanan fülvik asitler ve alkali çözeltide çözünmeyen

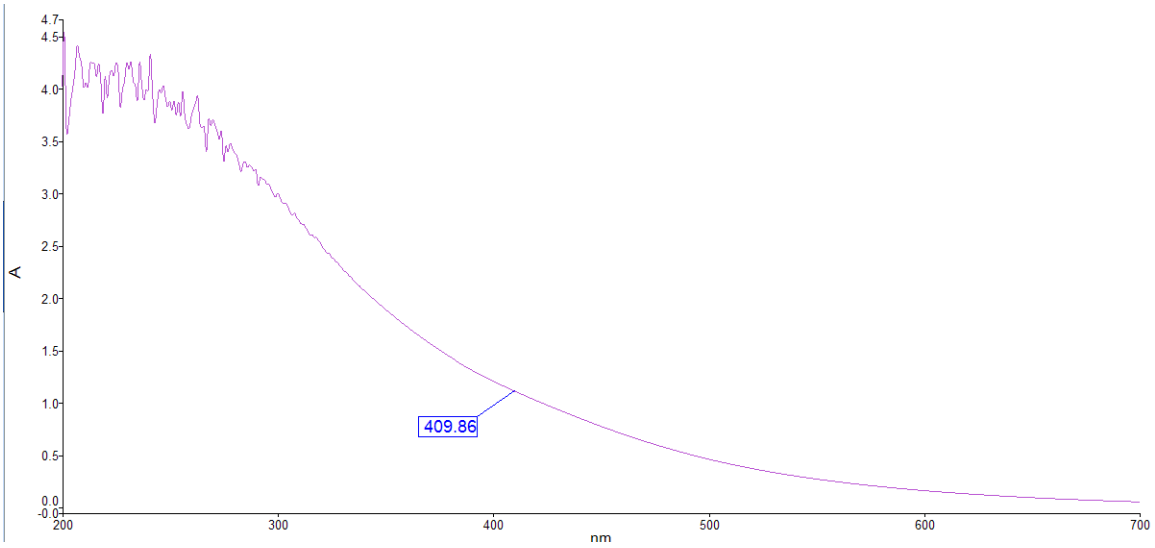
safsızlıklar uzaklaştırılmıştır. Tekrarlanan yıkama işlemlerinin ardından bazik hümik asit çözeltisine son kez sulu 6 M HCl çözeltisinden ilave edilerek hümik asitlerin çökelmesi sağlanmıştır. Santrifüjle ayrılan hümik asit çökeltisi, yıkama suyunda $AgNO_3$ ile beyaz çökelti vermeyinceye kadar ultra saf su ile yıkanmıştır. Ardından kurutulup desikatörde muhafaza edilmiştir. Yapılan işlemler **Şekil 6.8.**'de verilmiştir.



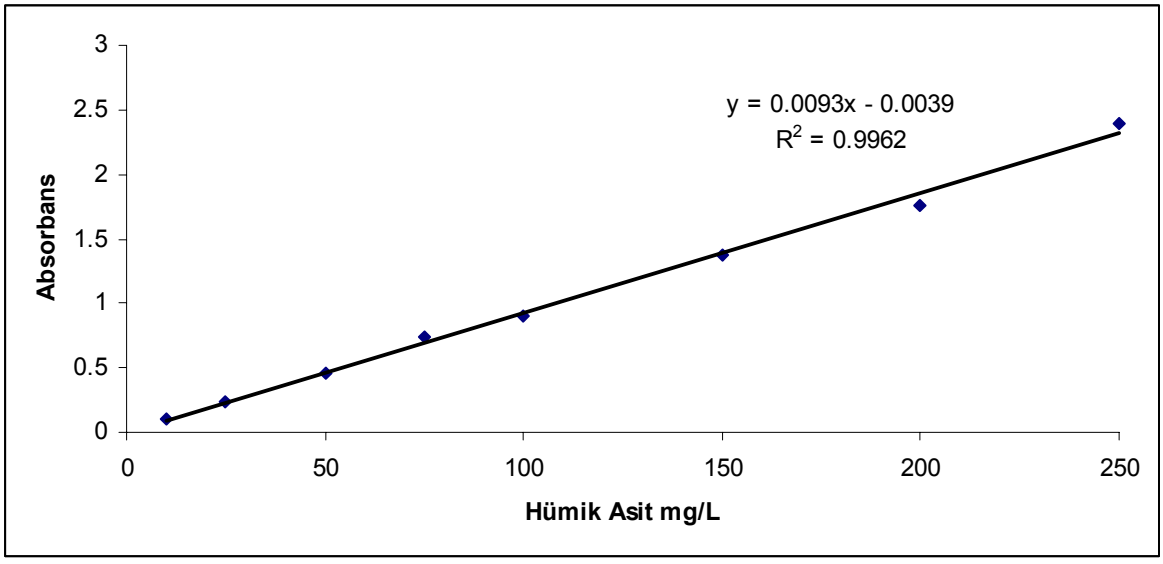

**Şekil 6. 8.** Hümik madde kaynağından hümik asit ekstraksiyonu akış grafiği

## 6.5 Biyokimyasal Kaynaklardan Ekstrakte Edilen Hümik Madde Miktarının Hesaplanması

Biyokimyasal kaynaklardan elde edilen hümik maddelerin miktarının hesaplanmasında, standart spektrofotometrik metot kullanılmıştır (Schnitzer, 1972; Sorouradin ve ark., 1993; Hiradate ve ark., 2006). Bu amaçla, pH'sı KOH ile 10,5'a ayarlanmış olan sulu seyreltme çözeltisi vasıtasıyla 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 ve 250 mg/L'lik hümik asit standartları hazırlanmıştır. Seyreltme çözeltisi, 0 mg/L'lik hümik asit çözeltisi olarak kullanılmıştır. Bu standartların UV-Visible spektrofotometresinde 410 nm'de (**Şekil 6.9.**) absorbansları alınarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur (**Şekil 6.10.**).




**Şekil 6. 9.** Örnek olarak verilmiş olan bir hümik asit çözeltisi UV spektrumu




**Şekil 6. 10.** Standart hümik asit çözeltilerinin absorbansları ile elde edilmiş olan kalibrasyon grafiği

Ekstrakte edilen hümik maddelerin (hümik asit + fülvik asit, **Şekil 6.8.A**), pH'sı KOH ile 10,5'a ayarlanmış olan sulu çözelti ile seyreltilerek, UV-Visible spektrofotometresinde 410 nm'de absorbansları okunmuştur. Konsantrasyonu bilinmeyen hümik madde çözeltisinin absorbansı ve hazırlanmış olan kalibrasyon grafiği kullanılarak % hümik madde verimi şu şekilde hesaplanmıştır:

**A**: Konsantrasyonu bilinmeyen hümik madde çözeltisinin absorbansı

**L**: Konsantrasyonu bilinmeyen hümik madde çözeltisinin hacmi L

**B**: Hümik madde kaynağından alınan kuru numune miktarı g

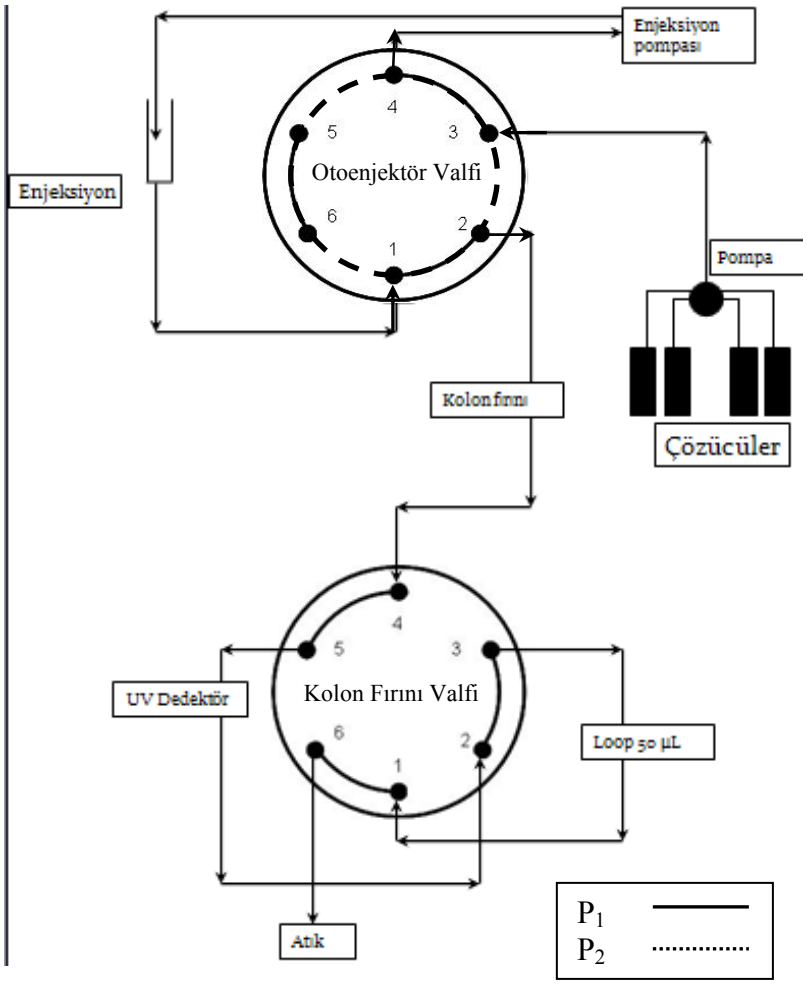
$$\%\ \text{Hümik Madde Verimi} = \frac{(A + 0.0039)/0.0093xL}{B} x100 \qquad (6.2)$$

## 6.6 FT-IR Analizleri

Yıkama ve saflaştırma işlemlerinden geçirilmiş saf ve kuru hümik asitlerin (**Şekil 6.8.B**) yapısında bulunan fonksiyonel gruplar hakkında fikir edinebilmek ve faklı kaynaklı hümik asitlerin yapılarındaki faklılıkları incelemek amacıyla FTIR analizleri yürütülmüştür. Analizler Perkin-Elmer marka (Spectrum 100 model) FTIR spektrofotometresi ile yapılmış olup; spektrumlar KBr ile pellet oluşturmadan yansıma esasına göre alınmıştır.

## 6.7 Akış Enjeksiyon Analizleri

Akış enjeksiyon analizlerinin yürütülmesinde, modifiye edilen Agilent HPLC sistemi kullanılmıştır (**Şekil 6.1.** ve **Çizelge 6.2.**). Sistemin şematik gösterimi **Şekil 6.11.**'da verilmiştir. Elde edilen datalar Chemstation (B.03.02 Versiyonu) programı kullanılarak toplanmış ve işlenmiştir.




**Şekil 6. 11.** Hümik asitlerin tespiti için kullanılan akış enjeksiyon sisteminin şematik gösterimi:

Konsantrasyonları 62,5; 125 ve 250 mg/L olan hümik asit standartları hazırlanmış ve bu sistemin parametrelerinin optimizasyonunda bu standartlar kullanılarak yorumlamalar yapılmıştır. Standartlar sisteme enjekte edilmeden önce 0,45 µm gözenek boyutuna sahip şırınga filtreler kullanılarak filtre edilmişlerdir. Hareketli faz çözeltisinden gelmesi muhtemel safsızlıkların sisteme zarar vermesini önlemek amacıyla da, 0,2 µm gözenek boyutuna sahip naylon membran filtre kullanılarak hareketli faz çözeltisi süzme düzeneğinde filtrelenmiştir.

Numune enjeksiyonu öncesi otoenjektör valfi kesikli çizgi ile belirtilen $P_2$ konumunda olmaktadır ve gelen hareketli faz çözeltisi 3 numaralı bölümden giriş yaparak 2 numaralı bölümden enjeksiyon bloğuna uğramadan kolon fırınına yönlendirilmektedir. Enjeksiyon yapılacağı zaman enjeksiyon pompası numuneyi belirtilen hacimde vialden çekmekte ve hücresine almaktadır. Ardından otoenjektör valfi düz çizgi ile belirtilen $P_1$ konumuna geçmekte ve hücre içersinde bulunan

numuneyi önüne alarak 1 numaralı bölümden giriş yapıp 2 numaralı bölümden kolon fırınına yönlendirilmektedir. Analiz sonlanana ve yeni bir analize geçilene kadar oto enjektör valfi bu konumda kalmaktadır.

## 6.8 Deneysel Tasarım Uygulamaları

### 6.8.1 Kısmi faktöriyel tasarım

Faktöriyel tasarım yöntemleri, 2n, 3n, 4n,... gibi tam faktöriyel tasarım, 2n-k, 3n-k, 4n-k,...gibi fraksiyonel tasarım ve Taguchi deney tasarım yöntemleri olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Parametre ve seviye sayısının artması durumunda tam faktöriyel tasarım yöntemlerinin kullanılması imkansız hale gelmektedir. Tam faktöriyel tasarım yöntemlerinden en fazla kullanılanı $2^2$, $2^3$ ve $2^4$ olanlardır. Oysa bilimsel çalışmalarda parametre sayısı genellikle 4'ten, seviye sayısı da 2'den fazla olmaktadır. Bu sebepten dolayı deneysel maliyetleri en az düzeyde tutabilmek için kesirli (kısmi) faktöriyel tasarım yöntemleri kullanılmaktadır (Havuz, 2007).

Hümik asitlerin tayininde standart metotlara alternatif olması düşünülen FIA sisteminin, kemometrik yöntemlerle şu parametrelerinin optimizasyonu yapılmıştır:

- Hareketli fazın akış hızı
- Hareketli fazın pH'sı
- Kolon fırını sıcaklığı
- Numune enjeksiyon hacmi

**Çizelge 6. 3.** Optimizasyonu yapılacak olan FIA sisteminin parametreleri ve kodlanmış seviye değerleri

| Seviye | **-2** | **-1** | **0** | **1** | **2** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Akış hızı (mL/dak)** | 0.5 | 0.75 | 1.0 | 1.5 | 2.0 |
| **pH** | 8 | 9 | 10 | 10.5 | 11 |
| **Sıcaklık ($^oC$)** | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 |
| **Numune Hacmi (µL)** | 5 | 10 | 20 | 30 | 40 |

**Çizelge 6.3.**'deki seviyeler, HPLC sisteminin çalışma prensipleri göz önünde bulundurularak seçilmiştir.

- HPLC sisteminde yüksek akış hızlarının, fazla çözücü harcaması sebebiyle deneysel tasarımın ilk faktörü olan akış hızı için seviye değerleri 0,5 – 2 mL/dk olarak seçilmiştir.
- Hümik asitlerin alkali pH'lar da çözünebilmesi ve 11'in üstündeki pH'ların HPLC sisteminin degazör ve diğer kısımlarına zarar vermesi sebebiyle pH seviyeleri 8 -11 olarak seçilmiştir.
- HPLC sisteminde hümik asitlerin tayini için uygun sıcaklık çalışma aralığı olan 20 – 40 $^{o}$C aralığı, deneysel tasarımın sıcaklık faktörü için seviye değeri olarak seçilmiştir.

Maddeler halinde verilmiş olan dört faktörün optimizasyonu tek bir deneysel tasarım ile yapıldığında faktörler arası etkileşimlerle beraber model eşitliğinde 19 tane etki ortaya çıkmaktadır ve bu durum faktörlerin etkilerini izlemeyi zorlaştırmaktadır. Bu sebeple optimizasyon işlemi ayrı deneysel tasarımlar kullanılarak 2 aşamada gerçekleştirilmiştir. İki deneysel tasarım arasında bütünlüğün sağlanması ve sonuçların ilişkilendirilmesi amacıyla sıcaklık faktörü her iki optimizasyon aşamasında ortak faktör olarak seçilmiştir:

- İlk aşamada hareketli fazın akış hızı, pH'sı ve sıcaklık parametrelerinin,
- İkinci aşamada ise sıcaklıkla numune hacmi parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

#### 6.8.1.1 Akış hızı, pH ve sıcaklık faktörlerinin optimizasyonunda kullanılan deneysel tasarım

Birinci aşamada ilk üç parametre için 5 seviyeli 3 faktörlü kısmi bir tasarım kullanılmıştır (Brereton, 1997). Bu kısımda numune enjeksiyon hacmi 10µL seviyesinde sabit tutularak analizler gerçekleştirilmiştir. Bu aşama için seçilmiş seviyeler ve deneysel tasarım aşağıda verilmiştir (**Çizelge 6.4.)**.

**Çizelge 6. 4.** İlk üç parametre için seçilen seviye kodları ve değerleri

| Seviye | **-2** | **-1** | **0** | **1** | **2** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Akış hızı (mL/dk)** | 0.5 | 0.75 | 1.0 | 1.5 | 2.0 |
| **pH** | 8 | 9 | 10 | 10.5 | 11 |
| **Sıcaklık ($^{o}$C)** | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 |

**Çizelge 6. 5.** İlk üç parametre için seçilen deneysel tasarım ve her bir deneyde parametrelerin sahip olduğu seviye kodları (Brereton, 1997)

| Tasarım No | Akış hızı (mL/dk) | pH | Sıcaklık ($^{o}$C) | Analiz Sırası* |
|---|---|---|---|---|
| **1** | 0 | 0 | 0 | ***13*** |
| **2** | 0 | -2 | -2 | ***1*** |
| **3** | -2 | -2 | 2 | ***5*** |
| **4** | -2 | 2 | -1 | ***22*** |
| **5** | 2 | -1 | 2 | ***10*** |
| **6** | -1 | 2 | 0 | ***23*** |
| **7** | 2 | 0 | -1 | ***12*** |
| **8** | 0 | -1 | -1 | ***7*** |
| **9** | -1 | -1 | 1 | ***9*** |
| **10** | -1 | 1 | 2 | ***20*** |
| **11** | 1 | 2 | 1 | ***24*** |
| **12** | 2 | 1 | 0 | ***18*** |
| **13** | 1 | 0 | 2 | ***15*** |
| **14** | 0 | 2 | 2 | ***25*** |
| **15** | 2 | 2 | -2 | ***21*** |
| **16** | 2 | -2 | 1 | ***4*** |
| **17** | -2 | 1 | -2 | ***16*** |
| **18** | 1 | -2 | 0 | ***3*** |
| **19** | -2 | 0 | 1 | ***14*** |
| **20** | 0 | 1 | 1 | ***19*** |
| **21** | 1 | 1 | -1 | ***17*** |
| **22** | 1 | -1 | -2 | ***6*** |
| **23** | -1 | -2 | -1 | ***2*** |
| **24** | -2 | -1 | 0 | ***8*** |
| **25** | -1 | 0 | -2 | ***11*** |

*Analizler tasarımdaki sıraya göre yapılmak istendiğinde bazı zorluklar meydana gelmektedir. Örneğin; faktörlerin seviyeleri arasındaki geçişler düşünüldüğünde, deney esnasında en çok zaman harcayan seviye geçişleri hareketli fazın pH'sına ait olmaktadır. Çünkü bu faktörün seviyesi değiştirilmek istendiğinde, tüm sistemin bu yeni pH değerine sahip çözelti ile şartlandırılması gerekmekte ve bu da

zaman kaybına sebebiyet vermektedir. Bu sebeple **Çizelge 6.5.**'de verilmiş olan deney sıraları, tasarımın yapısı gözetilerek aşağıdaki şekilde değiştirilmiştir (**Çizelge 6.6.**):

**Çizelge 6. 6.** Değiştirilmiş analiz sıraları ve kodları

| Analiz Sırası | pH | Sıcaklık ($^{o}$C) | Akış Hızı (mL/dk) |
|---|---|---|---|
| **1** | -2 | -2 | 0 |
| **2** | -2 | -1 | -1 |
| **3** | -2 | 0 | 1 |
| **4** | -2 | 1 | 2 |
| **5** | -2 | 2 | -2 |
| **6** | -1 | -2 | 1 |
| **7** | -1 | -1 | 0 |
| **8** | -1 | 0 | -2 |
| **9** | -1 | 1 | -1 |
| **10** | -1 | 2 | 2 |
| **11** | 0 | -2 | -1 |
| **12** | 0 | -1 | 2 |
| **13** | 0 | 0 | 0 |
| **14** | 0 | 1 | -2 |
| **15** | 0 | 2 | 1 |
| **16** | 1 | -2 | -2 |
| **17** | 1 | -1 | 1 |
| **18** | 1 | 0 | 2 |
| **19** | 1 | 1 | 0 |
| **20** | 1 | 2 | -1 |
| **21** | 2 | -2 | 2 |
| **22** | 2 | -1 | -2 |
| **23** | 2 | 0 | -1 |
| **24** | 2 | 1 | 1 |
| **25** | 2 | 2 | 0 |

#### 6.8.1.2 Numune hacmi ve sıcaklık faktörlerinin optimizasyonunda kullanılan deneysel tasarım

İkinci aşamada ise son iki parametre için 5 seviyeli 2 faktörlü bir kısmi tasarım kullanılmıştır (Brereton, 1997). Bu kısımda hareketli fazın akış hızı 2 mL/dk ve pH'sı 8 seviyelerinde sabit tutularak analizler gerçekleştirilmiştir. Bu aşama için seçilmiş seviyeler ve tasarım aşağıda verilmiştir (**Çizelge 6.7.**).

**Çizelge 6. 7.** Sıcaklık ve numune hacmi parametreleri için seçilen seviye kodları ve değerleri

| Seviye | **-2** | **-1** | **0** | **1** | **2** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Sıcaklık ($^oC$)** | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 |
| **Numune Hacmi (µL)** | 5 | 10 | 20 | 30 | 40 |

**Çizelge 6. 8.** Sıcaklık ve numune hacmi parametreleri için seçilen deneysel tasarım ve her bir deneyde parametrelerin sahip olduğu seviye kodları (Brereton, 1997)

| **Tasarım No** | **Sıcaklık ($^oC$)** | **Numune Hacmi (µL)** | **Analiz Sırası*** |
|---|---|---|---|
| **1** | 0 | 0 | ***13*** |
| **2** | 2 | -1 | ***22*** |
| **3** | -1 | 2 | ***10*** |
| **4** | 2 | 0 | ***23*** |
| **5** | 0 | -1 | ***12*** |
| **6** | -1 | -1 | ***7*** |
| **7** | -1 | 1 | ***9*** |
| **8** | 1 | 2 | ***20*** |
| **9** | 2 | 1 | ***24*** |
| **10** | 1 | 0 | ***18*** |
| **11** | 0 | 2 | ***15*** |
| **12** | 2 | 2 | ***25*** |
| **13** | 2 | -2 | ***21*** |
| **14** | -2 | 1 | ***4*** |
| **15** | 1 | -2 | ***16*** |
| **16** | -2 | 0 | ***3*** |
| **17** | 0 | 1 | ***14*** |
| **18** | 1 | 1 | ***19*** |
| **19** | 1 | -1 | ***17*** |
| **20** | -1 | -2 | ***6*** |
| **21** | -2 | -1 | ***2*** |
| **22** | -1 | 0 | ***8*** |
| **23** | 0 | -2 | ***11*** |
| **24** | -2 | -2 | ***1*** |
| **25** | -2 | 2 | ***5*** |

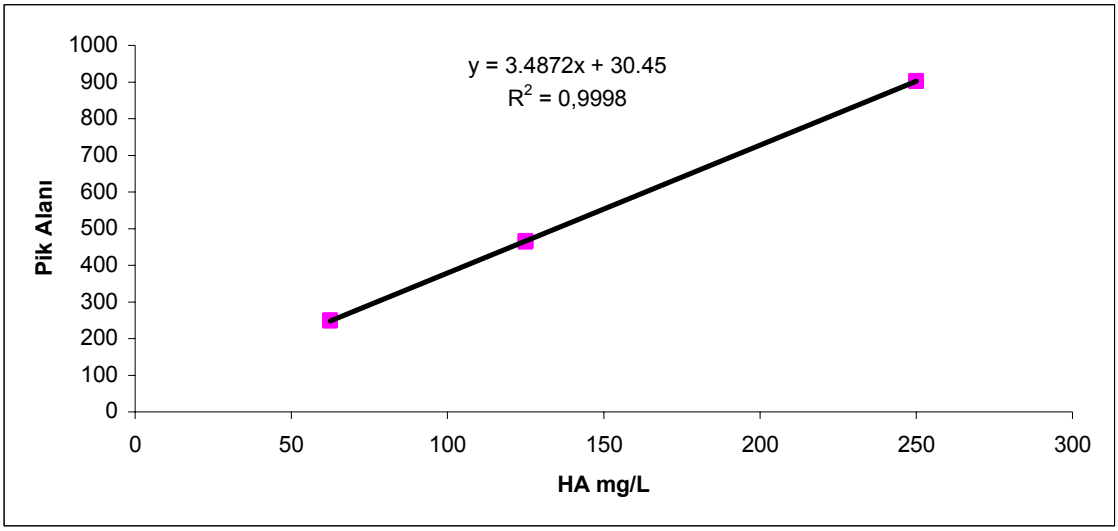
*Yukarıdaki iki faktörün (sıcaklık ve numune hacmi) seviyeleri arasındaki geçişler düşünüldüğünde, deney esnasında en çok zaman harcayan seviye geçişleri sıcaklık faktörüne ait olmaktadır. Çünkü bu faktörün seviyesi her değiştirildiğinde, kolon fırını yeni sıcaklık değerine ulaşana kadar analize ara vermekte ve bu da zaman kaybına sebebiyet vermektedir. Bu sebeple **Çizelge 6.8.**'de verilmiş olan deney sıraları, tasarımın yapısı gözetilerek aşağıdaki şekilde değiştirilmiştir (**Çizelge 6.9.**):

**Çizelge 6. 9.** Değiştirilmiş analiz sıraları ve kodları

| Analiz Sırası | Sıcaklık ($^oC$) | Numune Hacmi (µL) |
|---|---|---|
| **1** | -2 | -2 |
| **2** | -2 | -1 |
| **3** | -2 | 0 |
| **4** | -2 | 1 |
| **5** | -2 | 2 |
| **6** | -1 | -2 |
| **7** | -1 | -1 |
| **8** | -1 | 0 |
| **9** | -1 | 1 |
| **10** | -1 | 2 |
| **11** | 0 | -2 |
| **12** | 0 | -1 |
| **13** | 0 | 0 |
| **14** | 0 | 1 |
| **15** | 0 | 2 |
| **16** | 1 | -2 |
| **17** | 1 | -1 |
| **18** | 1 | 0 |
| **19** | 1 | 1 |
| **20** | 1 | 2 |
| **21** | 2 | -2 |
| **22** | 2 | -1 |
| **23** | 2 | 0 |
| **24** | 2 | 1 |
| **25** | 2 | 2 |

### 6.8.2 Cevap değerinin seçimi ve model eşitliğinin oluşturulması

FIA sisteminin optimizasyonunda kullanılan standart hümik asit çözeltileri (62,5, 125 ve 250 mg/L), bir önceki konuda verilen her bir deneysel koşula göre 3 tekrarlı ve ardı ardına sisteme enjekte edilmiştir. Analizlerden elde edilen 9 pik alanı konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiş ve oluşturulan kalibrasyon grafiklerinden lineerliğin bir ifadesi olan $R^2$ katsayıları hesaplanmıştır. Bu sayede her bir deneysel koşuldan bir $R^2$ değeri elde edilmiş ve bu değer o deneysel koşulun cevap değeri olarak kabul edilmiştir. Örnek olarak; belirli bir deneysel koşula göre gerçekleştirilen FIA analizinin kalibrasyon grafiği ve cevap değeri kabul edilen $R^2$ katsayısı **Şekil 6.12.**'de verilmiştir.




**Şekil 6. 12.** Belirli bir deneysel koşula göre enjekte edilen 3 hümik asit standardının (62,5, 125 ve 250 mg/L) ardı ardına 3 tekrarlı analizden elde edilen 9 pik alanının bir grafikte gösterimi ve regresyon katsayısı

Deneysel tasarım ile yapılan FIA sisteminin optimizasyonun her iki bölümünde, **Şekil 6.12.**'deki gibi her bir deneysel koşula göre analizler gerçekleştirilmiş ve $R^2$ katsayıları elde edilmiştir. Elde edilen bu $R^2$ katsayıları analizlerin yorumlanmasında, yüzey grafiklerinin çizdirilmesine imkan veren kuadratik model eşitliğin hesaplanmasında, normal dağılım ve yüzey grafiklerinin çizdirilmesinde cevap değeri olarak kullanılmıştır. Her iki deneysel tasarım için normal dağılım grafikleri çizdirilerek analiz sonucuna hangi etkinin daha anlamlı katkı sağladığı irdelenmiştir. FIA sisteminin optimizasyonunun ilk bölümünü oluşturan akış hızı, pH ve sıcaklık faktörleri için 3 yüzey grafiği; ikinci bölümünü oluşturan sıcaklık ve numune hacmi faktörleri için ise sadece 1 yüzey grafiği (2 faktör olduğu için) çizdirilerek optimum parametre değerleri tespit edilmeye çalışılmıştır. Yapılan hesaplamalarda ve grafiklerin çizdirilmesinde Excel, Origin ve Matlab programlarından faydalanılmıştır.

## 6.9 İstatistiksel Analiz

Hümik maddelerin kantitatif tayini için geliştirilen FIA-HPLC metodunun valide edilmesinde kullanılan parametreler:

- Doğruluk (Accuracy)
- Kesinlik (Precision) ve Tekrarlanabilirlik (Repeatability)
- Tayin Limiti (Limit of detection, LOD)

- Ölçüm Limiti (Limit of quantitation, LOQ)
- Seçicilik/Spesifik olma (Selectivity/Specificity)
- Lineer Bölge ve Ölçüm Aralığı (Linearity/Range)
- Sağlamlık (Ruggedness/Robustness)
- Hassasiyet (Sensivity)

FIA metodunun, standart metotlarla karşılaştırılmasında; alternatif t ve F testleri kullanılmıştır. F ve t testleri P: 0,05 olasılık düzeyinde (%95 güven seviyesinde) gerçekleştirilmiştir.

# 7 ARAŞTIRMA SONUÇLARI

## 7.1 Biyokimyasal Kaynaklardan Hümik Maddelerin Eldesi

### 7.1.1 Nem miktarları

Hümik maddelerin eldesinde kullanılan biyokimyasal kaynakların (leonardit, deniz yosunu, linyit, cibre, toprak ve çay) ham halde içerdikleri nem miktarları ağırlıkça yüzde olarak **Çizelge 7.1.**'de verilmiştir.

**Çizelge 7. 1.** Numunelerin nem içerikleri

| Numune | Nem Yüzdesi (% W/W) |
|---|---|
| Leonardit | 30,0 |
| Deniz Yosunu | 4,8 |
| Linyit | 22,3 |
| Cibre | 73,9 |
| Toprak | 28,3 |
| Çay Posası | 7,0 |

### 7.1.2 Ekstraksiyon metodunun seçimi

Biyokimyasal kaynaklı numunelerin içerdiği hümik maddelerin, yüksek verimle izole edilebilmesini sağlayacak uygun ekstraksiyon metodunun seçilmesi amacıyla leonardit numunesi aşağıda isimleri verilen farklı ekstraksiyon metotlarına tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek hümik madde veriminin elde edildiği ekstraksiyon metodu, diğer numuneler için baz alınarak biyokimyasal kaynaklardaki hümik maddelerin ekstraksiyonunda kullanılmıştır. Bu ekstraksiyonlar **Şekil 6.8.**'e göre yapılmış olup hümik madde miktarları ise standart spektrofotometrik metotla **Eşitlik 6.2.**'ye göre hesaplanmıştır.

#### 7.1.2.1 Leonardit numunesinin faklı ekstraksiyonları ve elde edilen hümik madde miktarları

Leonardit numunesinden hümik maddelerin eldesi için kullanılan farklı ekstraksiyon metotları aşağıda sıralanmıştır:

- Direkt KOH ekstraksiyonu,
- Direkt $Na_4P_2O_7$ ekstraksiyonu,
- $Na_4P_2O_7$ ön yükseltgemeli KOH ekstraksiyonu,
- $HNO_3$ ön yükseltgemeli KOH ekstraksiyonu,
- $H_2O_2$ ön yükseltgemeli KOH ekstraksiyonu,
- $KMnO_4$ ön yükseltgemeli KOH ekstraksiyonu.

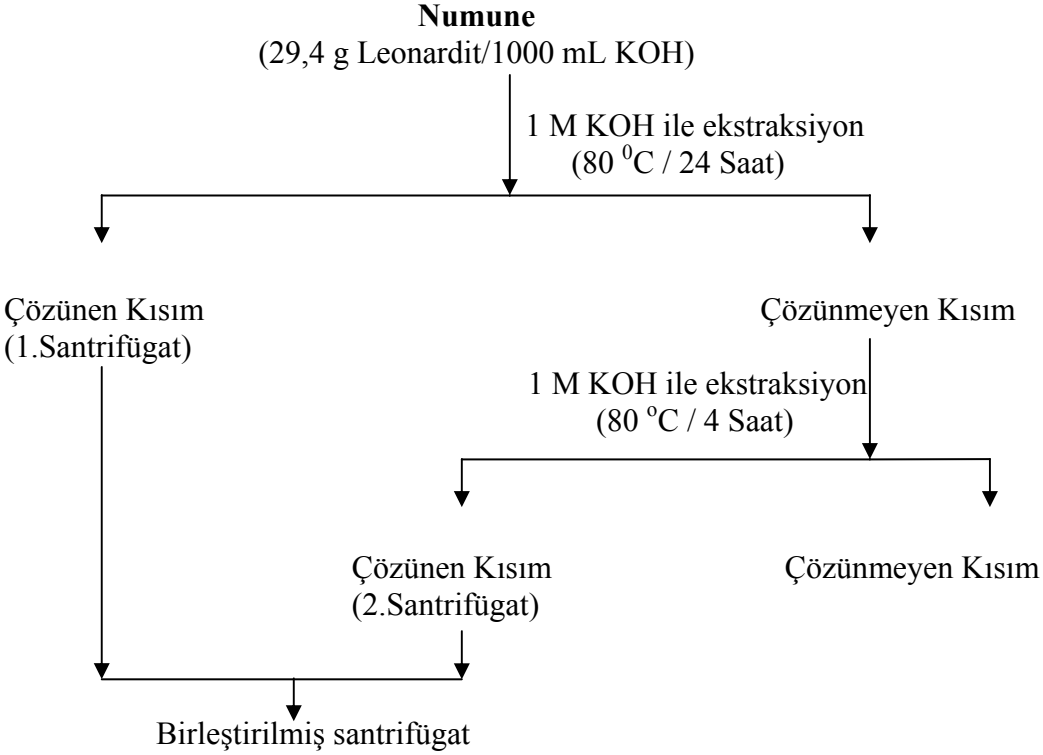
**Direkt KOH ekstraksiyonu**

Bazik olan KOH çözeltisinin kendi başına ekstraksiyon kabiliyetinin incelenmesi ve yükseltgemeli ekstraksiyon metotlarının farklılığını incelemek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

-Nem miktarı : % 30,0

-Leonardit Miktarı (Nemsiz) : 29,4 g

-Ekstraktör : 1 M KOH, pH= 13,29




Santrifügatlar birleştirilmiş ve seyreltme işlemlerine tabi tutulmuştur. Bu seyreltme işlemlerinin tümünde KOH ile pH'sı 10,5'a ayarlanmış saf su kullanılmıştır. Santrifügat çok derişik olduğu için üç aşamalı bir seyreltme işlemi uygulanmıştır. Santrifügatın hacmi ilk önce 1000 mL'ye seyreltilmiş ve ardından seyreltilmiş çözeltiden 10 mL alınarak 250 mL'ye seyreltilmiştir. Sonrasında bu çözeltiden de 0,5 mL alınarak 100 mL'ye seyreltilmiş ve bu haliyle absorbansı alınmıştır.

Santrifügat ⟶ 1000 mL $\underline{10\ mL}$ 250 mL $\underline{0{,}5\ mL}$ 100 mL

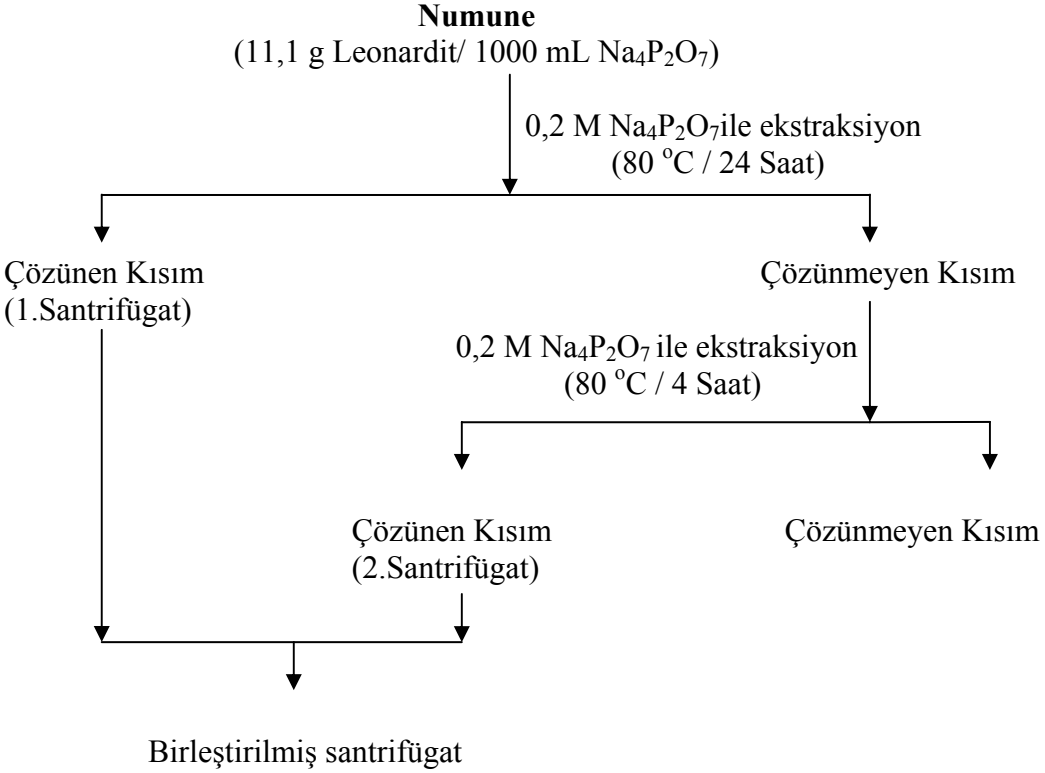
Absorbans (A) = 0,044

Toplam Hümik Madde (HM) = 25,8 **% 87,8 HM**

**Direkt $Na_4P_2O_7$ ekstraksiyonu**

Bazik ve yükseltgen bir madde olan $Na_4P_2O_7$ çözeltisinin kendi başına ekstraksiyon kabiliyetinin incelenmesi ve yükseltgemeli ekstraksiyon metotlarının farklılığını incelemek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

-Nem miktarı : % 30,0
-Leonardit Miktarı (Nemsiz) :11,1 g
-Ekstraktör : 0,2 M $Na_4P_2O_7$, pH=10,95




Santrifügat ⟶ 1000mL 0,5 mL ⟶ 100 mL A = 0,455

Toplam HM= 9,9 g **% 89,2 HM**

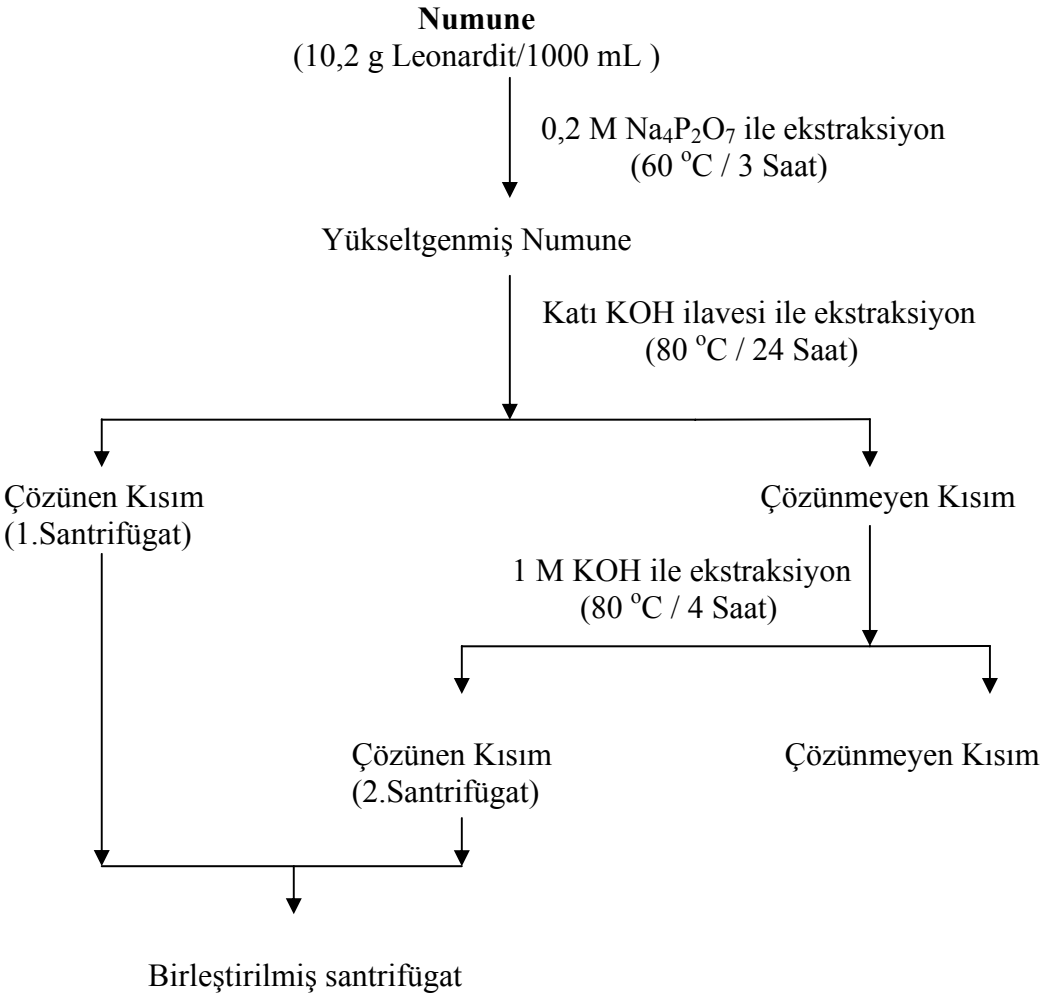
**$Na_4P_2O_7$ ön yükseltgemeli KOH ekstraksiyonu**

Bazik ve yükseltgen bir madde olan $Na_4P_2O_7$ çözeltisinin yükseltgen olarak kullanılıp, KOH çözeltisi ile yapılan ekstraksiyonlarda elde edilen hümik madde miktarındaki değişimin incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

-Nem miktarı : % 30,0

-Leonardit Miktarı (Nemsiz) : 10,2 g

-Ekstraktör : 0,2 M $Na_4P_2O_7$, pH= 10,95 / Katı KOH



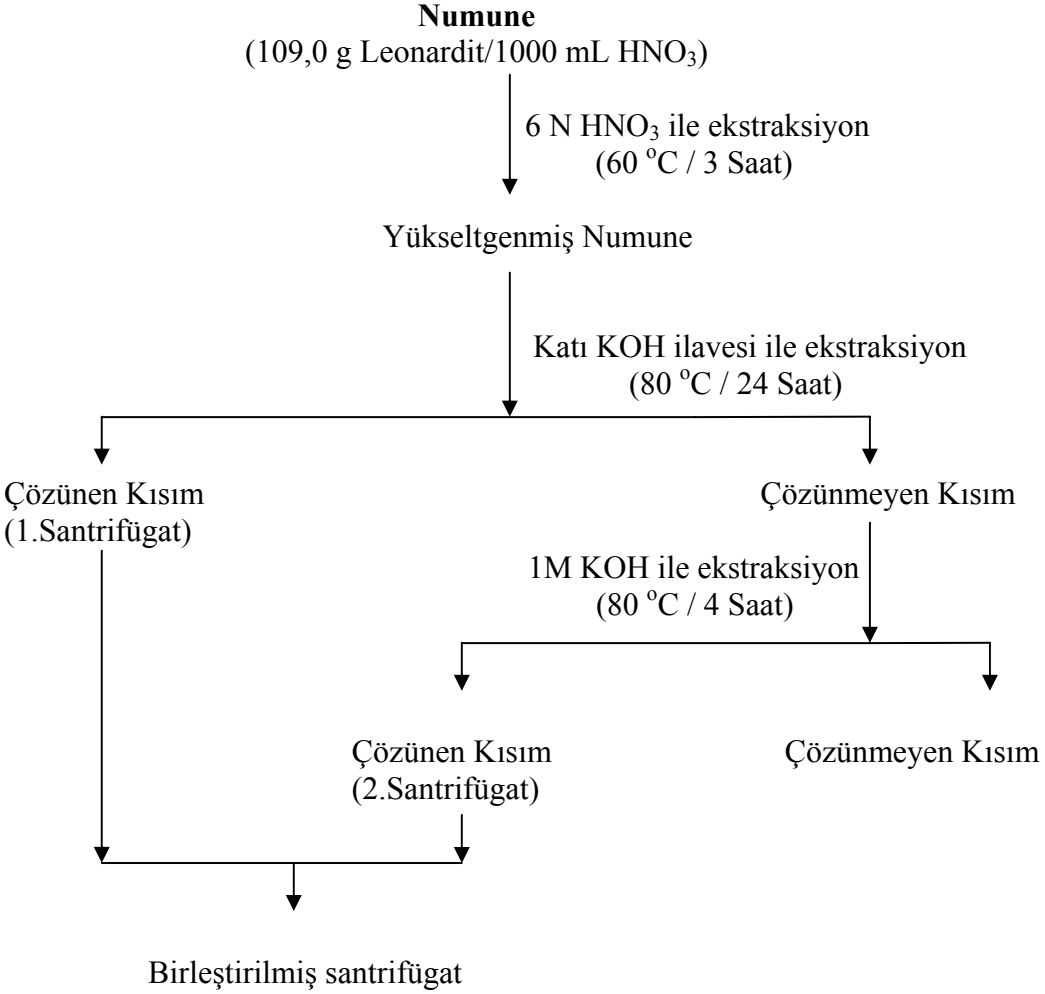

Santrifügat ⟶ 1000 mL $\underline{10\ mL}$ 250 mL $\underline{0{,}5\ mL}$ 100 mL A= 0,013

Toplam HM= 9,1 g **% 89,2 HM**

**$HNO_3$ ön yükseltgemeli KOH ekstraksiyonu**

Yükseltgen bir madde olan $HNO_3$ çözeltisinin yükseltgen olarak kullanılıp, KOH çözeltisi ile yapılan ekstraksiyonlarda elde edilen hümik madde miktarındaki değişimin incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

-Nem miktarı : % 30,05
-Leonardit Miktarı (Nemsiz) : 109,0g
-Ekstraktör : 6 N $HNO_3$, pH= 1,39 / Katı KOH




Santrifügat ⟶ 1000mL $\underline{10\ mL}$ 250 mL $\underline{0{,}5\ mL}$ 100 mL A = 0,188

Toplam HM = 103,2 g **% 94,7 HM**

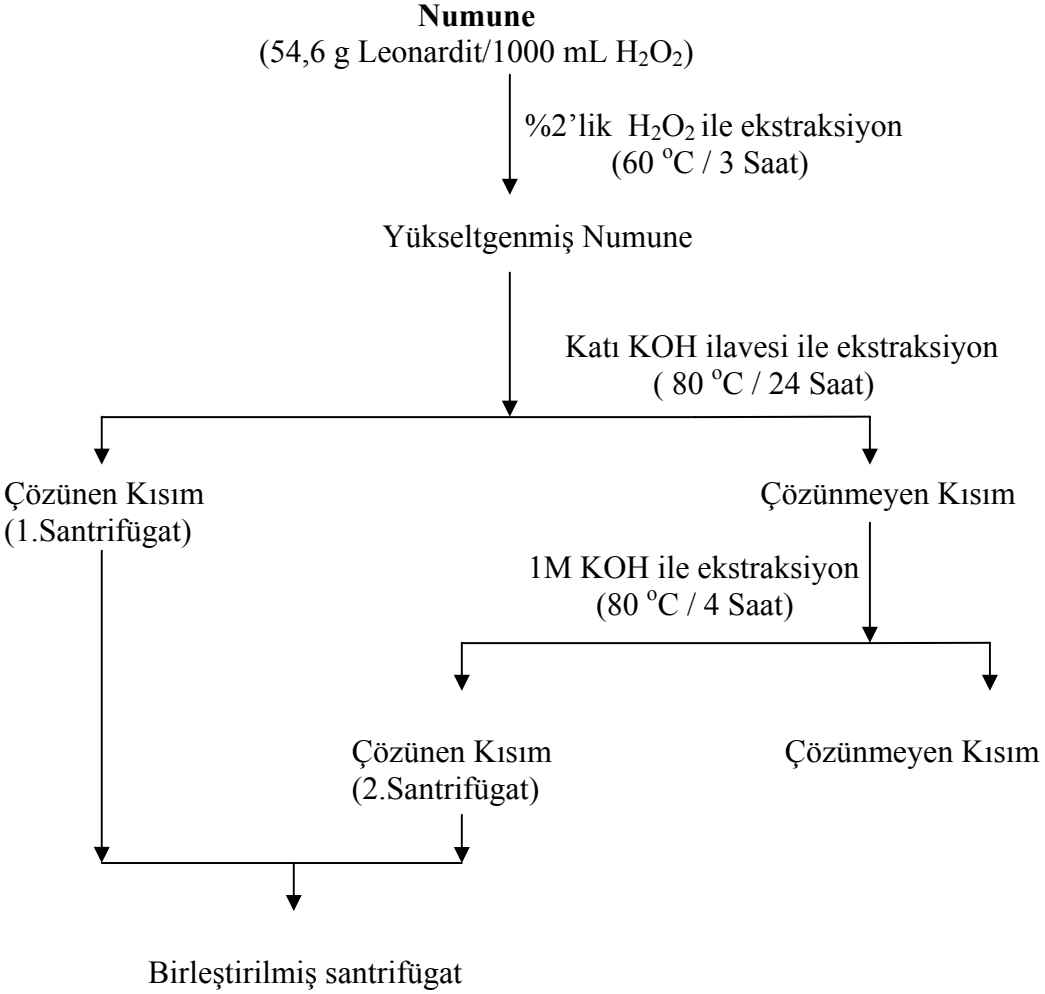
**$H_2O_2$ ön yükseltgemeli KOH ekstraksiyonu**

Yükseltgen bir madde olan $H_2O_2$ çözeltisinin yükseltgen olarak kullanılıp, KOH çözeltisi ile yapılan ekstraksiyonlarda elde edilen hümik madde miktarındaki değişimin incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

-Nem miktarı : % 30,0

-Leonardit Miktarı (Nemsiz) : 54,6 g

-Ekstraktör : %2'lik $H_2O_2$, pH= 3,20 / Katı KOH




Santrifügat ⟶ 1000 mL ⟶ 10 mL ⟶ 250 mL ⟶ 0,5 mL ⟶ 100 mL A= 0,089

Toplam HM= 50,0 g **% 91,6 HM**

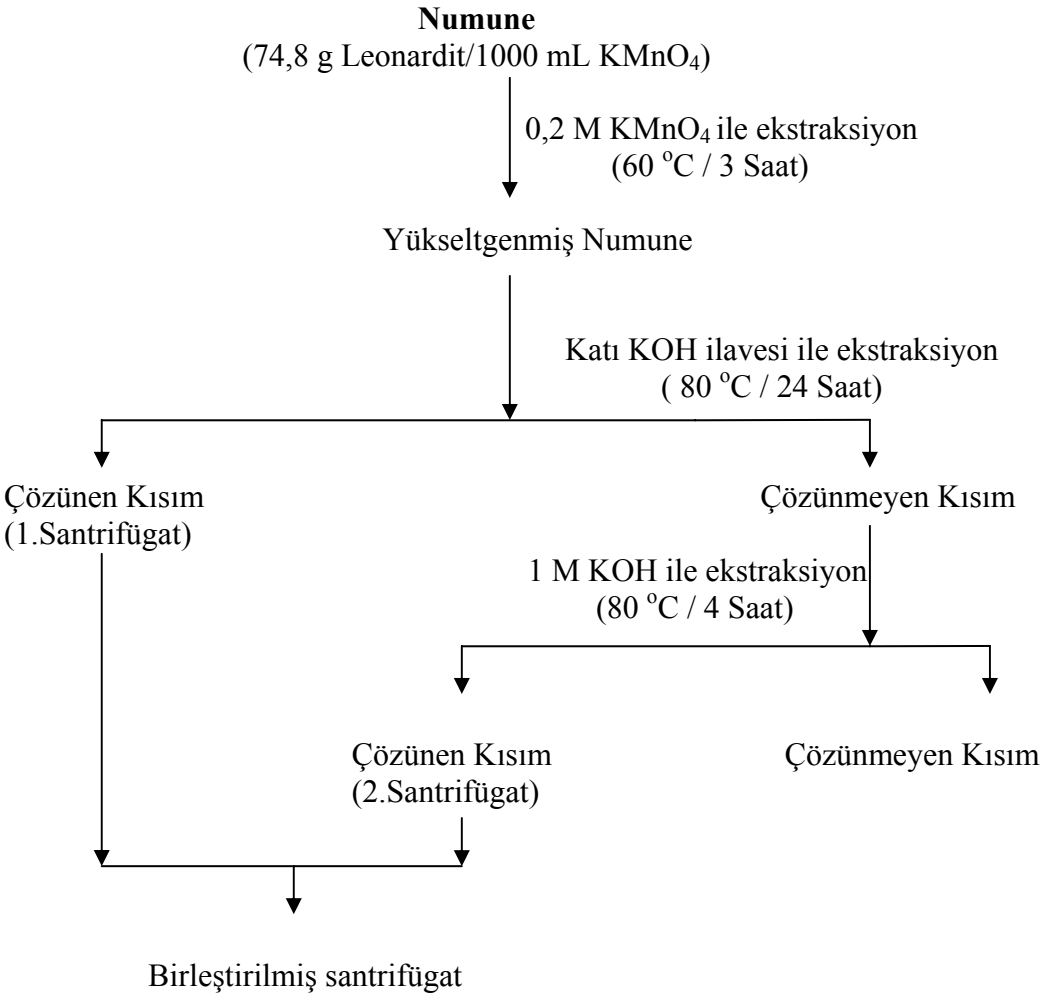
**$KMnO_4$ ön yükseltgemeli KOH ekstraksiyonu**

Yükseltgen bir madde olan $KMnO_4$ çözeltisinin yükseltgen olarak kullanılıp, KOH çözeltisi ile yapılan ekstraksiyonlarda elde edilen hümik madde miktarındaki değişimin incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

-Nem miktarı : % 30,05

-Leonardit Miktarı (Nemsiz) : 74,8 g

-Ekstraktör : 0,2 M $KMnO_4$ pH= 7,41 / Katı KOH




Santrifügat ⟶ 1000 mL $\xrightarrow{10\ mL}$ 250 mL $\xrightarrow{0,5\ mL}$ 100 mL A= 0,125

Toplam HM= 69,3 g **% 92,7 HM**

**Çizelge 7. 2.** Uygulanmış olan ekstraksiyon metotları ve bu metotlarla leonardit numunesinden elde edilen hümik madde miktarlarının değişimi

| Metot | | Konsantrasyon | Karıştırma Süresi (saat) | Sıcaklık ($^{o}$C) | % Hümik Madde Verimi |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. KOH | | 1 M | 24 | 80 | 87,8 |
| 2. $Na_4P_2O_7$ | | 0,2 M | 24 | 80 | 89,2 |
| 3. $Na_4P_2O_7$ + KOH | $Na_4P_2O_7$ | 0,2 M | 3 | 60 | 89,2 |
| | KOH | 1 M | 24 | 80 | |
| 4. $HNO_3$+ KOH | $HNO_3$ | 6 N | 3 | 60 | 94,7 |
| | KOH | 1 M | 24 | 80 | |
| 5. $H_2O_2$+ KOH | $H_2O_2$ | % 2 (W/W) | 3 | 60 | 91,6 |
| | KOH | 1 M | 24 | 80 | |
| 6. $KMnO_4$+KOH | $KMnO_4$ | 0,2 M | 3 | 60 | 92,7 |
| | KOH | 1 M | 24 | 80 | |

**Çizelge 7.2.**'de leonardit numunesine uygulanan yükseltgemeli ve yükseltgemesiz 6 farklı ekstraksiyon metodu ve bu metotlardan elde edilen hümik madde (Hümik asit + Fülvik asit) miktarları verilmiştir.

**Çizelge 7.2.**'de belirtilen ve ön yükseltgeme işlemi içermeyen ilk iki ekstraksiyon metodu incelendiğinde, daha zayıf bazik özellik gösteren $Na_4P_2O_7$'ın, KOH'e göre daha iyi bir verime sahip olduğu görülmektedir. Bu sonucun KOH'in sadece bazik özellik gösterirken; $Na_4P_2O_7$'ın hem bazik özellik hem de yükseltgeme özelliği göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Fakat ön yükseltgemeli ekstraksiyon metotlarının verimleri incelendiğinde, $Na_4P_2O_7$'ın diğer yükseltgenlere göre yükseltgeme özelliği nispeten zayıf olmuştur (**Çizelge 7.2.**). Ayrı bir yükseltgene ihtiyaç olmadan yapılacak ekstraksiyonlarda, $Na_4P_2O_7$ hem yükseltgeme hem de bazik ekstraktör özelliğiyle öne çıkmaktadır fakat daha yüksek verimler elde edilmek istendiğinde, daha güçlü bir yükseltgen ve daha bazik bir ekstraktör içeren metotlara ihtiyaç duyulmuştur. **Çizelge 7.2.**'deki ön yükseltgemeli metotlar incelendiğinde, en düşük verimin $H_2O_2$-KOH metoduna ait olduğu görülmektedir. Bu sonucun, yükseltgeme işlemi esnasında 60 $^oC$'a varan sıcaklığın tesiriyle $H_2O_2$'nin **Eşitlik 7.1**'deki reaksiyonu vererek bozunmaya uğramasından ileri geldiği düşünülmektedir.

$$2H_2O_{2\,(aq)} \xrightarrow{\text{ISI}} 2H_2O_{(aq)} + O_{2(g)} \qquad (7.1)$$

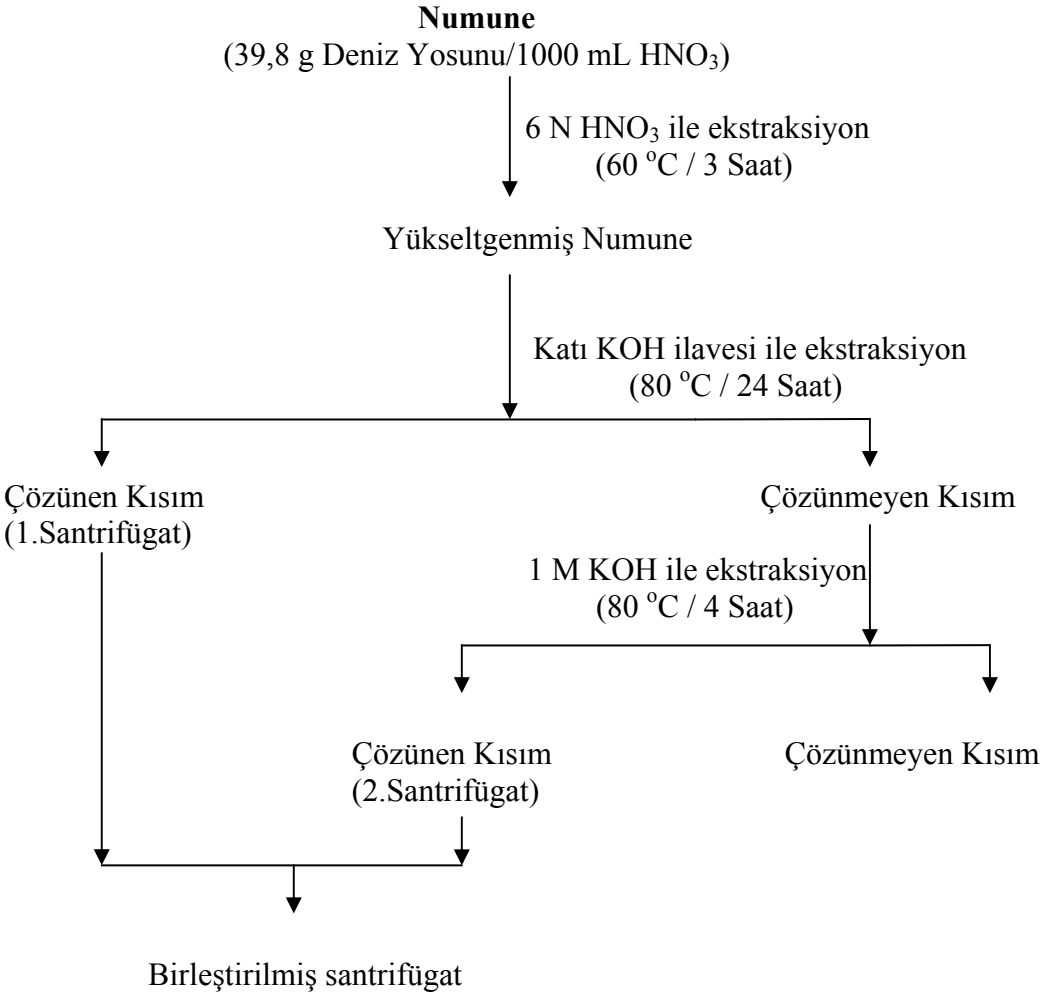
Yapılmış olan yükseltgenme işlemleriyle hümik madde kaynağındaki metoksi (-$OCH_3$) gruplarının karboksilik asit (-COOH) gruplarına dönüşmesi sonucu artan fonksiyonel grup miktarı ile ekstraksiyon veriminin arttığı düşünülmektedir. Ön yükseltgemeli alkali ekstraksiyon metotlarının, leonarditten ekstrakte edilebilen hümik madde miktarını artırdığı gözlemlenmiş (Tarhan ve ark., 2010) ve diğer yükseltgemeli metotlarla karşılaştırıldığında en yüksek hümik madde veriminin %94,7'le $HNO_3$-KOH ön yükseltgemeli alkali ekstraksiyon metoduna ait olduğu görülmüştür. Bu sebeple diğer biyokimyasal numunelerden hümik maddelerinin izolasyonu için $HNO_3$-KOH metodu temel alınmış ve ekstraksiyonları gerçekleştirilerek hümik madde miktarları hesaplanmıştır.

### 7.1.2.2 Deniz yosunu numunesindeki hümik madde miktarının hesaplanması

-Nem miktarı : % 4,8

-Deniz Yosunu Miktarı (Nemsiz) : 39,8 g

-Ekstraktör : 6 N $HNO_3$, pH= 1,39 / Katı KOH




Santrifügat ⟶ 1000 mL 0,5 mL ⟶ 100 mL A= 0,552

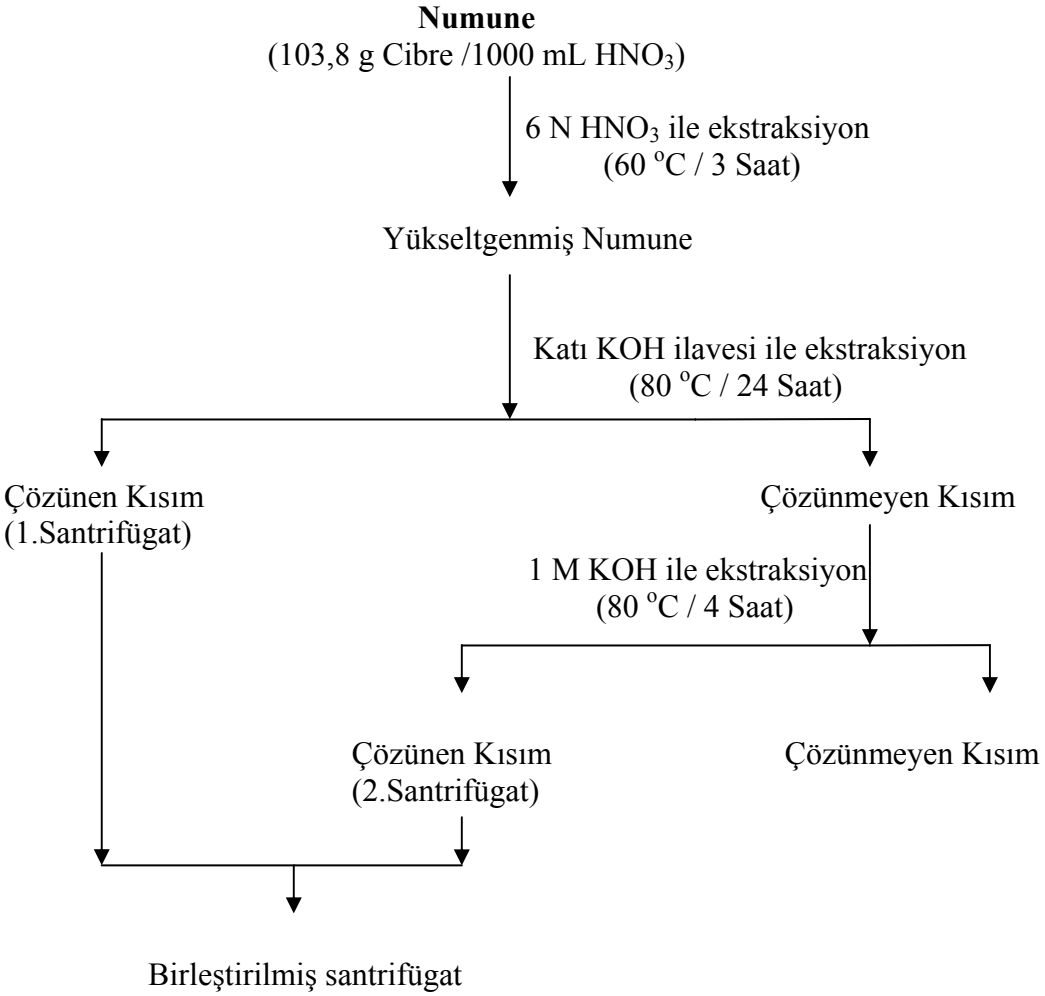
Toplam HM = 12,0 g **% 30,2 HM**

### 7.1.2.3 Cibre numunesindeki hümik madde miktarının hesaplanması

-Nem miktarı : % 73,9

-Cibre Miktarı (Nemsiz) : 103,8 g

-Ekstraktör : 6 N $HNO_3$, pH= 1,39 / Katı KOH




Santrifügat ⟶ 1000 mL $\xrightarrow{10\ mL}$ 250 mL $\xrightarrow{0,5\ mL}$ 100 mL A= 0,047

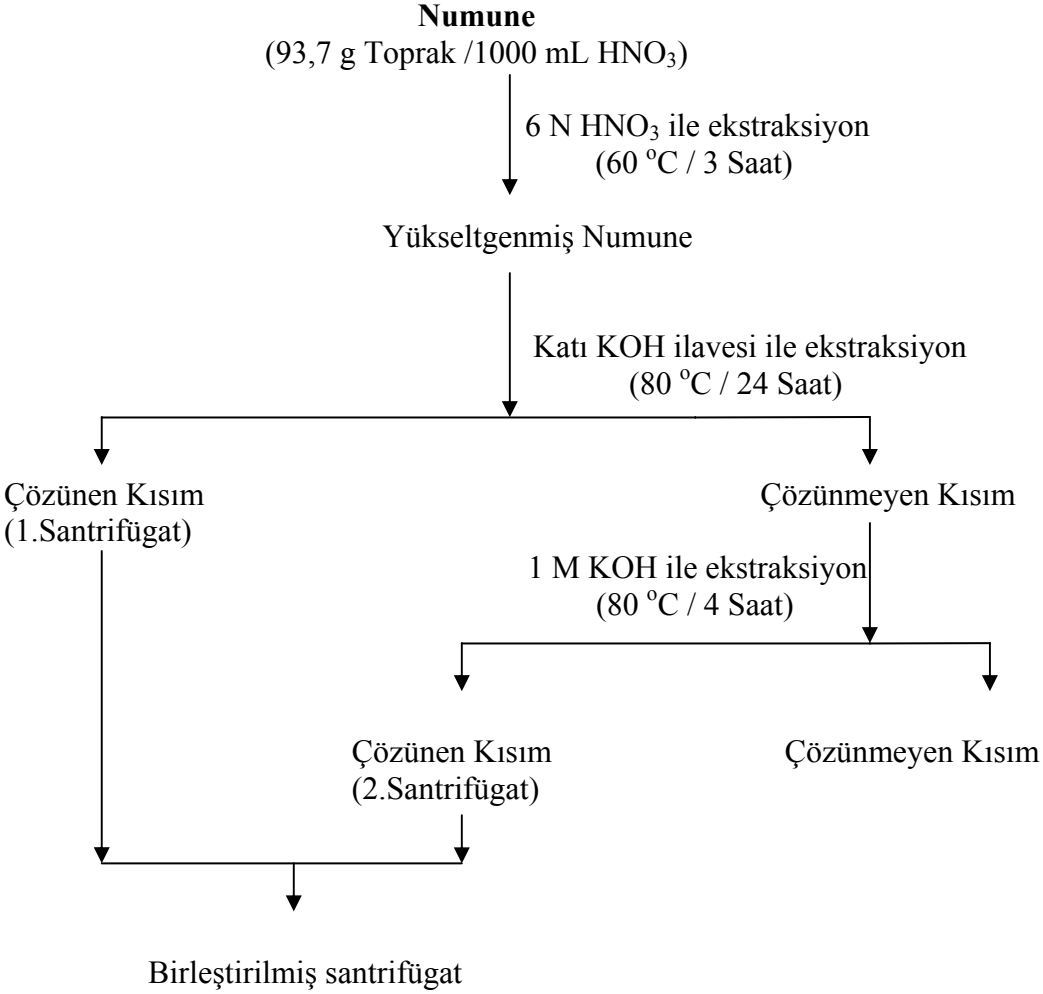
Toplam HM = 27,4 g **% 26,4 HM**

### 7.1.2.4 Toprak numunesindeki hümik madde miktarının hesaplanması

-Nem miktarı : % 28,3

-Toprak Miktarı (Nemsiz) : 93,7 g

-Ekstraktör : 6 N $HNO_3$, pH= 1,39 / Katı KOH




Santrifügat ⟶ 1000 mL ⟶ 10 mL ⟶ 250 mL ⟶ 1 mL ⟶ 100 mL A=0,074

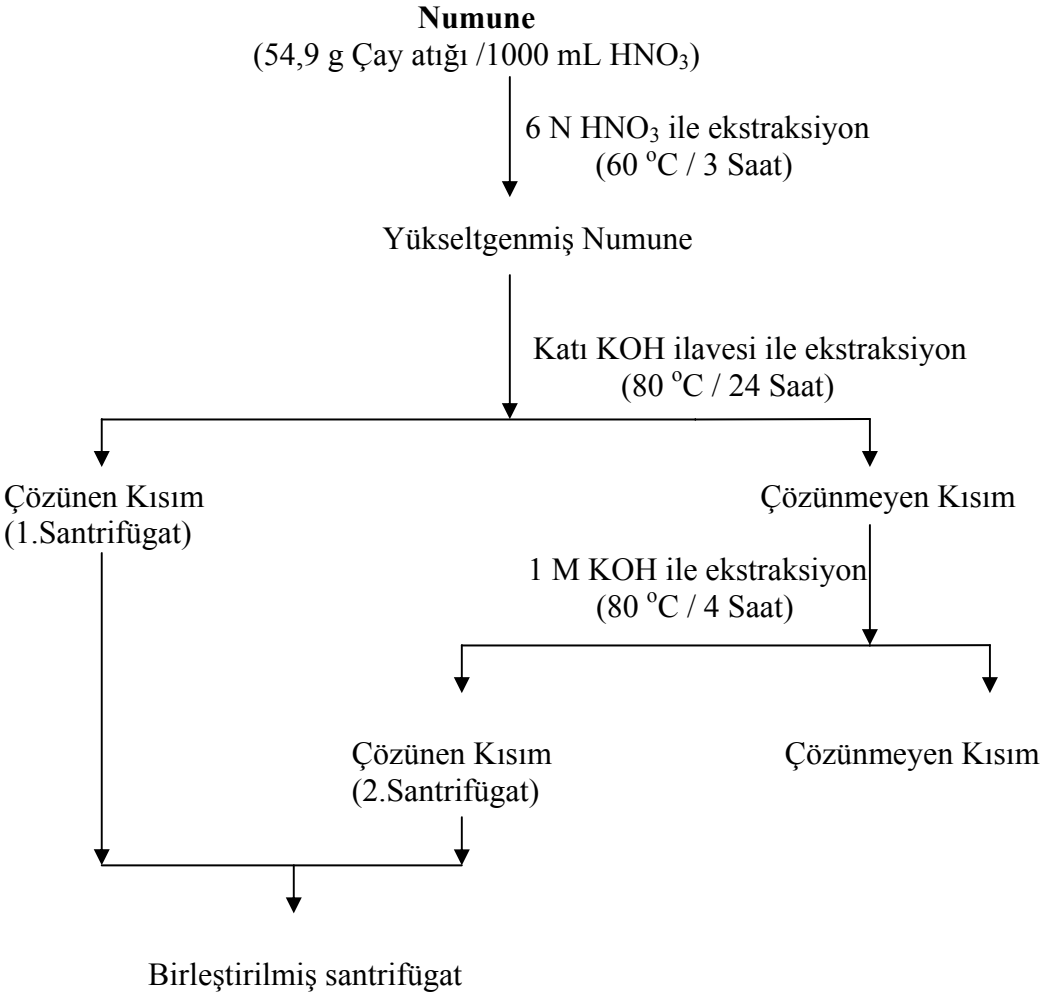
Toplam HM = 20,9 g **% 22,3 HM**

### 7.1.2.5 Çay atığı numunesindeki hümik madde miktarının hesaplanması

-Nem miktarı : % 7,0

-Çay Miktarı (Nemsiz) : 54,9 g

-Ekstraktör : 6 N $HNO_3$, pH= 1,39 / Katı KOH




Santrifügat ⟶ 1000 mL 0,5 mL 100 mL A = 0,539

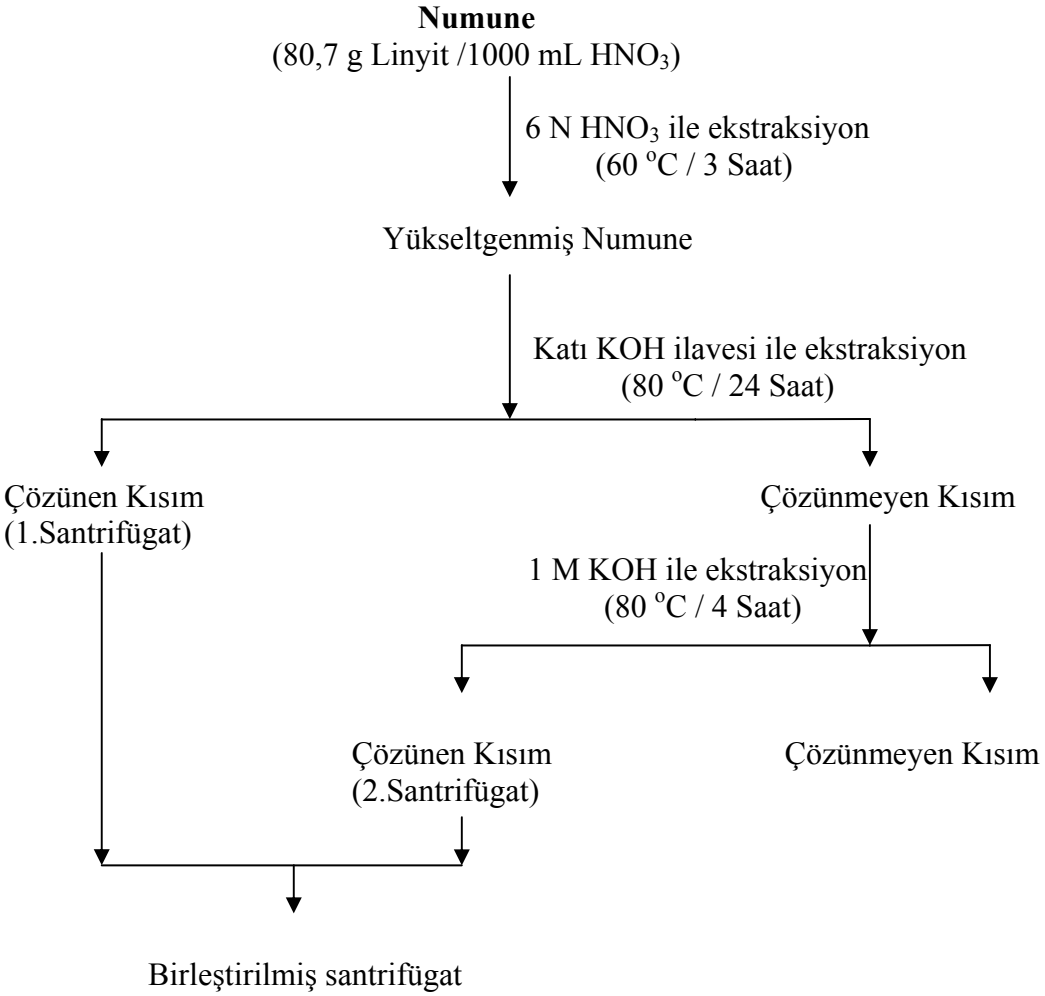
Toplam HM = 11,8 g **% 21,5 HM**

### 7.1.2.6 Linyit numunesindeki hümik madde miktarının hesaplanması

-Nem miktarı : % 22,3

-Linyit Miktarı (Nemsiz) : 80,7 g

-Ekstraktör : 6 N $HNO_3$, pH= 1,39 / Katı KOH




Santrifügat ⟶ 1000 mL 0,5 mL ⟶ 100 mL A= 0,597

Toplam HM = 12,9 g **% 16,0 HM**

**Çizelge 7. 3.** Biyokimyasal numunelerin hümik madde miktarları

| Numune | % Hümik Madde Miktarı |
|---|---|
| Leonardit | 94,7 |
| Deniz Yosunu | 30,2 |
| Cibre | 26,4 |
| Toprak | 22,3 |
| Çay | 21,5 |
| Linyit | 16,0 |

**Çizelge 7.3.** incelendiğinde, hümik madde verimi açısından leonardit numunesi diğerlerine göre büyük bir farkla öne çıkmıştır. Bu durum, günümüzde hümik madde kaynağı olarak en çok tercih edilen madenin leonardit olması sebebiyle beklenilen bir sonuç olmuştur. Leonarditi deniz yosunu numunesi takip etmiş ve diğer elde edilen hümik madde miktarları **Çizelge 7.3.**'teki azalan sırada verilmiştir.

Deniz yosunu numunesi, leonardit hariç diğer numunelerden büyük olan hümik madde yüzdesiyle öne çıkmıştır. Bu sonucun, deniz yosunun sahip olduğu yüksek organik madde ve besin miktarından ileri geldiği düşünülmektedir.

Üzümün suyu alındıktan sonra geri kalan kısmı olan cibre numunesinin de deniz yosununa yakın bir hümik madde oranına sahip olduğu görülmüştür. Bu durumdan, cibre numunesinin de yüksek bir organik madde içeriğine sahip olduğu söylenebilmektedir.

Hümik madde oranı bakımından cibreden sonra gelen toprak ve çay atığı numunelerinin hümik madde oranları birbirine yakın değerlerde çıkmıştır.

En düşük hümik madde içeriğine sahip biyokimyasal numune linyit olmuştur. Kömürleşme evrelerinde ilerleyen zamanla birlikte organik madde miktarı azalmaktadır (Kara, 1988). Linyitin de kömürleşme evrelerinin son basamak ürünlerinden biri olması sebebiyle böyle bir sonucu verdiği düşünülmektedir.

### 7.1.3 FTIR analizleri

Hümik asitlerin farklı dalga sayısı bölgelerine ait titreşim bantları **Çizelge 7.4.**'te verilmiştir. $HNO_3$ ön yükseltgemeli KOH ekstraksiyon metodu ile izole edilen hümik asitler saflaştırılıp kurutulduktan sonra KBr ile pellet oluşturulmadan FTIR cihazı ile spektrumları alınmıştır (**Şekil 7.1. (a) ve Şekil 7.1. (b)**). Hümik asitler hetereomoleküler bir yapıya sahip olmalarının yanı sıra fenolik ve karboksilik hidroksil fonksiyonel gruplarını ağırlıklı olarak içermektedirler. Bu sebeple de hümik asitlerin IR spektrumlarında ilk bakılan bant bölgesi 1700 $cm^{-1}$ civarı olmaktadır. **Şekil 7.1. (b)** incelendiğinde 6 hümik asidin de 1700 $cm^{-1}$ civarında verdikleri bantlar görülmektedir.

Ayrıca biyokimyasal numunelerden ekstrakte edilen tüm hümik asitler 1270 $cm^{-1}$ dalga boyu civarında geniş bir alanda bant vermiştir. Bunun ise yapılan yükseltgeme işlemiyle bağlanan nitrat gruplarından geldiği düşünülmektedir (**Şekil 7.1. (b)**).

**Şekil 7.1. (a) ve Şekil 7.1. (b)**'de verilmiş olan 6 spektrumun parmak izi bölgeleri (1400-650 $cm^{-1}$) incelendiğinde birbirine benzeyen ikili bantlar göze çarpmaktadır. Bu bantlar:

- Çay atığı – Cibre
- Deniz yosunu – Toprak
- Linyit – Leonardit

şeklinde gruplanmışlardır. Bu durum, benzer kökene sahip olan biyokimyasal kaynaklı hümik asitlerin benzer IR spektrumları vermesi olarak yorumlanmıştır.

Her ikisi de organik birer atık olan çay atığı ve cibre birbirine çok benzer bir spektrum vermiştir (**Şekil 7.1. (a) ve Şekil 7.1. (a)**). Ayrıca 2920-2850 $cm^{-1}$ civarında verdikleri alifatik ve metoksi bantları, içerdikleri organik madde miktarına dikkat çekmektedir (**Şekil 7.1 (a)**).

Toprak ve deniz yosunu numuneleri de birbirlerine benzer spektrumlar vermiştir (**Şekil 7.1. (b)**). Ayrıca sadece bu iki numune hafif birer kayma ile 1700 $cm^{-1}$ yerine 1684 $cm^{-1}$ dalga boyu civarında bant vermişlerdir.

Gruplanmanın sonuncusu ise, spektrumları hemen hemen birbirinin aynı olan leonardit ve linyite aittir (**Şekil 7.1. (b)**). Her ikisi de kömürleşme basamaklarının birer

ürünü olduğu ve benzer kökene sahip oldukları için titreşim bantları da aynı bölgelerde ve benzer çıkmıştır.

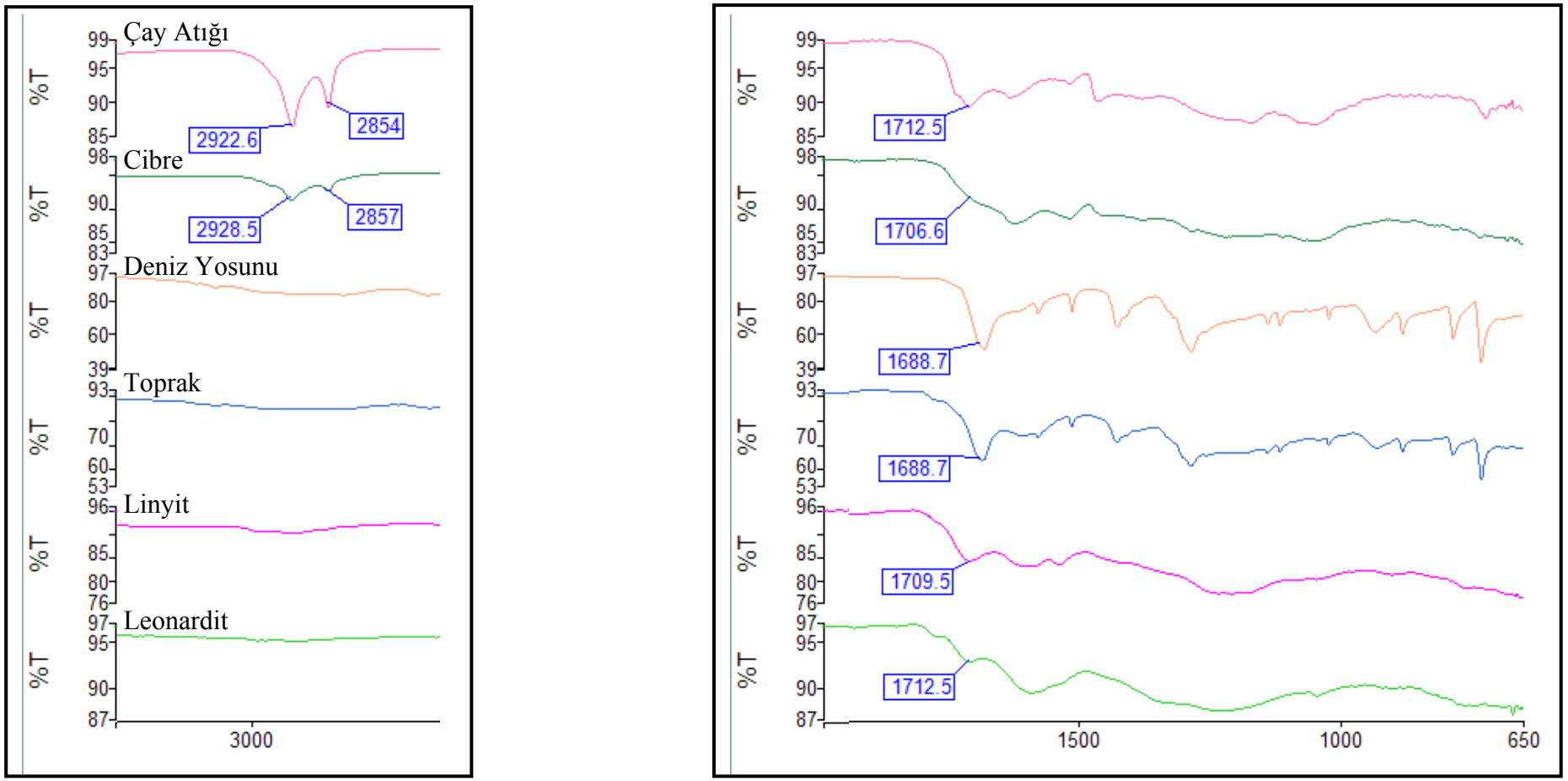
**Çizelge 7. 4.** Hümik asit FTIR spektrumunun bant titreşim bölgeleri (Tatzber ve ark., 2007)

| **Dalga sayısı ($cm^{-1}$)** | **Titreşim** |
|---|---|
| 3700-2200 | OH ve $-NH_3^+$, $-NH_2^+$, $-CO-NH_2$, -CO-NH-, S-H, P-H gruplarından geldiği varsayılan küçük katkılar[b] |
| 3050 | Aromatik gruplar[a] |
| 2920-2850 | Alifatik gruplar[a], metoksi grupları[b] |
| 1700 | Karboksil gruplarının karbonil titreşimleri, aldehitler ve ketonlar[a], ve esterlerin karbonil gruplarından geldiği varsayılan katkılar[b] |
| 1650 | Amit gruplarının C=O ve kinon ketonlarının C=O titreşimleri[a], nitrat ($R-O-NO_2$) ve nitritlerden (R-O-NO) katkılar[b] |
| 1550 | COO-, $-C-NO_2$ ve C=C[a] |
| 1500 | N-H, C=N ve C=C[a] |
| 1450 | Alifatik C-H[a] |
| 1420 | Primer amitlerin C=N titreşimleri[a], COO- tarzı gruplardan geldiği varsayılan katkılar[b] |
| 1360 | $-CO-CH_3$ ve nitrattan geldiği varsayılan titreşimler[b] |
| 1315 | Sülfone grupları($SO_2$); 1330-1050 arasındaki bir alanda bulunan esterlerde görülmesi gereken iki banttan biri[b] |
| 1270 | Nitratlar($R-O-NO_2$), =C-O-C grupları ve P=O[b] ve fenolik grupların C-O[c] titreşimlerinden geldiği tahmin edilen katkılar |
| 1210 | COOH'ın OH ve C-O titreşimleri, fenol ve aril eterlerinin C-O grupları[a], tersiyer alkol ve P-O-aril'den geldiği tahmin edilen titreşimler |
| 1120 | Alifatik OH-gruplarının C-OH titreşimleri[a], sülfoneler[b] |
| 1075 | Alkollerin C-O grupları ve alifatik eterlerin C-O grup titreşimleri |
| 1020 | Polisakkaritlerin ya da benzer maddelerin C-O grupları ve silikatlardan gelen Si-O[a], S=O, P-O-alkil ya da =C-O-C'dan geldiği varsayolan katkılar[b] |
| 900 | $R_2C=CH_2$ grupları[b] |
| 873-728 | Aromatik C-H[a], daha az subsitüte olmuş halkalar daha düşük dalga boylarında görülür[b] |
| 794 | 2 ya da 3 komşu H ve/veya izole H içeren benzen halkaları, $R_2C=CRH$ grupları ve nitratlar[b] |
| 766 | $sp^3$-$CH_2$ grupları ve 4 ve/veya 5 komşu H içeren benzen halkaları[b] |

[a] (Senesi, 2003)

[b] (Hesse, 2005)

[c] (Francioso, 1998)




**(a)** **(b)**

**Şekil 7. 1.** Biyokimyasal kaynaklardan elde edilen hümik asitlerin IR spektrum bölgeleri: (a) 2920-2858 $cm^{-1}$, (b) 1600-650 $cm^{-1}$

## 7.2 Akış Enjeksiyon Analizleri Ön Denemeleri

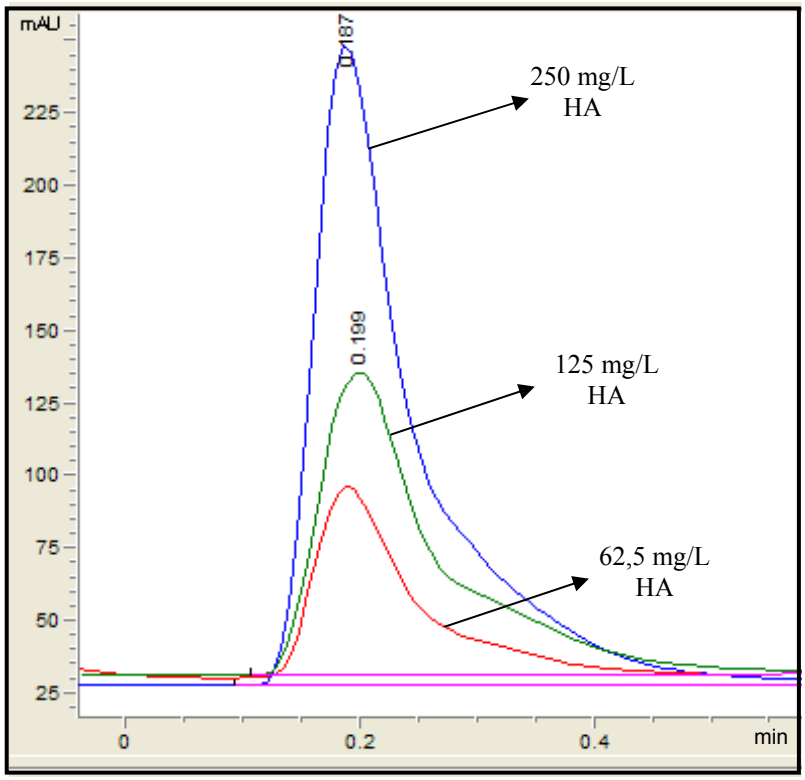
### 7.2.1 Hareketli faz denemeleri

#### 7.2.1.1 n-Propanol ile gerçekleştirilen analizler

Akış enjeksiyon analizlerinde ilk denemelere, HPLC sistemde var olan sistem bağlantıları (Color Code: Orange ID: 0.50 mm) ve n-propanol hareketli fazıyla başlanmıştır. Bu fazda 62,5; 125 ve 250 mg/L konsantrasyonuna sahip hümik asit (HA) standartları aşağıda verilen metoda göre sisteme ardı ardına 3 kez sırasıyla verilip pikler elde edilmiştir.

**Metot:**

| | |
|---|---|
| Hareketli Faz | : n-propanol |
| Akış Hızı | : 1 mL/dk |
| Numune Hacmi | : 10 µL |
| Enjeksiyon Tipi | : Numune çekme (N) - enjeksiyon (I) |
| Kullanılan Dalga Boyu | : 450 nm |
| Sıcaklık | : 20 $^{o}$C |



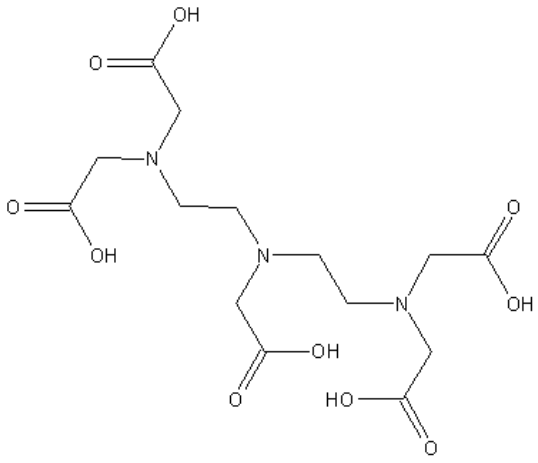

**Şekil 7. 2.** n-propanol hareketli fazında sisteme enjekte edilen 3 HA standardı pikinin bir arada gösterilişi

**Şekil 7.2.**'de görüleceği üzere bu hareketli faz kullanılarak yapılan denemelerde istenilen düzgünlükte pikler elde edilememiştir. Bunun ise, zayıf asidik özellikte olan n-propanolün hümik asitlerin çözünürlüğünü düşürerek kısmi bir koagüleşme meydana getirmesinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir.

Hümik asitler bazik ortamda çözünme, asidik ortamda da çökme özelliği sergiledikleri, 11 ve üzeri pH'ların da mevcut HPLC sisteminin degazör ve diğer kısımlarına zarar vermesi sebebiyle; hümik asitleri çöktürmeyecek kadar yüksek ve HPLC sistemine zarar vermeyecek kadar düşük bir pH değerine (8-11) sahip olan hareketli fazlara yönelinmiştir.

### 7.2.1.2 Sitrat/Fosfat tamponunu ile gerçekleştirilen analizler

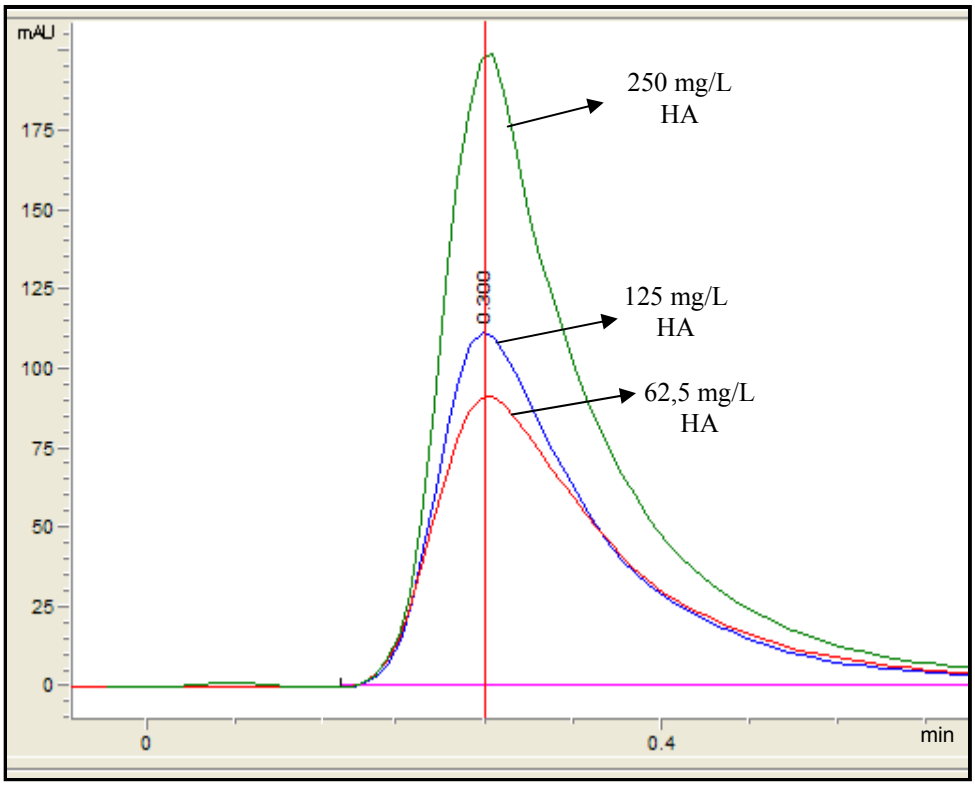
1,513 g sitrik asit ile 2,732 g $Na_3PO_4$'ın 1 L ultra saf su içersinde çözülmesiyle elde edilen bu fazda 62,5, 125 ve 250 mg/L konsantrasyonuna sahip HA standartları aşağıda verilen metoda göre sisteme ardı ardına 3 kez sırasıyla verilip pikler elde edilmiştir. Ayrıca ilk olarak bu denemelerde hümik asit standartlarının absorbanslarını artırması düşünülen DTPA (Dietilentriaminpentaasetikasit)'in 0,002 M'lık sulu çözeltisi, hümik asitlerle karıştırılıp sisteme enjekte edilmiştir (**Şekil 7.3.**).




**Şekil 7. 3.** DTPA molekülü

**Metot:**

| | |
|---|---|
| Hareketli Faz | : Sitrat/Fosfat tamponu pH=7 |
| Akış Hızı | : 1 mL/dk |
| Numune Hacmi | : 10 µL |
| Reaktif | : Sulu DTPA |
| Enjeksiyon Tipi | : N - reaktifle karıştırma (R) - I |
| Kullanılan Dalga Boyu | : 450 nm |
| Sıcaklık | : 20 $^{o}$C |




**Şekil 7. 4** Sitrat/Fosfat tamponu hareketli fazında sisteme enjekte edilen 3 HA standardı pikinin bir arada gösterilişi

Bu faz ile yapılan denemelerde bozuk pikler elde edilmesi (**Şekil 7.4.**) ve bu tamponun tuzu halinde birikerek HPLC sisteminin bağlantı birimlerine zarar vermesi üzerine diğer denemeye geçilmiştir.

### 7.2.1.3 DTPA çözeltisi ile gerçekleştirilen analizler

DTPA çözeltisinin hazırlanması:

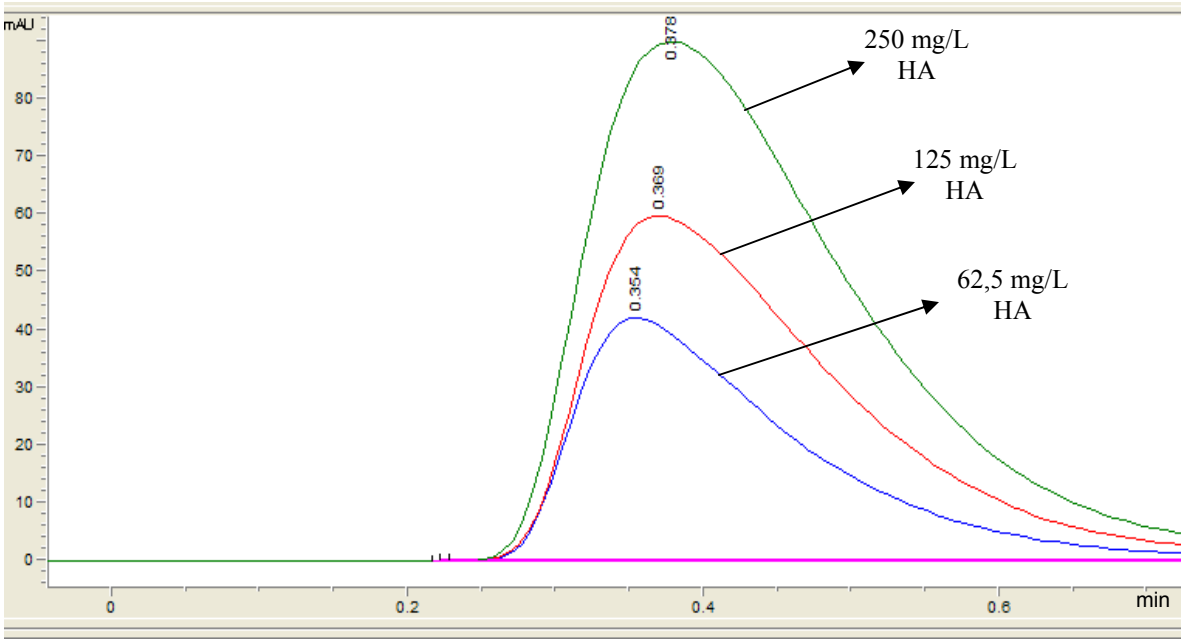
(20 mL Etanol)
+
(4 mL 0,002 M DTPA)

} Ultra saf su ile hacim 1000 mL'ye tamamlandı ve Sulu NaOH ile pH'sı 10,5' a ayarlandı.

DTPA çözeltisinin hareketli faz olarak kullanıldığı deneylerde 62,5; 125 ve 250 mg/L konsantrasyonuna sahip HA standartları aşağıda verilen metoda göre sisteme ardı ardına 3 kez sırasıyla verilip pikler elde edilmiştir. Bu metotta DTPA, hareketli fazda hâlihazırda mevcut olduğu için ayrı bir reaktif ilavesi basamağı olmadan analizler gerçekleştirilmiştir.

**Metot:**

| | |
|---|---|
| Hareketli Faz | : DTPA çözeltisi pH=10,5 |
| Akış Hızı | : 1 mL/dk |
| Numune Hacmi | : 10 µL |
| Reaktif | : Yok |
| Enjeksiyon Tipi | : N - I |
| Kullanılan Dalga Boyu | : 450 nm |
| Sıcaklık | : 20 $^{o}$C |

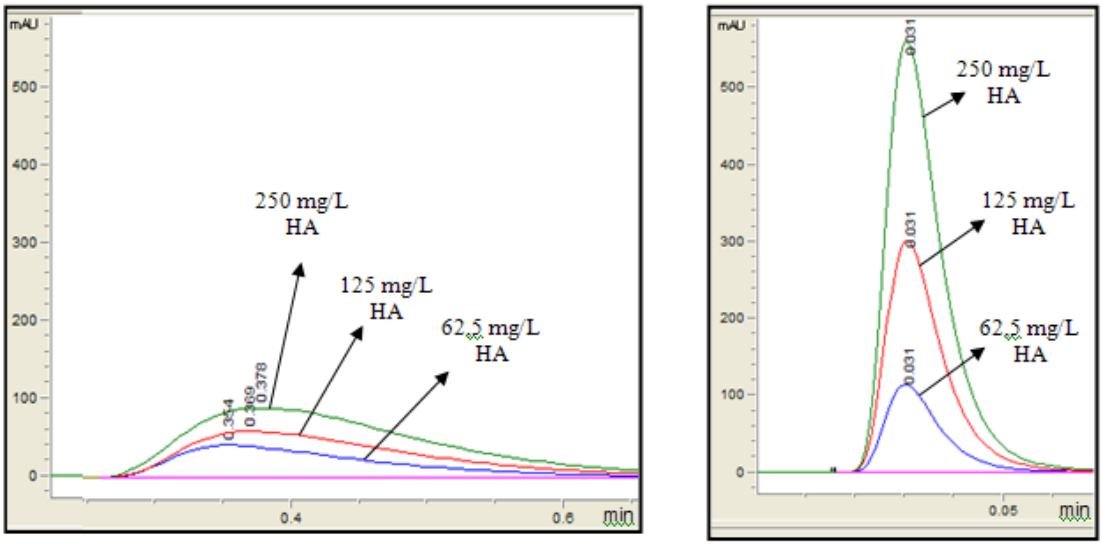



**Şekil 7. 5.** DTPA çözeltisi hareketli fazında sisteme enjekte edilen 3 HA standardı pikinin bir arada gösterilişi

Bu hareketli fazla yapılan denemelerde istenilen düzgünlükte ve aynı çıkış zamanına sahip pikler elde edilmiştir (**Şekil 7.5.**). Bu sebeple bundan sonraki diğer denemeler için hareketli faz olarak DTPA çözeltisi seçilmiştir.

### 7.2.2 Sistem bağlantılarının etkisi

Hümik asitlerin tayini için geliştirilen FIA sistemi ile yapılan analizlerde çıkış zamanının kısalması ve daha simetrik pikler elde edilmesi amacıyla sistemde var olan akış bağlantı hatları (Color Code: Orange ID: 0,50 mm) yenilenerek iç çapı 0,18 mm olan (Color Code: Yellow, ID: 0,18 mm) bağlantı hatları takılmıştır. Sisteme bu haliyle 62,5; 125 ve 250 mg/L konsantrasyonlarına sahip HA standartları enjekte edilerek sonuçlar yorumlanmıştır.




**(a)** **(b)**

**Şekil 7. 6.** Sistem bağlantılarının değişiminin pikler üzerindeki etkisi: (a) Eski sistemle elde edilen HA pikleri (iç çapı: 0,50 mm), (b) yeni sistemle elde edilen HA pikleri (iç çapı: 0,18mm)

**Şekil 7.6.**'da görüleceği gibi sistem bağlantılarının iç çapının küçültülmesi ile elde edilen pikler daha simetrik ve keskin olmuştur. Ayrıca bu sayede piklerin çıkış ve sonlanma zamanlarında gözle görülür bir azalma meydana gelmiştir. Eski sistemde yaklaşık 0,2 dakikada çıkmaya başlayıp 1 dakikada sonlanan HA pikleri, yeni sistem bağlantılarıyla 0,1 dakikadan az bir sürede çıkıp sonlanmıştır. Bu ise şöyle yorumlanmıştır: Akış enjeksiyon yöntemlerinde temel prensip, enjekte edilen numunenin hareketli faz içersinde dağılıp bant genişlemesine uğramadan detektörde okunmasıdır. Değiştirilen sistem bağlantıları eskisine göre daha az bir iç hacme sahip olmuş ve bu da ilerleyen hareketli fazın hızını artırmıştır. Artan bu hız piklerin daha erken çıkmasına, numunenin hareketli fazla dağılmamasına ve dolayısıyla daha simetrik

ve keskin pikler elde edilmesine imkan vermiştir. Bu sebeple de sonraki denemelerde, iç çapı 0,18 mm olan bağlantı birimleri ile analizler gerçekleştirilmiştir.

### 7.2.3 Enjektör yıkama etkisi

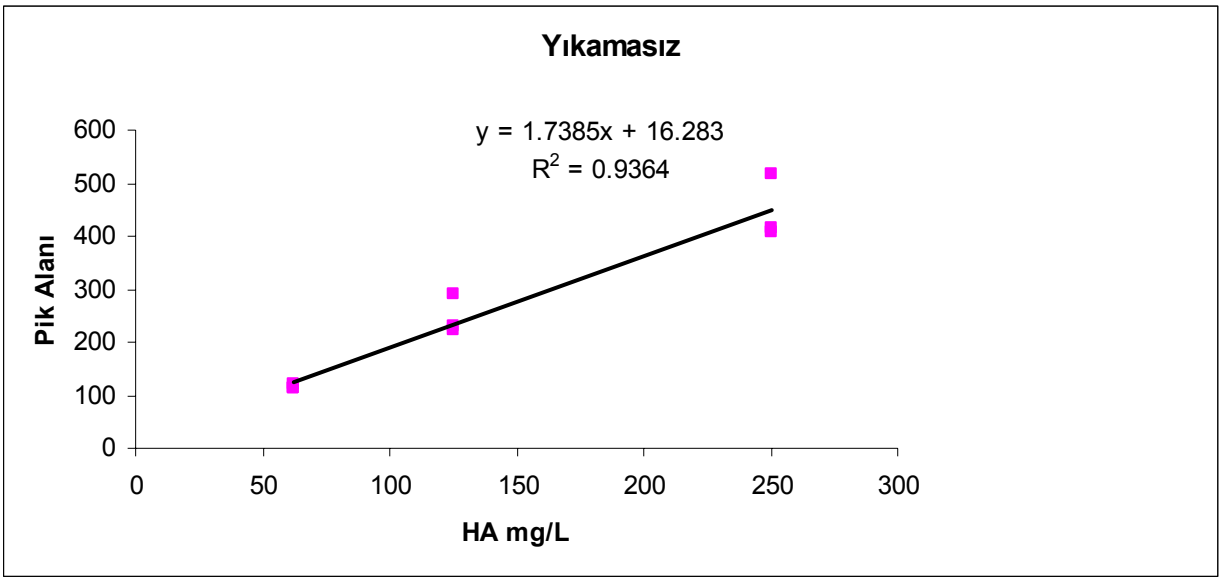
DTPA hareketli fazıyla yapılan denemelerde enjektör iğnesinin numune çekmeden önce yıkanmasının analizlerin tekrarlanabilirliği üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla otomatik enjektörün enjeksiyon programına, numune çekmeden önce yıkama komutu eklenmiştir. Yapılan tekrarlı analizlerden elde edilen pik alanları, hümik asit konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilerek elde edilen kalibrasyon grafiklerinin $R^2$ katsayılarına göre yorumlamalar yapılmıştır.

**Yıkamasız Metot:**

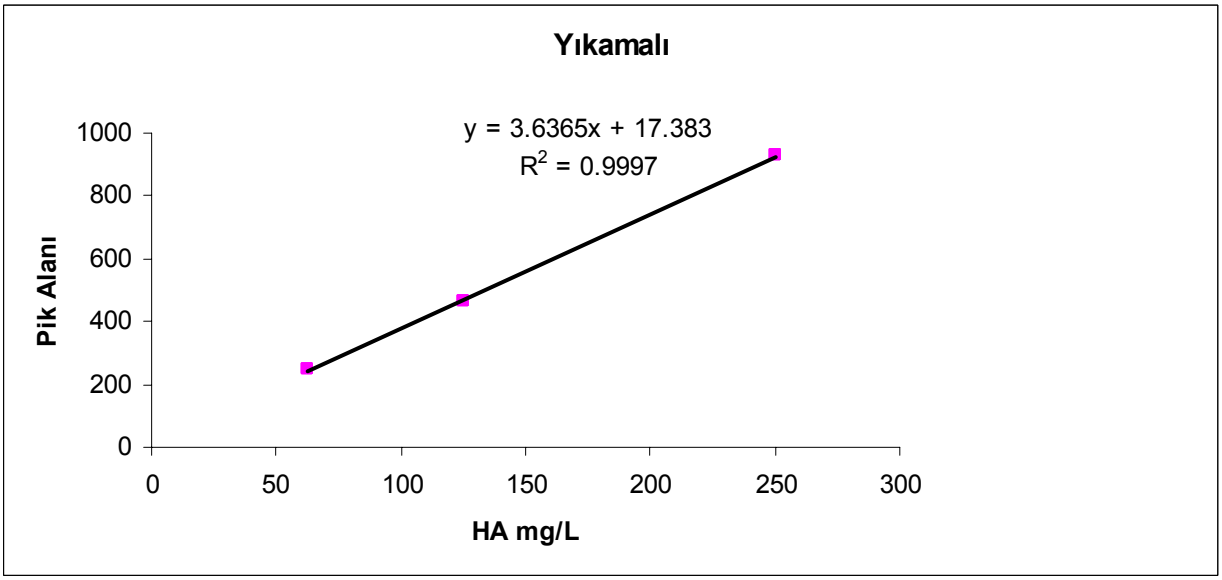
| | |
|---|---|
| Hareketli Faz | : DTPA çözeltisi pH=10,5 |
| Akış Hızı | : 1 mL/dk |
| Numune Hacmi | : 10 µL |
| Reaktif | : Yok |
| Enjeksiyon Tipi | : N - I |
| Kullanılan Dalga Boyu | : 450 nm |
| Sıcaklık | : 20 $^{o}$C |
| Enjektör Yıkaması | : *Yok* |

**Yıkamalı Metot:**

| | |
|---|---|
| Hareketli Faz | : DTPA çözeltisi pH=10,5 |
| Akış Hızı | : 1 mL/dk |
| Numune Hacmi | : 10 µL |
| Reaktif | : Yok |
| Enjeksiyon Tipi | : Enjektör Yıkaması 3 kez (3Y) - N - I |
| Kullanılan Dalga Boyu | : 450 nm |
| Sıcaklık | : 20 $^{o}$C |
| Enjektör Yıkaması | : *Enjeksiyon öncesi 3 kez ultra saf su ile* |




**Şekil 7. 7.** Enjektör yıkanmadan yapılan analizlerden elde edilen 3 HA standardın sisteme verilmesiyle elde edilen 9 pik alanının bir arada gösterimi

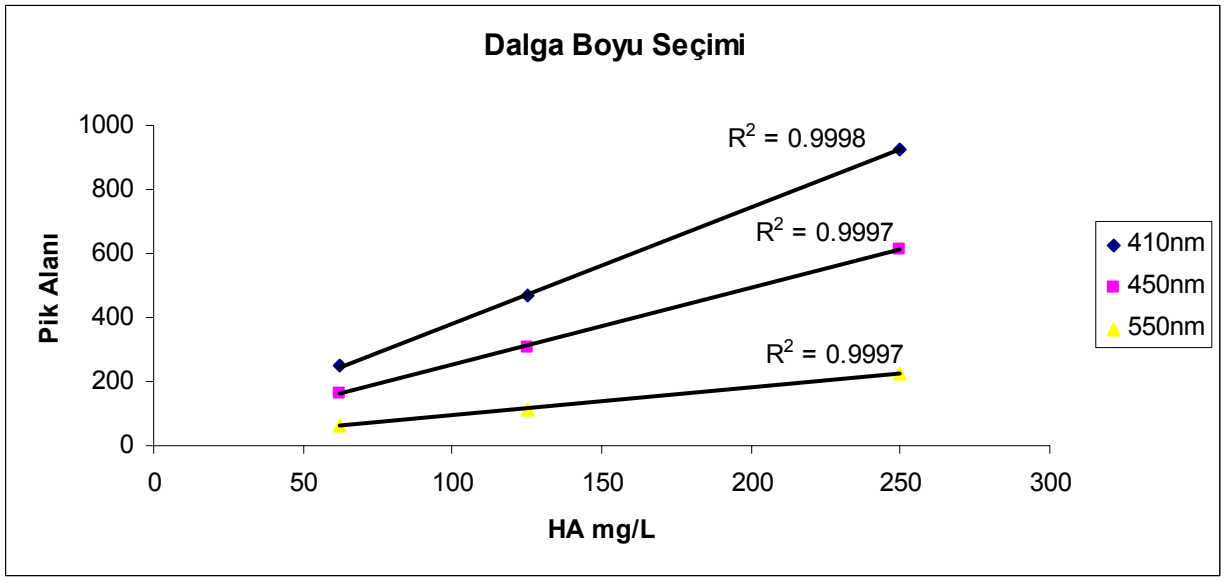



**Şekil 7. 8.** Enjektör yıkanarak yapılan analizlerden elde edilen 3 HA standardın sisteme verilmesiyle elde edilen 9 pik alanının bir arada gösterimi

**Şekil 7.7.** ve **Şekil 7.8.**'de görüleceği üzere, enjektörün yıkanması analizlerin tekrarlanabilirliğini büyük ölçüde (Yıkamalı $R^2$= 0,9997 > Yıkamasız $R^2$= 0,9364) iyileştirilmiştir. Yıkama işlemi ile enjektör iğnesi üzerinde biriken safsızlıkların ve daha önceki enjeksiyonlardan kalan maddelerin uzaklaştırıldığı düşünülmektedir. Bu sebeple sonraki analizlerde enjeksiyon programına yıkama basamağı eklenmiştir.

### 7.2.4 Dedektör dalga boyunun etkisi

Hümik asitlerin FIA sistemi ile analizinde hangi dalga boyu ile çalışılacağının tespiti için 62,5; 125 ve 250 mg/L konsantrasyonlarına sahip HA standartları 3 tekrarlı olarak, hümik maddelerin kromofor gruplarının absorpsiyon verdiği 410, 450 ve 550 nm dalga boylarında ayrı ayrı sisteme verilmiştir.




**Şekil 7. 9.** 410, 450 ve 550 nm dalga boylarında HA standartlarının verdiği pik alanları

**Şekil 7.9.**'da görüleceği üzere en büyük absorbans 410 nm'de alınmıştır. Bu sebeple bundan sonraki denemelerde HA standartlarının 410 nm'de verdikleri absorbans değerleri dikkate alınarak hesaplamalar yapılmıştır. *Bu aşamaya kadar yapılan denemeler sonucunda elde edilen ve deneysel tasarım analizlerinin gerçekleştirildiği metot parametreleri şöyledir:*

**Yıkamalı Metot:**

| | |
|---|---|
| Hareketli Faz | : DTPA çözeltisi pH=10,5 |
| Akış Hızı | : 1 mL/dk |
| Numune Hacmi | : 10 µL |
| Reaktif | : Yok |
| Enjeksiyon Tipi | : 3Y - N - I |
| Kullanılan Dalga Boyu | : 410 nm |
| Sıcaklık | : 20 $^{o}$C |
| Enjektör Yıkaması | : Enjeksiyon öncesi 3 kez ultra saf su ile |

## 7.3 Kısmi Deneysel Tasarım İle FIA Sisteminin Optimizasyonu

### 7.3.1 Birinci aşama: Akış hızı, pH ve sıcaklık faktörlerinin optimizasyonu

Akış hızı, pH ve sıcaklık faktörlerinin optimizasyonu deneysel tasarımın ilk bölümünde gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada numune enjeksiyon hacmi 10 µL olarak sabit tutulmuş ve aşağıdaki metoda göre **Çizelge 6.6.**'da belirtilen analizler gerçekleştirilmiştir.

**Yıkamalı Metot:**

| | |
|---|---|
| Hareketli Faz | : DTPA çözeltisi, pH= *Her bir deneysel koşula göre değiştirilmiştir* |
| Akış Hızı | : *Her bir deneysel koşula göre değiştirilmiştir* |
| Numune Hacmi | : 10 µL |
| Reaktif | : Yok |
| Enjeksiyon Tipi | : 3Y - N - I |
| Kullanılan Dalga Boyu | : 410 nm |
| Sıcaklık | : *Her bir deneysel koşula göre değiştirilmiştir* |
| Enjektör Yıkaması | : Enjeksiyon öncesi 3 kez ultra saf su ile |

**Çizelge 6.6.**'da bulunan her bir deneysel şartlarda, 62,5, 125 ve 250 mg/L konsantrasyonuna sahip HA standartları sisteme ardı ardına 3 kez enjekte edilmişlerdir. Elde edilen pik alanları HA konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilerek her bir deneysel koşul için $R^2$ değerleri hesaplanmıştır. Yüzey grafiklerinin elde edilmesinde kullanılan bağımsız değişkenlerin seviyeleri ve elde edilen $R^2$ değerleri **Çizelge 7.5.**'te verilmiştir.

**Çizelge 7. 5.** Kısmi deneysel tasarımın ilk bölümünde analizleri yapılan değişkenlerin seviye değerleri ve elde edilen cevap değerleri

| Analiz Sırası | Bağımsız Değişkenler | | | | | | Cevap Değeri ($R^2$) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $X_1$ (Akış hızı, mL $min^{-1}$) | Seviyesi | $X_2$ (pH) | Seviyesi | $X_3$ (Sıcaklık, $^oC$) | Seviyesi | |
| 1 | 1 | 0 | 8 | -2 | 20 | -2 | 0,9480 |
| 2 | 0,75 | -1 | 8 | -2 | 25 | -1 | 0,5316 |
| 3 | 1,5 | 1 | 8 | -2 | 30 | 0 | 0,9985 |
| 4 | 2 | 2 | 8 | -2 | 35 | 1 | 0,9989 |
| 5 | 0,5 | -2 | 8 | -2 | 40 | 2 | 0,6219 |
| 6 | 1,5 | 1 | 9 | -1 | 20 | -2 | 0,9956 |
| 7 | 1 | 0 | 9 | -1 | 25 | -1 | 0,8554 |
| 8 | 0,5 | -2 | 9 | -1 | 30 | 0 | 0,8898 |
| 9 | 0,75 | -1 | 9 | -1 | 35 | 1 | 0,5105 |
| 10 | 2 | 2 | 9 | -1 | 40 | 2 | 0,9981 |
| 11 | 0,75 | -1 | 10 | 0 | 20 | -2 | 0,6387 |
| 12 | 2 | 2 | 10 | 0 | 25 | -1 | 0,9989 |
| 13 | 1 | 0 | 10 | 0 | 30 | 0 | 0,6635 |
| 14 | 0,5 | -2 | 10 | 0 | 35 | 1 | 0,7572 |
| 15 | 1,5 | 1 | 10 | 0 | 40 | 2 | 0,9988 |
| 16 | 0,5 | -2 | 10,5 | 1 | 20 | -2 | 0,5661 |
| 17 | 1,5 | 1 | 10,5 | 1 | 25 | -1 | 0,9983 |
| 18 | 2 | 2 | 10,5 | 1 | 30 | 0 | 0,9996 |
| 19 | 1 | 0 | 10,5 | 1 | 35 | 1 | 0,7729 |
| 20 | 0,75 | -1 | 10,5 | 1 | 40 | 2 | 0,8439 |
| 21 | 2 | 2 | 11 | 2 | 20 | -2 | 0,9996 |
| 22 | 0,5 | -2 | 11 | 2 | 25 | -1 | 0,5872 |
| 23 | 0,75 | -1 | 11 | 2 | 30 | 0 | 0,6378 |
| 24 | 1,5 | 1 | 11 | 2 | 35 | 1 | 0,9987 |
| 25 | 1 | 0 | 11 | 2 | 40 | 2 | 0,6540 |

HA standartlarından elde edilen pik alanları ile hesaplanan $R^2$ katsayıları cevap değeri olarak kabul edilmiştir. **Çizelge 7.5.**'deki değişkenlerin seviye ve cevap değerleri kullanılarak *Morgan*'a göre quadratik polinomal model eşitliği hesaplanmıştır:

$$Y= -2{,}0810 + 1{,}3245X_1 + 0{,}7749X_2 - 0{,}0532X_3 + 0{,}1039X_1^2 - 0{,}0470X_2^2 + 0{,}0007X_3^2 - 0{,}1152X_1X_2 + 0{,}0020X_2X_3 - 0{,}0481X_1X_3 + 0{,}0044X_1X_2X_3 \quad (7.2)$$

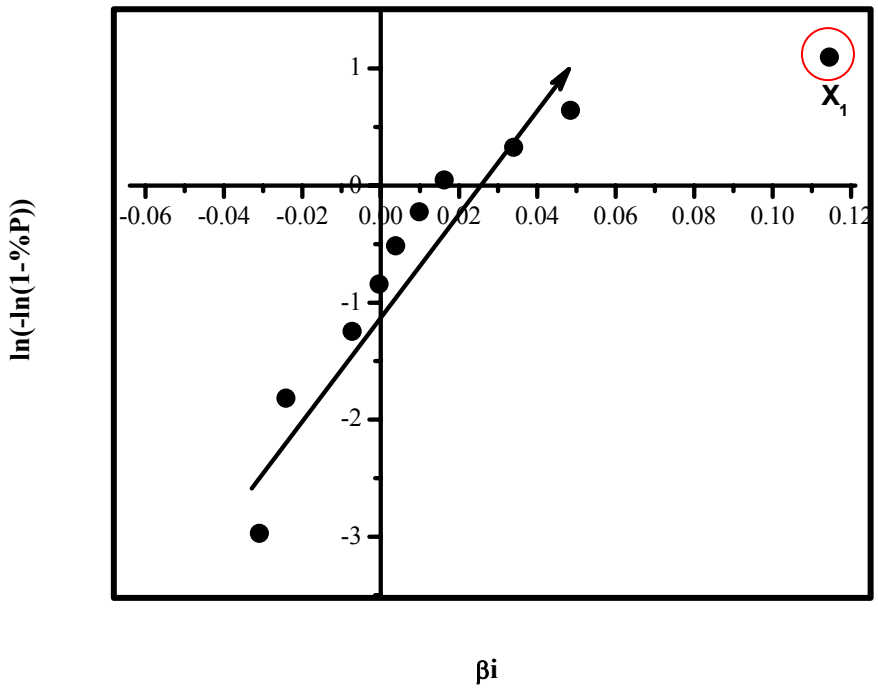
### 7.3.1.1 FIA sisteminin optimizasyonunun birinci aşamasında elde edilen normal dağılım grafiği ile etkilerin ve artıkların tespiti

**Çizelge 7.5.**'deki değişkenlerin kodlanmış değerleri (-2, -1, …) ve cevap değerleri kullanılarak *Morgan*'a göre quadratik polinomal model eşitliği hesaplanmıştır:

$$Y= 0{,}7164 + 0{,}1145X_1 - 0{,}0309X_2 - 0{,}0004X_3 - 0{,}0242X_1^2 + 0{,}0162X_2^2 + 0{,}0484X_3^2 + 0{,}0339X_1X_2 - 0{,}0073X_2X_3 + 0{,}0099X_1X_3 + 0{,}0039X_1X_2X_3 \quad (7.3)$$

**Çizelge 7. 6.** Normal dağılım grafiği verileri

| **Sıra** (Küçükten büyüğe) | **$\beta_i$** (Yukarıdaki eşitlikten) | **% P** [(Sıra – 0.5)/10] | **ln[-ln(1- %P)]** |
|---|---|---|---|
| 1 | -0,0309 ($X_2$) | 0,05 | -2.9702 |
| 2 | -0,0242 ($X_1^2$) | 0,15 | -1.8170 |
| 3 | -0,0073($X_2X_3$) | 0,25 | -1.2459 |
| 4 | -0,0004 ($X_3$) | 0,35 | -0.8422 |
| 5 | 0,0039 ($X_1X_2X_3$) | 0,45 | -0.5144 |
| 6 | 0,0099 ($X_1X_3$) | 0,55 | -0.2250 |
| 7 | 0,0162 ($X_2^2$) | 0,65 | 0.0486 |
| 8 | 0,0339 ($X_1X_2$) | 0,75 | 0.3266 |
| 9 | 0,0484 ($X_3^2$) | 0,85 | 0.6403 |
| 10 | 0,1145 ($X_1$) | 0,95 | 1.0972 |

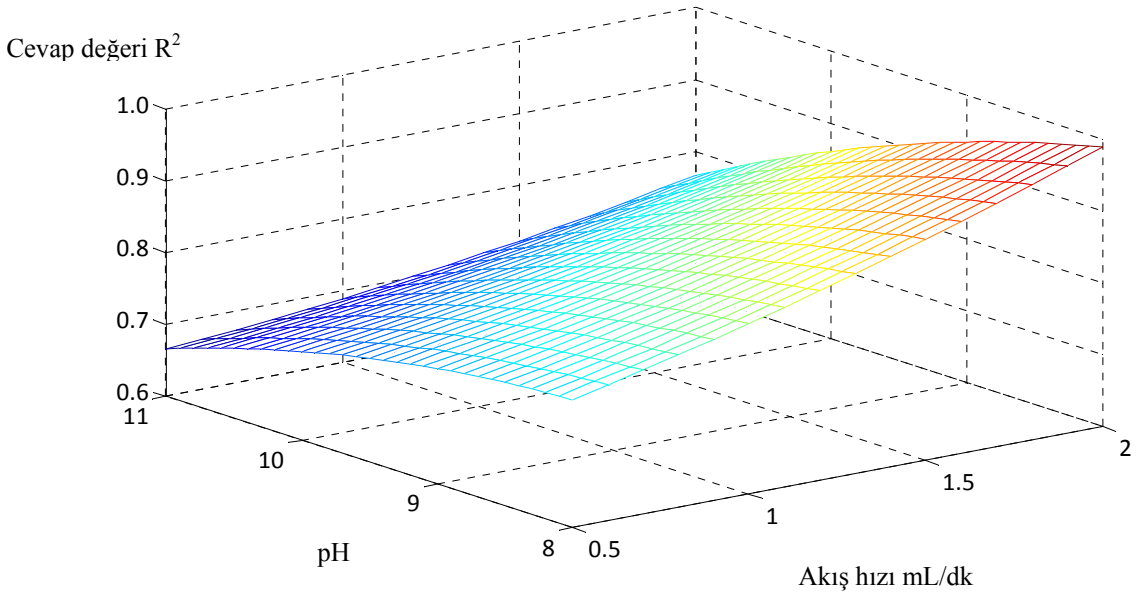



**Şekil 7. 10.** Akış hızı, pH ve sıcaklık faktörlerinin cevap değerine olan tesirlerini gösteren normal dağılım grafiği

**Şekil 7.10.**'da akış hızı ($X_1$) etkisi normal dağılımdan sapma göstermiştir. Bu grafiğe göre lineer ($\beta_i$), interaktif ($\beta_{ij}$) ve quadratik ($\beta_i^2$) olmak üzere 10 tane etkiden lineer ($\beta_i$) olan $X_1$'in diğerlerine göre daha anlamlı olduğu ve akış hızı ($X_1$) faktörünün en anlamlı etkiye sahip olduğu söylenebilmektedir. Bu çalışmada interaktif ($\beta_{ij}$) ve quadratic ($\beta_i^2$) etkileşimlerin cevap değeri üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı görülmektedir. Bir başka deyişle cevap değerinin dolayısıyla $R^2$ katsayısının değişmesinde en büyük etkiye akış hızında meydana getirilen değişimler sebep olmaktadır. Bu sonuç yüzey grafikleri ile de desteklenmiştir (**Şekil 7.11.** ve **Şekil 7.13.**).

### 7.3.1.2 FIA sisteminin optimizasyonunun birinci aşamasında elde edilen yüzey grafikleri ile parametre değerlerinin tespiti

Cevap değeri olarak kabul edilen $R^2$ katsayısı ile bağımsız değişkenlerin (Akış hızı, pH ve sıcaklık) seviyeleri arasındaki ilişkiyi görselleştiren ve bu sayede değişkenlerin optimum noktalarının tespitini mümkün kılan yüzey grafikleri, **Eşitlik 7.2.**'deki polinomal quadratik model kullanılarak Matlab programında çizdirilmiştir. İkili akış hızı-pH, sıcaklık-pH ve akış hızı-sıcaklık etkileşimlerini gösteren yüzey grafikleri aşağıda verilmiştir (**Şekil 7.11.**, **Şekil 7.12.**, **Şekil 7.13.**).




**Şekil 7. 11.** Değişen akış hızı ve pH değerlerinde $R^2$'de meydana gelen değişimi gösteren 3 boyutlu yüzey grafiği

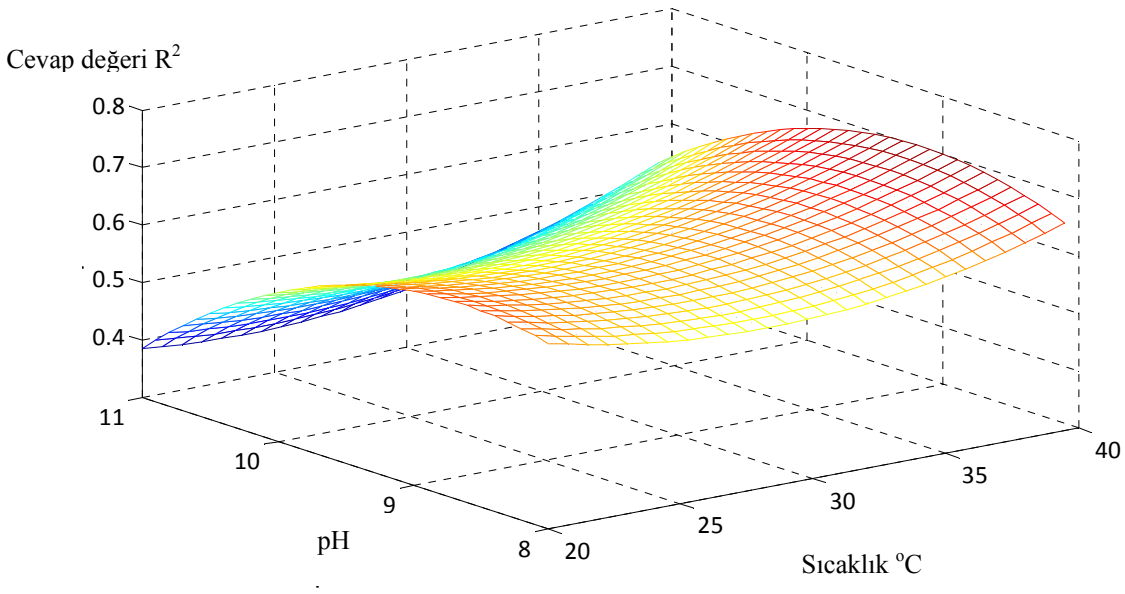
**Şekil 7.11.** akış hızı ve pH'nın $R^2$ değeri üzerinde meydana getirdiği değişimi göstermektedir. Hareketli faz çözeltisinin akış hızı arttıkça ve pH değeri düştükçe $R^2$ değeri artmıştır. Bu sonuç şöyle yorumlanabilir: Akış hızı arttıkça numune hareketli faz ile daha az etkileşeceği için numune bandı daha az genişlemiş ve daha tekrarlanabilir pikler elde edilmiştir.

Düşen pH değeriyle artan $R^2$ değeri ise şöyle yorumlanabilmektedir: Bazik ortamda çözünme özelliği sergileyen hümik asitler, pH değeri düştükçe hareketli fazda daha az çözünerek aynı şekilde daha az bant genişlemesine uğramış ve daha düzgün ve tekrarlanabilir pikler elde edilmiştir.

**Şekil 7.11.**'deki yüzey grafiğine göre bu iki değişkenin deneysel seviyeleri, en yüksek cevap değerinin alındığı; akış hızı için 2 mL/dk ve pH değeri için 8 olarak seçilmiştir.

**Şekil 7.12.** pH ve sıcaklığın $R^2$ değeri üzerinde meydana getirdiği değişimi göstermektedir. Sıcaklık faktörü, değişen seviyelerinde cevap değeri üzerinde büyük bir değişiklik meydana getirememiştir. Ayrıca bu yüzey grafiği sıcaklık için kritik bir noktayı göstermektedir. Yani cevap değeri, bu sıcaklık aralığında ne maksimum ne de minimum bir değer göstermiştir. Bu tarz yüzey grafikleri baz alınarak optimum değer seçimi uygun görülmemekle birlikte faklı seviyelerde denemeler yapılması uygun görülmektedir (Bezerra, 2008). Ancak bu seviyeler HPLC sisteminin çalışma aralığına

göre seçildiği için değiştirilememiştir. Bu sebeple sıcaklık parametresinin optimum değerinin tespiti **Şekil 7.11.**'deki yüzey grafiğine göre seçilememiştir.

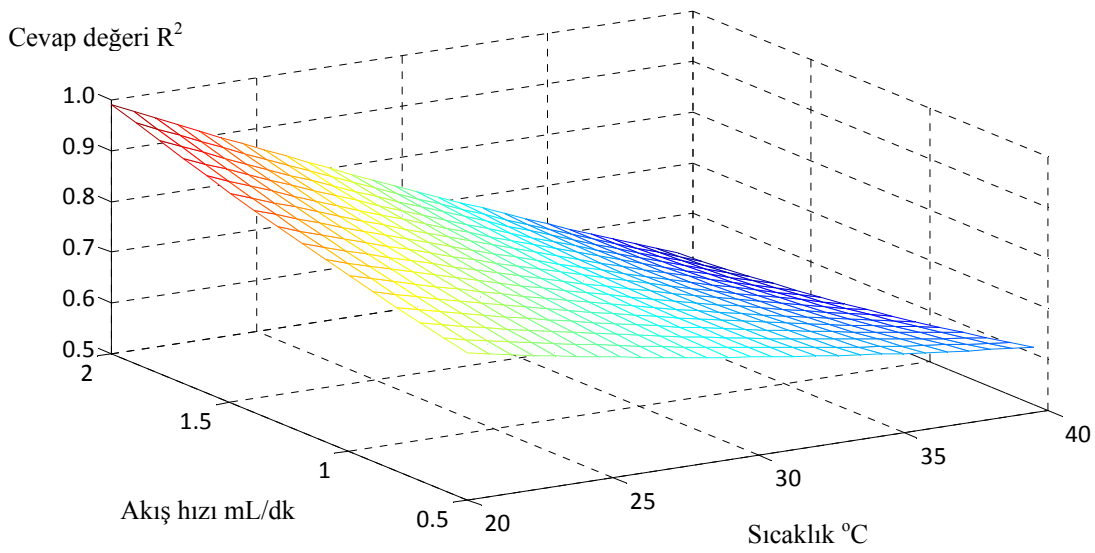



**Şekil 7. 12.** Değişen pH ve sıcaklık değerlerinde $R^2$'de meydana gelen değişimi gösteren 3 boyutlu yüzey grafiği

pH parametresi ise **Şekil 7.11.** için yapılan yorumunu desteklemiştir. Fakat bu pH ve sıcaklık seviyelerinde diğer iki yüzey grafiği kadar (**Şekil 7.11.**, **Şekil 7.13.**) iyi $R^2$ değerleri elde edilememiştir.

**Şekil 7.13.** akış hızı ve sıcaklığının $R^2$ değeri üzerinde meydana getirdiği değişimi göstermektedir. Grafikte görüldüğü üzere hareketli faz çözeltisinin akış hızı arttıkça ve sıcaklık değeri düştükçe $R^2$ değeri artmıştır. Bu durum şöyle yorumlanmıştır: Aynı şekilde, akış hızı arttıkça numune hareketli faz ile daha az etkileşmiş ve daha az bant genişlemesine uğrayarak daha düzgün ve tekrarlanabilir pikler elde edilmiştir. Bu durum ise $R^2$ katsayısının 1'e daha yakın değerler almasını sağlamıştır.

Sıvıların artan sıcaklık birlikte hacimlerinin arttığı bilinmektedir. Bu analizlerde de hareketli fazın sıcaklığı arttıkça içersinde ilerleyen numunenin de sıcaklıkla beraber hacmi artmış ve bu da bant genişliğini artırarak daha yayvan piklere ve 1'den düşük $R^2$ değerlerine sahip sonuçlar vermesine sebep olmuştur. En büyük $R^2$ değerleri akış hızının 2 mL/dk olduğu yüzey grafiklerinden elde edilmiştir (**Şekil 7.11.** ve **Şekil 7.13.**). Bu sonuç normal dağılım grafiğinde, "sonuçlara en anlamlı etkiyi akış hızındaki değişimler yapmaktadır" şeklinde yapılan yorumunu desteklemektedir.




**Şekil 7. 13.** Değişen akış hızı ve sıcaklık değerlerinde $R^2$'de meydana gelen değişimi gösteren 3 boyutlu yüzey grafiği

**Şekil 7.13.**'deki yüzey grafiğine göre bu iki değişkenin deneysel seviyeleri, en yüksek cevap değerinin alındığı; akış hızı için 2 mL/dk ve sıcaklık değeri için 20 $^oC$ olarak seçilmiştir.

3 yüzey grafiği toplu olarak değerlendirildiğinde hümik asitlerin kantitatif tayinini için geliştirilen FIA sisteminin optimizasyonunun birinci aşamasında aşağıdaki değerler optimum olarak seçilmiştir: Akış hızı: 2 mL/dk, pH: 8, Sıcaklık: 20 $^oC$.

### 7.3.2 İkinci aşama: Numune hacmi ve sıcaklık parametrelerinin optimizasyonu

Deneysel tasarımın ikinci aşamasında sistemin numune hacmi ve sıcaklık faktörlerinin optimizasyonu yapılmıştır. Daha önce belirtildiği üzere hem etki sayısının azaltılması hem de daha kolay değerlendirme imkanı sunmasından dolayı sıcaklık ve numune hacmi faktörleri ayrı bir deneysel tasarım ile çalışılmıştır. Bu aşamada akış hızı ve pH değerleri birinci bölümde yapılan optimizasyon sonuçlarına göre sabit tutularak aşağıdaki metoda göre **Çizelge 6.9.**'da belirtilen analizler gerçekleştirilmiştir.

**Yıkamalı Metot:**

| | |
|---|---|
| Hareketli Faz | : DTPA çözeltisi, pH= 8 |
| Akış Hızı | : 2 mL/dk |
| Numune Hacmi | : *Her bir deneysel koşula göre değiştirilmiştir* |
| Reaktif | : Yok |
| Enjeksiyon Tipi | : 3Y - N - I |
| Kullanılan Dalga Boyu | : 410 nm |
| Sıcaklık | : *Her bir deneysel koşula göre değiştirilmiştir* |
| Enjektör Yıkaması | : Enjeksiyon öncesi 3 kez ultra saf su ile |

**Çizelge 6.9.**'da bulunan her bir deneysel şartlarda, 62,5, 125 ve 250 mg/L konsantrasyonuna sahip HA standartları sisteme ardı ardına 3 kez enjekte edilmişlerdir. Elde edilen pik alanları HA konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilerek her bir deneysel koşul için $R^2$ değerleri hesaplanmıştır. Yüzey grafiklerinin elde edilmesinde kullanılan bağımsız değişkenlerin seviyeleri ve elde edilen ve $R^2$ değerleri **Çizelge 7.7.**'de verilmiştir. Bu çizelgeden de görüleceği üzere $R^2$ değerlerinin çoğu birbirine ve 1'e yakın çıkmıştır. Çünkü **Şekil 7.10.**'da gösterildiği üzere analizlerin tekrarlanabilirliğine en çok hareketli fazın akış hızı etki etmektedir. Aşağıdaki analizler de optimum akış hızı değerinde (2 mL/dk) yapıldığı için sonuçlar bu şekilde çıkmıştır. Ayrıca bu durum **Şekil 7.16.**'daki yüzey grafiği ile de desteklenmektedir.

**Çizelge 7. 7.** Kısmi deneysel tasarımın ikinci bölümünde analizleri yapılan değişkenlerin seviye değerleri ve elde edilen cevap değerleri

| Deney Sırası | Bağımsız Değişkenler | | | | Cevap Değeri ($R^2$) |
|---|---|---|---|---|---|
| | $X_3$ (Sıcaklık $^oC$) | Seviyesi | $X_4$ (Numune hacmi µL) | Seviyesi | |
| 1 | 20 | -2 | 5 | -2 | 0,9997 |
| 2 | 20 | -2 | 10 | -1 | 0,9999 |
| 3 | 20 | -2 | 20 | 0 | 0,9999 |
| 4 | 20 | -2 | 30 | 1 | 0,9999 |
| 5 | 20 | -2 | 40 | 2 | 0,9999 |
| 6 | 25 | -1 | 5 | -2 | 0,9996 |
| 7 | 25 | -1 | 10 | -1 | 0,9999 |
| 8 | 25 | -1 | 20 | 0 | 1,000 |
| 9 | 25 | -1 | 30 | 1 | 0,9999 |
| 10 | 25 | 0 | 40 | 2 | 1,0000 |
| 11 | 30 | 0 | 5 | -2 | 0,9994 |
| 12 | 30 | 0 | 10 | -1 | 0,9994 |
| 13 | 30 | 0 | 20 | 0 | 1,0000 |
| 14 | 30 | 0 | 30 | 1 | 0,9998 |
| 15 | 30 | 1 | 40 | 2 | 0,9975 |
| 16 | 35 | 1 | 5 | -2 | 0,9986 |
| 17 | 35 | 1 | 10 | -1 | 0,9982 |
| 18 | 35 | 1 | 20 | 0 | 0,9978 |
| 19 | 35 | 1 | 30 | 1 | 0,9986 |
| 20 | 35 | -1 | 40 | 2 | 0,9985 |
| 21 | 40 | 2 | 5 | -2 | 0,9989 |
| 22 | 40 | 2 | 10 | -1 | 0,9997 |
| 23 | 40 | 2 | 20 | 0 | 0,9995 |
| 24 | 40 | 2 | 30 | 1 | 0,9892 |
| 25 | 40 | 2 | 40 | 2 | 0,9999 |

HA standartlarından elde edilen pik alanları ile hesaplanan $R^2$ katsayıları cevap değeri olarak kabul edilmiştir. **Çizelge 7.7.**'deki değişkenlerin seviye değerleri ve cevap değerleri kullanılarak *Morgan*'a göre quadratik polinomal model eşitliği hesaplanmıştır:

$$Y= 0,9964 + 0,0003X_3 + 0,00002X_4 - 0,000006X_3^2 + 0,000002X_4^2 – 0,000004X_3X_4 \quad (7.4)$$

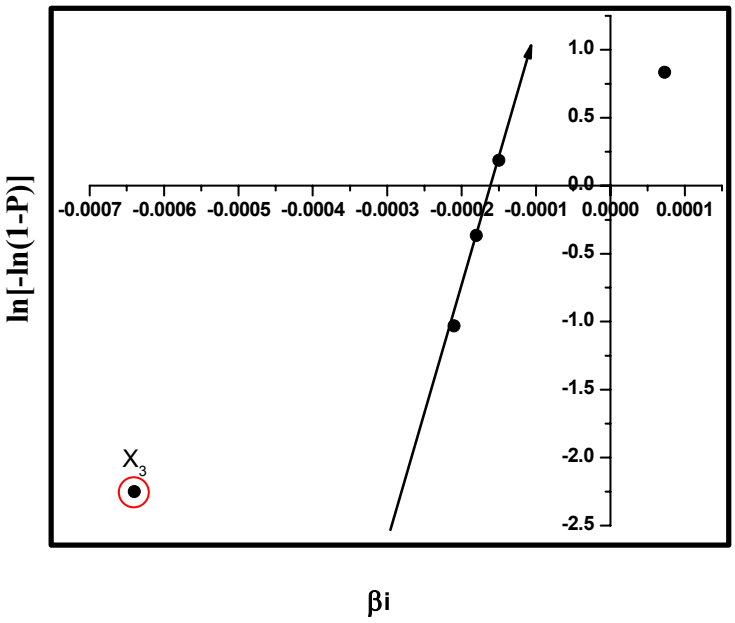
### 7.3.2.1 FIA sisteminin optimizasyonunun ikinci aşamasında elde edilen normal dağılım grafiği ile etkilerin ve artıkların tespiti

**Çizelge 7.7.**'daki değişkenlerin kodlanmış değerleri (-2, -1, …) ve cevap değerleri kullanılarak *Morgan*'a göre quadratik polinomal model eşitliği hesaplanmıştır:

$$Y= 0,99910 – 0,00064X_3 – 0,00021X_4 – 0,00015X_3^2 + 0,0000729X_4^2 – 0,00018X_3X_4 \quad (7.5)$$

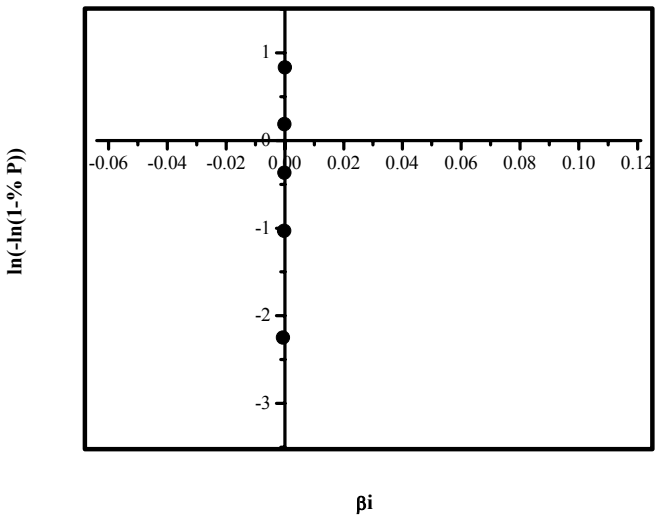
**Çizelge 7. 8.** Normal dağılım grafiği verileri

| **Sıra** (Küçükten büyüğe) | **$\beta_i$** (Yukarıdaki eşitlikten) | **% P** ((Sıra – 0.5)/5) | **ln(-ln(1- %P))** |
|---|---|---|---|
| 1 | -0,00064 ($X_3$) | 0,1 | -2.2504 |
| 2 | -0,00021 ($X_4$) | 0,3 | -1.0309 |
| 3 | -0,00018 ($X_3X_4$) | 0,5 | -0,3665 |
| 4 | -0,00015 ($X_3^2$) | 0,7 | 0,1856 |
| 5 | 0,0000729 ($X_4^2$) | 0,9 | 0,8340 |




**Şekil 7. 14.** Sıcaklık ve numune hacmi faktörlerinin cevap değerine olan tesirlerini gösteren normal dağılım grafiği

**Şekil 7.14.**'de de görüleceği üzere bu aşamada optimizasyonu yapılmak istenen sıcaklık ve numune hacmi faktörlerinin değişen seviyelerinde, cevap değeri olan $R^2$ katsayısına ve analizlerin tekrarlanabilirliğine en anlamlı etki $X_3$ (Sıcaklık) faktöründen kaynaklanmıştır. Fakat sıcaklık faktörünün bu etkisi bu etkisi, akış hızı ve diğer faktörlerin etkileri ile kıyaslandığında bir önemi kalmamaktadır. **Şekil 7.14.**'de gösterilen etkiler, akış hızı ve diğer faktörlerin etkilerini içeren ve birinci aşamada elde edilen normal dağılım grafiğinin skalasında çizdirildiğinde normal dağılım doğrusu üzerinde sıralanmakta ve anlamlı etkilerinin olmadığı görülmektedir (**Şekil 7.15.**).

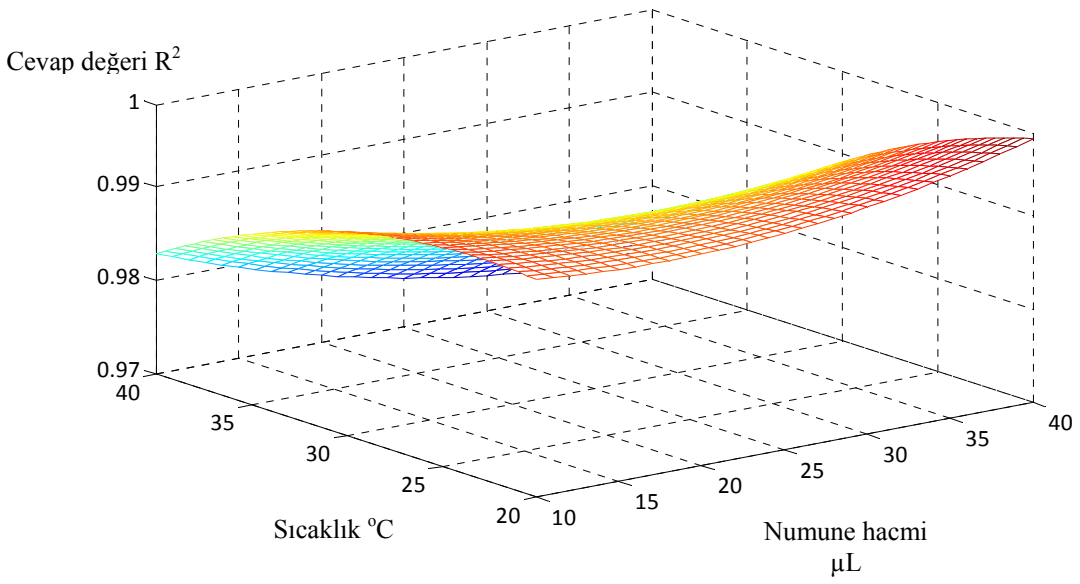



**Şekil 7. 15.** Şekil 7.10.'da verilmiş olan normal dağılım grafiğinin skalasında çizilen numune hacmi ve sıcaklık faktörlerinin normal dağılım grafiği

Daha önce de söylendiği üzere, analizlerin tekrarlanabilirliğine en çok etki eden akış hızı faktörü olmuş (**Şekil 7.10.**) ve bu aşamada yapılan optimizasyon deneyleri de bu faktörün optimum değerlerinde (2 mL/dk) gerçekleştirildiği için herhangi bir anlamlı etki gözlenememiştir.

### 7.3.2.2 FIA sisteminin optimizasyonunun ikinci aşamasında elde edilen yüzey grafikleri ile parametre değerlerinin tespiti

Cevap değeri olan $R^2$ katsayısı ile bağımsız değişkenlerin (Sıcaklık ve numune hacmi) seviyeleri arasındaki ilişkiyi görselleştiren yüzey grafikleri, **Eşitlik 7.4.**'teki polinomal quadratik model kullanılarak Matlab programında çizdirilmiştir. Sıcaklık – numune hacmi etkileşimlerini gösteren yüzey grafiği aşağıda verilmiştir (**Şekil 7.16.**).




**Şekil 7. 16.** Değişen sıcaklık ve numune hacmi değerlerinde $R^2$'de meydana gelen değişimi gösteren 3 boyutlu yüzey grafiği

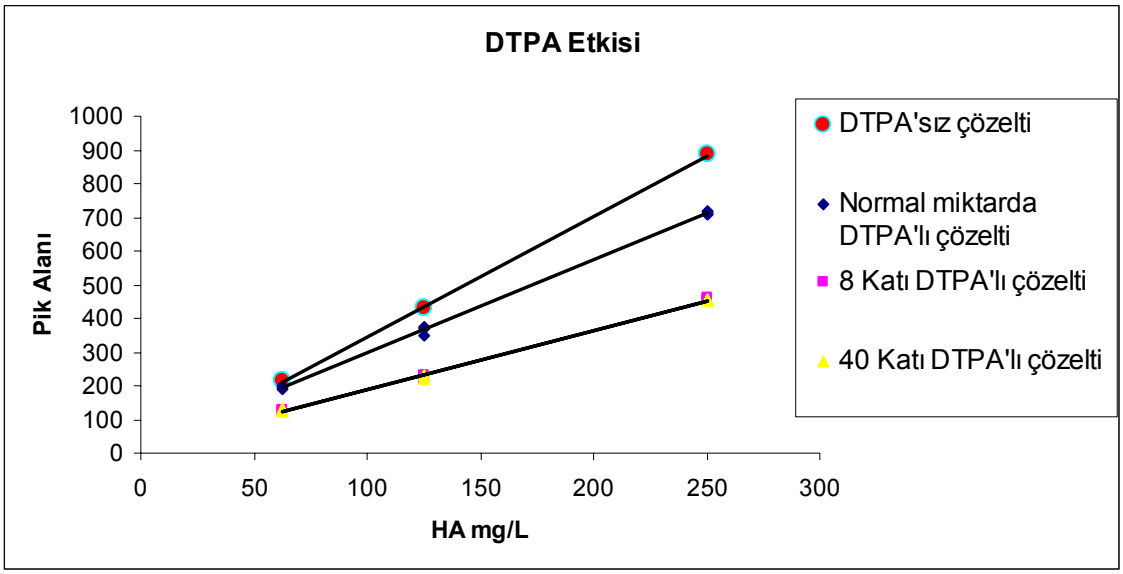
**Şekil 7.16.** sıcaklık ve numune hacminin $R^2$ katsayısı üzerinde meydana getirdiği değişimi göstermektedir. Hareketli faz çözeltisinin sıcaklığı düştükçe $R^2$ katsayısı artmıştır. Bu durum şöyle yorumlanmıştır: Bu analizlerde hareketli fazın sıcaklığı arttıkça içersinde ilerleyen numunenin de sıcaklıkla beraber hacminin arttığı ve bant genişliğini artırarak daha yayvan piklere ve 1'den düşük $R^2$ değerlerine sahip sonuçlar vermesine sebep olduğu düşünülmektedir.

Bu yüzey grafiği numune hacmi için kritik bir noktayı göstermektedir. Yani cevap değeri, bu numune hacmi aralığında ne maksimum ne de minimum bir değer göstermiştir. Bu tarz yüzey grafikleri baz alınarak optimum değer seçimi uygun görülmemekle birlikte faklı seviyelerde denemeler yapılması uygun görülmektedir (Bezerra, 2008). Ancak bu seviyeler HPLC sisteminin çalışma aralığına göre seçildiği için değiştirilememiştir. Bu sebeple de numune hacmi için optimum değer **Şekil 7.16.**'daki yüzey grafiğinden en büyük cevap değerinin alındığı 10 µL olarak seçilmiştir. Ayrıca bu analizler akış hızı faktörünün optimum olduğu seviyede (2mL/dk) yapıldığı için $R^2$ katsayısında büyük değişimler olmamıştır.

**Şekil 7.16.**'deki yüzey grafiğine göre bu iki değişkenin deneysel seviyeleri, en yüksek cevap değerinin alındığı; sıcaklık için 20 $^oC$ ve numune hacmi değeri için 10 µL olarak seçilmiştir.

## 7.4 Hareketli Faz Çözeltisindeki DTPA'nın Etkisi

Hümik asitlerin FIA sistemi ile tayininde hareketli faz çözeltisi içerisinde bulunan DTPA'nın pik alanlarının artışında ne derecede etkili olduğunun belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda DTPA içeren DTPA hareketli fazlarıyla 62;5, 25 ve 250 mg/L'lik HA standartları sisteme enjekte edilmiş ve sonuçlar alınmıştır (**Şekil 7.17.**).

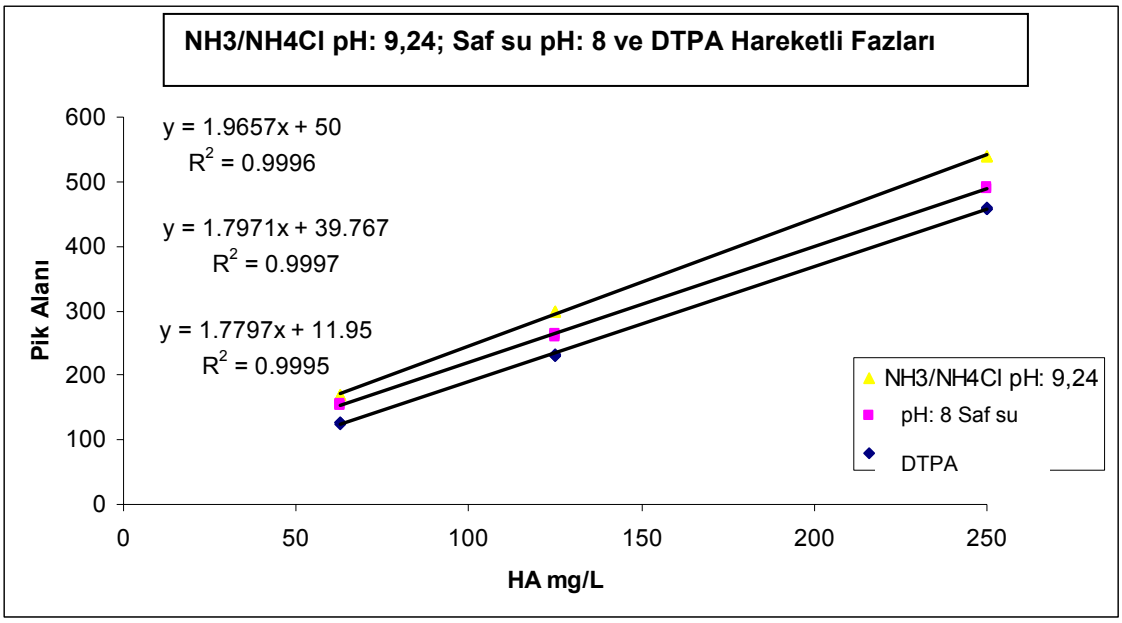



**Şekil 7. 17.** Farklı konsantrasyonlarda DTPA içeren DTPA çözeltileriyle yapılan analizlerin sonuçları

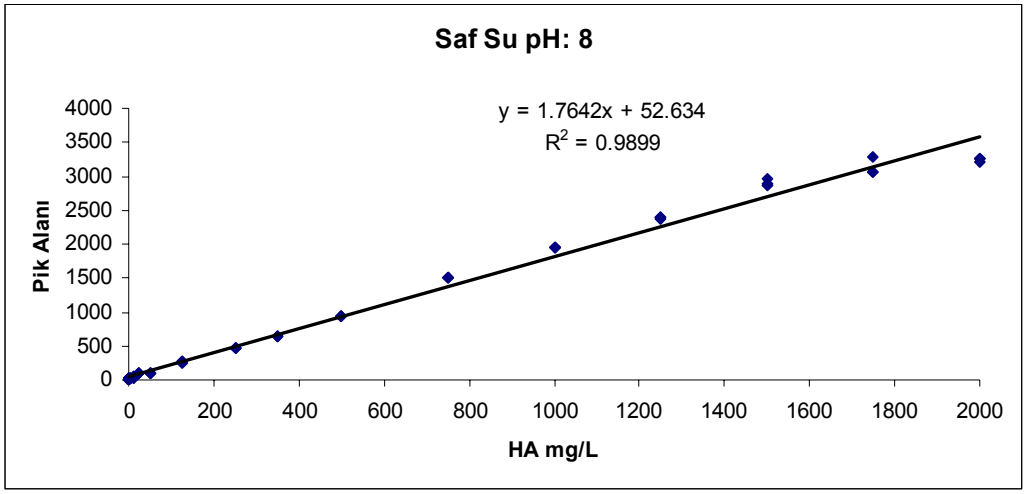
**Şekil 7.17.**'den de görüleceği üzere DTPA çözeltisindeki DTPA'nın konsantrasyonu arttıkça elde edilen pik alanlarında düşüş gözlemlenmiştir. Hatta DTPA içermeyen DTPA çözeltisi en fazla pik alanı veren hareketli faz olmuştur. Bu sebeple de bu aşamadan sonra hareketli faz çözeltisi olarak DTPA yerine pH'sı KOH ile 8'e ayarlanmış olan saf su kullanılmıştır.

## 7.5 Hareketli Faz Çözeltisi Olarak $NH_3/NH_4Cl$ Tamponunun Etkisi

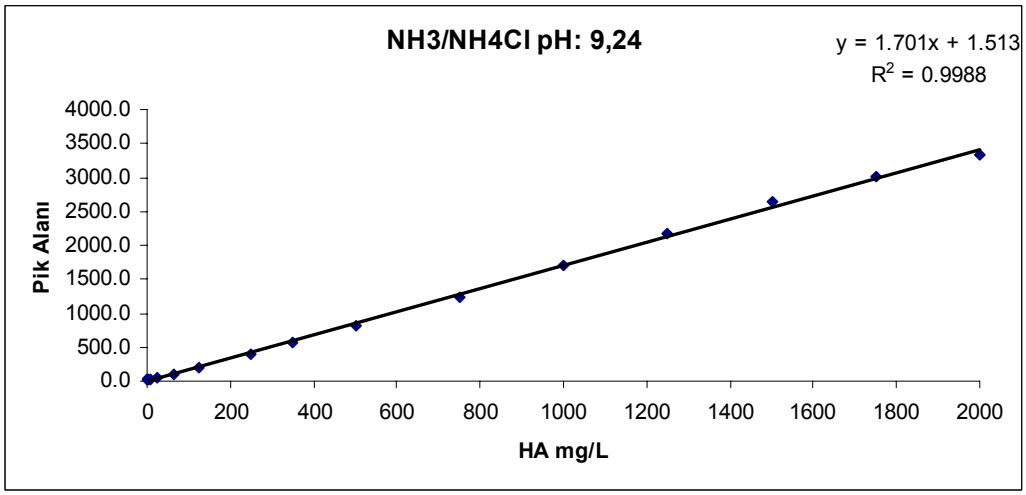
Optimizasyonu yapılmış olan metodun hareketli fazının pH'sının ortamda bulunan $CO_2$'den dolayı değişebileceği düşünülerek aynı şartlarda aynı standartlarla ek olarak $NH_3/NH_4Cl$ (pH: 9,24) tamponu hareketli faz olarak seçilip enjeksiyonlar yapılmıştır. Bu amaçla sisteme 0 - 2000 mg/L konsantrasyonlarında 16 HA standardı, 3 tekrarlı ve ard arda enjekte edilmiştir. Her iki seri için elde edilen pik alanları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafikleri meydana getirilmiştir. Elde edilmiş olan bu iki kalibrasyon grafiğinin farklı kalibrasyon bölgelerindeki $R^2$ katsayıları karşılaştırılarak, tüm bölgelerde en yüksek $R^2$ değeri veren hareketli faz çözeltisi bu metot için seçilmiştir.



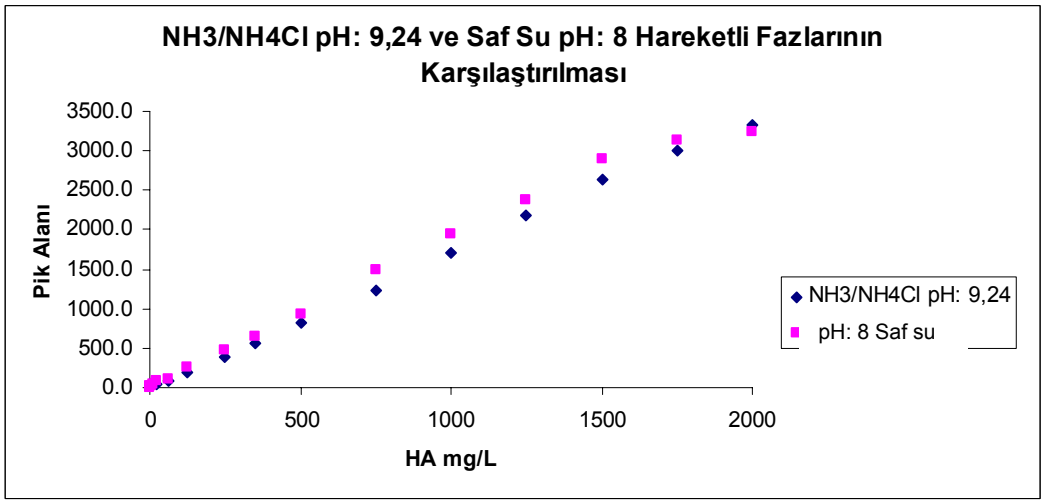

**Şekil 7. 18.** $NH_3/NH_4Cl$ pH: 9,24; saf su pH: 8 ve DTPA hareketli fazları ile FIA sistemine enjekte edilen 62,5; 125 ve 250 mg/L'lik HA standartlarının pik alanlarının karşılaştırılması




**Şekil 7. 19.** Saf su pH: 8 hareketli fazı ile FIA sistemine enjekte edilen 0-2000 mg/L'lik HA standartlarının kalibrasyon grafiği




**Şekil 7. 20.** $NH_3/NH_4Cl$ pH: 9,24 hareketli fazı ile FIA sistemine enjekte edilen 0-2000 mg/L'lik HA standartlarının kalibrasyon grafiği

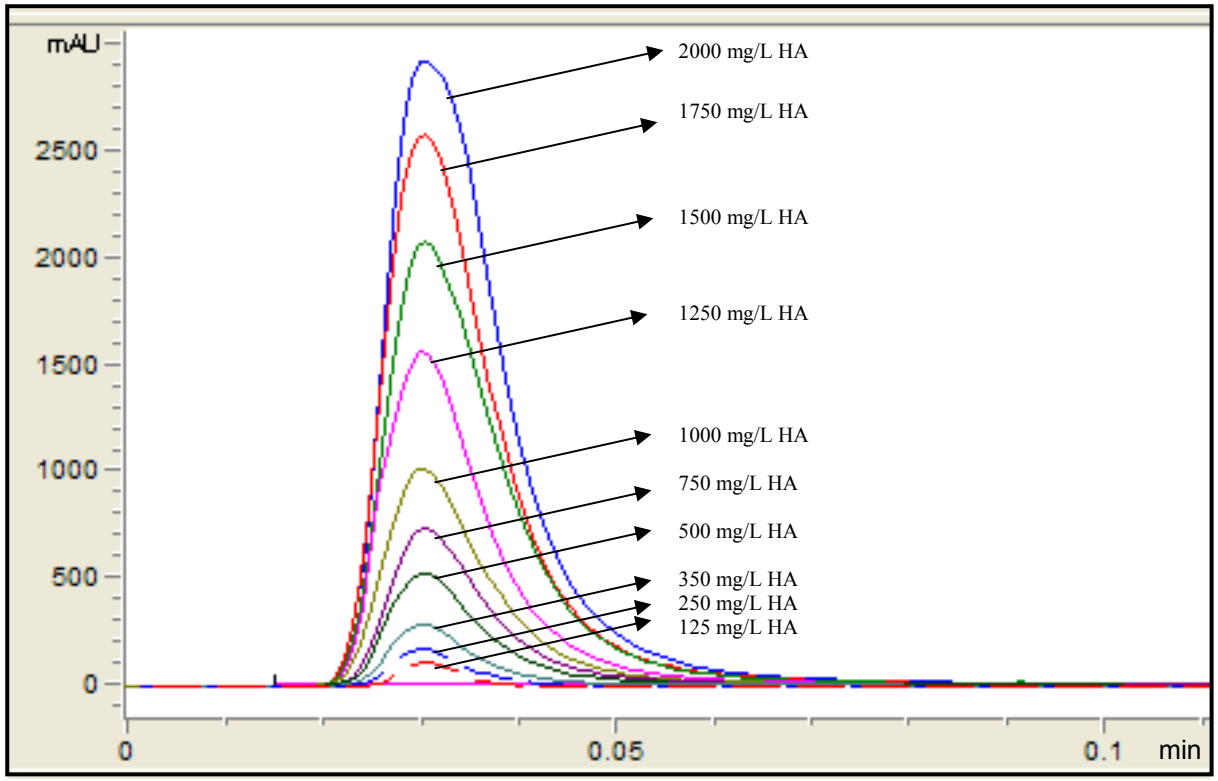



**Şekil 7. 21.** $NH_3/NH_4Cl$ pH: 9,24 ve saf su pH: 8 hareketli fazları ile FIA sistemine enjekte edilen 0-2000 mg/L'lik HA standartlarının pik alanlarının karşılaştırılması

**Çizelge 7. 9.** İki hareketli faz çözeltisiyle yapılan analizlere ait kalibrasyon grafiklerinin farklı HA konsantrasyonu bölgelerine ait $R^2$ değerleri (Aynı aralıkta daha büyük olan $R^2$ değeri koyu yazılmıştır)

| Metot | 0-62,5* | 0-500 | 0-1000 | 0-1500 | 0-2000 | 5-50 | 10-50 | 125-500 | 5-1000 | 10-1000 | 25-1000 | 125-1500 | 125-2000 | 500-2000 | 1000-2000 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **pH:8 Saf Su** | 0.849 | **0.998** | **0.998** | 0.999 | 0.990 | 0.811 | 0.729 | 0.998 | **0.998** | **0.998** | 0.998 | **0.999** | 0.983 | 0.959 | 0.929 |
| **$NH_3/NH_4Cl$** | **0.901** | **0.998** | **0.998** | 0.999 | **0.999** | **0.870** | **0.820** | **0.999** | **0.998** | **0.998** | **0.999** | 0.998 | **0.991** | **0.987** | **0.953** |

* mg/L cinsinden konsantrasyon aralığıdır.




**Şekil 7. 22.** Parametreleri optimize edilmiş FIA sistemi ile enjeksiyonu yapılan 125 – 2000 mg/L aralığındaki hümik asit standartlarının sırasıyla küçükten büyüğe pikleri

**Şekil 7.19.** incelendiğinde pH'sı 8 olan saf suyun hareketli faz olarak kullanıldığı enjeksiyonlarda, 1500 mg/L HA konsantrasyonundan itibaren tekrarlanabilirlikte ve doğrusallıkta sapmalar meydana geldiği görülmektedir. Fakat $NH_3NH_4Cl$ tamponunun kullanıldığı enjeksiyonlarda ise herhangi bir sapma gözlemlenmemiş ve $NH_3NH_4Cl$ tamponuna ait grafiklerin $R^2$ değerleri daha büyük çıkmıştır (**Şekil 7.20.**).

**Çizelge 7.9.**'daki sonuçlar irdelendiğinde, farklı konsantrasyon bölgelerine ait kalibrasyon grafiklerinden büyük olanlarının çoğunun $NH_3NH_4Cl$ tamponuna ait olduğu görülmektedir. Bu sebeple hareketli faz çözeltisi olarak $NH_3NH_4Cl$ tamponu seçilmiştir.

**Nihai Metot Parametreleri**

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar neticesinde optimizasyonu yapılan HA tayin metodunun nihai parametreleri şu şekilde olmuştur:

*HA Tayini İçin Optimize Edilen FIA Tayin Metodunun Parametreleri:*

| | |
|---|---|
| Hareketli Faz | : $NH_3/NH_4Cl$ pH:9,24 |
| Akış Hızı | : 2 mL/dk |
| Numune Hacmi | : 10 µL |
| Reaktif | : Yok |
| Enjeksiyon Tipi | : 3Y - N - I |
| Kullanılan Dalga Boyu | : 410 nm |
| Sıcaklık | : 20 $^oC$ |
| Enjektör Yıkaması | : Enjeksiyon öncesi 3 kez ultra saf su ile |

## 7.6 İstatistiksel Analiz Sonuçları ve Değerlendirilmesi

HA tayini için optimize edilen FIA metodundan elde edilen pik alanları ile istatistiksel testler gerçekleştirilmiştir. Null ve alternatif hipotezler doğrultusunda yapılan testler; %95 güven seviyesinde (P: 0,05), çift taraflı olarak gerçekleştirilmiş, hesaplanan alternatif t ve F değerleri, kritik t ve F değerleri ile karşılaştırılmıştır.

Standart HA standartları kullanılarak gerçekleştirilen metot geliştirme ve optimizasyon çalışmalarının ardından; HA tayinleri için geliştirilen FIA metodunun kullanılabilirliğini ve performansını kanıtlamak amacıyla validasyon çalışmalarına başlanmıştır.

FIA ile HA tayinine ilişkin istatistiksel çalışmalarından elde edilen sonuçlar aşağıda yer almaktadır:

**HA tayini için FIA metodunun doğruluğu**

HA'lerin tayini için FIA metodunun doğruluğunun test edilmesinde 500 mg/L konsantrasyonuna sahip HA standardı kullanılmıştır. Bu standart 3 tekrarlı olarak optimize edilmiş FIA metoduna göre sisteme verilmiş ve elde edilen pik alanlarından **Şekil 7.20.**'deki kalibrasyon grafiği kullanılarak sonuç mg/L cinsinden hesaplanmıştır.

$X_i$ : Elde edilen sonuçların ortalaması

$X_t$ : Gerçek değer

$$\text{Bağıl hata } (E_r) = \frac{Xi - Xt}{Xt} x100 \qquad (7.6)$$

$$E_r = \frac{479,4 - 500,000}{500,000} x100$$

$E_r$ = 4,12 olarak bulunmuştur.

Tekrarlı deneyler sonucunda ölçülen ortalama değer, gerçek değerin ± %5 sınırı içinde olduğu için, HA tayinleri için FIA metodunun doğruluğu kanıtlanmıştır.

**HA tayini için FIA metodunun kesinliği ve tekrarlanabilirliği**

HA'lerin tayini için FIA metodunun kesinliğinin ve tekrarlanabilirliğinin test edilmesinde 500 mg/L konsantrasyonuna sahip HA standardı kullanılmıştır. Bu standart 3 tekrarlı olarak optimize edilmiş FIA metoduna göre sisteme verilmiş ve elde edilen pik alanlarından standart sapma (S), bağıl standart sapma (RSD), varyans ($S^2$), ve varyasyon katsayısı (CV) terimleri aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır (**Çizelge 7.10.**). Ayrıca her bir seri değeri için güven aralıkları (P: 0,05) belirlenmiştir.

**Çizelge 7. 10.** FIA metodunun istatistiksel parametreleri

| Parametre | Değeri |
|---|---|
| S | 1,65 |
| RSD | 3,44 |
| $S^2$ | 2,72 |
| CV | 0,34 |

**HA tayini için tayin limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ)**

FIA yöntemi ile HA tayininde LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanmasında; **Şekil 7.20.**'de çizilen kalibrasyon grafiği kullanılmış ve 3 tekrarlı olarak analiz edilen 1 mg/L'lik HA standardının standart sapması hesaplanmıştır (**Çizelge 7.11.**). Hesaplanan standart sapma değerinin 3 katına tekabül eden değer LOD değeri (3*s), standart sapma değerlerinin 10 katına tekabül eden değer ise, LOQ değeri (10*s) olarak kabul edilmiştir.

**Çizelge 7. 11.** FIA metodunun LOD ve LOQ değerleri

| Parametre | Değeri |
|---|---|
| LOD | 9,18 mg/L |
| LOQ | 30,6 mg/L |

**HA tayini için FIA metodunun seçiciliği / spesifikliği**

HA tayini için FIA metodunun seçiciliği ve spesifikliği, HPLC sisteminde yapılan modifikasyonlar ve kemometrik çalışmalarla güçlendirilmiştir. Nihai metot geliştirildikten sonra yapılan tüm denemelerde hümik asitler aynı çıkış zamanında pikler vermiştir. Bu nedenle de bu metot hümik asitlerin geniş bir kalibrasyon aralığında uygun ve seçici bulunmuştur (**Şekil 7.22.**).

**HA tayini için doğrusallık ve lineer ölçüm aralığı**

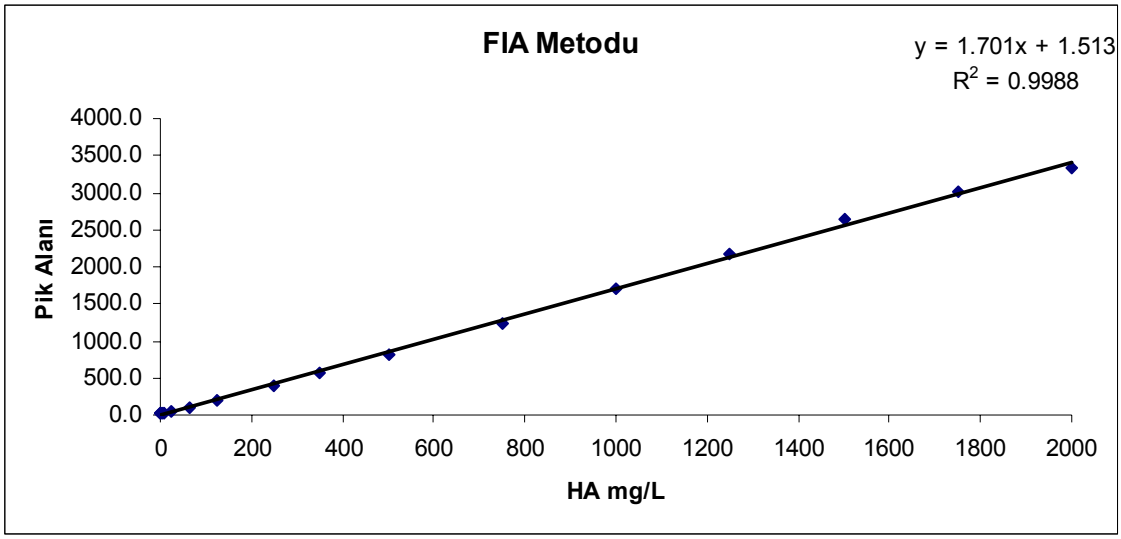
Yapılan optimizasyon çalışmaları neticesinde elde edilen nihai metoda göre oluşturulmuş kalibrasyon grafiği **Şekil 7.20.**'de gösterilmiştir. Görüldüğü üzere FIA metodu ölçülen tüm standart değerlerinde doğrusal bir kalibrasyon grafiği vermiştir ve 2000 mg/L değerine kadar lineer ölçüm aralığını korumuştur.

**HA tayini için FIA metodunun sağlamlığı**

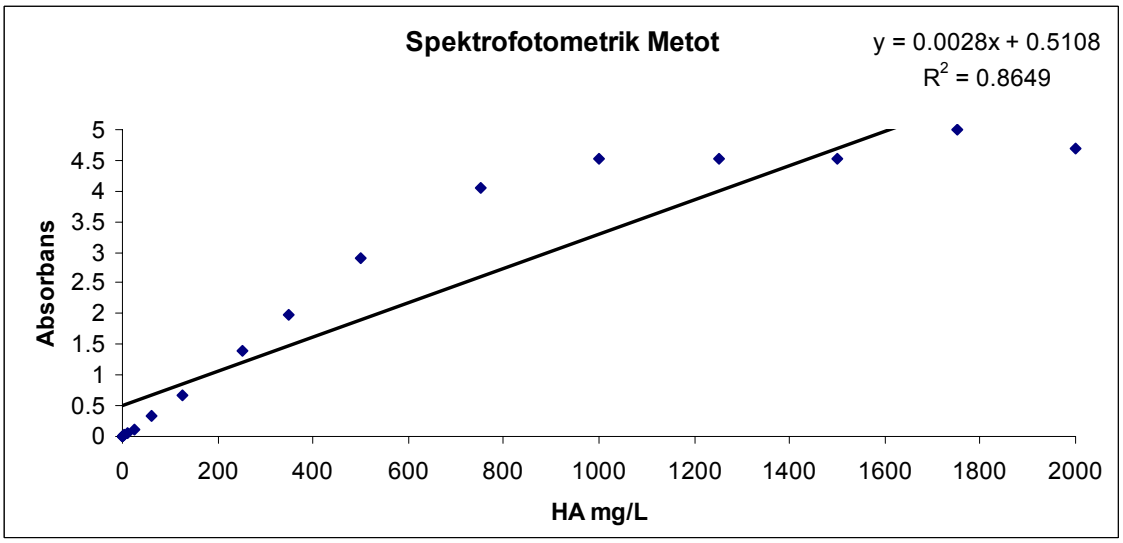
FIA ile HA tayininde; taşıyıcı fazın akış hızı ve pH'sı, numune hacmi ve sıcaklık gibi birçok parametrenin HA tayini üzerine etkileri incelenmiş ve incelemeler sırasında FIA yönteminin tekrarlanabilirlik, doğrusallık gibi önemli validasyon parametrelerini sağladığı belirlenmiştir. Dolayısıyla; HA tayini için FIA yöntemi sağlamlık açısından güvenilir bulunmuştur.

**HA tayini için geliştirilen FIA metodunun standart spektrofotometrik metotla karşılaştırılması**

FIA metodunda analiz edilen 0-2000 mg/L HA standartları, literatürde ve biyokimyasal numunelerimizin hümik madde içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart spektrofotometrik metotla (Schnitzer, 1972; Sorouradin ve ark., 1993; Hiradate ve ark., 2006) 3 tekrarlı olarak analiz edilerek metot validasyonu gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 7. 23.** FIA metoduyla elde edilen kalibrasyon grafiği




**Şekil 7. 24.** Spektrofotometrik metotla elde edilen kalibrasyon grafiği

**Şekil 7.23.** ve **Şekil 7.24.**'de görüleceği üzere, FIA metodu 2000 mg/L konsantrasyonuna kadar doğrusallığını kaybetmemişken, spektrofotometrik metot 750 mg/L konsantrasyonundan itibaren doğrusallıktan sapmalar göstermiştir.

**Alternatif F ve t denemeleri**

F ve t testleri her iki metot için 62,5 mg/L konsantrasyonundaki HA standardı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu standart her iki sistemde de üçer tekrarlı olarak verilmiş ve FIA metodu için **Şekil 7.23.**'teki; spektrofotometrik metot için ise **Şekil 7.24.**'teki kalibrasyon grafiği kullanılarak elde edilen sonuçlara göre yorumlamalar yapılmıştır.

**Çizelge 7. 12.** FIA ve spektrofotometrik metot kullanılarak 62,5 mg/L HA standardı için gerçekleştirilen analizlerden hesaplanan değerler

| HA (mg/L) değerleri (N: 3) | | | |
|---|---|---|---|
| FIA Metodu | | Spektrofotometrik Metot | |
| $\bar{y}_1 = 61,1$<br>$W_1 = 2,6$ | 62,0<br>59,4<br>62,0 | $\bar{y}_2 = 60,6$<br>$W_2 = 2,9$ | 59,0<br>60,0<br>61,9 |

***t denemesi***

Yukarıdaki çizelgeden de görüleceği üzere 3 tekrarlı deneyler yapılmıştır. Bunun gibi az sayıda deney sayısının olduğu durumlarda alternatif t denemesinden ($T_d$) faydalanılabilmektedir (Morgan, 1991). İki metottan elde edilen veriler (**Çizelge 7.12.**) kullanılarak $T_d$ değeri aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır:

$$T_d = \frac{2\left|\overline{y_1} - \overline{y_2}\right|}{w_1 + w_2} \qquad T_d = 0,18 \qquad (7.11)$$

**Çizelge 7. 13.** P: 0,05 ihtimaliyet seviyesi için kritik $T_d$ değerleri

| $N_1=N_2$ | $T_d$ |
|---|---|
| 2 | 3,43 |
| 3 | 1,27 |
| 4 | 0,81 |
| 5 | 0,61 |
| 6 | 0,50 |
| 7 | 0,43 |
| 8 | 0,37 |
| 9 | 0,33 |
| 10 | 0,30 |

3 çift deney sonucu için **Çizelge 7.13.**'ten elde edilen $T_d$ değeri P: 0,05 için 1,27'dir. Hesaplanan $T_d$ değeri bu değerden düşük çıkmıştır ve sıfır hipotezi reddedilemez. Bu sebeple iki metotla elde edilen ortalama değerlerin, P: 0,05 ihtimaliyet seviyesinde birbirinden farklı olmadığı görülmektedir.

***F denemesi***

Az sayıda deney ile yapılabilen diğer deneme ise alternatif F ($F_R$) denemesidir (Morgan, 1991). İki metottan elde edilen veriler (**Çizelge 7.12.**) kullanılarak $F_R$ değeri aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır:

$$F_R = \frac{w_1}{w_2} \qquad F_R = 0{,}90 \qquad (7.12)$$

**Çizelge 7. 14.** P: 0,05 ihtimaliyet seviyesi için iki yanlı $F_R$ değerleri

| $N_1=N_2$ | $F_R$ |
|---|---|
| 2 | 25,5 |
| 3 | 6,3 |
| 4 | 4,0 |
| 5 | 3,2 |
| 6 | 2,8 |
| 7 | 2,5 |
| 8 | 2,3 |
| 9 | 2,2 |
| 10 | 2,1 |

3 çift deney sonucu için **Çizelge 7.14.**'den elde edilen $F_R$ değeri P: 0,05 için 6,3'tür. Hesaplanan $F_R$ değeri bu değerden düşük çıktığı için iki metotla elde edilen sonuçların kesinlikleri arasında anlamlı bir fark olmadığı söylenebilmektedir.

# 8 SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu çalışma ile bazı biyokimyasal kaynaklardan yüksek verimli bir hümik madde ekstraksiyon metodu oluşturulmuş, hümik madde miktarları ve özellikleri incelenmiş, HPLC sisteminde yapılan modifikasyonlarla hümik asitlerin kantitatif tayini için yeni bir FIA metodu geliştirilmiştir.

Tarafımızca öne sürülen $HNO_3$ ön yükseltgemeli KOH ekstraksiyonu ile çözünme özelliği zamanla azalan hümik maddelere tekrar alkali çözelti içersinde çözünme yeteneği kazandırıldığı ve kaynağından izole edilen hümik madde miktarının artırıldığı görülmüştür.

Tespit edilen hümik madde miktarlarına göre cibre, çay atığı, deniz yosunu, toprak, linyit ve leonardit gibi biyokimyasal kaynakların birer hümik asit kaynağı olarak değerlendirilebileceği görülmüştür.

Günümüzde hümik maddelerin kantitatif analizinde spektrofotometrik metot sıklıkla kullanılmaktadır. Fakat bu metot çok fazla zaman, çözücü, emek ve numune miktarına ihtiyaç duymakta ve dar bir lineer aralığa (0-750 mg/L) sahip olmaktadır. Bu çalışmada geliştirilen FIA metodu; sahip olduğu geniş ve lineer ölçüm aralığı ile (0-2000 mg/L), farklı konsantrasyonlara sahip HA numunelerini seyreltme işlemine ihtiyaç duymadan çok az (10 µL) bir numune hacmi ile analiz edebilmekte ve saatte yaklaşık 60 analiz yapabilme kapasitesine sahip olmaktadır. Karmaşık hiçbir reaktife ihtiyaç duymayan bu FIA metodunda; hareketli faz çözeltisi olarak sadece $NH_3/NH_4Cl$ pH= 9,24 tamponu kullanılmaktadır. FIA metodundan elde edilen sonuçlar ile standart metotlardan elde edilen sonuçlar istatistiksel F ve t testlerinden faydalanılarak karşılaştırılmış ve iki metot arasında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir (%95 güven seviyesinde). Böylece; standart metotlarla iyi bir uyum gösteren FIA metodunun, HA analizleri için kullanımının çok uygun olduğu ve kolaylıkla uygulanabildiği görülmüştür.

Yapılan bu tez çalışmasında;

- Hümik maddelerin kaynaklarından yüksek verimle izole edilebilmelerini sağlayan ön yükseltgemeli bir metot geliştirilmiş ve hümik madde kaynağı olarak değerlendirilebilecek bazı biyokimyasal kaynakların hümik madde içeriği ortaya çıkarılmıştır.
- FIA sisteminin parametrelerinin HA tayini için uygun hale getirilmesinde kemometrik yöntemlerden faydalanılmış ve bu sayede optimizasyon süresince daha az zaman harcanarak sonuca gidilmiştir. 3 boyutlu yüzey grafikleri ile sistemin müsaade ettiği sınırlar içersinde optimizasyonu yapılan faktörlerin birbirleri ile etkileşimleri görselleştirilerek seviyeler kolaylıkla seçilmiştir.
- Hümik asitlerin hızlı ve hassas olarak tayini için yeni bir FIA metodu geliştirilmiş ve programlandığında tam otomatik analiz yapabilen bir HA tayin metodu meydana getirilmiştir.

Sonuç olarak; bu çalışma ile hümik maddelerin kaynaklarından izolasyonunda yükseltgeme metodunun önemi görülmüştür ve HA tayini için geliştirilen üstün özelliklere sahip tam otomatik FIA metodunun, sağladığı avantajlar ile standart metotların yerini alacağı düşünülmektedir.

# 9 KAYNAKLAR


Ayyıldız, H., F., 2010, Otomatikleştirilmiş akış enjeksiyon sistemleriyle yağ analiz metotlarının geliştirilmesi, Doktora Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya, 32-41.

Bezerra, M., A., Santelli, R., E., Oliveira, E., P., Villar, L., S., Escaleira, L., A., 2008, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*, 76, 965-977.

Bratskaya, S., Golikov, A., Lutsenko, T., Nesterova, O., Dudarchik, V., 2008, Charge characteristics of humic and fulvic acids: Comparative analysis by colloid titration and potentiometric titration with continuous pK-distribution function model, *Chemosphere*, 73, 557-563.

Brereton, R., G., 1997, Multilevel Multifactor Designs for Multivariate Calibration, *The Analyst*, 122, 1521-1529.

Daviesa, G., Fataftah, A., Radwanb, A., Raffauf, R., F., Ghabbour, E., A., Jansene, S., A., 1997, Isolation of humic acid from terrestrial plant Brugmansia sanguinea, *The Science of the Total Environment*, 201, 79-87.

Dinç, E., 2007, Kemometri çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 27, 61-92.

Ellerbrock, R. H., Kaiser, M., 2005, Stability and composition of different soluble soil organic matter fractions - evidence from d13C and FTIR signatures, *Geoderma*, 128, 28–37.

Fang, Z. Guo, T. Welz, B., 1991, " Determination of cadmium, lead and copper in water samples by flame atomic-absorption spectrometry with preconcentration by flow-injection on-line sorbent extraction" 38(6), 613-619.

Ferrer, J., Paez, G., Marmol, Z., Ramones, E., Chandler, C., Marin, M., Ferrer, A., 2001, Agronomic use of biotechnologically processed grape wastes, *Bioresource Technology*, 76, 39-44.

Francioso, O., Ciavatta, C., Tugnoli, V., Sanchez-Cortes, S., Gessa, C., 1998, Spectroscopic characterization of pyrophosphate incorporation during extraction of peat humic acids, *Soil Sc. Soc. Am. J.*, 62, 181–187.

Garcia, C., Hernfindez, T., Costa, F., 1992, Characterization of Humic Acids from Uncomposted and Composted Sewage Sludge by Degradative and Non-degradative Techniques, *Bioresource Technology*, 41, 53-57.

Gezici, O., 2010, Akış enjeksiyon-kromatografik yöntemlerle immobilize hümik asidin sabit faz özelliklerinin incelenmesi, Doktora Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Konya, 28-33.

Gökçe, B., Taşgetiren, S., 2009, Kalite için deney tasarımı, *Makine Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 6, 71-83.

Havuz, T., 2007, Anod çamurundaki kurşunun sodyum karbonatlı ortamda giderilmesi, Yükseklisans Tezi, Atatürk Üniversitesi *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, 15-20.

Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B., 2005, Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Thieme, Stuttgart, 33–69.

Hiradatea, S., Yonezawab, T., Takesako, H., 2006, Isolation and purification of hydrophilic fulvic acids by precipitation, *Geoderma*, 132, 196– 205.

Inbar, Y., Hadar, Y., Chen, Y., 1992, Characterization of humic substances formed during the composting of solid wastes from wineries, *The Science of the Total Environment*, 113, 35-48.

Janos, P., Krizenecka, S., Madronova, L., 2008, Acid–base titration curves of solid humic acids, *Reactive & Functional Polymers*, 68, 242-247.

Jones, M.N., Bryan, N.D., 1998, *Advanced. Colloid Interf. Sci.*, 78, 1.

Josanaide, S. R., Sonay, S., S. Garrigues, M. de la Guardia, 2001, FTIR tentative characterization of humic acids extracted from organic materials, *Spectroscopy Letters*, 34(2), 179–190.

Kaiser, M., Ellerbrock, R. H., 2005, Functional characterization of soil organic matter fractions different in solubility originating from a long-term field experiment, *Geoderma*, 127, 196–206.

Kara, H., 1988, Bazı linyitlerden elde edilen hümik asitlerin incelenmesi, Doktora Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Konya, 7.

Kutluca, M., 2007, Hümik asitlerin metal tutma ve ligant değiştirme özelliklerinin incelenmesi, Yükseklisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya, 3.

Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, A., Pertensen, J., Bergman, R., 1998, Experimental design and optimization, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 42, 3-40.

Manos, G., P., Tsai, E., 1980, Chromatographic behaviour of humic materials extracted from Barberton sludge, *Water, Air and Soil Pollution*, 13, 373-377.

Mema, V., 2006, Identification of extraction methods for the production of humic acids from black liquor, Yükseklisans Tezi, Stellenbosch Üniversitesi *Proses Mühendisliği Bölümü*, Stellenbosch, 1-2.

Michalowski, J., Halaburda, P., Kojlo, A., 2001, Determination of humic acid in natural waters by flow injection analysis with chemiluminescence detection, *Analytica Chimica Acta*, 438, 143-148.

Morgan, E., 1991, Experimental Design Analytical Chemistry by Open Learning, *John Wiley and Son*, 1-2.

Özkan, S., 2007, Türk linyitlerinden hümik asit ve gübre üretimi, Yükseklisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 33-34.

Perdue, E.M., 1985, Acidic functional groups of humic substances, *Geochemistry*, 493–526.

Romero, E., Plaza, C., Senesi, N., Nogales, R., Polo, A., 2007, Humic acid-like fractions in raw and vermicomposted winery and distillery wastes, *Geoderma*, 139, 397-406.

Ruzicka, J., Hansen, E.H., 1981, "Flow Injection Analysis", *John Wiley and Sons*, New York.

Ruzicka, J. Hansen, E.H., 1988, "Flow Injection Analysis", 2nd ed., *Wiley Interscience*, New York.

Ruzicka, J., Hansen, E.H., 1998, "Flow Injection Analysis" -*Second Edition- A wiley Interscience Publication*, USA.

Ruzicka, J. Hansen, E.H., 2002, *Analytical Chemistry*, 72(5), 212-217.

Schnitzer, M., Khan, S.U., 1972, Humic Substances in the Environment, *Mercel Dekker*, New York.

Senesi, N., D'Orazio, V., Ricca, G., 2003, Humic acids in the first generation of EUROSOILS, *Geoderma*, 116, 325–344.

Shirshova, L., T., Ghabbour, E., A., Davies, G., 2006, Spectroscopic characterization of humic acid fractions isolated from soil using different extraction procedures, *Geoderma,* 133, 204-216.

Silva, J., C., G., E., Machado, A., A., S., C., Silva, M., A., B., A., 1998, Acid-base properties of fulvic acids extracted from untreated sewage sludge and from composted sludge, *Wat. Res.*, 32, 441-449.

Skoog, D.A. Holler, F.J. and Nieman, A.T., 1998, "Principles Of Instrumental Analysis", -*Fifth Edition-, Saunders Collegepublishing*, USA.

Sorouradin, M., H., Hiraide, M., Kim, Y., S., Kawaguchi, H., 1993, Quantitative desorption of humic substances from Amberlite XAD resins with an alkaline solution of dodecyl sulfate.

Stevenson, F.J., 1982, Humus Chemistry: Genesis Composition, Reactions. *Wiley Interscience*, New York.

Stewart, K.K. Beecher, G.R. and Hare, P.E., 1976, *Anal. Biochem*, 70, 167.

Szabo, P., 2004, Characterization of alginite humic acid content, *Desalination*, 163, 85-91.

Tarhan, İ., Topkafa, M., Kara, H., 2010, Linyitlerden elde edilen hümik asit miktarı üzerine oksidasyon etkisinin incelenmesi, *5. Ulusal Analitik Kimya Kongresi*, Erzurum, 212.

Tatzber, M., Stemmer, M., Spiegel, H., Katzlberger, C., Haberhauer, G., Mentler, A., Gerzabek, M. H., 2007, FTIR-spectroscopic characterization of humic acids and humin fractions obtained by advanced NaOH, $Na_4P_2O_7$ , and $Na_2CO_3$ extraction procedures, *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 170, 522–529.

TSE, 2003, Kahverengi kömürler ve linyitler-Hümik asitlerin tayini, TS 5869 ISO 5073, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

Tombacz, E., Madi, E., Szekeres, M. ve LA. Rice, 2001, Electrolyte induced spontaneous fractionation of polydisperse humate solutions, in Understanding and Managing Organic Matter in Soils, R.S. Swift ve K.M. Spark, Sediments and Waters, , IHSS, *Hyde Park Press*, Adelaide, 53-60.

Topkafa, M., 2006, İmmobilize hümik asitlerin katı faz ekstraksiyon sistemlerinde kullanımı, Yükseklisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya, 37-43.

Unsal, T., Ok, S. S., 2001, Description of characteristics of humic substances from different waste materials, *Bioresource Technology*, 78, 239-242.

Veeken, A., Nierop, K., Wilde, V., Hamelers, B., 2000, Characterisation of NaOH extracted humic acids during composting of a biowaste, *Bioresource Technology*, 72, 33-41.

Vieyra, F., E., M., Palazzi, V., I., Pinto, M., I., S., Borsarelli, C., D., 2009, Combined UV–Vis absorbance and fluorescence properties of extracted humic substances-like for characterization of composting evolution of domestic solid wastes, *Geoderma*, 151, 61-67.

Wu, F., C., Evans, R., D., Dillon, P., J., Cai, Y., R., 2007, Rapid quantification of humic and fulvic acids by HPLC in natural waters, *Applied Geochemistry*, 22, 1598-1605.

# ÖZGEÇMİŞ



## KİŞİSEL BİLGİLER


**Adı Soyadı** : İsmail TARHAN
**Uyruğu** : T.C.
**Doğum Yeri ve Tarihi** : Kocaeli, 22.05.1987
**Telefon** : 0332 223 38 89
**Faks** : 0332 241 24 99
**e-mail** : ismtarhan@gmail.com / ismtarhan@selcuk.edu.tr


## EĞİTİM

| Derece | | Adı, İlçe, İl | Bitirme Yılı |
|---|---|---|---|
| Lise | : | Seka Çocuk Dostları Lisesi, Derince, KOCAELİ | 2004 |
| Üniversite | : | Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü | 2009 |
| Yüksek Lisans | : | Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı | |
| Doktora | : | - | - |

## İŞ DENEYİMLERİ

| Yıl | Kurum | Görevi |
|---|---|---|
| 2010-… | Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü | Araştırma Görevlisi |

## UZMANLIK ALANLARI

Humus, hümik asit ve fülvik asit ekstraksiyon ve fraksiyonlama teknikleri

Kromatografik (HPLC, GC) ayırma, tayin teknikleri ve uygulamaları

Kemometri ve istatistiksel analiz metotları

**YABANCI DİLLER**

İngilizce ( İyi seviyede yazan, anlayan ve orta seviyede konuşan)

**YAYINLAR**

**Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:**

- İsmail TARHAN, Mustafa TOPKAFA, Hüseyin KARA **"Linyitlerden Elde Edilen Hümik Asit Miktarı Üzerine Oksidasyon Etkisinin İncelenmesi"** 5. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 21-25 Haziran (2010), Erzurum

- H.Filiz AYYILDIZ, Fatma Nur ARSLAN, Mustafa TOPKAFA, Fatih DURMAZ, A. Gökçen SARAÇ, İsmail TARHAN, Hüseyin KARA **"Bitkisel Yağlardaki Serbest Yağ Asidi (FFA) Miktarının Otomatikleştirilmiş Akış Enjeksiyon (FIA) Sistemleriyle Tespitinde Sıcaklık ve Yağ Cinsinin Etkisi"** 5. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 21-25 Haziran (2010), Erzurum

- A. Gökçen SARAÇ, Hüseyin KARA, H. Filiz AYYILDIZ, Fatma Nur ARSLAN, Mustafa, İsmail TARHAN **"Tereyağı Örneklerindeki Konjuge Linoleik Asit İzomerlerinin GC/FID Sistemi Kullanılarak Tayini"** 24. Ulusal Kimya Kongresi, 29 Haziran-2 Temmuz (2010), Zonguldak.

- İsmail TARHAN, H. Filiz AYYILDIZ, Mustafa TOPKAFA, Fatma Nur ARSLAN, Fatih DURMAZ, Hüseyin KARA "**Hümik Maddelerin Akış Enjeksiyon Sistemleriyle Kantitatif Tayininde Hareketli Fazın Akış Hızının ve pH Değerinin Etkisinin İncelenmesi"** 25. Ulusal Kimya Kongresi, 27 Haziran-2 Temmuz (2011), Erzurum.

**Tezler**

Tarhan, İ., Öztürk, İ., **"Aspir Bitkisinin Yağ Asit Kompozisyonun Kromatografik Olarak İncelenmesi"** Lisans Mezuniyet Çalışması, Selçuk Üniversitesi, 2009

| |
|---|
| 250 mg/L Hümik asit (HA) |