T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ESER ANALİZ VE TÜRLEME ÇALIŞMALARINDA KROMATOGRAFİK YÖNTEMLER

SABRİYE SEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI

DANIŞMAN
PROF. DR. SEZGİN BAKIRDERE

İSTANBUL, 2017

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ESER ANALİZ VE TÜRLEME ÇALIŞMALARINDA KROMATOGRAFİK YÖNTEMLER

Sabriye Sel tarafından hazırlanan tez çalışması 23.05.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Yücel ŞAHİN
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Yard. Doç. Dr. Fatih Erulaş
Siirt Üniversitesi _____

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2015-01-02 YL08 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Kimya Bölümünde yapmış olduğum yüksek lisans öğrenimim boyunca ve hazırlamış olduğum tez sürecimde maddi manevi yardımlarını esirgemeyen, zekâsıyla ve titizliğiyle kendisine hayran olduğum değerli danışmanım Prof. Dr. Sezgin Bakırdere'ye,

Tez çalışmalarımda bana destek olanDoç. Dr. Fatma Turak'a, her konuda danışabileceğim bir arkadaş, abla ve dostum olan Doç. Dr. Melisa Türkoğlu'na, laboratuvar çalışmalarımda çok büyük yardım ve desteği olan Dotse Selali Chormey'e ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma, laboratuvar çalışmalarımda katkıları olan Redokslab değerli çalışanlarından Serdar Kalemtaş'a ve bu günlere gelmemi sağlayan, her koşulda yanımda olan her türlü fedakârlığı gösteren sevgili aileme çok teşekkür ederim.

Mayıs, 2017

Sabriye SEL

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ ix

KISALTMA LİSTESİ x

ŞEKİL LİSTESİ xi

ÇİZELGE LİSTESİ xv

ÖZET xvi

ABSTRACT xviii

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 5
1.3 Hipotez 6

BÖLÜM 2

VİTAMİNLER 8

2.1 Vitaminlerin Tanımı ve Tarihçesi 8
2.2 Vitaminlerin Sınıflandırılması 9
2.2.1 Yağda Çözünen Vitaminler 9
2.2.1.1 A Vitamini 9
2.2.1.2 D Vitamini 9
2.2.1.3 E Vitamini 10
2.2.1.4 K Vitamini 10
2.2.2 Suda Çözünen Vitaminler 10
2.2.2.1 Tiamin 10
2.2.2.2 Riboflavin 11
2.2.2.3 Niasin (Nikotinik asit, Nikotinamid) 12
2.2.2.4 Pantotenik asit (Vitamin B_5) 13
2.2.2.5 Piridoksin (Piridoksal, piridoksamin) 13
2.2.2.6 Folik asit (Vitamin B_9) 14

2.2.2.7 Siyanokobalamin 15
2.2.3 Vitaminlerin İnsan Sağlığına Olan Etkileri 15

BÖLÜM 3

VİTAMİN TAYİN YÖNTEMLERİ 16

3.1 Mikrobiyolojik Yöntemler 17
3.2 Enzimatik Yöntemlerle Vitamin Tayinleri 17
3.3 Spektroskopik Yöntemlerle Miktar Tayini 18
3.4 Elektroanalitik Yöntemler 19
3.5 Kromatografik Yöntemler 20
3.5.1 Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması 20
3.5.1.1 Ayrılma Mekanızmalarına Göre Sınıflandırma 20
3.5.1.2 Faz Tiplerine Göre Sınıflandırma 20
3.5.1.3 Uygulama Biçimine Göre Sınıflandırma 21

BÖLÜM 4

YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ 22

4.1 Çalışma Prensibi 22
4.2 HPLC Türleri 23
4.3 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Ekipmanları 23
4.3.1 Mobil Faz 24
4.3.2 Pompa 24
4.3.3 Enjektör 24
4.3.3.1 Manuel Enjektör 24
4.3.3.2 Otomatik Enjektör 25
4.3.3.3 Kolon 25
4.4 HPLC' de Kullanılan Parametreler 25
4.4.1 Kolonda Alıkonma Süresi 25
4.4.2 Seçicilik Faktörü (α) 26
4.4.3 Rezolüsyon 26
4.4.4 Kolon Etkinliği (Teorik Plaka Sayısı) 27
4.4.5 Dedektör 28
4.4.6 Yazıcı Sistemi 29
4.4.7 HPLC ile Yapılan Vitamin Tayinleri 29

BÖLÜM 5

SIVI KROMATOGRAFİ- KUADROPOL UÇUŞ ZAMANLI KÜTLE SPEKTROMETRESİ 31

5.1 Elektrosprey İyonizasyon (ESI) 32
5.2 Kuadropol Kütle Analizörü 33

BÖLÜM 6

DENEYSEL ÇALIŞMALAR 35

6.1 Kullanılan Cihazlar 35
6.1.1 HPLC Donanımı 36
6.1.2 LC/Q-TOF/MS Donanımı 37
6.1.3 Kolonlar 37
6.1.4 Diğer Ekipmanlar 37

6.1.5 Kullanılan Kimyasal Malzemeler 37
6.2 Optimizasyon Çalışmaları 38
6.3 Niasin ve Piridoksinin Sistem Analitik Performansının Tespiti 41
6.4 Farklı Kolonda Yapılan Optimizasyon Çalışmaları 44
6.5 Optimum Şartlar Altında Niasin ve Piridoksinin Sistem Analitik Performansının Belirlenmesi 47
6.6 İlaç Endüstrisinde Niasin ve Piridoksin İçeren Tabletlerin HPLC Sisteminde Kantitatif Analizleri 49
6.6.1 Marka A 50
6.6.2 Marka B 51
6.6.3 Marka C 51
6.7 Niasin ve Piridoksin Vitaminlerinin Yapay Mide Ortamındaki Davranışları 52
6.8 Musluk Suyu ve Atık Su Numunelerinde Bulunan Niasin ve Piridoksinin Kantitatif Tayinleri 54
6.9 LC/Q-TOF/MS Sisteminde Sistem Analitik Performans Değerlerinin Tespiti 58
6.10 İlaç Endüstrisinde Bulunan Niasin ve Piridoksin İçeren Tabletlerin Q-TOF LC/MS ile Kantitatif Analizleri 63
6.10.1 Marka A 63
6.10.2 Marka B 63
6.10.3 Marka C 64
6.11 HPLC ile Q-TOF LC/MS Analizlerine Ait Sonuçlar 65

BÖLÜM 7

METAL VE AĞIR METALLER 66

7.1 Metal ve Ağır Metallerin Tanımı ve Tarihçesi 67
7.2 Ağır Metallerin Etkileri 68
7.3 Krom Hakkında Genel Bilgiler 69
7.3.1 Kromun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri 69
7.4 Kromun Oluşumu 70
7.4.1 Toptakta Krom 70
7.4.2 Suda Krom 71
7.5 Kullanım Alanları 71
7.6 Kromun İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri 72

BÖLÜM 8

KROM TAYİN YÖNTEMLERİ 73

8.1 Spektroskopik Yöntemler 73
8.1.1 Atomik Absorbsiyon Spektrometri 73
8.1.2 Elektrotermal Atomik Absorpsiyon Spektrometresi 74
8.2 Elektroanalitik Yöntemler 75
8.3 Kromatografik Yöntemler 75
8.3.1 İyon Değiştirme Kromatografi-Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (IC-ICP-MS) 76
8.3.2 Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektrometresi (ICP-OES) 76

BÖLÜM 9

ENDÜKTİF EŞLEŞMİŞ PLAZMA KÜTLE SPEKTROMETRESİ (ICP-MS) 78

9.1 Çalışma Prensibi 79
9.2 Endüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektroskopisi Ekipmanları 79
9.2.1 Örnek Girişi 80
9.2.2 ICP Kısmı 82
9.2.3 Ara Yüzey 83
9.2.4 Kütle Analizörü 83
9.2.5 Dedektör 84
9.3 Girişimler 84
9.3.1 Spektral girişimler 84
9.3.1.1 İzobarik girişimler 84
9.3.1.2 Moleküler Girişimler 85
Poliatomik Girişimler 85
9.3.2 Spektral olmayan girişimler 86

BÖLÜM 10

TÜRLENDİRME 90

10.1 Türlendirme ve Önemi 88
10.2 İyon Kromatografi 89
10.3 İyon Değiştirme Dolgular 89
10.4 IC-ICP-MS ile Yapılan Krom Türlendirme Çalışmaları 90

BÖLÜM 11

DENEYSEL ÇALIŞMALAR 91

11.1 Kullanılan Cihazlar 91
11.2 IC-ICP-MS Donanımı 91
11.3 Kolonlar 91
11.3.1 Diğer Ekipmanlar 92
11.4 Optimizasyon Çalışmaları 92
11.4.1 Cr(III) ve Cr(VI)'nın Sistem Analitik Performansının Tespiti 95
11.5 Musluk Suyunda ve Kaplıca suyunda Cr(III), Cr(VI) Analitlerinin Eşzamanlı Tayinleri 98
11.6 IC-ICP-MS Sisteminde Yapılan Analizlerin Doğruluğunun Tespiti İçin Yapılan CRM Analiz Sonuçları 103
11.7 Bitki Çalışması 106
11.8 Cr(III) ve Cr(VI) Analitlerinin Yapay Mide ve Yapay Bağırsak Ortamındaki Davranışları 110
11.9 Kolon Geri Kazanım (Recovery) Çalışması 111

BÖLÜM 12

SONUÇ VE ÖNERİLER 112

KAYNAKLAR 115

ÖZGEÇMİŞ 128

SİMGE LİSTESİ

°C	Derece Celsius
L	Litre
min	Dakika
mg	Miligram
mL	Mililitre
mmol	Milimol
ng	Nanogram
nm	Nanometre
µg	Mikrogram

KISALTMA LİSTESİ

ACN	Asetonitril
AAS	Atomik Absorbsiyon Spektrometresi
B3	Niasin
B5	Pantetonik asit
B6	Piridoksin, Piridoksal, Piridoksamin
B2	Riboflavin
B9	Folat
B1	Tiamin
B12	Siyanokobalamin
ESI-MS	Elektrosprey İyonlaştırmalı Kütle Sepektrometresi
GC	Gaz Kromatografisi
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
IC	İyon Kromatografi
ICP-MS	Endüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi
ICP-OES	Optik Emisyon Kütle Spektrometresi
LC-MS	Sıvı Kromatografi-Kütle Sepektrometresi
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantitation
QTOF-MS	Kuadropole Uçuş Zamanlı- Kütle Spektrometresi
PDA	Diode Array Detection
RSD	Relative Standard Deviation
TLC	İnce Tabaka Kromatografi
TMP	Tiamin Mono Fosfat
TTP	Tiamin Tri Fosfat
UV-VIS	Ultraviyole-Görünür Bölge

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 A) Nikotinik asit, B) Nikotinamid 12
Şekil 2.2 A)Piridoksin, B)Piridoksal, C)Piridoksamin 14
Şekil 3.1 Vitamin tayinlerinde kullanılan elektroanalitik yöntemler 19
Şekil 4.1 Tipik bir sıvı kromatografisi cihazında sıvı akışını gösteren diyagram 23
Şekil 4.2 Tek bileşenli bir numuneye ait kromatogram 26
Şekil 4.3 Pik kuruklanma faktörünün tayini 27
Şekil 5.1 Elektrosprey iyonlaştırma düzeneği. 33
Şekil 5.2 Kuadropole analizörü..... 34
Şekil 6.1 Shimadzu HPLC cihazı..... 36
Şekil 6.2 Agilent LC/Q-TOF/MS cihazı 36
Şekil 6.3 50 mM $KH_2PO_4.2H_2O$ (pH 2.50) kullanılarak tiamin, niasin ve piridoksin için elde edilen HPLC kromatogramı. 40
Şekil 6.4 50 mM $KH_2PO_4.2H_2O$ (pH 2.50)'de %100 tampon çözelti kullanılarak yapılan elde edilen sinyaller. 41
Şekil 6.5 50 mM, pH 2.50 $KH_2PO_4.2H_2O$ tampon sisteminde Eclipse XDB C18 kolonda niasin ve piridoksinin 0.02-100 mgL^{-1} aralığındaki kromatogramları. 42
Şekil 6.6 50 mM, pH 2.50, $KH_2PO_4.2H_2O$ tampon çözelti sistemi kullanılarak HPLC-UV sisteminde pik alanı kullanılarak elde edilen niasine ait kalibrasyon doğrusu. 42
Şekil 6.7 50 mM, pH 2.50, $KH_2PO_4.2H_2O$ tampon çözelti sistemi kullanılarak HPLC-UV sisteminde pik alanı kullanılarak elde edilen pridoksine ait kalibrasyon doğrusu 43
Şekil 6.9 Zorbax SB C18 kolonda %15metanol- %85Tampon çözelti (23 mM, pH 3.54 H_3PO_4) sisteminde sırasıyla piridoksin ve niasin için elde edilen kromatogramlar. 47
Şekil 6.10 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15) ve Zorbax SB C18 kolon kullanılarak 0.025-100 mgL^{-1} aralığında niasin, piridoksin vitaminlerine ait standartların HPLC sistemine gönderilmesiyle elde edilen kromatogramlar. 47

Şekil 6.11 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15) ve Zorbax SB C18 kolon kullanılarak optimum şartlar altında elde edilen piridoksine ait kalibrasyon doğrusu. 48
Şekil 6.12 23mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15) ve Zorbax SB C18 kolon kullanılarak optimum şartlar altında elde edilen niasine ait kalibrasyon doğrusu. 48
Şekil 6.13 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15) ve Zorbax SB C18 kolon kullanılarak 0.025 mgL^{-1} niasin ve piridoksin mix standardına ait kromatogramlar. 49
Şekil 6.14 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15), Zorbax SB C18 kolon kullanarak Marka A numunelerinin HPLC sisteminde 3 tekrarlı yapılan analizine ait kromatogramlar. 50
Şekil 6.15 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15), Zorbax SB C18 kolon kullanarak Marka B numunelerinin HPLC sisteminde 3 tekrarlı yapılan analizine ait kromatogramlar. 51
Şekil 6.16 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15), Zorbax SB C18 kolon kullanarak Marka C numunelerinin HPLC sisteminde 3 tekrarlı yapılan analizine ait kromatogramlar. 52
Şekil 6.17 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15), Zorbax SB C18 kolon kullanarak niasin ve pridoksinin yapay mide ortamında 0-210 min aralığındaki bekleme sürelerine ilişkin kromatogramlar. 53
Şekil 6.18 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15), Zorbax SB C18 kolon kullanarak atıksu örneğinden optimum şartlarda elde edilen kromatogram. 54
Şekil 6.19 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15), Zorbax SB C18 kolon kullanarak musluk su örneğine ait kromatogram. 55
Şekil 6.20 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15), Zorbax SB C18 kolon kullanarak musluk suyunda 0.50 mg L^{-1} spike numune ile 0.50 mg L^{-1} standart çözeltiye ait kromatogramlar. 56
Şekil 6.21 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15), Zorbax SB C18 kolon kullanarak Musluk suyunda 10 mg L^{-1} spike numune ile 10 mg L^{-1} standart çözeltiye ait kromatogramlar. 56
Şekil 6.22 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15), Zorbax SB C18 kolon kullanarak Atık suda 0.50 mg L^{-1} spike numune ile 0.50 mg L^{-1} standart çözeltiye ait kromatogramlar. 57
Şekil 6.23 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15), Zorbax SB C18 kolon kullanarak Atık suda 10 mg L^{-1} spike numune ile 10 mg L^{-1} standart çözeltiye ait kromatogramlar. 57
Şekil 6.24 Poroshell 3x150x2.7 EC C18 kolonda H_20-CH_3OH mobil fazı kullanılarak optimum şartlar altında elde edilen pridoksine ait kalibrasyon doğrusu. 59
Şekil 6.25 Poroshell 3x150x2.7 EC C18 kolonda H_20-CH_3OH mobil fazı kullanılarak optimum şartlar altında elde edilen niasine ait kalibrasyon doğrusu. 60
Şekil 6.26 5.0 µg L^{-1} konsantrasyonundaki niasin ve piridoksinden oluşan mix standart çözeltinin H_20-CH_3OH mobil fazı kullanılarak LC/Q-TOF/MS sistemine tekrarlı gönderilmesi sonucu elde edilen kromatogramlar. 60
Şekil 6.27 5.0-5000 µg L^{-1} konsantrasyon aralığındaki niasin ve piridoksinden oluşan mix standart çözeltinin H_20-CH_3OH mobil fazı kullanılarak LC/Q-

TOF/MS sistemine optimum şartlar altında gönderilmesi sonucu elde edilen kromatogramlar. 61
Şekil 6.28 Niasine ait kantitatif sonuçların hesaplanmasında kullanılan iyonlara ait kromatogram 61
Şekil 6.29 Pridoksine ait kantitatif sonuçların hesaplanmasında kullanılan iyonlara ait kromatogram 62
Şekil 6.30 Marka A numunelerinin LC/Q-TOF/MS sisteminde niasin, piridoksin ve iç standarda ait 3 tekrarlı analize ait kromatogramlar. 63
Şekil 6.31 Marka B numunelerinin LC/Q-TOF/MS sisteminde piridoksine ait 3 tekrarlı analize ait kromatogramlar. 64
Şekil 6.32 Marka C numunelerinin LC/Q-TOF/MS sisteminde niasin ve piridoksine ait 3 tekrarlı analize ait kromatogramlar. 65
Şekil 7.1 Krom türlerinin Eh-pH ile değişimi 70
Şekil 8.1 Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi 74
Şekil 9.1 ICP-MS cihazının temel bileşenleri 80
Şekil 9.2 A: Konsantrik Nebulizör, B: Çapraz Akış Nebulizör, C: Yüksek Katılar Nebulizörü 81
Şekil 9.3 Sisleştirici ve spray chamber. 82
Şekil 9.4 İndüktif Eşleşmiş Plazma. 83
Şekil 11.1 IC-ICP-MS sisteminde optimum şartlar altında elde edilen Cr(III)'e ait kalibrasyon doğrusu. 96
Şekil 11.2 IC-ICP-MS sisteminde optimum şartlar altında elde edilen Cr(VI)' ya ait kalibrasyon doğrusu. 96
Şekil 11.3 0.50 µg/L derişimindeki Cr(III), Cr(VI) mix standart çözeltisinin tekrarlı cihaza gönderilmesi sonucu elde edilen kromatogramlar. 97
Şekil 11.4 0.50-250 µg/L aralığında Cr(III), Cr(VI) mix standart çözeltisinin IC-ICP-MS cihazına gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar. 97
Şekil 11.5 Musluk suyunun Dionex AS-9 kolona, %2.5 HNO_3 mobil faz ortamında IC-ICP-MS cihazına gönderilmesi ile elde edilen kromatogram. 98
Şekil 11.6 Musluk suyunda Dionex AS-9 kolon kullanılarak ,%2.5 HNO_3 mobil faz ortamında 10 µg L^{-1} spike Cr(III),Cr(VI) mix çözeltisi ve 10 µgL^{-1} standart çözeltisine ait kromatagramlar. 99
Şekil 11.7 Musluk suyunda Dionex AS-9 kolon kullanılarak ,%2.5 HNO_3 mobil faz ortamında 25 µgL^{-1} spike Cr(III),Cr(VI) mix çözeltisi ve 25 µg L^{-1} standart çözeltisine ait kromatagramlar. 100
Şekil 11.8 Musluk suyunda Dionex AS-9 kolon kullanılarak ,%2.5 HNO_3 mobil faz ortamında 100 µg L^{-1} spike Cr(III),Cr(VI) mix çözeltisi ve 100 µg L^{-1} standart çözeltisine ait kromatagramlar. 100
Şekil 11.9 Kaplıca suyunda Dionex AS-9 kolon kullanılarak, %2.5 HNO_3 mobil faz ortamında IC-ICP-MS cihazına gönderilmesi ile elde edilen kromatogram. 101
Şekil 11.10 Kaplıca suyunda Dionex AS-9 kolon kullanılarak, %2.5 HNO_3 mobil faz ortamında 25 µg L^{-1} spike Cr(III), Cr(VI) mix çözeltisi ve 25 µg L^{-1} standart çözeltilerinin IC-ICP-MS cihazına gönderilmesi ile elde edilen kromatogram. 102
Şekil 11.11 Kaplıca suyunda Dionex AS-9 kolon kullanılarak, %2.5 HNO_3 mobil faz ortamında 100 µg L^{-1} spike Cr(III), Cr(VI) mix çözeltisi ve 100 µg L^{-1} standart çözeltilerinin IC-ICP-MS cihazına gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar. 102

Şekil 11.12 IC-ICP-MS sisteminde ^{52}Cr izotopu için 5.0-50 µg/L aralığındaki standart çözeltilere ait kromatogramlar. 104
Şekil 11.13 IC-ICP-MS sisteminde ^{52}Cr izotopu için üç tekrarlı yapılan CRM analizine ait kromatogramlar. 104
Şekil 11.14 IC-ICP-MS sisteminde ^{53}Cr izotopu için 5.0-50 µg L^{-1} aralığındaki standart çözeltilere ait kromatogramlar. 105
Şekil 11.15 IC-ICP-MS sisteminde ^{53}Cr izotopu için üç tekrarlı yapılan CRM analizine ait kromatogramlar. 105
Şekil 11.16 IC-ICP-MS sisteminde 2.0-250µg/L aralığındaki kalibrasyon standartlarına ait kromatogramlar. 107

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1 Enzimatik Yöntemlerle Tayin Edilen Vitaminler. 18
Çizelge 4.1 Yaygın HPLC Dedektörleri ve Özellikleri. 29
Çizelge 6.1 HPLC sisteminde niasin ve piridoksinin alıkonmasına yönelik yapılan optimizasyon çalışmaları. 36
Çizelge 6.2 Tiamin, niasin ve piridoksin için elde edilen sistem analitik performans değerleri. 41
Çizelge 6.3 HPLC sisteminde niasin ve piridoksinin alıkonmasına yönelik farklı kolon için yapılan optimizasyon çalışmaları 42
Çizelge 6.4 Zorbax SB kolonda niasin ve piridoksin için elde edilen sistem analitik performans değerleri 46
Çizelge 6.5 Niasin ve piridoksinin yapay mide ortamında bekleme sürelerine ilişkin pik alanları 51
Çizelge 6.6 Niasin ve piridoksinin HPLC ve LCMS/QTOF sistemlerinde yapılan kantitatif analizlere ait sonuçlar 59
Çizelge 6.7 Niasin ve piridoksinin HPLC ve LCMS/QTOF sistemlerinde yapılan kantitatif analizlere ait sonuçlar 62

ÖZET

ESER ANALİZ VE TÜRLEME ÇALIŞMALARINDA KROMATOGRAFİK YÖNTEMLER

Sabriye SEL

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE

Bu tez kapsamında, suda çözünen vitaminler arasında yer alan niasin ve piridoksinin eş zamanlı tayini için Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Sıvı Kromatografi-Kuadrupol Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (LC/Q-TOF/MS) esaslı duyarlı analitik yöntemler geliştirilmiştir. HPLC çalışmalarında sistem parametreleri optimize edildikten sonra, analitlerin kromatografik ayrımları pH 3.54'e ayarlanmış 23 mM fosfat tamponu ve metanol (85:15, v/v) den oluşan mobil fazın 1.2 mL/min akış hızında sisteme gönderilmesi gerçekleştirilmiş, tayinler 220-260 nm dalga boyunlarında yapılmıştır. Optimum şartlar altında niasin ve piridoksin için sistem analitik performansı tespit edilmiş ve niasin için LOD değeri 3.7 µg/L, LOQ değeri 12.3 µg/L, piridoksin için ise LOD değeri 5.7 µg/L, LOQ değeri 18.9 µg/L bulunmuştur. HPLC sisteminde iki analit için de kalibrasyon grafiği geniş bir aralıkta doğrusal olarak tespit edilmiştir (R^2=0.9999-1.000).

Piyasada satılan, içerisinde niasin ve piridoksin analitlerini içeren Marka A (tablet) Marka B (tablet), Marka C (şurup) örneklerinin kantitatif olarak analizleri optimum şartlar altında yapılmıştır. Niasin ve piridoksinin yapay mide ortamındaki davranışlarının tespiti amacıyla mix standart mide ortamına ilave edilmiştir. Analitlerin mide ortamındaki davranışları 210 dakika boyunca yarım saatte bir analiz edilmiştir.

LC/Q-TOF/MS cihazı her iki analitin eşazmanlı tayinleri için optimize edilmiş ve sistemin analitik performansı tespit edilmiştir. Optimum şartlar altında Marka A, Marka B, Marka C' nin kantitatif analizleri LC/Q-TOF/MS cihazıyla yapılmıştır. Sonuçlar HPLC analizleriyle kıyaslanmıştır. Geliştirilen metodun atıksu ve musluk

suyu örneklerinde uygulabilirliğini tespit etmek için spike çalışması yapılmıştır. Geri kazanım değerleri musluk suyunda piridoksin ve niasin için sırası ile %90 – %105 elde edilirken atık suda bu değerler %94 - %97 aralığında bulunmuştur.

Tezin ikinci bölümünde ise Cr(III) ve Cr(VI) türlerinin İyon Kromatografi-Endüktif Eşleşmiş Kütle Spektrometresi (IC-ICP-MS) sisteminde yüksek doğruluk ve duyarlılıkta eş zamanlı tayinleri için analitik bir yöntem geliştirilmiştir. Sistemin tüm değişken parametreleri optimize edilmiş ve analitlerin ayrılması için %2.5' luk HNO_3 mobil faz olarak kullanılmıştır. Optimum koşullar altında Cr(III) için LOD değeri 0.09 µg/L, LOQ değeri 0.32 µg/L bulunurken, Cr(VI) için LOD değeri 0.03 µg/L, LOQ değeri 0.11 µg/L olarak elde edilmiştir. Geliştirilen metod musluk suyu ve atık su örneklerine uygulanmış ve yüksek geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Cr(III) ve Cr(VI) için yapılan biyoerişilebilirlik çalışmasında iki farklı bitki (marul ve çilek) yetiştirilmiştir. Bitkilerin yetiştirilmesi için besinler Cr(III) ve Cr(VI) ortamında hazırlanmıştır. 15 günlük takip sürecinden sonra çözelti içerisindeki Cr(III) miktarının zamanla azaldığı ve Cr(VI) analitinin ise zamanla indirgendiği gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Niasin, piridoksin, HPLC, LC/Q-TOF/MS, IC-ICP-MS, Cr(III), Cr(VI)

ABSTRACT

CHROMATOGRAPHIC METHODS IN TRACE ANALYSIS AND SPECIATION STUDIES

Sabriye SEL

Department of Chemistry

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE

In this thesis, a sensitive analytical method was developed for the simultaneous determination of niacin and pyridoxine for water-soluble vitamins. After the system was optimized, chromatographic separations of two analytes were achieved on a C18 column with a mobile phase including 23 mM phosphate buffer at pH 3.54 and methanol (85:15) at the flow rate of 1.2 mL / min and UV detection at 220-260 nm. Under optimal conditions, the system was analytically determined for niacin and pyridoxine, and the limit of detection (LOD) value was found 0.0037 mg / L, the limit of quantification (LOQ) value 0.0123 mg / L for niacin, the LOD value 0.0057 mg / L and the LOQ value 0.0189 mg / L for pyridoxine. The calibration graph for the two analytes in the HPLC system was linearly determined over a wide range (R^2 = 0.9999-1).

Brand A (tablet) Brand B (tablet), Brand C (syrup) containing analytes of niacin and pyridoxine sold in the market were quantitatively analyzed. In order to determine the behavior of the niacin and pyridoxine in the simulated gastric fluid, the mix was added to the simulated gastric fluid. The behavior of the analytes in the simulated gastric fluid was analyzed in half an hour for 210 minutes.

Quantitative analysis of the Brand A, Brand B, Brand C was done by LCMS / QTOF device. The results were compared with HPLC analyzes.

In another study, a spike study was done to determine the applicability of the developed method in waste water and tap water samples. Recovery values were 90% -105% for pyridoxine and niacin in tap water and 94% -97% for waste water.

In the second part of the thesis, a highly sensitive analytical method was developed for simultaneous determination of Cr (III), which is useful for the body and Cr (VI), which is a toxic effect, when found at trace levels. All the parameters of the system were optimized and 2.5% HNO_3 mobile phase was used to separate the analytes. The LOD value of Cr (III) was 0.09 µg / L and the LOQ value was 0.32 µg / L for Cr(III) and the LOD value was 0.03 µg / L and the LOQ value was 0.11 µg / L for Cr(VI). The developed method has been applied to tap water and wastewater samples and high recovery values are obtained. Two different plants (lettuce and strawberry) were cultivated in the bioavailability study for Cr (III) and Cr (VI). Nutrients were prepared in the presence of Cr (III) and Cr (VI). After 15 days of monitoring, the Cr (III) content in the solution was reduced and the Cr (VI) analyte was reduced.

Keywords: Niacin, pyridoxine, HPLC, waste water, LCMS/QTOF

BÖLÜM 1

GİRİŞ

NİASİN VE PRİDOKSİN VİTAMİNLERİNİN HPLC VE LC/Q-TOF/MS SİSTEMLERİNDE ESER SEVİYELERDE EŞ ZAMANLI TAYİNİ

1.1 Literatür Özeti

Vitaminler canlı hücrelerdeki biyokimyasal reaksiyonların hızlı ve düzenli yürütülmesi için gerekli olan ve insan organizması tarafından sentezlenemediğinden dışarıdan besinlerle alınması gereken organik bileşiklerdir [1]. Vitaminler insan vücudunda katalizör görevini üstlenirler ve insan yaşamının sağlıklı bir şekilde devam edebilmesi için önemli bir yere sahiptirler. Vitaminlerden herhangi biri yeteri kadar alınmadığında vücutta ciddi hastalıklar ortaya çıkabilir [2], [3]. Vitaminler kimyasal yapı ve özelliklerine göre yağda ve suda çözünen vitaminler olmak üzere iki gurupta toplanmıştır. Yağda çözünen vitaminler izopren türevleri olup A, D, E, K vitaminlerinden oluşurken, suda çözenen vitaminler arasında B kompleks vitaminleri (B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, B12) ve C vitamini yer almaktadır. Bu 13 gurup vitaminlerden her biri 'vitamer'olarak adlandırılan farklı yapı, biyopotensiyel ve farklı kararlılığa sahip biyolojik aktif formdan oluşur [4]. Yağda çözünen vitaminlerin fazlası vücutta yağ dokusunda depolandığından dolayı her gün alınmasına gerek yoktur. Suda çözünen vitaminlerde B12 hariç dokularda depolanmazlar ve fazlası idrarla atılır.

Vitaminlerin kalitatif ve kantitatif tayinleri için pek çok analitik yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan başlıcaları; enzimatik, mikrobiyolojik, kapiler elektroforez miseller

elektrokinetik kromatografi, ince tabaka kromatografi, miseller sıvı kromatografi, sıvı kromatografi ve gaz kromatografi gibi yöntemlerdir [5], [6], [7].

Suda çözünen vitaminlerin tayini, vitaminlerin yapılarının ve fonksiyonlarının birbirinden çok farklı oluşları, ısı, ışık oksidasyon gibi dış etmenlerden aşırı derecede etkilenmeleri, vitaminlerin kararsızlığı, içinde bulundukları matrikslerin karmaşıklığı ve matriks içerisinde çoğunlukla eser seviyelerde bulunmasından dolayı oldukça zordur [1], [8]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda örneklerin kalitatif ve kantitatif analizinde hassas, doğru ve hızlı yöntemlerin geliştirilmesi önemli bir konu haline gelmiştir [1], [9]. Ancak yapılan çalışmalar neticesinde yüksek hassasiyetli analitik cihazlar matriksi yoğun örneklerin analizlerinde başarısız olabilmektedir. Bu nedenle vitaminlerin tayininde önderiştirme ve ayırma/saflaştırma işlemlerine ihtiyaç duyulabilmektedir. Ekstraksiyon işlemleri genellikle sıvı-sıvı, katı–sıvı ve katı faz ekstraksiyonu şeklinde uygulanmaktadır. Bu yöntemlerde fazla miktarda örnek ve çözücü gerektiğinden dolayı, suda çözünen vitaminlerin tayininde ekstraksiyon basamaklarını basitleştiren ve daha iyi zenginleştirme faktörü sağlayan mikroekstraksiyon yöntemleri tercih edilmektedir [10], [11], [12]. Ekstraksiyon/önderiştirme yöntemleri ile matriks etkilerinden uzak, düşük tayin limitlerinde tayinler yapılabilse de analizler için harcanan sürenin ve analiz maliyetlerinin fazla oluşundan ötürü kromaografik yöntemler ile matriks etkileri bertaraf edilip yüksek doğruluk ve duyarlılıkta tayinler yapılmak istenmektedir.

Vitaminlerin tayinlerinde diğer yöntemler kullanılsa da en yaygın kullanılan yöntem HPLC'dir. HPLC metod optimizasyonu, parametrelerin ve kimyasal değişkenlerin (mobil faz pH'sı, tampon konsantrasyonu, akış hızı, kolon sıcaklığı, dedektör dalga boyu) çeşitliliği nedeniyle kompleks bir işlemdir. Optimizasyon, ayırma seçiciliği ve diğer performans kriterlerini gerçekleştirmek için önemli bir basamaktır [13].

Giorgi, Howland, Martin ve Bonner biyolojik örneklerde (plazma ve ürin) suda çözünen vitaminlerin tayinlerinin yapılması için yeni bir metod geliştirip validasyon çalışmalarını yapmıştır. Yüzde geri kazanım değerlerini %100'e yakın bulmuştur. Klinik çalışmaların çok geniş bir alanında düşük tayin limitlerine inebileceğini kanıtlamıştır [14].

Samanidau ve arkadaşları, tiamin, riboflamin, nikotonik asit, nikotin amid, pridoksin ve siyanokobalaminin düşük seviyelerde tespiti için katı faz eksiyonu esaslı metod geliştirmişlerdir. Vitaminlerin ayrımını Phenomenex Luna C_{18} (150x4.6mm) kolonu

kullanarak yapmışlardır. Mobil faz olarak 0.050 M CH_3COONH_4/CH_3OH ve H_2O/CH_3OH kullanmış, PDA dedektöründe 280 nm'de çalışmışlardır. Katı faz ekstraksiyonu başarıyla uygulanmış ve elde edilen yüzde geri kazanım değerleri %92.4-%98.8 aralığında elde edilmiştir [15].

Gomez ve arkadaşları, takviye gıdalardaki tiamin, riboflavin, niasin, pantotenik asit, pridoksin, folik asit, siyanokobalamin ve askorbik asitin izolasyonu ve eş zamanlı tayini için hızlı, basit, güvenilir bir yöntem geliştirip validasyon çalışmalarını yapmıştır. Kromatografik ayrım ters faz C18 kolon ile gerçekleştirilmiş olup vitaminler floresans ve UV-görünür bölgede farklı dalga boylarında ayrılmıştır. Valide edilen metod takviye süt, bebek gıdaları ve CRM numunlerine başarıyla uygulanmış ve geri kazanım değerleri %100'e yakın bulunmuştur [3].

Tezin ikinci kısmında çevre örneklerinde bulunan Cr(III) ve Cr(VI) türlerinin eşzamanlı tayinlerine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Metal tür tayini, örneklerdeki metallerin kimyasal yapılarının (türlerinin) belirlenmesi ve tayin edilmesi olarak tanımlanır [16], [17], [18]. Türlendirme düşüncesi Goldberg'in deniz suyundaki eser elementleri araştırmasıyla ortaya çıkmış olup bu alandaki çalışmalar 1954'ten daha önceki yıllara dayanmaktadır [19],[20].

Son yıllarda türlendirme çalışmaları toplam metal konsantrasyonu ölçümlerinden daha önemli hale gelmiştir. Hemen hemen tüm element türlerinin farklı biyoerişilebilirlik, toksisite ve taşınabilirliğe sahip olması gibi nedenlerden dolayı türlendirme çalışmaları literatürde ön plana çıkmıştır. Cr(III) ile Cr(VI), inorganik ve organik arsenik gibi çalışmalar türlendirmeye örnek verilebilir. Modern endüstrinin gelişmesiyle birlikte krom birçok alanda kullanılır hale gelmiştir. Demir çelik, metal kaplama, tekstil endüstrisi, bobin kaplama, pil ve akü üretim endüstrisi kullanım alanlarına tipik örnekler olarak verilebilir. Geniş kullanım alanına bağlı olarak doğal çevrede yüksek oranda kirlilik yaratmakta ve bu kirlilik besin zincirini etkilemektedir. Krom sulu ortamlarda Cr^{3+} ve Cr^{6+} olmak üzere farklı oksidasyon basamağında bulunur. Doğal ortamlarda ortamın pH' sına bağlı olarak Cr^{3+} iyonu için bulunma olasılığı en yüksek olan türler $[Cr(H_2O)_5(OH)]^{2+}$, $[Cr(H_2O)_4(OH)_2]^{+}$ ve Cr^{6+} iyonu için $HCrO_4^-$, CrO_4^{2-} dir [21]. Kimyasal türlerin özelliklerine göre metallerin bitkiler ve hayvanlar tarafından alınması ve depolanması farklı olmaktadır [18], [22]. Bazı eser elementlerin büyük yükseltgenme basamakları, küçük yükseltgenme basamaklarına göre daha zehirlidir. Örneğin; Cr^{6+},

Cr^{3+} iyonundan daha toksik etkiye sahiptir. Canlı organizmaları için gerekli olan Cr^{3+} insanlarda karbonhidrat metabolizmasını düzenler. Buna karşın Cr^{6+} toksik ve kansorojendir. Bu farklılık metal türlerinin kalitatif ve kantitatif tayinlerinin analitik kimyadaki önemini artırmıştır ve türlendirme çalışmalarının insan yaşamının kalitesini etkileyen birçok alanda (gıda ürünlerinin kalite-kontrolü, diyet takviyeleri, kozmetik, ilaç) uygulanmasına neden olmuştur [23]. 1990 yılından beri Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi Cr^{6+} bileşiklerini karsirojen olarak bilinen grup 1 bileşikleri içerisinde sınıflandırmıştır [24].

Kromum farklı matrikslerde türlendirilmesine yönelik yapılmış birçok çalışma literatürde rapor edilmiştir. Chen ve arkadaşları atık sulardaki krom türlerinin tespit edilmesi için eşleşmiş plazma kütle spektrometresi ile iyon kromatografi sistemini birleştirip validasyon çalışmalarını yapmışlardır. Cr(III) ile çeşitli ligandları kompleştirip, kompleksin kararlılığını ESI-MS (elektrosprey iyonizasyon-kütle spektrometresi) ile incelemişlerdir. ESI-MS sonuçlarına göre $[Cr(EDTA)]^-$ komplesinin en kararlı olduğunu görmüşlerdir. $[Cr(EDTA)]^-$ ile Cr (VI)'yı birbirinden ayırmak için ve Cl^- iyonundan kaynaklı girişimleri ortadan kaldırmak için anyon değiştirici kolon kullanmışlardır. İyon kromatografide mobil faz olarak pH 7.0'de 20 mM NH_4NO_3 ve 10 mM $NH_4H_2PO_4$ tamponunu kullanmışlardır. Çalışmada tayin limitlerini her iki krom türü için de 0.2 μg/L' nin altında bulmuşlardır [25].

Markiewicz ve arkadaşları sulardaki toplam krom miktarının doğru bir şekilde ölçülmesi ve Cr(VI) türünün tespit edilmesi için iki analitik metoda ICP-DRC-IDMS (endüktif eşleşmiş plazma - dinamik reaksiyon hücresi-izotop seyreltme kütle spektrometresi) ve HPLC/ICP-DRC-IDMS (yüksek performanslı sıvı kromatografisi/ endüktif eşleşmiş plazma- dinamik reaksiyon hücresi - izotop seyreltme kütle spektrometresi) ait optimizasyon çalışması yapmışlardır. İzobarik interferanslar DRC (dinamik tepkime hücresi) modu kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Örneklerdeki toplam krom miktarı 1 μg/L'nin altında bulunmuştur. Çeşitli su örneklerindeki krom tayininde izotop seyreltme yöntemi ile izlenebilirliği yüksek ve daha güvenilir sonuçlar elde edilmiştir [26].

Byrdy ve arkadaşları, krom türlerinin tespit edilmesi için HPLC-ICP-AES (sıvı kromatografisi-endüktif eşleşmiş plazma-atomik emisyon spektroskopisi) ve HPLC-ICP-MS (sıvı kromatografisi-endüktif eşleşmiş plazma kütle spektroskopisi) cihazlarını

kullanarak yeni bir analitik metod geliştirmişlerdir. Bu amaç için Cr(III) iyonu asidik ortamda kararlı olduğundan EDTA yardımı ile kompleksleştirerek iki türü birbirinden ayırmışlardır. İki türün birbirinden ayrılması için mobil faz olarak $(NH_4)_2SO_4$ ve NH_4OH kullanmışlardır. SO^+ den kaynaklanan poliatomik girişimlerden dolayı bağıl bulunma yüzdesi fazla olan m/z 52 yerine m/z 53 iyonu ile çalışmışlardır. Her iki tür için de geniş bir doğrusal aralık da çalışmış olup HPLC-ICP-MS'de gözlenebilme sınırını Cr (III) ve Cr(VI) için sırasıyla 40 pg ve 100 pg bulurken, HPLC-ICP-AES' de 100 pg ve 200 pg olarak bulmuşlardır [27].

1.2 Tezin Amacı

Vitaminlerin tayininde, kullanılan matrikslerin karmaşık olması, analit tayini üzerine matriks girişim olasılığının yüksek olmasından dolayı ayırma işlemlerine gerek duyulmaktadır. Bu çalışmada da B gurubu vitaminleri arasına yer alan iki analitin HPLC ve LC/Q-TOF/MS sistemlerinde yüksek doğruluk ve duyarlılıkta tayin edilebilmesi için analitik yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaca yönelik olarak geliştirilen yöntem ile piyasa da satılan, içerisinde çeşitli B gurubu vitaminlerini içeren tabletlerin analizlerinin yapılarak prospektüslerinde belirtilen miktarlarla kıyaslanmak istenmiştir. İnsan vücudunda mide ve bağırsak da eminiliminin olduğunu bildiğimiz niasin ve piridoksin için yapay mide ve bağırsak ortamı oluşturulup bu ortamlardaki davranışlarının incelenmesi amaçlanmıştır. HPLC ile tespit edilen tablet ve şuruplarda yer alan niasin ve pridoksin miktarları LC/Q-TOF/MS sisteminde optimum şartlarda tayin edilerek yöntemlerden aynı örnekler için elde edilen değerler karşılaştırlarak yöntemlerin doğrulukları tespit edilmek istenmiştir.

Son yıllarda sanayileşmenin artmasına bağlı olarak çevre kirliliğine neden olan ve insan sağlığını yakından ilgilendiren çalışmalar ilgi odağı haline gelmiştir. Bu tez kapsamında çevreye salınan toplam kromun tayininden ziyade krom türlerinin kalitatif ve kantitatif tayinlerinin yapılması için analitik bir yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaca yönelik olarak geliştirilen analitik yöntem ile musluk suyu, kaplıca suyu ve atık su örneklerindeki Cr(III) ve Cr(VI) türlerinin miktarları tespit edilmek istenmiştir. Bilindiği üzere eser miktarda Cr(III)' ün insan vücudu için yararı varken, Cr(VI) karsinojen ve toksik etkiye sahiptir. Buna ek olarak topraksız tarımla bitki yetiştirilip Cr(III) ve Cr(VI) türlerinin biyoerişilebilirlik çalışmasının yapılması hedeflenmiştir. Bu

çalışmanın devamında topraksız tarımla yetiştirilen bitkilerin yapay ağız, yapay mide ve yapay bağırsak ortamındaki davranışlarının incelenmesi de bu çalışmanın bir diğer amacını oluşturmuştur.

1.3 Hipotez

Vitaminler insan yaşamının devamı için önemli bir yere sahiptirler. Yağda veya suda çözünen vitaminlerden herhangi birinin eksikliği ciddi sağlık sorunlarına neden olabilmektedir. İnsan vücudu için bu kadar önemli olan bu organik bileşiklerin eser seviyelerde, yüksek doğruluk ve duyarlılıkta tayinleri de bu kapsamda çok önemlidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda örneklerin kalitatif ve kantitatif analizinde hassas, doğru ve hızlı yöntemlerin geliştirilmesi önemli bir konu haline gelmiştir. Vitaminlerin tayininde düşük tayin limitleri elde etmeye yönelik birçok ekstraksiyon/önderiştirme yöntemi kullanılıyor olsa da harcanan zaman ve analiz ücretlerinin fazla oluşu nedeni ile matriks etkilerinden kurtulmak amacı ile kromatografik yöntemlere eğilim artmıştır. HPLC ve LC/Q-TOF/MS sistemlerinde analitlerin düşük tayin limitlerinde eşzamanlı tayinleri rutin analiz laboratuvarları için kullanım kolaylığı sağlayacak, hem zamandan hem de analiz ücretlerinde tasarruf edilebilecektir. Niasin ve piridoksinin vücuttaki biyoerişebilirliğinin tespitinde mide ortamındaki davranışı son derece önemlidir. Bu kapsamda yapılacak çalışmalar literatürde var olan eksikliği tamamlamada önemli katkılar sağlayacaktır.

Çalışmanın 2. kısmında ise artan sanayileşmeye bağlı olarak insan sağlığına olumsuz etkileri olduğu bilinen krom türlerinin yüksek doğruluk ve duyarlılıkta tayin edilmesi hedeflenmektedir. Krom türlerinin farklı toksisiteye sahip olduğu düşünüldüğünde toplam krom tayinininden ziyade türleme çalışmaları ile analit(ler)in bulunduğu matriks ile ilgili yararlı bilgiler elde edilebileceği literatür bilgileri ışığında ortaya konulmuştur. Bu kapsamada son yıllarda farklı bioerişilebilirlik, farklı toksisite, farklı mobilite özelliklerine sahip Cr(III) ve Cr(VI) türlerinin birçok biyolojik ve çevre örneklerinde belirlenmesi önemli bir konu haline gelmiştir. Bu amaç doğrultusunda birden fazla teknik kullanılsa da ICP-MS ile yapılan çalışmaların duyarlılığının, doğruluğunun yüksek olması ve geniş bir doğrusal aralıkta çalışma imkanı sağlamasından dolayı tercih edilirliği yüksektir. Bu amaç doğrultusunda IC-ICP-MS sistemi kullanılarak geliştirilen metod sayesinde içme sularında ve atık sularda Cr(III) ve Cr(VI) türlerinin tespit edilmesi ile literatüre önemli katkılar sağlanması hedeflenmiştir.

BÖLÜM 2

VİTAMİNLER

2.1 Vitaminlerin Tanımı ve Tarihçesi

Vitaminler insan yaşamının sağlıklı bir şekilde devam ettirilmesi için önemli olan, eksikliğinde ciddi rahatsızlıklara yol açan organik maddelerdir [2]. Vitamin kelimesi ilk olarak 1911'de Funk adlı bir araştırmacı tarafından kullanılmasına rağmen bu tarihten çok daha öncede protein, karbonhidrat, mineral, lipid gibi yapıların dışında bazı kimyasal moleküllerin de insan vücudu için gerekli olduğu biliniyordu [28]. Sir James Lanchester 1601 yılında yiyeceklere turunçgil meyvelerini eklemiş ve diş eti kanaması, diş düşmesi gibi durumlarda koruyucu etki gösterdiği sonucuna ulaşmıştır. 1800'lü yıllarda yapılan çalışmalarda diyetlerine et, arpa, meyve eklenen gemicilerin beriberi hastalığının tedavi edildiğini gözlemlenmiştir. Hopkins 1912 yılında karbonhidrat, protein, yağ ve tuzlardan oluşan sentetik bir diyet hazırlamış ve sıçanların bu diyetle normal olarak büyüyemediğini gözlemlemiştir. Hazırlanan sentetik diyete süt eklendiğinde büyümenin normale döndüğü ve sütün tekrar çıkarıldığında büyümenin durduğu görülmüştür. Hopkins buradan yola çıkarak sütün içerisinde hayvanların büyümesi ve yaşaması için gerekli faktörlerin olduğu sunucuna varmış ve bu faktörlere 'vitaminler' demiştir [29].

Vitaminler insan ve hayvanların normal yaşam faaliyetlerinin yanı sıra bitki faaliyetlerinin ve mikroorganizmaların madde değişimi için de gerekli, biyolojik etkinliği yüksek organik katalizörlerdir [30]. Canlılarda madde değişimini gerçekleştiren katalizörlere 'enzim' denir. Enzimler yapı bakımından ikiye ayrılır; sadece proteinden oluşanlar ve protein + vitamin, protein + metal iyonundan oluşanlar.

Enzimlerin protein kısmına ‘apoenzim’, vitamin kısmına ‘koenzim’ denir. Organizmalarda vitamin veya metal iyonları eksik olursa protein kısımları reaksiyonların gerçekleştirilmesinde yeterli olamamaktadır. Bundan dolayı vitaminlerin insanların ve hayvanların beslenmesinde mutlak gerekli olduğu bilinen bir gerçektir [30].

2.2 Vitaminlerin Sınıflandırılması

Vitaminler, suda çözünen vitaminler ve yağda çözünen vitaminler olmak üzere iki sınıfa ayrılarak incelenirler.

2.2.1 Yağda Çözünen Vitaminler

İnsan vücudu için hayati önem taşıyan organik moleküllerdir [31]. Gıdaların katı ve sıvı yağlı kısımlarında yer alırlar. Suda çözünmediklerinden dolayı sadece safrada sindirime uğrarlar. Az tüketildiklerinde gece körlüğü, çocuklarda raşitizm, yetişkinlerde ise osteomalazi rahatsızlıklarına neden olur. Fazla tüketildiklerinde ise tehlikeli sonuçların ortaya çıkmasına sebebiyet verebilirler [31], [32] [33].

2.2.1.1 A Vitamini

A vitamini korneanın ve epitel hücrelerin korunması için gerekli vitaminler arasındadır. Hormonların sentezinde ve hormon mekanizmasının düzenlenmesinde rol oynar ve vücudu kansere karşı koruyucu etki gösterir. A vitamini (retinol) eksikliği vücutta farklı semptomların oluşmasına neden olur; ciltte ve gözlerde kuruluk, büyüme ve gelişmede yavaşlama görülebilir [34], [35].

2.2.1.2 D Vitamini

D vitamininin kemik metabolizmasındaki rolü uzun yıllardır bilinse de bu vitaminin fizyolojik iskelet hareketlerinde ömenli bir yere sahip olduğu son 15 yılda edinilen bilgiler oldukça gelişmiştir [36]. D vitamini, bebekler ve çocuklardaki kemik oluşumu ve mineralizasyonun düzenlenmesi için geleneksel olarak önemli bir faktör olarak gösterilmektedir [37].

2.2.1.3 E Vitamini

E vitamini ile aynı etkiyi gösteren 7 çeşit bileşeni vardır. Bu bileşenler arasından en önemlisi olarak bilinen ve üzerinde durulan, biyolojik/doğal antioksidan olarak adlandırılan a-tokoferol insan için çok gerekli bir vitamindir. Antioksidan özelliği nedeniyle hücrelerin korunmasına yardımcı olurken vitamin özelliği sayesinde vücudun fizyolojik gereksinimlerini karşılar [38].

2.2.1.4 K Vitamini

K_1, K_2 ve K_3 olmak üzere 3 çeşit olan ve naftokinonlar olarak bilinen K vitamininden K_1 (filokinon) vitamini yeşil bitki yapraklarında bulunurken, K_2 (menakinon) vitamini ise bağırsak bakterileri tarafından, K_3 ise sentetik olarak üretilen halidir [35]. K vitaminin vücuttaki en önemli fonksiyonlarından biri kanın pıhtılaşmasını sağlamaktır. Karaciğerde protrombin sentezlenmesinde etkilidir. Kemik gelişim için de önemli bir vitamindir. Sfingolipidlerin sentezini düzenler [39].

2.2.2 Suda Çözünen Vitaminler

Suda çözünen vitaminler vitamin B_1 (tiamin), vitamin B_2 (riboflavin), nikotinik asit (niasin), vitamin B_5 (pantotenik asit), vitamin B_6 (piridoksin), biotin (vitamin H), folik asit (vitamin B9), vitamin B_{12}, vitamin C (askorbik asit) olmak üzere 9 adet vitaminden oluşur. B kompleks vitaminlerinin hemen hepsinin birbirinden çok farklı kimyasal yapıları vardır; fakat hepsi polar yapıda moleküllerdir, bu nedenle suda çözünürler. Suda çözünen vitaminler (B_{12} hariç) bitkiler tarafından sentezlenirler. B_{12} ve vitamin C hariç vücutta depo şekilleri yoktur ve sürekli olarak diyetlerle alınmaları gerekir ve gerekli miktarlarda alınmadığında vücutta pellegra, beriberi, hipokromik anemi gibi rahatsızlıklara neden olabildiği gibi ölümlere kadar giden sonuçlar doğurabilir [40].

2.2.2.1 Tiamin

1890 yılında Hollandalı doktor Eijkman, beyazlatılmış pirinçle beslenen tavukların bacaklarında felçlerin oluştuğunu, başlarında ise zaman zaman kasılmalar olduğunu gözlemlemiştir. Tesadüfi olarak kabuklu pirinçle beslemek zorunda kalınan tavuklarda ise bu hastalıkların zamanla azaldığını görmüştür. Uzak Doğuda sıklıkla rastlanan

beriberi hastalığının sebebini ise kabuğu soyulmuş pirinçlerin çok tüketilmesine bağlamış, pirincin kabuğunda beriberi hastalığını tedavi eden maddenin olduğu sonucuna varmıştır. 1936 yılında suni olarak elde edilmiş, elde edilen bu maddeye Amerikan Kimya Derneği tarafından tiamin adı verilmiştir [41].

Bu vitaminin yapısında kükürt ve amin grubu bulunur. B_1 vitamini, suda kolay ama alkolde zor çözünen ve yalnızca tiamin pirofosfat haline önüştürüldüğünde biyolojik olarak aktif olan vitaminlerden birisidir [42].

Renksiz kristal yapıda olan tiamin hidroklorid su, metanol, gliserol gibi çözücülerde çözünürken, aseton, eter, kloroform, benzen gibi çözücülerde çözünmez. Tiamin pH 2-4 arasında en kararlı durumda bulunurken, pH değeri nötr ve alkali olduğu durmlarda kararlılığını kaybeder. pH 8 ve üzerinde ise tiamin çözeltisi hızla sarıya döner ve karmaşık bozunma ürünleri oluşmaya başlar [43]. Tiamin UV spektrumda absorpsiyon bandı gösterir. Tiamin ortamda oksitleyici bir madde bulunması durumunda sarı renkli olan ve kuvvetli mavi bir floresans veren tiyokroma oksitlenir. Buradan hareketle tiaminin miktar tayini yapılabilir [28].

Tiamin canlının metabolik faaliyetlerini devam ettirebilmesi için bulunması gereken bir vitamindir. Bütün vücut dokularında karbonhidratların ara metabolizmasında görev alır. Tiaminin aktif formu olan tiamin piro fosfat karbonhidrat metabolizmasına katılan bir dizi enzim için koenzim görevi görür [44]. Tiamin için alınması gereken günlük miktar bebeklerde 0.2 – 0.3 mg, çocuklarda 0.5 - 0.6 mg, yetişkinlerde 0.9 – 1.2 mg, erkeklerde 1.2 mg, kadınlarda 1.1 mg olarak rapor edilmiştir. Eğer yeteri kadar alınmazsa beriberi, anoreksiya, kilo kaybı, güçsüzlük, hafıza kaybı gibi rahatsızlıklar ortaya çıkabilir [43].

2.2.2.2 Riboflavin

1933'de bir Alman araştırma gurubu Kuhn ve arkadaşları sütten B_2 vitamini elde ettiklerini ve bunun riboflavin olduğunu öne sürmüşlerdir. Ancak suda çözünen ve ısıya dayanıklı bütün vitamin aktivitesinin riboflavin tarafından karşılanamadığı ve B gurubu vitaminler arasında piridoksin, nikotinamid, pantotenik asit gibi başka maddelerinde bulunduğu daha sonra anlaşılmıştır. Riboflavinin keşfinden sonra ise Kuhn tarafından sentezlenmiştir.

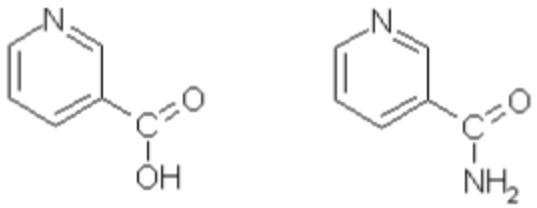
Bu vitamin nükleotitlerle birleşerek organizmada oksidasyon-redüksiyon zincirlerinin enzim sistemlerine koenzim olarak katılır. B2 vitamini karaciğer hücrelerinin insüline

karşı hassaslığını arttırarak insülin oluşumun hızlandırır. Asit çözeltilerde kaynatılmaya karşı oldukça dayanıklıdır. Alkali ortamda kaynatılma ile bozunabilir. Işığa maruz kalmakla bozunabilir [28].

2.2.2.3 Niasin (Nikotinik asit, Nikotinamid)

Niasin eksikliğinde ortaya çıkan bir rahatsızlık olan pellegra 1200'lü yıllarda bilinmesine rağmen Don Gasper Casal tarafından 1735 yılında tanımlanmıştır. İtalyan Frapolli ise kaba cilt anlamına gelen pellegra ismini vermiştir. 19. yüzyılda kıtlıktan dolayı Avrupa, Afrika ve ABD'de etkisini gösteren bu hastalık özellikle çocuklarda yaygın hale gelmiştir. Goldberg isimli bir hekimin yapmış olduğu çalışmalar neticesinde, hastaların yemeklerine et ve sebze eklenince hastalığın önlendiği ve düzeldiği görülmüş ve vitamin eksikliğinden kaynaklı bir rahatsızlık olabileceği ihtimali üzerinde durulmuştur. 1937 yılında ise Elvejhem pellegranın nikotinamid ile iyileştiği ve önlendiğini kanıtlamıştır. Günümüzde ise pellegra hastalığına Afrika, Mısır, Sudan, Tanzanya ve Pakistan'da rastlanabilmektedir [45].

Niasin (nikotinik asit) piridin-3-karboksilik asittir; amidi olan niasinamid (nikotinamid) ile birlikte vitamin etkisi gösterirler.



A) B)

Şekil 2.1 A) Nikotinik asit, B) Nikotinamid [45]

Niasin ve Nikotinamid organizmada birbirlerine dönüşebilirler. Niasin ve Niasinamid ısıya, alkalilere ve asitlere karşı dayanıklıdır. Niasin ve niasin amid renksiz kristal yapılı bir maddelerdir [2]. Her iki formunda organik çözücülerdeki çözünürlüğü çok azdır. Niasinin suda ve etanoldeki çözünürlüğü düşük iken niasinamid formunun sudaki ve etanoldeki çözürlüğü daha yüksektir. Her iki formda 262 nm' de maksimum absorpsiyona sahiptirler. Suda çözünen vitaminler arasında en dayanıklı vitamin olduğu söylenir [2].

Niasin glikoliz, yağ asidi biyosentezi, sitrat çevrimi ve solunum zinciri enzimlerinin pek çoğunun aktif formu için zorunlu olan NAD^+ ve $NADP^+$'' nin yapıtaşıdır [46]. Toksik maddelerin vücuttan atılmasında etkin bir rol oynar. Fakat aşırı miktarda tüketildiğinde ölümcül sonuçlar doğurabilir. Kan dolaşımını düzenler. Merkezi sinir sisteminin sağlıklı bir şekilde çalışmasını sağlar. Beyin ve hafiza fonksiyonlarını denetlemesinden dolayı şizofreni ve diğer zihinsel hastalıklarda tedavi etkisi büyüktür. Yeterli niasin düzeyleri insülin ile östrojen, progesteron ve testosteron gibi cinsiyet hormonlarının sentezi için hayati rol oynamaktadır [47].

Niasin için alınması gereken günlük miktar bebeklerde 2 – 4 mg, çocuklarda 6 - 8 mg, yetişkinlerde 12 -16 mg, erkelerde 16 mg, kadınlarda 14 mg' dır. Eksikliğinde pellegra adı ile bilinen semptomları dermatit (deri hastalıkları), demans (sinir sistemi) ve diare (gastrointestinal sistem) olarak karakterize edilen rahatsızlıklara neden olur [44]. Başlıca besin kaynağı mısır olan toplumlarda çoğunlukla görüldüğünden mısır hastalığı olarak da bilinir. Niasin aşırı miktarda alındığında retina kalınlaşmasına neden olur ve bunun sonucu olarak bulanık görme ve körlük oluşur [47].

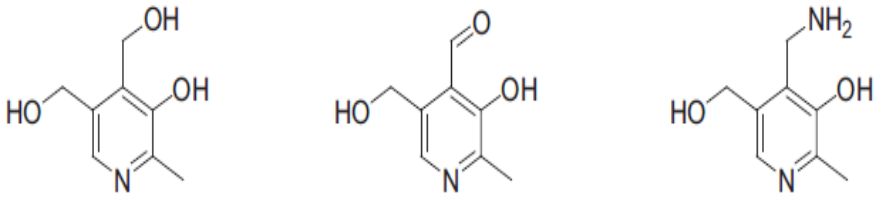
2.2.2.4 Pantotenik asit (Vitamin B_5)

Pantotenik asitin, yeşil bitkiler ve birçok mikroorganizma tarafından sentezlenmesi mümkündür. Isıya ve alkalilere karşı dayanıksızdır. Suda ve alkolde erime özelliği bulunur, sarı ve viskoz bir yağdır. Kalsiyum ve diğer tuzları renksiz kristal yapıda maddelerdir ve ticari olarak en çok bilinen kalsiyum pantotenattır [48].

Pantotenik asit insan ve hayvan organizmasında koenzim A'nın yapısında bulunmasından önemli bir yere sahiptir. Çeşitli börek üstü bezi hormonları, steroidler ve kortizonun oluşmasında önemli bir yere sahiptir [28].

2.2.2.5 Piridoksin (Piridoksal, piridoksamin)

Vitamin B_6, 6 adet farklı formu bulunur ve tüm formları 2-metil -3-hidroksipiridin'den türemiştir. Vitamin B_6; doğal olarak oluşan piridoksin, piridoksamin, piridoksal ve 3 esteri bulunan bir yapıdır. Bu formların arasında en kararlı olanı piridoksindir [49].



A) B) C)

Şekil 2.2 A)Piridoksin, B)Piridoksal, C)Piridoksamin [50]

Piridoksin ısıya dayanıklı olduğu halde piridoksamin ve piridoksal yüksek sıcaklıkta hızla bozunur. Bu maddeler ışıkta özellikle UV ışıkta bozunurlar. Piridoksalın kimyasal reaktivitesinin en belirgin özelliği ise Schiff bazı oluşturmak için aldehit gurupların amino grupları ile tepki vermesidir [48].

Piridoksal ve diğer türevleri bağırsaklardan kolayca emilir ve ATP tarafından piridoksal kinazın katalizlediği reaksiyonda fosforillenir. Piridoksin, piridoksal, piridoksamin insan ve hayvan organizmasında birbirlerine dönüşebilir özelliktedir. Canlı dokularda fosfat esterleri halinde bulunurlar; etkili ve kararlı formu piridoksal ve özellikle piridoksal fosfattır. Piridoksal fosfatın bilinen en önemli görevi, aminoasitlerin sentezinde rolü olan enzimlerin kofaktörlerini oluşturmak, aminoasitlerin hücreye girmesini ve hücrede toplanmasını sağlamaktır. Pridoksin ve türevleri bağışıklık sistemini güçlendirerek kolesterol birikimini önler, kalbi korur ve böbrek taşının oluşmasını engeller [28].

2.2.2.6 Folik asit (Vitamin B_9)

Folik asit doğada en çok yeşil yapraklarda ve karaciğerde bulunur. Sudaki kristalleri portakal sarısı renginde olan bu vitamin, ısıtılmakla erimez, fakat 250 °C de esmerleşerek bozunur. Serbest asit halinde çözünürlüğü düşükken sodyum tuzu halinde ise sudaki çözünürlüğü yüksektir. Bazik ve nötr çözeltilerinde ısıya karşı dayanıklı değildir [28].

Folik asit DNA ve RNA sentezi için gerekli olan bir vitamindir. Kemik iliği üzerine etkisi ile eritrosit yapımında ve aminoasit metabolizmasında yer alır. Folik asit pürin ve metiyonin biyosentezinde gerekli bir kofaktör olan suda çözünen bir vitamindir [51]. Eksikliğinde pürin biyosentezi ve dolayısıyla nükleik asit biosentezi bozulur ki bu da

kan tablosunu etkilemektedir. Folik asit eksikliği koroner arter hastalığı, inme, felç ve kanser olmak üzere yaşla ilişkili olarak pek çok rahatsızlığı hızlandırmaktadır [52].

2.2.2.7 Siyanokobalamin

Vitamin B_{12}, yapısında porfirin halka sistemine benzeyen korrin halka sistemi ve bir nükleotit bulunan kırmızı renkte ve kristalli bir bileşiktir. B_{12} sadece özel şartlarda izole edilebilir. Hayvanlar ve bitkiler siyanokobalamini sentezleyemezler. Siyanokobalamin'nin metabolizma reaksiyonlarında etkili olan şekli koenzim B_{12}'dir. Koenzim B_{12} metiyonin biyosentezinde, metilmalonil CoA'nın süksinil CoA'ya dönüşümünde, ribonükleotitlerin deoksiribonükleotitlere indirgemesinde rol oynar [53].

2.2.3 Vitaminlerin İnsan Sağlığına Olan Etkileri

Vitaminler sağlıklı bir vücut gelişimi, sindirim sistemi fonksiyonları, bağışıklık sisteminin enfeksiyonlara karşı güçlü ve hazır olması bakımından günlük olarak yeteri miktarda vücuda alınması gerekir. İnsan vücudunda karbonhidrat, yağ ve proteinin kullanılmasını da sağlarlar [54]. Oksidatif enerji üretimi için gereklidirler. Metabolizmada aminoasit ve nükleik asitlerin taşınmasında koenzim olarak görev yaparlar [54].

BÖLÜM 3

VİTAMİN TAYİN YÖNTEMLERİ

Vitaminler canlıların gelişmesi ve hayati fonksiyonlarının sürdürebilmesi için gerekli olan, eksikliğinde ciddi hastalıklara neden olan, enerji vermeyen fakat enerji veren besinlerin mekanizmasını düzenleyen organik maddelerdir [55]. Vitaminler gıdalarda eser seviyelerde bulunmaları, içerisinde bulundukarı matrikslerin karmaşık olması ve ısı, ışık ve çok hızlı okside olmaları gibi nedenlerden dolayı tayin edilmeleri zor ve zaman alır [56]. Son yıllarda vitaminlerin eş zamanlı tayinlerine olan ilgi artmaktadır. Bu nedenle özellikle suda çözünen vitaminlerin tayininde çeşitli analitik metodlar gelişmektedir [57], [14]. Literatürde suda çözünen vitaminlerin tayininde mikrobiyolojik yöntemler [58], elektrokimyasal yöntemler [59], spektrofotometrik yöntemler [60], kapiler elektroforez (CE) [61], ince tabaka kromatografisi [62], yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) [63], gaz kromatografisi (GC) [64], sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi [40] gibi yöntemler kullanılmaktadır. Uygulanan bu yöntemlerin birbirine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. UV spektrometrik yöntemler düşük seviyelerde vitamin tayinleri için yeterince hassas ve seçici değildir. Floresans ölçümleri daha hassas ve seçici olmasına rağmen farklı vitamer oluşumlarını ayıramamaktadır. Mikrobiyolojik yöntemlerin ise belli bir otomasyonu olmamasından ve rutin analizlerdeki maliyet yüksekliğinden dolayı tercih edilmemektedir. Daha yaygın kullanılan HPLC yönteminde ise kullanılan dedektörlerin seçiciliğinin yüksek olmasından dolayı karmaşık numune hazırlama basamaklarını gerektirmez, türevlendirmeye olan ihtiyacı azaltır [65].

3.1 Mikrobiyolojik Yöntemler

Vitaminlerin tayinlerinde mikrobiyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemle yapılan analizler daha çok gıda, ilaç, yem ve diğer sektörleri de kapsamaktadır. Bazı bakterilerin ve mayaların yaşamsal faaliyet göstermesi ortamda bulunan vitamin türüne bağlıdır. Mikroorganizmaların bulunduğu besiyer ortamına, (ihtiyaç duydukları vitamin hariç) gelişmeleri için gerekli olan diğer bileşenler eklendiğinde ya gelişmelerini tamamen durdurur ya da yavaşlatırlar. Besiyer ortamına ihtiyaç duydukları vitamin eklendiğinde mikroorganizmalar çoğalır ve gelişir. Bu olay eklenen vitaminin konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Besiyer ortamında oluşan bulanıklığın türbidimetrik yada titrimetrik olarak ölçülmesi sonucu kantitatif analizler yapılır. Mikrobiyolojik yöntemlerle vitaminlerin tayini daha çok niasin, siyanokobalamin ve pantotenik asite uygulanır. Bu yöntemler hassas ve her bir vitamin için özeldir [66].

3.2 Enzimatik Yöntemlerle Vitamin Tayinleri

Enzimatik yöntemlerle vitaminlerin tayinleri mümkün olup genellikle koenzim formları tayin edilir. Enzimatik yöntemlerle tayin edilen vitaminler Çizelge 3.1'de verilmiştir [67].

Çizelge 3.1 Enzimatik yöntemlerle tayin edilen vitaminler [67].

Tayin edilen vitamin	**Kullanılan enzim**	**Ölçüm yöntemi**
Tiamin (B1 vitamini)	Eritrosit Transketolaz	Spektrofotometrik
Riboflavin (B2 vitamini)	FAD bağlı glutatyon Redüktaz	Spektrofotometrik
Piridoksin (B6 vitamini)	Tirozin apodekarboksilaz Apotriptofanaz	Spektrofotometrik, Monomerik, Radyomerik, Amfometrik, PCO2 elektrodu

Talwar ve arkadaşları, eritrositler ve tam kanda bulunan tiamin pirofosfatın doğrudan ölçümü ile ilişkilendirilen tiamini HPLC ile tayin edip, elde edilen sonuçları eritrosit transketolaz aktivite testiyle tiamin eksikliği olduğu düşünülen 63 hasta üzerinde kıyaslamışlardır. Kan örneklerinde geri kazanım değerlerini %90'nın üzerinde tespit edip, eritrositlerdeki tiamin pirofosfatın tam kan ile güçlü bir korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır [68].

3.3 Spektroskopik Yöntemlerle Miktar Tayini

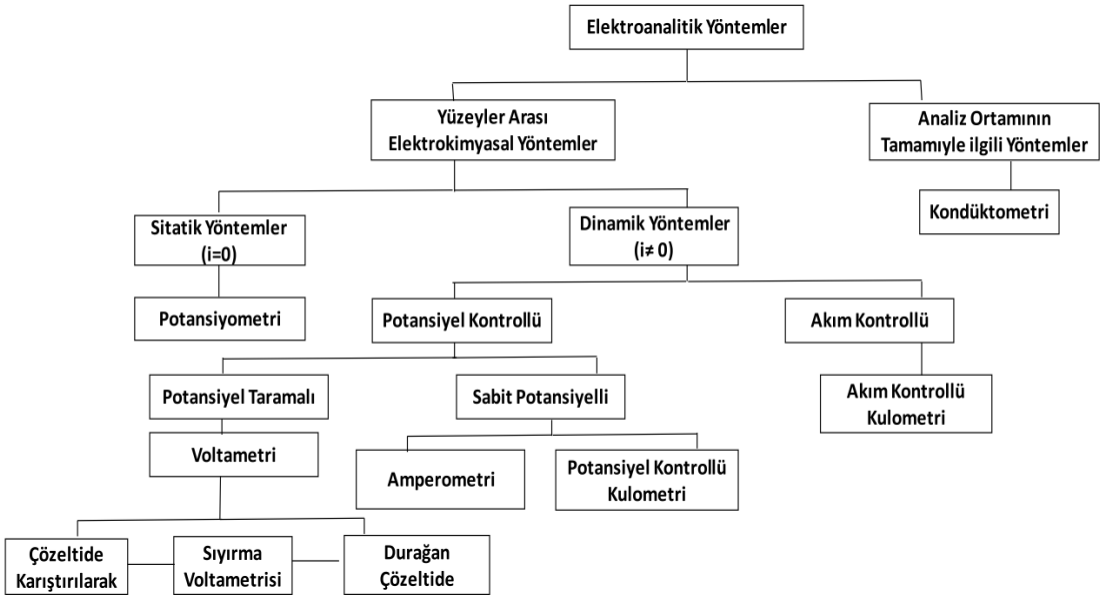
Spektroskopi, bir örnekteki atom, molekül veya iyonların bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımanın ölçülmesi prensibine dayanır. Literatürde kullanılan birçok spektroskopik yöntem mevcuttur. Bunlar; Ultraviyole ve Görünür Bölge Spektroskopisi, Kütle Spektroskopisi, Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi, Floresans ve Fosforesans Spektroskopisi, Atomik Emisyon ve Atomik Floresans Spektroskopisi, İnfrared (IR) Spektroskopisi, Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi, Floresans ve Fosforesans Spektroskopisi olarak özetlenebilir [69].

Vitaminlerin tayininde kullanılan spektrofluorimetrik yöntemler, spektrofotometrik yöntemler kadar yaygın kullanılmasa da yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahiptir [65].

Liu ve arkadaşları farmasötik formülasyonlardaki tiaminin trifenilmetan asit boyalar kullanarak spektrofotometrik olarak tayin edilmesi için yüksek hassasiyete sahip spektrofotometrik bir yöntem geliştirmiştir. Bu amaç için bromtimol mavisi, bromfenol mavisi, bromtimol yeşili gibi boyaların varlığında triton X-100, polivinil alkol gibi reaktifler ile kompleks oluşturmuşlardır. Maksimum absorbansın gerçekleştiği dalga boyu 420-450 nm aralığında iken maksimum sönümlemenin gerçekleştiği dalga boyu 550-620 nm aralığında tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda geri kazanım değerlerini %99- %104 aralığında bulunurken bağıl standart sapma değeri %5' in altında elde etmiştir [60].

3.4 Elektroanalitik Yöntemler

Elektroanalitik yöntemler, maddenin elektrik enerjisiyle etkileşmesi sonucunda ortaya çıkan fiziksel ve kimyasal enerjinin elektrik enerjisine çevrilmesiyle elektrot yüzeyinde meydana gelen yük aktarım miktarı, kütle aktarım hızı, kimyasal tepkimelerin hızı ve denge sabitlerinin bulunmasına olanak sağlayan yöntemlerdir. Elektroanalitik metodları voltametrik, polarografik, voltametrik, amperometrik yöntemler olarak guruplandırmak mümkündür [65].



Şekil 3.1 Vitamin tayinlerinde kullanılan elektroanalitik yöntemler [70].

Elektrokimyasal tekniklerin ile yüksek hassasiyet, doğruluk, geniş doğrusal aralık ve düşük maliyete gibi avantajların olması tercih edilirliğini arttırmaktadır [71].

Qijin ve arkadaşları, riboflavinin L-sistein ile modifiye edilmiş altın elektrot üzerindeki voltametrik davranışlarını incelemek ve riboflavini sıyırma voltametrisi ile tayin etmek için bir metod geliştirmişlerdir. Destekleyici elektrolitin pH değeri, riboflavin konsantrasyonu, birikim potansiyeli ve birikim zamanını optimize edilmiştir [72].

David ve arkadaşları, tiamin ve piridoksinin kalem grafit elektrot kullanarak voltametrik olarak tayin etmek için ucuz ve hızlı bir analitik yöntem geliştirmişlerdir. Bu iki vitaminin çalışma elektrodu olarak kullanılan kalem grafit elektrot üzerindeki voltametrik davranışları, farklı ortamlardaki dönüşümlü voltametri kullanılarak incelenmiştir. Vitaminlerin kantitatif tayini diferansiyel puls voltametrisi kullanılarak yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda tiaminin sadece NaOH ortamında eletroaktif olup iki

adet oksidasyon piki verdiği, piridoksin için ise HCl hariç olmak üzere kullanılan tüm destekleyici elektrolit çözeltilerinde pik verdiği görülmüştür. Elde edien LOD değerleri ise tiamin ve piridoksin için sırasıyla $5.34x10^{-6}$ M, $2.81x10^{-6}$ M olarak bulunmuştur [59].

3.5 Kromatografik Yöntemler

Kimyasal bir karışımdaki farklı yapılara sahip maddelerin birbirleriyle karışmayan iki faz arasındaki dağılım dengelerine göre ayrılmasını sağlayan işlem kromatografi olarak adlandırılmıştır. Bu yöntemde sabit ve hareketli faz olmak üzere iki faz bulunur. Ayrılacak olan maddeler sabit faz üzerinden hareketli faza tutunma oranlarına göre farklı hızlarda çıkarlar [73]. Ayrılacak olan madde sabit faz tarafından fazla tutulursa kolondan geç çıkar buna karşın kolon tarafından az tutulan maddeler ise kolonu çabuk terk eder. Böylelikle bir numunede bulunan bileşenler farklı alıkonma zamanına sahip olduğundan nitel ve nicel olarak tayin edilebilirler [74].

3.5.1 Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Kromatografik yöntemler faz tiplerine, uygulama biçimine ya da ayrılmanın dayandığı ilkelere göre sınıflandırılabilir [75].

3.5.1.1 Ayrılma Mekanızmalarına Göre Sınıflandırma

İyon değiştirme kromatografisi, iyon çifti kromatografisi, adsorbsiyon kromatografisi, partisyon, moleküler eleme, afinite kromatografisidir [76].

3.5.1.2 Faz Tiplerine Göre Sınıflandırma

Sıvı ve gaz kromatografisi olarak ikiye ayrılır. Sıvı kromatografisi katı-sıvı ve sıvı-sıvı olmak üzere ikiye ayrılır. Gaz kromatografisi, gaz-katı ve gaz-sıvı kromatografisi şeklinde ayrılır. Gaz-katı kromatografisinde durgun faz katı, gaz-sıvı kromatografisinde ise durgun faz sıvıdır [75], [76].

3.5.1.3 Uygulama Biçimine Göre Sınıflandırma

Kromatografik yöntemler uygulama biçimine göre düzlemsel kromatografi, gaz kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, kolon kromatografisi ve elektrokromatografi olarak guruplandırılır [73], [76].

Mandal ve arkadaşları, insan idrarındaki riboflavin ve siyanokobolaminin basit ve hızlı bir şekilde tanımlanması ve miktarlandırılması için izokratik elüsyonda bir ters faz sıvı kromatografi metodu geliştirip piklerin tanımlanması için MALDI - TOF MS (matriks destekli lazer desorpsiyon/ iyonlaşma-uçuş zamanlı kütle spektometresi) kullanmışlardır. Kromatografik ayırmayı 365 nm' de, mobil faz olarak metanol – 1.0 mM TFA (1:4) kullanarak gerçekleştirmiştir. Riboflavin ve siyanokobolamin için geri kazanım değerlerini sırasıyla %87 ve %90 olarak bulunmuştur. MALDI-TOF MS analizlerinin hızlı, hassas ve özellikle biomolekülerde protonlanmış analit moleküllerinin ESI-MS' dan (elektrosprey iyonlaşma) daha az parçalanmış olduğu desteklenmiştir [77].

BÖLÜM 4

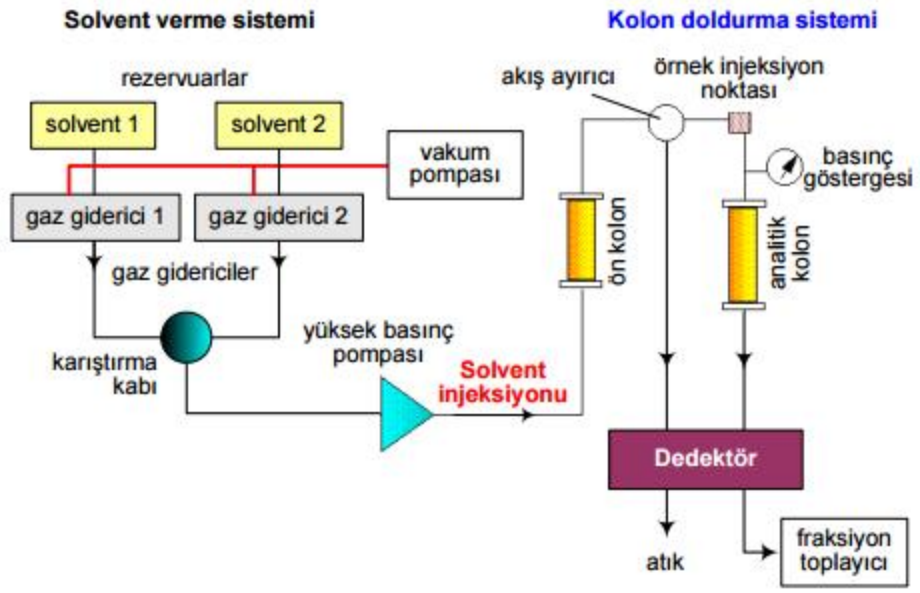
YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, kolon kromatografisinden türeyen ve günümüzde birçok bilim insanı tarafından farklı araştırmalarda kullanılan bir cihazdır [78], [79]. Yüksek ayrım gücüne sahip olması, basınca dayanıklı küçük çaplı ve paslanmaz kolon kullanımı, hızlı analiz, akış hızı ve yüksek mobil faz basıncının kontrol edilebilirliği gibi üstünlüklerinin olması HPLC'nin tercih edilir olmasını sağlamıştır [78]. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi diğer vitamin tayin yöntemleriyle kıyaslandığında hızlı, hassas ve yüksek doğruluk sağlar. Bunun yanında solvent tüketiminin az olması, diğer tekniklerle birleştirilme olanağı sağlaması ve az miktarda örnek kullanılması gibi avantajları vardır [80],[81].

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile ilaç, aminoasit, karbonhidrat, nükleik asit, protein, hidrokarbon, vitamin gibi pek çok alanda analiz yapmak mümkündür.

4.1 Çalışma Prensibi

Hareketli faz içerisinde çözünen numunenin yüksek basınç altında, sabit fazın katı dolgu maddesine sahip olduğu kolondan analitlerin sabit faza ya da hareketli faza olan ilgilerine göre belli bir hızla geçirilmesi prensibine dayanır [79], [82], [83]. Ayrılacak maddelerin polariteleri farklı olacağından kolondan farklı hızlarla, dolayısıyla farklı alıkonma sürelerinde kolondan çıkacaklardır. Alıkonma süresi; analitin kolon boyunca hareketi sonucu dedektöre ulaşıncaya kadar geçen süredir [38], [84]. Kolondan her ayrılan madde bir pik oluşturur ve kromatogram elde edilir. HPLC sistemi Şekil 4.1' de gösterilmiştir [85].



Şekil 4.1 Tipik bir sıvı kromatografisi cihazında sıvı akışını gösteren diyagram

4.2 HPLC Türleri

Sıvı kromatografisi, adsorbsiyon kromatografisi, dağılma kromatografisi, iyon değişimi kromatografisi, jel geçirgenlik veya moleküler eleme kromatografisi olarak 4 grupta toplanmıştır. Adsorbsiyon kromatografisi; normal faz ve ters faz sıvı kromatografisi olmak üzere iki çeşittir. Ters faz sıvı kromatografisi hareketli fazın polar, sabit fazın apolar olduğu durumdur; gerçekleştirilen ayırmalarda genellikle apolar yapıdaki C-8 ve C-18 kolonlar kullanılır. Ters faz sıvı kromatografide mobil fazın gücü, mobil fazın polaritesiyle ters orantılıdır. Mobil fazda çözünmüş olan madde ile sabit faz arasındaki hidrofobik etkileşimlerden kaynaklanır. Polaritesi düşük olan bileşen daha önce çıkar. Normal faz kromatografide ise sabit faz polar, hareketli faz apolardır. Polaritesi yüksek olan bileşen mobil fazda daha az çözüneceğinden kolondan daha geç çıkar [74], [84], [86].

4.3 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Ekipmanları

HPLC sisteminin ekipmanları degasser, pompa, autosampler, dedektör ve görüntüleme sisteminden oluşur. Degasser mobil fazdaki gazların giderilmesini sağlar. Ayırma işlemi kolonda gerçekleşir.

4.3.1 Mobil Faz

Analiti kolon boyunca taşıyan mobil fazdır. Mobil faz sisteme gönderilmeden önce filtrelerden geçirilerek taneciklerden uzaklaştırılır. Mobil fazın bileşimi ve pH değeri analitlerin ayrımını doğrudan etkiler. Kullanılan tekniğe, numune tipi ve kolona göre mobil faz seçilmesi gerekmektedir. Yüksek performanslı sıvı kromatografi sisteminde mobil faz sisteme iki şekilde gönderilir; gradient elüsyon ve izokritik elüsyon. Sabit bileşimdeki tek bir çözücü kullanılarak yapılan bir ayırma *izokratik elüsyon* olarak adlandırılır. Polarlıkları birbirinden farklı olan iki ve ya daha fazla çözücü sisteminin kullanıldığı tekniğe *gradient elüsyon* adı verilir [75].

4.3.2 Pompa

Pompa mobil fazın yüksek basınçla HPLC sistemi içerisinde hareket etmesini sağlar. Pompa akış hızını ve basıncı ayarlayarak, mobil fazı degazörden çekip örnekleme ve kolon ünitesine gönderir. Tekrarlanabilirlik ve doğruluk elde etmek amacıyla kararlı bir pompanın basıncına (genellikle 1000-2000 psi) ihtiyaç vardır. Düşük pH'da yüksek klorür konsantrasyonlu elektrolitlerin mobil faz olarak kullanılması, pompaların analiz sonrası iyi yıkanmaması gibi durumlarda pompalarda problemlerin çıkması olası bir durumdur. Gözlenen basınç kolon boyuna, partikül büyüklüğüne ve çözgene bağlıdır. Kolon ne kadar dar olursa akış hızı da o nisbette düşecektir [67].

4.3.3 Enjektör

İdeal bir enjektörden beklenen, örneği kolona solvent akışına zarar vermeden gönderebilmesidir. Sıvı kromatografisinde numuneyi enjekte etmek için iki farklı enjektörden yararlanılır; manuel enjektör ve otomatik enjektör.

4.3.3.1 Manuel Enjektör

Numunenin yüksek basınçlı ortama iletilmesi için kullanılır. Enjektör yükleme pozisyonuna getirilir, sonrasında loop içerisine doldurulur. Daha sonra enjektör basınçlı ortama yöneltilerek numune sisteme iletilir [87].

4.3.3.2 Otomatik Enjektör

Otomasyon sistemi sayesinde ayarlanan koordinatlara giden enjektör, numune şişesinden numuneyi çeker, loop içerisinde hareketli faza enjekte ederek sisteme iletilmesini sağlar [88]. Otomatik enjektörlü sistemlerde numune hacmi ancak loop hacmi kadardır. En önemli avantajı birden fazla enjeksiyon yapılması imkanı sağlamasıdır [87].

4.3.3.3 Kolon

HPLC sistemlerinde düzgün bir ayrımda kolonun seçimi çok önemlidir. Kolonlar farklı uzunluk, boyut ve dolgu malzemeleriyle çeşitlilik gösterirler. Bir kromatografik sistemin performansı, kolonda gerçekleştirilen ayırma ile yani, kolon dolgu maddesinin seçilmesi ve kullanılmasıyla tayin edilir. HPLC çalışmalarında kolonlar genellikle fonksiyonel grup eklenmiş silika veya polimer bazlı dolguludur. HPLC kolonlarında en fazla kullanılan dolgu maddesi mikroporöz silikadır. Alumina ve Celite (diyatome toprağı) de çok kullanılan maddelerdir. Dolgu maddelerin tanecik büyüklüklerinin 1.5-10 mikrometre aralığında olması istenir [89].

HPLC sisteminde kolon uzunluğunun artması bileşenlerin kolon da daha uzun süre tutulmasını sağlayacağından verimliliği artırır. Fakat rezolüsyonu arttırmak için kolon boyunu arttırmak iyi bir seçim değildir. Kolon boyunun artması analiz süresinin uzamasına neden olurken sistem geri basıncını atırır [90]. Polaritesi sabit faza yakın olan analit(ler) kolonda daha fazla tutulurken, hareketli faza yakın olanlar kolondan erken çıkar [91].

4.4 HPLC' de Kullanılan Parametreler

4.4.1 Kolonda Alıkonma Süresi

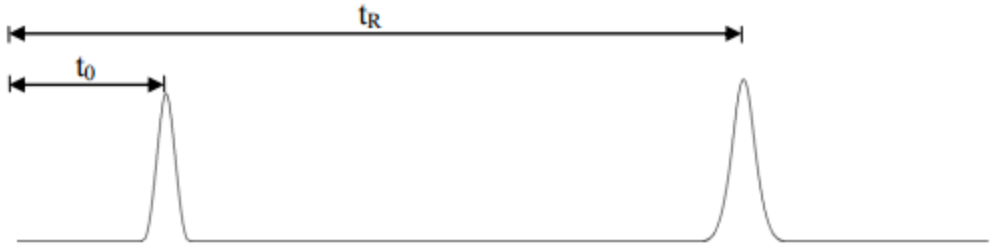
Alıkonma, sabit fazın hidrokarbon zincirleri ve analitin hidrokarbon zincirleri arasındaki hidrofobik etkileşime dayanır [74], [92]. Alıkonma süresi t_r ile ifade edilir.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Bu eşitlikte k; kapasite faktörü

t_0; ölü zaman denilen alıkonulmayan türün dedektöre ulaşması için geçen zaman,

t_R; analitin detektöre ulaşma süresi



Şekil 4.2 Tek bileşenli bir numuneye ait kromatogram [93].

Alıkonma süresini etkileyen, aralarında hareketi fazın türü, akış hızı, kolon uzunluğu, sabit faz türünün olduğu birçok faktör vardır. k değerinin 1-10 arasında olması istenen bir durumdur.

4.4.2 Seçicilik Faktörü (α)

Seçicilik faktörü birbirini takip eden iki pik arasındaki ayrımın ifadesidir. Seçicilik faktörü aşağıdaki formülle hesaplanır [93].

$$\alpha = \frac{k'_A}{k'_B}$$

$$\alpha = \frac{t_A - t_0}{t_B - t_0}$$

A kuvvetle tutunan B ise daha hızlı elüe olan analittir.

α =1 olduğunda iki pik birbirinden ayrılamaz ve birleşerek kolonu terk eder.

α ' yı etkileyen faktörler; hareketli faz, sabit faz ve sıcaklıktır.

4.4.3 Rezolüsyon

R bir numunedeki bileşenlerin birbirinden ayrımını ifade eden kantitatif bir terimdir. A ve B bileşeni için aşağıdaki gibi ifade edilir.

$$R = \frac{2(t_B - t_A)}{w_A + w_B}$$

Burada t_B; B bileşeninin alıkonma süresi, t_A; A bileşenin alıkonma süresi, W_B B bileşiğin pik genişliği, W_A ise A bileşiğinin pik genişliğidir.

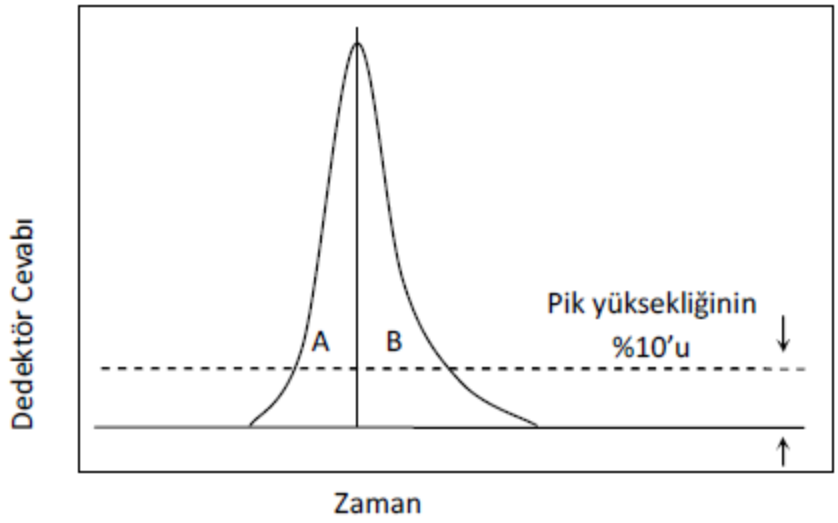
R değeri 1'den büyükse bileşenlerin birbirinden tamamen ayrıldığı anlamına gelir. R değeri 1'den küçükse bileşenlerin kromatogramda çakıştığını gösterir [93].

4.4.4 Kolon Etkinliği (Teorik Plaka Sayısı)

Teorik tabaka sayısı kromatografik kolon etkinliğini kantitatif olarak ifade etmek için kullanılan bir terimdir. Bir kromatografik kolonun etkinliği teorik plaka sayısıyla artar. N değeri alıkonma zamanı ile pikin genişliğinden hesaplanır [74], [92].

$$N = 16\left(\frac{t_R}{w}\right)^2$$

Kuyruklanma Faktörü (T) ve Asimetri Faktörü (A) terimleri pik asimetrisini ifade etmede kullanılır.



Şekil 4.3 Pik kuruklanma faktörünün tayini [92].

Pik kuyruklanma faktörü (T)= $\frac{A+B}{2A}$

T değeri, $0.5 \leq T \leq 2$ aralığında olması istenen bir durumdur. Pik kuyruklanma faktörünün 1 olması pikin simetrik olduğunu gösterir [74], [92].

4.4.5 Dedektör

HPLC sisteminde kullanılan dedektörler çok çeşitlidir. Analitin türüne göre UV absorpsiyon, kırılma indisi, floresans, iletkenlik dedektörü ve elektrokimyasal dedektörler kullanılabilmektedir [94]. En çok kullanılan sıvı kromatografisi dedektörü UV-Görünür bölgede absorbans ölçümüne dayanan türdür. İdeal bir dedektör; geniş bir konsantrasyon aralığında doğrusal cevap vermeli ve yüksek duyarlılık/düşük gürültü seviyesine sahip olmalıdır. Ayrıca ideal bir dedektör yüksek seçiciliğe sahip olmalı, mobil faza cevap vermemeli, sıcaklık ve akış hızından etkilenmemeli, analit(ler)e karşı duyarlılığı yüksek olmalıdır [95].

Çizelge 4.1 Yaygın HPLC dedektörleri ve özellikleri [92], [96].

Dedektör	**Analit/Özellikler**	**Duyarlılık**
UV/GB absorbans	Spesifik:UV kromofor gruplu bileşikler	ng
Diyot dizisi	Spesifik: UV/GB detektörleriyle aynı, UV spektrumu da sağlar	ng
Foloresans	Spesifik: Doğal floresans Maddeler veya floresan etiketli bileşikler	fg-ng
Kırılma indisi	Genel: Polimerler, şekerler, trigliseritler, organik asitler, eksipiyanlar.	0.1-10 µg
Evaporatif ışık - saçma	Genel: Uçucu olmayan veya yarı uçucu bileşikler, gradiente uyumludur.	ng'dan düşük
Elektrokimyasal	Spesifik: Elektro-aktif bileşikler	pg
İletkenlik	Spesifik: Anyonlar ve katyonlar, organik asitler, yüzey aktif maddeler	ng ppm-ppb
Radroaktivite	Spesifik: Radyoaktif- etiketlenmiş bileşikler	Düşük düzeyler

Çizelge 4.1 Yaygın HPLC dedektörleri ve özellikleri (devamı)

Kütle spektrometre	Hem genel hem spesifik: Kesin tespit	fg- pg- ng

4.4.6 Yazıcı Sistemi

Günümüzde HPLC sistemlerinde detektöre gelen sinyallerin toplanması için yaygın olarak bilgisayarlar kullanılmaktadır. Bilgisayarlar her bir bileşen için detektöre gelen sinyali ayırır ve onları kromatograma uygun şekilde yerleştirir. Mikroişlemciler ve bilgisayarların kullanılması kromatografik sistemlerde tekrarlanabilirliği artırmakta ve sistem validasyon parametrelerinde daha doğru sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır [97].

4.5 HPLC ile Yapılan Vitamin Tayinleri

HPLC cihazı ile farklı vitaminlerin tayinlerine ilişkin çalışmalar literatürde rapor edilmiştir. Kall gıdalardaki toplam B6 vitaminin tayini amacıyla hızlı ve hassas bir HPLC metodu geliştirip, geliştirilen bu isokritik HPLC metodunu mikrobiyolojik yöntemlerle tayin edilen piridoksin ile karşılaştırmıştır. Mobil faz olarak fosfat tamponu-asetonitril (93:7, pH; 2.75) kullanmıştır. HPLC metodu ile elde edilen piridoksin verilerinin hayvansal gıdalarda %70, meyve ve sebze ürünlerinde %20 oranında yüksek bulmuştur. Tahıl ürünlerinde ise mikrobiyolojik yöntemlerin datalarının %20 oranında daha yüksek olduğunu gözlemlemiştir [98].

Heudi ve arkadaşları gıda ürünleri ve premikslerdeki B12 vitamininin kantitatif tayini amacıyla basit, hızlı ve yeni bir metod geliştirmişlerdir. Gıda ürünlerindeki B12 vitamini 50 mM, pH: 4.0 sodyum asetat tamponu ile 100 ºC'de 4 saat bekletilerek ekstrakte edilmiş ve analiz öncesi imminoafinite kolon ile saflaştırılmıştır. Çalışmada B12 vitamini 361 nm' de tayin edilmiş ve mobil faz olarak su/asetonitril ve 0.025% trifloraasetik asit kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar neticesinde bağıl standart sapma değerleri %3.2' nin altında, geri kazanım değerleri 94-100 % aralığında bulunmuştur [99].

Chen ve arkadaşları multivitamin tabletlerde taurin ve suda çözünen 10 adet vitamini (tiamin, riboflavin, pantotenik asit, pridoksin, pridoksal, biotin, folik asit, askorbik asit,

nikotin amid, nikotinik asit) eş zamanlı tayin etmek için HPLC/ESI-MS sistemi kullanmıştır. Vitaminlerin ayrılması için C18 (250mm×4.6 mm) kolon kullanmıştır. Mobil faz olarak sulu heptaflorabutirik asit/metanol kullanıp 1.0 ml/min akış hızıyla çalışılmıştır. Elektrosprey iyonizasyonda pozitif/negatif modda çalışılmış ve vitaminlerin kantitatif tayininde hippürik asit iç standart olarak kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmaları neticesinde 10 adet vitamin için LOD değerleri 3-12 μgL^{-1}, % geri kazanım değerleri 98.2-102 aralığında bulunmuştur [100].

Jin ve arkadaşları tabletlerdeki mineral ve vitaminlerin (tiamin, riboflavin, niasinamid, pantotenik asit, folik asit ve askorbik asit) tayinlerini HPLC siteminde diyot array dedektör kullanarak yapabilmek için hızlı, basit ve yüksek kararlılık gösteren bir yöntem geliştirmiştir. Çalışmada mobil faz olarak fosfat tamponu-asetonitril (95:5) ve Alltima C18 kolon (250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm) kullanarak analizi gerçekleştirmiştir. Vitaminlerden bir kısmı 275 nm'de bir kısmıda 282 nm'de tayin edilmiştir. LOD değerleri 0.041-0.143mg/L aralığında bulunmuş ve doğruluk, kesinlik, tekrarlabilirliği yüksek bir metod geliştirilmiştir [101].

Amal Raj ve arkadaşları pridoksinin girişimsiz yüksek hassasiyette elektrokimyasal yöntemlerle tayin edilmesi ve pridoksinin parkinson ve astım hastalıklarındaki önemini belirtmek ve pridoksinin tayini için camsı karbon elektrot grafen oksit ile modifiye edilmiş bir elektrot geliştirmişlerdir. Yöntem literatürde yer olan amperometrik tayinler ile kıyaslanmış, daha düşük tayin limiti ve daha geniş doğrusal aralık elde edilmiştir [102].

BÖLÜM 5

SIVI KROMATOGRAFİ-KUADROPOL UÇUŞ ZAMANLI KÜTLE SPEKTROMETRESİ

Uçuş Zamanlı Kütle Spektroskopisi ölçüm metodunda yüklü moleküller, yüksek bir elektrik alan ile hızlandırılarak bütün kütlelerin aynı ilk enerjiye sahip olmaları sağlanır. Bu iyonlar, uçuş tüpü denilen yaklaşık 1-1.5 metrelik bir tüp boyunca uçarlar. İlk enerjileri aynı olmasına karşın moleküllerin hızları kütleleri ile ters orantılı olduğu için hafif moleküller daha hızlı uçacak, ağır moleküller ise yavaş ilerleyecektir. Bu moleküllerin kütleleri dedektörlere ulaşma zamanlarına göre tespit edilir. Bu ölçüm tekniğinin adı "Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi" dir. Bu tip kütle spektrometreleri kompleks biyopolimerlerin pmol düzeyindeki analizleri için de kullanılmaktadır [103], [104].

Kütle spektrometreleri manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek analizleme esasına göre çalısan cihazlardır. Kütle spektrometreleri uzun yıllardır kullanılsa da günümüzde bilgisayar kontrollü son derece hassas kütle spektrometreleri üretilmiş, araştırma ve analiz laboratuvarlarında kullanılan en önemli cihazlar arasında yer almaktadırlar. Arthur J Dempster'ın 1918 yılında elektron iyonizasyon ve termal iyonizasyon konusunda sağladığı ilerlemeler ve Francis Aston'un 1920'li yıllarda izotoplar ve onların kütleleri belirlenmesine yönelik yapmış olduğu çalışmalar ile kütle spektrometresinde gelişmeler elde edilmiştir. Kütle spektrometresi ticari amaçla ilk defa 1940'lı yıllarda petrol ve kimya endüstrisinde kullanıma sunulmuştur. Artık günümüzde

ise yapılacak analizin özelliklerine göre son derece hassas kütle spektrometreleri geliştirilmiş ve kimya, tıp, fizik gibi birçok alanda laboratuvarların önemli cihazları haline gelmiştir [105], [106].

Piyasaya sürülmesi çok uzun yıllar önce olmamasına rağmen, kuadrupole-uçuş zamanlı (TOF) kütle spektrometreleri, analitik topluluklar tarafından benzersiz yeteneklere sahip güçlü ve sağlam araçlar olarak hızla benimsenmiştir [107]. QTOF-MS sistemleri bilgi edinme amacıyla kullanıldığında hem prekürsor iyonlar hem de parçalanma iyonları için yüksek hassasiyet, yüksek çözünürlük ve yüksek kütle doğruluğu kombinasyonundan dolayı çok ilgi gören analitik araçlar haline gelişmiştir [108].

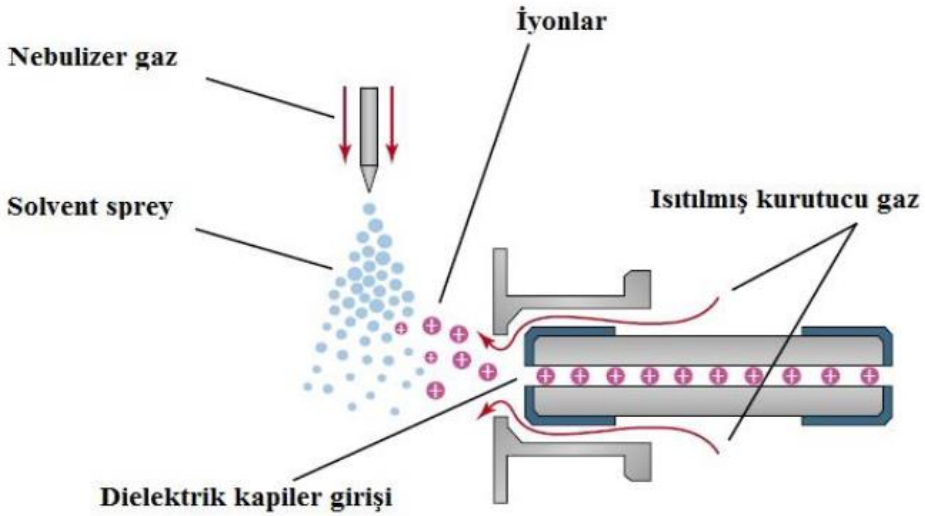
Kütle spektrometreleri, yüklü partiküllerin manyetik ya da elektriksel bir alandan geçerken diğer yüklü partikülllerden m/z oranlarına göre ayrılmaları prensibine göre çalışırlar [109]. Normalde moleküller yüklü partiküller değillerdir ve kütle spektrometreleri iyonizasyon işlemiyle moleküller uyarılır ve yüklü iyonize hale dönüştürülürler. Yüklü moleküller kararlı olmadıklarından başka moleküllerle veya bir yüzey ile çarpıştıklarında fragmentlerine parçalanırlar. Oluşan her bir iyon kendine özgü bir kütle/yük oranına sahiptir ve bu oranlarının yoğunluğa karşı gösterildiği bir spektrumla tanımlanmaktadır. Her bir iyonun yoğunluğu detektöre ulaşan miktarı ile orantılıdır ve her bileşiğin spektrumu kendine özeldir. Bilinmeyen bir örneğin analizi sonucu elde edilen spektrum referans spektrum ile karsılaştırılarak bileşiğin kütlesi tanımlanır [109].

Bir kütle spektrometresi temel olarak üç kısımdan oluşur. Bunlardan birincisi iyonlaştırma ara yüzeyidir ve moleküllerin gaz fazında iyon biçiminde olmalarını sağlar. İkincisi bölüm olan kütle analizöründe ise iyonlar uygulanan elektriksel akım ve radyo frekansla seçimli olarak ayrılırlar. Üçüncüsü ise bu iyonların miktarını yani kütle spektrometresi sinyalini oluşturan kısım olan detektördür. Kütle spektrometrelerinde iyon kaynağı olarak en çok ESI (elektrosprey iyonizasyon) ve MALDI (matriks destekli lazer iyonizasyon) kullanılmaktadır [110].

5.1 Elektrosprey İyonizasyon (ESI)

Elektrosprey iyonizasyon proteinler, polipeptitler ve mol kütlesi 100,000 daltondan büyük oligonükleotitler gibi biyo moleküllerin analizi için ilk defa 1984 yılında çok önemli bir teknik olarak ortaya çıkmıştır [111]. Elektrosprey iyonlaştırma ile uçucu

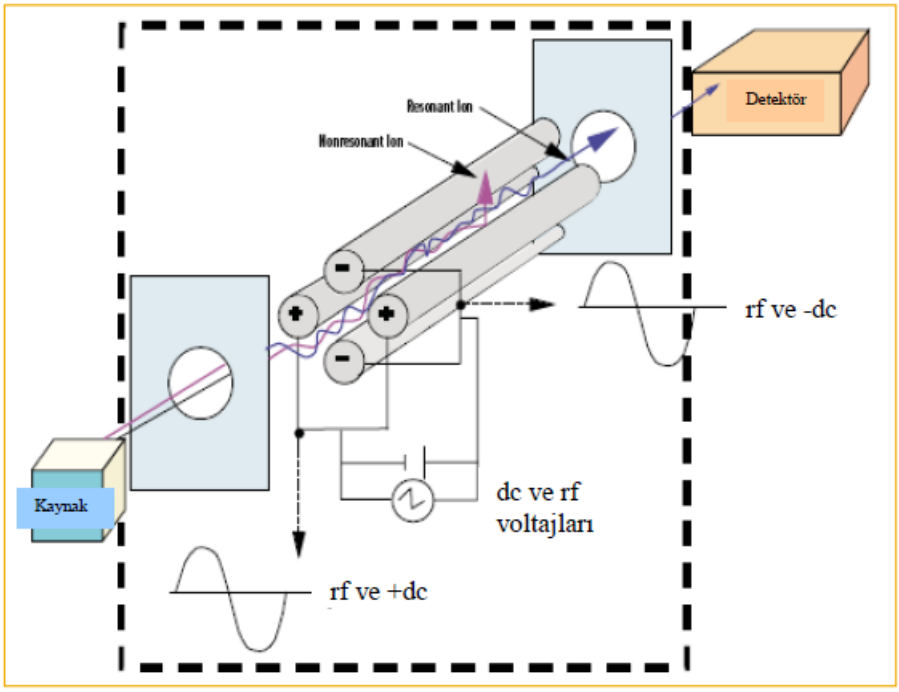
olmayan moleküllerin de gaz faz iyonlarının elde edilmesi mümkündür. HPLC'den gelen sıvı nebulizör tarafından spreyleştirilir. Oluşan sprey alanda bulunmakta ve bu spreye 150-350 ºC'da sıcak azot gazı püskürtülür. Sprey içindeki damlacık kuruma eğilimi gösterir ve bu sayede sıvı fazdaki maddeler MS ile analiz edilebilmektedir [112].



Şekil 5.1 Elektrosprey iyonlaştırma düzeneği [113].

5.2 Kuadropol Kütle Analizörü

Sıvı kromatografi kütle spektroskopisi tekniğinde kullanılan kuadrupol kütle spektrometresinde, birbirine paralel 4 silindirik ya da hiperbolik çubuk elektrotlara bir radyo frekansı ve doğru akım alanının kombinasyonu uygulanır. Uygulanan radyo frekans ve doğru akım voltajlarına göre sadece belirli iyonlar elektrot sistemi boyunca sabit bir yön izleyerek detektöre ulaşırken, diğer iyonlar ise sabit yörüngeler izleyemediğinden sistemde kaybolurlar. Birbirine bakan 4 elektrodun merkezine en yakın noktada ilerlemesi istendiğinden, bu koşula en yakın voltajlar seçilir. Son yıllarda üretilen LC–MS arayüzeyleri ile düşük molekül ağırlıklı ilaç ve metabolitlerden (<1000 Da) yüksek molekül ağırlıklı biyopolimerlere kadar (>100 000 Da) geniş bir spektrumdaki analitlerin tayinleri LC-MS ve LC-MS/MS teknikleri ile gerçekleştirilebilmektedir [114], [113].



Şekil 5.2 Kuadropole analizörü [113].

BÖLÜM 6

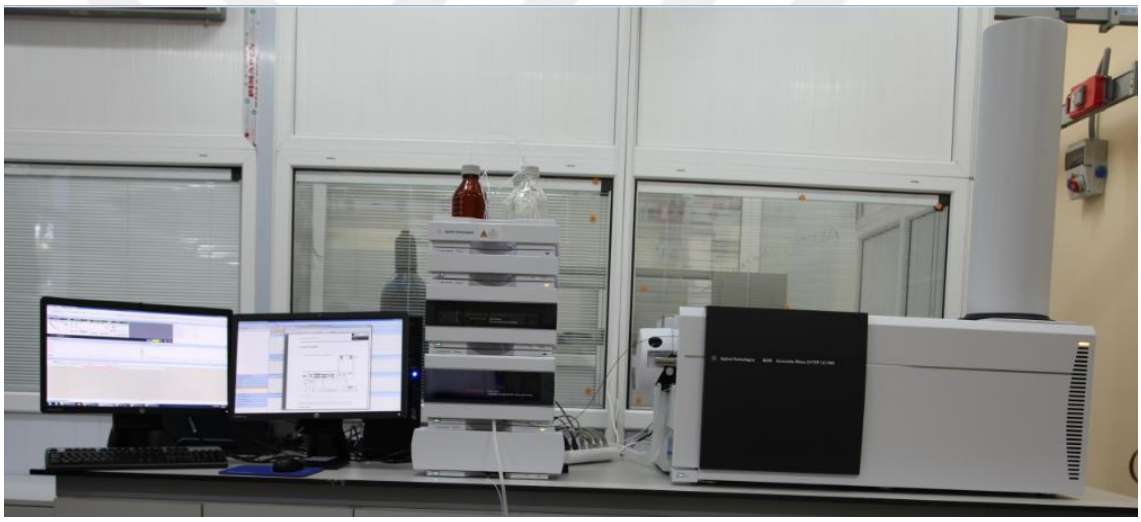
DENEYSEL ÇALIŞMALAR

6.1 Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında suda çözünen vitaminler arasında yer alan niasin ve piridoksinin eşzamanlı tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisinde yüksek doğruluk ve duyarlılıkta tayin yapılmasına yönelik bir analitik yöntem geliştirilmiştir. Bu amaçla maksimum absorpsiyonun gerçekleştiği iki farklı dalga boyunda (220 nm-260 nm) çalışmalar yürütülmüştür. İlaç endüstrisinde içerisinde niasin ve piridoksin içeren bazı ticari ilaçlarda miktar tayini yapılmıştır. Yapay mide ortamı hazırlanıp niasin ve piridoksin içeren mix çözeltinin bu ortamdaki davranışı incelenmiştir. Musluk suyunda ve atık su numunelerinde bulunan niasin ve piridoksinin miktar tayini yapılmıştır. Tabletlerdeki niasin ve piridoksinin HPLC ile elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması amacı ile LC/Q-TOF/MS cihazında numuneler optimum artlar altında analiz edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan tüm standart çözeltiler katı niasin ve piridoksin kullanılarak hazırlanan 1000 mg L^{-1} çözeltilerden seyreltilerek hazırlanmıştır.



Şekil 6.1 Shimadzu HPLC cihazı



Şekil 6.2 Agilent LC/Q-TOF/MS cihazı

6.1.1 HPLC Donanımı

Tüm deneysel çalışmalarda HPLC cihazı SPD M20A Diode Array Dedektör, DGU 20A Degazer, SIL 20 A Oto Örnekleyici sistemlerinden oluşan Shimadzu HPLC sistemidir. Tüm HPLC analizlerinde ECLIPSE XDB C18 5µm 4.6x250mm, Zorbax SB (5µm 4.6x250mm) kolonları ile çalışılmış olup zaman içerisinde ECLIPSE XDB C18 5µm 4.6x250mm kolonunda tiamin için pik performansı düştüğünden dolayı çalışmalar Zorbax SB (5µm 4.6x250mm) kolonu ile tamamlanmıştır.

- **Pompa:** LC 20 AT
- **Otomatik örnekleyici:** SIL 20 A Oto Örnekleyici

- **Dedektör:** SPD M20A Diode Array Dedektör
- **Degasser:** DGU 20A Degazer

6.1.2 LC/Q-TOF/MS Donanımı

Tüm deneysel çalışmalarda LC/Q-TOF/MS, Agilent Technologies 1260 oto örnekleyici, Degazer ve pompa bulunduran HPLC ünitesine bağlı Agilent 6530 markalı QTOF-MS sistemi kullanılmıştır. LC/Q-TOF/MS analizlerinde ve sistem analitik performans değerlerinin belirlenmesinde Poroshell 3x150 x 2.7 EC C18 kolon kullanılmıştır.

6.1.3 Kolonlar

- Zorbax SB 5µm 4.6x250mm
- ECLIPSE XDB C18 5µm 4.6x250mm
- Poroshell 3x150x2.7 EC C18

6.1.4 Diğer Ekipmanlar

- Mikro pipet: PhysioCare Concept - Eppendorf Research Plus (100-1000 µl; 0.5-5 ml)
- Hassas terazi: Sartorius Analytic A 120 S
- pH metre: Hanna HI 2211
- Manyetik karıştırıcı: IKA (RTC basic) manyetik karıştırıcı + ETS-D5 Elektronik Kontakt Termometre
- Derin dondurucu: Uğur Derin Dondurucu UCF 1600 L
- Mikrovialler: Agilent
- Cam malzemeler: Balon joje, beher, erlen, mezür

6.1.5 Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Çalışmalardaki tüm kimyasallar yüksek saflıkta kullanılmıştır. Saf su Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarlarından A Milli-Q® Reference System cihazı ile elde edilmiştir. Tiamin ve piridoksin çözeltileri, 1000 mg L^{-1}'lik stok çözeltisinden seyreltilerek hazırlanmıştır. Kullanılan kimyasal ve solventler;

- Metanol (>%99): Merck
- Asetonitril (>%99): Merck
- Potasyum dihidrojen fosfat di hidrat: Merck
- Sodyum hidroksit: Merck

6.2 Optimizasyon Çalışmaları

Niasin ve piridoksinin HPLC-UV sisteminde eser seviyelerde tayinleri için değişken olan tüm parametreler optimize edilmiştir. HPLC sisteminde türlerin alıkonmalarına yönelik birçok hareketli faz denenmiştir. Çalışma 1 için 23 mM H_3PO_4 tamponu hazırlanmıştır. Bunun için 1.58 mL H_3PO_4 bir miktar saf suda çözülmüştür. Seyreltik NaOH ile pH 3.54' e ayarlanmış ve ultra saf su ile 1.0 L'ye tamamlanmıştır. %15 metanol-% 85 tampon çözeltisi için 150 mL metanol ve 850 mL tampon çözelti kullanılmıştır.

Çalışma 4' te ise 25 mM $NaH_2PO_4.2H_2O$ tampon çözeltisi hazırlamak için 1.95 g tartılmış ve bir miktar saf suda çözülmüştür. pH ayarı seyreltik H_3PO_4 ile yapılmış ve son hacim olan 1.0 L' ye tamamlanmıştır.

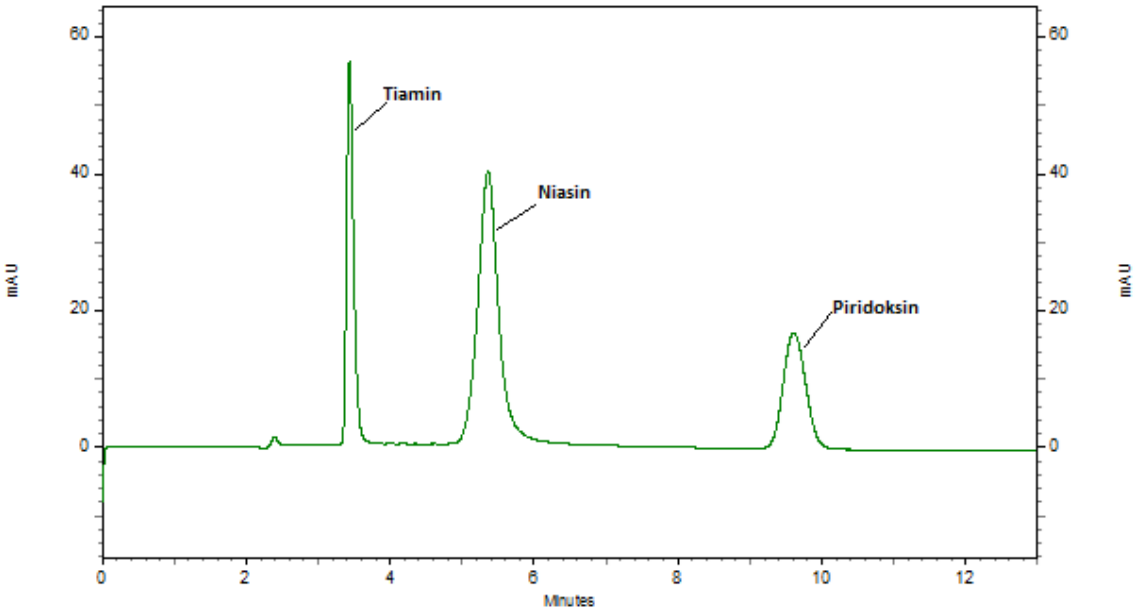
Çalışma 5, 6, 7' de ise 50 mM $KH_2PO_4.2H_2O$ kullanılarak fosfat tamponu hazırlanmıştır. Bunun için 7.8 g $KH_2PO_4.2H_2O$ tartılıp bir miktar ultra saf su içerisinde çözülmüştür. pH ayarı seyreltik H_3PO_4 ile yapılmıştır.

Çizelge 6.1 HPLC sisteminde niasin ve piridoksinin alıkonmasına yönelik yapılan optimizasyon çalışmaları

	Parametreler				
	Mobil Faz	**pH**	**Akış hızı, mL/min**	**Dalga boyu**	**Kolon**
Çalışma 1	%33CH_3OH-%67Tampon Tampon;23 mM H_3PO_4	3.54	1.0	220-260	ECLIPSE XDB C18, 5µm, 4.6x150mm
Çalışma 2	%33CH_3OH-%67Tampon Tampon;23 mM H_3PO_4	3.54	1.0	220-260	ECLIPSE XDB C18 5µm 4.6x250mm
Çalışma 3	%100Tampon Tampon;25mM $NaH_2PO_4.2H_2O$	2.20	1.0	220-260	ECLIPSE XDB C18 5µm 4.6x250mm
Çalışma 4	%20CH_3OH-%80tampon Tampon; 25 mM $NaH_2PO_4.2H_2O$	2.20	1.0	220-260	ECLIPSE XDB C18 5µm 4.6x250mm
Çalışma 5	%100tampon Tampon;50 mM $KH_2PO_4.2H_2O$	2.40	1.0	254	ECLIPSE XDB C18 5µm 4.6x250mm
Çalışma 6	%50CH_3OH - %50tampon Tampon;50 mM $KH_2PO_4.2H_2O$	2.40	1.0	240	ECLIPSE XDB C18 5µm 4.6x250mm
Çalışma 7	%100tampon Tampon;50 mM $KH_2PO_4.2H_2O$	2.50	1.0	220	ECLIPSE XDB C18 5µm 4.6x250mm

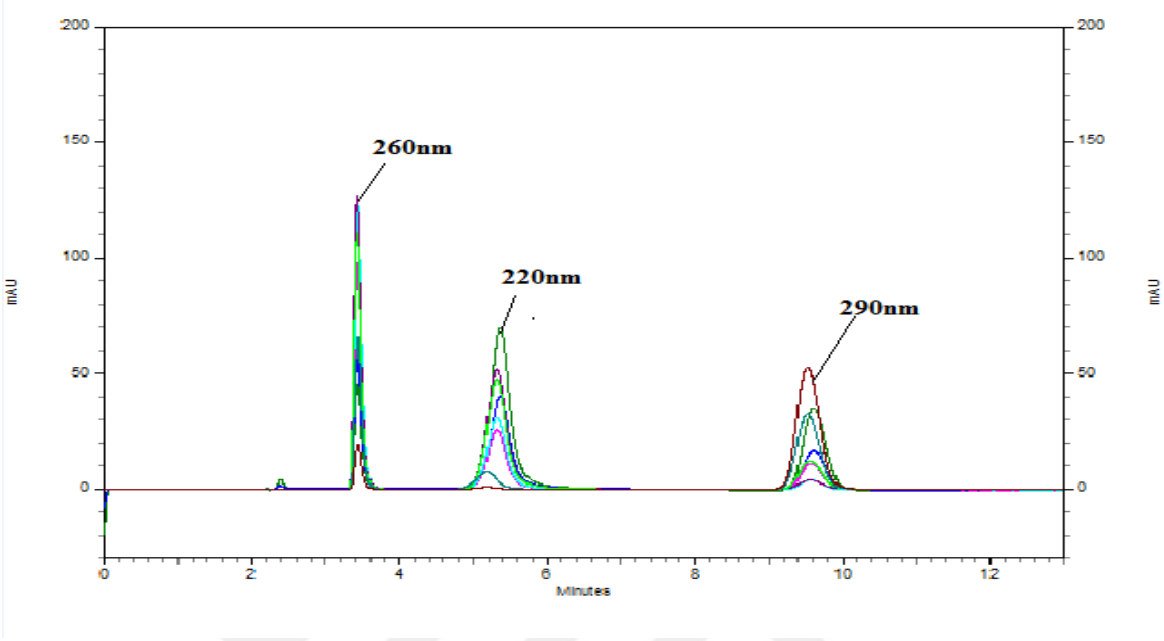
Optimum koşulların belirlenmesi amacıyla uygun pH, kolon, dalga boyu, akış hızı ve mobil faz belirlenmiştir. Zorbax Eclipse XDB kolonu tiamin, niasin ve piridoksin vitaminleri alıkonabilmiştir. Çalışmalara ilk önce pH optimizasyonu ile başlanmış,

yapılan literatür araştırmaları neticesinde ve vitaminlerin bazik ortamdaki kararsızlıklarından dolayı asidik ortamlarda tampon çözeltiler hazırlanmıştır. pH asidik olacak şekilde (2-4) çalışılmıştır. Çalışma 1'de kromatogram sonucuna göre niasin ve piridoksin için elde edilen alıkonma zamanı 1.5 ve 1.8 min'dir ve ölü zamana yakındır. Çalışma 2'de ise piridoksin için elde edilen alıkonma zamanı 2.5 min'dir. Niasin için elde edilen pikte ise kuyruklanma görülmüştür. Çalışma 1 ve 2'den yola çıkarak pH 3.54 ün B vitaminlerinin tayini için uygun olmadığı sonucuna varılmıştır. Çalışma 3'te niasin ve piridoksin için düzgün pik şekilleri elde edilememiş, özellikle piridoksin vitamini için kuyruklanma gözlemlenmiştir. pH değiştirilerek çalışma 4 ve 5'te elde edilen sonuçlarda ise sisteme metanol gönderilmesiyle zamanda azalma olmuş ve vitaminlerin ölü zamanda çıktığı görülmüştür. Çalışma 6'da pH 2.40 tampon çözeltisi HPLC sistemine gönderilmiş fakat simetrik analit sinyalleri gözlemlenememiştir. Çalışma 7'de ise ECLIPSE XDB kolonu için pH 2.50'de tiamin, niasin ve piridoksin analitleri için kolonda alıkonma elde edilmiş, düzgün pik şekilleri görülmüş ve çalışmaların devamında bu pH değeri ile devam edilmiştir.



Şekil 6.3 50 mM $KH_2PO_4.2H_2O$ (pH 2.50) kullanılarak tiamin, niasin ve piridoksin için elde edilen HPLC kromatogramı.

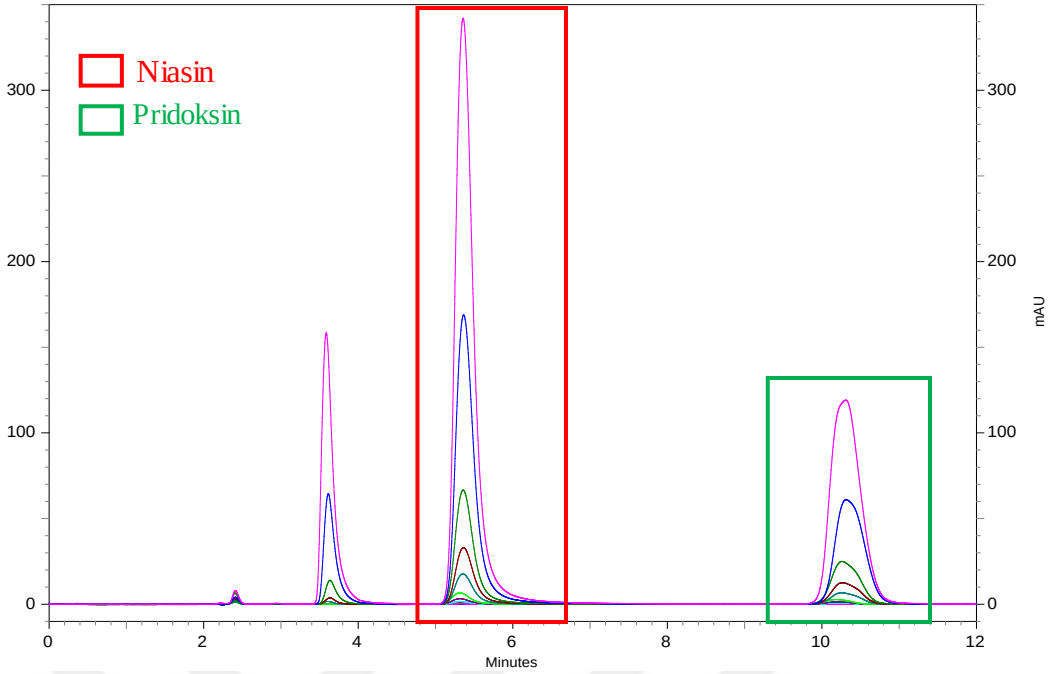
Optimizasyon çalışmalarına dalga boyu taraması yapılarak devam edilmiş ve her üç analit için de maksimum absorbansın görüldüğü dalga boyları olan 220-260 nm' de sistem analitik performansı belirlenmiştir.



Şekil 6.4 50 mM $KH_2PO_4.2H_2O$ (pH 2.50)'de %100 tampon çözelti kullanılarak yapılan elde edilen sinyaller.

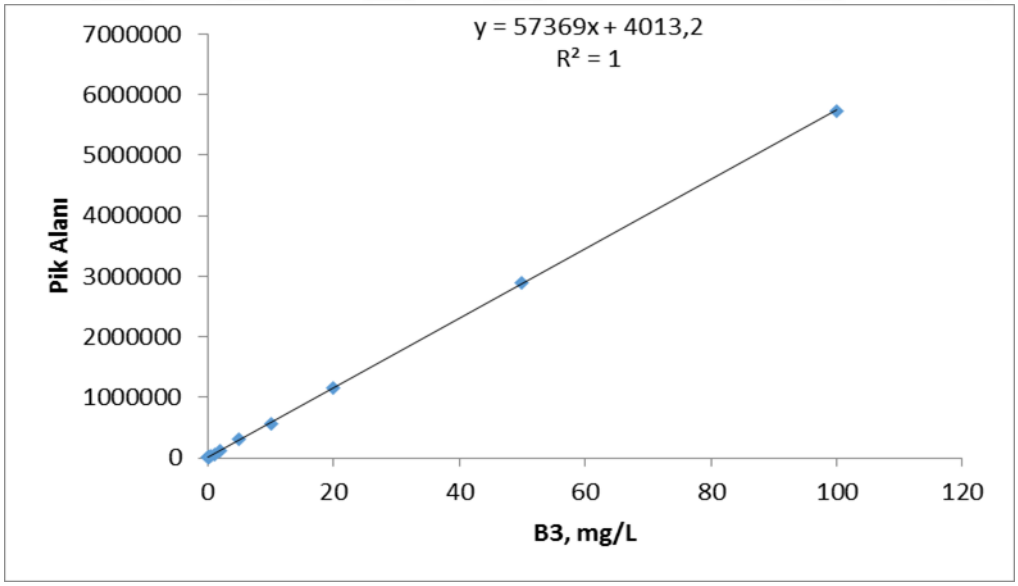
6.3 Niasin ve Piridoksinin Sistem Analitik Performansının Tespiti

Niasin ve pridoksin vitaminlerinin kantitatif tayinleri amacıyla belirlenen optimum kromatografik koşullar altında 0.02-100 mg L^{-1} arlığında mix standart çözeltiler HPLC sistemine gönderilmiş ve Şekil 6.4' deki kromtogramlar elde edilmiştir.

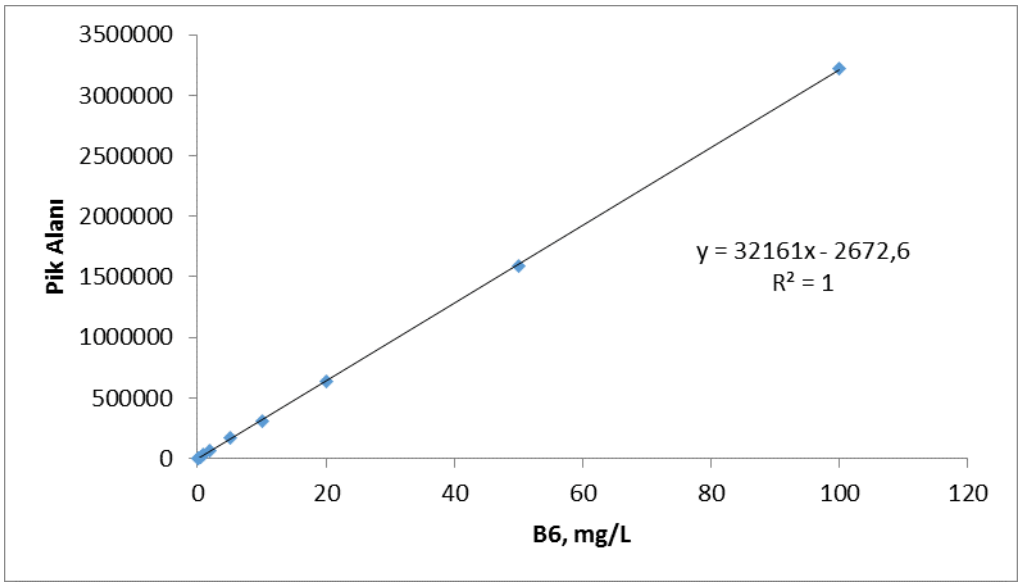


Şekil 6.5 50 mM, pH 2.50 $KH_2PO_4.2H_2O$ tampon sisteminde Eclipse XDB C18 kolonda niasin ve piridoksinin 0.02-100 mgL^{-1} aralığındaki kromatogramları.

Şekil 6.5' deki kromatogramlarda pik alanı kullanılarak elde edilen kalibrasyon doğruları Şekil 6.6 ve 6.7'da gösterilmiştir.

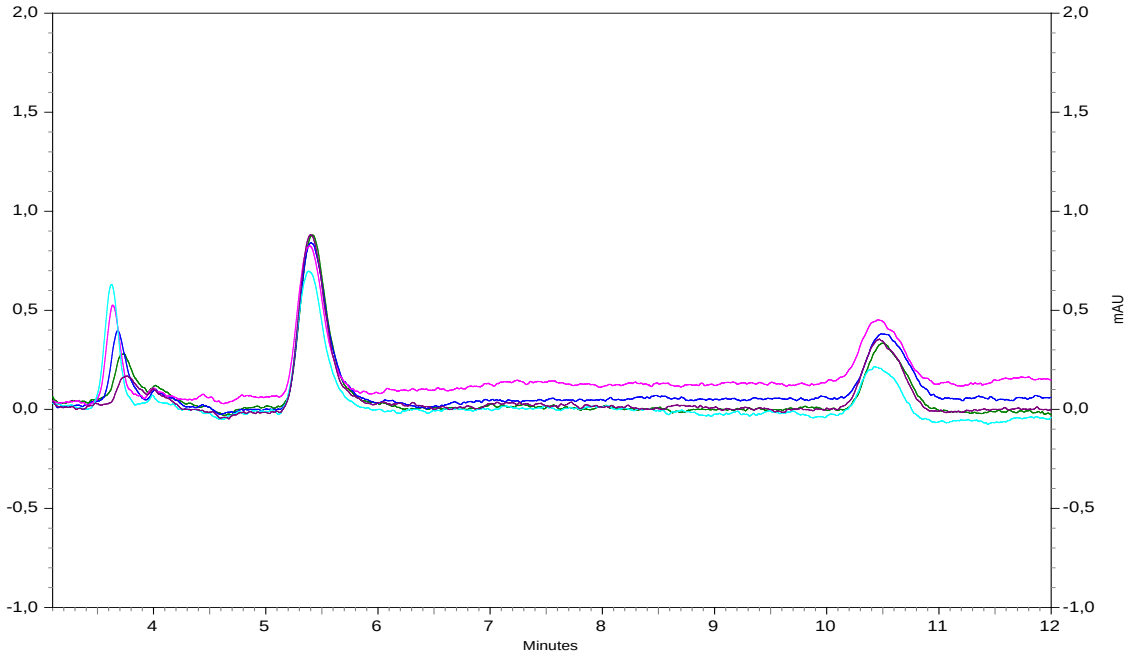


Şekil 6.6 50 mM, pH 2.50, $KH_2PO_4.2H_2O$ tampon çözelti sistemi kullanılarak HPLC-UV sisteminde pik alanı kullanılarak elde edilen niasine ait kalibrasyon doğrusu.



Şekil 6.7 50 mM, pH 2.50, $KH_2PO_4.2H_2O$ tampon çözelti sistemi kullanılarak HPLC-UV sisteminde pik alanı kullanılarak elde edilen pridoksine ait kalibrasyon doğrusu .

HPLC sisteminde LOD (limit of detection, gözlenebilme sınırı), LOQ (limit of quantitation, tayin limiti) değerlerinin tespiti amacıyla en küçük derişim olan 0.02 mg L^{-1} siteme 5 defa gönderilmiş Şekil 6.8' deki kromatogramlar elde edilmiştir.



Şekil 6.8 50 mM, pH 2.50, $KH_2PO_4.2H_2O$ tampon çözelti sistemi kullanılarak 0.02 mg L^{-1} niasin ve piridoksin mix standardının tekrarlı olarak HPLC-UV sistemindeki kromatogramları.

LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanılmıştır;

$$LOD = \frac{3 \times Standart\ Sapma}{Eğim}$$

$$LOQ = \frac{10 \times Standart\ Sapma}{Eğim}$$

Elde edilen LOD ve LOQ değerlerinin de aralarında olduğu niasin ve piridoksin için tespit edilen sistem analitik performans değerleri Çizelge 6.2' de görülmektedir.

Çizelge 6.2 Niasin ve piridoksin için elde edilen sistem analitik performans değerleri.

	Niasin	**Piridoksin**
LOD, mg/L	0.072	0.085
LOQ, mg/L	0.240	0.283
R^2	1.00	1.00
y=mx+n	y = 57369x + 4013,2	y=32161x- 2672,6

Eclipse XDB C18 kolonu ile her iki analit için simetrik şekillere sahip pikler elde edilebilmiş sistem analitik performans değerleri hesaplanmıştır. Fakat tiamin analiti tayininde problemlerle karşılaşılmıştır. Bu analite ait karalı sinyaller elde edilememiş, sinyallerde omuzlanmalar görülmüş, çalışılan analitik kolonda aynı analite ait alıkonma sürelerinde günler arasında farklılıklar tespit edilmiştir. Bu nedenle çalışmalara Zorbax SB 5µm 4.6x250mm kolonu ile devam edilmiştir.

6.4 Farklı Kolonda Yapılan Optimizasyon Çalışmaları

Analitlerin doğruluk ve duyarlılıkta tayinlerinin yapılması amacı ile çalışmalara Çizelge 6.3'te görülen parametreler ile devam edilmiştir.

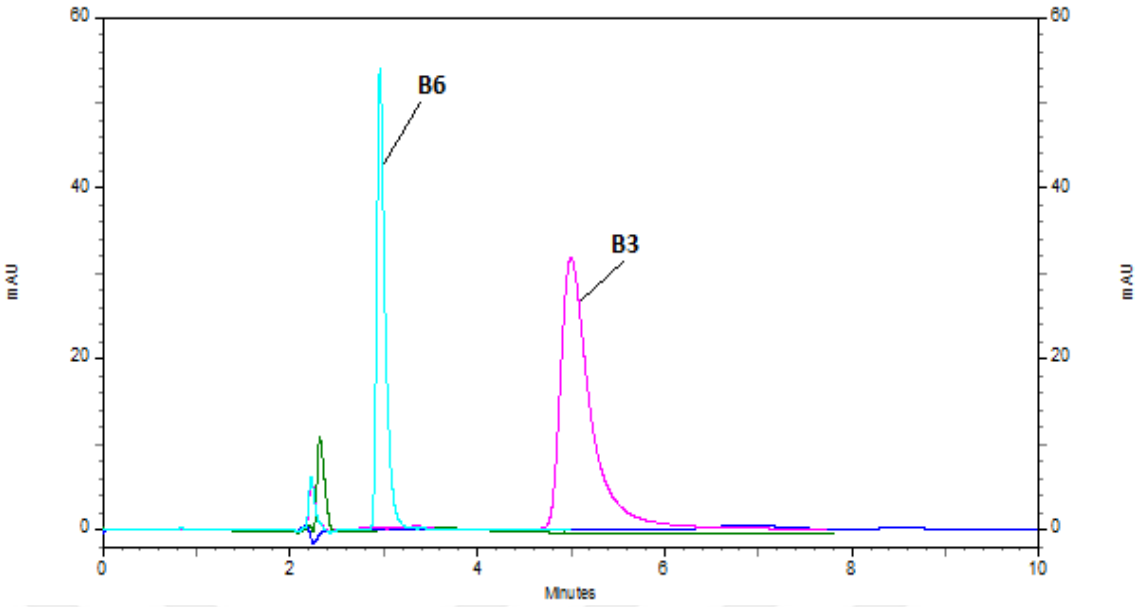
Çizelge 6.3 HPLC sisteminde niasin ve piridoksinin alıkonmasına yönelik farklı kolon için yapılan optimizasyon çalışmaları

	Parametreler				
	Mobil faz	**pH**	**Akış Hızı, mL/min**	**Dalga boyu**	**Kolon**
Çalışma 1	%33CH_3OH-%67Tampon Tampon;23 mM H_3PO_4	3.54	1.0	274	Zorbax SB 5µm 4.6x250mm
Çalışma 2	%100 tampon Tampon;25mM $NaH_2PO_4.2H_2O$	2.20	1.0	220-260	Zorbax SB 5µm 4.6x250mm
Çalışma 3	%30CH_3OH-%70tampon Tampon;25mM $NaH_2PO_4.2H_2O$	2.20	1.0	220-260	Zorbax SB 5µm 4.6x250mm
Çalışma 4	%30CH_3OH - %70tampon Tampon;30 mM H_3PO_4	2.50	1.0	220-260	Zorbax SB 5µm 4.6x250mm
Çalışma 5	%30CH_3OH - %70tampon Tampon;30 mM H_3PO_4	3.0	1.0	220-260	Zorbax SB 5µm 4.6x250mm
Çalışma 6	%30CH_3OH - %70tampon Tampon;30 mM H_3PO_4	3.30	1.0	220-260	Zorbax SB 5µm 4.6x250mm
Çalışma 7	%30CH_3OH - %70tampon Tampon;30 mM H_3PO_4	3.80	1.0	220-260	Zorbax SB 5µm 4.6x250mm
Çalışma 8	%15CH_3OH - %85tampon Tampon;23 mM H_3PO_4	3.54	1.0	220-260	Zorbax SB 5µm 4.6x250mm
Çalışma 9	%15CH_3OH - %85tampon Tampon;23 mM H_3PO_4	3.54	1.2	220-260	Zorbax SB 5µm 4.6x250mm

Çizelge 6.3 HPLC sisteminde niasin ve piridoksinin alıkonmasına yönelik farklı kolon için yapılan optimizasyon çalışmaları (devamı)

Çalışma 10	%15CH_3OH - %85tampon Tampon;23 mM H_3PO_4	3.54	1.5	220-260	Zorbax SB 5µm 4.6x250mm

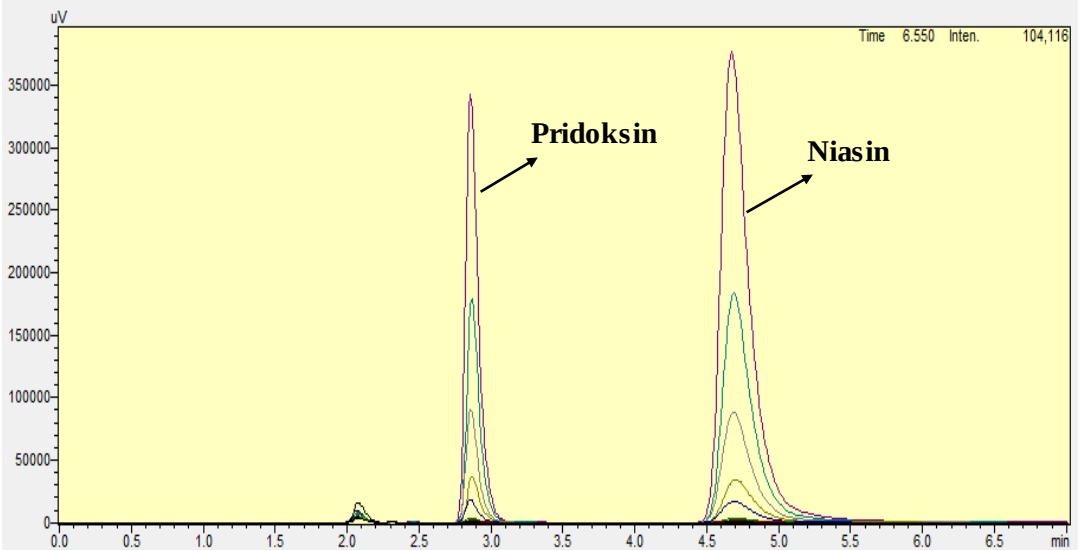
Çalışma 1'de piridoksin ve piridoksin için yeterli alıkonma süresi elde edilememiş, ölü zamana çok yakın sürede kolondan çıkmışlardır. Bundan sonraki aşamalarda öncelikli olarak pH optimizasyonu yapılmıştır. %30metanol -%70 tampon mobil fazında farklı pH' larda tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Daha önceki yapılan çalışmaların sonucunda maksimum absorbansın gerçekleştiği dalga boyu olan 220 ve 260 nm de çalışmalara devam edilmiştir. Çalışma 2'de sisteme %100 tampon çözelti gönderildiğinde niasin ve piridoksin için pik genişliği yaklaşık 2 dakika olmuş bu da piklerde kuyruklanmalara neden olmuştur. Bu kromatografik koşuların uygun olmadığı sonucuna varılmıştır. Çalışma 3'de pik şekillerinde iyileştirme yapmak için %30 metanol- %70tampon mobil fazı olarak hazırlanmış ancak tiamin ve piridoksin için yeterli alıkonma süresi elde edilememiş ölü zamanda pikler kolondan ayrılmıştır. Çalışma 4, 5, 6, 7, 8' de 30 mM'lık tampon çözeltiler sırasıyla pH 2.5, 3, 3.30, 3,80, 3.54 olmak üzere hazırlanmış fakat yeterli alıkonma sürelerinin elde edilememesinden dolayı mobil fazın konsantrasyonu azaltılarak çalışmalara devam edilmiştir. Mobil fazın konsantrasyonu 23 mM' a analitler kolonda alıkonulmaya başlanmıştır. Mobil fazın metanol oranı ise yarı yarıya azaltıldığında yeterli alıkonmanın elde edildiği ve piklerin birbirinden çok iyi ayrıldığı görülmüştür. Bundan sonraki aşamada akış hızı optimizasyonu yapılmış ve analitler HPLC siteminden sırasıyla 1.0 mL/min, 1.2 mL/min, 1.5 mL/min' de gönderilmiştir. Optimum koşullar 23 mM, %15 metanol-%85 tampon (pH 3.54) ve 1.2 mL/min olarak belirlenmiştir. Optimum şartlar altında elde edilen kromatogramlar Şekil 6.9' da görülmektedir.



Şekil 6.9 Zorbax SB C18 kolonda %15metanol- %85Tampon çözelti (23 mM, pH 3.54 H_3PO_4) sisteminde sırasıyla piridoksin ve niasin için elde edilen kromatogramlar.

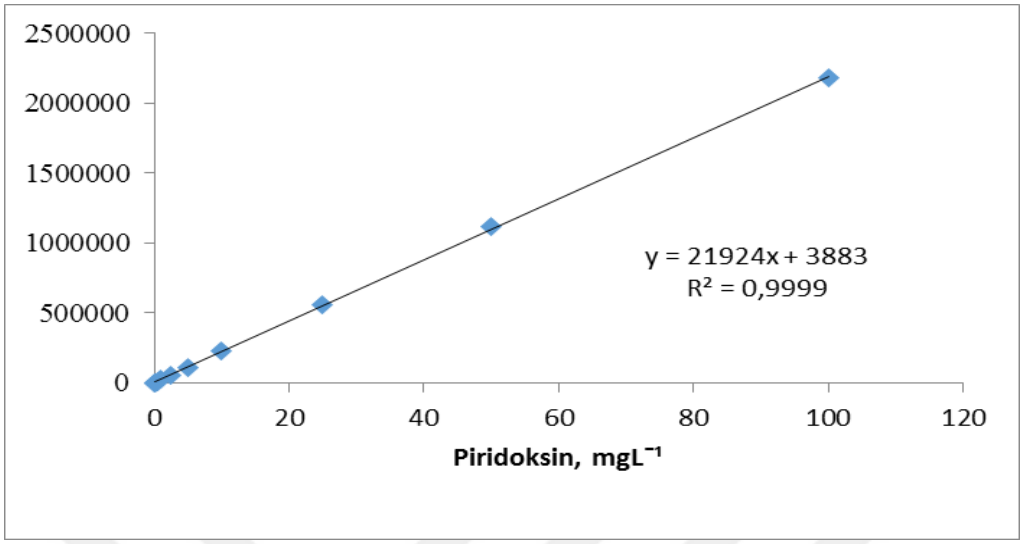
6.5 Optimum Şartlar Altında Niasin ve Piridoksinin Sistem Analitik Performansının Belirlenmesi

Zorbax SB C18 kolonu için sistem analitik performans değerlerinin tespiti amacı ile belirlenen optimum şartlar altında 0.025-100 mg L^{-1} aralığında standartlar HPLC sistemine enjekte edilmiş ve Şekil 6.10' daki kromatogramlar elde edilmiştir.

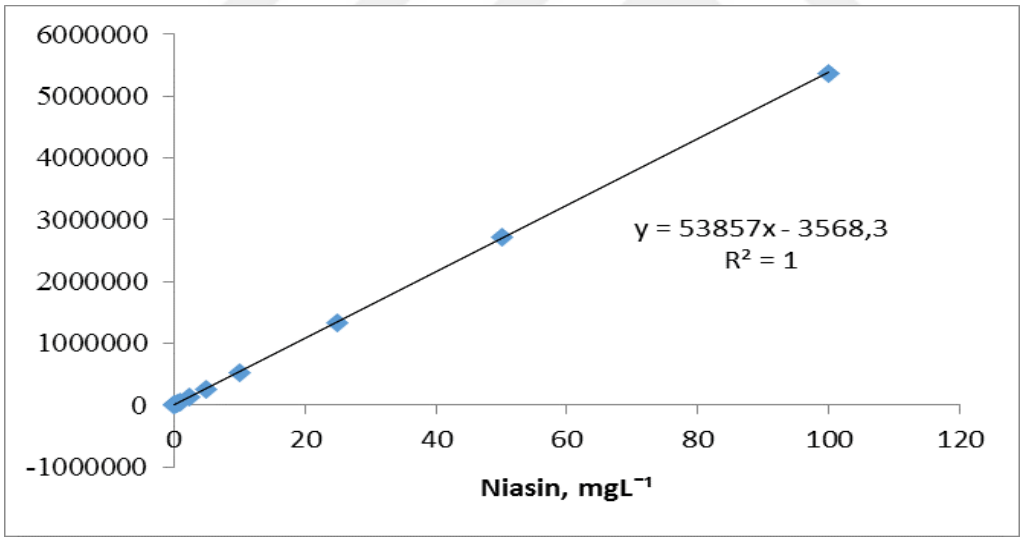


Şekil 6.10 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15) ve Zorbax SB C18 kolon kullanılarak 0.025-100 mgL^{-1} aralığında niasin, piridoksin vitaminlerine ait standartların HPLC sistemine gönderilmesiyle elde edilen kromatogramlar.

Şekil 6.9 ve 6.10' daki kromatogramlarda niasin ve piridoksinin pik alanlarını kullanarak elde edilen kalibrasyon doğruları aşağıda görülmektedir.

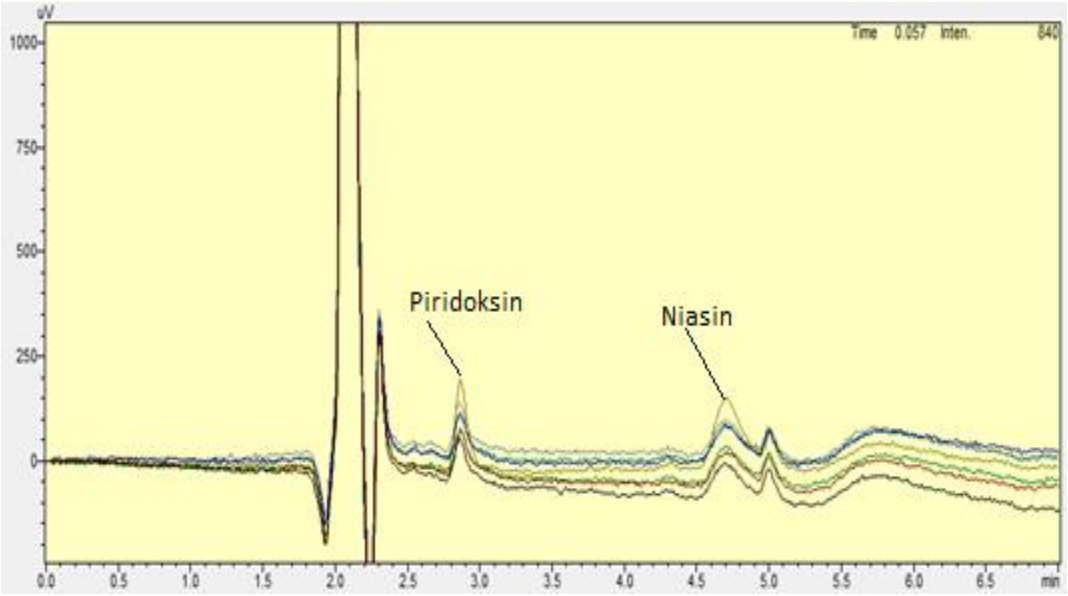


Şekil 6.11 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15) ve Zorbax SB C18 kolon kullanılarak optimum şartlar altında elde edilen piridoksine ait kalibrasyon doğrusu.



Şekil 6.12 23mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15) ve Zorbax SB C18 kolon kullanılarak optimum şartlar altında elde edilen niasine ait kalibrasyon doğrusu.

HPLC-UV sisteminde optimum şartlar altında LOD ve LOQ değerlerinin tespiti amacı ile kalibrasyon grafiğinde kullanılan en düşük derişim olan 0.025 mgL^{-1} 220 ve 260 nm de, sisteme 8 defa gönderilmiş ve Şekil 6.13'daki kromatogramlar elde edilmiştir.



Şekil 6.13 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15) ve Zorbax SB C18 kolon kullanılarak 0.025 mgL^{-1} niasin ve piridoksin mix standardına ait kromatogramlar.

Çizelge 6.4 Zorbax SB kolonda niasin ve piridoksin için elde edilen sistem analitik performans değerleri.

	Niasin (Pik alanı)	**Piridoksin(Pik alanı)**
LOD, mgL-1	0.0037	0.0057
LOQ, mgL-1	0.0123	0.0189
R^2	1.000	0.9999
y=mx+n	y = 53857x - 3568,3	y = 21924x + 3883
%RSD	5.69	4.71

Tabloda da görüldüğü gibi niasin ve piridoksin için çok düşük tayin limitleri elde edilebilmiş ve kalibrasyon doğrusunun en küçük noktası olan 0.025 mgL^{-1} LOQ değerine yakın bulunmuştur.

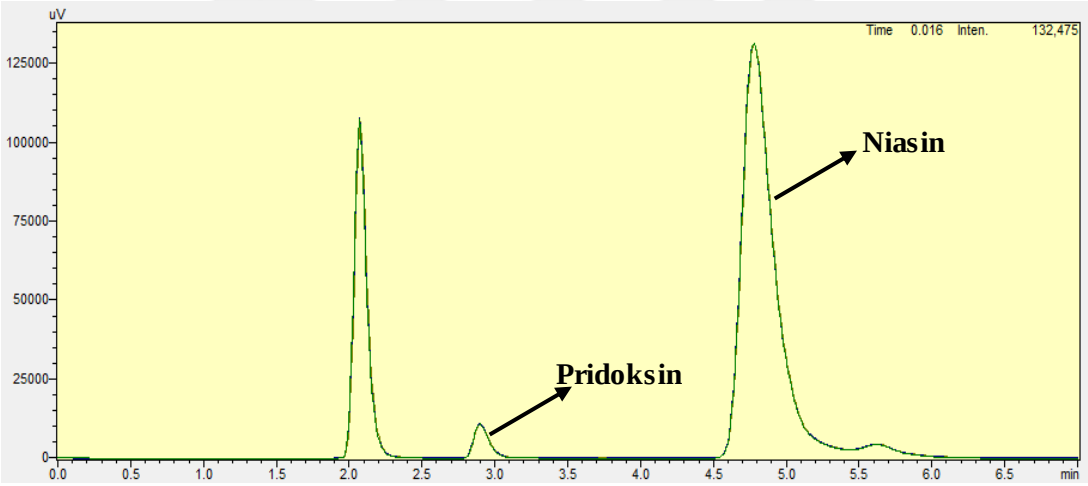
6.6 İlaç Endüstrisinde Niasin ve Piridoksin İçeren Tabletlerin HPLC Sisteminde Kantitatif Analizleri

Bu çalışmada kullanılan tüm markalar ülkemiz ilaç piyasasında aktif olarak satılan ilaçlardır. Tablet şeklinde satılan Marka A ve Marka B, şurup şeklinde satılan Marka

C’ nin içerisinde bulunan niasin ve piridoksinin kantitatif tayinlerinde daha önceden belirlenen optimum koşullar kullanılarak analizleri yapılmıştır. Tablet şeklinde olan Marka A, Marka B’ den birer adedi için Marka C için ise 5.0 mL kullanılarak analiz yapılmıştır. Tabletler toz haline getirilipşurup bir miktar suda çözündükten sonra 50 mL' ye tampon çözelti ile tamamlanmıştır. 15 dakika boyunca sonikasyonda tutulduktan sonra 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve süzülmüştür. Süzülen numunelerden her marka için farklı miktarlarda alınıp kalibrasyon grafiğinin ortalarında kalacak şekilde uygun seyreltmeler tampon çözelti kullanılarak yapılmıştır. Numuneler viallendikten sonra HPLC sistemine gönderilmiştir.

6.6.1 Marka A

Ürünün prospektüsünde 1 adet tablette 20 mg niasin, 2.0 mg piridoksin olduğu iddia edilmektedir. Marka A’nın HPLC sisteminde optimum koşullar yapılan 3 tekrarlı yapılan analizine ait kromatogramlar Şekil 6.14’ de görülmektedir.

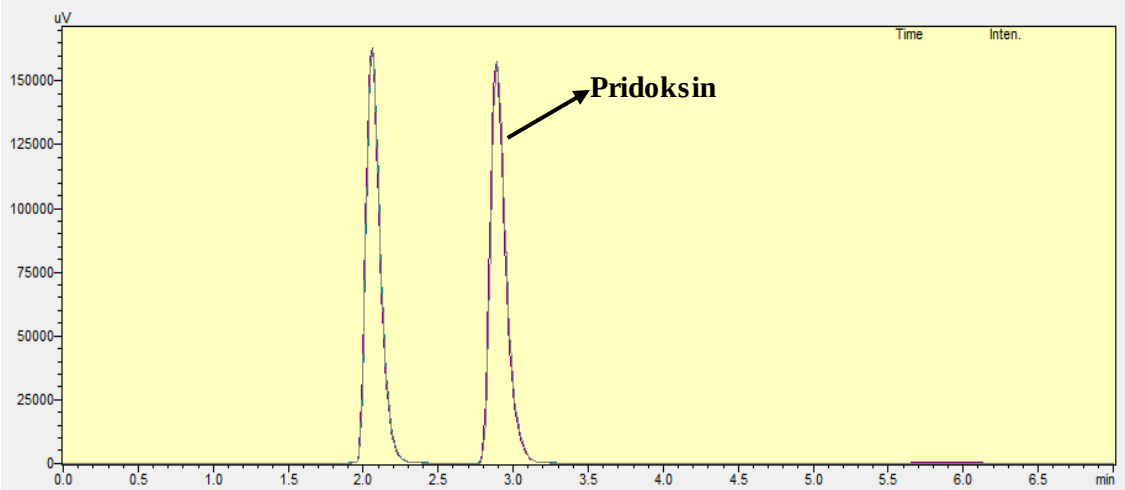


Şekil 6.14 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15), Zorbax SB C18 kolon kullanarak Marka A numunelerinin HPLC sisteminde 3 tekrarlı yapılan analizine ait kromatogramlar.

Kromatogramlarda görüldüğü üzere analitlerin alıkonma sürelerinde bir değişiklik tespit edilmemiştir. Bu durum geliştirilen analitik ayrıma/tayin yönteminde analit sinyallerinin matriks bileşenlerinde etkilenmediği snucuna varılmıştır. Yapılan hesaplamalara göre Marka A’ ya ait tablet içerisinde pik alanı kullanılarak bulunan piridoksin miktarı 1.87 ± 0.02 mg, niasin miktarı 19.78 ± 0.02 mg olarak bulunmuştur. Bu sonuçlardan hareketle piridoksin miktarının prospekte iddia edilen değerden düşük olduğu tespit edilmiştir.

6.6.2 Marka B

Ürünün prospektüsünde 1 adet tablette 250 mg piridoksin olduğu iddia edilmektedir. Piridoksin derişimi 50 mgL^{-1} olacak şekilde hazırlanan Marka B'nın HPLC sisteminde optimum koşullar yapılan 3 tekrarlı yapılan analizine ait kromatogramlar Şekil 6.15' de görülmektedir.

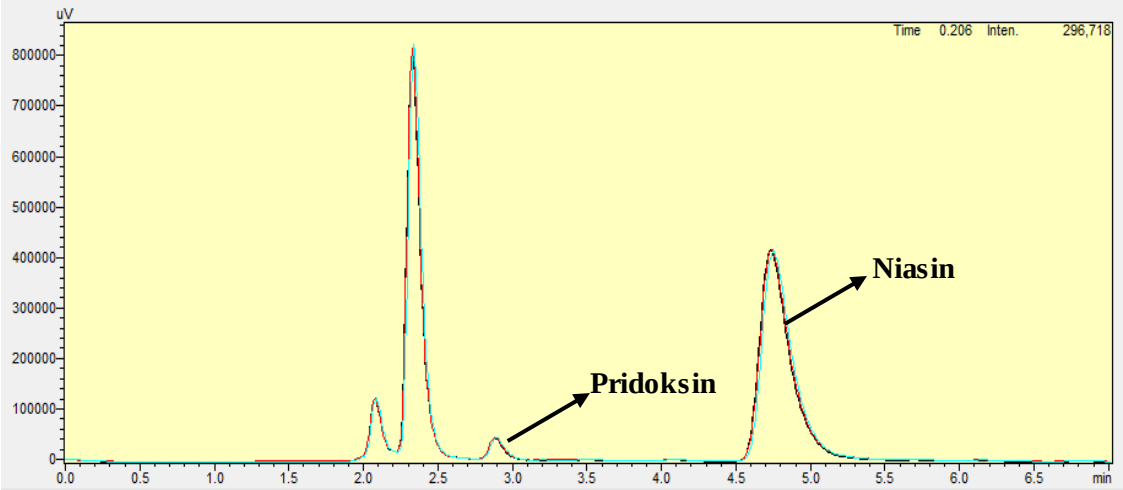


Şekil 6.15 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15), Zorbax SB C18 kolon kullanarak Marka B numunelerinin HPLC sisteminde 3 tekrarlı yapılan analizine ait kromatogramlar.

Yapılan hesaplamalara göre Marka B' ye ait tablet içerisinde pik alanı kullanılarak bulunan piridoksin miktarı 262.0 ± 10.2 mg olarak bulunmuştur. Bu sonuçların prospektüslerinde belirtilen sonuçlara yakın olduğu görülmüştür.

6.6.3 Marka C

Şurup şeklinde bir ilaç olan Marka C' nin ürün prospektüsünde her bir 5.0 mL' lik ölçek için 11 mg niasin, 1.3 mg piridoksin vitamini bulunduğu iddia edilmektedir. Hazırlanan numulerin 3 tekrarlı analizlerine ait kromatogramlar Şekil 6.16' da görülmektedir.

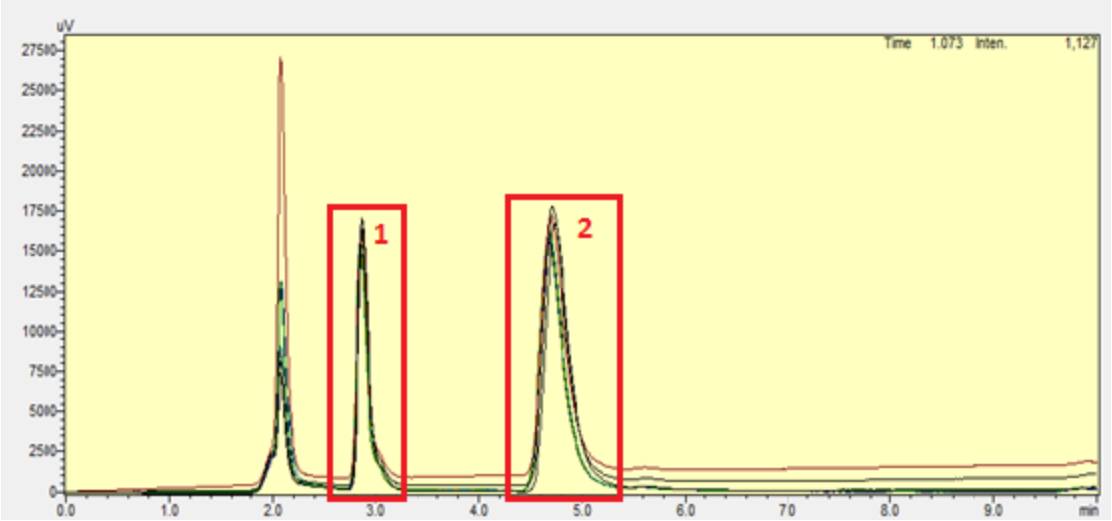


Şekil 6.16 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15), Zorbax SB C18 kolon kullanarak Marka C numunelerinin HPLC sisteminde 3 tekrarlı yapılan analizine ait kromatogramlar.

Kromatogramlardada görüldüğü üzere analit sinyalleri üzerine matrikste bulunan diğer bileşenlerin bir etkisi yoktur. Yapılan hesaplamalara göre Marka C' ye ait 5.0 mL' lik bir ölçekte pik alanı kullanılarak hesaplanan piridoksin miktarı 1.31 ± 0.01 mg, niasin miktarı 11.71 ± 0.10 mg olarak bulunmuştur.

6.7 Niasin ve Piridoksin Vitaminlerinin Yapay Mide Ortamındaki Davranışları

Bu çalışmada yapay mide ortamında niasin ve piridoksinin davranışlarının incelenmesi amacı ile vitamin standartları kullanılmıştır. Yapay mide sıvısı literatürde belirtilen şekilde hazırlanmıştır [115]. 100 mL yapay mide sıvısı için; 200 mg pepsin tartılıp, 80-90 mL 0.03 M NaCl'de çözülerek seyreltik HCI ile pH 1.2' ye ayarlanmış ve hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Vitamin standartları mide ortamına konulduktan sonra 37 ºC' de manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. 1000 mg/L mix standart çözelti mide ortamına konulduktan hemen sonra, son konsantrasyon 5.0 mg/L olacak şekilde 0.dakika olarak HPLC sisteminde analiz edilmiştir. Bundan sonraki her yarım saatte aynı işlemler tekrar edilerek 210 dakika boyunca analizler yapılmış ve Şekil 6.17'deki kromatogramlar elde edilmiştir.



Şekil 6.17 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15), Zorbax SB C18 kolon kullanarak niasin ve pridoksinin yapay mide ortamında 0-210 min aralığındaki bekleme sürelerine ilişkin kromatogramlar.

Kromatogramda gösterilen 1.pik piridoksine 2.pik ise niasine aittir. Şekilde gösterilen 1 ve 2 numaralı pik verilerinde Çizelge 6.5' te de görüldüğü gibi zaman bağlı olarak belirgin şekilde farklılık oluşmadığı gözlemlenmiştir. Analit sinyallerinde bir bozunma tespit edilmemiş olup bu sinyallere ilave olarak bozunma ürün sinyal(ler)i görülmemiştir.

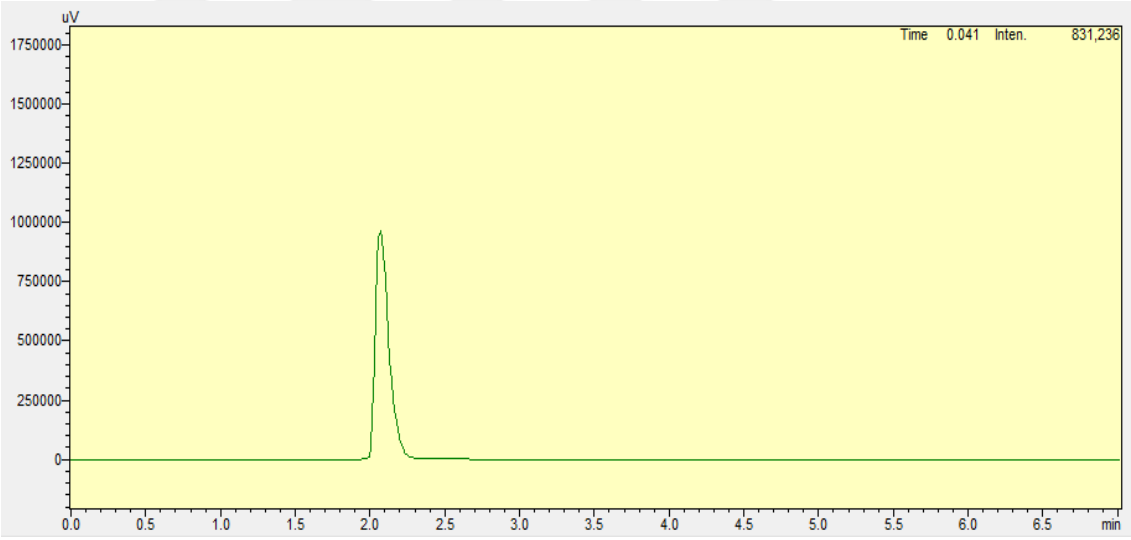
Çizelge 6.5 Niasin ve piridoksinin yapay mide ortamında bekleme sürelerine ilişkin pik alanları

	Piridoksin(pik alanı)	**Niasin (pik alanı)**
0.min	16331	171213
30. min	16756	17319
60. min	15587	16225
90. min	15413	16038
120. min	14903	15584
150. min	15127	15765
180. min	15512	16120
210. min	15024	15608

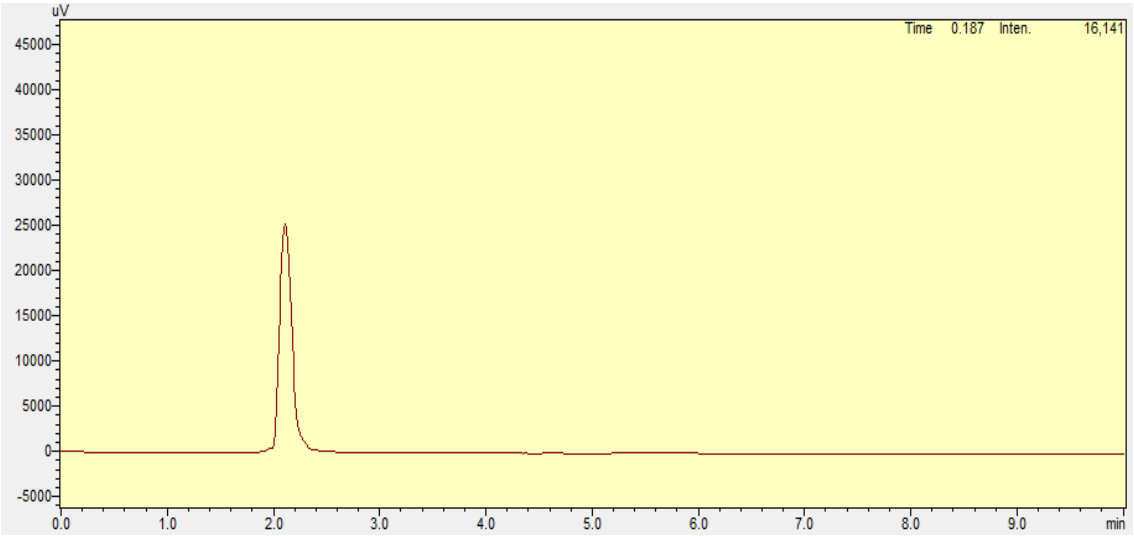
Yapay mide ortamına ait yapılan çalışmada, hazırlanan mix standart çözelti kullanıldığından ve analitlerin daha önceki çalışmalarla aynı alıkonma zamanına sahip olduğu kanıtlandığından spike deneyi yapılmamıştır.

6.8 Musluk Suyu ve Atık Su Numunelerinde Bulunan Niasin ve Piridoksinin Kantitatif Tayinleri

Musluk suyu ve yoğun bir matrikse sahip olan atık su numunelerinde bulunan niasin ve piridoksinin yüksek doğrulukla ve duyarlılıkta kantitatif olarak tayin edilip edilemediğinin tespiti amacı ile numuneler optimum şartlar altında analiz edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda Yıldız Teknik Üniversitesi Çevre Mühendisliği bölümünden atık su numunesi temin edilmiştir. Belli bir miktar atık su numunesi süzüldükten sonra içerisinde niasin ve piridoksin olup olmadığının tespiti amacıyla optimum koşullar altında HPLC sistemine gönderilmiş ve Şekil 6.18'deki kromatogram elde edilmiştir.



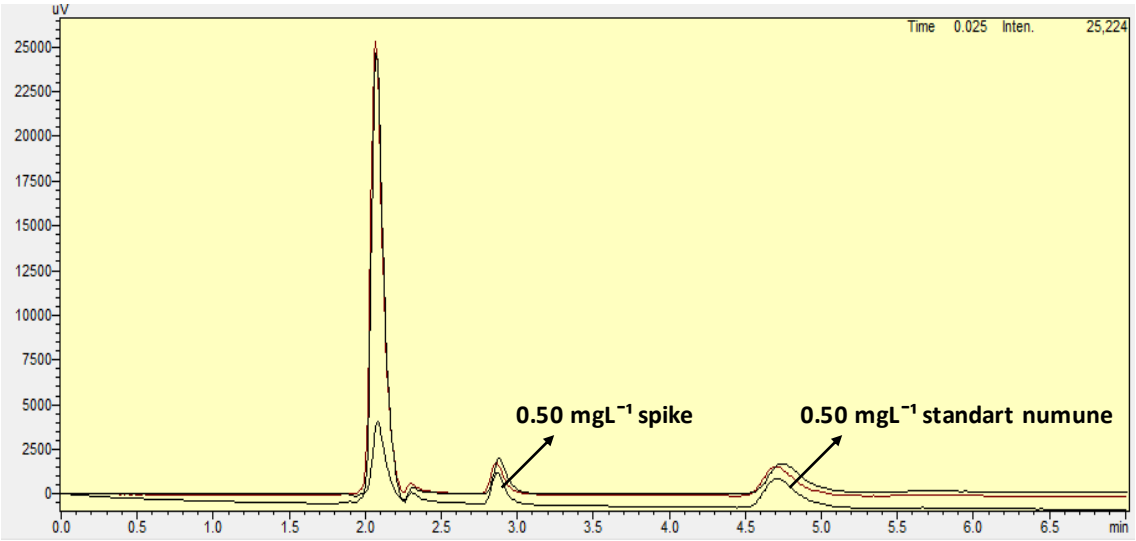
Şekil 6.18 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15), Zorbax SB C18 kolon kullanarak atıksu örneğinden optimum şartlarda elde edilen kromatogram.



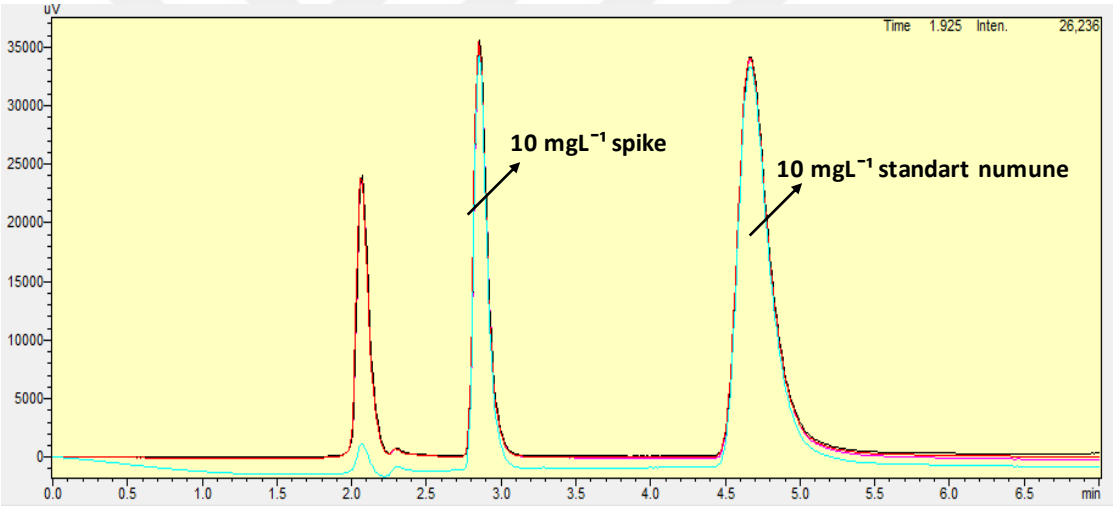
Şekil 6.19 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15), Zorbax SB C18 kolon kullanarak musluk su örneğine ait kromatogram.

Şekil 6.18 ve 6.19' de görüldüğü gibi 10 dakikalık analiz süresinde atık su ve musluk suyu numunelerinde niasin ve piridoksin görülmemiştir.

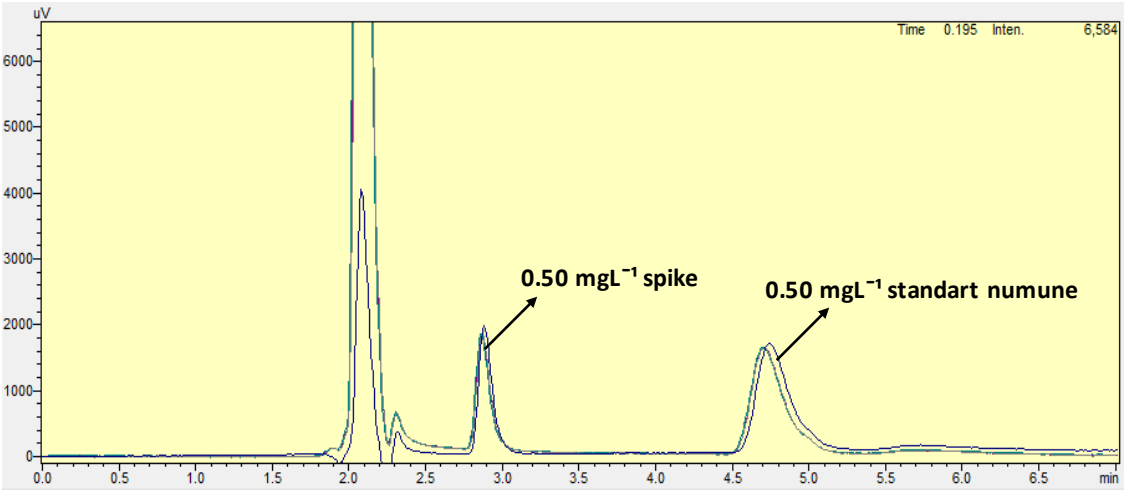
Atık suda ve musluk suyunda bu analitlerin bulunduğu durumda, geliştirilen analitik yöntemin kantitatif tayinlerde yüksek doğrulukta sonuçlar elde edilip edilemeyeceğinin tespit edilmesi ve matriksin analit sinyali üzerine olan etkisin incelenmesi için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. % geri kazanım değerleri 0.50 mg L^{-1} ve 10 mg L^{-1} derişimi için bulunmuştur. Çalışmada 10 mL' lik balon jojeye 1.0 mL 5.0 mg L^{-1} derişimindeki standart çözelti konulmuş ve hacmine atık su ile tamamlanmıştır. 10 mg L^{-1} lik spike numunesinin hazırlanması için 10 mL' lik balon jojeye 1.0 mL 100 mg L^{-1} mix standart çözelti konulmuş ve atık su ile hacim tamamlanmıştır. Aynı işlemler musluk suyu için de tekrarlanmıştır. Hazırlanan spike numuneleri HPLC sisteminde 3 tekrarlı olarak analiz edilmiş ve standart numuneler ile kıyaslanıp % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.



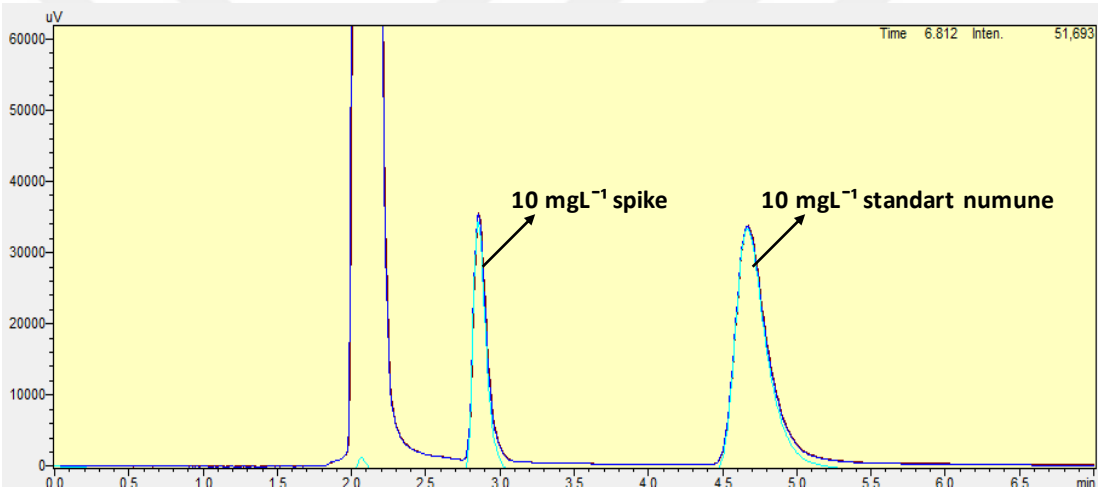
Şekil 6.20 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15), Zorbax SB C18 kolon kullanarak musluk suyunda 0.50 mg L^{-1} spike numune ile 0.50 mg L^{-1} standart çözeltiye ait kromatogramlar.



Şekil 6.21 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15), Zorbax SB C18 kolon kullanarak Musluk suyunda 10 mg L^{-1} spike numune ile 10 mg L^{-1} standart çözeltiye ait kromatogramlar.



Şekil 6.22 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15), Zorbax SB C18 kolon kullanarak Atık suda 0.50 mg L^{-1} spike numune ile 0.50 mg L^{-1} standart çözeltiye ait kromatogramlar.



Şekil 6.23 23 mM, pH 3.54 H_3PO_4-CH_3OH (85:15), Zorbax SB C18 kolon kullanarak Atık suda 10 mg L^{-1} spike numune ile 10 mg L^{-1} standart çözeltiye ait kromatogramlar.

Musluk suyu ve atık suda yapılan çalışmalarda analit sinyali üzerine matriks etkisinin olup olmadığının incelenmesi için standart çözeltiler kullanılarak kalibrasyon doğrusu çizilmiş ve musluk suyu ve atık su numunelerindeki niasin ve piridoksin miktarları bulunmuştur. Kromatogramlarda görüldüğü üzere iki analitin alıkonma sürelerinde bir değişiklik tespit edilmemiştir. Standart numuneler ile elde edilen alıkonma süreleri ile su ve atık su örneklerinde yapılan spike çalışmalarda elde edilen analit alıkonma süreleri aynı bulunmuştur. Bu durum geliştirilen analitik yöntemin yoğun matrikslerde bile matriks etkilerinden uzak bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

Musluk suyunda spike edilen numunede 0.50 mg L^{-1} piridoksin ve niasin beklenirken bu değer 0.45 mg L^{-1} piridoksin ve 0.52 mg L^{-1} niasin olarak bulunmuştur. Bu da bize geri kazanım değerlerinin sırasıyla %90 ve %105 olduğunu göstermiştir. Yine musluk suyunda 10 mg L^{-1} spike edilen numune piridoksin 10.1 mg L^{-1}, niasin 9.9 mg L^{-1} olarak bulunmuş, geri kazanım değerinin piridoksin ve niasin için %101 ve %99 olarak hesaplanmıştır. Atık su numunelerinde 0.50 mg L^{-1} derişiminde olması beklenen piridoksin ve niasin miktarları sırasıyla 0.47 mg L^{-1} ve 0.485 mg L^{-1} olarak bulunmuş, geri kazanım değerlerinin % 94 ve % 97 olduğu tespit edilmiştir. Yine atık suda 10 mg L^{-1} spike edilen numunede piridoksin 9.75 mgL^{-1}, niasin 9.8 mg L^{-1} olarak bulunmuştur. Geri kazanım değerleri piridoksin ve niasin için %97.5 ve %98 olarak hesaplanmıştır.

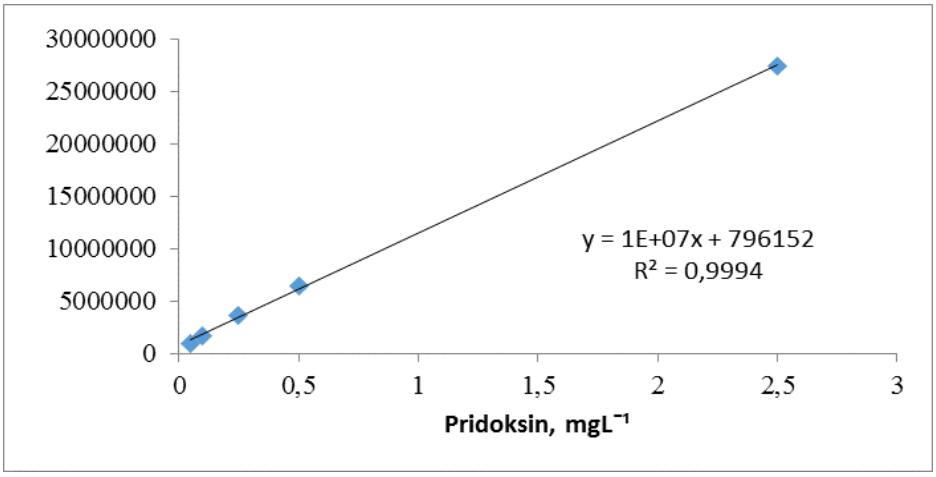
6.9 LC/Q-TOF/MS Sisteminde Sistem Analitik Performans Değerlerinin Tespiti

Bu çalışmada ilaç piyasasında satılan ve içerisinde niasin ve piridoksin içeren tabletlerin analizinin LC/Q-TOF/MS cihazı ile yapılmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle sistem analitik performans değerleri hesaplanmıştır. 0.005 mg L^{-1} - 5.0 mg L^{-1} aralığındaki kalibrasyon çözeltileri 1000 mg L^{-1} lik stok standart çözeltilerden seyreltilerek hazırlanmış ve iç standart olarak da hekzametoksifosfazin ($C_6H_{18}N_3O_6P_3$) 0.4 mg L^{-1} konsantrasyonunda kullanılmıştır. Niasin için 5.00 min lik bir alıkonma elde edilirken, piridoksin için 6.75 min' lik bir alıkonma zamanı elde edilmiştir. QTOF-LCMS analizleri için belirlenen optimum koşullar Çizelge 6.7'de verilmiştir.

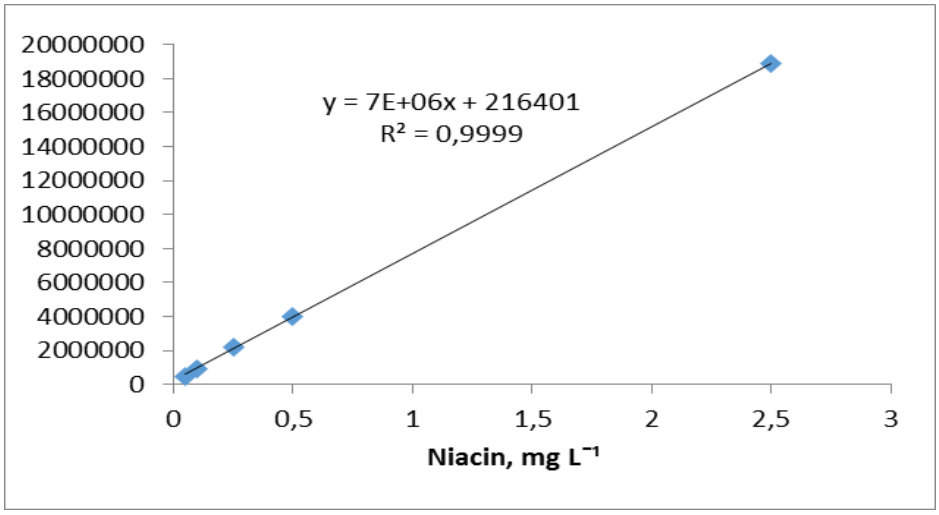
Çizelge 6.7 LC/Q-TOF/MS sisteminde Poroshell (3 x 150 mm, 2.7 µm) EC C18 kolon kullanılarak optimum koşullar altında uygulanan gradient programı.

Süre	**Mobil faz** A: H_2O + % 0.1 Formik asit B: Metanol	**Akış Hızı (mL/min):** 0.50
0.00	A: % 90, B: % 10	0.50
2.30	A: % 80, B: % 20	0.50
3.00	A: % 1, B: % 99	0.50
3.90	A: % 1, B: % 99	0.50
5.00	A: % 80, B: % 20	0.50
6.00	A: % 90, B: % 10	0.50

Şekil 6.23 ve Şekil 6.24'de niasin ve piridoksinin pik alanlarını kullanarak elde edilen kalibrasyon doğruları görülmektedir.

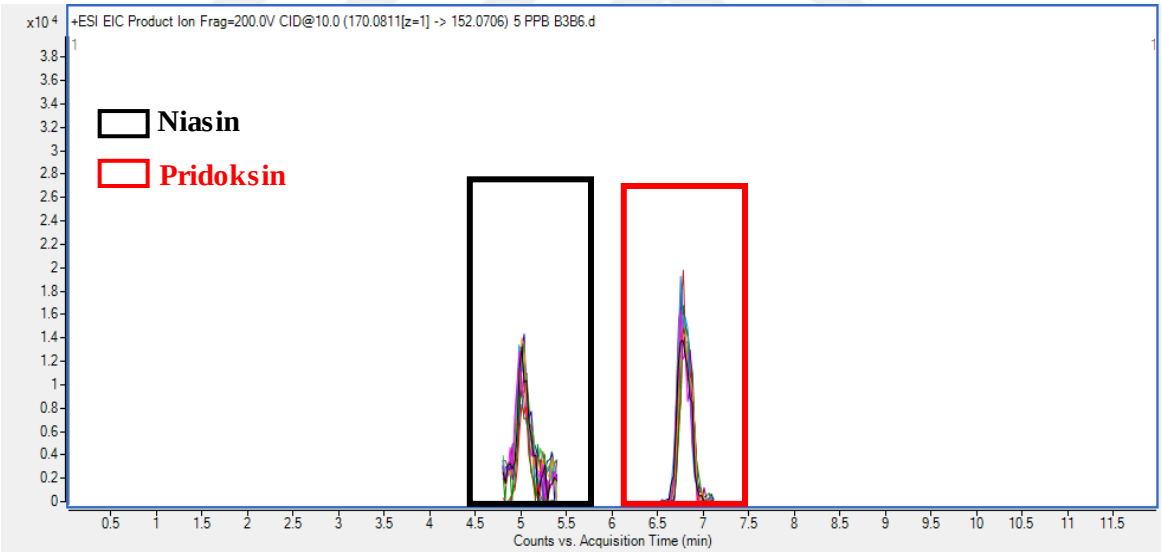


Şekil 6.24 Poroshell 3x150x2.7 EC C18 kolonda H_20-CH_3OH mobil fazı kullanılarak optimum şartlar altında elde edilen pridoksine ait kalibrasyon doğrusu.

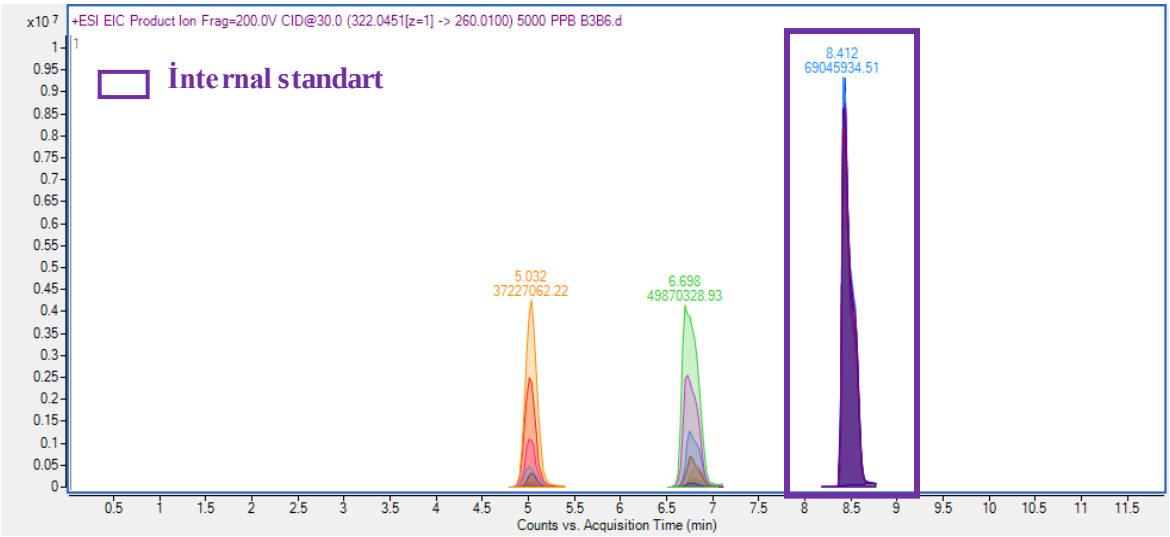


Şekil 6.25 Poroshell 3x150x2.7 EC C18 kolonda H_20-CH_3OH mobil fazı kullanılarak optimum şartlar altında elde edilen niasine ait kalibrasyon doğrusu.

LC/Q-TOF/MS sisteminin LOD ve LOQ değerlerinin tespiti amacı ile kalibrasyon grafiğinde kullanılan en düşük derişim 5.0 µg L^{-1} konsantrasyonundaki standart çözelti sisteme 8 defa gönderilmiş ve Şekil 6.26' daki kromatogramlar elde edilmiştir.

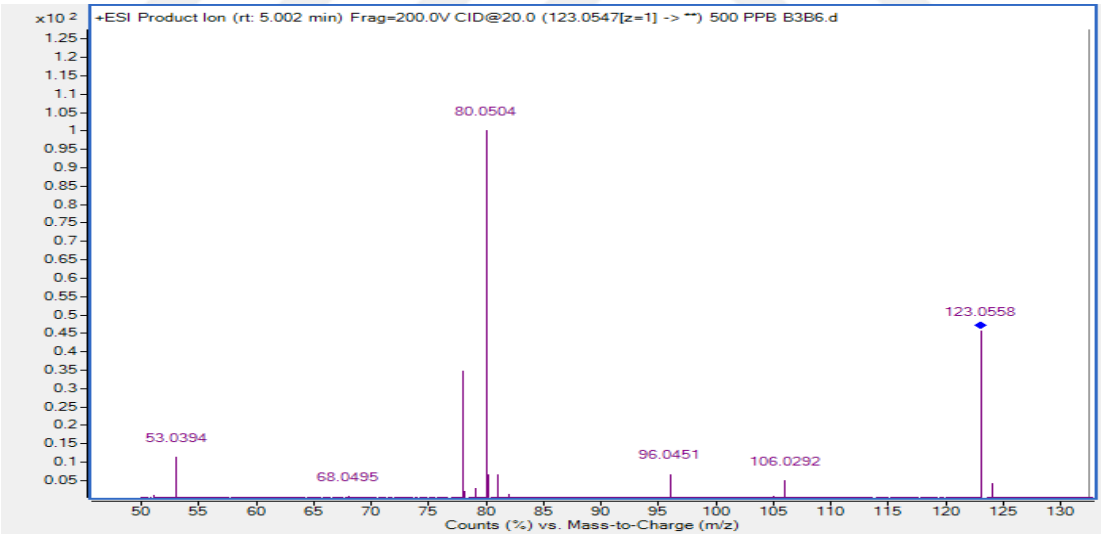


Şekil 6.26 5.0 µg L^{-1} konsantrasyonundaki niasin ve piridoksinden oluşan mix standart çözeltinin H_20-CH_3OH mobil fazı kullanılarak LC/Q-TOF/MS sistemine tekrarlı gönderilmesi sonucu elde edilen kromatogramlar.

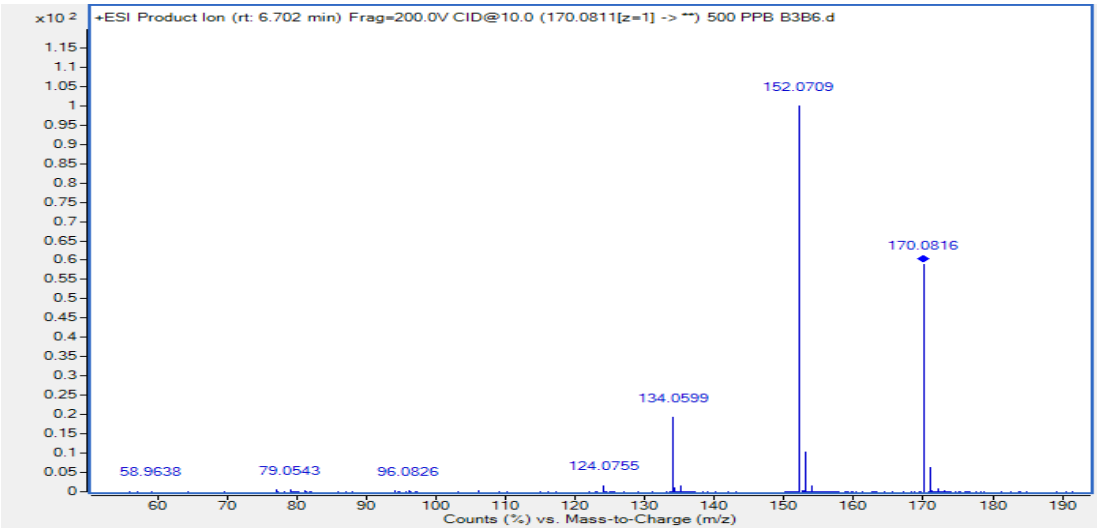


Şekil 6.27 5.0-5000 µg L^{-1} konsantrasyon aralığındaki niasin ve piridoksinden oluşan mix standart çözeltinin H_20-CH_3OH mobil fazı kullanılarak LC/Q-TOF/MS sistemine optimum şartlar altında gönderilmesi sonucu elde edilen kromatogramlar.

Kantitatif sonuçların hesaplanmasında niasin için en yüksek sinyalin elde edildiği parçalanma ürünü olan 80.0504 iyonu kullanılmış ve piridoksin için 152.0709 iyonu kullanılmıştır. Şekil 6.28 ve 6.29' da parçalanma ürünlerine ait kromatogramlar verilmiştir.



Şekil 6.28 Niasine ait kantitatif sonuçların hesaplanmasında kullanılan iyonlara ait kromatogram



Şekil 6.29 Pridoksine ait kantitatif sonuçların hesaplanmasında kullanılan iyonlara ait kromatogram

LC/Q-TOF/MS sisteminde analitler için elde edilen sistem analitk performans verileri Çizelge 6.8' de verilmiştir.

Çizelge 6.8 LC/Q-TOF/MS sisteminde niasin ve piridoksin için elde edilen sistem analitik performans değerleri.

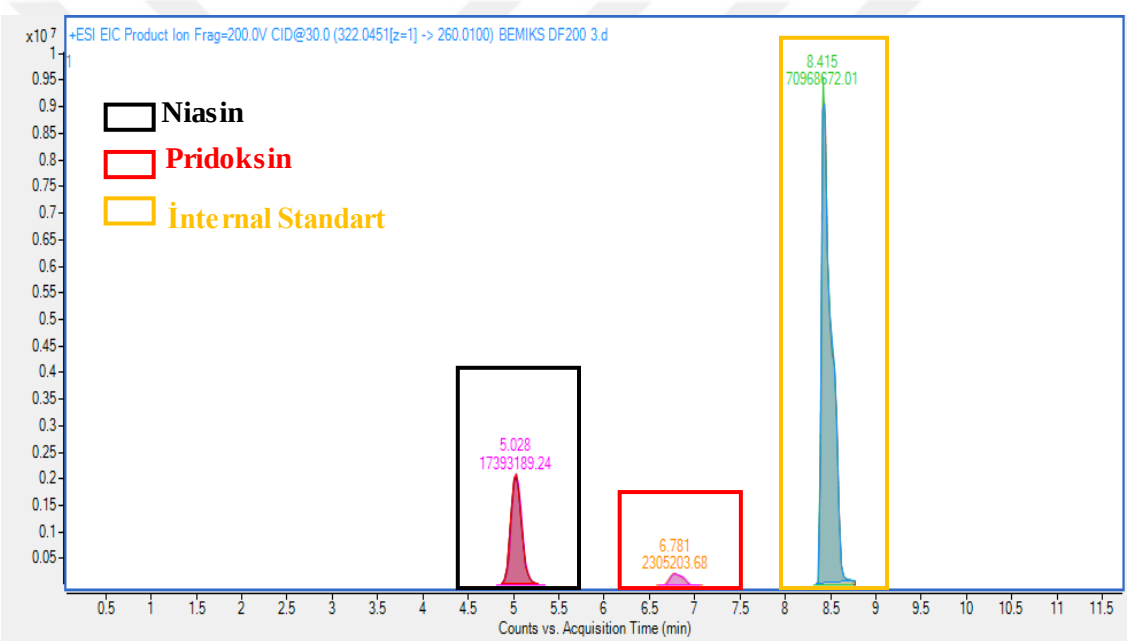
	Niasin	**Piridoksin**
LOD, µg/L	1.98	1.3
LOQ, µg/L	6.59	4.4
R^2	0.9999	0.9994
y=mx+n	y = 7E+06x + 216401	y =1E+07x + 796152

6.10 İlaç Endüstrisinde Bulunan Niasin ve Piridoksin İçeren Tabletlerin Q-TOF LC/MS ile Kantitatif Analizleri

HPLC sisteminde analiz edilen iki adet tablet ve bir adet şurup örneği aynı şartlarda hazırlanarak LC/Q-TOF/MS sisteminde analize hazır hale getirilmiştir.

6.10.1 Marka A

Ürünün prospektüsünde 1 adet tablette 20 mg niasin, 2.0 mg piridoksin olduğu iddia edilmektedir. Piridoksin derişimi 0.20 mg L^{-1} ve Niasin derişimi 2 mg L^{-1} olacak şekilde hazırlanan Marka A'nın LC/Q-TOF/MS sisteminde optimum koşullar yapılan 3 tekrarlı yapılan analizine ait kromatogramlar Şekil 6.30' da görülmektedir.



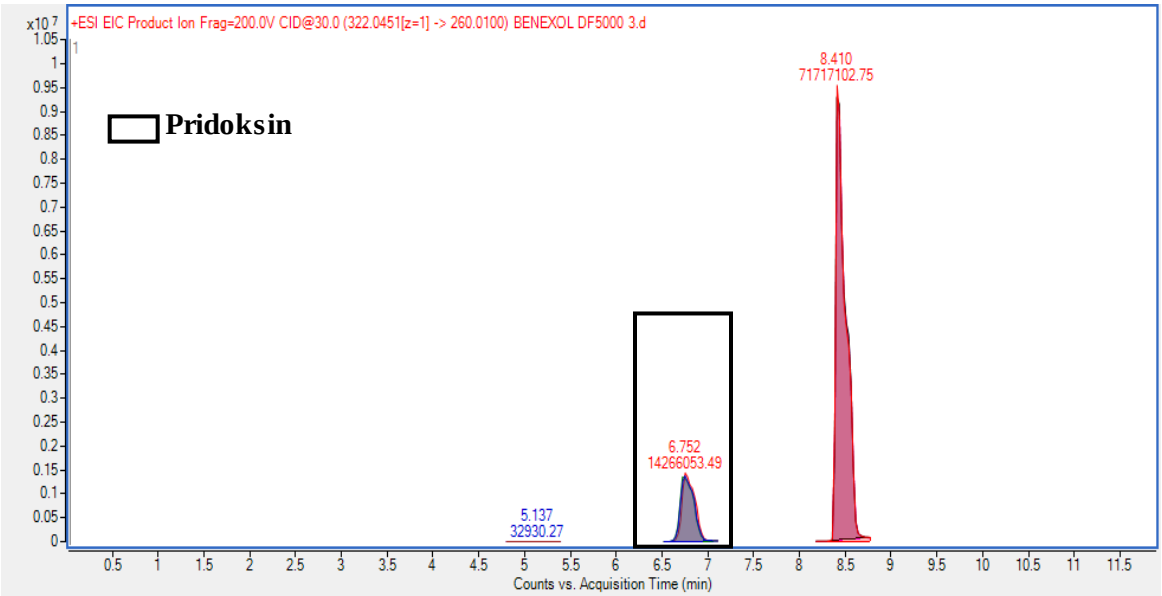
Şekil 6.30 Marka A numunelerinin LC/Q-TOF/MS sisteminde niasin, piridoksin ve iç standarda ait 3 tekrarlı analize ait kromatogramlar.

Yapılan hesaplamalara göre Marka A' ya ait tablet içerisinde pik alanı kullanılarak bulunan piridoksin miktarı 1.79 ± 0.03 mg, niasin miktarı 21.19 ± 0.67 mg olarak bulunmuştur.

6.10.2 Marka B

Ürünün prospektüsünde 1 adet tablette 250 mg piridoksin olduğu iddia edilmektedir. Piridoksin derişimi kalibrasyon grafiğinin ortalarına gelecek şekilde hazırlanan Marka

B'nın LC/Q-TOF/MS sisteminde optimum koşullar yapılan 3 tekrarlı yapılan analizine ait kromatogramlar Şekil 6.31' de görülmektedir.

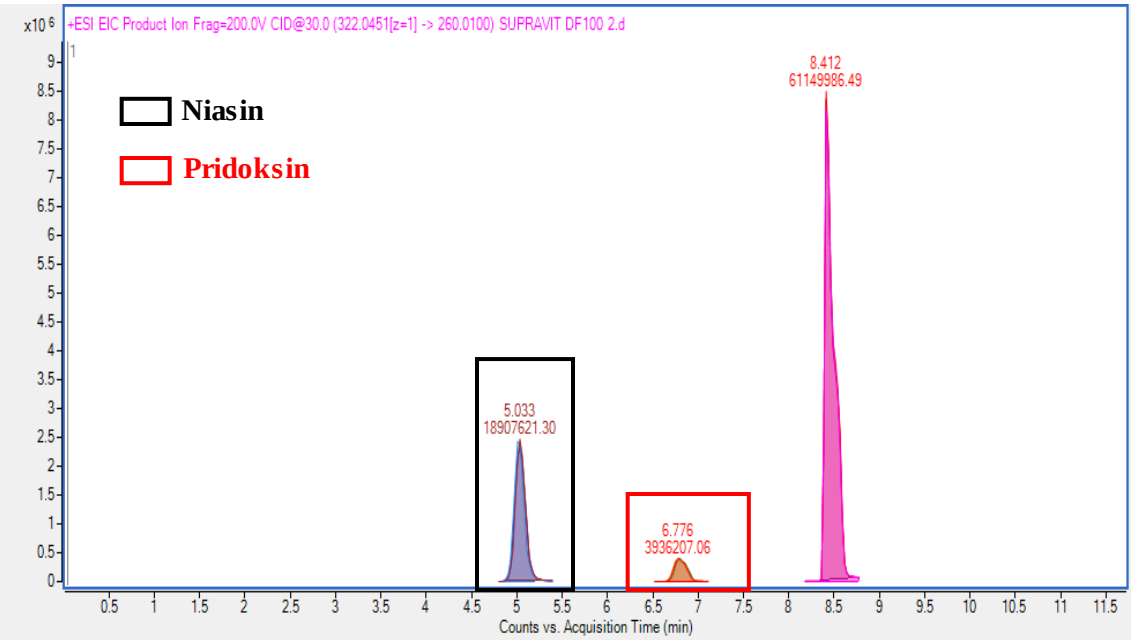


Şekil 6.31 Marka B numunelerinin LC/Q-TOF/MS sisteminde piridoksine ait 3 tekrarlı analize ait kromatogramlar.

Yapılan hesaplamalara göre Marka B 'ya ait tablet içerisinde pik alanı kullanılarak bulunan piridoksin miktarı 272.60 ± 8.40 mg olarak bulunmuştur. Bu sonuçların prospektüslerinde belirtilen sonuçlara çok yakın olduğu görülmüştür.

6.10.3 Marka C

Şurup şeklinde bir ilaç olan Marka C' nin ürün prospektüsünde her bir 5.0 mL' lik ölçek için 11 mg niasin, 1.3 mg piridoksin vitamini bulunduğu belirtilmektedir. Hazırlanan numulerin 3 tekrarlı analizlerine ait kromatogramlar Şekil 6.32'de gösterilmiştir.



Şekil 6.32 Marka C numunelerinin LC/Q-TOF/MS sisteminde niasin ve piridoksine ait 3 tekrarlı analize ait kromatogramlar.

Yapılan hesaplamalara göre Marka C 'ye ait 5.0 mL' lik bir ölçekte pik alanı kullanılarak bulunan piridoksin miktarı 1.24 ± 0.01 mg, niasin miktarı 11.77 ± 0.13 mg olarak bulunmuştur.

6.11 HPLC ile Q-TOF LC/MS Analizlerine Ait Sonuçlar

Marka A, Marka B, Marka C' nin iki farklı cihazda yapılan analiz sonuçları Çizelge 6.7' de verilmiştir. Çizelge 6.9'da görüldüğü gibi her iki cihazda yapılan analizlere ait sonuçlar birbiriyle uyum içerisindedir.

Çizelge 6.9 Niasin ve piridoksinin HPLC ve Q-TOF LC/MS sistemlerinde yapılan kantitatif analizlere ait sonuçlar.

	HPLC Analizine Ait Sonuçlar		**LC/Q-TOF/MS Analizine Ait Sonuçlar**	
	Niasin	**Piridoksin**	**Niasin**	**Piridoksin**
Marka A	19.78 ± 0.02	1.87 ± 0.02	21.19 ± 0.67	1.79 ± 0.03
Marka B	-	262.0 ± 10.2	-	272.60 ± 8.40

Çizelge 6.9 Niasin ve piridoksinin HPLC ve Q-TOF LC/MS sistemlerinde yapılan kantitatif analizlere ait sonuçların (devamı)

Marka C	11.71± 0.10	1.31 ± 0.01	11.77 ± 0.13	1.24 ± 0.01

BÖLÜM 7

ÇEVRE ÖRNEKLERİNDE Cr(III) VE Cr(VI) TÜRLERİNİN IC-ICP-MS SİSTEMİNDE ESER SEVİYELERDE EŞZAMANLI TAYİNLERİ

7.1 Metal ve Ağır Metallerin Tanımı ve Tarihçesi

Element, aynı cins atomlar topluluğu olarak tanımlanır [116]. Metaller, yüksek elektrik iletkenliğine, karakteristik bir parlaklığa ve basınç altında kırılmadan şekil değiştirebilme yeteneğine sahip elementlerdir. Al, Ag, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Hg, Pb, Zn gibi elementler metaldir [117].

Ticari ve endüstriyel kullanımın her geçen gün artmasına bağlı olarak metal ve ağır metallerin canlı dokularda birikimi endişeye neden olmaktadır. Metallerin cevherleri işlenmeye başlandığından beri metaller atmosfere, hidrosfere ve pedosfere yayılmaya başlamıştır. Yüzyıllar boyunca insanlar ağır metallerin gerek çevreye gerekse insan sağlığına olan etkilerini bilmeden takı, silah, su borusu gibi birçok alanda çeşitli amaçlar için kullanmışlardır. Sanayileşmenin artması ile birlikte ağır metal kirliliği artmış ve buna bağlı zehirlenmeler ilk olarak japonyada ortaya çıkmıştır [118]. Ağır metaller termik santraller, cam üretimi, çimento üretimi gibi çeşitli endüstriyel faaliyetler neticesinde çevreye yayılırlar. Havaya atılan ağır metaller buradan bitkiler ve besin zinciri yoluyla hayvanlara ve oradan da insanlara ulaşır. Hayvanlar ve insanlar tarafından aeresol olarak veya toz halinde solunurlar. Bunun sonucu olarak insanlar ve diğer canlılar üzerinde ağır tahribatlar oluşması mümkündür. Ağır metal tanımı, fiziksel olarak yoğunluğu 5g/cm^3 ten daha yüksek olan metaller için kullanılır. Ağır metal gurubuna krom, kadmiyum, kurşun, demir, kobalt bakır, civa, çinko olmak üzere 60'tan fazla metal dahil edilmektedir [119].

Temel Endüstrilerden Atılan Metal Türleri Çizelge 7.1 de gösterilmiştir [118].

Çizelge 7.1 Endüstrilerden atılan metal türleri.

Endüstri Türü	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Ni	Sn	Zn
Kağıt Endüstrisi	-	+	+	+	+	+	-	-
Petrokimya	+	+	-	+	+	-	+	+
Klor-alkali üretimi	+	+	-	+	+	-	+	+
Gübre Sanayi	+	+	+	+	+	+	-	+
Demir-çelik Sanayi	+	+	+	+	+	+	+	+
Enerji Üretimi(Termik)	+	+	+	+	+	+	+	+

7.2 Ağır Metallerin Etkileri

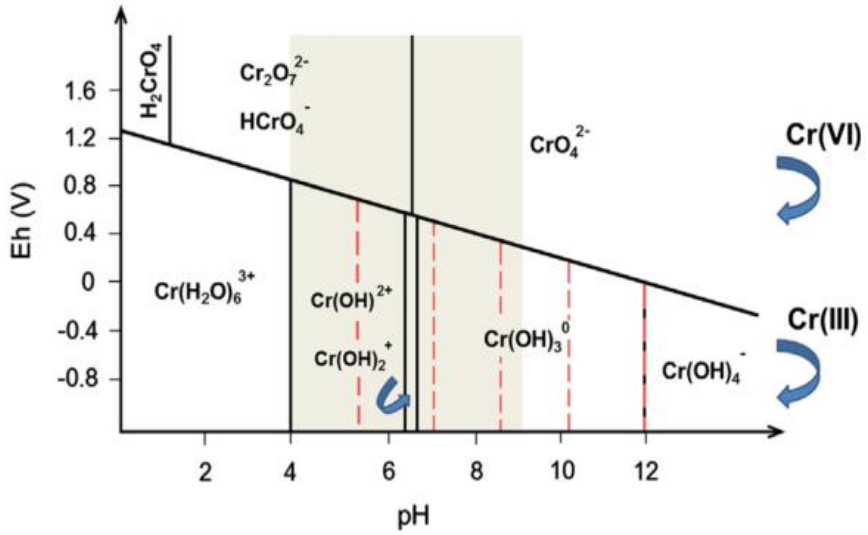
Yaşamsal faaliyetlerin devamlılığı için bazı metallerin belirli konsantrasyonlarda düzenli olarak besin yoluyla alınması gereklidir. İnsan vücudu için gerekli eser elementler arasında krom, kobalt, vanadyum, selenyum, çinko ve demir yer almaktadır. Tedavi amaçlı kullanılan eser elementler, insan vücudunda gerekli olmayan lityum, altın, bizmut, galyum, platindir. Gerekli olmayan toksik elementler ise gümüş, nikel, arsenik, civa, antimon, titandır. Ağır metaller biyolojik proseslerde aynı etkilere sahip değillerdir. Örneğin bakır hayvanlarda ve insanlarda kırmızı kan hücrelerinin üretimi için gerekli olduğu gibi saç ve derinin yapısında da bulunur ve vücuda alınması gerekmektedir. Buna karşılık kurşun ve civa gibi bazı ağır metallerin çok düşük konsantrasyonlarda dahi alınması psikolojik olarak etkileyip çeşitli sağlık problemlerine neden olmaktadır. Ağır metaller bütün canlı organizmaları aynı düzeyde etkilemezler. Nikel bitkiler açısından toksik etki gösterirken, hayvanlarda eser düzeyde bulunması gerekir. Farklı sistemlerdeki ağır metallerin etki mekanizması konsantrasyonlarına bağlı olarak değişir genel kanısından ziyade etki canlı türüne ve metal iyonunun yapısına bağlıdır [120].

7.3 Krom Hakkında Genel Bilgiler

7.3.1 Kromun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Krom ilk kez 1789' da Fransız L.N. Vauquelin tarafından üretilmiş ve çok renkli olmasından dolayı yunanca renkler anlamına gelen 'chrome' olarak adlandırılmıştır. Krom periyodik tabloda VIB gurubunda yer alan gümüş renkli elementtir. Atom numarası 24 ve kütle numarası 51,996 olup yoğunluğu 7.14 g/cm^3, kaynama noktası 2482 °C, erime noktası 1550 °C, elektron dağılımı: [Ar] $3d^5$ $4s^1$ şeklindedir. Krom dünyanın kabuğunda en bol bulunan 7.element olup 21.yüzyılda en çok rastlanan elementlerden biridir. Doğal krom, dört kararlı izotopu olan ^{50}Cr (% 4.31), ^{52}Cr (% 86.76), ^{53}Cr (% 9.55) ve ^{54}Cr ün (% 2.38) kanşımı biçiminde bulunur. Kısa ömürlü radyoaktif beş izotopa sahiptir. ^{48}Cr (238 s), ^{49}Cr (41.9 min), ^{51}Cr (27.8 gün), ^{55}Cr (3.5 min), ^{56}Cr (5.9 min). Krom yüksek sıcaklıkta birçok elementle reaksiyona girer. Krom, seyreltik HCl ya da H_2SO_4 içinde hızla çözünürken nitrik asit ve fosforik asitte çözünmez. Doğada serbest halde bulunmayıp kromit minerali ($FeCr_2O_4$) halinde bulunur. Dünyada en çok Afrika, Rusya ve Türkiye' de (Bursa, Fethiye, Guleman) bulunur. Cevheri karbon ya da silisyumla ferrokroma indirgenir. 3d ve 4s orbitallerinde bulunan elektronları kimyasal reaksiyonlara katıldığından dolayı, kromun değerliği +2, +3, +4, +5, +6 olabilmektedir. Doğada en çok (III) ve (VI) oksidasyon basamaklarında bulunabilmektedir. Kromun +3 ve +6 oksidasyon basamakları birbirinden farklı özelliklerde olup kimyasal ve biyokimyasal olarak da farklı reaktivitelere sahiptirler [121].

Farklı oksidasyon basamaklarındaki krom türlerinin oluşması başta pH olmak üzere, indirgenme/yükseltgenme reaksiyonu, çöktürme/çözülme, adsorbsiyon/desorpsiyon fizikokimyasal prosesler sonucu gerçekleşmektedir [122]. Cr (VI), pH 5.8' in altındaki asidik ortamlarda bikromat ve kromat şeklinde oluşurken, nötral ve alkali ortamlarda CrO_4^{2-} anyonları şeklinde oluşur [123].



Şekil 7.1 Krom türlerinin Eh-pH ile değişimi [122].

7.4 Kromun Oluşumu

Genel olarak, krom doğal olarak kayalarda, toprakta, bitkilerde, hayvanlarda, volkanik toz ve gazlarda ortak olarak bulunan bir elementtir. Diğer krom kaynağı ise sanayi ve diğer alanlarda kullanılması sonucu oluşan kromdur. Yeryüzünde doğal olarak var olan krom yer kabuğu, hava, su, toprakta bulunurken; diğer kaynaklarda ise gübrelerden, ilaç, yem katkıları, böcek ilaçları, ilaç katkıları, koruyucular ve herbisitlerden kaynaklanmaktadır [124]. Kromun çevresel ortamdaki konsantrasyonu atmosferde < 10 ng m^{-3}, toprakta 500 mg kg^{-1}, bitki örtüsünde <0.5 mg kg^{-1}, tatlı suda < 10 µg L^{-1}, sediment < 80 mg kg^{-1}'dır [125].

Dünyanın kabuğunda doğal olarak bulunan krom konsantrasyonu 0.1-0.3 mg kg^{-1} olarak bilinmektedir. Çevre ve insan sağlığının korunması için toprakta kabul edilebilir seviyenin 64 mg kg^{-1} olduğu tahmin edilmektedir. Tatlı sudaki krom konstrasyonu 0.1-117 mg L^{-1} arasında değişirken deniz suyu 0.2-50 mg L^{-1} krom içermektedir [126].

7.4.1 Toptakta Krom

Ağır metaller toprakta; iyon değişim bölgelerinde absorblanmış olarak, kristallerin ve kristal olmayan inorganik çökeltilerin yüzeyinde ya da organik bileşikler tarafından kompleksleştirilmiş biçimde bulunabilir [127]. Kirlenmiş topraklarda yapılan çalışmalarda toprak yüzeyinde krom konsantrasyonunun yüksek olduğu ve toprak yüzeyinden derinlere gittikçe krom konsantrasyonunun azaldığı gözlenmiştir [128].

Cr(III), insan sağlığı için eser seviyelerde alınması gereken ve toprakda kararlı ve az çözünen bir katyondur. Buna karşın Cr(VI), toprakda çözünür ve hareketli bir anyondur. Toprakta nötr pH'da krom 4 değişik yapıda bulunabilmektedir. Genellikle +3 değerlikli katyon Cr^{3+} ve CrO_2^- olarak bulunurken, +6 değerlikli krom ise $Cr_2O_7^{2-}$ ve CrO_4^{2-} şeklinde bulunur. Cr(III)'ün topraktaki davranışı büyük oranda pH' ya bağlıdır. pH 5-6 nın üzerinde krom çözünmez ve kompleks oluşturur. pH değeri 4 üzerinde olduğunda +3 değerlikli krom çökelmeye başlar ve hidrojen iyonları adsorblanır ya da toprak tarafından kompleksleştirilir. Toprağın pH'sının düşürülmesi ya da ortamda bulunan manganez oksitler +3 değerlikteki kromun oksidasyonunu artırmakta ve buna bağlı olarak +6 değerlikli krom miktarının artmasına neden olmaktadır [129]. +6 değerlikli krom ise ortamda bulunan Fe(II) ve sülfit gibi indirgeyici ajanların varlığında Cr(III)'e indirgenebilmektedir [130], [131].

7.4.2 Suda Krom

Doğal sularda krom, iki kararlı oksidasyon basamağında Cr(III) ve Cr(VI) olarak bulunur. Bu iki form arasındaki varlığı ve bulunma oranı kimyasal ve fotokimyasal redoks dönüşümü, çöktürme - çözünme ve adsorpsiyon - desorpsiyon reaksiyonlarını içeren çeşitli proseslere bağlıdır. Orta pH değerlerinde Cr(III)/Cr(VI) oranı ortamın oksijen konsantrasyonuna bağlıdır. Oksijenlenmiş yüzey sularında ise sadece pH ve oksijen konsantrasyonuna bağlı olmayıp ortamda bulunan redükleyici ve kompleksleştiricilerin konsantrasyonuna da bağlıdır. Su sistemlerinde kromun ana kaynağı evsel atık su atıklarıdır. Suda ki sistemlerde kromun daha az önemli kaynakları şunlardır: metal imalatı, kanalizasyonun okyanus atığı, kimyasal imalat, demir dışı metallerin işlenmesi ve atmosferik çöküntülerdir [132]. İçme suyunda krom konsantrasyonu Cr(VI)' nın toksik etkileri ve Cr(III)' ün Cr(VI)' ya oksidasyon potansiyeli nedeniyle izin verilen maksimum değeri 0.10 mg/L' dir [133], [134].

7.5 Kullanım Alanları

Krom darbelere ve ısıya dayanıklı olması ile paslanmaz özelliğe sahip olmasından dolayı çok geniş kullanım alanına sahiptir. Savunma sanayisinde geniş kullanım alanı bulmasından dolayı jeopolitik önemi yüksek elementler arasındadır. Özellikle otomobil parçalarında ve kesici aletlerde korozyon önleyici kaplama olarak kullanımı da

yaygındır. Yüksek erime sıcaklığı nedeniyle, tuğla ve kalıp yapımında da rağbet görmektedir. Krom, cama zümrüt yeşili bir renk verir ve sık tercih edilen bir katalizördür.

7.6 Kromun İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Kromun bilinen oksidasyon derecelerinden +3 ve +6 değerlikli kromun insan sağlığına olan etkilerinden daha çok bahsedilmektedir. Cr(III), insan ve hayvan canlılığının devamlılığı için gerekli olan glikoz, lipid ve protein metabolizmasında esas teşkil eder, dolayısıyla çoğunlukla pikolinat veya nikotinat formunda bir diyet takviyesi olarak kullanılır. Krom insülin hareketinde kritik bir kofaktör olarak güçlü bir şekilde rol oynar [135]. Trivalent formunun toksisitesi düşük iken hegzavalent formu toksiktir. Hekzavalent krom cildin ve mukoza zarlarının tahrişine neden olarak boronşlarda alerjik etkiler gösterir. Vücut sıvılarıyla indiregenmeyen Cr(VI) hücre zarına nüfuz ederek eritrositler ve lenfositler tarafından hızlıca emilirler. Diğer metal tuzları arasında kromat tuzları hücre çekirdeğinde DNA'ya zarar vererek kromazomal sapmalara ve hücre transformasyonuna neden olarak çok kısa sürede genotoksik cevaplar vermektedir [136]. 1990 yılından beri Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC, Fransa), kromat üretimi, krom pigmenti üretimi ve krom kaplama endüstrilerinden elde edilen Cr(VI) bileşiklerinin insanlarda karsinojen etkileri sahip olduğunu kanıtlarken Cr(III) bileşiklerinin kanserojenliği açısından insanlarda yetersiz kanıt bulunduğunu belirtmiştir [137], [23]. Derideki hekzavalent formunun ters etkileri ülserleşmeyi, deri iltihaplanmasını ve alerjik reaksiyonlarını içermektedir. Hekzavalent krom bileşiklerinin solunması ülserleşme ve nasal septumdaki mukoz membranların perforasyonu, yutak ve gırtlakta tahriş, bronşit, bronşların spazm şeklinde kasılması ve ödem gibi sorunlara neden olabilir. Solunumla ilgili belirtiler arasında öksürme ve hırıltı, nefesin çabuk kesilmesi, burun kaşıntısı yer almaktadır.

BÖLÜM 8

KROM TAYİN YÖNTEMLERİ

8.1 Spektroskopik Yöntemler

Spektroskopi, bir örnekteki atom, molekül veya iyonların bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımanın ölçülmesi prensibine dayanır. Ultraviyole ve Görünür Bölge Spektroskopisi, Kütle Spektroskopisi, Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi, Floresans ve Fosforesans Spektroskopisi, Atomik Emisyon ve Atomik Floresans Spektroskopisi, İnfrared Spektroskopisi, Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi, Floresans ve Fosforesans Spektroskopisi gibi birçok yöntem spektroskopinin alt dallarını oluşturur [69].

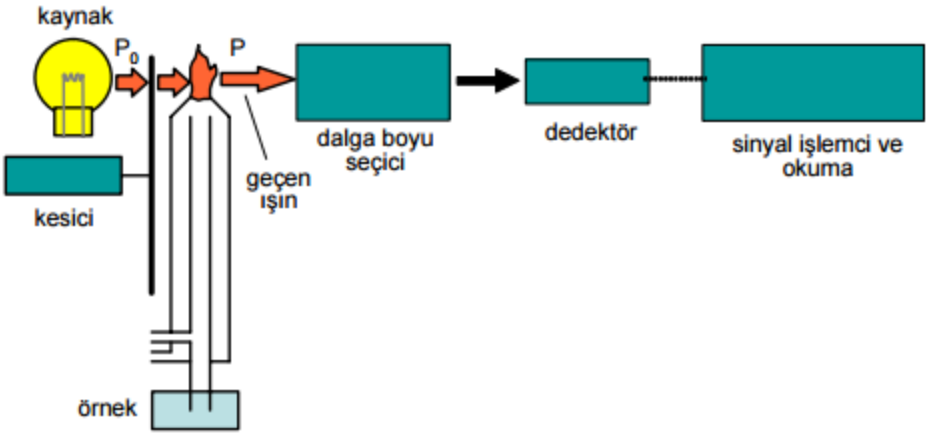
Literatürde krom tayininde yüksek seçicilik sağlayan atomik spektroskopik tekniklerden alevli atomik absorbsiyon spektrometri (FAAS), elektrotermal atomik absorbsiyon spektrometri (ETAAS) ve eşleşmiş plazma- atomik emisyon spektrometri (ICP-AES) gibi yöntemler kullanılmıştır [138].

8.1.1 Atomik Absorbsiyon Spektrometri

Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi, gaz halindeki ve temel enerji düzeyinde bulunan atomların, UV ve görünür bölgedeki ışığı absorplaması ilkesine dayanır. Işıma şiddetindeki azalma ortamda absorbsiyon yapan elementin derişimi ile doğru orantılıdır. Atomik absorpsiyon spektroskopisi metallerin çoğunun tayinini gerçekleştirmek mümkündür. Atomik absorpsiyon spektroskopisinde element, elementel hale

dönüştürüldükten sonra buharlaştırılır ve kaynaktan gelen ışın demetine maruz bırakılır [139].

Şekil 8.1 de atomik absorpsiyon spektroskopisi gösterilmiştir.



Şekil 8.1 Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi [140].

Khmiri ve arkadaşları çimentodaki toplam krom ve hekzavalent kromun hızlı bir şekilde tayini için atomik absorpsiyon spektrometrisini kullanarak analitik bir yöntem geliştirmişlerdir. Örneklerin çözündürülmesi için çeşitli asitlerle muamele edilmiş ve sonuçlardaki kesinliğin, doğruluğun ve tekrarlanabilirliğin kloronitrik ile yapılan örneklerde en yüksek olduğunu kanıtlamışlardır [141].

8.1.2 Elektrotermal Atomik Absorpsiyon Spektrometresi

Elektrotermal atomlaştırıcılar grafit fırın olarak bilinirler. Fırın elektriksel dirençle 3000 ºC' ye kadar istenirse kademeli olarak ısıtılabilmektedir. Alevli sistemlere göre daha pahalı fakat daha avantajlıdır. Özellikle ağır metal elementlerinin analizinde ppb düzeyine kadar inebildikleri için daha fazla tercih edilmektedir. Elektrotermal atomlaştırıcı olarak kullanılan grafit fırın 2-3 cm uzunluğunda 1 cm iç çapındaki tüptür. Bu tüpün her iki yanına bağlanmış elektrik akımı ile ısıtma yapılır. Burada numune çözeltisi 20- 45 s 110 °C de kurutma yapılarak suyu uzaklaştırılır. 350-1200 °C'de, 20-45 s de ısıtılarak organik maddeler uzaklaştırılır. 2000-3000 °C' de, 3-10 s de ısıtılarak atomlaştırılır. Elektrotermal atomlaştırıcılar düşük miktardaki numunelerde bile yüksek duyarlılığa sahip olduğundan alevli atomlaştırıcılara göre daha çok tercih edilir [139].

Mandiwana ve arkadaşları toprak numunelerinden hekzavalent kromu seçici olarak tayin eden bir metod geliştirmişlerdir. Bu, toprak ile reaktif olarak kullandıkları 0.01 M

Na_3PO_4 solüsyon karışımını 5 dakika kaynatarak elde etmişlerdir. Geliştirilen metoda göre toprak örneklerindeki Cr(VI) için gözlenebilme sınırını 0.07 μg g^{-1} olarak bulmuşlardır. İstatistiksel değerlendirme ile valide edilen metoda göre krom türlerinin konsantrasyonlarının toplamının, toplam kromun toplam konsantrasyonunun %95'lik güven düzeyinde olduğunu göstermişlerdir [142].

8.2 Elektroanalitik Yöntemler

Bir elektrokimyasal hücredeki analit çözeltisinin elektrokimyasal özelliklerine dayanan kalitatif ve kantitatif yöntemleri kapsamaktadır. Elektroanalitik yöntemler ile elektrot ara yüzeylerinde meydana gelen yük aktarımının stokiyometrisi ve hızı, kütle aktarım hızı, adsorpsiyon derece, kimyasal tepkimelerin hızı ve denge sabitleri gibi bilgileri elde etmek mümkündür. Elektroanalitik metodları voltametrik, polarografik, amperometrik yöntemler olarak sınıflandırmak mümkündür [143]. Örneğin literatürde sulardaki farklı elementler için voltametrik yöntemler kullanarak farklı oksidasyon basamaklarının toksik özelliklerini ve element türlerinin kararlılıkları hakkında bilgi elde edilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır [144], [145].

Li ve arkadaşları doğal sulardaki Cr(VI)' nın aktif Cr(III) ve aktif olmayan organik Cr(III) türlerinden ayırmak için katodik sıyırma yöntemini kullanarak analitik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem Cr(III) ile dietilen diamin tetra asetik asit (DTPA) ile oluşturduğu kompleksin katalitik katodik davranışlarının incelenmesi prensibine daynır. Bu teknik ile toksik etkileri olan Cr(VI)' nın aktif Cr(III) ve aktif olmayan organik Cr(III) komplekslerinin sudaki tayininde kullanılabileceğini kanıtlamıştır [146].

8.3 Kromatografik Yöntemler

Kimyasal bir karışımdaki farklı yapılara sahip maddelerin birbirleriyle karışmayan iki faz arasındaki dağılım dengelerine göre ayrılmasını sağlayan işlemlerin bütününe kromatografik yöntemlerle ayrırma denir. Sıvı kromatografisinde, türlerin ayrılması, ayırma moduna bağlı olarak polarite, elektrostatik özellikler, boyut ve van der Waals kuvvetleri arasındaki farklılıklardan kaynaklanan sabit bir faz ile sıvı mobil faz arasındaki farklı dağılıma göre gerçekleşir [147].

Krom türlerinin kontaminasyonunu ve miktarlandırma sırasındaki kayıplarını en aza indirgemek veya redoks dönüşümlerini gözlemleyebilmek için on-line ayırma

yöntemleri giderek daha çok kullanılmaktadır [148]. Son yıllarda, yüksek duyarlılık ve seçicilik nedeniyle indüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi, krom tayininde dikkat çeken bir teknik haline gelmiştir. Krom türlerinin uygun kromatografik ayrımını sağlamak için çeşitli yaklaşımlar kullanılsa da; iyon kromatografisi (IC) ile birleştirilen ICP-MS en geniş ve yaygın kullanım alanına sahip tekniklerinden biridir [149].

8.3.1 İyon Değiştirme Kromatografi-Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (IC-ICP-MS)

İndüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometrisi, örneklerin yüksek sıcaklıktaki bir plazmaya, genellikle argon plazma gönderilerek moleküler bağların kırılarak atomların iyonlaştırıldığı bir analitik tekniktir. Örnek, solüsyon halinde örnek giriş sistemi aracılığıyla nebulizöre ve sprey odacığına gönderilir. Burada yüksek hızlı argon akışı sayesinde örnek solüsyonu sisleştirilir. Argon plazmasına çok küçük damlacıklar taşınırken, belirli bir büyüklüğün üzerinde olan damlacıklar atığa gider. 8000-10000 K sıcaklıklardaki plazma örneği buharlaştırır ve iyonize eder. İyonlar atmosferik basınçtan örnekleyici (sampler) ve süzücü (skimmer) konlar aracılığıyla yüksek vakumlu ortama çekilir. İyon lensleri aracılığıyla quadrupola odaklanan iyonlar kütle filtresine yönlendirilir. İyonlar kütle spektrometrede kütle / yük oranına göre ayrılırlar ve detektör tarafından ölçülürler [150].

Barnowski ve arkadaşları kromun elementel türlerinin tespit edilmesi için iyon değiştirme kromatografisi ile ICP-MS'i birleştirmişlerdir. Çalışmada interferansları azaltmak için nitrik asit kullanmışlardır. Krom türlerinin ayrılması için anyon değiştirici kolon kullanarak 1.2 mL/min akış hızında çalışmışlardır. Çeşitli su örneklerinde yapılan yüzde geri kazanım değerleri Cr(III) türü için %87'nin üzerinde elde edilirken, Cr(VI) türü için %100.8 olarak hesaplanmıştır [151].

8.3.2 Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektrometresi (ICP-OES)

Birçok element için kullanılan bu cihazın en büyük dezavantajı tayin limitleridir. ICP-MS cihazında elde edilen tayin limitleri bu cihaz ile elde edilememektedir. Elementlerin eşzamanlı tayinlerinin yapılıyor olması bu cihazı popüler hale getirmiştir. Narukawa ve arkadaşları Avustralya bölgesindeki 9 farklı uçucu küldeki trivalent ve hekzavalent kromun tayini için iyon değiştirme kromatografisi ve ICP-AES (IC-ICP-AES)

kullanarak analitik bir yöntem geliştirmişlerdir. Örneklerdeli krom türleri 0.10 M NaOH ile ekstrakte edilmiştir. Analitlerin birbirinden ayrılması için 1.2 ml/min akış hızında çalışılmış ve toplam analiz süresi 10 dakika olarak belirlenmiştir. Cr(III) için LOD değeri 0.050 mg L^{-1} olarak elde edilirken, Cr(VI) için 0.090 mg L^{-1} olarak bulunmuştur [152].

BÖLÜM 9

ENDÜKTİF EŞLEŞMİŞ PLAZMA KÜTLE SPEKTROMETRESİ (ICP-MS)

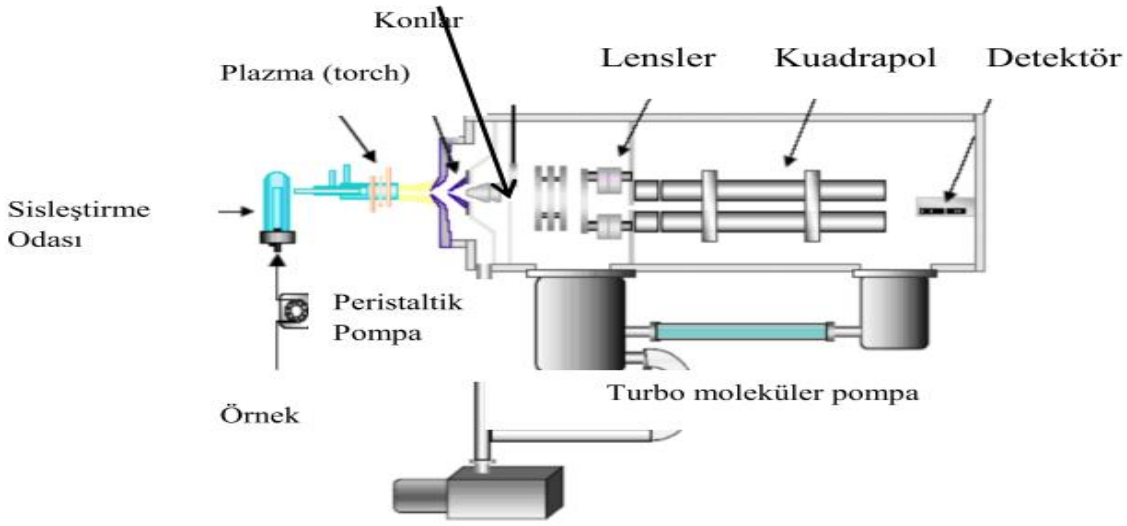
ICP-MS, farklı örnek matrikslerinde bulunan eser ve ultra eser seviyelerdeki pek çok elementin aynı anda hızlı tayinini sağlayan en duyarlı analitik tekniklerden biridir [153]. ICP-MS elementel türlendirme, çoklu izotop oranlarının belirlenmesi, geniş bir doğrusal aralıkta yüksek hassasiyet, oldukça düşük tayin limitlerinde çalışma imkanı sağlar [154], [155]. Farklı matrislerdeki çok sayıda elementi aynı anda tayin edebilme imkanı sayesinde nitel analizlerde, izotop oranlarının belirlenmesinde, periyodik tablodaki elementlerin büyük çoğunluğunun kantitatif tayinlerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır [150], [156]. Gıda, çevre, jeolojik, yarı iletken, biyomedikal ve nükleer alan gibi birçok uygulama alanına sahiptir. ICP-MS eser element tayinlerinde geleneksel olarak atomik absorpsiyon ve ICP-optik emisyon spektrometrisi gibi atomik spektrometrik teknikler, X-ışım floresans yöntemi (XRF), nötron aktivasyon analizi (NAA) ve elektrokimyasal yöntemler gibi pek çok yöntem kullanılmaktadır [157]. Son yıllarda yapılan çalışmalarla birlikte plazma kaynaklı atamlaştırıcıların tercih edilirliği artmıştır. ICP-MS teknoloji diğer elementel analiz teknikleri (atomik absorbsiyon spektrometresi, optik emisyon spektrometresi) ile karşılaştırıldığında kullanılan iyonlaştırıcı kaynağının ICP olmasından dolayı basit ve karmaşık matrislerdeki interferansların etkisini etkili bir şekilde ortadan kaldırması, çoklu element tayinlerinde hızlı olması ve tayin limitlerinin düşük olması gibi üstünlükleri vardır [158], [159], [160].

9.1 Çalışma Prensibi

Analizi yapılmak istenen örnekteki elementler iyonlaştırıldıktan sonra kütle spektrometrometresine gönderilir ve m/z oranlarına göre ayrılıp tayin edilirler. ICP-MS ile optik emisyon spektrometride kullanılan argon plazma kaynağı aynıdır. Argon gazının hem taşıyıcı gaz olarak hem de plazmanın oluşumunda kullanılmasının nedeni periyodik tablodaki birçok elementin 1.iyonlaşma enerjisinin argonun iyonlaşma enerjisi olan 15.76 eV değerinden küçük olmasıdır. Periyodik tablodaki C, N, H, O, F elemetleri ile soygazların (He, Ne, Ar, Xe, Kr, Rn) 1. iyonlaşma enerjisinin argona yakın olması ya da argondan büyük olması nedeniyle ICP-MS ile ölçümleri yapılamaktadır. Elementler plazma içerisinde +1 yüklü pozitif iyonlarına dönüşürler. Örnek çözelti peristaltik pompa kullanılarak sisleştiriciye gönderilir ve aerosol haline dünüştürülür. Oluşan aerosol taşıyıcı gaz olan argon ile ICP' ye taşınır. Burada önce atomlaştırılır daha sonra da iyonlaştırıldıktan sonra arayüz kısmına gönderilir. Arayüzde örnekleyici ve sıyırıcı olmak üzere iki adet ayırıcı koni vardır. Bu koniler iyonların atmosfer basıncından yüksek vakum bölgesine çekilmesini sağlar. İyon lens sistemi sayesinde odaklanan iyonlar m/z oranlarına göre ayrılmak üzere kütle analizörüne gönderilir. Kütle analizörü belirli bir zaman diliminde belirli m/z oranına sahip iyonların geçişine izin verir ve bu iyonların şiddeti elektron çoğaltıcı dedektör (EM) tarafından sırasıyla ölçülür [153].

9.2 Endüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektroskopisi Ekipmanları

1980'lerden itibaren kullanılmaya başlayan ICP-MS cihazı 5 bölümden oluşmaktadır. Bunlar; örnek enjeksiyon kısmı, ICP kısmı, arayüz, iyon lens sistemi, quadropol ve dedektörden oluşur [161].

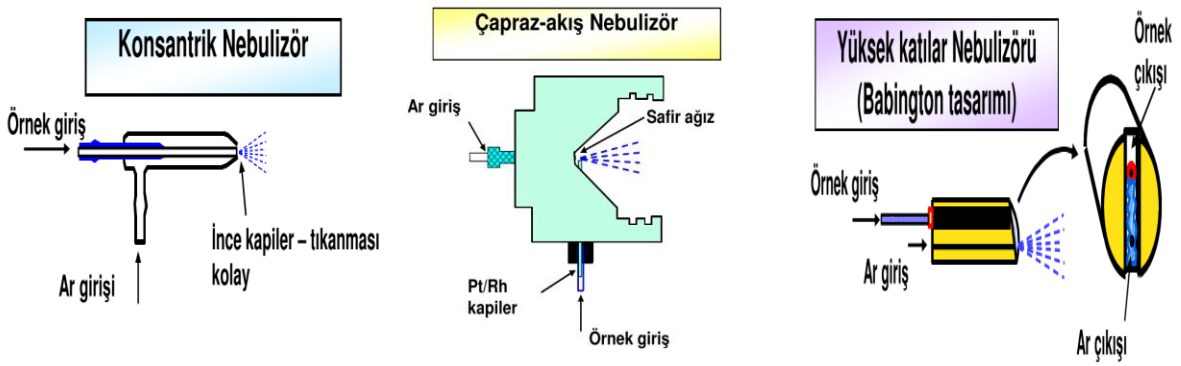


Şekil 9.1 ICP-MS cihazının temel bileşenleri [162].

9.2.1 Örnek Girişi

Örnek giriş sistemi sayesinde sıvı örnekler aerosol haline getirildikten sonra oluşan küçük damlacıklar halinde plazmaya ulaşır. Plazmadaki büyük damlacıklar ise sistemden aynı anda uzaklaştırılır. Sıvı örnekler sisleştirici yardımıyla sisleştrildikten sonra aerosollerine dönüştürülerek küçük damlacıklar halinde plazmaya gönderilir [147], [163].

Elektrotermal buharlaştırma da katı ve sıvı örneklerin verilmesinde kullanılan bir diğer yöntemdir. Analitin buharlaşması elektrotermal cihazında gerçekleştiğinden, plazmanın numuneyi desolvate etmesi gerekmez, bu nedenle plazma, atomizasyon, iyonlaşma ve uyarılma için daha fazla enerjiye sahiptir [164]. Lazer aşındırma sistemi ise 1985 yılından beri katı numunelerin direk analizi için güçlü analitik tekniklerden biridir [165]. LA-ICP-MS kullanımının en önemli avantajı yarı-nicel analiz olup bilinmeyen örneklerin kompozisyonu hakkında fikir vermesidir.

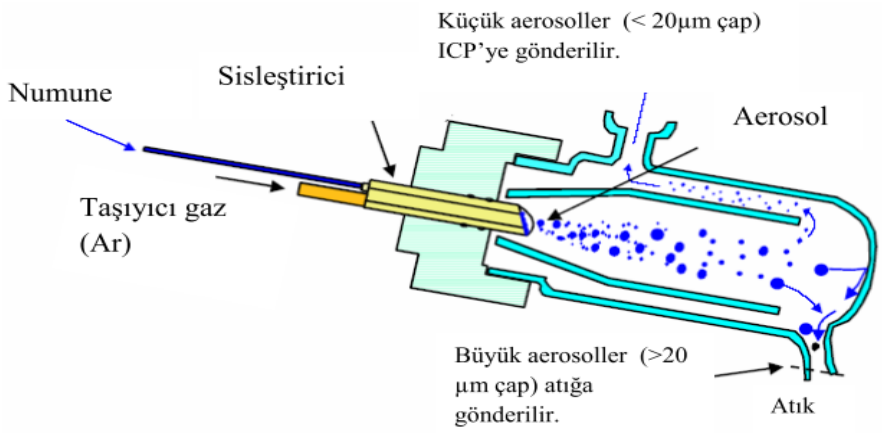


A) B) C)

Şekil 9.2 A: Konsantrik Nebulizör, B: Çapraz Akış Nebulizör, C: Yüksek Katılar Nebulizörü [166].

Konsantrik nebülizörler kuvarz malzemeden yapılmış olup dakikada 0.10 mL' lik akışa kadar düşük hızlarda çalışabilmek için tercih edilmektedir. Bu tip nebülizörlerde örnek argon gazı yardımıyla sisleştirilip taşınır fakat kapiler tüpün çapı küçük olduğundan tıkanmalar yaşansa da kesinliği yüksek, %RSD değerleri düşük sonuçlar elde edilmesine yardımcı olmaktadır. Çapraz akışlı nebülizörler HF hariç tüm reaktiflerle uyumludur. Konsantrik nebülizörlere göre tıkanma problemi daha azdır [167]. Bu nebülizörelerde daha düşük akış hızı olmasına rağmen daha yüksek performans sergilerler yani daha ince aerosol, daha yüksek hassasiyet ve daha düşük dedeksiyon limitlerinin elde edilmesini sağlarlar [168].

Babington nebülizörler asit, baz ve organik çözeltilere karşı dayanıklılığı yüksektir. Yoğunluğu yüksek matrislerde kullanılabilir. Tuz birikimi ve tıkanmalar gerçekleşmez. Sisleştiricinin ucunda sisteme adapte olmuş bir soğutma çemberi bulunur. Bu kısmın sıcaklığı büyük damlacıkların yoğunlaştırılıp sistemden uzaklaştırılması, çapı 20 µm' nin altında olan damlacıkların için ise plazmaya ulaşmasını sağlamak için 2 °C' de tutulmaktadır. ICP-MS spray chamber sıcaklığı termal kararlılığı sağlamak için ve plazmaya giden solvent miktarını minimize etmek için tipik olarak 2-5 °C' ye soğutulur [163].

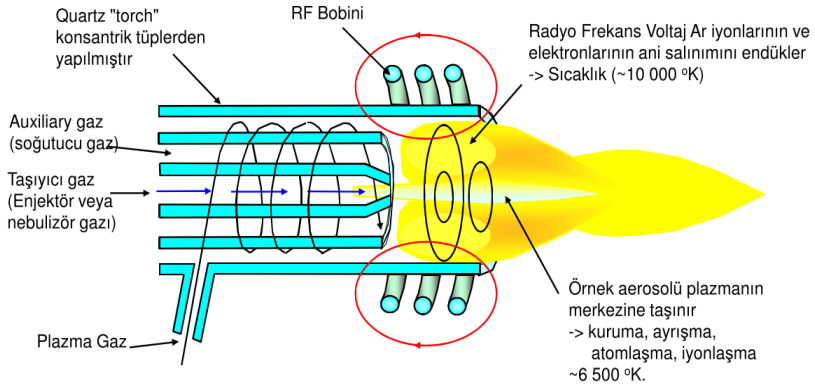


Şekil 9.3 Sisleştirici ve spray chamber [162].

9.2.2 ICP Kısmı

Plazma elektriksel iletkenliği olan, içerisinde katyon ve elektron içeren bir gaz karışımından oluşur. Plazma kaynakları arasında ICP'ler yaygın olarak kullanılsa da DCP (doğru akımlı plazma), MIP (Mikrodalga uyarımlı plazma) da atomik spektroskopi de plazma kaynağı olarak kullanılmaktadır. Doğrudan akımlı plazmalarda güvenilirliğinin düşük olması ve interferans eğilimi fazladır. Elektrotsuz bir kaynak olan mikrodalga uyarımlı plazma kaynaklarında ise plazma sıcaklığı 2000-3000 K lerin üzerine çıkamadığıdan matris etkileri yüksektir. Ayrıca örnek aspire edildiğinde plazma kolaylıkla sönebildiğinden kullanımı yaygın değildir [150]. İndüktif eşleşmiş plazma teknolojisinde plazma elektriksel bir yük boşalması olup pozitif yüklü iyonlar elde etmek için kullanılır. Plazma torchu iç içe geçmiş üç kuvartz borudan oluşur. Bu borunun en dış kısmı ile orta kısmının arasından 12-17 L/min akış hızında argon soğutucu gaz olarak geçer. Sistemden geçen yardımcı gaz ve nebülizör gazı 1.0 L/ml akış hızına sahiptir. Plazma hızlı salınan manyetik alan ile (27 MHz) serbest elektronların endüktif birleşmesi sonucu oluşturulur. Ortamdaki enerji çarpışmanın etkisi ile argon moleküllerine geçer [147], [169]. Plazma kuvartz bir tüp olan torch'un içerisinden geçen gaz akışında tutulur. Aerosol halinde olan örnek yaklaşık 6000-8000 K sıcaklıktaki plazmadan geçer. Bu aşamada plazmada ayrışma, atomizasyon ve iyonizasyon süreçleri gerçekleşir. Oluşan iyonlar spektrometre içerisine yönlendirilir [170].

Argon gazı kullanılmasının nedeni; inert olması, yüksek saflıkta elde edilebilir olması ve 1.iyonlaşma enerjisinin diğer tüm elementlerin 1.iyonlaşma enerjisinden düşük olması 2.iyonlaşma enerjisinin ise küçük olmasıdır.



Şekil 9.4 İndüktif Eşleşmiş Plazma [166].

9.2.3 Ara Yüzey

Plazma ile cihazı birbirine bağlayan ara birimdir. Bu bölümde detektöre ulaşması istenmeyen türler uzaklaştırılırken sadece pozitif yüklü iyonların detektöre ulaşması sağlanır. Cihazın MS kısmında bulunan örnekleyici ve sıyırıcı olmak üzere 2 adet aktarıcı koni bulunmaktadır. Pozitif yüklü metal iyonları atmosferik basıçtan (760 torr) önce çapı 1 mm' den küçük olan örnekleyici koniye sonrasında da çapı 0.4-0.8 mm olan sıyırıcı koniden geçerek yüksek vakum bölgesine (10^{-6} torr) çekilirler [150].

9.2.4 Kütle Analizörü

Pozitif yüke (+1) sahip iyonlar bu bölümde kütle/yük oranlarına göre hızlı bir şekilde ayrılırlar. ICP-MS teknolojilerinde farklı çeşitlerde kütle spektrometreleri mevcuttur; kuadropol, manyetik sektör ve uçuş zamanlı. Genellikle ICP-MS cihazlarındaki kullanım kolaylığı, geniş kütle aralığına sahip olması gibi nedenlerle kuadropol kütle spektrometreleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Kütle rezolüsyonu 0.5 atomik kütle biriminin altındadır. 12-18 mm çapında, 200 mm boyunda birbirine paralel dört çubuktan oluşur. Karşılıklı çubuklar doğru akım kaynağına bağlı olup 5-10 V' luk potansiyel uygulanması sonucu pozitif yüke sahip iyonların detektöre doğru hızlandırılmasını sağlar. Doğru RF ve DC voltajları seçildiğinde yalnızca istenen kütle/yük oranına sahip iyonlar ilerleyeceğinden yeterli rezolüsyonu elde etmek olasıdır [171].

9.2.5 Dedektör

ICP-MS cihazlarında genellikle elektron çoğaltıcı detektörler kullanılmaktadır. Buna bağlı olarak kullanılan dedektörlerin yüksek doğruluğa sahip olması, geniş bir doğrusal aralıkta hassas sonuçlar verebiliyor olması ve minimum gürültü seviyesine sahip olması beklenir [172]. Birbirine paralel dört çubuktan oluşan kütle sistemini terk eden iyonlar uygulanan voltajla dedektörün iç yüzeyine doğru çekilirler. Bu iyonlar dinotlara çarparak ikincil elektronları oluştururlar. İyonlar ilerledikçe oluşan ikincil iyonların da sayısı artar. Elektron demetleri elektrik sinyallarine dönüştürülür ve sonuçta bir tane iyondan milyonlarca elektron üretilerek detektöre çarpan sinyal miktarı hesaplanır [150].

9.3 Girişimler

İndüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi ile birden fazla elementin hızlı, aynı anda ve düşük dedeksiyon limitlerinde analizi mümkün olsa da analizler esnasında oluşabilen girişim etkilerini de unutmamak gerekir. Girişimler spektral ve spektral olmayan girişimler olarak sınıflandırılırlar. Spektral girişimler genellikle, analit iyonunun plazmada oluşan iyonik türlerle (Ar^+, O_2^+ vb) aynı kütle/yük oranına sahip olduğunda oluşmaktayken, spektral olmayan girişimler ise numunenin yapısından yani matriksten kaynaklanmaktadır. Spektral girişimler izobarik ve moleküler girişimlerden oluşmaktadır [169].

9.3.1 Spektral girişimler

9.3.1.1 İzobarik girişimler

Atom numaraları farklı, kütle numaraları aynı ^{114}Sn - ^{114}Cd gibi elementlere izobarik elementler denir. İzobarik girişimleri engellemenin en iyi yolu o elementin farklı izotopları ile çalışmaktır. Periyodik tablodaki elementlerin çoğu izobarik çakışma yapmayan birden fazla izotopa sahiptir. Örneğin, indiyum $^{113}In^+$ ve $^{115}In^+$ olmak üzere iki kararlı izotopu bulunmaktadır. İzotoplardan birincisi $^{113}Cd^+$, ikincisi ise $^{115}Sn^+$ sinyallerini etkilemektedir [159]. Çizelge 9.1 de izobarik girişimlere örnekler verilmiştir [162].

Çizelge 9.1. İzobarik girişimler.

Atomik Kütle	İlgili elementin bağıl bolluğu	Girişim elementi bağıl bolluğu
43	Ca (0.14)	-
52	Cr (83.76)	
56	Fe (91.66)	
57	-	Fe (2.19)
63	Cu (69.09)	
75	100	

9.3.1.2 Moleküler Girişimler

Moleküler girişimler de poliatomik ve çift yüklü poliatomik girişimler olarak guruplandırılmaktadır.

Poliatomik Girişimler

Numune matriksindeki türlerin etkileşmesi, numune çözücüsü ve plazma gazı poliatomik girişimlere neden olabilir. $^{40}ArH^{+}$, $^{16}O^{2+}$, $^{14}N^{+}$, gibi çok sayıda moleküler iyon girişim nedeni olabilmektedir. Bu girişimler analitin farklı bir izotopunun kullanılmasıyla engellenebilir. Matriks içerisinde klorür bulunması veya numune hazırlama aşamasında kullanılan asitlerden klorür geldiği durumunda $^{40}Ar^{35}Cl^{+}$, $^{40}Ar^{37}Cl^{+}$, $^{35}Cl^{16}O^{+}$ vb. yapıların oluşması yine poliatomik girişimlere neden olur. Girişimleri gidermek için ICP-MS sistemlerinde kuadropolden önce reaksiyon ortamına helyum, hidrojen, amonyak gibi gazlar gönderilerek poliatomik interferansa neden olan türlerin birbirinden ayrılması sağlanır. Çizelge 9.2' de girişim yapan bazı türler verilmiştir [162].

Çizelge 9.2 Girişim yapan türler.

Poliatomik Tür	**m/z**	**Girişim**
^{40}Ar ^{34}SH, ^{40}Ar ^{35}Cl	75	As
^{40}Ar ^{12}C, ^{35}Cl ^{16}OH	52	Cr
^{40}Ar ^{23}Na, ^{12}C ^{16}O ^{35}Cl	63	Cu
^{34}S ^{16}O2, ^{32}S ^{34}S	66	Zn
^{40}Ar ^{16}O, ^{40}Ca ^{16}O	56	Fe
^{40}Ar ^{38}Ar	78	Se
^{40}Ar ^{16}OH, ^{40} Ca ^{16}OH	57	Fe

Çift Yüklü Poliatomik Girişimler

Plazmada 1 elektron yerine 2 elektronun +2 yüklü iyonların oluşması durumunda gerçekleşir. Kuadropol iyonları m/z oranlarına göre ayırır. Normal olarak yük değeri 1 kabul edilerek yapılan hesaplamalar yük değeri +2 olduğunda hatalı sonuçlara neden olur. Bu tür girişim etkileri daha çok çift yüklü türler oluşturabilecek seryum (Ce), lantan (La), stronsiyum (Sr), toryum (Th) ve baryum (Ba) da görülmektedir. $^{136}Ba^{2+}$ ile $^{68}Zn^{+}$ buna örnek verilebilir. Spektral interferanslar plazma ve torch koşullarının iyileştirilesi ile giderilebilir [159].

9.3.2 Spektral olmayan girişimler

Örnek matriksinden kaynaklanan girişimlerdir. Analit sinyalini etkileyen bozucu madde konsantrasyonu 500 – 1000 µg/mL olduğunda gözlemlenir. Çözünmüş katıların konlarda ve iyon lenslerinde birikmesi sinyallerin azalmasına dolayısıyla da duyarlılık kaybına yol açar. İyon kaynağı içersindeki pozitif yüklü ağır metal iyonları, daha hafif metal iyonlarını iterek onların uzaklaşmasına neden olup ve pozitif yük etkisiyle hafif iyonların sinyallerinin azalmasına neden olur. Ortamda Na, K gibi kolay iyonlaşabilen

elementlerin bulunması durumunda As gibi zor iyonlaşan elementlerin sinyalleri düşer. Bu tip girişimler daha seyreltik çalışılarak, matriks eşlemesi yapılarak ya da iç standart kullanılarak giderilmesi mümkündür. İç standart eklenirken örneğe ve standartlara eşit miktarda eklenip daha sonra analitin iç standarda oranı bulunarak sonuç hesaplanması mümkündür. İç standart seçilirken seçilen iç standardın örnekte bulunmamasına ve iyonlaşma potansiyeli ile kütlesinin analit ile uyumlu olmasına dikkat edilmelidir [162].

BÖLÜM 10

TÜRLENDİRME

10.1 Türlendirme ve Önemi

Türlendirme, IUPAC tarafından bir örnek içerisindeki bir veya birden fazla elementin fiziksel ve kimyasal türlerinin kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmesi için yapılan analitik ölçümlerin bütünüdür. Geçmişte bir elementin toplam konsantrasyonun belirlenmesinin yeterli olduğu düşüncesi günümüzde kimyasal türlerin toksik özelliklerin belirlenmesi, bioerişilebilirlik ve taşınabilirlik gibi özelliklerinin birbirinden farklı olması türlendirme çalışmalarına olan ihtiyacı artırmıştır [173]. Literatürde element tayinlerinde hassasiyeti ve seçiciliği artırmak için atomik emisyon spektrometrik yöntemlerle (ICP-AES, DCP) HPLC ve IC kombine edilmiştir [174], [175]. Fakat bu yöntemler aynı anda birden fazla elementin tayininde yetersiz kalmaktadır. İndüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi ise ultra eser seviyelerdeki element miktarlarını hassas ve doğru bir şekilde tayin etmede diğer yöntemlerin önüne geçmektedir. Bununla birlikte ICP-MS teknolojileri ile elementlerin farklı oksidasyon basamakları hakkında tek başına bilgi elde etmek zordur. Bu nedenle birçok araştırmacı HPLC ve IC gibi ekipmanları ICP-MS ile kombine ederek ICP-MS'i element seçici ve çoklu elementel dedektör olarak kullanmışlardır [176], [177]. Ayrıca IC-ICP-MS sistemleri ile yapılan çoğu türlendirme çalışmasında ön konsantrasyona gerek kalmamaktadır [178].

Krom tayininde tüm krom izotopları üzerinde spektral girişim etkileri görülse de en büyük girişim etkileri ortamda C ve Cl bulunduğu durumlarda oluşan $^{40}Ar^{12}C^{+}$ ve $^{37}Cl^{16}O^{+}$ iyonlarıyla görülmektedir [179]. Görülen girişim etkilerini ortadan kaldırmak

ve krom türlerini ayırmak için çeşitli anyon ve katyon değiştirici kolonlar kullanılmaktadır [180].

10.2 İyon Kromatografi

İyon değiştirme kromatografisi çoğunlukla iyon kromatografi olarak kısaltılır. İyon kromatografi, yüksek hassasiyette ve güvenilir şekilde geniş bir uygulama alanına sahip olup türleri iyon değiştirici reçine kullanarak ayırma ve tayin etmede yaygın kullanım alanına sahip yöntemlerden biridir. İyon kromatografi ilk olarak 1970' li yıllarda anyon-değiştirici veya katyon-değiştirici reçine ile doldurulmuş HPLC kolonlarında anyon ve katyon karışımlarının kolaylıkla ayrılabileceğinin farkedilmesi ile geliştirilmiş ve daha sonraki zamanlarda kullanımı giderek artmıştır [181].

10.3 İyon Değiştirme Dolgular

İyon değiştirme reçineleri tarafından iyonları ayırma ve tayin etme metodudur. Anyonları ayırmak için anyon değiştirme reçineleri, katyonları ayırmak için katyon değiştirme reçineleri kullanılması prensibine dayanır. Katı bir maddenin yapısında bulunan iyonların, bu katı maddenin temasta olduğu bir çözelti içindeki aynı cins yüklü olan baska iyonlarla bir dengeye göre değiştirilmesi özelliğine dayanir. Kullanılan bu katı maddeler, çözelti ortamında çözünmeyen büyük moleküllü maddelerdir. Katyon değiştirici reçinelerin aktif bölgeleri, kuvvetli bir asit olan sülfonik asit ($R\text{-}SO_3\text{-}H^+$) ve karboksil gurubu olan zayıf asitlerdir ($R\text{-}COO^-H^+$). Anyonik iyon değiştirici reçinelerde aktif gurup olarak, kuvvetli bir baz olan tersiyer amin grupları ($\text{-}N(CH_3)_3{}^+OH^-$) veya daha zayıf bir baz olan primer amin gruplarını ($\text{-}NH_3{}^+OH^-$) bulunur.

Sülfonik asit tipi bir iyon değiştirici, A^{x+} katyonunu içeren bir sulu çözelti ile temas ettiğinde, bir yer değiştirme dengesi meydana gelir:

$$xRSO_3{}^-H^+ \text{ (katı)} + A^{x+} \text{ (çözelti)} \leftrightarrow (RSO_3{}^-)x\ A^{x+} \text{ (katı)} + xH^+ \text{ (çözelti)}$$

Benzer şekilde, kuvvetli bazik iyon değiştirici, B^{x-} anyonu ile aşağıdaki denklemde gösterildiği gibi etkileşebilir:

$$xRN(CH_3)_3OH^- \text{ (katı)} + B^{x-} \text{ (çözelti)} \leftrightarrow [RN(CH_3)_3+]xB^{x-} \text{ (katı)} + xOH^- \text{ (çözelti)}$$ [181].

10.4 IC-ICP-MS ile Yapılan Krom Türlendirme Çalışmaları

Sacher ve arkadaşları su örneklerindeki Cr(III) ve Cr(VI) türlerinin eş zamanlı tayin edebilmek için iyon kromatografi ile ICP-MS sistemini kombine etmişlerdir. Her iki krom türü için de herhangi bir ön değiştirme yöntemi kullanılmadan gözlenebilme sınırını 0.1 µg/L'nin altında bulmuşlardır. Tekrarlanabilirliğin artırılması için iç standart olarak Rh(III) kullanmışlardır. Sistemin ve analizlerinin doğruluğunun kanıtlanması için sertifikalı referans madde kullanılmış ve sertifika değeri ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir [182].

Meng ve arkadaşları ortam havasındaki Cr(VI)'nın IC-ICP-MS ile tayin edilmesi için hassasiyeti ve seçiciliği yüksek bir analitik yöntem geliştirmişlerdir. Bu amaç için ortam partikülleri önceden %10 HNO_3 ile yıkanmış 47 mm selüloz ester üzerinde toplanmıştır. Krom türlerinin tayin edilmesinde ^{50}Cr, ^{52}Cr, ^{53}Cr izotopları ile çalışmıştır. ^{53}Cr izotopunu kullanarak Cr(VI) için elde edilen % geri kazanım değerini %90.9 ± 8.8 bulunmuştur [183].

Shah ve arkadaşları Avustralya'daki kömür ve yanma ürünlerindeki toplam kromun ve krom türlerinin IC-ICP-MS ile tespit edilmesi için analitik bir yöntem geliştirmişlerdir. Kömür ve kül örnekleri ICP-MS sistemine gönderilmeden çözünür hale getirilmiştir. Çözünürleştirme işlemi EPA 3060A referans alınarak, HF/HNO_3 asit karışımının 110 °C'de 90 dakika boyunca örnek ile muamele edilmesi ile başarılmıştır. Analizlerinin doğruluğunun desteklenmesi için sertifikalı referans madde kullanılmıştır (SRM 1633A). Cr(VI) için LOD değeri 4 µg/kg, % geri kazanım değerleri ise %74-117 aralığında bulunmuştur [184].

BÖLÜM 11

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

11.1 Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında toksik etkisi olan Cr(VI) türü ile eser seviyelerde bulunması durumunda vücuda katkısı olan Cr(III) türlerinin birbirinden ayrılması ve kantitatif tayinlerinin yapılması için Thermo iyon kromatografi (IC) ile birleştirilen Thermo Scientific™ iCAP Q ICP-MS cihazı kullanılarak hassas, doğruluğu yüksek bir analitik yöntem geliştirilmiştir. Bu çalışmada manuel enjeksiyon sistemi kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan Cr(III) ve Cr(VI) standart çözeltileri 1000 mg L^{-1} çözeltilerden seyreltilerek hazırlanmıştır.

11.2 IC-ICP-MS Donanımı

IC-ICP-MS sistemi ICAPQ ICP-MS ve ICS 1100 iyon kromatografi sisteminden oluşmaktadır. ICP-MS cihazı otosampler bilgisayar otomasyon sistemlerinden oluşmaktadır.

11.3 Kolonlar

Bu tez çalışmasında krom türlerinin birbirinden ayrılması ve miktar tayinlerinin yapılması için optimizasyon çalışmlarına 2 adet kolon kullanılarak devam edilmiştir.

- Dionex IonPac AS9 (4 × 250 mm)
- Dionex IonPac AS7 (2 × 250 mm)

11.3.1 Diğer Ekipmanlar

- Mikro pipet: PhysioCare Concept - Eppendorf Research Plus (100-1000 µl; 0.50-5 ml)
- Hassas terazi: Sartorius Analytic A 120 S
- pH metre: Hanna HI 2211
- Manyetik karıştırıcı: IKA (RTC basic) manyetik karıştırıcı + ETS-D5 Elektronik Kontakt Termometre
- Derin dondurucu: Uğur Derin Dondurucu UCF 1600 L
- Cam malzemeler: Balon joje, beher, erlen, mezür

11.4 Optimizasyon Çalışmaları

Cr(III) ve Cr(VI) analitlerinin IC-ICP-MS sisteminde eser seviyelerde tayini için değişken tüm parametreler optimize edilmiştir. IC-ICP-MS sisteminde türlerin alıkonmalarına yönelik birçok hareketli faz denenmiştir.

Çizelge 10.1 IC-ICP-MS sisteminde Cr(III) ve Cr(VI) analitlerinin alıkonmasına yönelik yapılan optimizasyon çalışmaları.

	Mobil faz	**Standart Hazırlamada Kullanılan Çözelti**	**Akış Hızı**	**Kolon**
Çalışma 1	50 mM NH_4NO_3 pH 4.0	50 mM NH_4NO_3, pH 4.0	0.6	Dionex IonPac AS7 (2 × 250 mm)
Çalışma 2	50 mM NH_4NO_3 pH 4.0	50 mM NH_4NO_3 pH 4.0	0.8	Dionex IonPac AS7 (2 × 250 mm)
Çalışma 3	50 mM NH_4NO_3 pH 4.0	50 mM NH_4NO_3 pH 4.0	1.0	Dionex IonPac AS7 (2 × 250 mm)

Çizelge 10.1 IC-ICP-MS sisteminde Cr(III) ve Cr(VI) analitlerinin alıkonmasına yönelik yapılan optimizasyon çalışmaları (devamı)

Çalışma 4	100 mM NH_4NO_3 pH 4.0	100mM NH_4NO_3 pH 4.0	0.6	Dionex IonPac AS7(2 × 250 mm)
Çalışma 5	100 mM NH_4NO_3 pH 4.0	100mM NH_4NO_3 pH 4.0	0.8	Dionex IonPac AS7 (2 × 250 mm)
Çalışma 6	100 mM NH_4NO_3 pH 4.0	100 mM NH_4NO_3 pH 4.0	1.0	Dionex IonPac AS7(2 × 250 mm)
Çalışma 7	100 mM NH_4NO_3 pH 4.0	100 mM NH_4NO_3 pH 4.0	0.6	Dionex IonPac AS9(4 × 250 mm)
Çalışma 8	100 mM NH_4NO_3 pH 4.0	100 mM NH_4NO_3 pH 4.0	0.8	Dionex IonPac AS9(4 × 250 mm)
Çalışma 9	100 mM NH_4NO_3 pH 4.0	100 mM NH_4NO_3 pH 4.0	1.0	Dionex IonPac AS9(4 × 250 mm)
Çalışma 10	%2.5 HNO_3	50 mM NH_4NO_3 pH 4.0	0.6	Dionex IonPac AS94 × 250 mm)
Çalışma 11	%2.5 HNO_3	50 mM NH_4NO_3 pH 4.0	0.8	Dionex IonPac AS94 × 250 mm)
Çalışma 12	%2.5 HNO_3	100 mM NH_4NO_3 pH 4.0	0.6	Dionex IonPac AS94 × 250 mm)
Çalışma 13	%2.5 HNO_3	100 mM NH_4NO_3 pH 4.0	0.8	Dionex IonPac AS94 × 250 mm)
Çalışma 14	%2.5 HNO_3	100 mM NH_4NO_3 pH 4.0	1.0	Dionex IonPac AS94 × 250 mm)

Çalışmalara 50 mM NH_4NO_3 mobil faz olarak kullanılarak başlanmıştır. Çalışma 1' de pH 4, 50 mM NH_4NO_3 çözeltisinin hazırlanması için 4.0 g tartılmış ve bir miktar saf su içerisinde çözülmüştür. 0.10 M HNO_3 ile pH 4' e ayarlandıktan sonra hacmine saf su ile tamamlanmıştır. Çalışma 1,2,3' de 50 mM için farklı akış hızları da denenerek yapılan çalışmalarda Cr(III) ve Cr(VI) analitleri için ayarlanan 600 saniyelik analiz süresi boyunca pik gözlenmemiştir. Daha sonraki çalışmalarda NH_4NO_3 derişimi 100 mM olacak şekilde hazırlanmıştır. Çalışma 4, 5, 6' da ise aynı kolonla denemelere devam edilmiş fakat farklı akış hızlarında yapılan çalışmalarda her iki analit için de bir alıkonma elde edilememiştir. 100 mM olarak hazırlanan NH_4NO_3 derişimi sabit tatularak farklı kolon (Dionex IonPac AS9 (4×250 mm) ile çalışmalara devam edilmiştir. Kolon dolgu malzemesinin daha büyük olduğu bu kolon ile yapılan çalışmalarda her iki analit için de pik şekillleri simetrik olmasa da pik gözlemlenmiştir. Çalışma 1-9 aralığında kullanılan standart çözeltiler suda hazırlanmıştır. Çalışma 10' da %2.5' luk HNO_3 mobil faz olarak kullanılmıştır. Daha önceki çalışmalarda suda hazırlanan standart çözeltiler bundan sonraki çalışmalarda 50 mM, pH: 4, NH_4NO_3 çözeltisi içersinde hazırlanmıştır. Çalışma 10 ve 11'de yapılan denemelerde mobil faz olarak %2.5' luk HNO_3 kullanılmış ve Cr(III) ve Cr(VI) analitlerini içeren standart çözeltiler pH 4 e ayarlanmış 50 mM NH_4NO_3 ile hazırlanmıştır. Bu çalışmalarda her iki analit de kolonda alıkonulmuş ve Cr(III) analitinin ölü zamandan daha uzak bir alıkonma zamanında elde edilmesi için standartların hazırlandığı NH_4NO_3 çözeltisinin derişimi artırılmıştır. 100 mM ile devam edilen çalışmalarda her iki analit için de yeterli alıkonma süreleri elde edilmiştir. Çalışma 12'de 0.60 mL/min akış hızıyla çalışıldığında analitlerin kolondan çıkma sürelerinin arttığı ve pik genişliğinin artması sonucu pik de kuyruklanmaların oluştuğu görülmüştür. Çalışma 11'de 0.80 mL/min akış hızıyla, çalışma 12'de 1.0 mL/min akış hızı kullanıldığında ise ölü zamandan yeterli uzaklık da simetrik pik şekilleri elde edilmiştir. Optimum koşullar %2.5' luk HNO_3 mobil faz olarak 1.0 mL/min akış hızında gönderilmesi ve 100 mM NH_4NO_3 içerisnde hazırlanan Cr(III) ve Cr(VI) standart çözeltilerinin kullanılmasıyla elde edilmiştir.

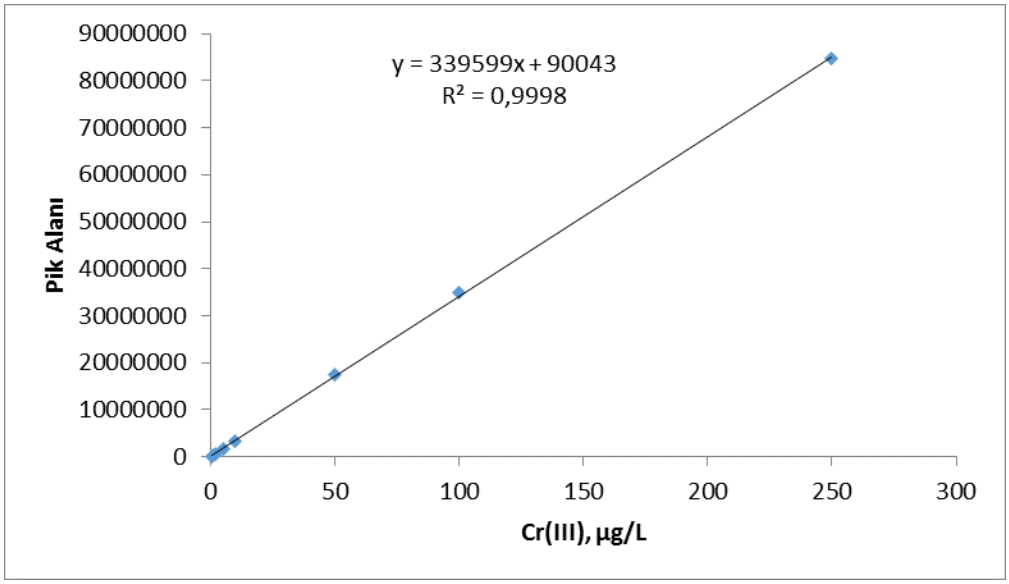
11.4.1 Cr(III) ve Cr(VI)'nın Sistem Analitik Performansının Tespiti

Dionex IonPac AS9 kolonu için sistem analitik performans değerlerinin tespiti amacı ile belirlenen optimum şartlar altında 0.50 - 250 μg L^{-1} aralığında standartlar IC-ICP-MS sistemine enjekte edilmiştir.

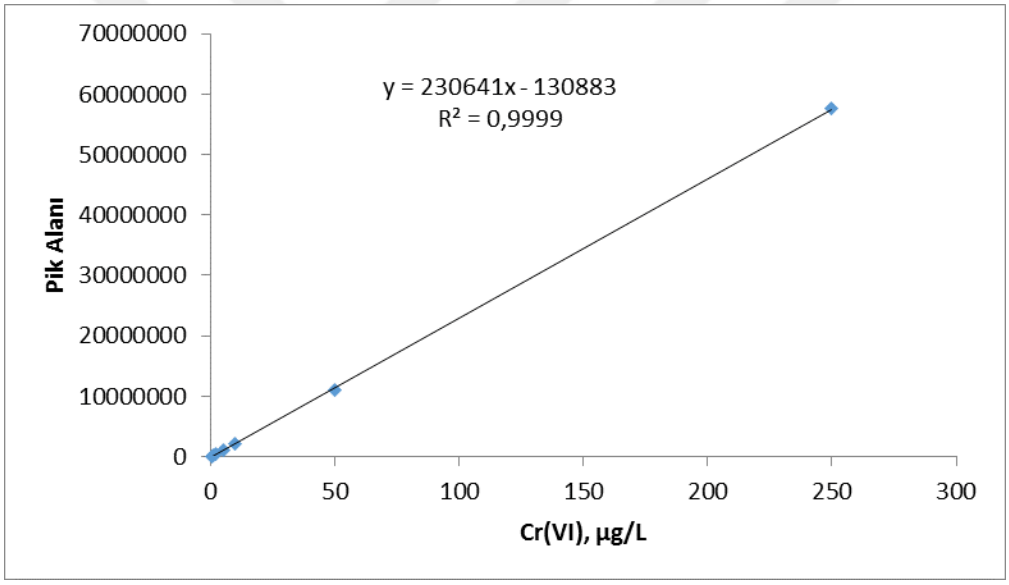
Çizelge 10.2 Dionex IonPac AS9 kolonda Cr(III) ve Cr(VI) için elde edilen optimum koşullar

Mobil Faz	%2.5 HNO_3
Akış Hızı, mL/min	1.0
Enjeksiyon Hacmi	50 μL
Numune Hazırlama Tamponu	100 mM NH_4NO_3 pH 4.0
Kolon	Dionex IonPac AS-9 (4 × 250 mm)
Alıkonma Zamanı, saniye	Cr(III):149, Cr(VI):260

Cr(III) ve Cr(VI)' nın eşzamanlı kantitatif tayini amacıyla cihazın analitik performansının belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Cihazın LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesi amacıyla bir seri standart çözelti 100 mM NH_4NO_3 (pH 4) içerisinde hazırlanmış ve bu aralıkta bir kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.

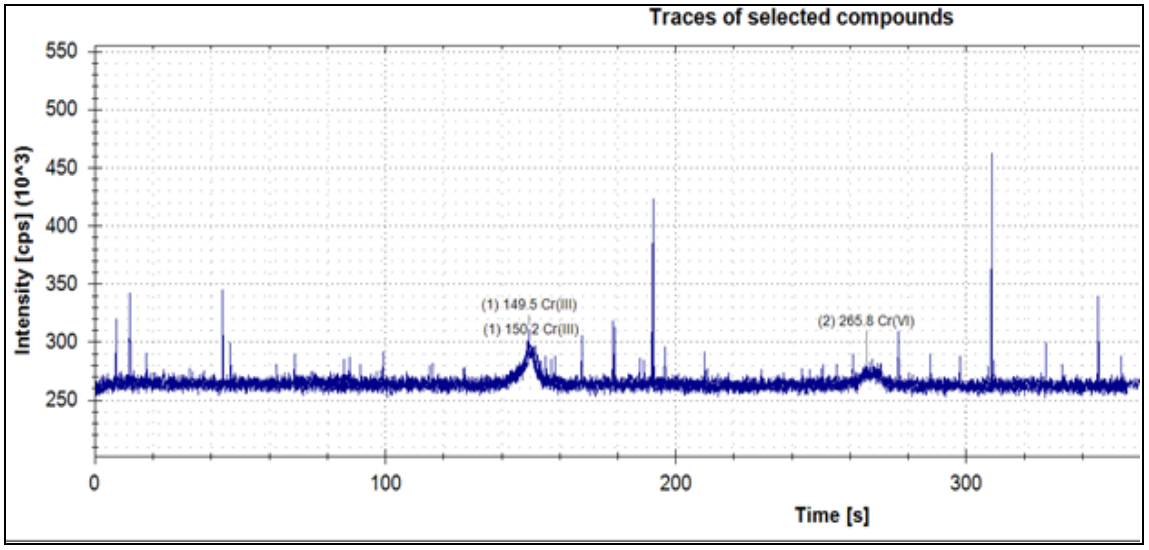


Şekil 11.1 IC-ICP-MS sisteminde optimum şartlar altında elde edilen Cr(III)'e ait kalibrasyon doğrusu.

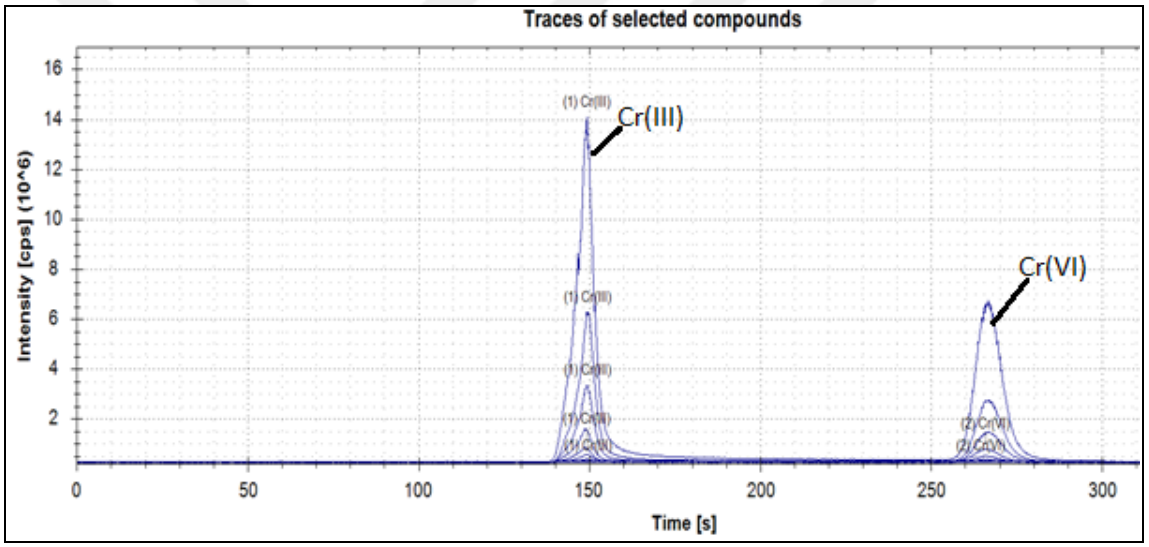


Şekil 11.2 IC-ICP-MS sisteminde optimum şartlar altında elde edilen Cr(VI)' ya ait kalibrasyon doğrusu.

IC-ICP-MS sisteminin LOD ve LOQ değerlerinin tespiti amacı ile kalibrasyon grafiğinde kullanılan en düşük derişim 0.50 µg/L sisteme gönderilmiş ve Şekil 11.3'deki kromatogram elde edilmiştir.



Şekil 11.3 0.50 µg/L derişimindeki Cr(III), Cr(VI) mix standart çözeltisinin tekrarlı cihaza gönderilmesi sonucu elde edilen kromatogramlar.



Şekil 11.4 0.50-250 µg/L aralığında Cr(III), Cr(VI) mix standart çözeltisinin IC-ICP-MS cihazına gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar.

Elde edilen LOD, LOQ ve %BSS değerlerinin de aralarında olduğu Cr(III) ve Cr(VI) için tespit edilen sistem analitik performans değerleri Çizelge 10.3' de görülmektedir.

Çizelge 10.3 Dionex Ion Pac AS9 kolonda Cr(III) ve Cr(VI) için elde edilen sistem analitik performans değerleri

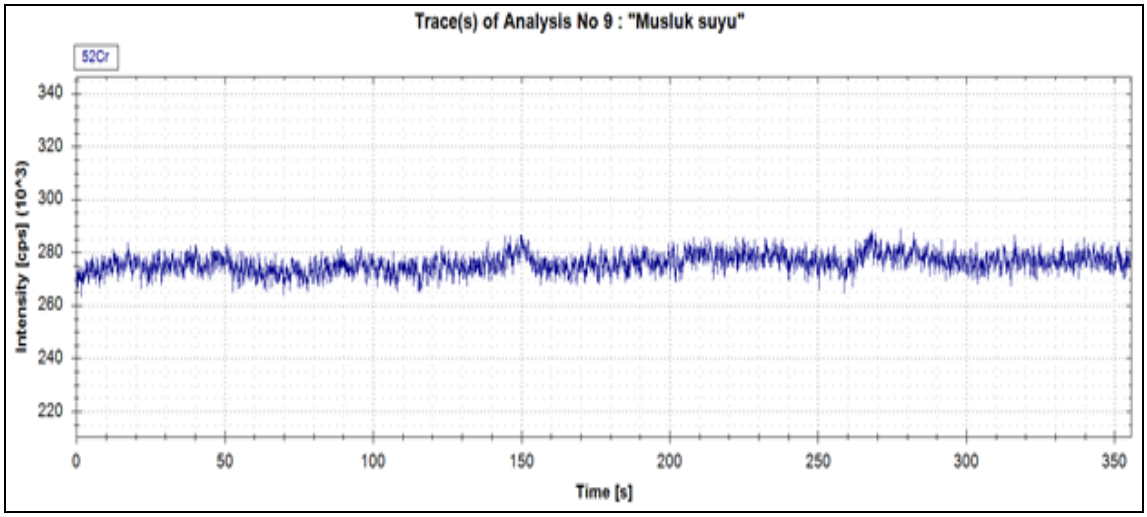
	Cr(III)	**Cr(VI)**
LOD, µg/L	0.09	0.03

Çizelge 10.3 Dionex Ion Pac AS9 kolonda Cr(III) ve Cr(VI) için elde edilen sistem analitik performans değerleri (devamı)

LOQ, µg/L	0.32	0.11
R^2	0.9998	0.9999
y=mx+n	y =331790x + 305533	y = 230641x - 130883
%BSS	4,64	2,16

11.5 Musluk Suyunda ve Kaplıca suyunda Cr(III), Cr(VI) Analitlerinin Eşzamanlı Tayinleri

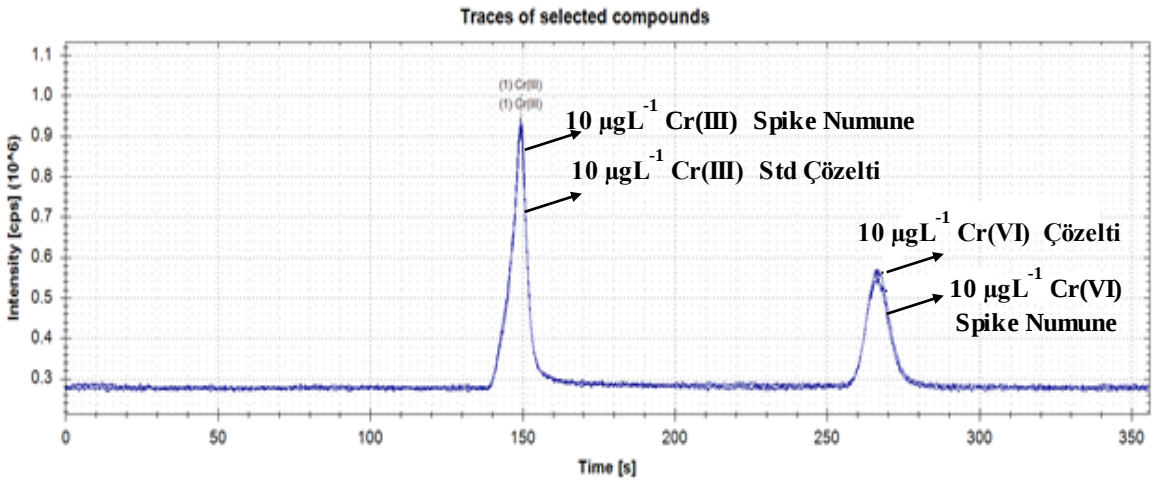
Yoğun bir matrikse sahip olan kaplıca suyu numunesi ve musluk suyunda bulunan Cr(III) ve Cr(VI) analitlerinin geiştirilen analitik yöntem ile yüksek doğrulukla kantitatif tayininin yapılıp yapılmadığını analamak amacı ile çalışmalar yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda Yıldız Teknik Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümünden kaplıca suyu numunesi temin edilmiştir. Belli bir miktar kaplıca suyu numunesi süzüldükten sonra içerisinde Cr(III) ve Cr(VI) olup olmadığının tespiti amacıyla optimum koşullar altında IC-ICP-MS sistemine gönderilmiştir. Benzer çalışmalar musluk suyu örneği için de yapılmış ve Şekil 11.5'deki kromatogram elde edilmiştir.



Şekil 11.5 Musluk suyunun Dionex AS-9 kolona, %2.5 HNO_3 mobil faz ortamında IC-ICP-MS cihazına gönderilmesi ile elde edilen kromatogram.

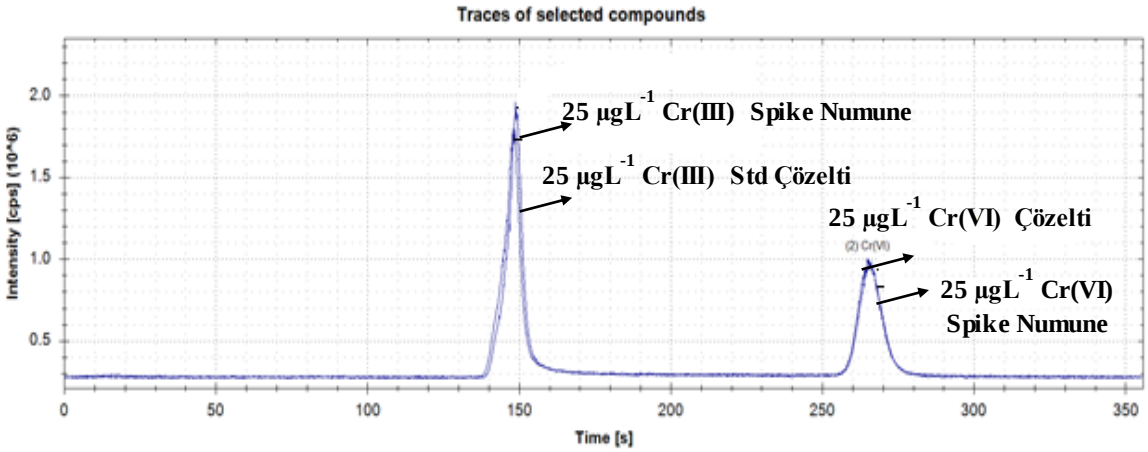
Kromatogramdan da görüldüğü gibi musluk suyunda Cr(III), Cr(VI) görülmemiştir. Musluk suyunda Cr(III), Cr(VI) iyonlarının geliştirilen analitik yöntem ile tayinlerinin yapılabildiğini göstermek amacı ile 10 μgL^{-1}, 25 μgL^{-1} ve 100 μgL^{-1} konsantrasyonları elde edilecek spike çalışması yapılmıştır. Bu amaçla musluk suyuyla hazırlanmış pH:4 NH_4NO_3 tamponu kullanılmıştır. Bu tampon çözelti kullanılarak 2-250 μgL^{-1} aralığında standart çözeltiler hazırlanarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Hazırlanan 10 μgL^{-1}, 25 μgL^{-1} ve 100 μgL^{-1} spike çözeltilerinden elde edilen analit sinyal alanları ile standart 10 μgL^{-1}, 25 μgL^{-1}, 100 μgL^{-1}çözeltilerinden elde edilen analit alanları kullanılarak % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

Spike sonucu elde edilen 10 μgL^{-1} Cr(III) ve Cr(VI)' dan oluşan mix çözeltinin musluk suyuyla hazırlanmış 10 μgL^{-1} standart çözeltisi ile çakıştırılmasına ait kromatogramlar Şekil 1.6.'da gösterilmiştir.



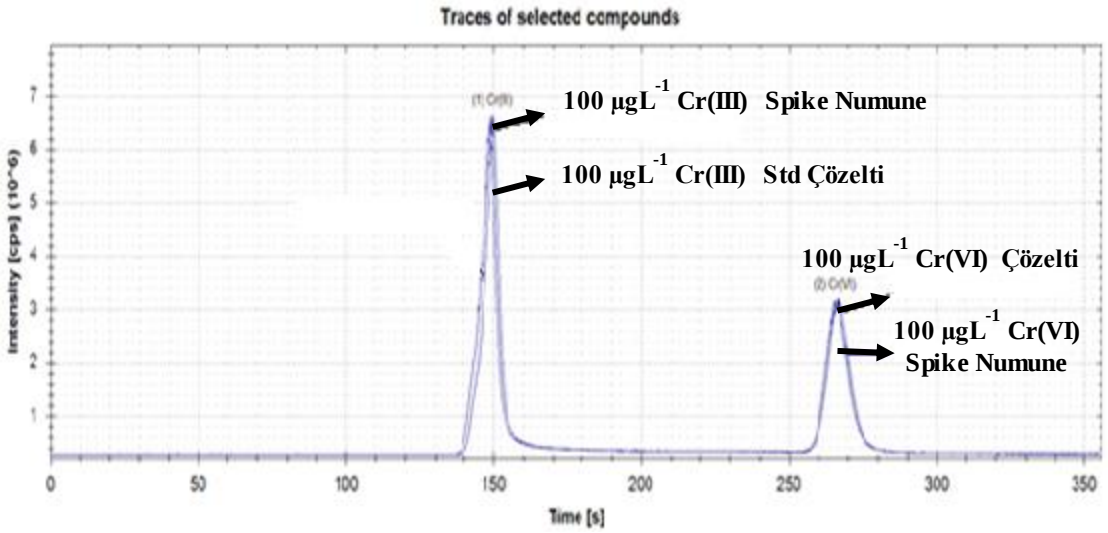
Şekil 11.6 Musluk suyunda Dionex AS-9 kolon kullanılarak ,%2.5 HNO_3 mobil faz ortamında 10 µg L^{-1} spike Cr(III),Cr(VI) mix çözeltisi ve 10 μgL^{-1} standart çözeltisine ait kromatagramlar.

Spike sonucu elde edilen 25 µg L^{-1} Cr(III) ve Cr(VI)'dan oluşan mix çözeltinin musluk suyuyla hazırlanmış 25 µg L^{-1} standart çözeltisi ile çakıştırılmasına ait kromatogramlar Şekil 11.7'de görülmektedir.

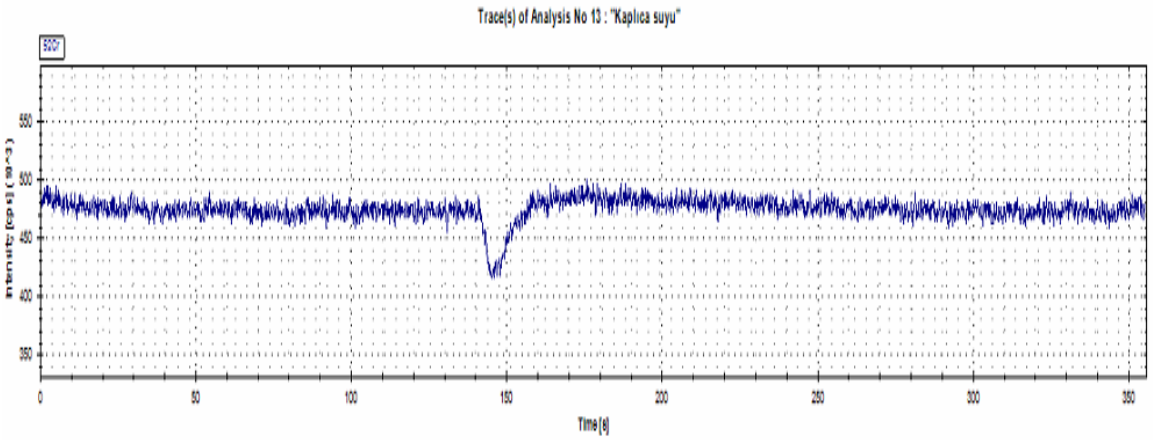


Şekil 11.7 Musluk suyunda Dionex AS-9 kolon kullanılarak ,%2.5 HNO_3 mobil faz ortamında 25 µgL^{-1} spike Cr(III),Cr(VI) mix çözeltisi ve 25 µg L^{-1} standart çözeltisine ait kromatagramlar.

Spike sonucu elde edilen 100 µgL^{-1} Cr(III) ve Cr(VI)'dan oluşan mix çözeltinin musluk suyuyla hazırlanmış 100 µgL^{-1}standart çözeltisi ile çakıştırılmasına ait kromatogramlar Şekil 11.8'de görülmektedir.



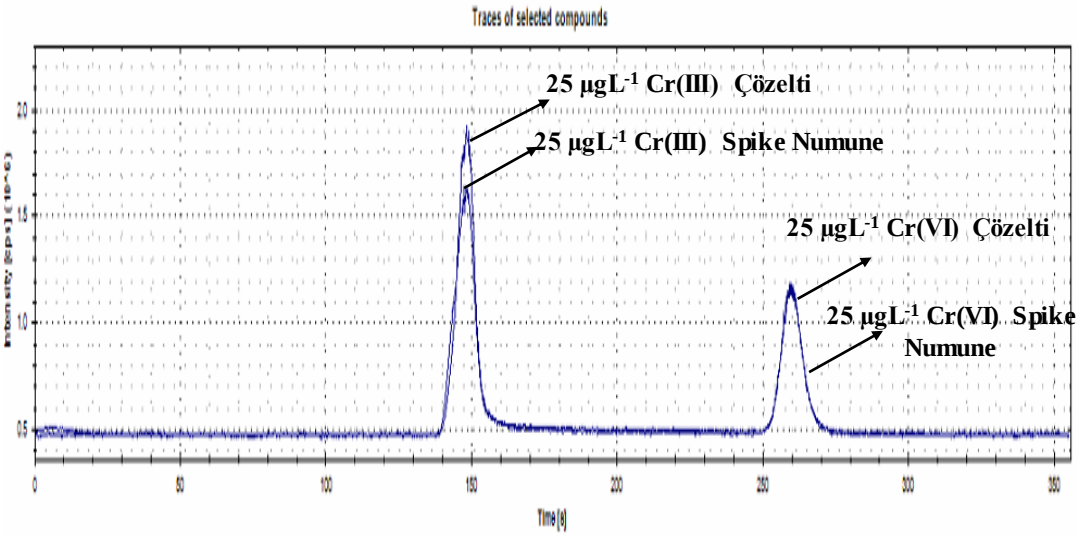
Şekil 11.8 Musluk suyunda Dionex AS-9 kolon kullanılarak ,%2.5 HNO_3 mobil faz ortamında 100 µg L^{-1} spike Cr(III),Cr(VI) mix çözeltisi ve 100 µg L^{-1} standart çözeltisine ait kromatagramlar.



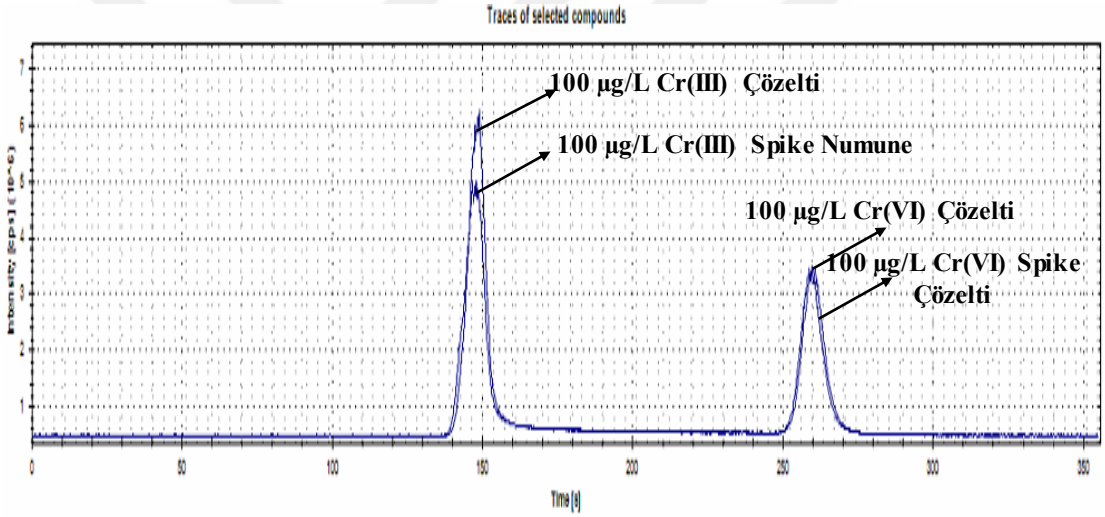
Şekil 11.9 Kaplıca suyunda Dionex AS-9 kolon kullanılarak, %2.5 HNO_3 mobil faz ortamında IC-ICP-MS cihazına gönderilmesi ile elde edilen kromatogram.

Kromatogramdan da görüldüğü gibi blank numune olarak gönderilen kaplıca suyunda Cr(III), Cr(VI) görülmemiştir. Kaplıca suyunda Cr(III), Cr(VI) iyonlarının geliştirilen analitik yöntem ile tayinlerinin yapılabildiğini göstermek amacı ile 25 µg L^{-1} ve 100 µg L^{-1} konsantrasyonları kullanılarak spike çalışması yapılmıştır. Bu amaçla kaplıca suyuyla hazırlanmış pH:4 NH_4NO_3 tamponu kullanılmıştır. Bu tampon çözelti kullanılarak 5-250 µg L^{-1} aralığında standart çözeltiler hazırlanarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Hazırlanan 25 µg L^{-1} ve 100 µg L^{-1} spike çözeltilerinden elde edilen analit sinyal alanları ile standart 25 µg L^{-1}, 100 µg L^{-1} çözeltilerinden elde edilen analit sinyaline ait alanlar kullanılarak % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

Musluk suyu ve Kaplıca suyunda yapılan çalışmalarda analit sinyali üzerine matriks etkisinin olup olmadığının incelenmesi için standart çözeltiler kullanılarak kalibrasyon doğrusu çizilmiş, musluk suyu ve atık su numunelerindeki Cr(III) ve Cr(VI) miktarları tayin edilmiştir. Musluk suyunda spike edilen numunede 10 µgL^{-1} Cr(III) ve Cr(VI) beklenirken bu değer 9.93 µg L^{-1} Cr(III) ve 10.26 µg L^{-1} Cr(VI) olarak bulunmuştur. Bu da bize geri kazanım değerlerinin sırasıyla %99.3 ve %102.6 olduğunu gösterir. Yine musluk suyunda 100 µgL^{-1} spike edilen numune Cr(III) 100.11 µg L^{-1}, Cr(VI) için 101.12 mg L^{-1} olarak bulunmuş, geri kazanım değerinin Cr(III) ve Cr(VI) için sırasıyla %101.1 ve %101.2 olarak bulunmuştur. Kaplıca suyunda analit siyali üzerine matris etkisinin olup olmadığının incelenmesi için kaplıca suyuna 25 µg L^{-1} ve 100 µg L^{-1} standart çözeltiler spike edilmiştir.



Şekil 11.10 Kaplıca suyunda Dionex AS-9 kolon kullanılarak, %2.5 HNO_3 mobil faz ortamında 25 µg L^{-1} spike Cr(III), Cr(VI) mix çözeltisi ve 25 µg L^{-1} standart çözeltilerinin IC-ICP-MS cihazına gönderilmesi ile elde edilen kromatogram.



Şekil 11.11 Kaplıca suyunda Dionex AS-9 kolon kullanılarak, %2.5 HNO_3 mobil faz ortamında 100 µg L^{-1} spike Cr(III), Cr(VI) mix çözeltisi ve 100 µg L^{-1} standart çözeltilerinin IC-ICP-MS cihazına gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar.

Kaplıca suyunda spike edilen numunede 25 µg L^{-1} Cr(III) ve Cr(VI) beklenirken bu değer 25.05 µg L^{-1} Cr(III) ve 25.08 µg L^{-1} Cr(VI) olarak bulunmuştur. Bu da bize geri kazanım değerlerinin sırasıyla %100.17 ve %100.29 olduğunu gösterir. Kaplıca suyunda 100 µgL^{-1} spike edilen numune Cr(III) 91.80 µg L^{-1}, Cr(VI) için 100.50 µg L^{-1} olarak bulunmuş, geri kazanım değerinin Cr(III) ve Cr(VI) için sırasıyla % 91.80 ve % 100.50 olarak tespit edilmiştir. Numune analiti üzerine matris etkisinin olmadığı ve geliştirilen yöntemin musluk suyunda ve kaplıca suyunda uygulanabilir olduğu kanıtlanmıştır.

Çizelge 11.4 Dionex Ion Pac AS9 kolonda musluk suyunda 10 µg/L, 25 µg/L, 100 µg/L spike deneyleri için elde edilen % geri kazanım değerleri.

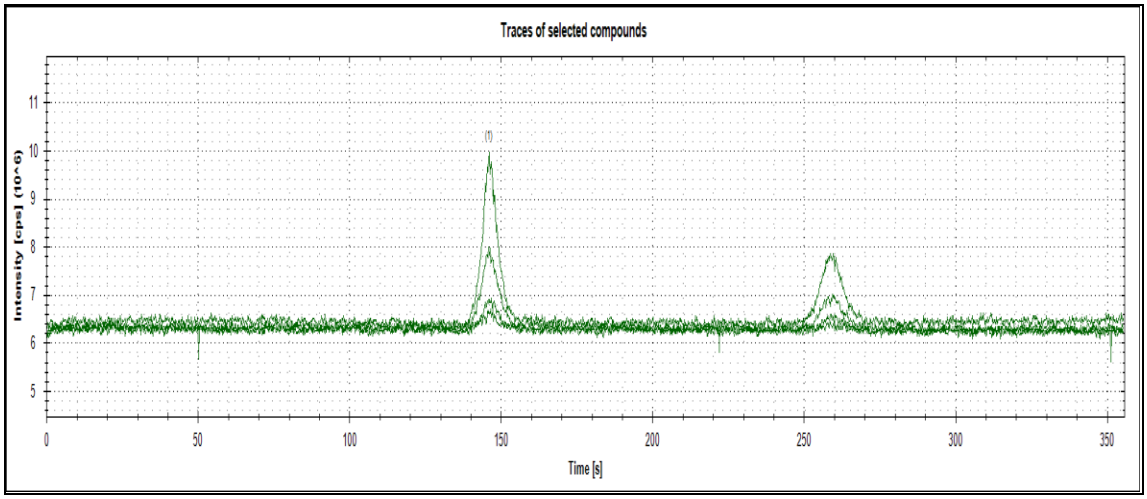
	Cr(III) %Geri Kazanım	**Cr(VI) %Geri Kazanım**
10 µg/L, spike mix	99.3 ± 4.6	102.6 ± 2.2
25 µg/L, spike mix	97.2 ± 4.5	101.1 ± 2.2
100 µg/L, spike mix	101.1 ± 4.7	101.2 ± 2.1

Çizelge 11.5 Dionex Ion Pac AS9 kolonda Kaplıca suyunda 25 µg/L, 100 µg/L spike deneyleri için elde edilen % geri kazanım değerleri.

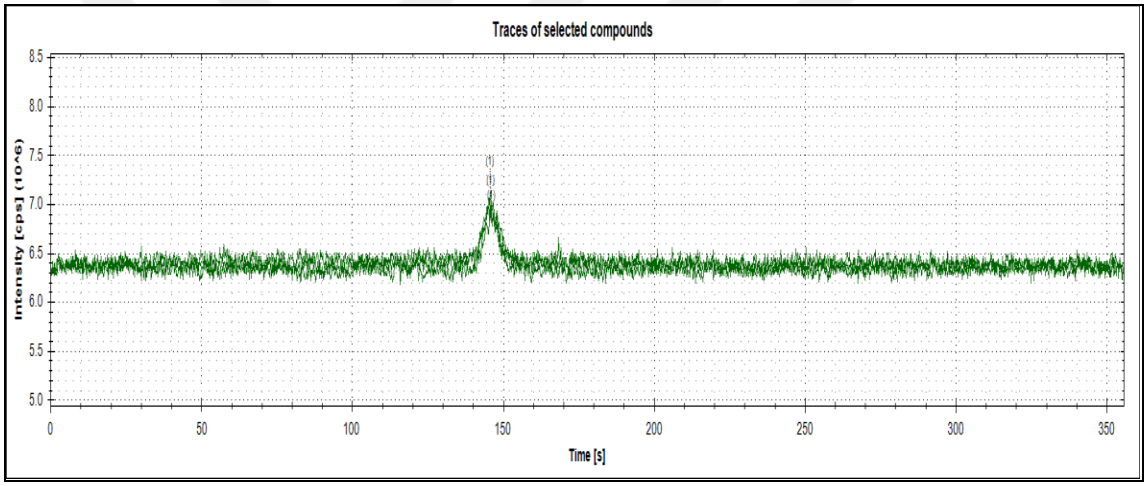
	Cr(III) %Geri Kazanım	**Cr(VI) %Geri Kazanım**
25 µg/L, spike mix	100.17 ± 4.65	100.29 ± 2.62
100 µg/L, spike mix	91.80 ± 4.26	100.50 ± 2.70

11.6 IC-ICP-MS Sisteminde Yapılan Analizlerin Doğruluğunun Tespiti İçin Yapılan CRM Analiz Sonuçları

Geliştirilen analitik yöntemin doğruluğunu test etmek amacı ile 1201 kodlu kaynak suyu analiz edilmiştir. CRM analizinde ^{52}Cr ve ^{53}Cr izotopları ile çalışılmış, bağıl bulunma yüzdesi yaklaşık 10 kat fazla olan ^{52}Cr izotopu için elde edilen sinyal değerleri de yaklaşık 10 kat fazla bulunmuştur. 3 tekrarlı yapılan CRM analizi için 5.0-50 ng mL^{-1} aralığında kalibrasyon standartları sisteme gönderilerek krom türlerinin sertifikalı referans madde içerisinde miktarları tespit edilmeye çalışılmıştır. Standart ve CRM için elde edilen kromatogramlar Şekil 11.12, 11.13, 11.14, ve 11.15' de görülmektedir.

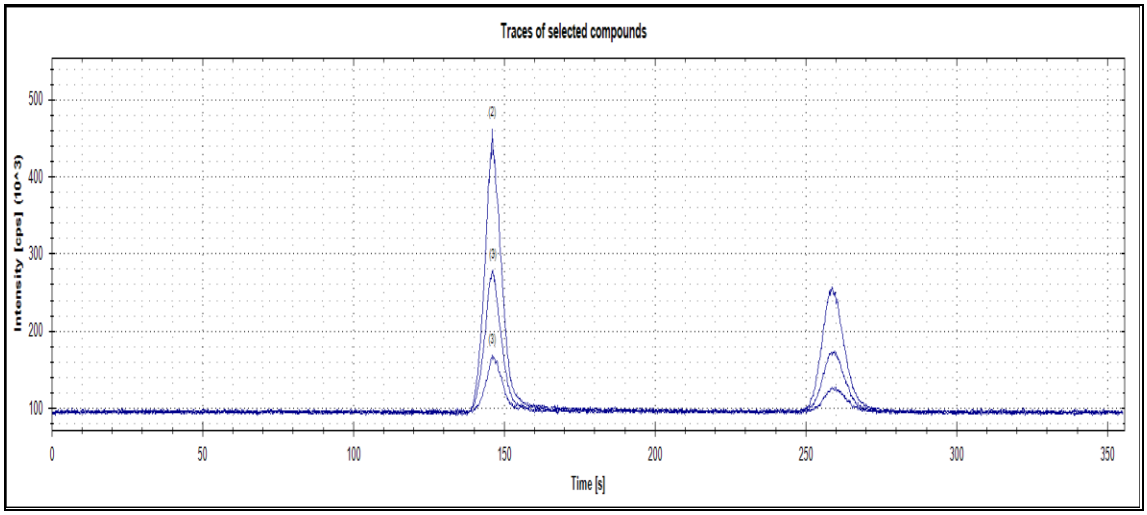


Şekil 11.12 IC-ICP-MS sisteminde ^{52}Cr izotopu için 5.0-50 µg/L aralığındaki standart çözeltilere ait kromatogramlar.

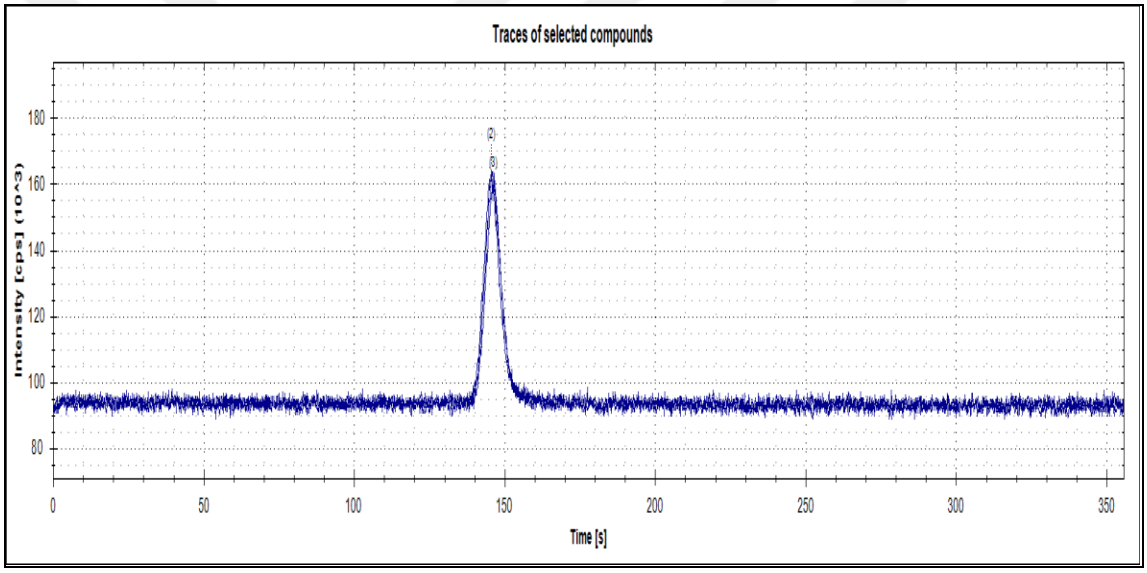


Şekil 11.13 IC-ICP-MS sisteminde ^{52}Cr izotopu için üç tekrarlı yapılan CRM analizine ait kromatogramlar.

Şekil 11.13' de görüldüğü üzere CRM in yapısında Cr(III) tespit edilmiş olup Cr(VI) sinyali görülmemiştir.



Şekil 11.14 IC-ICP-MS sisteminde ^{53}Cr izotopu için 5.0-50 µg L^{-1} aralığındaki standart çözeltilere ait kromatogramlar.



Şekil 11.15 IC-ICP-MS sisteminde ^{53}Cr izotopu için üç tekrarlı yapılan CRM analizine ait kromatogramlar.

Şekil 11.15 de görüldüğü üzere ^{52}Cr ve ^{53}Cr izotoplarında yapılan çalışmalarla in 1201 kodlu UME CRM'in içerisinde Cr(III) tespit edilmiş olup Cr(VI) sinyali görülmemiştir.

Çizelge 11.5 Cr(III) için IC-ICP-MS sisteminde elde edilen sonuçlar ve sertifika değerleri.

	Ortalama (µg/kg)	**Standart sapma**	**Sertifika değeri (µg/kg)**	**Standart sapma**
^{52}Cr	34.93	0.93	34.6	1.2
^{53}Cr	35.78	0.60		

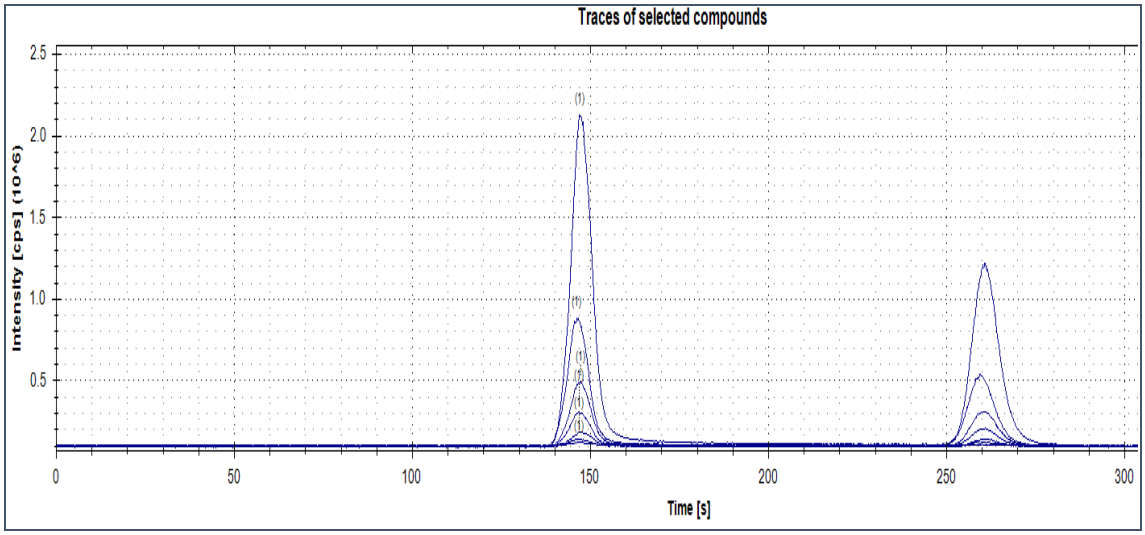
Çizelge 11.5' de ^{52}Cr ve ^{53}Cr izotopları için elde edilen Cr(III) konsantrasyonu ve standart sapma değerleri verilmiştir. Sertifikalı referans maddenin yapısında hangi krom türünün bulunduğu sertifikada rapor edilmemesine rağmen Cr(III) analiti Çizelge 11.5' de görülen derişimlerde tespit edilmiştir. Sonuçlar 1201 CRM için verilen referans değer ile uyum içerisindedir.

11.7 Bitki Çalışması

Bitki çalışmasında, bitkinin gelişiminin gözlenmesi, Cr(III) ve Cr(VI)'nın bitki gelişimine olan etkisinin incelenmesi için topraksız tarım çalışması yapılmıştr. Bu amaç için marul bitkisinden faydalanılmıştır. Dört farklı çalışma gurubu oluşturulmuştur. Bitki gelişiminin gözlenmesi amacıyla Kontrol (blank), Cr(III), Cr(VI) ve mix karışımdan oluşan 250 µg L^{-1}'lik standart çözeltiler kullanılarak 100 mL'lik besi ortamı oluşturulmuştur. Bitkiler 14 gün boyunca gözlenmiş olup ağırlık kaybından yola çıkarak başlangıçtaki ağırlıklarına saf su ile tamamlanmıştır. Her iki günde bir bitki ortamından 0.25 g örnek alınmış ve son ağırlık 10 g olacak şekilde NH_4NO_3 ile tamamlanmıştır.

Bitkinin Cr(III), Cr(VI) ve mix karışımından ne kadarını kullandığının tespit edilmesi amacıyla 2.0-250 µgL^{-1} aralığında kalibrasyon çözeltileri IC-ICP-MS sisteminde okutulmuştur.

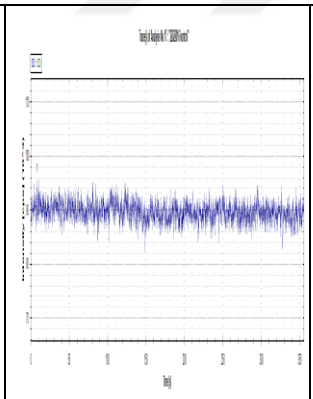
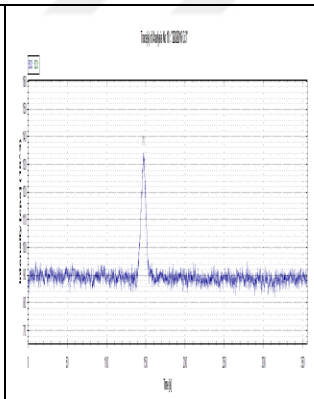
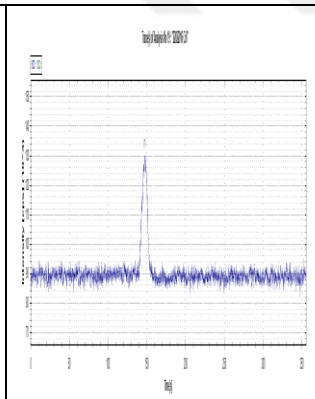
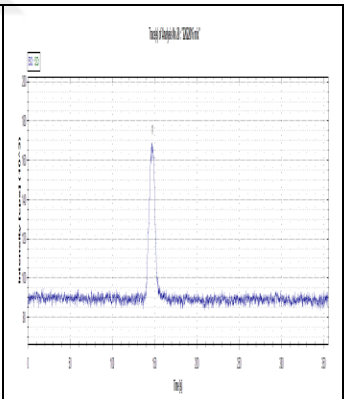
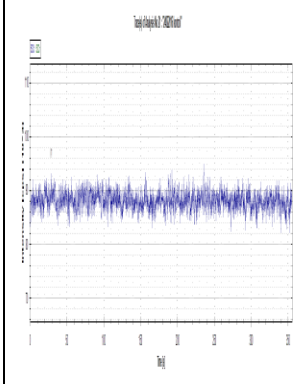
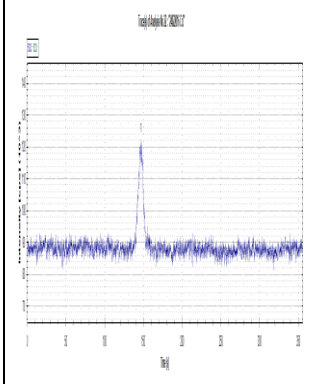
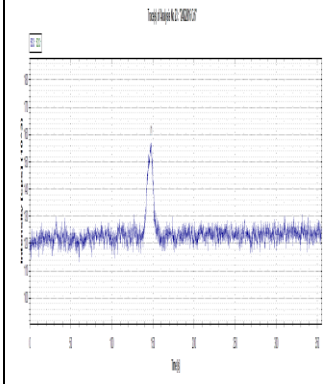
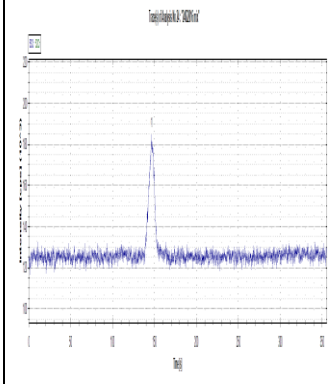
Tablo 11.2'deki kromatogafik şartlar kullanılmış olup standartlar için elde edilen kromatogramlar Şekil 11.16'de gösterilmiştir.



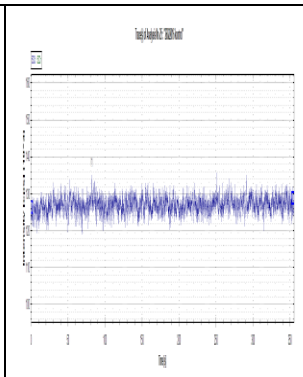
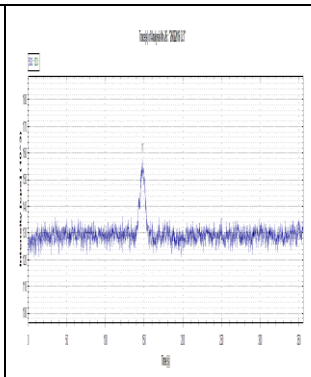
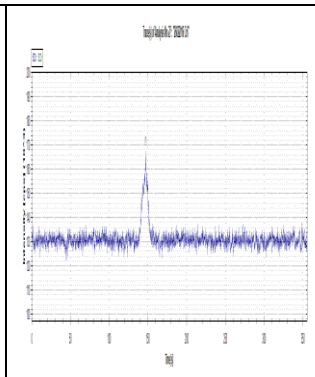
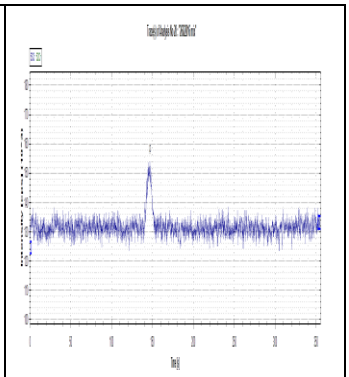
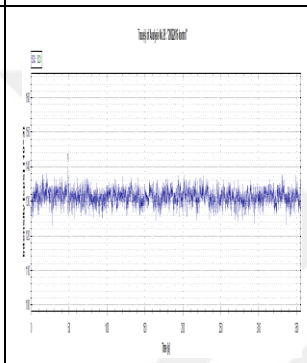
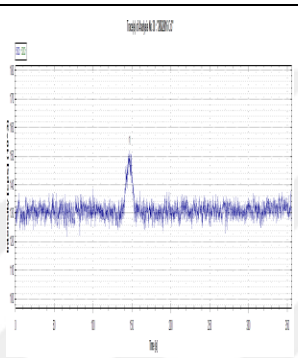
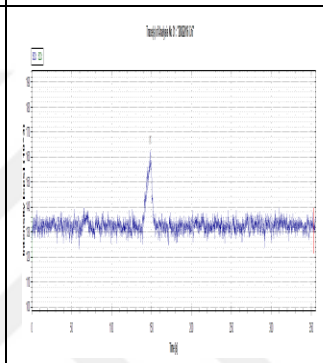
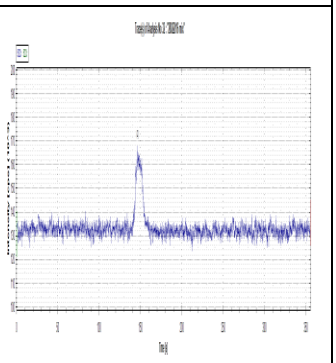
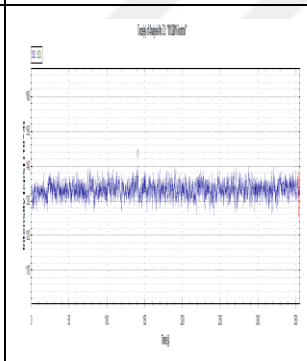
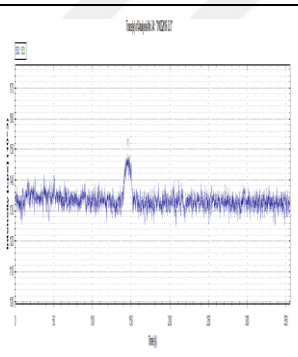
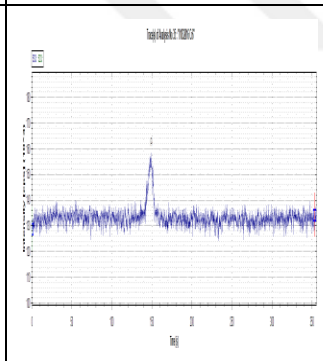
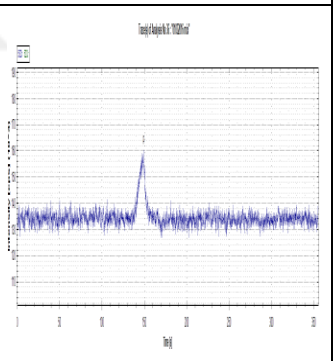
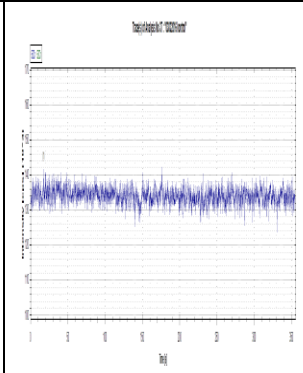
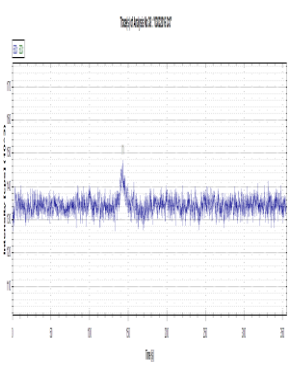
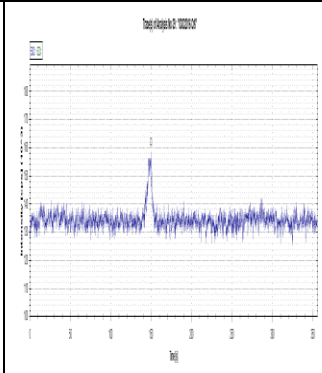
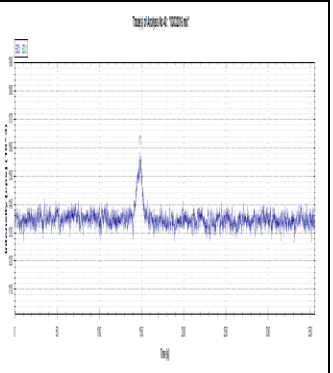
Şekil 11.16 IC-ICP-MS sisteminde 2.0-250µg/L aralığındaki kalibrasyon standartlarına ait kromatogramlar.

1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 ve 15.gün de kontrol grubu, Cr(III), Cr(VI) ve mix çözeltilerden alınan örneklerin IC-ICP-MS sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramalar Çizelge 11.6' da görülmektedir.

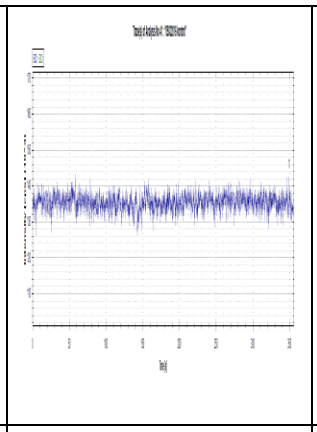
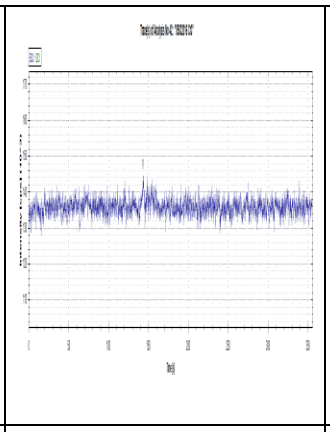
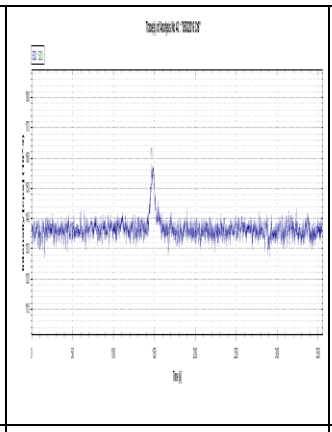
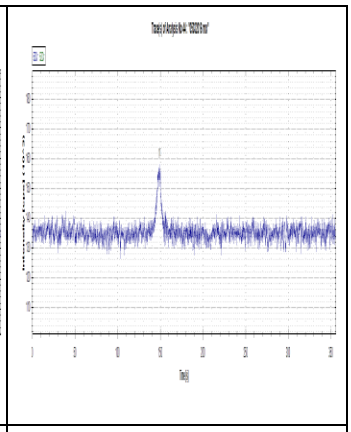
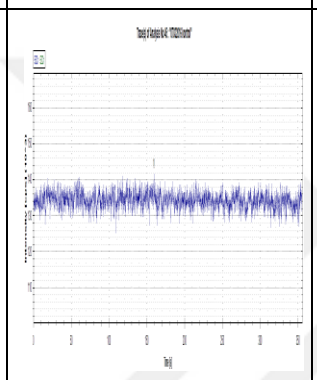
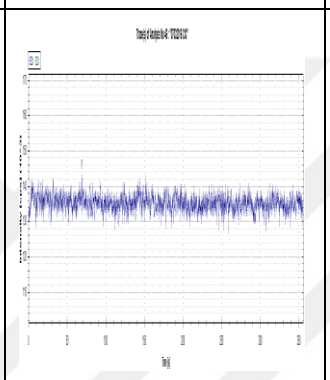
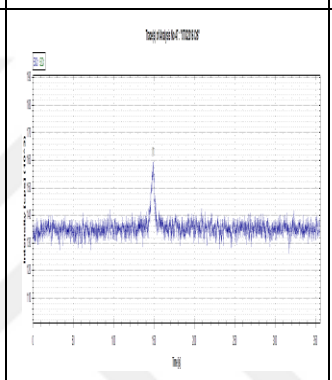
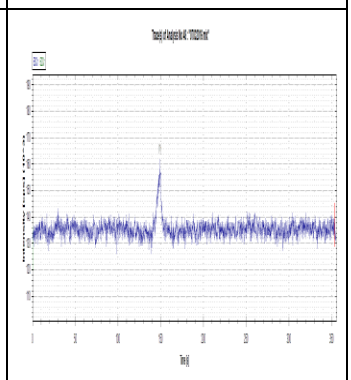
Çizelge 11.6 Kontrol, Cr(III), Cr(VI) ve her iki analiti içeren mix çözeltinin 14 boyunca yapılan analizlerine ait kromatogramlar.

	Kontrol	**Cr(III)**	**Cr(VI)**	**Mix**
1.gün				
3.gün				

Çizelge 11.6 Kontrol, Cr(III), Cr(VI) ve her iki analiti içeren mix çözeltinin 14 boyunca yapılan analizlerine ait kromatogramlar (devamı)

5.gün				
7.gün				
9.gün				
11.gün				

Çizelge 11.6 Kontrol, Cr(III), Cr(VI) ve her iki analiti içeren mix çözeltinin 14 boyunca yapılan analizlerine ait kromatogramlar (devamı)

13.gün				
15.gün				

Yapılan analizler sonucu analitlere ait elde edilen derişimler Çizelge 11.7. de görülmektedir.

Çizelge 11.7 Kontrol, Cr(III), Cr(VI) ve her iki analiti içeren mix çözeltinin 15 boyunca yapılan analizlerinde elde edilen analit miktarları.

	1.Gün (µg/L)	3.Gün (µg/L)	5.Gün (µg/L)	7.Gün (µg/L)	9.Gün (µg/L)	11.Gün (µg/L)	13.Gün (µg/L)	15.Gün (µg/L)
Cr(III)	220.0±10.2	173.6±8.1	149.6±6.9	135.2±6.3	93.6±4.3	63.2±2.9	< 3.6	T.E.
Cr(VI)	201.6±4.4	193.6±4.2	179.2±3.9	159.2±3.4	113.2±2.4	101.6±2.2	95.2±2.1	54.4±1.2
Mix	421.6±19.6	296 ±13.7	141.6±6.6	239.6±11.1	167.6±7.8	133.2±6.2	110±5.1	80.4±3.7

Cr(VI) ve mix çözeltilerini içeren bitkilerden alınan örneklerde Cr(VI)'nın Cr(III)'e indirgendiği gözlenmiştir. Dolayısıyla Cr(VI)' ya ait pik gözlenmemiştir.

11.8 Cr(III) ve Cr(VI) Analitlerinin Yapay Mide ve Yapay Bağırsak Ortamındaki Davranışları

Tezin bu bölümüne kadar olan çalışmalarda topraksız tarım ile bitkiler yetiştirilmiş ve ve bitkilerin bulunduğu ortama Cr(III), Cr(VI) ve her iki analiti de içeren mix çözelti eklenmiştir. 15 günlük takip sürecinden sonra alınan örnekler IC-ICP-MS sisteminde okutulmuştur. Bu bölümde ise bitkiye herhangi bir yolla geçen Cr türlerinin insan vücudunda nasıl bir etkiye sahip olduğunun incelemesi yapılmıştır. Bilindiği üzere krom türlerinden Cr(III) belli bir konsantrasyon aralığında insan vücudu için faydalı bir etki gösterirken, Cr(VI) eser düzeylerde bile kansorojen etki göstermektedir. Bu çalışma için yapay mide ve yapay bağırsak ortamı oluşturulmuştur. Yapay mide ve yapay bağırsak ortamı literatürde var olan çalışmalardan yararlanılarak hazırlanmıştır [115]. 100 mL yapay mide sıvısı için; 200 mg pepsin tartılıp, 80-90 ml 0.03 M NaCl'de çözülerek seyreltik HCI ile pH 1.2' ye ayarlanmış ve hacim 100 mL' ye tamamlanmıştır. Yapay bağırsak ortamı için 0.05 M KH_2PO_4 hazırlamak için 6.8 g tartılmıştır. pH 7.5' ye H_3PO_4 ile ayarlanmıştır. 10 mL yapay bağırsak sıvısı için 0.10 g pankreatin tartılıp 8-9 mL 0.05 M KH_2PO_4 içersinde çözülerek H_3PO_4 ile pH 7.5' ye ayarlanmıştır ve 10 mL' ye tamamlanmıştır. İçerisinde 250 μgL^{-1} Cr(III), Cr(VI) ve her iki analitide içerisinde barındıran mix çözeltiler bulunan bitki numuneleri mide ortamında 3 saat bekletilirken, bağırsak ortamında 7 saat bekletilmiştir. Krom türlerinin yapay mide ve yapay bağırsak ortamında belli sürelerde bekletilmesi sonucu analitlerin mide ve bağırsak ortamına olan salınımları Çizelge 11.8' de verilmiştir.

Çizelge 11.8 Cr(III), Cr(VI) ve mix numunelerin yapay mide ve yapay bağırsak ortamındaki miktarları.

	Cr(III), $\mu g\ L^{-1}$	Cr(VI), $\mu g\ L^{-1}$	Mix, $\mu g\ L^{-1}$
Yapay Mide	12.74 ± 0.59	17.49 ± 0.45	30.57 ± 1.40
Yapay Bağırsak	3.11 ± 0.15	12.00 ± 0.31	13.38 ± 0.62

11.9 Kolon Geri Kazanım (Recovery) Çalışması

Kolonda krom türlerinin tutunup tutunmadığının tespiti amacıyla kolon geri kazanım çalışması yapılmıştır. Bu amaçla 350 s boyunca kolon kullanılarak, enjekte edilen 1.0 mg L^{-1} lik mix çözelti toplanmıştır. Kolon kullanılmadan toplanan mix çözelti NH_4NO_3 çözeltisiyle, kolon ile elde edilen ağırlığa eşit olacak şekilde tamamlanmıştır. Elde edilen mix çözeltiler ICP-MS sisteminde 3 tekrarlı okutulmuştur. Elde edilen geri kazanım değeri Çizelge 11.8' de görülmektedir.

Çizelge 11.8 Kolon geri kazanım değerleri.

Ortalama	**Standart Sapma**
103.88	2.42

Çizelge 11.8'de de görüldüğü gibi kolon kullanılarak ve kolonsuz toplanan mix çözeltilerin sinyal değerleri yaklaşık olarak aynı bulunmuş olup geri kazanım değeri 103.88 ± 2.42 olarak tespit edilmiştir. Kolonda krom türlerinden herhangi birinin tutunmadığı sonucuna varılmıştır. Bu durum kullanılan kolon ile krom türleme çalışmalarının belirtilen şartlar altında rahatlıkla yapılabileceği sonucunu ortaya çıkartmışdır.

BÖLÜM 12

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında genellikle karmaşık matriksler içerisinde bulunan suda çözünen vitaminlerden niasin ve piridoksinin yüksek doğruluk ve duyarlılıkta kantitatif tayinlerine yönelik HPLC ve LC/Q-TOF/MS esaslı analitik yöntemler geliştirilmiştir. Analitlerin düşük tayin limitlerinde yüksek doğrulukla tayin edilmesi için sistemlerin değişken tüm parametreleri optimize edilmiştir. HPLC sisteminde kullanılan Zorbax SB C18 kolonu için LOD/LOQ değerleri sırasıyla niasin ve piridoksin için 3.7 μg L^{-1}/12.3 μg L^{-1}, 12.3 μg L^{1}/18.9 μg L^{-1} bulunmuştur. pH 3.54'e ayarlanmış 23 mM fosfat tamponu ve metanol (85:15) mobil faz olarak kullanılmıştır. Zorbax SB C18 analitik kolonu 220 nm dalga boyunda niasin ve piridoksin analitlerin ayrılmasında kullanılmış, optimum akış 1.2 mL/min olarak belirlenmiştir. LC/Q-TOF/MS ile yapılan çalışmalarda tüm analitlerin kalitatif ve kantitatif tayinleri ve sistem optimizasyon parametrelerinin belirlenmesi için Poroshell 3x150x2.7 EC C18 kolon kullanılmıştır. LC/Q-TOF/MS sisteminde niasin ve pridoksin için LOD/LOQ değerleri sırasıyla 1.98 μg L^{-1} / 6.59 μg L^{-1}, 1.3 μg L^{-1} / 4.4 μg L^{-1} olarak bulunmuştur. Mobil faz olarak % 0.1 formik asit içeren H_2O- CH_3OH kullanılmış olup analitlerin birbirinden ayrılması için gradient programı uygulanmış, optimum akış hızı 0.50 mL/min olarak belirlenmiştir.

Piyasada kullanım sıklığı yüksek ve tüketimi fazla olan vitamin tabletlerinin vücuda alımının yeterli düzeyde olup olmadığının tespiti amacıyla vitamin tabletlerinin ve şurupların analizine yönelik hızlı ve ucuz analitik yöntemlerin geliştirilmesi bu tez kapsamında hedeflenmiş ve gerçekleştirilmiştir. Vitamin tabletlerinin ve şuruplarının

prospektüslerinde iddia edilen miktarlarla farklı cihazlarda yapılan analiz sonuçlarının birbirleriyle aynı doğrultuda olup olmadığının tespiti hedeflenmiştir. Bu amaç için niasin ve piridoksin analitlerinin miktar tayinleri hem HPLC-DAD hem de LC/Q-TOF/MS sistemlerinde tekrarlı olarak yapılmış ve her iki sistemde yapılan analizlerin birbiriyle ve prospektüslerinde belirtilen miktarla karşılaştırılmıştır. HPLC ve LC/Q-TOF/MS sisteminde her iki analit için elde edilen verilerin birbirleri ile uyum içerisinde olduğu tespit edilmiştir.

Vitaminlerin vücuda alındıktan sonra midede bulundukları süre içerisindeki davranışlarının incelenmesi için mix vitamin standardı hazırlanıp yapay mide ortamında çalışmalar yürütülmüş ve HPLC sisteminde analizler yapılmıştır. Elde edilen analiz sonuçlarına göre kromatogramda niasin ve piridoksin analitlerinin dışında başka bir pike rastlanmamış ve analitlerin pik alanlarında zaman içerisinde bir değişiklik gözlenmemiştir.

Bu tez kapsamında niasin ve piridoksinin eş zamanlı tayinleri için geliştirilen analitik yöntem yoğun bir matrikse sahip olan atık su örneklerine ve musluk suyu örneklerine başarılı bir şekilde uygulanmış ve yapılan spike deneyleri sonucu yüksek geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Tayinlerde pik alanı kullanılmış ve geri kazanım değerleri musluk suyu için %99-101 aralığında, atık su için %97.5-98.0 aralığında bulunmuştur. Analitik performansı ortaya konulan bu analitik yöntem farklı matrikslerde bulunan niasin ve piridoksin analitlerinin yüksek doğruluk ve duyarlılıkta tayin edilmesine olanak sağladığı kanıtlanmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında krom türlerinin yüksek doğruluk ve duyarlılıkta tayinlerine yönelik analitik bir yöntem geliştirilmiştir. Analitlerin düşük tayin limitlerinde yüksek doğrulukla tayin edilmesi için sistemin değişken tüm parametreleri (mobil fazın türü, mobil fazın oranı, pH, akış hızı) optimize edilmiştir. IC-ICP-MS sisteminde kullanılan Dionex AS-9 kolonu için LOD/LOQ değerleri sırasıyla Cr(III) ve Cr(VI) türleri için 0.10 μg L^{-1}/0.34 μg L^{-1}, 0.03 μg L^{1}/0.11 μg L^{-1} bulunmuştur. Çalışmada kullanılan standart çözeltiler pH 4 e ayarlanmış 100 mM NH_4NO_3 çözeltisi ile hazırlanmıştır. Çalışmada mobil faz olarak 0.55 M (% 2.5) HNO_3 kullanılmıştır. Dionex AS-9 analitik kolonu Cr (III) ve Cr(VI) analitlerinin ayrılmasında kullanılmış, optimum akış 1.0 mL/min olarak belirlenmiştir. Cr(III) ve Cr(VI) türlerinin eş zamanlı tayinleri için geliştirilen analitik yöntem yoğun bir matrikse sahip olan kaplıca suyu

örneklerine ve musluk suyu örneklerine başarılı bir şekilde uygulanmış ve yapılan spike deneyleri sonucu yüksek geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

Çalışmada topraksız tarım çalışması da yapılarak bitki yetiştirilmiş ve bitkinin yetiştirildiği ortama belli miktarlarda krom türleri eklenmiştir. Çalışmanın sonucunda Cr(III) türünün yüksek miktarda bitkiye geçtiği gözlemlenmiştir.

KAYNAKLAR

[1] Gentili, A. Caretti, F. D'Ascenzo, G. Marchese, S. Perret, D. Di Corcia, D. ve Rocca, L.M., (2008). "Simultaneous determination of water-soluble vitamins in selected food matrices by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry", Rapid Communications in Mass Spectrometry, 22: 2029-2043.

[2] Combs Jr, G.F., (1991). "The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health", American Journal of Clinical Nutrition, 53: 755-763.

[3] Zafra-Gómez, A. Garballo, A. Morales, J.C. ve García-Ayuso, L.E., (2006). "Simultaneous determination of eight water-soluble vitamins in supplemented foods by liquid chromatography", Journal of agricultural and food chemistry, 54: 4531-4536.

[4] Gentili, A. ve Caretti, F., (2013). "Analysis of vitamins by liquid chromatography", Liquid Chromatography. Amsterdam: Elsevier: 477-517.

[5] Poongothai, S. Ilavarasan, R. ve Karrunakaran, C., (2010). "Simultaneous and accurate determination of vitamins B1, B6, B12 and alpha-lipoic acid in multivitamin capsule by reverse-phase high performance liquid chromatographic method", International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences, 2: 133-139.

[6] Sheppard, A. ve Prosser, A., (1970). "[82] Gas chromatography of vitamin B 6", Methods in Enzymology, 18: 494-500.

[7] Wang, J.L. Liu, X. ve Schnute, W.C., "Simultaneous Analysis of Water-Soluble Vitamins in Beverages by UHPLC-MS/MS", Energy, 87: 21.

[8] Selimoğlu, F., (2009). Evsel Atıksu Arıtma Tesislerinde Bazı B Grubu Vitamin Miktarlarının Belirlenmesi.

[9] Fernandez-Muino MA, S.-O.M., Valls-Garcia F, (2002). "Water-soluble vitamins. In Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals Hurst WJ (ed). CRC Press Inc.: BocaRaton, FL".

[10] Sarafraz-Yazdi, A. ve Amiri, A., (2010). "Liquid-phase microextraction", TrAC Trends in Analytical Chemistry, 29: 1-14.

[11] Dadfarnia, S. ve Shabani, A.M.H., (2010). "Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals—A review", Analytica chimica acta, 658: 107-119.

[12] Alver, E. Demirci, A. Ve Özcimder, M., (2012). "Microextraction methods", Sigma, 30: 75-90.

[13] Sahu, P.K. ve Patro, C.S., (2014). "Application of chemometric response surface methodology in development and optimization of a RP-HPLC method for the separation of metaxalone and its base hydrolytic impurities", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 37: 2444-2464.

[14] Grotzkyj Giorgi, M. Howland, K. Martin, C. ve Bonner, A.B., (2012). "A novel HPLC method for the concurrent analysis and quantitation of seven water-soluble vitamins in biological fluids (plasma and urine): a validation study and application", The Scientific World Journal, 2012.

[15] Chatzimichalakis, P.F. Samanidou, V.F. Verpoorte, R. ve Papadoyannis, I.N., (2004). "Development of a validated HPLC method for the determination of B-complex vitamins in pharmaceuticals and biological fluids after solid phase extraction", Journal of separation science, 27: 1181-1188.

[16] Skoog, D.A. Holler, F.J. ve Crouch, S.R., (2007). Instrumental analysis: Cengage Learning India.

[17] Villar, M. Alava, F. Lavilla, I. ve Bendicho, C., (2001). "Operational speciation of thallium in environmental solid samples by electrothermal atomic absorption spectrometry according to the BCR sequential extraction scheme", Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 16: 1424-1428.

[18] Dündar, M.Ş. ve Altundağ, H., (2007). Talyumun Sağlığa Etkisi, Çevresel Kaygı Ve Talyum Türlenmesı, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11: 64-77.

[19] Burguera, M. ve Burguera, J., (1997). "Analytical methodology for speciation of arsenic in environmental and biological samples", Talanta, 44: 1581-1604.

[20] Jain, C. ve Ali, I., (2000). "Arsenic: occurrence, toxicity and speciation techniques", Water Research, 34: 4304-4312.

[21] Tan, H.K., (1998). "A continuous stirred tank reactor study on chromic acid removal by ion exchange".

[22] Batley, G.E., (1989). Trace Element Speciation Analytical Methods and Problems: CRC Press.

[23] Marcinkowska, M. ve Barałkiewicz, D., (2016). "Multielemental speciation analysis by advanced hyphenated technique–HPLC/ICP-MS: A review", Talanta, 161: 177-204.

[24] Organization, W.H., (2011). Guidelines for drinking-water quality: Geneva: world health organization.

[25] Chen, Z. Megharaj, M. ve Naidu, R., (2007). "Speciation of chromium in waste water using ion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry", Talanta, 72: 394-400.

[26] Markiewicz, B. Komorowicz, I. ve Barałkiewicz, D., (2016). "Accurate quantification of total chromium and its speciation form Cr (VI) in water by ICP-DRC-IDMS and HPLC/ICP-DRC-IDMS", Talanta, 152: 489-497.

[27] Byrdy, F.A. Olson, L.K. Vela, N.P. ve Caruso, J.A., (1995). "Chromium speciation by anion-exchange high-performance liquid chromatography with both inductively coupled plasma atomic emission spectroscopic and inductively coupled plasma mass spectrometric detection", Journal of chromatography A, 712: 311-320.

[28] Tulum, Y., (2007). "B Kompleks Vitaminleri ve Biyokimyası".

[29] Altınışık, M., "Vitaminler Tanımı ve Tarihçe": 1-37.

[30] Bozkurt, D., (2014). "Soğuk Plazma Uygulamasının Vitaminler Ve Polifenol Oksidaz (Pfo) Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Ensititüsü".

[31] J. Gregory, O.R., Fennema, (1996). "Food Chemistry, Third Edition", Food science and technology, ISBN 0-8247-9346-3: 531-610.

[32] Gibney, M.J. Vorster, H.H. ve Kok, F.J., (2002). Introduction to human nutrition: Blackwell science Oxford.

[33] Turner, C. King, J.W. ve Mathiasson, L., (2001). "Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis", Journal of chromatography A, 936: 215-237.

[34] Nelson, D.L. Lehninger, A.L. ve Cox, M.M., (2008). Lehninger principles of biochemistry: Macmillan.

[35] Luque-Garcıa, J. ve de Castro, M.L., (2001). "Extraction of fat-soluble vitamins", Journal of chromatography A, 935: 3-11.

[36] Pierrot-Deseilligny, C. ve Souberbielle, J.-C., (2017). "Vitamin D and multiple sclerosis: an update", Multiple Sclerosis and Related Disorders.

[37] Chakhtoura, M. El Ghandour, S. Shawwa, K. Akl, E.A. Arabi, A. Mahfoud, Z. Habib, R. Hoballah, H. ve Fuleihan, G.E.H., (2017). "Vitamin D Replacement in Children, Adolescents and Pregnant Women in the Middle East and North Africa: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials", Metabolism.

[38] Şeker, M.E., (2006). "Türkiyede Bulunan Bazı Üzüm Türlerinin Çekirdeklerindeki E-Vitamini Miktarının HPLC ile Tayini", Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Manisa.

[39] Soutif-Veillon, A. Ferland, G. Rolland, Y. Presse, N. Boucher, K. Féart, C. ve Annweiler, C., (2016). "Increased dietary vitamin K intake is associated with less severe subjective memory complaint among older adults", Maturitas, 93: 131-136.

[40] Cellar, N.A. McClure, S.C. Salvati, L.M. ve Reddy, T.M., (2016). "A new sample preparation and separation combination for precise, accurate, rapid, and simultaneous determination of vitamins B 1, B 2, B 3, B 5, B 6, B 7, and B 9 in infant formula and related nutritionals by LC-MS/MS", Analytica chimica acta, 934: 180-185.

[41] Wuest, H.M., (1962). "The history of thiamine", Annals of the New York Academy of Sciences, 98: 385-400.

[42] Jordan, F. ve Patel, M.S., (2003). Thiamine: catalytic mechanisms in normal and disease states: CRC Press.

[43] Trang, H.K., (2013). "Development of HPLC methods for the determination of water-soluble vitamins in pharmaceuticals and fortified food products".

[44] Weber, P., (2015). "Vitamin basics;The facts about vitamins in nutrition", Corporate Scientist for Human Nutrition & Health".

[45] Barut, İ., "Niasin(B3) Vitaminin Yağ Grefti Yağ Grefti Sağ Kalımı Üzerine Etkisi

", Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik ve Rekonsrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı.

[46] Sharpless, K.E. Margolis, S. ve Thomas, J.B., (2000). "Determination of vitamins in food-matrix Standard Reference Materials", Journal of chromatography A, 881: 171-181.

[47] Mittal, M.K. Florin, T. Perrone, J. Delgado, J.H. ve Osterhoudt, K.C., (2007). 'Toxicity from the use of niacin to beat urine drug screening", Annals of emergency medicine, 50: 587-590.

[48] Ball, G.F., (2005). Vitamins in foods: analysis, bioavailability, and stability: CRC Press.

[49] Anne Theobald, E.A., (1996). "Evaluation of Methods for the

Analysis of Infant Formulae-Part I - Determination of Vitamins", EUROPEAN COMMISSION JOINT RESEARCH CENTRE,Environment Institute Ispra (VA) Italy.

[50] Hayashi, H., (2012). Historical Context of Vitamin B, ed. B Vitamins and Folate. 3-20.

[51] Reynolds, E., (2006). "Vitamin B12, folic acid, and the nervous system", The lancet neurology, 5: 949-960.

[52] Kruman, I.I. Kumaravel, T. Lohani, A. Pedersen, W.A. Cutler, R.G. Kruman, Y. Haughey, N. Lee, J. Evans, M. ve Mattson, M.P., (2002). "Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease", Journal of Neuroscience, 22: 1752-1762.

[53] Green, R., (2013). "Vitamin B12: Physiology, Dietary Sources, and Requirements".

[54] Lukaski, H.C., (2004). "Vitamin and mineral status: effects on physical performance", Nutrition, 20: 632-644.

[55] Heudi, O. Kilinc, T. ve Fontannaz, P., (2005). "Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase high performance liquid chromatography with ultra-violet detection: application to polyvitaminated premixes", Journal of chromatography A, 1070: 49-56.

[56] Bates, C., (1997). "Vitamin analysis", Annals of clinical biochemistry, 34: 599-626.

[57] Shabangi, M. ve Sutton, J.A., (2005). "Separation of thiamin and its phosphate esters by capillary zone electrophoresis and its application to the analysis of water-soluble vitamins", Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis, 38: 66-71.

[58] Odunfa, S.A., (1986). "Microbiological assay of vitamin B and biotin in some Nigerian fermented foods", Food chemistry, 19: 129-136.

[59] David, I.G. Florea, M.-A. Cracea, O.G. Popa, D.E. Buleandra, M. Iorgulescu, E.E. David, V. Badea, I.A. ve Ciucu, A.A., (2015). "Voltammetric determination of B1 and B6 vitamins using a pencil graphite electrode", Chemical Papers, 69: 901-910.

[60] Liu, S. Zhang, Z. Liu, Q. Luo, H. ve Zheng, W., (2002). "Spectrophotometric determination of vitamin B 1 in a pharmaceutical formulation using triphenylmethane acid dyes", Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis, 30: 685-694.

[61] Fotsing, L. Fillet, M. Bechet, I. Hubert, P. ve Crommen, J., (1997). "Determination of six water-soluble vitamins in a pharmaceutical formulation by capillary electrophoresis", Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis, 15: 1113-1123.

[62] Díaz, A.N. Paniagua, A.G. ve Sánchez, F.G., (1993). "Thin-layer chromatography and fibre-optic fluorimetric quantitation of thiamine, riboflavin and niacin", Journal of chromatography A, 655: 39-43.

[63] Nakos, M. Pepelanova, I. Beutel, S. Krings, U. Berger, R. ve Scheper, T., (2017). "Isolation and analysis of vitamin B 12 from plant samples", Food chemistry, 216: 301-308.

[64] Hachey, D. Coburn, S. Brown, L. Erbelding, W. DeMark, B. ve Klein, P., (1985). "Quantitation of vitamin B6 in biological samples by isotope dilution mass spectrometry", Analytical biochemistry, 151: 159-168.

[65] Eitenmiller, R.R. Landen Jr, W. ve Ye, L., (2016). Vitamin analysis for the health and food sciences: CRC press.

[66] Blake, C.J., (2007). "Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements: a review", Analytical and bioanalytical chemistry, 389: 63-76.

[67] Budak, R.Ç., (2006). "Biyolojik materyallerde B12 vitamini bileşenlerinin ve diğer suda çözünür vitaminlerin dağılımının incelenmesi", Ege Üniversitesi , Fen Bilimleri Enstitüsü , Biyokimya Anabilim Dalı.

[68] Talwar, D. Davidson, H. Cooney, J. ve Jo'reilly, D.S., (2000). "Vitamin B1 status assessed by direct measurement of thiamin pyrophosphate in erythrocytes or whole blood by HPLC: comparison with erythrocyte transketolase activation assay", Clinical chemistry, 46: 704-710.

[69] Hofmann, A., (2010). "Spectroscopic techniques: I spectrophotometric techniques".

[70] Şener, E., (2015). "http://home.anadolu.edu.tr/~erolsener/Anadolu_Site/Ders_Notlar_files/Analitik 2-2015".

[71] Özkan, S.A. Uslu, B. ve Aboul-Enein, H.Y., (2003). "Analysis of pharmaceuticals and biological fluids using modern electroanalytical techniques", Critical Reviews in Analytical Chemistry, 33: 155-181.

[72] Qijin, W. Nianjun, Y. Haili, Z. Xinpin, Z. ve Bin, X., (2001). "Voltammetric behavior of vitamin B 2 on the gold electrode modified with a self-assembled monolayer of l-cysteine and its application for the determination of vitamin B 2 using linear sweep stripping voltammetry", Talanta, 55: 459-467.

[73] Beşergil, B., (2015). "Enstrümantel Analiz, Sıvı Kormatografi Ders Notları", Gazi Kitap Evi 1.Baskı.

[74] Douglas A. Skoog, F.J.H., Timoty A. Nieman, "Enstrümantel Analiz İlkeleri ", Bilim Yayıncılık, s; 498-531, 702-716, Ankara,.

[75] Beşergil, B., (2015). "Enstrümantal Analiz", 1. Baskı, Gazi Kitapevi, Ankara.

[76] Gürol Emekdaş, S.G., Hüseyin Gün, Ömer Kocabeyoğlu, "Kormatografik Yöntemler", Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 1:108 - 118, 1990.

[77] Mandal, S.M. Mandal, M. Ghosh, A.K. ve Dey, S., (2009). "Rapid determination of vitamin B 2 and B 12 in human urine by isocratic liquid chromatography", Analytica chimica acta, 640: 110-113.

[78] Gupta, V. Jain, A.D.K. Gill, N. ve Gupta, K., (2012). "Development and validation of HPLC method-a review", Int. Res J Pharm. App Sci, 2: 17-25.

[79] Santosh Kumar Bhardwaj, K.D., D. D. Agarwal, (2015). "A Review: HPLC Method Development and Validation", International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry.

[80] De Leenheer, A.P. ve Lambert, W., (2000). Modern Chromatographic Analysis Of Vitamins: Revised And Expanded: CRC Press.

[81] Moreno, P. ve Salvado, V., (2000). "Determination of eight water-and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography", Journal of chromatography A, 870: 207-215.

[82] Weston, A. ve Brown, P.R., (1997). High Performance Liquid Chromatography & Capillary Electrophoresis: Principles and Practices: Academic press.

[83] Walker, J.Q., (2012). Chromatographic systems: maintenance and troubleshooting: Elsevier.

[84] Snyder, L.R. Kirkland, J.J. ve Glajch, J.L., (2012). Practical HPLC method development: John Wiley & Sons.

[85] Başkan, D., (2015). "Bazı Gıda Boyar Maddelerin Analizi İçin Yeni Bir Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromotografisi (Rp-Hplc) Metodu Geliştirme", Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

[86] Meyer, V.R., (2013). Practical high-performance liquid chromatography: John Wiley & Sons.

[87] Koyunoğlu, S., (2008). "Paeonia Türleri İçerisindeki Monoterpen Glikozitlerinin Yapı Tayinleri Ve Kromatografik Analizleri ve Yapı Tayinleri

İçin Yöntem Geliştirilmesi", Hacettepe Ünversitesi Sağlık Bilimleri Estitüsü, Analitik Kimya Programı, Doktora Tezi.

[88] Serbest, H., (2016). "Valsartanın farklı Matrikslerde Tayinine Yönelik Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Kararlılık Çalışması. ", Yüksek lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, .

[89] Neşetoğlu, N., (2015). "Parasetamol Ve Flurbiprofenin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi İle Yanyana Analizi", Yüksek lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,.

[90] Dibek, H., (2014). "Analitik Laboratuvarlarda Hplc Kolonu Seçimi", Turkchem Derg., 60-61

[91] Unutkan, T., (2016). "Amoksisilinin Farklı Matrikslerde Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi Sistemi İle Düşük Seviyelerde Tayini", Yüksek lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,.

[92] Porgalı, E., (2011). "Bazı Fenolik Bileşiklerin Hplc Tekniğiyle Yöresel Kırmızı Şaraplarda Tayin Edilmesi", Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

[93] Wenzel, T., "Separation Science - Chromatography Unit", Department of Chemistry

Bates College,.

[94] Kaushal Ramni, K.N., Upadhyay Ashutosh, Suri O. P, Tahakkar Arti, (2011). "High Performance Liquid Chromatograhy Dedectors- A review", International Journal Research Journal Of Pharmacy, IRJP 2 (5) 2011 1-7.

[95] Patel Amit, H.A., Beniwal Prashant, "Various Detectors Used In The High Performance Liquid Chromatography With Comparison Of Their Sensitivity", Seth G. L. Bihani S.D. College of Technical Education,

Institute of Pharmaceutical Sciences and Drug Research.

[96] Ahuja, S. ve Dong, M., (2005). Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC: Elsevier.

[97] Kupiec, T., (2004). "Quality-control analytical methods: High-performance liquid chromatography", International journal of pharmaceutical compounding, 8: 223-227.

[98] Kall, M.A., (2003). "Determination of total vitamin B 6 in foods by isocratic HPLC: a comparison with microbiological analysis", Food chemistry, 82: 315-327.

[99] Heudi, O. Kilinc, T. Fontannaz, P. ve Marley, E., (2006). "Determination of vitamin B 12 in food products and in premixes by reversed-phase high performance liquid chromatography and immunoaffinity extraction", Journal of chromatography A, 1101: 63-68.

[100] Chen, Z. Chen, B. ve Yao, S., (2006). "High-performance liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry for simultaneous

determination of taurine and 10 water-soluble vitamins in multivitamin tablets", Analytica chimica acta, 569: 169-175.

[101] Jin, P. Xia, L. Li, Z. Che, N. Zou, D. ve Hu, X., (2012). "Rapid determination of thiamine, riboflavin, niacinamide, pantothenic acid, pyridoxine, folic acid and ascorbic acid in Vitamins with Minerals Tablets by high-performance liquid chromatography with diode array detector", Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis, 70: 151-157.

[102] Raj, M.A. Gowthaman, N. ve John, S.A., (2016). "Highly sensitive interference-free electrochemical determination of pyridoxine at graphene modified electrode: Importance in Parkinson and Asthma treatments", Journal of colloid and interface science, 474: 171-178.

[103] BİBEROĞLU, G., (2003). "Kütle spektrometresi ve tıp alanında kullanımı", Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 23: 491-498.

[104] Boyle, J.G. Whitehouse, C.M. Fenn, J.B. ve Cotter, R.J., (1991). "An ion-storage time-of-flight mass spectrometer for analysis of electrospray ions", Rapid Communications in Mass Spectrometry, 5: 400-405.

[105] Clayton, P., (2001). "Applications of mass spectrometry in the study of inborn errors of metabolism", Journal of inherited metabolic disease, 24: 139-150.

[106] Andersen, B. ve Wise, B., (1986). "Textbook of clinical chemistry", Philadelphia: WB Saunders Company: 197-208.

[107] Chernushevich, I.V. Loboda, A.V. ve Thomson, B.A., (2001). "An introduction to quadrupole–time-of-flight mass spectrometry", Journal of Mass Spectrometry, 36: 849-865.

[108] Lacorte, S. ve Fernandez-Alba, A.R., (2006). "Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food", Mass spectrometry reviews, 25: 866-880.

[109] Cooks, R. Busch, K. ve Glish, G.L., (1983). "Mass spectrometry: analytical capabilities and potentials", Science, 222: 273-282.

[110] Şahar, U., (2015). Denizkestanesi Paracentrotus Lividus'un Yumurta Jel Kılıfi Glikoproteinlerinin İzolasyonu Ve Glikan Profilinin MALDI-TOF-MS Ve LC-MS/MS Sisteminde Glikomik Yaklaşımla Belirlenmesi, DOKTORA TEZİ, Biyoloji Anabilim Dalı, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

[111] Kirpekar, F. Nordhoff, E. Larsen, L.K. Kristiansen, K. Roepstorff, P. ve Hillenkamp, F., (1998). "DNA sequence analysis by MALDI mass spectrometry", Nucleic acids research, 26: 2554-2559.

[112] Gaskell, S.J., (1997). "Electrospray: principles and practice", Journal of Mass Spectrometry, 32: 677-688.

[113] ANILANMERT, D.E.B., (2014). "GHB, Ketamin, Norketamin, Fenobarbital, Tiyopental, Zolpidem, Zopiklon Ve Fenitoin'in LC-MS/MS Yöntemi İle İdrardan Eşzamanlı Tayini", Doktora Tezi, Fen Bilimleri Ana Bilim Dalı, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü.

[114] Ardrey, R.E., (2003). Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction: John Wiley & Sons.

[115] Fu, T.-J. Abbott, U.R. ve Hatzos, C., (2002). "Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid A comparative study", Journal of agricultural and food chemistry, 50: 7154-7160.

[116] Greenwood, N.N. ve Earnshaw, A., (2012). Chemistry of the Elements: Elsevier.

[117] Mortimer, C.E. Altınata, T. ve Anıl, H., (1999). Modern üniversite kimyası: Çağlayan Kitabevi.

[118] Kahvecioğlu, Ö. Kartal, G. Güven, A. ve Timur, S., (2003). "Metallerin çevresel etkileri-I", Metalurji Dergisi, 136: 47-53.

[119] Okcu, M. Tozlu, E. Kumlay, A.M. ve Pehluvan, M., (2012). "Ağır metallerin bitkiler üzerine etkileri".

[120] Bakar, Ç., (2009). "Metaller ve İnsan Sağlığı: Yirminci Yüzyıldan Bugüne ve Geleceğe Miras Kalan Çevre Sağlığı Sorunu", 1.Tıbbi Jeoloji Çalıştayı,.

[121] Langård, S., (2013). Biological and environmental aspects of chromium: Elsevier.

[122] Markiewicz, B. Komorowicz, I. Sajnóg, A. Belter, M. ve Barałkiewicz, D., (2015). "Chromium and its speciation in water samples by HPLC/ICP-MS–technique establishing metrological traceability: a review since 2000", Talanta, 132: 814-828.

[123] Remoundaki, E. Hatzikioseyian, A. ve Tsezos, M., (2007). "A systematic study of chromium solubility in the presence of organic matter: consequences for the treatment of chromium-containing wastewater", Journal of chemical technology and biotechnology, 82: 802-808.

[124] Emsley, J., (2011). Nature's building blocks: an AZ guide to the elements: Oxford University Press.

[125] Rieuwerts, J., (2015). The elements of environmental pollution: Routledge.

[126] Shahid, M. Shamshad, S. Rafiq, M. Khalid, S. Bibi, I. Niazi, N.K. Dumat, C. ve Rashid, M.I., (2017). "Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review", Chemosphere, 178: 513-533.

[127] Dowdy, R. ve Volk, V., (1983). "Movement of heavy metals in soils", Chemical mobility and reactivity in soil systems: 229-240.

[128] Lund, U. ve Fobian, A., (1991). "Pollution of two soils by arsenic, chromium and copper, Denmark", Geoderma, 49: 83-103.

[129] Kim, J.G. Dixon, J.B. Chusuei, C.C. ve Deng, Y., (2002). "Oxidation of chromium (III) to (VI) by manganese oxides", Soil Science Society of America Journal, 66: 306-315.

[130] Makino, T. Kamewada, K. Hatta, T. Takahashi, Y. ve Sakurai, Y., (1998). "Determination of optimal chromium oxidation conditions and evaluation of soil oxidative activity in soils", Journal of Geochemical Exploration, 64: 435-441.

[131] Han, F.X. Su, Y. Sridhar, B.M. ve Monts, D.L., (2004). "Distribution, transformation and bioavailability of trivalent and hexavalent chromium in contaminated soil", Plant and soil, 265: 243-252.

[132] Barceloux, D.G. ve Barceloux, D., (1999). "Chromium", Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 37: 173-194.

[133] Organization, W.H., (2004). Guidelines for drinking-water quality: World Health Organization.

[134] Mandal, B.K. Vankayala, R. ve Uday Kumar, L., (2011). "Speciation of chromium in soil and sludge in the surrounding tannery region, Ranipet, Tamil Nadu", ISRN toxicology, 2011.

[135] Cefalu, W.T. ve Hu, F.B., (2004). "Role of chromium in human health and in diabetes", Diabetes care, 27: 2741-2751.

[136] Durham, T.R. ve Snow, E.T., (2006). Metal ions and carcinogenesis, ed. Cancer: cell structures, carcinogens and genomic instability. Springer, 97-130.

[137] Edition, F., (2011). "Guidelines for drinking-water quality", WHO chronicle, 38: 104-108.

[138] Gomez, V. ve Callao, M., (2006). "Chromium determination and speciation since 2000", TrAC Trends in Analytical Chemistry, 25: 1006-1015.

[139] Welz, B. ve Sperling, M., (2008). Atomic absorption spectrometry: John Wiley & Sons.

[140] Beşergil, B., "Enstrümantel Analiz Temel İlkeler, Atomik Spektroskopi", ISBN 978-605-344-249-3, Gazi Kitap evi.

[141] Khmiri, A. ve Samet, B., (2009). "Chromium in cement: development of an analytical method and investigation of contamination sources", Advances in Cement Research, 21: 39-44.

[142] Mandiwana, K.L., (2008). "Rapid leaching of Cr (VI) in soil with Na 3 PO 4 in the determination of hexavalent chromium by electrothermal atomic absorption spectrometry", Talanta, 74: 736-740.

[143] Scholz, F., (2010). Electroanalytical methods: Springer.

[144] Pesavento, M. Alberti, G. ve Biesuz, R., (2009). "Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: a review", Analytica chimica acta, 631: 129-141.

[145] Gonzalvez, A. Armenta, S. Cervera, M. ve De la Guardia, M., (2010). "Non-chromatographic speciation", TrAC Trends in Analytical Chemistry, 29: 260-268.

[146] Li, Y. ve Xue, H., (2001). "Determination of Cr (III) and Cr (VI) species in natural waters by catalytic cathodic stripping voltammetry", Analytica chimica acta, 448: 121-134.

[147] Xing, L., (2010). "Ion Exchange Chromatography Coupled To Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Powerful Technique For Stability

Constant Determination, Speciation Analysis And Kinetic Studies", Queen's University, Department of Chemistry, Canada.

[148] Ackley, K.L. ve Caruso, J.A., (2003). "Separation techniques", Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology: 147.

[149] Unceta, N. Séby, F. Malherbe, J. ve Donard, O., (2010). "Chromium speciation in solid matrices and regulation: a review", Analytical and bioanalytical chemistry, 397: 1097-1111.

[150] Thomas, R., (2013). Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners: CRC press.

[151] Barnowski, C. Jakubowski, N. Stuewer, D. ve Broekaert, J.A., (1997). "Speciation of chromium by direct coupling of ion exchange chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry", Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 12: 1155-1161.

[152] Narukawa, T. Riley, K.W. French, D.H. ve Chiba, K., (2007). "Speciation of chromium in Australian fly ash", Talanta, 73: 178-184.

[153] Rao, R.N. ve Talluri, M.K., (2007). "An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals", Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis, 43: 1-13.

[154] Tomlinson, M.J. Lin, L. ve Caruso, J.A., (1995). "Plasma mass spectrometry as a detector for chemical speciation studies", Analyst, 120: 583-589.

[155] Caruso, J.A. ve Montes-Bayon, M., (2003). "Elemental speciation studies—new directions for trace metal analysis", Ecotoxicology and Environmental Safety, 56: 148-163.

[156] Nardi, E.P. Evangelista, F.S. Tormen, L. Saint, T.D. Curtius, A.J. de Souza, S.S. ve Barbosa, F., (2009). "The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples", Food chemistry, 112: 727-732.

[157] Eroğlu, A.E., "pahalı, kullanması çok zor ve hacimce çok büyük olduğu sanılan ICP".

[158] Gómez-Ariza, J. Sánchez-Rodas, D. ve Giráldez, I., (1998). "Selective extraction of iron oxide associated arsenic species from sediments for speciation with coupled HPLC-HG-AAS", Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 13: 1375-1379.

[159] Özcan, Ş.E., (2010). Arsenic Speciation In Fish By HPLC-ICP-MS, Ed^Eds.: Mıddle East Technıcal Unıversıty.

[160] D'Ilio, S. Violante, N. Majorani, C. ve Petrucci, F., (2011). "Dynamic reaction cell ICP-MS for determination of total As, Cr, Se and V in complex matrices: Still a challenge? A review", Analytica chimica acta, 698: 6-13.

[161] Ha, Y. Tsay, O.G. ve Churchill, D.G., (2011). "A tutorial and mini-review of the ICP-MS technique for determinations of transition metal ion and main group element concentration in the neurodegenerative and brain sciences", Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly, 142: 385-398.

[162] Güzelsoy, N.A., (2013). "ICP-MS İle Bazı Gıda Takviyelerinde Element Analizleri Veanalitik Problemler".

[163] Thomas, R., (2001). "A Beginner's Guide to ICP-MS - Part II : The Sample-Introduction System", Spectroscopy Tutorial: 56-60.

[164] Carey, J.M. ve Caruso, J.A., (1992). "Electrothermal vaporization for sample introduction in plasma source spectrometry", Critical Reviews in Analytical Chemistry, 23: 397-439.

[165] Fernández, B. Claverie, F. Pécheyran, C. ve Donard, O.F., (2007). "Direct analysis of solid samples by fs-LA-ICP-MS", TrAC Trends in Analytical Chemistry, 26: 951-966.

[166] Technologies, A., "7500_ Introduction_TR_Kısa.pdf".

[167] Mora, J. Maestre, S. Hernandis, V. ve Todolı, J.L., (2003). "Liquid-sample introduction in plasma spectrometry", TrAC Trends in Analytical Chemistry, 22: 123-132.

[168] Todolí, J.L. ve Mermet, J.M., (2006). "Sample introduction systems for the analysis of liquid microsamples by ICP-AES and ICP-MS", Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 61: 239-283.

[169] Taylor, H.E., (2001). Inductively coupled plasma-mass spectrometry: practices and techniques: Academic Press.

[170] Mahesh Batsala, B.C., Bhargavi Sakala, Sreekanth Nama and Sreenu Domatoti, (2012). "Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS)", International Journal Of Research In Pharmacy And Chemistry, IJRPC 2012, 2(3)

[171] Roos, P. Appelblad, P. Skipperud, L. ve Sjögren, A., (2006). The NKS-NORCMASS guide to beginners in ICP-MS.

[172] Rehkämper, M. Schönbächler, M. ve Stirling, C.H., (2001). "Multiple Collector ICP-MS: Introduction to Instrumentation, Measurement Techniques and Analytical Capabilities", Geostandards and Geoanalytical Research, 25: 23-40.

[173] Ebdon, L., (2001). Trace element speciation for environment, food and health: Royal Society of Chemistry.

[174] Ahmad, S. Murthy, R.C. ve Chandra, S.V., (1990). "Chromium speciation by column chromatography using a direct current plasma atomic emission spectrometer", Analyst, 115: 287-289.

[175] Bushee, D. Krull, I. Savage, R. ve Smith Jr, S., (1982). "Metal cation/anion speciation via paired-ion, reversed phase HPLC with refractive index and/or inductively coupled plasma emission spectroscopic detection methods", Journal of Liquid Chromatography, 5: 463-478.

[176] Bushee, D.S., (1988). "Speciation of mercury using liquid chromatography with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry", Analyst, 113: 1167-1170.

[177] Inoue, Y. Sakai, T. ve Kumagai, H., (1995). "Simultaneous determination of chromium (III) and chromium (VI) by ion chromatography with inductively

coupled plasma mass spectrometry", Journal of chromatography A, 706: 127-136.

[178] Pantsar-Kallio, M. ve Manninen, P.K., (1997). "Simultaneous determination of toxic arsenic and chromium species in water samples by ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry", Journal of chromatography A, 779: 139-146.

[179] Gürleyük, H. ve Wallschläger, D., (2001). "Determination of chromium (III) and chromium (VI) using suppressed ion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry", Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 16: 926-930.

[180] Hagendorfer, H. ve Goessler, W., (2008). "Separation of chromium (III) and chromium (VI) by ion chromatography and an inductively coupled plasma mass spectrometer as element-selective detector", Talanta, 76: 656-661.

[181] Destanoğlu, O., (2016). "İletkenlik Dedektörlü İyon Kromatografi İle Çeşitli Örneklerde Siyanür, Siyanat, Tiyosiyanat, Krom(VI) Ve Metal-Siyanür Kompleksleri Tayini", İstanbul Teknik Üniversitesi, Doktora Tezi Fen Bilimleri Enstitüsü.

[182] Sacher, F. Raue, B. Klinger, J. ve Brauch, H.-J., (1999). "Simultaneous determination of Cr (III) and Cr (VI) in ground and drinking waters by IC-ICP-MS", International journal of environmental analytical chemistry, 74: 191-201.

[183] Meng, Q. Fan, Z.T. Buckley, B. Lin, L. Huang, L. Yu, C.-H. Stiles, R. ve Bonanno, L., (2011). "Development and evaluation of a method for hexavalent chromium in ambient air using IC-ICP-MS", Atmospheric Environment, 45: 2021-2027.

[184] Shah, P. Strezov, V. ve Nelson, P.F., (2012). "Speciation of chromium in Australian coals and combustion products", Fuel, 102: 1-8.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Sabriye SEL

Doğum Tarihi ve Yeri : 23.07.1987

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta :sabriye.sel@merklab.yildiz.edu.tr

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	**Alan**	**Okul/Üniversite**	**Mezuniyet Yılı**
Y. Lisans	Analitik Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2017
Lisans	Kimya	Celal Bayar Üniversitesi	2009
Lise	YDAL	Edremit Lisesi	2005

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	**Firma/Kurum**	**Görevi**
2013-2017	Yıldız Teknik Üniversitesi	Memur/Kimyager
2009-2010	Aycan Yağ San. Tic. Ltd. Şti	Kimyager

YAYINLARI

Makale

1.Arsenic Speciation in Water and Chicken Samples at Trace Levels by Ion Chromatography-Inductively Coupled PlasmaMass Spectrometry

2.Determination of trace amount of cadmium using dispersive liquid-liquid microextraction-slotted quartz tube-flame atomic absorption spectrometry, Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, Volume 129, 1 March 2017, Pages 37–41, doi.org/10.1016/j.sab.2017.01.006