



## Demir ve Alüminyumun Doğal Sularda UV Spektrofotometrik Tayini İçin Yöntem Geliştirilmesi ve Elde Edilen Verilerin Kemometrik Kalibrasyon Yöntemleriyle Değerlendirilmesi

A. Hakan AKTAŞ\*<sup>1</sup>, Bengisu MUTLUTÜRK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 32200, Isparta

(Alınış Tarihi: 10.07.2014, Kabul Tarihi: 12.12.2014)

### Anahtar Kelimeler

PCA  
PCR  
PLS  
UV-Görünür Alan  
Spektroskopisi  
Kemometri  
CAS  
PCV

**Özet:** Bu çalışmada, kemometrik kalibrasyon yöntemlerinden temel bileşen analizi yöntemi (PCA), temel bileşen regresyonu yöntemi (PCR) ve kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS), doğal sularda bulunan  $Fe^{3+}$  ve  $Al^{3+}$ 'ün miktar tayininde başarı ile uygulanmıştır. UV- Görünür Alan Spektroskopisinden elde edilen veriler kemometrik olarak değerlendirilmiştir. Uygulamada iki farklı ligand chrome azurol S (CAS) ve pyrocatechol violet (PCV) denenmiş ve daha kararlı sonuçlar elde edildiğinden CAS ile çalışmalara devam edilmiştir.  $Fe^{3+}$  ve  $Al^{3+}$  CAS ile komplekslerinin spektrofotometrik yöntemlerle uygun parametreleri belirlenmiş (ligand miktarı, pH, bekleme süreleri, metal derişimi ve absorbans arasındaki ilişki ve yabancı iyon etkisi) ve optimum koşullar sağlanmıştır. Optimum koşullar sağlandıktan sonra  $Fe^{3+}$  ve  $Al^{3+}$  içeren doğal su örneğinin spektrofotometrik tayinleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler kemometrik olarak değerlendirilmiştir.

## UV Spectrophotometric Method Development for the Determination of Iron and Aluminum in Natural Waters and Evaluation of the data Obtained from the Calibration of Chemometric Methods

### Keywords

PCA  
PCR  
PLS  
UV-Visible  
Spectrophotometer  
Chemometry  
CAS  
PCV

**Abstract:** In this study, principal component analysis method (PCA), principal component regression method (PCR), partial least squares method (PLS) of chemometry calibration methods, are successfully realized on quantitation of  $Fe^{3+}$  and  $Al^{3+}$  present at natural water. The data gathered from UV- Visible Spectroscopy are evaluated chemometrically. In the application two distinctive ligand chrome azurol S (CAS) and pyrocatechol violet (PCV) are tested and studies are proceeded with CAS due to more stable results that are obtained. Optimum parameters (ligand amount, pH, waiting period, relation between metal concentration and absorbance, foreign ion effect) and conditions of  $Fe^{3+}$  and  $Al^{3+}$  CAS and their complexes are determined with spectrophotometric methods. After the optimum conditions are provided, spectrophotometric determinations of natural water including  $Fe^{3+}$  and  $Al^{3+}$  are realized and obtained data are evaluated as chemometry.

### 1. Giriş

Doğal suların içerisinde bulunan ve organizmalarda zararlı etki oluşturabilecek maddelerin arasında metaller önemli yer tutmaktadır. Bu metallere demir ve alüminyum yaşamsal açıdan oldukça önemlidir. İnsan vücudunun günlük alüminyum alımı yaklaşık 5 mg'dır ve bu nispeten düşük akut toksisite yol açar. Aslında emilim günde yaklaşık 10 mikrogram olduğu varsayılır ve bu tutarların insanlar

için zararsız kabul edilir. Diğer taraftan, böbrek hasarı olan kişiler alüminyum toksisitesine duyarlıdır ve alerji riski vardır. Bir diğer önemli metal ise demir'dir. Demir, hücrel oksidatif mekanizmalar ve dokulara oksijen taşınması gibi yaşamsal önemi olan birçok olayda yer almaktadır. Birçok enzim ve koenzim molekülünde demir, bir bileşen veya kofaktör olarak görev yapmaktadır (Belce, 2002). 1,0 mg/L den fazla demir suda yaşayan diğer canlılar içinde zararlı etki yapar. Vücutta çok az bulunan

serbest demir, oldukça zehirlidir ve mide bağırsak kanalında hasar yapıp vücudun ihtiyacından fazla demir emilmesine sebep olarak zehirlenmelere yol açar (Kaya ve Akar, 1998).

Bu çalışmada doğal sularda bulunan demir ve alüminyumun spektrofotometrik olarak tayini için yöntem geliştirilmesi, çok değişkenli kalibrasyon teknikleri ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın önemini ikili karışım halinde olan sentetik numunedeki her bir bileşenin ayrı ayrı analiz edilmesine gerek olmaması oluşturmaktadır. Birden fazla etken maddenin bir arada bulunduğu bileşiklerde bu etken maddelerin aynı bölgede absorpsiyon vermeleri sonucunda spektral girişimleri nedeniyle doğrudan kantitatif analizleri mümkün olmadığı için bir ayırma işleminin ardından ancak analizleri yapılabilir. Bu durum, uzun yıllar ürün analizlerinde UV- görünür alan spektrofotometrilerin kullanımını kısıtlayıcı bir faktör olmuştur. Ancak günümüzde karışım analizlerinde UV-görünür alan spektrofotometrisi, kemometrik yöntemlerin kullanımıyla tekrar güncellik kazanmıştır. Bunlardan bazıları elektro termal atomik absorpsiyon metodu (ETAAS) ve grafit fırınlı atomik absorpsiyon metodu (GFAAS) (Zarei vd., 2006; Sancar vd., 2003), indüktif eşleşmiş plazma-optik emisyon spektrometre metodu (ICP-OES) (Tarhan vd., 1994; Nagaoku ve Maitani, 2000), atomik absorpsiyon spektrofotometri (AAS) (Coscaine vd., 2002), kromatografi (Kendüzler ve Türker, 2003; Ryan ve Meaney, 1992), spektrofotometri (Bond ve Nagaosa, 1985; Thakur ve Deb, 1999) ve voltametri'dir (Limson vd., 1998). Bu yöntemlerden, demir ve alüminyum analizinde, seçilen spektrofotometrik tayin için çeşitli ligandlar kullanıldığı araştırmalar sonucunda gözlemlenmiştir. Bunlara örnek olarak da krezol sarısı (Nagaoku ve Maitani, 2000), alizarin kırmızısı (Safavi vd., 2006), 2-hidroksi-1-naftaldehit benzoil hidrazon (Reddy vd., 2000), eriochrome black T (Honorato vd., 2001), setil trimetilamonyum bromür (Rodrigues vd., 2005; Royset, 1985), krom azurol S (Marczenko ve Kaowska, 1981) ve setil piridinyum klorür (Gao vd., 2005) verilebilir.

Yapılan çalışmada hem çok bileşenli madde ile çalışılmış, hem de hesaplamalar istatistik olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, numenin kantitatif olarak değerlendirilmesinde, klasik UV spektroskopisi yöntemi ile kemometrik kalibrasyon yöntemlerinden temel bileşen regresyonu yöntemi (PCR) ve kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS) ile uygulanmıştır. UV-Görünür Alan Spektroskopisinden elde edilen veriler kemometrik olarak değerlendirilmiştir.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Kullanılan Cihaz

UV-Vis spektrumları, bilgisayar tarafından kontrol edilen 1cm uzunluğundaki hücre ile donatılan UV

1700 Pharmaspec Shimadzu spektrofotometrisi (Shimadzu, Kyoto, Japan) kullanılarak not edilen spektrum değerleri doğal sulardaki demir ve alüminyumun miktarlarını belirlemek için kemometrik metotlara uygulanmıştır.

### 2.2. Kemometrik Yazılım

Elde edilen verileri kullanılarak oluşturulan PCR ve PLS kemometrik yöntemleri için elimizde lisansı bulunan Minitab 16 paket programı kullanılmıştır.

### 2.3. Kullanılan Kimyasallar

Yapılan çalışmada analitik saflıkta olan, kimyasallar alüminyum klorür ve demir (III) klorür heksahidrat, pH çalışmaları için asetik asit, sodyum asetat trihidrat, amonyum klorür, hidroklorik asit, glasiyel asetik asit, nitrik asit, sülfürik asit ve amonyak, ligand olarak chrome azurol S (CAS) ve pyrocatechol violet (PCV) ve kompleks içindeki karakteristik absorpsiyon için cetylpyridinium chloride (CPC) ve 0,05 S. cm<sup>-1</sup> den düşük kondüktiviteye sahip, Milli - Q su arıtma (Millipore Corp.) sisteminden sağlanan su kullanılmıştır.

### 2.4. Yöntem

Bu çalışmada, spektrofotometrik ölçümlerle metal katyonları komplekslerinin stok çözeltilerinin spektrumları okunmuştur. Bu işlem için önce tek tek sonra farklı oranlarda hazırlanan sentetik karışımların spektrumları alınmıştır. Son işlem olarak da doğal su örneklerinde ölçümler yapılmıştır. Elde edilen veriler, farklı kemometrik yöntemlerle değerlendirilmiştir. İlk basamakta, UV spektrofotometre cihazının kalibrasyonu (sıfırlama işlemi) yapılmıştır. Kalibrasyon işlemi önce her iki hücre boş bırakılarak havaya karşı yapılmıştır. Sonra aynı işlem bu kez her iki ışık yoluna hidroklorik asit ile hazırlanan kör numunesi konularak yapılmıştır. Bütün okumalarda hep kör bu şekilde hazırlanmıştır. Kör olarak sadece hidroklorik asit kullanılmasının nedeni bu çalışmada genel olarak çözücümüz hidroklorik asit olduğu içindir. Kör seçimi yapılırken girişim etkilerini yok etmek için, kör olarak çözücü tercih edilmiştir. İkinci basamakta, saf metal katyonları komplekslerinin tek tek spektrumları alınmıştır. Bu işlem esnasında stok metal katyonlarının derişimleri 0,1- 2,5 ppm arasında olacak arasında saf maddeler stoklardan alınarak toplam hacim 10 mL ye tamamlanarak çözeltileri hazırlanmış ve UV spektroskopisinde absorpsiyon okumaları yapılmıştır. Üçüncü basamakta, her bir madde ayrı bir dalga boyunda maksimum verdiğinden saf metal katyonlarından oluşturulan sentetik karışımların UV spektroskopisinde absorpsiyon okumaları yapılmış ve birbiri yanında herhangi bir ön ayırma işlemine gerek olmaksızın metal katyonu-kompleksleri incelenmiştir. Son

basamakta ise, doğal su numunelerinde  $Fe^{3+}$ -CAS ve  $Al^{3+}$ -CAS komplekslerinin çözeltileri incelenmiştir.

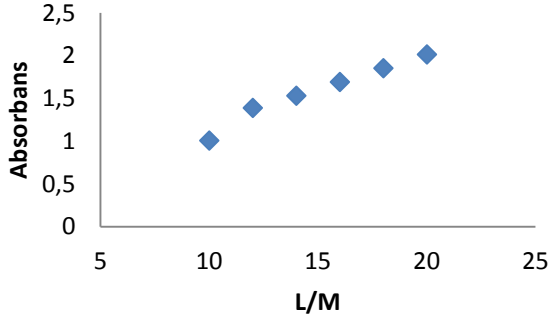
### 3. Bulgular

$Fe^{3+}$ -CAS ve  $Al^{3+}$ -CAS komplekslerinin oluşumu için en uygun optimum şartlar belirlendikten sonra, kemometrik kalibrasyonların  $Fe^{3+}$ -CAS ve  $Al^{3+}$ -CAS komplekslerinin analizi için iki farklı kemometrik yöntem geliştirildi. Bunlar PCR ve PLS kalibrasyon yöntemleridir. Kemometrik yöntemlerin uygulaması için spektral koşullar optimizasyonu ve optimal kalibrasyon setinin hazırlanması için ön çalışmalar yapıldı.

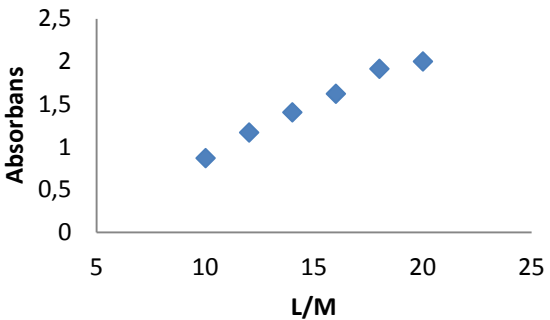
### 3.1. Komplekslerin Oluşumu İçin Optimum Şartlar

#### 3.1.1. Ligand Miktarı

$Fe^{3+}$ -CAS ve  $Al^{3+}$ -CAS komplekslerinin oluşumu için en uygun ligand miktarının bulunması amacıyla 10 ppm lik  $Fe^{3+}$  ve  $Al^{3+}$  metal çözeltilerine CAS çözeltilisinden çeşitli hacimlerde eklenerek ortam pH'sı pH=5 tamponu ile ayarlanmış, oluşan çözeltilerin spektrumları alınarak en uygun ligand miktarı bulunmuştur.  $Fe^{3+}$ -CAS ve  $Al^{3+}$ -CAS kompleksinin oluşumuna ligand miktarının etkisi Şekil 1 ve 2 de görülmektedir.



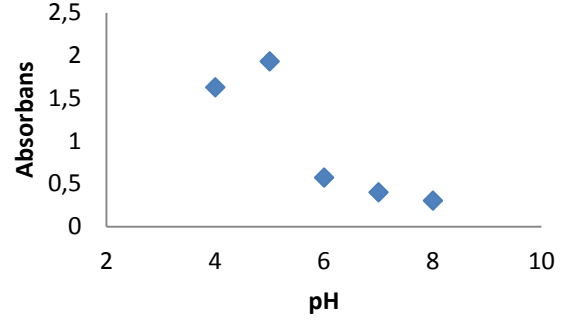
Şekil 1  $Fe^{3+}$ -CAS kompleksinin oluşumuna ligand miktarının etkisi



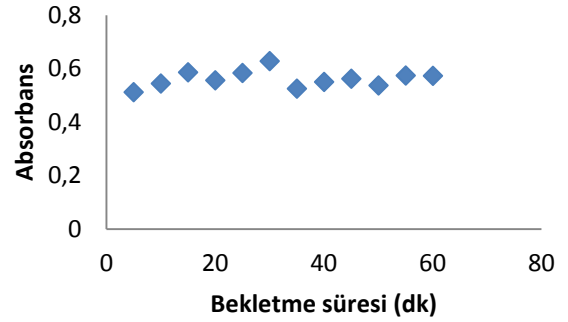
Şekil 2  $Al^{3+}$ -CAS kompleksinin oluşumuna ligand miktarının etkisi

#### 3.1.2. Optimum pH

$Fe^{3+}$  ve  $Al^{3+}$  metal katyonlarının CAS komplekslerinin oluşumuna pH'nın etkisini incelemek amacıyla (Şekil 3, 4) her bir metal kompleksine pH 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 ve 8,0 olacak şekilde spektrumları alınmıştır.



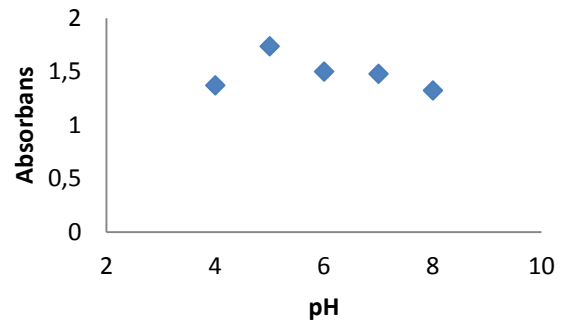
Şekil 3  $Fe^{3+}$ -CAS kompleksinin oluşumuna pH'nın etkisi



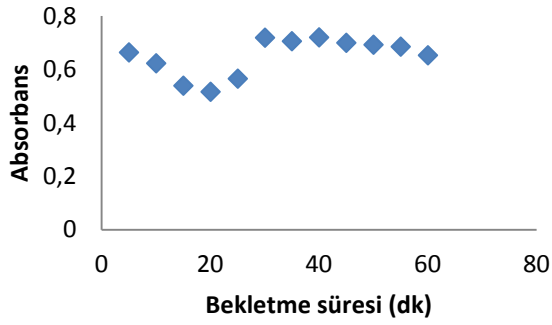
Şekil 4  $Al^{3+}$ -CAS kompleksinin oluşumuna pH'nın etkisi

#### 3.1.3. Bekletme Süresi

$Fe^{3+}$  ve  $Al^{3+}$  metal katyonlarının CAS komplekslerinin 10ppm lik çözeltileri pH=5 tamponu ile ayarlandı. Oluşan komplekslerin spektrumları 5'er dakika aralıklarla 60 dakika boyunca ölçülerek en uygun bekleme süresinin 30 dakika olduğu belirlenmiştir. (Şekil 5, 6).



Şekil 5  $Fe^{3+}$ -CAS kompleksinin oluşumuna bekletme süresinin etkisi



Şekil 6 Al<sup>3+</sup>-CAS kompleksinin oluşumuna bekleme süresinin etkisi

### 3.1.4. Yabancı İyon Etkisi

Çalışılacak olan su numunelerinde eser miktarda da olsa bulunma olasılığı olan mangan, krom, potasyum, sodyum, kadmiyum, kurşun, kalsiyum, magnezyum ve baryum iyonlarının 25 ppm'lik çözeltilerinin 0,2 mL'sine CAS çözeltisinin 1 mL'si katılarak tampon çözelti ile 10 mL'ye tamamlanmış ve spektrumları alınmıştır. Optimum koşullar altında absorbans oluşumuna etki edebilecek herhangi bir girişim yapmadığı belirlenmiştir.

### 3.1.5. Metal Derişimi ve Absorbans İlişkisi

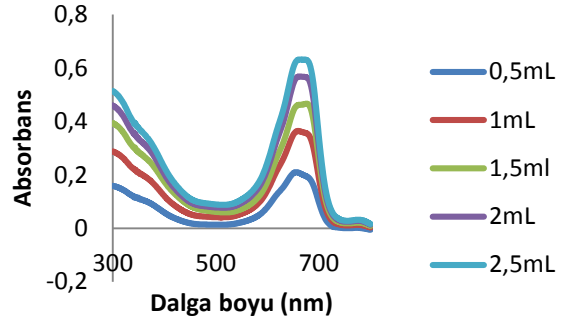
Al<sup>3+</sup> ve Fe<sup>3+</sup> saf halde 100 ppm standart çözeltileri öncelikle hazırlanmıştır. Daha sonra 0,2-3,0 ppm arasında saf maddeler stoklardan alınarak üzerine optimum koşullar sağlanacak şekilde CAS ligandı eklenmiş ve tampon çözeltiyle ortam pH'ı 5 yapılmıştır. Son hacmin 10ml'ye tamamlanmasından sonra çözeltilerin spektrumları alınmış, bu işlem sonrası absorbanslar ölçülerek kaydedilmiştir. Çizelge 1'de gösterildiği her bir kompleksin maksimum absorbans yaptığı dalga boyu, molar absorpsiyon katsayısı, kalibrasyon denklemi ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Çizelgede, korelasyon katsayılarında, oluşan komplekslerin derişimleri ile ölçülen absorbanslar arasında yeterli bir doğruluk olduğu görülmektedir.

Çizelge 1 Çalışılan metal komplekslerinin spektroskopik özellikleri

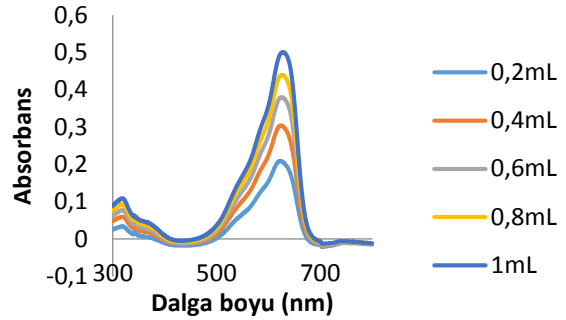
Metal kompleksi	Fe <sup>3+</sup> -CAS	Al <sup>3+</sup> -CAS
Mak.abs. Yaptığı dalga boyu	660nm	628nm
Molar abs. Katsayısı	2,23.10 <sup>3</sup>	5,26.10 <sup>3</sup>
Kalibrasyon denklemi	y=0,21025x+0,137	y=0,0728x+0,1472
Korelasyon katsayısı	0,9781	0,9894

Her bir oluşan kompleksin önce tek tek spektrumları alınmaktadır. Bu spektrumlar alınırken derişim aralıkları Fe<sup>3+</sup>-CAS kompleksleri için 0,5 – 2,5 ppm ve Al<sup>3+</sup>-CAS kompleksleri için ise bu değerler 0,2– 1,0

ppm arasındadır. Bu derişim aralıkları tayini yapılan her bir kompleks için lineer doğrusallığın olduğu bölgelerdir. Bu çalışma sonucu elde edilen grafikler Şekil 7 ve 8'de gösterilmiştir.



Şekil 7 Fe<sup>3+</sup>-CAS komplekslerinin absorpsiyon spektrumları



Şekil 8 Al<sup>3+</sup>-CAS komplekslerinin absorpsiyon spektrumları

Fe<sup>3+</sup>-CAS ve Al<sup>3+</sup>-CAS kompleksleri Çizelge 1'de de görüldüğü üzere ayrı dalga boylarında maksimum absorbans vermektedirler. Bu özellikten yararlanılarak bir sonraki aşamada bu iki kompleksin sentetik karışımları hazırlanmış ve bunlar birbiri yanında herhangi bir ön ayırma işlemi yapmaksızın tayin edilmişlerdir. Fe<sup>3+</sup>-CAS ve Al<sup>3+</sup>-CAS kompleksleri sürekli spektrum göstermekte ve üst üste örtüşen spektrumlar gözlenmektedir.

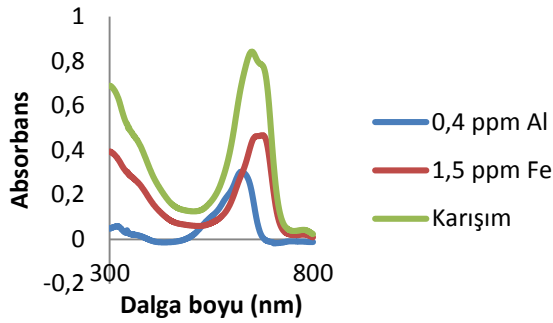
Kemometrik kalibrasyonların Fe<sup>3+</sup>-CAS ve Al<sup>3+</sup>-CAS komplekslerinin analizine uygulamasında üç farklı kemometrik yöntem geliştirildi. Bunlar PCA, PCR ve PLS kalibrasyon yöntemleridir. Kemometrik yöntemlerin uygulaması için spektral koşullar optimizasyonu ve optimal kalibrasyon setinin hazırlanması için ön çalışmalar yapılmıştır.

Saptanan spektral koşullarda kalibrasyon setinin ve numunelerin 300-700 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları alınmış ve kemometrik kalibrasyonlar 620-670 nm dalga boyu bölgesindeki absorbans değerlerinin beşer nanometrelik vektörel ölçümleri kullanılarak elde edilmiştir. Kemometrik algoritmalarla hesaplanan PCA, PCR ve PLS

kalibrasyonları yapay ve doğal su numunesinin analizine uygulanmıştır.

### 3.2. Spektral Koşulların Optimizasyonu

Spektrofotometrik çalışmalarda  $Fe^{3+}$ -CAS ve  $Al^{3+}$ -CAS için  $1.10^{-3}$  M HCl çözücüsünün uygun çözücü olduğu saptanmıştır.  $1.10^{-3}$  M HCl içerisinde  $Fe^{3+}$ -CAS ve  $Al^{3+}$ -CAS kompleksleri ile buna karşılık gelen karışımının 300-800 nm dalga boyu aralığında spektrumları alınmıştır (Şekil 9). Şekil 9'dan da görüldüğü gibi her iki bileşik aynı dalga boyu aralığında girişim yapmaktadır. Bu nedenle klasik spektroskopik yaklaşımlarla her iki bileşiğin aynı anda miktar tayinleri mümkün değildir.



Şekil 9  $Fe^{3+}$  (1,5  $\mu\text{g/mL}$ ) ve  $Al^{3+}$  (0,4  $\mu\text{g/mL}$ ) ile iki bileşiğe karşılık gelen karışımın absorpsiyon spektrumları (1.10-3 M HCl içerisinde).

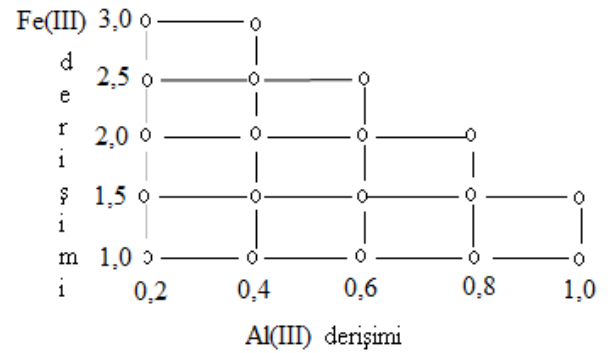
Çizelge 2  $Fe^{3+}$  ve  $Al^{3+}$  analizi için kalibrasyon seti

Kalibrasyon Seti		
No	Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	$Fe^{3+}$	$Al^{3+}$
1	1	0,2
2	1	0,4
3	1	0,6
4	1	0,8
5	1	1,0
6	1,5	0,2
7	1,5	0,4
8	1,5	0,6
9	1,5	0,8
10	1,5	1,0
11	2,0	0,2
12	2,0	0,4
13	2,0	0,6
14	2,0	0,8
15	2,5	0,2
16	2,5	0,4
17	2,5	0,6
18	3,0	0,2
19	3,0	0,4

### 3.3. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması

Kemometrik kalibrasyonlar için hidroklorik asit içerisinde  $Fe^{3+}$ -CAS için 1,0-3,0  $\mu\text{g/mL}$  ve  $Al^{3+}$ -CAS için 0,2-1,0  $\mu\text{g/mL}$  derişim aralığında her iki bileşiği içeren 19 değişik kompozisyonda simetrik bir kalibrasyon seti hazırlanmıştır. Çizelge 2' de hazırlanan kalibrasyon seti sunulmaktadır.

Kalibrasyonlar için rastgele kalibrasyon seti yerine simetrik kalibrasyon seti tercih edilmiştir. Bunun nedeni analiz esnasında meydana gelebilecek kalibrasyon hatalarını minimize etmektir. Çizelge 2' deki simetrik kalibrasyon setinin iki boyutlu düzlemdeki projeksiyon grafiği Şekil 10'da görülmektedir.



Şekil 10 Simetrik kalibrasyon setinin iki boyutlu düzlemdeki grafiği

### 3.4 PCR ve PLS Kemometrik Yöntemlerinin Uygulanması (Applying PCR and PLS Chemometric Methods)

Gerekli kalibrasyon çalışmaları hazırlandıktan sonra kemometrik uygulamalara geçilmiştir. Bu aşamada  $Al^{3+}$  ve  $Fe^{3+}$  içeren 19 farklı karışım hazırlanmış ve bu karışımların spektrumları alınarak veriler elde edilmiştir. Ele geçen veriler önce Excel'de gerekli hale getirilmiş ve buradan Minitab 16 paket programına taşınarak gerekli işlemlerin yapılmasıyla PCR ve PLS yöntemleri ile geri kazanımlar hesaplanmış ve hesaplanan değerler Çizelge 3 ve Çizelge 4'te gösterilmiştir.

### 3.5. Kemometrik Yöntemlerin Validasyonu

PCR ve PLS kalibrasyonlarının kurulmasında faktör seçimi için çapraz validasyon işlemi kullanılır. Bunun için karelerin tahmin hatalarının toplamı (prediction error sum of squares  $\rightarrow$  PRESS) hesaplanır. Optimal faktör sayısını bulmak için önerilen kriterler PRESS değeri ve F- istatistiğidir [22,23]. Hesaplanan PRESS değerleri için aşağıda verilen formül kullanılmıştır.

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (c_i^{eklenen} - c_i^{bulunan})^2 \quad (1)$$

Kemometrik kalibrasyonların validasyonu için kalibrasyonu ve tayin basamaklarında kalibrasyonun standart hatası (standard error of calibration → SEC) parametresi kullanılmaktadır. SEC değerini minimum yapan kalibrasyon koşulları ve F-istatistiği kullanılır. Çalışmada hesaplanan SEC değerleri için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (c_i^{eklenen} - c_i^{bulunan})^2}{n-1}} \quad (2)$$

(n değeri yapay karışımların toplam sayısıdır)

PCR yöntemini valide etmek için Fe<sup>3+</sup>-CAS için 1,0-3,0 µg/mL ve Al<sup>3+</sup>-CAS için 0,2-1,0 µg/mL çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı derişimlerde 19 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir set hazırlanmıştır. Hazırlanan bu validasyon seti (çizelge 2) kullanılarak kurulan PCR kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edilmiş, geri kazanım (GK) değerleri; Fe<sup>3+</sup>-CAS ve için % 101,26 ve Al<sup>3+</sup>-CAS için % 101,75 olarak bulundu. Standart sapma değerleri Fe<sup>3+</sup>-CAS için % 14,71 Al<sup>3+</sup>-CAS için ise % 13,18 olarak hesaplanmıştır. PCR kalibrasyon yönteminin sentetik karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3'te verilmiştir.

Çizelge 3 Fe<sup>3+</sup>-CAS ve Al<sup>3+</sup>-CAS sentetik karışımlarına PCR validasyon yönteminin uygulanması ve elde edilen geri kazanım değerleri

Karışım (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		Geri kazanım (%)	
Fe <sup>3+</sup> -CAS	Al <sup>3+</sup> -CAS	Fe <sup>3+</sup> -CAS	Al <sup>3+</sup> -CAS	Fe <sup>3+</sup> -CAS	Al <sup>3+</sup> -CAS
1	0,2	1,16	0,22	116,71	113,22
1	0,4	0,67	0,34	67,08	85,01
1	0,6	1,14	0,65	114,88	109,33
1	0,8	1,06	0,87	106,5	109,95
1	1	0,99	0,95	99,8	95,4
1,5	0,2	1,93	0,28	128	141,55
1,5	0,4	1,81	0,42	120,72	106,9
1,5	0,6	1,59	0,64	106,15	107,21
1,5	0,8	1,33	0,71	89	88,7
1,5	1	1,43	0,99	95,62	99,47
2	0,2	2,29	0,18	114,75	92,58
2	0,4	1,89	0,42	94,82	105,77
2	0,6	1,8	0,52	90,32	87,28
2	0,8	2,09	0,84	104,62	105,04
2,5	0,2	2,37	0,19	94,85	96,46
2,5	0,4	2,71	0,42	108,73	106,03
2,5	0,6	2,24	0,51	89,75	86,03
3	0,2	2,49	0,21	83,33	104,63
3	0,4	2,91	0,37	97,26	92,64
$\bar{X}$				101,26	101,75
SS				14,71	13,11

PLS yöntemini valide etmek için Fe<sup>3+</sup>-CAS için 1,0-3,0 µg/mL ve Al<sup>3+</sup>-CAS 0,2 - 1,0 µg/mL çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı derişimlerde 19 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir set hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti (çizelge 2) kullanılarak kurulan PLS kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım (GK) değerleri; Fe<sup>3+</sup>-CAS için % 101,29 ve Al<sup>3+</sup>-CAS için % 101,97 olarak bulundu. Standart sapma değerleri Fe<sup>3+</sup>-CAS için % 14,76 Al<sup>3+</sup>-CAS için ise % 13,82 olarak hesaplandı. PLS kalibrasyon yönteminin sentetik karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4 Fe<sup>3+</sup>-CAS ve Al<sup>3+</sup>-CAS sentetik karışımlarına PLS kalibrasyon yönteminin uygulanması ve elde edilen geri kazanım değerleri

Karışım (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		Geri kazanım (%)	
Fe <sup>3+</sup> -CAS	Al <sup>3+</sup> -CAS	Fe <sup>3+</sup> -CAS	Al <sup>3+</sup> -CAS	Fe <sup>3+</sup> -CAS	Al <sup>3+</sup> -CAS
1	0,2	1,16	0,224	116,6	113,65
1	0,4	0,67	0,33	67,44	84,36
1	0,6	1,12	0,65	112,94	109,14
1	0,8	1,1	0,88	110,21	110,59
1	1	1	0,95	100,11	95,86
1,5	0,2	1,95	0,29	130,52	145,26
1,5	0,4	1,8	0,42	120,4	105,52
1,5	0,6	1,54	0,62	102,99	104,74
1,5	0,8	1,34	0,71	89,96	89,63
1,5	1	1,42	0,99	94,89	99,39
2	0,2	2,3	0,19	115,04	95,73
2	0,4	1,88	0,42	94,22	105,04
2	0,6	1,79	0,52	89,85	87,06
2	0,8	2,1	0,84	105	105,18
2,5	0,2	2,37	0,18	94,89	94,17
2,5	0,4	2,71	0,42	108,7	105,51
2,5	0,6	2,25	0,51	90,17	85,07
3	0,2	2,5	0,21	83,57	108,92
3	0,4	2,91	0,37	97,01	92,67
$\bar{X}$				101,29	101,97
SS				14,76	13,82

PCR ve PLS kalibrasyon yöntemlerinin doğruluk ve kesinliğini doğrulamak amacı ile elde edilen verilere ANOVA testi uygulanmıştır.

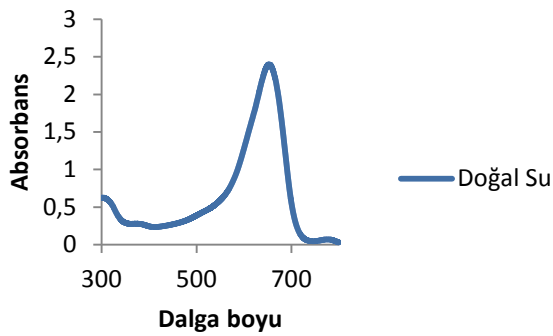
ANOVA testinde F-hesaplanan < F-tablo ve p-değeri > p=0,05 olduğu için % 95 güven aralığında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Varyans analizinde iki serbestlik derecesi kullanılır. Gruplar arası serbestlik derecesi=1 Grup içi serbestlik derecesi=36. F-hesaplanan < F-tablo ve p-değeri > p=0,05 olduğu için

bu kalibrasyon modeli ticari numunenin incelenmesinde kullanılabilir olduğuna karar verilmiştir.

### 3.6. Geliştirilen Yöntemin Doğal Su Numunesinde Uygulanması

Elde edilen veriler ışığında geliştirilen yöntemi doğal sularda  $Al^{3+}$  ve  $Fe^{3+}$  UV spektrofotometrik olarak tayini için öncelikle Antalya Elsazı Köyü yer altı doğal suyu, su sondaj kuyusundan alınmıştır.

Örnek suyun, deneyin sonucunu etkilememesi adına doğal su numunesi iki defa filtreden geçirilmiş, daha sonra kompleks oluşumunda elde edilen optimum şartlar altında UV spektrofotometrede okunmuştur.



Şekil 11 Doğal su karışımının absorpsiyon spektrumları ( $1.10^{-3}$  M HCl içerisinde).

## 4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada,  $Al^{3+}$  ve  $Fe^{3+}$ 'in iki farklı ligandla en uygun kompleksi oluşturulmuş ve optimum şartlar belirlenmiş ve daha sonra spektrofotometrik yöntemle doğal suda analiz yapılmıştır.

Optimum şartlar oluşturulurken çeşitli parametreler göz önüne alınmıştır. Bunlardan ligand miktarı 2,0; optimum pH 5 olarak tespit edilmiş, oluşan metal-ligand kompleksinin bekletme süresine etkisi olmadığı saptanmıştır. Çalışmada ayrıca mangan, krom, potasyum, sodyum, kadmiyum, kurşun, kalsiyum, magnezyum ve baryum iyonlarının çalıştığımız metallerin absorpsiyonuna etki etmediği anlaşılmıştır.

Optimum şartlar sağlandıktan sonra çalıştığımız metallerin saf haldeki spektrumları alınmış ve aynı dalga boylarında absorbans vermelerinden yararlanılarak sentetik karışımları hazırlanmıştır. Şekil 9'dan da görüldüğü gibi her iki bileşik aynı dalga boyu aralığında girişim yapmaktadır. Bu nedenle klasik spektroskopik yaklaşımlarla her iki bileşiğin aynı anda miktar tayinleri mümkün değildir. Böyle durumlarda kemometrik yöntemlerden yararlanmak mümkündür. Bu metallerin bir arada tayinleri için PCR ve PLS kemometrik yöntemleri geliştirilmiş, hazırlana validasyon setiyle (Çizelge-4 ve Çizelge-5)

kurulan PCR ve PLS kalibrasyonunun kesinlik ve doğruluğu test edilmiştir.

PCR ve PLS kalibrasyon yöntemlerinin doğruluk ve kesinliğini doğrulamak amacı ile elde edilen verilere ANOVA testi uygulanmıştır.

ANOVA testinde F-hesaplanan < F-tablo ve p-değeri >  $p=0,05$  olduğu için % 95 güven aralığında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Varyans analizinde iki serbestlik derecesi kullanılır. Gruplar arası serbestlik derecesi=1 Grup içi serbestlik derecesi=36. F-hesaplanan < F-tablo ve p-değeri >  $p=0,05$  olduğu için bu kalibrasyon modeli ticari numunenin incelenmesinde kullanılabilir olduğuna karar verilmiştir.

Optimizasyon ve yöntem geliştirmenin doğrulanmış sonuçlarını doğal su numunesinde uygulanmıştır. Uygulama sonucunda geri kazanım değerleri çizelge-5'te gösterilmiştir.

Çizelge 5 Doğal su numunesine PLS ve PCR validasyon yönteminin uygulanması ve elde edilen geri kazanım değerleri

	PLS	PCR
$\bar{X}_{Fe^{3+}-CAS}$	6,90664	6,79574
$\bar{X}_{Al^{3+}-CAS}$	0,42676	0,43492

Sonuç olarak kemometrik yöntemlerin  $Al^{3+}$  ve  $Fe^{3+}$  karışımlarının analizinde uygun olduğu ve bu yöntemlerin tekrarlanabilirliğinin yüksek olup duyarlı ve doğru sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir.

## Teşekkür

3406-YL1-12 no'lu proje ile bu çalışmayı destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığına teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

Belce A (2002) Mineraller, In " İnsan Biyokimyası" Ed. By Onat T, Emerk k ve Sözmeyen EY, 529-537, Palme Yayıncılık, Ankara.

Bond A.M., Nagaosa Y., (1985) "Determination of aluminium, copper and manganese in biological and other samples as 8-quinolinol complexes by high-performance liquid chromatography with electrochemical and spectrophotometric detection", Anal. Chim. Acta, 178, 197-208.

Coscaine A.R, Andrade J.C., Poppi R.J.,(2002) "PLS regression using real sample calibration for aluminium and iron determination in plant extracts", Analyst, 127,135-139.

- Coscine A.R., Andrade J.C., Poppi R.J., Mello C., Raji B.V., Mbrey M.F., (2000) "Multivariate calibration applied to a highly interfering chemical system: The simultaneous spectrophotometric determination of aluminium and iron in plants using xylenol orange and partial least squares regression", *Anal. Chim. Acta*, 423, 31-40.
- Gao H.W., Chen L., Yang Q.Z., (2005) "Direct sensitive determination of trace amounts of dissolved ferric iron in natural water by light absorption ratio variation spectrometry", *Journal of AOAC International*, 88, 1231-1235.
- Honorato R.S., Carneiro J.M.T., Zagatto E.A.G., (2001) "Spectrophotometric flowbatch determination of aluminium in plant tissues exploiting a feedback mechanism", *Anal. Chim. Acta*, 441, 309-315.
- Kendüzler E., Türker A.R., (2003) "Atomic absorption spectrophotometric determination of trace copper in waters, aluminium foil and tea samples after preconcentration with 1-nitroso-2-naphthol-3,6-disulfonic acid on Amsersorb 572", *Anal. Chim. Acta*, 480, 259-266.
- Kaya S ve Akar F (1998) *Metallerin 'Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji'* Ed. By Kaya S, Pirinççi İ. ve Bilgili A, 119-143, 1. Baskı, Medisan Yayıncılık, Ankara.
- Kaya, B., (2007) "Kombine Farmasötik Preparatlardan Telmisartan ve Hidroklorotiyazid'in kemometrik Kalibrasyon Yöntemleriyle Aynı Anda Miktar Tayinleri.", Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 104s, Ankara.
- Kramer, R., (1998) "Chemometrics Techniques for Quantitative Analysis", New York, Marcel Dekker
- Limson J., Nyokong T., Daya S., (1998) "The interaction of melatonin and its precursors with aluminium, cadmium, copper, iron, lead, and zinc: An adsorptive voltametric study", *Journal of Pineal Research*, 24(1), 15-21.
- Marczenko Z., Kaowska H., (1981) "Spectrophotometric determination of iron(III) with chrome azurol S or eriochrome cyanine R and some cationic surfactants", *Anal. Chim. Acta*, 123, 279-287.
- Martens, H., Naes, T., (1989) "Multivariate Calibration", Wiley, Chichester.
- Nagaoku M.H., Maitani T., (2000) "Binding patterns of co-existing aluminium and iron to human serum transferrin studied by HPLC-high resolution ICP-MS", *Analyst*, 125, 1962-1965.
- Otto, M., (1998) "Chemometrics: Statistics and Computer Applications in Analytical Chemistry", Weinheim, Wiley-VCH.
- Reddy V.K., Reddy S.M., Reddy P.R., Reddy T.S., (2000) "Simultaneous spectrophotometric determination of copper (II), vanadium (V) and iron (III) using 2-hydroxy-1-naphthaldehyde benzoylhydrazone", *Journal of Analytical Chemistry*, 55(5), 435-439.
- Rodrigues J.L., de Magalhaes S.C., Luccas P.O., (2005) "Flow injection spectrophotometric determination of Al in hemodialysis solutions", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36, 1119-1123.
- Royset O., (1985) "Comparison of four chromogenic reagents for the flow-injection determination of aluminium in water", *Anal. Chim. Acta*, 178, 223-230.
- Ryan E., Meaney M., (1992) "Determination of trace levels of copper (II), aluminium (III) and iron (III) by reversed phase high performance liquid chromatography using a novel on-line sample preconcentration technique", *Analyst*, 117, 1435-1439.
- Safavi A., Abdollahi H., Mirzajani R., (2006) "Simultaneous spectrophotometric determination of Fe(III), Al (III) and Cu(III) by partial least squares calibration method", *Spectrochimica Acta Part A*, 63, 196-199.
- Scancar J., Benedik R.M.M., Krizaj I., (2003) "Total metal concentrations in serum of dialysis patients and fractionation of Cu, Rb, Al, Fe and Zn in spent continuous ambulatory peritoneal dialysis fluid", *Talanta*, 59, 355-364.
- Tahan J.E., Granadilla V.A., Romero R.A., (1994) "Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of Al, Cu, Fe, Pb, V and Zn in clinical samples and certified environmental reference materials", *Anal. Chim. Acta*, 295, 187-197.
- Thakur M., Deb M.K., (1999) "The use of 1-[pyridyl-(2)-azo]-naphthol-(2) in the presence of Tx-100 and N-N'-diphenylbenzamide for the spectrophotometric determination of copper in real samples", *Talanta*, 49, 561-569.
- Wang N., Liang W., (1993) "Simultaneous third-derivative spectrophotometric determination of copper and nickel in iron alloys and aluminium alloy", *Talanta*, 40(6), 897-899.
- Zarei K., Atabati M., Malekshabani Z., (2006) "Simultaneous spectrophotometric determination of iron, nickel and cobalt in micellar media by using direct orthogonal signal correction-partial least squares method", *Anal. Chim. Acta*, 556, 247-254.