T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

MİKROPLASTİKLERİN SUCUL ORTAMDA TESPİTİNDE GPC KOLON PERFORMANSININ İNCELENMESİ

Proje No: **FHIZ-2021-546**

Hızlı Destek Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr., Belgin İzgi
Fen-Edebiyat Fakültesi/Kimya

Araştırmacı
Öğrenci, Büşra Kuruca

Haziran 2022

BURSA

TEŞEKKÜR

Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine, proje destekleri için teşekkür ederiz.
Projenin deneysel ve teorik çalışmalarının yürütülmesinde destek veren Yüksek Lisans Öğrencim Büşra KURUCA'ya özverili çalışmaları için teşekkür ederim.

Prof. Dr. Belgin İZGİ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ii
İÇİNDEKİLER iii
ÖZET v
ABSTRACT vi
1. AMAÇ ve KAPSAM 1
2. GENEL BİLGİLER 2
2.1. Polimerler 2
2.2. Plastikler ve Mikroplastikler 2
2.2.1. Birincil (primer) mikroplastikler 3
2.2.2. İkincil (sekonder) mikroplastikler 3
2.2.3. Mikroplastiklerin sağlık üzerine etkileri 3
2.2.4. Dünyada mikroplastik kirliliği 4
2.2.5. Mikroplastiklerin analiz yöntemleri 5
2.3. Analiz Metodu ve Metot ile İlgili Kuramsal Bilgiler 6
2.3.1. Boyut eleme kromatografisi (SEC) 6
2.3.2. Molar kütle ortalamaları (M_n, M_w, M_v, M_z) 8
2.3.3. Cihaz bileşenleri 9
2.4. Diğer Analiz Yöntemleri 12
2.4.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT – IR) 12
2.4.2. Raman spektroskopisi 12
2.5. Kaynak Araştırma 13
3. GEREÇ VE YÖNTEM 15
3.1. Gereç 15
3.1.1. Çalışmada kullanılan cihazlar 15
3.1.2. Çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları 16
3.1.3. Stok ve ara stok polimer çözeltileri 16
3.2. Yöntem 16
3.2.1. Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması 16
3.2.2. Mevcut kolonların performansının belirlenmesi 17
4. BULGULAR 18
4.1. Ultrahydrogel – 250 Å 18
4.2. Ultrahydrogel – 500 Å 20
4.3. Ultrahydrogel – 1000 Å 21
4.4. Ultrahydrogel – 2000 Å 23

4.5. Ultrahydrogel – 250 Å, Ultrahydrogel – 500 Å ve Ultrahydrogel – 1000 Å..... 25
4.6. Ultrahydrogel – Seq için validasyon parametreleri 27
5. SONUÇ ve TARTIŞMA 28
6. KAYNAKLAR 29

ÖZET

Son yıllarda yapılan çalışmalar, küresel plastik üretiminin her yıl artacağını göstermektedir. Plastik üretiminin artması ile deniz ve tatlı su habitatlarında plastik birikimlerinin artması kaçınılmazdır. Biriken bu plastikler, rüzgâr ve güneş ışınları gibi çeşitli doğa koşulları ile çağımızın en büyük sorunlarından biri haline gelen mikroplastiklerin oluşmasına sebep olmaktadır. Büyük plastiklerin çeşitli koşullar altında parçalanması ile oluşan mikroplastik grubunun (ikincil mikroplastikler) yanı sıra, özel amaçlar için doğrudan üretilen mikroplastikler de mevcuttur (birincil mikroplastikler). Ek olarak, 2019 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yayınlanmış olan ‘‘İçme Sularında Mikroplastikler’’ isimli kitapçıkta da belirtildiği gibi, mikroplastiklerin tespitine yönelik bir standart metot henüz bulunmamaktadır. Mikroplastiklerin tespitine yönelik çeşitli analiz yöntemleri olmasına rağmen bazı eksiklikler gözlemlenmektedir. Literatürde kapsamlı bir tarama yapıldığında, mikroplastiklerin matriks ortamından izolasyonunda yaygın olarak organik çözücülerin kullanıldığı görülmektedir. Bu çalışmada, özellikle yeşil kimyaya uygun olarak, mikroplastiklerin organik çözücü kullanmadan sucul ortamda analiz edilmesi amaçlanmıştır. Bu sebeple Boyut Eleme Kromatografisi kullanılmış olup, sulu hareketli fazlara uygun olan farklı gözenek büyüklüğüne sahip dört Ultrahydrogel kolonunun performansı test edilmiştir. Her bir kolon için artan molekül kütlelerinin logaritmasına karşı alıkonma zamanına göre çizilen kalibrasyon grafikleri ile en küçük kareler yöntemi kullanılarak regresyon katsayıları hesaplanmış ve Ultrahyrogel 250 Å; 500 Å; 1000 Å; 2000 Å kolonları için sırasıyla 0,9977; 0,9890; 0,9789; 0,1306 olarak belirlenmiştir. Bu durumda Ultrahyrdogel 2000 Å kolonunun çalışmadığına karar verilmiştir. Ardından her bir kolon için, artan molekül kütlesine karşı alıkonma zamanına göre çizilen kalibrasyon grafikleri ile teorik plaka sayıları ve plaka yükseklikleri hesaplanmıştır. Teorik plaka sayıları ve plaka yükseklikleri Ultrahyrogel 250 Å; 500 Å; 1000 Å kolonları için sırasıyla 256 – 0,85 ± 0,40; 713 – 0,44 ± 0,11; 342 – 0,96 ± 0,27 olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmanın sonucunda, mevcut olan kolonlardan üç tanesinin çalışır olduğu tespit edilmiştir.

ABSTRACT

Research in recent years shows that global plastic production will increase every year. With the increase in plastic production, it is inevitable that plastic accumulations will increase in marine and freshwater habitats. These accumulating plastics cause the formation of microplastics, which has become one of the biggest problems of our age with various natural conditions such as wind and sun rays. In addition to the group of microplastics (secondary microplastics) formed by the breakdown of large plastics under various conditions, there are also microplastics produced directly for special purposes (primary microplastics). In addition, as stated in the booklet "Microplastics in Drinking Water" published by the World Health Organization (WHO) in 2019, there is no standard method for the detection of microplastics. Although there are various analysis methods for the detection of microplastics, some deficiencies are observed. When a comprehensive search is made in the literature, it is seen that organic solvents are widely used in the isolation of microplastics from the matrix environment. This study, it is aimed to analyze microplastics in the aquatic environment without using organic solvents, especially in accordance with green chemistry. For this reason, Size Exclusion Chromatography was used and the performance of four Ultrahydrogel columns with different pore sizes suitable for aqueous mobile phases was tested. The regression coefficients were calculated using the least-squares method with the calibration graphs drawn according to the logarithm of the increasing molecular masses versus retention time for each column. regression coefficients for the Ultrahyrogel 250 Å, 500 Å, 1000 Å, and 2000 Å columns were determined as 0,9977; 0,9890; 0,9789, and 0,1306, respectively. As the result, it was observed that the Ultra-hydrogel 2000 Å column was inoperative. Then, for each column, the theoretical plate numbers and plate heights were calculated with the calibration graphs drawn according to the increasing molecular mass versus the retention time. Theoretical plate numbers and plate heights for the Ultrahydrogel 250 Å, 500 Å, and 1000 Å columns were found 256 – 0,85 ± 0,40, 713 – 0,44 ± 0,11 and 342 – 0,96 ± 0,27 respectively. As a result of the study, it was determined that three of the existing columns were operational.

1. AMAÇ ve KAPSAM

Son yapılan çalışmalara bakıldığında, küresel plastik üretiminin yıllık 350 milyon tonu aştığı ve her yıl yüzde 4 oranında artacağı bilinmektedir. Bu durumda, özellikle tatlı su ve deniz habitatları dâhil olmak üzere, çeşitli ortamlarda plastik çöp birikimine neden olması beklenmektedir. Biriken bu plastik çöpleri nehirler, tarımsal sulama, atık su arıtma tesislerinin deşarj suları, yoğun yağmurlar, seller ve rüzgâr gibi yollarla denizlere kadar taşınmakta ve zaman içerisinde çeşitli faktörler yardımıyla parçalanarak 5 mm'den daha küçük boyutlu olan mikroplastiklere (MP) dönüşmektedir (ikincil MP). Ayrıca, mikroplastikler direkt olarak özel bir amaçta kullanılmak üzere de üretilebilmektedir (birincil MP). Her iki tür mikroplastikler de sucul ve karasal ortamları önemli ölçüde kirletmektedir. Günlük kullanımdaki plastiklerin yapımında kullanılan ham plastik peletler de birincil MP'lerdir ve onlar da plastik üretim tesislerinden doğaya karışmaktadır. Mikroplastiklere yönelik yapılan çalışmalar incelendiğinde farklı tekniklerin kullanıldığı gözlenmiş olsada henüz standart metot bulunmadığı bilinmektedir.

Bu çalışmamızın amacı, laboratuvarımızda bulunan mevcut cihaz altyapısının (2020 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Rektörlüğü tarafından TÜBİTAK 215S620 No'lu proje kapsamında bakım – onarımı yapılan Boyut Eleme Kromatografisi) analitik performans parametreleri değerlendirilerek, mikroplastiklerin tespitinde uygunluğunun araştırılmasıdır. Literatürde daha önce yapılmış olan çalışmaların aksine, bu çalışmada organik çözücü kullanılmadan, yeşil kimyaya uygun bir deneysel prosedür oluşturulması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda, sulu fazda çalışmaya uygun olan farklı gözenek büyüklüklerinde dört Ultrahydrogel kolonunun performans değerlendirilmesi yapılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Polimerler

Monomer adı verilen küçük ve basit yapıların, kovalent bağlarla birbirlerine bağlanarak oluşturdukları makromoleküllere polimer denmektedir. Polimerler, günlük hayatta yaygın olarak kullanılan plastik, kauçuk, boya gibi ürünlerin temel hammaddesini oluşturmaktadır. Polimer molekülleri doğrusal, dallanmış veya çapraz bağlı yapılarda olabilir. Çapraz bağ oranının fazla olması ağ yapılı polimerlere yol açar. Bu zincir yapıları polimer özelliklerini etkiler. Doğrusal ya da dallanmış zincirlere sahip bir polimer çeşitli çözücülerde çözünebilirler. Çapraz bağlı veya ağ yapılı bir polimerin çözünmesi olası değildir (Saçak, 1998).

Bu gibi zincir biçimlerinden kaynaklanan özelliklere göre polimerler kendi içlerinde ayrıca termoplastikler, elastomerler ve termosettingler olmak üzere üç ana grup altında ayrıca toplanabilir (Saçak, 1998).

- Termoplastikler, plastik kelimesini tam olarak karşılayan gruptur ve günlük hayatta kullanılan polimerler içerisinde en fazla pay termoplastiklerindir. Doğrusal ya da dallanmış zincirler içerirler. Kolayca uygun çözücülerde çözünebilirler. Kristalin ya da amorf yapılarda olabilirler. Kullanılan plastikler genelde kristalin ve amorf bölgeleri birlikte yapılarında taşırlar, yani yarı-kristalindirler.
- Elastomerler, esnek ve elastik malzemelerdir. Çekme kuvveti ile yüksek oranda uzama gösterirler ve bu kuvvet ortadan kalktığında hızla ilk boyutlarına dönerler. Bu yetenekleri polimer zincirleri arasında az oranda bulunan çapraz bağlardan kaynaklanır.
- Termosettingler ise yoğun çapraz bağ içeren (ağ-yapı) üç boyutlu sert polimerlerdir. Isı ile eritilemezler ve yeniden şekillendirilemezler. Termosetting polimerler şekillendirilmeden önce viskoz sıvı halindedir.

2.2. Plastikler ve Mikroplastikler

IUPAC'e göre plastik; Performansı iyileştirmek ve / veya maliyetleri düşürmek için başka maddeler içerebilen polimerik malzeme olarak tanımlanmaktadır (da Costa, Duarte, & Rocha-Santos, 2017).

Mikroplastik terimi ilk kez 2004 yılında Thompson ve arkadaşları tarafından deniz suyu üzerinde yapılan çalışmalarda 5 mm'den küçük mikroskobik plastik parçalarını tanımlamak için kullanılmıştır (Frias & Nash, 2019; Thompson et al., 2004).

Mikroplastikler kaynaklarına bağlı olarak birincil ve ikincil mikroplastikler olmak üzere sınıflandırılmaktadır.

2.2.1. Birincil (primer) mikroplastikler

Birincil mikroplastikler, endüstride çeşitli alanlarda işlenen ve günlük hayatımızda sıkça kullandığımız ürünlerde bulunan mikroskobik boyuttaki plastiklerdir. Diş macunu, yüz temizleme jeli, duş jeli ve nemlendirici kremler gibi kişisel bakım ürünleri, temizlik malzemeleri, saç boyası, allık, rimel, oje gibi makyaj malzemeleri, böcek kovucu spreyler ve sentetik giysiler bünyelerinde mikroplastik barındırmaktadır (Doğruyol, 2019). Naylon gibi sentetik tekstillerde kullanılan plastik elyaflarda birincil mikroplastiklere örnektir (da Costa et al., 2017).

Aynı zamanda plastik ürün üretiminde hammadde olarak değerlendirilen, boyutları 5 mm'den küçük, silindirik veya küresel şekle sahip 'pelet' olarak tanımlanan mikroplastikler de yaygın olarak kullanıldığından üretim ve taşınma aşamaları esnasında kazara denize dökülerek veya kontrolsüzce sulara verilerek birincil kaynaklar arasına girmektedir. Peletler dayanıklı oldukları ve üzerinde kalıcı organik kirleticileri adsorblayabildikleri için bu kirleticilerin besin zincirine girmesinde taşıyıcı görev almaktadır (Doğruyol, 2019).

Birincil mikroplastikler çoğunlukla kanalizasyon yoluyla atık su arıtma tesislerine, oradan da nehir ortamına dâhil olurlar.

2.2.2. İkincil (sekonder) mikroplastikler

Denizler ve karalar üzerinde bulunan büyük plastiklerin parçalanması ve ayrışması ile oluşan küçük parçalar ikincil mikroplastikleri oluşturmaktadır. Bu parçalanma ve ayrışma süreci sıcaklık, güneş ışığı gibi çevresel faktörlere göre değişim gösterdiği gibi plastiğin boyutu, kırılganlığı ve yoğunluğu gibi yapısal özelliklerinden de etkilenmektedir (Doğruyol, 2019).

İkincil mikroplastikler, hem atık su arıtma tesislerinden hem de direkt olarak doğaya bırakılmalarından kaynaklı olarak bir kirlilik oluştururlar.

Hem birincil hem de ikincil mikroplastikler deniz ekosisteminde yüksek miktarda bulunmaktadır ve her iki tür mikroplastikler de sucul ve karasal ortamları önemli ölçüde kirletmektedir (Anonim, n.d.-b).

2.2.3. Mikroplastiklerin sağlık üzerine etkileri

Mikroplastik toksisitenin kesin mekanizmaları hala tam olarak anlaşılamamakla birlikte; potansiyel toksik etkilerinin 3 farklı kaynaktan olduğu bildirilmektedir.
Bunlar;

- Canlılar tarafından yutulduğunda fazla enerji harcanması veya tıkanma.

- Plastiklerin bünyelerinde taşıdığı plastikleştiriciler gibi katkı maddelerinin sızması
- Mikroplastikler tarafından adsorbe edilen kalıcı organik kirleticilere maruz kalma olarak sıralanabilir (da Costa et al., 2017).

Mikroplastiklerin Sağlık üzerindeki etkilerini fiziksel ve kimyasal etkiler olmak üzere iki grupta incelemek mümkündür.

- **Fiziksel Etkiler**

Mikroplastikler 1 mikrometre ile 5 mm arasında değişen küçük boyutları nedeniyle, planktonlar, balıklar ve deniz memelileri gibi sucul canlılar tarafından yutulabilmektedir (da Costa et al., 2017). Deniz canlılarının yanı sıra kuşlar da su yüzeyindeki mikroplastikleri yiyecekle karıştıracak ve yutacaklardır. Mikroplastiklerin yutulması, canlıların daha az yiyecek tüketmesine ve dolayısıyla yaşam işlevlerini yerine getirmek için daha az enerjiye sahip olmasına neden olmakta, aynı zamanda nörolojik ve üreme toksisitesine neden olabilmektedir (Rogers, 2020).

- **Kimyasal Etkiler**

Mikroplastikler biyolojik olarak parçalanamaz yani özünde biyokimyasal olarak inert maddelerdir ve hemen hemen hepsi yapılarında serbest olan küçük moleküler boyutlu katkı maddeleri içermektedirler. Plastik üretimi sırasında polimerizasyon reaksiyonlarına girmemiş monomerler, çözücüler ve katkı maddeleri sentetik matristen uzaklaşabilmekte ve plastik malzemelerden sızabilmektedirler. Bu sık kullanılan katkı maddelerinin büyük çoğunluğu lipofiliktir, bu da onları hücre zarlarına nüfuz etmek için uygun hale getirir ve daha sonra biyokimyasal reaksiyonlara katılırlar (da Costa et al., 2017).

Polivinil klorür (PVC), polistiren (PS) ve polikarbonatın (PC) omurgasızlarda ve aynı zamanda kemirgenlerde ve insanlarda üreme anormallikleri ve kanser gelişimi ile ilişkili toksik monomerleri serbest bıraktığı gözlenmektedir (Wang, Tan, Peng, Qiu, & Li, 2016). Plastik üretiminde kullanılan katkı maddeleri ayrıca plastiklerden sızdığı ve deniz organizmaları tarafından yutulduğu kanıtlanmıştır (Koelmans, Besseling, & Shim, 2015).

2.2.4. Dünyada mikroplastik kirliliği

2014 yılında Dünya denizlerinde yapılan bir çalışmada, suda sürüklenir vaziyette bulunan tüm plastiklerin sayısının 5,25 trilyon olup bunun %92'sini mikroplastiklerin oluşturduğu hesaplanmıştır (Anonim, 2017).

2016 yılında ODTÜ Deniz Bilimleri Enstitüsü, Doğu Akdeniz kıyılarında yaptığı bilimsel çalışmada, 1 litre deniz suyunda yaklaşık 0,3 – 21 aralığında mikroplastik parçacığı olduğu

tespit edilmiştir.Aynı alışmada deniz tabanında yapılan örneklemelerde ise bu değerlerin 1 metreküp kumda 100-560 mikroplastik parçacığı seviyelerinde olduğu bulunmuştur (Anonim, 2017).

2016 yılında Türkiye'nin Akdeniz sahillerinde yapılan bir başka çalışmada ise, aylık olarak örnekleme yapılmış ve 28 türe ait 1137 balığın yarısından fazlasının sindirim siteminde mikroplastiklere rastlanmıştır (Anonim, 2017).

2017 yılında Pekin Nehri'nde yapılan çalışmalarda, araştırmacılar 1 kg sedimentte 178 – 544 aralığında Mikroplastik parçacığı olduğu belirlenmiştir (Wang et al., 2017).

2018 yılında ise Bloukrans Nehri'nde çok sayıda mikroplastik, nehir akışındaki zamansal farklılıklara dayalı olarak incelenmiştir. Yaz mevsimine (6.3 ± 4.3 items/kg) kıyasla kış mevsiminde (160.1 ± 139.5 MP/kg) daha fazla mikroplastik parçacığı tespit edilmiş. Araştırmacılar bu durumun yaz mevsiminde azalan nehir akışıyla ilişkili olduğunu düşünmüşlerdir (Nel, Dalu, & Wasserman, 2018).

2018 yılına kadar yapılan çalışmalarda, deniz ve tatlı su ekosistemlerinin birleşiminde, 114'ten fazla sucul türde mikroplastik bulunmuştur (Rogers, 2020).

Yengeçler gibi kabuklular da dahil olmak üzere çeşitli omurgasız deniz hayvanlarının sindirim sistemlerinde ve dokularında da mikroplastiklerin varlığına rastlanmaktadır (Rogers, 2020).

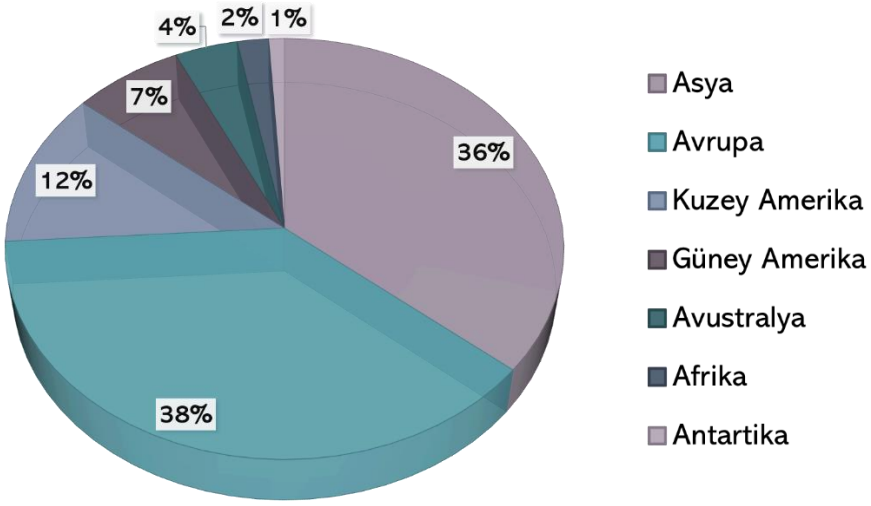
2020 yılında yayınlanan bir araştırmada, dokuz yıllık bir sürede dünya genelinde kapsamlı bir çalışma yapılmıştır (Ajith, Arumugam, Parthasarathy, Manupoori, & Janakiraman, 2020). Elde edilen verilere göre mikroplastiklere en çok rastlanan kıtaların %36'lık bir oranla Asya ve %38'lik bir oranla Avrupa olduğu görülmüştür ve bu bölgelerde mikroplastiklere en çok rastlanan ülkeler Çin ve Birleşik Krallık olarak belirlenmiştir. İlgili grafik Şekil.2.1'de verilmiştir.

2.2.5. Mikroplastiklerin analiz yöntemleri

Mikroplastiklerin analizinde çeşitli detektörlerle modifiye edilmiş sıvı kromatogafi tekniklerinden yararlanılmaktadır (Anonim, n.d.-a). Bunlardan bazıları şu şekilde sıralanabilir;

- RP HPLC (Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
- SP HPLC (Düz Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
- SEC (Boyut Dışlama Kromatografisi)
- IC (İyon Kromatografisi, Anyon / Katyon Kromatografisi)

Mikroplastiklerin kromotografik yöntemler ile analizinde Gaz kromatografi tekniğinden de yararlanılmakla birlikte en çok kullanılan türü GC/MS'tir (Anonim, n.d.-a). Kromatografik yöntemlere ek olarak, NMR ve FT – IR gibi spektroskopik yöntemlerle de mikroplastiklerin kalitatif analizleri yapılabilmektedir.



Şekil.2.1.2010 – 2019 yılları arasında dünya genelinde yürütülen çalışma kapsamında elde edilen mikroplastik yüzdesi (Ajith et al., 2020)

2.3. Analiz Metodu ve Metot ile İlgili Kuramsal Bilgiler

2.3.1. Boyut eleme kromatografisi (SEC)

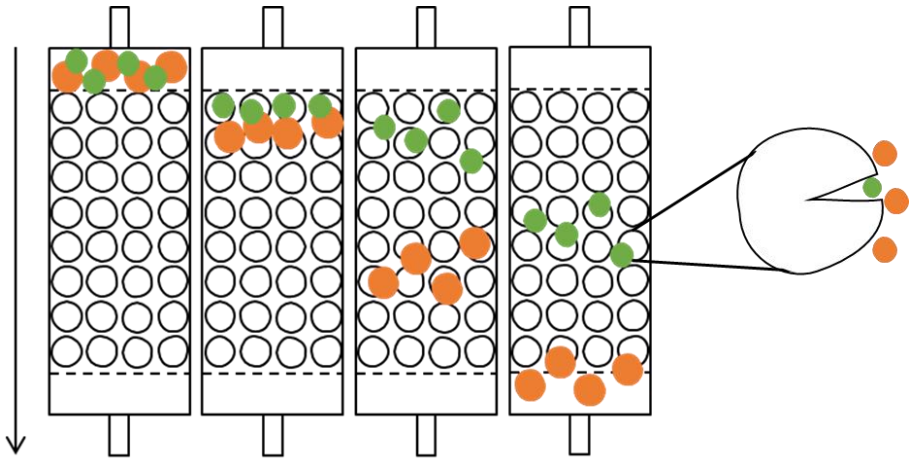
Michael S. Tswett, 1903 – 1906 yılları arasında yaptığı çalışmalarda, petrol eterindeki bitkisel pigmentleri kalsiyum karbonat üzerinde ayırması ile kromatografiyi tanımlamıştır (Snyder, Kirkland, & Dolan, 2009; Striegel, Yau, Kirkland, & Bly, 2009). Boyut eleme kromatografisi, sıvı kromatografi tekniklerinden biridir. Bu teknik hareketli faz ve çözücü olarak kullanılan çözeltinin özelliklerine göre isimlendirilmektedir. Hareketli faz ve çözücü olarak organik bir çözelti kullanıldığında teknik Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) adını alırken, sulu çözücüler ve sulu hareketli fazlar kullanıldığında Jel Filtrasyon Kromatografisi (GFC) adını almaktadır. Bu tekniklerde cihaz aksamlarında bir değişme olmaksızın hareketli faz (ve buna bağlı olarak sabit faz) ve çözücünün türü değiştiğinden, genel olarak Boyut Eleme Kromatografisi terimi kullanılmaktadır.

1959 yılında, J. Porath, P. Flodin ve çalışma arkadaşları, sulu ortamda şişirilen çapraz bağlı polidekstran jel ile dolu kolonları kullanarak, resmi olarak Jel Filtrasyon Kromatografisini tanıtmışlardır (Porath & Flodin, 1959). Bu teknik ile, suda çözünebilen bazı makromolekülleri

boyutlarına göre ayırmak mümkün olmakla birlikte, düşük basınçlı sistemlerde biyomoleküllerin ayırımları için de yaygı olarak kullanılmaktadır (Striegel et al., 2009).

J. C. Moore, 1964 yılında organik çözücülerde çözünebilen sentetik polimerleri ayırmak için çapraz bağlı polistiren jel ile doldurulmuş kolonların kullanımını önermiş ve böylece Jel Geçirgenlik Kromatografisi tekniği kullanılmaya başlanmıştır (Moore, 1964, 1968). Bu teknik ile, uygun kalibrasyon yöntemi kullanıldığında sentetik polimerler için molar kütle (MM) ve molar kütle dağılımı (MMD) bilgisi sağlanabilmektedir. Bu bilgileri diğer teknikler ile elde etmek zor olduğundan Jel Geçirgenlik Kromatografisi tekniği kullanımı hızla artış göstermiştir (Striegel et al., 2009).

Boyut Eleme Kromatografisi (SEC), moleküllerin çözeltideki boyutlarına göre ayırımını sağlayan bir kromatografi tekniğidir. Örnek çözeltisi, rijit yapılı ve gözenekli bir dolgu malzemesi ile doldurulmuş kolona verilerek, kolon boyunca sabit akış hızındaki mobil (hareketli) faz ile taşınması sağlanmaktadır. Kolon dolgu malzemesinin gözenek boyutu, ayrılmanın gerçekleştiği moleküler boyut aralığını belirlemektedir. Küçük boyutlu moleküller kolonda geçerken, sabit fazın dolgu materyalinde bulunan gözeneklere nüfuz edeceğinden kolonda daha uzun bir yol izleyerek kolondan en son ayrılmaktadır. Büyük boyutlu moleküller ise, gözeneklerin içinde kalamayacakları için kolon boyunca akışı sağlanarak kolonu önce terk etmektedir. Dolayısıyla, kolondan ilk önce zincir uzunluğu büyük olan polimer molekülleri ayrılmaktadır (Hill, 1995; Saçak, 1998; Striegel et al., 2009). Farklı iki boyuttaki bir karışımın SEC kolonundaki davranışı, Şekil.2.2.'de gösterilmiştir.



Şekil.2.2. İki farklı boyuttaki karışımın SEC kolonu ile ayrılma mekanizması

Boyut dışlama kromatografisi, daha önce de bahsedildiği gibi, molekülleri boyutlarına göre ayırmasının yanı sıra, polimerlerin molar kütle dağılımları veya molar kütle ortalamalarını (M_n, M_w, M_v, M_z) belirlemek için kullanılan analitik bir tekniktir (Striegel et al., 2009).

2.3.2. Molar kütle ortalamaları (M_n, M_w, M_v, M_z)

Sentetik bir polimer, farklı molekül kütlelerine sahip moleküllerden oluşmaktadır. Bu sebeple molekül kütlesi değeri bir ortalama olarak ifade edilmekle birlikte, birkaç farklı molekül kütlesi ortalaması tanımlanmaktadır (Mori & Barth, 1999). Büyük polimerlerin sentezi için gerçekleştirilen polimerizasyon reaksiyonları sırasında bir polimer zinciri başlatılır, büyüdükten sonra sonlandırılır. Reaksiyon sırasında oluşan polimer zincirlerinin uzunluğu ve miktarı, reaksiyon mekanizmasına ve koşullarına göre değişmektedir (Striegel et al., 2009).

Polimerlerin molekül kütleleri önemli bir kriter olmakla birlikte değişik yöntemlerle belirlenebilmektedir. Kullanılan yönteme göre farklı molekül kütlesi yönteminden bahsedilmektedir (Saçak, 1998);

- **M_n – Sayıca ortalama molekül kütlesi:**

Donma noktası alçalması (kriyoskopi), kaynama noktası yükselmesi (ebüliyoskopi), osmotik basınç ve buhar basıncı alçalması gibi fiziksel özellikler, çözeltide çözünmüş olan maddelerin molekül sayılarından doğrudan etkilenmektedir. Bu tür özelliklere sayısal özellikler (koligatif özellikler) denmektedir ve bu özelliklerin ölçülmesi ile belirlenen molekül kütlesi sayıca ortalama molekül kütlesi (M_n) olarak adlandırılmaktadır.

- **M_w – Ağırlıkça ortalama molekül kütlesi:**

Madde monokromatik ışık demeti ile karşılaştığında iki olay gözlenmektedir. Bu olaylardan biri ışının madde tarafından absorplanması diğeri ise gelen ışının doğrultusuna göre saçılmasıdır. Ağırlıkça ortalama molekül kütlesi (M_w) genellikle ışık saçılımı yöntemi gibi moleküler boyuta duyarlı yöntemlerle belirlenmektedir.

- **M_v – Viskozite ortalama molekül kütlesi:**

Aynı molekül kütlesine sahip küçük moleküllerle kıyaslandığında, polimer çözeltilerinin viskoziteleri oldukça yüksektir. Polimerlerin bu özelliğinden yararlanılarak viskozite ortalama molekül kütlesi belirlenir.

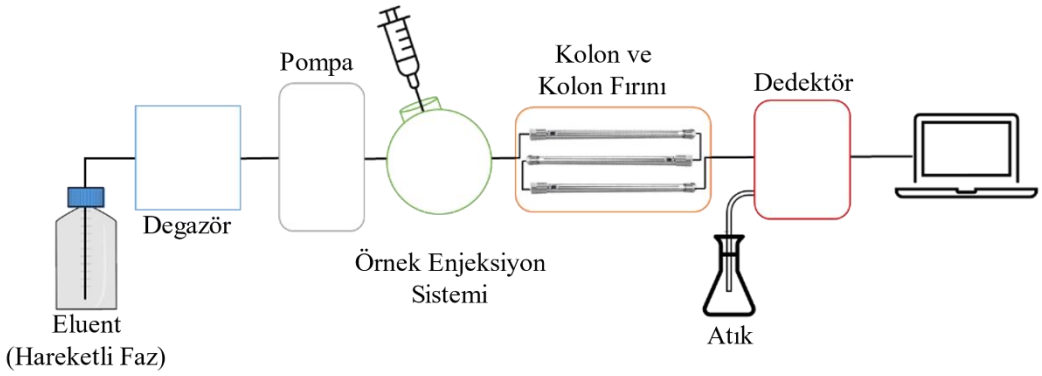
- **M_z – Z ortalama molekül kütlesi:**

Z ortalama molekül kütlesi, ultrasantrifüj yöntemi ile belirlenmektedir. Fazla kullanılmayan bu yöntemde, farklı molekül büyüklüklerine sahip polimerler santrifüj edilmektedir. Santrifüj hücresinin tabanına doğru farklı hızlarda hareket eden polimerlerin molekül kütlesi, sedimentasyon hızındaki farktan ve polimer çözeltisinin hacmi yardımıyla bulunabilmektedir.

2.3.3. Cihaz bileşenleri

Temelde, Boyut Eleme Kromatografisi (SEC) için kullanılan cihaz bileşenleri ile diğer sıvı kromatografi türleri arasında bir fark yoktur. Uygun kolonların basit bir şekilde değiştirilmesi ile bir sıvı kromatografisi, kolayca bir Boyut Eleme Kromatografisine dönüştürülebilmektedir. Kolon farklılığına ek olarak, diğer sıvı kromatografi türlerinin aksine, SEC'de gradient elüsyon kullanılmamaktadır. Ayrıca, ışık saçılması veya viskozimetri gibi dedektörler neredeyse yalnızca SEC'de kullanılırken, bazı dedektör türleri nadiren kullanılır (Podzimek, 2011).

SEC için temel bileşenleri, bir solvent şişesi (hareketli faz için), bir gaz giderme cihazı (degazör), örneğin ve hareketi fazın kolonda akışını sağlayan bir pompa, örneği cihaza verebilmek için bir örnek enjesiyon sistemi, kolonlar (sabit fazlar), bir dedektör sistemi, son olarak veri toplama ve işlemeye izin veren SEC yazılımlı bir bilgisayardan oluşmaktadır. Cihaza ait bileşenlerin şematik gösterimi Şekil.2.3'te verilmiştir.



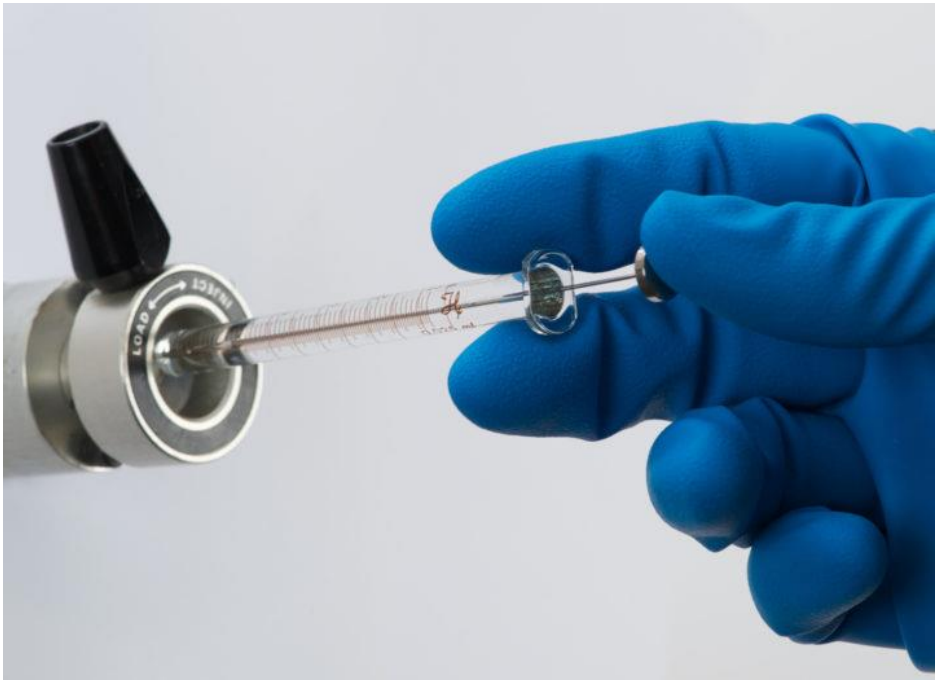
Şekil.2.3. SEC tekniğinin şematik gösterimi

A. Pompa sistemi ve degazör

Pompa sistemi, basınç etkisi ile hareketli fazın ve örneğin kolonda akışını sağlamaktadır. Kolonda sabit ve tekrarlanabilir bir hareketli faz akışı sağlamak, pompa sisteminin en önemli işlevidir. Sabit akışlı, pistonlu pompalar, kolon geri basıncını etkileyen değişimlere karşı hassas olduğundan yaygın olarak kullanılmaktadır. Kolona verilen örnek ve eluent içinde gaz bulunması durumunda arızalara sebebiyet verebilmektedir. Kromatografi pompasında bulunan bir hava kabarcığı, basınçta anlık bir düşüşe ve akış hızında azalmaya neden olmaktadır. Pompanın arızalanmasını önlemek için bir gaz giderme sistemi gerekmektedir. Bu gibi durumların engellenmesi için pompa sisteminden önce degazör ünitesi eklenmektedir. Bazı eski tip cihazlarda bu ünite bulunmadığından, gaz giderme işlemi bir ultrasonik banyo kullanılarak da yapılabilmektedir (Podzimek, 2011; Striegel et al., 2009).

B. Örnek enjeksiyon sistemi

Örnek enjeksiyon sistemi, SEC performansının belirlenmesindeki önemli faktörlerden biridir. Pik genişlemesinin ihmal edilebilmesi için, örnek çözeltisi kolona yeterince dar bir bantta yerleştirilmelidir. Enjektörler kullanıma uygun, tekrarlanabilir ve yüksek basınçlara karşı çalışabilir olmalıdır (Striegel et al., 2009). Örnek çözeltisinin kolona enjekte edilmesinde, manuel enjeksiyon ya da otomatik enjeksiyon kullanılabilmektedir. Manuel enjeksiyon sistemlerinde, valfin döngüsü örnek yükleme konumundayken uygun uçlu bir enjektör kullanılarak örnek çözeltisi ile doldurulur ve ardından döngü enjeksiyon konumuna çevrilerek örneğin kolona gönderilmesi sağlanır. Enjeksiyon hacmi genellikle 20 – 200 µL'dir, çözücüyü tamamen boşaltmak ve döngüyü uygun şekilde doldurmak için örnek çözeltisinin fazla miktarı kullanılır (Podzimek, 2011). Manuel enjeksiyon sistemi Şekil.2.4'te gösterilmiştir.



Şekil.2.4. Manuel enjeksiyon sistemi

C. Eluent (hareketli faz)

Boyut eleme kromatografisinde analizin önemli parçalarından biri de hareketli fazdır. Hareketli faz, belirli kriterlere uygun olacak şekilde seçilmelidir. Analizi istenen polimeri çözmesinin yanı sıra, kromatografik sistemin normal bir basınç aralığında çalışmasını sağlamak için viskozitesi yeterince düşük olmalı ve polimer moleküllerinin kolon dolgu materyalleri ile (sabit faz) etkileşime girmesini önlemelidir. Ayrıca, analiz öncesinde ya da analiz sırasında çözeltiden polimerlerin çökelmesini önlemek için kararlı çözeltiler oluşturmalıdır. Bu kriterlerden birinin dahi sağlanamaması, numunenin etkili bir şekilde karakterize edilememesi ile

sonuçlanmaktadır. Boyut eleme kromatografisinde, eluent olarak tetrahidrofuran (THF), tolüen ve kloroform gibi organik çözücüler kullanılmaktadır. Pullulan, polietilen, dekstran ya da poli(akrilik asit) gibi suda çözünebilen polimerlerin analizinde ise çeşitli tuzların eklenmesi ile su kullanılabilmektedir. Genellikle $NaNO_3$, NaN_3 veya Na_2SO_4 gibi tuzların yanı sıra tampon çözeltiler de kullanılmaktadır (Hill, 1995; Podzimek, 2011).

D. Kolon (sabit faz)

Kolonlar (sabit faz), kromatografik tekniklerde etkili bir ayırma sağlamak için gereken en önemli parçadır. Genellikle 300 mm uzunluğundadır ve kolon iç çapı 7,5 – 8,0 mm aralığında değişmektedir. Metallerle temas etmesi sonucu bozunabilen biyomalzemeler dışında, SEC kolonları için genellikle paslanmaz çelik kullanılmaktadır (Podzimek, 2011).

Analiz için uygun kolon seçiminde dikkat edilmesi gereken birkaç husus bulunmaktadır. Kolon dolgu materyallerinin analizi istenen örnek ile kimyasal olarak etkileşime girmemesi başta olmak üzere, hareketli faz tarafından tamamen ıslanabilmeli ancak ters şişme etkilerine maruz kalmamalıdır. Analizi istenen örneğin molar kütle dağılımını belirleyebilmesi için yeterli gözenek boyut aralığına sahip olmalıdır. Genellikle SEC kolonlarının gözenek boyutları 60 – 4 000 Å aralığında değişmektedir. Organik hareketli fazlar söz konusu olduğunda, en yaygın kullanılan kolon dolgu materyalleri çapraz bağlı polistiren jeller ya da trimetil silan türevli silikalardır. Sulu hareketli fazlar söz konusu olduğunda ise, en yaygın kullanılan kolon dolgu materyalleri çapraz bağlı hidroksillenmiş polimetakrilat, polipropilen oksit jelleri ya da gliseril türevli silikadır (Hashimoto, Sasaki, Aiura, & Kato, 1978; Hill, 1995; Snyder et al., 2009).

E. Dedektör

Dedektörler, kromatografik sistemde hareketli fazın bileşimindeki değişikliği elektrik sinyaline dönüştürerek işleyen önemli bir kısımdır. Karmaşık polimerlerde bulunan birçok farklı makromolekülün etkili bir şekilde karakterizasyonunun yapılabilmesi için çok sayıda algılama yöntemi gerekmektedir. Algılama yöntemleri kimyasal ve fiziksel olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Kızılötesi (IR), nükleer manyetik rezonans (NMR), kütle spektroskopisi (MS) ve ultraviyole – görünür bölge spektroskopisi (UV/VIS) gibi teknikler kimyasal dedektörler olarak sıralanırken, viskozimetre ve ışık saçılımı gibi teknikler fiziksel detektörlerdir. Refraktif indeks (kırılma indisi, RI), ultraviyole (UV), ışık saçılımı ve viskozimetre dedektörleri, SEC tekniğindeki en önemli dedektörleri temsil etmektedir. Refraktif indeks ve ultraviyole dedektörleri konsantrasyona duyarlı detektörlerdir. Bu tip dedektörler, kromatografik kolondan ayrıştırılan analitlerin konsantrasyonunu ölçmektedir (Podzimek, 2011; Striegel et al., 2009).

- ***Refraktif indeks (kırılma indisi, RI) dedektörü***

Refraktif indeks (RI) dedektörleri boyut eleme kromatografisi tekniğinde yaygın olarak kullanılan detektörlerdendir. Spesifik bir kırılma indisine sahip bütün bileşikler için evrensel olarak kullanılabilmektedir. UV dedektörleri ile kıyaslandığında, RI dedektörleri sıcaklığa ve akış hızındaki dalgalanmalara karşı oldukça hassastır (Podzimek, 2011).

2.4. Diğer Analiz Yöntemleri

2.4.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT – IR)

1800 yılında gökbilimci Sir William Herschel tarafından keşfedilen Kızılötesi spektroskopisi (IR) (Anonim, 2021), kızılötesi ışığın incelenen madde tarafından absorplanması esasına dayanmaktadır (Anonim, n.d.-c). Absorplanma, molekülün yapısında bulunan bağların titreşimleri ve dönmeleri için gerekli enerjinin, cihaz tarafından elektromanyetik spektrumun kızılötesi bölgesinden gönderilmesi sonucu gerçekleşmektedir. Kızılötesi ışının absorplanabilmesi için, molekülün dipol momente sahip olması gerekmektedir (Anonim, n.d.-c).

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT – IR) ile, organik ya da inorganik bileşiklerin karakterizasyonu gerçekleştirilebilmektedir (Büyüksırt & Kuleaşan, 2014; Ono, Bamba, Oku, Yonetani, & Fukusaki, 2011). FT – IR spektroskopisinde, örneğe zarar vermeden ve hızlı bir şekilde analiz yapılabilmektedir. Bu durum FT – IR kullanımını yaygınlaştırmıştır (Lin & Wang, 2012). FT – IR spektroskopisi, katı, sıvı ve gaz örneklerin analizine uygun bir tekniktir (Gómez-Ordóñez & Rupérez, 2011). FT – IR ile katı örneklerin analize hazırlanması için üç yöntem bulunmaktadır. Birinci yöntemde örnekler KBr ile karıştırılır ve preslenerek ince bir disk haline getirilir (Büyüksırt & Kuleaşan, 2014; Erkahveci & Karaali, 1996). Diğer yöntemde katı örnek, likit bir parafin ile karıştırılır ve iki IR geçirgen pencere içine sıvanarak preslenir (Erkahveci & Karaali, 1996). Üçüncü yöntemde ise, katı örnek uygun bir çözücü içerisinde çözülerek analize hazırlanır (Büyüksırt & Kuleaşan, 2014; Mak, Chuah, Ahmad, & Bhat, 2013).

2.4.2. Raman spektroskopisi

Bir tür titreşim spektroskopisi olan Raman Spektroskopisinin temelini, Raman saçılması oluşturmaktadır. Raman saçılması, 1928 yılında ünlü fizikçi Sir Chandrasekhara Venkata Raman tarafından keşfedilmiştir (Akçe & Kadıoğlu, 2020). Moleküllerin yapısı hakkında oldukça önemli bilgiler veren Raman Spektroskopisi, örneğin görünür bölge (VIS) ya da yakın IR (NIR) ışından meydana gelen güçlü bir ışık kaynağından saçılan ışının belli bir açı ile ölçümüne dayanmaktadır (Skoog, Holler, & Crouch, 2013). Bir molekülün Raman spektrumu, o moleküle ait moleküler parmak izi niteliği taşımaktadır.

Raman spektroskopisi ile, inorganik veya organik bileşiklerin nitel (kalitatif) ve nicel (kantitatif) analizleri gerçekleştirilebilmektedir. Bu teknik, hızlı olmakla birlikte, kolay ve örnek tahribatını gerektirmeyen oldukça önemli bir spektroskopik tekniktir. IR spektroskopisini tamamlayıcı nitelikte olup, IR spektroskopisinde gözlenemeyen zayıf titreşimler, bu teknik sayesinde gözlenebilmektedir (Akçe & Kadıoğlu, 2020; Skoog et al., 2013). Raman spektrometre sistemleri, üç ana bölümden oluşmaktadır. Bunlar; lazer (ışık) kaynağı, numune aydınlatma sistemi ve spektrometre bölümleridir (Ferraro, Nakamoto, & Brown, 2003).

2.5. Kaynak Araştırma

2021 yılında Kirstein ve arkadaşları (Kirstein et al., 2021), tamamlayıcı iki teknik olan µFT – IR görüntüleme ve Py – GC/MS ile içme suyu dağıtım sistemlerinde boyutları 6,6 µm'ye kadar mikroplastikleri değerlendirmişlerdir. Çalışma kapsamında en yaygın kullanılan plastik polimerlerden polietilen (PE), polipropilen (PP), polistiren (PS), polivinil klorür (PVC), poliamid (PA6,6), polimetil metakrilat (PMMA), Polikarbonat (PC) ve polietilen-terftalat (PET) araştırılmıştr. Numunelerin ekstraksiyonu etanol ile gerçekleştirilmiştir. İçme suyundaki MP'lerin bolluğu ve kimyasal bileşimi, bir Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) görüntüleme tekniği kullanılarak belirlenmiştir. µFTIR yoluyla incelemeden sonra numuneler Py-GCMS ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçların kütle bazlı derişimleri, standart sertifikalı plastik polimerlerin artan derişimleri ile hazırlanan kalibrasyon grafiğinden hesaplanılmıştır. Sonuçlar 0,8 – 7,45 ppb aralığında tespit edilmiştir.

2019 yılında Gomiero ve arkadaşları (Gomiero et al., 2019), kıyı şeritlerinden topladıkları deniz kumu örneklerinde mikroplastikleri tanımlamak için yeni bir teknik geliştirmişlerdir. Bu çalışmada çeşitli kirlilik kaynaklarına maruz kalan on bölgeden alınan örneklerdeki plastik parçacıkların miktarı ve polimerik bileşimi araştırılmaktadır. Mikroplastikler çok aşamalı bir prosedür uygulanarak kum örneklerinden ekstrakte edilmiştir. Kalibrasyon grafikleri yansıda görmüş olduğunuz 8 plastik polimerin artan derişimlerde çözeltileri hazırlanarak oluşturulmuştur. Analizler Py GC/MS ile gerçekleştirilmiştir. İncelenen tüm alanlarda bulunan en bol polimer, polietilen (PE) olmuştur ve bunu Polivinil klorür (PVC) ve Polietilen teraftalat (PET) takip etmiştir. Analiz numunelerinin hiçbirinde Polikarbonat (PC) bulunamamıştır.

2018 yılında Biver ve arkadaşları (Biver et al., 2018), sahil sedimentlerinde bulunan mikroplastiklerin yarı – kantitatif tespiti için jel geçirgenlik kromatografisine (GPC) dayalı bir teknik geliştirmişlerdir. İki farklı bölgeden alınan kum öneklerinde analizi gerçekleştirmişlerdir. Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) analizleri, diyot dizisi (DAD) ve floresan (FLD) çift dedektörü, PLgel Mesopore kolonu, eluent olarak 1.0 mL/dk akış hızında kloroform kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon grafiği için farklı molekül kütlelerine sahip on Polistiren (PS) standardı kullanılmıştır. Kum örnekleri Diklormetan ile ekstrakte edilmiştir. Hazırlanan kalibrasyon grafiklerinden elde edilen sonuçlar bölgelere göre farklılık göstermiş olup, yaklaşık 3,3 – 104 ppm aralığında değişmektedir.

2015 yılında Hintersteiner ve arkadaşları (Hintersteiner, Himmelsbach, & Buchberger, 2015), yaptıkları bir çalışmada çeşitli kişisel bakım ürünlerinde poliolefin (PO) mikroplastiğinin kantitatif tayinini gerçekleştirmişlerdir. Seçilen kişisel bakım ürünlerinden mikroplastiklerin izolasyonunu iki aşamalı bir ektraksiyon yöntemi ile gerçekleştirildikten sonra HT – GPC tekniği ile analiz yapılmıştır. Sabit faz olarak 3 Plgel Olexis kolon ve mobil faz olarak 1,2,4 – Triklorobenzen kullanılmıştır. Farklı molekül kütlelerine sahip polistiren standartları ile oluşturulan kalibrasyon grafiği ile, kişisel bakım ürünlerinde bulunan PO miktarı belirlenmiştir. Ürüne bağlı olarak, %0,1–3 w / w aralığında, farklı şekillerde, 1 mm'nin altındaki boyutlarda ve değişen miktarlarda mikroplastik gözlemlenmiştir. Bu yöntemde %92-96 aralığında geri kazanım elde edilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışmada kullanılan cihazlar

Bu çalışmada Empower Build 1154 yazılımına sahip, Waters 2424 Refraktif İndeks (RI) dedektörü ile modifiye edilmiş Boyut Eleme Kromatografisi (SEC) kullanılmıştır. Sabit faz olarak dört adet farklı gözenek boyutlarına sahip Waters marka Ultrahydrogel (300 x 7,8 mm, 30°C) kolonları kullanılmışıtır. Hareketli faz olarak ise, kolonlara ait kitapçıkta önerilen 0,2 g/L'lik NaN_3 çözeltisi kullanılmıştır.

Çalışma kapsamında kullanılan Boyut Eleme Kromatografisi Şekil.3.1'de ve cihaz özellikleri Çizelge.3.1'de verildiği gibidir.

Çizelge.3.1. Boyut eleme kromatografisi (SEC) için cihaz özellikleri

Ultrahydrogel Kolonlar	250 Å – 500 Å – 1000 Å – 2000 Å
Maksimum Akış Hızı (FR)	1 mL dk^{-1}
Kolon Sıcaklığı	30°C
Ortam Sıcaklığı	19 – 22°C
Polarite	+
Elüsyon Modu	İzokratik



Şekil.3.1. Boyut eleme kromatografisi (SEC)

3.1.2. Çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları

Analiz öncesi hazırlık basamaklarında cam malzemelerin kurutulması amacıyla, Nüve marka FN 055 model etüv kullanılmıştır.

Analizler sırasında standart polimerlerin tartılması için Radwag marka AS 220/C/2 model analitik terazi kullanılmıştır. Ölçümler 0,0000 g ± 0,0001 hassasiyetinde gerçekleştirilmiştir.

Standart polimer çözeltilerinin hazırlanmasında farklı hacim aralıklarında beş farklı mikropipet kullanılmıştır. Mikropipetlerin markaları ve hacim aralıkları şu şekildedir;

- Volac, 5 – 50 µL
- Biohit Proline Plus, 10 – 100 µL
- Labopette, 50 – 200 µL
- Volac, 50 – 500 µL
- Biohit Proline Plus, 100 – 1000 µL

Boyut Eleme Kromatografisinde kullanılan hareketli fazı degaze etmek amacıyla, Everest marka ultrasonik banyo kullanılmıştır.

3.1.3. Stok ve ara stok polimer çözeltileri

Bu çalışmada, molekül kütleleri 106 ile 24 400 Dalton (Da) arasında değişen on polietilen glikol (PEG) standardı (Waters Corporation, Almanya) kullanılmıştır.

Tüm PEG standartları için, 100 mg/mL'lik ana stok çözeltiler hazırlanmıştır. Sıvı olan PEG standartlarından cam bir tüp içerisine mikropipet ile 300 µL alınmış ve üzerine 2700 µL NaN_3 çözeltisi eklenerek hazırlanmıştır. Katı olan PEG standartlarından ise, yaklaşık 300 mg (0,3000 ± 0,0002 g) tartım alınarak bir miktar NaN_3 çözeltisi içerisinde çözülmüş ve son hacim NaN_3 çözeltisi ile 3 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

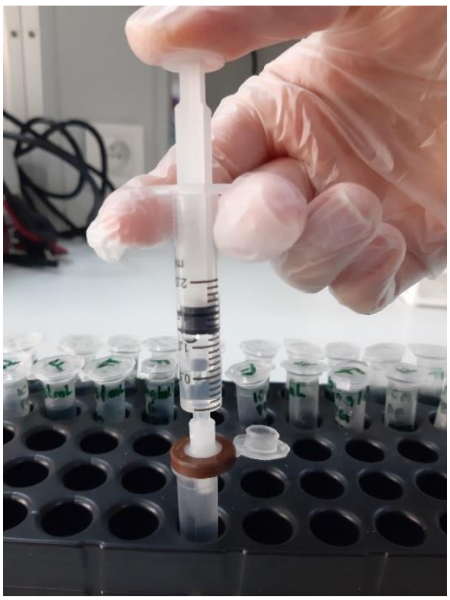
Polimer çözeltilerinin hazırlanmasında, standart polimerlerin bilgi formlarında hazırlanması önerilen 0,2 g/L'lik NaN_3 çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözelti <0,05 µs iletkenliğindeki milli – Q saf su ile hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Hazırlanan ana stok PEG standartlarından yararlanılarak, derişimi 10 mg/mL olan ara stok polimer çözeltileri hazırlanmıştır. Standartlar SEC kolonlarına enjekte edilmeden önce 0,45

µm'lik şırınga ucu filtreler ile süzülmüştür (Şekil.3.2). Tüm standartlar için enjeksiyonlar üç tekrarlı yapılmıştır.



Şekil.3.2. Standart polimer çözeltilerinin şırınga ucu filtre ile süzülmesi

3.2.2. Mevcut kolonların performansının belirlenmesi

Projenin gerekçesinde belirtildiği üzere; TÜBİTAK 215S620 No'lu proje kapsamında, Bursa Uludağ Üniversitesi Rektörlüğü tarafından bakım – onarımı yapılan Boyut Eleme Kromatografisi (SEC) cihazına ait yaklaşık yirmi yıllık dört Ultrahydrogel kolonu (250 Å – 500 Å – 1000 Å – 2000 Å), bu araştırmada performans denemesine tabii tutulmuştur.

Hızlı destek projesi kapsamında temin edilen PEG standartları ile hazırlanan çözeltiler, sırası ile mevcut olan her bir Ultrahydrogel kolonu için denenmiştir. Hareketli fazın akış hızı, denemeler boyunca 1 mL/dk'da sabit tutulmuştur. Kalibrasyon grafikleri alıkonma zamanına karşı molekül kütlesinin logaritması (Log (M_W)) olarak çizilmiştir. Grafiğin doğru denklemi ve regresyon katsayısı (R^2) en küçük kareler yöntemine göre hesaplanmıştır.

Teorik plaka sayısı ve plaka yüksekliği, sırası ile 3.1 ve 3.2'de belirtilen formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\mathrm{N} = 16 \times \left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \text{ (3.1) ve } \mathrm{H} = \mathrm{L}/\mathrm{N} \text{ (3.2)}$$

Burada; N teorik plaka sayısı, t_R ilgili pikin alıkonma zamanı, W ilgili pikin genişliği, H plaka yüksekliği ve L ise kolonların uzunluğudur (300 mm).

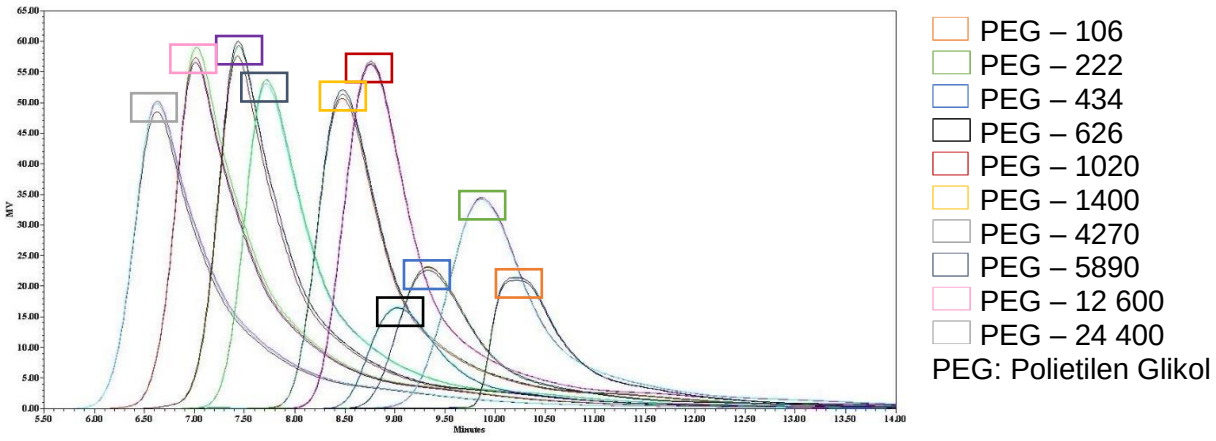
Kromatografik yöntemlerde teorik plaka sayıları genellikle 100 – 10^6 aralığındadır (Keller & Giddings, 2020). Bu çalışma sonucunda kolonların performansının yüksek olduğunu kabul etmek için teorik plaka sayısının yüzden büyük olması (N>100), plaka yüksekliğinin birden küçük olması (H<1) ve regresyon katsayının 0,97'den büyük olması (R^2>0,97) gerekmektedir.

4. BULGULAR

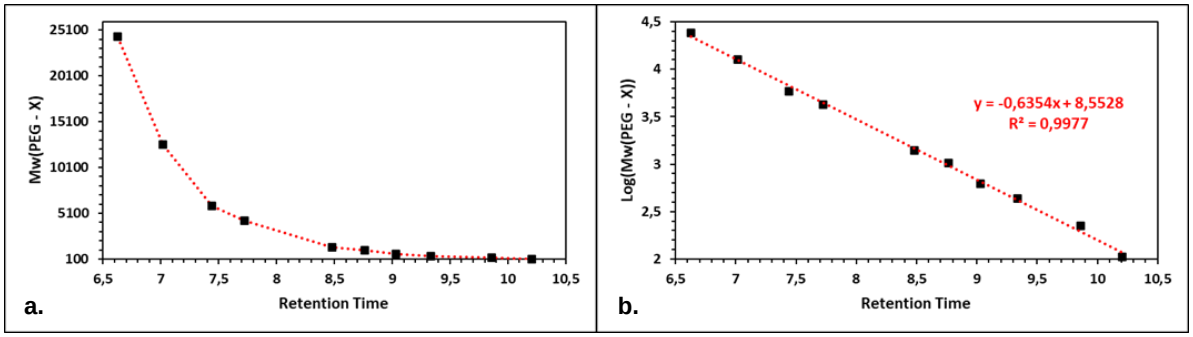
4.1. Ultrahydrogel – 250 Å

Ultrahydrogel–250 Å kolonu için, ara stok PEG standartları, en küçük molekül kütlesinden başlanarak cihaza enjekte edilmiştir. Elde edilen veriler ile artan molekül kütlesine karşı alıkonma zamanının değişimini gösteren grafik çizilmiştir. Kalibrasyon grafiği ise alıkonma zamanına karşı Log (M_W) olacak şekilde çizilmiş ve R^2 değeri 0,9977 olarak hesaplanmıştır.

Ultrahydrogel–250 Å kolonuna ait kromatogramlar ve çizilen grafikler Şekil.4.1 ve Şekil.4.2'de verilmiştir.



Şekil.4.1. Ultrahydrogel – 250 Å kolonuna ait kromatogram



Şekil.4.2. Ultrahydrogel – 250 Å kolonu için **a.** Molekül kütlesine göre, **b.** Molekül kütlesinin logaritmasına göre çizilen kalibrasyon grafikleri

Ultrahydrogel – 250 Å kolonu için yapılan denemeler sonucunda;

- Pik yüksekliklerinin ve pik alanlarının, her bir PEG standardı için yapılan üç tekrarlı enjeksiyonlar arasında uyumlu olduğu gözlenmiştir.
- Standartlara ait alıkonma zamanlarının (t_R), enjeksiyonlar arasında uyumlu olduğu ve beklendiği üzere molekül kütlesi arttıkça düştüğü gözlenmiştir.
- Ultrahydrogel – 250 Å kolonu, gözenek boyutu en küçük olan kolon olması sebebi ile, PEG standartlarının kolonda kalma sürelerine bağlı olarak, gözlenen pik genişliklerinin çok yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu sebeple Ultrahydrogel – 250 Å kolonuna ait teorik plaka sayıları, 4.1 formülü kullanılarak ve plaka yükseklikleri 3.2 formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Çizelge.4.5).

$$N = 5{,}54 \times \left(\frac{t_R}{W/_2}\right)^2 \quad (4.1)$$

Ultrahydrogel – 250 Å kolonuna ait veriler Çizelge.4.1'de verilmiştir.

Çizelge.4.1. Ultrahydrogel – 250 Å kolonuna ait veriler

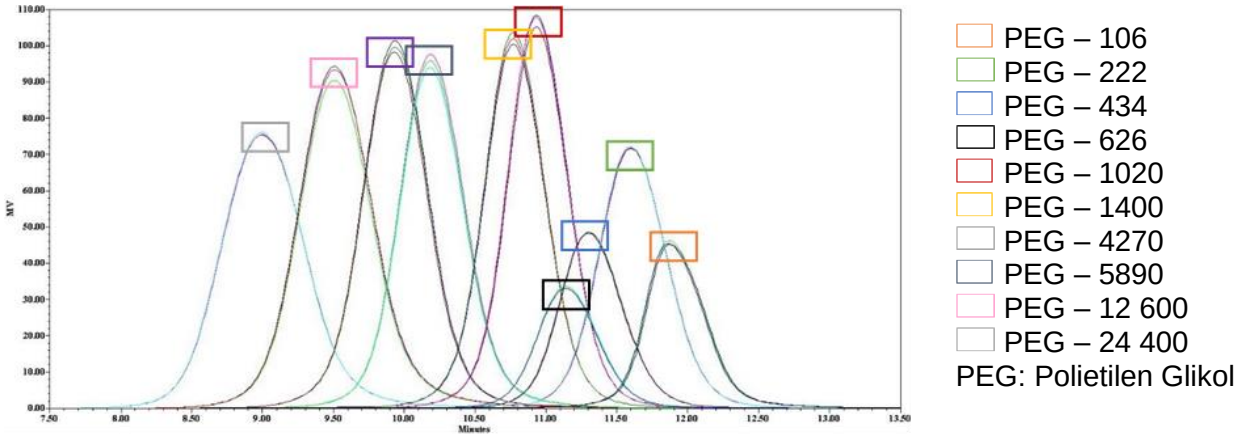
PEG – X (M_W)	**t_R (min)**	**Pik Yüksekliği (µv)**	**Pik Alanı (µV sec^{-1})**
106	10,21 ± 0,008	20 485 ± 116	1 227 414 ± 34 263
222	9,86 ± 0,003	33 203 ± 170	2 283 940 ± 5 951
434	9,34 ± 0,002	21 875 ± 224	1 441 832 ± 17 602
626	9,03 ± 0,003	15 414 ± 82	1 003 761 ± 7 000
1020	8,76 ± 0,002	55 391 ± 292	3 132 433 ± 97 751
1400	8,48 ± 0,002	50 424 ± 648	2 723 260 ± 26 600
4270	7,72 ± 0,002	52 586 ± 392	2 693 004 ± 45 209
5890	7,44 ± 0,006	57 713 ± 1 218	2 866 431 ± 69 500
12600	7,02 ± 0,005	56 462 ± 1 257	3 056 478 ± 2 095

24400	6,63 ± 0,002	48 395 ± 892	2 677 496 ± 87 284

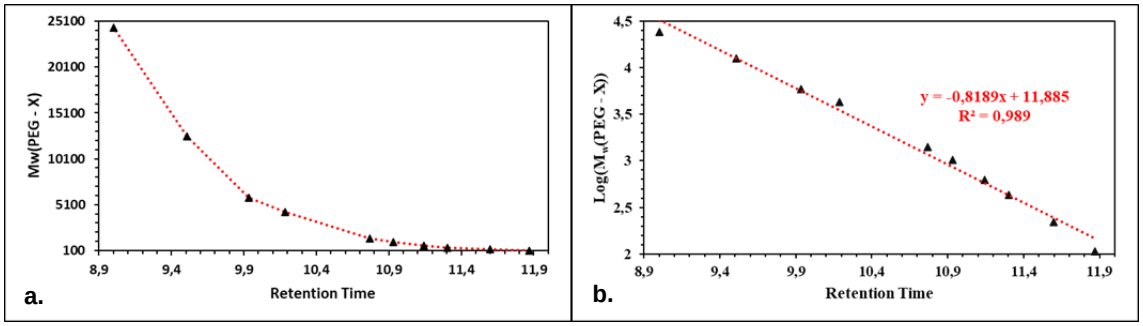
4.2. Ultrahydrogel – 500 Å

Ultrahydrogel–500 Å kolonu için, ara stok PEG standartları, en küçük molekül kütlesinden başlanarak cihaza enjekte edilmiştir. Elde edilen veriler ile, artan molekül kütlesine karşı alıkonma zamanının değişimini gösteren grafik çizilmiştir. Kalibrasyon grafiği ise alıkonma zamanına karşı Log (M_W) olacak şekilde çizilmiş ve R^2 değeri 0,9890 olarak hesaplanmıştır.

Ultrahydrogel–500 Å kolonuna ait kromatogramlar ve çizilen grafikler Şekil.4.3 ve Şekil.4.4'te verilmiştir.



Şekil.4.3. Ultrahydrogel – 500 Å kolonuna ait kromatogram



Şekil.4.4. Ultrahydrogel – 500 Å kolonu için, **a.** Molekül kütlesine göre **b.** Molekül kütlesinin logaritmasına göre çizilen kalibrasyon grafikleri

Ultrahydrogel – 500 Å kolonu ile yapılan denemeler sunucunda;

- Pik yüksekliklerinin ve pik alanlarının, her bir PEG standardı için yapılan üç tekrarlı enjeksiyonlar arasında uyumlu olduğu gözlenmiştir.
- Standartlara ait alıkonma zamanlarının (t_R), enjeksiyonlar arasında uyumlu olduğu ve beklendiği üzere molekül kütlesi arttıkça düştüğü gözlenmiştir. Ayrıca, Ultrahydrogel – 250 Å ile karşılaştırıldığında, aynı standartlara ait alıkonma zamanlarında artış gözlenmiştir.

- Ultrahydrogel – 500 Å kolonuna ait teorik plaka sayıları, 3.1 formülü kullanılarak ve plaka yükseklikleri 3.2 formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Çizelge.4.5).

Ultrahydrogel – 500 Å kolonuna ait veriler Çizelge.4.2'de verilmiştir.

Çizelge.4. 2. Ultrahydrogel – 500 Å kolonuna ait veriler

PEG – X (M_W)	t_R (min)	Pik Yüksekliği (µv)	Pik Alanı (µV sec^{-1})
106	11,87 ± 0,007	45 018 ± 542	1 340 013 ± 13 360
222	11,60 ± 0,003	71 686 ± 374	2 482 048 ± 8 169
434	11,30 ± 0,003	48 143 ± 170	1 564 349 ± 698
626	11,14 ± 0,002	33 111 ± 305	1 044 932 ± 8 544

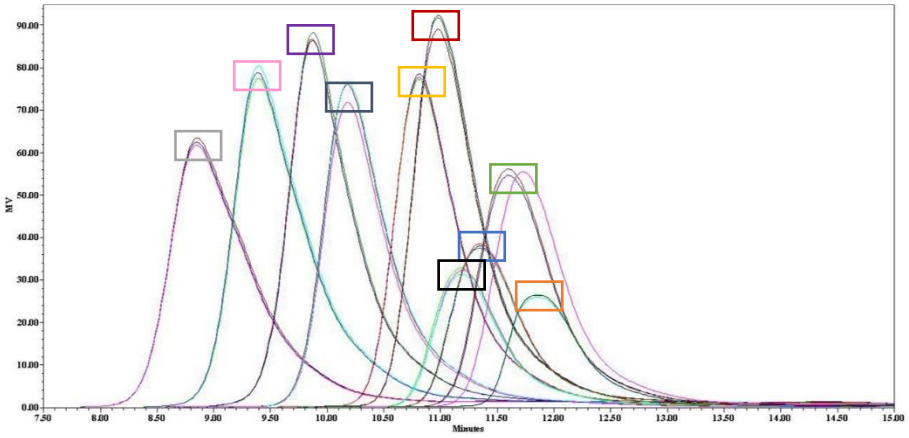
Çizelge.4. 2. Ultrahydrogel – 500 Å kolonuna ait veriler (devam)

PEG – X (M_W)	t_R (min)	Pik Yüksekliği (µv)	Pik Alanı (µV sec^{-1})
1020	10,93 ± 0,001	106 724 ± 1 747	3 349 360 ± 54 069
1400	10,77 ± 0,001	101 572 ± 1 692	3 193 236 ± 43 831
4270	10,19 ± 0,002	95 410 ± 1 824	3 089 403 ± 73 484
5890	9,94 ± 0,004	99 110 ± 1 608	3 288 132 ± 62 645
12600	9,51 ± 0,002	92 281 ± 1 962	3 374 955 ± 84 747
24400	9,00 ± 0,001	75 146 ± 349	3 051 626 ± 12 831

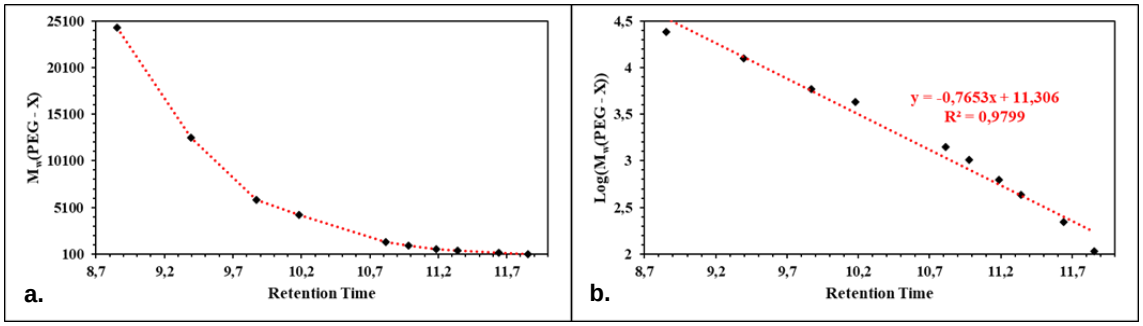
4.3. Ultrahydrogel – 1000 Å

Ultrahydrogel – 1000 Å kolonu için, ara stok PEG standartları, en küçük molekül kütlesinden başlanarak cihaza enjekte edilmiştir. Elde edilen veriler ile, artan molekül kütlesine karşı alıkonma zamanının değişimini gösteren grafik çizilmiştir. Kalibrasyon grafiği ise alıkonma zamanına karşı Log (M_W) olacak şekilde çizilmiş ve R^2 değeri 0,9799 olarak hesaplanmıştır.

Ultrahydrogel–1000 Å kolonuna ait kromatogramlar ve çizilen grafikler Şekil.4.5 ve Şekil.4.6'da verilmiştir.



Şekil.4.5. Ultrahydrogel – 1000 Å kolonuna ait kromatogram



Şekil.4.6. Ultrahydrogel – 1000 Å kolonu için **a.** Molekül kütlesine göre, **b.** Molekül kütlesinin logaritmasına göre çizilen kalibrasyon grafikleri

Ultrahydrogel – 1000 Å kolonu ile yapılan denemeler sunucunda;

- Pik yüksekliklerinin ve pik alanlarının, her bir PEG standardı için yapılan üç tekrarlı enjeksiyonlar arasında uyumlu olduğu gözlenmiştir.
- Standartlara ait alıkonma zamanlarının (t_R), enjeksiyonlar arasında uyumlu olduğu ve beklendiği üzere molekül kütlesi arttıkça düştüğü gözlenmiştir. Ayrıca, daha küçük gözenek boyutlarına sahip Ultrahydrogel 250 Å ve 500 Å kolonları ile karşılaştırıldığında, aynı standartlara ait alıkonma zamanlarında belirgin artışlar gözlenmiştir.
- Ultrahydrogel–1000 Å kolonuna ait teorik plaka sayıları, 3.1 formülü kullanılarak ve plaka yükseklikleri 3.2 formülü kullanılarak hesaplandı (Çizelge.4.5).

Ultrahydrogel – 1000 Å kolonuna ait veriler Çizelge.4.3'te verilmiştir.

Çizelge.4.3. Ultrahydrogel – 1000 Å kolonuna ait veriler

PEG – X (M_W)	t_R (min)	Pik Yüksekliği (µv)	Pik Alanı (µV sec^{-1})
106	11,86 ± 0,001	25 691 ± 329	1 140 971 ± 12 600
222	11,64 ± 0,075	54 871 ± 751	2 556 309 ± 46 885
434	11,34 ± 0,003	37 504 ± 417	1 658 236 ± 11 978
626	11,19 ± 0,007	31 737 ± 709	1 343 376 ± 33 146
1020	10,98 ± 0,003	90 248 ± 1 735	3 810 576 ± 61 512
1400	10,81 ± 0,002	77 063 ± 687	3 226 059 ± 22 763
4270	10,18 ± 0,003	73 105 ± 2 438	3 140 661 ± 117 831
5890	9,87 ± 0,004	86 077 ± 1 000	3 609 347 ± 39 025
12600	9,40 ± 0,003	77 826 ± 1 424	3 582 380 ± 71 881
24400	8,85 ± 0,002	61 645 ± 740	3 080 027 ± 38 020

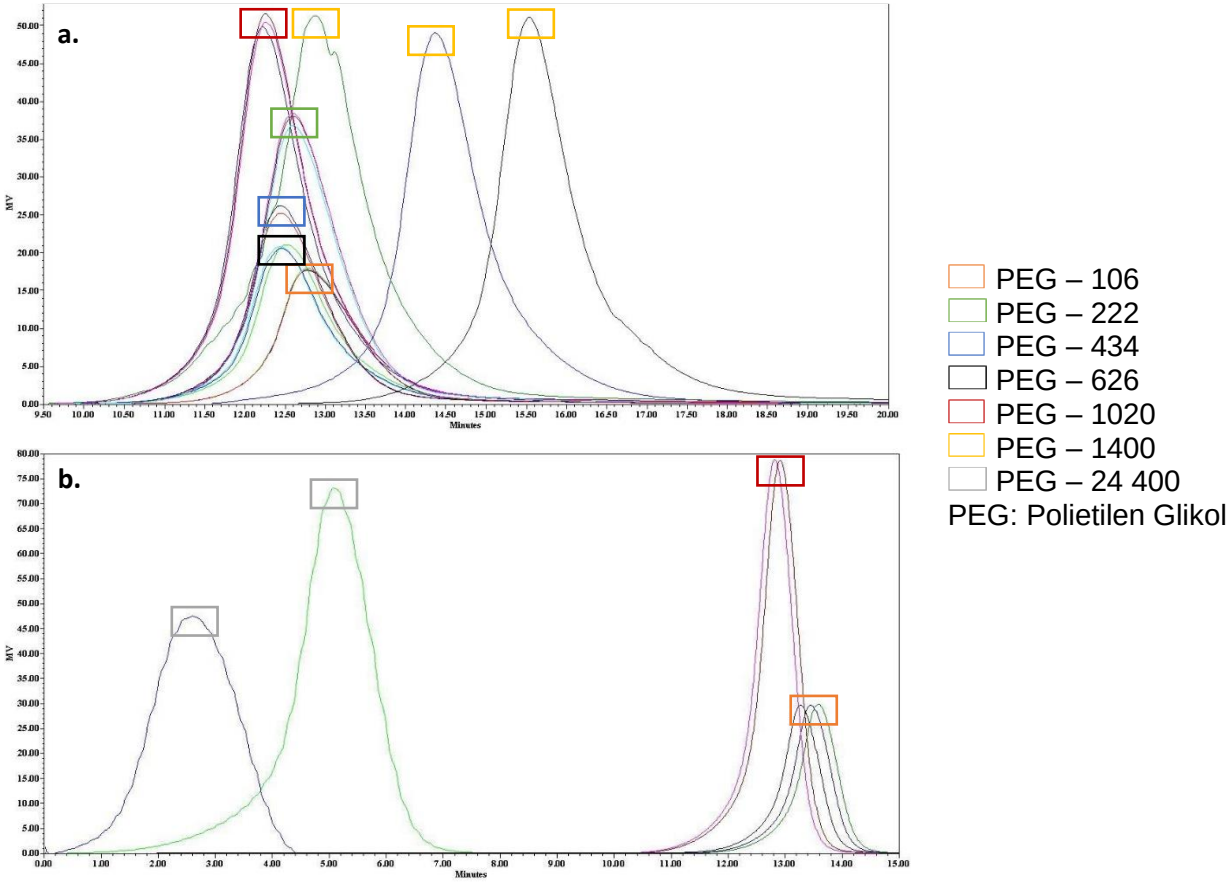
4.4. Ultrahydrogel – 2000 Å

Ultrahydrogel – 2000 Å kolonu için, ara stok PEG standartları, en küçük molekül kütlesinden başlanarak cihaza enjekte edilmiştir.

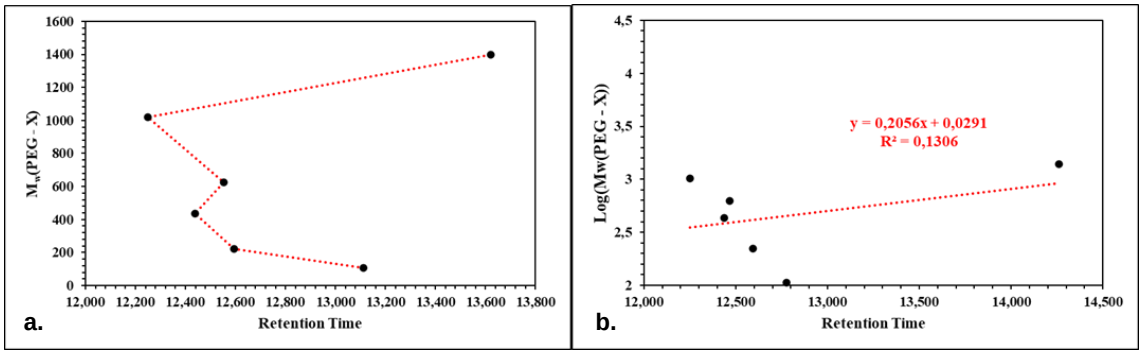
Molekül kütlesi 106 – 1400 Da aralığındaki altı PEG standardı denendiğinde, elde edilen sonuçların tutarsız olduğu gözenmiştir. Kolonda tıkanıklık olabileceği düşünülerek, Ultrahydrogel – 2000 Å kolonu cihaza akış yönünün tersine bağlanıp yaklaşık üç saat boyunca 0,2 g/L'lik NaN_3 çözeltisi ile yıkanmış ve ardından kolon yönü orijinal pozisyonuna döndürülerek yeniden deneme yapılmıştır.

Elde edilen veriler ile, artan molekül kütlesine karşı alıkonma zamanının değişimini gösteren grafik çizilmiştir. Kalibrasyon grafiği ise alıkonma zamanına karşı Log (M_W) olacak şekilde çizilmiş ve R^2 değeri 0,1306 olarak hesaplanmıştır.

Ultrahydrogel – 2000 Å kolonuna ait kromatogramlar ve çizilen grafikler Şekil.4.7 ve Şekil.4.8'de verilmiştir.



Şekil.4.7. Ultrahydrogel – 2000 Å kolonuna ait kromatogramlar, **a.** İlk denemeye ait kromatogram, **b.** Yıkamadan sonra yapılan ikinci denemeye ait kromatogram



Şekil.4.8. Ultrahydrogel – 2000 Å kolonu için **a.** Molekül kütlesine göre, **b.** Molekül kütlesinin logaritmasına göre çizilen kalibrasyon grafikleri

Ultrahydrogel – 2000 Å kolonu ile yapılan denemeler sunucunda;

- Pik yüksekliklerinin ve pik alanlarının, her bir PEG standardı için yapılan üç tekrarlı enjeksiyonlar arasında tutarsız olduğu gözlenmiştir.
- Kolon performansından şüphe edilerek 106 Da, 626 Da ve 1400 Da molekül kütleli PEG standartları ile deneme enjeksiyonları yapılmıştır. PEG – 106 standardı için; yapılan ikinci denemenin sonucunun ilk denemeden farklı olduğu gözlenmiştir.

Ultrahydrogel – 2000 Å kolonunun, 0,2 g/L'lik NaN_3 çözeltisi ile yaklaşık üç saat yıkandıktan sonra yapılan yeni deneme sonucunda;

- PEG–106 standardı için, alıkonma zamanları ikinci denemede elde edilen verilere benzer sonuçlar verdi fakat pik yüksekliklerinde yaklaşık iki kat artış gözlenmiştir.
- PEG–1020 standardı için, yapılan ilk iki enjeksiyonda daha önce yapılan ikinci denemelerden farklı sonuçlar elde edilmiş fakat yeni veriler aynı sette verilen PEG–106 standardı ile uyumlu olduğu görülmüştür. Fakat üçüncü enjeksiyonda analiz süresi, standardın kolondan çıkması için yeterli olmamıştır.
- PEG–24400 standardı için ilk enjeksiyonda elde edilen verilerin, pik yüksekliklerine bakılarak bir önceki enjeksiyonda kolonda kalan PEG–1020 standardına ait olduğu düşünülmüştür. Bu standarda ait ikinci enjeksiyonda ise, pik yüksekliğine bakılarak PEG – 24 400 Da standardının ilk enjeksiyonuna ait olduğu belirlenmiştir.

Ultrahydrogel – 2000 Å kolonuna ait veriler Çizelge.4.4'te verilmiştir.

Çizelge.4.4. Ultrahydrogel – 2000 Å kolonuna ait veriler

PEG – X (M_W)	t_R (min)	Pik Yüksekliği (µv)	Pik Alanı (µV sec^{-1})
106	12,78 ± 0,001	16 809 ± 139	1 117 576 ± 7 943
222	12,59 ± 0,004	36 610 ± 820	2 438 132 ± 1 701 146
434	12,44 ± 0,002	24 888 ± 568	1 635 756 ± 37 805
626	12,47 ± 0,044	19 614 ± 296	1 274 268 ± 29 077
1020	12,25 ± 0,021	49 369 ± 812	3387 368 ± 54 931
1400	14,26 ± 1,335	48 912 ± 1 199	3 486 137 ± 237 433

Nihai sonuç olarak; Ultrahydrogel – 2000 Å kolonunun çalışmadığına karar verildi.

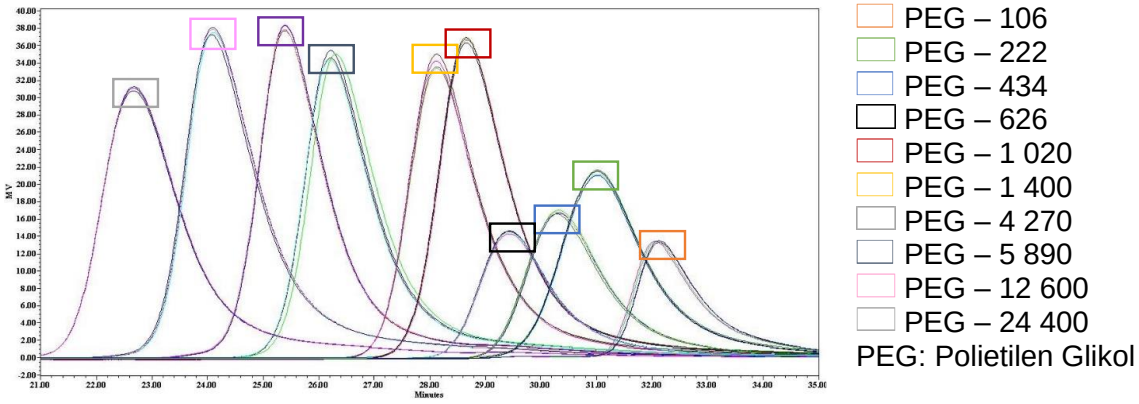
4.5. Ultrahydrogel – 250 Å, Ultrahydrogel – 500 Å ve Ultrahydrogel – 1000 Å

Çalışır kabul edilen Ultrahydrogel 250 Å, Ultrahydrogel – 500 Å ve Ultrahydrogel – 1000 Å kolonları (Ultrahydrogel – Seq.), gözenek boyutu büyükten küçüğe doğru olacak şekilde cihaza bağlanmıştır. SEC cihazının seri olarak bağlanan kolonlara optimizasyonu için, yaklaşık üç gün belirli aralıklarla 0,2 g/L'lik NaN_3 çözeltisi ile yıkama yapılmıştır.

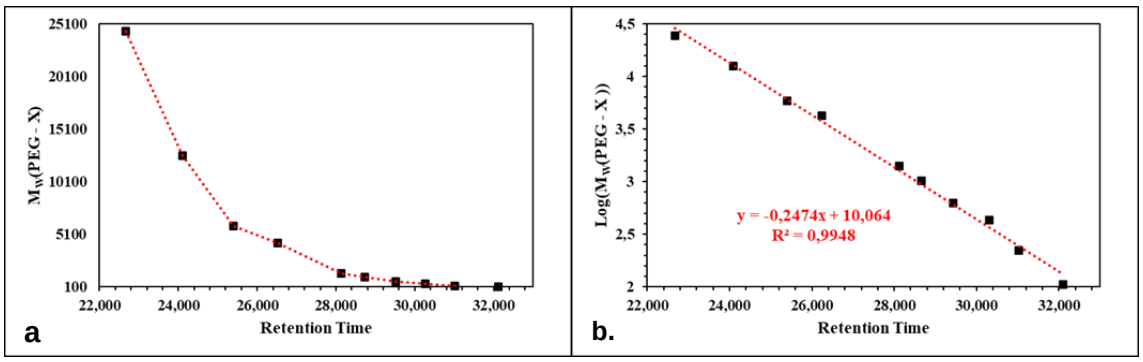
Optimizasyon sağlandıktan sonra, ara stok PEG standartları, en küçük molekül kütlesinden başlanarak cihaza enjekte edilmiştir. Elde edilen veriler ile, artan molekül kütlesine karşı

alıkonma zamanının değişimini gösteren grafik çizilmiştir. Kalibrasyon grafiği ise alıkonma zamanına karşı Log (M_W) olacak şekilde çizilmiş ve R^2 değeri 0,9948 olarak hesaplanmıştır.

Ultrahydrogel – Seq. Kolonları ile yapılan enjeksiyonlara ait kromatogramlar ve çizilen grafikler Şekil.4.9 ve Şekil.4.10'da verilmiştir.



Şekil.4.9. Ultrahydrogel – 250 Å, 500 Å, 1000 Å kolonlarının kombinasyonu ile yapılan enjeksiyonlara ait kromatogramlar



Şekil.4.111. Ultrahydrogel – 250 Å, 500 Å, 1000 Å kolonları için **a.** Molekül kütlesine göre, **b.** Molekül kütlesinin logaritmasına göre çizilen kalibrasyon grafikleri

Ultrahydrogel – Seq. Kolonları ile yapılan analiz sonucunda,

- Pik yüksekliklerinin ve pik alanlarının, her bir PEG standardı için yapılan enjeksiyonlar arasında uyumlu olduğu gözlendi.
- Standartlara ait alıkonma zamanlarının (t_R), enjeksiyonlar arasında uyumlu olduğu ve beklendiği üzere molekül kütlesi arttıkça düştüğü gözlendi.
- Ultrahydrogel – Seq. kolonları ile yapılan denemeler sonucunda, teorik plaka sayıları 3.1 formülü kullanılarak ve plaka yükseklikleri 3.2 formülü kullanılarak hesaplandı.

Kolonlara ait hesaplanan teorik plaka sayıları (N) ve plaka yükseklikleri, Çizelge.4.5'te gösterildiği gibidir.

Çizelge.4. 3. Teorik plaka sayıları ve plaka yükseklikleri

Kolonlar	Teorik Plaka Sayısı (N)	Plaka Yüksekliği (H)
Ultrahydrogel – 250 Å	256	0,85 ± 0,40
Ultrahydrogel – 500 Å	713	0,44 ± 0,11
Ultrahydrogel – 1000 Å	342	0,96 ± 0,27
Ultrahydrogel – Seq*	441	0,76 ± 0,28

*Ultrahydrogel – Sequential: Ultrahydrogel – 250 Å, Ultrahydrogel – 500 Å, Ultrahydrogel – 1000 Å

4.6. Ultrahydrogel – Seq için validasyon parametreleri

Tekrarlanabilirlik, seçilen bir PEG standardı için farklı zaman aralıklarındaki enjeksiyonların alıkonma sürelerinin karşılaştırılması ile gerçekleştirilmiştir. Üç farklı günde yapılan enjeksiyonlar sonucunda PEG–24400 standardının t_R değeri 22.66 ± 0,02 olarak bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik testine ait veriler Çizelge.4.6'da verilmiştir. Bu test, aynı analizci tarafından, aynı standart ve cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge.4. 6. Tekrarlanabilirlik testleri

	26.01.2022	**27.01.2022**	**02.02.2022**
t_R (dk)	22,67 ± 0,01	22,63 ± 0,01	22,66 ± 0,01
Genişlik (sn)	338,00 ± 2,58	330,67 ± 1,53	323,67 ± 1,53
N	259	269	282

Seçicilik, üç farklı moleküler kütledeki PEG'in aynı konsantrasyonlarda (her biri 10 mg/mL) karıştırılmasıyla hazırlanan çözeltinin enjekte edilmesiyle gerçekleştirilmiştir (n=3).

Kapasite faktörü ve seçicilik faktörü sırasıyla 4.2 ve 4.3'te verilen formüllerle hesaplanmıştır.

$$k = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} \quad (4.2) \qquad \alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (4.3)$$

Burada k kapasite faktörü, α seçicilik faktörü, t_R alıkonma zamanı, t_0 hareketli fazın ölü hacmidir. Seçicilik testinin sonuçları Çizelge.4.7'de verilmiştir.

Çizelge.4. 7. Seçicilik faktörü sonuçları (Analiz süresi: 45 dk; Akış hızı: 1 mL/dk)

[i]k_1	3,02
[ii]k_2	3,99
[iii]k_3	4,63
[iv]α_1	1,32
[v]α_2	1,16

[i]: PEG 24400'ün kapasite faktörü; [ii]: PEG 1400'ün kapasite faktörü; [iii]: PEG 106'nın kapasite faktörü; [iv]: k_2 ve k_1'in seçicilik faktörü; [v]: of k_3 and k_2'nin seçicilik faktörü

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Mevcut olan ticari Ultrahydrogel kolonlarının kullanım klavuzunda, 72 saatten uzun süre kullanılmaması durumunda (w/w) %0,05'lik NaN_3 çözeltisi ile doldurulması ve cihaza takılı olmadığı sürece uç kapaklarının kapalı olması gerektiği belirtilmektedir. Fakat cihaza bakım – onarımı yapılmadan önce, kolonların herhangi bir çözelti ile doldurulmadan ve uç kapakları takılmadan açıkta bırakıldığı tespit edilmiştir. Kolonları şartlandırmak için uzun bir süre boyunca milli – Q saf su ile yıkama yapılıp kolon içerisindeki gözeneklerin şişmesi sağlanmıştır.

Kolonların şartlandırılmasından sonra, Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından FHIZ–2021–546 numaralı proje kapsamında temin edilen Polietilen Glikol (PEG) standartları ile, her bir kolonun performansı test edilmiştir. Çalışmanın sonucunda kolonların teorik plaka sayıları ve plaka yükseklikleri hesaplanmıştır. Ultrahydrogel – 250 Å, Ultrahydrogel – 500 Å ve Ultrahydrogel – 1000 Å kolonlarının çalışır durumda olduğu kabul edilmiştir (Çizelge.5.5). Ultrahydrogel – 2000 Å kolonunun ise, kalibrasyon grafiği çizildiğinde R^2 değerinin beklenen değerden çok küçük olması sebebi ile (0,1306) teorik plaka sayısı ve plaka yüksekliği hesaplanmamıştır.

6. KAYNAKLAR

Ajith, N., Arumugam, S., Parthasarathy, S., Manupoori, S., & Janakiraman, S. (2020). Global distribution of microplastics and its impact on marine environment—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, *27*(21), 25970–25986. doi: 10.1007/s11356-020-09015-5

Akçe, M. A., & Kadıoğlu, Y. K. (2020). Raman Spektroskopisinin İlkeleri ve Mineral Tanımlamalarında Kullanılması. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, *9*(20 20), 99–115. doi: 10.17100/nevbiltek.778678

Anonim. (n.d.-a). Chromatography Analysis of Polymers and Plastics.pdf. Retrieved April 4, 2021, from https://www.intertek.com/polymers/chromotography-analysis/

Anonim. (n.d.-b). Denizlerde mikroplastik sorunu; kirlenen denizler halk sağlığını da tehlikeye atıyor.pdf. Retrieved April 4, 2021, from https://www.bilimma.com/denizlerde-mikroplastik-sorunu-kirlenen-denizler-halksagligini-da-tehlikeye-atiyor/

Anonim. (n.d.-c). Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi.pdf. Retrieved November 12, 2022, from ODTU website: https://merlab.metu.edu.tr/tr/fourier-donusumlu-kizil-otesi-spektrometresi#:~:text=Kızılötesi (IR) Spektroskopisi temel olarak,spektrumun kızılötesi bölgesinden gönderilmesiyle gerçekleşir

Anonim. (2017). Türkiye'de Mikroplastik Problemi.pdf. Retrieved May 2, 2021, from https://tr.boell.org/tr/2017/06/07/turkiyede-mikroplastik-problemi-durum-vahim

Anonim. (2021). Sir William Herschel discovered far-infrared heating in 1800. Retrieved April 4, 2022, from Ifracomfort website: https://www.infracomfort.co.nz/2021/herschel-infrared-heating/

Biver, T., Bianchi, S., Carosi, M. R., Ceccarini, A., Corti, A., Manco, E., & Castelvetro, V. (2018). Selective determination of poly(styrene) and polyolefin microplastics in sandy beach sediments by gel permeation chromatography coupled with fluorescence detection. *Marine Pollution Bulletin*, *136*(August), 269–275. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.09.024

Büyüksırt, T., & Kuleaşan, H. (2014). Fourier Dönüşümlü Kizilötesi (FTIR) Spektroskopisi ve Gıda Analizlerinde Kullanımı. *Gıda*, *39*(4), 235–241. doi: 10.5505/gida.43434

da Costa, J. P., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. A. P. (2017). Microplastics – Occurrence, Fate and Behaviour in the Environment. In *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 75). Elsevier Ltd. doi: 10.1016/bs.coac.2016.10.004

Doğruyol, P. (2019). *Haliç Sedimanlarında Mikroplastik Kirliliğinin Araştırılması*. [Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi], İstanbul, Türkiye.

Erkahveci, A., & Karaali, A. (1996). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektroskopinin Gıda Analizlerine Uygulanması. *Gıda*, *21*(5), 337–345.

Ferraro, J. R., Nakamoto, K., & Brown, C. W. (2003). *Introductory Raman Spectroscopy* (2nd ed.). Academic Press. doi: 10.1038/sj.embor.embor770

Frias, J. P. G. L., & Nash, R. (2019). Microplastics: Finding a consensus on the definition.

Marine Pollution Bulletin, *138*(September 2018), 145–147. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.11.022

Gómez-Ordóñez, E., & Rupérez, P. (2011). FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. *Food Hydrocolloids*, *25*(6), 1514–1520. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.02.009

Gomiero, A., Øysæd, K. B., Agustsson, T., van Hoytema, N., van Thiel, T., & Grati, F. (2019). First record of characterization, concentration and distribution of microplastics in coastal sediments of an urban fjord in south west Norway using a thermal degradation method. *Chemosphere*, *227*, 705–714. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.04.096

Hashimoto, T., Sasaki, H., Aiura, M., & Kato, Y. (1978). High-Speed Aqueous Gel-Permeation Chromatography. *J Polym Sci Polym Phys Ed*, *16*(10), 1789–1800. doi: 10.1002/pol.1978.180161007

Hill, C. (1995). *Handbook of size exclusion chromatography* (Vol. 69; C. Wu, Ed.). Marcel Dekker, INC. Retrieved from https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003267095906231

Hintersteiner, I., Himmelsbach, M., & Buchberger, W. W. (2015). Characterization and quantitation of polyolefin microplastics in personal-care products using high-temperature gel-permeation chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *407*(4), 1253–1259. doi: 10.1007/s00216-014-8318-2

Keller, R. A., & Giddings, J. C. (2020). Chromatography. Retrieved February 9, 2022, from Encyclopaedia Britannica, Inc. website: https://www.britannica.com/science/chromatography

Kirstein, I. V., Hensel, F., Gomiero, A., Iordachescu, L., Vianello, A., Wittgren, H. B., & Vollertsen, J. (2021). Drinking plastics? – Quantification and qualification of microplastics in drinking water distribution systems by µFTIR and Py-GCMS. *Water Research*, *188*, 116519. doi: 10.1016/j.watres.2020.116519

Koelmans, A. A., Besseling, E., & Shim, W. J. (2015). Nanoplastics in the Aquatic Environment. Critical Review. In M. Bergmann, L. Gutow, & M. Klages (Eds.), *Marine Anthropogenic Litter* (pp. 325–340). Cham: Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-319-16510-3_12

Lin, S. Y., & Wang, S. L. (2012). Advances in simultaneous DSC-FTIR microspectroscopy for rapid solid-state chemical stability studies: Some dipeptide drugs as examples. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*(5), 461–478. doi: 10.1016/j.addr.2012.01.009

Mak, Y. W., Chuah, L. O., Ahmad, R., & Bhat, R. (2013). Antioxidant and antibacterial activities of hibiscus (Hibiscus rosa-sinensis L.) and Cassia (Senna bicapsularis L.) flower extracts. *Journal of King Saud University - Science*, *25*(4), 275–282. doi: 10.1016/j.jksus.2012.12.003

Moore, J. C. (1964). Gel permeation chromatography. I. A new method for molecular weight distribution of high polymers. *Journal of Polymer Science Part A: General Papers*, *2*(2), 835–843. doi: 10.1002/pol.1964.100020220

Moore, J. C. (1968). Gel permeation chromatography: Its inception. *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia*, *21*(1), 1–3. doi: 10.1002/polc.5070210103

Mori, S., & Barth, H. G. (1999). *Size Exclusion Chromatography*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-662-03910-6

Nel, H. A., Dalu, T., & Wasserman, R. J. (2018). Sinks and sources: Assessing microplastic abundance in river sediment and deposit feeders in an Austral temperate urban river system. *Science of the Total Environment*, *612*, 950–956. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.298

Ono, D., Bamba, T., Oku, Y., Yonetani, T., & Fukusaki, E. (2011). Application of Fourier transform near-infrared spectroscopy to optimization of green tea steaming process conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *112*(3), 247–251. doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.05.002

Podzimek, S. (2011). *Light Scattering, Size Exclusion Chromatography and Asymmetric Flow Field Flow Fractionation*. John Wiley & Sons, Inc.

Porath, J., & Flodin, P. (1959). Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature*, *183*(1657–9).

Rogers, K. (2020). Microplastics.pdf. Retrieved April 24, 2021, from Encyclopaedia Britannica, Inc. website: https://www.britannica.com/technology/microplastic

Saçak, M. (1998). *Polimer Kimyasina Giriş*. Ankara: A.Ü.F.F. Döner Sermaye İşletmesi Yayınları.

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2013). Principles of Instumental Analysis. In E. Kılıç & H. Yılmaz (Eds.), *Thomson Corporation* (6th ed.). Ankara: Bilim Yayıncılık.

Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2009). Introduction to Modern Liquid Chromatography. In *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. doi: 10.1002/9780470508183

Striegel, A. M., Yau, W. W., Kirkland, J. J., & Bly, D. D. (2009). Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography: Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography: Second Edition. In *Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography: Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography: Second Edition*. doi: 10.1002/9780470442876

Thompson, R. C., Olsen, Y., Mitchell, R. P., Davis, A., Rowland, S. J., John, A. W. G., … Russell, A. E. (2004). Lost at Sea: Where Is All the Plastic? *Science*, *304*(5672), 838–838. doi: 10.1126/science.1094559

Wang, J., Peng, J., Tan, Z., Gao, Y., Zhan, Z., Chen, Q., & Cai, L. (2017). Microplastics in the surface sediments from the Beijiang River littoral zone: Composition, abundance, surface textures and interaction with heavy metals. *Chemosphere*, *171*, 248–258. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.12.074

Wang, J., Tan, Z., Peng, J., Qiu, Q., & Li, M. (2016). The behaviors of microplastics in the marine environment. *Marine Environmental Research*, *113*, 7–17. doi: 10.1016/j.marenvres.2015.10.014