

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ISPARTA'DAKİ İÇME SUYU VE KAYNAKLARINDAN ALINAN
SU NUMUNELERİNİN İÇERDİĞİ BAZI ANYONLARIN
KAPİLER ELEKTROFOREZ CİHAZI İLE İNCELENMESİ**

Ali Serol ERTÜRK

Danışman: Doç. Dr. Fethiye GÖDE

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ISPARTA – 2009**

TEZ ONAYI

Ali Serol ERTÜRK tarafından hazırlanan “İsparta’daki İçme Suyu ve Kaynaklarından Alınan Su Numunelerinin İçerdiği Bazı Anyonların Kapiler Elektroforez Cihazı ile İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Süleyman Demirel Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Fethiye GÖDE
(Süleyman Demirel Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı)

Jüri Üyeleri :
Doç. Dr. Esengül KIR
(Süleyman Demirel Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı)

Yrd. Doç. Dr. Ahmet Faruk ÖZDEMİR
(Süleyman Demirel Üniversitesi, Fizik Anabilim Dalı)

Prof. Dr. Mustafa KUŞÇU
Enstitü Müdürü

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

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Kapiler Elektroforez (CE).....	1
1.1.1. CE’de kullanılan ayırma yöntemleri	2
1.1.1.1. Kapiler alan elektroforezi (CZE)	2
1.1.1.2. Kapiler jel elektroforez (CGE).....	3
1.1.1.3. Miseller elektrokinetik elektrokromatografi (MEKC)	3
1.1.1.4. İzoelektrik odaklanma (IEF)	3
1.1.2. CE’nin özellikleri.....	3
1.1.3. CE’nin ana bileşenleri	4
1.1.4. CE’de numune enjeksiyonuna genel bakış	4
1.1.5. CE’de numune bileşenlerinin kapiler içerisinde taşınma ve ayrıştırılma ilkesi. 5	
1.2. CE’nin Prensipleri.....	6
1.2.1. Elektroforezin tarihi geçmişi ve gelişimi	6
1.2.2. Yüksek Performanslı Kapiler Elektroforez (HPCE)	7
1.2.3. Elektroforez.....	7
1.2.4. Elektroosmotik akış (EOF)	9
1.2.5. EOF kontrolü.....	14
1.3. CE’nin Temel Teorisi.....	18
1.3.1. CE’nin analitik parametreleri.....	18
1.3.1.1. Taşınabilirlik ve göç zamanı	18
1.3.1.2. Dispersiyon (Saçılma).....	20
1.3.1.3. Verimliği (N) etkileyen faktörler	22
1.3.1.4 Joule ısınması ve sıcaklık değişimi	24
1.3.1.5. Enjeksiyon fişi uzunluğu.....	28

1.3.1.6. Çözünen-duvar etkileşimi	30
1.3.1.7. Elektro-dispersiyon	33
1.3.1.8. Ayırıcılık	35
1.4. CE’de Numune Enjeksiyonu ve Enjeksiyon Yöntemleri.....	37
1.4.1. Hidrodinamik enjeksiyon	38
1.4.2. Elektrokinetik enjeksiyon	40
1.5. CE’de Enjeksiyon ve Çalıştırma	41
1.6. Kapillerler.....	42
1.6.1. Kapiller müdahale yöntemleri.....	43
1.6.1.1. Kapilere ilk defa kullanmadan önce müdahale	44
1.6.1.2. Çalışmalar arasında kapiller koşullandırma müdahaleleri	44
1.6.1.3. Kullanım sonrası kapiller saklanması için müdahale	44
1.7. CE’de Veri Sonuçlarının Analizi ve Tespiti Etme Yöntemleri.....	45
1.7.1. Optik tespit yöntemleri.....	45
1.7.1.1. UV absorplayıcı optik tespit yöntemleri	46
1.7.1.2. Floresans optik tespit yöntemleri	46
1.7.2. Elektrokimyasal tespit yöntemi.....	46
1.7.3. Birleştirilmiş yöntemler	47
1.7.4. CE’de kullanılan diğer tespit yöntemleri	47
1.8. Kapiller Alan Elektroforez (CZE) ile Küçük İyonların Tespiti	47
1.8.1. Küçük iyonların CZE’si	48
1.8.2. Dolaylı fotometrik tespit yöntemi (IPD)	49
1.8.3. CZE-IPD ile küçük iyonların tespiti için çalışma elektrolitinin seçilmesi.....	50
1.8.4. Dolaylı ayıraç (VR) seçim kriterleri	52
1.8.5. EOF değiştiriciler	54
2. KAYNAK ÖZETLERİ	55
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	62
3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler.....	62
3.1.1. Kullanılan cihazlar	62
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	62
3.1.3. Kullanılan cam malzemeler ve diğer sarf malzemeleri.....	62
3.1.4. Analizi yapılan su numuneleri	63
3.2. Deney için Gerekli Hazırlıklar	63

3.2.1. Kullanılan standart çözeltisinin saflığının araştırılması.....	63
3.2.2. Çalışma elektrolitin araştırılması ve seçilmesi.....	64
3.2.3. Kullanılacak standart numunesi çözeltilerinin hazırlanması.....	65
3.3. Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi	65
3.3.1. Kapilerin kullanıma hazırlanması ve şartlandırılması.....	65
3.3.2. Numunenin cihaza verilmesi.....	66
3.3.3. Uygulanacak CE yönteminin seçilmesi	66
3.3.4. Kalibrasyon eğrilerinin hazırlanması	67
3.3.5. Elektroferogram verilerinin değerlendirilmesi ve karşılaştırılması	67
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	69
4.1. Kalibrasyon Bulguları	69
4.2. Yöntem Bulguları.....	70
4.2.1. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ)	70
4.2.2. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik	71
4.3. Uygulanan CZE-IPD Yöntemiyle Isparta'daki İçme Suyu ve Kaynaklarından Alınan Çeşitli Su Numunelerinin Analiz Sonuçları	71
4.4. Uygulanan CZE-IPD Yöntemiyle Elde Edilen Elektroferogram Bulguları.....	73
4.4.1. Elektroferogram bulgularının istatistiksel sonuçları	78
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	80
6. KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	87

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ISPARTADAKİ İÇME SUYU VE KAYNAKLARINDAN ALINAN SU NUMUNELERİNİN İÇERDİĞİ BAZI ANYONLARIN KAPİLER ELEKTROFOREZ CİHAZI İLE İNCELENMESİ

Ali Serol ERTÜRK

**Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı**

Danışman: Doç. Dr. Fethiye GÖDE

Bu tez çalışmasında, Isparta'daki çeşitli içme suyu ve kaynaklarından alınan su numunelerinin kapiler elektroforez (CE) cihazı ile analizi yapıldı. Analizleri yapabilmek için, kapiler alan elektroforezi ile dolaylı tespit yöntemi (CZE-IPD) kullanıldı. Bu yöntem vasıtasıyla içme suyu numunelerinde bulunan en yaygın inorganik anyonların (florür, bromür, klorür, sülfat, nitrat, fosfat gibi), miktar tayinleri ve tespitleri yapıldı.

Tespit edilen inorganik anyonların CZE-IPD yöntemiyle ayrıştırılması, 4,5 dakikadan daha kısa sürede gerçekleştirildi. Uygulanan CE yönteminin geçerliliğinin gösterilmesi amacıyla kesinlik, standart sapma ve tayin sınırı gibi parametreler hesaplandı. Bu hesaplamalar sonucunda elde edilen veriler istatistiksel olarak incelendi. Alınan çeşitli su numuneleri, içerdikleri anyon miktarları açısından kıyaslandı ve TSE 266 (2005) içme suyu standartlarına uygunluğu araştırıldı.

Anahtar Kelimeler: Kapiler elektroforez, içme suyu, su analizi, anyonlar

2009, 87 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

INVESTIGATION OF SOME CONSTITUENT ANIONS OF WATER SAMPLES WHICH ARE TAKEN FROM DRINKING WATER AND ITS SOURCES IN ISPARTA BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS INSTRUMENT

Ali Serol ERTÜRK

**Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Chemistry Department**

Supervisor: Assoc. Prof. Fethiye GÖDE

In this thesis, analysis of water samples taken from variety sources of drinking waters in Isparta was done by capillary electrophoresis (CE) instrument. Indirect photometric detection with capillary zone electrophoresis (CZE-IPD) method was used in order to make analysis. By means of this method, quantitative analysis and detections of most common inorganic anions (fluoride, bromide, chloride, sulphate, nitrate, phosphate, eg.) which are present in drinking water samples were done.

Separation of detected anions by CZE-IPD method performed in less than 4.5 minutes. In order to show the validity of the used CE method, parameters like precision, standard deviation and confidence limit were calculated. Statistically investigation and comparison of the taken water samples in terms of anion quantity ingredients were done by using these calculations. Detected anion quantities were investigated by TSE 266 (2005) drinking water standards.

Key Words: Capillary electrophoresis, drinking water, water analysis, anions.

2009, 87 pages

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanması sırasında, benden desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yaralandığım saygıdeğer hocam Doç. Dr. Fethiye Göde'ye, tezin laboratuvar çalışmalarını yürütebilmek için bana kapılarını açan, başta Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürü Doç.Dr. Gülgün Tınaz olmak üzere, merkezi laboratuvar yönetimine ve tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Çalışmaların bitirebilmem için, her anlamda maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen saygıdeğer hocam Adıyaman Üniversitesi Kimya Bölüm Başkanı Doç. Dr. Murat Koca'ya sonsuz saygılarımı sunar ve teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında, benden yardımını esirgemeyen ve her anlamda destek olan canım eşim Arş. Gör. Müzeyyen Ertürk (Adıyaman Üniversitesi)'e ve aileme sonsuz sevgilerimi sunar, teşekkür ederim.

Ali Serol ERTÜRK
ISPARTA, 2009

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. CE'nin ana bileşenleri.....	4
Şekil 1.2. EOF'nin kapiler tüp içerisindeki yön gösterimi.....	6
Şekil 1.3. Kapiler duvarındaki çift katmanın gösterimi	9
Şekil 1.4. Elektroosmotik akışın oluşması	10
Şekil 1.5. EOF'ye farklı kapiler materyallerinde pH'ın etkisi	12
Şekil 1.6. Akış profili ve ilgili çözünen bölge	13
Şekil 1.7. CE'de farklı çözünen göçlerinin EOF ile ilişkili gösterimi	14
Şekil 1.8. Elektroosmotik akış taşınabilirliğinin tampon derişimi ve iyon gücü fonksiyonu olarak gösterimi.....	16
Şekil 1.9. Küçük anyonların göç yönlerinin slika kapiler ve EOF yönü değiştirilmiş kapiler için gösterimi.....	17
Şekil 1.10. Elektroosmotik akış taşınabilirliğinin (μ_{EOF}) ve etkin çözünen taşınabilirliğinin (μ_{ep}) hesaplanması	19
Şekil 1.11. Etkin ve toplam kapiler uzunluğu tanımlaması	19
Şekil 1.12. Kapiler merkezinden çevresine doğru sistematik ısı değişimi.....	25
Şekil 1.13. Joule ısınmasını gözlemlemek için Ohm kuralı işaretleri.....	26
Şekil 1.14. Seçicilikte enjeksiyon fişi uzunluğu etkisi.....	28
Şekil 1.15. Protein duvar etkileşimlerinin HETP, H, üzerindeki etkisi	31
Şekil 1.16. Tampon derişiminin BSA triptik sindirim ayrışımına etkisi	32
Şekil 1.17. Numune ve tampon iletkenlikleri uyumsuzluklarına bağlı elektro- dispersiyon gösterimleri	33
Şekil 1.18. Elektro-dispersiyona bağlı olarak çözünenlerin baş ve kuyruk oluşumu	34
Şekil 1.19. Tespit yolunun artırılması için kullanılan yöntemler.....	46
Şekil 1.20. CZE'de iyonların göçü.....	48
Şekil 1.21. Dolaylı tespit yöntemi (IPD)'nin çalışma prensibi	49
Şekil 1.22. Taşınabilirlik uyumu temelli dolaylı ayıraç seçimi	53
Şekil 3.1. Fluka anyon standartı, anyon ayrıştırma analiz elektroferogramı	64
Şekil 4.1. Bromür, Klorür, Sülfat, Nitrat, Florür, Fosfat'ın kalibrasyon eğrileri.....	69
Şekil 4.3. Ayazmana mesireliği numune elektroferogramı.....	74
Şekil 4.4. Ev çeşmesi numune elektroferogramı.....	74
Şekil 4.5. Eğirdir gölü numune elektroferogramı	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Kapilerlerde meydana gelen ayırma sistemlerinin özeti.....	2
Çizelge 1.2. Elektroosmotik akışı değiştirmek için kullanılan metotlar	15
Çizelge 1.3. Seçilen moleküllerin difüzyon katsayıları	22
Çizelge 1.4.CE’de saçılmaya neden olan etkenlerden bazıları	23
Çizelge 1.5. Kapiler duvar sıcaklığı ve merkezden duvara sıcaklık farkı gösterimi..	26
Çizelge 1.6. Joule ısınmasını ve sıcaklık değişimini kontrol etmek için metotlar	27
Çizelge 1.7. Enjeksiyon uzunluğu ve difüzyon katsayısının verimlilik üzerindeki etkisi	29
Çizelge 1.8. Adsorpsiyonun verimlilik üzerindeki etkisi.....	31
Çizelge 1.9. IPD için çalışma elektrolitleri	51
Çizelge 3.1. Tek yönlü ANOVA testi için hipotez oluşturma ve karar verme aşamalarının gösterimi	68
Çizelge 4.1. Kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel verileri.....	70
Çizelge 4.2. Anyonlar için LOD ve LOQ değerleri	70
Çizelge 4.3. Gün içi ve günler arasında anyonların göç sürelerindeki tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirliklerin gösterimi	71
Çizelge 4.4. Uygulanan CZE-IPD yöntemi ile çeşitli içme suyu kaynaklarından alınan numunelerin analiz sonuçları.....	72
Çizelge 4.5. CZE-IPD yöntemiyle analizi yapılan numunelerin göç sürelerindeki tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirliklerin gösterimi	77
Çizelge 4.6. Referans anyon grubu ve diğer gruplar arasında ortalama anyon miktarları olasılıklarının (p), çoklu kıyaslama gösterimi	78

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

$\bar{x}$	Aritmetik ortalama
k'	Kapasite faktörü
r'	Kapiler iç çapı
$\bar{t}_m$	Ortalama göç zamanı
$\bar{\mu}_{app}$	Ortalama olarak gözlemlenebilen taşınabilirlik
$\bar{\mu}$	Ortalama taşınabilirlik
μ_{app}	Gözlenebilir taşınabilirlik
μ_{EOF}	EOF'nin taşınabilirliği
μ_{ep}	Elektroforetik taşınabilirlik
BGE	Çalışma elektroliti ve/veya tamponu
BSS	Bağıl standart sapma
C	Analit derişimi
CE	Kapiler elektroforez
CGE	Kapiler jel elektroforez
cm	Santimetre
CZE	Kapiler alan elektroforezi
CZE-IPD	Dolaylı fotometrik tespit yöntemiyle kapiler alan elektroforezi
D	Çözünen difüzyon katsayısı
DAD	Diyot sıralı dedektör
dak.	Dakika
E	Elektriksel alan
EC	Elektro kromatografi
EOF	Elektroosmotik akış
F_E	Elektrik kuvveti
F_F	Sürtünme kuvveti
G	Yerçekimi sabiti
GA	Güven aralığı
HETP	Bir teorik tabakaya eşdeğer yükseklik
HPCE	Yüksek performanslı kapiler elektroforez
IC	İyon kromatografisi

IEF	İzoelektirik odaklanma
IPD	Dolaylı fotometrik tespit
ITP	Kapiler izotakoforez
K_d	Birinci derece çözünme katsayısı
kV	Kilovolt
L	Litre
l	Kapiler etkin uzunluğu
L	Kapiler toplam uzunluğu
LOD	Gözlenebilirlik sınırı
LOQ	Alt tayin sınırı
m	Metre
M	Molar
mAU	Mili absorbans birimi
MEKC	Miseller elektrokinetik romatografi
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MS	Kütle spektroskopisi
N	Etkinlik (Teorik tabaka sayısı)
nL	Nanolitre
OFM	EOF yön değıştirici
Q	Güç yoğunluğu
q	İyon yükü
r	İyon yarıçapı
r	Korelasyon
R, R^2	Tanımlayıcılık katsayısı
s	Saniye
SS	Standart Sapma
t	Zaman
t_0	Tutulmamış çözeltinin elüsyon süresi
t_i	Enjeksiyon süresi
t_m	Göç zamanı
t_r	Tutulmuş çözeltinin elüsyon süresi
UV	Ultraviyole (Morötesi)

V	Volt
V_{EOF}	Elektroosmotik akış hızı
v_{EOF}	EOF'nin hızı
v_{ep}	İyon hızı
VR	Görsellik ayırıcı, dolaylı ayıraç
w_b	Dispersiyon
w_i	Enjeksiyon tıpası uzunluğu
Δh	Yükseklik farkı
ΔP	Kapiler boyunca basınç farkı
ϵ	Dielektrik sabiti
ζ	Zeta potansiyeli
η	Viskozite
κ	Termal iletkenlik
μA	Mikroamper
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
P	Numune çözeltisinin yoğunluğu
σ	Pikin standart sapması

1. GİRİŞ

Kapiler elektroforez, sulu çözelti ve türlerini ayırmada kullanılan, basit, yüksek derecede verimli bir analitik ayırma tekniğidir. Enjeksiyon hacimleri pikolitreden nanolitreye kadar olan aralıkta değişen küçük hacimde numunelerin kullanılmasını gerektiren kapiler elektroforez, gün geçtikçe birçok alanda yaygın olarak kullanılmaya başlanmış ve analitik ayrıştırıcıları çözümleyici olmasının yanı sıra, bazı durumlarda, diğer kromatografik tekniklere kıyasla ilgi çekici çözümler sunar hale gelmiştir (Arce et al., 1997).

Küçük anyonların kapiler elektroforez kullanılarak ayrıştırılması son yıllarda büyük ilgi kazandı. Yüksek çözünürlük, kısa analiz zamanları ve az miktarda elektrot ve numune kullanılması kapiler elektroforez tekniğinin temel avantajlarıdır (Kuban et al., 1999).

Bu çalışmada, Isparta'daki bazı içme suyu ve kaynaklarından alınan su numunelerinin kapiler elektroforez (CE) cihazı kullanılarak, seçilen CE yöntemiyle, içerdikleri anyonların incelenmesi ve miktar bakımından tayinlerinin yapılması amaçlanmıştır. Çalışmalar sonucunda, uygulanan CE yönteminin geçerliliğinin gösterilmesi amacıyla, kesinlik, standart sapma, tayin sınırı gibi parametreler hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar sonucunda elde edilen veriler istatistiksel olarak incelenmiş ve alınan su numunelerinin içerdikleri anyon miktarları açısından aralarında anlamlı bir fark olup olmadığı araştırılmıştır.

1.1. Kapiler Elektroforez (CE)

Diğer bir adıyla kapiler alan elektroforezi (CZE) olarak bilinen CE, iyonik türleri, yük ve sürtünme kuvvetlerine göre ayırmada kullanılır. Elektriksel olarak yüklenmiş analitlerin, iletken bir ortam içerisinde, elektriksel alan etkisiyle hareketi geleneksel elektroforez olarak bilinir. CE tekniği türleri yük/kütle oranına göre, içerisi elektrot dolu küçük bir kapiler tüp içerisinde ayırmak için tasarlanmıştır (Engelhardt et al., 1996). CE'de kullanılan ayırma teknikleri Çizelge 1.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Kapillerlerde meydana gelen ayırma sistemlerinin özeti (Engelhardt et al., 1996).

Kapiler Alan Elektroferez (CZE)	Miseller Elektrokinetik Kromatografi (MEKC)	Kapiler Jel Elektroferez (CGE)	İzoelektrik Odaklanma (IEF)	Kapiler İzotakoferez (ITP)	Elektro Kromatografi (EC)
Değiştirilmiş/Değiştirilmemiş kapiler	Değiştirilmemiş kapilerler	Değiştirilmiş ve doldurulmuş kapilerler	Değiştirilmiş/Değiştirilmemiş kapiler	Değiştirilmemiş Kapilerler	Doldurulmuş kapilerler
EOF kontrollü/kontrol süz	EOF var	Bastırılmış EOF	Bastırılmış EOF/ Zayıfça var	EOF var	EOF var
Elektroforetik göç ve EOF etkisiyle ayırıştırma	Elektroforetik göç ve EOF etkisiyle, numunelerin miseller ve tampon arasında bölünmesi ile ayırıştırma	EOF'nin etkisi olmadan, eleme etkisiyle elektroforetik göçle ayırıştırma	Numunenin izoelektrik noktasına göre pH meyiline göre ayırıştırma	Elektroforetik göç ve EOF etkisiyle ayırıştırma	İstasyon fazıyla etkileşerek ayırıştırma, EOF pompa olarak hizmet eder
Küçük ve büyük yüklü moleküllerin ayırıştırılmasında bir çok uygulaması mümkün	Küçük, nötr ve yüklü moleküller için geniş uygulama alanı mümkün	DNA molekülleri ve SDS- denature proteinler için molekül büyüklüğüne bağlı olarak ayırıştırma	Amfoterik analitlerin pI değerlerine göre ayırıştırma	Uygulama alanı kısıtlı, CE'den önce seyreltik çözeltilerin zenginleştirilmesi	HPLC'de olduğu gibi aynı uygulama alanları

1.1.1. CE'de kullanılan ayırma yöntemleri

1.1.1.1. Kapiler alan elektroforezi (CZE)

Kapiler alan elektroforez (CZE)'de ayırma yöntemi, çözünenlerin taşınabilirlik farklılıklarına bağlı olarak, içi tamamen elektrolit doldurulmuş kapiler tüp kullanılması vasıtasıyla gerçekleştirilir ve CE'nin en çok kullanılan metodu olma özelliğini gösterir (Engelhardt et al., 1996).

1.1.1.2. Kapiler jel elektroforez (CGE)

CGE’de kapiler t p polimer  zelti veya jelle doldurulur. Makro moleküllerin elektroforetik g  leri jel matrisi tarafından engellenir.  z nm ş maddelerin kapiler boyunca transferi, makro moleküllerin taşımış oldukları yüke bağlı olmasına rağmen, ayırma moleküllerin boyutuna bağlıdır (Engelhardt et al., 1996).

1.1.1.3. Miseller elektrokinetik elektrokromatografi (MEKC)

Yüksüz moleküller, MEKC aracılığıyla ayrıştırılır. Deterjanlar tampon  zeltiye eklenir ve nötr moleküller, misel ve tampon  zelti içinde hidrofobik karakterlerine göre dağılırlar. Ayırma, en çok negatif yüklü misellerin taşınabilirliklerine ve miselin dışında  z nen maddelerin elektroosmatik akış aracılığıyla transferine bağlı olarak yapılır (Engelhardt et al., 1996).

1.1.1.4. İzoelektrik odaklanma (IEF)

İzoelektrik odaklanma (IEF), elektriksel alan içerisinde bulunan tampon  zeltisine amfolit eklenmesiyle pH’da meydana gelen değişime bağlı olarak yapılır (Engelhardt et al., 1996).

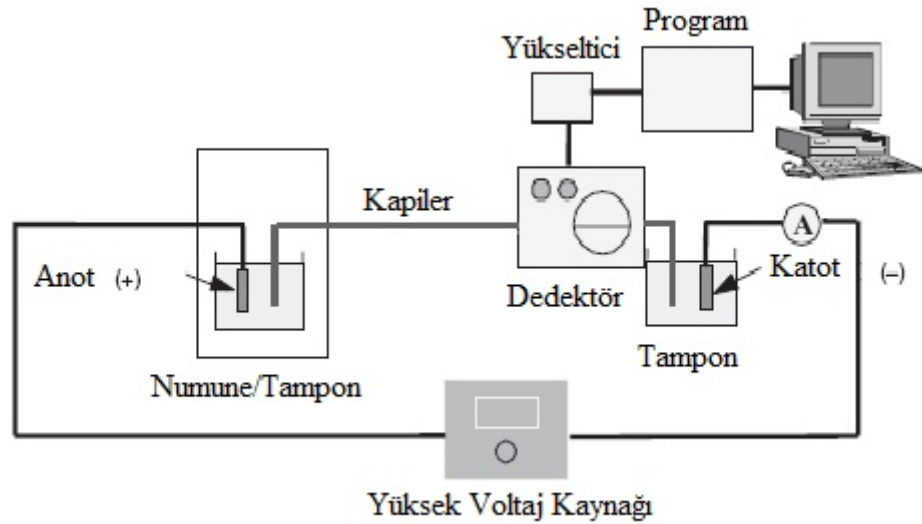
1.1.2. CE’nin  zellikleri

- Elektroforez, dar bor ve 25-75  m arasında i  çapa sahip eritilmiş silika kapilerler kullanılarak gerçekleştirilir.
- Kapiler boyunca 10-30 kV arasında yüksek voltajlar ve 100-500 V/cm arasında yüksek elektriksel alanlar uygulanabilir.
- Kapilerlerin yüksek dayanıklılığı, istenmeyen akım oluşumlarını ve i  ısınmayı önler.
- Yüksek verimlilik ($N > 10^5$ - 10^6) ve kısa analiz süreleri sunar.
- Tespit kapilerlerde (on capillary) gerçekleştirilir. Herhangi bir dış tespit hücresine gerek yoktur.
- Küçük numune hacimleri kullanılmasını gerektirir (1-50 nl).
- Seçiciliği değiştirmek için birçok modu ve uygulama alanı vardır.

- Sulu ortamlarda çalışır.
- Otomatik olarak çalışma mümkündür (Heiger, 2000).

1.1.3. CE'nin ana bileşenleri

CE'nin ana bileşenleri Şekil 1.1.'de gösterildiği gibi, anot ve katot elektrotlar, bu elektrotlara bağlı tampon çözelti kapları, maksimum 30 kV yüksek voltaj güç kaynağı, dedektör (UV, floresans veya kütle spektroskopisi-MS), 20-100 cm uzunluğu arasında değişebilen ve iki tampon çözelti kabını birbirine bağlayan kuarz (amorfi SiO_2 , 25-100 μm iç çapa sahip) kapiler tüp ve verilerin analizini gerçekleştirmek üzere CE cihazına bağlanmış bir bilgisayardan oluşmaktadır (Marina et al., 2005).



Şekil 1.1. CE'nin ana bileşenleri (Marina et al., 2005)

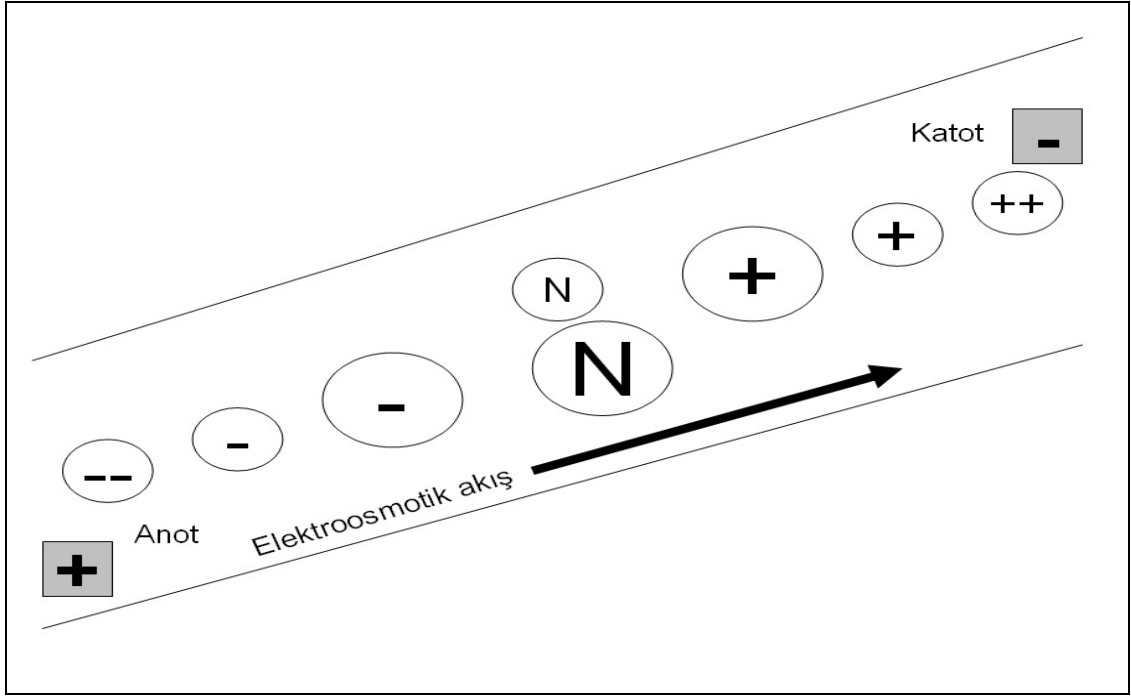
1.1.4. CE'de numune enjeksiyonuna genel bakış

CE'de yaklaşık olarak çok küçük ölçeklere sahip olarak bir kaç nL numune, kapiler tüpün anot ucundan enjekte edilir. Bu enjeksiyon işlemi; enjeksiyonun yapılmakta olduğu kabın indirilmesi veya kaldırılması, basınç yöntemi, tampon çözeltisinden vakum yöntemi kullanılarak, ya da basit olarak kapilerin içindeki madde örneklerinin elektroforetik göçü sayesinde gerçekleştirilebilir (Engelhardt et al., 1996).

1.1.5. CE’de numune bileşenlerinin kapiler içerisinde taşınma ve ayrıştırılma ilkesi

Kapiler içerisindeki tampon çözelti içerisinde bulunan numune bileşenlerinin ayrıştırılması, tampon çözeltiye kapiler boyunca uygulanan potansiyel yardımıyla başlar. Potansiyel uygulanması sonucu oluşan elektriksel alan, çözünen maddelerin göç etmesine sebep olur. Üst üste devam eden elektroforetik göç (μ_{ep}), çözünen maddelerin taşınmasına pasif olarak katkıda bulunurken ayrıştırılmasına herhangi bir katkısı bulunmayan bir elektroosmotik akış (EOF) tır. Bu (EOF); tampon çözeltinin pH’ına ve kapillerinin yüzey özelliklerine sıkı sıkıya bağlıdır. EOF, o kadar büyük olabilir ki sadece nötr olan moleküller değil; ayrıca negatif yüklü iyonlar da göç yollarının zıt tarafında bulunan dedektöre taşınabilirler (Skoog et al., 2007).

Çoğu tampon çözeltide, kuvars kapiler yüzeyinde var olan negatif yükler, yüzey silanol gruplarının ayrışması sonucunda oluşur ve kapillerinin duvarına yakın olan kısımda bulunan çözeltide pozitif bir yük oluşumuna sebep olur. Sonuç olarak, EOF katot yönünde hareket eder ve dedektör araçsal yapılandırma olarak, cihazın katot bölümüne daha yakın olan bölümüne yerleştirilir. EOF, çözünen madde bölümlerinin, kapiler tüp içerisinde dedektöre doğru taşınmasına yardımcı olur. Bunun sonucunda, yeteri kadar yüksek bir EOF’ye sahip olunmasıyla birlikte, anyonlar da katoda doğru transfer edilebilir. Şekil 1.2.’de bu durum gösterilmiştir.



Şekil 1.2. EOF'nin kapiler tüp içerisindeki yön gösterimi

1.2. CE'nin Prensipleri

1.2.1. Elektroforezin tarihi geçmişi ve gelişimi

Elektroforez farklı yüklü türlerin bir elektriksel alan içerisinde birbirlerini itme ve çekmeleri sonucunda oluşan farklı hareketleri olarak tanımlanır. Elektroforez ayırma tekniği olarak ilk defa 1937'de Tiselius tarafından duyuruldu. Tiselius protein karışımlarını tampon çözeltileri arasına bir tüp içerisinde koyduktan sonra bu tüpe elektriksel alan uygulayarak, numune bileşenlerinin yükleri ve taşınabilirlikleri tarafından belirlenen bir oranla, bir yönde hareket ettiklerini buldu. Bu çalışmasından dolayı Tiselius Nobel ödülüyle ödüllendirilmiştir.

Açık tüp elektroforez, ilk olarak Hjerten tarafından 1967'de tanımlandı. O sıralarda, sadece milimetrik bor kapilerler elde edilebildiği için, Hjerten, kapilerleri boylamsal aksisleri doğrultusunda ısı yayılımı etkisini minimuma indirmek için döndürdü. Daha sonradan Virtanen ve sonrasında Mikkers elektroforezi yaklaşık olarak 200 µm iç çapta sırasıyla cam ve teflondan yapılmış kapilerlerde gerçekleştirdi. 1980'lerde

Jorgenson ve Lukacs, tekniği 75 µm iç çapta slika kapilerler kullanarak geliştirdi. Jorgenson ayrıca teoriyi açıkladı, çalışma parametreleri ve ayırma kalitesi arasındaki ilişkiyi tarif etti ve yüksek performanslı kapiler elektroforezin (HPCE) potansiyelini, analitik bir teknik olarak gösterdi. O zamandan günümüze ise kapiler elektroforezin çeşitli yönlerini açıklayan pek çok dergi ve birkaç kitap yazılmıştır (Heiger, 2000).

1.2.2. Yüksek Performanslı Kapiler Elektroforez (HPCE)

CE, elektroforeze enstrümantal bir yaklaşım olarak düşünülebilir. Plaka jeller yerine kapiler kullanılmasına bağlı olarak performansta meydana gelen gelişmeler, kromatografinin düz yatak formatında gerçekleştirilmesi yerine, kolonlarda uygulanmasıyla, performansta meydana gelen gelişmelere birçok açıdan benzerdir. Ayrıca; CE formatında ayırıştırma mekanizmalarının fazlasıyla genişlemesine bağlı olarak elektroforezin uygulama alanı da genişlemektedir. Bunun sonucunda; elektroforez makro moleküllerin ayırıştırılması ile daha fazla sınırlı kalmamakta ve kation, anyon ve nötr moleküllerin bir analizde ayırıştırılmasında da kullanılabilir (Heiger, 2000).

1.2.3. Elektroforez

Elektroforezle ayırma bir elektriksel alan içerisindeki çözünen hızı farklılıklarına dayanır. Bir iyonun hızı aşağıdaki gibi verilebilir.

$$v_{ep} = \mu_{ep} E \quad (1.1)$$

v_{ep} = iyon hızı

μ_{ep} = elektroforetik taşınabilirlik

E = uygulanan elektriksel alan

Elektriksel alan, basitçe uygulanan voltaj ve kapiler uzunluğunun fonksiyonudur (volt/cm). Verilen bir iyon ve ortam için taşınabilirlik, o iyonun karakteristiği olan bir sabittir. Taşınabilirlik, molekülün uyguladığı ve ortam içerisindeki sürüklenme sürtünmesi tarafından dengelenen elektrik kuvveti tarafından belirlenebilir.

$$\mu_{ep} \alpha = \frac{\text{Elektrik kuvveti (} F_E \text{)}}{\text{Sürtünme Kuvveti (} F_F \text{)}} \quad (1.2)$$

Elektrik kuvveti;

$$F_E = qE \quad (1.3)$$

olarak ifade edilir.

Küresel bir iyon için sürtünme kuvveti ise

$$F_F = -6\pi\eta r v_{ep} \quad (1.4)$$

dir. Burada;

q = iyon yükü

η = çözelti viskozitesi

r = iyon yarıçapı

v_{ep} = iyon hızı

dır.

Elektroforez esnasında, bu iki kuvvetin dengede olduğu durağan bir hale ulaşılır. Bu noktada, bu iki kuvvet eşit fakat zıt yöndedir ve

$$qE = 6\pi\eta r v_{ep} \quad (1.5)$$

dir.

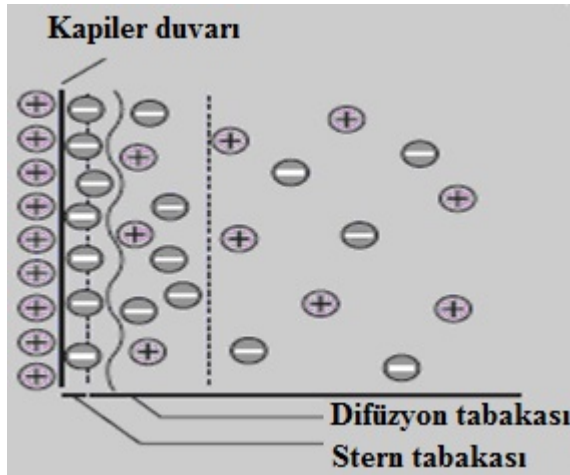
Bu denklem, iyon hızı için çözülür ve (1.5) denklemi, (1.1) denkleminde yerine yazılırsa, fiziksel parametreler açısından taşınabilirlik (1.6) denklemindeki gibi tarif edilebilir.

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (1.6)$$

(1.6) denklemi, küçük, yüksek yüklü türlerin yüksek taşınabilirliğe sahipken büyük, düşük yüklü türlerin düşük taşınabilirliğe sahip olduklarının kanıtıdır (Heiger, 2000).

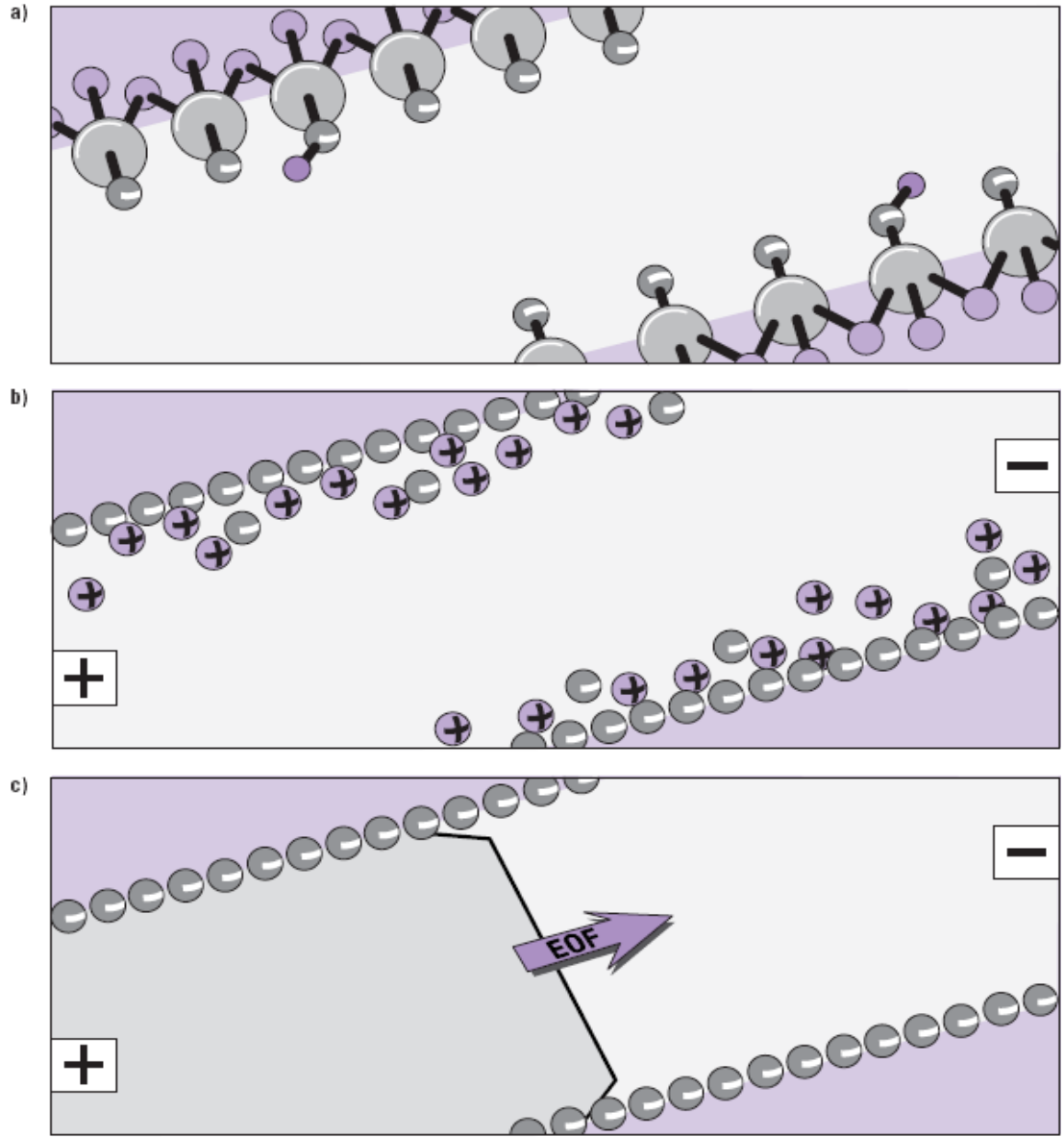
1.2.4. Elektroosmotik akış (EOF)

CE'nin çalışmasının temel bileşeni elektroosmatik veya elektroendoosmatik akış (EOF)'tır. EOF kapillerin içerisinde toplu sıvı akışıdır ve kapillerin iç duvarı üzerindeki yüzey yükü sonucu oluşur. EOF, kapillerin duvarındaki çözelti çift katmanına uygulanan elektriksel alanın etkisinden kaynaklanır (Şekil 1.3.). EOF kapiler içerisinde kalan çözünenlerin kalma zamanını, çözünenlerin taşınabilirliği üzerine akış yerleşimi ile kontrol eder. Bu, kapiler uzunluğunun arzu edildiği gibi değiştirilebilmesi ile oluşturabilir; fakat seçiciliği etkilememektedir.



Şekil 1.3. Kapiler duvarındaki çift katmanın gösterimi (Heiger, 2000)

Sulu koşullar altında, çoğu katı yüzey, fazla miktarda negatif yük taşır. Bu, yüzeyin iyonlaşmasından dolayı veya yüzeydeki iyonik türlerin adsorpsiyonundan kaynaklanabilir. Erimiş silika için, EOF her ne kadar daha kuvvetli olarak SiO^- anyonik (SiO^-) formunda var olabilen çeşitli silanol grupları (SiOH) tarafından kontrol edilse de, iki süreçten de kaynaklanması mümkündür. Bu durum Şekil 1.4. a'da gösterilmiştir. Erimiş silikanın tam pI (izoelektrik noktası) değerini belirlemek zor olmasına rağmen, EOF pH=4'ün üzerinde anlamlı olur.



Şekil 1.4. Elektroosmotik akışın oluşması (Heiger, 2000)

- a) Negatif yüklü erimiş silika yüzeyi (Si-O⁻).
- b) Hidratlaşmış katyonlar yüzeyin yakınında toplanması.
- c) Katoda doğru elektriksel akım uygulanması üzerine yığın akışı (EOF).

Yük denkliliğini sağlamak için yüzeyin yakınında biriken karşı yükler (çoğu durumda katyonlar), çift tabakayı oluşturur ve duvara çok yakın bir potansiyel fark oluşturur. Bu durum Şekil 1.2. b’de gösterilmiştir ve zeta potansiyeli olarak bilinir. Kapiler boyunca voltaj uygulandığı zaman, yaygın çift tabakayı oluşturan katyonlar katoda doğru çekilirler. Çünkü katyon tabakası çözünmeye ve bu tabakanın hareketleri yığın çözeltiyi katoda doğru sürüklemeye başlar. Bu durum şematik olarak Şekil 1.2. c’de gösterilmiştir.

EOF’nin büyüklüğü hız ve taşınabilirlik açısından

$$v_{EOF} = \left(\frac{\epsilon \zeta}{\eta} \right) E \quad (1.7)$$

veya

$$\mu_{EOF} = \left(\frac{\epsilon \zeta}{\eta} \right) \quad (1.8)$$

olarak ifade edilebilir. Burada;

v_{EOF} = EOF'nin hızı

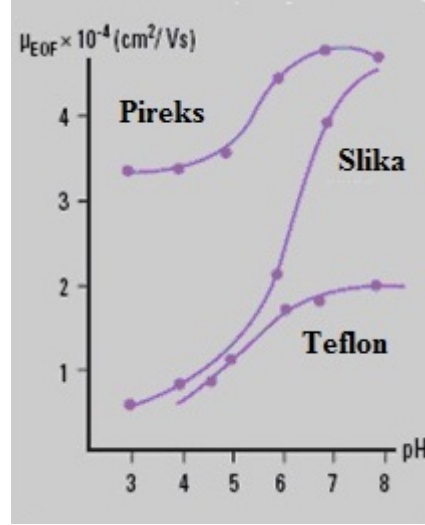
μ_{EOF} = EOF "taşınabilirlik"

ζ = zeta potansiyeli

ϵ = dielektrik sabiti

dir.

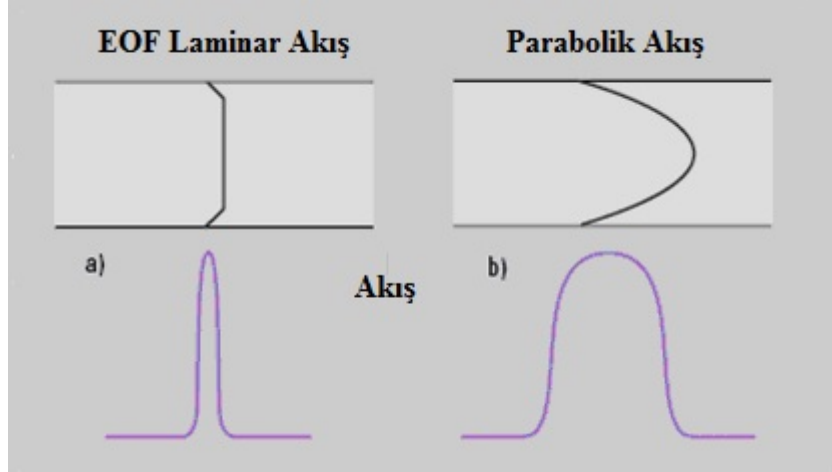
ζ , genellikle kapiler duvarı üzerindeki yüzey yükü tarafından belirlenir. Bu yük çok kuvvetli bir şekilde pH’a bağlı olduğundan dolayı, EOF’nin büyüklüğü pH’a bağlı olarak değişir. Yüksek pH’larda genellikle silanol grupları proton kaybederken, EOF genellikle proton kazanılan düşük pH’lara oranla daha yüksektir. Bazı durumlara bağlı olarak, EOF pH 2 ile 12 arasında değişiklik gösterebilir. Şekil 1.5.’de bu durum erimiş silika ve diğer malzemeler için gösterilmiştir.



Şekil 1.5. EOF'ye farklı kapiler materyallerinde pH'ın etkisi (Heiger, 2000)

ζ , ayrıca tampon çözeltinin iyonik gücüne bağlıdır. Artan iyon gücü, çift tabakanın sıkışmasına, ζ 'nin düşmesine ve EOF'nin azalmasına sebep olur.

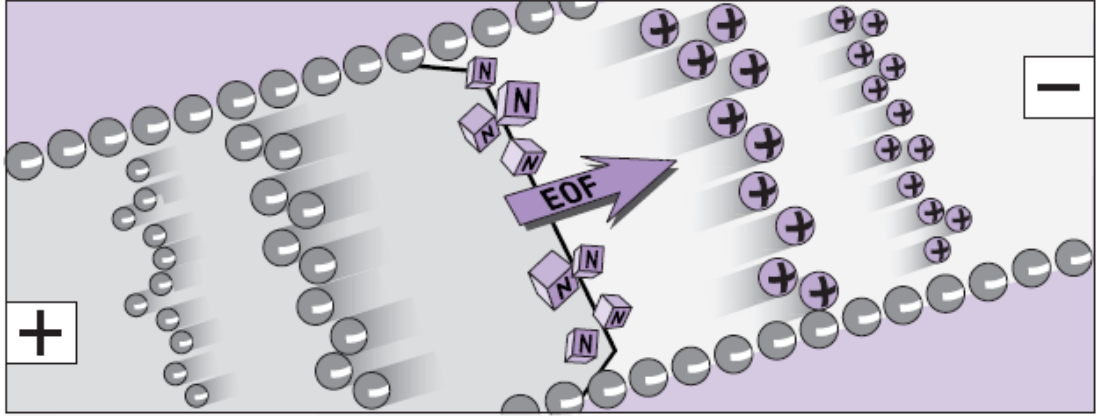
EOF'nin eşsiz bir özelliği ise Şekil 1.6.'da gösterildiği üzere düz akış profilidir. Akışa sebep olan kuvvet, kapilerin duvarları boyunca düzgün bir şekilde dağıtıldığından dolayı, kapiler içerisinde herhangi bir basınç düşmesi gözlenmez ve bunun sonucunda akış neredeyse kapiler boyunca aynı şekilde olur. Düz akış profili çözünen bölgelerinin dağılmasında herhangi bir dış pompa tarafından oluşturulan kuvvetin duvarlar tarafından paylaşılması sonucu oluşan laminar veya parabolik bir akışa direk katkıda bulunmamasından dolayı yararlıdır. Şekil 1.6. a duvarlardaki hızlı akış oranı düşüşünü göstermektedir. Bu çözelti bölgesi, yüzeyde akışa karşı olan sürtünmeden kaynaklanır.



Şekil 1.6. Akış profili ve ilgili çözünen bölge

EOF, bütün türlerin yüküne bakmaksızın aynı yönde hareketine sebep vermektedir. Normal koşullar altında (negatif yüklenmiş kapiler yüzeyi), akış anottan katoda doğrudur. Anyonlar kendi sahip oldukları elektroforetik taşınabilirlikten daha büyük bir akışla katoda doğru sürüklenirler. Bunun sonucu olarak anyonlar, katyonlar ve nötr moleküller aynı yönde göç ettikleri için bir seferde elektroforezlenebilirler. Bu durum Şekil 1.7.'de gösterilmiştir. Şekil 1.7.'de görüldüğü üzere katyonlar, katoda doğru bir elektroforetik çekim olduğundan ve EOF'nin yönünün de katoda doğru olmasından dolayı daha hızlı göç ederler. Nötrler EOF ile aynı hızda taşınırlar; fakat birbirinden ayrıştırılamazlar. Anyonlar anoda doğru çekildiklerinden dolayı daha yavaş göç ederlerken aynı zamanda EOF tarafından katoda doğru taşınmaya devam etmektedirler.

Küçük anyonların analizlerinde (örneğin, sodyum, potasyum, klorür) genellikle EOF, çözünenlerin taşınabilirliğinden büyük değildir. Ayrıca, Kapiler duvarının yükünün değişmesi, çözünen taşınabilirliğinin değiştirmeksizin EOF'yi düşürebilir. Bu durumlarda, anyonlar ve katyonlar zıt yönlerde hareket edebilir (Heiger, 2000).



Şekil 1.7. CE’de farklı çözünen göçlerinin EOF ile ilişkili gösterimi (Heiger, 2000)

1.2.5. EOF kontrolü

EOF, genelde yararlı olsa da, çoğu zaman kontrol edilmeyi gerektirir. Yüksek pH’larda, EOF çok hızlı olabilir. Bunun sonucunda, henüz ayrıştırma işlemi tamamlanmadan, çözünenin elüsyonuna neden olabilir. Aksine, düşük pH’larda ise, negatif yüklü duvar, katyonik çözünenlerin kolombik etkileşimler sonucu adsorpsiyonuna neden olur. Bu durum genellikle protein ayrışmaları için problem oluşturmaktadır. Ek olarak, IEF, CGE gibi diğer elektroforetik ayrıştırma yöntemlerinde sıklıkla EOF’nin düşürülmesi gerekmektedir.

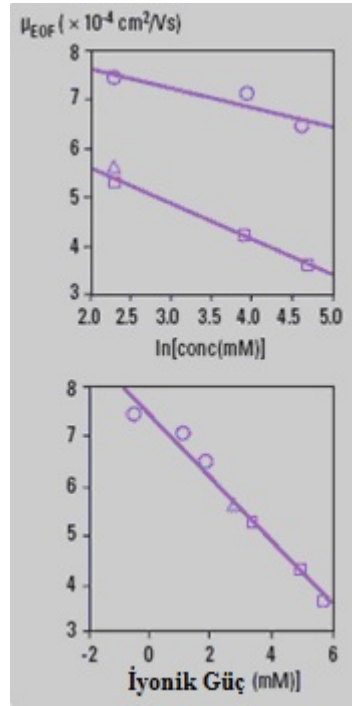
Temel olarak, EOF’nin kontrolü, kapiler yüzey yükünün veya tampon çözeltinin viskozitesinin değiştirilmesiyle mümkün olmaktadır. EOF kontrolü için ayrıca birçok metot vardır. Bunlardan bazıları Çizelge 1.2.’de gösterilmiştir. Kapiler duvarının yüzey yükünü etkileyen koşullar genellikle çözünen maddeyi de etkiler (Örneğin pH). Başarılı ayrışmalar, genellikle şartlar hem EOF hem de çözünen taşınabilirliği özellikleri için optimize edildiği zaman sağlanır.

Çizelge 1.2. Elektroosmotik akışı değiştirmek için kullanılan metotlar (Heiger, 2000)

Değişken	Sonuç	Yorum
Elektrik alanı	EOF'de orantılı değişim gözlemlenir.	- Verimlilik ve seçicilik azaltıldığı zaman azalabilir. - Arttırıldığı zaman joule ısınması oluşabilir.
Tampon pH'ı	Düşük pH'da EOF düşer, yüksek pH'da artar.	- EOF'yi değiştirmek için en uygun ve kullanışlı metottur. - Çözünenin yükü ve yapısı değişebilir.
İyon gücü veya tampon derişimi	Arttığı zaman ζ ve EOF yi düşürür.	- Yüksek iyonik güç yüksek akım oluşturur ve joule ısınmasına sebep olabilir. - Düşük iyonik güç numune adsorpsiyonu için problem olabilir. - İletkenlik numune iletkenliğinden farklı olursa pik şekli bozulabilir. - Azaltılırsa numune istifini bozabilir.
Sıcaklık	Viskoziteyi $^{\circ}\text{C}$ başına % 2-3 değiştirir.	Cihazsal olarak sıcaklık kontrol edilebildiğinden dolayı genellikle kullanışlıdır.
Organik değiştirici	Zeta potansiyeli ve viskoziteyi genellikle değiştirir (Genellikle EOF'yi düşürür.)	- Kompleks değişimler gerçekleşebilir. - Seçiciliği değiştirebilir.
Yüzey aktifi	Hidrofobik ve/veya iyonik etkileşimler vasıtasıyla kapiler duvarına emilir.	- Anyonik yüzey aktifleri EOF'yi arttırabilir. - Katyonik yüzey aktifleri de EOF'yi arttırabilir.
Nötr hidrofilik polimer	Hidrofobik etkileşimler sonucu kapiler duvarına emilir.	Yüzey yükünü ve artan viskoziteyi perdeleyerek, EOF'yi düşürür.
Kovalent kaplama	Kapiler duvarına kimyasal bağlanma oluşur.	- Birçok değişiklik (hidrofiliklik veya yük) mümkün olabilir. - Kararlılık genelde problemlidir.

EOF'nin oranı, elektriksel alan düşürülerek kolayca azaltılabilir. Fakat, bu yöntemin analiz süresi, verimlilik ve seçicilik (ayırma gücü) açısından çeşitli dezavantajlara sebep olmaktadır. Pratik olarak EOF'de en etkili değişiklik, en basit yolla tampon çözeltisinin pH'ı değiştirilerek yapılabilir (Bkz. Şekil 1.5.). pH'ı ayarlamak ayrıca çözünen maddenin yükünü ve taşınabilirliğini de etkileyebilir. Düşük pH'a sahip tampon çözeltileri hem kapiler yüzeyini hem de çözüneni protonlarken, yüksek pH'a sahip tamponlar her ikisinden de proton uzaklaştırır.

EOF, tampon çözeltinin derişimi ve iyonik gücün ayarlanmasından da etkilenir. Bu etkinin büyüklüğü Şekil 1.8.'de gösterilmiştir. Yüksek tampon derişimleri çözünenin kapiler duvarı ile duvarlardaki etkili yükü düşürerek kolombik etkileşimlerini sınırlamasında kullanışlıdır. Kapiler içerisindeki ısınma, yüksek tampon çözeltilerin kullanılmasını sınırlandırmaktadır. Genel tampon derişimleri, 100 ile 500 mM ve daha fazlası kullanılmasına rağmen, 10 ile 50 mM arasında sıralanmaktadır.



Şekil 1.8. Elektroosmotik akış taşınabilirliğinin tampon derişimi ve iyon gücü fonksiyonu olarak gösterimi (Heiger, 2000)

Çemberler: borat tamponu

Kareler: fosfat tamponu

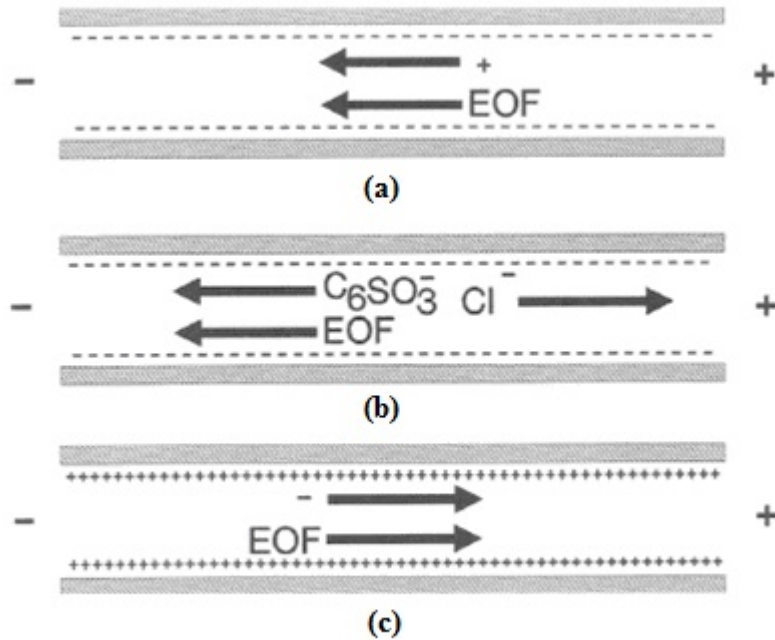
Üçgenler: karbonat tamponu, pH=8

Son olarak, EOF dinamik veya kovalent kaplama yapılarak kapiler duvarının değiştirilmesi ile kontrol edilebilir (tampon eklentileri). Bu kaplamalar yüzey yükünü arttırabilir, düşürebilir veya ters çevirebilir. Bunun sonucu olarak EOF'yi de değiştirmektedir (Heiger, 2000).

Katyonların ve anyonların göç yönleri Şekil 1.9.'da gösterilmiştir. Katyonlar için, elektroforetik taşınabilirlik ve EOF'nin yönü katoda doğru yönelmiştir. Küçük

katyonların göçü göz önüne alındığında, göç yönü değişmez (Şekil 1.9. a). Anyonlar için ise durum farklıdır. Klorür ve sülfat gibi yüksek taşınabilirliğe sahip anyonlar, yüksek EOF'ye rağmen, anoda doğru göç ederler (Şekil 1.9. b). Daha az taşınabilirliğe sahip olan hekzan sulfonat gibi anyonlar EOF etkisi altında katoda doğru sürüklenirler.

Bütün anyonları bir seferde tespit edebilmek için, EOF, setili trimetil amonyum hidroksit veya protonlaşmış poli amin dietilen triamin (DETA) gibi bir katyon yüzey reaktifi kullanılarak ters çevrilmelidir (Şekil 1.9. c). EOF bir kere anoda doğru çevrildiğinde, bütün anyonlar bu yönde hareket etmektedir (Weinberger, 2000).



Şekil 1.9. Küçük anyonların göç yönlerinin silica kapiler ve EOF yönü değiştirilmiş kapiler için gösterimi (Weinberger, 2000)
(a),(b):silica kapiler, (c): EOF değiştirilmiş kapiler

1.3. CE'nin Temel Teorisi

1.3.1. CE'nin analitik parametreleri

CZE, CE'nin en basit yöntemidir ve CE için gerekli alan analitik parametreler kolon kromatografisine benzer olarak tarif edilebilir.

1.3.1.1. Taşınabilirlik ve göç zamanı

Çözünen maddenin CE dedektörüne ulaştığı noktaya kadar geçen zamana göç zamanı (t_m) denir. Bu mesafe ve görünen çözünen taşınabilirliği (μ_{app}) (1.9) denklemindeki gibi hesaplanabilir.

$$\mu_{app} = \frac{l}{t_m E} = \frac{lL}{t_m V} \quad (1.9)$$

Burada;

$$\mu_{app} = \mu_{ep} + \mu_{EOF}$$

V = uygulanan voltaj

l = etkin kapiler uzunluğu

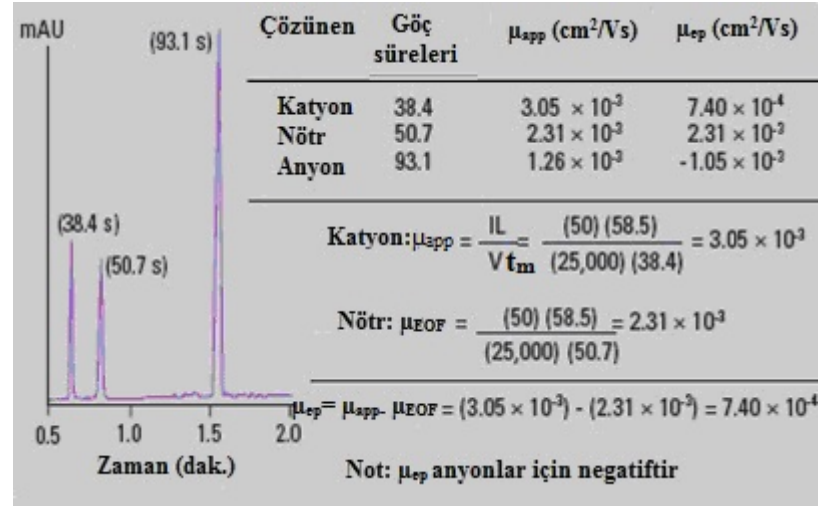
L = toplam kapiler uzunluğu

t_m = göç süresi

E = elektrik alanı

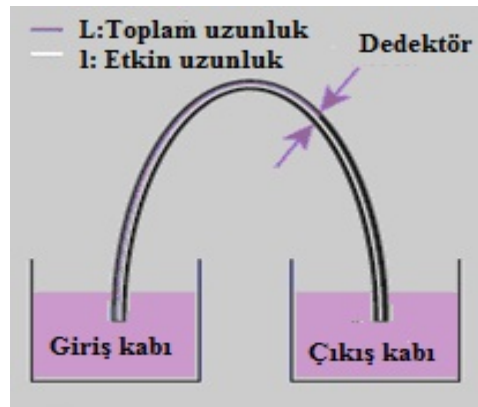
dır.

EOF'nin varlığında ölçülen taşınabilirliğe görünen taşınabilirlik (μ_{app}) denir. μ_{app} , EOF'ye eşit hızda hareket eden nötr bir işaretleyici kullanarak, EOF'yi bağımsızca ölçerek, gözlemlenen taşınabilirlikten çıkarılabilir. Nötr işaretleyicilere örnek olarak aseton verilebilir. Buna örnek bir hesaplama Şekil 1.10.'daki gibi verilebilir.



Şekil 1.10. Elektroosmotik akış taşınabilirliğinin (μ_{EOF}) ve etkin çözünen taşınabilirliğinin (μ_{EP}) hesaplanması (Heiger, 2000)

İki farklı kapiler uzunluğu olan etkin ve toplam kapiler uzunluğu Şekil 1.11.'de sistematik olarak tarif edilmiştir. Etkin uzunluk (l), enjeksiyon noktasından tespit noktasına kadar olan bölümdür. Dedektör CE üzerinde (on capillary) tespit yönteminde, bu uzunluk toplam kapiler uzunluğundan yaklaşık olarak 5-10 cm daha kısadır. Kütle Spektroskopisi-MS (Off colon) gibi tespit yöntemi için ise iki uzunluk birbirine eşittir. Elektrik alanı (E) toplam uzunluk açısından tanımlansa da, her iki uzunluk birimi, göç süresi, etkin uzunluk açısından tanımlandığı için önemlidir (Heiger, 2000).



Şekil 1.11. Etkin ve toplam kapiler uzunluğu tanımlaması (Heiger, 2000)

1.3.1.2. Dispersiyon (Saçılma)

Elektroforez ile ayırma, çözünen taşınabilirliğindeki farklılıklara dayanır. İki bölgeyi birbirinden ayırt etmek için gerekli fark, bölgelerin uzunluklarına bağlıdır. Bölge uzunluğu önemli derecede bölgenin üzerine etkiyen saçılım sürecine bağlıdır. Saçılım (w_b) bölge uzunluğunu ve ayırıştırma işlemini başarabilmek için gerekli olan taşınabilirlik farkını arttırdığından dolayı kontrol edilmelidir.

$$w_b = 4\sigma \quad (1.10)$$

Burada;

σ = pikin standard sapması
(zaman, uzunluk veya hacim)
dır.

Verimlilik (N), teorik tabaka sayısı olarak ifade edilebilir. N, (1.11) denklemindeki gibi ifade edilir.

$$N = \left(\frac{l}{\sigma}\right)^2 \quad (1.11)$$

Burada;

l = kapiler etkin uzunluğu

dur ve Bir teorik tabakaya eşdeğer yükseklik (HETP) ile ilişkilendirilebilir. $HETP=H$, (1.12) denklemindeki gibidir.

$$H = \left(\frac{l}{N}\right) \quad (1.12)$$

Normal koşullar altında (küçük enjeksiyon fiş uzunluğu, çözünen ve duvar arasında etkileşim yok, v.b.) CE'de çözünen bölge genişlemesine tek katkı, boylamasına (kapiler boyunca) difüzyondur. Radyal difüzyon (kapiler genişliğince), düz akış profilinden dolayı önemli değildir. Aynı şekilde, konveksiyonel genişleme, kapiler anti konveksiyonel özelliklerinden dolayı önemsizdir. Bütün bunların sonucunda,

verimlilik kromatografideki moleküler difüzyon koşuluna bağlıdır. Bu koşul (1.13) denkleminde gösterilmiştir.

$$\sigma^2 = 2D_t = \frac{2DL}{\mu_{ep} V} \quad (1.13)$$

Burada;

D= Çözünen maddenin difüzyon katsayısı
dır.

(1.13) denklemi, (1.10) denkleminde yerine yazılırsa, tabaka katsayısı (N) için temel bir elektroforetik ifade elde edilmiş olur. Bu ifade (1.14) denkleminde verilmiştir.

$$N = \frac{\mu_{ep} V l}{2DL} = \frac{\mu_{ep} E l}{2D} \quad (1.14)$$

(1.13) denklemi yüksek elektriksel alanın neden uygulandığının kanıtıdır. Bunun sebebi çözünen maddenin yüksek elektrik alanında kapiler içerisinde daha kısa süre bulunması ve bunun sonucu olarak difüzyon için daha az zamana sahip olmasıdır. Ayrıca, protein ve DNA gibi yüksek difüzyon katsayısına sahip olan moleküllerin küçük moleküllere oranla daha az saçılım sergilediklerini (1.13) denklemi göstermektedir. Mümkün olan difüzyon katsayılarının geniş aralığı Çizelge 1.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. Seçilen moleküllerin difüzyon katsayıları (Heiger, 2000)

Molekül	D(x10 ⁵ cm ² /s)
HCl	3,05
NaCl	1,48
Glisin	1,06
Sitrat	0,66
Saytokrom C	0,11
Hemoglobin	0,069
Tabakko mozaik virusü	0,0046

Teoriksel plaka sayısı elektroferogram kullanılarak direkt olarak belirlenebilir.

$$N = 5,54 \left(\frac{t_m}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (1.15)$$

Burada;

t_m = göç zamanı

$w_{1/2}$ = yarı yükseklikteki geçici pik genişliği

dir.

(1.15) denkleminde, pratikte ölçülen verimlilik; (1.14) denkleminde, hesaplanabilen verimlilikten daha azdır. Bunun sebebi, teorik hesaplamaların, sadece boyuna difüzyona bağlı bölge genişlemelerini hesaba almasıdır (Heiger, 2000).

1.3.1.3. Verimliliği (N) etkileyen faktörler

CE’de saçılmaya, boyuna difüzyonun yanı sıra bir sürü etken neden olabilir. Bunların arasından en önemlileri joule ısınmasına bağlı olarak oluşan sıcaklık değişimleri, enjeksiyon fişi uzunluğu ve kapiler duvarıyla çözünen etkileşimleridir. Bu olgular genellikle kontrol edilebilir. Bunlar ve diğer bölge genişletici mekanizmalar Çizelge 1.4.’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.4. CE’de saçılmaya neden olan etkenlerden bazıları (Heiger, 2000)

Kaynak	Yorum
Boyuna difüzyon	- Verimliliğin temel verimini tanımlamaktadır. - Düşük difüzyon katsayılı çözünenler, daralmış bölgeler oluşturmaktadır.
Joule ısınması	Sıcaklık değişimlerine ve Laminar akışa sebep olur.
Enjeksiyon uzunluğu	- Enjeksiyon uzunluğu difüzyon kontrollü bölgelerin uzunluğundan daha az olmaktadır - Tespit limiti zorlukları, sıklıkla idealden daha uzun enjeksiyon uzunlukları gerektirmektedir.
Numune adsorpsiyonu	Çözünenin kapiler duvarı ile etkileşimi ciddi pik kuyruklanmalarına sebep olmaktadır.
Düzgün olmayan tampon kapları	Laminar akışa sebep vermektedir
Dedektör hücre boyutu	Pik genişliğiyle ilişkili olarak küçük olmalıdır.

(1.13) denkleminde tarif edildiği üzere saçılma, tek etkenin moleküler difüzyon olduğu varsayımı üzerine elde edilir. Varyans daha çok sistemin toplam varyansı (σ^2_T) tarafından daha iyi ifade edilir. σ^2_T , katkıda bulunan varyansların toplamı olarak (1.16) denklemindeki gibidir.

$$\sigma^2_T = \sigma^2_{DIF} + \sigma^2_{INJ} + \sigma^2_{TEMP} + \sigma^2_{ADS} + \sigma^2_{DET} + \sigma^2_{Electrodispersion} + \dots \quad (1.16)$$

Burada, alt simgeler;

DIF= difüzyon

INJ= enjeksiyon

TEMP= sıcaklık değişimi

ADS= adsorpsiyon

DET= Tespit etme

ve elektro dispersiyondur. (1.16) denklemindeki saçılma süreçlerinden herhangi biri eğer baskın gelirse, teorik limitler elde edilemez ve (1.14) denklemini geçerli olamaz. Bu durumda, voltajın artırılmasıyla, verimlilikte ve seçicilikte minimum gelişmeler elde edilebilir (Heiger, 2000).

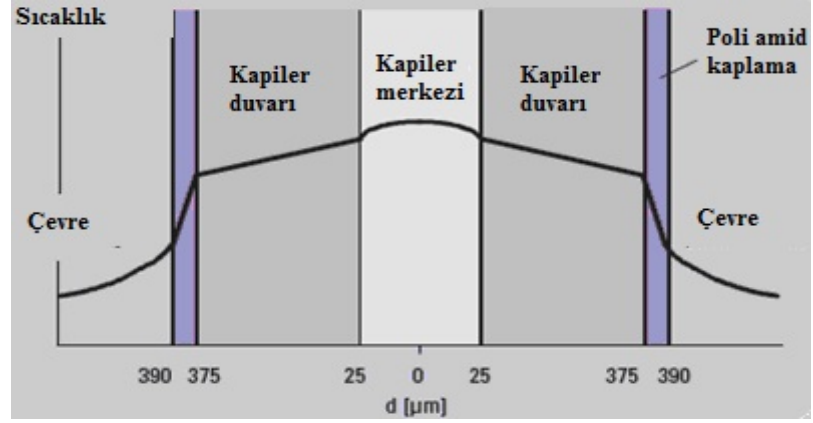
1.3.1.4 Joule ısınması ve sıcaklık değişimi

Elektroforezi, dar bor kapillerlerde gerçekleştirmenin temel avantajı ısınma etkisinin azaltılmasıdır. Isınma, düzgün dağılmayan sıcaklık değişimlerine, viskozitede yerel değişikliklere ve bant genişlemesine sebep olduğundan dolayı problem oluşturmaktadır. Verimlilik ve seçicilik için, teorik denklemler mümkün olduğu kadar yüksek elektrik alanın kullanılmasını savunurken, joule ısınması, kapillerin boyutlarını ve sıcaklık kontrol ölçümlerini göz önüne almaksızın bu yaklaşımın yararını sınırlandırır.

Elektrik akımının geçmesi esnasında oluşan ısıya joule ısı denir. Sıcaklık artışı, oluşan güce (Voltaj ve akımın ürünü) bağlı olarak artar ve kapillerin boyutları, tampon çözeltinin iletkenliği ve uygulanan voltaj tarafından belirlenir. Önemli yüksek sıcaklık artışları, güç oluşumu harcanmasını aştığı zaman meydana gelir. Tipik güç oluşturma aralıkları 0,5 ile 5 W/m aralıklarıdır.

Genellikle mutlak sıcaklık artışları zararlı olmamasına karşın, sıcaklık değişimleri zararlıdır. Kapiler duvarları boyunca ısının termal dağılımı duvarlardan ziyade daha çok kapillerin merkezinde sıcaklıklara sebep olabilir. Bu sıcaklık değişimleri çalışma tamponunda viskozite farklılıklarına ve bölge deformasyonuna neden olabilir. Sıcaklık farklılığı kontrolü, sıcaklıkta meydana gelebilecek 1 °C artış, viskozite de % 2-3 değişime (ve % 2-3 taşınabilirlikte değişim) sebep verdiğinden dolayı kritiktir.

Kapillerin merkezi ve çevresinde meydana gelen sıcaklık değişimi Şekil 1.12.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.12. Kapiler merkezinden çevresine doğru sistematik ısı değişimi
(Heiger, 2000)
d=iç çap

Şekil 1.12.'de gösterildiği üzere sıcaklık farklılığı iç çapa, duvarın kalınlığına, poliamid kaplamaya ve çevrenin sıcaklık transfer katsayısına bağlıdır. Analitik olarak bu durum (1.17) denklemindeki gibi ifade edilebilir.

$$\Delta T_r = \frac{Q r_1^2}{2} \left[\frac{1}{\kappa_1} \ln \left(\frac{r_2}{r_1} \right) + \frac{1}{\kappa_2} \ln \left(\frac{r_3}{r_2} \right) + \frac{1}{r_3} \left(\frac{1}{h} \right) \right] \quad (1.17)$$

Burada;

Q = güç yoğunluğu

r = yarıçap

κ = termal iletkenlik

h = kapilerden çevresine termal transfer oranı

Alt karakter 1, 2 ve 3 tamponu göstermektedir.

dır.

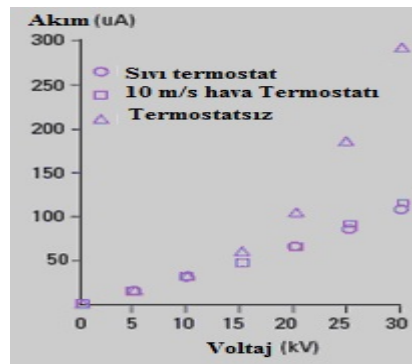
İç kapiler duvarı ile kapiler merkezi arasındaki hesaplanmış bazı sıcaklık farkları örnekleri Çizelge 1. 5.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.5. Kapiler duvar sıcaklığı ve merkezden duvara sıcaklık farkı gösterimi (Heiger, 2000)

Yarıçap (μm)	Duvar sıcaklığı, K	Sıcaklık farkı, K
25	299,0	0,53
50	301,2	1,39
75	304,2	3,14
100	307,7	5,58
125	311,6	8,72

(1.17) denklemi, küçük iç çapa sahip geniş dış çaplı kapiler kullanmanın avantajlı olduğunu göstermektedir. Düşük hacim limitleri, santimetreye yüzlerce volt uygulansa bile oluşturulan ısı miktarını sınırlandırmaktadır. Ayrıca, yüksek iç yüzey hacim oranı, oluşan ısının kapiler duvarlarında, düzgün dağılmasına yardımcı olur. Poliamidin izolasyon özelliklerinde azalma ve çevreye ısı transferi aktarılmasına bağlı olarak geniş dış çapa sahip olan kapilerler avantajlıdır. Poliamid kaplama sadece birkaç mikron kalınlığında olsa da, poliamidin düşük termal iletkenliği, ısı yayılımını önemli derecede önler.

Aşırı ısı oluşumunu ve mümkün olan sıcaklık değişkenliklerini bildiren birçok metot vardır. EOF'de veya taşınabilirlikte artan voltajla meydana gelen oransız artış sıcaklık artışını belirtmektedir (Şekil 1.13.).



Şekil 1.13. Joule ısınmasını gözlemlemek için Ohm kuralı işaretleri (Heiger, 2000)

Joule ısınmasını önleyebilecek çeşitli metotlar Çizelge 1.6.'da verilmiştir. (1.17) denkleminde göre sıcaklık değişimi güçteki orantılı küçülmeyle azaltılabilmektedir. Bu, ya uygulanan voltajın düşürülmesiyle ya da iyonik gücün veya tampon iyon taşınabilirliğinin düşürülmesinin sonucu olarak tampon iletkenliğinin düşürülmesiyle başarılabılır. Diğer metotlar kullanışlı olmasına rağmen uygulamada sınırlı kalabilmektedir. Azaltılmış tampon derişimi, tampon kapasitesini düşürebilir ve ayrıca çözünen duvar etkileşimlerini arttırabilir.

Çizelge 1.6. Joule ısınmasını ve sıcaklık değişimini kontrol etmek için metotlar (Heiger, 2000)

Değişken	Etki
Elektrik alanı düşürme	- Isı oluşumunda orantılı düşüş gözlenir. - Verimlilik ve seçiciliği düşürür.
Kapiler iç çapını küçültme	- Akımda etkin düşüş olur. - Duyarlılık düşer. - Artmış numune adsorpsiyonuna sebep olabilir.
Tampon iyonik gücünü veya derişimini düşürme	- Akımda orantılı düşüş gözlenir. - Artmış numune adsorpsiyonuna sebep olabilir.
Aktif sıcaklık kontrolü	Isıyı dengeler ve kapilerden ısıyı uzaklaştırır.

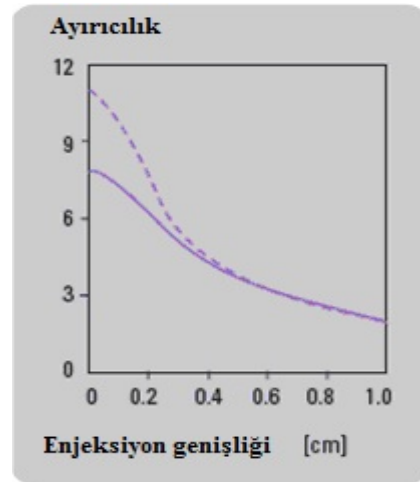
Sıcaklık farklılıklarındaki belirgin düşüş, alanın karesine yarıçapla bağlı olarak (bunun sonucunda elektirik akımı) kapilerin iç çapını düşürerek gerçekleştirilebilir. Kapiler iç çapı 5-10 μm kadar küçük olan kapilerler kullanılabilir. Fakat bu tarz kapilerler, rutin kullanımlar için başlıca tespit, numune yükleme ve kapiler tıkanma zorluklarına bağlı olarak pratik değildirler. 25-50 μm iç çaplar daha pratik kullanıma sahiptir.

Isının dış kapiler duvarından uzaklaştırılması ayrıca önemlidir. Bu, genellikle kapilerin çevresindeki sıcaklığa duyarlı bir fan kullanılması ile başarılmaktadır. Dramatik gelişmeler soğutma sistemleri kullanılarak yapılabilir. Sıvıyla soğutma teorik olarak daha verimliyen ($\kappa_{\text{sıvı}} > \kappa_{\text{hava}}$). 5 -7 W/m güç oluşumunda daha az tipik koşullar altında, yüksek hızlı hava soğutması yeterlidir (Bkz. Şekil 1.12.).

Aktif sıcaklık kontrolü sadece ısı yayılımı için değil aynı zamanda sabit bir kapiler çalışma sıcaklığı sağlayabilmek için de önemlidir. Joule ısınması olayının olmadığı durumlarda bile göç zamanındaki değişkenlikler, çevre sıcaklığında meydana gelen değişimlerden kaynaklanabilir ve $^{\circ}\text{C}$ başına viskozitede % 2-3 değişime neden olabilir. Bunun yanı sıra; numune yükleme ayrıca sıcaklığa bağlıdır ve küçük değişimler enjeksiyon miktarında önemli etki oluşturabilir (Heiger, 2000).

1.3.1.5. Enjeksiyon fişi uzunluğu

Enjeksiyon sürecinde numune tıpası uzunluğu minimuma indirilebilir. Eğer numune tıpası uzunluğu difüzyon tarafından kaynaklanandan daha uzunsa, verimlilik ve seçicilik kayba uğrayacaktır. Bu durum Şekil 1.14.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.14. Seçicilikte enjeksiyon fişi uzunluğu etkisi (Heiger, 2000)

Kullanılan hesaplamalar: Üst eğri= 20 kV, alt eğri= 10 kV

$$\mu_{\text{ep1}} = 3,0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}, \mu_{\text{ep2}} = 3,15 \text{ cm}^2/\text{Vs}, \mu_{\text{EOF}} = 3,0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs},$$

$$\text{Difüzyon katsayısı} = 7 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

Enjeksiyonun toplam varyansa katkısı, (1.18) denkleminde gösterilmiştir.

$$\sigma = \frac{w_i^2}{12} \quad (1.18)$$

Burada;

w_i = enjeksiyon fişi uzunluğu

dur.

Standard olarak enjeksiyon fişi uzunluğu, difüzyondan kaynaklanan $(2Dt)^{1/2}$ standart sapmadan daha az olmalıdır. Tam uzunluğun hem çözünenlerin difüzyon katsayısına hem de analiz süresine etkisi vardır. Makro moleküller, küçük moleküllerden 100 kat daha az difüzyon katsayısına sahip olabilir ve daha kısa numune tıplarına gereksinim duyar. Difüzyon katsayısı ve enjeksiyon kanal uzunluğu ve bunların verimlilik üzerine etkisi Çizelge 1.7.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.7. Enjeksiyon uzunluğu ve difüzyon katsayısının verimlilik üzerindeki etkisi (Heiger, 2000)

Enjeksiyon uzunluğu (mm)	N ($D=10^{-5}$ cm ² /s)	N ($D=10^{-6}$ cm ² /s)
1	238.000	1.400.000
2	164.000	385.000
10	81.000	112.000

Enjeksiyon uzunluğunun pratik sınırı kapiler uzunluğunun toplamının % 1-2 sidir. 70 cm kapiler için, % 1 uzunluk 7 mm'ye karşılık gelmektedir (veya 50mm iç çap için 14nl). Tekrarlanabilir olarak şu anki cihazlar bu küçük hacimdeki numuneleri yükleyebilirken, tipik koşullar altında tespit sınırı zorlukları genellikle daha uzun enjeksiyon uzunluklarını gerektirir (Heiger, 2000).

1.3.1.6. Çözünen-duvar etkileşimi

Çözünen ile kapiler duvarı arasındaki etkileşim CE için zararlıdır. Etkileşimin uzunluğuna bağlı olarak, pik kuyruklanması hatta çözünenin toplam adsorpsiyonu meydana gelebilir. Erimiş kapiler duvarlarından adsorpsiyonun temel nedenleri, katyonik çözünenlerle negatif yüklü duvar arasındaki iyonik ve hidrofobik etkileşimlerdir.

Adsorpsiyona bağlı varyans (1.19) denkleminde verilmiştir.

$$\sigma_{ads}^2 = \frac{k' V_{EOF} l}{(1+k')^2} \left(\frac{r^2 k'}{4D} + \frac{2}{K_d} \right) \quad (1.19)$$

Burada;

k' = kapasite faktörü

V_{EOF} = elektroosmotik akış hızı

D = çözünen difüzyon katsayısı

l = kapiler etkin uzunluğu

K_d = birinci deece çözünme katsayısı

dır.

Kapasite faktörü (1.20) denklemindeki gibi tanımlanır.

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (1.20)$$

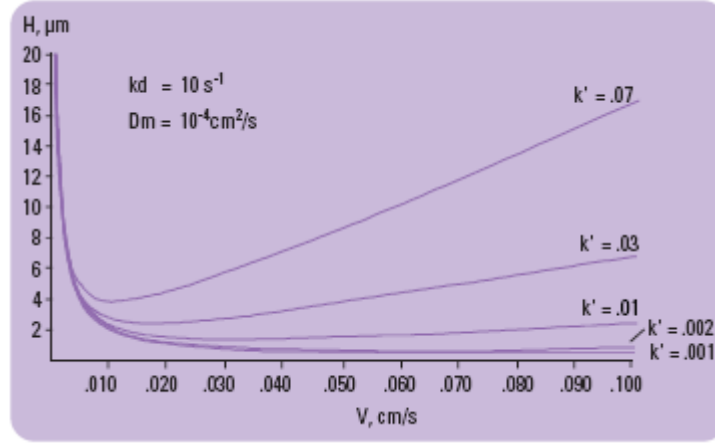
Burada;

t_r = tutulmuş çözeltinin elüsyon süresi

t_0 = tutulmamış çözeltinin elüsyon süresi

dir.

(1.19) denklemi, hem enine difüzyonu hem de adsorpsiyon-desorpsiyon kinetiği (K_d)'ni tarif eder. Varyans kapasite faktörünün büyüklüğüne sıkı sıkıya bağlıdır. Şekil 1.15. ve Çizelge 1.8.'de görüldüğü üzere küçük etkileşimler verimde dramatik etkilere sebep verebilir. 0,1'den daha az kapasite faktörleri bile çok kötü sonuçlar verebilir.



Şekil 1.15. Protein duvar etkileşimlerinin HETP, H, üzerindeki etkisi (Heiger, 2000)

Çizelge 1.8. Adsorpsiyonun verimlilik üzerindeki etkisi (Heiger, 2000)

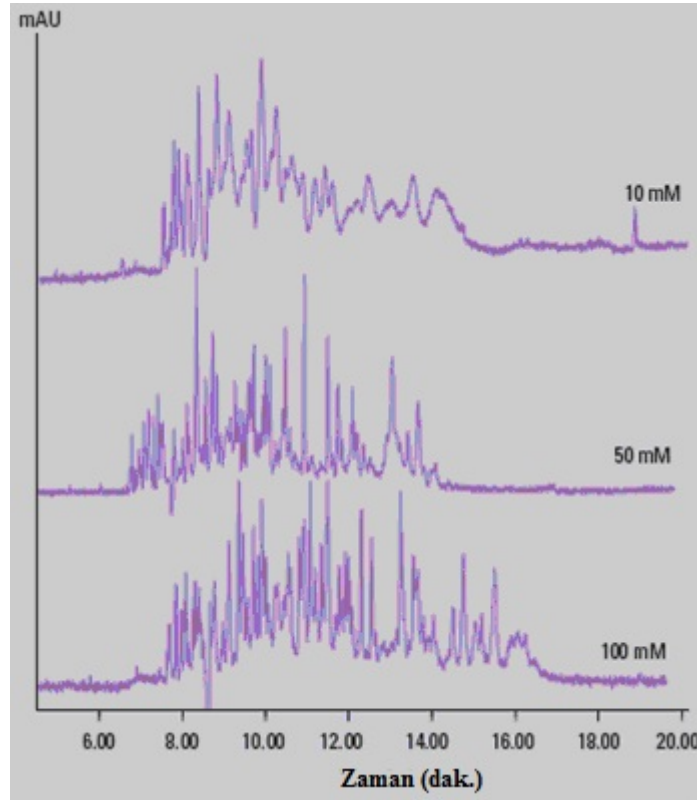
k'	H	N
0,001	0,58	$1,7 \times 10^6$
0,005	1,00	$1,0 \times 10^6$
0,010	1,54	$6,5 \times 10^6$
0,05	6,78	$1,5 \times 10^6$
0,100	15,7	$6,4 \times 10^4$

$$D = 5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}, v_{\text{EOF}} = 1 \text{ mm/s}, l = 50 \text{ cm}, L = 60 \text{ cm}$$

Pratik olarak, protein ayrışmaları 0,01 ile 0,1 arasında kapasite faktörleri sergiler. Bunun sonucunda; 1 ile 5×10^5 arasında tabaka hesabı beklenilebilir.

Çözünen-duvar etkileşimini azaltmak için uygulanan birçok yöntem vardır. Bunlardan bazılarını uygulamak çok kolaydır ve genellikle istisna sonuçlar verir.

Tamponun derişiminini arttırmak, (örneğin, etkin yüzey yükünü azaltarak) çözünen etkileşimlerini azaltır. Yüksek iyon yükü ayrıca EOF'yi düşürür. Böylece çözünenlerin kapilerde kalma süresi artar. Bu durum Şekil 1.16.'da örnekle gösterilmiştir. Bu yaklaşım artan akım ve buna bağlı olarak joule ısınması tarafından sınırlandırılabilir.



Şekil 1.16. Tampon derişiminin BSA triptik sindirim ayrışımına etkisi
(Heiger, 2000)

Koşullar: Fosfat tamponu pH=7, V=25 kV, $i = 9,36$, ve $71 \mu A$, sırasıyla, $l=50$ cm, $L= 58,5$ cm, $50 \mu m$ iç çap, $375 \mu m$ dış çap, BSA derişimi 2 mg/ml, enjeksiyon= 100 mbars

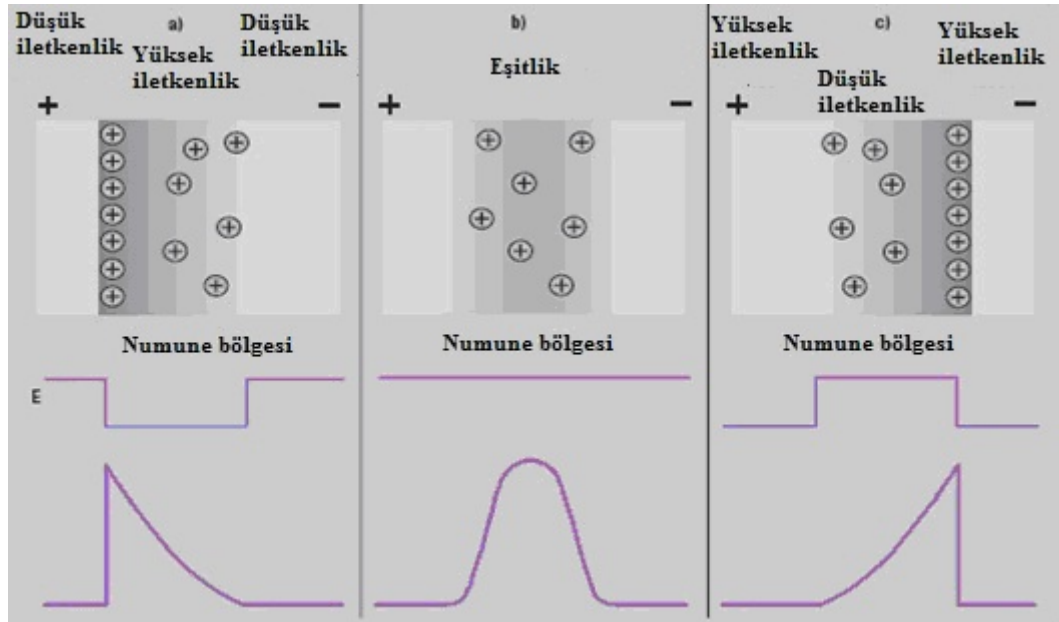
Adsorpsiyonu sınırlamak için diğer bir yaklaşım ise yüksek pH'larda çalışmaktır. Düşük pH'larda (<2-3), erimiş silikanın silanol grupları temel olarak yüksüz olacaktır. EOF hemen hemen sıfırken, proteinler (ve diğer türler) yüklenmiş ve pozitif yüklü oldukları için katoda doğru hareket edeceklerdir. Aksine, yüksek pH'larda (>9-10) ise, hem duvar hem de numune proton kaybetmiş olacak ve negatif

yükleneyecektir, bunun sonucunda ise çözünen duvar etkileşimleri yük itişmeleri sonucunda sınırlanmış olacaktır (Heiger, 2000).

1.3.1.7. Elektro-dispersiyon

Numune bölgesi ve çalışma tampon iletkenlikleri üç temel etkiye yol açabilir: 1) eğri pik şekilleri; 2) Çözünen derişimi veya odaklanması (düşük iletkenlikli numune), veya çözünen odaklanamaması (yüksek iletken numune); 3) bazı iyonların aşırılığına bağlı olarak (örneğin, Cl^-), geçici eşforetik durumlar.

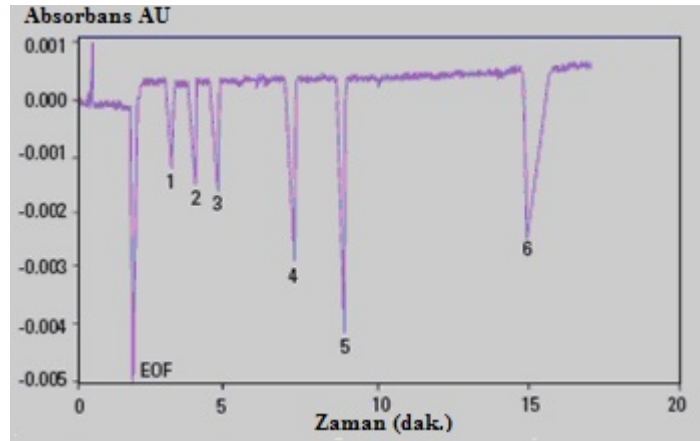
Çözünen bölge; çalışma tamponundan daha yüksek bir taşınabilirliğe sahip olduğu zaman, çözünen bölgenin önde olan tarafı difüz edecek ve kuyruk kısmı keskin olacaktır. Aksine, çözünen bölge, çalışma tamponundan daha düşük bir taşınabilirliğe sahipse, önde olan kısım keskin ve kuyruk kısmı difüz edecektir. İletkenliklerin eşit olduğu durumda ise, herhangi bir pik değişikliği ortaya çıkmayacaktır. Bu durum sistematik olarak Şekil 1.17.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.17. Numune ve tampon iletkenlikleri uyumsuzluklarına bağlı elektro-dispersiyon gösterimleri (Heiger, 2000)

Bu pik şeklindeki değişiklikler, iletkenlikteki değişiklikler ve bu değişiklikler sonucu her bölgedeki elektriksel alan farklılıklardan dolayı meydana gelmektedir. Çözünen bölge, çalışma tamponundan daha yüksek taşınabilirliğe (yani: yüksek iletkenlik ve düşük direnç) sahip olduğu zaman, göç edilen taraf doğrultusunda olan çözünenin ön tarafı, tampon bölgesine girerken daha yüksek bir voltaj düşmesiyle karşılaşır. Bu difüz eden çözünenin, numune bölgesinden uzaklaşarak ivme kazanmasına sebep olur. Kuyruk bölgesindeki çözünen çalışma tamponuna difüze ederken ayrıca voltaj düşmesinde bir artışla karşılaşır. Fakat, göçle aynı yöndeysen kuyruk kısmını keskin tutarak, çözünen bölgeye doğru geri ivmelenme kazanır (Şekil 1.17.a). Aynı nedenler, zıt durumun ve zıt yüke sahip olan iyonların keskin önce gelen ve difüz eden kuyruk oluşturmalarına neden olur (Şekil 1.17.c). Nötr türler iletkenlik farklılıklarından etkilenmezler (Şekil 1.17.b).

Bu değişimler her zaman oluşmasına rağmen, difüzyonu da içeren diğer dağıtıcı etkilerle çok küçük derecede bağlantılı olabilirler. Değişimlerin oluşması, diğer taraftan çok geniş aralıkta taşınabilirlikli çözünen içeren numune olduğunun kanıtıdır. İnorganik anyonların ve organik asitlerin ayrışımının bir örneği Şekil 1.18.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.18. Elektro-dispersiyona bağlı olarak çözünelerin baş ve kuyruk oluşumu (Heiger, 2000)

1) Klorür, 2) Klorat, 3) Florür, 4) Asetat, 5) Propionat, 6) MES

Koşullar: Tespit = Indirect UV

Tampon= 0,01 M benzoik asit, pH= 8, Trisli, Tespit dalgaboyu= 254 nm, V=25 kV, l= 50 cm, L= 57 cm, 75 µm iç çap

Yüksek taşınabilirliğe sahip hızlı ayrışan iyonlarda baş oluşumu gözlemlenirken, normal taşınabilirliğe sahip iyonlar Gaussyen pik şekli oluşturur. Diğer taraftan düşük taşınabilirlikli geç ayrışan iyonlar, kuyruk kısmı oluşturur. En iyi pik şekilleri, eğer elektolit ve çözünen anyonları eşit taşınabilirliklere sahiplerse oluşmaktadır.

Pik şekli değişimleri sadece seçicilik kaybolduğu zaman zararlıdır. Bu olayları azaltmanın ölçüleri tampon bileşenlerinin taşınabilirliklerini numune taşınabilirlikleriyle kıyaslama veya yaklaşık olarak numune derişimininkinden iki kat daha fazla büyüklükte çalışma pH'ı sağlamayı içermektedir (Heiger, 2000).

Mikkers vd. (1977), elektrolit anyonundan daha çok taşınabilirliğe sahip olan çözünen anyonlarının elektroferogramında, pik baş şekillenmesi oluşurken, elektrolit anyonlarından daha düşük taşınabilirliğe sahip olan çözünen anyonlarının elektroferogramlarında, pik kuyruk şekillenmesi oluştuğunu göstermişlerdir (Romano et al., 1991).

1.3.1.8. Ayırıcılık

Numune bileşenlerinin seçiciliği, ayırma biliminde en son hedeftir. Seçicilik en basit şekliyle (1.21) denklemindeki gibi ifade edilir.

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} = \frac{t_2 - t_1}{4\sigma} \quad (1.21)$$

Burada;

t = göç zamanı

w = anahat pik genişliği (zaman içerisinde)

σ = geçici standart sapma

altıyazı 1 ve 2, 2 tane çözünen olduğunu gösterir.

dır.

(1.21) denklemindeki pay, ayırma işlemini farklı göçler açısından; payda ise ona karşı gelen dağıtıcı işlemler açısından tarif eder.

CE’de ayırma, öncelikle seçiciliğe değil verimliliğe dayanır. Kromatografide genellikle bunun zıttı doğrudur. Çok keskin çözünen bölgelerine bağlı olarak, çözünen taşınabilirliklerinde küçük farklılıklar (<0,05 bazı durumlarda), genellikle tam bir seçicilik için yeterlidir. Elbette, dağılmanın boyutu, yeterli taşınabilirlik farklılıkları gerçekleştirilebilirse sorun değildir

İki bileşenin seçiciliği verimlilik açısından, (1.22) denklemindeki gibi ifade edilebilir.

$$R = \frac{1}{4} N^{1/2} \left(\frac{\Delta\mu}{\bar{\mu}} \right) \quad (1.22)$$

Burada;

$$\Delta\mu = \mu_2 - \mu_1,$$

$$\bar{\mu} = \frac{\mu_2 + \mu_1}{2}$$

dır.

(1.14) denklemi, (1.22) denkleminde yerine yazılırsa, verimliliğin kesin olarak hesaplanmasını gerektirmeyen, seçicilik için yaygınca referans gösterilen, teorik bir denklem elde edilmiş olur. Bu durumda ayrıca EOF’nin seçicilik üzerindeki etkisi de tanımlanmış olur. Bu durum (1.23) denkleminde gösterilmiştir.

$$R = \frac{1}{4\sqrt{2}} (\Delta\mu) \left(\frac{V}{D(\bar{\mu} + \mu_{EOF})} \right)^{1/2} \quad (1.23)$$

Uygulanan voltajla doğrusal olarak artan verimliliğe kıyasla, karekök ilişkisine bağlı olarak seçicilikte benzer bir fayda bulunamamıştır. Seçiciliği iki kat arttırabilmek için voltaj dört kat arttırılmalıdır. Bu durumdan kazanılan fayda genellikle joule ısınması tarafından sınırlandırılır.

(1.23) denklemi sonsuz seçiciliğin $\bar{\mu}$ ve μ_{EOF} eşit fakat birbirine zıt oluşu zaman elde edilmiş olacağının kanıtıdır. Yani iyonlar EOF'ye zıt yönde ve aynı oranda göç ettikleri zaman bu durum gerçekleşmiş olacaktır. Bu durumda, diğer taraftan ise, analiz süresi sonsuza yaklaşır. Kısacası, çalışma parametreleri, seçicilik ve analiz süresini dengeleyebilmek için kontrol edilmelidir (Heiger, 2000)

1.4. CE'de Numune Enjeksiyonu ve Enjeksiyon Yöntemleri

Tekrarlanılabilir numune enjeksiyonu gerçekleştirebilmek, CE'de karşılaşılan en büyük problemlerden biridir. Numune boyutu o kadar küçük tutulmalıdır ki, bant genişlemesine sebebiyet verilmemelidir. Bunu başarabilmek için, 2–20 nL numune hacimleri tekrarlanılabilir olarak enjekte edilebilmelidir. Aşırı miktarda numune hacimleri kullanılması, çok hızlı bir şekilde pik bozulmalarına sebep olmakta ve ayırıcılığı (R) yok etmektedir (Engelhardt et al., 1996).

Kapiler elektroforezde kullanılan iki enjeksiyon tekniği vardır. Bunlar, hidrodinamik ve elektrokinetik enjeksiyon teknikleridir. Hidrodinamik enjeksiyon basitçe uygulanır ve genellikle kapilere uygun miktarda numune enjekte edilmesini garanti eder. Elektrokinetik enjeksiyon ise, tampon çözelti ile ilişkili olarak numunenin iletkenliği kapilere giren iyonların miktarını etkiler. Eğer kantitatif sonuçlar isteniyorsa bu parametreler dikkatli bir şekilde kontrol edilmelidir (Weinberger, 2000)

CE'de enjeksiyon voltaj kapalıyken yapılır. Enjeksiyondan sonra voltaj çalışma potansiyeline getirilir. Eğer tam voltaj artışı uygulanırsa kapiler içerisindeki tampon ısınır ve genişler. Sıvı genişlemesinin oranı eğer çözünen göç oranından daha fazlaysa, numunenin bir miktarı kapilerin giriş kabına geri boşalabilir. Uygun voltajda çalışmak bu durumun oluşmasını engellemektedir (Weinberger, 2000).

1.4.1. Hidrodinamik enjeksiyon

Hidrodinamik enjeksiyon,

- i) Kapileri numune girişi tarafından yükselterek (Hidrostatik enjeksiyon),
- ii) Numune kabına tek başına basınç uygulanarak (Basınç enjeksiyonu),
- iii) Dedektör tarafındaki tampon kabına vakum uygulanarak (Basınç enjeksiyonu),
- iv) Şırıngayla enjekte ederek ve kapilere giren numune hacmini azaltmak için bir bölücü uygulayarak, dört farklı yolla gerçekleştirilebilir (Weinberger, 2000).

Hidrostatik enjeksiyonda tampon çözelti ve numune kabı arasındaki fark küçük numune hacimlerinin enjekte edilmesine olanak sağlar. Bu şekilde numune çözeltisi ayırma kapilerinin içerisine çekilir. Uygulanan numenin miktarı, yükseklikler arasındaki farka (genellikle 5-10 cm), zamana (5-45 sn) ve elektrolit çözeltisinin hidrodinamik özelliklerine (viskozite, yoğunluk) bağlıdır. Bunun sonucu olarak, numune ve elektrolit çözeltisi arasındaki yoğunluk ve viskozite farklılıkları ihmal edilebilir. Enjekte edilen maddenin miktarı sadece yükseklik farkına ve enjeksiyon süresine bağlıdır (Engelhardt et al., 1996).

Basınç enjeksiyonunda ise numune, numune kabı ve kapiler tüpün diğer ucu arasında basınç farklılıkları uygulanarak enjekte edilir. Bu yöntemle, numune enjeksiyonu, numune kabındaki basıncı arttırarak veya kapilerin diğer ucundaki basıncı vakumlayarak yapılabilir. Enjekte edilen maddenin miktarı sadece basınç farklılığına ve enjeksiyon süresine bağlıdır (Engelhardt et al., 1996).

Genel anlamda, en yaygın olarak, hidrodinamik enjeksiyonda tampon kabı numune kabı ile yer değiştirilir ve daha sonrasında belirli bir yüksekliğe kadar belirli bir zaman için yükseltilir. Bu sayede, numune ve tampon kabı içerisinde bulunan sıvılar arasında yükseklik farkı oluşturulur. Bu yükseklik farkı, hidrostatik bir basınca neden olur ve numunenin kapiler içerisine girmesini sağlar. Çözünen elektroforetik taşınabilirliği veya numune çözeltisinin içeriği CE’de bu tür enjeksiyonu etkilememektedir. Bu teknik vasıtasıyla enjekte edilen çözünmüş miktarı (Q), (1.24) denklemindeki gibi ifade edilir. i-iii enjeksiyon metodlarını kullanarak birim zamanda

(V_t , nL/s) enjekte edilen maddenin hacmi ise Poiseuille eşitliği tarafından belirlenir ve (1.25) denklemindeki gibi gösterilmektedir (Marina et al., 2005).

$$Q = \frac{\Delta P \pi r'^4 C t_i}{8 \eta L}, \quad (1.24)$$

$$v_t = \frac{\Delta P r'^4 \pi t}{128 \eta L} \quad (1.25)$$

Burada;

ΔP = kapiler boyunca basınç farkı

r' = kapiler iç çapı

η = tampon vizkositesi

L = kapiler uzunluğu

t = zaman

dır. Yerçekimi dayanaklı enjeksiyonlardan ise;

$$\Delta P = \rho g \Delta h, \quad (1.26)$$

ρ = numune çözeltisinin yoğunluğu

g = yerçekimi sabiti

Δh = numune kabı ve detektör tarafındaki tampon kaplarında bulunan sıvılar arasındaki fark

tır.

Hidrodinamik enjeksiyon genellikle iç çapı 25- 100 μm arasında olan kapilerler için kullanışlıdır. Daha küçük iç çaplarda, yüksek basınçlı enjeksiyonu, enjeksiyon süresini mümkün olabildiği kadar kısa tutabilmek için kullanılmalıdır. Enjeksiyon basıncı, geniş iç çaplı kapilerler için ise, 1 s üzerinde enjeksiyon süreleri uygulanarak azaltılmalıdır. Çünkü, daha kısa enjeksiyon süreleri doğruluğu kötü yönde etkileyebilmektedir.

Kapilere enjekte edilen madde miktarının kaplar arasındaki yükseklik seviyesini ve enjeksiyon süresini nasıl değiştirilebileceği (1.24) denkleminde ifade edilmektedir. Hidrodinamik enjeksiyon yönteminde, basınç ve vakum ayrıca kullanılır. Bu iki yöntem genellikle ticari CE enstrümanlarında mevcuttur (Weinberger, 2000).

1.4.2. Elektrokinetik enjeksiyon

Bu metotta kapilerin içerisine daldırıldığı numune kabı, güç kaynağına bağlanır ve voltaj uygulanır. Voltaj uygulanmasına bağlı olarak geçen kısa bir zaman dilimi içerisinde numune bileşenleri ayırma kapilerinin içerisine doğru göç ederler. Enjekte edilen maddenin miktarı, uygulanan potansiyelin büyüklüğüne ve voltaj uygulama zamanına bağlıdır (Engelhardt et al., 1996).

Elektrokinetik enjeksiyon, yüksek voltajın uygulanacağı uçta yerleştirilmiş olan tampon kabının, numune içeren bir kapla değiştirilmesini gerektirmektedir. Sonrasında, kısa süre için (genellikle birkaç sn) voltaj uygulanır (genellikle ayırma voltajından 3-5 kat daha az). Bu kısa voltaj uygulaması, numunenin dar bir bandının kapiler içerisine göç etmesine neden olur. Numune kabı tekrar tampon içeren kapla yer değiştirilir. Daha sonra ayırma voltajı uygulanır ve elektroforetik işlem başlamış olur (Marina et al., 2005).

Bu metot basit ve etkilidir. Minimum bant genişlemesine sebebiyet vermektedir. Bununla birlikte; farklı taşınabilirliklere sahip çeşitli numune bileşenleri, en taşınabilir türler daha az taşınabilir olanlardan çok miktarda enjekte edildiğinden dolayı, ayırt edebilir. Elektro göçle enjeksiyon, aynı zamanda numune çözeltisi iletkenliğinden etkilenir. Enjekte edilen numune miktarının doğru hesaplanabilmesi için, numune ve tampon çözeltinin benzer iletkenlik göstermesi gerekmektedir. Elektrokinetik enjeksiyon tekniğiyle enjekte edilen çözünen miktarı (Q), (1.27) denklemindeki gibi ifade edilebilir.

$$Q = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{EOF}) V \pi r^2 C t_i}{L} \quad (1.27)$$

Burada;

r' = kapiler iç çapı

C = analitin derişimi

t_i = enjeksiyon süresi (enjeksiyonu gerçekleştirmek için kullanılan voltajdaki zaman)

L = kapiler uzunluğu

Bir kapiler için, enjekte edilen çözünen miktarının, enjeksiyon süresini ve enjeksiyon sürecinde uygulanan voltajı, nasıl değıştirilebileceğı (1.27) denkleminde gösterilmektedir (Marina et al., 2005).

1.5. CE’de Enjeksiyon ve Çalıştırma

CE’de numune enjeksiyonu yaparak cihazın çalıştırılması için gerekli adımlar aşağıdaki gibidir.

- Kapiler, çalışma tamponunda 1-5 dakika arasında dengeye getirilmelidir.
- Numune kabı kapiler elektrot montaj yerine transfer edilmelidir.
- Numune hızlı bir şekilde hidrodinamik veya elektro kinetik enjeksiyon yöntemi kullanılarak enjekte edilmelidir (1-30 s).
- Aktarmayı ihmal etmek gerekirse kapilerin dış duvarlarını yıkamak için bir merkez oluşturulmalıdır.
- Kapiler elektrot montaj kısmının numune tarafı, çalışma tamponuna döndürülmelidir.
- Hızlı bir şekilde, 15 s’lik bir voltaj rampası kullanarak maksimum voltaj uygulanmalı ve ayırma işleminin ilerlemesine izin verilmelidir
- Eğer gerek görülürse 0,1 N veya 1 N sodyum hidroksit veya fosforik asitle yıkama basamağı işleme konmalıdır.
- Diğer numune için basamak 1’e geri dönülmelidir.

Numene kapilere yüklenir yüklenmez mümkün olduğu kadar hızlı bir şekilde çalıştırma işlemini uygulamak önemlidir. Aksi halde, çözünen difüzyonu, enjeksiyon bölgesini genişletecek ve çözünen iyonları tampon bölgesine nüfuz edecektir. Bunun tam tersi olarak tampon iyonları kapiler içerisine de nüfuz edebilir (Weinberger, 2000).

1.6. Kapilerler

CE için ayırma kapillerleri cam, erimiş silika, teflon gibi farklı materyaller kullanılarak hazırlanmaktadır. Bununla birlikte, erimiş silikalar;

- UV ve görünen yayılımlara karşı mükemmel geçirgen olmaları ve bundan dolayı kapiler üzerinden optik tespit etmeye izin vermeleri,
- imal edilmesi kolay olmaları,
- ucuz olmaları,

gibi özelliklere sahip olduklarından dolayı en çok kullanılan ve uygulanan kapilerlerin başında gelmektedirler.

Kapiler ebatları söz konusu olduğunda, erimiş silika kapilerler ticari olarak 2-200 μm arasında temin edilebilmektedirler. 25-75 μm arasında iç çapa sahip olanlar, özellikle de 50 μm iç çapa sahip olanlar en çok tercih edilen kapilerlerdir. Kapilerin iç çapında meydana gelen düşme, ısının iyi yayılmasına katkıda bulunur. Bu da yüksek voltajlarda çalışılmasına, bunun sonucunda verimliliğin artmasına ve daha kısa sürede analizler yapılmasına imkan sağlamaktadır. Küçük çapta kapilerler kullanmanın dezavantajları ise optik tespit yöntemi kullanıldığı zaman hassaslık kaybı oluşması ve kapilerin tıkanmasıdır.

Kapilerler, uzunluk açısından genellikle 50-100 cm arasında bulunmaktadırlar. Kısa kapilerler analiz süresinde azalmaya sebep olur (Bkz. (1.9) denklemi). Fakat, elektriksel alanda ve akım şiddetinde, kapilerin uzunluğu düşürüldüğü zaman artış olduğundan dolayı, uygulama olarak bir sınır söz konusu olmaktadır.

En uygun kapiler şekli silindirik tüp şeklidir. Bununla birlikte, dikdörtgen, Z şekilli, veya balonlu veya çok yansıtımlı hücreli olanlarda optik tespit hassaslığı arttırabilmek için kullanılmaktadırlar. Ayrıca, T şeklinde kapilerler, bazı belli başlı CE uygulamalarında, voltajda herhangi bir kesinti olmaksızın numune kesri toplanmalarına izin verdiklerinden dolayı kullanılmaktadır (Marina et al., 2005).

CE ile ayırma yöntemine bağlı olarak, kapillerler sadece elektriği ileten çözeltilerle doldurulur veya ilaveten jel veya sabit tabaka içerirler. Çözünenlerin kapillerin iç duvarıyla etkileşimi belirgin bant genişlemesini veya geri dönüşümü olmayan adsorpsiyonu teşvik edebilir. Bu etkileşim kapiler duvarının yapısına ve koşullandırma müdahalesine bağlıdır (Ayrıca EOF'nin yönünü ve büyüklüğünü etkilemektedir). Kısacası, iç duvarın kontrolü birinci derece önem ihtiva etmektedir. Erimiş silika kapillerlerde, kapillerin iç duvarında ve iletken çözeltiyle kontak halinde bulunan silanol gruplarının ayrışması, kapiler iç duvarında negatif yüklenmeye sebep verir. Bu negatif yükler, pozitif yüklü çözünenlerin çekimine ve katoda doğru EOF'nin oluşumuna neden olmaktadır.

Kapiler iç duvarı yükünün değiştirilmesi çözünenlerin adsorpsiyonunu engelleyebilir ve ayrıca EOF'nin yönünü ve büyüklüğünü değiştirebilir. Bu durumda bazı seçenekler mümkün olabilmektedir. Bunlar;

- Düşük pH'da çalışma, silanol gruplarının ayrışmasını önleyerek silika yüzeyinin yüklerini yok eder.
- Elektrostatik itme kuvvetleri varlığında oluşan adsorpsiyonu önlemek için çözünenlerin ve kapiler iç duvarının elektrik yükünün manipulasyonu.
- Dinamik olarak kapiler iç duvarını değiştiren, EOF'yi önleyen veya değiştiren kimyasal reaktiflerin eklenmesi.
- EOF'nin önlenmesi ve değiştirilmesinin yanı sıra, çözünenler ve kapillerin iç duvarındaki etkileşimleri önlemek için kapiler iç duvarının kalıcı olarak kaplanmasıdır (Marina et al., 2005).

1.6.1. Kapiler müdahale yöntemleri

Göç zamanlarının tekrarlanabilirliklerinin ve ayırabilirliğini garanti edebilmek için kapiler iç duvar yüzeyine farklı müdahalelerde bulunulması gerekmektedir. Üç farklı şekilde müdahale söz konusu olmaktadır (Marina et al., 2005).

- Kapilere ilk defa kullanmadan önce ön müdahale
- Çalışmalar arasında kapiler koşullandırma müdahaleleri

- Kullanım sonrası kapiler saklanması için müdahale

1.6.1.1. Kapilere ilk defa kullanmadan önce müdahale

Ön müdahaleler, genellikle kapiler iç duvarının sodyum hidroksitle aktifleştirilmesi ve sonrasında su ve tampon çözeltisiyle yıkanmasını kapsamaktadır. Kapilerlerin ilk kez kullanılmasından önce bu basamağın yapılması erimiş silika kapilerler arasında farklı firmalar tarafından üretim yapılmasından dolayı oluşabilecek değişiklikleri azaltmak için kullanılmaktadır. Kapiler duvarını kararlı hale getirmek için diğer bir yaklaşım ise “voltaj koşullandırması” olarak adlandırılır. Kolonu denge haline getirmek için kısa süre voltaj uygulanır. Diğer benzer bir koşullandırma ise elektro koşullandırma değildir. Bu koşullandırmada ise kapiler analizden önce 1 saat kadar 30 kV’ da çalıştırılır (Marina et al., 2005).

1.6.1.2. Çalışmalar arasında kapiler koşullandırma müdahaleleri

Kapileri her çalışmadan önce yıkamak ayrı bir ihtiyaçtır. Yıkama sistemi ilk çalışma koşullarına geri döndürür. Bu durumda EOF değişkenliği etkisi azaltıldığından dolayı daha az göç süresi hatası oluşacaktır. Yıkama reaktifleri (sodyum hidroksit, su, tampon) genellikle çalışmalar arasında kapilerin koşullandırılabilmesi için uygulanır. Fakat, analiz süresini arttırmamak için kısa yıkama operasyonu tavsiye edilir. Eğer kapiler duvarında adsorbe edilmiş madde varsa (protein içeren numuneler), ek bir sodyum hidroksitle ve/veya 0,1-1M aralığında güçlü asitler veya sodyum dodesil sülfat (SDS) yıkama basamağı ara çalıştırma yıkama basamağı olarak kullanılır (Marina et al., 2005).

1.6.1.3. Kullanım sonrası kapiler saklanması için müdahale

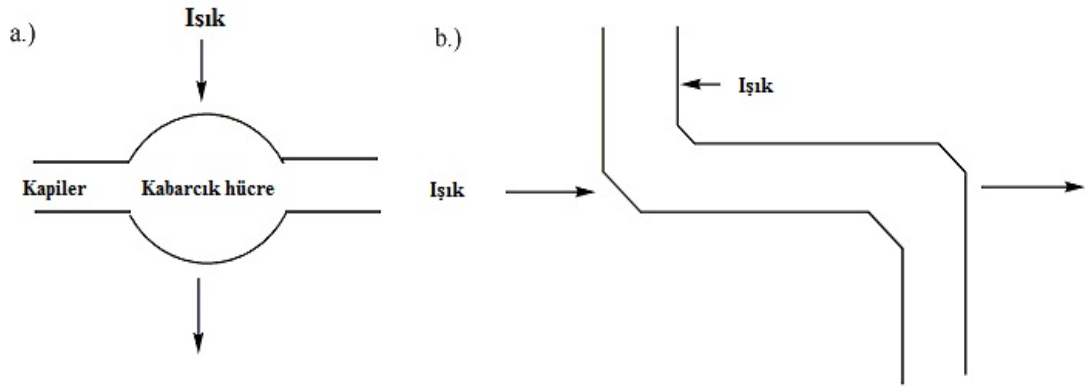
Kullanım sonrası kapilerlerin saklanması için farklı stratejiler önerilmektedir. Bunların bazıları sodyum hidroksitle yıkama, distile edilmiş su ve kapiler boyunca hava geçirilmesi veya metanolla yıkanmasıdır. Genellikle, kaplama kapilerler sodyum hidroksitle yıkamadan zarar görebileceği için üretici tarafından öngörülen tavsiyeler doğrultusunda yıkanmalıdır (Marina et al., 2005).

1.7. CE’de Veri Sonuçlarının Analizi ve Tespiti Etme Yöntemleri

CE’de kullanılan en popüler tespit yöntemi optik tespit yöntemine dayanır. Bu tarz kapilerde tespit etme yöntemi, erimiş silika kapillerlerin mükemmel UV yayılması geçirgenliği sayesinde başarılabilmektedir. Optik tespit yönteminin ana dezavantajı ise CE’nin genellikle 25-75 μm iç çaplarda küçük ebatlarına bağlı olarak sınırlı hassasiyete sahip olmasıdır. Bu küçük ebatlardan dolayı enjekte edilen numune hacmi ve optik yol uzunluğu azalmaktadır ve buna bağlı olarak hassasiyet düşmektedir (Marina et al., 2005). CE’de temel tespit yöntemleri üç kategoriye ayrılmaktadır. Bunlar; optik tespit yöntemleri (UV absorplayıcı ve floresans yöntemi), elektrokimyasal tespit yöntemi ve birleştirilmiş yöntemlerdir (Kütle spektroskopisi-MS gibi) (Li and Wu, 2000).

1.7.1. Optik tespit yöntemleri

Optik tespitte hassaslığı arttırmanın bir yolu geniş iç çapa sahip kapillerler kullanmaktır. Fakat bunun sonucunda pik veriminde kayıp oluştuğundan dolayı bu yol her zaman mümkün olmamaktadır. Diğer bir yolu ise tespit yolunun uzatılmasıdır. Kapiler elektroforezde tespit yapılan hücrenin içerisinde alınan yolun uzunluğu ($\sim 50 \mu\text{m}$) geleneksel bir UV hücresininkinden ($\sim 1 \text{ cm}$) çok daha azdır. Beer Lambert yasasına göre, dedektörün hassaslığı, hücrenin tespit yolunun uzunluğu ile doğru orantılıdır. Hassaslığı arttırabilmek için, tespit yolu uzatılabilmesine rağmen, bu artış ayırcılıkta kayba sebebiyet vermektedir. Sekil 1.19.’da bu durum gösterilmektedir. Kapiler tüp kendi başına tespit noktasından bir kabarcık hücre (buble cell) oluşturularak veya tespit noktasına ek tüp ilave edilerek Şekil 1.19.b’deki gibi daha uzun tespit yolu elde edilmesi için uzatılabilir. Fakat tüm bu metotların uygulanması ayırmanın çözünürlüğünü azaltacaktır (Skoog et al., 2007).



Şekil 1.19. Tespit yolunun artırılması için kullanılan yöntemler (Skoog et al., 2007)
a) bubble cell b) z cell (ilave tüp eklenmesi)

1.7.1.1. UV absorplayıcı optik tespit yöntemleri

CE’de optik tespit çok yaygın olarak UV-Vis absorpsiyon dedektörü kullanılarak başarılmaktadır. Bu dedektörün kullanılmasının sebepleri, basit, düşük maliyete sahip olması, kullanımı kolay olması ve geniş kullanım alanına sahip olmasıdır. Günümüzde genellikle diyot-sıralı (DAD-diode array detectors) dedektörler kullanılmaktadır. Bu dedektörlerin piyasada bulunan UV-Vis dedektörlerine kıyasla avantajı daha saf pik ve bazı yapısal bilgi vermesinden dolayıdır (Li and Wu, 2000).

1.7.1.2. Floresans optik tespit yöntemleri

CE’de optik tespit için diğer yöntemler termo optik tespite ve geleneksel ve lazerli floresans ölçüme dayalı metotlardır. Floresans tespit yönteminin kullanılması UV-Vis tespit yöntemine kıyasla daima hassaslığı arttırmaktadır. Lazer floresans tespit CE’de en hassas tespit yöntemlerinden birisidir. Absorplama yapmayan ve floresans özelliği olmayan analitleri tespit edebilmek için CE’de dolaylı optik tespit yöntemi yapmak mümkün olmaktadır (Marina et al., 2005).

1.7.2. Elektrokimyasal tespit yöntemi

CE’de elektrokimyasal dedektör kullanımının önemi son yıllarda oldukça artmaktadır. Bu tespit yönteminin önemi, elektrot yüzeyindeki reaksiyona ve optik tespite kıyasla, hücre hacimleri hassasiyetinde hiç azalma olmadan tespitlerin

yapılabilmesine bağlıdır. Bu tespit yönteminde çok dar kapillerlerin kullanılması mümkün olabilmektedir.

İletkenlik dedektörleri evrensel tespit dedektörleri olarak göz önünde bulundurulmaktadır. Absorplama yapmayan iyonların tespitinde çok kullanışlıdır ve ayrıca dolaylı bir yöntemde çalışabilirler. CE'nin iletkenlik tespit yöntemi ile birleştirilmesi sonucunda bu tarz dedektörde elde edilen hassasiyet artmaktadır (Marina et al., 2005).

1.7.3. Birleştirilmiş yöntemler

Kütle spektroskopisi (MS), hassaslığına, evrenselliğine, tedarik ettiği yapısal bilgilere bağlı olarak en çok ilgi çeken ve güçlü CE tespit tekniklerinden bir tanesidir. En önemli dezavantajı, yüksek maliyete sahip olmasıdır (Li and Wu, 2000).

1.7.4. CE'de kullanılan diğer tespit yöntemleri

CE'de kullanılan diğer tespit metotları indeks, radyo aktivite, fosferesansa dayalı yeni optik tespit yöntemi, kemilüminisans, titreşim spektroskopisi, (infrared ve Raman) veya NMR (nükleer manyetik rezonans) dır. Bunların çoğu CE tekniklerinin sınırlarını göz önünde bulundurabilmek için ve bu sınırların üstesinden gelebilmek için yoğun araştırma çabaları sonucu ortaya çıkan tekniklerdir. Aslında; yüksek pik verimliliğine, düşük pik hacimlerine ve analitleri incelemek için kullanılan sınırlı zamana rağmen CE'de tespit bir meydan okumadır. Çok farklı karakterlere sahip olan analitlerin ve çok karışık gerçek matrislerin analiz edilebilmesi, nanolitre hacimlere, hatta daha düşük hacimlere kadar olan düşük derişimlerde, bu numunelerin tespitini yapabilecek metotların varlığını gerektirir. Tespit yönteminin seçimi, numunenin özelliklerine, matris içeriğine, talep edilen tespit aralıklarına veya kantitatif verilere ilaveten kalitatif ve yapısal bilgilere bağlıdır (Li and Wu, 2000).

1.8. Kapiler Alan Elektroforez (CZE) ile Küçük İyonların Tespiti

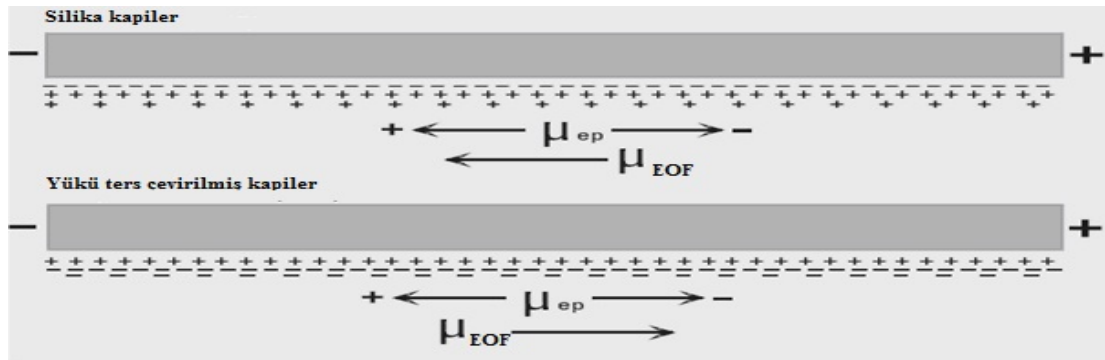
Küçük iyonların ayrıştırılması geleneksel olarak iletkenlik tespit yöntemiyle iyon değiştirme kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilir. Bu teknik iyon kromatografisi (IC) olarak bilinir ve son 20 yılı aşkındır çok başarılı bir şekilde uygulanmaktadır.

Fakat, pahalı ve kısa süreli kolonlara gereksinim duyulması ve taşınabilir tabakanın güçlü asidik ve bazik olması gibi gereksinimlerine teknoloji tam olarak cevap verememektedir. Pik performansının sağlanabilmesi için sürekli pompalama sistemlerine gereksinim duyulmaktadır. Matris etkisi yaygındır ve kapsamlı numune hazırlanmasına gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenlerden dolayı birim analiz fiyatları yüksek olabilmektedir (Weinberger, 2000).

CZE, küçük iyonların ayrıştırılması için uygun bir yöntemdir. Ayırma temeli çeşitli iyonlar arasındaki taşınabilirliklerdeki farklılıklara dayanmaktadır. Bu şekilde iyon kromatografisine kıyasla daha yüksek hızda ayrışmalar yapılabilir. IC ile tespit yapabilmek için gerekli kolon fiyatları 700 dolara kadar mal olmaktadır, CZE'nin erimiş silika kapillerleri sadece birkaç dolar verilerek değiştirilebilmektedir. Birçok CZE metoduna benzer diğer kromatografik yöntemlere göre CZE ile birim analiz fiyatları oldukça azdır (Heiger, 2000).

1.8.1. Küçük iyonların CZE'si

Küçük iyonların hareketi ve EOF'si sistematik olarak Şekil 1.20.'de gösterilmektedir (Heiger, 2000).



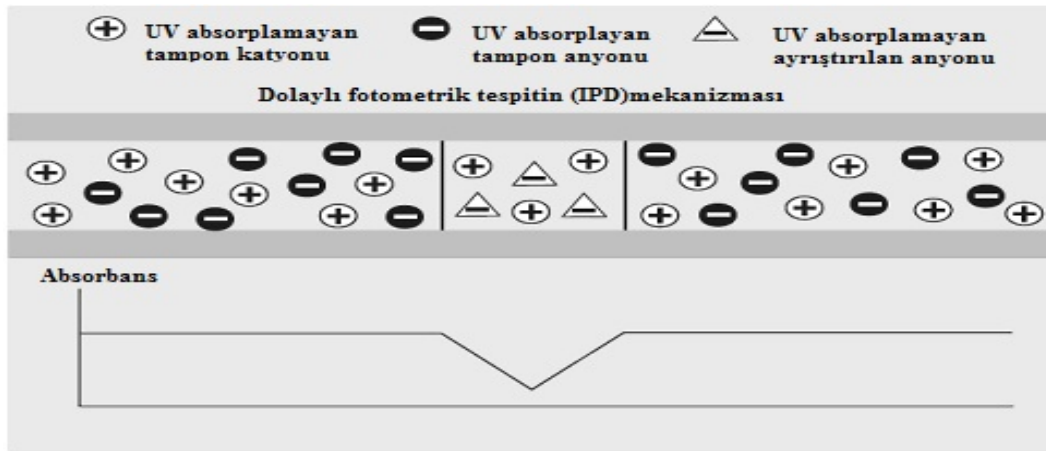
Şekil 1.20. CZE'de iyonların göçü (Heiger, 2000)

Ayrırmanın seçiciliğini ve hızını ayarlayabilmek için EOF'yi sıkça kontrol etmek gerekmektedir. Yüksek hızda ayırmlar gerçekleştirebilmek için hem elektroforez hem de EOF aynı yönde olmalıdır. Bu durum, katyonlar için, katyonlar ve EOF aynı anda, doğal olarak katoda doğru yönlendiklerinden dolayı, otomatik olarak karşılanmaktadır.

Anyonlar için, EOF'yi ters (negatif polarite, numune tarafı negatif) çevirebilmek için bir katkı maddesine gereksinim duyulabilir. Katyonik yüzey aktifleri genellikle bu amaç için kullanılırlar. Yüksek ve düşük taşınabilirlikli anyonları aynı anda gözlemleyebilmek ve tespit edebilmek için EOF ters çevrilmelidir. Aksi taktirde yüksek taşınabilirlikli anyonlar anoda doğru göç ederken, düşük taşınabilirlikli anyonlar katoda doğru sürüklenirler. Benzer taşınabilirlikli anyonları ayırırken, EOF kontrolü, hız ve seçiciliği optimize etmek haricinde gerekli değildir (Weinberger, 2000).

1.8.2. Dolaylı fotometrik tespit yöntemi (IPD)

CZE ile ayırma yönteminde tespit yöntemi problem oluşturmaktadır. Birçok küçük anyon spektrumun ultraviolet (UV) bölgesinde veya görünür bölgesinde absorplama yapmamaktadır. Tespit problemi dolaylı fotometrik tespit yöntemi (IPD) ile çözülmüştür. Bu yöntemin çalışma prensibi Şekil 1.21.'de gösterilmiştir



Şekil 1.21. Dolaylı tespit yöntemi (IPD)'nin çalışma prensibi
(Heiger and Weinberger, 1994)

Bu teknikte ayrımı yapılacak iyon türüyle aynı yüke sahip olan UV absorplayan bir çözünen, çalışma tamponuna (BGE), kimyasal katkı maddesi olarak ilave edilir. Bu kimyasal katkı maddesi, görsellik ayırıcı (VR) veya dolaylı ayıraç olarak bilinir ve elektroferogram zeminini (baseline) yükseltir. Çözünen iyonları elektronötrlük prensibinin gerektirdiği üzere, VR özelliği gösterirler. Ayrılmış iyonlar dedektör penceresine doğru göç edip, dedektör penceresini geçtiklerinde yüksek

elektroferogram zemini çizgisiyle ilişkili olarak negatif pikler olarak ölçülürler. Diyot sıralı dedektörün (DAD), sinyal ve referans dalga boyu değiştirilerek, pozitif bir sinyal elde edilir. DAD'ın spektral kapasitesine bağlı olarak, referans ve sinyal kanalları için en uygun dalga boyunu seçmek basittir. CZE'nin dolaylı fotometrik tespit (IPD) yöntemi ile birleştirilmesi geniş uygulama alanı bulmaktadır ve CZE-IPD yöntemi kromofor içermeyen hemen hemen tüm iyonik analitlerin ayrışımı için uygundur (Heiger and Weinberger, 1994).

1.8.3. CZE-IPD ile küçük iyonların tespiti için çalışma elektrolitinin seçilmesi

CZE-IPD yöntemi genellikle küçük UV absorplamayan iyonların ölçümü ve belirlenmesi için uygulanır. Anyonları ve katyonları ayırabilmek için kullanılan bazı ayırma tarifleri Çizelge 1.9.'da verilmiştir. Çizelge 1.9.'dan da anlaşıldığı üzere verilen uygulama için, çeşitli kullanılabilir elektrolit sistemleri vardır (Weinberger, 2000).

Çizelge 1.9. IPD için çalışma elektrolitleri (Heiger and Weinberger, 1994)

Analiz Edilen Madde	Çalışma Elektoliti
Anyonlar	5 mM kromat, 0,01 mM TTAB
	5 mM kromat, 0,2 mM TTAB, pH=8,2
	20 mM p-amino benzoat, 0,07 mM TTAH, pH= 9,6
	2,25 mM Piromellitik asit, 6,5 mM NaOH 0,75 mM Hekzametonyum hidroksit 1,6 mM Triethanolamin, pH=7,7
Amino asitler	10 mM p-amino salisilik asit, 0,05 mM CTAB, pH=11
	10 mM p-amino salisilik asit, 20 mM α -CD, pH=11
Kreatinler	5 mM piridin, 3,6 mM tartarik asit, 2 mM 18C6, pH=4
Metal katyonlar	8 mM nikotinamid, pH=3,2, %12 MeOH, 0,95 mM 18C6
	5 mM imidazol, 6,75 mM HTAB, pH=4
	5 mM piridin, 3,6 mM tartarik asit, 2 mM 18C6, pH=4
	10 mM metil benzil amin, 15 mM laktat, pH=4,3
	5 mM benzimidazol, tartarik asit, pH= 5,2
	% 0,1 HEC, 40 mM 18C6
	10 mM p-amino piridin, asetik asit, pH=4,5
	5 mM 18C6 veya 10 mM HTBA
	8 mM 4-metilbenzilamin, 15 mM laktat, % 5 metanol, pH=4,25
Organik asitler	5 mM ftalat, 0,25 mM CTAB, pH=7
Fosfonoik asitler, alkil	10 mM fenilfosfonoik asit, 200 mM borat, pH=6
Fosfolipitler	5 mM AMP, 100 mM borik asit, % 10 su, % 80 metanol, % 10 asetonitril
Fitik asit	50 mM Benzoat, pH=6,2, L-His, kaplama kapiler
Potasyum, ilaç zıt iyonu	6 mM imidazol, 4 mM formik asit
Kısa zincirli yağ asitleri	80 mM Tris, 10 mM benzoik asit
Sodyum dodesi sülfat	5 mM dihidroksibenzoik asit, % 5 metanol, pH=8,1
Sülfatlar, alkil	12 mM 5,5-dietil barbiturik asit, pH= 8,6
Pentosan	8,7 mM Benzen-1,2,4-trokarboksilat, pH= 4,9
Fosfatlar, polifosfatlar	5 mM ATP, 0,02 mM CTAB, pH=3,6

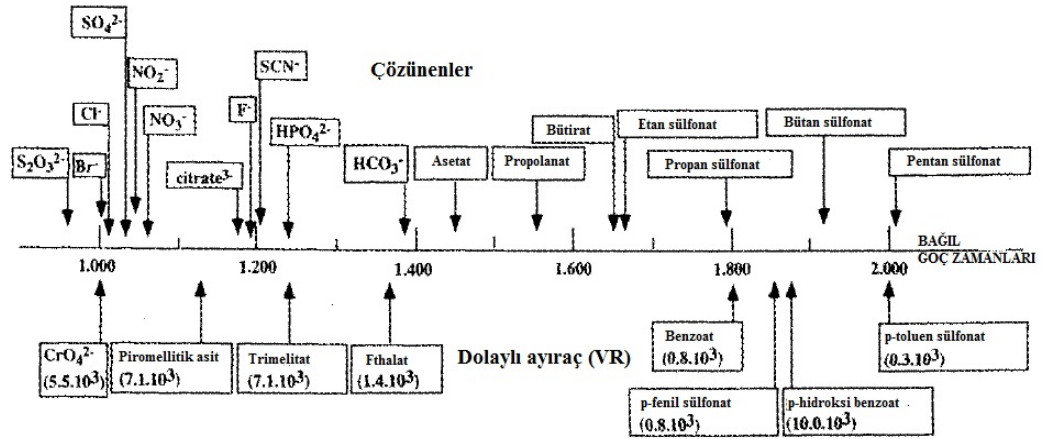
Dolaylı tespit yöntemi prensibine (Şekil 1.21.) göre, aynı yükün UV soğuran ayıracı (ortak iyon olarak) tampon çözeltiye katkı maddesi olarak ilave edilir. Bu ayıracı elektroferogram zeminini yükseltir. Çözünen iyonları var olduğu zaman, elektro nötrlük mantığının gerektirdiği üzere katkı maddesinin yerini alırlar. Ayrılmış anyonlar, dedektör penceresine doğru yol alırken, yükselmiş elektroferogram zeminine ilişkin negatif pikler olarak ölçülürler (Weinberger, 2000).

1.8.4. Dolaylı ayıracı (VR) seçim kriterleri

Dolaylı ayıracı (VR) seçim kriterleri aşağıdaki gibidir:

- Ayıracın molar absorpsiyonu maksimum olmalıdır. Bu, yüksek molar absorpsiyona sahip bir ayıracı seçmek ve maksimum absorpsiyonun dalga boyunda gözlem yapmak demektir. Çözünenin absorpsiyon yapmadığı bir dalga boyu seçmek aynı derecede önemlidir.
- Ayıracı, çözünenin ortak iyonu olmalıdır.
- Genel olarak dolaylı ayıracı (VR) tampon olarak hizmet eder.
- VR çözünenden farklı bir dalga boyunda absorpsiyon yapmalıdır.
- Ayıracı, uygun pH'da iyonlaşmış olmalıdır. Hem ayıracı hem de çözünen yer değiştirmenin meydana gelebilmesi için iyonlaşmalıdır.
- Ayıracın taşınabilirliği, çözüneninkine mümkün olduğu kadar uygun ve yakın olmalıdır. BGE' deki VR değişimi oldukça düşük olmalıdır.

Elektro-dispersiyon probleminin ortaya çıkması muhtemel olduğundan dolayı, hassaslık için ayıracı değişiminin düşük tutulması gerekmektedir. Bu problem özellikle ayırımı yapılan büyük difüzyon katsayısına sahip küçük iyonlar için önemlidir. Şekil 1.22.'de verilen diyagram dolaylı ayıracın seçilmesi için izlenmesi gereken yolu özetlemektedir. Örneğin, yüksek taşınabilirliğe sahip klor, sülfat, nitrat ve nitrit gibi iyonlar, en iyi şekilde kromat veya piromellitik asit tarafından tespit edilebilir.



Şekil 1.22. Taşınabilirlik uyumu temelli dolaylı ayıraç seçimi (Weinberger, 2000)
Dolaylı ayıraçların ve çözünenlerin (anyonlar) pH=8'de bağlı göç zamanları (kromat=1). Parantez içerisindeki numaralar 254 nm'de molar absorpsiyonlar

Organik asitler en iyi ftalat veya benzoat ile tespit edilirken, alkil sülfonatlar en iyi p-toluen sülfonat veya daha düşük taşınabilirlikli naftalin sülfonatla bile tespit edilebilirler (Heiger and Weinberger, 1994; Weinberger, 2000).

Ayıracın taşınabilirliği, çözünenininkine mümkün olduğu kadar uygun ve yakın olmalıdır. BGE'deki VR derişimi oldukça düşük olmalıdır. VR seçim kriterinin sonucu olarak taşınabilirliklerin uyuşması gereksinimi ortaya çıkmaktadır. Ne zaman çözünen derişimi BGE'ninkine yaklaşırsa, bir çeşit bant genişlemesi, yerel elektriksel alan içerisinde çözünenin etkisine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bu olay elektrodispersiyon olarak bilinmektedir (Bkz. Şekil 1.17.). Çözünen iyon taşınabilirliği, elektrolit iyon taşınabilirliğine eşit olduğunda, herhangi bir şekilde elektrodispersiyon'a rastlanmaktadır. Bunun nedeni çözünen ve elektrolit sistemi sınırları boyunca her yerde aynı olan bir elektriksel alan oluşmasıdır.

Bu durum, geleneksel CZE'de çok nadir olarak gözlemlenebilmektedir. Bu eşitlik, çözünen derişiminin, BGE derişiminden oldukça düşük olduğu durumlarda gerçekleşebilmektedir. Elektrodispersiyon etkisinin tamamen yok edilebilmesi için çözünen derişimi, BGE derişiminden 50 kat daha düşük tutulmalıdır ki, bu CZE-IPD yöntemi uygulandığı zaman mümkün olamamaktadır..

Düşük taşınabilirliğe sahip iyonların ölçümü yapılırken, ya düşük taşınabilirlikli VR seçilmelidir ya da tam tersi yapılmalıdır. Elektro-dispersiyon pik alanları kullanılarak yapılan nicel tayinleri etkilememektedir. Fakat bant genişlemesi, eğer, çok yakın göç eden piklerin ayırıcılıkları arasında kendiliğinden değişikliğe neden olurlarsa, problem oluşturabilir (Heiger and Weinberger, 1994).

1.8.5. EOF değiştiriciler

Tespit hassaslığı, hem maksimum molar absorbansa sahip olan hem de çözünen iyon taşınabilirliğiyle en uygun taşınabilirliği gösteren çalışma elektrolitinin seçilmesiyle maksimize edilebilir.

Anyon analizlerinde EOF'nin dedektöre doğru yönlenmesini ve elektrolitin dedektöre doğru sürüklenmesini garanti edebilmek için elektrolite EOF değiştirici (OFM) eklenir. OFM'nin elektrolite eklenmesinin sebebi, normalde katyonik yöne doğru olan EOF'nin yönünü değiştirmektir (Oehrle, 1996). EOF anoda doğru oldukça anyonlar EOF ile aynı yönde hareket ederler. Bu durumda kapiler boyunca hareket eden anyonların net hızı artar ve hızlı bir ayırma işlemi gerçekleşir. Su numunesinde net bir yüke sahip olmayan numuneler EOF ile aynı yönde ve aynı oranla hareket ederler. Yeraltı sularında bulunan; potasyum, sodyum, kalsiyum ve magnezyum gibi katyonlar EOF'ye zıt yönde katoda doğru hareket ederler (Romano and Krol, 1993).

CZE ile anyonları hızlı bir şekilde ayırt edebilmek amacıyla OFM'ler BGE'ye, EOF'yi ters çevirebilmek için eklenir. Bu şekilde EOF, anyonların hareket ettiği yönle aynı yönde hareket eder. Kullanılan katyonik yüzey kaplayıcıları veya OFM çeşitlerinden bazıları: Tetra desili trimetil amonyum bromür TTAB (TTAB içerenler Nice-Pak OFM Anion BT olarak veya CIA-Pak OFM anion BT olarak patentlidir), tetra desili trimetil amonyum hidroksit, dodesil trimetil amonyum bromür (DTAB), setil trimetil amonyum bromür (CTAB), heksametonyum bromür (HMBBr) veya hidroksit (HMOH), deka metonyum bromür dietilen triamin, tri bütül hekzadesil fosfonyum bromür, üçüncü derece aminler (örneğin: trietilamin) ve benziltrimetilamonyum bromürdür (Harakuwe and Haddad, 1999).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Romano vd. (1991), analizi yapılmak istenen analitin, taşınabilirliğine uygun olan çalışma elektrolit seçimi yaparak ayırma optimizasyonunu yapmışlardır. Uyguladıkları tekniğin yararlarını, inorganik anyonlar, organik asitler ve alkil sülfonitler gibi anyonik türlerin, birçok karışık numune matrisi içeriklerinin analizlerini yaparak göstermişlerdir.

Jones ve Jandik (1991), düşük moleküler ağırlıktaki inorganik ve organik anyonların IC'ye göre CE ile analizlerinin, verimlilik ve analiz süreleri açısından belirgin bir gelişme sunduğunu ve ayırmanın seçiciliğinin tahmin edilebileceğini vurgulamışlardır. Ayrıca, makalelerinde yeterli ayırıcılığın, EOF ile çözünen iyonlarının aynı yönde göç ettiği sistemlerde gözlemlendiğini göstermiş ve ayırt edici bir avantaj olduğuna işaret etmişlerdir.

Nair ve Izzo (1993), bromür, klorür, sülfat, nitrit, florür, fosfat ve karbonat gibi inorganik anyonların pik göç sürelerinin, CE yöntemiyle tespitinde derişime bağlı olarak kaydığını göstermişlerdir. Standart ve bilinmeyen numunelerinin miktar tayinleri ve pik belirlemeleri için benzer derişimlerde karşılaştırılmaları gerektiklerinin önemli olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca; bu durumun yüksek derişimlerde florür ve fosfat gibi birçok analit için, bu derişimlerin kapiler boruyu aşırı yüklemesinden dolayı, doğrusallıktan sapmaya sebep olduğunu göstermişlerdir.

Romano ve Krol (1993), patentli EOF değıştirici CIA-Pak OFM Anion BT kullanarak yedi anyon standardının ayırmasını geliştirdikleri metot vasıtasıyla içme sularında, yeraltı kaynak sularında ve atık sularda uygulamışlar ve CE'nin bu sulardaki birincil ve ikincil anyonik kirleticilerin analizlerindeki kabiliyetlerini göstermişlerdir. Ayrıca; analiz işlemini 5 dakikadan daha kısa bir sürede tamamlamışlar ve toplanan verilerin IC ile mükemmel bir korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir.

Li ve Li (1994), EOF'nin yönünü değıştirmeksizin, dedektöre zıt yönde, sadece güç kaynağının polaritesini pozitiften negatife çevirerek, 12 tane anyonun (tiyosülfat,

bromür, klorür, sülfat, nitrit, nitrat, molibdat, sitrat, florür, fosfat, karbonat ve asetat) enjeksiyonu yaparak tespit etmek istemişler; fakat sadece ilk sekizini 24 dakikada ayırıştırabilmişlerdir. Bu durumu EOF ile zıt yönde hareket eden anyonların elektroforetik akışlarının EOF'ye zıt yönde ve yavaş olmalarıyla ilişkilendirmişlerdir. Ayrıca, ayırımı hızlandırmak için BGE'ye, CTAB OFM'sinden farklı derişimlerde ekleyerek, ayırımı CTAB derişimine bağılı olarak daha kısa sürede, hatta 12 anyonun 4 dakikadan daha kısa sürede, anyonların elektroforetik hareketliliklerinin ve EOF'nin yönünün aynı yönde olmasına bağılı olarak, ayırıştırılabilmişlerdir.

Rhemrev-Boom (1994), Fluka Chemie AG'den temin edilen elektrolit çözeltisini, en yaygın inorganik anyonların (florür, klorür, bromür, sülfat, nitrat, nitrit, tiyosülfat ve fosfat) tespitinde kullanarak tasdiklemiş ve diğere temin edilebilen ve laboratuvar yapımı pH'ı 8'e ayarlanmış elektrolit çözeltisini, CE cihazıyla CZE-IPD yöntemi kullanarak incelemiş ve kıyaslamıştır. Sonuç olarak, elektrolit çözeltisi sisteminin tiyosülfat, bromür, klorür, sülfat, nitrit ve nitrat gibi hızlı göç eden anyonların tayininde uygun olduğı gösterilmiştir. Bu çalışmada en iyi doğrusalılık 1-10 mg/L arasındaki derişimlerde gözlemlenmiştir. Ayrıca, Fluka elektrolit tamponu kullanıldığında 8 anyon için göç sürelerinin yeteri kadar tekrar edilebilir ve tekrar üretilebilir gözüktüğü belirtilmiştir. Laboratuvar yapımı çalışma elektroliti tamponu ile tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik açısından kıyaslama yapıldığında ise, laboratuvar yapımı tamponunun, florür ve fosfat haricinde, diğere anyonların, göç süresi, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik değerleri açısından belirgin bir şekilde kötü olduğı gösterilmiştir. Bu durumun, kullanılan entegrasyon programının, negatif pikler için elektroferogram zemini çiziminde zorlanılmasından ve bunun sonucunda pik entegrasyonun elle yapılmak zorunda kalınmasından kaynaklandığı açıklanmıştır. Diğere bir deyişle, pik yükseklikleri kıyaslanabilir sonuçlar, florür ve fosfat hariç diğere anyon pikleri için alınabilmiş ve laboratuvar yapımı tampon kullanılarak yapılan tayinlerde florür ve fosfat için daha iyi pikler elde edilebilmiştir.

Oehrle (1996), 254 nm dalga boyunda kromat çalışma elektrolitine, patentli OFM madde (CIA-Pak OFM anyon) ekleyerek ve negatif polarite uygulayarak çeşitli içme suları numunelerindeki anyonları CE kullanarak tespit etmiştir. CE için kullanılan teknikle yapılan anyon analizinin 5 dakikadan daha kısa bir sürede hızlı bir sürede

gerçekleştirdiği gösterilmiş ve IC ile bu sürenin 22 dakika sürdüğü gösterilmiştir. Ayrıca, CE ve IC’de kullanılan tekniklerle tespiti yapılan anyon miktarlarının iyi korelasyon gösterdiği belirtilmiştir.

François vd. (1996), 260 nm dalga boyunda dolaylı UV tespit yöntemiyle CE sistemi kullanarak temel inorganik anyonların (bromür, karbonat, klorat, klorür, florür, nitrat, nitrit, sülfat, fosfat) ayrıştırmasını başarmıştır. Çeşitli türlerde katyonik yüzey aktifleri, dikromattan hazırlanmış kromat tabanlı tampon çözeltisine eklenerek OFM olarak test edilmiştir. Katyonik yüzey aktifinin, doğası ve derişimi, tampon pH’ı, katyonik yüzey aktifinin dikromat derişimi, analit anyonun göç süresine değişken olan voltaj ve sıcaklık pik verimliliği, simetri faktörü ve ayırıcılık parametreleri araştırılmıştır.

Zemann (1997), polikasyonik bir yüzey aktifi olan Hekza dimetirin bromür (HDB) elektrolit çözeltisine ekleyerek, kapillerin iç kısmının kaplanmasını sağlamış ve bu şekilde anoda doğru hızlı bir EOF oluşturmuştur. Bunun sonucu olarak karbonatlar, karboksilik asitler, fenolik bileşiklerin CE ile 1 dakikadan daha kısa bir sürede ayrıştırılması gerçekleştirilmiştir.

Arce vd. (1997), CE ile ortaklaşa çalışabilen bir akış enjeksiyon sistemi geliştirmişler ve bu sisteminin numune hazırlama yeteneğini, CE tarafından yapılan ayırma ve tayinlerle test etmişlerdir. Böyle bir bütünleşmiş sistemin ne kadar yararlı olduğunu gösterebilmek için su saflaştırma fabrikalarında, hem anyonların hem de katyonik türlerin, çok parametrelili gözlemlerini yapabilen otomatik metotlar geliştirmişler ve bu şekilde düzenli olarak suyun kalite kontrolünün, devamlı yapılabileceğini göstermişlerdir.

Yağmur sularının ihtiva ettiği klorür, nitrat ve sülfat anyonlarının tespiti CE tekniği kullanılarak rutin bir metot geliştirilerek yapılmış ve sonuçların incelenmesinde IC yöntemi referans olarak CE ile kıyaslanmıştır. Sonuç olarak, IC yönteminin, özellikle dinamik aralıkta ve doğrulukta anyon analizi için daha güvenilebilir bir teknik olduğu sonucuna varılmış; fakat, CE tekniğinin daha ucuz bir teknik olmasının yanında, yüzey sularından alınan numuneleri çok küçük numune miktarları ile

hazırlanmasının sonucu olarak; bazı fosfat ve organik asit fosfat bileşenleri içeren anyonların tespitine izin veren farklı bir seçicilik mekanizmasının olduğu sonucuna varılmıştır (Valsecchl et al., 1997).

Mineral suları, çeşme suları ve nehir sularından alınan numuneler, lityum iç standart olarak kullanılarak, bu suların içerdikleri anyonlar ve katyonlar incelenmiştir. İncelemeler için IC ve CE yöntemleri kullanılmış ve her iki yöntemle de elde edilen sonuçların kıyaslaması sonucunda, CE'nin bir kez uygulama sonucunda, yaygın inorganik anyon ve katyonları tespit edebilme olasılığı sunduğu gözlemlenmiştir. Önerilen sistemin doğal su numuneleri için basit, hızlı ve yeteri kadar duyarlı ve doğru sonuçlar verdiği sonucuna varılmıştır (Padaruskas et al., 1998).

Kullanılan numunelerdeki metal katyonları EDTA ile şelatlaştırılarak ve anyon ayrıştırma metodu kullanılarak birbirinden ayrıştırılmıştır. Böylece on dokuz yaygın anyonun ve katyonun CE ile ayrıştırılması, 6 dakikada hazırlanan elektrolit vasıtasıyla, pH=8 düzeylerinde ayrıştırılması başarılmıştır. Kullanılan bu metod vasıtasıyla çeşitli su numunelerindeki anyon ve katyonların analizi gösterilmiştir (Kuban et al., 1999).

Hiissa vd. (1999), Fluka tampon çözeltisi kullanarak CE ile uyguladıkları kapiler koşullandırması yardımıyla; bromür, klorür, sülfat, nitrit, nitrat, florür ve dihidrojen fosfatı, standart çözeltiden pH=7,7'de 20 dak. içinde ayırmayı başarmışlardır. Kullanmış oldukları metod vasıtasıyla klorür, sülfat ve nitrat tayinini, tespit edilebilirlik sınırlarında oldukları takdirde doğal sulardan ve belirli miktarda numune seyreltmesine enjeksiyon süresinde değişikliklere giderek ayırt edebilmişlerdir. Ölçüm sonuçlarının doğrusallık değerleri, regresyon analizi yapılarak gösterilmiş ve bromür, klorür, sülfat, nitrit ve nitrat için korelasyon katsayılarının 0,997- 0,999 arasında olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada CE metodunun bahsi geçen anyonların tespitinde uygun olduğu, düşük iyonik güçte yeraltı sularında iyon tespitinin başarılı olduğu rapor edilmiştir.

Fukushi vd. (1999), içme, mineral, yeryüzü, yeraltı, deniz sularında ve yağmur, kar ve atık su numunelerindeki inorganik anyonların tayininde hassaslık ve matris

müdahalesindeki gelişmeleri kısaca gözden geçirmişlerdir. Çevresel numunelerdeki inorganik anyonların tespitinde ve tayininde CE'nin geniş bir uygulama alanında kullanıldığını rapor etmişler ve CE tekniğiyle birlikte hassas ve element seçici tespit tekniklerinin ve ön derişim prosedürlerinin kullanılmasının uygun olacağını ve yakın gelecekteki gelişmelerde yer alabileceğini rapor etmişlerdir.

Soga ve Ross (1999), PDC çalışma elektroliti kullanarak, hem inorganik anyonların CE ile dolaylı tespitine imkan sağlamışlar hem de katyonları negatif yüklü kompleksleri haline getirmişlerdir. OFM olarak ise CTAB kullanmışlardır. Bu şekilde, 15 dakikadan daha kısa bir sürede anyonları ve metal katyonlarını aynı anda CE ile ayırtırmayı başarmışlardır. Sonuç olarak, önerilen metodun birçok uygulama alanında anyon ve metal katyon analizlerinin de yararlı olacağına işaret etmişlerdir.

Jones ve Jandik (1991)'in CE ile ayırmanın seçiciliğini kontrol eden faktörleri araştırdıkları bilinmektedir. İnorganik anyon analizinde tespit edilebilen madde miktarını otuza çıkararak 2 dakikadan daha kısa bir sürede bu anyonları tespit etmeyi başarmışlardır (Doble and Haddad, 1999).

Harakuwe ve Haddad (1999), inorganik anyonların ayırtırılmasında, seçicilikte meydana gelen etkilerin analitin kimyasal çevresinden (pH, yüzey kaplayıcı içeriği, BGE, OFM ve kompleksleştirici türlerin varlığı) fiziksel etkilerden (ayırma koşulları, numuneleme şekli gibi.) kaynaklananlardan daha önemli olduğunu göstermişlerdir.

Öztekin ve Erim (2001) inorganik anyonlar ve organik asitlerin CE ile aynı anda tespit edebilmesi için hızlı, kolay ve tekrar üretilebilir bir metot geliştirmişlerdir. Çalışmalarında, OFM katkı maddesi kullanmadan, katyonik kapiler tüp iç duvar kaplayıcı polimer poli etilen amin (PEI) vasıtasıyla EOF'yi ters çevirerek, 7 dakika içinde inorganik anyonların ve organik asitlerin ayırımın gerçekleştirmişler ve bu metodu, 1:40 seyreltilmiş ve yerel marketten temin edilmiş şarap numunelerinde ayırım yapmak için uygulamışlardır. Sonuç olarak, PEI kaplama kolonların EOF'yi değiştirdiğini ve inorganik ve organik anyonların CE ile ayırtırılmasında diğer yüzey aktifleri kullanımına alternatif olarak kullanılabileceklerini rapor etmişlerdir.

Ehmann vd. (2003), inorganik ve organik asitlerin belirlenmesinde, ticari olarak elde edilebilen piromellitik asit (PMA) elektrolit tampon çözeltisi bileşenlerini değişikliğe uğratarak alternatif yeni bir PMA elektrolit sistemi önermişlerdir. Ayrıca, ticari ve önerilen PMA çalışma elektroliti sistemlerinin kalibrasyon eğrileri, göç süreleri, tekrar üretilebilirlikleri gibi bazı parametrelerini istatistiksel olarak ANOVA testi kullanılarak incelemişlerdir.

Kocatürk vd. (2003), basit bir kapiler elektroforetik ayırma yöntemi geliştirerek, deniz suyundan, bromür iyonunu, NaCl içeren çalışma elektroliti kullanarak 2 dakika gibi hızlı bir sürede ayrıştırmayı başarmışlardır. Geliştirdikleri metodu, Bağaziçi ve Karadeniz sularında 0-72 m arasında değişen derinliklerde bromür iyonu tespiti için uygulamış ve ortalama olarak % 3 BSS elde etmişlerdir.

Diress ve Lucy (2004), ortamda OFM olarak CTAB veya DDAB mevcutken hacimce % 30'a kadar metanol (MeOH) kullanarak EOF'nin kontrol edilebileceğini göstermişler ve bu durumu CE ile ortamda % 50'ye kadar MeOH mevcutken gerçekleştirebilmişlerdir. Böylece küçük anyonlar için hızlı ana hat ayrışmaları ve seçicilik değişkenlikleri gözlemlenmiştir.

Takayanagi vd. (2006), bromat iyonunun CZE-IPD ile tayini için yüksek derecede hassas bir metot geliştirmişler ve hassaslığı korumak için elektrokinetik enjeksiyon yöntemi uygulamışlardır. Bromat için buldukları tespit sınırı $0,1 \mu\text{g/L BrO}_3^-$ olduğundan dolayı borat iyonu çeşme ve ırmak sularında başlangıçta tespit edilemezken; matris etkisi numune çözeltisinin seyreltilmesiyle ortadan kaldırılmış ve numuneye borat takviyesi yapılarak, bromat iyonu sinyali matris iyonlarına kıyasla genişletilmiştir. Sonuç olarak, borat iyonu 10-16 kez seyreltmeyle geri kazanılmış ve önerilen sistem, içme sularında $\mu\text{g/L}$ seviyesinde analiz yapabilmeye olanak sağlamıştır.

Blanco-Heras vd. (2007), geliştirdikleri piromellitik asit (PMA) elektrolitinin, gerçek numunelerde inorganik ve organik anyonların tespiti için yapılan rutin analizlerde çalışma elektroliti olarak kullanılabileceğini, uygulamış oldukları seçicilik ve sağlamlık testleriyle göstermişlerdir.

Garcia vd. (2008), klorür, nitrat, sülfat, florür ve fosfat gibi inorganik anyonların tayininde kullanılmak üzere bir metot geliştirmişler ve bu metodun optimizasyonunu ve geçerliliğini göstermişlerdir. Çalışmalarında CTAB'yi EOF değiştirici olarak kullanıp, dolaylı UV tespit metodu için görsellik ayırıcı olarak da kromat kullanmışlardır. Oluşturdukları kalibrasyon eğrileriyle analizini yaptıkları iyonlar için ng/nL'yi bile tespit edebilecek hassaslıkta tespit sınırları rapor etmişlerdir.

Pascali vd. (2009), CZE yöntemi esasına dayanarak, yüksek viskoziteye sahip çalışma elektroliti tamponu ve 10 cm kadar kısa bir kapiler kullanarak, direkt UV tespiti yöntemi ile serum numunelerinden bromürü kısa bir sürede ayıştırmayı başarmışlardır. Geliştirdikleri yöntemi klinik testlere ve adli zehirli analizlerde kullanmayı amaçlamışlardır.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler

3.1.1. Kullanılan cihazlar

- Kapiler elektroforez (Hewlett Packard Agilent 3D-CE, UV diyot sıralı dedektörlü, bilgisayar kontrollü, 3D CE Chemstation, Rev A.10.01(1635) yazılımı yüklü)
- Bilgisayar (Microsoft Windows® işletim sistemi ve Microsoft Office® 2000 yazılımı yüklü)
- Otomatik pipet (100–1000 µL)

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

- HPCE kalitesinde $\text{pH}=7,7 \pm 0,2$ tampon çözeltisi (Fluka)
- 100 ppm (0,1 g/L) HPCE kalitesinde multielement anyon standart çözeltisi (Fluka)
- HPCE kalitesinde 0,1 M NaOH çözeltisi (Fluka, temiz oda koşullarında hazırlanmış ve 0,2 µm membran filtreyle filtrelenmiş.)
- HPCE kalitesinde saf su (Fluka, temiz oda koşullarında hazırlanmış ve 0,2 µm membran filtreyle filtrelenmiş.)

3.1.3. Kullanılan cam malzemeler ve diğer sarf malzemeleri

- Eritilmiş silika kapiler (40 cm etkin uzunluk, 48,5 cm toplam uzunluk, 50 µm iç çap)
- Kapiler elektroforez viali (Agilent)
- Balon joje (25-100mL, semlab ®)
- Beher (5–250 mL, semlab®)
- Otomatik pipet ucu (100–1000 µL)

3.1.4. Analizi yapılan su numuneleri

Tez çalışmalarında; üzerinde anyon analizi yapılan su numuneleri, Isparta ve yöresinde bulunan ve içme suyu niteliği taşıyan, aşağıda belirtilen 5 yerden alınmıştır. Bunlar;

- Gölcük gölü (Volkanik göl)
- Eğirdir gölü
- Karbuz çeşmesi
- Ev çeşmesi
- Ayazmana Mesireliği (yeraltı kaynak suyu)
- Pir Mehmet Efendi Çeşmesi (yeraltı kaynak suyu)

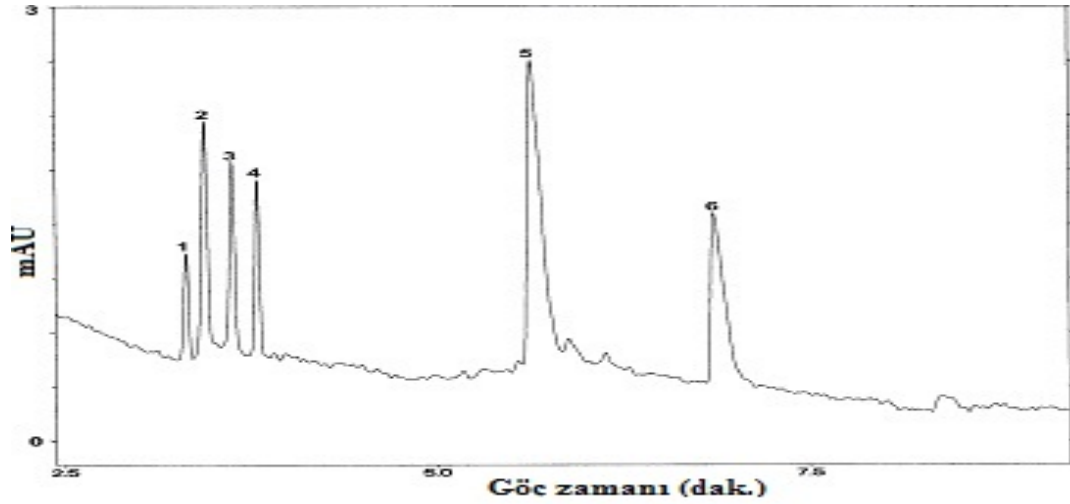
dir.

3.2. Deney için Gerekli Hazırlıklar

3.2.1. Kullanılan standart çözeltisinin saflığının araştırılması

Bu çalışmada kullanılan çok anyonlu HPCE standart çözeltisi Fluka firmasından temin edilmiştir. CZE yöntemiyle CE’de anyonların analizinde kullanılmaktadır. Yüksek saflıkta tuzlar ve su kullanılarak hazırlanmış ve 0,2 µm membran filtre kullanılarak filtre edilerek, CE analitik ölçülerinde ve kalitesinde üretilmiştir. Ayrıca, Fluka firması tarafından sertifikalıdır.

Çok anyonlu standart çözeltisi, bromür, klorür, florür, nitrat, fosfat ve sülfat iyonlarının her birinden ayrı ayrı 100 ppm (0,1 g/L) ihtiva etmektedir ve yoğunluğu 20°C de 1,00 g/mL’dir. Tipik olarak, bu çözeltinin, 1-10 ppm arasında arzu edilen konsantrasyonlarda HPCE kalitesinde saf su ile seyreltilebileceği, kapiler test çözeltisi pik belirleme ve miktar analizlerinde, yaklaşık 0,5 mg/L tespit sınırına sahip olarak kullanılabilmesi, Fluka’dan standartla birlikte tedarik edilen uygulama notlarında yer almaktadır. Fluka standart çözeltisinin CE ile analiz sonuçları ve anyon ayırıştırma sırası Şekil 3.1.’deki gibidir.



Şekil 3.1. Fluka anyon standartı, anyon ayırıştırma analiz elektroferogramı (Rhemrev-Boom, 1994)

(1) Bromür, (2) Klorür, (3) Sülfat, (4) Nitrat, (5) Florür, (6) Fosfat, her biri 6 mg/l (6 ppm) konsantrasyondadır.

3.2.2. Çalışma elektrolitin araştırılması ve seçilmesi

Tez çalışmalarında, pH=7,7 tampon çözeltisi (Fluka, HPCE kalitesinde), çalışma elektroliti olarak kullanılmıştır. Birbirinden farklı kapiler koşullandırması ve farklı çalışma uygulamaları ve metotları içermesine rağmen; bu çalışma elektrolit sistemi, dolaylı fotometrik UV tespit yöntemi kullanılarak çeşitli çalışmalarda inorganik anyon ayırıştırma elektrolit sistemi olarak kullanılmıştır (Rhemrev-Boom, 1994; François et al., 1996; Doble and Haddad, 1999; Hiissaa et al., 1999).

Bu elektrolit, “anyonlar için piromellitik asit elektrolit tamponu” olarak veya sodyum piromellitik tampon çözeltisi olarak da bilinmektedir. Sertifikalıdır ve Fluka tarafından temiz oda koşullarında hazırlanmış ve 0,2 µm membran filtreyle filtrelenmiştir. İnorganik ve düşük ağırlığa sahip organik anyonların tespitinde kullanılmaktadır.

Fluka tampon çözeltisi 0,75 mM hekzametonyum hidroksit, 6,5 mM NaOH, 2,25 mM piromellitik asit ve 1,60 mM triethanolamin içermektedir. Hekzametonyum hidroksit, EOF değiştirici ve piromellitik asit UV kromofor madde olarak elektrolit sistemde yer almaktadır. Elektrolit pH'ı $7,7 \pm 0,2$ (25°C) dır ve 200 ile 800 nm

arasında UV absorpsiyonu yapmaktadır. Kullanıma hazır olup herhangi bir şekilde seyreltmeye gerek yoktur (Rhemrev-Boom, 1994).

Çalışma elektrolit çözeltisi seçiminde Bölüm 1.8.3. ve 1.8.4.'den yararlanılmıştır (Bkz. Çizelge 1.9. ve Şekil 1.22.).

3.2.3. Kullanılacak standart numunesi çözeltilerinin hazırlanması

Üç ayrı 25 mL'lik balon jojeye 10 mL kadar HPCE kalitesinde saf su ilave edildikten sonra, 100 ppm çok anyonlu standart çözeltisinden sırasıyla 0,5, 1,25 ve 2,5 mL otomatik pipetle eklenmiştir. Üzerlerine HPCE kalitesinde su eklenerek, çözeltiler 25 mL'ye tamamlanmıştır. Böylece sırasıyla 2, 5 ve 10 ppm'lik 3 ayrı çok anyonlu standart çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çok anyonlu standart çözeltileri kalibrasyon ölçümlerini belirlemek üzere CE'de ölçümlere hazır hale getirilmiştir.

3.3. Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi

3.3.1. Kapilerin kullanıma hazırlanması ve şartlandırılması

Analiz süresini kısa tutabilmek amacıyla toplam uzunluk 48,5 cm ve etkin uzunluk 40 cm seçilmiş ve 50 µm iç çaplı eritilmiş silika kapiler kullanılmıştır.

Kapiler, kasete uygun bir şekilde yerleştirildikten sonra 5 dakika HPCE kalitesindeki saf sudan geçirilerek yıkanmış ve arkasından 30 dakika 0,1M HPCE kalitesindeki NaOH'dan geçirilerek şartlandırılmıştır.

Her gün başlangıcında kapiler 15 dakika 0,1 M HPCE kalitesinde NaOH'dan ve 20 dakika tampon çözeltiden geçirilerek şartlandırılmıştır.

Her bir enjeksiyon arasında kapiler, 15 dakika 0,1 M HPCE kalitesinde NaOH, 2 dakika HPCE kalitesinde saf su ve 15 dakika tampon çözeltisinden geçirilmiştir. Bu şekilde her bir enjeksiyon için daha tutarlı göç süreleri elde edilmiş ve daha düzgün elektroferogram zeminleri (baseline) elde edilmiştir.

Gün sonunda ise kapiler 0,1 M HPCE kalitesinde NaOH'dan 5 dakika geçirilmiş ve diğer gün kullanmak üzere tampon çözeltide saklanmıştır.

Analizlere ara verildiği zamanlarda ise kapiler, 0,1 M HPCE kalitesindeki NaOH'den 5 dakika, HPCE kalitesindeki saf sudan 2 dakika ve arkasından kapilerden 2 dakika hava geçirilerek kurutulmuş ve kasetinde saklanmıştır.

3.3.2. Numunenin cihaza verilmesi

Numuneler CE'nin viallerine koyularak cihaza yerleştirilmiştir. Kullanılan tampon çözeltilerinin giriş ve çıkış viallerinde yer alan tampon seviyeleri farkının aynı olup olmadığı kontrol edildikten sonra, kapiler şartlandırılması yapılmıştır. Arkasından, 10 saniye süreyle, 50 mbar basınçla hidrodinamik enjeksiyonla numune enjeksiyonu yapılmıştır. Daha sonra, kapiler uçları çalışma elektrolit tamponuna daldırılarak, çalışma sıcaklığı olarak kabul edilen 25°C'de -30 kV negatif polarite voltaj verilerek elektroforez başlatılmıştır. Negatif polarite uygulanarak numune enjeksiyonun katottan yapılması sağlanmış ve iyonların elektroforetik hareketliliğinin yönünün anoda doğru ters çevrilmesi sağlanmıştır.

Diyot sıralanmış dedektör (DAD)'le 245 nm UV referans sinyalde 350 nm dönüştürülmüş sinyal kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Negatif pikleri pozitifte çevirebilmek ve pik alanlarını pozitifte çevirip CE cihazına bağlı olan bilgisayarda bulunan Agilent CE 3D Chemstation programıyla daha kolay hesaplayabilmek için dönüştürülmüş sinyal yöntemi kullanılmıştır.

3.3.3. Uygulanacak CE yönteminin seçilmesi

CZE yöntemi, inorganik anyonların ayrıştırılmasında hızlı ve yüksek ayırıcılığa sahip bir metot olmasından dolayı, CE yöntemi olarak kullanılmıştır. Bu yöntemde, iyonlar elektrik alan içerisinde bağlı iyonik taşınabilirliklerine göre ayrıştırılırlar. Ayrıca, CZE yöntemi dolaylı tespit yöntemi (IPD) ile birlikte kullanılarak, optik olarak absorbans olmayan veya UV absorplamayan bileşikler içinde kullanılabilir. Bundan dolayı kapiler alan elektroforez kullanılarak dolaylı fotometrik tespit yöntemi (CZE-IPD) kullanılması, tez çalışmalarında, anyonların ayrıştırılmasında kullanılmak üzere uygun CE yöntemi olarak seçilmiştir.

3.3.4. Kalibrasyon eğrilerinin hazırlanması

100 ppm Fluka tampon stok standart çözeltisi, 2, 5 ve 10 µg/mL derişimlerinde, çoklu anyon çözeltisi standart analiz çözeltilerine, HPCE kalitesinde saf su kullanılarak seyreltilmiştir. Bu çözeltilerin her biri ikişer kez enjekte edilmiş ve elde edilen pik alanlarının ortalama değeri alınmış ve her bir derişim için ortalama pik alanı değeri alınarak çoklu anyon çözeltisi içerisinde bulunun altı anyondan (bromür, klorür, sülfat, nitrat, florür, fosfat) her biri için ayrı ayrı kalibrasyon eğrileri türetilmiştir.

3.3.5. Elektroferogram verilerinin değerlendirilmesi ve karşılaştırılması

Elektroferogramdan elde edilen pik alanları ve göç süreleri analiz yapılan CE cihazına bağlı bulunan bilgisayarda bulunan Agilent 3D-CE Chemstation, Rev A.10.01(1635) yazılımı yardımıyla hesaplanmıştır.

Kalibrasyon eğrilerinin hazırlanması sırasında elde edilen, her bir hazırlanan çok anyonlu standart çözelti derişim değeri ve bu değerler için elektroferogramdan elde edilen pik alanları ortalamaları Microsoft Office Excel ® 2003 programına aktararak, doğrusal regresyon analizi yapılmış ve kalibrasyon eğrileri ve eğri denklemleri elde edilmiş, ve korelasyon (r) ve tanımlayıcılık (R veya R²) katsayıları hesaplanmıştır. Ayrıca bu denklemler vasıtasıyla su kaynaklarından alınan, anyon içeriği derişimi bilinmeyen numunelerin, ihtiva ettikleri anyon miktarı tayinleri yapılmıştır.

Doğru denklemleri ve basit matematiksel istatistik hesaplamalar (ortalama $\bar{x}$, standard sapma (SS), bağıl standart sapma (BSS)) yapılırken Microsoft Ofis Excel® programından faydalanılmıştır.

Tez çalışmaları sonucunda, referans anyon grubu numune derişimleri ve diğer anyon grubu numuneleri arasındaki numune derişim ölçüm sonuçları arasında fark olup olmadığı; anlamlılık kıyaslama testi, tek yönlü ANOVA (One Way ANOVA) testi kullanılarak gösterilmiştir. Tek yönlü ANOVA testi için gerekli olan karışık istatistiksel hesaplamalar için SPSS® (11.5) programı kullanılmıştır.

ANOVA testi uygulamasında, sıfır hipotezi (H_0) ve alternatif hipotez (H_1) kurulması ve test sonuçlarında karar verilmesi için gerekli olan aşamalar ve diğer parametreler Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

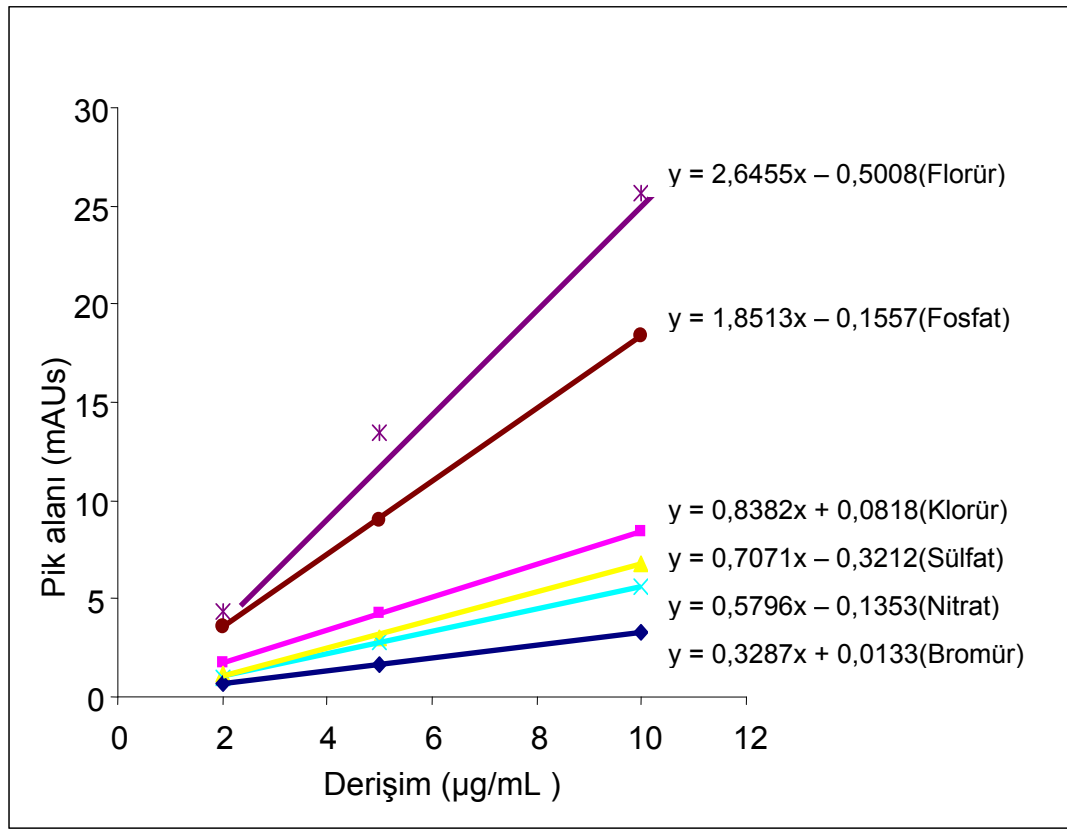
Çizelge 3.1. Tek yönlü ANOVA testi için hipotez oluşturma ve karar verme aşamalarının gösterimi

HİPOTEZ	
H_0	Anyon derişimleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktur.
H_1	Anyon derişimleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark vardır.
α	$\alpha=0.05$ yanılma düzeyi seçilmiştir.
KARAR	
$p_H>0,05$	Anyon derişimleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktur.
$p_H<0,05$	Anyon derişimleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark vardır.
$p_H<0,01$	Anyon derişimleri ortalamaları arasında çok anlamlı bir fark vardır.
$p_H<0,001$	Anyon derişimleri ortalamaları arasında ileri düzeyde anlamlı bir fark vardır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kalibrasyon Bulguları

Bilinmeyen numunenin madde miktarını elektroferogramlar vasıtasıyla hesaplayabilmek için 2, 5 ve 10 µg/mL standart çoklu anyon analizlerinin CZE-IPD yöntemi vasıtasıyla elde edilen pik alanlarına karşılık gelen kalibrasyon eğrileri çizilmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Bromür, klorür, sülfat, nitrat, florür, fosfatın kalibrasyon eğrileri

2–10 µg/mL derişim aralığında çalışılmış ve her bir anyon için 6 farklı kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrileri için ortalama denklemler ($y=ax+b$) ve istatistiksel değerler Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel verileri (n=2)

Anyon adı	Regresyon denklemleri $y = ax + b$	Eğimin standard hatası	Kesişimin standart hatası	Korelasyon (r)	Tanımlayıcılık Korelasyon katsayısı (R^2)
Bromür	$y = 0,3287x + 0,0133$	0,0077	0,0507	0,9997	0,9994
Klorür	$y = 0,8382x + 0,0818$	0,0027	0,0174	0,9999	0,9999
Sülfat	$y = 0,7071x - 0,3212$	0,2554	0,0390	0,9985	0,9970
Nitrat	$y = 0,5796x - 0,1353$	0,0090	0,0590	0,9999	0,9998
Florür	$y = 2,6455x - 0,5008$	1,0350	0,1578	0,9982	0,9965
Fosfat	$y = 1,8513x - 0,1557$	0,0248	0,1628	0,9999	0,9998

y: Pik alanı (mAU) x=Derişim (µg/mL)

4.2. Yöntem Bulguları

4.2.1. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ)

Gözlenebilme sınırı (LOD), pik alanındaki her bir birim değişime karşılık, derişimlerde meydana gelen hata payının standart sapmasına (SD) ve kalibrasyon eğrisinin eğimine (a) dayanarak gözlenebilme sınırına yakın olan değerler içerisinde $LOD = 3.3(SD/a)$ formülüne dayanarak hesaplanabilmektedir. Aynı noktalara dayanarak, alt tayin sınırı (LOQ), $LOQ = 10(SD/a)$ formülüne dayanarak alt tayin sınırına yakın olan derişim değerleri arasında hesaplanabilmektedir. Her bir anyon için kalibrasyon sonucu elde edilen LOD ve LOQ değerleri Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Anyonlar için LOD ve LOQ değerleri

Anyon	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Bromür	0,44	1,34
Klorür	0,06	0,18
Sülfat	1,03	3,13
Nitrat	0,29	0,89
Florür	1,13	3,41
Fosfat	0,33	0,99

4.2.2. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik

Numune enjeksiyon yöntemleri doğrultusunda (Bkz. Bölüm 3.3.2.), 20 µg/mL'ye HPCE kalitesinde saf su ile seyreltilmiş olan Fluka standart çözeltisi kullanılarak yapılan enjeksiyonlar sonucu, standart anyonlarının göç sürelerinde gün içi ve günler arası ve kesinlik değerleri (%BSS) hesaplama sonuçları Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Gün içi ve günler arasında anyonların göç sürelerindeki tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirliklerin gösterimi

Anyon	Tekrarlanabilirlik (%BSS), n=3	Tekrar üretilebilirlik (%BSS),n=2
Bromür	1,02	0,680
Klorür	1,08	0,820
Sülfat	0,85	0,560
Nitrat	1,26	0,700
Florür	2,17	0,060
Fosfat	2,63	1,050

Çizelge 4.3.'de gösterildiği üzere, aynı gün içerisinde göç sürelerinde % 0,5-3,0 arasında tekrarlanabilirliğe ulaşılabilirken, iki farklı gün arasında bu değer göç sürelerinde kendisini tekrar üretilebilirlik olarak % 0,5-1,5 arasında göstermektedir.

4.3. Uygulanan CZE-IPD Yöntemiyle Isparta'daki İçme Suyu ve Kaynaklarından Alınan Çeşitli Su Numunelerinin Analiz Sonuçları

Bilinmeyen numune miktarı tayini yapılmasında, ön görülen anyonların kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve kalibrasyon denklemleri elde edilmiştir. Elde edilen bu denklemler kullanılarak yapılan hesaplama sonuçları, Isparta ve çevresindeki çeşitli içme suyu ve kaynaklarından alınan su numunelerinin ihtiva ettikleri anyon miktarları ve derişimleri; kullanılan referans tampon çözelti çalışma elektroliti ve kapiler elektroforez için özel üretilmiş olan HPCE kalitesinde analizde kullanılan kimyasal maddeler yardımıyla, değişikliğe uğratarak uygulanan CZE-IPD yöntemi vasıtasıyla Çizelge 4.4.'de gösterilmiştir. Ayrıca, tanımlayıcı istatistiksel değerler

(Standart sapma (SS), ortalama bulunan numune miktarı ($\bar{x}$), Güven aralığı (GA),) de Çizelge 4.4.'de verilmiştir. Derişimlerin hesaplanmasında türetilmiş kalibrasyon eğrilerinin denklemlerinden yararlanılmıştır (Bkz. Çizelge 4.1).

Çizelge 4.4. Uygulanan CZE-IPD yöntemi ile çeşitli içme suyu kaynaklarından alınan numunelerin analiz sonuçları

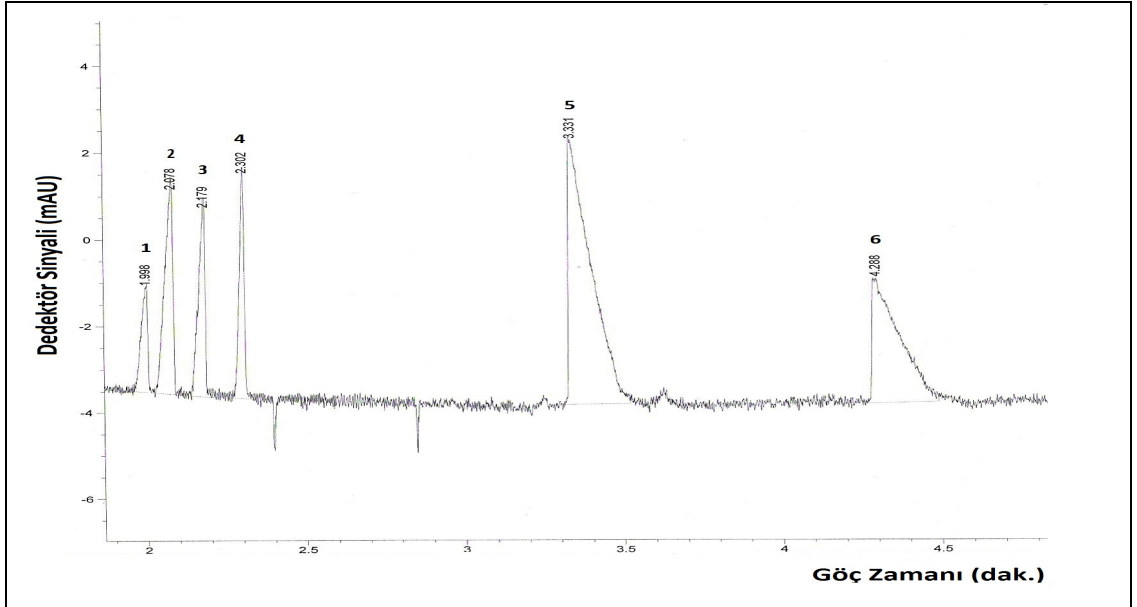
Numune Alınan Yer	Gölcük gölü (n=4)			Ayazmana mesireliği (n=4)			Pir Mehmet Efendi çeşmesi (n=4)			
Anyonlar	Klorür	Sülfat	Florür	Klorür	Sülfat	Nitrat	Klorür	Sülfat	Nitrat	Florür
Pik Alanı (mAU)	4,1100	16,2120	8,0370	3,2550	5,7170	3,0580	2,7410	87,4080	1,1730	2,2930
	5,0330	16,8330	9,2190	3,4250	6,3340	3,4130	2,9840	89,6330	1,1770	1,8970
	4,6280	16,6780	9,1740	3,0530	5,5690	3,0150	2,8880	88,2570	1,3380	3,1820
	4,4790	17,5210	8,5570	3,5090	6,5630	3,5860	2,5800	88,6580	0,9730	1,3580
Bulunan numune miktarı (µg/mL)	3,9275	23,3817	3,2273	2,9074	8,5394	5,5095	2,2942	124,0690	2,2572	1,0561
	5,0286	24,2599	3,6741	3,1102	9,4120	6,1220	2,5841	127,2157	2,2641	0,9064
	4,5455	24,0407	3,6571	2,6664	8,3301	5,4353	2,4696	125,2697	2,5419	1,3921
	4,3677	25,2329	3,4239	3,2105	9,7358	6,4205	2,1021	125,8368	1,9122	0,7026
$\bar{x}$	4,4673	24,2288	3,4956	2,9736	9,0043	5,8718	2,3625	125,5978	2,2439	1,0143
SS	0,4555	0,7664	0,2122	0,2405	0,6763	0,4780	0,2106	1,3063	0,2578	0,2906
GA (µg/mL)	0,4464	0,7511	0,2079	0,2357	0,6627	0,4684	0,2064	1,2802	0,2527	0,2847
%BSS	10,1972	3,1632	6,0702	8,0873	7,5105	8,1404	8,9136	1,0401	11,4908	28,6461

Çizelge 4.4. (devam)

Numune Alınan Yer	Karbuz çeşmesi (n=4)				Eğirdir gölü (n=4)		Ev çeşmesi (n=4)		
Anyonlar	Klorür	Sülfat	Nitrat	Florür	Klorür	Sülfat	Klorür	Sülfat	Florür
Pik Alanı (mAU)	7,4300	8,4180	0,5660	1,9270	5,5420	7,5160	5,6630	6,5600	0,5890
	7,4600	8,4530	0,6670	2,0770	5,7350	7,3180	7,1390	8,5120	0,7730
	6,5280	7,5050	0,6300	2,1070	7,0210	9,0440	6,5230	7,5820	0,5060
	7,4730	8,6540	0,8160	2,2490	6,4070	8,3910	6,3730	7,6480	0,7940
Bulunan numune miktarı (µg/mL)	7,8883	12,3592	1,2100	0,9177	5,6359	11,0836	5,7802	9,7316	0,4119
	7,9241	12,4087	1,3842	0,9744	5,8661	10,8036	7,5412	12,4922	0,4815
	6,8122	11,0680	1,3204	0,9857	7,4004	13,2445	6,8063	11,1769	0,3806
	7,9396	12,6930	1,6413	1,0394	6,6679	12,3210	6,6273	11,2703	0,4894
$\bar{x}$	7,6411	12,1322	1,3890	0,9793	6,3926	11,8632	6,6887	11,1677	0,4409
SS	0,5530	0,7246	0,1830	0,0499	0,8044	1,1326	0,7233	1,1295	0,0532
GA (µg/mL)	0,5419	0,7100	0,1793	0,0489	0,7883	1,1099	0,7088	1,1069	0,0521
%BSS	7,2371	5,9721	13,1733	5,0967	12,5833	9,5471	10,8140	10,1138	12,0609

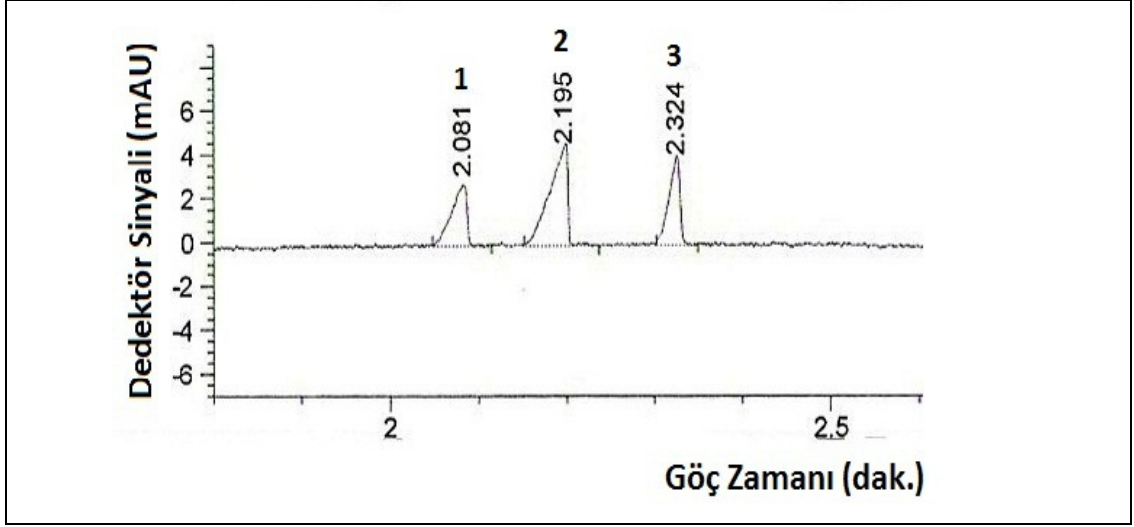
4.4. Uygulanan CZE-IPD Yöntemiyle Elde Edilen Elektroferogram Bulguları

CZE-IPD yöntemi kullanılarak Fluka standart çözeltisi ve Isparta'daki içme suyu ve kaynaklarından alınan su numuneleri üzerinde yapılan incelemelerde, CE vasıtasıyla tespit edilen anyonlarla ilgili elektroferogramlar Şekil 4.2., 4.3., 4.4., 4.5., 4.6., 4.7. ve 4.8.'de gösterilmiştir. Ayrıca, elektroferogramlardan elde edilen veriler vasıtasıyla her bir farklı yerden alınan numune için ihtiva ettiği anyonun, dörder ölçüm sonrasında gözlemlenebilen göç süreleri (t_m) ve taşınabilirliklerindeki (μ_{app}) tekrarlanabilirlik değerleri Çizelge 4.5.'de gösterilmiştir.

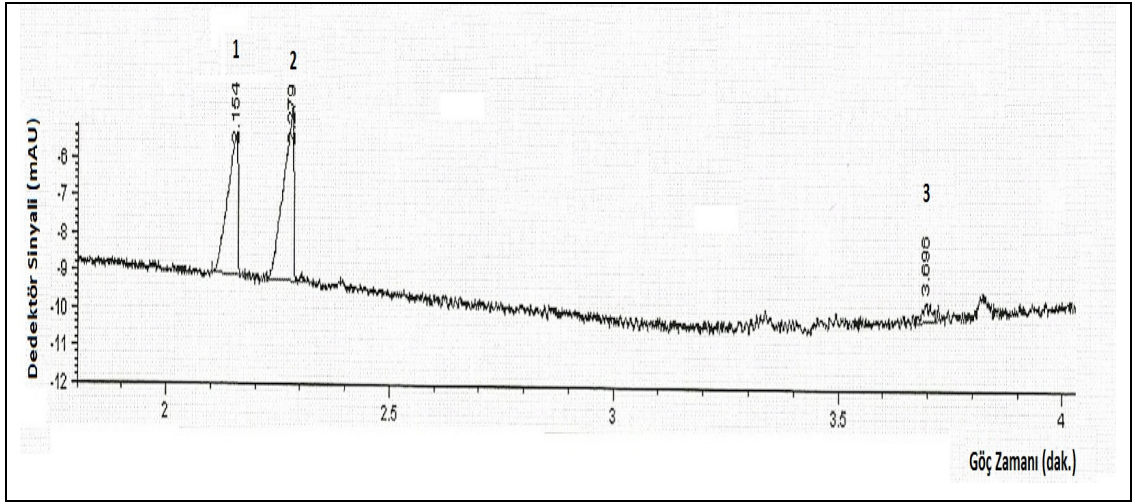


Şekil 4.2. CZE-IPD yöntemiyle analizi yapılan standart anyon çözeltisi elektroferogramı

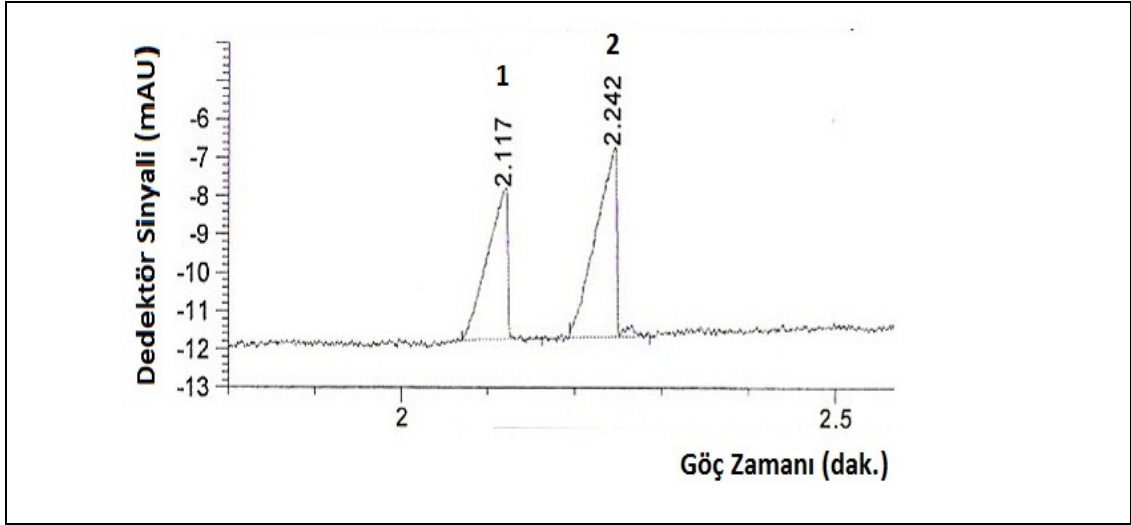
CZE koşulları: Erimiş slika kapiler, 48,5 cm x 50µm iç çap, 40 cm etkin uzunluk; voltaj 30 kV (negatif); Fluka pH=7,7 tampon çözeltisi: 0,75 mM hekzametonyum hidroksit, 6,5 mM NaOH, 2,25 mM piromellitik asit ve 1,60 mM triethanolamin (Fluka); dolaylı fotometrik UV tespiti (IPD), 350 nm inverted, 245 nm referans sinyal; hidrodinamik enjeksiyon (50 mbars). Pikler: 1=Bromür (0,44 mg/l); 2=Klorür (0,06 mg/l); 3= Sülfat (1,03 mg/l); 4. Nitrat (0,29 mg/l); 5. Flörür (1,13); 6. Fosfat (0,33 mg/l).



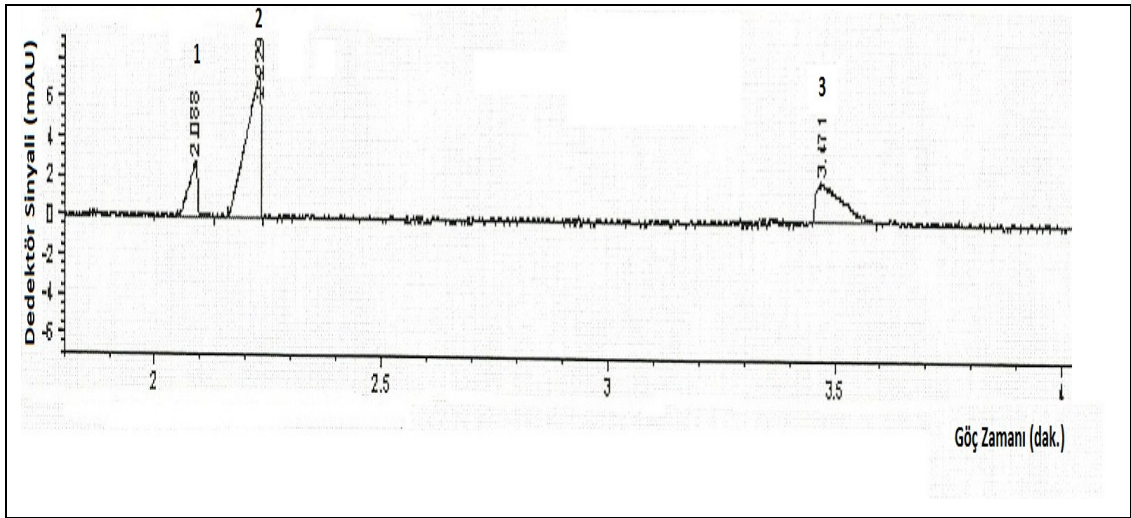
Şekil 4.3. Ayazmana mesireliği numune elektroferogramı
CZE koşulları: standart anyon çözeltisiyle aynı koşullar (Bkz. Şekil 4.1.)
Pikler: 1=Klorür, 2=Sülfat, 3= Nitrat



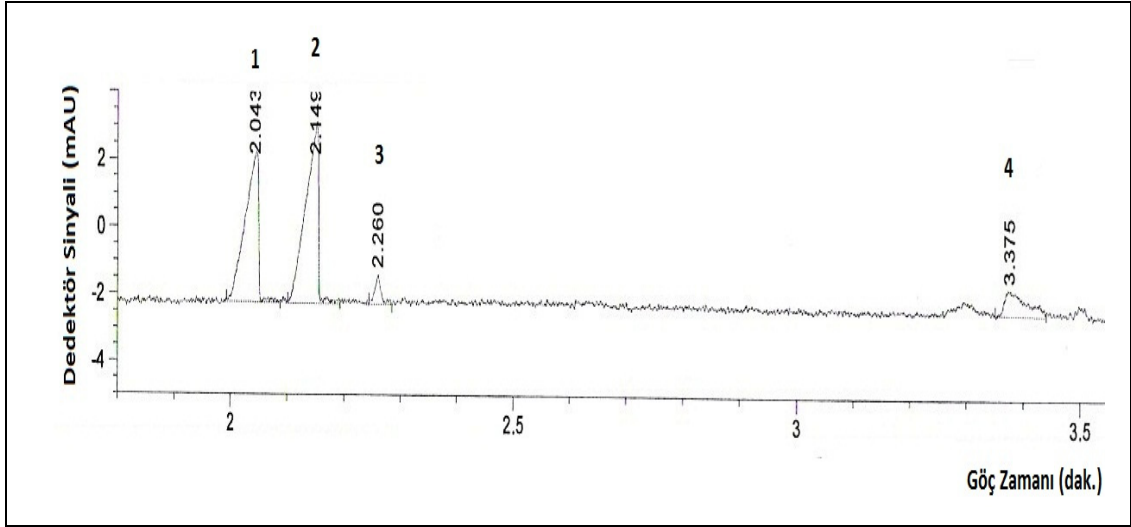
Şekil 4.4. Ev çeşmesi numune elektroferogramı
CZE koşulları: standart anyon çözeltisiyle aynı koşullar (Bkz. Şekil 4.1.)
Pikler: 1=Klorür, 2=Sülfat, 3= Florür



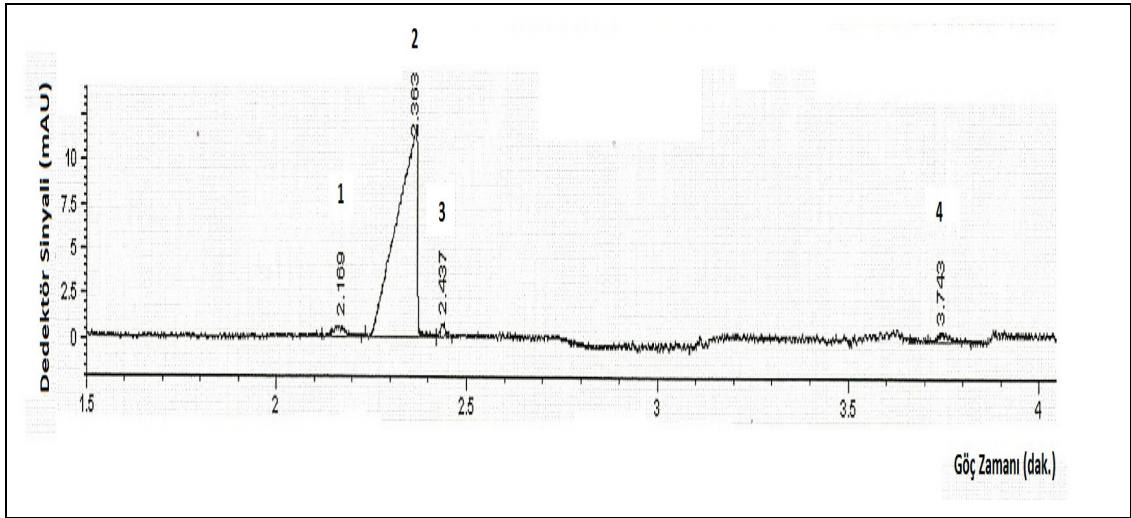
Şekil 4.5. Eğirdir gölü numune elektroferogramı
CZE koşulları: standart anyon çözeltisiyle aynı koşullar (Bkz. Şekil 4.1.)
Pikler: 1=Klorür, 2=Sülfat



Şekil 4.6. Gölcük gölü numune elektroferogramı
CZE koşulları: standart anyon çözeltisiyle aynı koşullar (Bkz. Şekil 4.1.)
Pikler: 1=Klorür, 2=Sülfat, 3= Florür



Şekil 4.7. Karbuz çeşmesi numune elektroferogramı
CZE koşulları: standart anyon çözeltisiyle aynı koşullar (Bkz. Şekil 4.1.)
Pikler: 1=Klorür, 2=Sülfat, 3= Nitrat, 4= Florür



Şekil 4.8. Pir Mehmet Efendi çeşmesi numune elektroferogramı
CZE koşulları: standart anyon çözeltisiyle aynı koşullar (Bkz. Şekil 4.1.)
Pikler: 1=Klorür, 2=Sülfat, 3= Nitrat, 4= Florür

Çizelge 4.5. CZE-IPD yöntemiyle analizi yapılan numunelerin göç sürelerindeki tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirliklerin gösterimi

Numune Alınan Yer	Gölcük gölü (n=4)			Ayazmana mesireliği (n=4)			Pir Mehmet Efendi çeşmesi (n=4)			
Anyonlar	Klorür	Sülfat	Flor	Klorür	Sülfat	Nitrat	Klorür	Sülfat	Nitrat	Florür
Göç süresi t_m (dak.)	2,0880	2,2290	3,4710	2,1140	2,2310	2,3580	2,1610	2,3630	2,4380	3,7430
	2,1250	2,2680	3,5040	2,1190	2,2370	2,3640	2,1590	2,3660	2,4400	3,7670
	2,1050	2,2470	3,4610	2,1010	2,2160	2,3420	2,1690	2,3630	2,4370	3,7430
	2,0450	2,1820	3,3650	2,0810	2,1950	2,3240	2,1740	2,3790	2,4530	3,7020
$\bar{t}_m$	2,0908	2,2315	3,4503	2,1038	2,2198	2,3470	2,1658	2,3678	2,4420	3,7388
SS	0,0340	0,0366	0,0597	0,0170	0,0187	0,0179	0,0070	0,0076	0,0074	0,0270
%BSS	1,6283	1,6423	1,7312	0,8061	0,8431	0,7638	0,3229	0,3223	0,3046	0,7218
Taşınabilirlik μ_{app} (cm ² /skV)	0,5162	0,4835	0,3105	0,5098	0,4831	0,4571	0,4987	0,4561	0,4421	0,2879
	0,5072	0,4752	0,3076	0,5086	0,4818	0,4559	0,4992	0,4555	0,4417	0,2861
	0,5120	0,4797	0,3114	0,5130	0,4864	0,4602	0,4969	0,4561	0,4423	0,2879
	0,5270	0,4939	0,3203	0,5179	0,4910	0,4638	0,4958	0,4530	0,4394	0,2911
$\bar{\mu}_{app}$	0,5156	0,4831	0,3124	0,5123	0,4856	0,4592	0,4977	0,4552	0,4414	0,2883
SS	0,0085	0,0080	0,0055	0,0041	0,0041	0,0035	0,0016	0,0015	0,0013	0,0021
%BSS	1,6405	1,6553	1,7530	0,8093	0,8463	0,7658	0,3228	0,3214	0,3038	0,7242

Çizelge 4.5. (devam)

Numune Alınan Yer	Karbuz çeşmesi (n=4)				Eğirdir gölü (n=4)		Ev çeşmesi (n=4)		
Anyonlar	Klorür	Sülfat	Nitrat	Florür	Klorür	Sülfat	Klorür	Sülfat	Florür
Göç süresi t_m (dak.)	2,0440	2,1490	2,2590	3,3670	2,1670	2,2950	2,1690	2,2940	3,7380
	2,0430	2,1490	2,2600	3,3750	2,1340	2,2590	2,1660	2,2910	3,6930
	2,0540	2,1610	2,2770	3,4250	2,1190	2,2440	2,1650	2,2910	3,7050
	2,0850	2,1960	2,3040	3,4530	2,1170	2,2420	2,1540	2,2790	3,6960
$\bar{t}_m$	2,0565	2,1638	2,2750	3,4050	2,1343	2,2600	2,1635	2,2888	3,7080
SS	0,0196	0,0222	0,0210	0,0410	0,0231	0,0245	0,0066	0,0067	0,0206
%BSS	0,9549	1,0275	0,9241	1,2047	1,0830	1,0856	0,3031	0,2906	0,5566
Taşınabilirlik μ_{app} (cm ² /skV)	0,5273	0,5015	0,4771	0,3201	0,4974	0,4696	0,4969	0,4698	0,2883
	0,5275	0,5015	0,4769	0,3193	0,5051	0,4771	0,4976	0,4704	0,2918
	0,5247	0,4987	0,4733	0,3147	0,5086	0,4803	0,4978	0,4704	0,2909
	0,5169	0,4908	0,4678	0,3121	0,5091	0,4807	0,5004	0,4729	0,2916
$\bar{\mu}_{app}$	0,5241	0,4981	0,4738	0,3166	0,5050	0,4769	0,4982	0,4709	0,2907
SS	0,0050	0,0051	0,0044	0,0038	0,0054	0,0051	0,0015	0,0014	0,0016
%BSS	0,9475	1,0189	0,9190	1,2022	1,0747	1,0770	0,3038	0,2914	0,5541

4.4.1. Elektroferogram bulgularının istatistiksel sonuçları

CZE-IPD yöntemi kullanılarak, bilinmeyen numuneler üzerinde CE ile yapılan ölçümlerden elde edilen elektroferogramlar incelenerek, tayin edilen numune konsantrasyonlarının her bir anyon grubu için, bir grup referans alınmış (I.grup) ve diğer gruplarda bulunan (II.grup) ortalama anyon miktarları arasında anlamlı bir farkın olup olmadığı tek yönlü ANOVA (One-Way ANOVA) istatistiksel testi kullanılarak tespit edilmiş ve Çizelge 4.6.'da çoklu kıyaslamaları gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Referans anyon grubu ve diğer gruplar arasında ortalama anyon miktarları olasıklarının (p), çoklu kıyaslama gösterimi

Çoklu Kıyaslama					
Numune alınan yer		p(0,05)			
I. Grup	II.Grup	Klorür	Sülfat	Nitrat	Florür
Ev Çeşme	Eğirdir gölü	0,987	0,959	-	-
	Ayazmana Mesireliği	0,000*	0,140*	-	-
	Gölcük gölü	0,001*	0,000*	-	0,000*
	Karbuz çeşme	0,340	0,854	-	0,011*
	Pir M. Efendi Çeşme	0,000*	0,000*	-	0,007*
Eğirdir gölü	Ev Çeşme	0,987	0,959	-	-
	Ayazmana Mesireliği	0,000*	0,026*	-	-
	Gölcük gölü	0,005*	0,000*	-	-
	Karbuz çeşme	0,113	0,999	-	-
	Pir M. Efendi Çeşme	0,000*	0,000*	-	-
Ayazmana mesireliği	Ev Çeşme	0,000*	0,140	-	-
	Eğirdir gölü	0,000*	0,026*	-	-
	Gölcük gölü	0,038*	0,000*	-	-
	Karbuz çeşme	0,000*	0,013*	0,000*	-
	Pir M. Efendi Çeşme	0,771	0,000*	0,000*	-
Gölcük gölü	Ev Çeşme	0,001*	0,000*	-	0,000*
	Eğirdir gölü	0,005*	0,000*	-	-
	Ayazmana Mesireliği	0,038*	0,000*	-	-
	Karbuz çeşme	0,000*	0,000*	-	0,000*
	Pir M. Efendi Çeşme	0,002*	0,000*	-	0,000*
* Ortalama farkı p=0,05 seviyesinde anlamlıdır.					

Çizelge 4.6. (devam)

Karbuz çeşme	Ev Çeşme	0,340	0,854	-	0,011*
	Eğirdir gölü	0,113	0,999	-	-
	Ayazmana Mesireliği	0,000*	0,013*	0,000*	-
	Gölcük gölü	0,000*	0,000*	-	0,000*
	Pir M. Efendi Çeşme	0,000*	0,000*	0,017*	0,995
Pir M. Efendi Çeşme	Ev Çeşme	0,000*	0,000*	-	0,007*
	Eğirdir gölü	0,000*	0,000*	-	-
	Ayazmana Mesireliği	0,771	0,000*	0,000*	0,000
	Gölcük gölü	0,002*	0,000*	-	0,000*
	Karbuz çeşme	0,000*	0,000*	0,017*	0,995
* Ortalama farkı p=0,05 seviyesinde anlamlıdır.					

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Altı farklı anyon (bromür, klorür, sülfat, nitrat, florür, fosfat) içeren standart anyon çözeltisi kullanılarak 1-10 µg/mL arasında değişen derişimler kullanılarak X'in 6 ve daha iyi bir rakamı simgelediği 0,99X korelasyon katsayıları, anyon analizleri için hesaplanmıştır. Standart çözeltisinin seyreltilmesinde yüksek kalitede kapiler alan elektroforezi için özel ölçümde hazırlanmış saf su kullanılmış ve her bir bilinmeyen anyon için, derişimleri, göç süreleri ve gözlenebilen taşınabilirlik değerleri için % BSS değerleri hesaplanmıştır. Sonuç olarak, alınan numuneler için, ihtiva ettikleri çeşitli anyonlar için göç süreleri % 0,25-1,8 arasında değerlerde saptanmıştır. Ayrıca bu sonuç anyon taşınabilirlikleri için % 0,3-1,8 arasında değişen değerlerde saptanmıştır. Bu hesaplamalar sonucunda, kesinlik açısından göç sürelerinin ve taşınabilirlik ölçümlerinin birbirleri arasında yüksek derecede kesinlik gösterdikleri söylenebilir.

Rhemrev-Boom (1994), Fluka elektrolit tamponu kullanarak CE ile yaptığı anyon analizleri sonuçlarında, her bir anyonunun kendi bulunduğu numune grubu içerisinde tekrarlanan ölçümler doğrultusunda göç süreleri için %2'nin altında %BSS değerleri gösterirken, miktar tayinleri için kullanılan pik alanlarının %BSS değerlerinin klor sülfat ve nitrat gibi anyonlar için % 7-15 arasında sonuçlar verdiğini ve bu değerlerin tekrarlanabilirlik açısından iyi değerler olduğunu vurgulamıştır. Diğer taraftan florür ve fosfat tayinlerinde %BSS değerlerinin %67, %30 gibi sapmalar gösterdiği gözlemlenmiş ve bu durumun pik alanı entegrasyonun otomatik olarak değil de elle yapılması sonucundan kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada ise, her bir su numunesi için bilinmeyen anyon miktarları kesinlik değerleri, florür anyonu hariç diğer anyon değerleri için %1-14 arasında hesaplanmıştır. Florür için ise Pir Mehmet Efendi çeşmesinden alınan numunelerin miktar tayinleri sonucunda kesinlik değeri % 28,65 olarak hesaplanmıştır. Bu durum, Fluka tampon çözeltisi kullanarak, CZE-IPD yöntemiyle florür anyon miktarı tayinin kesinlik açısından her bir numune analizinde büyük farklılıklar gösterebileceğini göstermektedir. Bu da; bu çalışmada, Fluka tampon çözeltisi kullanarak yapılan florür anyonu tayinlerinin sapmalar gösterebileceğini göstermektedir.

Isparta ve çevresinde farklı yerlerdeki içme suyu kaynaklarından alınan derişimleri bilinmeyen su numunelerinin içerdikleri anyon miktarı tayin edildikten sonra, her bir numune grubu, içediğı her bir anyon miktarı açısından istatistiksel olarak fark olup olmadığını incelemek ve kıyaslamalar yapabilmek için tek yönlü ANOVA testi uygulanmıştır ve ortalama anyon miktarları olasılıkları hesaplanmıştır (Bkz. Çizelge 4.6.).

Tek yönlü ANOVA istatistiksel çoklu ortalama anyon miktarı olasılıkları karşılaştırmaları sonucunda; analiz için alınan su numuneleri içerdikleri klor miktarları açısından karşılaştırıldıklarında; Eğirdir gölü, ev çeşmesi ve Karbuz çeşmesinden alınan numuneler kendi aralarında benzerlik gösterirken, Pir Mehmet Efendi çeşmesi ve Ayazmana mesireliğı çeşmesinden alınanlar da kendi aralarında benzerlik göstermektedir. Diğer bir taraftan, Gölcük gölünden alınan su numesi klor miktarları, Eğirdir gölü, Ayazmana mesireliğı ve Pir Mehmet Efendi çeşmesinden alınanlarla anlamlı bir fark gösterirken, ev çeşmesi ve Karbuz çeşmesinden alınan numunelerle ileri düzeyde anlamlı farklılık göstermektedir.

CE ile analiz için alınan su numuneleri içerdikleri sülfat miktarları açısından karşılaştırıldıklarında; Eğirdir gölü, ev çeşmesi ve Karbuz çeşmesinden alınan numuneler kendi aralarında benzerlik gösterirken, Ayazmana mesireliğı ve ev çeşmesinden alınanlar da kendi aralarında benzerlik göstermektedir. Öte yandan, Gölcük gölünden ve Pir Mehmet Efendi çeşmesinden alınan su numuneleri birbirleriyle ve diğer yerlerden alınan su numuneleri ile ileri düzeyde anlamlı farklılık göstermektedir.

CE ile analiz için alınan su numunelerinden, içeriğinde nitrat tespit edilen Ayazmana mesireliğı, Karbuz çeşmesi ve Pir Mehmet Efendi çeşmesinden alınan numuneler, nitrat miktarları açısından karşılaştırıldıklarında bir benzerlik gözlemlenmezken, Pir Mehmet Efendi çeşmesi ve Karbuz çeşmesinden alınan numuneler arasında anlamlı bir fark varken; Ayazmana mesireliğı ve Karbuz çeşmesinden alınan numuneler arasında ileri düzeyde anlamlı bir farklılığın olduğu bulunmuştur.

CE ile analiz için alınan su numuneleri içerdikleri florür miktarları açısından karşılaştırıldıklarında, Pir Mehmet Efendi çeşmesi ve Karbuz çeşmesinden alınan numuneler kendi aralarında benzerlik gösterirken, ev çeşmesi ve Gölcük gölünden alınan numuneler birbirleri arasında ileri düzeyde anlamlı farklılık göstermektedir. Diğer bir taraftan; ev çeşmesinden alınan numuneler ile Karbuz ve Pir Mehmet Efendi çeşmesinden alınanlar arasında anlamlı bir farklılık görülürken, Gölcük gölünden alınan numuneler ile Karbuz çeşmesi ve Pir Mehmet Efendi çeşmesinden alınan numuneler arasında ileri düzeyde anlamlı bir fark görülmektedir.

TSE.266 (2005) içme suyu standartlarına göre, içme suyunda bulunması gereken anyon miktarları, kaynak (memba) suları (Sınıf 1) ve kaynak suları dışındaki insani tüketim amaçlı işlem görmüş kaynak (memba) suları (Sınıf 2, Tip 1) için florür= 1,0 µg/mL, nitrat= 25 µg/mL, klorür=30 µg/mL, sülfat= 25 µg/mL olarak bildirilmiştir. Kaynak suları dışındaki insani tüketim amaçlı içme ve kullanma suları (Sınıf 2, Tip 2) için ise bu miktarlar, florür= 1,5 µg/mL, nitrat= 50 µg/mL, klorür=250 µg/mL, sülfat= 250 µg/mL olarak bildirilmiştir.

Buna göre, Gölcük gölünden alınan numunede tespit edilen ortalama klor ve sülfat miktarları (Bkz. Çizelge 4.4.), Sınıf 1 ve Sınıf 2, Tip 1 standartlarına uygunken, florür miktarının (Bkz. Çizelge 4.4.) içme suyu standartlarının dışında olduğu görülmüştür.

Ayazmana mesireliğinden alınan numunede tespit edilen ortalama klorür, sülfat, nitrat miktarları (Bkz. Çizelge 4.4.), TSE.266 (2005) Sınıf 1 ve Sınıf 2, Tip 1 standartlarına uygundur.

Pir Mehmet Efendi çeşmesinden alınan numunede tespit edilen ortalama klorür ve nitrat miktarları (Bkz. Çizelge 4.4.) TSE.266 (2005) Sınıf 1 ve Sınıf 2, Tip 1 standartlarına uygunken, sülfat ve florür miktarları, kaynak suları dışındaki insani tüketim amaçlı, içme ve kullanma suları (Sınıf 2, Tip 2) standartlarına uygundur.

Karbuz çeşmesinden alınan numuneden tespit edilen ortalama klorür, sülfat nitrat ve florür miktarları (Bkz. Çizelge 4.4.) TSE. 266 (2005) Sınıf 1 ve Sınıf 2, Tip 1 standartlarına uygundur.

Eğirdir gölünden alınan numunede tespit edilen ortalama klorür, sülfat miktarları (Bkz. Çizelge 4.4.), TSE. 266 (2005) Sınıf 1 ve Sınıf 2, Tip 1 standartlarına uygundur.

Ev Çeşmesinden alınan numunede tespit edilen ortalama klor, sülfat ve florür miktarları (Bkz. Çizelge 4.4), TSE. 266 (2005) Sınıf 1 ve Sınıf 2, Tip1 standartlarına uygundur.

6. KAYNAKLAR

- Arce, L., Rios, A., Valcarcel, M., 1997. Flow injection-capillary electrophoresis coupling to automate online sample treatment for the determination of inorganic ions in water. *Journal of Chromatography A*, 791, 279-287.
- Blanco-Heras, G. A., Turnes-Carou, I. T., Mahia, P. L., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodriguez, D., Fernandez-Fernandez, E., 2007. Capillary electrophoretic method for the determination of inorganic and organic anions in real samples Strategies for improving repeatability and reproducibility. *Journal of Chromatography A*, 1144, 275-278.
- Diress, A.G., Lucy, C.A., 2004. Electroosmotic flow reversal for the determination of inorganic anions by capillary electrophoresis with methanol-water buffer. *Journal of Chromatography A*, 1027, 185-191.
- Doble, P., Haddad, P.R., 1999. Indirect photometric detection of anions in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 834, 189-212.
- Ehmann, T., Fabry, L., Rüfer, H., Kotz, L., Pahlke, S., Mantler, C., 2003. Modification and validation of the pyromellitic acid electrolyte for the capillary electrophoretic determination of anions. *Journal of Chromatography A*, 995, 217-226.
- Engelhardt, H., Beck, W., Schmitt, T., Gutnikov, G., 1996. *Capillary Electrophoresis: Methods and Potentials*. Braunschweig, Vieweg, ISBN 3-540-67011-4, pp. 215, Federal Republic of Germany.
- François, C., Morin, Ph., Dreux, M., 1996. Adjusting the Selectivity of Inorganic Anion Separation by Capillary Electrophoresis. *J. High Resol. Chromatogr.*, 19, 5-16.
- Fukushi, K., Takeda, S., Chayama, K., Wakida, S., 1999. Application of capillary electrophoresis to the analysis of inorganic ions in environmental samples. *Journal of Chromatography A*, 834, 349-362.
- Garcia, S. T., Valenzuela, M. I. A., Gil E. P., 2008. Optimization and validation of capillary electrophoresis methodology for inorganic anions in atmospheric aerosol samples. *Talanta*, 75, 748-752.
- Harakuwe, A.H., Haddad, P.R., 1999. Control of separation selectivity in capillary zone electrophoresis of inorganic anions. *Journal of Chromatography A*, 834, 213-232.
- Heiger, D., 2000. *An Introduction, High Performance Capillary Electrophoresis*. 5968-9963E, 135, Germany.

- Heiger, D., Weinberger, R., 1994. Determination of Small Ions by Capillary Zone Electrophoresis with Indirect Photometric detection. Agilent Technologies, Publication Number:5963-1138E.
- Hiissa, T., Sirén, H., Kotiaho, T., Snellman, M., Hautojärvi, A., 1999. Quantification of anions and cations in environmental water samples, Measurements with capillary electrophoresis and indirect-UV detection. *Journal of Chromatography A*, 853, 403-411.
- Jones, W.R., Jandik, P., 1991. Controlled changes of selectivity in the separation of ions by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 546, 445-458.
- Kocatürk, N., Öztekin, N., Erim, F. B., 2003. Direct determination of bromide ions in seawater by capillary zone electrophoresis using polyethyleneimine-coated capillaries. *Anal Bional Chem*, 377, 1207-1211.
- Kuban, P., Kuban P., Kuban, V., 1999. Simultaneous capillary electrophoretic separation of small anions and cations after complexation with ethylenediaminetetraacetic acid. *Journal of Chromatography A*, 836, 75-80.
- Li, K., Li, S.F.Y., 1994. Determination of anions in water samples by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection. *Journal of Liquid Chromatography*, 17 (18), 3889-3910.
- Li, S.F.Y., Wu, Y.S., 2000. *Capillary Electrophoresis*. National University of Singapore, Singapore, 1176-1187.
- Marina, M.L., Rios, A., Valcarcel, M., 2005. *Comprehensive Analytical Chemistry XLV*. Elsevier B.V., Volume XLV ISSN: 0166-526 DOI: 10.1016/S0166-526X (05) 45001-1, 758.
- Nair, J.B., Izzo, C.G., 1993. Anion screening for drugs and intermediates by capillary ion electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 640, 445-461.
- Oehrle, S.A., 1996. Analysis of anions in drinking water by capillary ion electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 733, 101-104.
- Öztekin, N., Erim, F.B., 2001. Simultaneous Determination of Inorganic Anions and Organic Acids by Capillary Electrophoresis. *Turk J Chem*, 25, 145-150.
- Padarauskas, A., Olsauskaite, V., Paliulionyte, V., 1998. Simultaneous determination of inorganic anions and cations in waters by capillary electrophoresis. *Journal of Chromotography A*, 829, 359-365.
- Pascali, J. P., Liotta, E., Gottardo, R., Bartolotti, F., Tagliora, F., 2009. Rapid optimized seperation of bromide in serum samples with capillary zone electrophoresis by using glycerol as additive to the bacground electrolyte. *Journal of Chromatography A*, 1216, 3349-3352.

- Rhemrev-Boom, M.M., 1994. Determination of anions with capillary electrophoresis and indirect ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 680, 675-684.
- Romano, J., Jandik, P., Jones, W. R., Jackson, P. E., 1991. Optimization of inorganic capillary electrophoresis for the analysis of anionic solutes in real samples. *Journal of Chromatography*, 546, 411-421.
- Romano, J.P., Krol, J., 1993. Capillary ion electrophoresis, an environmental method for the determination of anions in water. *Journal of Chromatography*, 640, 403-412.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R., 2007. *Principles of Instrumental Analysis*. Belmont, CA : Thomson Brooks/Cole, 6th ed., 1039, USA.
- Soga, T., Ross, G.A., 1999. Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids and metal cations by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 834, 65-71.
- Takayanagi, T., Ishida, M., Mbuna, J., Driouich, R., Motomizu, S., 2006. Determination of bromate ion in drinking water by capillary zone electrophoresis with direct photometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1128, 298-302.
- Valsecchi, S., Tartan, G., Polesello, S., 1997. Determination of anions in rainwater by capillary electrophoresis with conductivity detection. *Journal of Chromatography A*, 760, 326-332.
- Weinberger, R., 2000. *Practical Capillary Electrophoresis*. Academic Press, 2nd edition, ISBN-13: 0127423567, 462.

ÖZGEÇMİŞ



Adı Soyadı : Ali Serol Ertürk

Doğum Yeri ve Yılı : Malatya, 1983

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Isparta Gönen Anadolu Öğretmen Lisesi, 2000.

Lisans :Boğaziçi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Bölümü, 2007.

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl:

Metamar Marble Incorporation, Isparta, Project Manager, 2007-2008.

Adıyaman Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Araştırma Görevlisi, 2008-

Yayınları (SCI ve diğer makaleler)