

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI

Mikro ekstraksiyon ile eser düzeyde metal zenginleştirilmesi

Proje No

FBA-12-3822

Proje Türü

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Mustafa Soylak
Fen Fakültesi-Kimya Bölümü

Araştırmacıların Adı Soyadı

Erkan Yılmaz

Fen Fakültesi-Kimya Bölümü

Faheem Shah, Ghulam Abbas Kandhri

Fen Fakültesi-Kimya Bölümü (misafir araştırmacı)

TEŞEKKÜR

Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine projemizi desteklediği için teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. GİRİŞ.....	1

2. GENEL BİLGİLER

2.1. AĞIR METALLER VE İNSAN SAĞLIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ.....	3
2.2. Analit Elementleri ve Önemleri.....	4
2.2.1. Kurşun.....	4
2.2.2. Kadmiyum.....	4
2.2.3. Bakır.....	5
2.3. ESER ELEMENT ANALİZİ VE ZENGİNLEŞTİRME YÖNTEMLERİ.....	5
2.3.1. Zenginleştirme Yöntemlerindeki sınırlamalar.....	7
2.3.1.1. Kirlilik.....	8
2.3.1.2. Örnek Miktarı.....	8
2.3.1.3. Eser Element Kaybı.....	8
2.3.1.4. İşlem Karmaşıklığı ve Hız.....	8
2.4. ATOMİK ABSORPSİYON SPEKTROSKOPİSİ.....	8
2.4.1. Atomik Absorpsiyon spektrometresi.....	8
2.4.1.1. Işık Kaynakları.....	9
2.4.2. Aas'nin analitik Performansı İle İlgili Terimler.....	13
2.4.2.1. Duyarlılık.....	13
2.4.2.2. Doğruluk.....	13
2.4.2.3. Kesinlik.....	13
2.4.2.4. Gözlenebilme Sınırı (DL).....	13

2.4.3. Aas İle Elementlerin Kantitatif Tayini.....	14
2.4.3.1. Kalibrasyon Grafiği Yöntemi.....	14
2.4.3.2. Standart Ekleme Yöntemi.....	14
2.4.4. Aas’ de Girişimler.....	14

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ.....	15
3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	15
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışları.....	15
3.2. Yöntem.....	16
3.2.1. Biyolojik Örneklerdeki Kadmium ve Bakırın Zenginleştirilmesi İçin Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu.....	16
3.2.2. Biyolojik Örneklerdeki Kurşun’ un Tayini İçin İyonik Sıvı Temelli Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu Tekniği.....	16

4. BULGULAR

4.1. Biyolojik Örneklerdeki Kadmium ve Bakırın Zenginleştirilmesi İçin Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu.....	18
4.1.1. Geri Kazanıma pH’ ın Etkisi	18
4.1.2. Geri Kazanıma Kompleksleştirici Miktarının Etkisi.....	19
4.1.3. Geri Kazanıma Ekstraksiyon Çözücüsü Hacminin Etkisi.....	20
4.1.4. Geri Kazanıma Dispersif Çözücü Türü ve Hacminin Etkisi.....	20
4.1.5. Geri Kazanıma Santrifüj Dönme Hızı ve Süresinin Etkisi.....	21
4.1.6. Matriks İyonlarının Etkisi.....	21
4.1.7. Yöntemin Analitik Performansı.....	22

4.1.8. Gerçek Örneklerden Analit İyonlarının Geri Kazanım Çalışmaları.....	22
4.1.9. Sertifikalı Referans Madde Analizi.....	23
4.2. Biyolojik Örneklerdeki Kurşun’ un Tayini İçin İyonik Sıvı Temelli Dispersif Sıvı- Sıvı Mikroekstraksiyonu Tekniği.....	24
4.2.1. Geri Kazanıma pH’ ın Etkisi.....	24
4.2.2. Geri Kazanıma Kompleksleştirici Miktarının Etkisi.....	24
4.2.3. Geri Kazanıma Ekstraksiyon Çözücüsü Hacminin Etkisi.....	25
4.2.4. Geri Kazanıma Triton X-100 Hacminin Etkisi.....	25
4.2.5. Vorteks Süresinin Geri Kazanıma Etkisi.....	25
4.2.6. Matriks İyonlarının Etkisi.....	26
4.2.7. Yöntemin Analitik Performansı.....	27
4.2.8. Gerçek Örnek Analizleri.....	27

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

KAYNAKLAR.....	30
PROJE KAPSAMINDA YAPILAN YAYINLAR.....	31

ÖZET

Bu proje çalışması ile çeşitli gerçek örneklerdeki eser bakır, kadmiyum ve kurşun elementlerinin dispersive sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu (DSSME) yöntemleri ile zenginleştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Zenginleştirme sonrası analit konsantrasyonları alevli atomik absorpsiyon spektrometresi ile ölçülmüştür. pH, kullanılacak ligand türü ve miktarı, dispersive ve ekstraksiyon çözücüsü seçimi ve bunların miktarları gibi önemli parametreler optimize edilmiştir. Yöntemlerin doğruluğu sertifikalı referans referans madde analizleri ve ekleme çalışmaları ile kontrol edilmiştir. Geliştirilen yöntemler biyolojik ve gıda örneklerine uygulanmıştır. Proje kapsamında yapılan çalışmalarda iki adet uluslararası makale yayınlanmıştır.

ABSTRACT

Preconcentration of trace lead, cadmium and copper elements with dispersive liquid-liquid microextraction methods in different real samples have been made. concentrations of analyte were measured with flame atomic spectrometer. The important parameters like pH, the type and amount of ligand, the selection dispersive and extraction solvent and their amount were optimized. Accuracy of the methods was controlled by analyzing of certified reference materials and addition studies. The developed method was applied biological and food samples. Two international publications were published with this project.

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Dünya üzerinde yaygın bir şekilde birikmeye başlayan ağır metaller, dünya yüzeyindeki tüm canlı organizmalar için bir tehdit unsuru oluşturmaktadır. 21. Yüzyılda bilim insanların ilgilendiği konuların başında eser element analizleri ve bu analizlerin canlı sağlığına olan etkisinin araştırılması gelmektedir [1, 2]. Bu analizlerin önemi eser elementlerin değişik alanlardaki fonksiyonları ve kullanımları arttıkça artmıştır. Eser element analizi terimi büyük miktarlardaki bileşenlerden oluşan ortam içinde çok küçük miktarlardaki elementlerin tayini için kullanılmaktadır. Eser elementlerin bulundukları örnek ortamından direkt tayinleri, yabancı iyonların göstermiş oldukları matriks etkisinden ve elementlerin konsantrasyonlarının analitik cihazların gözlenebilme sınırından düşük olmalarından dolayı sınırlıdır. Böyle ortamlarda yeterli duyarlık, kesinlik ve doğrulukla analitik sinyal alınamaz. Analiti gerek uygun ortam içine almak gerekse küçük hacimde toplayarak deriştirmek amacıyla ayırma ve zenginleştirme işlemleri uygulanır [1-5].

Bu işlemler arasında birlikte çöktürme, katı faz ekstraksiyonu, sıvı-sıvı ekstraksiyonu kromatografik yöntemler, elektro biriktirme ve bulutlanma noktası ekstraksiyonu sayılabilir. Ancak bu yöntemler fazla miktarda çözücü kullanılması ve buna bağlı olarak aynı oranda atık oluşması, fazla miktarda ya da hacimde örnekler ile çalışılması, fazla zaman harcanması, karmaşık analiz sistemleri gereksinimi ve otomasyon zorluğu gibi dezavantajlara sahiptir. Dispersive sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu (DSSME) gibi mikroekstraksiyon teknikleri yukarıda bahsedilen dezavantajları etkili bir şekilde minimize etmiş ya da ortadan kaldırmıştır [1-8].

Bu proje çalışması ile çeşitli çevre ve biyolojik örneklerdeki eser elementlerin, doğru, hızlı, ucuz ve çevre dostu bir mikroekstraksiyon yöntemi ile zenginleştirildikten sonra alevli AAS ile tayinleri gerçekleştirilmiştir. Proje kapsamında geliştirilen dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu yöntemlerinin gerçek örneklerle uygulanmasından önce optimizasyonları gerçekleştirildi. Son yıllarda mikroekstraksiyon ile ağır metal iyonlarının zenginleştirilmesi ve ayrılmasına verilen önem gittikçe artmıştır. Dünya ile paralel olarak bu çalışmaların

üniversitemiz laboratuvarlarında yapılması ve çalışmaların uluslararası dergilerde yayına dönüştürülmesi dünya literatürüne katkıda sağlamak açısından önem arz etmektedir. Bu kapsamda uluslararası dergilerde 2 adet makale yayınlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. AĞIR METALLER VE İNSAN SAĞLIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ

Ağır metaller yer kabuğunda doğal olarak bulunan bileşiklerdir. Bozulmaz ve yok edilemezler. Küçük bir miktara kadar vücudumuza gıdalar, içme suyu ve hava yolu ile girerler. Bioakümülatiftirler ve insan vücudunda herhangi bir olumlu fonksiyonu olmayıp fazlasıyla toksik etkiye sahiptirler. Solunum, beslenme ve deri Emilimi yoluyla insan vücuduna girerek dokularda birikmeye başlarlar. Bu metaller vücuttan uzaklaştırılmaz ve zaman içinde toksik değere ulaşırlar. Bununla birlikte yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilirler. İnsan vücudundaki eser element miktarı bireyin yaşadığı bölgenin durumuna göre değişmektedir. Özellikle kandaki eser element düzeyi günlük alınan gıdalara bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

Ağır metallerin doğal kökenli kaynaklarının başında toprak ana maddesi gelir. Önemli diğer kaynak ise metal sanayidir. Çeşitli madenlerin çıkarılmasından işletilmesine kadar tüm kademelerde atmosfere belli oranda Pb, Cu, Zn, Ni, Co, Mn verilmektedir. Kömür atıkları, ticari gübreler, tarımda kullanılan pestisitler, endüstriyel atık sular, kanalizasyon atıkları, hayvansal atıklar, trafik kökenli atıklar da diğer ağır metal kaynaklarını oluşturur [9]. Ağır metaller zehirlilik derecesi ve canlı bünyesindeki işlevlerine göre sınıflandırılabilir. Birinci grup metaller bilinen en zehirli ağır metaller olup, kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), ve cıva (Hg)'dan oluşmaktadır. Bu metaller her derişimde zehirlidir ve biyolojik işlevi yoktur. Örneğin, vücutta Hg birikimi 25 mg olduğu zaman nörolojik bozukluklar, 25-100 mg arası görme ve işitme bozuklukları, denge bozuklukları ve parmak uçlarında dokunma hissinin azalması, 200 mg' ın üstündeki birikimlerde ise sağırılık, körlük, felç ve ölüm olayları ortaya çıkmaktadır [10]. Üçüncü grup metaller ise biyokimyasal olarak gerekli metallerdir. Bunlar bakır (Cu), çinko (Zn), kobalt (Co), nikel (Ni), vanadyum (V), selenyum (Se), krom (Cr) ve demir (Fe)'dir. Bununla birlikte bu metaller belli derişim düzeyinin üzerinde zehirli konuma

gelir. Bu grup elementlerden Ni, Cr, Cu ve Se nükleik asitlerle etkileşimi nedeniyle kanserojen etki göstermektedirler [9].

2.2. ANALİT ELEMENTLER VE ÖNEMLERİ

2.2.1. Kurşun

Kurşun; akü, petrol, boya sanayinde, pillerde, elektrik kablolarında, boru ve kapların parlatılması gibi bir çok alanda kullanılmaktadır. Çevre kirliliğine neden olan kurşunun büyük bölümü motorlu araçlarda kullanılan benzinin yanması sonucu ortaya çıkan tetra etil kurşundan kaynaklanmaktadır. Yapısında kurşun bulunan borulardan geçen su gıdaların taşınması ve saklanması için kullanılan kaplardaki kurşun lehimleri de gıdalarda kontaminasyona neden olmaktadır. Boyaların yapısında bulunan kurşun da bir diğer kontaminasyon nedenidir. Otomobillerden çevreye yayılan kurşun, boyalardan yayılanın yaklaşık üçte biridir. Kurşunun vücutta toksik etki yaratabilmesi için kanda veya yumuşak dokularda belli bir düzeye kadar birikmesi gerekir. Yaş, beslenme ve fizyolojik durumlar gibi bir çok faktöre bağlı olarak etkisi değişmektedir. Çocuklar için 40-80 µg Pb/100 ml toksik belirtilerin görülebileceği, 80 µgPb/100 ml kurşun zehirlenmelerinin görüldüğü düzeydir. Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar kurşunun sinir sistemi, kan, mide, bağırsak ve böbrekler üzerinde olumsuz etkilere neden olduğunu göstermiştir. Üreme ve akciğerler de etkilenen organlardır. Kurşunun akut belirtileri kalp yetmezliği, koma ve ölümdür. Deney hayvanların da kansere neden olduğu da saptanmıştır [11-17].

2.2.2. Kadmiyum

Kadmiyum ve bileşikleri; boya (boyar madde ve mürekkep üretimi), cam, tekstil ile sentetik polimerlerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar; kadmiyumun bir çok sanayi dalında kullanılmasının, bu toksik metalin toprak, hava ve su yoluyla gıda maddelerine bulaşma riskini artırdığını ve bazı gıdalarda yüksek düzeyde kontaminasyon olduğunu göstermektedir. Kadmiyumun en önemli etkisi hipertansiyona neden olmasıdır. Ağız yoluyla 15 mg kadmiyumun alınması insanlarda derhal mide bulantısı ve kusmaya neden olur. En fazla etkilenen organ böbreklerdir. Bu hastalığın belirtileri bel ve kas ağrıları şeklinde başlamakta, hastalığın ileri aşamalarında kemik yumuşaması ve deformasyonu, vücut ağırlığının sürekli azalması, kemik kırılmaları, görme bozuklukları görülmektedir.

Kadmiyumun hayvanlarda kanserojenik etki gösterdiği saptanmasına karşın, insanlarda bugüne kadar bu tür bir etkisi belirlenmemiştir [18-22].

2.2.3. Bakır

Doğada 200'den fazla bakır minareli bulunmakla beraber sadece 20 tanesi bakır cevheri olarak endüstriyel öneme sahiptir. Endüstride bakırın önemli rol oynamasının nedeni çok farklı özelliklere sahip olmasıdır. Bakırın en önemli özellikleri arasında yüksek elektrik ve ısı iletkenliği, aşınmaya ve korozyona direnç, çekilebilme ve dövülebilme özellikleri sayılabilir. Ayrıca alaşımları çok çeşitli olup endüstride (otomotiv, basınçlı sistemler, borular, vanalar, elektrik santralleri ve elektrik - elektronik vb.) değişik amaçlı kullanılmaktadır. Bakırın genel kimyasal özelliklerinden dolayı doğaya yayılımı açısından “Atmofil” (hava sever) grupta yer almasına rağmen, havada bulunan bakır konsantrasyonu üretim yapan sanayi birimine uzaklığına bağlıdır. Doğada yaygın bir şekilde bulunması, endüstriyel ve tarımsal alanda, insan ve hayvan hastalıklarının tedavisinde ve günlük yaşamda fazla kullanılan bir metal olması nedeniyle başta insanlar olmak üzere çeşitli hayvanlarda sık sık zehirlenmelere yol açar. Ancak bakır çeşitli canlı türlerinin dokularında eser element olarak bulunması bakımından büyük bir öneme sahiptir. İnsan metabolizmasında bakır esas elementlerden birisidir. Yetişkinlerin günde 2 mg bakıra ihtiyaç duyduğu tahmin edilmektedir. İnsan kanında ise litrede 0.8 mg bakır iyonu vardır[23-25].

2.3. ESER ELEMENT ANALİZİ VE ZENGİNLEŞTİRME YÖNTEMLERİ

“Eser Derişim” olarak kabul edilen derişim aralığı 10^{-6} - 10^{-8} eser derişim olarak kabul edilmiştir. Kaiser, ppm ve ppb tanımlarını vermiştir. Bugünkü yaygın kullanım ise 10^{-2} - 10^{-6} derişim aralığı eser, 10^{-6} 'nın altındaki derişimler de ultra eser olarak bilinmektedir. mg veya μg düzeyindeki eser elementler, bulundukları ortamlarda ana bileşenlerinin yanında çok küçük derişimlerde. Eser analizde düşük konsantrasyondaki analitlerin tayinine elverişli, özellikle duyarlı, doğruluğu, kesinliği ve seçimliliği iyi olan yöntemlere ihtiyaç vardır. Aletli analiz yöntemlerinin gelişmesi, elektronik alanındaki gelişmelerle beraber son yıllarda olmuştur. Aletli analiz yöntemleri Tablo 2.1' de verilmektedir ve bu yöntemler tekli yöntemler olarak da adlandırılmaktadır. Bunların dışında günümüzde özellikle ayırmayı da sağlaması nedeniyle geniş kullanım alanı bulan kromatografik yöntemler de mevcuttur [9, 26].

Tablo 2. 1. Enstrümantal yöntemlerde kullanılan fiziksel ve kimyasal özellikler.

Karakteristik Özellikler	Enstrümantal Yöntemler
Işın emisyonu	Emisyon spektroskopisi; floresans, fosforesans ve luminesans
Işın absorpsiyonu	Spektrofotometri ve fotometri; fotoakustik, spektroskopi; nükleer manyetik rezonans ve elektron spin rezonans spektroskopisi
Işın saçılması	Türbidimetri; nefelometri; raman spektroskopisi
Işın kırılması	Refraktometri; interferometri
Işın difraksiyonu	X-ışınları ve elektron difraksiyon yöntemleri
Işın rotasyonu	Polarimetri; optik rotary dispersiyonu; dairesel dikroizm
Elektrik potansiyeli	Potansiyometri; kronopotansiyometri
Elektrik yükü	Kulometri
Elektrik akımı	Amperometri; polarografi
Elektriksel direnç	Kondüktometri
Kütle	Gravimetri
Kütle / yük oranı	Kütle spektrometri
Reaksiyon hızı	Kinetik yöntemler
Termal özellikler	Termal gravimetri ve titrimetrik yöntemler
Radyoaktivite	Aktivasyon ve izotop seyreltme yöntemleri

Eser elementler, matriks olarak adlandırılan örneğin temel bileşenlerinin bulunduğu ortam içinde tayin edilirler. Ortam; metaller, madenler, mineraller, bileşikler, su, sulu çözeltiler, organik ve biyolojik maddelerden oluşabilir. Şayet eser analize ortamın etkisi yoksa ve eser

elementlerin ortam içindeki derişimi kullanılacak yöntemeye göre yeterince yüksek ise böyle ortamlar uygun analiz ortamlarıdır. Birçok durumda matriks eser elementin tayini üzerine olumsuz etki yapar. Böyle ortamlarda yeterli duyarlık, kesinlik ve doğrulukla sonuç alınamaz. Hatta bazı hallerde tayin dahi mümkün olmaz. Çünkü eser element derişimi, analiz yöntemine göre belirli bir düzeyin üzerinde olmalıdır. Aksi takdirde alınan sinyal, aletin zemin sinyalinin altında kalır.

Aynı derişimde bulunan eser elementlerin farklı ortamlarda farklı büyüklükte analitik sinyaller oluşturduğu iyi bilinen başka bir eser analiz problemi olup “matriks etkisi” adını alır. Eser analizde kullanılan aletli yöntemlerin bağıl yöntemler olduğu düşünülürse, standartlar ile numunenin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin birbirine benzetilmesi istenir. Standart hazırlanması eser element analizlerinin önemli problemlerinden birisidir. Eser element analizinde kullanılan aletsel yöntemeye göre eser element tayininde şu problemlerle karşılaşılır [27, 28].

1. Eser element derişiminin, doğrudan tayininin yapılamayacak kadar küçük olması,
2. Çok küçük miktardaki başlangıç örneğinde ana bileşen, yan bileşen ve eser elementlerin analizi,
3. Çok büyük miktardaki bir örnekten tayini yapılacak eser elementin ayrılması,
4. Ortam girişimlerini önlemek ve tayin kapasitesini artırmak için analitin bulunduğu ortamdan kurtarılması ve küçük bir hacimde toplanması [28, 33].

Yukarıda maddeler halinde verilen problemleri çözmek için etkili bir ayırma ve zenginleştirme çalışmasının yapılması şarttır. Ve bu yapılacak olan ayırma ve zenginleştirme çalışması aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır.

2.3.1. Zenginleştirme Yöntemlerindeki Sınırlamalar

Küçük derişimlerdeki eser elementlerin deriştirilmesinde karşılaşılan bazı sınırlamalar vardır. Bunlardan bazıları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

2.3.1.1. Kirlilik

Ayırma işlemleri sırasında tayini yapılacak örneğe farklı kaynaklardan analit içeren yabancı maddeler girebilir. Kontaminasyon adı verilen bu olay, eser analizde karşılaşılan önemli problemlerden birisidir. Kullanılan kaplar, reaktifler, ayırma için kullanılan diğer cihazlar hatta laboratuvar atmosferi bu tür kirlenmeye neden olabilir. Kirliliği belirleyebilmek için örnek kullanılmadan ayırmanın bütün adımları gerçekleştirilerek kör denemeler yapılır.

2.3.1.2. Örnek Miktarı

Tayini yapılacak örnek miktarı, örnekleme ve işlem güçlükleri nedeni ile sınırlıdır. Örneğin büyüklüğü, kullanılan yöntem kadar istenilen eser elementlerin derişimlerine de bağlıdır. ppm veya ppb düzeyindeki eser elementlerin tayininde kullanılan örnek miktarı 0,1-10 gramdır. Bu sıvı örnek için genelde 10–1000 mL’dir.

2.3.1.3. Eser Element Kaybı

Zenginleştirme esnasında elementlerin bir kısmı kayba uğrayabilir. Bu kayıplar zenginleştirme yöntemleri sırasında meydana gelebilen buharlaşma, dikkatsiz çalışma, tam olmayan ayırma, çalışmada kullanılan malzemenin çeperlerinde kuvvetli adsorpsiyon sonucu oluşabilir. Bu faktörler bağıl hatanın yüksek olmasına neden olurlar.

2.3.1.4. İşlem Karmaşıklığı ve Hız

Analit derişimi düştükçe, ön işlemlerin uygulanması sırasında çeşitli problemlerle karşılaşılır. Ayrıca, yapılan işlemlerin sayısının artması tekniği daha da karmaşık hale getirebilir. Bu durumda hem zaman kaybına hem de fazla reaktife ihtiyaç duyulmasına neden olur. Fazla reaktifin kullanılması ise kirlilik riskini arttırır. Bu nedenle analiz sırasında işlem basamakları amaca yönelik olarak mümkün olduğunca az tutulmalı ve hızlı olunmalıdır [52, 56].

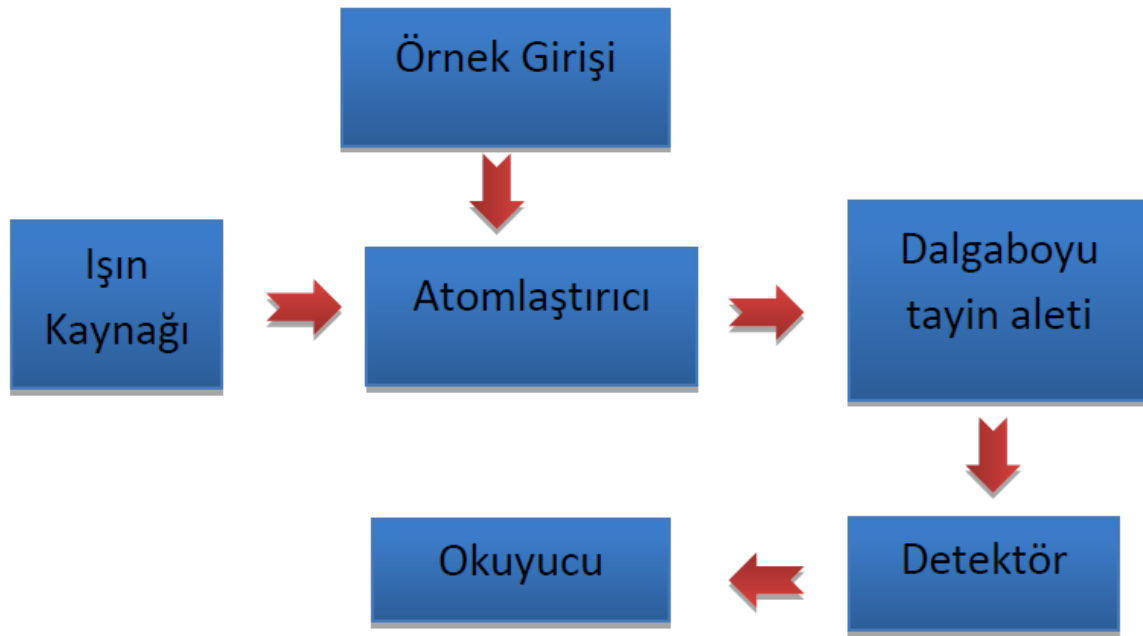
2.4. ATOMİK ABSORPSİYON SPEKTROSKOPİSİ

2.4.1. ATOMİK ABSORPSİYON SPEKTROMETRESİ

Atomik absorpsiyon spektrometrisi (AAS) geniş olarak kullanılır ve iyi doğruluk ve kabul edilebilir tekrarlılık ile içinde biyolojik, klinik, çevresel, besin ve jeolojik örneklerin

bulunduğu geniş aralıktaki örneklerde elementlerin veya metallerin eser seviyelerini ($\mu\text{g/mL}$) ve ultra eser (sub- $\mu\text{g/mL}$) seviyelerinin tayin edebilecek teknik olarak kabul edilir.

Atomik absorpsiyon spektroskopisi yüksek sıcaklıkta gaz halinde bulunan element atomlarının elektromanyetik ışınları absorplaması üzerine kurulmuştur. Bir elementin atomik absorpsiyon spektroskopisiyle analizini yapmak için o elementin önce nötral hale, sonra buhar haline gelmesi, daha sonra da bir kaynaktan gelen elektromanyetik ışın demetinin yoluna dağılması gerekir. Son yıllarda atomik spektroskopi alanında ICP, lazer teknikleri ve elektrotermal atomlaştırıcı AAS kullanımı popülerdir. Alevli teknikler ucuz, pratik ve kullanımı kolay olduğundan analitik uygulamalarda daha çok tercih edilmektedir. Şekil 2.1.'de atomik absorpsiyon spektrometresi şematik olarak gösterilmektedir [33, 34]. Atomik absorpsiyon spektrometresi ışık kaynağı, absorpsiyon ortamı (atomlaştırıcı), monokromatör ve alıcıdan oluşur.



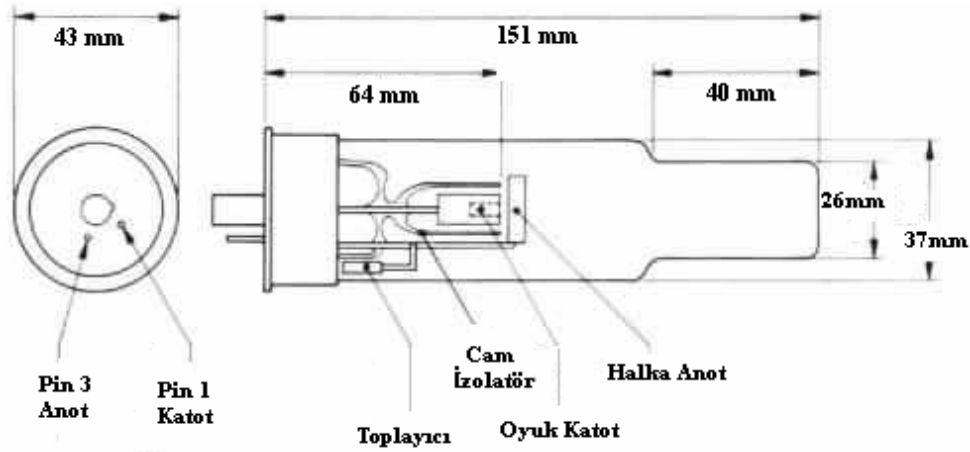
Şekil 2.1. Atomik absorpsiyon spektrometresinin şematik gösterimi

2.4.1.1. Işık Kaynakları

Çok geniş olarak kullanılır ve AAS'de kabul edilen ışın kaynağı çizgi kaynaktır, çoğunlukla oyuk katot lambası (HCL) ve daha az bir ölçüde de düşük radyofrekanslı elektrot boşalım lambalarıdır (EDL).

Oyuk Katot Lambaları

Atomik absorpsiyonda en yaygın kullanılan ışık kaynağıdır. Oyuk katot lambası düşük basınçta inert bir gazla doldurulmuş bir katot ve anot içeren cam bir silindirdir. (Şekil 2.2) Katot incelenen elementin çok saf metalinden veya o elementi içeren bir alaşımdan yapılmıştır. Anot ise nikel, tungsten gibi metallerden yapılmıştır.



Şekil 2.2. Oyuk katot lambası

Elektrotlar arasına 100-400 volt' luk bir gerilim uygulandığında 1-50 mA' lik bir akım oluşturulur. İnert gaz atomları iyonlaşır. İyonlar yüksek hızla katoda çarpar ve katot yüzeyindeki atomlardan bazılarını koparıp gaz fazına geçirir. Bu atomların bir kısmı, iyon ve elektronlarla çarpışarak uyarılırlar. Uyarılmış atomlar temel hallerine dönerken katot elementinin karakteristik spektrumunu yayarlar.

Elektrotsuz Boşalım Lambaları

Elektrotsuz boşalım lambalarında tayin edilecek element yüksek frekans sarımlarına sıkıca yerleştirilmiş ve yalıtılmış bir ceket içinde bulunan kuartz bir tüp içine doldurulmuştur. Bu lambaların ışık şiddeti yüksek, ısınma süresi kısa ve kararlılığı iyidir. As, Se ve Sb gibi uçucu ve kısa dalga boylarında (< 200 nm) absorpsiyon ve emisyon yapabilen elementler için geliştirilmişlerdir.

2.4.1.2. Atomlaştırmacılar

Atomlaştırmacının en önemli görevi örnekteki molekül veya iyonlardan temel haldeki element atomlarını oluşturmaktır. Bir analiz başarılı olup olmaması atomlaşmanın etkinliğine bağlıdır. Tayinin duyarlılığı incelenen elementin atomlaşma derecesi ile doğrudan orantılıdır. Atomlaştırmacılar alevli ve alevsiz olmak üzere ikiye ayrılır.

Alevli Atomlaştırmacılar

Alevli AAS’de örnek genellikle aerosol halde alev girişine verilir. Alevler bir oksidant ve yakıttan oluşur. AAS’de kullanılan alevler hava asetilen (hava oksidant ve asetilen yakıt) ve azot oksit-asetilen (azot oksit oksidant ve asetilen yakıt) tır. Burdaki alevler yanan alev olarak isimlendirilir. Diğer alevler difüzyon alevi olarak isimlendirilir ve bu alev önerilir ama geniş olarak kullanılmaz. Alevin birincil nesnesi atomlar içinde moleküllerin parçalanmasıdır. Hava-asetilen (2500oK) periyodik tablodaki 40-50 element için uygun ve verimlidir. Periyodik tablodaki diğer 10 ila 20 element daha sıcak olan azot oksit-asetilen alevi (3200 °K) gerektirir [35, 36]. Uzun ince alev maksimum seçicilik için AAS’de caziptir.

Tablo 2.2. Alev türleri

Yanıcı Gaz	Yakıcı Gaz	Sıcaklık (°C)
Dogal Gaz	Hava	1800
Propan	Hava	1900
Asetilen	Hava	2300
Asetilen	Oksijen	3100
Asetilen	N2O	2800

Alevsiz Atomlaştırmacılar

Alevsiz atomlaştırmacılara elektrotermal atomlaştırmacılarda denir. Elektrotermal atomlaştırmacılar içinde en popüler olanı grafit fırın’dır. Grafit yüksek saflıktadır. Örnek 5 – 10 µl olarak mikropipet yardımı ile enjekte edilir. Sonra akım geçirilir. Geçen akım ayarlanarak istenilen sıcaklığa ulaşılabilir. Sıcaklık programı 4 basamaklıdır.

1. Kurutma : Çözücü uçurulur (100 – 110 °C).
2. Kül etme : Ortam bileşenleri parçalanır, kül edilir. (200 – 700 °C)
3. Atomlaşma : Atomlaşma ısı etkisiyle veya grafitle indirgemeyle olur.(1800–2500 °C)
4. Temizleme : Fırın ikinci kullanım için temizlenir. Sıcaklık atomlaşma sıcaklığından 100 – 200 °C daha fazladır.

Elektrotermal atomlaştırıcıların yapımı daha zor ve pahalıdır. Daha büyük ve gelişmiş güç kaynağı gerekli olduğundan fiziksel olarak daha fazla yer kaplarlar. Buna karşılık aleve göre bir çok üstünlük sunarlar. Bunlar;

1. Elektrotermal atomlaştırıcılarda küçük örnek hacimleri kullanılır.
2. Aleve de sisletmesi zor olan viskoz sıvılarla kolaylıkla çalışılabilir.
3. Elektrotermal atomlaştırıcılarda daha düşük gözlenebilirlik sınırı değerleri elde edilir.
4. Atomik buharın kimyasal ve ısısal çevresi daha iyi denetlenebilir.
5. Elektrotermal atomlaştırıcılarda buharlaşma ve atomlaşma verimleri aleve göre genellikle daha üstündür.
6. Duyarlılık daha fazladır.
7. Katı örneklerin doğrudan analizi mümkündür [92, 94].

2.4.1.3. Monokromatör

Başlıca görevi incelenen elementin emisyon hattını ışık kaynağının yaydığı öteki hatlardan ayırmaktır. AAS' de monokromatör olarak prizma veya şebeke kullanılır.

2.4.1.4. Alıcı

Atomik absorpsiyon spektroskopisinde ışık sinyalinin elektrik sinyaline dönüştürülmesinde başlıca fotoçoğaltıcılar kullanılır. Foto çoğaltıcılar ışığa duyarlı bir katot, ard arda daha pozitif bir potansiyel gösteren bir seri dinot ve arasında bir anottan oluşan bir vakum fotoseldir.

2.4.2. AAS'NİN ANALİTİK PERFORMANSI İLE İLGİLİ TERİMLER

2.4.2.1. Duyarlık

Okunan absorbans değerlerinin standart çözeltilerin derişimlerine karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen kalibrasyon eğrisinin eğimi duyarlık olarak tanımlanır. Atomik absorpsiyonda duyarlık özel olarak analiz elementinin net % 1'lik absorpsiyonuna veya 0.0044'lük absorbans değerine karşılık gelen derişim olarak tanımlanmıştır [70].

2.4.2.2. Doğruluk

Ölçülen bir değerin gerçek bir değere ne kadar yakın olduğunu belirtir ve analitik işlemin çok sayıda tekrarlanmasıyla bulunan ortalama değerin gerçek değere yakınlığı olarak tanımlanır.

2.4.2.3. Kesinlik

Kesinlik, sonucun tekrarlanabilirliğinin bir ölçüsüdür. Çalışma şartlarında uygulanan analitik işlemlerin tekrarlanması ile elde edilen sonuçların birbirine yakınlığı kesinliği belirler. Kesinliğin en yaygın kullanılan ölçüsü standart sapmadır.

2.4.2.4. Gözlenebilme Sınırı (DL)

Bir analitik yöntemin performansı genellikle gözlenebilme sınırı ile ölçülür. Gözlenebilme sınırı teorik olarak analitin tayin edilebilen en küçük derişimi olarak tanımlanır ve $x = k_{ör} x + 3s_{kör}$ ile bulunan derisimdir. $Kör x$, kör çözeltilerin ortalama sinyali ve $s_{kör}$ de standart sapmasıdır, bulunan x absorbans biriminde olup, kalibrasyon dogrusundan karşılık gelen derişim bulunur. Bu gözlenebilme sınırıdır [37].

2.4.2.5. Tayin Sınırı (LOQ)

Normal olarak gözlenebilme sınırı yakınında tayin yapılamaz. Tayinin yapılabildiği derişim DL değerinin bazen 5 bazen de 10 katı olarak alınır. Bu değere tayin sınırı denir.

2.4.3. AAS İLE ELEMENTLERİN KANTİTATİF TAYİNİ

AAS ile genellikle metalik özellik gösteren elementlerin tayini yapılır. Bütün element atomları kendilerine özgü dalga boyundaki ışını absorplayıp uyarıldıkları zaman elektronların bulunduğu daha yüksek enerji seviyelerine bağlı olarak farklı şiddetlerde ve dalga boylarında absorpsiyon hatları oluşur. Spektroskopik analizlerde çalışılacak dalga boyu seçilirken en şiddetli absorpsiyonun olduğu dalga boyu belirlenir. Böylece seçilen dalga boyunda küçük derişimlerde bile absorbans değerleri okunabilir. AAS’ de elementlerin kantitatif tayini için kalibrasyon grafiğı ve standart ekleme yöntemleri kullanılır.

2.4.3.1. Kalibrasyon Grafiğı Yöntemi

AAS’ de kantitatif analiz Lambert – Beer yasasına dayanılarak yapılır. Bütün şartlar sağlandıktan sonra derişimleri bilinen standart çözeltilerin ölçülen absorbans değerleri derişimlerine karşı grafiğı geçirilerek uygun bir kalibrasyon eğrisi elde edilir. Daha sonra örneğin absorbansı okunarak grafik yardımıyla analiz elementinin derişimini bulunur.

2.4.3.2. Standart Ekleme Yöntemi

Örneğin bulunduğu matriksten kaynaklanan fiziksel ve kimyasal girişimler sonuçlara etki eder. Örnekteki matriks tam olarak bilinmiyorsa matriksin etkisini standart çözeltilerle tamamen gidermek mümkün olmaz. Yani örnekteki absorbans derişim ilişkisi standart çözeltilerinkinden farklıdır. Bu gibi durumlarda standart ekleme yöntemi kullanılır. Bunun için numune en az üçe ayrılır. Birinci kısım belli bir hacme kadar çözücü ile seyreltilir. ikinci ve üçüncü kısımlara artan miktarlarda standart çözeltiden ekleme yapılır ve çözücü ile birincinin hacmine getirilir. Her çözeltilinin absorbansı ölçülür ve eklenen element derişimlerine karşı absorbanslar grafiğı geçirilir. Kalibrasyon doğrusunun yatay eksenini kestiğı noktanın negatif işaretlisi çözeltideki bilinmeyen derişimini verir.

2.4.4. AAS’ DE GİRİŞİMLER

1. Kimyasal Girişimler
2. İyonlaşma Girişimleri
3. Spektral Girişimler
4. Fiziksel Girişim
5. Zemin Girişimleri

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometresi: Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Ana Bilim Dalı'nda bulunan Perkin Elmer marka 3110 model alevli atomik absorpsiyon spektrometresi kullanıldı. Alev olarak hava / asetilen alevi kullanıldı. Analizlerde AAS' nin nebulizörüne direkt bağlı olan el yapımı bir mikroyenjeksiyon sistemi kullanılmıştır.

Analitik terazi: Kullanılacak kimyasalların tartımları 0.1 g duyarlılıktaki OHAUS Adventurer Pro tipi analitik terazide yapılmıştır.

pH metre: Çalışmalar esnasında çözeltilerin pH değerlerinin ayarlanması için Sartorius marka PT-10 model pH metre kullanıldı.

Saf Su Cihazı: Deneysel çalışmalar boyunca ihtiyaç duyulan suyun elde edilmesinde Millipore marka saf su cihazı kullanılmıştır.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışları

Çalışmalarda kullanılan çözeltilerin hazırlanmasında analitik saflıkta kimyasal maddeler ve ultra saf su kullanıldı. Stok çözeltiler, incelenen her bir iyonun analitik saflıktaki nitrat tuzlarından, derişimi 1000 µg/mL olacak şekilde hazırlandı. Deneysel çalışmalarda, amaca göre bu stok çözeltilerden alınıp, seyreltmeyle istenilen derişime getirilerek kullanıldı. Çalışmalarda ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan 1-butil-3-metilimidazolyum hekzaflorofosfat iyonik sıvısı Merck firmasından temin edilmiştir. Kadmiyum ve bakırın zenginleştirilmesi için yapılan çalışmada kompleksleştirici olarak kullanılan ditizon (0.1 % (w/v) Riedel-deHaen firmasından temin edilmiştir. Kurşun' un zenginleştirilmesi için yapılan

çalışmada kompleksleştirici olarak kullanılan 1-(2-Piridazol)-2-naftol (PAN) (0.01 % (w/v) ise Acros organics firmasından temin edilmiştir. Her iki kompleksleştirici de etanol ortamında hazırlanmıştır. Kurşun' un zenginleştirilmesi için yapılan çalışmada dispersif çözücüsü olarak Triton X-100 (0.1% v/v) yüzey aktif maddesi kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Biyolojik Örneklerdeki Kadmium ve Bakırın Zenginleştirilmesi İçin Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu

Zenginleştirme çalışmaları öncelikle kadmium ve bakır içeren model çözeltilerle gerçekleştirildi. Bu amaçla 15 mL' lik model çözeltilerin pH' ı 9.0' a tampon çözeltiler vasıtası ile ayarlandı. Model çözeltilere, şelatlaştırıcı reaktif olarak etanolde hazırlanmış % 0.01' lik ditizon çözeltilisinden 1000 µL ilave edildi. Kompleks oluşumundan sonra model çözelti ortamına 100 µL 1-butil-3-metilimidazolyum hekzaflorofosfat iyonik sıvısından ve 100 µL metanol ilave edildi. Çözelti ortamında bir bulanma gözlemlendi. Elde edilen bu çözelti birkaç saniye çalkalandı, 15 dakika bekletildi ve 4000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra faz ayrımı gerçekleşti üstteki su fazı bir enjektör ile alınıp atıldı ve geride kalan ekstraksiyon fazının üzerine 200 µL derişik HNO₃ ilave edildi. Zenginleştirilmiş faz içerisindeki analit konsantrasyonu alevli atomik absorpsiyon spektrometresi ile mikroenjeksiyon sistemi kullanılarak ölçüldü. Kör çözeltiler için de aynı işlem uygulandı. Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon metodu üzerinde etkili olan pH, kompleksleştirici miktarı, ekstraksiyon ve dispersif çözücü miktarları, örnek hacmi ve matriks etkisi gibi parametreler optimize edilmiştir.

3.2.2. Biyolojik Örneklerdeki Kurşun' un Tayini İçin İyonik Sıvı Temelli Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu Tekniği

Yapılan bu çalışmada 10 µg L⁻¹ Pb(II) iyonu içeren 10 mL' lik standart çözeltiler kullanılmıştır. Bu çözelti üzerine kompleksleştirici olarak 1 mL 0.01%' lik PAN çözeltilisinden ilave edildi ve pH' ı 7.0' a ayarlandı. Model çözelti ortamına 200 µL 1-butil-3-metilimidazolyum hekzaflorofosfat iyonik sıvısından ve 500 µL 0.01%' lik Triton X-100 ilave edildi. Bu çözelti 2800 rpm' de 15 saniye vorteks ile çalkalandı ve bulanık bir çözelti elde edildi. Bu esnada Pb-PAN kompleksi iyonik sıvı fazına ekstrakte edildi. 3500 rpm' de 15 dakika santrifüj işleminden sonra faz ayrımı gerçekleşti üstteki su fazı bir enjektör ile

alınıp atıldı ve geride kalan viskoz sıvı 0.5 mL asidik etanolde çözüldü. Son hacimdeki analit konsantrasyonu alevli atomik absorpsiyon spektrometresi ile mikroenjeksiyon sistemi kullanılarak ölçüldü. Kör çözeltiler için de aynı işlem uygulandı. Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon metodu üzerinde etkili olan pH, kompleksleştirici miktarı, iyonik sıvı ve yüzey aktif madde miktarları, örnek hacmi ve matriks etkisi gibi parametreler optimize edilmiştir.

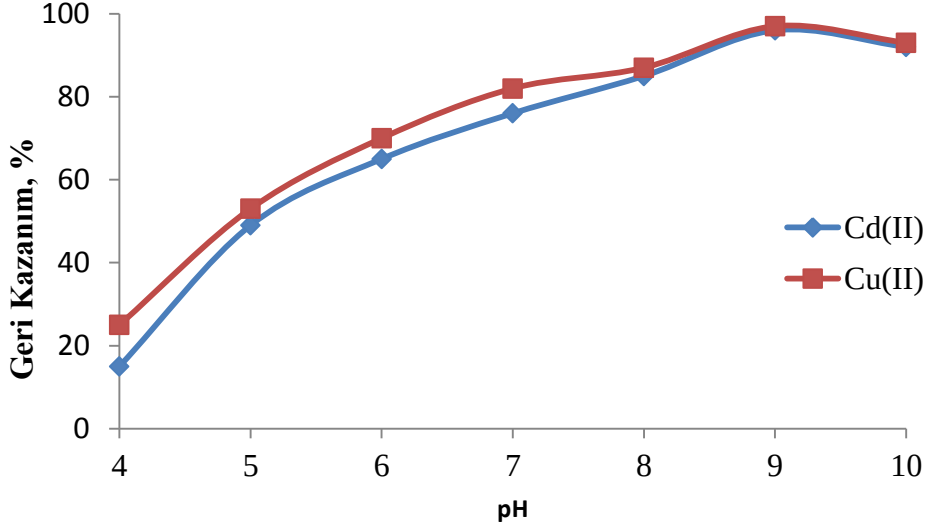
4. BULGULAR

Geliştirilen yöntemler gerçek örneklerle uygulanmadan önce model çözelti ortamında optimize edildi. Optmimizasyon çalışmaları kapsamında pH, kompleksleştirici miktarı, ekstraksiyon ve dispersif sıvısı miktarları, örnek hacmi, santrifüj süresi ve hızı, matriks etkisi gibi parametreler optimize edildi. Geliştirilen yöntemler için gözlenebilme sınırı, tayin sınırı, lineer aralık, % bağıl standart sapma gibi analitik performans ile ilgili değerler hesaplandı. Optimizasyon işlemlerinden sonra yöntemler gerçek örneklerle ve sertifikalı referans maddelere başarı ile uygulandı.

4.1. Biyolojik Örneklerdeki Kadmium ve Bakırın Zenginleştirilmesi İçin Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu

4.1.1. Geri Kazanıma pH' ın Etkisi

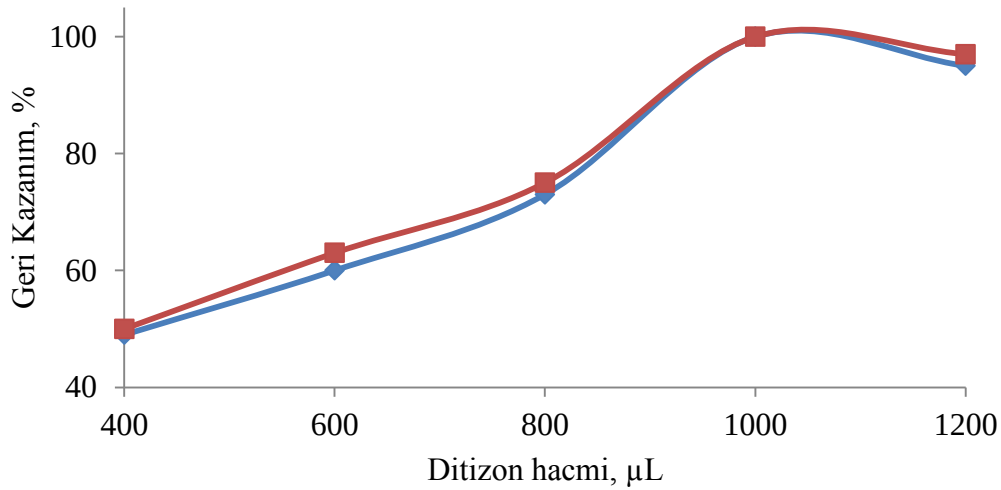
Eser düzeyde bulunan Cd(II) ve Cu(II) iyonlarının kompleksleştirici ile kompleks oluşturması ve model çözelti ortamından iyonik sıvı fazına (ekstraksiyon fazı) ekstrakte olması ortamın pH değerine de bağlı olduğundan, tampon çözelti yardımı ile farklı pH değerlerinde model çözeltiler hazırlanmıştır. Daha sonra zenginleştirme işlemi başamaklarına tabi tutulan örneklerin absorbanları alevli AAS ile tayin edilmiştir. pH için geri kazanma değerleri üç paralel çalışma sonucunun ortalaması olarak hesaplandı ve optimum pH 9.0 olarak seçilmiştir. Geri kazanma verimlerinin pH ile değişimi Şekil 4.1' de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Elementlerin geri kazanım değerlerine pH'nın etkisi (N=3).

4.1.2. Geri Kazanıma Kompleksleştirici Miktarının Etkisi

Geliştirilen mikroekstraksiyon çalışmasında Cd(II) ve Cu(II) iyonlarını kompleks hale getirmek için ditizon (dithizone) kompleksleştirici olarak kullanılmıştır. Optimum kompleksleştirici miktarını bulmak için farklı miktarlarda ditizon çözeltisi (% 0,01 w/v) model çözeltilere ilave edilmiştir. En iyi sonuç 1000 μ L kompleksleştirici ilavesinde elde edilmiştir.



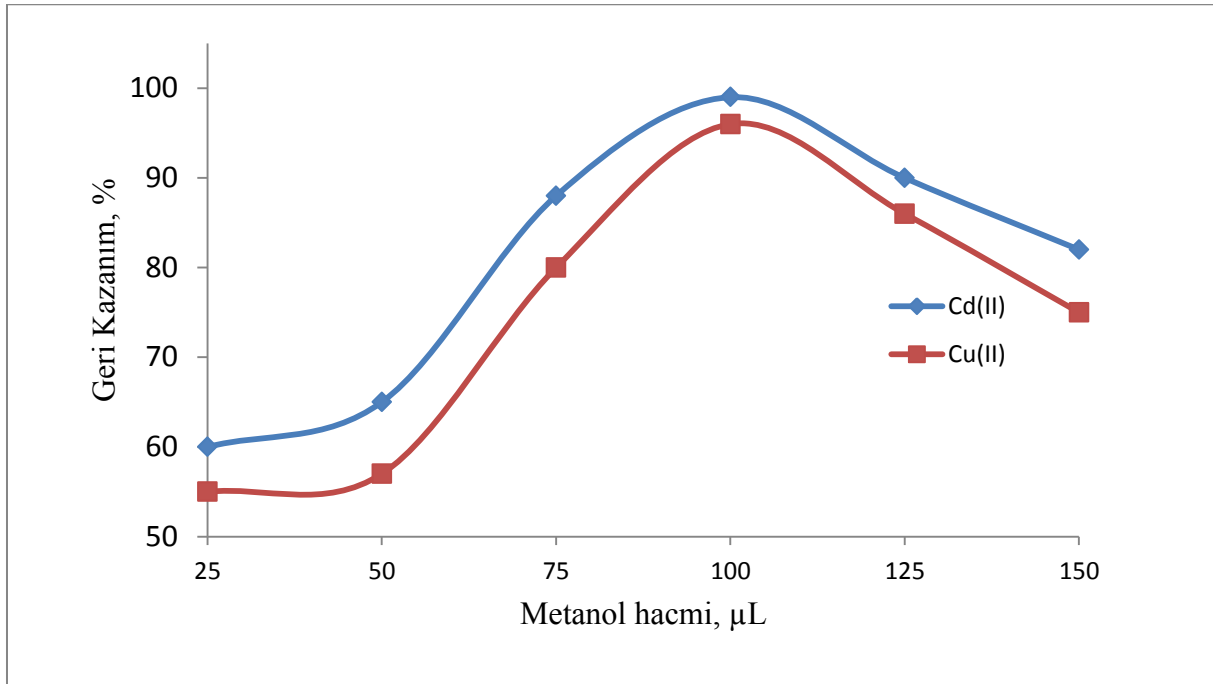
Şekil 4.2. Elementlerin geri kazanım değerlerine ditizon hacminin etkisi (N=3).

4.1.3. Geri Kazanıma Ekstraksiyon Çözücüsü Hacminin Etkisi

Bu çalışma kapsamında 1-butil-3-metilimidazolyum hekzaflorofosfat iyonik sıvısı ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılmıştır. Model çözelti ortamına hacmi 50-150 μL arasında değişen iyonik sıvıdan ilave edilmiş ve geri kazanıma etkisi incelenmiştir. En iyi geri kazanım değeri 100 μL iyonik sıvı ilavesi ile elde edilmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda ekstraksiyon çözücüsü olarak çözelti ortamına 100 μL iyonik sıvıdan ilave edilmiştir.

4.1.4. Geri Kazanıma Dispersif Çözücü Türü ve Hacminin Etkisi

Dispersive sıvı-sıvı mikroekstraksiyon çalışmalarında kullanılacak olan dispersif çözücülerinin hem su fazı ile hem de ekstraksiyon fazı ile karışması gerekmektedir. Bunun için metanol, etanol, aseton ve asetonitril dispersif çözücüsü olarak kullanılmıştır. En iyi geri kazanım değerleri metanol kullanıldığı zaman elde edilmiştir ve bundan sonraki çalışmalarda dispersif çözücüsü olarak seçilmiştir. Optimum metanol hacmini bulmak için farklı hacimlerde metanol model çözeltilere ilave edilmiştir. En iyi sonuç 100 μL metanol ilavesinde elde edilmiştir.



Şekil 4.3. Elementlerin geri kazanım değerlerine metanol hacminin etkisi (N=3).

4.1.5. Geri Kazanıma Santrifüj Dönme Hızı ve Süresinin Etkisi

Su fazı ile ekstraksiyon fazı arasında etkili bir şekilde faz ayrımı olması için santrifüj işlemi önemli bir basamaktır. Santrifüj dönme hızı (rpm) ve süresinin elementlerin geri kazanım değerleri üzerine etkisi incelendi ve optimize edildi. En iyi geri kazanım değerleri 10 dakika 4000 rpm santrifüj hızında elde edilmiştir.

4.1.6. Matris İyonlarının Etkisi

Alevli AAS ile tayinlerde ortamda bulunabilecek alkali, toprak alkali, geçiş metali ve anyon iyonlarının geliştirilen mikroekstraksiyon yöntemiyle zenginleştirilen analitlerin geri kazanım değerlerine etkileri araştırılmış sonuçlar Tablo 3.4’ de verilmiştir. İncelenen tüm matris iyonları için belirtilen konsantrasyonlarda kantitatif geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

Tablo 4.1. Geri kazanıma matris iyonlarının etkisi (N=3).

İyon	Eklendiği Madde	Tolere Edilebilir derişimler (mg/L)
Na^+	NaNO_3	2000
K^+	KCl	2000
Mg^{2+}	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	250
Ca^{2+}	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	250
Fe^{3+}	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	25
Zn^{2+}	$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	25
Pb^{2+}	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	25
Cl^-	KCl	2000
SO_4^{2-}	Na_2SO_4	2500

4.1.7. Yöntemin Analitik Performansı

Geliştirilen yöntem için elde edilen kalibrasyon doğruları sırası ile şekildedir;

$$(A = 0.0324 C (\text{Cd}) + 0.0024)$$

$$(A = 0.0193 C (\text{Cu}) + 0.001)$$

A: Atomik absorpsiyon spektrometresinden elde edilen absorbans sinyali

C: Konsantrasyon

Eşitlikler için elde edilen korelasyon katsayısı (r^2) kadmiyum ve bakır için sırası ile 0.993 ve 0.995 olarak hesaplanmıştır.

Gözlenebilme sınırının (GS) tayini için 10 paralel kör örneğe geliştirilen mikroekstraksiyon yöntemi uygulandı. Kör çözeltilerin standart sapmasının 3 katının (3s) kalibrasyon doğrusunun eğimine (b) bölünmesi ile (3s/b) gözlenebilme sınırı değerleri hesaplandı. Kadmiyum ve bakır için gözlenebilme (GS) ve tayin sınırları (TS) sırası ile (0.05 ve 0.08 $\mu\text{g L}^{-1}$) ve (0.15 0.25 $\mu\text{g L}^{-1}$) olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemde kadmiyum ve bakır için hesaplanan % bağıl standart sapma (BSS) değerleri sırası ile 2.2 %ve 2.9 % şeklindedir. Bu zenginleştirme çalışması ile 75 katlık bir zenginleştirme faktörü elde edilmiştir.

4.1.8. Gerçek Örneklerden Analit İyonlarının Geri Kazanım Çalışmaları

Geliştirdiğimiz metodun doğruluğunu test etmek için saç ve idrar örneklerine analit ilavesi yapıp, geri kazanılabilirliğini test ettik. . Yöntem her bir örnek için 3 paralel uygulandı ve son hacimde bulunan analit derişimleri AAS' de ölçüldü. Sonuçlar Tablo 4.2' de verilmektedir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde ekleme ve geri kazanma çalışmasında 97.4 % - 100.1% arasında geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Bu sonuçlar biyolojik örneklerde bulunan kadmiyum ve bakır miktarının geliştirilen yöntem ile kantitatif olarak analiz edilebileceğini göstermiştir.

Tablo 4.2. Ekleme-Geri kazanma çalışması sonuçları (N=3)

	Saç örneği			İdrar Örneği	
	Eklenen miktar	Bulunan	Geri kazanım %	Bulunan	Geri Kazanım %
Cd	0	1.76 ± 0.07^a	-	0.015 ± 0.002	-
	5	6.65 ± 0.02	98	5.01 ± 0.08	99
	10	11.7 ± 0.36	100	10.1 ± 0.25	100
	20	21.4 ± 0.62	98	20.1 ± 0.42	100.1
Cu	0	20.3 ± 0.52	-	0.25 ± 0.05	-
	5	25.2 ± 0.56	99	5.13 ± 0.12	97.4
	10	30.1 ± 0.78	98	10.1 ± 0.32	98.8
	20	40.2 ± 0.86	100	20.2 ± 0.51	99.7

^aOrtalama değer $\pm$ standart sapma

4.1.9. Sertifikalı Referans Madde Analizi

Geliştirilen yönteminin doğruluğunu test etmek amacıyla, geliştirilen yöntem CRM BCR 144R sewage sludge of domestic origin isimli sertifikalı referans maddesine uygulanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.3’ de verilmiştir. Bulunan sonuçların standart referans madde içerikleri ile karşılaştırdığı zaman uyumlu olduğu anlaşılmıştır.

Tablo 4.3. Standart referans madde analiz sonuçları (N=3)

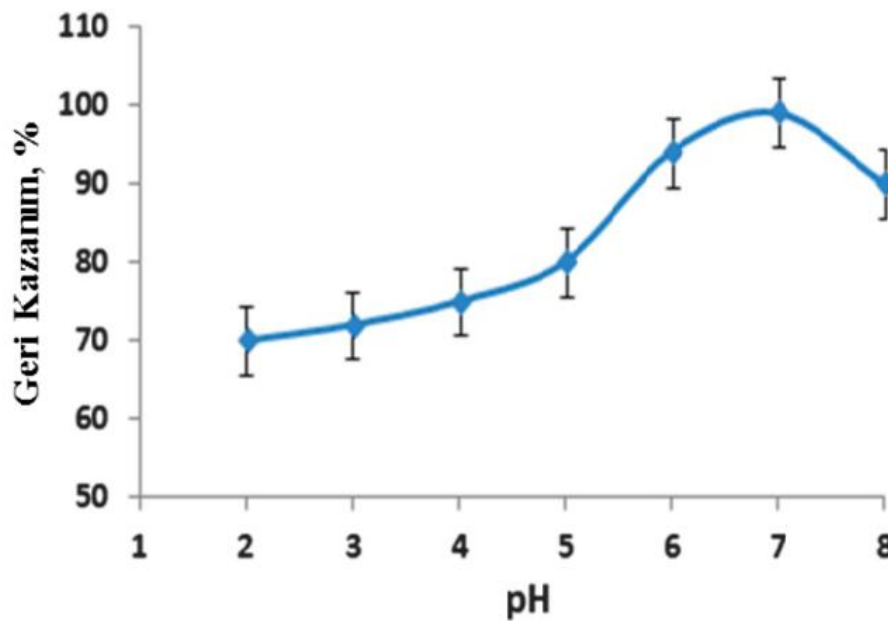
Analit	CRM BCR 144R sewage sludge of domestic origin mg/kg		
	Sertifika Değeri	Bulunan Değer	Geri kazanım, %R
Cd	1.84 ± 0.02^a	1.81 ± 0.04	98.4
Cu	300 ± 7.5	296 ± 8.6	98.7

^aOrtalama değer $\pm$ standart sapma

4.2. Biyolojik Örneklerdeki Kurşun' un Tayini İçin İyonik Sıvı Temelli Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu Tekniği

4.2.1. Geri Kazanıma pH' ın Etkisi

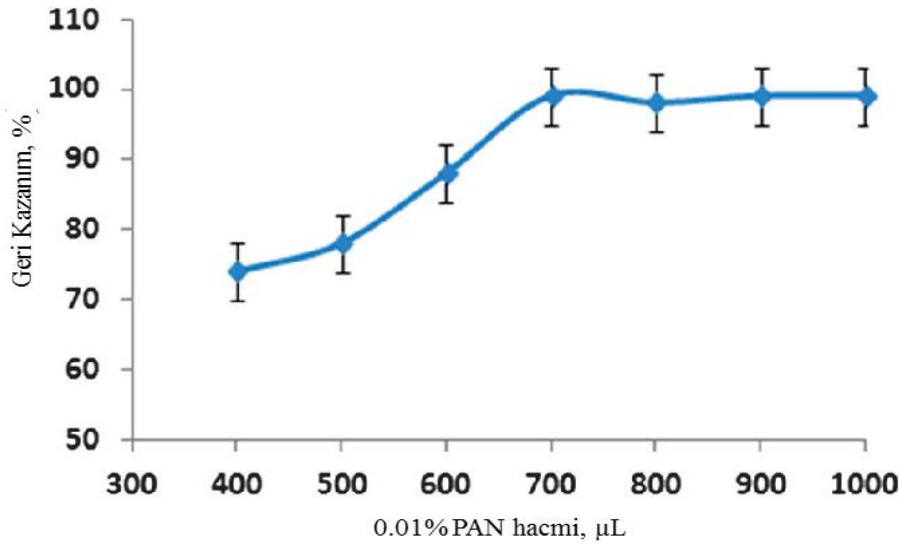
Sıvı temelli mikroekstraksiyon çalışmaları incelendiği zaman su fazındaki metal iyonlarının bir kompleksleştirici ile hidrofobik kompleks oluşturması ve etkili bir ekstraksiyonun olmasının ortam pH' ına bağlı olduğu görülmüştür. Bunun için Pb(II) iyonunun PAN ile oluşturduğu kompleksin ekstraksiyonu üzerine pH etkisi incelenmiştir. pH' ı 2.0-8.0 arasında değişen model çözeltiler hazırlanmış ve geliştirilen mikro ekstraksiyon yöntemi bu çözeltilere uygulanmıştır. En iyi geri kazanım değerinin elde edildiği pH 7.0, çalışma pH' ı olarak seçilmiştir. Geri kazanım verimlerinin pH ile değişimi Şekil 4.4' de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Kurşun' un geri kazanımına pH' ın etkisi (N=3)

4.2.2. Geri Kazanıma Kompleksleştirici Miktarının Etkisi

Bu çalışmada kurşun iyonunun hidrofobik kompleksini oluşturmak için 1-(2-Piridazol)-2-naftol (PAN) kompleksleştirici olarak kullanılmıştır. Optimum kompleksleştirici miktarını bulmak için farklı miktarlarda PAN çözeltisi (% 0,01 w/v) model çözeltilere ilave edilmiştir. En iyi sonuç 700 µL kompleksleştirici ilavesinde elde edilmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda ortama 700 µL PAN ilave edilmiştir.



Şekil 4.5. Kurşun' un geri kazanımına kompleksleştirici hacminin etkisi (N=3)

4.2.3. Geri Kazanıma Ekstraksiyon Çözücüsü Hacminin Etkisi

Bu çalışma kapsamında 1-butil-3-metilimidazolyum hekzaflorofosfat iyonik sıvısı ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılmıştır. Model çözelti ortamına hacmi 50-300 µL arasında değişen iyonik sıvıdan ilave edilmiş ve geri kazanıma etkisi incelenmiştir. En iyi geri kazanım değeri 200 µL iyonik sıvı ilavesi ile elde edilmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda ekstraksiyon çözücüsü olarak çözelti ortamına 200 µL iyonik sıvıdan ilave edilmiştir.

4.2.4. Geri Kazanıma Triton X-100 Hacminin Etkisi

Bu çalışmada metanol, etanol, aseton ve asetonitril gibi organik dispersif çözücülerin yerine bir yüzey aktif madde olan Triton X-100 çözeltisi kullanılmıştır. Bunun için öncelikle %0.01' lik Triton X-100 çözeltisi hazırlanmıştır. Model çözeltilere 100-500 µL arasında değişen yüzey aktif maddeden ilave edilmiş ve geri kazanıma etkisi incelenmiştir. Triton X-100' ün çözelti ortamında 500 µL ilave edilmesi ile en iyi geri kazanım değeri elde edilmiştir.

4.2.5. Vorteks Süresinin Geri Kazanıma Etkisi

Son yıllarda yapılan dispersif sıvı-sıvı çalışmalarının birçoğunda vorteks etkili bir şekilde kullanılmıştır. Vorteks ile karıştırma işleminin süresi de optimize edilmesi gereken önemli bir parametredir. Bizim çalışmamızda model çözeltiler 5-30 saniye arasında değişen sürelerde

vortekse konulmuş ve bu işlemin ekstraksiyon verimine etkisi incelenmiştir. Deneysel sonuçlar 15 saniyelik vorteks işleminin yeterli olduğunu göstermiştir.

4.2.6. Matriks İyonlarının Etkisi

Metodun seçiciliğini test etmek amacıyla, Alevli AAS ile tayin sırasında çözelti ortamındaki Pb(II) iyonunun vermiş olduğu absorbans değerine ve geri kazanma değerine diğer iyonların etkisi incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.5’ de verilmiştir. İncelenen tüm matriks iyonları için belirtilen konsantrasyonlarda kantitatif geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

Tablo 4.5. Geri kazanıma matriks iyonlarının etkisi (N=3)

İyon	Eklendiği Madde	Tolere Edilebilir derişimler (mg/L)
Na ⁺	NO ₃ ⁻	15000
K ⁺	Cl ⁻	10000
Mg ²⁺	NO ₃ ⁻	4000
Ca ²⁺	NO ₃ ⁻	4000
Fe ³⁺	NO ₃ ⁻	40
Zn ²⁺	NO ₃ ⁻	40
Cd ²⁺	NO ₃ ⁻	40
Cu ²⁺	NO ₃ ⁻	40
Cl ⁻	Cl ⁻	10000
SO ₄ ²⁻	Na ⁺	1000
CO ₃ ²⁻	Na ⁺	1000

4.2.7. Yöntemin Analitik Performansı

Geliştirilen yöntem için 0.992 korelasyon katsayısı (R^2) ile elde edilen kalibrasyon doğrusu şu şekildedir;

$$A = 0.0044 (C) - 0.0015$$

A: Atomik absorpsiyon spektrometresinden elde edilen absorbans sinyali

C: Konsantrasyon

Elde edilen kalibrasyon doğrusu 5-200 $\mu\text{g L}^{-1}$ arasında lineerlik göstermektedir

Gözlenebilme sınırının (GS) tayini için 10 paralel kör örneğe geliştirilen mikroekstraksiyon yöntemi uygulandı. Kör çözeltilerin standart sapmasının 3 katının (3s) kalibrasyon doğrusunun eğimine (b) bölünmesi ile (3s/b) gözlenebilme sınırı değerleri hesaplandı. Kurşun için gözlenebilme sınırı ve % bağıl standart sapma (BSS) değerleri sırası ile 0.307 $\mu\text{g L}^{-1}$ ve % 4.09 olarak hesaplanmıştır. Bu dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu çalışması ile 54.2 katlık bir zenginleştirme faktörü elde edilmiştir.

4.2.8. Gerçek Örnek Analizleri

Geliştirilen bu mikroekstraksiyon yöntemi, gerçek örneklerdeki kurşunun tayini için etkili bir şekilde kullanılmıştır. Geliştirilen yönteminin doğruluğunu test etmek amacıyla, NIST-SRM 1515 Apple leaves isimli sertifikalı referans maddesi kullanılmıştır. Sertifikalı referans madde içerisinde bulunan kurşun % 97.7 oranında geri kazanılmıştır.

Geliştirdiğimiz metodun doğruluğunu test etmek için saç ve idrar örneklerine ekleme geri kazanma çalışmaları yapıldı. Zenginleştirme işlemi sonrasında son hacimde bulunan analit derişimleri AAS' de ölçüldü. Sonuçlar Tablo 4.6 ' da verilmektedir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde bütün geri kazanım değerlerinin kantitatif (>%95) olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar biyolojik örneklerde bulunan kadmiyum ve bakır miktarının geliştirilen yöntem ile kantitatif olarak analiz edilebileceğini göstermiştir.

Tablo 4.6. Ekleme-Geri kazanma çalışması sonuçları (N=3)

	Saç örneği			İdrar Örneği	
	Eklenen miktar (µg)	Bulunan (µg)	Geri kazanım %	Bulunan (µg)	Geri Kazanım %
Pb	0	6.1	-	0.57	-
	4	10.3	105.0	4.66	102.3
	8	14.2	101.3	8.61	100.5
	12	18.3	101.6	12.25	97.3
	16	21.6	96.9	15.79	95.1

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de ayırma zenginleştirme çalışmalarının önemi sürmektedir. Proje kapsamındaki çalışmalar ile gerçek örneklerde bulunan kadmiyum, bakır ve kurşun iyonlarının matris ortamından ayrılması ve zenginleştirilmesi için için dispersif sıvı-sıvı mikro ekstraksiyonunu esas alan 2 adet ayırma-zenginleştirme yöntemi geliştirilmiştir. Ayırma zenginleştirme çalışmalarında etkin rol oynayan, çözelti pH' ı, kompleksleştirici seçimi ve kompleksleştirici miktarı, ekstraksiyon ve dispersif çözücülerinin seçimi ve miktarları, örnek hacmi ve matris etkisi gibi analitik parametrelerin optimizasyonu model çözeltiler kullanılarak yapılmıştır.

Optimum şartlar altında geliştirilen yöntemlerin doğrulukları gerçek örneklerle yapılan ekleme ve geri kazanma çalışmaları ve çeşitli sertifikalı referans maddelerin analizleri ile kontrol edilmiştir. Yapılan bu doğruluk testleri sonucunda elde edilen bütün geri kazanım değerleri kantitatifdir. Bu da geliştirilen dispersive sıvı-sıvı mikroekstraksiyon tekniklerinin, gerçek örnek ortamında bulunan analitlerin duyarlı ve doğru tayinlerinde kullanılabileceğini göstermektedir.

Yapılan bu çalışmalar ile uluslararası 2 dergide 2 adet makale yayınlanmıştır. Bu da, literatüre eser element tayin yöntemi konusunda katkıda bulunarak daha sonraki çalışmaların önünü açacaktır. Analitlerin tayinlerinde, duyarlı fakat pahalı cihazların yerine, her laboratuarda bulunabilen alevli atomik absorpsiyon spektrometresi kullanılmıştır. Proje kapsamında üniversitemiz araştırma projeleri biriminin vermiş olduğu maddi destek ile mevcut araştırma olanaklarımız daha da iyileştirilmiştir. Yapılan çalışmalar ile proje başvuru dosyasında belirtilen başarı ölçütleri yerine getirilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Soylak, M., Yilmaz, E., 2011, Ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction of lead as pyrrolidinedithiocarbamate chelate prior to its flame atomic absorption spectrometric determination, *Desalination*, 275: 297-301.
2. Tabrizi, A. B., 2010, Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for iron speciation and determination in different water samples, *Journal of Hazardous Materials*, 183: 688–693.
3. Jiang, H., Qin, Y., Hu, B., 2008, Dispersive liquid phase microextraction (DLPME) combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) for determination of trace Co and Ni in environmental water and rice samples, *Talanta*, 74: 1160–1165.
4. Baliza, P. X., Teixeira, L. S. G., Lemos, V. A., 2009, A procedure for determination of cobalt in water samples after dispersive liquid – liquid microextraction, *Microchemical Journal*, 93: 220-224.
5. Khani, R., Shemirani, F., Majidi, B., 2011, Combination of dispersive liquid liquid microextraction and flame atomic absorption spectrometry for preconcentration and determination of copper in water samples, *Desalination*, 266: 238-243.
6. Gao, Z., Ma, X., 2011, Speciation analysis of mercury in water samples using dispersive liquid liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 702: 50-55.
7. Najafi, N. M., Tavakoli, H., Alizadeh, R., Seidi, S., 2010, Speciation and determination of ultra trace amounts of inorganic tellurium in environmental water samples by dispersiveliquid liquid microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 670: 18-23.
8. Wen, X., Yang, Q., Yan, Z., Deng, Q., 2011, Determination of cadmium and copper in water and food samples by dispersive liquid liquid microextraction, *microchemical journal*, 97 (2): 249-254.

9. Nişli, G., Ertaş, F.N., 2001, Eser Analizin Önemi ve Yöntem Seçimi, Eser Analiz Yaz Okulu Kitapçığı, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, İzmir.
10. Bonvehı, J.S., Coll, F.V., 1997, A Chemical Study of The mineral Fraction of Tarragona Hazelnuts (*Corylus avellana*L.), *Acta Alimentaria*, 26: 243-253.
11. Beliles, R.V., 1975, Metals, in *Toxicology. The Basic Science of Poisons*. L.J. Casarett & J. Ditil (Eds). Macmillan Publ. Co, Inc., New York.
12. Yiğit, V., Teke, İ., Yazar, O., Bozkurt, E., Ceritoğlu, A., Nas, C., Saygı, G., Gftrgin., Y. 1979, Bazı Gıda Maddelerinde Kimyasal Kontaminantlar (ağır metaller) Üzerinde Araştırmalar. TÜBİTAK, MBEAE, Beslenme ve Gıda Tekn. Ünitesi, Yayın No: 37.
13. Tuncer, S. 1985, İzmir ve Çandarlı (Aliağa Limanı) Körfezlerinde yaşayan bazı mollusk, alg ve ortamlarındaki ağır metal kirlenmesi ile ilgili araştırmalar. E.Ü. Hidrobiyoloji ve Su Ürünleri Araştırma-Uygulama Merkezi, (Doktora Tezi).
14. Barak, N.A.E., Mason. C.F., 1990, Mercury, Cadmium and Lead In Eels and Roach: The Effects of Size, Season and Locality On Metal Concentrations In Fiesh and Liver, *Science of The Total Environment*, 92:249-256.
15. Toğçuoğlu, S., Erentürk, N., Saygı, N., Kut. D., Esen, N., Başsarı, A. Seddigh, E., 1990, Trace Metal Levels of Fish From The Marmara and Black Sea. *Toxic. Environ. Chem.*, 29:95-99.
16. Güneş, H.İ., 1984, İzmir Körfezi Deniz Suyunda ve Su ürünlerinde Ağır Metal Kontaminasyonun (Hg, Pb, Cd, As, Fe, Zn, Cu, Ni, Cr) Araştırılması. TOK Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü, İzmir Gıda Kontrol ve Araştırma Enst. Md. Genel Yayın No: 130.
17. Concon, J.M., 1988, Marcel Dekker, Inc., New York. *Food Toxicology. Part B: Contaminants and Additives*.
18. Abu-Hilal, A.H., Badran, M.M., 1990, Effect of Pollution Sources On Metal Concentration In Sediment Cores From T Gulf of Aqaba (Red Sea). *Marine Pollution Bulletin*. 21 (4):190-197.
19. El Nabawi, A., Heinzow, B., Kruse, H., 1987, As, Cd, Ctı, Pb, Hg and Zn in Fish From Alexandria Region, Egypt. *Bull. Environ, Contam. Toxicol.*, 39:889-897.

20. Marcovecchio, E., Moreno, V.J., Perez, A., 1988, Determination of Heavy Metal Concentrations In Biota of Bahia Blanca, Argentina. *The Science of The Environment*, 75:181- 190.
21. Cirugeda Delgado, C., Şantöz Diaz, M.D., Cirugeda Delgado, M.E., 1988, Contents of The Toxic Metals Lead and Cadmium In Chicken Eggs From Different Spanish Regions, *Alimentaria*, 191(21): 23-24.
22. Schmidt, H., Klein, J., Dirschhert. C., Merk, H. W., 1988, Untersuchungen über den Cadmiumgehalt in Nieren von Schlachtkühen aus Oberbavarn. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 39 (2): 47-48.
23. Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., 2004, Metallerin Çevresel Etkileri-I. İTÜ Metalurji Mühendisliği,
24. Dumiu, G., 1975, Kirli Su El Kitabı. Devlet Su İşleri Genel Müdürlüğü, Ankara.
25. Blumenthal, S., Lewand, D., Sochanik, A., Krezoski, S., Petering D.H., 1994, Inhibition of Na-F-Glucose Contraspport In Kidney Corticel Cells By Cadmium and Copper: protection by zinc, *Tox. And App. Pharm.* 129: 177–187.
26. Mizuke, A., 1986, Preconcentration Techniques in Inorganic Trace Analysis, *Fresenius Z. Anal. Chem.* 324: 672–677.
27. Gündüz, T., 2005, Kantitatif Analiz Ders Kitabı, Gazi Kitabevi, 8. Baskı, Ankara.
28. Gökçel, İ., 2001, Eser Analizde Örnek Alma ve Koruma, Eser Analiz Yaz Okulu Kitapçığı, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, İzmir.
29. Ertaş, H., Ertaş N., 2001, Eser Analizde Örnek Hazırlama Teknikleri, Eser Analiz Yaz Okulu Kitapçığı, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, İzmir.
30. <http://www.sampleprep.duq.edu/>
31. Atanassova, D., Stefanova, V., Russeva, E., 1998, Co-precipitative Pre-concentration With Sodium Diethyldithiocarbamate and ICP-AES Determination of Se, Cu, Pb, Zn, Fe, Co, Ni, Mn, Cr and Cd in Water, *Talanta*, 47: 1237–1243.
32. Mincezweski, J., Chwastowska, J., Dybesynski, R., 1982, Separation and Preconcentration Method Inorganic Trace Analysis, Ellis Horwood Ltd. New York, Chichester.
33. Oymak, T., 2003, Silikajel- Dimetilgloksim Katı Faz Ekstraksiyonu ile Çeşitli

Örneklerdeki Palladyumun Atomik Absorpsiyon Spektrometrik Yöntemle Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.

34. Büyükpatır, E., 2000, Altın, Palladyum ve Platinin Amberlit XAD-7 Dolgulu Kolanla Katı Faz Ekstraksiyonu, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.

35. Tokalıoğlu, S., 1993, XAD-1180 Reçinesi ile Bazı Eser Elementlerin Zenginleştirilmesi ve AAS ile Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.

36. Elçi, L., Kartal, S., Ülgen, A., 1998, Ensrümantal Analiz Ders Notları, Kayseri.

37. Lin, Y., Rao, A.M., Sadanadan, B., Kenik, E.A., Sun, Y.P., 2002, Functionalizing Multiple-Walled Carbon Nanotubes With Aminopolymers. The Journal of Physical Chemistry B, 106 (6): 1294-1298.

Room Temperature Ionic Liquid-based Microextraction for Pre-concentration of Cadmium and Copper from Biological Samples and Determination by FAAS

Ghulam A. Kandhro^{a,b,c}, Mustafa Soylak^{a*}, Tasneem Gul Kazi^b, Erkan Yilmaz^a, and Hassan I. Afridi^b

^a Erciyes University, Fen Faculty, Department of Chemistry, 38039, Kayseri, Turkey

^b National Centre of Excellence in Analytical Chemistry, University of Sindh, Jamshoro, 76080, Pakistan

^c Department of Basic Sciences, Mathematics and Humanities, Dawood College of Engineering and Technology, Karachi, 74800, Pakistan

INTRODUCTION

The influence and toxicity of trace metals such as cadmium (Cd) and copper (Cu) on the environment and on human health are today receiving greater consideration in pollution and nutritional assessments (1-2). Cd is a non-essential element and plays no positive role for humans or animals. It is categorized as a predominantly toxic metal even at very low levels, and affects destruction of body organs, i.e., lungs, kidneys, and liver (3). The most significant anthropogenic sources of Cd are emission from industrial plants, such as steel works, zinc smelters, power stations, and incinerators (1,4). The intake of Cd by humans takes place by respiration of polluted air or through ingestion of different foods (5,6). The productions of free radicals, which deteriorate the physiological functions of the human body, are carried out by Cd through different mechanisms (7,8). On the other hand, Cu is an essential trace element, plays vital roles in many biochemical reactions of the human organisms and in the metabolism of lipids, carbohydrates, proteins, and the synthesis of nucleic acids (9-10). Even though Cu is important for humans, high levels of Cu can be harmful and cause vomiting, nausea, diarrhea, irritation of throat and nose, and form toxic-free hydroxyl radicals resulting in cancer by destroying the DNA (11-12).

ABSTRACT

Room temperature ionic liquids (RTILs) are considered "Green Solvents" for their thermally stable and non-volatile properties. They are employed to replace traditional volatile organic solvents in solvent extraction, organic synthesis, and electrochemistry. In the present work, a simple, selective, sensitive and economical microextraction methodology was developed based on the separation and pre-concentration of RTILs for trace cadmium (Cd) and copper (Cu) determination in biological samples. The Cd and Cu pre-concentration was established using the RTIL (1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([C4mim][PF6]) with dithizone complex. For the quantitative recovery of Cd and Cu, the effects of the parameters inducing the extraction efficiency and its subsequent determinations, i.e., pH, amount of complexing reagent, volume of RTILs and dispersant solvent, sample volume, extraction time, and temperature were studied. For Cd and Cu determination under the optimized conditions, the detection limits (LOD) of 0.05 and 0.08 µg/L and quantification limits (LOQ) of 0.15 and 0.25 µg/L, respectively, were obtained. An enrichment factor of 75 was achieved for both analytes and the relative standard deviation was < 3%. BCR 144R sewage sludge of domestic origin certified reference material (CRM) was used for validation of the present method. The proposed RTIL microextraction method was applied for the pre-concentration of Cd and Cu in biological samples with satisfactory results.

The low levels of these analytes present in a complex sample matrix require a procedure that does not affect the accuracy and sensitivity of the analytical method selected. Therefore, a cleanup or enrichment step is most important. The procedures proposed in the literature for the separation and pre-concentration of Cd and Cu include cloud point extraction (CPE), solid phase extraction (SPE), coprecipitation, capillary microextraction, single-drop microextraction (SDME), and solid phase microextraction (SPME) (13-21), etc. Even though liquid-liquid solvent extraction can efficiently reduce the limit of detection and remove interferences, it is tedious, time-consuming, and laborious, and requires high purity organic solvents. However, their removal after usage from the sample solution results in high risk of pollution to the environment (22-23).

Within the last few years, room temperature ionic liquids (RTILs), which are considered green solvents, were used as alternative extractants for traditional liquid-liquid extraction procedures (24-25). Various problems related to the loss of solvent by evaporation as well as regular organic solvents were avoided by using ionic liquids (ILs) as substitute solvents. RTILs have high thermal stability even at elevated temperatures, good solubility for organic and inorganic compounds, and insignificant vapor pressure (26). The main benefit of ILs is that they are environmentally friendly for the extraction of elements (27). RTILs have been

*Corresponding author.
E-mail: soylak@erciyes.edu.tr
Tel: +90 352 4374901 / 33150
Fax: +90 352 4374933

applied in SPE (28), hollow fiber membrane extraction (29), and liquid phase microextraction (30–31), and offer significantly high enrichment factors.

The aim of the present work was to establish a rapid, simple, novel, and highly efficient analytical procedure for Cd and Cu determination in biological samples using the combination of RTIL with flame atomic absorption spectrometry (FAAS). Dithizone is an extensively used complexing agent that can produce a complex with many metal ions. It acted as the ligand with methanol as the dispersant solvent for the Cd and Cu pre-concentration in biological samples. The influence of several experimental parameters on the extraction of Cd and Cu were investigated to examine the extraction behavior of ionic liquids.

EXPERIMENTAL

Instrumentation

A PerkinElmer® Model 3110 flame atomic absorption spectrometer, equipped with a 10-cm air-acetylene burner, was used for the determination of Cd and Cu (PerkinElmer, Inc., Shelton, CT, USA). At 12.5 and 15 mA, the hollow cathode lamps of Cd and Cu were operated with a 0.7 nm spectral bandwidth. The analytical wavelengths were set at 228.8 and 324.8 nm, respectively. A Sartorius Model PT-10 glass-electrode was used to establish the pH levels (Sartorius Co., Goettingen, Germany). An ALC PK Model 120 centrifuge machine and a Vortex 3000 ANA Shaker (Wiggen Hauser, Salenger, Malaysia) were used. For the purification of water, a Model RO 180 (Human Corporation, Korea) reverse osmosis water purification system was used to achieve 1 µS/cm water conductivity. The instrumental settings are listed in Table I.

Standards and CRM

Standard solutions of Cd and Cu were prepared by dilution of the stock solution (1000 mg/L), obtained from Merck, Darmstadt, Germany. The standard solutions were prepared by stepwise dilution of the stock solution. Certified reference material (CRM) BCR 144R sewage sludge of domestic origin was provided by the Community Bureau of Reference (Geel, Belgium).

Chemicals, Reagents, and Glassware

In this study, all reagents used were analytical grade. Concentrated nitric acid (HNO₃, purity 65%) and methanol were obtained from Merck (Germany) and Sigma Aldrich (St. Louis, USA), respectively. Ionic liquid (IL) 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([C₄mim][PF₆]) was obtained from Merck. A 0.1% (w/v) dithizone was obtained from Riedel-deHaen (Sleeze, Germany). The dithizone solution was prepared in methanol. A 0.1 M phosphate buffer solution was prepared from di-sodium hydrogen phosphate (Na₂HPO₄) in reverse osmosis water, and a pH range of 4–10 was prepared with (0.1 M) HNO₃/NaOH. All laboratory glassware and plastic containers used in the present experimental work were kept in 10% (v/v) HNO₃ and, prior to use, were rinsed with reverse osmosis water.

Sample Preparation

A 1-mL aliquot of sample solution was taken and Cd and Cu was instantly determined and pre-concentrated using the RTIL method.

Portions of 1 g human scalp hair and 2 mL of urine samples were placed into a PTFE beaker (10 mL). Then, 10 mL of concentrated HNO₃ was added and the solution kept standing overnight. The solution was evaporated and 10 mL of HNO₃ and H₂O₂ (2:1) was added, then heated to near dryness. The residue was dissolved in 0.2 M HNO₃. Before analysis, the phosphate buffer solution was used to adjust to pH 9. The certified reference material (CRM) BCR 144R sewage sludge of domestic origin and the blank samples were prepared using the same method as for the biological samples in order to assess Cd and Cu concentrations with the reagents.

Recommended RTIL Procedure

For the enrichment of Cd and Cu, 15-mL aliquots of standard solution containing the Cd and Cu analyte in the range of 0.12–100 µg/L, three replicate samples of 10 mL of BCR 144R and triplicate samples of each real biological (scalp hair and urine) sample were taken into 50-mL graduated centrifuge tubes. Then, 3 mL of different buffers were added to adjust the pH in the range of 4–10. The pH of the solution was adjusted to the desired pH by the addition of 1 M HCl and/or NaOH. After adjusting the pH, 300–1200 µL dithizone solution (0.01%), 100 µL of each methanol and ([C₄mim][PF₆]) were added as disperser and extractant solvents, respectively. This step resulted in a cloudy solution (water, methanol, and ([C₄mim][PF₆])) in the tube. The centrifuge tubes were shaken carefully and gradually for a few

TABLE I
Instrument Settings

Parameters			
Elements	Wavelength (nm)	Slit width (nm)	Lamp current (mA)
Cd	228.8	0.7	4
Cu	324.8	0.7	30

seconds and allowed to stand for 15 minutes. Then the cloudy solution was centrifuged for 10 minutes at 4000 rpm. This allowed the formation of two well-defined phases, and dispersive droplets of IL were sedimented at the bottom of the centrifuge tube. After enrichment, the upper aqueous phase was decanted, the IL phase dissolved in 200 μL of concentrated HNO_3 , and then introduced into the FAAS using a home-made micro-sample aspiration system. For the respective analyte determinations, the samples were introduced into the nebulizer of the FAAS by using the home-made microsample aspiration system. In this system, 100 μL of the sample was injected into a mini home-made Teflon® funnel with an Eppendorf® pipette. The Teflon funnel was connected to the nebulizer with capillary tubing (19,32).

Calibration of Cd and Cu was prepared by subjecting the aqueous standards to the same RTIL procedure. A blank submitted to the RTIL was measured similar to the calibration solution of the standards, CRM, and real biological samples. The validation and accuracy of the proposed RTIL method were checked by using the CRM BCR 144R sewage sludge of domestic origin for both analytes.

RESULTS AND DISCUSSION

The RTILs procedure in comparison to conventional dispersive liquid phase microextraction was carried out using a single solvent reagent. RTILs and dispersive liquid phase microextraction procedures substantially increase the surface area of the extraction solvent, and the contact area between extraction solvent and analytes enhances the recovery of the analytes. In addition, ILs are used as an alternative to toxic organic solvents in RTILs as compared to dispersive liquid-phase microextraction (DLLME). Some significant experimental factors that would affect the enrichment efficiency were studied in order to achieve optimum extraction recovery.

Effect of pH

The pH plays a distinctive role on metal-ligand development and affects production of the complex and its consequent extraction. The influence of pH on optimum complex production for the extraction of Cd and Cu was studied on replicate subsamples of standards or real samples by altering the pH of the aqueous solution ranging from 4–10. The results illustrated in Figure 1 show that the Cd and Cu recoveries in the presented system decrease with a pH range of 4–7,

then increases with a pH higher than 7. Optimum extraction efficiency was obtained at pH 9. To prevent hydrolyzation of the metal ion at a higher pH value, the pH of 9 was selected for both analytes. The metal chelator is in neutral form at a lower pH, and distributes or mixes in the organic phase. This leads to a very low level metal chelate complex because there is only a limited amount of deprotonated chelator present for the production of the complex. On the other hand, at a higher pH, a high level of deprotonated chelator leads to a high level of metal chelate complex, resulting in high extraction efficiency.

Effect of Dithizone Concentration

Dithizone is a strong chelating ligand for metal ion extraction because it can produce stable complexes with many metal ions under appropriate conditions. The recovery of Cd and Cu increased with an increase in 0.01% (w/v) dithizone from 400 to 1200 μL , and remained constant with a further increase in the dithizone level. At 1000 μL , optimum recovery of Cd and Cu was obtained and 0.01% dithizone was chosen for further experiments to avoid the competitive chelation of matrix ions in real biological samples (see Figure 2). Optimum extraction efficiency was dependent on the concentration of the complexing agent. When the volume of dithizone was >1000 μL , the analytical signal remained constant.

Effect of Volume of Ionic Liquid

The volume of the extractant is an important factor in conventional liquid phase extraction and significantly affects the extraction efficiency of the analytes. In the present work, $([\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6])$ was chosen as the extraction solvent due to its hydrophobicity. The volume of $([\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6])$ was opti-

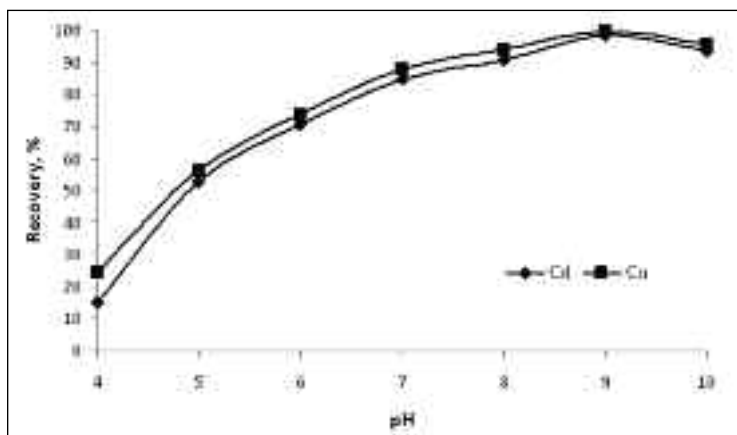


Fig. 1. Effect of pH on the (%) recovery of Cd and Cu: 1000 μL of a dithizone (0.01%), 100 μL of ILs and methanol, centrifugation at 10 minutes at 4000 rpm.

mized in the range of 50–150 μL . The results in Figure 3 show that the Cd and Cu recoveries increased along with an increase in the volume of $([\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6])$ from 50 to 100 μL , while the extraction efficiency of $([\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6])$ remained constant when the volume was >100 μL . Therefore, 100 μL IL was chosen in order to achieve perfect analytical characteristics.

Disperser Solvents and Their Effects

The disperser solvent must be miscible in both extractant and aqueous phase and should have

good dispersive ability. Therefore, methanol, acetone, ethanol, and acetonitrile were used as disperser solvents. The influence of these solvents on the extraction efficiency of RTILs was determined using different volumes of each disperser solvent with 100 μL of $([\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6])$ and 0.01% dithizone. The results indicated that among the four disperser solvents, methanol has the highest extraction efficiency for Cd and Cu. Thus, methanol was selected as the disperser solvent for further studies.

The effect of volume of methanol on the extraction efficiency of Cd and Cu was also studied. To attain the optimum volume of methanol, different volumes (25–150 μL) of methanol were tested. The results showed that the extraction efficiency increased with an increase in the volume of methanol up to 100 μL , then reduced with a further increase in methanol volume (see Figure 4). It can be concluded that a minimum volume of methanol results in $([\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6])$ not being dispersed well and consequently decreases the extraction efficiency. On the other hand, the solubility of the metal-dithizone complex in the aqueous phase increases with a higher volume of methanol but reduces the extraction efficiency. For further studies, 100 μL of methanol was chosen as the optimum volume.

Sample Volume

The effects of sample volume with a constant amount of 100 μL of $([\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6])$ and methanol on the extraction of Cd and Cu were studied from 10.0 to 50.0 mL. By increasing the sample volume to >20 mL, the extraction efficiency of the respective analytes decreased.

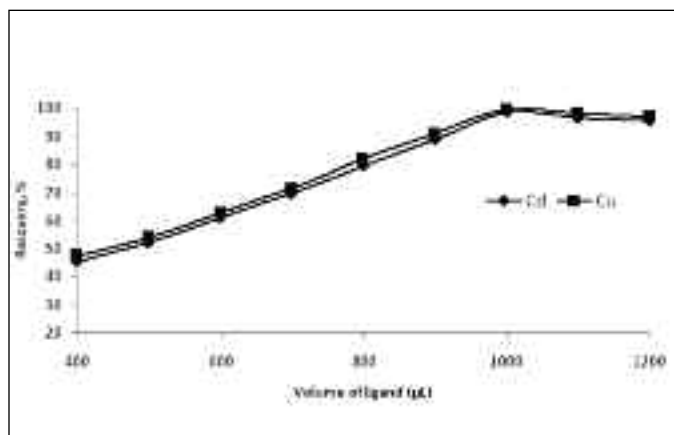


Fig. 2. Effect of dithizone concentration on the (%) recovery of Cd and Cu: pH 9, 100 μL of ILs and methanol, centrifugation at 10 minutes at 4000 rpm.

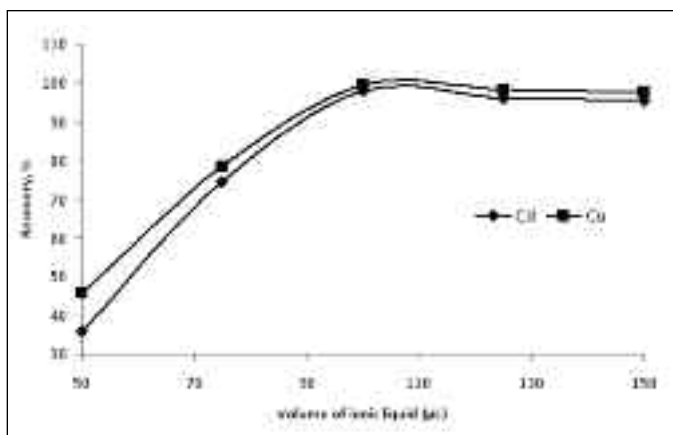


Fig. 3. Effect of ILs volume on the (%) recovery of Cd and Cu: 1000 μL of 0.01% of a dithizone, pH 9, 100 μL of methanol, centrifugation at 10 minutes at 4000 rpm.

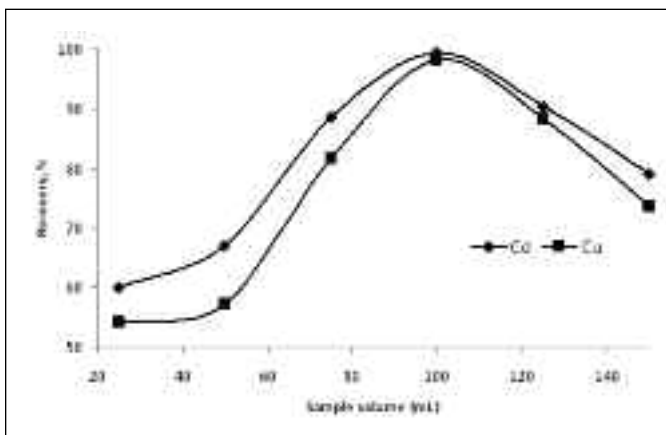


Fig. 4. Effect of methanol volume on the (%) recovery of Cd and Cu: 1000 μL of 0.01% of a dithizone, pH 9, 100 μL of ILs, centrifugation at 10 mints at 4000 rpm.

The optimal extraction recovery was found at 15 mL. Therefore, a sample volume of 15 mL was selected for subsequent work.

Effects of Centrifugation Rate and Time

The centrifugation rate and time that induced the pre-concentration of ILs from the aqueous phase was investigated from 5 to 20 minutes at the 2500–5000 rpm range, respectively. The analytical signals of Cd and Cu increased by increasing the extraction time up to 10 minutes and then keeping the time constant. Mass transfer is a time-dependent process and the maximum integrated absorbance is attained when the system is at equilibrium. However, it takes time for a system to reach complete equilibrium. The extraction time was investigated by monitoring the variation of the integrated absorbance. The integrated absorbance increases with an increase in extraction time up to 10 minutes, and after 10 minutes the increase becomes slower. Therefore, to avoid dropwise dissolution, the extraction time of 10 minutes was selected for quantitative complex formation of the analytes (3). Greater extraction efficiency was obtained at 4000 rpm, and above this centrifugation rate, there was no effect on the extraction efficiency.

TABLE II
Effect of Interfering Ions on the Recovery of Cd and Cu Using RTILs

Interferent Ions	Conc. (µg/mL)	Added Ions	% Recovery	
			Cd	Cu
Fe ³⁺	25	Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	98.4	95.6
Zn ²⁺	25	Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	96.9	97.4
Pb ²⁺	25	Pb(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	95.7	93.1
Na ⁺	2000	NaNO ₃	98.7	97.2
K ⁺	2000	KCl	97.8	96.3
Ca ²⁺	250	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	96.9	93.4
Mg ²⁺	250	Mg(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	89.3	90.4
Cl ⁻	2000	KCl	97.5	94.8
SO ₄ ²⁻	2500	Na ₂ SO ₄	91.4	91.2

Influences of Concomitants

The reliability of the proposed pre-concentration method on the recovery of Cd and Cu was studied in the presence of possible concomitant ions. The results listed in Table II demonstrated that the existence of greater amounts of interfering ions had no noticeable effect on the recovery of the respective analytes within a ± 5% error. The influence of interfering ions present up to 5000 µg/mL each was insignificant on the pre-concentration of the analytes. The results indicate that the proposed pre-concentration procedure can be useful in the analysis of biological samples without any systematic error.

Calibration, Precision, and Detection Limits

Calibration graphs were established for Cd and Cu by enrichment of the sample with 0.01 % dithizone, ionic liquid, and disperser solvent in a medium buffered at pH 9. Calibrations were achieved with a series of Cd and Cu standards after subjecting to RTIL. The calibration curve equations after the pre-concentration method for Cd and Cu, respectively, were :
(A = 0.0324 C (Cd) + 0.0024) and
(A = 0.0193 C (Cu) + 0.001),
where A is the absorbance and C is the concentration of the analyte in

the extraction solvent. The correlation coefficients of the equations were 0.993 and 0.995 for Cd and Cu, respectively, which shows that a good linear regression was obtained between absorbance and concentration.

The limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) for Cd and Cu were estimated as follows: LOD = 3 x s/m and LOQ = 10 x s/m, respectively, where s is the standard deviation of 10 measurements of the blank and m is the slope of the calibration graph. The LOD and LOQ of Cd and Cu, respectively, was found to be (0.05 and 0.08) and (0.15 and 0.25) µg/L. The relative standard deviations (RSDs) of the proposed method were 2.2 and 2.9% for both analytes by measuring the standard solution (n = 5). The enrichment factors (EF) for Cd and Cu were found to be 75, respectively, designed as the slope ratio of the two calibration curves of the standard with micro-extraction and without micro-extraction.

Accuracy of Proposed Method

For verification of accuracy, validation, and precision of the proposed method, CRM BCR 144R sewage sludge of domestic origin, triplicate samples, procedural and reagent blanks were applied for Cd and Cu determination. The percentage recoveries of Cd and Cu in the CRM samples by RTILs were in the 98.4–98.7% range (see Table III). The analytical results were in good

TABLE III
Analytical Results of Cd and Cu Determination in CRM BCR 144R (Sewage Sludge of Domestic Origin) using RTILs (n = 3) in (mg/Kg)

	Certified Value x ± s ^a	Observed Value x ± s ^a	Recovery ^b (%)
Cd	1.84 ± 0.02	1.81 ± 0.04	98.4
Cu	300 ± 7.5	296 ± 8.6	98.7

^a mean ± standard deviation (n=10).

^b (%)Recovery = [Observed value] / [Certified value] × 100.

agreement with the CRMs and the presented values, and no significant differences were detected ($p > 0.05$). The mean levels for Cd and Cu differed by less than 1–2% from the certified values. These results demonstrate the validity of the proposed procedure for Cd and Cu pre-concentration.

Comparative Data of Analytical Characteristics of DLLME

A comparison of the proposed procedure with other described pre-concentration procedures for Cd and Cu pre-concentration is summarized in Table IV. The developed RTIL procedures have relatively lower LOD (0.05 and 0.08 $\mu\text{g/L}$) and higher EF (75) for Cd and Cu, respectively, than some of the other methods listed in Table IV and require only 10 mL of sample solution. This is useful for pre-concentration of both Cd and Cu at trace levels in real biological samples. As shown in Table IV, the proposed RTIL method, compared with literature data, indicates that the RSD, LOD/LOQ, and the EF of the present study are comparatively better than in previously described studies (3, 22–23, 33–40).

Applications

The RTIL method is suitable for the determination of Cd and Cu in biological samples (scalp hair and urine) as listed in Table V. The analytical applicability of the proposed methodology was verified by measuring the Cd and Cu levels in 10 mL each of CRMs and biological samples. The samples were pre-concentrated with 0.01% dithizone and 100 μL of each IL and methanol, respectively. The results show that the proposed RTILs can be successfully applied for the separation and pre-concentration of biological samples.

TABLE IV
Comparison of Analytical Characteristics of the RTILs
With Other Reported Methods for Cd and Cu Pre-concentration

System	Analysis Method	Enrichment Factor	RSD (%)	Linear Range ($\mu\text{g/L}$)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	Reference
Cd						
On-line SPE	GFAAS	24.6	3.2	0.006–0.3	0.0028	(33)
CPE	FAAS	5	0.8–3.0	3–300	1.00	(34)
DLLME	GFAAS	122	2.9	0.002–0.021	0.0005	(23)
SDME	GFAAS	65	7.4	0.01–1	0.0007	(3)
Cu						
On-line SPE	FAAS	560	2.1	0.16–12	0.04	(35)
CPE	FAAS	64.3	1.6	0.27–100	0.27	(36)
DLLME	FAAS	42	5.1	50–2000	3	(37)
IL-SDME	UV-Vis.	33	3.4	—	0.15	(22)
RTILs						Present
Cd/Cu	FAAS	75	2.2/2.9	0.12–100	0.05/0.08	study

TABLE V
Analytical Results of Cd and Cu Determination in Standard and Spiked Biological Samples by RTILs (n=3) in $\mu\text{g/mL}$

	Spiked Sample	Found	Recovery (%)	Found	Recovery (%)
		Hair sample		Urine sample	
Cd	0	1.76 $\pm$ 0.07 ^a	—	0.015 $\pm$ 0.002	—
	5	6.65 $\pm$ 0.02	98	5.01 $\pm$ 0.08	99.9
	10	11.7 $\pm$ 0.36	100	10.1 $\pm$ 0.25	100.0
	20	21.4 $\pm$ 0.62	98	20.1 $\pm$ 0.42	100.1
Cu	0	20.3 $\pm$ 0.52	—	0.25 $\pm$ 0.05	—
	5	25.2 $\pm$ 0.56	99	5.13 $\pm$ 0.12	97.4
	10	30.1 $\pm$ 0.78	98	10.1 $\pm$ 0.32	98.8
	20	40.2 $\pm$ 0.86	100	20.2 $\pm$ 0.51	99.7

^a mean $\pm$ standard deviation ($x \pm s$) ($n = 4$).

CONCLUSION

An effective procedure for the pre-concentration and separation of Cd and Cu in biological samples is described using room temperature ionic liquids (RTILs) consisting of 1000 μL of dithizone, 100 μL each of IL and methanol, followed by FAAS determination. The detection limits (LODs) for Cd and Cu were

0.05 and 0.08 $\mu\text{g/L}$ and the quantification limits (LOQs) were 0.15 and 0.25 $\mu\text{g/L}$, respectively. In comparison to traditional extraction methods, the proposed method is rapid and simple, cost-effective, environmentally save, offers an enhancement factor of 75, enhanced sensitivity, and requires no toxic organic solvents. The greater toler-

ance of coexisting ions and excellent analytical performance shows that the developed method is applicable for the investigation of trace elements in biological samples.

ACKNOWLEDGMENT

Dr. Ghulam A. Kandhro is grateful to TUBITAK for the "2216 Research Fellowship Programme for Foreign Citizens" and financial support. The authors are also grateful for the financial support from the Unit of the Scientific Research Project of Erciyes University (Project no: FBA-12-3822).

Received July 2, 2012.

REFERENCES

1. M. Soylak and L. Elci, J. Trace Microprobe Techn. 18, 397 (2000).
2. R. Khani, F. Shemirani and B. Majidi, Desalination 266, 238 (2011).
3. Z. Fan and W. Zhou, Spectrochim. Acta B 61, 870 (2006).
4. J.L. Manzoori, H. A-Zadeh and M. Amjadi, Talanta 71, 582 (2007).
5. H.H. Aydin, C. Coker and B. Ersoz, Turk. J. Med. Sci. 31, 127 (2001).
6. M. Ikeda, Z.W. Zhang, S. Shimbo, T. Watanabe, H. Nakatsuka, C.S. Moon, N. Matsuda-Inoguchi, K. Higashikawa, Sci. Total Environ. 249, 373 (2000).
7. S.J. Stohs, D. Bagchi, E. Hassoun and M. Bagchi, J. Environ. Pathol. Toxicol. 19, 201 (2000).
8. T. Tsukahara, T. Ezaki, J. Moriguchi, K. Furuki, S. Shimbo, N. Matsuda-Inoguchi, M. Ikeda, Sci. Total Environ. 305, 41, (2003).
9. T.G. Kazi, G.A. Kandhro, H.I. Afridi, N. Kazi, J.A. Baig, M.B. Arain, A.Q. Shah, N. Syed, S.K. Wadhwa, N.F. Kolachi, S. Khan, Biol. Trace Elem. Res. 134, 265 (2009).
10. A.M. Viegas-Crespo, M.L. Pavao, O. Paulo, V. Santos, M.C. Santos and J. Neve, J. Trace Elem. Med. Biol. 14, 1 (2000).
11. T. Theophanides and J. Anastassopoulou, Crit. Rev. Oncol./Hematol. 42, 57 (2002).
12. D. Mendil, Ö.D. Uluözlü, M. Tüzen and M. Soylak, J. Hazard. Mater. 165, 724 (2009).
13. C. Duran, A. Gundogdu, V.N. Bulut, M. Soylak, L. Elci, H.B. Senturk, M. Tufekci, J. Hazard. Mater. 146, 347 (2007).
14. F.A. Aydin and M. Soylak, Talanta 73, 134 (2007).
15. S. Saracoglu, M. Soylak and L. Elci, Trace Elem. Electrolytes 18, 129 (2001).
16. F. Armagan, M. Soylak, L. Elci and M. Dogan, J. Trace Microprobe Tech. 20, 15 (2002).
17. S. Candir, I. Narin and M. Soylak, Talanta 77, 289 (2008).
18. H. Jiang and B. Hu, Microchim. Acta 161, 101 (2008).
19. J.N. Kamau, J.C. Ngila, A. Kindness and T. Bush, Anal. Lett. 44, 1891 (2011).
20. M. Soylak and M. Tuzen, J. Hazard. Mater. 137, 1496 (2006).
21. M. Soylak and M. Dogan, Anal. Lett. 29, 635 (1996).
22. X. Wen, Q. Deng and J. Guo, Spectrochim. Acta A 79, 1941 (2011).
23. A. Moghimi, J. Chin. Chem. Soc. 55, 369 (2008).
24. A.B. Pereiro and A. Rodriguez, Ind. Eng. Chem. Res. 48, 1579 (2009).
25. Z. Gao and X. Ma, Anal. Chim. Acta 702, 50 (2011).
26. P. Berton, E.M. Martinis, L.D. Martinez and R.G. Wuilloud, Anal. Chim. Acta 640, 40 (2009).
27. X. Han and D.W. Armstrong, Acc. Chem. Res. 40, 1079 (2007).
28. J.F. Liu, N. Li, G.B. Jiang, J.M. Liu, J.Ä. Jönsson and M.J. Wen, J. Chromatogr. A 1066, 27 (2005).
29. J.F. Peng, J.F. Liu, X.L. Hu and G.B. Jiang, J. Chromatogr. A 1139, 165 (2007).
30. F. Pena-Pereira, I. Lavilla and C. Bendicho, Trends Anal. Chem. 29, 617 (2010).
31. A. Sarafraz-Yazdi and A. Amiri, Trends Anal. Chem. 29, 1 (2010).
32. M. Soylak and E. Yilmaz, Desalination 275, 297 (2011).
33. A.N. Anthemidis, G.A. Zachariadis and J.A. Stratis, J. Anal. At. Spectrom. 18, 1400 (2003).
34. A. Afkhami, T. Madrakian and H. Siampour, J. Hazard. Mater. 138, 269 (2006).
35. A.N. Anthemidis and K.G. Ioannou, Talanta 79, 86 (2009).
36. C. Jianrong and T.K. Chuan, Anal. Chim. Acta 450, 215 (2001).
37. M.A. Farajzadeh, M. Bahram, B. Ghorbani Mehr and J.Ä. Jönsson, Talanta 75, 832 (2008).
38. I. Narin, M. Soylak, L. Elci, and M. Dogan, Anal. Lett. 34, 1935 (2001).
39. M. Soylak, and M. Dogan, Trace Elem. Electroly. 13, 130 (1996).
40. M. Soylak, A.U. Karatepe, L. Elci, and M. Dogan, Turk. J. Chem., 27, 235 (2003).

Cite this: *Anal. Methods*, 2012, **4**, 4091

www.rsc.org/methods

PAPER

Vortex-assisted liquid–liquid microextraction coupled to flame atomic absorption spectrometry for lead determination: ionic liquid based microextraction using Triton X-100 as dispersant

Faheem Shah,^{*ab} Erkan Yilmaz,^a Tasneem Gul Kazi,^b Hassan Imran Afridi^b and Mustafa Soylak^a

Received 18th July 2012, Accepted 4th October 2012

DOI: 10.1039/c2ay25773d

A simple liquid–liquid microextraction termed as vortex-assisted liquid–liquid microextraction (VLLME) coupled to flame atomic absorption spectrometry for lead (Pb) determination is achieved through phase-partitioning phenomena of ionic surfactants in aqueous solution. In this procedure, the hydrophobic chelate of Pb with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN) was extracted into the fine droplets of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate [C₄mim][PF₆], while using Triton X-100 (TX-100) as dispersing medium. Several variables including [C₄mim][PF₆] volume, pH of sample, TX-100 volume, concentration of PAN, centrifugation time and rate were considered to be studied. At optimum experimental values of significant variables, detection limit (LOD) and the enhancement factor (EF) were observed to be 0.307 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 54.2, respectively. The relative standard deviation (RSD) of 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb was 4.09%. The coexisting ions showed no obvious negative outcome on Pb preconcentration. Validation of the developed method was carried out by Pb determination in “NIST-SRM 1515 Apple leaves” standard reference material and the results were found in good agreement with the certified values. The method was applied satisfactorily for the preconcentration of Pb in acid digested samples.

1. Introduction

Heavy metals including lead (Pb) have the potential to interfere with numerous biochemical events within cells throughout the body and can create a wide variety of health problems.^{1–3} Lead can affect individuals of any age, but its effect is inconsistent in children because their own patterns of behavior put them at higher exposure threat. Lead comprises a universal health risk in industrialized countries, especially affecting young children. Several recent reports have revealed that still Pb exposure is a major communal health problem globally.^{4–6} Anemia in children is an extensive problem in several developing countries and leads to increased morbidity and mortality rates.⁷ Being a toxicant, Pb has the ability to disturb many biochemical actions in living cells and is responsible for a number of health problems.^{8–10} Consequently its determination in trace levels in biological media has become more important, but because of complex templates and generally low concentrations of Pb, detection is not easy in biological and environmental samples, and thus more sensitive

instrumental techniques or a preconcentration step are required. In this regard, a range of preconcentration procedures have been developed for the preconcentration of Pb, like liquid–liquid microextraction (LLME),^{11,12} cloud point extraction,¹³ coprecipitation,¹⁴ ion exchange¹⁵ and solid phase extraction.^{16,17} The LLME has been used for a longer time, where relatively large amounts of high purity solvents and usually much time is required. In addition their disposal may also produce a harsh environment related problem. Currently, analytical chemists are trying to lessen the amounts of solvents and chemicals used in such extractions, leading to miniaturize the classical extraction techniques to reduce the consumption of time and amount of chemicals. Recently, chemists are finding certain ways to miniaturize the classical microextraction techniques.

In nonionic surfactant-based extractions, the understudy solutions separate into two distinct phases, *i.e.*, one is surfactant rich phase and the other is aqueous phase. The system is similar to biphasic aqueous-organic solvent systems, but is unlikely phase rich with surfactant and is a more reasonable substitute to risky, costly organic solvents and quite environmentally friendly, as compared to those used in LLME. Conversely, ILs have not been used often in dispersive LLME. IL's immiscibility in water (resulting in biphasic systems) and elevated solubility in organic solvents makes them appropriate solvents for conventional LLME. In this regard, the study of the IL's extractability towards various species of organic nature is a matter of

^aErciyes University, Fen Fakültesi, Department of Chemistry, 38039 Kayseri, Turkey. E-mail: shah_ceac@yahoo.com; kimyager_erkany@hotmail.com; soylak@erciyes.edu.tr; Tel: +90-352-4374933

^bNational Center of Excellence in Analytical Chemistry, University of Sindh, Jamshoro 76080, Pakistan. E-mail: tgkazi@yahoo.com; hassanimranafridi@yahoo.com; Fax: +92-221-771560; Tel: +92-222-771379

significance for the efficient extraction method development.¹⁸ LLME came into sight in the 1990s as a good tool to minimize solvent volume used in extraction and improved sample consumption. A number of new procedures with different extraction performance have been developed from classical LLME.^{19–21} Very recently, in our previous work we dispersed the IL thermally, not chemically, into aqueous phase; however, high temperatures should be avoided.¹² So this method is not appropriate for all analytes and cannot be used under all conditions.

The objective of the present study was to develop IL-based VLLME for Pb while using nonionic surfactant TX-100 as dispersion medium, thus avoiding thermal dispersion and use of hazardous organic solvents, followed by analysis with FAAS in different samples. Any variable (pH, IL volume, Triton X-100 and chelating agent concentration, centrifugation time and rate) influencing the method is studied in order to find the optimum experimental values.

2. Experimental

2.1. Reagents

All of the solutions were made with water purified through reverse osmosis. 1-(2-Pyridylazo)-2-naphthol (PAN) was obtained from ACROS ORGANICS (New Jersey, USA) and its 0.01% solution was prepared by dissolving 0.01 g in 100 mL of ethanol (Merck). 1-Butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate [C₄MIM][PF₆] and nonionic surfactant Triton X-100 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A nonionic surfactant dilute solution (0.1% v/v) was prepared by dissolving 0.1 mL of Triton X-100 in 100 mL distilled water. Standard solutions of Pb were prepared by the dilution of certified standard solution (1000 mg L⁻¹) Fluka (Bush, Switzerland). 0.2 M HNO₃ was used for series dilution of the stock standard solution to make working standards.

Sodium phosphate buffer of pH 2–3 was prepared with proper amounts of sodium dihydrogen phosphate and phosphoric acid. For pH 4–6, ammonium acetate buffer was made by adding an appropriate amount of acetic acid to ammonium acetate solutions. Phosphate buffer solution was prepared by the addition of appropriate amounts of sodium dihydrogen phosphate to disodium hydrogen phosphate to result in solutions of pH 7, and ammonia–ammonium chloride buffer solution made of ammonia and ammonium chloride, was used for pH 8 adjustments.

2.2. Apparatus

A Perkin-Elmer Model 3110 flame atomic absorption spectrometer (Norwalk, CT, USA) was used for metal analysis. The hollow cathode lamp of Pb was run under the conditions suggested by the manufacturer. Overall analysis was carried out with an air/acetylene flame, using 10 cm long slot-burner head and without any background correction. 100 µL of the samples was injected through self-made injection system of Teflon funnel and Eppendorf Pipette. This injection system was connected with the capillary tubing of nebulizer.¹⁰ Peak heights were recorded as signals. For pH adjustments, pH meter, Nel pH-900 (Ankara-Turkey) Model glass-electrode was used. Vortex mixer

(WIGGEN HAUSER®, Malaysia) was used for thorough mixing of solutions.

2.3. Sample pre-treatment

The scalp hair samples were washed out in order to offer an accurate judgment of endogenous metal contents. Washing of samples was carried out with Triton X-100, followed by rinsing with deionized water and acetone, and then drying in an oven at 80 °C.²² 1 g of dried scalp hair samples were added with 3 mL of mixture of HNO₃ and 30% H₂O₂ (2 : 1 v/v) and left to stand for 10 min.^{23,24} Urine samples were collected and digested immediately as follows: 2 mL of urine were placed in a 100 mL beaker and 3 mL digestion mixture of HNO₃ and 30% H₂O₂ (2 : 1 v/v) were added, then left to stand for 10 min.²¹ The resulting mixtures were digested on a hotplate until semidried masses were obtained, which were dissolved in 10 mL of 0.1 M HNO₃ after cooling and filtered.

2.4. Liquid–liquid microextraction procedure

Standard solution (10 mL in volume) carrying 10 µg L⁻¹ of Pb, was taken in a glass conical tube with screw cap and 1 mL of 0.01% (m/v) PAN solution was added. pH was adjusted to pH 7 with respective buffer system, which was found to be the optimum one. After adding 500 µL of 0.01% TX-100, 200 µL of IL [C₄MIM][PF₆] the tube was capped and was vigorously shaken on vortex mixer for 15 s at 2800 rpm until a cloudy solution formed. Pb–PAN chelate was extracted into fine tiny droplets of [C₄MIM][PF₆]. After that, the resulting cloudy mixture was centrifuged at 3500 rpm for 10 min in order to attain phase separation. The IL phase was sedimented at the bottom of the tube. The viscous IL phase was dissolved in 0.5 mL of acidic methanol prior to its analysis by FAAS.

3. Results and discussion

3.1. Effect of experimental conditions

Any variable (pH, IL, TX-100 volume, ligand concentration, vortex time, centrifugation time and rate) influencing the efficacy of proposed microextraction procedure was assessed in order to find the optimized experimental conditions.

3.1.1. Effect of pH. The effect of pH on microextraction procedure of Pb was investigated because pH has an important role in the formation of metal–chelate complexes and thus in its extraction. pH range of 2–8 was studied for this purpose. As observed in Fig. 1, maximum recovery of Pb occurred at pH 7. Phosphate buffer of pH 7 was selected as the optimum for consequent experiments.

3.1.2. Effect of ligand amount. The effect of ligand amount on recovery was examined and the results are shown in Fig. 2. Incline in recovery was observed as the ligand concentration increases up to a specific amount and this is sufficient for total complexation and maximum recovery. A volume of 700 µL was marked as the optimum for microextraction, while adding more ligand has no significant effect on recovery.

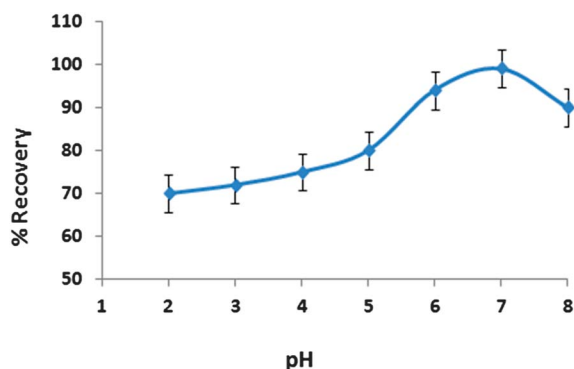


Fig. 1 Effect of pH on Pb analytical response.

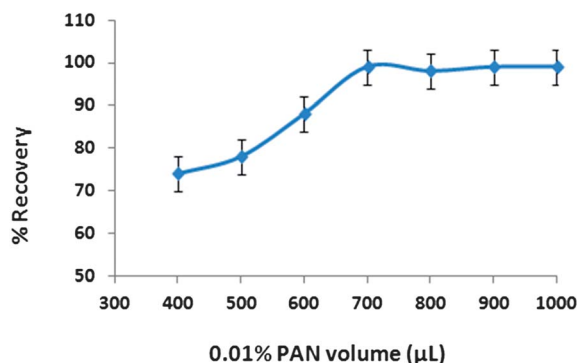


Fig. 2 Effect of volume (μL) of 0.01% (v/v) PAN on Pb analytical response.

Table 1 Effect of some coexistent ions on lead recovery ($N = 3$)

Coexistent ions	Added as	Tolerance limit (mg L^{-1})
Na^+	NO_3^-	15 000
K^+	NO_3^-	10 000
Ca^{2+} , Mg^{2+}	NO_3^-	4000
Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}	NO_3^-	40
Fe^{3+}	Cl^-	40
Cl^-	K^+	10 000
CO_3^{2-} , SO_4^{2-}	K^+	1000
PO_4^{3-}	NaH_2PO_4	500

Table 2 Recovery studies of lead in real samples

Added (μg)	Hair sample		Urine sample	
	Found (μg)	% Recovery	Found (μg)	% Recovery
0	6.1	—	0.57	—
4	10.3	105.0	4.66	102.3
8	14.2	101.3	8.61	100.5
12	18.3	101.6	12.25	97.3
16	21.6	96.9	15.79	95.1

3.1.3. Effect of IL. The amount of IL is one of the considerable variables affecting the efficiency of the proposed procedure. For this reason, the microextraction system was examined with care to define the lowest possible IL volume required for

Table 3 Comparison of VLLME with other reported preconcentration techniques for Pb determination

Technique	Instrumentation	EF	Detection limits ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Ref.
CPE	FAAS	46	4.5	28
SPE	FAAS	30	6.1	29
LPME	FAAS	40	9.5	30
SPE	FAAS	37	3.75	31
IL-DLLME	FAAS	273	0.6	32
DLLME	GF AAS	150	0.02	33
LLME	GF AAS	5	1	34
Co-precipitation	GF AAS	20	0.5	35
On-line-SPE	GF AAS	20.5	0.012	36
CPE	GF AAS	50	0.08	37
VLLME	FAAS	54.2	0.307	Present

achieving the possible highest enrichment factor. The variations in recovery against IL volume were studied in the range of 50–300 μL . We noticed that the recovery of the analyte was affected by the IL volume. The results obtained show that IL quantitatively extracts Pb when its volume was 200 μL . No significant changes were observed in recovery at higher IL volume. For that reason, in order to get better enrichment factor, 200 μL of IL was found to be optimum.

3.1.4. Effect of TX-100. It is reported that the solubility of 'hydrophobic' $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ in TX-100 solution increases with increasing concentration. The reason for these observations is due to the existence of significant interactions (H-bonding, dipole-induced dipole) among $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ and TX-100.²⁵ Physicochemical properties of IL can be modified in a favorable manner by addition of nonionic surfactant to such systems. Dilute nonionic surfactant (0.01% TX-100) was chosen as dispersion medium. The effect of TX-100 volume on Pb recovery was examined within the 0.01% (v/v) TX-100 volume range from 100–500 μL . The recovery is maximum as the Triton X-100 volume was 400 μL . Recovery may decrease at higher concentrations due to the increase of the TX-100 volume. At lower concentration, recovery of analyte was low because there were few molecules of TX-100 to disperse IL. So, Triton X-100 of 500 μL volume was selected for subsequent studies.

3.1.5. Effect of vortex time. The effect of vortex time on recovery was examined in the range of 5–30 s. Linear increase in recovery was observed as vortex time was increased up to 15 s which was enough for maximum recovery. As there was no further increase in recovery and we also aimed to spend less time on extraction, so 15 s of vortex time was used for further work.

3.1.6. Effect of centrifugation time and centrifugation rate. Centrifuge time and rate are also among the key variables which influence the separation of IL and aqueous phase. Recovery of Pb was monitored between 5 and 25 min as centrifugation time. We observed maximum recovery when the centrifugation time was up to 15 min. When the centrifugation time was at its lowest or highest value, the recoveries were both lower. The lower centrifugation time may not assure the complete phase separation, and higher centrifuge time may provoke the IL to dissolve back in aqueous phase. Additionally, the centrifugation rate was

studied between 500 and 4000 revolutions per minute (rpm). At centrifugation rate of 500 rpm, we observed lower recovery, while for an increase of centrifugation rate above 500 rpm, a gradual increase was noticed. We attained maximum recovery at 3500 rpm, while no further increase in recovery was observed with increase in centrifuge rate, so 10 min and 3500 rpm were chosen as the optimum values for further study.

3.2. Effect of interference

Experiments were carried out to find the extent to which our microextraction procedure is influenced by coexisting ions. For these studies, different amounts of coexisting ions were added to standard solutions of $10 \mu\text{g L}^{-1}$ of Pb and the procedure was followed. The observed Pb recoveries in the presence of these coexisting ions were above 95%. Pb was almost quantitatively recovered in the presence of all interfering ions (results are shown in Table 1) which prove the applicability of our procedure for Pb determination in different samples.

3.3. Analytical performance

Extraction recovery (ER), enhancement factor (EF) and consumptive index (CIn) were three main parameters, employed to explore the performance of our microextraction procedure. Extraction recovery is the percentage of total amount of Pb that has been extracted into viscous IL phase. Mathematically:

$$\text{ER} = \frac{m_{\text{ILphase}}}{m_{\text{aq}}} = \frac{C_{\text{ILphase}} \times V_{\text{ILphase}}}{C_{\text{aq}} \times V_{\text{aq}}} \times 100$$

Here in this equation m_{ILphase} is the amount of Pb in final IL rich phase and m_{aq} is the Pb initial amount in the sample solution. C_{ILphase} and C_{aq} are the amounts of Pb in IL phase and aqueous phase, respectively. Similarly, V_{ILphase} and V_{aq} are the concerned volumes of these two phases.²⁶

At optimum conditions, we observed maximum extraction recovery. Correlation coefficient ($R^2 = 0.992$) was obtained for the calibration graph which was linear in the range of $5\text{--}200 \mu\text{g L}^{-1}$. The regression equation was $[y = 0.0044 (\text{Pb}) - 0.0015]$, where y denotes the absorbance signal and concentration of Pb is expressed as $\mu\text{g L}^{-1}$. Relative standard deviation (RSD) as a result of 10 replicates analysis containing $10 \mu\text{g L}^{-1}$ Pb was 4.09% and detection limit (LOD), calculated as the ratio of three times standard deviation of ten blank readings to the slope of the calibration curve was $0.307 \mu\text{g L}^{-1}$. Another term “enrichment factor (EF)” is actually the ratio of calibration curve slopes before and after the application of microextraction procedure and was found to be 54.2.

Another term “consumptive index (CIn)” defined as:

$$\text{CIn} = V_s / \text{EF}$$

V_s denotes the volume of sample (mL).^{11,12} CIn observed for the microextraction procedure was found to be 0.184. EF with a high value was obtained with a reduced volume of sample, thus resulting in CIn with low value. Thus, CIn reveals the effectiveness of sample consumption, and is a good tool for preconcentration method selection even with limited sample volume.²⁷

3.4. Analysis of real samples

We effectively used our VLLME methodology for Pb microextraction in different real samples. Experiments were also conducted by spiking the samples with different amounts of Pb for the validation of our procedure accuracy. Results in Table 2 confirm the validity of our microextraction procedure. Moreover, we also checked the applicability of our methodology by the analysis of “NIST-SRM 1515 Apple leaves” standard reference material and found concordant results with the certified value of $0.470 \mu\text{g g}^{-1}$, the observed recovery was 97.7%. Results obtained with our proposed method were compared with the other reported preconcentration methods for Pb determination (Table 3). Our proposed VLLME yields a relatively low limit of detection when compared to those methods using FAAS. If VLLME is combined with sensitive techniques like ICP-MS or atomic fluorescence spectrometry, its limit of detection can be significantly improved. Additionally, the VLLME avoids the use of volatile organic solvent replaced with IL as the green extraction solvent and TX-100 as dispersant. Thus it was concluded that our microextraction procedure can be successfully applied to real samples without any systematic errors.

4. Conclusion

Our liquid–liquid microextraction procedure for Pb preconcentration offers certain advantages, like its ease, rapidness, sensitivity and selectivity for Pb microextraction. The proposed method employing a vortex mixer for the formation of vortex stream and TX-100 as dispersion medium accelerated Pb extraction into IL extractant. Additionally, use of toxic organic extractants and dispersant solvents (*i.e.*, chloroform, carbon tetrachloride, methanol and acetone *etc.*), has been replaced with green alternatives such as IL and TX-100. Coexistent ions in different samples did not interfere in Pb determination and were found to be tolerable.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK) for “2216 Research Fellowship Programme for Foreign Citizens” and financial support. The authors are also grateful for the financial support of the Unit of the Scientific Research Project of Erciyes University (Project no: FBA-12-3822).

References

- 1 R. Saraymen, M. Soylak and I. Narin, *Fresenius Environ. Bull.*, 1998, **7**, 403–405.
- 2 D. Jarosinsk, S. Peddada and J. Rogan, *Environ. Res.*, 2004, **95**, 133–142.
- 3 M. Soylak, L. Elci and M. Dogan, *Anal. Lett.*, 1997, **30**, 623–631.
- 4 S. Zhi, W. Sheng and S. P. Levine, *AIHAJ*, 2000, **61**, 842–849.
- 5 L. L. Hazard, *J. Natl. Med. Assoc.*, 2002, **94**, 749.
- 6 T. I. Lidsky and J. S. Schneider, *Brain*, 2003, **126**, 5–19.
- 7 F. Shah, T. G. Kazi, H. I. Afridi, J. A. Baig, S. Khan, N. F. Kolachi, S. K. Wadhwa and A. Q. Shah, *Sci. Total Environ.*, 2010, **408**, 5325–5330.
- 8 C. C. Cassol, A. P. Umpierre, G. Ebeling, B. Ferrera, S. S. X. Chiaro and J. Dupont, *Int. J. Mol. Sci.*, 2007, **8**, 593–605.
- 9 S. Carda-Broch, A. Berthod and D. W. Armstrong, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **375**, 191–199.

- 10 A. Saria, M. Tuzen, Ö. D. Uluözlü and M. Soylak, *Biochem. Eng. J.*, 2007, **37**, 151–158.
- 11 M. Soylak and E. Yilmaz, *Desalination*, 2011, **275**, 297–301.
- 12 F. Shah, T. G. Kazi, Naeemullah, H. I. Afridi and M. Soylak, *Microchem. J.*, 2012, **101**, 5–10.
- 13 F. Shah, T. G. Kazi, H. I. Afridi, Naeemullah, M. B. Arain and J. A. Baig, *J. Hazard. Mater.*, 2011, **192**, 1132–1139.
- 14 M. Soylak, B. Kaya and M. Tuzen, *J. Hazard. Mater.*, 2007, **147**, 832–837.
- 15 I. Narin, M. Soylak, K. Kayakirilmaz, L. Elci and M. Dogan, *Anal. Lett.*, 2003, **36**, 641–658.
- 16 M. Soylak, A. U. Karatepe, L. Elci and M. Dogan, *Turk. J. Chem.*, 2003, **27**, 235–242.
- 17 C. Duran, A. Gundogdu, V. N. Bulut, M. Soylak, L. Elci, H. B. Senturk and M. Tufekci, *J. Hazard. Mater.*, 2007, **146**, 347–355.
- 18 C. F. Poole and S. K. Poole, *J. Chromatogr., A*, 2010, **1217**, 2268–2286.
- 19 M. A. Jeannot and F. F. Cantwell, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 2236–2240.
- 20 H. H. Liu and P. K. Dasgupta, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 1817–1821.
- 21 M. Tuzen and M. Soylak, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **504**, 325–334.
- 22 R. R. Martin, I. M. Kempson, S. J. Naftel and W. M. Skinner, *Chemosphere*, 2005, **58**, 1385–1390.
- 23 F. Shah, T. G. Kazi, H. I. Afridi, S. Khan, N. F. Kolachi, M. B. Arain and J. A. Baig, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2011, **74**, 727–732.
- 24 H. I. Afridi, T. G. Kazi, N. Kazi, M. K. Jamali, M. B. Arain, N. Jalbani, J. A. Baig and R. A. Sarfraz, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2008, **80**, 280–288.
- 25 M. Soylak and M. Tuzen, *J. Hazard. Mater.*, 2008, **152**, 656–661.
- 26 M. Cruz-Vera, R. Lucena, S. Cárdenas and M. Valcárcel, *J. Chromatogr., A*, 2009, **1216**, 6459–6465.
- 27 Z. Fang, *Flow Injection Separation and Preconcentration*, VCH, Weinheim, Germany, 1st edn, 1993.
- 28 C. R. T. Tarley, S. L. C. Ferreira and M. A. Z. Arruda, *Microchem. J.*, 2004, **77**, 163.
- 29 E. Matoso, L. T. Kubota and S. Cadore, *Talanta*, 2003, **60**, 1105.
- 30 H. Bai, Q. Zhou, G. Xie and J. Xiao, *Talanta*, 2010, **80**, 1638–1642.
- 31 E. M. Gama, A. da, S. Lima and V. A. Lemos, *J. Hazard. Mater.*, 2006, **136**, 757.
- 32 S. R. Yousefi and F. Shemirani, *Anal. Chim. Acta*, 2010, **669**, 25–31.
- 33 M. T. Naseri, M. R. M. Hosseini, Y. Assadi and A. Kian, *Talanta*, 2008, **75**, 56.
- 34 T. kumamaru, Y. Okamaoto, S. Hara, H. Matsuo and M. Kiboku, *Anal. Chim. Acta*, 1989, **218**, 173.
- 35 T. Minami, Y. Sohrin and J. Ueda, *Anal. Sci.*, 2005, **21**, 1519.
- 36 E. V. Alonso, M. T. S. Cordero, A. G. D. Torres and J. M. C. Pavon, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **385**, 1178.
- 37 J. Chena, S. Xiao, X. Wu, K. Fang and W. Liu, *Talanta*, 2005, **67**, 992.