ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Pınar ERDAL

FARKLI LİFLER İÇİN MOLEKÜLER, MİKROSKOPİK VE SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE ADLİ ANALİZ METOTLARININ OLUŞTURULMASI

TEKSTİL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2014

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI LİFLER İÇİN MOLEKÜLER, MİKROSKOPİK VE SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE ADLİ ANALİZ METOTLARININ OLUŞTURULMASI

Pınar ERDAL

DOKTORA TEZİ

TEKSTİL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 31/10/2014 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/~~Oyçokluğu~~ile Kabul Edilmiştir.

.....	.....	.....
Prof. Dr. R.Tuğrul OĞULATA	Prof. Dr. Mesut BAŞIBÜYÜK	Yrd.Doç. Dr. Füsun DOBA KADEM
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

.....	.....
Doç. Dr. İsmail AKYOL	Yrd.Doç. Dr. Serin MEZARCIÖZ
ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

FARKLI LİFLER İÇİN MOLEKÜLER, MİKROSKOPİK VE SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE ADLİ ANALİZ METOTLARININ OLUŞTURULMASI

Pınar ERDAL

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEKSTİL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. R.Tuğrul OĞULATA
Yıl: 2014, Sayfa: 131
Jüri : Prof. Dr. Tuğrul OĞULATA
: Prof. Dr. Mesut BAŞIBÜYÜK
: Yrd. Doç. Dr. Füsun DOBA KADEM
: Doç.Dr. İsmail AKYOL
: Yrd. Doç. Dr. Serin MEZARCIÖZ

Günümüzde birçok alanda olduğu gibi adli tıp alanında da gelişen teknoloji ile birlikte güncelmetotlardan yararlanılarak suç ve suçlu kavramları kesine yakın deliller ile yeniden değerlendirilmeye başlanmıştır. Tekstil ürünleri, meydana gelen bir adli vaka sonrası, olay aydınlatmada kesinlikle göz ardı edilemeyecek delillerdendir. Zira suç işleyen ve suça maruz kalan herkes, tekstil yüzeyleri ve aksesuarlarıyla etkileşim halindedir. Adli uygulamalarda, tek tekstil elyafı için tanımlama yöntemleri güncel olup, aynı zamanda en az ön işlem gerektiren tahribatsız yöntemler için büyük bir uygulama potansiyeline sahiptir.

Bu çalışmada, adli bir olayla ilgili daha güvenilir kanıtlar oluşturmak amacıyla, olay yerinde delil olarak kalabilecek bazı hayvansal liflere yönelik moleküler; bazı bitkisel ve sentetik liflere yönelik ise mikroskopik, spektroskopik ve kromatografik yöntemlere dayalı yeni metotların geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır.

Hayvansal liflerin moleküler tanımlanmasında *sitokrom b* geni üzerinden oluşturulan multipleks PCR ile beş farklı hayvansal lif için (At, koyun, sığır, tavşan ve kedi) sırasıyla 623, 309,265, 201,70 bç uzunluklarda bant verebilen kit oluşturulmuştur. Hayvansal lifler için geliştirilen moleküler metot ile aynı anda birçok hayvansal lifi kısa sürede kesin olarak birbirinden ayırt edebilecek, bu sayede karışıklığa mahal vermeden suçlu ile şüpheli bağlantısı kolaylıkla kurulabilecektir. Ayrıca tekstil sektöründe bir sorun olan etiketleme hatalarının çözümüne yönelik bir yaklaşım olarak ve liflerin gerçek değerinin tespitinde kullanılabilecektir.

Akrilik, naylon ve pamuk lifi üzerindeki boyarmaddelerin (bazik, asit ve reaktif) tanımlanmasına yönelik geliştirilen mikroskopik ve spektroskopik metotlarla aynı lifin üzerindeki boyarmaddelerin belirlenmesi sınırlı kalmıştır. Ancak HPLC cihazı kullanılarak oluşturulan kromatografik metotlar ile yüksek doğrulukta sonuçlar alınmıştır. Bununla ilgili olarak bu elyaflar üzerinden ekstraksiyonla alınan boyarmaddelerin kromatografik olarak tanımlanması yapılmıştır. Bazik boyarmaddelerden renklere göre (mavi, kırmızı ve sarı) alıkonma zamanları sırasıyla 4,25; 5,7 ve 3,5 dk.; maksimum absorbans değerleri ise 598; 498 ve 430 nm. olarak bulunmuştur. Asit boyarmaddeler için renklere göre alıkonma zamanları 9,75; 9,59 ve 9,25 dk. ve maksimum absorbans değerleri 657, 520 ve 400 nm. olarak belirlenmiştir. Reaktif boyarmaddeler için alıkonma zamanları 11,30; 10,75 ve 6,36 dk. ve maksimum absorbans değerleri 606; 524 ve 429 nm. olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak hayvansal lifler geliştirilen moleküler yöntemle başarılı olarak türlere göre kimliklendirilmiştir. Sentetik ve bitkisel liflerin mikroskopik, spektroskopik ve kromotografik yöntemlerle tanımlanacağı metotlar geliştirilmiştir. Boyarmaddelerin varlıkları tespit edilebilir olduğu ancak hangi boyarmaddeler olduğu uygulamasında sınırlı kalmıştır.

Anahtar Kelimeler: Adli Bilimler, Boyarmadde, Elyaf, PZR, Mitokondriyal DNA

ABSTRACT

PhD THESIS

DEVELOPMENT OF FORENSIC ANALYSIS METHODS FOR DIFFERENT FIBERS VIA MOLECULAR, MICROSCOPIC AND SPECTROSCOPIC WAYS

PhD THESIS

Pınar ERDAL

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF TEXTILE ENGINEERING

Supervisor : Prof. Dr. R.Tuğrul OĞULATA
Year: 2014, Pages: 131
Jury : Prof. Dr. Tuğrul OĞULATA
: Prof. Dr. Mesut BAŞIBÜYÜK
: Asst. Prof. Dr. Füsun DOBA KADEM
: Assoc. Prof. Dr. İsmail AKYOL
: Asst. Prof. Dr. Serin MEZARCIÖZ

As in many fields of science and technology, with advancing technology in forensic sciences, by using the advanced investigation techniques, "the concepts of crime and offender" have begun to be assessed in the context of evidence. Textile products are evidences that can be possibly found at the crime scenes and absolutely nonnegligible. Because, everyone that offends and exposed to crime is interacting with textile surfaces and accessories. Identification methods for single textile fibers are in demand for forensic applications, and nondestructive methods with minimal pretreatment have the greatest potential for utility.

In the present study, in order to form more reliable evidences related to the forensic case; studies intended to compose new methods or animal fibers based on molecular methods, and also for some vegetable and synthetic fibers based on microscopic, spectroscopic and chromatographic methods. In this context, a kit is made for molecular identification of animal fibers by means of multiplex PCR formed over the *cytB* gene; that gives bands at 623, 309, 265, 201 and 70 base pairs for five animals (horse, sheep, cow, rabbit and cat) respectively. By means of the molecular method that is relevant to animal fibers, it was possible to characterize and identify a lot of animal fibers in a sitting; so offender and doubter connection can be easily established. Furthermore, this method can be used in determination of the correct value of the fibres as a solution of the mislabeling and adulteration in textile industry.

For synthetic and vegetable fibres, identification of fibers by means of chromatografic method is defined at high accuracy whereas identification of dyestuffs on the same kind of fiber stayed limited with microscopic and spectroscopic methods. Chromatografic identification is performed for dyestuffs extracted from case fibers. For basic dyestuffs retention times are 4,25; 5,7 and 3,5 min. and maximum absorbance values are 598; 498 and 430 nm. according to the colors (blue, red and yellow). For acid dyestuffs; retention times are 9,75; 9,59 and 9,25 min. and maximum absorbance values are 657, 520 and 400 nm. It is found that for reactive dyetuffs retention times are 11,30; 10,75 and 6,36 min. and maximum absorbance values are 606; 524 and 429 nm.

As a result, animal fibers are succesfully identified according to the species by means of the molecular method developed. And also microscopic, spectroscopic and chromatografic methods developed that aid to identify synthetic and vegetable fibres. By means of these methods existence of the dyestuffs are determined but these methods stayed limited for determination of the dyestuff classes.

KeyWords: Forensic Science, Textile Dyestuff, Fiber, PCR, Mitochondrial DNA

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve bana “Farklı Lifler İçin Moleküler, Mikroskopik Ve Spektroskopik Yöntemlerle Adli Analiz Metotlarının Oluşturulması” konulu doktora tezini veren yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile bana daima yol gösteren danışman hocam sayın Prof. Dr. R.Tuğrul OĞULATA’ya sonsuz teşekkürler.

Doktora Tez İzleme Komitesi üyeleri Sayın Prof.Dr.Mesut BAŞIBÜYÜK’e ve Yrd. Doç. Dr. Füsun DOBA KADEM’e çalışmamın tüm aşamalarında yönlendirici ve olumlu katkılarından dolayı teşekkür ederim. Doktora çalışmam içerisinde yer alan moleküler analizler için K.S.Ü Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuarı ve ÜSKİM Mikrobiyoloji ve Genetik Laboratuarı olanaklarından yararlanmamı sağlayan, deneyimlerini paylaşan Sayın Prof.Dr. Yüksel BÖLEK’e ve Doç.Dr.İsmail AKYOL’a teşekkür ederim.Ayrıca laboratuar çalışmalarındaki desteğinden dolayı Arş.Gör. Gül ÖZÇELİK’e, Arş.Gör Ferit Can YAZDIÇ’a, Arş.Gör Fadime TOPÇAL YAZDIÇ’a ve Arş.Gör Elif KÖKSALAN’a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması kapsamında kullanılan boyarmaddeleri sağlayan DystarKimya Sanayi A.Ş.’ye ve Sayın Ersin YAHŞİ’ye teşekkür ederim. Tez çalışmasında kullanılan nylon elyafları sağlayan Polystar Tekstil San. ve Tic. Ltd. Şti.’ne ve Sayın Önal YILDIZ’a; akrilik elyafları sağlayan Aksa Akrilik Kimya San. A.Ş.’ye ve pamuk elyaflarını sağlayan Mipsan Kahramanmaraş İplik San. ve Tic. A.Ş’ye ve Sayın Ali ARDIÇ’a teşekkür ederim. Tezim süresince bana destek veren, laboratuar uygulamalarında fikirlerini ve emeğini eksik etmeyen Uzman Esen TUTAR’a, bana her zaman katlanmak zorunda kalmasının dışında alışması zor alışınca da bırakması zor olan Uzman Alev YILMAZ’a; iyi bir insan olduğunu sadece yüzüne bakarak anlayabileceğiniz samimi ve ender insanlardan biri Kimya Yüksek Müh. Evrim ALP’e; onu tanıdığıma çok sevindiğim samimiyeti ve güler yüzü ile bana enerji veren Kimya teknisyeni Ayten COŞKUN’a ve yardımlarını esirgemeyen diğer tüm ÜSKİM çalışanı arkadaşlarıma teşekkür ederim. Bu güne gelmemde büyük emeği olan, hakkını ödeyemeyeceğim annem Ayşe PARLAKYİĞİT’e ve babam Yılmaz PARLAKYİĞİT’e şükranlarımı sunarım. Bu süreci benimle yaşayan eşim M.Enver ERDAL’a; çocuklarım Gökçe ve Kübra’ya çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
ÇİZELGELER DİZİNİ VII
ŞEKİLLER DİZİNİ X
1. GİRİŞ 1
1.1. Moleküler Biyoloji Metotları 6
1.2. Mikroskopik Analiz Yöntemleri 6
1.3. Spektroskopik Analiz Yöntemleri 7
1.4. Kromatografik Analiz Yöntemleri 8
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 13
2.1. Boyarmaddelerin ve Arkeolojik kazılarda çıkarılan tarihi tekstiller üzerindeki bitkisel boyarmaddelerin sıvı kromatografi(LC) cihazlarında incelenmesi ile ilgili çalışmalar; 13
2.2. Adli delil niteliği taşıyan elyaf üzerindeki boyarmaddenin sıvı kromatografi(LC) tekniği kullanılarak incelenmesi ile ilgili çalışmalar 14
2.3. Boyalı elyafın mikroskobik ve spektroskobik analizleri 19
2.4. Hayvansal liflerin moleküler yöntemlerle tanımlanması 20
3. MATERYAL METOD 23
3.1. Bitkisel, Sentetik ve Hayvansal Liflerin Temini 23
3.2. Boyarmaddeler ve boyama yardımcıları 24
3.2.1. Bazik boyarmaddeler 24
3.2.2. Asit boyarmaddeler 26
3.2.3. Reaktif boyarmaddeler 27
3.3. Liflerin Boyanması 29
3.4. Moleküler Analizler 33
3.4.1. Hayvansal liflerden DNA İzolasyonu 34
3.4.2. DNA agaroz jel elektroforezi 35

3.4.3. Hayvansal lif örneklerinin Mitokondriyal Sitokrom b gen bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) 39
3.5. Mikroskopik analizler 40
3.5.1. Floresan-Işık Mikroskobu 40
3.5.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (EDX analizi ile birlikte) 41
3.6. Spektroskopik analizler 42
3.7. Kromatografik analizler 42
3.8. İstatistik Analizler 43
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 45
4.1. Liflerin boyanması 45
4.2. Hayvansal Liflerin Moleküler Olarak Tanımlanması 46
4.2.1. Hayvansal liflerin orijinlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile belirlenmesi 46
4.3. MikroskobikAnalizler 51
4.3.1. Hayvansal elyafların SEM mikroskopu Analizleri 51
4.3.2. Sentetik ve Bitkisel Liflerin FISH mikroskopu Analizleri 54
4.3.2.1. Boyanmamış elyaf FISH görünümleri 54
4.3.2.2. Karışım boyanmış elyaf FISH görünümleri 55
4.3.2.3. Kırmızı, mavi ve sarı renklerde boyanmış elyaf FISH görünümleri 55
4.3.3. SEM mikroskopu analiz sonuçları 57
4.3.4. SEM-EDX mikroskopu analiz sonuçları 59
4.4. Elyafların spektroskopik analizleri 62
4.4.1.Akrilik elyafın FT-IR analizleri 62
4.4.2. Naylon elyafının FT-IR analizleri 63
4.4.3. Pamuk elyafının FT-IR analizleri 64
4.4.4. Çalışmada kullanılan tüm elyafların FT-IR analizleri 65
4.5. Boyarmaddelerin Kromatografik Analizleri 67
4.5.1. Boyarmaddelerin HPLC Koşulları 67
4.5.2. Boyarmaddelerin HPLC Gradient Koşulları 69
4.5.3. Boyarmaddelerden Standart Çözeltilerin Hazırlanması 71

4.5.3.1. Bazik Boyarmaddelerden Standart Çözeltilerin Hazırlanması (Metot 1) 71
4.5.3.2. Bazik Boyarmaddelerden Standart Çözeltilerin Hazırlanması (Metot 2) 74
4.5.3.3. Bazik Boyarmaddelerden Standart Çözeltilerin Hazırlanması (Metot 3) 74
4.5.3.4. Asit Boyarmaddelerden Standart Çözeltilerin Hazırlanması 77
4.5.4. Boyarmaddelerin Liflerden Ekstraksiyon İşlemleri 81
4.5.4.1. Akrilik Elyaftan Bazik Boyarmaddenin Ekstraksiyon İşlemi 81
4.5.4.2. Naylon Elyaftan Asit Boyarmaddenin Ekstraksiyon İşlemi 82
4.5.4.3. Pamuk Elyaftan Reaktif Boyarmaddenin Ekstraksiyon İşlemi 83
4.6. Bazik boyarmaddelerin HPLC analizleri 84
4.6.1.Bazik boyarmaddelerin HPLC analizleri-Metot 1 84
4.6.2. Bazik boyarmaddelerin HPLC analizleri-Metot 2 85
4.6.3. Bazik boyarmaddelerin HPLC analizleri-Metot 3 85
4.6.4. Bazik boyarmaddeler için Kontrol örneklerinin HPLC analizleri 87
4.7. Asit boyarmaddelerin HPLC analiz metodu 89
4.8. Reaktif boyarmaddelerin HPLC analizleri 89
4.8.1. Reaktif Boyarmaddeler için Kontrol Örnekleri HPLC Analizleri 92
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 95
KAYNAKLAR 97
ÖZGEÇMİŞ 103
EKLER 104

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 3.1. Hayvanların türleri 23
Çizelge 3.2. Akrilik boyamada kullanılan boyarmaddeler 25
Çizelge 3.3. Bazik boyarmaddeler ve kimyasal özellikleri 25
Çizelge 3.4. Naylon boyamada kullanılan kimyasallar ve boyarmaddeler 26
Çizelge 3.5. Asit boyarmaddeler ve kimyasal özelikleri 27
Çizelge 3.6. Pamuk boyamada kullanılan kimyasallar ve boyarmaddeler 28
Çizelge 3.7. Reaktif boyarmadde özelikleri 29
Çizelge 3.8. Liflerin boyama reçeteleri 30
Çizelge 3.9. Bazik boyarmaddelerin doyurma faktörleri (f) 33
Çizelge 3.10. PZR bileşenleri 39
Çizelge 3.11. PZR amplifikasyon şartları 39
Çizelge 4.1. cytB geni üzerinden tasarlanmış primer detayları 48
Çizelge 4.2. Hayvansal elyafların SEM mikroskop görünümleri 52
Çizelge 4.3. Boyanmamış Akrilik, Naylon ve Pamuk elyafların SEM görünümleri 58
Çizelge 4.4. (a) Bazik-Metot 1 (b) Bazik-Metot 2 (c) Bazik-Metot 3 (d) Asit (e) Reaktif boyarmaddeler için Hplc koşulları 67
Çizelge 4.5. (a) Bazik Boyarmaddeler için Su ve Asetonitril (ACN) mobil fazı gradient koşulları; (b) Bazik Boyarmaddeler için Metanol ve su mobil fazı gradient koşulları; (c) Asit Boyarmaddeler için Su (A), Asetonitril (B) ve metanol (C) mobil fazları gradient koşulları; (d) Reaktif Boyarmaddeler için Su, dihexylamnonium acetate ve metanol mobil fazları gradient koşulları 70
Çizelge 4.6. Stok çözeltiden alınacak miktar 72
Çizelge 4.7. Bazik Boyarmaddeler için Kalibrasyon Çözeltileri-Metot 1 73
Çizelge 4.8. Stok çözeltisinden alınacak miktar 74
Çizelge 4.9. Ana stok çözeltisinden alınacak miktar 75
Çizelge 4.10. Bazik Boyarmaddeler için Kalibrasyon Çözeltileri-Metot 3 76
Çizelge 4.11. Stok çözeltiden alınacak miktar 77

Çizelge 4.12. Asit Boyarmaddeler için Kalibrasyon Çözeltileri 78
Çizelge 4.13. Ana stok çözeltisinden alınacak miktar 79
Çizelge 4.14. Reaktif Boyarmaddeler için Kalibrasyon Çözeltileri 80
Çizelge 4.15. Akrilik Elyaf Kontrol Örnekleri 82
Çizelge 4.16. Naylon Elyaf Kontrol örnekleri 82
Çizelge 4.17. Kontrol örnekleri 84
Çizelge 4.18. Bazik boyarmaddelerin maksimum absorbanstaki dalgaboyları ve alıkonma süreleri 85
Çizelge 4.19. Bazik Boyarmaddelerin Maksimum absorbansı ve alıkonma zamanları 87
Çizelge 4.20. Aynı cins bazik boyarmaddelerin farklı renklerinin karışımı ile boyanan kontrol örneklerinde her bir boyarmaddenin konsantrasyonlarının belirlenmesi 88
Çizelge 4.21. Asit Boyaların Maksimum absorbansı ve alıkonma süreleri 89
Çizelge 4.22. Reaktif boyaların maksimum absorbansı ve alıkonma zamanları 91
Çizelge 4.23. Aynı cins boyarmaddelerin farklı renklerinin karışımı ile boyanan kontrol örneklerinde her bir boyarmaddenin konsantrasyonlarının belirlenmesi 92

ŞEKİLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Özel hayvansal liflerin sınıflandırılması 2
Şekil 1.2. HPLC Cihazı temel kısımları 11
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan hayvansal lif örnekleri 24
Şekil 3.2. Ataç HT boyama makinesi 30
Şekil 3.3. Boyamalarda sıcaklık-zaman değişim grafiği (a) Akrilik elyaf için (b) Naylon elyaf için (c) Pamuk elyaf için 32
Şekil 3.4. Steril kabin içerisinde elyaf örneklerinin etanol ile yıkanması ve kurutulması 35
Şekil 3.5. Agaroz jelin hazırlanması 36
Şekil 3.6. Agaroz jeli küvete dökme işlemi 36
Şekil 3.7. DNA ladder markeri 37
Şekil 3.8. Örneklerin Agaroz Jel'e yüklenmesi 37
Şekil 3.9. Jel elektroforez tankı 38
Şekil 3.10. Jel görüntüleme sistemi 38
Şekil 3.11. FISH Mikroskobu 40
Şekil 3.12. SEM-EDX Mikroskobu 41
Şekil 3.13. Cressington marka altın ve karbon kaplama cihazı 41
Şekil 3.14. FT-IR cihazı 42
Şekil 3.15. Çalışmada kullanılan HPLC cihazı 42
Şekil 4.1. Ham ve Boyanmış akrilik elyafları a) ham akrilik b) karışım boyanmış akrilik c) kırmızı boyalı akrilik d) mavi boyalı akrilik e) sarı boyalı akrilik 45
Şekil 4.2. Ham ve Boyanmış naylon elyafları a) ham naylon b) karışım boyanmış naylon c) kırmızı boyalı naylon d) mavi boyalı naylon e) sarı boyalı naylon 46
Şekil 4.3. Ham ve Boyanmış pamuk elyafları a) ham pamuk b) karışım boyanmış pamuk c) kırmızı boyalı pamuk d) mavi boyalı pamuk e) sarı boyalı pamuk 46
Şekil 4.4. Mitokondriyal DNA bölgesinin şematik gösterimi 47

Şekil 4.5. Hayvan liflerinden izole edilen DNA'lar kalıp olarak kullanıldığında cytB bölgesinden amplifiye edilen PCR ürünleri; M: Referans ladder (100 bp ladder); 1: At; 2: koyun; 3: sığır; 4: tavşan; bant 5: kedi 49
Şekil 4.6. Çeşitli hayvan tüylerinin Cytb bölgesine ait PCR ürünleri, Bant M: nükleik asit uzunluk referans cetveli (100 bp ladder); Bant 1: At, koyun, tavşan ve kedi; Bant 2: At ve tavşan; Bant 3: Tavşan ve kedi; Bant 4: At, koyun, sığır ve kedi; Bant 5: at, koyun, sığır, tavşan ve kedi..... 50
Şekil 4.7. Hayvansal liflerinin SEM-EDX cihazındaki enine kesit görünümleri (a) at (b) koyun (c) sığır (d) tavşan (e) kedi..... 53
Şekil 4.8. Boyanmamış elyaf görünümleri (a)akrilik (b) naylon (c) pamuk..... 54
Şekil 4.9. Boyanmış elyaf görünümleri (a) akrilik (b) naylon (c) pamuk..... 55
Şekil 4.10. Akrilik elyafı (a) Kırmızı (b) mavi (c) sarı renklerde boyanmış 56
Şekil 4.11. Naylon elyafı (a) Kırmızı (b) mavi (c) sarı renklerde boyanmış 56
Şekil 4.12. Pamuk elyafı (a) Kırmızı (b) mavi (c) sarı renklerde boyanmış..... 57
Şekil 4.13. Bazik boyarmaddelerle karışım boyanmış akrilik elyafına ait ölçümler 59
Şekil 4.14. Boyanmamış akrilik elyafına ait ölçümler..... 59
Şekil 4.15. Reaktif boyarmaddelerle boyanmış pamuk elyafına ait ölçümler 60
Şekil 4.16. Boyanmamış pamuk elyafına ait ölçümler 60
Şekil 4.17. Asit boyarmaddelerle karışım boyanmış naylon elyafına ait ölçümler 61
Şekil 4.18. Boyanmamış naylon elyafına ait ölçümler 61
Şekil 4.19. Akrilik elyafın FT-IR spektrumları..... 63
Şekil 4.20. Naylon elyafının FT-IR spektrumları 64
Şekil 4.21. Pamuk elyafının FT-IR spektrumları..... 65
Şekil 4.22. Boyanmamış elyafların FT-IR spektrumları..... 66
Şekil 4.23. Hazırlanan stoklar..... 71
Şekil 4.24 Sırasıyla kontrol elyaflardan ekstrakte edilen boyalı ekstraktlar..... 81

Şekil 4.25. Kontrol elyafların ekstraksiyon sonrası Eppendorf tüpü içindeki görünümü 81
Şekil 4.26. Standart boyarmaddelerin kalibrasyon grafikleri; a) Astrazon Flavine 10 GFFSarı bazik boyarmadde (430 nm); b)Astrazon Blue FGRL micro 200 % Mavibazik boyarmadde (598 nm); c) Astrazon Red GTLN 200% micro Kırmızı bazik boyarmadde(498 nm) 87
Şekil 4.27. Standart boyarmaddelerin kalibrasyon grafikleri: a)Remazol Gol den Yellow RNL gran 150 % (Sarı); b) Remazol Red RB-A 133 % (Kırmızı)reaktif boyarmadde (524 nm); c) Remazol Br. Blue R spc 160% (Mavi) reaktif boyarmadde (606) 91

1. GİRİŞ

İnsanlar günlük yasamlarında tekstil yüzeyler ve aksesuarları ile daima temas içindedirler. Suç da insanın günlük yaşamı içinde gerçekleşen bir olgu olduğundan, suçun gerçekleşmesi esnasında mağdur ve fail olan kişilerin tekstil yüzeyler ve aksesuarları ile teması kaçınılmazdır.

Delil, hukuki bir ihtilafı veya suçu ispatlamaya yarayan, ikamesi hukuk tarafından yasaklanmamış her türlü vasıtadır (Kaygısız ve ark, 2002). Meydana gelen olaylar sonrası delillendirme amacıyla, olay yerinde ve olayla ilgili kişiler üzerinde inceleme ve araştırmalar yapılmaktadır. Bu faaliyetlerin tümüne, "olay yeri incelemesi" denir (Dinler, 2004). Olay yeri incelemenin temel amacı, olayın çözümünü sağlayacak delillerin tam, sağlam ve usulüne uygun bir sekilde toplanmasını ve değerlendirilmek üzere ilgili laboratuara iletilmesini sağlamaktır. Olayı doğrudan veya dolaylı bir sekilde aydınlatmayı sağlayacak her türlü materyal delil olarak değerlendirilebilir. Herhangi bir seyin delil niteliği taşıması için mantıklı, kullanılabilir, olayla ilgili olması ve hukuka uygun olarak elde edilmesi gerekir. İfade ve belge deliller dışında kalan ve gözle görülüp, elle tutulabilen bütün deliller "maddi delil" olarak kabul edilir.

Bir suç sonrası, olay yerinde ve kişiler üzerinde yapılan incelemelerde tekstil yüzey ve aksesuarları göz ardı edilmemeli ve olayın çözümünde kullanılmalıdır. Kimi zaman olayın aydınlatılması için tek delil, kumaş parçası, küçük bir elbise ipi, lifi veya düğme vb. olabilir. Bu nedenle tekstil yüzeyler ve aksesuarları daha itinalı bir şekilde araştırılmalı, korunmalı ve delil olarak kullanılmalıdır. (İşbilen ve Dinler, 2004). Locard değişim esasına göre öncelikle bir kişi herhangi bir nesne ya da başka bir kişi ile temas ettiğinde delillerde bir aktarım meydana gelir. Bu sayede, şüpheli ile suçlu arasında bir bağlantı kurulması sağlanır.

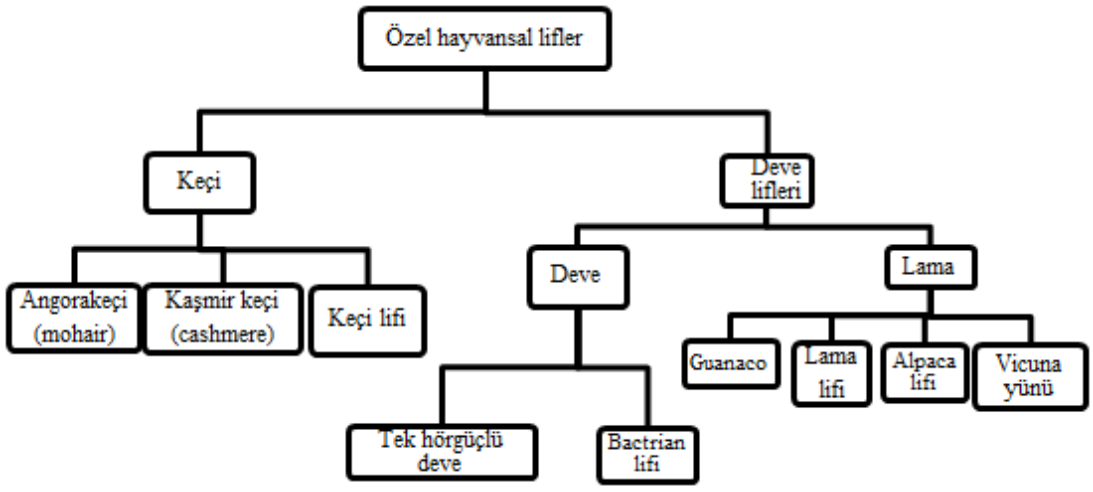
İlgisiz lifler olumlu bir şekilde uyarsa, tesadüfî temas olasılığı düşerken, kasıtlı temas olasılığı artar.

Çalışmada; daha hassas araştırma gerektiren lifler (hayvansal; bitkisel ve sentetik) tercih edilmiştir. Günlük hayatta kıyafetlerde en çok kullanılan bitkisel lif pamuk; en çok kullanılan sentetik liflerden naylon ve akrilik seçilmiştir; bu liflerin

boyanmasında ise boyarmadde olarak da endüstride en çok kullanılan boyarmaddeler olan reaktif, asit ve bazik boyarmaddelerle çalışılmıştır. Hayvansal liflerden ise kıyafetlerin ve ayakkabıların yapımında en çok tercih edilen, olay yerinde kalma ve bulunma ihtimali yüksek, koyun, tavşan, at, sığır ve kedi gibi hayvanların lifleri kullanılmıştır.

Hayvansal lifler; yumuşak ve lüks tekstil giyim üretmek için kullanılırlar. Koyun (yün) ilgili hayvansal liflerin içinde en sık kullanılan hayvansal elyaftır. Bununla birlikte, büyük miktarlarda giyim ve diğer tekstil ürünlerinin üretiminde kullanılmaktadır. Bunlar bazen tek başına kullanılır, bazen de koyun yünü ile birlikte bir tür ek görünümlü güzellik, doku, renk, yumuşaklık, esneklik, dayanıklılık ve parlaklık veya maliyetini azaltmak üzere özel efektler üretmek için farklı hayvansal elyaflar da kullanılmaktadır.

Bu liflerin en büyük grubunu, keçi, deve, özel saç telleri olarak bilinen ve yün altında sınıflandırılan türler oluşturur. Genel olarak giyim ürünleri için kullanılan çeşitli hayvan lifleri, Şekil 1.1 'de gösterilmiştir. Ek lifler sığırlar, atlar, misk öküzü ve tavşanlar gibi çeşitli kürk hayvanlarından alınanlar olarak sayılabilir.



Şekil 1.1. Özel hayvansal liflerin sınıflandırılması

Bitkisel lifler, sağlık ve bakım şartlarının kolay olması nedeniyle kullanım alanları en geniş doğal liflerdir. Bitkinin tohumundan, gövdesinden, yaprağından, meyvesinden elde edilebilen ve doğrudan tekstil hammaddesi olarak kullanılabilen

lifler bu sınıfta yer almaktadır. Pamuk bitki tohumundan elde edilen elyaf grubundadır. Nem çekme özelliği; kendi ağırlığının %85'i kadar olduğundan özellikle yaz aylarında kıyafetlerde en çok tercih edilen liftir. Pamuk lifi; gömlekler, bluzlar, elbiseler, etekler, iş giysileri, bebek çamaşırları, havlular, iç giyim, telalar, perdeler, halılar, döşemelik kumaşlar, yatak takımları, eldiven, eşarp, şapka, çorap ve ipliklerde kullanılır.

Sentetik lifler; kimyasal sentez yoluyla petrol, taş kömürü ve kimyasal ilaveler gibi sentetik maddelerden elde edilirler. Çalışma için seçilen iki sentetik elyaftan biri olan poliamid (naylon); ince çoraplar, mayo, spor giysileri, süveter, yelken, balık ağları ve duvardan duvara halı, bukleli iplik, iç çamaşırları ve tekstil ürünlerinin ve yapımında kullanılır.

Çalışma için seçilen ikinci sentetik elyaf olan poliakrilonitril (PAN lifi) yani akrilik ise, çok iyi ve kabarık şekilde tekstürize edilebildiğinden iyi ısı tutma özelliğine sahiptir. Yüne benzer olmasına rağmen keçeleşmez. Tente, eşofman, döşemelik kumaşlar, masa örtüleri, halılar, battaniyeler, örgü iplikleri, erkek ve kadın triko giysileri yapımında kullanılır.

Elyaf analizi için kullanılan yeni analitik teknikler hem tahribatsız ve hem de yıkıcı yöntemleri içerir. Tahribatsız teknikler mikroskopi, spektroskopi ve ultraviyole-görünür mikrospektrofotometri (UV-vis MSP) içerir. Adli amaçla yaygın kullanılan mikroskopi formları; Fourier transform infrared (FT-IR) mikroskobisi; polarize ışık mikroskopisi (Goodpaster ve Liszewski, 2009) karşılaştırma mikroskopisi ve taramalı electron mikroskopisi (SEM-EDS). Tahribatlı teknikler ise kimyasal yöntemlerle tamamen çözünmesi ya da elyafın özelliğini kaybedip, başka bir analiz yapılamayacak şekilde tahrip olmasıdır.

Tek tekstil liflerini tanımlama yöntemleri ve hayvansal tür tayini doğrulamaları adli uygulamalar için önemli olup, ön işlemsiz tahribatsız yöntemlerin uygulanması için büyük potansiyele sahiptir (Appalaneni ve ark. 2014).

Hayvansal elyaf tanımlama, genelde ışık mikroskobu (LM) ya da taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanan bir uzman analist tarafından yapılır (International Wool Textile Organisation, 2000; International Standards

Organization, 2007 ; ASTM International, 2008; American Association of Textile Chemists and Colorists, 2012).

En yaygın kullanılan standart test prosedürleri olan ASTM TM D629-08, IWTO TM 58-00, AATCC TM 20A- 2012, ve ISO 17751; LM veya SEM veya her iki mikroskoplar birden kullanılarak kimlik tespiti esasına dayanmaktadır. LM'ye dayalı test yöntemi, liflerin iç ve dış yapısı hakkında bilgi sağlarken; şekil, kütikül morfoloji, iç pigmentasyon ve medullasyon ayrıntılarını gösterir.

Öte yandan, SEM yöntem yüksek çözünürlükte üst deri hücrelerinin ince yapısını verir. Mikroskobik test yöntemi ne olursa olsun standartlar, genellikle özneldir çünkü; güvenilir elyaf analizinde, analistin deneyimleri önemlidir. Ancak, son on yıldır, hayvansal lifleri tanımlamak için çeşitli test yöntemleri geliştirilmiştir.

Bu yöntemler temel olarak dört gruba ayrılmaktadır: 1) sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi ile protein fraksiyonlarının ekstraksiyonu ve analizi gibi kimyasal yöntemler (SDS-PAGE), (Thomson ve ark, 2010); kortikal hücre ayrımı ve iç ve dış lipid analizleri; 2) yakın IR dahil enstrümantal yöntemler (Guan ve Long, 2007); 3) CCM ya da görüntü analizi ile daha iyi mikroskobik analiz; (Wang ve ark., 2011) dalga doku analizi (Zhang ve ark., 2010) ve yapay sinir ağı (Shi ve Yu, 2011); ve 4) DNA polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon parça uzunluk polimorfizm gibi moleküler biyoloji yöntemleri (PCR-RFLP) (Jin ve ark., 2011), ve monoklonal antikorlar üreterek immünolojik yöntem.

Her yöntemin mikroskobik yöntem yerine geçecek gibi uygun olduğu iddia edilmiştir. Hayvansal liflerde en güvenilir test yöntemleri, moleküler biyolojik yöntemlere dayalı olup, moleküler DNA teknolojisi olarak söylenebilir. Tanınabilir morfolojik özellikleri olmadan numunelerin türlerinin belirlenmesi için DNA temelli yaklaşımlar daha uygundur.

Çalışmada, hayvansal lifler, mitokondriyal DNA tabanlı moleküler teknikler kullanılarak incelenecektir. DNA'larının ekstrakte edilmesi ve DNA dizilimlerinin tespiti ile hayvansal lif orjininin tayini yapılacaktır.

Bitkisel ve sentetik liflerin tanımlamasında bilinen ve sorgulanan elyafın mikroskobik kıyaslaması ilk önce yapılmalıdır. Daha sonra IR-spectroskopi ile referans, bilinen ve sorgulanan elyafın spektrumları incelenir. Yine bir sonuç elde

edilemez ise elyaftan boyarmadde ekstraksiyonu ve kromatografik metotlar kullanılmalıdır. (Carey ve ark., 2013)

Çalışma, kriminal açıdan suçlu ile şüphelinin kıyaslanması esnasında ortaya çıkabilecek karışıklıkların elyaf ve üzerindeki boyarmaddelerin ayırt edilmesine dair metotlarla ve olay yerinden alınan kürk kıyafet delillerinin DNA'ya dayalı tekniklerle tayin edilmesiyle aydınlanmasına odaklanmıştır.

Dolayısıyla henüz adli anlamda; bu tezde kullanılan gruplardaki reaktif, asit ve bazik boyarmaddelerle boyanmış pamuk, naylon ve akrilik liflerden boyarmadde ekstraksiyonu ve HPLC'de tanımlanması yapılmamıştır. Ayrıca koyun, keçi vb. kürk hayvanlarının ayırt edilmesine yönelik bir çalışmaya kriminal çalışmalarda rastlanmamıştır.

Türkiye'de yapılan araştırma sonucu adli elyaf analizlerini Kriminal Polis Laboratuarlarının yaptığı anlaşılmıştır. Bu analizler mikroskobik ve enstrümantal olarak yapılırken, mikroskop kullanımında liflerin kalınlık, renk farkı gibi özeliklerine bakılmaktadır. Aynı renkteki lifler içinse elektron mikroskobunda enine ve boyuna kesitler alınıp incelenirken aynı zamanda elementel tayini de yapılarak ayırt etmeye çalışılmaktadır. Enstrümantal tayinlerde ise FT-IR kullanılarak elyaf ve boyarmadde tespiti gerçekleştirilmektedir.

Dolayısıyla Türkiye'de mevcut kriminal çalışmaları içinde de, elyaftaki boyarmaddeyi ekstrakte edip, boyarmadde veya boyarmaddelerin ayrıntılı tespiti ve kıyaslaması şeklinde bir çalışma henüz yapılmamıştır. Çalışma bu konudaki eksiklikleri giderecek özellikte olup özgün değer taşımaktadır.

Ayrıca olay yerinde bulunan tekstil elyafındaki boyarmaddenin ve kürk ürünlerinin, bilimsel açıdan en üst metotların kullanılarak incelenmesi yolu ile adli vakalarda yanlış kararların verilmesi engellenmiş olacaktır. Çalışma sonuçları adli vakaların aydınlatılmasına ve tekstil analizinde duyarlı tekniklerin geliştirilmesi açısından yenilik taşımaktadır.

Çeşitli tekstil materyalleri üzerindeki boyarmaddeleri kalitatif ve kantitatif olarak tayin edebilmek için bu hassas cihazlarda henüz standart deney prosedürlerinin ve metotlarının henüz tam oturmadığını ve aynı zamanda hassas cihazların kullanılmadığı düşünülürse mevcut klasik tayin yöntemlerinde lif

kayıplarının gerçekleşebileceği söylenebilir, dolayısıyla bu çalışmanın tekstil endüstrisine ve tekstil mühendisliğinin adli olayların çözümüne olumlu katkı yapacaktır.

Özetle tez çalışmasında, hayvansal liflerin analizleri DNA temelli moleküler teknikler kullanılarak, akrilik, naylon ve pamuk elyafların ve bunların boyanmasında kullanılan boyarmaddelerin ise mikroskopik, spektroskopik ve kromatografik analizleri yapılmıştır.

1.1. Moleküler Biyoloji Metotları

Genetik, biyoteknoloji, moleküler biyoloji, biyokimya ve adli tıp alanlarında, genetik materyal üzerine yapılan araştırmaların ön çalışması olarak DNA izolasyonu, büyük öneme sahip bir aşamadır. Tüm yüksek yapılı organizmaların genomlarındaki bir veya daha fazla özelliğin karakterizasyonu DNA bantlarının ortaya koyulmasıyla olur. Farklı büyüklükteki ve farklı sayıdaki DNA bantlarının ortaya koyulması ile her birey için DNA parmakizi elde edilmiş olur. DNA profilinin çıkarılması ve spesifik DNA parmak izlerinin elde edilmesinde izlenen yollar aşağıdaki gibidir:

Materyalin sağlanması,

Materyallerden DNA izolasyonu,

Kullanılacak yönteme göre, genetik materyalin çoğaltılması ve ortaya koyulması (PZR),

Bireyler arasındaki polimorfizimin farklı moleküler markır teknikleri ile belirlenmesi (RFLP, RAPD, AFLP, ISSR),

DNA profilinin spesifik bir programda analiz edilmesidir

1.2. Mikroskopik Analiz Yöntemleri

Floresan-Işık Mikroskobu ve Taramalı Elektron Mikroskobu (EDX analizi ile birlikte) çalışmanın bu bölümü için kullanılmıştır.

Floresan-Işık Mikroskobu; ışık mikroskobu olması ile birlikte, esasen floresan maddelerle spesifik olarak boyanmış hücre ve doku preparatlarının karanlıkta görüntülenmesini de sağlayan özelliğe sahip ileri araştırmalarda kullanılan bir mikroskoptur. Bu yönteme FISH (Fluorescence In Situ Hybridisation) adı verilir.

Taramalı elektron mikroskobunda ise temel prensip, örnek yüzeyinden yansıyan elektronların bir toplayıcıda birikmesi ve bu biriken elektronların bir takım yansıtıcılar yardımı ile görüntü haline getirilmesidir. Burada en büyük sorun alınan organik veya inorganik materyal üzerinde elektronların birikerek görüntü kayıplarına neden olması ya da elektron geçirgen örnekten yansımanın yeterince olmamasıdır ki, bu da örnek hazırlanma esnasında kullanılan kaplama maddeleri ile engellenmektedir. Kaplayıcı ajan olarak altın, palladyum, gümüş, karbon ve alüminyum kullanılmaktadır. Özellikle hassas inorganik veya organik materyallerin elektron demetinin oluşturduğu akım gücü altında zarar görmesi (büyük büyütmelerde önemli ölçüde görüntü kayıplarına neden olmaktadır) kaplama yöntemiyle engellenmektedir.

Taramalı elektron mikroskobu tekniği, adli tıp bilimi ve diğer görüntüleme teknikleriyle uğraşanlara daha kolay ve büyük büyütmelere çıkma olanağı sağlaması yönünden avantaj sağlamaktadır. Kriminal olayların aydınlatılmasında elektron mikroskobunun kullanımı çok yaygın olup organik olmayan materyal (lif, ip, kumaş parçası ve mukayeseleri, oto boya analizi, cam analizi vs.) ve biyolojik materyal (Saç ve vücut kıllarının analizleri, iskelet kalıntılarının incelenmesi, leke incelemeleri vs.) analizlerinde kullanılmaktadır.

1.3. Spektroskopik Analiz Yöntemleri

Spektroskopi, ışın-madde etkileşmesini inceleyen bir bilim dalı olup, bir örnekteki atom, molekül veya iyonların bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımanın ölçülmesi ve değerlendirilmesi şeklinde de tanımlanabilmektedir.

Spektroskopinin farklı çeşitleri vardır; UV Görünür Bölge Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi, IR Spektroskopisi, Raman Spektroskopisi, NMR

Spektroskopisi, X-Işınları Spektroskopisi, Radyokimya, Kütle Spektroskopisi, Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi ve Atomik Emisyon Spektroskopisi.

İnfrared spektroskopisi ise, maddenin infrared ışınlarını absorplaması üzerine kurulmuş bir spektroskopi dalıdır. IR spektroskopisi, daha çok yapı analizinde kullanılır ve çoğu kez elektronik ve NMR spektroskopisiyle birlikte uygulanır. Her maddenin kendine özgü bir IR spektrumu vardır.

Fourier Transform Infrared (Kızılötesi) Spektroskopisi (FTIR); Kızılötesi (IR) absorbsiyon spektroskopisi bir tür titreşim spektroskopisidir; IR ışınları molekülün titreşim hareketleri tarafından soğurulmaktadır. Matematiksel Fourier dönüşümü spektroskopisinde ışıma şiddeti, zamanın bir fonksiyonu olarak alınır. Her dalga boyunu ayrı ayrı tarama gerekmeksizin hızlı ve yüksek çözünürlükte spektrumlar elde edilebilir.

FTIR-ATR (Attenuated Total Reflectance); absorpsiyon bantlarının dalga boyunda azalma meydana getirilerek daha az emekle ve örnek kalınlığından bağımsız olarak soğurganlığı çok fazla olabilen farklı maddelerin spektrum analizlerine olanak sağlar. ATR tekniğinin temelinde ışının numune tarafından soğrulup yansıtılması (geçirgenlik metodu) yerine ışının örnekten saçılımı ölçülür. ATR Tekniği polimer, köpük, tekstil, boya, sır gibi kaplama maddelerin analizlerinde oldukça etkindir.

Gaz, sıvı ve katı örnekler incelenebilir. Polar olmayan ve hidrojen içermeyen CS2, CCl4 gibi çözücülerden kullanılır. Katı örneklerin KBr ile tabletleri yapılarak incelenir. Çekilen spektrumlar, kütüphanelerdeki spektrumlarla karşılaştırılarak nitel analiz yapılır.

1.4. Kromatografik Analiz Yöntemleri

Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. Çeşitli maddelerin hareketli faz yardımıyla, sabit faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanır.

Kromatografi'nin Sınıflandırılması; ayrılma mekanizmalarına göre, uygulama biçimine göre ve faz tiplerine göre yapılmaktadır.

Ayrılma mekanizmalarına göre kromotografi; Adsorpsiyon kromatografisi, Partisyon kromatografisi, İyon değiştirme kromatografisi, Jel filtrasyon kromatografisi, iyon çifti kromatografisi ve afinite kromatografisi gibi kısımlara ayrılır.

Uygulama biçimine göre kromotografi; Düzlemsel kromatografi, Kağıt kromatografisi, İnce tabaka kromatografisi (TLC), Kolon kromatografisi, Gaz kromatografisi (GC), Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi kısımlara ayrılır.

Faz tiplerine göre kromotografi ise; Sıvı kromatografisi [Sıvı-Katı kromatografisi, Sıvı-Sıvı kromatografisi] ve Gaz kromatografisi [Gaz-Katı kromatografisi, Gaz-Sıvı kromatografisi] olarak gruplara ayrılır.

Bu çalışmada uygulama biçime göre kromatografi çeşitlerinden olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır. Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi, sıvı fazda çözünebilen bir kimyasal karışımın kolay ve hızlı bir şekilde bileşenlerine ayrılabildiği oldukça duyarlı bir kromatografik yöntemdir (Sousa ve Conceição Oliveira, 2010). Uygun çözücü kullanılarak çözülen örnek karışımı yüksek basınç altında kromatografik kolondan geçirilir ve burada bileşenlerine ayrılır. Bileşenlerin birbirinden ayrılması ve bunun derecesi önemlidir ve çözünmüş bileşenler ile sabit faz arasındaki etkileşime bağlıdır (Ünsal, 2006).

Bu yöntemde, sabit faz olarak kullanılan dolgu maddelerinin tanecik boyutunun küçültülmesi sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylece kolonun etkinliği arttırılmış olur. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için basınç uygulanması gerekir.

HPLC sistemi pompa, enjektör, kolon dedektör ve bilgisayar birimlerinden oluşmaktadır. Bu sistemin önemli bir bölümü ayırmanın gerçekleştiği kolondur. Kromatografik analiz süreci çözücüde çözünmüş örneğin sisteme enjekte edilmesi ile başlar. Hareketli (sürekli) faz ile birlikte kolona pompalanan örnek, kolon içinde

bileşenlerine ayrılmaya başlar. Her bileşenin gönderdiği sinyaller dedektör tarafından kaydedilir ve kromatogram olarak adlandırılır.

HPLC uygulamalarında mobil ve bileşimi kromatografik performansı etkileyen faktörlerden biridir. Mobil faz yüksek derecede saf, dedektör ile uyumlu, düşük viskoziteli ve örneği çözebilme gücüne sahip olmalıdır.

Sabit faz ise, 3-10 µm partikül boyutunda, olabildiğince eşboyutlu, ortalamanın ± % 10'una denk gelecek partikül boy dağılımına sahip, 70-300 Å gözenek boyutunda ve 50-250 m^2/g yüzey alanında olmalıdır.

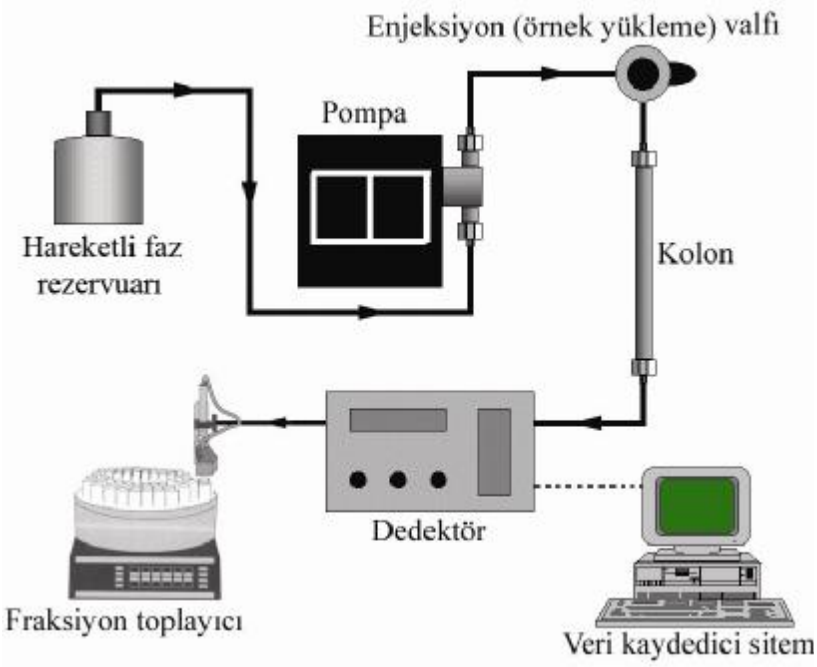
Uygun çözücüde çözünen örneğin bu sabit faz ve sürekli faz yatağıyla etkileşmesi için yüksek basınçlı pompalar kullanılmaktadır. Kullanılan partiküllerin boyutu küçüldükçe uygulanan basıncın da arttırılması gerekmektedir. Küçük partiküller; yüksek çözünürlük, hızlı analiz ve yüksek örnek yükleme kapasitesi gibi avantajlara sahiptir. Modern pompalar; 0.01-10 ml/dak arasında akış hızı; % 1'den fazla sapmayan akış hızı kararlılığı ve 5000 psi'ya kadar çıkabilen maksimum basınç değerine sahiptir. Örnek bileşenleri dedektörden geçerken, UV absorbans, floresans emisyon ya da kırılma indisindeki değişimden dolayı ışık şiddetindeki değişim belirlenir ve kaydedilir. Belirlenen bu değişimler (kromatogramlar) üzerinden alıkonma süreleri, pik alanları gibi değerler tayin edilerek, kolon performans parametreleri hesaplanır. Sıvı kromatografisinde en çok kullanılan dedektör tipi UV absorbans dedektörleridir. Bu dedektörler ile 190-600 nm aralığında analiz mümkün olmaktadır.

Günümüzde HPLC, birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Başlıca kullanım alanları bileşen ayırma, saflaştırma, tanımlama ve derişim tayinidir.

HPLC'de bileşen ayırma işlemi, her maddenin belli bir sabit faz ve mobil faz bileşiminde farklı çıkış süresinin olmasından yararlanılarak yapılmaktadır. Saflaştırma; ise hedeflenen bir maddenin diğer maddelerden ya da atıklardan ayrılması işlemidir. Her maddenin belli kromatografik koşullar altında karakteristik bir piki bulunur. Ayrılması istenen maddeye göre ve diğer maddelerle olan ilişkisine göre koşullar belirlenir. Kromatografik saflaştırma işleminde, istenilen madde kolon çıkışında toplanarak diğer fraksiyonlardan izole edilir. HPLC'de madde tanımlaması, bilinmeyene ait olan pik alıkonma süresinin standarda ait alıkonma süresiyle

çakıştırılması ile yapılabilir. Herhangi bir maddenin HPLC ile tanımlanabilmesi için öncelikle dedektörün doğru seçilmesi gerekir. Dedektör seçildikten ve optimum koşullarda ayarlandıktan sonra bir ayırma analizi yapılmalıdır. Tanımlanmaya çalışılan maddenin seçilen dedektör ve analiz koşullarında kabul edilebilir bir çıkış süresi ve belirgin bir piki olmalıdır. Çıkış süresini kısaltmak için bazı ayarlamalar yapılabilir. Bunlardan ilki kolon seçimi, diğeri mobil faz seçimi ve son olarak da akış hızı seçimidir. Kesin bir tanımlama için bilinen bir örneğin kullanılması gerekir. HPLC'de tanımlı bir maddenin, bir sıvı çözeltisinde derişimi tayin edilebilir. Bu işlem istenilen maddenin değişik konsantrasyonlarda HPLC'ye enjekte edilmesi işlemini içerir. Bilinen konsantrasyonlar bir seri pik verir. Bu piklerin altında kalan alanlar hesaplanarak derişime karşı grafiğe geçirilir ve kalibrasyon grafiği çizilir. Bilinmeyen derişime ait pik alanı saptanarak kalibrasyon eğrisi aracılığıyla bilinmeyen derişim bulunur.

HPLC; tekstil alanında pestisit analizlerinde, boyarmadde analizlerinde ve diğer organik madde analizlerinde kullanılmaktadır. Klasik bir HPLC sistemi Şekil 1.2'de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. HPLC Cihazı temel kısımları

HPLC türleri, normal faz kromatografisi, ters faz kromatografisi, büyüklükçe ayırma kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi olarak 4 gruba ayrılır.

HPLC'de kullanılan sürekli fazın polaritesi ayırma işleminde önemli rol oynar. İki farklı elüsyon tipi vardır: İzokratik Elüsyon ve Gradient Elüsyonu. İzokratik elüsyonda; kolona sabit bileşimdeki sürekli faz pompalanır. Sürekli fazın polaritesi sabit olduğu için kolona çok fazla ilgi duyan bileşenleri kolondan atmak zorlaşır ve elüsyon süresi uzar. Maddelerin molekül büyüklüğüne göre tayini de bu elüsyon türü ile gerçekleşir. Gradient Elüsyonda ise sürekli faz bileşimi analiz boyunca doğrusal olarak değişir. Analiz örneğinin kolon dolgu materyali yüzeyine afinitesi önemlidir. Ortamdaki eluentin polaritesi zamanla değiştirilerek örneklerin partikül yüzeyine afinitesi değiştirilir ve ayırma sağlanır (Tuncer 2008).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bu bölümde tez kapsamına uygun olarak literatürde yer alan çalışmalar dört bölüme ayrılarak incelenmiştir. i- boyarmaddelerin ve arkeolojik kazılarda çıkarılan tarihi tekstiller üzerindeki bitkisel boyarmaddelerin sıvı kromatografi(LC) cihazlarında incelenmesini içeren çalışmalar; ii- adli delil niteliği taşıyan elyaf üzerindeki boyarmaddenin sıvı kromatografi (LC) cihazlarında incelenmesi ile ilgili çalışmalar, iii- boyalı elyafın mikroskobik ve spektroskobik analizlerini içeren çalışmalar, iv- ise Kürk ürünlerin moleküler anlamda incelenmesi ile ilgili ve konunun anlaşılmasına ışık tutulabilecek çalışmalar verilmiştir.

2.1. Boyarmaddelerin ve Arkeolojik kazılarda çıkarılan tarihi tekstiller üzerindeki bitkisel boyarmaddelerin sıvı kromatografi(LC) cihazlarında incelenmesi ile ilgili çalışmalar;

Blanc ve ark, (2006) çalışmalarında; tarihi haritalarda ve çizimlerde kullanılan doğal boyarmaddelerin HPLC-DAD ile tanımlanması için metot geliştirmişlerdir. Carminic asit, indigotin, crocetin, Jambogic asit, alizarin ve purpurin için kromatografik alıkoyma zamanları çalışılmıştır. Mobil faz 40 mM, SDS-10 mM fosfat tampon çözeltisi pH 2.3),% 0,1 TFA (eluent A) ve asetonitrilden (eluent B) programlanmış bir gradyan (5% B% 95 B) kullanarak oluşturulmuştur. Analizleri (250mm × 4.60mm bir Phenomenex, Luna 5u NH2 100a kolon kullanılarak yapılmıştır (id, 5 µm parçacık). 0.6 ml dak^{-1} debi, 20 µl enjeksiyon ve 35 $^{\circ}$C kolon sıcaklığı çalışma koşulları olarak uygulanmıştır. Örneklemede kullanılan yeni bir teknik ile Granada'daki 'the Royal Chancellery'ye ait tarihi haritalardan alınan doğal boyarmadde numunelerinin ekstraktları başarıyla analiz edilmiştir.

Sousa & Conceição Oliveira (2010); master tezinde Smithsonian's Helmut Schweppe Koleksiyonu'ndan 62 adet ilk sentetik boyaların analizini HPLC-DAD-MS'de yapmıştır. 62 boyayı karakterize etmek amacıyla çeşitli kromatografik ve kütle parametreleri optimize edilmiştir. Bu yaklaşım aynı zamanda seçilen doğal boyalara uygulanmıştır. Çünkü ilk sentetik boyaların doğal biyolojik kaynaklardan

elde edilen boyalarla birlikte boyadığı bilinmektedir. HPLC-DAD-MSn analizi öncesinde, yumuşak ekstraksiyon yöntemleri boyalı tekstil üzerinde test edildi. Mevcut çalışmada, 11 kimyasal aileden gelen 62 boyanın hem de seçilmiş doğal boyaların aynı yöntem kullanılarak karakterize edilmesi mümkün olmuştur.

Petroviciu ve arkadaşları, (2012) çalışmalarında, tarihi tekstiller üzerindeki boyarmadde analizleri için LC/MS ve LC/MS/MS protokollerinin oluşturulmasını amaçlamışlardır. Bu çalışma sonunda, 0.5'er mg'lık alınan tarihi numuneler üzerindeki 11 boyarmadde tespit edilmiştir.

Deveoglu ve arkadaşları, (2012) çalışmalarında, kenevir boya bitkisinden elde edilen doğal pigmentler (Datisca cannabina L.) KAI (SO4) $_2$.12 H2O (şap), FeSO4 $7H_2O$ ve $SnCl_2$ $2H_2O$ mordan kullanılarak hazırlanmıştır. RP-HPLC-DAD yöntemi yani ters-faz yüksek performans sıvı kromatografi doğal boyar pigmentlerin belirlenmesi için kullanılmıştır. Pigmentlerden boya maddesi ekstraksiyonu %37 HCl/MeOH/H2O (02:01:01 v / v / v) karışımı ile gerçekleştirilmiştir. Pigmentler ATR-FTIR analizi ile karakterize edilmiştir ve tüm metallerin datiscetin ve karbonatlar olarak çökeldiği bulunmuştur. Pigmentlerin termal degradasyonu termogravimetrik analiz ile tespit edilmiştir. Elde edilen doğal pigmentlerin mikro ve kimyasal homojenliği enerji dağılım spektroskopisi ile donatılmış alan emisyon taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir.

2.2. Adli delil niteliği taşıyan elyaf üzerindeki boyarmaddenin sıvı kromatografi(LC) tekniği kullanılarak incelenmesi ile ilgili çalışmalar

Griffin ve arkadaşları, (1994) çalışmalarında Kuzey İrlanda Adli Tıp Laboratuarında sıkça karşılaşılan fiziksel delil olarak akrilik elyaftan bahsetmişlerdir. Akriliği boyamada kullanılan bazik boyarmaddelerin ayrımı ve analizini dar çaplı kolonlarla izokratik HPLC ile gerçekleştirilmiştir. HPLC'de solvent olarak 9:1 oranında methanol ve sıvı amonyum asetat çözeltisi (pH:9,76) karışımı kullanılmıştır. 0.2 cm.siyah akrilik elyafından ekstrakte edilen boyarmaddeler (sırasıyla sarı kırmızı ve mavi boya bileşenleri olarak), tek kanal detektörüne 3 enjeksiyon yapılarak 400, 500 ve 600 nm.'de çok hassas olarak tespit edilmiştir.

Speers ve arkadaşları, (1994) yaptıkları çalışmada; asit, bazik ve dispers boyarmaddeleri ayırmak ve karakterize etmek amacıyla ucu kapalı–dar çaplı ters fazlı kolon ve PDA dedektörü olan gradyant elüsyonlu HPLC sistemi kullanmışlardır. Bir seri ticari boyarmadde kullanılarak relatif alıkoyma zamanlarından ve spektral datalarından yola çıkarak bir database oluşturulmuştur.

Rendle ve Wiggins (1995) çalışmalarında; tekstil elyafının kriminal bir olayda kullanılabilecek yararlı bir kanıt kaynağı olduğunu vurgulamışlardır. Kriminal laboratuarları transfer olan veya edilen lifleri kanıt kaynakla benzerlik ya da benzeşmezlik açısından rutin olarak karşılaştırmışlardır. Tanımlama, sınıflama, kıyaslama yaparken bir dizi teknik kullanırlar ve üzerindeki boyarmaddeyi de analiz edip kıyaslarlar. Bu çalışmada elyaf boyarmaddelerinin analizi ve kıyaslanması yapılmıştır. Genel anlamda elyaf tipinin de belirlenmiş olduğu farz edilmektedir. Kriminal laboratuarlarda sıklıkla analiz numunesi az miktarda ve kan gibi bazı maddelerle kirlenmiş olabilir. Ekstrem durumlarda da tek bir küçük numune mevcut olabilir. Bu yüzden seçilen analitik rota çalışmak zorundadır, çünkü 2. bir çalışma yoktur. Bunun kriminal davalara bakan laboratuarlarda kesinlikle olması gerekir çünkü hatalar yanlış hüküm giyme veya suçlunun yanlışlıkla salıverilmesine neden olabilir.

Wiggins (2001) yaptığı çalışmada elyaf analizlerini üstlenen Amerika'daki kriminal laboratuarlara ve Avrupa elyaf grubunun üyelerine (Israel, Japonya, Kanada ve Avustralya.) 1994 ve 1995 yıllarında anket yapılmıştır. Sonuçta Avrupa'da elyaf kanıtın Amerika'dan daha fazla olduğu vakaya rastlanılırken, Avrupalıların daha modern cihazlarla donatılmış laboratuarlara sahip olduğu görülmüştür.

Tuinman ve arkadaşları, (2003) Elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi (ESI-MS) uygulanması iz-elyaf renk analizi için asidik boyalar kullanılarak geliştirilmeye çalışılmıştır. Boyaların nicel bilgileri ve miktar tanımı bu tekniği kullanarak mümkün olduğu vurgulanmıştır. Arasında bilinmeyen boyalar bulunan bileşiklerin ise kimyasal yapısı hakkında tek başına kromatografik tekniklerin yeterli olmayıp ESI-MS/MS'in farklı bakış açıları sunduğu anlatılmıştır.

Huang ve arkadaşları, (2004) çalışmalarında, adli iz niteliği taşıyan tekstil liflerinden ekstre edilen boyaların belirlenmesi için LC-MS analizi ve yöntemi

kullanılmıştır. MS detektörü önce seri olarak yerleştirilen bir UV-görünür absorbans dedektörü ile renkli tekstil liflerinden ekstrakte olmayan diğer boya bileşenlerinin takibinin kolaylaştığı sonucuna varılmıştır.

Huang ve arkadaşları, (2005)çalışmalarında; 10 farklı pamuk elyafından bilinmeyen boyarmaddeler ekstrakte etmişlerdir. Sonuçta elyaflar ekstraksiyon protokolleri uygulanarak kütle spektrumlarından, kromatografik davranışlarından ve MS deki iyonlaşmalarından faydalanarak ayırt edilmişlerdir.

Wood ve arkadaşları, (2006) çalışmalarında; LC/MS de adli analizlerin yapılması ile ilgili son gelişmeleri özetlemişlerdir. Sonuçta LC ile MS uzun yıllardır birada kullanılmaktaydı. Fakat kullanıcı dostu LC ara yüzleri olan ESI ve APCI ile farklı disiplinlerden birçok bilim adamı arasından bu tekniğin popularitesi artmaya başladı. Ve sonuçta LC/MS/MS cihazı GC/MS ‘e alternatif olarak daha polar, uçucu olmayan ve ısıl direnci az olan güç analitlerde kullanılmaya başlandı.

Lauren ve arkadaşları (2006) çalışmalarında: Adli elyaf boyarmadde analizlerinin LC/MS’e uygulanabilirliğini tesbit etmek için asetonitril kullanarak çok aşamalı bir kromatografik yöntem geliştirilmiş, 15 bazik ve 13 dispers boyarmadde standart karışımının tanımı ve ayrılması sağlanmıştır. Sonuçta: UV spektralarında benzer özellik gösteren renkli tekstil elyaflarının kromatografide ayrılmaları sağlanmıştır.

Morgan ve arkadaşları, (2007) çalışmalarında delil elyaf için ekstraksiyon ve sonraki boya bileşenlerinin analizinde gelişmiş bir ayrım imkânı sunuyor. Bu araştırmada; sınırlı boyutta tekstil örneklerinden boyaların izole edilip ayrılması için yüksek çözünürlüklü kılcal elektroforez yöntemlerinin geliştirilmesine değinilmiştir. Naylon, pamuk, polyester ve akrilik elyafından boyaların ekstraksiyonunu optimize etmek için bir kombinasyonal yaklaşım kullanılmıştır.

Cakir ve Üner, (2008) çalışmalarında, Adli Bilimcilerin fiziksel kanıtla bir bağlantı kurmak için birçok araçlarının olduğunu ve belki de en eski ve en az kullanılan araçlardan birinin de modern laboratuar polarize ışık mikroskobu (PLM) olduğunu vurgulamışlardır. PLM, bu tür iz kanıtlarını (lif, saç, toprak, cam, boyalar, patlayıcı ve sayısız gibi çeşitli organik ve inorganik maddeler) hızlı bir şekilde belirleyebilir. İpek lifleri yaygın olarak kullanılan doğal elyaflar pamuk, keten ve yün

gibi, adli tanımlama amacıyla karakterize edilmiştir. Bu çalışmada, polarize ışık mikroskobunda birkaç ipek elyafın analizi yapılmıştır.

Dresen ve arkadaşları, (2009); çalışmalarında Elektrospray iyonlama ardışık kütle spektrometrisi kütüphanesinin, klinik ve adli toksikoloji ile alakalı 1253 bileşik için 5600 civarında spektra içerdiğinden bahsetmişlerdir. Lineer iyon traplı olan hibrid ardışık kütle spektrometresini kullanmaktadır. Gradyent elüsyonlu standart ters fazlı analitik kolonlar kullanan sistem içerisie 1-2 ng(saf bileşik solüsyonları) madde enjekte edilir. Maksimum kütle spektral bilgisini elde etmek için ürün iyon spektrası [+ veya – iyonizasyonda, düşük, orta ve yüksek çarpışma enerjilerinde ve ilaveten yayılan çarpışma enerjisini uygulayan] elde edilmelidir. Sonuçta; 1253 bileşikten oluşan MS/MS spektral kütüphane kurulmuş ve bu kütüphane adli ve klinik açıdan önem taşıyan uyuşturucular, farmasötikler, toksik organik bileşikler (pestisitleri) içermektedir.

Eng ve arkadaşları, (2009) çalışmalarında metamerizmanın iki veya daha fazla renkli öğenin farklı renklendirici kimyasallarla boyanmış olmasına rağmen gözlemciye aynı renkmiş gibi görünmesi ile ilgili bir olgu olduğuna değinilmiştir. Bu farklılıkların, farklı UV-görünür spektrumları ile sonuçlanması gerektiği belirtilmiştir. Bu çalışmada farklı renklendirme maddeleri veya renklendirici ajanların farklı göreceli konsantrasyonları kullanılarak oluşturulan mavi tekstil liflerinin, UV-görünür microspectrophotometry kullanarak 350 ve 800 nm arasında spektrumları alınarak ayırt edilebileceğini göstermek için çalışıldı. Test edilen bazı metamerik örnekler yaklaşık üç veya daha fazla odakta kesişirken, bazılarının kesiştiği nokta olmadığı belirlendi. Kesişen spektrumlarda ise, boya kimyaları veya göreceli bileşen konsantrasyonları arasında hiçbir korelasyon bulunmamıştır.

Goodpaster ve Liszewski (2009) çalışmalarında tekstilin elyafı kanıt izi için anahtar form olduğunu belirtmişlerdir ve o izleri güvenli ve elyaf rengini kıyaslamada kullanılan kromatografi, spektroskopi ve kütle spektrometrisi yöntemleri üzerine odaklanmıştır. Boyanmış elyaf spektralarındaki farklılaşma için kullanılan çok değişkenli istatistiklerin artışı ve diğer data analiz teknikleri de ayrıca tartışılmıştır. Güvenli biçimde birleştirmek ya da ayırt etmek adli bilimciler tarafından çok önem taşır. Elyaf komposizyonunu tayin için mikroskobik ve

enstrümantal analizler yapılsa da elyaf rengini incelemek ilave bir özelik kazandırır. Bu da özelikle elyafın büyük kısmının kompozisyonunun nispeten aydınlatıcı olmadığı durumlarda önemlidir. Sonuçta kriminal araştırmalarda elyaf kanıtının önemi, onların analizi için mikroskopik ve enstrümantal metotlarla önemli ölçüde araştırmalar yapılmasına teşvik etmiş ve güvenilirliği artan matematiksel tekniklere dayalı spektroskopik kıyaslamadır. Buna rağmen cihazlardaki çoğu yeni gelişmenin etkisi henüz tam olarak fark edilmemiştir.

Green ve arkadaşları, (2009) çalışmasında ortam basıncında direk yüzeyden yüksek hassasiyet sağlayan yeni bir uygulama geliştirmişlerdir. Bu alanda birçok dalda çalışmalar vardır; nanogram seviyelerinde patlayıcıların tespiti, sahte tıbbi tabletler, kötü amaçla kullanılan uyuşturucu maddelerin idrardan ve plazmadan tespiti, parmak izi tanımlamasının image analizi. Ayakkabı kutusu büyüklüğündeki MS'ler ile olay mahallinde tespit yeni gelişmelerdendir. Adli dataların mahkemede incelenmesi gerekli ve hassas ölçüm altyapısının akredite ölçümlere dayanması çok önemlidir. Bu yeni MS'lerde de tekrarlanabilir, tekrar üretilebilir ve geçerli sonuçları veren metotlara ihtiyaç vardır. Bu konuda yoğun bir araştırma çabası vardır ki bu da ambient MS için gerçekleşmesi zor olan bir geleceği mümkün kılabilir.

Stefan ve arkadaşları, (2009) çalışmalarında, asit boyalı naylon elyafından boyarmaddeyi ekstrakte edecek farklı çözücüleri verebilen bir otomatik sıvı dağıtım sistemi ve ekstraktın verimine bakabilecek bir UV dizayn etmişlerdir. Böylelikle en optimum ekstraksiyon şartları belirlenmesi amaçlanmış, aynı zamanda benzer renk tonunda ama farklı ticari isimdeki boyarmaddelerin de ayırt edilmesi hedeflenmiştir. Sonuçta naylon elyafından ekstrakte ettikleri boyarmaddeleri CE yöntemi analiz etmiş ve aynı renklerdeki farklı boyarmaddeleri dahi birbirinden ayırt edebilmişlerdir. Bu çalışmanın da adli analizler için önemi büyüktür.

Wąs-Gubała (2009) yaptığı derleme niteliği taşıyan çalışmada, Tekstil elyafının delil niteliğinin birçok faktöre bağlı olduğunu belirtmekte; bunlar arasında, suç mahallinden delilin nasıl toplandığı, laboratuar testlerinin güvenilirliği, elyaf renk ve cinsi olduğundan bahsetmektedir. Sonuçta tek elyaf incelemeleri sonucunda analiz sonuçlarının yorumlanmasının çok önemli olduğu ve birçok çözülemeyen suç vakalarının aydınlatılmasında bu sonuçların kullanılabileceğinden bahsedilmiştir.

Brinsko (2010) çalışmasında üreticiler tarafından doğa dostu ve biyolojik olarak parçalanabilen elyafların halı, kıyafet gibi tekstil ürünlerinde kullanımının gitgide artmasından bahsetmişlerdir. Bu yüzden bu modern elyafların da adli vakalarda görülmesi sıklaşacaktır ve adli araştırıcıların onların tanıması önem arz etmektedir. Bu çalışmada seçilen Azlon, PLA, selüloz kompozitleri-aljinat, kitin gibi ve bambu viskoz rayonu gibi elyafların karakterizasyonu için PLM(Polarize ışık mikroskopu) ve FT-IR kullanılmıştır. Elyaf enine kesitleri, refraktif indisleri, erime noktaları, çözünürlükleri ve FT-IR ölçümleri yapılmıştır. Sonuçta Azlon ve PLA elyafları diğer elyaflardan optik ve kimyasal özelik açısından daha kolay ayırt edilebildi. Selüloz kompozitleri diğer seçilen bazı elyaflardan çok az farklılık gösterirken bambu viskoz rayonu normal viskoz rayonundan ayırt edilemedi.

2.3. Boyalı elyafın mikroskobik ve spektroskobik analizleri

Cho ve arkadaşları, (2001) çalışmalarında akrilik elyafına carrier uygulamış, uygulama öncesi ve sonrası ATR tekniği kullanarak yüzey bitim işlemini tespit için infrared spektralarını almışlardır. Aynı çalışmada 2 farklı ticari isimde polyester elyafı ayırt edilmeye çalışılmıştır. Ayrıca BTCA (1,2,3,4- butanetetracaroxylic acid ve sodyum hypophosphite) isimli apre pamuk kumaşlara uygulanmış, uygulama öncesi ve sonrası değerlendirilmiştir. Sonuçta transmisyon ölçümlerinde genelde elyafı düzleştirip hatta kesit almak gerekirken ATR tekniği ile yüzey hazırlama işlemine gerek olmadan okuma yapılabildiğini çünkü ATR tekniğinde numune yüzeyinden yansıyan radyasyonun değerlendirildiği bir teknik olduğu vurgulanmıştır, yüzeye uygulanmış bir apre var ise bunun belirlendiğinden ve dolayısıyla adli analizlerde kullanılabileceğinden bahsetmişlerdir.

Grieve ve arkadaşları, (2001) çalışmalarında: 73 bilinen siyah pamuk boyası ve değişik tekstillerden alınan 158 siyah pamuk numunesinin UV-görünür mikrospektrofotometre spektralarını kaydetmişlerdir. Böylece kükürt kaynaklı ve birkaç istisna ile birlikte reaktif spektraların gerçekleşmesi mümkün olmuştur. Bu boyarmadde sınıflarının spektral değişim derecesi ve mikrospektrofotometrenin bunları ayırma gücü araştırılmıştır. Siyah reaktif boyarmaddeler 0.91'lik ayırma gücü

ile ayırma gücü 0.18 olan kükürt boyarmaddelere göre yüksek derecede bireysellik göstermişlerdir.

2.4. Hayvansal liflerin moleküler yöntemlerle tanımlanması

Hayvansal lifler sıklıkla pazarlama esnasında çokca tağşiş edilen çok değerli endüstriyel ürünlerdir. Şu anda lifleri belirlemek ve ayırmak için kullanılan kesin bir yöntem yoktur. Subramanian ve arkadaşları, (2005) çalışmalarında, kaşmirden keçi ve koyun yünlerini ayırt etmek bir PCR-RFLP tekniği için türetmiştir. Çalışmada her iki türün mitokondriyal sitokromb dizileri çoğaltılmıştır. PCR ile korunmuş bölgelerden dizayn edilen primerler kullanılmıştır. Çoğaltılmış ürünü endonükleazlar yani BamH1 ve SSP1 ile kesilerek iki tür arasındaki gözlenen polimorfizm tespit edilmiştir. Bu teknik hayvansal liflerin tağşiş edilip edilmediğinin tespit edilmesi için diğer liflerde de test edilebilir.

Tobe ve Linacre, (2008) çalışmasında adli soruşturmalarda 18 Avrupa ortak memeli türlerini tanımlamak için (porsuk, kedi, inek, köpek, eşek, tilki, keçi, kobay, hasat fare, kirpi, at, ev fare, insan, domuz, tavşan, sıçan, kırmızı geyik ve koyun) için bir metot geliştirmiştir. Deney yaygın tür tanımlaması ve filogeni çalışmalarında kullanılan mitokondriyal sitokrom b genine dayanır. DNA ‘lar doku ve yanak içi sürüntüden alınarak izole edilmiştir. Türe özgü tasarlanan, homoloji ve varyasyon alanları tespit edilmiş spesifik primerler sadece tasarlanmış olduğu türlerde DNA çoğalması sağlayacak şekildedir.

Kirsten ve arkadaşları, (2009) çalışmasında, bir DNA analitik yöntemi sunmuştur. İşlem görmemiş ve işlem görmüş (yıkanmış, ağartılmış ve boyanmış) kaşmir, cashgora, ince yün, yak ve devetüyü (Baktria deve ve tek hörgüçlü deve) elyaf numunelerinin tanımlanmasında kullanılan bu metot SEM’de (taramalı elektron mikroskopu) yapılan miktar belirleme metodu ile karşılaştırılmıştır. Bu iki metodun avantaj ve dezavantajları üzerinde durulmuştur.

Wang ve arkadaşları, (2011) doğal ya da işlenmiş hayvan kılından mitokondriyal DNA’yı hızlı bir şekilde ekstrakte etmek için bir metot sunmuştur. Koyun ve keçi mitokondriyal 12S ribozomal RNA (rRNA) genleri ile özel olarak

tepkimeye girebilen, iki takım polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) primerleri veprobları tasarlanmıştır. TaqMan PCRsadece kaşmir ve yünüayırt etmez aynı zamanda kaşmir / yün karışımı içindeki miktarlarını da belirlemeyi sağladığından bahsedilmiştir. Bu ürünün dünya pazarlarında kaşmir elyafının kalitesini belirlemek için kullanılabileceği açıklanmıştır.

Lu ve arkadaşları, (2012) çalışmasında Yak elyafı ile ve kahverengi kaşmirin, morfolojik görünüm olarak yüksek bir benzerlik göstermekte olduğunu belirtmiştir, ayrıca ağartılmış veya boyanmış numuneler görsel olarak ayırt edilemez olabilir. Yüksek kar cazibesi olan kaşmire karşın yak elyafının ucuz oluşu; yanlış beyan ve tağşişi de beraberinde getirebilmektedir. Yak elyafını tanımlamak için polimeraz zincir reaksiyon primerleri ve yak 12S ribozomal ribonükleik asit ile spesifik olarak reaksiyona girebilen bir prob tasarlanmıştır. Bu metodun yak elyaf ürünlerinin tanımlanması ve kaşmir ürünlerin kalitesinin incelenmesi için direkt olarak uygulanabileceği belirtilmiştir.

Yapılan literatür taramasında adli anlamda, liflerden boyarmadde ekstraksiyonu ve boyarmadde tanımlaması ve dolayısı ile lifin tanımlanması incelenen boyarmaddeler için yapılmamıştır. Ayrıca hayvansal liflerin adli açıdan tanımlanmasında kullanılan moleküler yöntemlerde kit oluşturma işlemi yapılmamıştır.

3. MATERYAL METOD

3.1. Bitkisel, Sentetik ve Hayvansal Liflerin Temini

Bu tez çalışması kapsamında seçilen bazı elyafların moleküler, mikroskopik, spektroskopik ve kromatografik olarak tanımlanmasının yapılması hedeflenmiştir. Bu amaçla bitkisel ve sentetik liflerden pamuk, naylon ve akrilik; hayvansal liflerden ise at, koyun, sığır, tavşan ve kedi lifleri seçilmiştir. Bu lifler giyimde en çok tercih edilen liflerdenoldukları için olay yerinde delil olarak en fazla rastlanabilecek niteliktedirler.

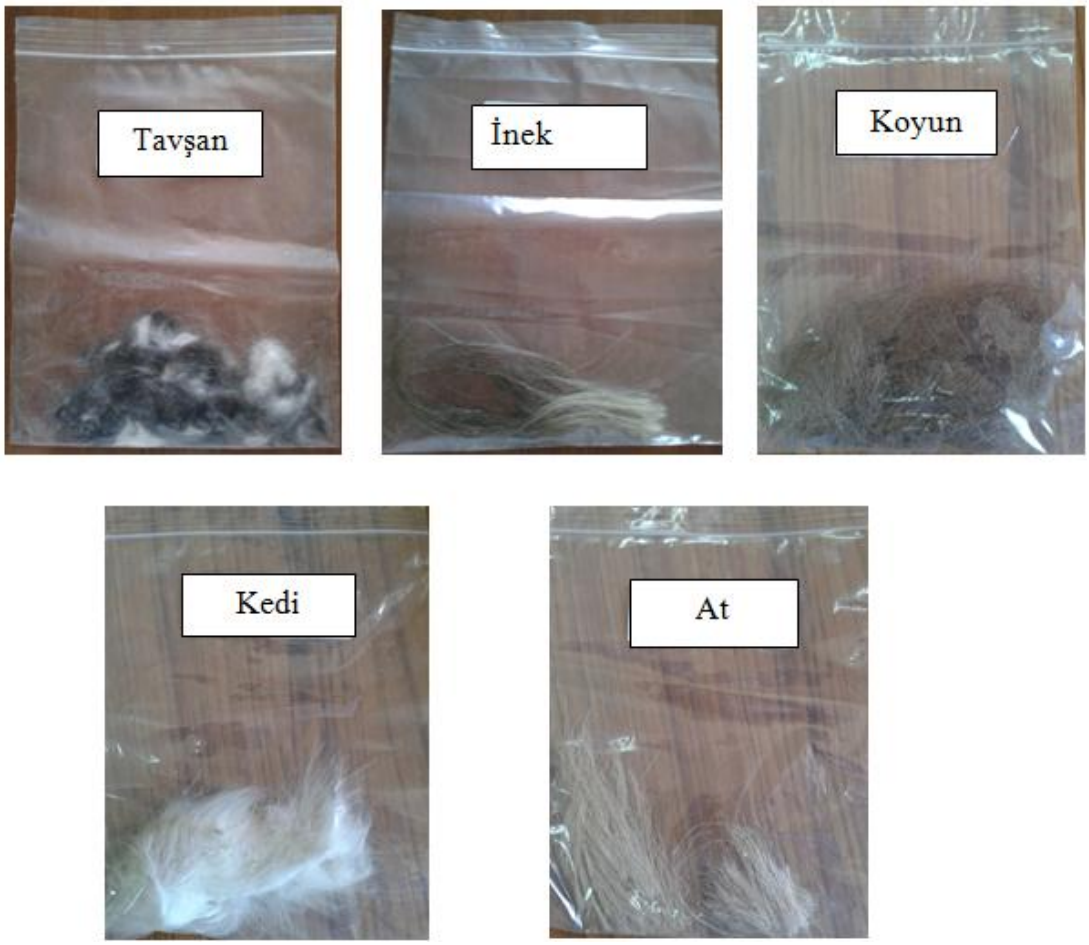
Bitkisel liflerden pamuk, K.Maraş Kipaş Mipsan İplik İşletmelerinden; naylon lifi Polystar firmasından ve akrilik elyafı ise Aksa Akrilik'ten temin edilmiştir.

Çalışma için gerekli hayvansal lifler, Kahramanmaraş hayvanat bahçesinden ve KSÜ Hayvansal üretim çiftliğinden yasal izinler alınarak etik kurul belgesine sahip veteriner tarafından belirlenen at, koyun, sığır, eşek, tavşan, keçi, köpek ve kedi'den alınmıştır. Örnek toplanan hayvanlara ait ırk bilgileri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Hayvanların türleri

Çalışmada kullanılan havyan türü	Cinsi
Tavşan	Ada
İnek	Sementer
Koyun	Mouflon
Kedi	Van
At	Midilli

Hayvansal lif örnekleri, DNA kontaminasyonunu önlemek için eldiven kullanılarak toplanmıştır. Hayvansal lifler kilitli poşetlere konarak (Şekil 3.1) etiketlenmiş ve laboratuara ulaştırıldıktan sonra DNA izolasyonuna kadar buzdolabı şartlarında muhafaza edilmiştir



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan hayvansal lif örnekleri

3.2. Boyarmaddeler ve boyama yardımcıları

Elyaflar 3 farklı tip boyarmadde (bazik, asit ve reaktif boyarmaddeler) ile 4 farklı tonda (kırmızı, sarı, mavi ve bunların eşit oranda karışımlarını içeren bir kahve tonu) boyanmıştır.

3.2.1. Bazik boyarmaddeler

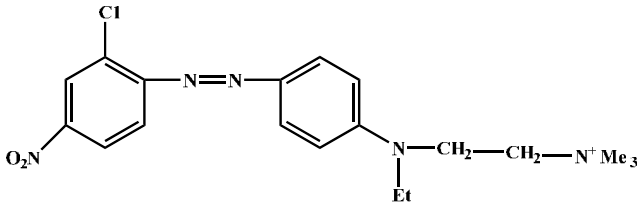
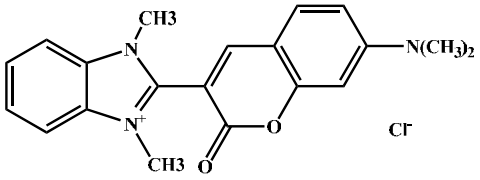
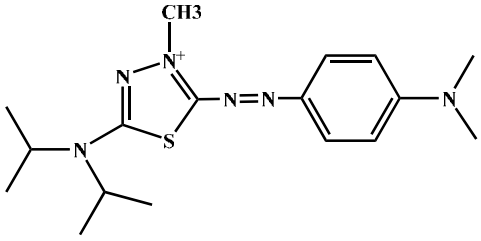
Akrilik elyafı Çizelge 3.2'deki kimyasallar ve boyarmaddeler kullanılarak boyanmıştır.

Çizelge 3.2. Akrilik boyamada kullanılan boyarmaddeler

	Kimyasal Madde Adı	**Üretici Firma**
Boyarmaddeler	Astrazon Red GTLN 200% micro	Dystar
	Astrazon Flavine 10 GFF 300%	Dystar
	Astrazon Blue FGRL micro 200 %	Dystar

Akrilik elyafı Çizelge 3.3'de kimyasal içeriği ve bazı özellikleri verilen bazik boyalarla 4 farklı tonda boyanmıştır.

Çizelge 3.3. Bazik boyarmaddeler ve kimyasal özellikleri

Boyarmadde Adı ve CI*	**Konsant-rasyon**	**Molekül Ağırlık (g/mol)**	**Kimyasal yapısı**
Astrazon Red GTLN 200% micro; basic red 18:1	% 0,75	390.17	
Astrazon Flavine 10 GFF 300% ;basic yellow 40	% 0,75	473.54	
Astrazon Blue FGRL micro 200 %; basic blue 159	% 0,75	394.003	

*CI: Renk İndeks Numarası (Color Index)

3.2.2. Asit boyarmaddeler

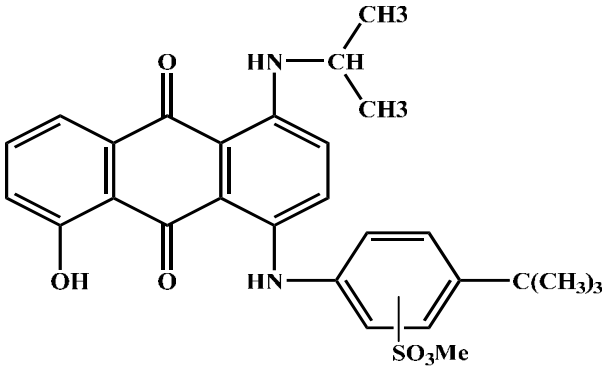
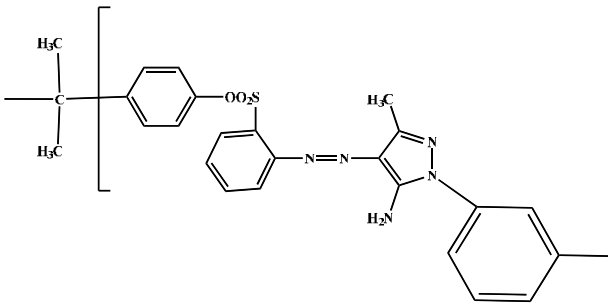
Naylon elyafı Çizelge 3.4'deki kimyasallar ve boyarmaddeler kullanılarak boyanmıştır.

Çizelge 3.4. Naylon boyamada kullanılan kimyasallar ve boyarmaddeler

İçerik	Kimyasal Madde Adı	Üretici Firma
Mcllavaine	0.2 M Na_2HPO_4 30,9 ml	Panreac
buffer(tampon)	0.2 M Citric Acid 49.1 ml	Sigma Aldrich
(McIlvaine 1921)		
Boyarmaddeler	Telon Blue A3GL	Dystar
	Telon Red AFG	Dystar
	Telon Yellow M-4GL	Dystar

Naylon elyafı Çizelge 3.5'de kimyasal içeriği ve bazı özellikleri verilen asit boyarmaddelerle 4 farklı tonda boyanmıştır.

Çizelge 3.5. Asit boyarmaddeler ve kimyasal özelikleri

Boyarmadde adı ve CI *	**Konsant-rasyon**	**Molekül Ağırlığı (gr/mol)**	**Kimyasal yapısı**
Telon Blue A3GL; acid blue 290	%1	480.579+ Me	
Telon Red AFG; acid red 360	%1	541.55	-
Telon Yellow M-4GL ; acid yellow 79	%1	1111.11	

*CI: Renk İndeks Numarası (Color Index)

3.2.3. Reaktif boyarmaddeler

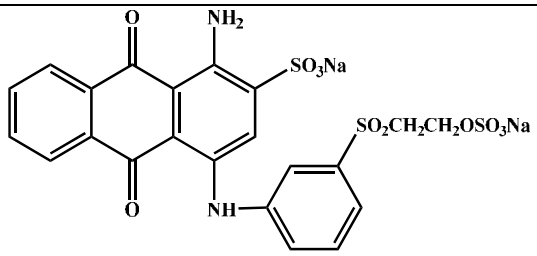
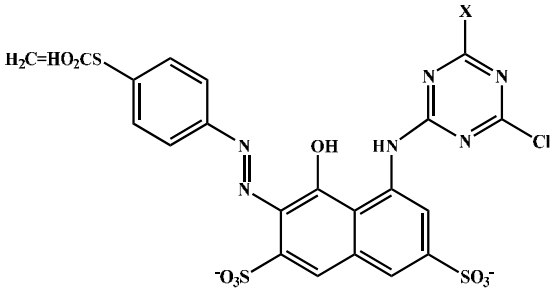
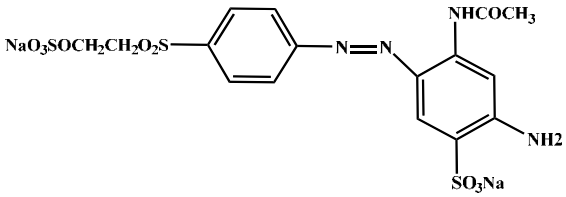
Pamuk elyafı Çizelge 3.6’ deki kimyasallar ve boyarmaddeler kullanılarak boyanmıştır.

Çizelge 3.6. Pamuk boyamada kullanılan kimyasallar ve boyarmaddeler

Boyama yardımcıları ve boyarmaddeler	Kimyasal Madde	Üretici Firma
Tuz	Sodyum klorür	Panreac
Soda(Alkali)	Sodyum Sülfat	Sigma Aldrich
Boyarmaddeler	Remazol Brilliant Blue R spc 160%	Dystar
	Remazol Red RB-A 133 %	Dystar
	Remazol Golden Yellow RNL gran 150 %	Dystar
Reaktif boyama sonrası yıkama maddesi	Setawash	Setaş Kimya A.Ş.

Pamuk elyafı Çizelge 3.7'de kimyasal içeriği ve bazı özellikleri verilen reaktif boyalarla 4 farklı tonda boyanmıştır.

Çizelge 3.7. Reaktif boyarmadde özelikleri

Boyarmadde adı ve CI	**Konsant-rasyon %**	**Molekül ağırlığı ($gmol^{-1}$)**	**Kimyasal yapısı**
Remazol Br. Blue R spc 160% C.I.61200 Reaktif Blue 19	1	626.54	
Remazol Red RB-A 133 % Reaktif Red 198	1	984.21	
Remazol Golden Yellow RNL gran 150 % Reaktif Orange 107	1	566.49	

*CI: Renk İndeks Numarası (Color Index)

3.3. Liflerin Boyanması

Lifler (Akrilik, Naylon ve Pamuk) Ataç HT boyama makinesinde (Şekil 3.2) boyanmıştır.



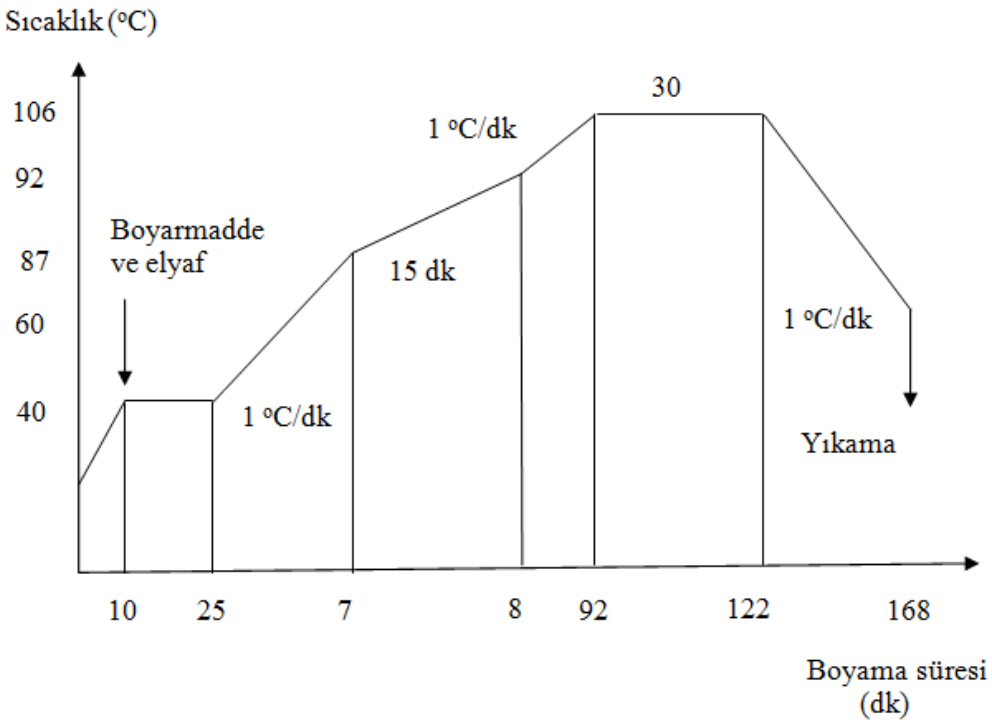
Şekil 3.2. Ataç HT boyama makinesi

Farklı liflerde farklı boyarmaddeler ve yardımcı kimyasalları kullanılarak farklı reçetelerle (Çizelge 3.8) boyama gerçekleştirilmiştir.

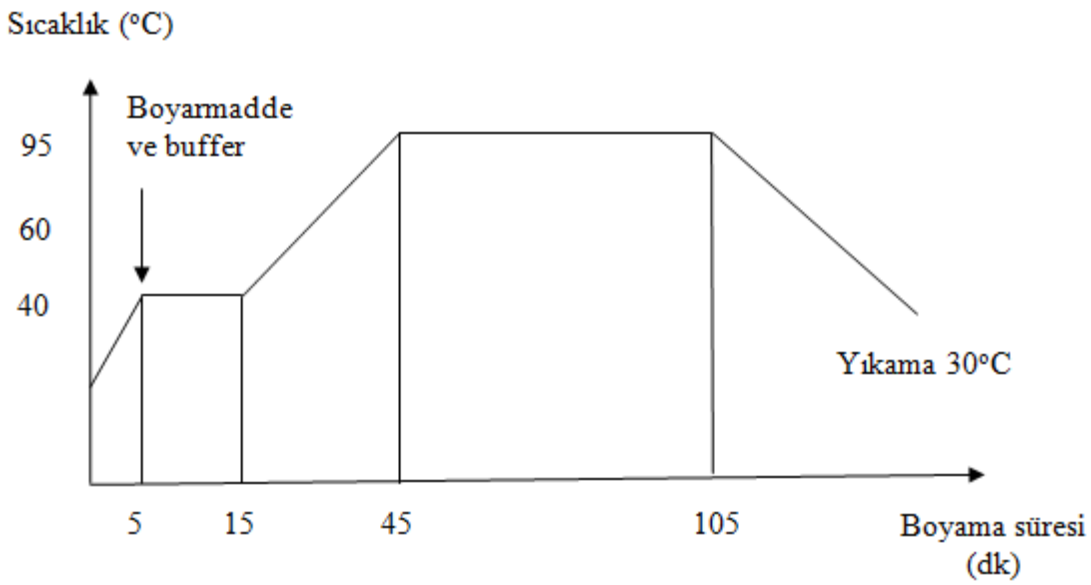
Çizelge 3.8. Liflerin boyama reçeteleri

İçerik	**Akrilik**	**Naylon**	**Pamuk**
Başlangıç boyama pH değeri	-	4	6
Boya miktarı	% 0,75(w/v)	%1 (w/v)	%1(w/v)
Flotte oranı	1/25	1/25	1/10
Elyaf	2 gr.	2 gr.	2 gr.
Çözelti	50mL.	50mL.	20mL.
Mcllavaine Buffer	-	20 mL.	-
Tuz miktarı (%1 lik boyamalar için)	-	-	30 gr/L
Tuz miktarı (%3 lük boyamalar için)	-	-	40 gr/L
Soda miktarı (%1 lik boyamalar için)	-	-	8 gr/L
Soda miktarı (%3 lük boyamalar için)	-	-	15 gr/L

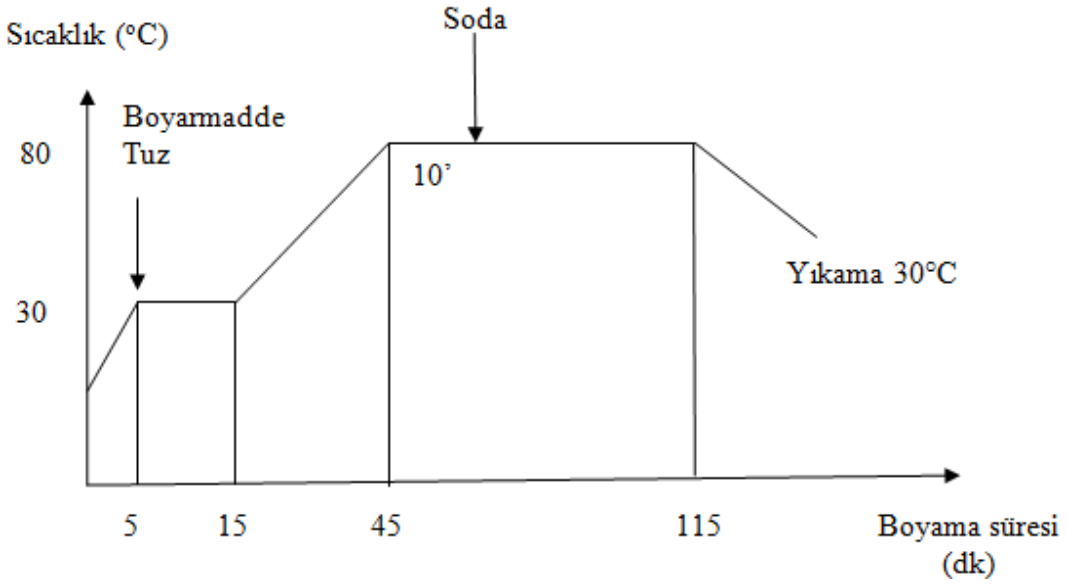
Boyama işlemi farklı liflerde (sırasıyla akrilik, nylon ve pamuk) Şekil 3.3. ile değişen grafiklerde gösterilmiştir.


Sıcaklık (°C)
106
92
87
60
40
Boyarmadde
ve elyaf
1 °C/dk
15 dk
30
1 °C/dk
1 °C/dk
Yıkama
10
25
7
8
92
122
168
Boyama süresi
(dk)

(a)


Sıcaklık (°C)
95
60
40
Boyarmadde
ve buffer
Yıkama 30°C
5
15
45
105
Boyama süresi
(dk)

(b)



(c)

Şekil 3.3. Boyamalarda sıcaklık-zaman değişim grafiği (a) Akrilik elyaf için (b) Naylon elyaf için (c) Pamuk elyaf için

Bazik boyarmaddelerle, akrilik liflerin boyanmasında, lif üzerinde sınırlı sayıda (-) yüklü merkez olduğundan, boyarmadde moleküllerinin bağlanabileceği grup sayısı sınırlıdır. Bu sınırın üzerinde lif boyarmadde alamaz. Bu değer lif doyma değeri olarak bilinir. Lifin doyma değerinin aşılmamasına dikkat edilmelidir. Lifin doyma değeri olduğu gibi boyarmaddenin de doyurma faktörü vardır.

Boyarmaddelerin doyurma faktörü "f" ve lif doyma değeri "A" nın bilinmesi; boyanacak bir lif için, kullanılacak boyarmaddenin doyurma konsantrasyonunu hesaplamayı mümkün kılar (http://www.teknolojiweb.net/akriligin-boyanmasi/). Aksa Akrilik elyafın doyma faktörü SF (A) faktör 1,4'tür. Boyarmadde üreticisinden alınan bu faktörler Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Bazik boyarmaddelerin doyurma faktörleri (f)

Boyarmaddeler (Renk indeks no) (Dystar)	f faktör	P (%)
Astrazon Blue FGRL micro 200 % (basic blue 159)	0,33	0,75
Astrazon Red GTLN 200% micro (basic red 18:1)	0,76	0,75
Astrazon Flavine 10 GFF 300% (basic yellow 40)	0,66	0,75

P: Boyarmadde konsantrasyonları

Mavi, kırmızı ve Sarı boyarmaddeler için doyurma faktörleri; sıra ile f1, f2, f3'tür.

Eğer, boyarmaddelerin "% boyarmadde * f" toplamı, lifin A değerinden daha büyük ise; kullanılacak boyarmadde lifin aşırı doymasına neden olur. Kural olarak; kullanılan boyarmadde %'si ile doyurma faktörünün çarpımının, boyanan lifin doyma sayısından küçük olması gerekir (p * f <A). Yani; P1.f1+P2.f2+P3.f3 aşırı doyma için A'dan büyük olmalıdır. Burada P1, P2, P3 sıra ile üç boyarmaddenin % miktarlarıdır.

(0,33*0,75+ 0,76*0,75+0,66*0,75)=1,3125

A=1,4 idi. Bu durumda; yukarıdaki reçete lifin aşırı doymasına neden olmayacaktır. Naylon lifi boyamalardan sonra 15 dakika 60 ^{o}C' de su ile yıkama işlemi ve ardından 5 dakika soğuk su ile durulama yapılarak yıkama işlemi tamamlanmıştır. Pamuk lifi; boyama sonrası 10 dakika kaynar sabunlama işlemi (Setawash, reaktif boyama sonrası yıkama maddesi ile) ve 5 dk. soğuk durulama ile yıkama yapılmıştır.

3.4. Moleküler Analizler

Olay yerlerinde bitkisel ve sentetik elyafların yanı sıra hayvansal elyaf ve deri ürünleri de (yünlü kazaklar, deri ceket, ayakkabı vs.) delil olarak kalabilmektedir. Bunların doğru bir şekilde tür tayinlerinin yapılması suç ile şüpheli bağlantısının doğru tespit edilmesinde ve yanlış kararların önlenmesinde rol oynamaktadır. Ayrıca moleküler çalışmalar ile tekstil endüstrisinde kullanılan hayvansal lif ve derilerin orjinlerinin tespit edilmesi ve karşım olarak kullanıldığında miktar tayinlerinin yapılması mümkündür.

Çalışmanın bu bölümünde deri ve elyafları tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılan beş farklı hayvan için (Koyun, tavşan, at, sığır, kedi) toplanan lif örneklerinden izole edilen mitekondriyal DNA örneklerinden tanımlama yapılmıştır. Moleküler çalışmalar, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, ÜSKİM Mikrobiyoloji ve Mikrobiyal genetik laboratuarında gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. Hayvansal liflerden DNA İzolasyonu

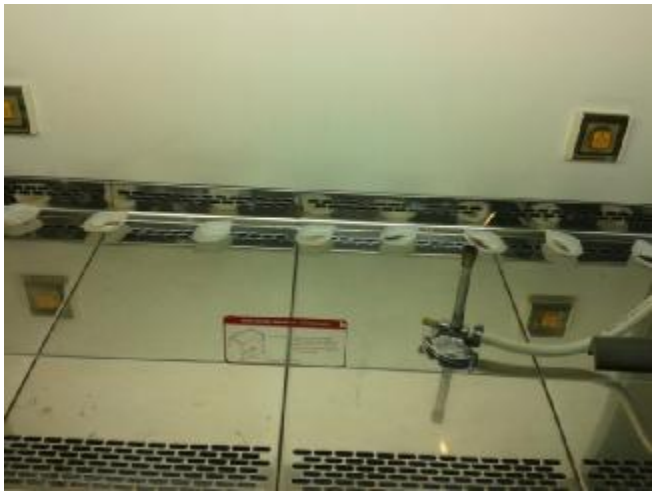
Toplanan hayvansal lif örneklerinden DNA izolasyonu (Sambrook 1989)'ın fenol/kloroform+Proteinaz K yöntemi modifye edilerek toplam genomik DNA izolasyon metodu ile yapılmıştır. İzolasyon aşamalarını aşağıdaki prosedür takip edilerek yapılmıştır.

Saklama poşetlerinde bulunan lif örneklerinden eldiven giyilerek özenle kök kısımlarını da içerecek şekilde bir miktar çıkartılmıştır. Örnekler plastik tartı kapları içerisinde etil alkol (%70) ile temizlenip oda sıcaklığında steril kabinde 15-20 dk. kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.4). Kurutmayı takiben steril 1.5 ml'lik ependorf tüpü içerisine kıl örnekleri kökünden yukarıya doğru 1cm'lik kısım dahil steril makasla çok küçük parçalara kesilmiştir. Bu işlemi takiben tüp içerisine sıvı azot konularak örnekler dondurulmuş ve hemen 15-20 saniye homojenize edilerek hücre duvarlarının kırılması sağlanmıştır. Homojenizasyondan sonra tüp içerisine 700 µL TEN tampon (100 mM Tris, 10 mM EDTA, 250 mM NaCl, pH:8.0), 40 µL %20 w/v SDS eklenip tüpler vorteks edildikten sonra 55 °C'ye ayarlı vorteks özellikli ısı tablasında 24 saat inkübe edilmiştir.

Ertesi gün tüp içerisine 50 µL Proteinaz K (20 mg/mL) eklenip vorteks yapıldıktan sonra 55 °C'de 24 daha inkübe edilmiştir. Proteinaz K uygulamasını takiben tüp içerisine RNaz eklenerek 10 µL (10 mg/mL) örnekler her 3 saat vorteks edilmiştir. İnkübasyon sonrası (3 günlük) tüp içerisine 600 µL Fenol/Kloroform (1:1) eklenip 13000 dev/dk'da 10 dakika ve 4 °C'desantrifüj edilmiştir. Fenol/Kloroform (1:1) aşaması tekrar edildikten sonra üst tabaka başka bir tüpe alınarak içerisine 500 µL Kloroform/izoamil alkol (24:1) eklenip ependorf tüpü hafifçe alt-üst edilmiştir. Tüpler sonra 10000 dev/dk'da 2 dakika santrifüj edilip (4 °C) oluşan üst faz temiz bir

tüpe alınmıştır. Kloroform/isomil alkol (24:1) aşaması tekrarlandıktan sonra üst tabaka başka bir tüp içerisine alınarak toplanan üst faz hacmin %70'ikadar izopropanol eklenmiştir.

Tüpler hafifçe alt-üst edilip içine 200 µL etil alkol (%70) eklenerek 1-2saat buzdolabında (-20 °C) bekletilmiştir. Daha sonra tüpler 14000 dev/dk'da 15dakika santrifüj edildikten sonra tüp içindeki sıvı DNA peletleri kurunarak atılmıştır. Alkol kalıntıların uzaklaştırılması için oda sıcaklığında tüp ağzı açık olarak biraz bekletilmiş ve peletin kuruması sağlanmıştır. Daha sonra tüp içerisine 50µL TE (10 mMTris, 1 mM EDTA, pH:8.0) tampon eklenerek, 50 °C'lik ısı tablasıda 30 dakika süreyle bekletilip DNA çözündürüldükten sonra miktarı Nanodrop cihazı ile belirlenerek kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafazaya alınmıştır.



Şekil 3.4. Steril kabin içerisinde elyaf örneklerinin etanol ile yıkanması ve kurutulması

3.4.2. DNA agaroz jel elektroforezi

İzole edilen DNA örneklerinin görüntülenmesinde %1'lik (w/v) agaroz jel kullanılmıştır. Agaroz jel elektroforez işlemi aşağıda verilmiştir.

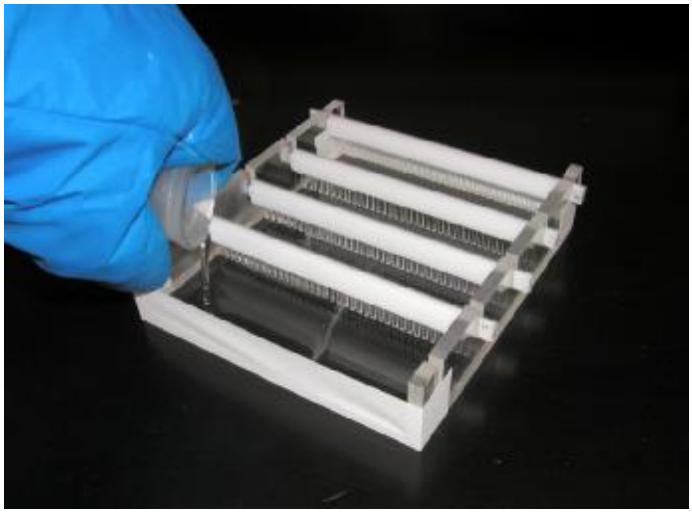
Agaroz jel elektroforez işlemi (Sambrook 1989):

Erlenmayer içerisine (250 ml'lik) 100 ml 1XTBE (1 g agaroz/100 ml 1XTBE: Tris-Borik asit-EDTA),çözeltisi ve 1 g agaroz (Sigma) tartılarak konulup mikrodalga fırın kullanılarak eritilmiştir. (Şekil 3.5)



Şekil 3.5. Agaroz jelin hazırlanması

Daha sonra jel biraz soğutulduktan sonra Şekil 3.6'daki gibi traylere döküp jel tarakları yerleştirilmiş ve jelin katılaşması beklenmiştir.



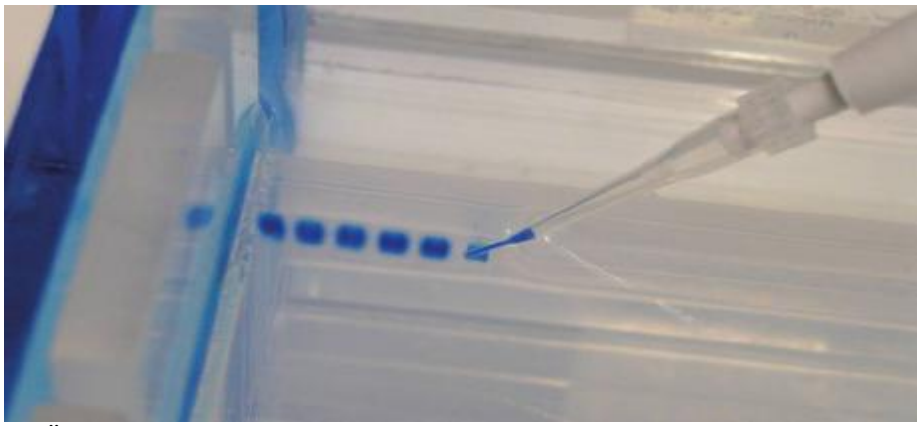
Şekil 3.6. Agaroz jeli küvete dökme işlemi

Daha sonra, 1XTBE içeren elektroforez tankına, küvet yerleştirildikten sonra, taraklar hafifçe çıkartılmıştır. Jel kuyularının baş kısmına moleküler ağırlık markeri yüklenmiştir (Şekil 3.7).



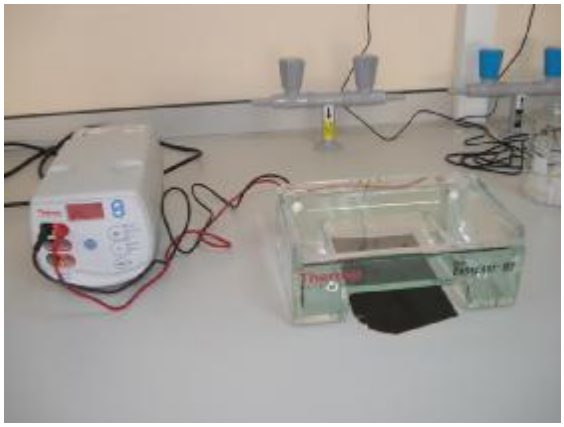
Şekil 3.7 DNA ladder markeri

Jel görüntülemede 1 kb ve 100 bç DNA ladder kullanılmıştır (Favorgen, Tayvan). Kuyulara, 10 µl DNA örnekleri 2 µl yükleme tamponu (%0.25 bromofenol mavisi, %40 sükroz, 100 mM EDTA, pH:8.0) ile birlikte yüklenmiştir (PZR ürünleri 5 µl + 1 µl yükleme tamponu) (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Örneklerin Agaroz Jel'e yüklenmesi

Yükleme sonrası güç kaynağından jel tankına 100 Volt elektrik akımı verilerek jel 30-40 dakika koşturulmuştur (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Jel elektroforez tankı

Daha sonra jel, etidyum bromür (0.5 µg/ml) içeren bir kabın içerisinde 10 dakika bekletilip DNA'ların boyanması sağlanmıştır. Boyanan jelde, ultraviyole (UV) ışık altında DNA'nın varlığı görüntülenmiş ve fotoğrafı çekilerek değerlendirmek üzere bilgisayara aktarılmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Jel görüntüleme sistemi

3.4.3. Hayvansal lif örneklerinin Mitokondriyal Sitokrom b gen bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Çalışmada kullanılan hayvansal elyaf örneklerinin *Cyt b* gen bölgelerinin polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile çoğaltılmasında kullanılan bileşenler Çizelge 3.10'da verilmiştir. Bu bileşenlerin tümü belirtilen miktarlarda buz üzerindeki 0.2mL'lik PZR ependorf tüpleri içerisinde hazırlandıktan sonra PZR cihazına (Eppendorf/Favorgen/BioRad) amplifiye edilmiştir. PZR amplifikasyon şartları Çizelge 3.11'de belirtildiği gibi ayarlanmıştır. PZR için gerekli DNA polimeraz *Taq* polimeraz HiFi *Taq* polimeraz, HS-Pf *Taq* polimeraz ile dNTP mix Fermentas firmasından temin edilmiştir.

Çizelge 3.10. PZR bileşenleri

Bileşenler	Konsantrasyon	Miktar
Kalıp DNA	20-30 ng/µl	1.0 µl
PZR Buffer	10X	4.0 µl
İleri Primer	10 pmol/µl	1.0 µl
Geri Primer	10 pmol/µl	1.0 µl
dNTP mix	1.0 nM	1.0 µl
Taq DNA polimeraz	5U/µl	0.5µl
dH2O		31.5µl
Toplam		40µl

Çizelge 3.11. PZR amplifikasyon şartları

Döngü işlemi	Sıcaklık (°C)	Döngü sayısı	Süre
Ön denaturasyon	95	1	5 dakika
Denatürasyon	95		30 saniye
Yapışma	60	35	30 saniye
Uzama	72		45 saniye
Kalıntı eleminasyonu	72	1	20 dakika
Bekleme	4	1	∞

Belirtilen PZR şartlarında amplifiye edilen ürünler %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. PZR işleminde kalıp DNA olarak liflerden izole edilmiş DNA'lar ayrı olarak kullanıldığı gibi belli oranlarda karıştırılarak çoklu PZR yapılmıştır.

Sonuçlar, bulgular ve tartışmalar kısmında verilmiştir. İncelenecek hayvansal lifler kıyafetlerin ve ayakkabıların yapımında en çok tercih edilen koyun, tavşan, at, sığır, kedi gibi hayvanlar olarak seçilmiştir. Bu hayvanların çoğuna ait örnekler temin edilmiştir. Bu örneklerin DNA'ları elde edilip, her türe özgü tasarlanan primerler eklenerek PCR (Polimeraze Chain Reaction) cihazında hedef bölgeler çoğaltılmıştır. Jel görüntüleme ile bantlar gözlemlenmiştir. Bu sayede bilinmeyen herhangi bir tüy için DNA analizi yapılarak bu primerler eklenecek ve hangi türe ait olduğu kesinleşmiş olacaktır.

3.5. Mikroskopik analizler

Elyafların mikroskop görüntüleri Nikon marka FISH mikroskopunda ve SEM-EDX Mikroskobu kullanılarak yapılmıştır.

3.5.1. Floresan-Işık Mikroskobu

Pamuk, akrilik ve naylon elyaflarının ham ve boyanmış hallerinin, boyuna ve renkli görüntüleri 20x lensler kullanılarak Şekil 3.11'de gösterilen mikroskopta alınmıştır.



Şekil 3.11. FISH Mikroskobu

3.5.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (EDX analizi ile birlikte)

EDX Energy-dispersive X-ray spectroscopy ile boyanmış ve boyanmamış pamuk, akrilik ve naylon elyafların kimyasal analizlerini yapmak amacıyla; aynı zamanda hayvansal liflerin boyuna ve enine kesit görünümleri için Şekil 3.12'de gösterilen taramalı elektron mikroskobu Zeiss Evo LS 10 cihazı kullanılmıştır. Numunelere görüntüleme işleminden önce aşağıda Şekil 3.13'de gösterilen kaplama cihazında altın kaplama işlemi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar bulgular ve tartışma kısmında sunulmuştur.



Şekil 3.12. SEM-EDX Mikroskobu



Şekil 3.13. Cressington marka altın ve karbon kaplama cihazı

3.6. Spektroskopik analizler

Elyaf analizlerinde Şekil 3.14'de gösterilen Perkin Elmer marka FT-IR cihazı kullanılmıştır. Boyanmış ve boyanmamış pamuk, akrilik ve naylon elyafların spektrumları; ATR (Attenuated total reflection) aparatı takılı olan FT-IR cihazında MIR (Orta-IR) bölgede alınmıştır. Herbir numuneye özgü parmak izi niteliğinde olan karakteristik pikler bulgular ve tartışma kısmında değerlendirilmiştir.



Şekil 3.14. FT-IR cihazı

3.7. Kromatografik analizler

Analizler Shimadzu marka sıvı kromatografi (HPLC) cihazında (Şekil 3.15) yapılmıştır. Cihazda Degasser (DGU-20A5)ünitesi, pompa (LC20AD) ünitesi, otoörnekleyici (SIL-20AHT) ünitesi, fırın (CTO-20AC) ünitesi, kolon (Inertsil ODS3, C18 (250 mm.x4,6 mm.x 5µm.) ve diyot dizi dedektör (DAD) (SPD-M20A) ünitesi mevcuttur.



Şekil 3.15. Çalışmada kullanılan HPLC cihazı

Akrilik, naylon ve pamuk lifi üzerindeki boyarmaddelerin tanınmasına yönelik kısımda kromatografik analizler yapılmıştır. Bu analizlerin hepsinde yani akrilikteki bazik, naylondaki asit ve pamuktaki reaktif boyarmaddelerin tespit edilmesine yönelik çalışmalarda hemen hemen aynı yöntem takip edilmiştir. Yani sistematik olarak HPLC'de metot oluşturulabilmesi için kırmızı, mavi ve sarı renklerde bazik, asit ve reaktif boyarmaddeler standart olarak temin edilmiştir. Standart boyaların 3 farklı renginden (Sarı, kırmızı ve mavi) rastgele konsantrasyonlarda karışımlar oluşturulmuştur. Cihazda ayrılma özellikleri tespit edilmiştir. Bu boyarmaddelere ait olduğu düşünülen pikler gözlendiğinde, hangi pikin hangi boyarmaddeye ait olduğunu tespit etmek için ve alıkonma sürelerinin net olarak tespit edilmesi için boyarmaddeler cihazda tek tek analiz edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanarak kalibrasyon eğrisi çizdirilmiştir. Daha sonra deneme amacıyla kontrol numuneler (casefiber) hazırlanıp boyarmaddeleri ekstrakte edilip cihazda okutulmuştur. Elde edilen veriler bulgular ve tartışma kısmında tartışılmıştır.

3.8. İstatistik Analizler

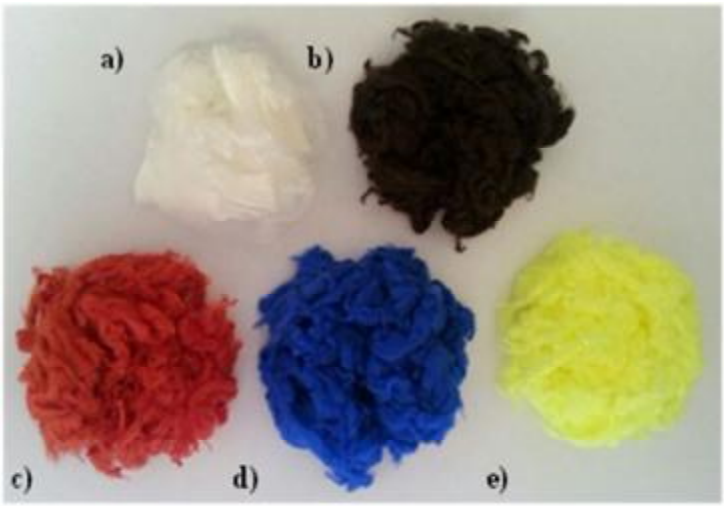
Çalışmada elde edilen sonuçlar en az üç tekerrürlü olarak yapılmıştır. Bulgularımızın öznel olması nedeniyle, uygun istatistiksel gruplandırılmaların oluşturulması mümkün olmamış, dolayısı ile istatistiki değerlendirme karşılaştırılmalı olarak yapılamamıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

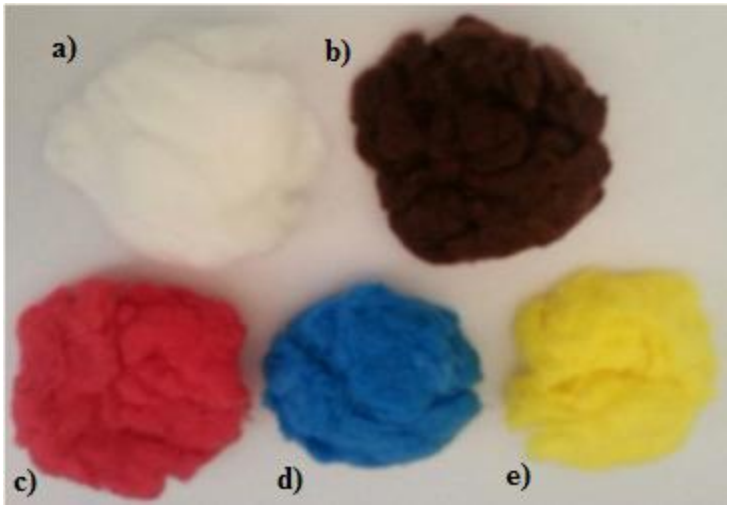
Bu kısımda elyaflara uygulanan moleküler mikroskopik, spektroskopik, kromatografik analizlerden alınan sonuçlar sırayla incelenecektir.

4.1. Liflerin boyanması

Lifler 3.2. Boyarmadde ve Boyama Yardımcıları ile 3.3.'de Liflerin Boyanması kısmında anlatıldığı gibi farklı reçetelerle ve farklı boyama grafikleri ile boyanmıştır.



Şekil 4.1. Ham ve Boyanmış akrilik elyafları a) ham akrilik b) karışım boyanmış akrilik c) kırmızı boyalı akrilik d) mavi boyalı akrilik e) sarı boyalı akrilik



Şekil 4.2. Ham ve Boyanmış naylon elyafları a) ham naylon b) karışım boyanmış naylon c) kırmızı boyalı naylon d) mavi boyalı naylon e) sarı boyalı naylon



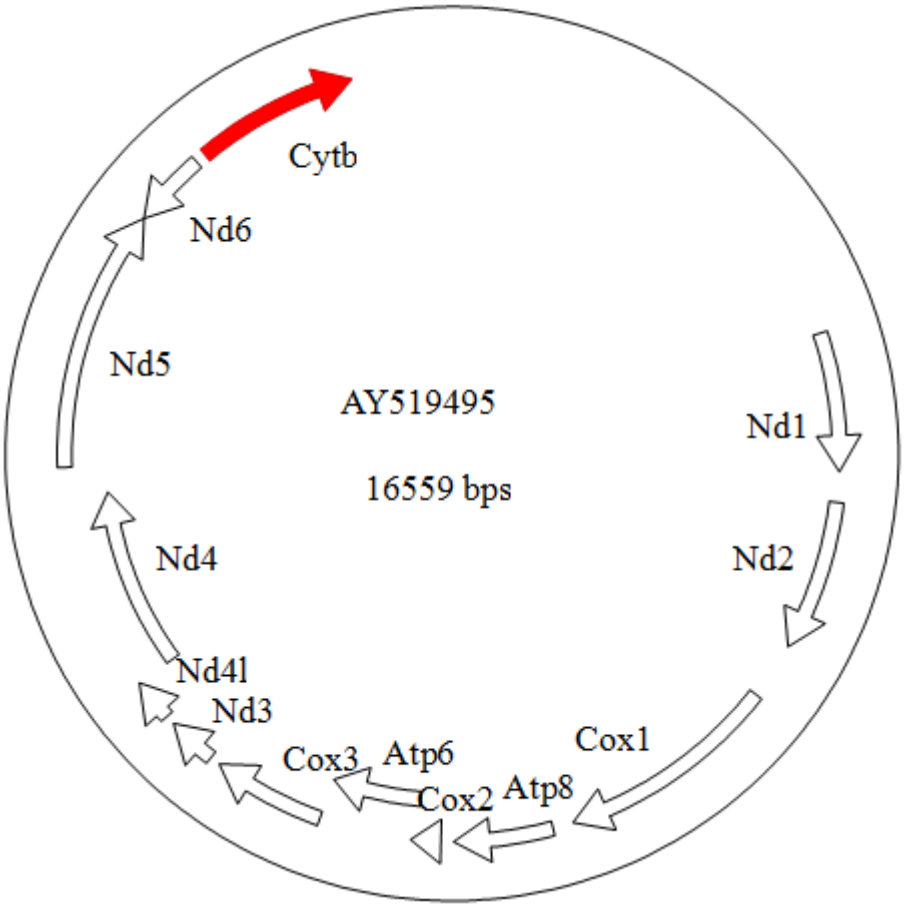
Şekil 4.3. Ham ve Boyanmış pamuk elyafları a) ham pamuk b) karışım boyanmış pamuk c) kırmızı boyalı pamuk d) mavi boyalı pamuk e) sarı boyalı pamuk

4.2. Hayvansal Liflerin Moleküler Olarak Tanımlanması

4.2.1. Hayvansal liflerin orijinlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile belirlenmesi

Tez çalışmasında, hayvansal liflerden izole edilen DNA örneklerinden mitokondriyal genom üzerinden sitokrom b (*Cyt b*) gen bölgesini çoğaltmak için

gerekli universal ileri ve türe özel geri Primerler, Gen Bankası internet portalından (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) araştırılmış ve tasarlanmıştır. *CytB* geni 1140 bç uzunlukta ve CytB proteinini kodlamaktadır (Şekil 4.4). Bu protein organik moleküllerdeki enerjiyi hücrenin kullanabileceği forma dönüştürmektedir. Bu gen üzerindeki mutasyon letal etkilidir dolayısı ile bu gen üzerindeki farklılıklar gerçek tür farklılıkları olarak ifade edilmektedir.



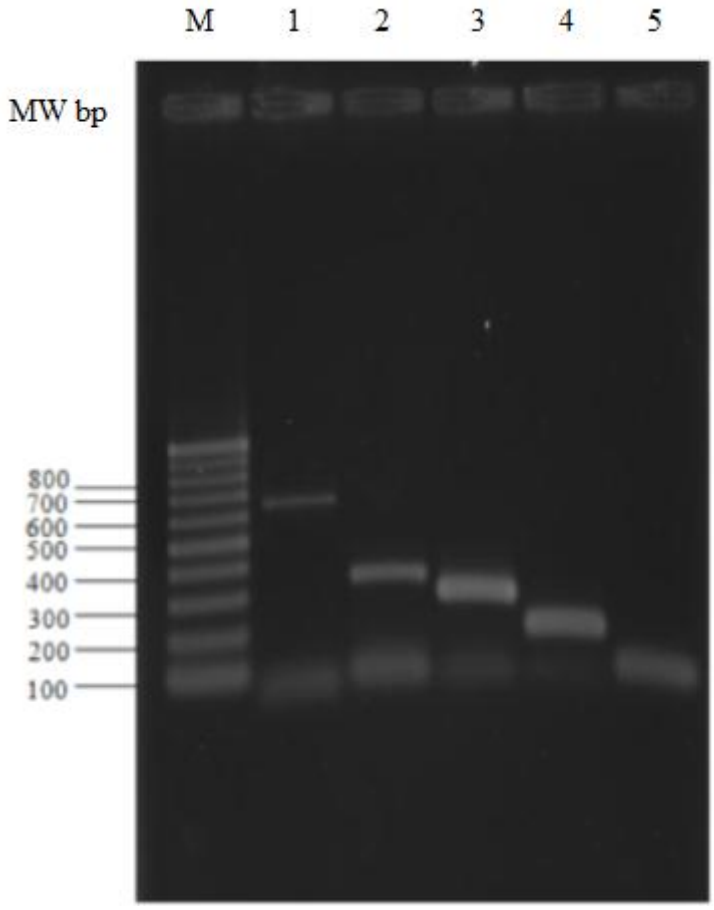
Şekil 4.4. Mitokondriyal DNA bölgesinin şematik gösterimi

Gen üzerinden tasarlanan primerlerin nükleotid dizileri ve moleküler detayları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Primerler, İontek, İstanbul firmasından temin edilmiştir.

Çizelge 4.1. *cytB* geni üzerinden tasarlanmış primer detayları

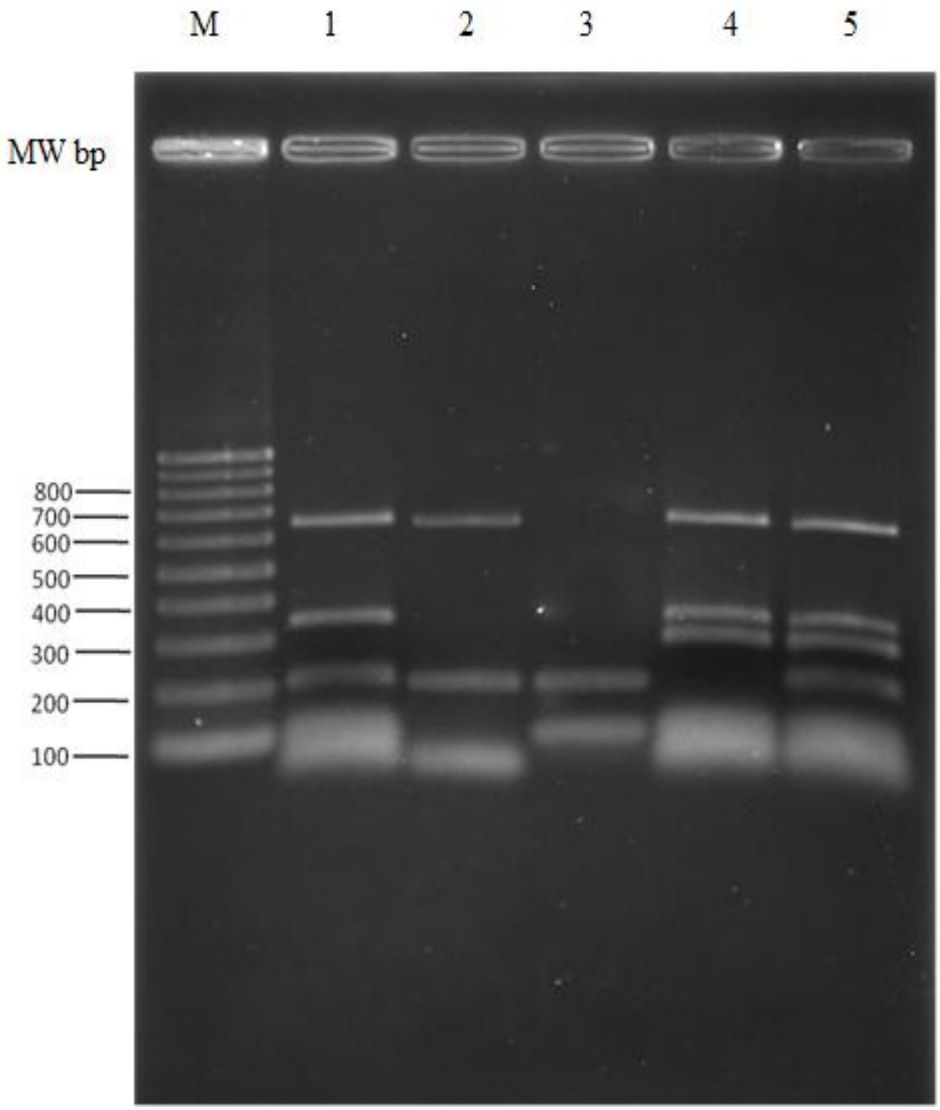
Primer Tür	Primer nükleotid dizisi (5′→ 3′)	Amplicon uzunluğu (bç)	Erişim no
CytUniF	TGAGGACAAATATCATTYTGAGGRGC		Universal
Cat R *Felis catus*	TTTCCCTCAGATYCATTCTACTAGTTCAGTC	89 bp	NC_001700
Cow R *Bos Taurus*	TAAGATGTCCTTAATGGTATAGTAG	287 bp	NC_001567
Horse F *Equus caballus*	TACGTATGGGTGTTCCACTGGC	208 bp	NC_001640
Rabbit F *Oryctolagus cuniculus*	GTGAAAATTTGAATTATAAGGCACAG	192 bp	NC_001913
Sheep F *Ovis aries*	GGCGTGAATAGTACTAGTAGCATGAGGATG	336 bp	NC_001941

Materyal ve metod kısmında açıklanan yöntemler takip edilerek at, koyun, sığır, tavşan ve kedi liflerinden toplam DNA'lar izole edilmiştir. Amplifikasyonlar da CytBF-HorseF, CytBF-SeepF, CytBF-CowF, CytBF-RabbitF ve CytBF-CatF primer çiftleri kullanılarak yapılmıştır. İzole edilen DNA'lar kalıp olarak kullanılarak Şekil 4.5'de gösterilen PCR amplifikasyonları elde edilmiştir. Amplikon uzunlukları; At için 623 bp (kuyu 1); koyun 309bp (kuyu 2); sığır lifi 265 bp (kuyu 3); tavşan lifi 201 bp (kuyu 4); kedi lifi 70 bp (kuyu 5) olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar referans sekans ile karşılaştırıldığında beklenen sonuçları vermiştir.



Şekil 4.5. Hayvan liflerinden izole edilen DNA'lar kalıp olarak kullanıldığında cytB bölgesinden amplifiye edilen PCR ürünleri; M: Referans ladder (100 bp ladder); 1: At; 2: koyun; 3: sığır; 4: tavşan; bant 5: kedi

Ayrıca karışık liflerde türlerinin tespitine yönelik olarak, Şekil 4.6.'da gösterildiği gibi Multipleks PZR yapılmıştır. Bu reaksiyonlarda birden fazla kalıp DNA ve birden fazla primer çifti kullanarak amplifikasyon aynı reaksiyon tüpünde çoğaltılmıştır. Cytb bölgesinde hayvan lifleri karışık kombinasyonlar halinde olarak çalışılarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Yani olay yerinde herhangi bir şekilde bir arada bulunabilecek hayvansal liflerin tanımlanması yüksek güvenilirlikte gerçekleştirilebilecektir.



Şekil 4.6. Çeşitli hayvan tüylerinin Cytb bölgesine ait PCR ürünleri, Bant M: nükleik asit uzunluk referans cetveli (100 bp ladder); Bant 1: At, koyun, tavşan ve kedi; Bant 2: At ve tavşan; Bant 3: Tavşan ve kedi; Bant 4: At, koyun, sığır ve kedi; Bant 5: at, koyun, sığır, tavşan ve kedi

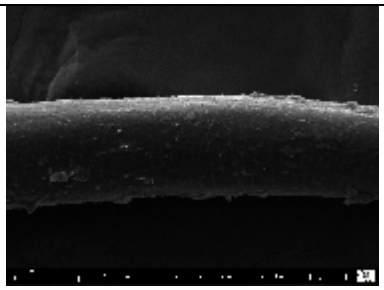
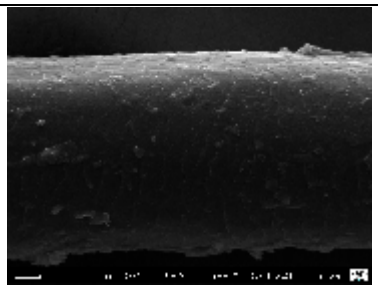
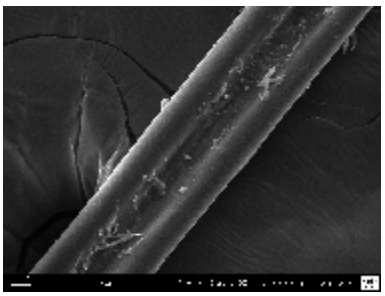
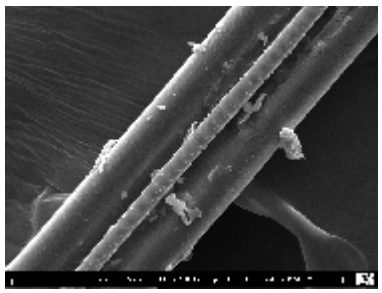
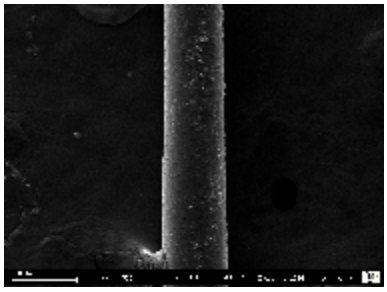
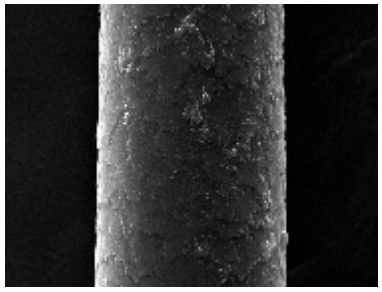
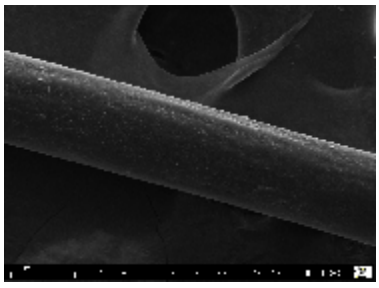
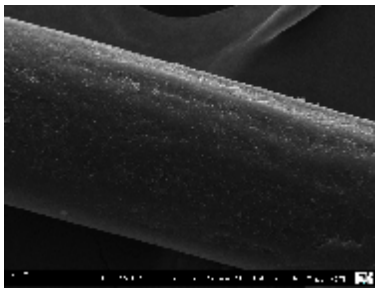
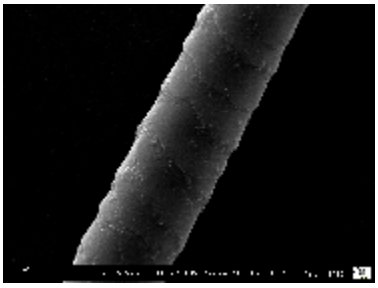
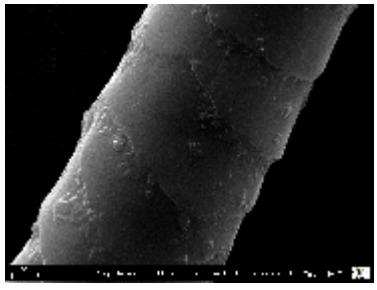
4.3. MikroskobikAnalizler

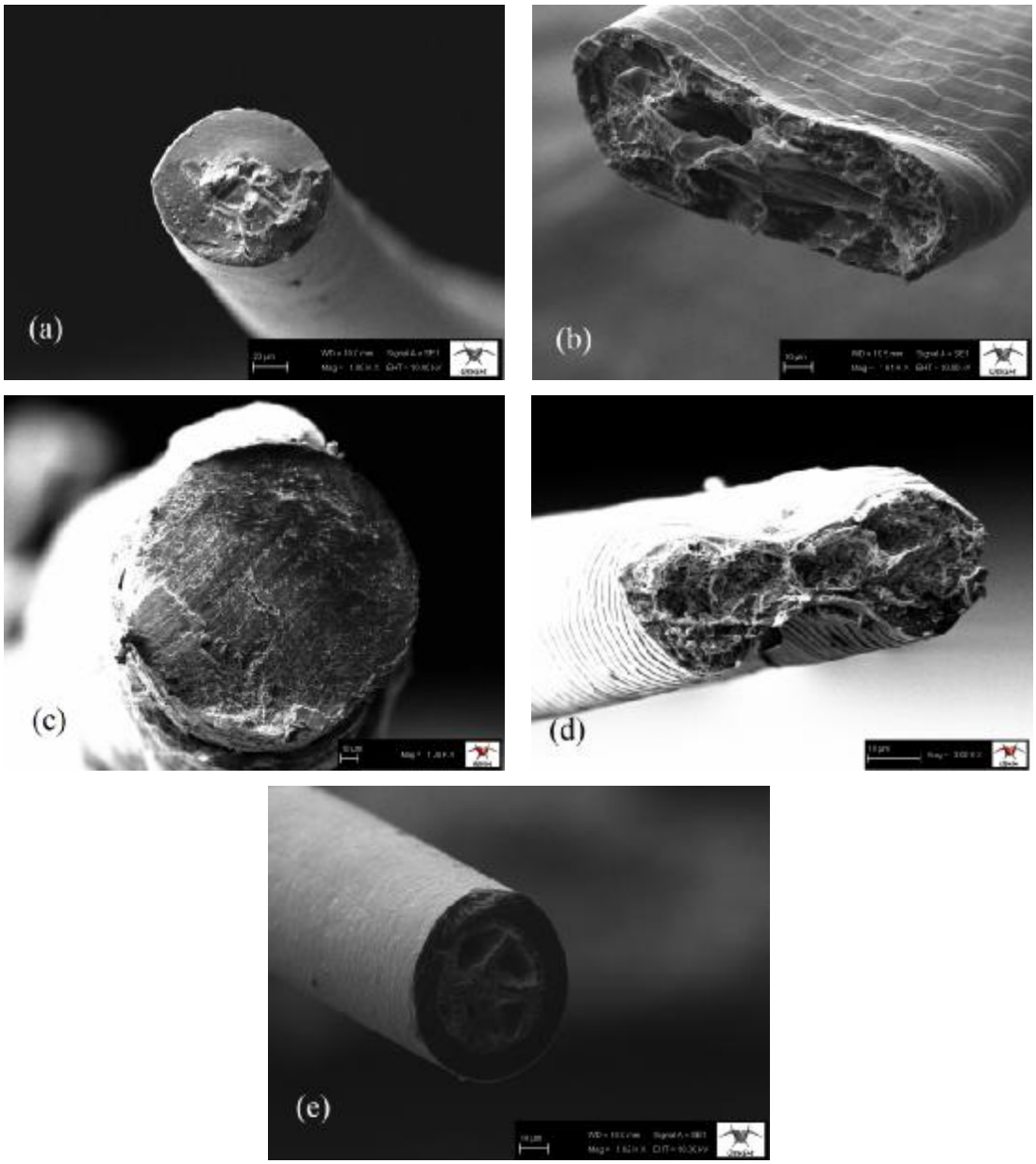
Hayvansal liflerin boyuna ve enine kesit görünümleri SEM mikroskopunda görüntülenmiştir. 3 ana renk (sarı, kırmızı, mavi) bir de bu renklerin karışımı olmak üzere 4 farklı renkteki sentetik ve bitkisel liflerin (Pamuk, akrilik, naylon) ise mikroskobik analizleri FISH ve SEM mikroskobunda yapılmıştır.

4.3.1. Hayvansal elyafların SEM mikroskopu Analizleri

Hayvansal liflerin 500 kat ve 1000 kat büyütme sonrası boyuna görünümleri (Çizelge 4.2'de) ve enine kesit görünümleri (Şekil 4.7'de) Zeiss EVO-LS marka SEM-EDX cihazında alınmıştır. Koyun, at ve sığır lifleri birbiriyle benzerlik gösterirken, kedi ve tavşan lifleri farklılık arzetmektedir.

Çizelge 4.2. Hayvansal elyafların SEM mikroskop görünümleri

Elyaf Cinsi	**500 kat büyütme**	**1000 kat büyütme**
Koyun		
Tavşan (sırasıyla 750 kat ve 1000 kat büyütme)		
At		
Sığır		
Kedi (sırasıyla 5000 kat ve 10000 kat büyütme)		



Şekil 4.7. Hayvansal liflerinin SEM-EDX cihazındaki enine kesit görünümleri (a) at (b) koyun (c) sığır (d) tavşan (e) kedi

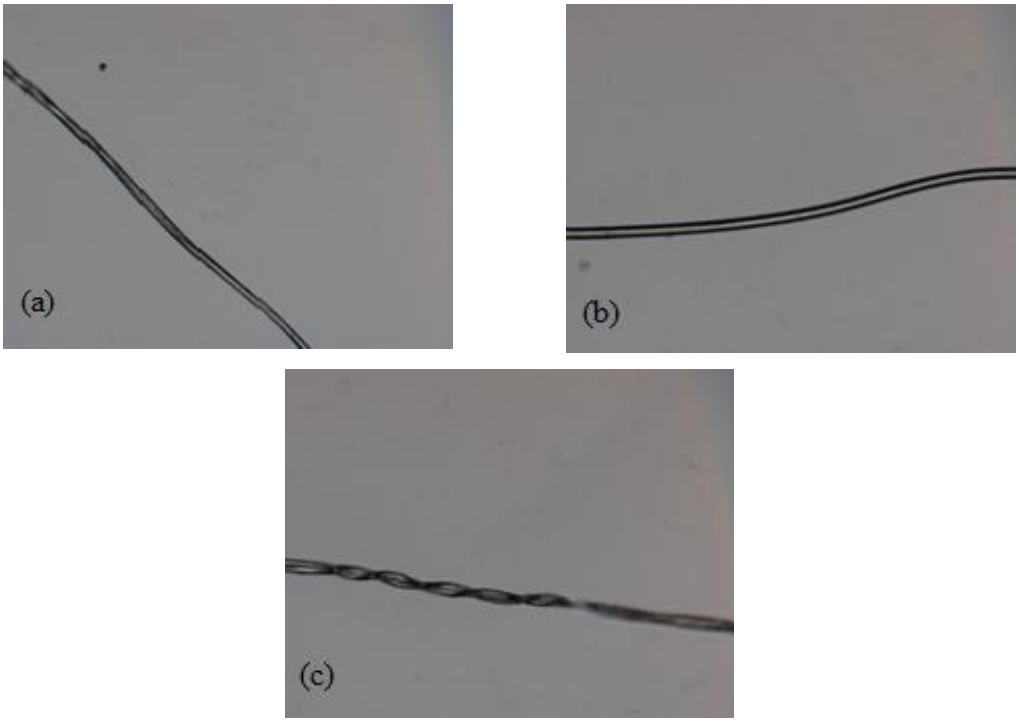
Görüntülerden anlaşılacağı gibi bazı hayvan liflerini birbirinden ayırt etmek neredeyse imkânsız görünmektedir. Özellikle at, koyun, tavşan ve kedi tüyünün boyuna görünümleri birbirine çok benzemektedir. Aynı zamanda koyunla tavşanın ve at ile kedinin de enine kesit görünümleri neredeyse aynıdır. Bu aşamada mikroskop uzmanının tecrübeye dayalı kararı önemli olmaktadır. En doğrusu ise daha gelişmiş moleküler teknikleri uygulamaktır.

4.3.2. Sentetik ve Bitkisel Liflerin FISH mikroskopu Analizleri

Bu kısımda boyanmamış (ham), 3 farklı renge boyanmış (sarı, kırmızı, mavi) ve bu üç rengin karışımına boyanmış olan 3 elyafın (Pamuk, akrilik, naylon) renkli ve boyuna görünümleri yeralmaktadır.

4.3.2.1. Boyanmamış elyaf FISH görünümleri

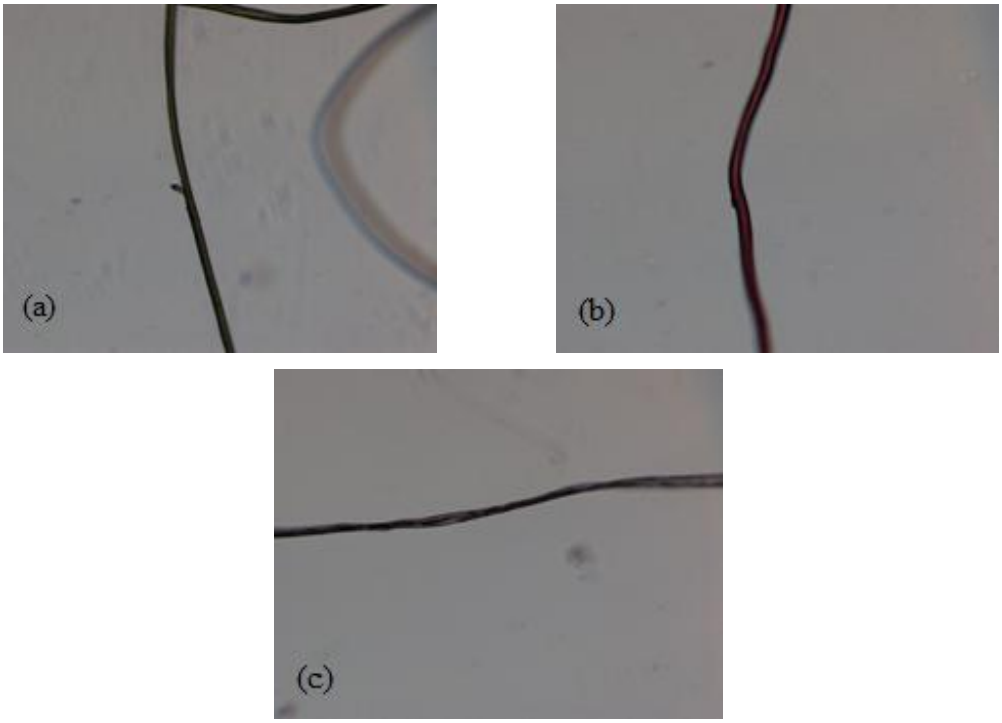
Şekil 4.8'de görüldüğü gibi, boyanmamış akrilik ve naylon birbirinden ayırt edilemezken pamuk burgu şeklindeki yapısıyla diğerlerinden ayrılabilmektedir.



Şekil 4.8. Boyanmamış elyaf görünümleri (a)akrilik (b) naylon (c) pamuk

4.3.2.2. Karışım boyanmış elyaf FISH görünümleri

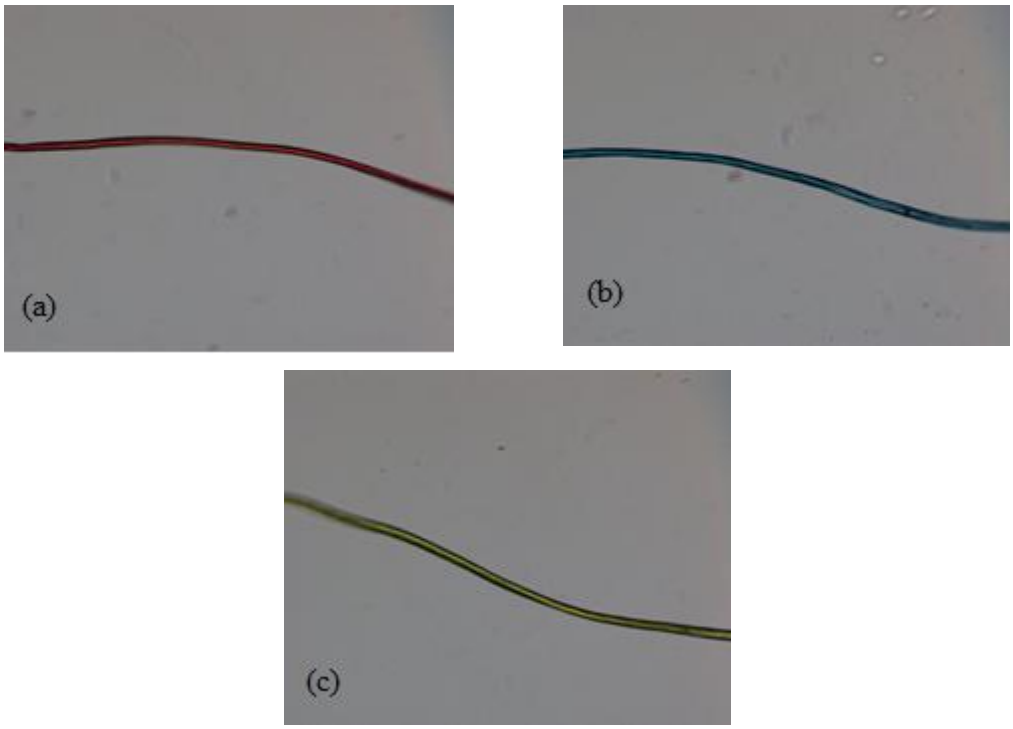
Karışım boyanmış akrilik ve naylon hem şekil hem renk tonu itibariyle birbirinden ayırt edilemezken pamuk kıvrımlı yapısıyla yine kendini belli etmektedir (Şekil 4.9) ve diğer elyaflardan kolaylıkla ayırt edilebilmektedir.



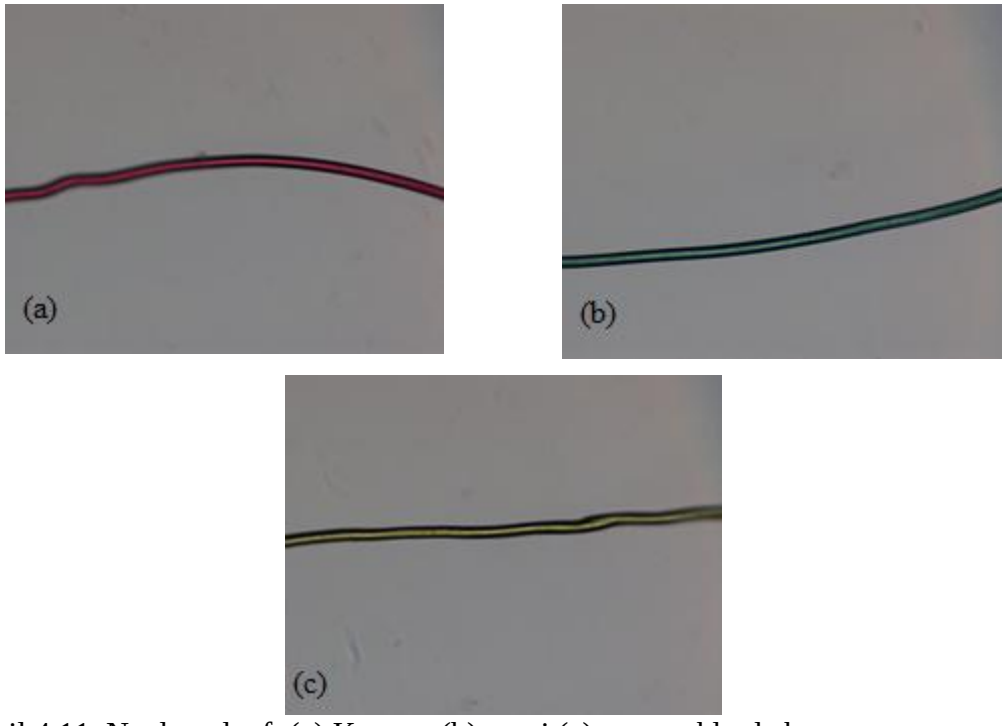
Şekil 4.9. Boyanmış elyaf görünümleri (a) akrilik (b) naylon (c) pamuk

4.3.2.3. Kırmızı, mavi ve sarı renklerde boyanmış elyaf FISH görünümleri

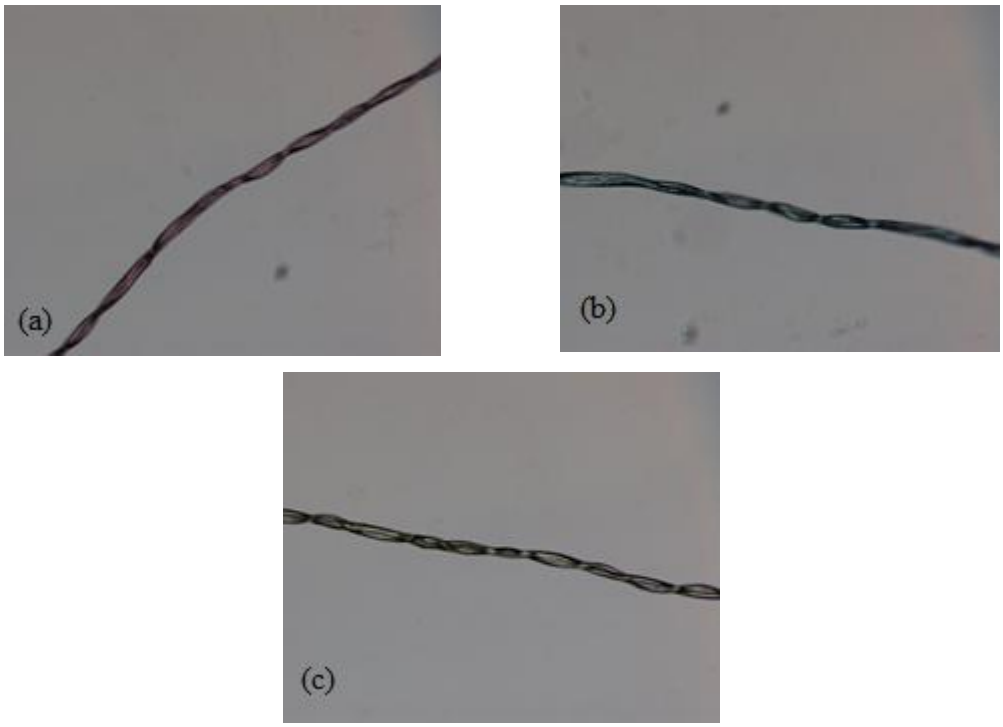
Aynı renk tonlarına boyanmış naylon ve akrilik elyafları birbirlerinden ayırt edilemezken pamuk elyafı boyuna görünümünün kıvrımlı yapısından dolayı kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. (Şekil 4.10 – 4.12)



Şekil 4.10. Akrilik elyafı (a) Kırmızı (b) mavi (c) sarı renklerde boyanmış



Şekil 4.11. Naylon elyafı (a) Kırmızı (b) mavi (c) sarı renklerde boyanmış



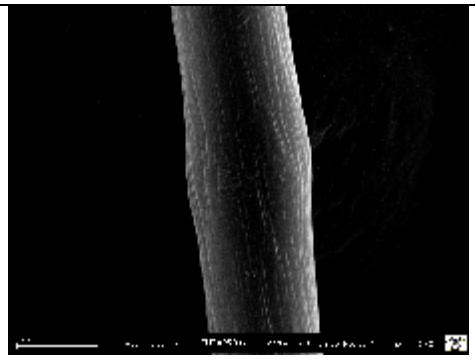
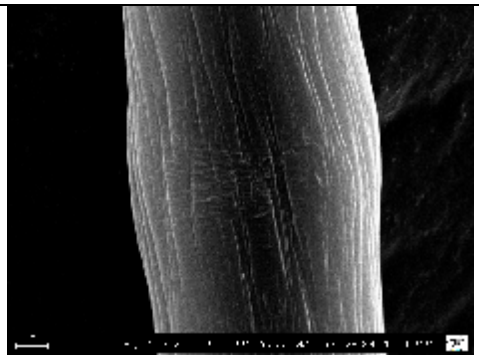
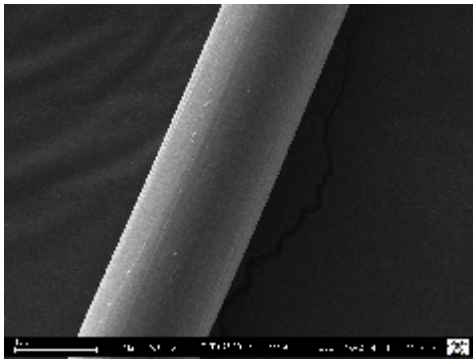
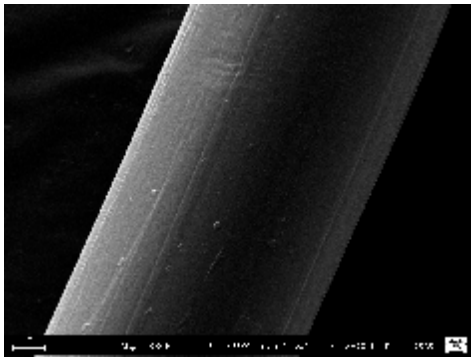
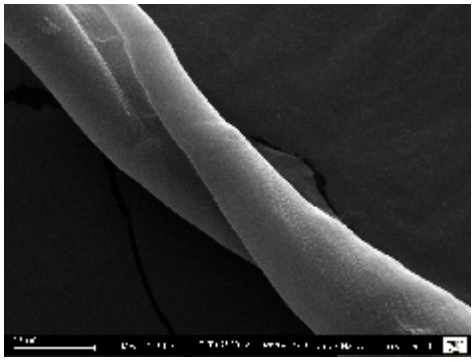
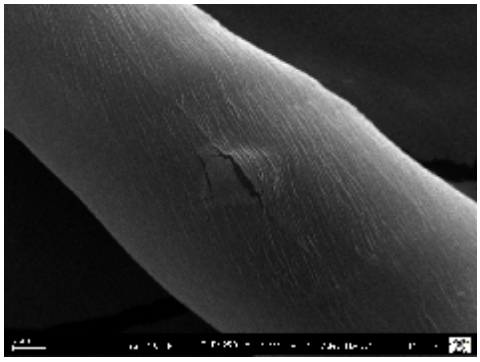
Şekil 4.12. Pamuk elyafı (a) Kırmızı (b) mavi (c) sarı renklerde boyanmış

(Brinsko, 2010) çalışmasında azlon, PLA, selüloz kompozitleri-aljinat, kitin, bambu ve viskoz rayonu gibi elyafları karakterizasyonlarını yapmak için ışık mikroskopunda aldığı boyuna görünümlerin yanı sıra enine kesitleri, refraktif indisleri, erime noktaları ve çözünürlüklerine bakmıştır. Boyuna görünümlerinden ayırt edilemeyen naylon ve akrilik gibi lifler örneğin erime noktaları farkından veya çözünürlüklerinden ayırt edilebilir. Ancak bu metotlar tahribatlı metotlar olduğundan adli analizlerde tercih sebebi olmamaktadır.

4.3.3. SEM mikroskopu analiz sonuçları

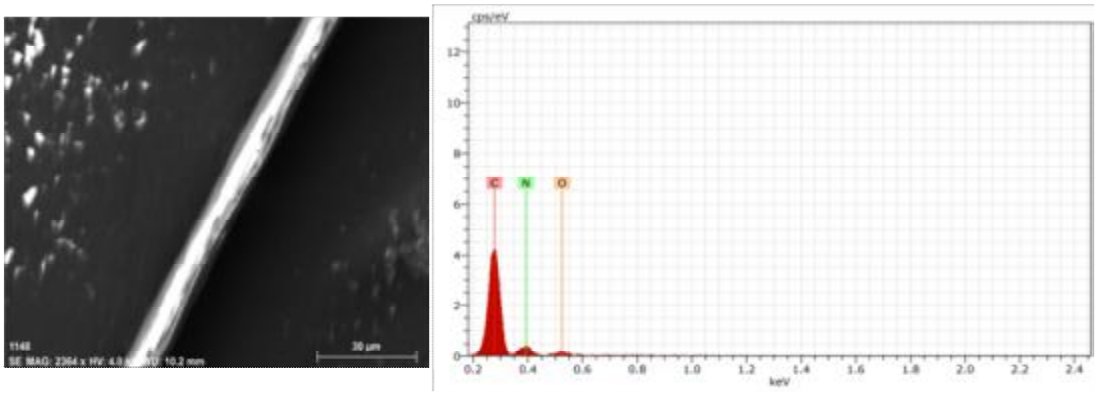
Boyanmamış Akrilik, Naylon ve Pamuk elyafların 5000 ve 10000 kat büyütmeler sonucu SEM görüntüleri Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Boyanmamış Akrilik, Naylon ve Pamuk elyafların SEM görünümleri

Elyaf Cinsi	5000 kat büyütme	10000 kat büyütme
Akrilik		
Naylon		
Pamuk		

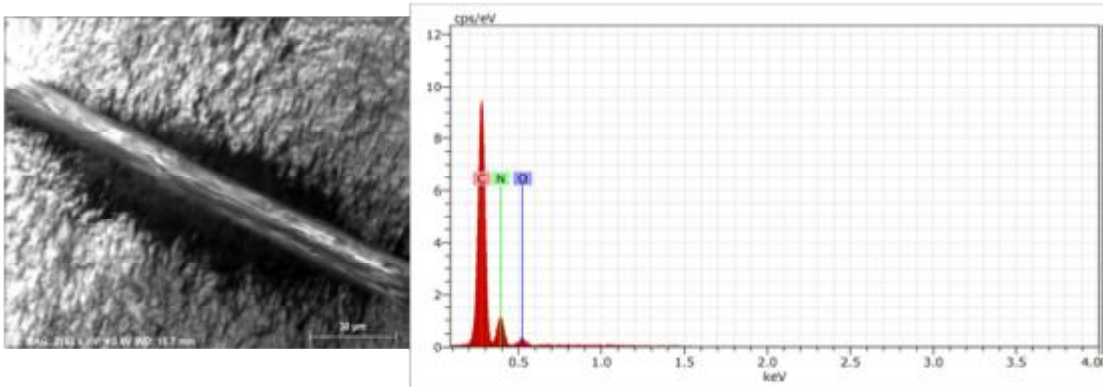
Akrilik ve Naylon elyafların görünüm olarak benzediği ancak pamuk elyafının kıvrımlı yapısından dolayı farklılık gösterdiği ve ayırtedilebildiği görülmüştür.

4.3.4. SEM-EDX mikroskopu analiz sonuçları



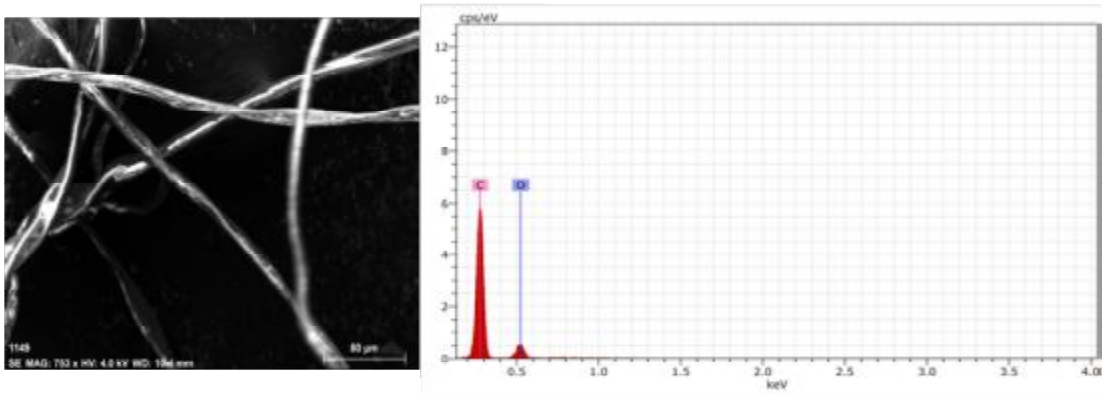
Şekil 4.13. Bazik boyarmaddelerle karışım boyanmış akrilik elyafına ait ölçümler

Şekil 4.13’ de görüldüğü üzere SEM-EDX analizi sonucu bazik boyarmaddelerle karışım boyanmış akrilik elyafının kimyasal içeriğinde % 75.15 Karbon, % 19.86 Azot ve % 4.99 oksijen saptanmıştır.



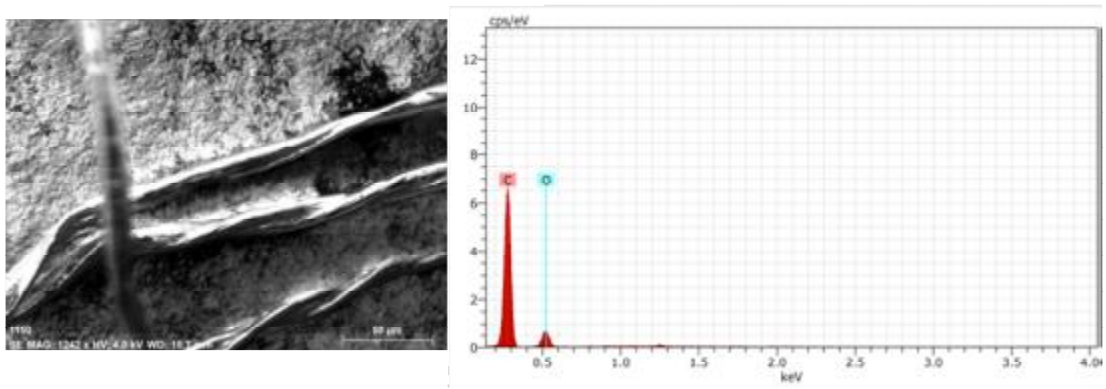
Şekil 4.14. Boyanmamış akrilik elyafına ait ölçümler

Şekil 4.14’de görüldüğü üzere SEM-EDX analizi sonucu boyanmamış akrilik elyafın kimyasal içeriğinde % 72.56 Karbon, % 23.51 Azot ve % 3.94 oksijen saptanmıştır.



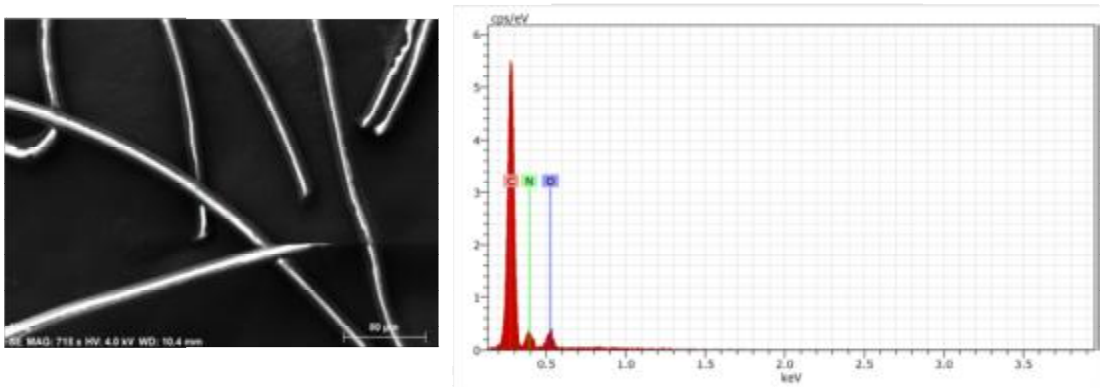
Şekil 4.15. Reaktif boyarmaddelerle boyanmış pamuk elyafına ait ölçümler

SEM-EDX analizi sonucu Reaktif boyarmaddelerle karışım boyanmış pamuk elyafın kimyasal içeriğinde % 85.80 Karbon, % 14.20 oksijen saptanmıştır. (Şekil 4.15)



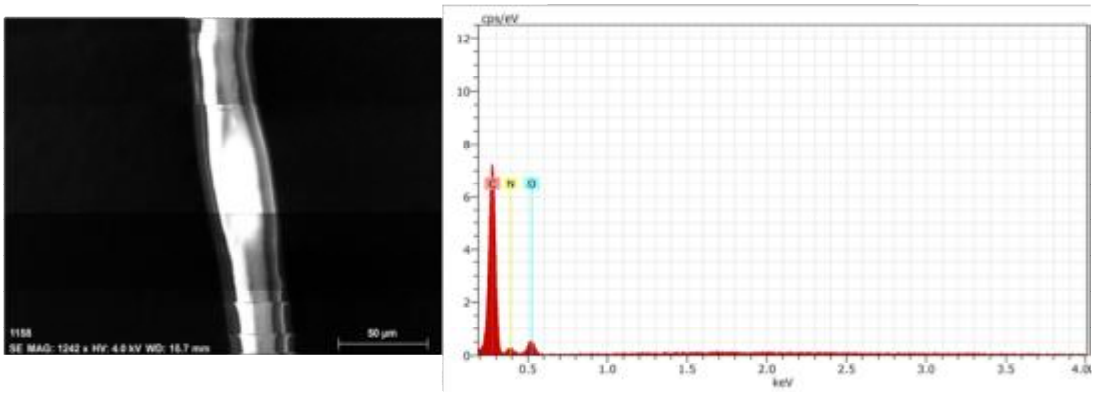
Şekil 4.16. Boyanmamış pamuk elyafına ait ölçümler

SEM-EDX analizi sonucu boyanmamış pamuk elyafın kimyasal içeriğinde % 85.17 Karbon, % 14.83 oksijen saptanmıştır. (Şekil 4.16)



Şekil 4.17. Asit boyarmaddelerle karışım boyanmış naylon elyafına ait ölçümler

Şekil 4.17'de görüldüğü üzere SEM-EDX analizi sonucu Asit boyarmaddelerle karışım boyanmış naylon elyafın kimyasal içeriğinde % 78.00 Karbon, % 13.64 Azot ve % 8.37 oksijen saptanmıştır.



Şekil 4.18. Boyanmamış naylon elyafına ait ölçümler

Şekil 4.18'de görüldüğü üzere SEM-EDX analizi sonucu boyanmamış naylon elyafın kimyasal içeriğinde % 87.33 Karbon, % 5.38 Azot ve % 7.29 oksijen saptanmıştır.

Boyanmış ve boyanmamış elyaflar için bakılırsa; elyaflar arasındaki element yüzdesi pamuk ve akrilik için belirgin bir fark göstermemiştir. Ancak naylon elyafının boyanmış ve boyanmamış olanının element yüzdesi % 9luk bir fark göstermektedir.

Farklı cins elyaflar arasında değerlendirildiğinde boyanmış akrilik ve naylon elyafın elementlerin içeriği ve yüzdesi (Karbon, oksijen ve azot) %3 lük bir fark göstermiş ve birbirine yakın olduğu saptanmıştır. Boyanmış pamuğun element içeriği (Karbon ve oksijen) ve yüzdesi diğerlerinden farklılık göstermiştir.

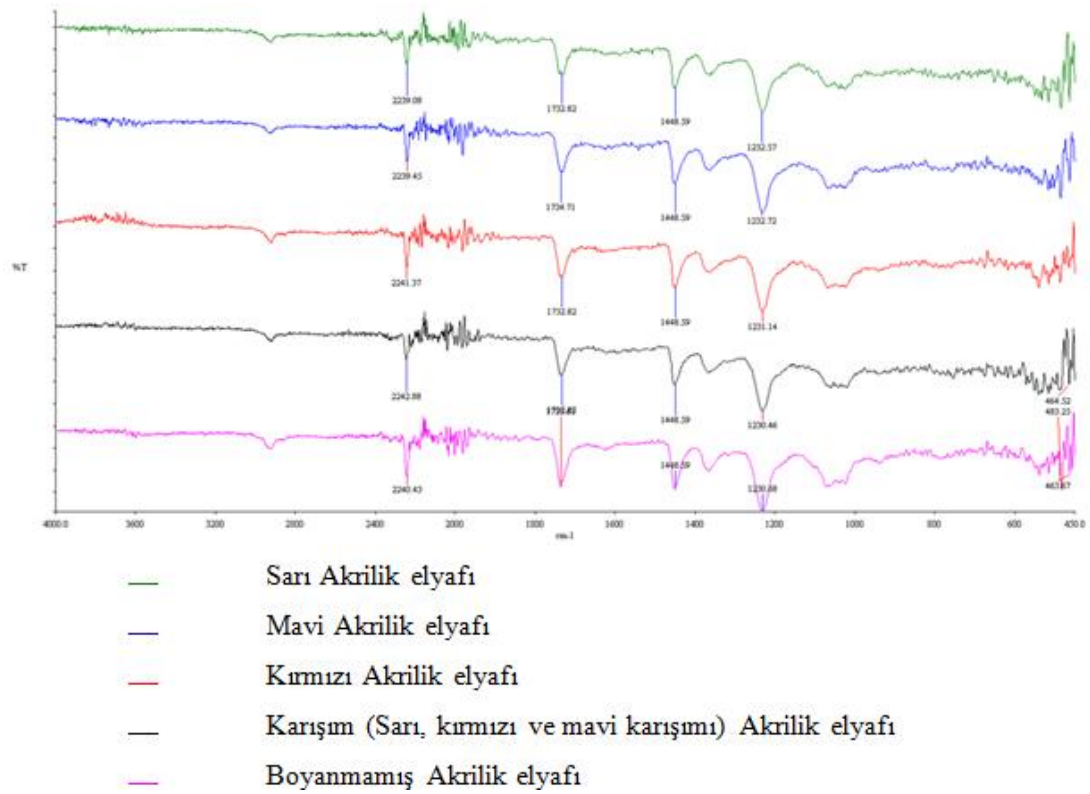
Dolayısıyla; olay yerinde aynı tonda fakat farklı türde (pamuk için; reaktif ve direk, naylon için; asit ve metal kompleks, akrilik için bazik ve pigment) boyarmaddelerle boyanmış 2 aynı elyaf bulunması durumunda SEM-EDX sonuçları bu konuyu aydınlatmak için yetersiz kalacaktır. Elyaf üzerindeki boyarmadde miktarı çok az olduğundan ve EDX bunu algılamadığı için başka bir tayin yöntemine ihtiyaç duyulacaktır. Bu da ancak elyaflar üzerindeki boyarmaddeleri ekstrakte edip tanımlama yöntemi ile tesbit edilebilir.

4.4. Elyafların spektroskopik analizleri

Bu çalışmada kızılötesi (infrared) spektroskopisi yöntemi (FT-IR) kullanılmıştır. Boyanmamış ve farklı renk tonlarına boyanmış pamuk, naylon ve akrilik liflerinin spektrumları alınmıştır.

4.4.1.Akrilik elyafın FT-IR analizleri

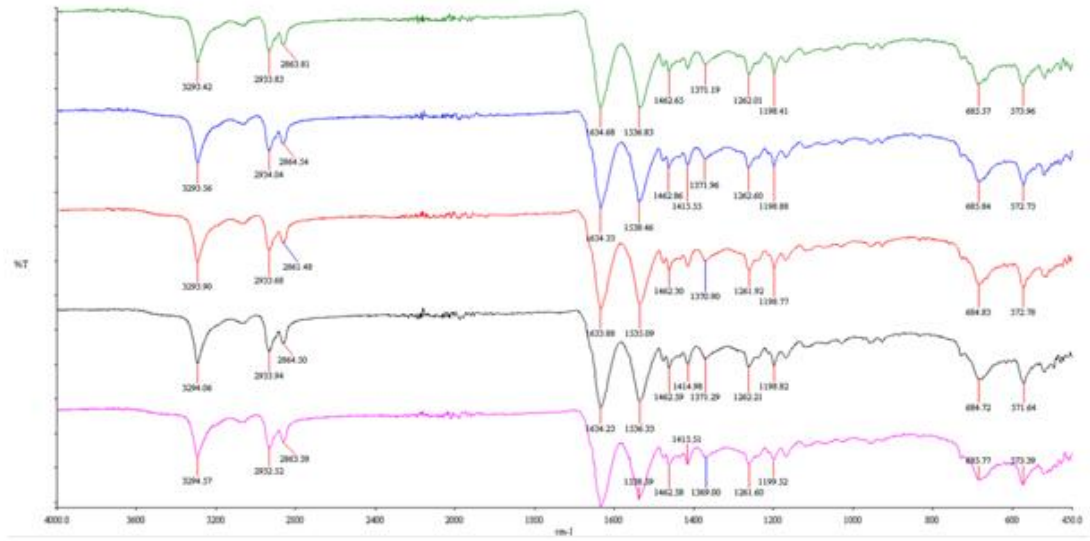
Boyanmamış akrilik elyafı, karışım boyanmış akrilik elyafı, kırmızı boyanmış akrilik elyafı, mavi boyanmış akrilik elyafı ve sarı boyanmış akrilik elyafının spektrumları Şekil 4.19’da yeralmaktadır. Spektrumlardan boyanın ve de boya türünün alınan spektrumlarda farklılık oluşturmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4.19. Akrilik elyafın FT-IR spektrumları

4.4.2. Naylon elyafının FT-IR analizleri

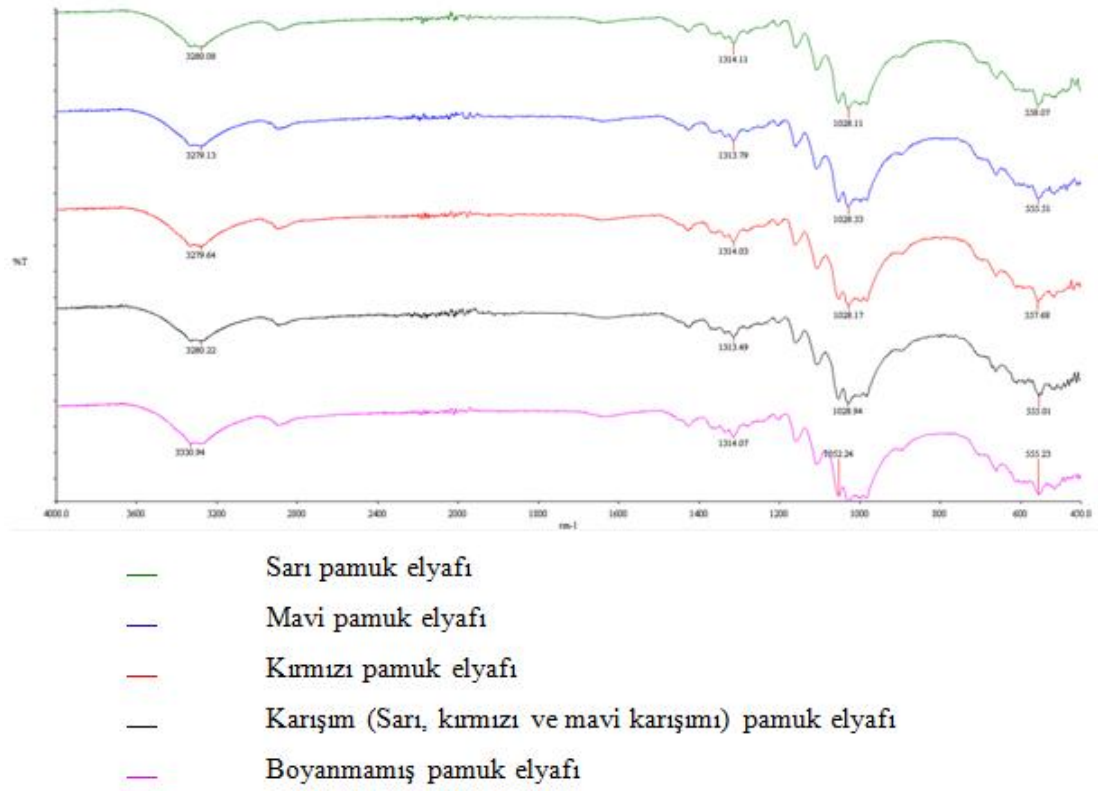
Şekil 4.20'de boyanmamış naylon elyafı, karışım boyanmış naylon elyafı, kırmızı boyanmış naylon elyafı, mavi boyanmış naylon elyafı ve sarı boyanmış naylon elyafının spektrumları yeralmaktadır. Yine akrilik elyafında olduğu gibi naylon elyaf için alınan spektrumlardan boyanın ve de boya türünün spektrumlarda farklılık oluşturmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4.20. Naylon elyafının FT-IR spektrumları

4.4.3. Pamuk elyafının FT-IR analizleri

Orta–IR dediğimiz MIR bölgede ATR ile alınan spektrumlarda Şekil 4.21'de boyanmamış pamuk elyafı, karışım boyanmış pamuk elyafı, kırmızı boyanmış pamuk elyafı, mavi boyanmış pamuk elyafı ve sarı boyanmış pamuk elyafı yeralmaktadır. Aynen akrilik ve naylon elyafında da olduğu gibi pamuk elyaf için alınan spektrumlardan da boyanın ve de boya türünün spektrumlarda farklılık oluşturmadığı gözlenmiştir.

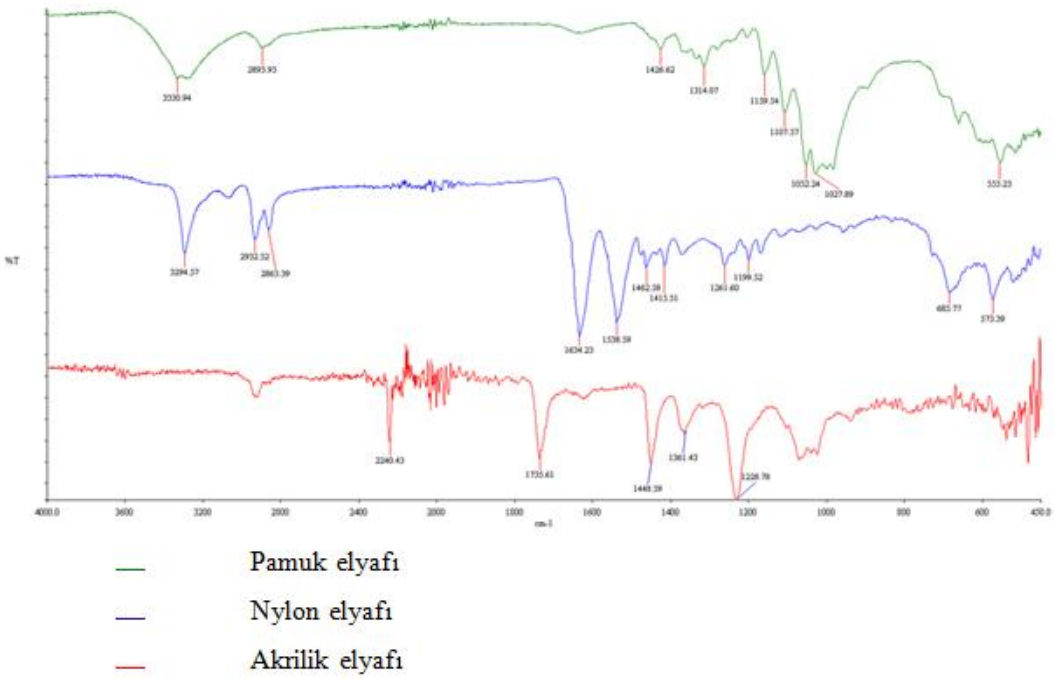


Şekil 4.21. Pamuk elyafının FT-IR spektrumları

4.4.4. Çalışmada kullanılan tüm elyafların FT-IR analizleri

Boyanmamış akrilik, naylon ve pamuk elyaflarının spektrumları Şekil 4.22'de verilmiştir.

Boyanmamış haldeki elyafların spekrumları birbirinden oldukça farklı olup karakteristik elyafa özgü pikler her bir elyaf için farklıdır.



Şekil 4.22. Boyanmamış elyafların FT-IR spektrumları

FT-IR sonuçlarına bakıldığında aynı cins boyalı ve boyasız olan elyafların aynı spektruma sahip olduğu; farklı cins elyafların ise spektrumlarının da farklı olduğu sonucuna varılmıştır.

Ancak olay yerinde aynı tonda fakat farklı türde (pamuk için; reaktif ve direk, naylon için; asit ve metal kompleks, akrilik için bazik ve pigment) boyarmaddelerle boyanmış 2 aynı elyaf bulunması durumunda; aynı SEM-EDX analiz sonuçları gibi FT-IR sonuçları da bu konuyu aydınlatmak için yetersiz kalacaktır. Elyaf üzerindeki boyarmadde miktarı çok az olduğundan ve FT-IR bunu algılamadığı için başka bir tayin yöntemine ihtiyaç duyulacaktır.

(Cho, 2001) elyaf üzerindeki bitim işlemlerinin tanınmasına yönelik çalışmalar yapmıştır. Elyaf üzerindeki apre maddesi denilen bitim işlemi kimyasalına yönelik de piklere rastlamış ve belirlemiştir. Fakat sonuç kısmında şunu da belirtmiştir. Spektrumu alınan elyaf adli delil niteliği taşıyan tek elyaf ise, elyafa özgü kuvvetli piklerin elyaf üzerindeki apre maddesine özgü pikleri bastırdığı ve bu piklerin diğer piklerin altında kaldığını belirtmiştir. Çünkü apre maddeleri de aynen

boyarmadde gibi elyafa az miktarlarda fikse ettirilen kimyasallardır. Bu düşük konsantrasyonlardaki maddelerin tanınmasına yönelik ileri teknikler denenmelidir.

4.5. Boyarmaddelerin Kromatografik Analizleri

Bu kısımda sarı, kırmızı, mavi ve bunların karışımı renklere bazik, asit ve reaktif boyarmaddelerle boyanan akrilik, naylon ve pamuk liflerinden söküm işlemleri ile ekstrakte edilen boyarmaddelerin kromotografik özellikleri ayrı ayrı HPLC ile incelenmiştir.

4.5.1. Boyarmaddelerin HPLC Koşulları

Bazik, asit ve reaktif boyarmaddelerin her 3 rengi de (Kırmızı, mavi ve sarı) aşağıda listelenen şartlarda analiz edilmiştir (Çizelge 4.4.a-e).

Çizelge 4.4. (a) Bazik-Metot 1 (b) Bazik-Metot 2 (c) Bazik-Metot 3 (d) Asit (e) Reaktif boyarmaddeler için Hplc koşulları

Hplc koşulları	
Kolon	Inertsil ODS3, C18 (250 mm.x4,6 mm.x 5µm.)
Akış	0,225 mL/min
Sıcaklık	35^{o}C
Absorbance	190 ile 800 nm. arası
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Mobil Faz	su(asitlendirilmiş) ve Asetonitril (asitlendirilmiş) 50:50(v:v)
Asitlendirme	formik asitle pH:2,5'a ayarlanarak yapılmıştır.

(a)

Çizelge 4.4. Devamı

Hplc koşulları	
Kolon	Inertsil ODS3, C18 (250 mm.x4,6 mm.x 5µm.)
Akış	0,2 ml/min
Sıcaklık	35^{o}C
Absorbans	190 ile 800 nm. arası
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Mobil Faz	Metanol-su [50:50(v:v)]

(b)

Hplc koşulları	
Kolon	Inertsil ODS3, C18 (250 mm.x4,6 mm.x 5µm.)
Akış	1 ml/ dk (Kolondan analiz öncesi 40 dk. Mobil faz geçirilerek şartlandırılmıştır.)
Sıcaklık	35^{o}C
Absorbans	190 ile 800 nm. Arası Özellikle 400, 500 ve 600 nm. (kırmızı, mavi ve sarı bazik boyarmaddeler için
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Mobil Faz	Metanol-sıvı amonyum asetat(pH: 9,76) (9:1 v/v) 94 mL. Konsantre amonyak ve 22 mL. glacial asetik asit üzerine 884 mL.saf su) ilave edilerek ve pH: 9,76'ya birkaç damla amonyak ya da glacial asetik asitle ayarlanmıştır. Seyreltme: Kullanım öncesi 1:9 metanolle seyreltilmiştir.

(c)

Hplc koşulları	
Kolon	Inertsil ODS3 , C18 (250 mm.x4,6 mm.x 5µm.)
Akış	0,5 ml/min
Sıcaklık	35^{o}C
Absorbance	190 ile 800 nm. arası
Enjeksiyon hacmi	20 µl
Mobil Faz	Eluent A : su Eluent B: Asetonitrile Eluent C: metanol

(d)

Çizelge 4.4. Devamı

Hplc koşulları	
Kolon	Inertsil ODS3 , C18 (250 mm.x4,6 mm.x 5µm.)
Akış	0,2 mL/min
Sıcaklık	40^{o}C
Absorbance	190 ile 800 nm. arası
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Mobil Faz	Solvent A: 2,5 mM dihexylamnonium acetate ve su çözeltisi Solvent B: 2,5 mM dihexylamnonium acetate ve metanol çözeltisi

(e)

Dihexylamnonium acetate, eşit molde Dihexylamine ve asetik asitin karışımı ile elde edilmiştir. Dihexylamine olarak, Merck for synthesis; Asetik asit olarak ise Sigma Aldrich HPLC grade kullanılmıştır.

4.5.2. Boyarmaddelerin HPLC Gradient Koşulları

Gradient koşullar Çizelge 4.5.a-e'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. (a) Bazik Boyarmaddeler için Su ve Asetonitril (ACN) mobil fazı gradient koşulları; (b) Bazik Boyarmaddeler için Metanol ve su mobil fazı gradient koşulları; (c) Asit Boyarmaddeler için Su (A), Asetonitril (B) ve metanol (C) mobil fazları gradient koşulları; (d) Reaktif Boyarmaddeler için Su, dihexylamnonium acetate ve metanol mobil fazları gradient koşulları

Süre(dk)	% ACN	% Su	Akış oranı mL/dk
0	34	66	0,225
2	34	66	0,225
7	42	58	0,225
28	48	52	0,225
31	98	2	0,225
35	98	0.4	0,400

(a)

Süre (dk)	% Metanol	% Su	Akış oranı (ml/dk)
0	50	50	0,2
15	95	5	0,2
40	95	5	0,2

(b)

Süre	Mobil Faz			Akış oranı
(dk)	% Çözücü A	% Çözücü B	% Çözücü C	(ml/dk)
0	80	20	0	0,50
10	2	98	0	0,50
15	2	98	0	0,50
20	80	20	0	0,50
40	0	0	100	0,1

(c)

Çizelge 4.5. Devamı

Süre (dk)	% Çözücü B	% Çözücü A	Akış oranı (ml/dk)
0	60	40	1
20	100	0	1

(d)

Çözücü A: 2,5 mM dihexylamnonium acetate ve su çözeltisi
Çözücü B: 2,5 mM dihexylamnonium acetate ve metanol çözeltisi

4.5.3. Boyarmaddelerden Standart Çözeltilerin Hazırlanması

4.5.3.1. Bazik Boyarmaddelerden Standart Çözeltilerin Hazırlanması (Metot 1)

Boyarmaddelerin her bir renginden 0,01'er gr. tartılıp birleştirilerek karışım yapılmış ve çözücüyle (50:50 asitlendirilmiş su ve asetonitril) 100mL.ye tamamlanarak çözünmüştür (Şekil 4.23). Bu da 0,01*3=0,03 gr.(300mg/L) yada 300 ppm.'e karşılık gelmektedir (Çizelge 4.6). Formik asit olarak, % 98-100 saflıkta Sigma Aldrich ve Asetonitril olarak "Sigma Aldrich chromasolv for HPLC grade" kullanılmıştır.

Çizelge 4.7'de belirlenen kalibrasyon çözeltileri hazırlanarak HPLC cihazında okutulmuş ve boyaların maksimum absorbansı ve alıkonma süreleri belirlenmeye çalışılmıştır.



Şekil 4.23. Hazırlanan stoklar

Çizelge 4.6. Stok çözeltiden alınacak miktar

	Konsantrasyon (gr/100 ml)	Astrazon Blue (FGRL 200 %micro)	Astrazon Red (GTLN 200% micro)	Astrazon Flavine (10 GFF 300%)	T. Hacim/Çözücü
Stok	0,03	0,01 gr	0,01 gr	0,01 gr	100 mL/ su(asitlendirilmiş) ve Asetonitril (asitlendirilmiş) 50:50(v:v)

Çizelge 4.7. Bazik Boyarmaddeler için Kalibrasyon Çözeltileri-Metot 1

Kal. * Çöz. **	Kons. (µg/ml)ppm	Boya miktarı (mg)	Alındığı stok (mL)	Çözücü *mL*	Toplam *mL*	Hacim/Çözücü	Sökümyapılacakelyafmiktarı(%100 tekrargeni kazanım olduğukabul edilirse)gr
1(mix1)	22,5	225.10^{-3}	*$22,5.10^{-3}$ (300 ppm'den)*	*9,9775*	*10*		0,01
2(mix2)	22.5	225.10^{-4}	*0,1*	*0,9*	*1*		0,001
3(mix3)	11.25	1125.10^{-5}	*0,5*	*0,5*	*1*		0,0005
4(mix4)	5.625	5625.10^{-6}	*0,5*	*0,5*	*1*		0,00025
5(mix5)	2.8125	28125.10^{-7}	*0,5*	*0,5*	*1*		0,000125

Kal*: kalibrasyon; Çöz**: Çözelti

Karışım yapılarak hazırlanan boya çözeltisinden 20 mL. cihaza enjekte edilmiştir. Kırmızı ve mavi boyarmaddeler HPLC ile ayrılmamıştır, çünkü her üç boyarmaddenin geliş süreleri üst üste çakışmıştır. Dolayısıyla beklenen ayrım gerçekleşmemiştir. Bu nedenle 2. Metot denenmiştir.

4.5.3.2. Bazik Boyarmaddelerden Standart Çözeltilerin Hazırlanması (Metot 2)

Boyarmaddelerin her bir renginden 0,01 gr. tartılıp birleştirilerek karışım yapılmış (Çizelge 4.8) ve solventle (50:50 metanol-su) 100 mL.ye tamamlanarak çözünmüştür. Bu da 0,01*3=0,03 gr.(300mg/L) yada 300 ppm'e karşılık gelmektedir.

Çizelge 4.8. Stok çözeltisinden alınacak miktar

	Kons. (gr/100 ml)	Astrazon Blue FGRL micro 200 % gr	Astrazon Red GTLN 200% micro gr	Astrazon Flavine 10 GFF 300% gr	T. Hacim/Çözücü
Stok	0,03	0,01	0,01	0,01	100 ml/ metanol-su(50:50(v:v))

Bu metotla kromotogramlarda ayrım; yani kırmızı, sarı ve mavi boyarmaddelere ait kromotogramlar gözlenememiştir. Bu yüzden kalibrasyon eğrisi çizdirmek için çalışmalar yapılmamıştır. Uygulanacak yeni bir metot için parametreler belirlenmiştir ve 3. Metot denenmiştir.

4.5.3.3. Bazik Boyarmaddelerden Standart Çözeltilerin Hazırlanması (Metot 3)

Boyarmaddelerin her bir renginden 0,01'er gr. tartılıp birleştirilerek karışım yapılmış ve metanol ile 10 mL.'ye tamamlanarak çözünmüştür (Çizelge 4.9). Bu da 1000 ppm.'e karşılık gelmektedir. Stok çözelti kullanılarak 225 ppm'lik ara stok çözeltisi hazırlanmıştır. Metanol olarak, Sigma Aldrich HPLC grade kullanılmıştır.

Çizelge 4.9. Ana stok çözeltisinden alınacak miktar

	Kons. (µg/ml)	Astrazon Blue FGRL micro 200 %	Astrazon Red GTLN 200% micro	Astrazon Flavine 10 GFF 300%	T. Hacim/Çözücü
Stok	1000 ppm	0,01 gr	0,01 gr	0,01 gr	10 ml/ metanol
Ara Stok	225 ppm	2,25 mL	2,25 mL	2,25 mL	6,75 mL. boya mix/3,25 mL.metanol

Çizelge 4.10'da belirlenen kalibrasyon çözeltileri hazırlanarak HPLC cihazında okutulmuş ve boyaların maksimum absorbansı ve alıkonma süreleri belirlenmiştir.

Çizelge 4.10. Bazik Boyamaddeler için Kalibrasyon Çözeltileri-Metot 3

Kal. * Çöz. **	Kons. (µg/ml) ppm	Boya miktarı (mg)	Alındığı stok (µl)	Çözücü (µl)	Toplam Hacim/ Çözücü (ml)	Söküm yapılacak elyaf miktarı (%100 tekrar geri kazanım olduğu kabul edilirse) (gr)
			100	*900*		
1(mix1)	22,5	225.10^{-3}	*500* *(225ppm'den)*	*500*	*1*	0,01
2(mix2)	11,25	225.10^{-4}	*500* *(22,5 ppm'den)*	*500*	*1*	0,001
3(mix3)	5,625	1125.10^{-5}	*500* *(11,25 ppm'den)*	*500*	*1*	0,0005
4(mix4)	2,81	5625.10^{-6}	*500* *(5,625 ppm'den)*	*500*	*1*	0,00025
5(mix5)	1,406	28125.10^{-7}	*500* *(2,81ppm'den)*	*500*	*1*	0,000125
6(mix6)	0,70	$1406.25.10^{-7}$	*500* *(1,406 ppm'den)*	*500*	*1*	0,0000625

4.5.3.4. Asit Boyarmaddelerden Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Boyarmaddelerin her bir renginden 0,01 gr. tartılıp birleştirilerek karışım yapılmış ve solventle (50:50Asetonitrile-su) 10mL.'ye tamamlanarak çözünmüştür. Bu da 1000 ppm.'e karşılık gelmektedir (1000µg/ mL). Daha sonra stoktan kullanılarak 300 ppm'lik ara stok çözelti hazırlanmıştır (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.12'de belirlenen kalibrasyon çözeltileri hazırlanarak HPLC cihazında okutulmuş ve boyaların maksimum absorbansı ve alıkonma süreleri belirlenmeye çalışılmıştır

Çizelge 4.11. Stok çözeltiden alınacak miktar

	Kons. (gr/100 ml)	Telon Blue A3GL	Telon Red AFG	Telon Yellow M-4GL	T. Hacim/Çözücü
Stok	1000 ppm	0,01 gr	0,01 gr	0,01 gr	10 mL/ Asetonitril-su (50:50, v:v)
Ara Stok	300 ppm	3 mL	3 mL	3 mL	9 mL. boya mix/1 mL. Asetonitril-su

Çizelge 4.12. Asit Boyarmaddeler için Kalibrasyon Çözeltileri

Kal. * Çöz. **	Kons. (µg/ml) ppm	Boya miktarı (mg)	Alındığı stok (µl)	Çözücü (µl)	Toplam Hacim/ Çözücü(ml)	Söküm yapılacak elyaf miktarı (%100 tekrar geri kazanım olduğu kabul edilirse)(gr)
1(mix1)	30	3.10^{-1}	100 (300ppm' den)	900	1	0,01
2(mix2)	15	3.10^{-2}	500 (30 ppm'den)	500	1	0,001
3(mix3)	7,5	15.10^{-3}	500 (15 ppm'den)	500	1	0,0005
4(mix4)	3,75	75.10^{-4}	500 (7,5 ppm'den)	500	1	0,00025
5(mix5)	1,875	375.10^{-5}	500 (3,75 ppm'den)	500	1	0,000125
6(mix6)	0,9375	1875.10^{-6}	500 (1,875 ppm'den)	500	1	0,0000625

Boyarmaddelerin her bir renginden 0,01 gr. tartılıp birleştirilerek karışım yapılmış ve solventle (50:50 metanol-su) 10mL.ye tamamlanarak çözünmüştür. Bu da 1000 ppm.'e karşılık gelmektedir (Çizelge 4.13). Daha sonra stoktan kullanılarak 300 ppm'lik ara stok çözelti hazırlanmıştır.

Çizelge 4.13. Ana stok çözeltisinden alınacak miktar

	Kons. (gr/100 ml)	Remazol Br. Blue R spc 160%	Remazol Red RB-A 133 %	Remazol Golden Yellow	T. Hacim/Çözücü
Stok	1000 ppm	0,01 gr	0,01 gr	0,01 gr	10 ml/ Solvent A+Solvent B
Ara Stok	300 ppm	3 ml	3 ml	3 ml	9 mL. boya mix/1 mL. Solvent A+Solvent B

Çizelge 4.14'de belirlenen kalibrasyon çözeltileri hazırlanarak HPLC cihazında okutulmuş ve boyaların maksimum absorbansı ve alıkonma süreleri belirlenmeye çalışılmıştır.

Çizelge 4.14. Reaktif Boyamaddeler için Kalibrasyon Çözeltileri

Kal. * Çöz. **	Kons. (µg/ml)ppm	Boya miktarı (mg)	Alındığı stok (µl)	Çözücü (µl)	Toplam Hacim/ Çözücü (ml)	Söküm yapılacak elyaf miktarı (%100 tekrar geri kazanım olduğu kabul edilirse)(gr)
1(mix1)	30	3.10^{-1}	100 (300ppm' den)	900	1	0,01
2(mix2)	15	3.10^{-2}	500 (30 ppm'den)	500	1	0,001
3(mix3)	7.5	15.10^{-3}	500 (15 ppm'den)	500	1	0,0005
4(mix4)	3.75	75.10^{-4}	500 (7.5 ppm'den)	500	1	0,00025
5(mix5)	1.875	375.10^{-5}	500 (3.75 ppm'den)	500	1	0,000125
6(mix6)	0,9375	1875. 10^{-6}	500 (1,875 ppm'den)	500	1	0,0000625

4.5.4. Boyarmaddelerin Liflerden Ekstraksiyon İşlemleri

Elyaflar (Akrilik, naylon ve pamuk) ekstraksiyon işlemlerine tabi tutulmuş en uygun ekstraksiyon koşulları belirlenmiştir. Her 3 elyaf içinde 7'şer kontrol numunesi hazırlanmış ve çalışılmıştır (Şekil 4.24 ve Şekil 4.25).



Şekil 4.24 Sırasıyla kontrol elyaflardan ekstrakte edilen boyalı ekstraktlar



Şekil 4.25. Kontrol elyafların ekstraksiyon sonrası Eppendorf tüpü içindeki görünümü

4.5.4.1. Akrilik Elyaftan Bazik Boyarmaddenin Ekstraksiyon İşlemi

Elyaftan boyarmadde ekstraksiyonu: (Griffin ve ark. 1994) Bu çalışmada uygulanan metot modifiye edilmiştir. Elyaflar PZR tüpüne konulmuştur, Üzerine 10mL. formik asit+su (1:1, v/v) ilave edilip termoblok'ta 100 $^{\circ}$C de 20 dk. bekletilmiştir. Ekstrakttan 5 mL. alınarak, HPLC mobil fazı(metanol) ile seyreltilmiştir (Çizelge 4.15). Bundan 20 mL. alınarak HPLC cihazına verilmiştir.

Çizelge 4.15. Akrilik Elyaf Kontrol Örnekleri

Kontrol elyaf numarası	Kontrol Elyaf miktarı [gr]	Seyreltme ajanı [1 mL]
Kör	0.01	Metanol-sıvı amonyum asetat
1	0,01	Metanol-sıvı amonyum asetat
2	0,001	Metanol-sıvı amonyum asetat
3	0.005	Metanol-sıvı amonyum asetat
3,5	0,0005	Metanol-sıvı amonyum asetat
4	0,00025	Metanol-sıvı amonyum asetat
5	0,000125	Metanol-sıvı amonyum asetat

4.5.4.2. Naylon Elyaftan Asit Boyarmaddenin Ekstraksiyon İşlemi

Elyaftan boyarmadde ekstraksiyonu: Elyaflar Eppendorf tüpüne konulmuştur, Üzerine Çizelge 4.16'da belirtilen miktarda Formik asit+su ilave edilip ve PZR cihazında 100 °C de 25 dakika bekletilmiştir. Ekstrakttan 5 mL. alınarak, yine Çizelge 4.16'da belirtilen miktarda HPLC mobil fazı (ACN-su) ile seyreltilmiştir. Bundan 20 mL. alınarak cihaza verilmiştir.

Çizelge 4.16. Naylon Elyaf Kontrol örnekleri

Kontrol elyaf numarası	KontrolElyaf miktarı	Söküm + Seyreltme ajanı
Kör	0.01 gr	200 µL Formik asit+su, 800 µl ACN
1	0,01 gr elyaf (100 mg) için	200 µL Formik asit+su, 800 µl ACN
2	0,001	100 µL Formik asit+su, 900 µl ACN
3	0.005	100 µL Formik asit+su, 900 µl ACN
3,5	0,0005	20 µL Formik asit+su, 980 µl ACN
4	0,00025	10 µL Formik asit+su, 990 µl ACN
5	0,000125	10 µL Formik asit+su, 990 µl ACN

4.5.4.3. Pamuk Elyaftan Reaktif Boyarmaddenin Ekstraksiyon İşlemi

Pamuk elyaftan boyarmadde ekstraksiyonu: (Enzim metodu) (Carey ve ark. 2013) Bu kısımda reaktif boyayı pamuk üzerinden sökmek için selülaz enzimi (Trichoderma Viride, 1.1 U/mg) kullanılmıştır. 1 mL asetik asitin 32 mL su içerisinde çözünmesi ile 0.5 molar asetik asit çözeltisi hazırlanmış olmaktadır. 2 gram NaOH 16.7 mL distile suda çözünerek 3 molar sodyum hidroksit çözeltisi elde edilmiştir. Selülaz çözeltisi ise 0.01 g selülaz enziminin 10 mL sulu asetik asit çözeltisine eklenmesi ile oluşmaktadır. Bu çözelti kullanımdan en az 4 saat önce hazırlanmalıdır.

Selülaz prosedürü: Selülaz parçalama işlemi kovalent bağlarla pamuğa bağlanan reaktif boyarmaddenin çözünerek kromatografik tekniklerle analiz edilmesine imkân sağlar.

Elyaflar PZR tüpüne konulmuş, üzerine 10 µL NaOH çözeltisi eklenerek 4 ºC de 4 saat bekletilmiştir. Soğutulduktan sonra elyaflar asetik asit çözeltisi ile yıkanıp 2 kez de selülaz çözeltisi ile yıkanmıştır. Daha sonra 10 µL selülaz çözeltisi eklenip 50 ºC'de 550 rpm'de 20 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra 5000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir.

Ekstrakttan 5 mL. alınarak, 1mL. HPLC mobil fazı ile seyreltilmiştir. Bundan 20 mL. alınarak cihaza verilmiştir. Fakat söküm işlemi tam gerçekleşmediğinden sonuç alınamamıştır. Daha sonra aşağıdaki söküm işlemi uygulanmıştır.

Pamuk elyaftan boyarmadde ekstraksiyonu: (Hidrosülfit metodu) (Laing ve ark. 1991) 0,8 gr Sodyum ditiyonit (Hidrosülfit), 4,5 mL. 10 % w/v sodyum hidroksit çözeltisi (1,2- dimetoksietan/su, 1:2 v/v) ile 100 mL.'ye tamamlanmıştır. Pzr tüplerin içindeki her bir kontrol örneği üzerine 10 mL. eklenerek 100 °C 'de 30 dakika bekletilmiştir. Ve söküm işlemi gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.17'de belirtilen oranlarda olmak üzere toplam 1 mL mobil fazla seyreltilip 20 mL. alınarak cihazda analiz edilmiştir.

Çizelge 4.17. Kontrol örnekleri

Kontrol elyaf numarası	Kontrol Elyaf miktarı	Seyreltme ajanı
Kör	0.01 gr	400 µl Solvent A+ 600 µl Solvent B
1	0,01 gr elyaf (100 mg) için	400 µl Solvent A+ 600 µl Solvent B
2	0,001	400 µl Solvent A+ 600 µl Solvent B
3	0.005	400 µl Solvent A+ 600 µl Solvent B
3,5	0,0005	400 µl Solvent A+ 600 µl Solvent B
4	0,00025	400 µl Solvent A+ 600 µl Solvent B
5	0,000125	400 µl Solvent A+ 600 µl Solvent B

Boyaların Maksimum absorbansı ve alıkonma süreleri belirlenmiştir. HPLC ile analiz edilen farklı oranlardaki karışımlara (mixlere) ait kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Bu eğriler ve kromatogramlar bulgular ve tartışma bölümünde verilmiştir.

4.6. Bazik boyarmaddelerin HPLC analizleri

HPLC analizlerinde 3 farklı yöntem denenmiştir. Ancak uygulanan ilk 2 yöntem başarılı olmamıştır. Bu yöntemlerin eksik olan tarafları 4.6.1. ve 4.6.2.de belirtilmiştir.

4.6.1.Bazik boyarmaddelerin HPLC analizleri-Metot 1

1. metotta boyarmaddeler Çizelge 4.4.a'da verilen HPLC şartlarında denenmiştir. Ancak kırmızı ve mavi bazik boyarmaddeler ayrılmamıştır, çünkü Çizelge 4.18'de görüldüğü gibi kırmızı ve mavi boyarmaddeler aynı alıkonma zamanında çıkmıştır. 1. Metot içerisindeki parametrelerin değiştirilerek denenmesi gerekmektedir.

Çizelge 4.18. Bazik boyarmaddelerin maksimum absorbanstaki dalgaboyları ve alıkonma süreleri

	Maksimum absorbans gösterdiği dalgaboyu (nm.)	Alıkonma zamanları dk.
Astrazon Red GTLN 200% micro	475	10,02
Astrazon Blue FGRL micro 200 %	615	10,02
Astrazon Flavine 10 GFF 300%	435	7,78
3lü karışım boyarmadde	435, 475, 615 nm.	14,83 /20,25 /20,25

4.6.2. Bazik boyarmaddelerin HPLC analizleri-Metot 2

2. deneysel metot çalışması Çizelge 4.4.b.'de verilen HPLC şartlarında denenmiştir. Bu metotla alınan kromatogramlarda baseline (temel çizgi) düzgün çıkmamıştır. Bu yüzden kalibrasyon eğrisi oluşturmak için çalışmalar ve değerlendirme yapılamamıştır.

4.6.3. Bazik boyarmaddelerin HPLC analizleri-Metot 3

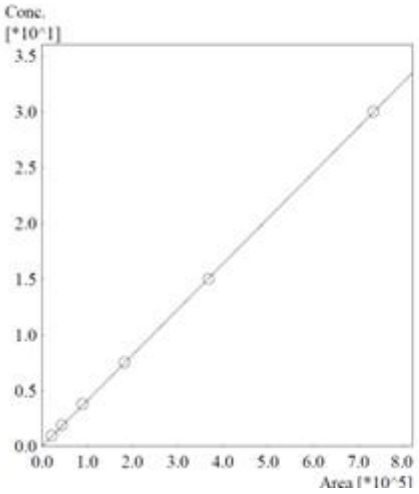
Tasarlanan 3. Deney metoduna ait koşullar Çizelge 4.4.c'de belirtilmiştir. 3. metoda göre yapılan karışım boyamaların kalibrasyon çözeltilerinin HPLC kromatogramları Ek-1'de sunulmuştur.

Farklı oranlarda verilen boyarmadde mixlerden elde edilen grafiklerle kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş; mixlerin mg/L (ppm) olarak miktarı verilmiştir. Bu grafiklerde R^2 (konsantrasyon-pik alanı ilişkisi) değerlerinin 1'e çok yakın olması sonuçların hassasiyetini göstermektedir. Farklı kalibrasyon çözeltileri arasındaki oranlar piklerin altındaki alanlarla doğru orantılı çıktığı için R^2 değeri 1 e çok yakın çıkmıştır.

HPLC analizi için; Astrazon Flavine 10 GFF Sarı bazik boyarmadde (10mg/ml); Astrazon Blue FGRL micro 200 % Mavibazik boyarmadde (10mg/ml); Astrazon Red GTLN 200% micro (Kırmızı) (10mg/ml) standartları hazırlanmıştır.

Oluşturulan standart piklerin alan hesapları LC Solution kromotografik analiz sistemi ile (Shimadzu) yapılmıştır. Boyarmadde absorbans değerleri 598 nm (Astrazon Blue FGRL micro 200 %), 498 nm (Astrazon Red GTLN 200% micro) ve 430 nm (Astrazon Flavine 10 GFF) de belirlenmiştir. Üç farklı standart boyarmaddenin kalibrasyon grafikleri Şekil 4.26 a-c'de gösterilmiştir.

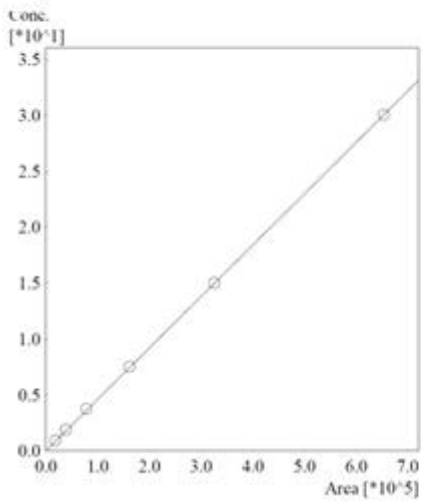
a)



Kon.(mg/L)	Ortalama Pik Alanı
0.930	22075.0
1.875	44711.1
3.750	89387.7
7.500	182972.6
15.000	369245.1
30.000	733749.8

$R^2 = 0.9999751$

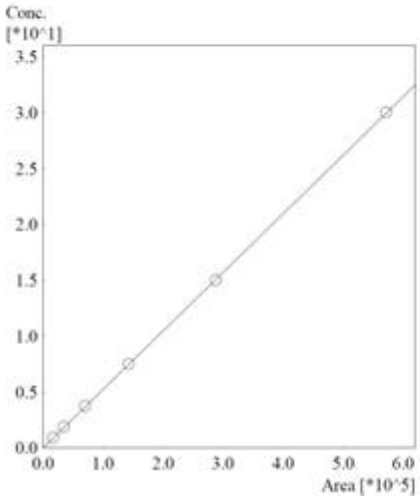
b)



Kon.(mg/L)	Ortalama Pik Alanı
0.930	18743.0
1.875	38964.9
3.750	78576.4
7.500	161977.9
15.000	325723.2
30.000	653199.0

$R^2 = 0.999993$

c)



Kon.(mg/L)	Ortalama Pik Alanı
0.930	17560.4
1.875	35077.2
3.750	70875.1
7.500	143067.5
15.000	288125.0
30.000	571901.6

$R^2 =$ 0.9999791

Şekil 4.26. Standart boyarmaddelerin kalibrasyon grafikleri; a) Astrazon Flavine 10 GFFSarı bazik boyarmadde (430 nm); b)Astrazon Blue FGRL micro 200 % Mavibazik boyarmadde (598 nm); c) Astrazon Red GTLN 200% micro Kırmızı bazik boyarmadde(498 nm)

Boyaların Maksimum absorbansı ve alıkonma zamanları belirlenmiştir (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19. Bazik Boyarmaddelerin Maksimum absorbansı ve alıkonma zamanları

Bazik Boyarmaddeler	Maksimum absorbansı (nm)	Alıkonma zamanları(dk)
Astrazon Blue FGRL micro 200 % (Mavi)	598	4,25
Astrazon Red GTLN 200% micro (Kırmızı)	498	5,7
Astrazon Flavine 10 GFF (Sarı)	430	3,5

4.6.4. Bazik boyarmaddeler için Kontrol örneklerinin HPLC analizleri

Çizelge 4.20.'deki gibi belirlenen ağırlıklardaki lifler 10mL. (1:1 v/v formik asit) ve su içeren çözücü eklenen liflerden boyarmaddenin sökümü gerçekleştirilmiştir. Sonra bu ekstraktlardan 5'er µL alınıp 1 mL. Metanol-sıvı amonyum asetat (9:1 v/v) mobil fazı ile seyreltilip cihazda analiz edilmiştir.

Çizelge 4.20. Aynı cins bazik boyarmaddelerin farklı renklerinin karışımı ile boyanan kontrol örneklerinde her bir boyarmaddenin konsantrasyonlarının belirlenmesi

Kontrol elyaf miktarları (gr)	Konsantrasyonlar (ppm)		
	Sarı(430nm)	Mavi(498nm)	Kırmızı(598nm)
0,01	0,324	0,413	0,242
0,001	0,522	0,699	0,392
0,005	0,470	2,662	1,486
0,0005	1,516	30,147	15,291
0,00025	0,592	11,805	6,593
0,000125	1,948	64,884	33,511

Bazik boyarmaddelerin tayini için esasen de boyanın hangi tip boyarmadde olduğunun tespit edilebilmesi için kontrol örnekleri çalışılmıştır. Kontrol amaçlı hazırlanan 0.01 gr, 0.001 gr, 0.005 gr, 0.0005 gr, 0.00025 gr ve 0.000125 gr. elyaflardan ekstrakte edilen bazik boyarmaddelerin pikleri Çizelge 4.2.'de tanımlanan doğru alıkonma zamanlarında ve absorbanslarda çıkmıştır. Bununla ilgili kromatogramlar EK-2' de verilmiştir. Bu metot ile ekstrakte edilen bazik boyarmaddelerin kalitatif ve kantitatif tanımlama işlemi yapılmıştır.

Ancak elyaftan söküm yapıldığında ve analiz edildiğinde başlangıçtaki hesaplanan konsantrasyon değerleriyle eşleşme gözlenmemiştir. Muhtemel sebepler; boyarmaddelerin (yani 3 lü karışım yapılanların) elyafa nüfuz etme(absorbans) miktar ve hızının birbirinden farklı olması; söküm işleminde kullanılan kimyasal maddelerin boyarmaddelerle etkileşime girip bileşik oluşturması ve boyarmaddenin etkisini bloke etmesi; söküm esnasında sirkülasyon alanı yetersizliği.

Yani 0.01 gr. elyafa da; 0.000125 gr.elyafa da aynı boyuttaki eppendorf tüpünde söküm için aynı miktarda formik asit+su eklenmesi bu sonuçların alınmasında etken olabilir. Zira 0,000125 gr elyafın söküm esnasında sirkülasyon alanı 0,01 gr. elyafa göre daha fazladır.

Çözüm olarak; birbiri ile absorbans hızları yakın boyarmadde seçimi; sirkülasyon alanı daha geniş tüplerin içerisinde söküm yapılması, boyarmaddelerle söküm maddelerinin etkileşiminin araştırılması, gerçeğe daha yakın sonuçların eldesi için iyi bir yaklaşım olabilir.

Bu haliyle bu metodun şimdilik kalitatif yaklaşımlara daha uygun olduğu sonucu çıkarılabilir.

4.7. Asit boyarmaddelerin HPLC analiz metodu

Boyaların Maksimum absorbansı ve alıkonma süreleri belirlenmiştir. Çizelge 4.21.'den görüleceği gibi asit boyarmaddeler farklı alıkonma zamanlarında sonuç vermiştir.

Çizelge 4.21. Asit Boyaların Maksimum absorbansı ve alıkonma süreleri

	Maksimum absorbansı (nm)	Alıkonma zamanları (dk)
Telon Blue A3GL	657	9,75
Telon Red AFG	520	9,5
Telon Yellow M-4GL	400	9,25

Ancak Farklı oranlarda verilen mixlerden elde edilen grafiklerle kalibrasyon eğrisi oluşturulması denenmiş; kalibrasyon eğrileri düzgün oluşturulamamıştır. Bunun dışında eluent değiştirilerek ve kolon değiştirilerek farklı metotlar denenmiş fakat düzgün bir sonuç alınamamıştır. Bu sonuca göre asit boyarmaddelerin kalitatif ayrımı yapılmış ancak kantitatif sonuçlar alınamamıştır.

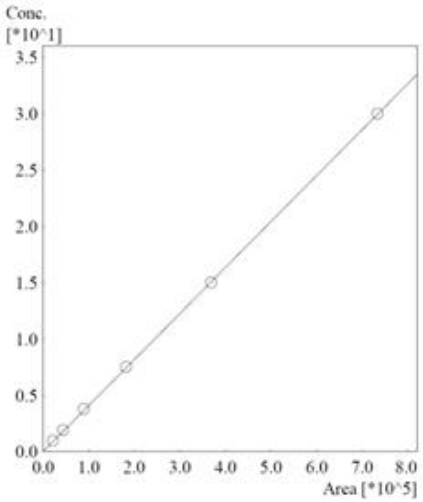
4.8. Reaktif boyarmaddelerin HPLC analizleri

Bu metoda göre yapılan karışım boyamaların kalibrasyon çözeltilerinin HPLC sonuçları Ek-3'de sunulmuştur.

Farklı oranlarda verilen karışımlardan (mixlerden) elde edilen grafiklerle aşağıdaki gibi kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur.

HPLC analizi için; Remazol Golden Yellow RNL gran 150 % (10mg/ml); Remazol Red RB-A 133 % (10mg/ml); Remazol Br. Blue R spc 160% (10mg/ml) standartları hazırlanmıştır. Oluşturulan standart piklerin alan hesapları LC Solution kromotografik analiz sistemi ile (Shimadzu) yapılmıştır. Boyarmadde absorbans değerleri 429 nm (Remazol Golden Yellow RNL gran 150 % (Sarı) reaktif boyarmadde), 524 nm (Remazol Red RB-A 133 %(Kırmızı) reaktif boyarmadde) ve 606 nm (Remazol Br. Blue R spc 160% (Mavi) reaktif boyarmadde) de belirlenmiştir. Üç farklı standart boyarmaddenin kalibrasyon grafikleri Şekil 4.27.(a-c'de gösterilmiştir).

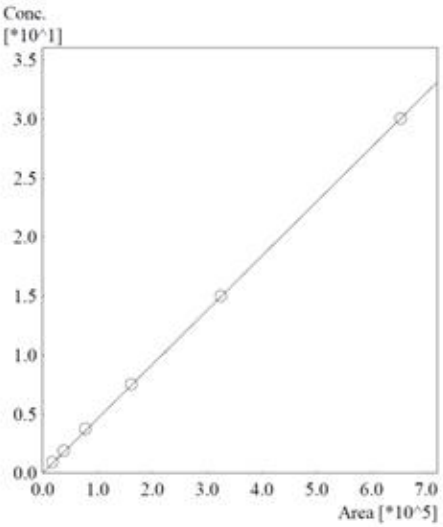
a)



Kon.(mg/L)	Ortalama Pik Alanı
0.930	22075.0
1.875	44711.1
3.750	89387.7
7.500	182972.6
15.000	369245.1
30.000	733749.8

$R^2 = 0.9999751$

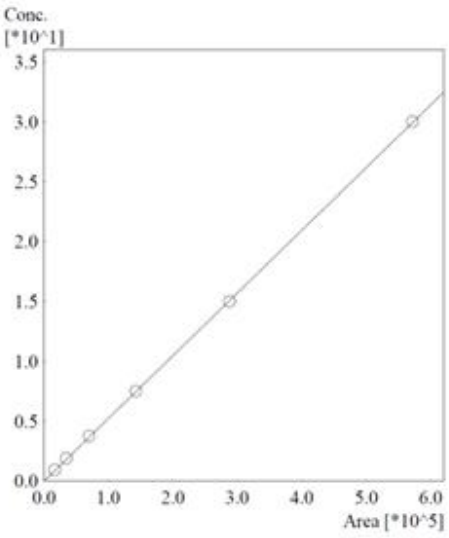
b)



Kon.(mg/L)	Ortalama Pik Alanı
0.930	18743.0
1.875	38964.9
3.750	78576.4
7.500	161977.9
15.000	325723.2
30.000	653199.0

$R^2 = 0.999993$

b)



Kon.(mg/L)	Ortalama Pik Alanı
0.930	17560.4
1.875	35077.2
3.750	70875.1
7.500	143067.5
15.000	288125.0
30.000	571901.6

$R^2 =$ 0.9999791

Şekil 4.27. Standart boyarmaddelerin kalibrasyon grafikleri: a)Remazol Golden Yellow RNL gran 150 % (Sarı); b) Remazol Red RB-A 133 % (Kırmızı)reaktif boyarmadde (524 nm); c) Remazol Br. Blue R spc 160% (Mavi) reaktif boyarmadde (606)

Çizelge 4.22. Reaktif boyaların maksimum absorbansı ve alıkonma zamanları

Reaktif boyalar	Maksimum absorbansı (nm)	Alıkonma zamanları (dk)
Remazol Br. Blue R spc 160% (Mavi)	606	11,30
Remazol Red RB-A 133 % (Kırmızı)	524	10,75
Remazol Golden Yellow RNL gran 150 % (Sarı)	429	6,36

Reaktif boyarmaddelerin tayini için esasen de boyanın hangi tip boyarmadde olduğunun tespit edilebilmesi için kontrol örnekleri çalışılmıştır. Kontrol amaçlı hazırlanan elyaflardan (casefiber) ekstrakte edilip verilen reaktif boyarmaddelerin tanımlama işlemleri doğru alıkonma sürelerinde ve absorbanslarda sonuç vermiştir (Çizelge 4.22). Bu metot ile ekstrakte edilen reaktif boyarmaddelerin kalitatif ve kantitatif tanımlama işlemi yapılmıştır.

4.8.1.Reaktif Boyarmaddeler için Kontrol Örnekleri HPLC Analizleri

Çizelge 4.23.'deki gibi belirlenen ağırlıklardaki lifler 10mL. sodyum ditiyonit ve sodyum hidroksit çözeltisi içeren çözücü eklenen liflerden boyarmaddenin sökümü gerçekleştirilmiştir. Sonra bu ekstraktlardan 5'er µL alınıp 1 mL. dihexylamnonium çözeltisi içeren mobil fazı ile seyreltilip cihazda analiz edilmiştir.

Çizelge 4.23. Aynı cins boyarmaddelerin farklı renklerinin karışımı ile boyanan kontrol örneklerinde her bir boyarmaddenin konsantrasyonlarının belirlenmesi

Casefiber(Kontrol elyaf) gramajları	Konsantrasyonlar (ppm) 429nm Sarı	524nm Kırmızı	606nm Mavi
0,01gr	0,177	1,208	7,715
0,001 gr	0,000	0,118	0,070
0,005 gr	0,013	0,009	0,066
0,0005 gr	0,047	0,570	1,696
0,00025 gr	0,007	0,072	0,023
0,000125 gr	0,012	0,017	0,031

Reaktif boyarmaddelerin tayini için esasen de boyanın hangi tip boyarmadde olduğunun tespit edilebilmesi için kontrol örnekleri çalışılmıştır. Kontrol amaçlı hazırlanan 0.01 gr, 0.001 gr, 0.005 gr, 0.0005gr, 0.00025 gr ve 0.000125 gr. elyaflardan ekstrakte edilen boyarmaddelerin pikleri Çizelge 4.22'de tanımlanan doğru alıkonma zamanlarında ve absorbanslarda çıkmıştır. Bu metot ile ekstrakte edilen reaktif boyarmaddelerin kalitatif ve kantitatif tanımlama işlemi yapılmıştır. Ancak kromatogramlarda pikler gürültülü çıkmıştır. Bunun sebebi olarak cihazın numunenin temelindeki maddeleri (boyama yardımcı maddeleri) algılamış olması düşünülebilir. Aynen bazik boyarmaddelerde düşünülen muhtemel sebepler reaktif boyaların tanınmasında da geçerlidir. Bunlar; boyarmaddelerin (yani 3 lü karışım yapılanların) elyafa nüfuz etme (absorbans) miktar ve hızının birbirinden farklı

olması; söküm işleminde kullanılan kimyasal maddelerin boyarmaddelerle etkileşime girip çökelek oluşturması ve boyarmaddenin etkisini bloke etmesi; söküm esnasında sirkülasyon alanı yetersizliği.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada 3 farklı tür boyarmadde kullanılmıştır. Bunlar reaktif, asit ve bazik boyarmaddelerdir. Bu boyarmaddelerin 3'er farklı tonunun (sarı, kırmızı ve mavi) karışım yapılmasıyla 3 er farklı elyaf türü boyanmıştır. Bu elyaflar ise en çok kullanılan elyaflar olup pamuk, naylon ve akrilik'tir. Bu boyarmaddelerin ve elyafların adli olaylardaki önemine binaen, tanınması ile ilgili spektroskopik ve mikroskopik çalışmalar denenmiştir.

Fish mikroskopundan alınan sonuçlara göre; bitkisel liflerin kendilerine özgü enine kesit şekillerinden ayırtedilebildiği ancak, sentetik liflerin üretim tekniğinden dolayı benzer enine kesitte olabileceği ve ayırtedilemeyeceği sonucuna varılmıştır. Dolayısı ile daha farklı bir tekniğin denenmesi gerekmektedir.

SEM-EDX analiz sonucuna göre; sentetik lifler element içeriği olarak aynı olabilmekte ve karıştırılabilmektedir. Fakat bitkisel ve sentetik lifler kendi aralarında ayırtedilebilmektedir. Bu metot aynı elementel orana sahip bitkisel ve sentetik elyafların kendi aralarında ayırtedilmesi konusunda yetersiz kalmaktadır.

FT-IR analizleri sonuçlarında ise her bir elyafın farklı spektrumlarının olduğu, karakteristik piklerin farklı noktalarda çıktığı gözlense de; olay yerinde ve şüpheli üzerinde bulunan farklı boyalarla boyanmış aynı tür elyafın varlığı durumunda bu metot da daha üst bir metodun gerekliliğini ortaya koymuştur.

SEM-EDX ve FT-IR bu çalışmada kullanılan elyaflar için ayırt etmede kısmen yeterli bulunmuştur, sözkonusu lifler pamuk, viskon ve yün lifleri olduğunda durum değişip bu yöntemlerle ayrım mümkün olmayacaktır. İşte bu noktada bitkisel ve sentetik lifler için kromatografik yöntemler; hayvansal lifler için de moleküler yöntemlerin uygulanması daha etkin bir ayırtetme imkânı sunacaktır.

Bununla ilgili olarak bu elyaflar üzerinden sökümle alınan boyarmaddelerin kromatografik olarak tanımlanması yapılmaya çalışılmıştır. Kromatografik metod oluşturma bilindiği gibi uzun süren ve denemeler gerektiren bir olgu olduğundan daha önce farklı boyarmaddelere denenmiş metotlar baz alınıp modifiye edilmiştir. Ayrıca elyaftan boyarmaddenin söküm işlemleri ile ilgili daha önceden yapılmış yayınlanmış bazı yöntemlerin de yer yer doğru çıkmadığı görülmüştür. En optimize

şartlar elde edilinceye kadar çalışılmış olup boyarmaddelerin standart olarak okutulmasından, elyaftan sökülmesine kadar geçen her evre titizlikle yapılmış reaktif ve bazik boyarmaddelerin düzgün şekilde ayrımı sağlanmıştır. Fakat asit boyarmaddelerle ilgili aynı şeyi söylemek pek mümkün değildir. Birden fazla yöntem denenerek modifikasyonlar eklenerek yapılan çalışmalar sonuç vermemiştir. Yani düzgün baseline, düzgün kalibrasyon eğrileri, düzgün kromatogramlar, pikler ve düzgün ayrım maalesef sağlanamamıştır. Metotla ilgili başka değişikliklerin yapılıp gözlenmesi gereklidir.

HPLC tekniği, diğer yöntemlere göre doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, duyarlılık ve sonuçların hızlı elde edilmesi gibi birçok üstün yanlara sahiptir. Ayrıca, HPLC ile nanogram seviyesinde bile miktar analizi yapılabilmektedir. Kriminal olaylarda, olay yerinde bulunan delil bazen tek bir lif bile olabileceğinden düşük derişimlere inebilmek oldukça önemlidir. Bundan dolayı da adli tıptadelil elyaf analizlerinde HPLC oldukça önem arzetmektedir. HPLC çalışmalarında, sabit fazın özellikleri ve hareketli fazın bileşimi, ayrılan maddenin kromatografik davranışına etki etmektedir. Bundan dolayı ayrımın iyileştirilmesi ve kabul edilebilir sonuçların alınabilmesi için kromatografik koşulların optimizasyonuna gerek duyulmaktadır.

Tez çalışmasının moleküler kısmında *Cytb* gen bölgesi başarılı bir şekilde çalışılmış ve uygulanabilir sonuçlar vermiştir.

Olay yerinde bulunabilecek türde hayvansal lifler ve karışımları çalışılmış, farklı bir yaklaşımla bu elyafların ayrımının ve kriminal bulgu elde edecek sonuçlar elde edilmiştir.

Multipleks PZR ile aynı anda birçok hayvansal lifi kesin olarak birbirinden ayırt edebilecek, böylece karışıklığa mahal vermeden suçlu ile şüpheli bağlantısı kolaylıkla kurulabilecektir. Ayrıca tekstil sektöründe bir sorun olan etiketleme hatalarının çözümüne yönelik bir yaklaşım olarak ve liflerin gerçek değerinin tespitinde kullanılabilecektir.

Kromatografik alanda; farklı boyarmaddeler için geliştirilen bu metotlar, prosedürler denenebilir. Elyaf ektraksiyonu ile ilgili farklı yaklaşımlar çalışılabilir.

KAYNAKLAR

AMERICAN ASSOCIATION OF TEXTILE CHEMISTS AND COLORISTS A.T.M.A., 2012. AATCC Test Method 20A Research Triangle Park, NC, USA.

APPALANENI K., HEIDER E.C., MOORE A.F. and CAMPIGLIA A.D., 2014. Single Fiber Identification with Nondestructive Excitation-Emission Spectral Cluster Analysis. dx.doi.org/10.1021/ac500021h | Anal. Chem.

ASTM INTERNATIONAL W.C., PA, USA. , 2008. ASTM, D629-08 in Test Method of American Society of Testing and Materials, Standard Test Methods for Quantitative Analysis of Textiles.

BLANC R., ESPEJO T., LOPEZ-MONTES A., TORRES D., CROVETTO G., NAVALON A. and VILCHEZ J.L., 2006. Sampling and identification of natural dyes in historical maps and drawings by liquid chromatography with diode-array detection. Journal of Chromatography A, 1122: 105-113.

BRINSKO, K.M., 2010. Optical Characterization of Some Modern Eco-Friendly Fibers. Journal of Forensic Sciences, 55(4): 915-923.

CAKIR, I. and UNER, B., 2008. Forensic analysis of silk fibers. Microscopy and Microanalysis, 14: 1462-1463.

CAREY A., RODEWIJK N., XU X. and VAN DER WEERD J., 2013. Identification of Dyes on single Textile Fibres by HPLC-DAD-MS. FORENSIC SCI SEM, 3(3): 143-152.

CHO L., REFFNER J.A., GATEWOOD B.M. and WETZEL D.L., 2001. Single fiber analysis by internal reflection infrared microspectroscopy. Journal of Forensic Sciences, 46: 1309-1314.

DEVEOGLU O., TORGAN E. and KARADAG R., 2012. High performance liquid chromatography of some natural dyes: analysis of plant extracts and dyed textiles. Coloration Technology, (128); 133-138.

DINLER V., 2004. Olay Yeri İncelemesinde Biyolojik Delillerin Önemi ve Uygulamada Yasanan Sorunlar. 6. Ulusal Adli Bilimler Kongresi, 28-30 Haziran, İstanbul: 1-14.

DRESEN S., GERGOV M., POLITI L., HALTER C. and WEINMANN W., 2009. ESI-MS/MS library of 1,253 compounds for application in forensic and clinical toxicology. Analytical and bioanalytical chemistry.(395): 2521-2526.

ENG M., MARTIN P. and BHAGWANDIN C., 2009. The analysis of metameric blue fibers and their forensic significance. Journal of Forensic Science: (54), 841-845.

GOODPASTER J.V. and LISZEWSKI E.A., 2009. Forensic analysis of dyed textile fibers. Analytical and bioanalytical chemistry, 394: 2009–2018.

GREEN F.M., SALTER T.L., STOKES P., GILMORE I.S. and O'CONNOR G., 2009. Ambient mass spectrometry: advances and applications in forensics. Surface and Interface Analysis (42): 347-357.

GRIEVE M.C., BIERMANN T.W. and DAVIGNON M., 2001. The evidential value of black cotton fibres. Science and Justice, (41): 245-260.

GRIFFIN R.M.E., SPEERS S.J., ELLIOTT L., TODD N., SOGOMO W. and KEE T.G., 1994. An improved high-performance liquid chromatography system for the analysis of basic dyes in forensic casework. Journal of Chromatography A, (674); 271-280.

GUAN ZHONG S. and LONG L., 2007. Study on distinguishing problem of cashmere fiber. Wool Textile Journal, (12): 1-18.

HAMLYN P.F. G.N., KIBRIA I., BROADBENT E. and CARTHY B.J., 1995. DNA based techniques for speciality fibre analysis. Proceeding of the 9th. International Wool Textile Research Conference Biella, Italy: 513-518,.

HUANG M., RUSSO R., FOOKES B.G. and SIGMAN M.E. ,2005. Analysis of fiber dyes by liquid chromatography mass spectrometry with electrospray ionization: discriminating between dyes with indistinguishable UV visible absorption spectra. J Forensic Sci, (50): 526-534.

HUANG M., YINON J. and SIGMAN M.E., 2004. Forensic identification of dyes extracted from textile fibers by liquid chromatography mass spectrometry, Journal of Forensic Sciences,(49), 238-249.

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION I.T.M., 2007. ISO Test Method-17751,Textiles Quantitative Analysis of Animal Fibres by Microscopy-Cashmere, Wool, Specialty Fibres and Their Blends. International Standards Organization, ISO, Geneva, Switzerland

INTERNATIONAL WOOL TEXTILE ORGANISATION B., BELGIUM, 2000. Scanning Electron Microscopic Analysis of Specialty Fibers and Sheep's Wool and Their Blends," IWTO Test Method 58-00.

İŞBİLEN A. ve DİNLER V., 2004. Adli olayların çözümünde tekstil yüzey ve aksesuarları, 3. Anadolu Adli Bilimler Kongresi, Eskisehir Osmangazi Üniversitesi.

JI. W, BAI L, JI M. and YANG X, 2011. A method for quantifying mixed goat cashmere and sheep wool. Forensic Science International, 208: 139-142.

JIN M., RUAN Y., YAN B. and SHI D., 2011. Extraction Method of mtDNA for Cashmere and Wool Fibers. Wool Text. J, 39, 53.

KAYGISIZ M. A.T.A., BAYKAL A. ve BAYER M., 2002. Olay Yeri İnceleme Hizmet İçi Eğitim Kaynak Kitabı. EGM Yayınları, Ankara.

KIRSTEN K., CESCUTTI G., KRUSE L. AND MUSSIG J., 2009. Development of a DNA-analytical Method for the Identification of Animal Hair Fibers in Textiles. Textile Research Journal; 79: 69-75.

LAING D., DUDLEY R., HARTSHORNE A., HOME J., RICKARD R. and BENNETT D., 1991 The extraction and classification of dyes from cotton and viscose fibres. Forensic Science International, (50): 23-35.

LAUREN M. PETRICK. and W. RONALD FAWCETT, 2006. High-Performance Liquid Chromatography–Ultraviolet–Visible Spectroscopy–Electrospray Ionization Mass Spectrometry Method for Acrylic and Polyester Forensic Fiber Dye Analysis. J Forensic Sci ,(51), 4: 771-779.

LEEDER J., MCGREGOR B. and STEADMAN R. 1998. Properties and Performance of Goat Fibre. RIRDC Publication.

LU W., FEI J., YANG J., TANG M., DONG Z., ZHOU Z., YE J. AND WU H., 2012. A novel method to identify yak fiber in textile. Textile Research Journal, 0(00) 1-7.

McLLVAINE T.C., 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. Journal of Biological Chemistry *(*49), 183-186.

MORGAN S.L., VANN B.C., BAGULEY B.M. and STEFAN A.R., 2007. Advances in Discrimination of Dyed Textile Fibers using Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry. Trace Evidence Symposium, Clearwater, Florida, Clearwater, FL.

PETROVICIU I., MEDVEDOVICIA., ALBU F. and BERGHE I, 2012. Lc-Ms As Analytical Technique For The Identification of Natural Dyes In Historic Textiles. Romanian Reports in Physics, 64: 507-515.

RENDLE D.F. and WIGGINS K.G., 1995. Forensic analysis of textile fibre dyes. Review of Progress in Coloration and Related Topics, (25): 29-34.

SAMBROOK J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T., 1989. Molecular cloning. A laboratory manual (2nd ed.).

SHI X.-J. and YU W.-D., 2011. Intelligent animal fibre classification with artificial neural networks. International Journal of Modelling, Identification and Control, (12): 107-12.

SOUSA M. and CONCEIÇÃO OLIVEIRA M.D., 2010. Analysis of Early Synthetic Dyes with HPLC-DAD-MS. Department of Conservation and Restoration. Master Thesis. Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade de Lisboa, Lisbon.45 pages.

SPEERS S.J., LITTLE B.H. and ROY M., 1994. Separation of acid, basic and dispersed dyes by a single-gradient elution reversed-phase high-performance liquid chromatography system. Journal of Chromatography A, 674: 263-70.

STEFAN A.R., DOCKERY C.R., NIEUWLAND A.A., ROBERSON S.N., BAGULEY B.M., HENDRIX J.E. and MORGAN S.L., 2009. Forensic analysis of anthraquinone, azo, and metal complex acid dyes from naylon fibers by micro-extraction and capillary electrophoresis. Analytical and Bioanalytical Chemistry. (394): 2077-85.

SUBRAMANIAN S., KARTHIK T. and VIJAYARAAGHAVAN N.N., 2005. Single nucleotide polymorphism for animal fibre identification. Journal of Biotechnology, 116: 153–158.

THOMSON I., PRIYANKA P. RANE and BARVE SS., 2010. International Journal of Zoological Research. (6): 286-92.

TOBE S.S. and LINACRE A.M.T., 2008. A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome *b* gene. Electrophoresis, 29: 340–347.

TUINMAN A.A., LEWIS L.A. and LEWIS S.A., 2003. Trace-fiber color discrimination by electrospray ionization mass spectrometry: A tool for the analysis of dyes extracted from submillimeter naylon fibers. Analytical chemistry. (75): 2753-60.

TUNCER D.D.M., 2008. Protein saflaştırma Kromatografik Teknikler 1. Can Matbaacılık, Mersin Üniversitesi.

ÜNSAL E., 2006. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi için farklı polaritelere sahip fonksiyonel gruplu kolon dolgu materyallerin sentezi ve kromatografik karakterizasyonu. Hacettepe Üniversitesi, Doktora tezi, Kimya Mühendisliği.

WANG B., HU Z., GE S., KONG L. and ZHANG B., 2011. Identification of Wool and Cashmere Based on Light Microscope. Wool Text. J. 39-42.

WĄS-GUBAŁA J., 2009. Selected Aspects of the Forensic Examination of Textile Traces. Fibres and Textiles in Eastern Europe, 17: 26-9.

WIGGINS K.G., 2001. Forensic textile fiber examination across the USA and Europe. Journal of Forensic Sciences, 46: 1303-8.

WOOD M., LALOUP M., SAMYN N., DEL MAR RAMIREZ FERNANDEZ M., DE BRUIJN E.A., MAES R.A.A. and DE BOECK G., 2006. Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry in forensic science. Journal of Chromatography A, 1130: 3-15.

ZHANG J., PALMER S. and WANG X., 2010. Identification of animal fibers with wavelet texture analysis. Proceedings of the World Congress on Engineering.

http://www.analitik.hacettepe.edu.tr (01.03.2014)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ (19.05.2014)

http://www.teknolojiweb.net/akriligin-boyanmasi/) (06.05.2014)

ÖZGEÇMİŞ

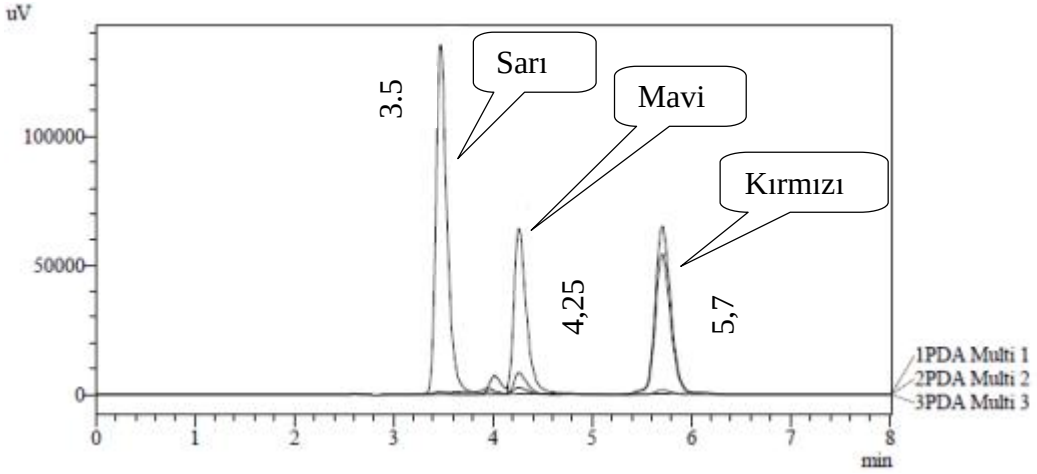
1978 yılında Kahramanmaraş'ta doğdu. İlköğrenimini Atatürk İlkokul'unda, ortaöğrenimini Kahramanmaraş Çukurova Elektrik Anadolu Lisesi'nde tamamladıktan sonra 1997 yılındaKahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Tekstil Mühendisliği Bölümü'nde başladığı lisans eğitimini 2001 yılında tamamladı. Aynı yıl Gaziantep Üniversitesi Tekstil Mühendisliği Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı ve aynı Bölüme araştırma görevlisi olarak atandı. 2004 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2005 yılında Gaziantep Üniversitesi Tekstil Mühendisliği Bölümün'de öğretim görevlisi olarak çalışmaya devam etti. 2008 yılında Çukurova Üniversitesi Tekstil Mühendisliği Bölümü'nde doktora eğitimine başladı. 2009 yılında ise Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Tekstil Mühendisliği Bölümün'de uzman olarak çalışmaya başladı. Halen de bu görevini sürdürmektedir. Evli ve 2 çocuk annesidir.

EKLER

EK 1. Bazik boyarmaddelerle ilgili HPLC analizleri metot 3

Ek - 1.1. Bazik boyarmaddelerin kalibrasyon çözeltilerindeki her bir boyarmaddenin konsantrasyonlarının belirlenmesi

	Boyarmaddeler		
Kalibrasyon Çözeltileri	430nm	498nm	598nm
	Sarı	Mavi	Kırmızı
Mix 2 (11,25 ppm)	11,255	11,282	11,261
Mix 3 (5,625 ppm)	5,722	5,675	5,712
Mix 4 (2,81 ppm)	2,666	2,654	2,656
Mix 5 (1,40 ppm)	1,280	1,282	1,293
Mix 6 (0,7 ppm)	0,578	0,579	0,583

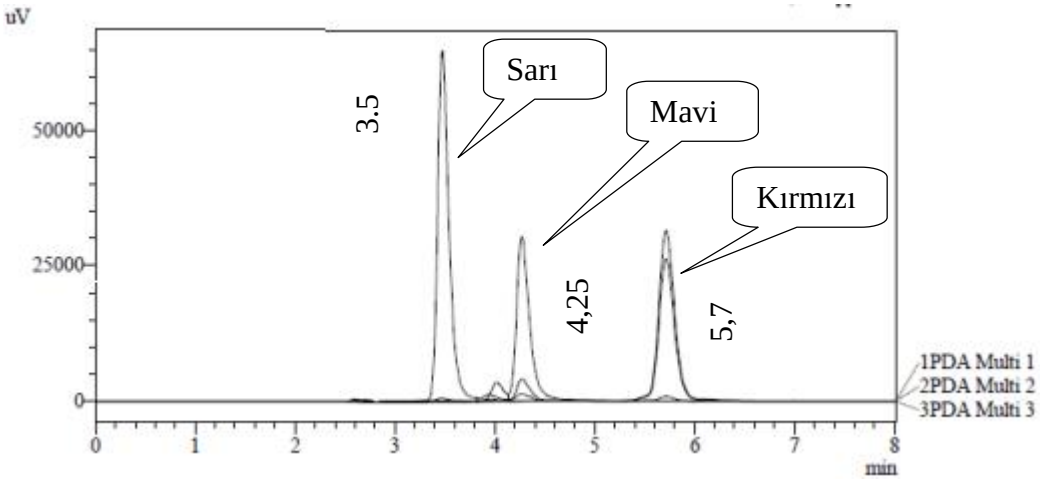


1 PDA Multi 1 / 430 nm 4nm

2 PDA Multi 2 / 498 nm 4nm

3 PDA Multi 3 / 598 nm 4nm

Ek - 1.2. Bazik boyarmaddeler kalibrasyon çözeltisi 2 (mix 2 için) HPLC sonuçları

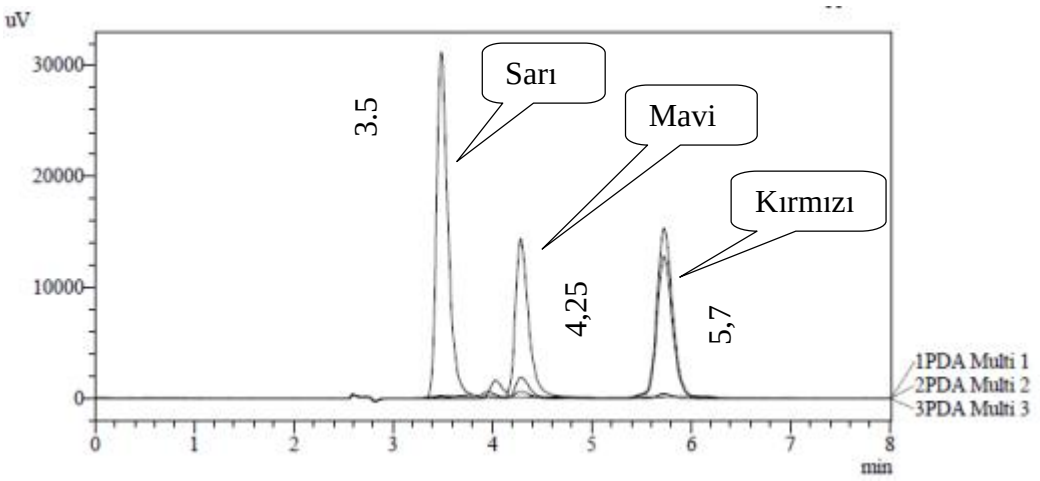


1 PDA Multi 1 / 430 nm 4nm

2 PDA Multi 2 / 498 nm 4nm

3 PDA Multi 3 / 598 nm 4nm

Ek - 1.3. Bazik boyarmaddeler kalibrasyonçözeltisi 3 (mix 3 için) HPLC sonuçları

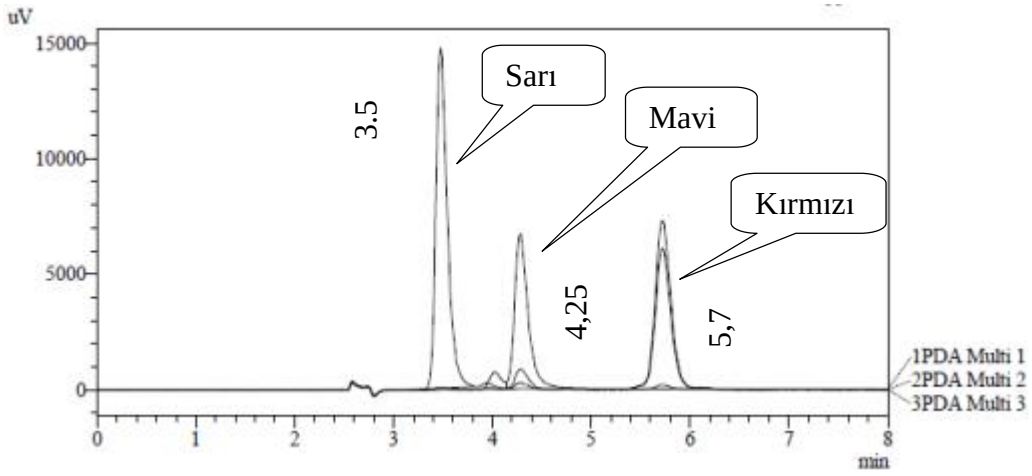


1 PDA Multi 1 / 430 nm 4nm

2 PDA Multi 2 / 498 nm 4nm

3 PDA Multi 3 / 598 nm 4nm

Ek - 1.4. Bazik boyarmaddeler kalibrasyon çözeltisi 4 (mix 4 için) HPLC sonuçları

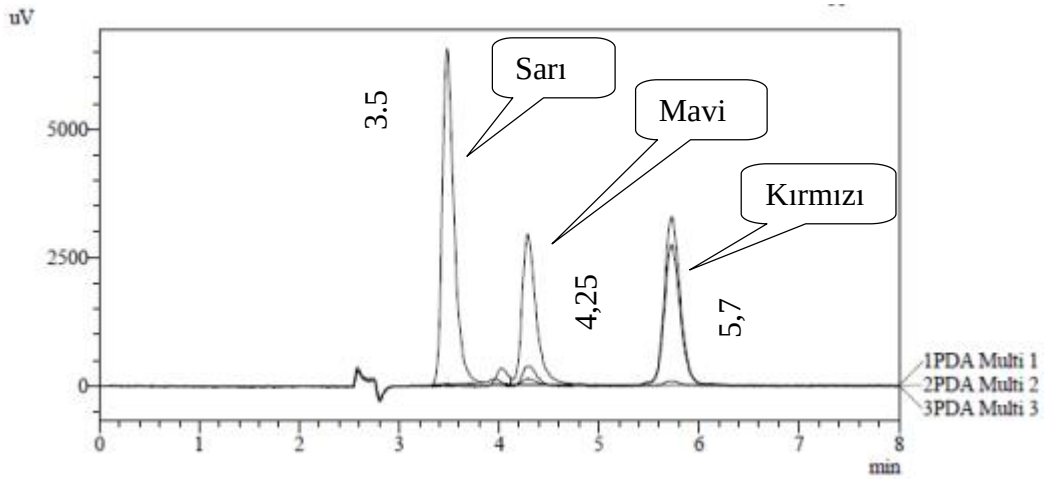


1 PDA Multi 1 / 430 nm 4nm

2 PDA Multi 2 / 498 nm 4nm

3 PDA Multi 3 / 598 nm 4nm

Ek - 1.5. Bazik boyarmaddeler kalibrasyonçözeltisi 5 (mix 5 için) HPLC sonuçları



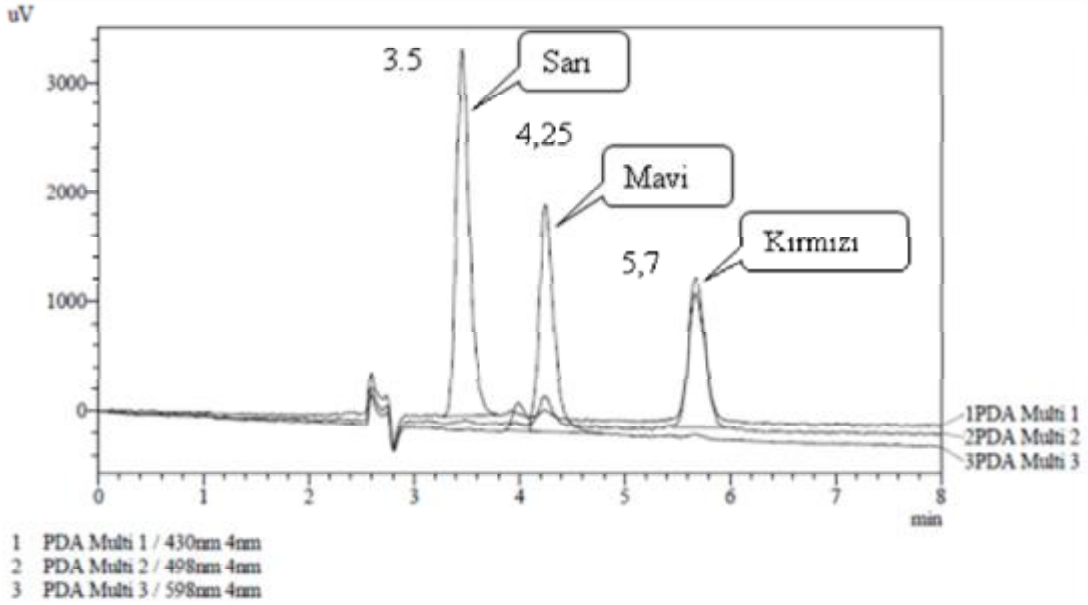
1 PDA Multi 1 / 430 nm 4nm

2 PDA Multi 2 / 498 nm 4nm

3 PDA Multi 3 / 598 nm 4nm

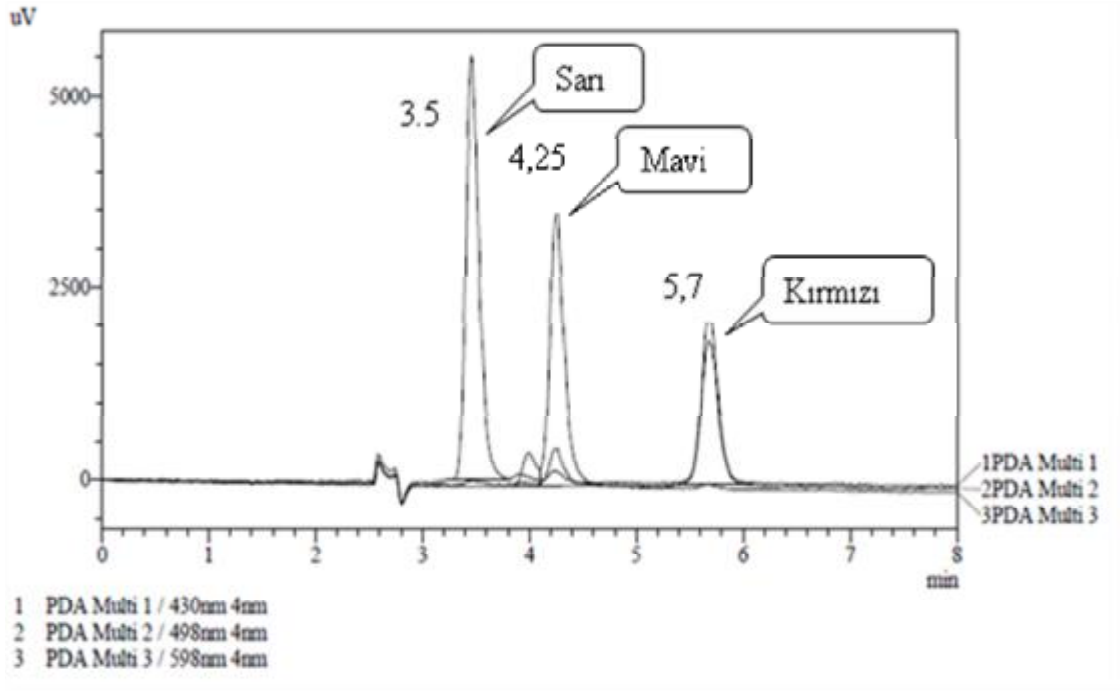
Ek - 1.6. Bazik boyarmaddeler kalibrasyon çözeltisi 6 (mix 6 için)HPLC sonuçları

EK 2. Bazik boyarmaddelerle boyanmış casefiber- kontrol örneklerinin kromatogramları

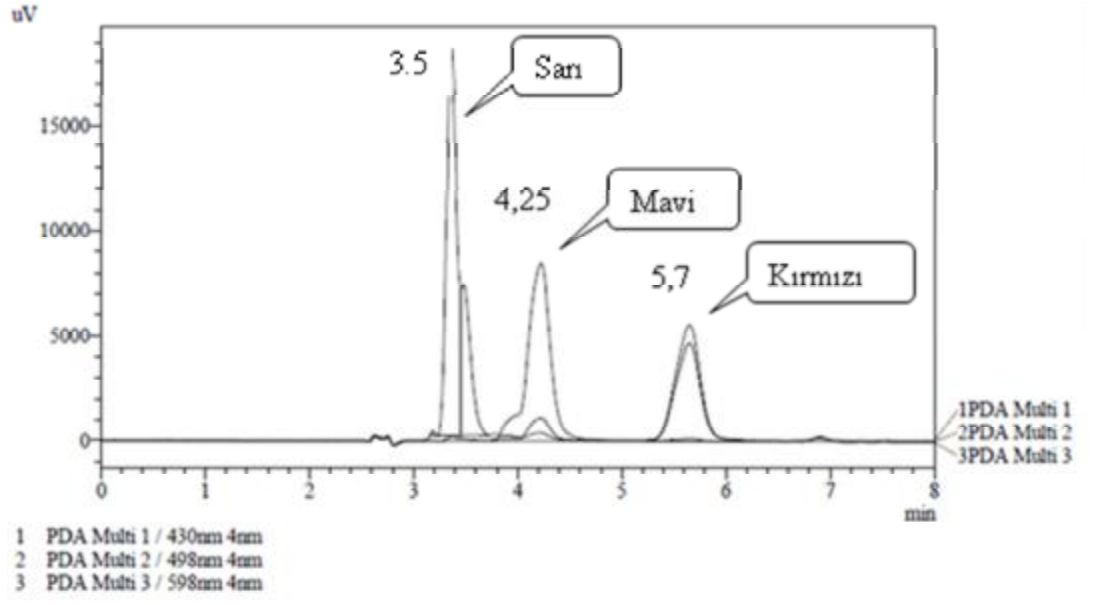


Ek – 2.1. Bazik boyarmaddeler kalibrasyon çözeltisi 6 (mix 6 için)HPLC sonuçları

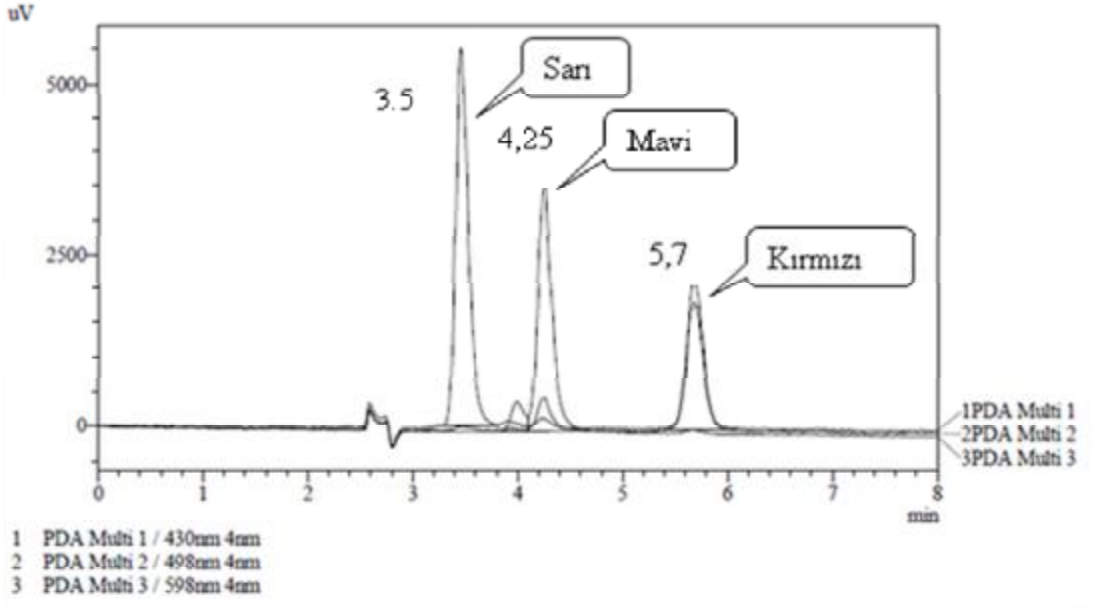
Bazik boyarmaddelerle boyanmış Casefiber 1 (0.01 gr) için HPLC sonuçlarının üst üste çakıştırılmış 3 farklı dalga boyuna ait şematik gösterimi



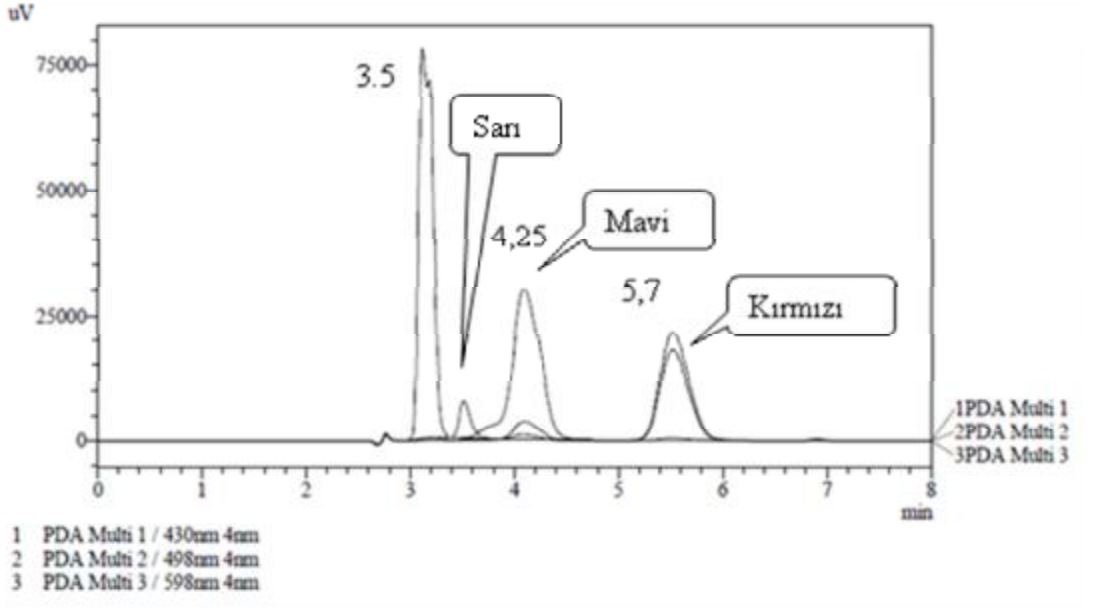
Ek 2.2. Bazik boyarmaddelerle boyanmış Casefiber 2 (0.001 gr)için HPLC sonuçlarının üst üste çakıştırılmış 3 farklı dalga boyuna ait şematik gösterimi.



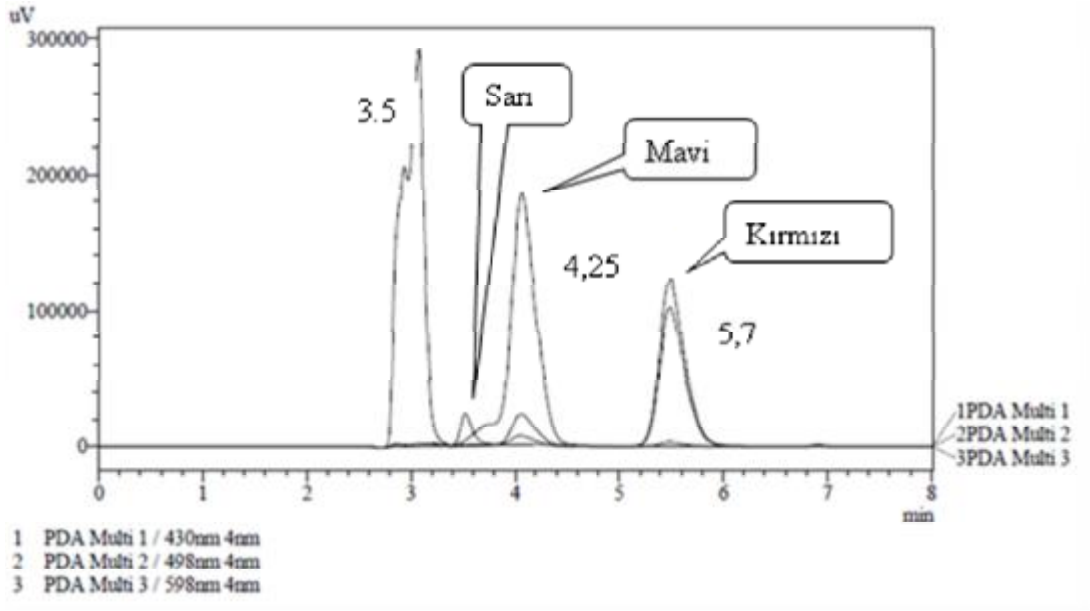
Ek 2.3. Bazik boyarmaddelerle boyanmışCasefiber 3 (0.005 gr) için HPLC sonuçlarının üst üste çakıştırılmış 3 farklı dalga boyuna ait şematik gösterimi.



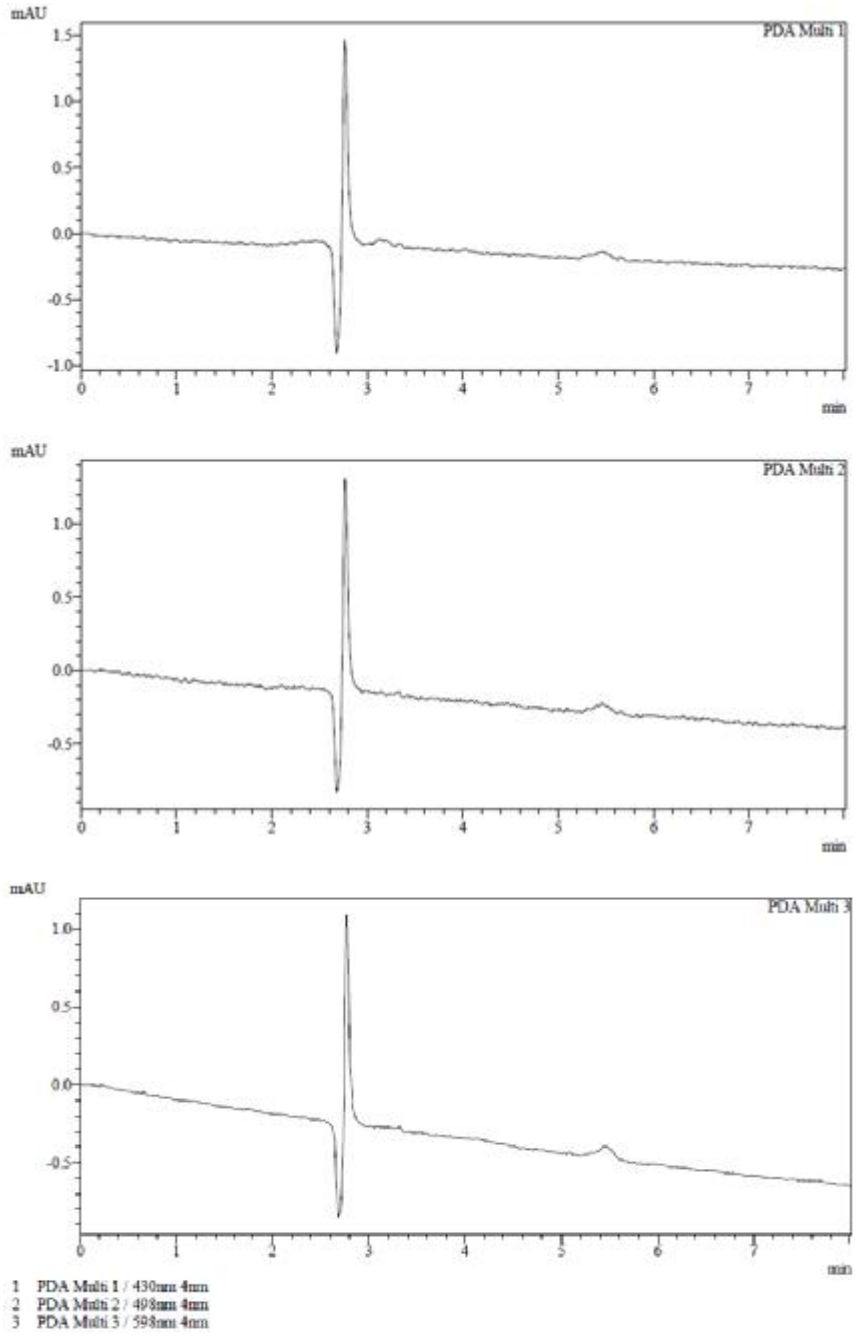
Ek 2.4. Bazik boyarmaddelerle boyanmış Casefiber 3,5(0,0005 gr)için HPLC sonuçlarının üst üste çakıştırılmış 3 farklı dalga boyuna ait şematik gösterimi.



Ek 2.5. Bazik boyarmaddelerle boyanmış Casefiber 4 (0,00025 gr))için HPLC sonuçlarının üst üste çakıştırılmış 3 farklı dalga boyuna ait şematik gösterimi



Ek 2.6. Bazik boyarmaddelerle boyanmış Casefiber 5 (0,000125 gr)için HPLC sonuçlarının üst üste çakıştırılmış 3 farklı dalga boyuna ait şematik gösterimi

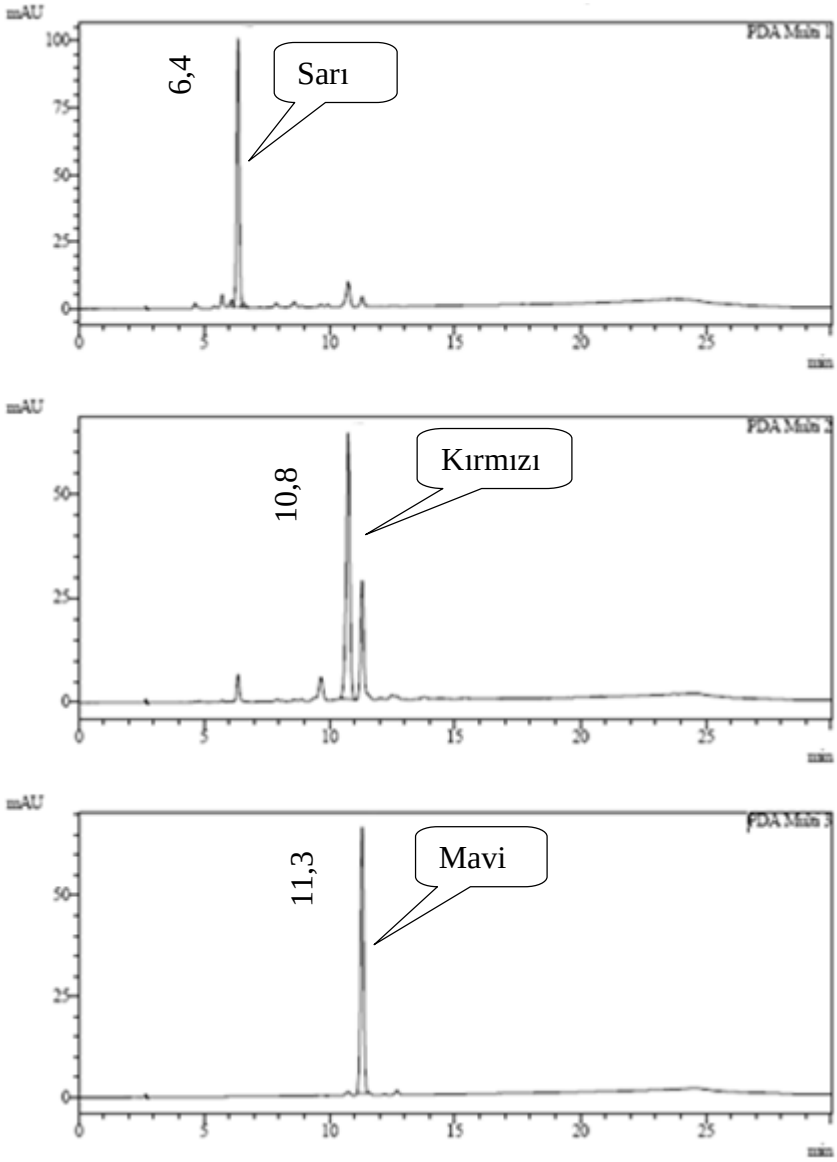


Ek 2.7. Casefiber blank (0,01 gr) için HPLC sonuçlarının 3 farklı dalga boyuna ait şematik gösterimi

EK 3. Reaktif boyarmaddelerle ilgili HPLC analiz metodu

Ek 3.1. Reaktif boyarmaddelerin kalibrasyon çözeltilerindeki her bir boyarmaddenin konsantrasyonlarının belirlenmesi

	Konsantrasyonlar (ppm)		
Kalibrasyon Çözeltileri	429nm	524nm	606nm
	Sarı	Kırmızı	Mavi
Mix 1	29,978	30,045	29,961
Mix 2	15,086	14,982	15,094
Mix 3	7,476	7,450	7,495
Mix 4	3,652	3,614	3,713
Mix 5	1,827	1,792	1,838
Mix 6	0,902	0,862	0,920

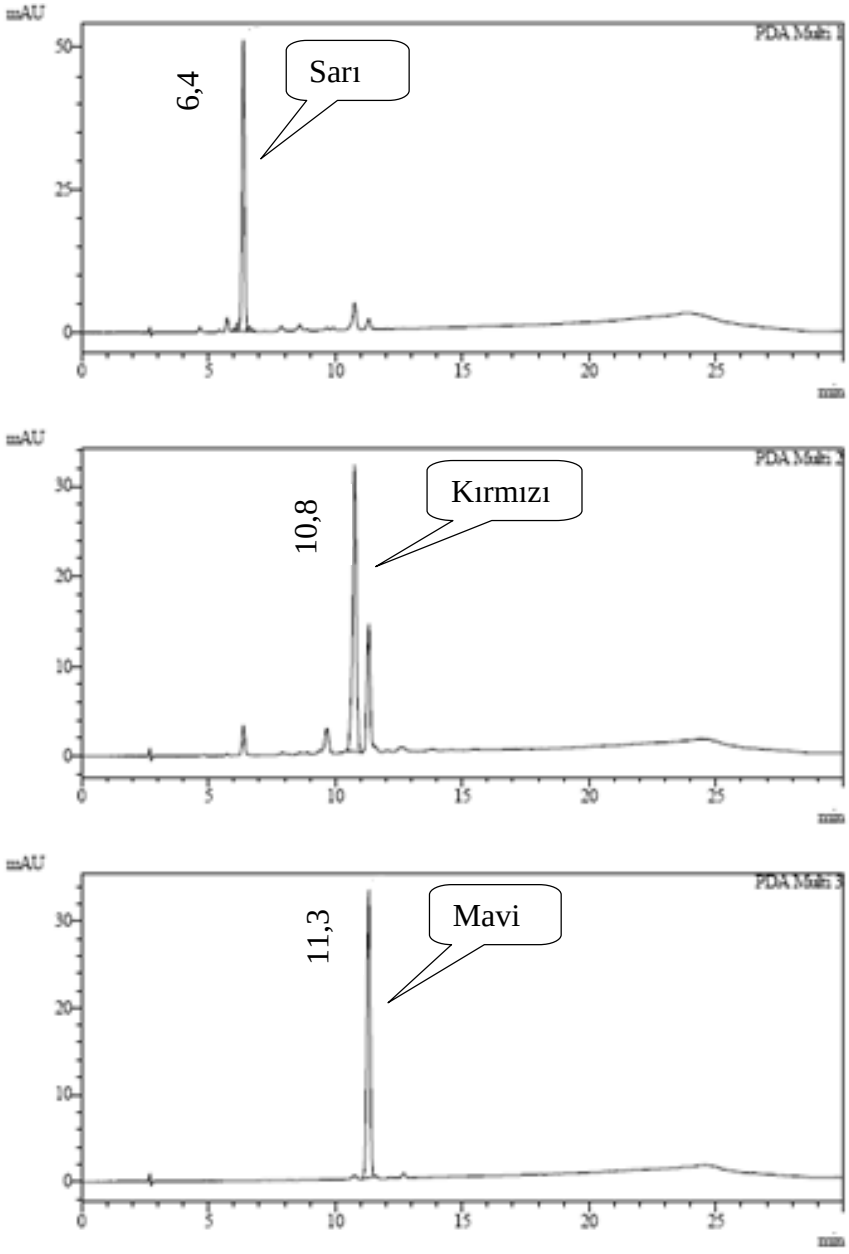


1 PDA Multi 1 / 429 nm 4nm

2 PDA Multi 2 / 524 nm 4nm

3 PDA Multi 3 / 606 nm 4nm

Ek 3.2. Reaktif boyarmadde kalibrasyon çözeltisi 1 (mix 1 için) HPLC sonuçları

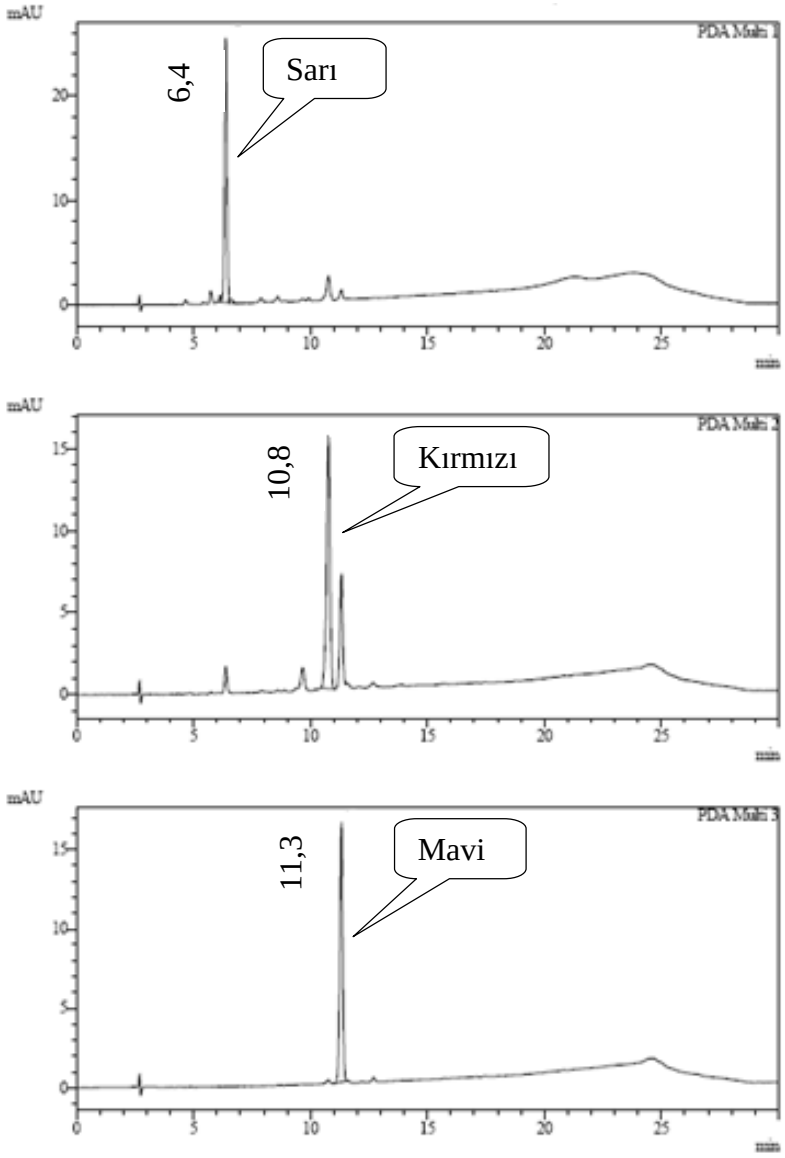


1 PDA Multi 1 / 429 nm 4nm

2 PDA Multi 2 / 524 nm 4nm

3 PDA Multi 3 / 606 nm 4nm

Ek 3.3. Reaktif boyarmadde kalibrasyon çözeltisi 2 (mix 2 için) HPLC sonuçları

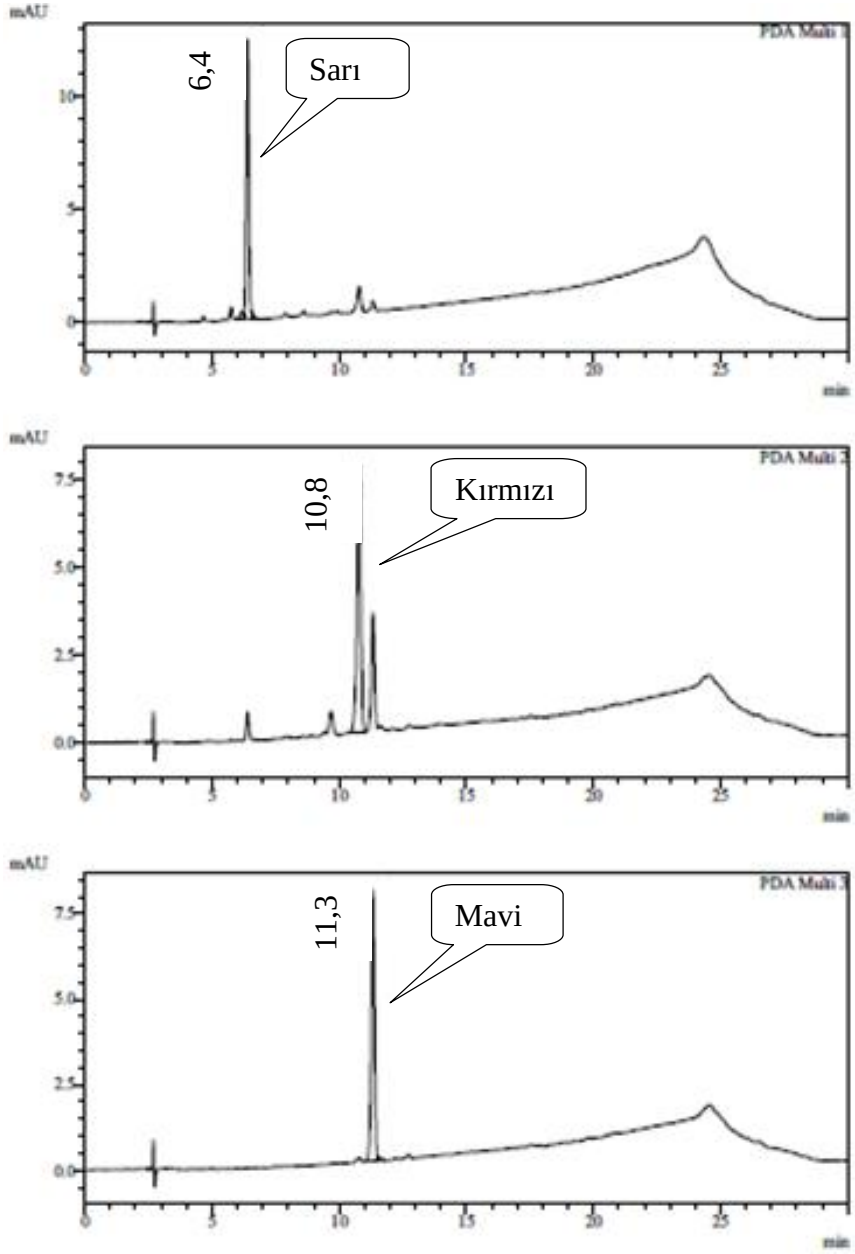


1 PDA Multi 1 / 429 nm 4nm

2 PDA Multi 2 / 524 nm 4nm

3 PDA Multi 3 / 606 nm 4nm

Ek 3.4. Reaktif boyarmadde kalibrasyon çözeltisi 3 (mix 3 için) HPLC sonuçları

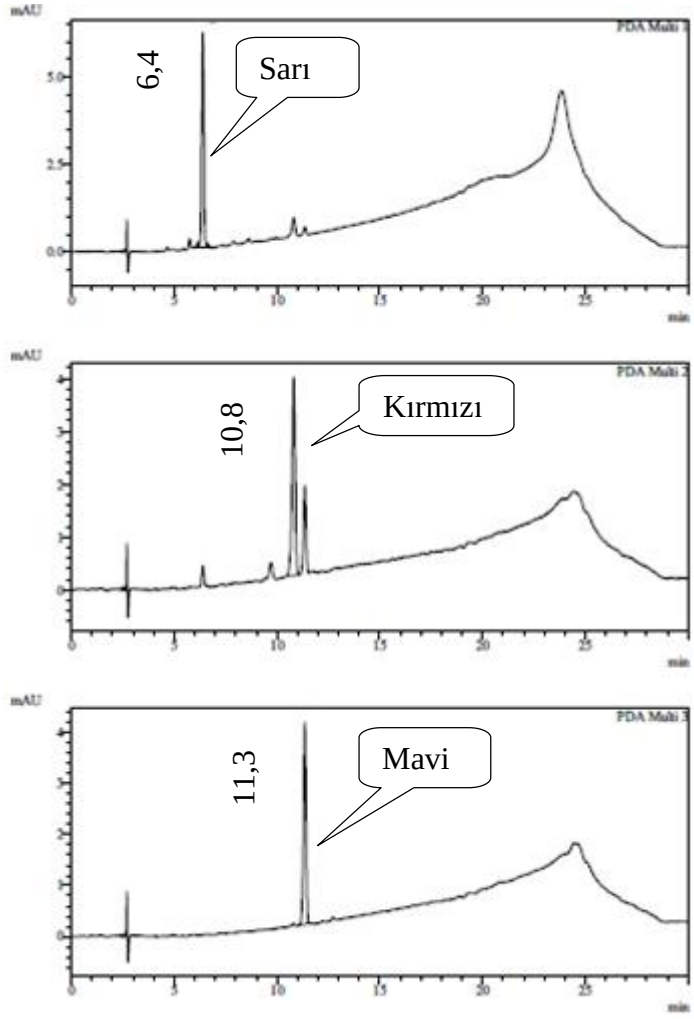


1 PDA Multi 1 / 429 nm 4nm

2 PDA Multi 2 / 524 nm 4nm

3 PDA Multi 3 / 606 nm 4nm

Ek 3.5. Reaktif boyarmadde kalibrasyon çözeltisi 4 (mix 4 için) HPLC sonuçları

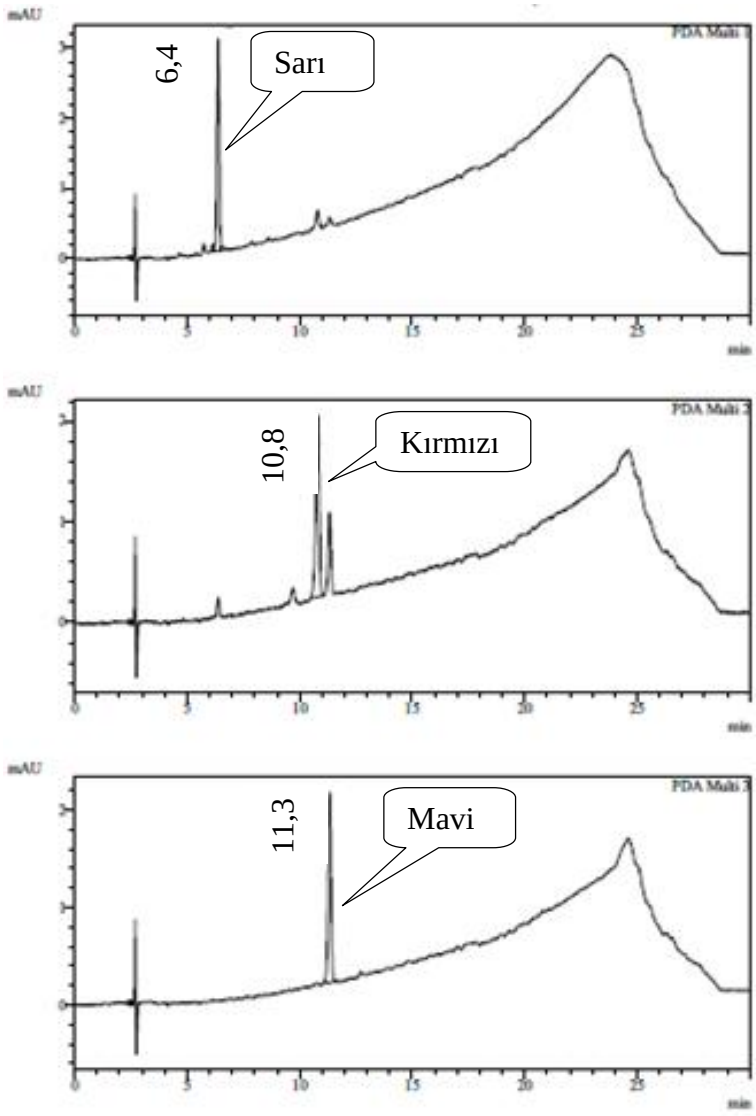


1 PDA Multi 1 / 429 nm 4nm

2 PDA Multi 2 / 524 nm 4nm

3 PDA Multi 3 / 606 nm 4nm

Ek 3.6. Reaktif boyarmadde kalibrasyon çözeltisi 5 (mix 5 için) HPLC sonuçları



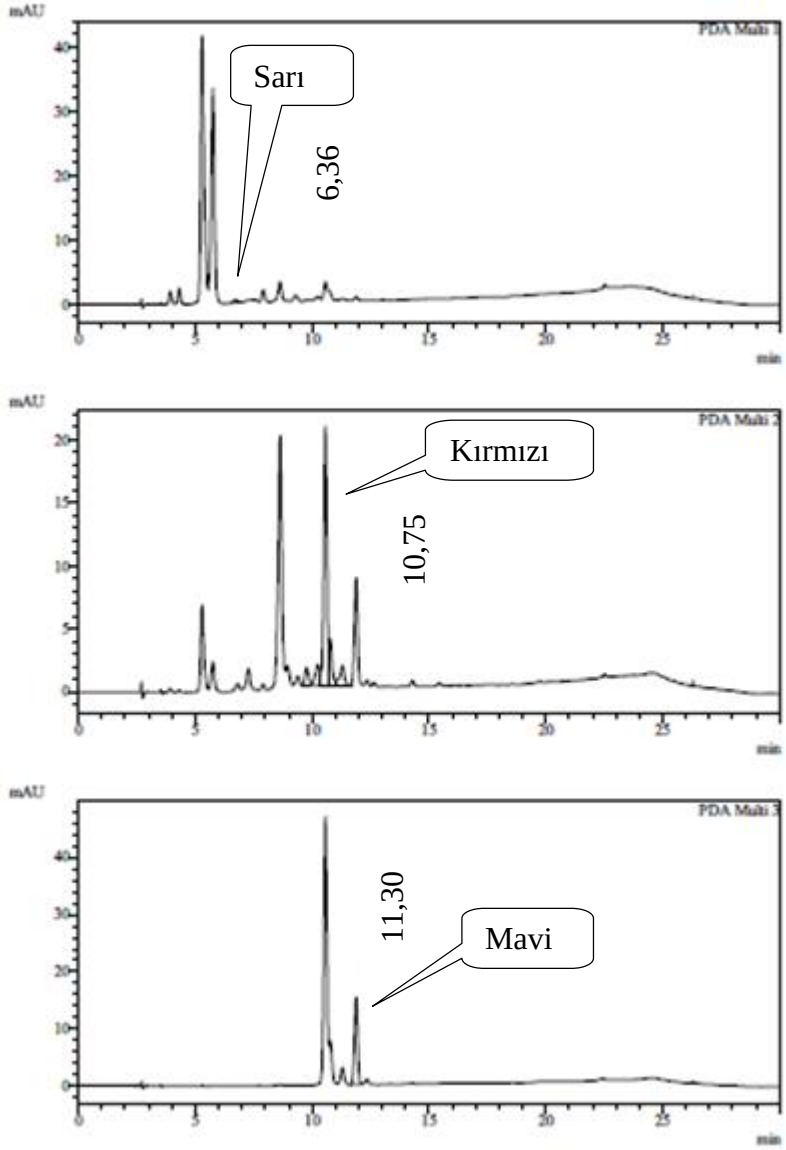
1 PDA Multi 1 / 429 nm 4nm

2 PDA Multi 2 / 524 nm 4nm

3 PDA Multi 3 / 606 nm 4nm

Ek 3.7. Reaktif boyarmadde kalibrasyon çözeltisi 6 (mix 6 için) HPLC sonuçları

EK 4. Reaktif boyarmaddelerle boyanmış casefiber- kontrol örneklerinin kromatogramları

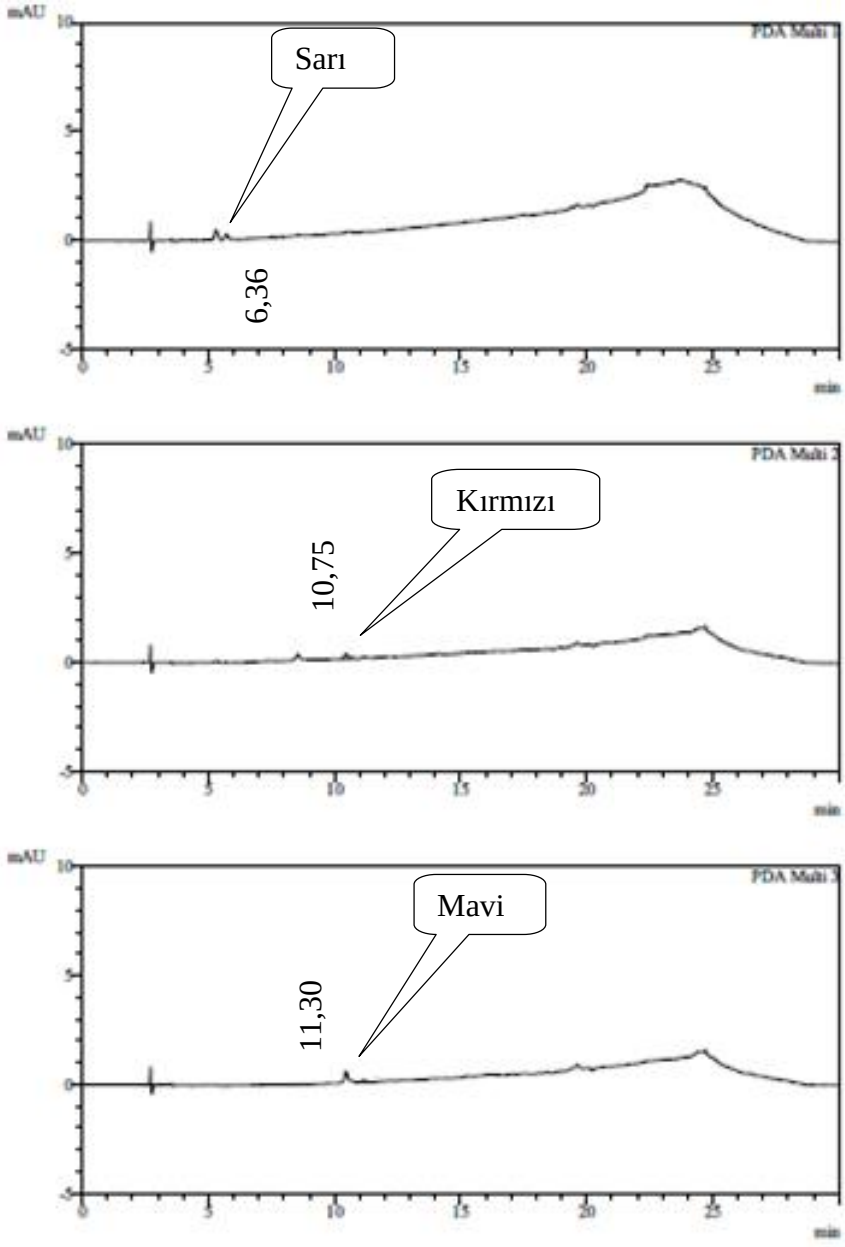


1 PDA Multi 1 / 429 nm 4nm

2 PDA Multi 2 / 524 nm 4nm

3 PDA Multi 3 / 606 nm 4nm

Ek 4.1. Case fiber 1 (kontrol örneği) için 3 farklı dalga boyuna ait HPLC sonuçlarının şematik gösterimi

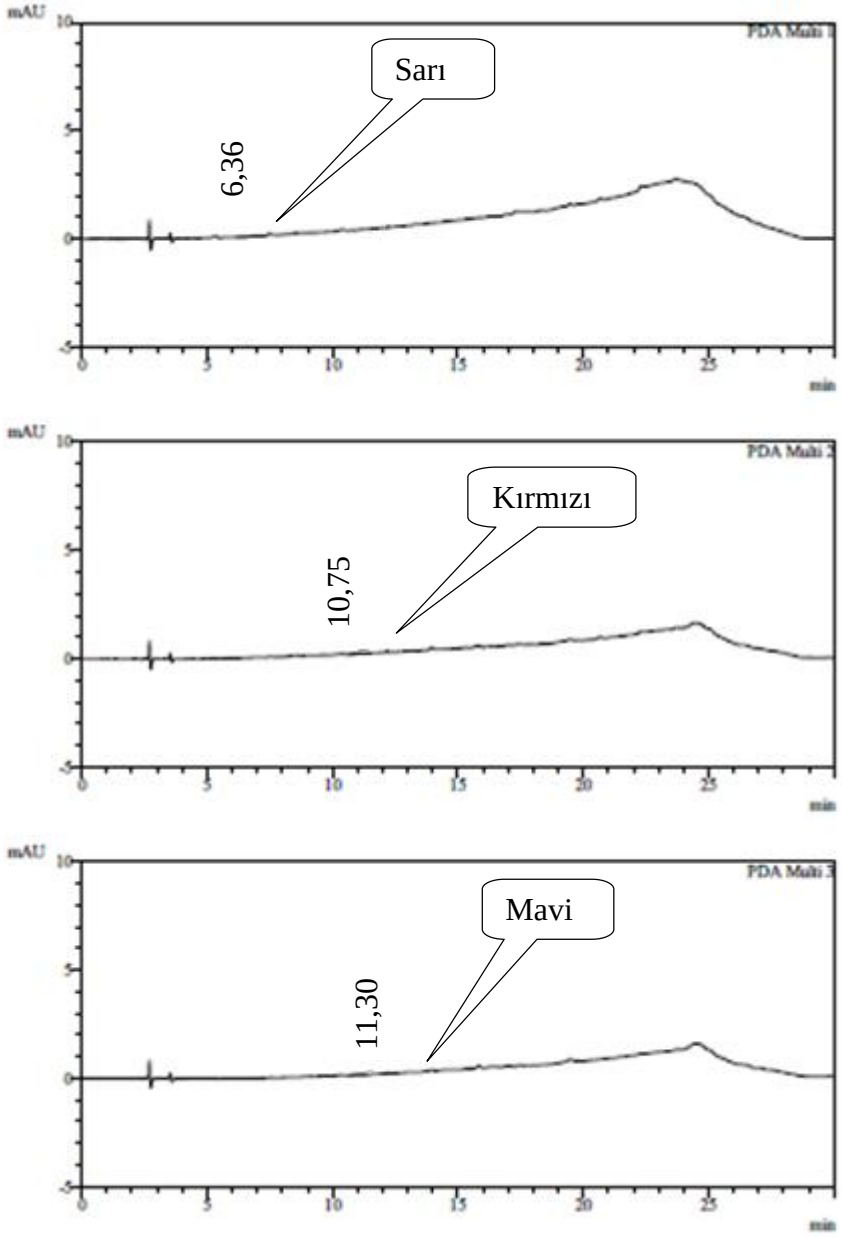


1 PDA Multi 1 / 429 nm 4nm

2 PDA Multi 2 / 524 nm 4nm

3 PDA Multi 3 / 606 nm 4nm

Ek 4.2.Case fiber 2(kontrol örneği) için 3 farklı dalga boyuna ait HPLC sonuçlarının şematik gösterimi

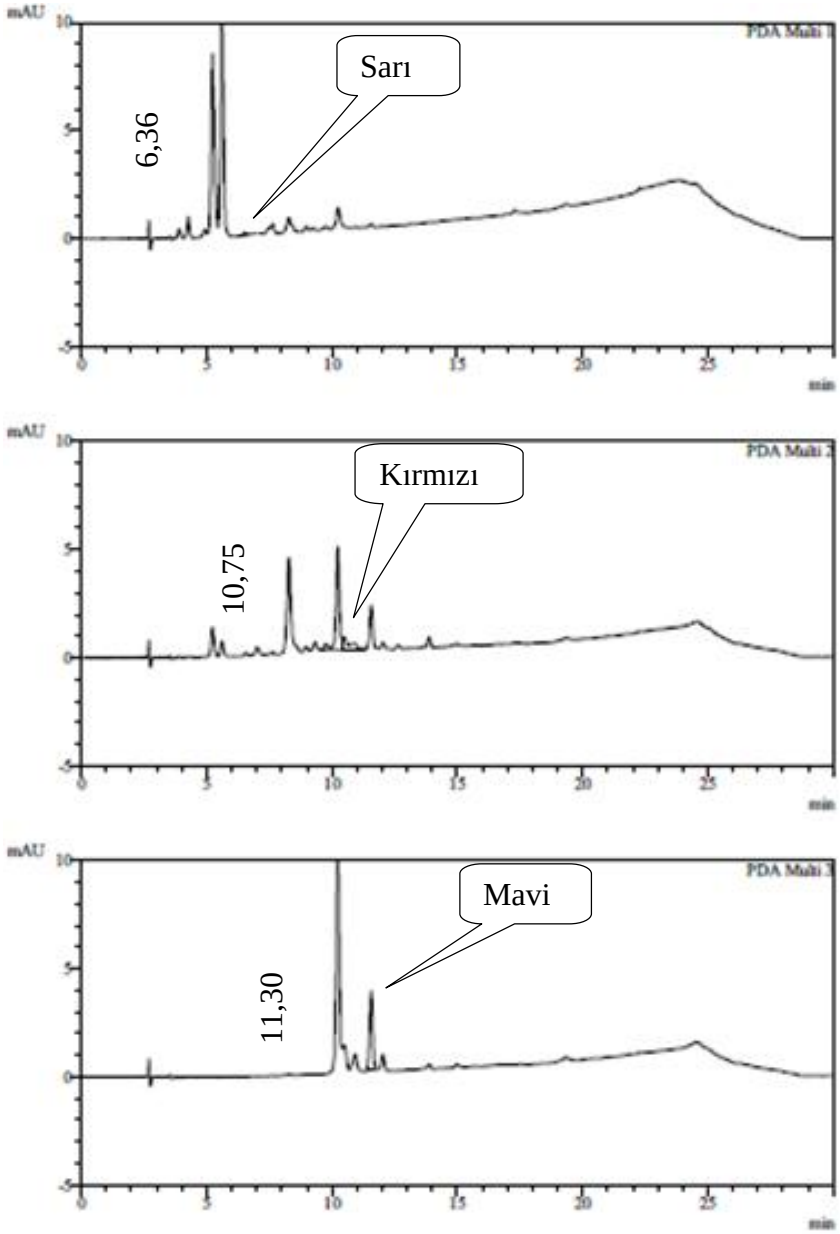


1 PDA Multi 1 / 429 nm 4nm

2 PDA Multi 2 / 524 nm 4nm

3 PDA Multi 3 / 606 nm 4nm

Ek 4.3. Case fiber 3(kontrol örneği) için 3 farklı dalga boyuna ait HPLC sonuçlarının şematik gösterimi

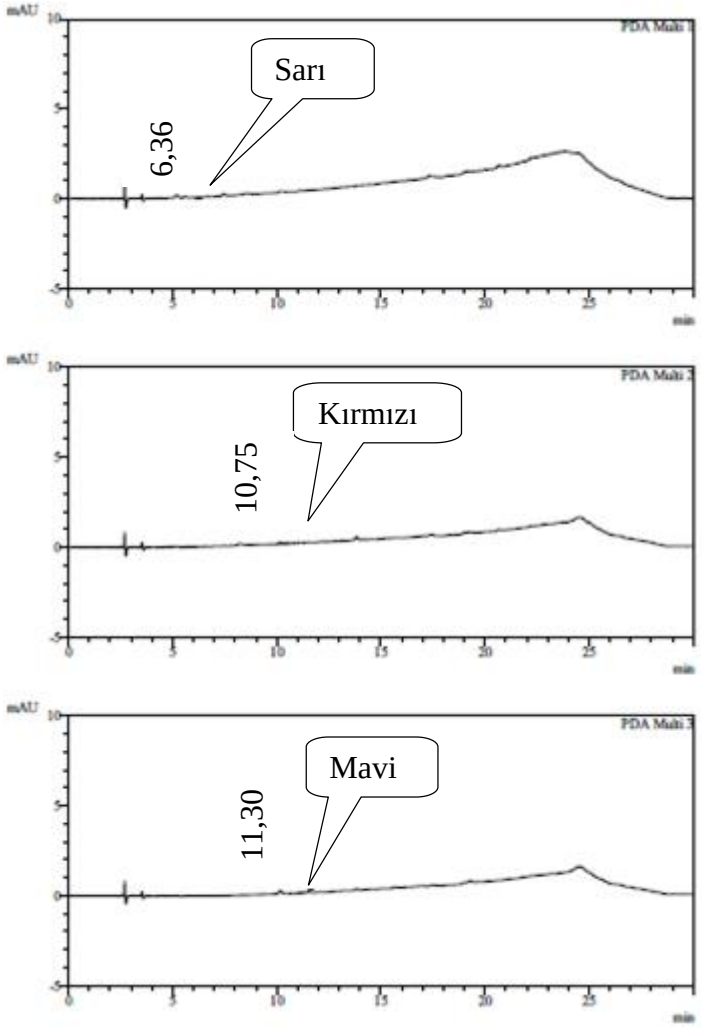


1 PDA Multi 1 / 429 nm 4nm

2 PDA Multi 2 / 524 nm 4nm

3 PDA Multi 3 / 606 nm 4nm

Ek 4.4. Case fiber 3,5 (kontrol örneği) için 3 farklı dalga boyuna ait HPLC sonuçlarının şematik gösterimi

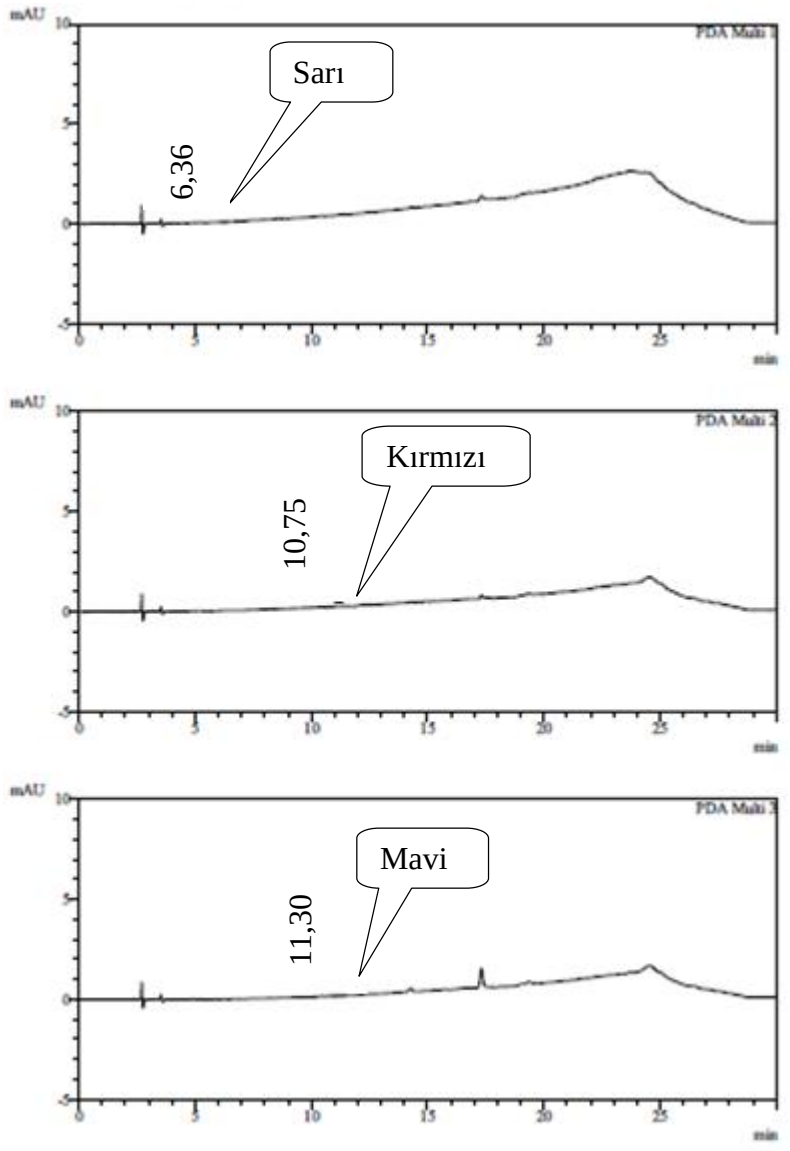


1 PDA Multi 1 / 429 nm 4nm

2 PDA Multi 2 / 524 nm 4nm

3 PDA Multi 3 / 606 nm 4nm

Ek 4.5. Case fiber 4 (kontrol örneği) için 3 farklı dalga boyuna ait HPLC sonuçlarının şematik gösterimi



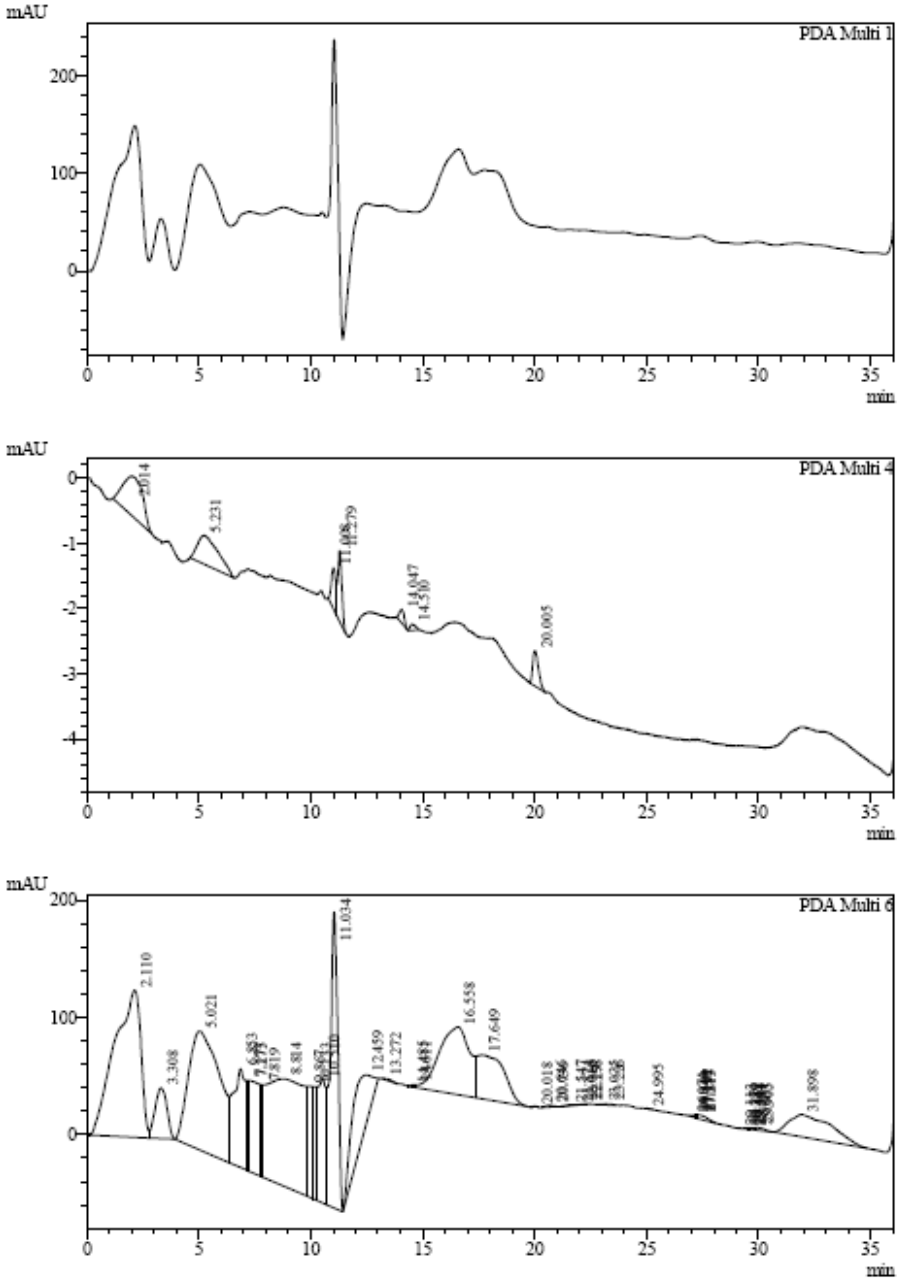
1 PDA Multi 1 / 429 nm 4nm

2 PDA Multi 2 / 524 nm 4nm

3 PDA Multi 3 / 606 nm 4nm

Ek 4.6. Case fiber 5 (kontrol örneği) için 3 farklı dalga boyuna ait HPLC sonuçlarının şematik gösterimi

EK 5. Asit boyarmaddelerle ilgili HPLC analiz metodu

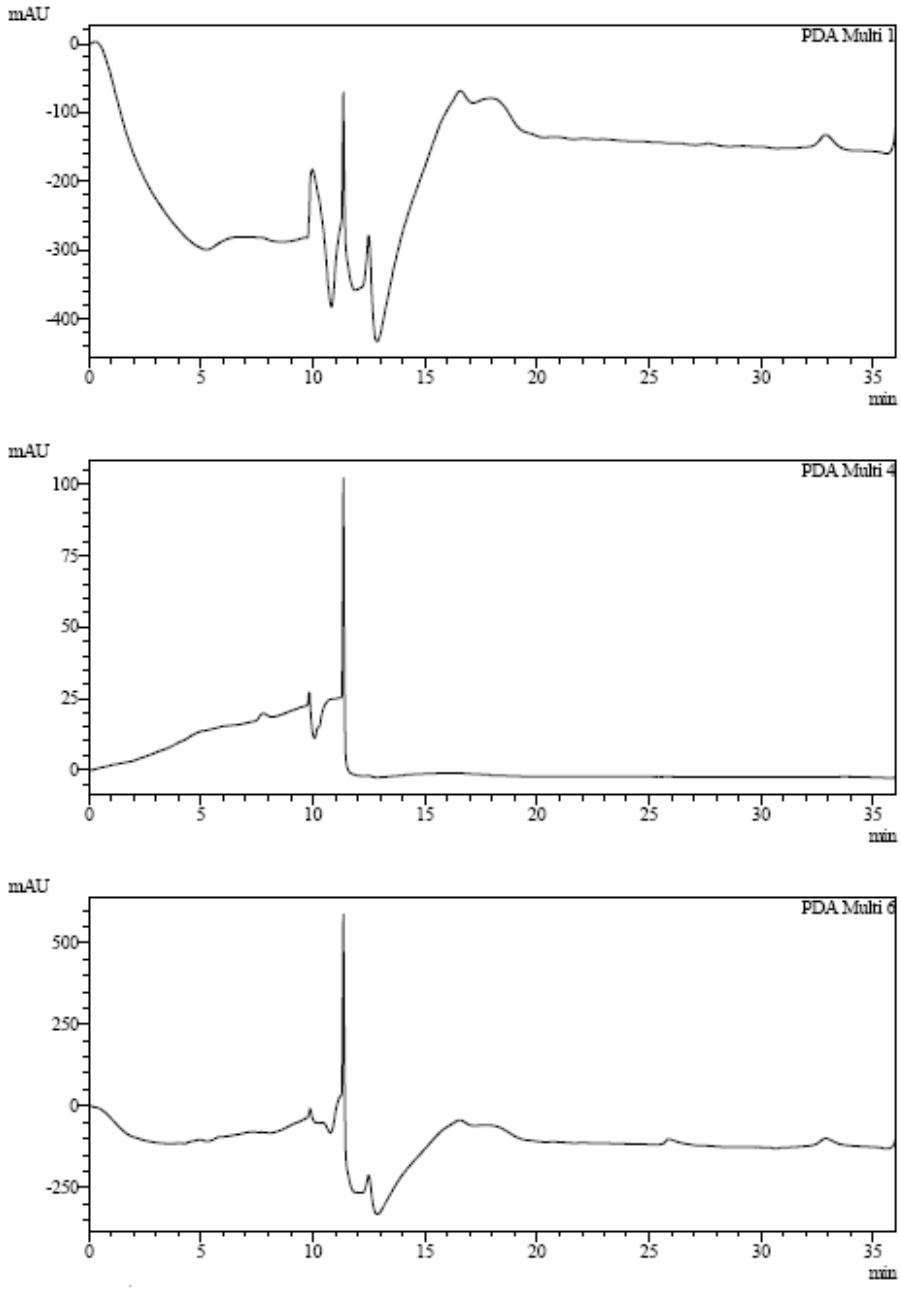


1 PDA Multi 1 / 210 nm 4nm

2 PDA Multi 4 / 277 nm 4nm

3 PDA Multi 6 / 190 nm 4nm

Ek 5.1. Asit boyarmadde kalibrasyon çözeltisi 1 (mix 1) için3 farklı dalga boyuna ait HPLC sonuçlarının şematik gösterimi

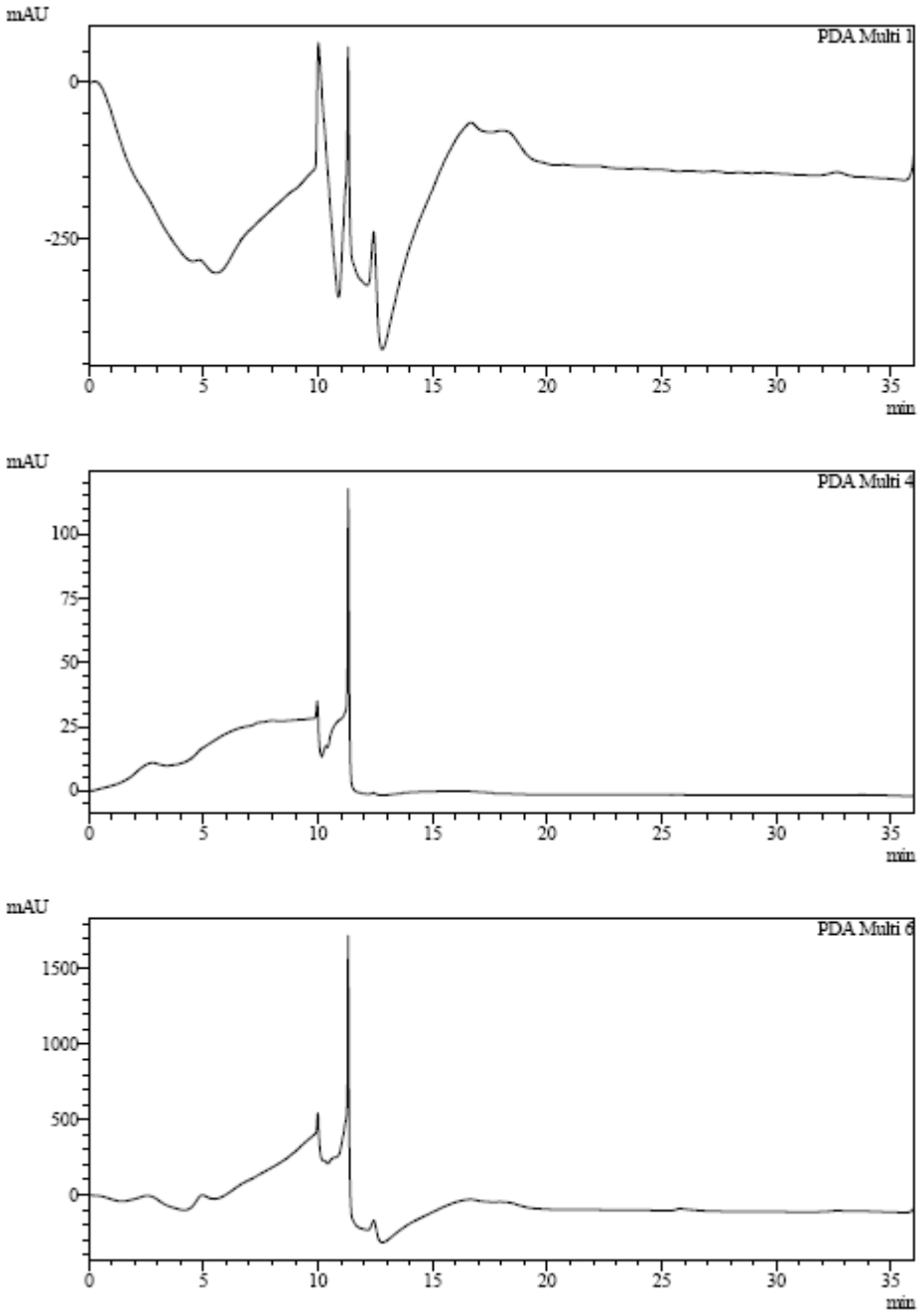


1 PDA Multi 1 / 210 nm 4nm

2 PDA Multi 4 / 277 nm 4nm

3 PDA Multi 6 / 190 nm 4nm

Ek 5.2. Asit boyarmadde kalibrasyon çözeltisi 2 (mix 2 için) 3 farklı dalga boyuna ait HPLC sonuçlarının şematik gösterimi

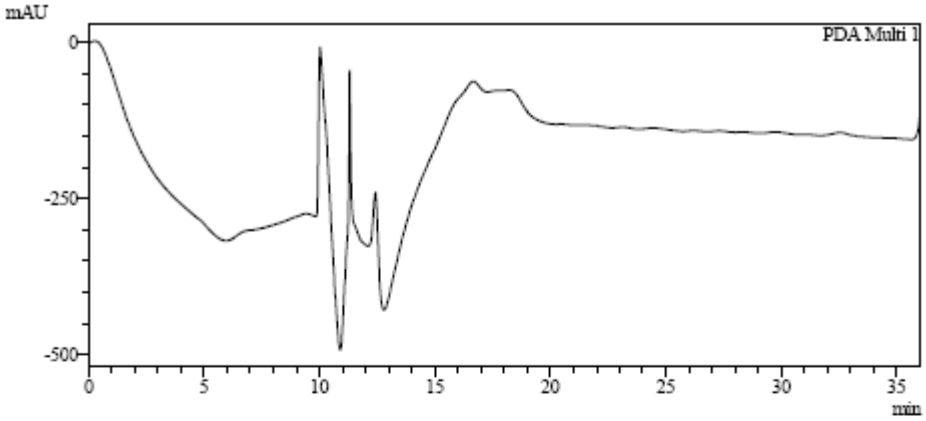


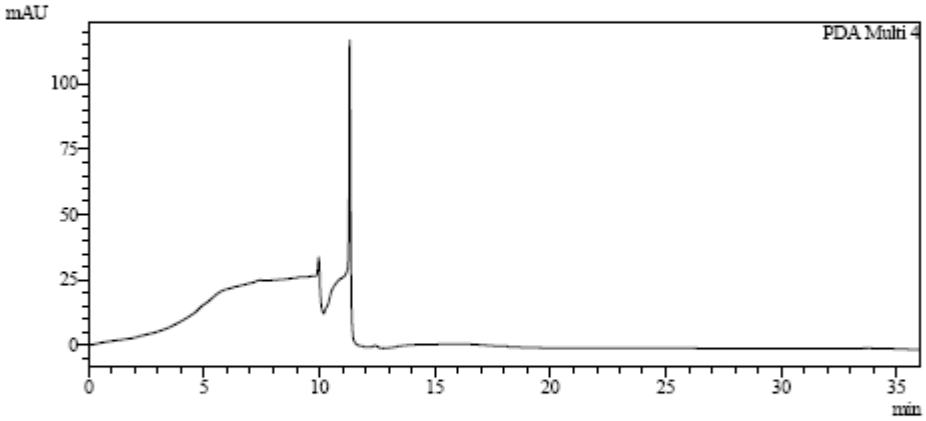
1 PDA Multi 1 / 210 nm 4nm

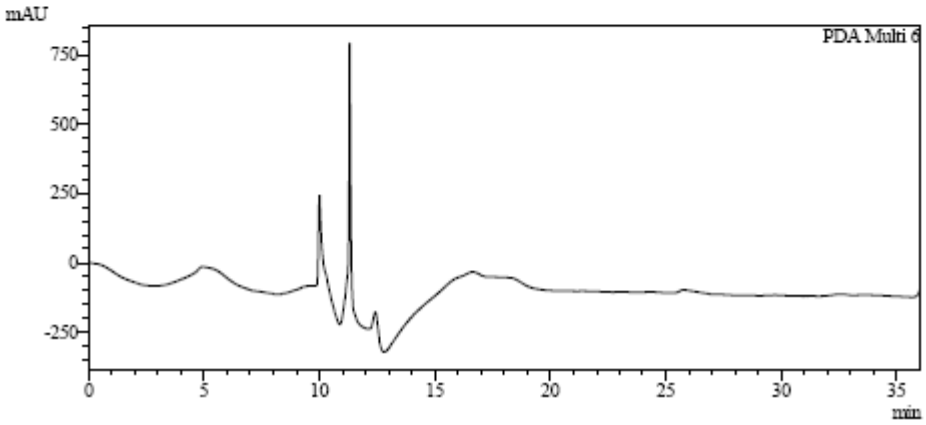
2 PDA Multi 4 / 277 nm 4nm

3 PDA Multi 6 / 190 nm 4nm

Ek 5.3. Asit boyarmadde kalibrasyon çözeltisi 3 (mix 3 için) 3 farklı dalga boyuna ait HPLC sonuçlarının şematik gösterimi





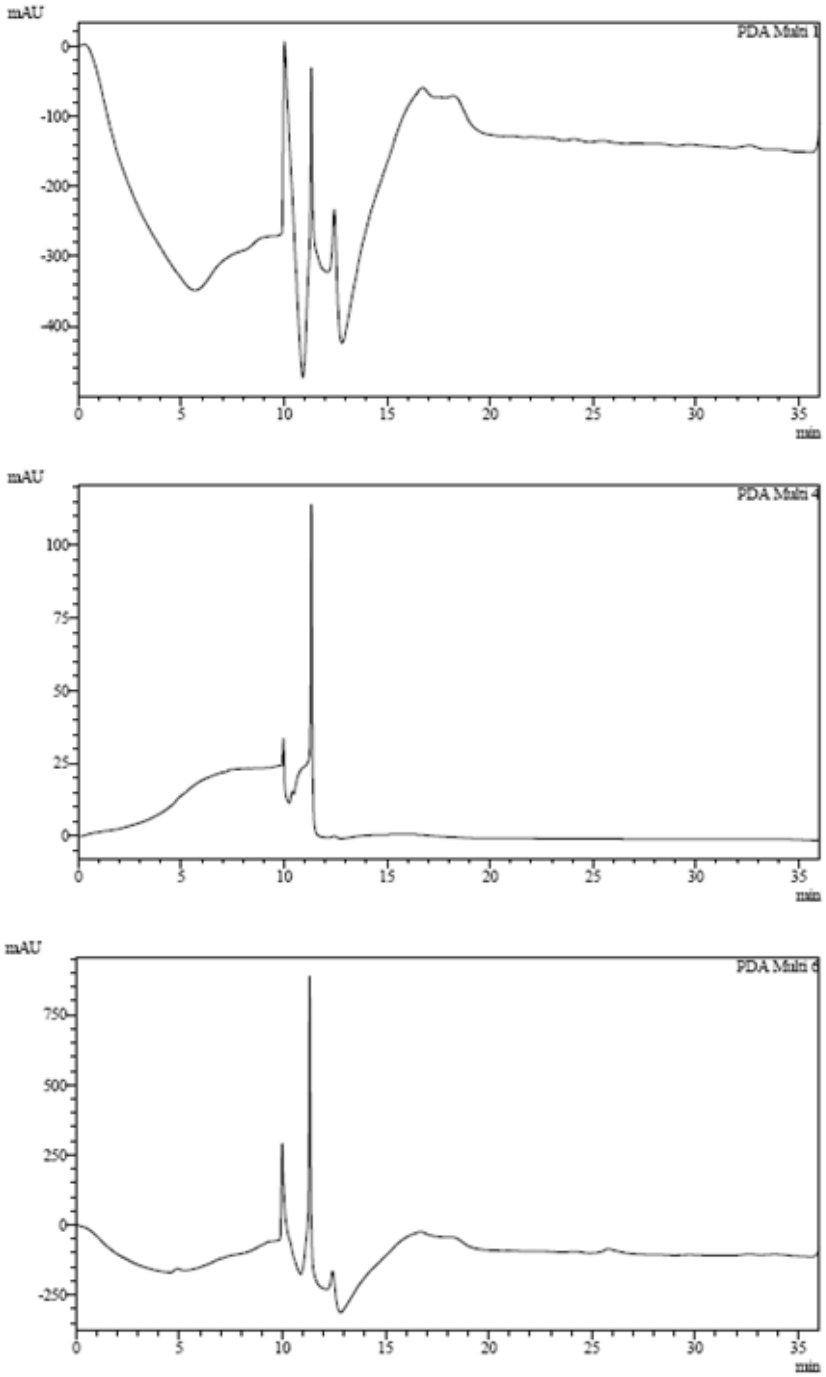


1 PDA Multi 1 / 210 nm 4nm

2 PDA Multi 4 / 277 nm 4nm

3 PDA Multi 6 / 190 nm 4nm

Ek 5.4. Asit boyarmadde kalibrasyon çözeltisi 4 (mix 4 için) 3 farklı dalga boyuna ait HPLC sonuçlarının şematik gösterimi



1 PDA Multi 1 / 210 nm 4nm

2 PDA Multi 4 / 277 nm 4nm

3 PDA Multi 6 / 190 nm 4nm

Ek 5.5. Asit boyarmadde kalibrasyon çözeltisi 5 (mix 5 için) 3 farklı dalga boyuna ait HPLC sonuçlarının şematik gösterimi