

## ICP–OES KULLANILARAK BİTKİLERDEKİ MAKRO VE MİKRO ELEMENTLERİN BİRLİKTE TAYİNİNDE ÇOK DEĞİŞKENLİ KALİBRASYON TEKNİKLERİNİN UYGULANMASI<sup>1-2</sup>

Özlem Bengü DAŞ<sup>3</sup>

Adnan KENAR<sup>4</sup>

### ÖZET

Bu çalışmada, bitkilerde bulunan bazı makro (Ca, K ve Mg) ve mikro (Cu, Fe, Mn ve Zn) elementlerin, ICP–OES cihazı kullanılarak, birlikte tayininde çok değişkenli kalibrasyon tekniklerinin uygulanması (CLS, PCR ve PLS1) ve bu yöntemle elde edilen sonuçların, tek değişkenli kalibrasyon teknikleriyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması çalışılmıştır. Bitki yaprak örnekleri sülfürik asit ve hidrojen peroksit ile yaş yakma yöntemine göre parçalanarak, makro ve mikro besin elementleri sulu çözeltiye alınmıştır. Cu, Ca, Fe, K, Mg, Mn ve Zn elementlerinin ICP–OES ile tayin yönteminin doğruluğu standart referans şeftali yaprağı (NIST 1547) ile kontrol edilmiştir. Tek değişkenli kalibrasyon tekniğinde 7 farklı dalga boyunda, çok değişkenli kalibrasyon tekniğinde ise 129 farklı dalga boyunda çalışılmıştır. Kalibrasyon çözeltilerinin çapraz validasyonu sonucunda, çok değişkenli kalibrasyon tekniklerinden PLS1'in en iyi yöntem olduğu belirlenmiştir. Sentetik karışımlardan elde edilen % geri kazanım sonuçları tek değişkenli kalibrasyon tekniğinde; Cu, Ca, Fe, K, Mg, Mn ve Zn için sırasıyla; %139.77; %126.92; %103.99; %69.10; %134.16; %124.19 ve %171.77; PLS1 yönteminde ise sırasıyla; %106.67; %99.75; %94.21; %95.54; %95.02; %99.00 ve %106.78 olarak bulunmuştur. %95 ve %99 güven seviyesindeki t– testi sonucunda tek değişkenli kalibrasyon ile PLS1 yöntemi arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuş ve ICP–OES için PLS1 yönteminin daha uygun bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kemometri, çok değişkenli kalibrasyon, makro elementler, mikro elementler, bitki, birlikte tayin

### ABSTRACT

#### THE APPLICATION OF MULTIVARIATE CALIBRATION TECHNIQUES FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF MACRO AND MICRO ELEMENTS IN PLANTS USING ICP–OES

In this study, some of the macro (Ca, K and Mg) and micro (Cu, Fe, Mn and Zn) elements found in plants using ICP–OES device, the determination of the application of multivariate calibration techniques (CLS, PCR and PLS1) and the results obtained by this method is to compare the results of the univariate calibration techniques. Leaf

<sup>1</sup> Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: Ocak 2016

<sup>2</sup> Bu çalışma Yüksek Lisans Tez Projesinden hazırlanmıştır.

<sup>3</sup> Kimyager, Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü, Yalova

<sup>4</sup> Prof. Dr., Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Ankara

samples were prepared by wet digestion method using H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Determination of Cu, Ca, Fe, K, Mg, Mn and Zn by ICP–OES method were checked with reference standard peach leaves (NIST 1547). As the univariate calibration technique was studied at 7 different wavelengths, multivariate calibration technique was studied at 129 different wavelengths. As a result of cross–validation of the calibration solutions, multivariate calibration techniques were the best, PLS1. The results of obtained from the % recovery of synthetic mixtures of univariate calibration technique for Cu, Ca, Fe, K, Mg, Mn and Zn were 139.77%; 126.92%; 103.99%; 69.10%; 134.16%; 124.19% and 171.77% and at the PLS1 method 106.67%; 99.75%; 94.21%; 95.54%; 95.02%; 99.00% and 106.78% respectively. As a result of student t–test at confidence level of 95% or 99%, significant differences were found between univariate calibration method and PLS1 and the PLS1 method was determined as a suitable method for ICP–OES.

**Keywords:** Chemometrics, multivariate calibration, macro elements, micro elements, plants, simultaneous determination

## GİRİŞ

Bir organizmanın gelişimi ve enerji kaynağı olarak ihtiyaç duyduğu kimyasal maddelere besin denilmektedir. Dünya üzerinde yaşayan her canlı gibi bitkilerde beslenmek zorundadır. Ancak, bitkiler diğer canlılardan farklı olarak geliştikleri ortamdan inorganik maddeleri alıp sentezleyerek organik madde yaparlar ve güneşin fiziksel enerjisini kimyasal gıda enerjisine dönüştürerek hayatsal faaliyetlerine devam ederler [6, 11, 12].

Bitkinin başlıca besin kaynağı topraktır ve bitkiler besin kaynağı olan topraktan birçok element alır. Bitkilerin değişik organlarında 74 element olduğu belirlenmiştir. Ancak bunların çok az bir kısmı bitki gelişimi için mutlak gerekli olan elementlerdir. Bitkilerin sağlıklı gelişmeleri ve verim artışı için mutlak gerekli besin maddelerince dengeli beslenmesi gereklidir. Alınabilir formdaki besin elementlerinin bir veya daha fazlasının eksikliği toprak verimliliğini ve bitki gelişimini önemli oranda etkiler [3]. Bu yüzden bitki analizleri, mutlak gerekli besin elementlerinin bitkideki miktarları hakkında bilgi sahibi olmak için önemlidir. Ayrıca bitki analizleri, gerek toprakta mevcut olan gerekse gübreye verilen besin maddelerinin bitkiye faydalı olup olmadığı, bitkiye alınımında bir problem ya da uygulanan gübreleme programının doğru olup olmadığı hakkında önemli bilgiler verir [1].

Bitki analizlerinde gravimetrik, volümetrik, fotometrik, alevfotometrik ve spektrometrik gibi yöntemler uygulanmaktadır [5]. Ancak günümüzde spektrometrik analiz yöntemleri sıklıkla tercih edilmektedir. Spektroskopik cihazlar pahalı, kullanımının zor ve zaman alıcı

olması gibi dezavantajları olsa da, aynı anda birden fazla örneğin, birden fazla dalga boyunda analizine olanak sağlaması, duyarlılığının yüksek olması, değerlendirmenin çabuk ve kolay olması gibi nedenlerden dolayı tercih edilir. Spektroskopik cihazlar aynı anda çok sayıda dalga boyuna ait veri üretmesine karşılık, sıklıkla analizlerde tek dalga boyundaki veriler kullanılarak analizler yapılmaktadır. Tek değişkenli analiz dediğimiz bu uygulamada, çalışılan dalga boyuna diğer türlerin etkisi ihmal edilmekte veya gözden kaçmaktadır. Ayrıca cihazın ürettiği çok sayıda veri kullanılmamaktadır. Son yıllarda analiz işlemlerinde doğruluğu, kesinliği ve güvenilirliği yüksek sonuçlara ulaşmak için yeni tekniklere ihtiyaç artmıştır. Enstrümantal yöntemlerin de gelişmesiyle birlikte veri sayısının artması istatistik ve matematiksel işlemlerin kullanımını gerektirmiştir. Bunun sonucu olarak da kemometrik yaklaşımlar analitik kimyada kullanılmaya başlanmıştır. Kemometrik yaklaşımda, cihazın ürettiği verilerin çok büyük bir kısmı kullanılmaktadır. Çok değişkenli kalibrasyon tekniğinde çok sayıdaki dalga boyundan elde edilen veriler kalibrasyon işlemlerinde kullanıldığından, aynı anda birden fazla bileşenin analizinde çapraz seçiciliklerde dikkate alınmakta ve böylece birden fazla bileşen analizi, diğer bileşenlerin etkileri ortadan kaldırılarak daha doğru bir biçimde yapılabilmektedir. Bu tip analizlere ise çok değişkenli analiz tekniği adı verilmektedir [4, 7, 8, 9, 10].

Bu çalışmada bitkilerde bulunan makro ve mikro besin elementlerinin, ICP–OES cihazı kullanılarak, birlikte tayininde çok değişkenli

kalibrasyon tekniklerinin uygulanması ve bu yöntemle elde edilen sonuçların yine ICP-OES cihazından elde edilen veriler kullanılarak tek değişkenli kalibrasyon teknikleri ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda çalışma kapsamındaki 7 element için birçok dalga boyunda okumalar yapılmış olup elde edilen verilere çok değişkenli kalibrasyon tekniklerinden, temel bileşen regresyonu (PCR), klasik en küçük kareler metodu (CLS) ve kısmi en küçük kareler metodu (PLS1) uygulanmıştır.

Bu çalışmanın amaçlarından bir diğeri de çok değişkenli kalibrasyon tekniklerini uygulayarak ICP-OES cihazının analitik performansını arttırmaktır.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Çalışmada kullanılan yaprak numuneleri Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsünün araştırma bahçesinden temin edildi. Deneylerde standart referans materyal olarak NIST 1547 şeftali yaprağı kullanıldı. Tartımlar hassas terazide gerçekleştirildi. Yaprak örneklerinin hazırlanmasında Nitrik asit (%65'lik) kullanıldı. Örnekler Cem Mars6 Marka

Mikrodalga fırında parçalandı. Enstrümantal cihaz olarak ICP-OES kullanıldı. ICP-OES cihazının çalışma şartları ise; Güç 1 kW, Plazma gaz akışı (Ar) 15 L/min, Yardımcı gaz akışı (Ar) 1.5 L/min, Sisleştirici gaz akışı (Ar) 0.75 L/min, RF jeneratörü 40 MHz ve Pompa hızı 15 rpm.

### Metot

*Tek değişkenli kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması*

Tek değişkenli kalibrasyon çözeltileri, seyreltme yöntemiyle hazırlanmıştır. 1000 mg/L Cu, Ca, Fe, K, Mg, Mn ve Zn içeren standartlardan gerekli miktarlar alınarak Çizelge 1'de belirtilen Std-10 standardı hazırlandı ve diğer standartlar bu standarttan seyreltilerek hazırlandı.

*Çok değişkenli kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması*

Çok değişkenli kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanmasında kemometrik kalibrasyon deney tasarımı kullanıldı [2]. Çok değişkenli kalibrasyon çözeltileri için, Çizelge 2'deki derişim seviye değerlerini içeren 25 farklı derişimde Çizelge 3'teki dizayna göre ana ve ara stok standartlarından gerekli miktarda 50 ml'lik balon jojelere alınıp ultra saf su ile hacmine tamamlandı.

Çizelge 1. Tek değişkenli kalibrasyon çözeltilerindeki elementlerin derişimleri, mg/L  
Table 1. The concentrations of elements in the univariate calibration solution, mg/L

Standard	Cu	Ca	Fe	K	Mg	Mn	Zn
Std-1	0.006	0.586	0.006	0.586	0.098	0.004	0.004
Std-2	0.012	1.172	0.012	1.172	0.195	0.008	0.008
Std-3	0.023	2.344	0.023	2.344	0.391	0.016	0.016
Std-4	0.047	4.688	0.047	4.688	0.781	0.031	0.031
Std-5	0.094	9.375	0.094	9.375	1.563	0.063	0.063
Std-6	0.188	18.75	0.188	18.75	3.125	0.125	0.125
Std-7	0.370	37.50	0.370	37.50	6.250	0.250	0.250
Std-8	0.750	75.00	0.750	75.00	12.500	0.500	0.500
Std-9	1.500	150.00	1.500	150.0	25.000	1.000	1.000
Std-10	3.000	300.00	3.000	300.0	50.000	2.000	2.000

Çizelge 2. Çok değişkenli kalibrasyon çözeltilerindeki elementlerin seviye değerleri, mg/L  
Table 2. Level values of the elements in the multivariate calibration solution, mg/L

Tasarım Design	Cu	Ca	Fe	K	Mg	Mn	Zn
-2	0.010	10	0.010	10	1	0.010	0.010
-1	0.020	50	0.020	50	5	0.020	0.020
0	0.100	100	0.100	100	10	0.100	0.100
1	1.000	200	1.000	200	25	1.000	1.000
2	2.000	300	3.000	300	50	2.000	2.000

Çizelge 3. Çok değişkenli kalibrasyon çözeltileri için kemometrik tasarım  
Table 3. Chemo metrics design for multivariate calibration solutions

	Cu	Ca	Fe	K	Mg	Mn	Zn
T1	0	0	0	0	0	0	0
T2	0	-2	-2	2	-1	2	0
T3	-2	-2	2	-1	2	0	-1
T4	-2	2	-1	2	0	-1	-1
T5	2	-1	2	0	-1	-1	1
T6	-1	2	0	-1	-1	1	2
T7	2	0	-1	-1	1	2	1
T8	0	-1	-1	1	2	1	0
T9	-1	-1	1	2	1	0	2
T10	-1	1	2	1	0	2	2
T11	1	2	1	0	2	2	-2
T12	2	1	0	2	2	-2	1
T13	1	0	2	2	-2	1	-2
T14	0	2	2	-2	1	-2	0
T15	2	2	-2	1	-2	0	1
T16	2	-2	1	-2	0	1	1
T17	-2	1	-2	0	1	1	-1
T18	1	-2	0	1	1	-1	-2
T19	-2	0	1	1	-1	-2	-1
T20	0	1	1	-1	-2	-1	0
T21	1	1	-1	-2	-1	0	-2
T22	1	-1	-2	-1	0	-2	-2
T23	-1	-2	-1	0	-2	-2	2
T24	-2	-1	0	-2	-2	2	-1
T25	-1	0	-2	-2	2	-1	2

Bu tasarıma göre kalibrasyon çözeltilerinin içeriği şöyledir:

Çizelge 4. Çok değişkenli kalibrasyon çözeltilerindeki elementlerin derişimleri, mg/L  
Table 4. Concentrations of the element in the multivariate calibration solution, mg/L

	Cu	Ca	Fe	K	Mg	Mn	Zn
T1	0.1	100	0.1	100	10	0.1	0.1
T2	0.1	10	0.01	300	5	2	0.1
T3	0.01	10	3	50	50	0.1	0.02
T4	0.01	300	0.02	300	10	0.02	0.02
T5	2	50	3	100	5	0.02	1
T6	0.02	300	0.1	50	5	1	2
T7	2	100	0.02	50	25	2	1
T8	0.1	50	0.02	200	50	1	0.1
T9	0.02	50	1	300	25	0.1	2
T10	0.02	200	3	200	10	2	2
T11	1	300	1	100	50	2	0.01
T12	2	200	0.1	300	50	0.01	1
T13	1	100	3	300	1	1	0.01
T14	0.1	300	3	10	25	0.01	0.1
T15	2	300	0.01	200	1	0.1	1
T16	2	10	1	10	10	1	1
T17	0.01	200	0.01	100	25	1	0.02
T18	1	10	0.1	200	25	0.02	0.01
T19	0.01	100	1	200	5	0.01	0.02
T20	0.1	200	1	50	1	0.02	0.1
T21	1	200	0.02	10	5	0.1	0.01
T22	1	50	0.01	50	10	0.01	0.01
T23	0.02	10	0.02	100	1	0.01	2
T24	0.01	50	0.1	10	1	2	0
T25	0.02	100	0.01	10	50	0.02	2

Tek değişkenli kalibrasyon çözeltileri ile çok değişkenli kalibrasyon çözeltilerinin bileşimi incelendiğinde, tek değişkenli kalibrasyon

çözeltisi 7 tane elementi düşük derişimden yüksek derişime doğru artacak şekilde içerdiği, çok değişkenli kalibrasyon çözeltilerinin ise, her

çözeltilerdeki elementlerin birbirine göre oranı farklı olacak şekilde içerdiği görülmektedir.

#### *Sentetik numune çözeltilerinin hazırlanması*

Sentetik numune çözeltileri, 1000 ve 20 mg/L'lik Cu, Ca, Fe, K, Mg, Mn ve Zn standartlarından sırasıyla 0.2; 80; 0.8; 100; 30; 0.3 ve 0.5 mg/L içecek hacimde alınarak 50 ml'lik balon jöjeye koyulup ultrasaf su ile hacmine tamamlandı.

#### *Yaprak numunelerinin analize hazırlanması*

Laboratuvara getirilen bitki yaprak örneği, yıkanıp temizlendikten sonra kese kâğıtlarına koyulup etüvde 48 saat 65°C'de kurutuldu. Kurutulmuş bitki örnekleri, öğütme makinasında öğütüldü.

Yaprak örnekleri sülfürik asit ve hidrojen peroksit yaş yakma yöntemiyle hazırlandı [4].

#### *ICP-OES ile element analizi*

Hazırlanan çözeltilerin nicel analizi ICP-OES cihazı ile yapıldı. Cihaz öncelikle tek kalibrasyon çözeltileri (Çizelge 3) ile, her elemente ait tek dalga boyunda okumalar alınarak kalibre edildi ve daha sonra hazırlanan sentetik numuneler, yaprak numuneleri ve standart eklenmiş yaprak numunelerinin okuması yapıldı. Tek değişkenli kalibrasyon çalışmasında, cihaz için önerilen ve en yüksek emisyon şiddeti veren dalga boyları seçildi. Bunlar: Cu 324.754; Ca 317.933; Fe 238.204; K 766.491; Mg 280.270; Mn 257.610 ve Zn 213.857'dir. Cihaz daha sonra çok değişkenli kalibrasyon çözeltileri (Çizelge 4) ile toplamda 129 tane dalga boyunda okumalar yapılarak kalibre edildi ve sentetik numuneler, yaprak numuneleri ve standart eklenmiş yaprak numunelerinin okuması yapıldı. Hesaplamalar [4] literatüründe verilen hesaplama algoritmalarına uygun MATLAB programında yazılmış CLS, PCR ve PLS1 program modülleri ile yapılmıştır.

## **BULGULAR VE TARTIŞMA**

### ***Kemometrik yöntemlerin çapraz validasyonu***

Çok değişkenli kalibrasyonda kullanılan kalibrasyon çözeltileri (training set) ile kemometrik yöntemlerden CLS, PSR ve PLS1 yöntemleri kullanılarak her element için kalibrasyon yapıldı ve kalibrasyon çözeltilerinin

element derişimleri bu kalibrasyondan tekrar hesaplanarak çapraz validasyon yapıldı. Çapraz validasyon işleminde, toplam 25 tane kalibrasyon çözeltilisine ait verilerden her defasında bir çözeltiliye ait veriler çıkarılarak geride kalan 24 tanesi ile kalibrasyon yapıldı ve bu kalibrasyon kullanılarak 25. çözeltilinin element derişimi hesaplandı. Bu işlem 25 defa tekrar edilerek, kalibrasyon çözeltilerini oluşturan 25 tane çözeltilinin derişimleri çapraz validasyon işlemi ile hesaplanmıştır. Ayrıca bu çözeltilerin tahmin edilen hata kareleri toplamı (Predicted Residual Error Sum of Squares, PRESS), korelasyon katsayısı ( $R^2$ ), kalibrasyonun standart hatası (Standard Error of Calibration, SEC) ve karşılaştırma grafiklerinin eğimi (m) hesaplandı [5]. Bu değerler Çizelge 4'de verilmiştir.

Farklı yöntemler için çizilen karşılaştırma grafiklerinden, eğimi 1'e en yakın olan en küçük PRESS ve SEC değerlerine sahip yöntemin PLS1 yöntemi olduğu görülmektedir. Bu sebeple bundan sonra numuneler üzerinde yapılan çalışmalarda hesaplamalar PLS1 yöntemi ile yapılmış ve sonuçlar tekli kalibrasyon yöntemi ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

### ***Yaprak numuneleri ve standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçların sonuçlarının değerlendirilmesi***

Gerçek yaprak numunelerine belirlenen miktarlarda standart ilave edilerek hazırlanan numuneleri ICP-OES cihazında elde edilen sonuçlarında her iki yöntem için % geri kazanım değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 5'de verilmiştir.

### ***Sentetik numune sonuçlarının değerlendirilmesi***

Hazırlanan sentetik numunelerin tek değişkenli ve çok değişkenli kalibrasyon yöntemlerinden (PLS1) elde edilen sonuçlarına göre % geri kazanım sonuçları hesaplandı. Daha sonra %95 ve %99 güven aralıklarında gerçek değerler ile tahmin değerleri arasında anlamlı bir fark olup olmadığına bakıldı. Bu değerler Çizelge 3'de verilmiştir.

Sentetik numunelerin % geri kazanım sonuçları incelendiğinde, PLS1 yönteminin daha iyi sonuçlar verdiği görülmektedir.

İstatistiksel t testi sonuçları incelendiğinde %95 güven seviyesinde, tek değişkenli kalibrasyon yönteminde gerçek değerler ile tahmin değerleri arasında, 7 elementten (Cu, Ca, Fe, K, Mg, Mn ve Zn) demir elementinde anlamlı bir fark olmadığı, diğer elementlerde anlamlı fark olduğu bulunmuştur. PLS1 yönteminde ise bakır, kalsiyum, potasyum ve mangan da anlamlı bir farkın olmadığı; demir, magnezyum ve çinko da ise anlamlı bir farkın olduğu sonucuna ulaşıldı.

%99 güven seviyesindeki sonuçlar incelendiğinde ise tek değişkenli kalibrasyon yönteminde gerçek değerler ile tahmin değerleri arasında demir elementinde anlamlı bir fark olmadığı, diğer elementlerde anlamlı fark olduğu bulunmuştur. PLS1 yönteminde ise bütün elementlerde gerçek ve tahmin değerleri arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Bunlara ait hesaplamalar Çizelge 7 ve Çizelge 8'de verilmiştir.

Çizelge 5. Kalibrasyon çözeltilerinin PRESS, SEC, R<sup>2</sup> değerleri ve karşılaştırma grafiklerinin eğimi (m)

Table 5. PRESS, SEC, R<sup>2</sup> values of calibration solutions and the inclination of the comparison chart (m)

Yöntem Method	Elementler Elements	PRESS	SEC	Eğim (m) Inclination	R <sup>2</sup>
CLS	Cu	21586.30	55.53	-5.3071	0.6599
	Ca	149655.10	146.22	0.9728	0.9786
	Fe	23860.28	58.38	-3.1102	0.4552
	K	405390.5	240.65	1.0259	0.9480
	Mg	6601.914	30.71	0.9817	0.9674
	Mn	2043.01	17.08	-0.4699	0.0656
	Zn	18874.33	51.92	-3.0967	0.2482
PCR	Cu	742.856	10.3	-0.3776	0.7417
	Ca	41688.36	77.17	0.9915	0.9940
	Fe	1718.966	15.67	-0.434	0.9774
	K	250559.5	189.19	0.968	0.9639
	Mg	1305.07	13.65	0.9919	0.9935
	Mn	749.070	10.34	-0.3809	0.7168
	Zn	770.683	10.49	-0.4133	0.8814
PLS1	Cu	6.423	0.70	0.9359	0.9857
	Ca	40666.1	100.83	0.9918	0.9941
	Fe	8.297	0.83	0.9518	0.9918
	K	165774.5	101.79	0.9757	0.9765
	Mg	714.795	8.06	1.0018	0.9964
	Mn	4.441	0.74	0.9404	0.9910
	Zn	11.088	0.92	0.9357	0.9723

Çizelge 6. Sentetik numunelerin tek değişkenli kalibrasyon ve PLS1 yöntemlerinden elde edilen % geri kazanım sonuçları (N=5)

Table 6. Univariate calibration and % recovery of synthetic sample results obtained from methods PLS1 (N=5)

Elementler Elements	Bilinen (mg/L) Known	Bulunan (mg/L) Obtained		% Geri kazanım Regain	
		Tek değişkenli Univariate	PLS1	Tek değişkenli Univariate	PLS1
Cu	0.2	0.28 ± 0.005	0.21 ± 0.02	139.77 ± 2.73	106.67 ± 9.51
Ca	80	101.53 ± 1.04	79.80 ± 1.82	126.92 ± 1.28	99.75 ± 2.27
Fe	0.8	0.83 ± 0.038	0.75 ± 0.04	103.99 ± 4.73	94.21 ± 5.1
K	100	69.10 ± 2.00	95.54 ± 5.65	69.10 ± 2.00	95.54 ± 5.65
Mg	30	40.25 ± 0.788	28.51 ± 0.96	134.16 ± 2.63	95.02 ± 3.18
Mn	0.3	0.37 ± 0.005	0.30 ± 0.01	124.19 ± 1.62	99.00 ± 2.48
Zn	0.5	0.86 ± 0.03	0.53 ± 0.02	171.77 ± 6.09	106.78 ± 4.71

**Gerçek numune sonuçlarının değerlendirilmesi**

**Standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesi**

Tek değişkenli ve çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri, gerçek yaprak örneklerine de uygulandı. İki yöntemden elde edilen sonuçlar incelendi. Her iki yöntem içinde gerçek numunelerin güven aralıkları hesaplandı (Çizelge 6).

Gerçek yaprak numunelerine belirlenen miktarlarda standart ilave edilerek hazırlanan numuneleri ICP-OES cihazında elde edilen sonuçlarında her iki yöntem için % geri kazanım değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 10'da verilmiştir.

Çizelge 7. Sentetik numunelerin tek değişkenli kalibrasyon ve PLS1 yöntemleri kullanılarak %95 güven seviyesinde elde edilen istatistiksel sonuçlar (N=5)

Table 7. The statistical results obtained from samples of synthetic univariate calibration methods using a 95% confidence level and PLS1 (N=5)

Elementler Elements	Bilinen (mg/L) Known	Bulunan (mg/L) Obtained		$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$		$t_{deneyisel} = \frac{\bar{x} - \mu}{s/\sqrt{N}} < t_{kritik}$	
		Tek değişkenli Univariate	PLS1	Tek değişkenli Univariate	PLS1	Tek değişkenli Univariate	PLS1
Cu	0.2	0.28 ± 0.005	0.21 ± 0.02	0.28 ± 0.006	0.21 ± 0.025	35.78 > 2.78	1.11 < 2.78
Ca	80	101.53 ± 1.02	79.80 ± 1.82	101.53 ± 1.27	79.80 ± 2.26	47.2 > 2.78	0.25 < 2.78
Fe	0.8	0.83 ± 0.038	0.75 ± 0.04	0.83 ± 0.047	0.75 ± 0.05	1.76 < 2.78	2.79 > 2.78
K	100	69.10 ± 2.0	95.54 ± 5.65	69.10 ± 2.49	95.54 ± 7.02	34.5 > 2.78	1.76 < 2.78
Mg	30	40.25 ± 0.788	28.51 ± 0.96	40.25 ± 0.98	28.51 ± 1.19	29.09 > 2.78	3.47 > 2.78
Mn	0.3	0.37 ± 0.005	0.29 ± 0.01	0.37 ± 0.006	0.29 ± 0.01	31.3 > 2.78	2.23 < 2.78
Zn	0.5	0.86 ± 0.03	0.53 ± 0.02	0.86 ± 0.037	0.53 ± 0.025	26.8 > 2.78	3.35 > 2.78

Çizelge 8. Sentetik numunelerin tek değişkenli kalibrasyon ve PLS1 yöntemleri kullanılarak %99 güven seviyesinde elde edilen istatistiksel sonuçlar (N=5)

Table 8. The statistical results obtained from samples of synthetic univariate calibration methods using a 99% confidence level and PLS1 (N=5)

Elementler Elements	Bilinen (mg/L) Known	Bulunan (mg/L) Obtained		$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$		$t_{deneyisel} = \frac{\bar{x} - \mu}{s/\sqrt{N}} < t_{kritik}$	
		Tek değişkenli Univariate	PLS1	Tek değişkenli Univariate	PLS1	Tek değişkenli Univariate	PLS1
Cu	0.2	0.28 ± 0.005	0.21 ± 0.02	0.28 ± 0.01	0.21 ± 0.04	35.78 > 4.60	1.11 < 4.60
Ca	80	101.53 ± 1.02	79.80 ± 1.82	101.53 ± 2.10	79.80 ± 3.74	47.2 > 4.60	0.25 < 4.60
Fe	0.8	0.83 ± 0.038	0.75 ± 0.04	0.83 ± 0.078	0.75 ± 0.08	1.76 < 4.60	2.79 < 4.60
K	100	69.10 ± 2.0	95.54 ± 5.65	69.10 ± 4.11	95.54 ± 11.62	34.5 > 4.60	1.76 < 4.60
Mg	30	40.25 ± 0.788	28.51 ± 0.96	40.25 ± 1.62	28.51 ± 1.97	29.09 > 4.60	3.47 < 4.60
Mn	0.3	0.37 ± 0.005	0.29 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.29 ± 0.02	31.3 > 4.60	2.23 < 4.60
Zn	0.5	0.86 ± 0.03	0.53 ± 0.02	0.86 ± 0.06	0.53 ± 0.04	26.8 > 4.60	3.35 < 4.60

Çizelge 9 Gerçek numunelerin %95 güven seviyesinde tek değişkenli kalibrasyon ve PLS1 yöntemi ile elde edilen sonuçları (N=5)

Table 9. Univariate calibration 95% confidence level of the actual sample and the results obtained with the methods PLS1 (N=5)

Elementler Elements	Gerçek yaprak numuneleri True leaf samples			
	Tek değişkenli Univariate	$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$	PLS1 (mg/L)	$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$
Cu	1.62 ± 0.07	1.62 ± 0.08	1.41 ± 0.05	1.41 ± 0.06
Ca	34.13 ± 1.12	34.13 ± 1.39	18.75 ± 1.41	18.75 ± 1.84
Fe	0.54 ± 0.038	0.54 ± 0.04	0.68 ± 0.04	0.68 ± 0.05
K	73.96 ± 1.34	73.96 ± 1.67	135.94 ± 4.37	135.94 ± 5.43
Mg	9.16 ± 0.33	9.16 ± 0.41	6.48 ± 0.08	6.48 ± 0.10
Mn	0.13 ± 0.005	0.13 ± 0.006	0.002 ± 0.01	0.002 ± 0.01
Zn	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01

Çizelge 10. Tek değişkenli kalibrasyon ve PLS1 yöntemlerinin standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % geri kazanım sonuçları (N=5)

Table 10. Univariate calibration and PLS1 methods obtained using the standard addition technique % recovery results (N=5)

Elementler Elements	İlave edilen (mg/L) Addition	Bulunan (mg/L)				% Geri kazanım Regain	
		Gerçek numuneler True samples		Standart ilaveli numuneler Standard addition samples		Tek değişkenli Univariate	PLS1
		Tek değişkenli Univariate	PLS1	Tek değişkenli Univariate	PLS1		
Cu	0.1	1.62 ± 0.07	1.41 ± 0.05	1.74 ± 0.04	1.51 ± 0.04	120.90 ± 61.46	100.78 ± 10.73
Ca	50	34.14 ± 1.12	18.75 ± 1.41	90.35 ± 0.79	84.04 ± 2.53	112.43 ± 2.09	130.58 ± 7.56
Fe	0.2	0.54 ± 0.038	0.68 ± 0.04	0.82 ± 0.027	1.06 ± 0.05	139.64 ± 24.31	187.89 ± 39.78
K	50	73.96 ± 1.34	135.94 ± 4.37	115.88 ± 3.76	189.41 ± 7.71	83.83 ± 6.14	106.94 ± 9.88
Mg	10	9.16 ± 0.33	6.48 ± 0.08	24.28 ± 0.4	15.67 ± 0.35	151.16 ± 6.94	91.81 ± 3.12
Mn	0.2	0.13 ± 0.005	0.002 ± 0.01	0.37 ± 0.003	0.29 ± 0.01	120.42 ± 3.35	145.08 ± 7.81
Zn	0.2	0.17 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.36 ± 0.02	130.01 ± 5.16	105.22 ± 10.16

## SONUÇ

Bu çalışma da ICP–OES ile elementel analizde çok değişkenli kalibrasyon teknikleri geliştirildi. Geliştirilen CLS, PCR ve PLS1 tekniklerinden hangisinin daha iyi olduğunu belirlemek amacıyla kalibrasyon çözeltilerinin çapraz validasyonu yapıldı. Çapraz validasyon sonuçları her bir element için incelendiğinde, kemometrik yöntemler arasından tahmin ve gerçek değerleri arasındaki uyumun en iyi PLS1 yönteminde olduğu sonucuna ulaşıldı. Ayrıca Çizelge 4’deki R<sup>2</sup> ve SEC değerleri incelendiğinde R<sup>2</sup> değerlerinin 1’e yakın olması sebebiyle veri saçılmasının en düşük olduğu yöntemin PLS1 olduğu görüldü. SEC değerleri her bir element için incelendiğinde en düşük SEC değerlerini PLS1 yönteminin verdiği görüldü.

Uygulanan tek değişkenli kalibrasyon ve çok değişkenli kalibrasyon yöntemlerinin arasındaki fark, kullanılan kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanma biçimi ve ölçümlerin alındığı dalga boylarıdır. Tek değişkenli kalibrasyon yönteminde kalibrasyon çözeltileri yedi tane elementin bir arada düşük derişimden yüksek derişime doğru artan derişimlerdeki çözeltilerinden oluşmuştur. Bu çözeltilerin hepsinde yedi katyonun birbirine göre bağlı derişim oranları sabittir. Hâlbuki gerçek numunelerle çalışılırken, farklı numunelerdeki elementlerin aynı oranlarda olması beklenemez. Ayrıca, her ne kadar atomik spektroskopik yöntemlerdeki absorpsiyon veya emisyon pikleri keskin olsa da her elemente ait çok sayıda pik bulunduğundan bunlardan bazılarının az veya çok çakışarak elementlerin birbirine az veya çok

bozucu etki yapması beklenebilir. Ancak her elemente ait tek dalga boyunda çalışıldığında, varsa bu gibi çakışmalardan kaynaklanan bozucu etkinin belirlenmesi mümkün değildir. ICP–OES cihazı biz kullansak ta kullanmasak ta çok sayıdaki dalga boyunda emisyon şiddetlerini ölçmektedir. Buna göre çok sayıda dalga boyundaki emisyon şiddetleri birlikte hesaplamalara dahil edilecek olursa, elementlerin her emisyon pikindeki katkısı hesaba katılacağından dolayı bozucu etkiler ortadan kaldırılmış olacaktır. Uygulanan çok değişkenli kalibrasyon tekniğine, hem kalibrasyon çözeltilerindeki element derişimleri gerçek numunelerde karşımıza çıktığı gibi farklı oranlarda olacak şekilde hazırlanmış ve hem de emisyon şiddetlerinin okunmasında her pikteki çapraz etkileşmeyi dikkate alacak şekilde çok sayıda dalga boyunda okumalar yapılmıştır.

Öncelikle, gerçek yaprak numunelerinin bileşimine benzer bileşimde hazırlanmış sentetik numuneler üzerine tek değişkenli ve çok değişkenli analiz yöntemi uygulanmış ve Çizelge 3’de görüldüğü gibi, tek değişkenli yöntemde % geri kazanımların %100’den oldukça farklı olduğu, çok değişkenli yöntemde ise %100 civarında değiştiği görülmüştür. Çizelge 4 ve Çizelge 5’te görüldüğü gibi, her iki yöntemden elde edilen sonuçlar üzerine student t testi uygulandığında %95 ve %99 güven seviyelerinde tek değişkenli yöntem sonuçlarının sentetik numune bilinen sonuçlarında anlamlı olarak farklı olduğu görülmüştür. Çok değişkenli yöntemden elde edilen sonuçlar bilinen derişimlerle karşılaştırıldığında ise %95 ve %99 güven seviyelerinde bilinen derişimlerle



aralarında anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir. Çok değişkenli yöntem, farklı dalga boylarındaki her bir elementin katkısını hesaba kattığından doğruluğu daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir.

Gerçek yaprak numuneleri üzerinde de benzer şekilde tek değişkenli ve çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri uygulandığında Çizelge 6'daki sonuçlar elde edilmiştir. Her iki yöntemi karşılaştırabilmek amacıyla, gerçek yaprak numunesi çözeltilerine bilinen derişimler de standart element çözeltileri ilave edilmiş ve yöntemler tekrar uygulanmıştır. Standart ilave edilmiş ve edilmemiş numune okumalarından elde edilen derişimlerin farkından yararlanarak, ilave edilen standart element derişimindeki % geri kazanım hesaplanmış ve Çizelge 7'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde tek değişkenli yöntemdeki geri kazanım yüzdelerinin, çok değişkenliden elde edilenlere göre çok daha fazla %100'den saptığı gözlenmektedir. Çok değişkenli yöntemde göre elde edilen yüzde geri kazanımlardan bazılarında da %100'den oldukça fazla sapmalar gözlenmiştir. Bu farklılığın, gerçek numunelerde bulunabilen ancak kalibrasyonda dikkate alınmayan türlerin çapraz etkilerinden kaynaklandığı düşünülebilir.

Tüm bu bulgular ışığında, ICP-OES yöntemi ile bitki yapraklarındaki Cu, Ca, Fe, K, Mg, Mn ve Zn elementlerinin tayininde her bir elemente ait tek dalga boyunda okumalar yapmak yerine, çok sayıdaki dalga boyundan elde edilen verilerin kullanılmasının doğruluğu daha yüksek sonuçlar verdiği sonucuna varılmıştır.

Ayrıca gerçek yaprak numunelerinde bulunabilecek diğer türlerin de dikkate alınarak kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması ve buna bağlı olarak ilave yeni dalga boylarının seçilmesinin analiz sonuçlarının doğruluğunu daha da yükseltebileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Atalay, İ. Z., 2010. Toprak Verimliliği Teşhis Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi Yayını, 5. Bitki Besleme Kongre Bildiriler Kitabı, İzmir. 695 s.*
2. Brereton, R. G., 1997. Multilevel Multifactor Designs for Multivariate Calibration. *Analyst 122:1521-1529.*
3. Çetinkaya, O., A. Sümer, A. Sungur, S. Adiloğlu ve C. Akbulak, 2010. Aşağı Kara Menderes Havzası Topraklarının Alınabilir Fe, Cu, Zn, Mn Durumu ve Yersel Dağılımı. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi Yayını, 5. Bitki Besleme Kongre Bildiriler Kitabı, İzmir. 695 s.*
4. Edward, V. Thomas and M. Haaland, 1990. Comparison of Multivariate Calibration Methods for Quantitative Spectral Analysis. *Anal. Chem. 62:1091-1099.*
5. Kacar, B. ve A. İnal, 2008. Bitki Analizleri, *Cilt 1, Nobel Yayını, Ankara. 892 s.*
6. Kacar, B. ve V. Katkat, 1998. Bitki Besleme. *Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayını, Yayın No: 127, 595 s, Bursa.*
7. Kramer, R., 1998. Chemometrics Techniques for Quantitative Analysis, *Marcel Dekker, New York.*
8. Kazem Kargosha, Amir H. M. Sarrafi, 2001. Simultaneous Spectrophotometric Determination of Calcium and Magnesium in Dialysis Fluids Using Multivariate Calibration Methods. *Analytical Letters 34(10):1781-1793.*
9. Ling Gao, Shouxin Ren, 2005. Simultaneous Spectrophotometric Determination Of Four Metals By Two Kinds Of Partial Least Squares Methods. *Spectrochimica Acta Part A 61 (2005) 3013-3019.*
10. Richard G. Brereton, 2007. Applied Chemometrics for Scientists. *John Wiley & Sons Ltd, 2007.*
11. Ülgen, N., N. Yurtsever ve B. Alkan, 1980. Gübre ve Gübreleme. *Köyşleri ve Kooperatifler Bakanlığı Toprak-Su Genel Müdürlüğü, Genel Yayın No: 88, Çiftçi Yayınları No: 4, Ankara.*
12. Yıldız, Y., 2011. Kazova Topraklarının Mikro Element İçeriklerinin Mesafeye Bağlı Değişiminin Analizi ve Bazı Toprak Özellikleri Arasındaki İlişkiler (Basılmamış Yüksek Lisans Tezi). *Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Toprak Anabilim Dalı Tokat. 92 s.*