

**3-NİTROTİROZİN İÇİN NİCEL
TAYİN YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

EBRU TÜRKÖZ ACAR

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

3-NİTROTİROZİN İÇİN NİCEL TAYİN YÖNTEMİ
GELİŞTİRİLMESİ

EBRU TÜRKÖZ ACAR

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

AKADEMİK DANIŞMAN

Prof. Dr. A. NUR ONAR

SAMSUN - 2008

3-NİTROTİROZİN İÇİN NİCEL TAYİN YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

ÖZ

Bu çalışmada Alzheimer, ALS ve Parkinson gibi hastalıklarda, in vivo oksidatif tahribin biyoişaretleyicisi olarak bilinen 3-nitrotirozinin(3-NT) nicel tayini için analiz yöntemi geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla voltametri ve kapiler elektroforez tekniklerinden faydalanılmıştır.

Voltametrik çalışmalar 0,30M pH 9,0 fosfat tamponunda yürütülmüş, kare dalga voltametrisi (KDV) ile asılı civa damla elektrodunda (HMDE), -0,497V (Ag/AgCl'e karşı (3M KCl)) potansiyelinde bir indirgenme piki gözlenmiştir. Dönüşümlü voltametri deneyleri sonucu akımın adsorpsiyon kontrollü olduğu belirlenmiş, ardından adsorptif sıyırma kare dalga voltametrisi (AdSKDV) yöntemi çalışılmıştır. KDV için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla $4,27 \times 10^{-9}$, $1,42 \times 10^{-8}$ M olarak bulunurken, AdSKDV' de bu değerler $2,53 \times 10^{-10}$ ve $1,46 \times 10^{-9}$ M olarak bulunmuştur. Daha düşük derişimde çalışmaya izin veren AdSKDV ile 3-NT' nin biyolojik sıvıda analizleri yapılmıştır. Yöntem için geri alınabilirlik değeri % $96,29 \pm 2,32$ olarak hesaplanmıştır.

Geniş kullanım alanına sahip bir ayırma tekniği olan kapiler elektroforez ile yapılan çalışmalarda, son yıllarda geliştirilen ve önderiştirme aşamasını da barındıran büyük hacimli örnek sıkıştırma tekniği (BHÖS) kullanılmıştır. Ters faz polaritenin uygulandığı deneylerde, elektroosmotik akış (EOF) düzenleyici olarak setiltrimetilamonyumbromür (CTAB) ve dietilentriaminin (DETA) kullanıldığı iki yöntem geliştirilmiştir. İncelemeler sonucunda en iyi çalışma şartları 0,5mM CTAB içeren 0,1M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon süresi olarak belirlenmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla $6,56 \times 10^{-10}$ ve $2,19 \times 10^{-9}$ M, geri alınabilirlik değeri de % $106,23 \pm 11,93$ olarak hesaplanmıştır.

Geliştirilen AdSKDV ve CTAB kullanılan BHÖS-CE yöntemleri, plazma ve beyin omurilik sıvılarında hem doğrudan hem de özütleme işlemi sonrasında 3-NT nicel tayini için kullanılmıştır. Her iki yöntemde özütleme işlemi uygulandıktan sonra analiz edilen plazma numuneleri için alınan verilerde student t testi uygulanmış ve % 95 güven seviyesinde değerler kıyaslanarak yorumlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: 3-nitrotirozin, voltametri, kapiler elektroforez, adsorptif sıyırma, sıkıştırma

* Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Araştırma Fonu F-415 No' lu Proje tarafından desteklenmiştir.

DEVELOPING OF QUANTITATIVE DETERMINATION METHOD FOR 3-NITROTYROSIN

ABSTRACT

In this work, analysis methods were developed for quantitative determination of 3-nitrotyrosin (3-NT) which was known as biomarker of in vivo oxidative damage in Alzheimer, ALS and Parkinson diseases. For this purpose voltammetry and capillary electrophoretic techniques were used.

Voltammetric studies were performed in 0.30 M pH 9.0 phosphate buffer as supporting electrolyte, a reduction peak was observed at -0.497 V (vs Ag/AgCl (3 M KCl)) with a hanging mercury drop electrode by square wave voltammetry (SqW). Cyclic voltammetric measurements showed that current was controlled by adsorption. Then adsorptive stripping square wave voltammetry (AdSqW) was studied. In SqW, LOD and LOQ values were found as 4.27×10^{-9} and 1.42×10^{-8} M respectively. In AdSqW these values were as 2.53×10^{-10} and 1.46×10^{-9} M. In plasma and cerebrospinal fluid (CSF) 3-NT was analyzed using AdSqW which allowed to study at low level concentrations. Recovery was calculated as 96.29 ± 2.32 %.

Capillary electrophoresis is a separation technique with wide application area. Recently for preconcentration and injecting large volumes to the capillary large volume sample stacking (LVSS) method has been reported. Applying reverse phase polarity; using diethylentriamine(DETA) and cetyltrimethylammoniumbromide(CTAB) as EOF modifiers two capillary electrophoretic methods were developed. The method with CTAB was preferred and the optimum conditions were determined as 0.1 M pH 7.0 phosphate buffer with 0.5mM CTAB, 30°C temperature, -20 kV separation potential and 500 s injection time LOD and LOQ values were calculated as 6.56×10^{-10} and 2.19×10^{-9} M respectively. Recovery of for this method was found as 106.23 ± 11.93 %.

AdSqW and CE with LVSS methods were compared for quantitative determination of 3-NT in biological fluids. Student t test was applied to the data of plasma samples those analysed directly and after extraction step with two methods using 95% confidence level.

Key Words: 3-nitrotyrosin, voltammetry, capillary electrophoresis, adsorptive stripping, stacking

* This work had been supported by Ondokuz Mayıs University as a research Project (F-415).

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim ve tez dönemlerim süresince ilgisini ve desteğini benden hiç esirgemeyen, güler yüzü ile sadece akademik değil, hayata dair tüm zorlu dönemlerimin üstesinden gelmemi sağlayan, adaletten, aydınlıktan ve doğrudan yana gerçek bir eğitimci olma yolunda bana örnek olan, değerli hocam, Prof. Dr. A. Nur ONAR' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezimin oluşumu süresince katkılarını, yakın ilgilerini ve desteklerini gördüğüm değerli hocalarım Prof. Dr. Yüksel KESİM ve Doç.Dr. Ş.Fatma Aygün' e

Tezimin hazırlanmasında bilgi ve desteği ile yanımda olan hocam Prof. Dr. Musa ONAR' a

Çalışmalarım ve görevim süresince her türlü zor anımda yanımda olan, arkadaşlıklarını daima arayacağım Araş. Gör. S. Meral KARACAN, doktora öğrencisi Ayşin ZÜLFİKAROĞLU, Yrd. Doç.Dr. BehiceYAVUZ ERDOĞAN, Araş. Gör. Onur DUMANLI, ve Araş. Gör. Dr. Aliye GEDİZ ERTÜRK' e

İhtiyaç duyduğumda yanımda olan bölümümüz öğretim üyeleri, araştırma görevlileri ve teknisyenlerine,

En yakın dostum, dayanağım, gururum, kardeşim Emrah TÜRKÖZ' e

Bana hayata karşı dimdik durmayı öğreten, düşüp kalkamayacağımı düşündüğüm zamanlarda bana yeniden hayat veren Annem Kıymet TÜRKÖZ ve Babam Ramazan TÜRKÖZ' e

Her şeyden habersiz benimle birlikte birçok zorluğa katlanan, canımın parçası sevgili kızım Dila ACAR' a

En başından beri! daima benimle olan, sabrını, desteğini, sevgisini esirgemeyen, diğer yarım, değerli eşim Hakan ACAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Ebru TÜRKÖZ ACAR

Aralık 2008

İÇİNDEKİLER

1.	GİRİŞ.....	1
2.	GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.	3-Nitrotirozin.....	3
2.1.1.	3-Nitrotirozinin Kimyasal Yapısı.....	4
2.1.2.	3-Nitrotirozinin Tayin Yöntemleri.....	4
2.1.2.1.	İmmun Yöntemler.....	4
2.1.2.2.	Kromatografik Yöntemler.....	5
2.1.2.2.a.	Kütle Spektrometrik (MS) Detektörlü Analiz Yöntemleri.....	5
2.1.2.2.b.	UV Detektörlü Analiz Yöntemleri.....	7
2.1.2.2.c.	Elektrokimyasal Detektörlü Analiz Yöntemleri.....	7
2.1.2.3.	Elektroforetik Teknikler.....	8
2.2.	Voltametri	8
2.2.1.	Voltametri Cihazı.....	9
2.2.1.1.	Mikroelektrotlar.....	10
2.2.1.2.	Aşırı Gerilim.....	10
2.2.2.	Voltamogramlar.....	10
2.2.3.	Voltametrik Yöntemler.....	12
2.2.3.1.	Oksijen Dalgaları.....	12
2.2.3.2.	Polarografi.....	12
2.2.4.	Dönüşümlü Voltametri.....	12
2.2.5.	Kare-Dalga Voltametrisi.....	13
2.2.6.	Sıyırma Voltametrisi.....	14
2.2.6.1.	Adsorptif Sıyırma Voltametrisi.....	14
2.2.7.	Voltametrde Biyolojik Materyal Analizi.....	15
2.3.	Kapiler Elektroforez.....	16
2.3.1.	Elektroforez.....	16
2.3.2.	Enstrüman ve Kapiler Elektroforez Analizi.....	17
2.3.3.	Kapiler Kolon.....	18
2.3.4.	Joule Isınması.....	19
2.3.5.	Elektroozmos.....	19
2.3.5.1.	EOF Mobilitesini Etkileyen Faktörler.....	21

2.3.5.1.a.	Zeta Potansiyeli.....	21
2.3.6.	Kapiler Elektroforezde Akış Profili.....	22
2.3.7.	Elektroforegram.....	23
2.3.8.	Ayırıcılık ve Verim.....	25
2.3.9.	Değişim Kaynakları.....	26
2.3.9.1.	Sıcaklık.....	27
2.3.9.2.	Sınırlı Örnek Verme Hacmi.....	27
2.3.9.3.	Analit- Duvar Etkileşimi.....	28
2.3.10.	Örnek Verilmesi.....	28
2.3.11.	Belirleme Yöntemleri.....	29
2.3.12.	Ayırma Yöntemleri ve İlkeleri.....	30
2.3.12.1.	Kapiler Kuşak Elektroforezi (CZE).....	31
2.3.12.2.	Miselli Elektrokinetik Kromatografi (MEKC).....	32
2.3.12.2.a	MEKC’ de Seçiciliğin ve Ayırıcılığın Kontrolü.....	33
2.3.12.3.	Kapiler Jel Elektroforez (CGE).....	35
2.3.12.3.a	CGE’ de Jel Bileşiminin Etkisi.....	36
2.3.12.4.	Kapiler İzoelektrik Odaklama (CIEF)	36
2.3.12.5.	Kapiler İzotakoforez (CITP).....	38
2.3.13.	Önderiştirme (Sıkıştırma) Yöntemleri.....	39
2.3.13.1.	Elektrokinetik Önderiştirme Teknikleri.....	39
2.3.13.1.a	Izotakoforetik Önderiştirme.....	39
2.3.13.1.b	Sürekli Tampon Sistemlerinde Alan Arttırılması	41
2.3.13.1.c	Alan-Arttırmalı Kapiler Elektroforezde Elektroozmotik Özellikler...	43
2.3.13.2.	Elektroozmotik Akış ve Kolonda Deriştirme.....	46
2.3.13.2.a	Polarite Dönüşümü ile Örnek Sıkıştırması.....	46
2.3.13.2.b	Polarite Dönüşümü Olmaksızın Örnek Sıkıştırması.....	48
2.3.13.2.c	Hidrodinamik Karşıdengeleyici Akış.....	52
2.3.14.	Kapiler Elektroforez ile Biyolojik Materyal Analizi.....	52
2.4.	Kemometri.....	54
2.4.1.	Matris Hesaplamaları	55
2.4.1.1.	Matris Çarpımı.....	56
2.4.2.	Tam Faktoriyel Tasarım.....	57
2.5.	Alt Teşhis ve Alt Tayin Sınırlarının Belirlenmesi.....	60

3.	MATERYAL VE YÖNTEM.....	61
3.1.	Materyal.....	61
3.1.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	61
3.1.2.	Kullanılan Cihazlar.....	61
3.1.3.	Voltametri Yönteminde Kullanılan Deneysel İşlem.....	62
3.1.4.	Kapiler Elektroforez Yönteminde Kullanılan Deneysel İşlem.....	62
3.2.	Voltametrik Çalışmalar.....	63
3.2.1.	Kare Dalga Yöntemi.....	63
3.2.1.1.	Destek Elektrolitin Seçimi.....	63
3.2.1.2.	pH Seçimi.....	63
3.2.1.3.	Destek Elektrolit Derişiminin Belirlenmesi.....	63
3.2.1.4.	Kare Dalga Şartlarının Kemometrik Yaklaşım ile Seçilmesi.....	63
3.2.1.5.	Kare Dalga Yöntemi ile Elde Edilen Kalibrasyon Eğrisi.....	64
3.2.2.	Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları.....	64
3.2.2.1.	Civa Elektrotta Yapılan Çalışmalar.....	65
3.2.2.2.	Camsı Karbon Elektrotta Yapılan Çalışmalar.....	65
3.2.3.	Adsorptif Sıyırma Voltametrisi Yöntemi.....	65
3.2.3.1.	Damla Boyutu Seçimi.....	65
3.2.3.2.	Karıştırma Hızı Seçimi.....	65
3.2.3.3.	Biriktirme Potansiyeli Seçimi.....	65
3.2.3.4.	Biriktirme Zamanı Seçimi.....	66
3.2.3.5.	Adsorptif Sıyırma Voltametrisi ile Elde Edilen Kalibrasyon Eğrisi...	66
3.2.3.6.	Geri Alınabilirlik Çalışmaları.....	66
3.2.3.7.	Yöntemin Sağlamlığı ve Güçlülüğü.....	67
3.2.3.8.	Plazmada Analizler.....	67
3.2.3.8.a.	Doğrudan Plazma Analizleri.....	67
3.2.3.8.b.	Özütleme İşlemi Yapılmış Plazma Analizleri	67
3.2.3.9.	Beyin Omurilik Sıvısında (BOS) Analizler.....	70

3.2.3.9.a.	Doğrudan BOS Analizleri.....	70
3.2.3.9.b.	Özütleme İşlemi Yapılmış BOS Analizleri.....	70
3.3.	Kapiler Elektroforetik Çalışmalar.....	71
3.3.1.	Setiltrimetilamonyumbromür (CTAB) Kullanılan Çalışmalar.....	71
3.3.1.1.	Mor Ötesi Spektrum Veri Eldesi.....	71
3.3.1.2.	pH Seçimi.....	71
3.3.1.3.	CTAB Derişimi Etkisinin İncelenmesi.....	72
3.3.1.4.	H ₃ PO ₄ Derişimi, Sıcaklık ve Ayrırma Potansiyelinin Kemometrik Yaklaşım ile Seçimi.....	72
3.3.1.5.	Enjeksiyon Süresinin Seçimi	73
3.3.1.6.	Kalibrasyon Eğrisi.....	74
3.3.2.	Dietilentriamin (DETA) Kullanılan Çalışmalar.....	74
3.3.2.1.	pH Seçimi.....	74
3.3.2.2.	DETA Derişimi Etkisinin İncelenmesi.....	74
3.3.2.3.	H ₃ PO ₄ Derişimi, Sıcaklık ve Ayrırma Potansiyelinin Kemometrik Yaklaşım ile Seçimi	75
3.3.2.4.	Enjeksiyon Süresinin Seçimi.....	75
3.3.1.5.	Kalibrasyon Eğrisi.....	76
3.4.	Kapiler Elektroforezde Analizler.....	76
3.4.1.	Geri Alınabilirlik Çalışmaları.....	76
3.4.2.	Yöntemin Sağlamlığı ve Güçlülüğü.....	76
3.4.3.	Plazmada Analizler.....	77
3.4.3.a.	Doğrudan Plazma Analizleri.....	77
3.4.3.b.	Özütleme İşlemi Yapılmış Plazma Analizleri.....	77
3.4.4.	BOS' ta Analizler.....	77
3.4.4.a.	Doğrudan BOS Analizleri.....	77
3.4.4.b.	Özütleme İşlemi Yapılmış BOS Analizleri.....	78
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	79
4.1.	Voltametik Çalışmalar.....	79
4.1.1.	Kare Dalga Yöntemi.....	79
4.1.1.1.	Destek Elektrolit Seçimi.....	79
4.1.1.2.	pH Seçimi.....	84

4.1.1.3.	Tampon Derişimi Seçimi.....	85
4.1.1.4.	Kare Dalga şartlarının Kemometrik Yaklaşımla Seçilmesi.....	86
4.1.1.5.	Kare Dalga Yöntemi ile Elde Edilen Kalibrasyon Eğrisi.....	87
4.1.2.	Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları.....	89
4.1.2.1.	Cıva Elektrotta Yapılan Çalışmalar.....	89
4.1.2.2.	Camsı Karbon Elektrotta Elektrotta Yapılan Çalışmalar.....	92
4.1.3.	Adsorptif Sıyırma Voltametrisi Yöntemi.....	95
4.1.3.1.	Damla Boyutu Seçimi.....	96
4.1.3.2.	Karıştırma Hızı Seçimi.....	97
4.1.3.3.	Biriktirme Potansiyeli Seçimi.....	98
4.1.3.4.	Biriktirme Süresi Seçimi.....	99
4.1.3.5.	Adsorptif Sıyırma Voltametrisi ile Elde Edilen Kalibrasyon Eğrisi...	101
4.1.3.6.	Geri Alınabilirlik Çalışmaları.....	102
4.1.3.7.	Yöntemin Sağlamlığı ve Güçlölüğü.....	103
4.1.3.8.	Plazmada Analizler.....	104
4.1.3.8.a.	Doğrudan Plazma Analizleri.....	104
4.1.3.8.b.	Özütleme İşlemi Yapılmış Plazma Analizleri.....	105
4.1.3.9.	Beyin Omurilik Sıvısında (BOS) Analizler.....	110
4.1.3.9.a.	Doğrudan BOS Analizleri.....	110
4.1.3.9.b.	Özütleme İşlemi Yapılmış BOS Analizleri.....	111
4.2.	Kapiler Elektroforetik Çalışmalarda Yöntem Geliştirme.....	115
4.2.1.	Setiltrimetilamonyumbromür (CTAB) Kullanılan Çalışmalar.....	116
4.2.1.1.	Mor Ötesi Spektrum Çalışmaları.....	116
4.2.1.2.	Kapiler Elektroforezde Cevapların Değerlendirilmesi.....	119
4.2.1.3.	pH Seçimi.....	120
4.2.1.4.	CTAB Derişimi Etkisinin İncelenmesi.....	122
4.2.1.5.	H ₃ PO ₄ derişimi, Sıcaklık ve Ayırma Potansiyelinin Kemometrik Yaklaşımla Seçimi	124
4.2.1.6.	Enjeksiyon Süresinin Seçimi	124
4.2.1.7.	Kalibrasyon Eğrisi.....	126
4.2.2.	Dietilentriamin (DETA) Kullanılan Çalışmalar.....	128
4.2.2.1.	pH Seçimi.....	128

4.2.2.2.	DETA Derişimi Etkisinin İncelenmesi.....	129
4.2.2.3.	H ₃ PO ₄ derişimi, Sıcaklık ve Ayırma Potansiyelinin Kemometrik Yaklaşım ile Seçimi	131
4.2.2.4.	Enjeksiyon Süresinin Seçimi.....	132
4.2.2.5.	Kalibrasyon Eğrisi.....	134
4.3.	Kapiler Elektroforezde Analizler.....	137
4.3.1.	Geri Alınabilirlik Çalışmaları.....	137
4.3.2.	Yöntemin Sağlamlığı ve Güçlülüğü.....	138
4.3.3.	Plazmada Analizler.....	139
4.3.3.a.	Doğrudan Plazma Analizleri.....	139
4.3.3.b.	Özütleme İşlemi Yapılmış Plazma Analizleri.....	141
4.3.4.	BOS' ta Analizler.....	145
4.3.4.a.	Doğrudan BOS Analizleri.....	146
4.3.4.b.	Özütleme İşlemi yapılmış BOS Analizleri.....	150
5.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	155
6.	KAYNAKLAR.....	160
	EK 1.....	166
	EK 2.....	167
7.	ÖZGEÇMİŞ.....	168

SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

3-NT	3-Nitrotirozin
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
MS	Kütle Spektrometrisi
GC	Gaz Kromatografisi
LC	Sıvı Kromatografisi
LOD	Alt Teşhis Sınırı
LOQ	Alt Tayin Sınırı
ALS	Amiyotrofik Lateral Skleroz
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
ECD	Elektrokimyasal Belirleme
i	Akım
KDV	Kare Dalga Voltametrisi
AdSV	Adsorptif Sıyırma Voltametrisi
η	Viskozite
μ	Mobilite
r	Yarıçap
CE	Kapiler Elektroforez
EOF	Elektroosmotik Akış
CZE	Kapiler Kuşak Elektroforezi
CGE	Kapiler Jel Elektroforez
MEKC	Miselli Elektrokinetik Kromatografi
CEC	Kapiler Elektrokromatografi
CIEF	Kapiler İzoelektrik Odaklama
CITP	Kapiler İzotakoforez
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
CD	Siklodekstrin
pI	İzoelektrik pH
CTAB	Setiltirimetilamonyumbromür
DETA	Dietilentriamin

LVSS	Büyük Hacimli Örnek Sıkıştırma
FESI	Alan Arttırmalı Örnek Sıkıştırma
GCE	Camsı Karbon Elektrot
AdSKDV	Adsorptif Sıyırma Kare Dalga Voltametrisi
BHÖS KE	Büyük Hacimli Örnek Sıkıştırılmalı Kapiler Elektroforez

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	3-nitrotirozinin açık yapısı.....	4
Şekil 2.2.	Doğrusal taramalı voltamogram örneği.....	11
Şekil 2.3.	Bir CE analiz sisteminin genel görünümü.....	17
Şekil 2.4.	Bir kapiler kolonda ayırımın basit bir gösterimi.....	18
Şekil 2.5.	Kapiler yüzeyinde oluşan elektriksel çift tabakanın görünümü.....	20
Şekil 2.6.	Kapiler iç yüzeyinde silanol gruplarının iyonlaşmasının pH ile değişimi.....	21
Şekil 2.7.	Yüklü ve yüksüz maddelerin EOF varlığındaki hareket ve yönlenmeleri.....	22
Şekil 2.8.	Elektroozmotik ve HPLC de geçerli olan hidrodinamik akış görünümünün bir karşılaştırması.....	23
Şekil 2.9.	Tipik bir elektroforegramın görünümü.....	23
Şekil 2.10.	Spektroskopik yöntemler kullanıldığında ışın yolunun kapilerin çapı ile belirlenmesinin gösterilişi.....	29
Şekil 2.11.	Alt teşhis sınırı (LOD) değerini iyileştirmek için geliştirilen hücre tasarımları.....	30
Şekil 2.12.	Kapiler kuşak elektroforezde karışımın analiz süresince niteliği değişmeyen bir tampon içerisinde ayrılması.....	31
Şekil 2.13.	Anyonik yüzey aktif madde ilavesinde ayırımın şematik görünümü.....	32
Şekil 2.14.	a) MEKC de kuşak ayırım şematik gösterimi ve b) elektroforegram.....	33
Şekil 2.15.	(a) İyonik misel ve (b)iyonik ve noniyonik yüzey aktiflerin (1) içerden, (2) yüzeyde, (3) kosurfaktan olarak ve (4) noniyonik yüzeyle etkileşimiyle karışık misel.....	34
Şekil 2.16.	Siklodekstrin ilavesinde MEKC ayırımının şematik bir gösterimi.....	34
Şekil 2.17.	Kapiler izoelektrik odaklama ayırma tamponunda kolon boyunca pH değişimi oluşturulması.....	36
Şekil 2.18.	Kapiler izoelektrik odaklama yönteminde karışım ayrılırken çözeltide de yönlenmeler oluşur, bu da pH değişimine neden olur.....	37
Şekil 2.19.	Kapiler izotakoforez yönteminde ayırımın şematik gösterimi.....	37
Şekil 2.20.	CZE de geçici ITP örnek önderiştirmesinin şematik diyagramı Yöntem 1 : öncü elektrolit (LE) destek tamponu veya zemin tamponunda kullanılır. Yöntem 2 : Örnek tamponu öncü iyonlar içerir ve zemin tamponundaki karşı iyonlar artçı elektrolit (TE) olarak rol oynarlar.....	40
Şekil 2.21.	Bir kolonda iki farklı derişimde (C_1 ve C_2) yerel elektroozmotik hızlar (v_{e_1}, v_{e_2}) ve çözelti akışı (v_b) karşılaşmasından oluşan laminer akışlar (v_{a_1}, v_{a_2}) ve basınç düşüşleri ($\Delta P_1, \Delta P_2$). δ çift tabaka kalınlığıdır.....	44

Şekil 2.22.	Polarite dönüşümü kullanımıyla örnek deriştirme işleminin şematik diyagramı.....	47
Şekil 2.23.	Pompa olarak elektroozmotik değıştiricinin kullanıldığı örnek deriştirme işleminin şematik gösterimi.....	48
Şekil 2.24.	Asidik pH da büyük hacimli örnek sıkıştırma çalışmasında örnek çözeltisi (S) ve ayırma çözeltisinde (BGS) anyonik türlerin değışimi. A, başlangıç durumu (sudaki örneğin enjeksiyonu ve voltaj uygulanması); B, örnek matriksinin tamamen çıkarılmasından önce ayrı bir sıkışmış kuşak oluşur; C, kuşaklar detektöre doğru hareket etmeye göç etmeye ve ayrılmaya başlar; elektroforetik büyüklüklerin sırası $a > b > c$	50
Şekil 2.25.	Asidik pH da alan-arttırmalı örnek enjeksiyonu çalışmasında su tıkaçı ve BGS kuşaklarında anyonik türlerin değışimi. A, başlangıç durumu (su tıkaçının enjeksiyonu) ardından inlet pozisyonunda S ile negatif polaritede voltaj uygulanması (anyonlar su tıkaçına elektrokinetik olarak enjekte edilirler); B, voltaj akımın belirli bir yüzdesinde kapanır (bu da anyonların derişim sınırında odaklandığını, anyonların su tıkaçında bulunduğunu ve su tıkaçının kısmen çıkarıldığını gösterir); C, ayırım ve odaklanmış kuşakların belirlenmesi.....	50
Şekil 3.1.	Kapiler elektroforezde analiz öncesi, analiz ve analiz sonrası uygulamaları gösteren şema.....	62
Şekil 4.1.	KDV ile 1 M HCl destek elektrolitinde a: $5,04 \times 10^{-6}$ M b: $1,00 \times 10^{-5}$ M c: $1,50 \times 10^{-5}$ M d: $1,98 \times 10^{-5}$ M e: $2,47 \times 10^{-5}$ M standart 3-NT çözeltileri için alınan voltamogramlar.....	79
Şekil 4.2.	KDV ile 1 M NaOH destek elektrolitinde a: $5,04 \times 10^{-6}$ M b: $1,00 \times 10^{-5}$ M c: $1,50 \times 10^{-5}$ M d: $1,98 \times 10^{-5}$ M e: $2,47 \times 10^{-5}$ M standart 3-NT çözeltileri için alınan voltamogramlar.....	80
Şekil 4.3.	KDV ile 1 M KCl destek elektrolitinde a: $5,04 \times 10^{-6}$ M b: $1,00 \times 10^{-5}$ M c: $1,50 \times 10^{-5}$ M d: $1,98 \times 10^{-5}$ M e: $2,47 \times 10^{-5}$ M standart 3-NT çözeltileri için alınan voltamogramlar.....	80
Şekil 4.4.	KDV ile 0,5 M pH 4 asetat tamponunda a: $5,04 \times 10^{-6}$ M b: $1,00 \times 10^{-5}$ M c: $1,50 \times 10^{-5}$ M d: $1,98 \times 10^{-5}$ M e: $2,47 \times 10^{-5}$ M standart 3-NT çözeltileri için alınan voltamogramlar.....	81
Şekil 4.5.	KDV ile 0,5 M pH 9 borat tamponunda a: $5,04 \times 10^{-6}$ M b: $1,00 \times 10^{-5}$ M c: $1,50 \times 10^{-5}$ M d: $1,98 \times 10^{-5}$ M e: $2,47 \times 10^{-5}$ M standart 3-NT çözeltileri için alınan voltamogramlar.....	81
Şekil 4.6.	KDV ile 0,05 M pH 1,90 BRT tamponunda a: $5,04 \times 10^{-6}$ M b: $1,00 \times 10^{-5}$ M c: $1,50 \times 10^{-5}$ M d: $1,98 \times 10^{-5}$ M e: $2,47 \times 10^{-5}$ M standart 3-NT çözeltileri için alınan voltamogramlar.....	82
Şekil 4.7.	KDV ile 0,05 M pH 4,80 BRT tamponunda a: $5,04 \times 10^{-6}$ M b: $1,00 \times 10^{-5}$ M c: $1,50 \times 10^{-5}$ M d: $1,98 \times 10^{-5}$ M e: $2,47 \times 10^{-5}$ M standart 3-NT çözeltileri için alınan voltamogramlar.....	82
Şekil 4.8.	KDV ile 0,05 M pH 9 BRT tamponunda a: $5,04 \times 10^{-6}$ M b: $1,00 \times 10^{-5}$ M c: $1,50 \times 10^{-5}$ M d: $1,98 \times 10^{-5}$ M e: $2,47 \times 10^{-5}$ M standart 3-NT çözeltileri için alınan voltamogramlar.....	83
Şekil 4.9.	KDV ile 0,5 M pH 9 fosfat tamponunda a: $5,04 \times 10^{-6}$ M b: $1,00 \times 10^{-5}$ M c: $1,50 \times 10^{-5}$ M d: $1,98 \times 10^{-5}$ M e: $2,47 \times 10^{-5}$ M standart 3-NT çözeltileri için alınan voltamogramlar.....	83

Şekil 4.10.	KDV ile $1,00 \times 10^{-5}$ M (2,26 mg/L) 3-NT için 0,5 M fosfat tamponunda pH değişim grafiği.....	85
Şekil 4.11.	KDV ile $1,0 \times 10^{-8}$ M 3-NT için pH 9,00 değerinde tampon derişimi ile akım farkının değişimi.....	86
Şekil 4.12.	Genliğin 0,1 V, frekansın 50 Hz ve potansiyel adımının 0,01 V olduğu kare dalga şartlarında pH 9,0 0,3 M fosfat tamponunda $2,02 \times 10^{-8}$ – $1,05 \times 10^{-6}$ M 3-NT için elde edilen voltamogramlar.....	88
Şekil 4.13.	Genliğin 0,1 V, frekansın 50 Hz ve potansiyel adımının 0,01 V olduğu kare dalga şartlarında pH 9,0 0,3 M fosfat tamponunda $2,02 \times 10^{-8}$ – $1,05 \times 10^{-6}$ M derişimleri arasında elde edilen kalibrasyon eğrisi grafiği.....	89
Şekil 4.14.	Fosfat tamponunda (pH 9,0 0,3 M) 5 V/s tarama hızında $3,68 \times 10^{-7}$ M 3-NT için elde edilen dönüşümlü voltamogram.....	90
Şekil 4.15.	Fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) 4×10^{-7} M 3-NT için tarama hızının logaritmasına karşı akım farkının logaritma değeri grafiği.....	91
Şekil 4.16.	Fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) 4×10^{-7} M 3-NT için tarama hızının kareköküne karşı akım farkı değeri grafiği.....	91
Şekil 4.17.	Fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) 4×10^{-7} M 3-NT için tarama hızının logaritmasına karşı potansiyel değeri grafiği.....	92
Şekil 4.18.	GCE de 0,03 V/s tarama hızında 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunda $1,50 \times 10^{-4}$ M 3-NT için elde edilen dönüşümlü voltamogram 1-ilk uygulanan indirgeme yönü 2- yükseltgeme yönü.....	93
Şekil 4.19.	Fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $1,50 \times 10^{-4}$ M 3-NT' in GCE de dönüşümlü voltamogramlarında tarama hızının kareköküne karşı akım farkı değişimi.....	94
Şekil 4.20.	Fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $1,50 \times 10^{-4}$ M 3-NT' in GCE' de dönüşümlü voltamogramlarında tarama hızının logaritmasına karşı akım değerlerinin logaritmasının değişimi.....	94
Şekil 4.21.	Fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $1,50 \times 10^{-4}$ M 3-NT' in GCE' de dönüşümlü voltamogramlarında tarama hızının kareköküne karşı pik potansiyelinin logaritma değerlerinin değişimi.....	95
Şekil 4.22.	Fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $6,33 \times 10^{-8}$ M 3-NT için KDV ve AdSKDV ile elde edilen voltamogramların karşılaştırılması a) Destek elektrolit çözeltisi voltamogramı b) $6,33 \times 10^{-8}$ M 3-NT için KDV ile elde edilen voltamogram b) $6,33 \times 10^{-8}$ M 3-NT için AdSKDV ile elde edilen voltamogram.....	96
Şekil 4.23.	AdSKDV yöntemi ile fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $2,36 \times 10^{-8}$ M 3-NT için damla boyutu ile akım farkı değişimi.....	97
Şekil 4.24.	AdSKDV yöntemi ile fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $2,36 \times 10^{-8}$ M 3-NT için karıştırma hızı ile akım farkı değişimi.....	98
Şekil 4.25.	AdSKDV yöntemi ile fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $2,36 \times 10^{-8}$ M 1000 rpm karıştırma hızında biriktirme potansiyeli ile akım farkı değişimi.....	99
Şekil 4.26.	AdSKDV yöntemi ile fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $2,36 \times 10^{-8}$ M 3-NT için -0,15 V biriktirme potansiyelinde 1000 rpm karıştırma hızında biriktirme zamanı ile akım farkı değişimi.....	100

Şekil 4.27.	AdSKDV yöntemi ile 3-NT için $2,39 \times 10^{-9}$ - $5,97 \times 10^{-7}$ M derişimleri arasında 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyelinde 20 s biriktirme sonucu elde edilen voltamogramlar.....	101
Şekil 4.28.	AdSKDV yöntemi ile 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V potansiyelde 20s biriktirme sonucu 3-NT için $2,39 \times 10^{-9}$ - $5,97 \times 10^{-7}$ M derişimleri arasında elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	102
Şekil 4.29.	Destek elektrolit olarak 0,30 M pH 9,0 fosfat tamponunun kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde plazma numunelerinin doğrudan adsorptif sıyırma yöntemi ile analizi sonucu elde edilen voltamogramlar A) 100 µl Plazma numunesi için elde edilen voltamogram B) A + a: $4,00 \times 10^{-9}$ M b: $7,95 \times 10^{-9}$ M c: $1,18 \times 10^{-8}$ M derişimlerinde standart 3-NT eklenmesi ile elde edilen voltamogramlar.....	104
Şekil 4.30.	Plazma numunesinde özütlenme işlemi yapıldıktan sonra 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde AdSKDV ile elde edilen voltamogramlar a) Plazma numunesi b) a+ $4,0 \times 10^{-7}$ M 3-NT c) a+ $7,91 \times 10^{-7}$ M 3-NT.....	105
Şekil 4.31.	AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde BOS numunelerinin doğrudan adsorptif sıyırma yöntemi ile analizi sonucu elde edilen voltamogramlar a) Destek elektrolit çözeltisi b) 50 µl BOS numunesi c) 100 µl BOS numunesi.....	110
Şekil 4.32.	BOS1 hidrolizati için AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde elde edilen voltamogram A) BOS1 hidrolizati voltamogramı B) BOS1 hidrolizati üzerine a: $1,00 \times 10^{-7}$ b: $3,00 \times 10^{-7}$ c: $6,85 \times 10^{-7}$ d: $1,15 \times 10^{-6}$ M derişimlerinde standart 3-NT eklenmesi ile elde edilen voltamogramlar.....	111
Şekil 4.33.	BOS2 hidrolizati için AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde elde edilen voltamogram A) BOS2 hidrolizati voltamogramı B) BOS2 hidrolizati üzerine a: $2,02 \times 10^{-6}$ b: $4,01 \times 10^{-6}$ c: $7,95 \times 10^{-6}$ M derişimlerinde standart 3-NT eklenmesi ile elde edilen voltamogramlar.....	112

Şekil 4.34.	BOS3 hidrolizati için AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde elde edilen voltamogram A) BOS3 hidrolizati voltamogramı B) BOS3 hidrolizati üzerine a: $2,02 \times 10^{-6}$ b: $4,01 \times 10^{-6}$ c: $7,95 \times 10^{-6}$ M derişimlerinde standart 3-NT eklenmesi ile elde edilen voltamogramlar.....	112
Şekil 4.35.	BOS4 hidrolizati için AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde elde edilen voltamogram A) BOS4 hidrolizati voltamogramı B) BOS4 hidrolizati üzerine a: $2,02 \times 10^{-6}$ b: $4,01 \times 10^{-6}$ c: $7,95 \times 10^{-6}$ M derişimlerinde standart 3-NT eklenmesi ile elde edilen voltamogramlar.....	113
Şekil 4.36.	BOS5 hidrolizati için AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde elde edilen voltamogram A) BOS5 hidrolizati voltamogramı B) BOS5 hidrolizati üzerine a: $2,02 \times 10^{-6}$ b: $4,01 \times 10^{-6}$ c: $7,95 \times 10^{-6}$ M derişimlerinde standart 3-NT eklenmesi ile elde edilen voltamogramlar.....	113
Şekil 4.37.	BOS8 hidrolizati için AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde elde edilen voltamogram A) BOS8 hidrolizati voltamogramı B) BOS8 hidrolizati üzerine a: $2,02 \times 10^{-6}$ b: $4,01 \times 10^{-6}$ c: $7,95 \times 10^{-6}$ M derişimlerinde standart 3-NT eklenmesi ile elde edilen voltamogramlar.....	114
Şekil 4.38.	BOS9 hidrolizati için AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde elde edilen voltamogram A) BOS9 hidrolizati voltamogramı B) BOS9 hidrolizati üzerine a: $2,02 \times 10^{-6}$ b: $4,01 \times 10^{-6}$ c: $7,95 \times 10^{-6}$ M derişimlerinde standart 3-NT eklenmesi ile elde edilen voltamogramlar.....	114
Şekil 4.39.	Klasik kapiler elektroforez ve BHÖS yönteminin basit bir karşılaştırması; $4,052 \times 10^{-5}$ M 3-Nitrotirozin için 0,5 mM CTAB içeren 0,15 M pH 7 fosfat tamponunda 25 °C ve -15 kV ayırma potansiyelinde (a) Klasik kapiler elektroforez (b) BHÖS-CE yönteminde elde edilen elektroforegramlar	116
Şekil 4.40.	Standart 3-NT çözeltisi ($2,027 \times 10^{-8}$ M) için 214,40 nm dalga boyunda elde edilen elektroforegram.....	117
Şekil 4.41.	Standart 3-NT çözeltisi ($2,027 \times 10^{-8}$ M) için 208,50 nm dalga boyunda elde edilen elektroforegram.....	117
Şekil 4.42.	Standart 3-NT çözeltisi ($2,027 \times 10^{-8}$ M) için 214,40 nm dalga boyunda elde edilen elektroforegramda 2,070. dk daki spektrum.....	117
Şekil 4.43.	Standart 3-NT çözeltisi ($2,027 \times 10^{-8}$ M) için 214,40 nm dalga boyunda elde edilen elektroforegramda 2,140. dk daki spektrum.....	118

Şekil 4.44.	Standart 3-NT çözeltisi ($2,027 \times 10^{-8}$ M) için 208,50 nm dalga boyunda elde edilen elektroforegramda 1. pik için gösterilen spektrum.....	118
Şekil 4.45.	Standart 3-NT çözeltisi ($2,027 \times 10^{-8}$ M) için 208,50 nm dalga boyunda elde edilen elektroforegramda 2. pik için gösterilen spektrum.....	118
Şekil 4.46.	Standart 3-NT analizi ile elde edilen pikte gözlenen omuzun 3-NT pik alanına katkısı olmaktadır.....	120
Şekil 4.47.	Standart 3-NT analizinde pik yüksekliği esas alındığında, standart maddede gözlenen omuzun cevaba katkısı olmamaktadır.....	120
Şekil 4.48.	Farklı pH değerlerinde $4,052 \times 10^{-5}$ M 3-Nitrotirozin için 0,5 mM CTAB içeren 0,15 M fosfat tamponunda 25 °C ve -15 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 30s enjeksiyon koşulunda elde edilen elektroforegramlar. a) 6.4 b) 6.6 c) 7.0 d) 7.5 e) 8.0 f) 8.5.....	121
Şekil 4.49.	Farklı pH değerlerinde $4,052 \times 10^{-5}$ M 3-Nitrotirozin için 0,5 mM CTAB içeren 0,15 M fosfat tamponunda 25 °C ve -15 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 30s enjeksiyon koşulunda elde edilen pik boylarının karşılaştırılması.....	122
Şekil 4.50.	Farklı CTAB derişimlerinde 0,15 M fosfat tamponunda 25 °C ve -15 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 30s enjeksiyon koşulunda dimetilsülfoksit için alınan elektroforegramlar a) CTAB içermeyen elektrolit b) 0,5 mM CTAB c) 1 mM CTAB d) 1,5 mM CTAB içeren elektrolit.....	123
Şekil 4.51.	Farklı CTAB derişimlerinde 0,15 M pH 7,0 fosfat tamponunda 25 °C ve -15 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 30s enjeksiyon koşulunda dimetilsülfoksit kullanılarak hesaplanan EOF hızlarının CTAB derişimi ile değişimi.....	123
Şekil 4.52.	Farklı enjeksiyon sürelerinde $8,108 \times 10^{-7}$ M 3-NT için 0,5 mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30 °C ve -20 kV ayırma potansiyelinde elde edilen elektroforegramlar a) 200 s b) 300 s c) 400 s d) 500 s e) 600 s.....	125
Şekil 4.53.	Farklı enjeksiyon sürelerinde 0,5 mM CTAB içeren 0,15 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30 °C ve -20 kV ayırma potansiyelinde pik yüksekliğinin değişimi.....	126
Şekil 4.54.	Kalibrasyon eğrisi için 3-NT için $8,108 \times 10^{-9} - 1,014 \times 10^{-7}$ M derişim aralığında 0,5 mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyonla elde edilen elektroforegramlar.....	127
Şekil 4.55.	CTAB ile BHÖS kapiler elektroforez yönteminde 3-NT için 0,5mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyonla $8,108 \times 10^{-9} - 1,014 \times 10^{-7}$ M derişim aralığında elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	127
Şekil 4.56.	Farklı pH değerlerinde $4,054 \times 10^{-6}$ M 3-Nitrotirozin için 1 mM DETA içeren 0,05 M fosfat tamponunda 25 °C ve -20 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 30s enjeksiyon koşulunda elde edilen pik boylarının karşılaştırılması.....	128

Şekil 4.57.	Farklı pH değerlerinde $4,052 \times 10^{-6}$ M 3-Nitrotirozin için 1 mM DETA içeren 0,05 M fosfat tamponunda 25 °C ve -20 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 30s enjeksiyon koşulunda elde edilen elektroforegramlar. a) 5,0 b) 6,0 c) 6,5 d) 7,0 e) 7,5 f) 8,0 g) 8,5 h) 9,0.....	129
Şekil 4.58.	Farklı DETA derişimlerinde 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 25 °C ve -20 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 30s enjeksiyon koşulunda dimetilsülfoksit kullanılarak hesaplanan EOF hızlarının belirlenmesi ile ilgili elektroforegramlar a) 0,5 mM b) 1mM c) 2 mM d) 3 mM e) 4 mM f) 5 mM.....	130
Şekil 4.59.	Farklı DETA derişimlerinde dimetilsülfoksit kullanılarak ölçülen EOF hızlarının değışimi.....	131
Şekil 4.60.	Farklı enjeksiyon süreleri kullanıldığında 1 mM DETA içeren 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 25 °C ve -20 kV ayırma potansiyelinde 50mbar basınçta elde edilen elektroforegramlar.....	133
Şekil 4.61.	Farklı enjeksiyon sürelerinde $4,054 \times 10^{-6}$ M M 3-NT için 1 mM DETA içeren 0,05 M fosfat tamponunda 25 °C ve -20 kV ayırma potansiyelinde pik yüksekliğinin değışimi.....	134
Şekil 4.62.	Standart 3-NT çözeltisi için ($2,027 \times 10^{-12}$ M) 1 mM DETA içeren 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 20 °C ve -30 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 300s enjeksiyon süresinde elde edilen elektroforegram.....	135
Şekil 4.63.	Standart 3-NT çözeltisi için ($4,054 \times 10^{-12}$ M) 1 mM DETA içeren 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 20 °C ve -30 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 300s enjeksiyon süresinde elde edilen elektroforegram.....	135
Şekil 4.64.	Standart 3-NT çözeltisi için ($2,027 \times 10^{-11}$ M) 1 mM DETA içeren 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 20 °C ve -30 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 300s enjeksiyon süresinde elde edilen elektroforegram.....	135
Şekil 4.65.	Standart 3-NT çözeltisi için ($4,054 \times 10^{-11}$ M) 1 mM DETA içeren 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 20 °C ve -30 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 300s enjeksiyon süresinde elde edilen elektroforegram.....	136
Şekil 4.66.	Standart 3-NT çözeltisi için ($8,108 \times 10^{-11}$ M) 1 mM DETA içeren 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 20 °C ve -30 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 300s enjeksiyon süresinde elde edilen elektroforegram.....	136
Şekil 4.67.	Standart 3-NT çözeltisi için ($2,027 \times 10^{-10}$ M) 1 mM DETA içeren 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 20 °C ve -30 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 300s enjeksiyon süresinde elde edilen elektroforegram.....	136
Şekil 4.68.	Fosfat tamponunda (0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0) 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında plazma üzerine standart maddeler ilave edilerek elde edilen elektroforegramlar a) Seyreltilmiş plazma b) $a+1,014 \times 10^{-7}$ M 3-NT c) $a+ 4,05 \times 10^{-7}$ M 3-NT.....	139

Şekil 4.69.	Plazma 4 numunesi için (1:1000 oranında seyreltme) 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram.....	140
Şekil 4.70.	Plazma 5 numunesi için (1:1000 oranında seyreltme) 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram.....	140
Şekil 4.71.	Plazma 6 numunesi için (1:1000 oranında seyreltme) 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram.....	141
Şekil 4.72.	Fosfat tamponunda (0,05mM CTAB içeren 0,10 M pH 7,0) 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında plazma hidrolizatu üzerine standart maddeler ilave edilerek elde edilen elektroforegramlar a) Seyreltilmiş plazma b) $a+2,53 \times 10^{-9}$ M 3-NT c) $a+3,80 \times 10^{-9}$ M 3-NT.....	142
Şekil 4.73.	Fosfat tamponunda (0,05mM CTAB içeren 0,10 M) 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında plazma numunesi için elde edilen elektroforegramlar a) pH 7,0 b) pH 8,5.....	143
Şekil 4.74.	Fosfat tamponunda (0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0) 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında BOS numunesi üzerine standart madde ilavesinde elde edilen elektroforegramlar a) BOSnumunesi b) $a+2,03 \times 10^{-7}$ M 3-NT c) $a+4,05 \times 10^{-7}$ M 3-NT.....	146
Şekil 4.75.	BOS1 numunesi için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram.....	147
Şekil 4.76.	BOS2 numunesi için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram.....	147
Şekil 4.77.	BOS3 numunesi için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram.....	147
Şekil 4.78.	BOS6 numunesi için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram.....	148
Şekil 4.79.	BOS8 numunesi için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram.....	148
Şekil 4.80.	BOS10 numunesi için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram.....	148
Şekil 4.81.	BOS11 numunesi için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram.....	149

Şekil 4.82.	BOS12 numunesi için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram.....	149
Şekil 4.83.	BOS13 numunesi için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram.....	149
Şekil 4.84.	BOS14 numunesi için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram.....	150
Şekil 4.85.	Fosfat tamponunda (0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0) 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegramlar a) BOS hidrolizati b) a+ $8,11 \times 10^{-8}$ M 3-NT.....	151
Şekil 4.86.	BOS1 hidrolizati için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram.....	151
Şekil 4.87.	BOS2 hidrolizati için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram.....	152
Şekil 4.88.	BOS3 hidrolizati için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram.....	152
Şekil 4.89.	BOS4 hidrolizati için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram.....	152
Şekil 4.90.	BOS5 hidrolizati için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram.....	153
Şekil 4.91.	BOS8 hidrolizati için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram.....	153
Şekil 4.92.	BOS9 hidrolizati için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram.....	153
Şekil 5.1.	Nitrofenollerin indirgenmesi ile ilgili tepkime mekanizmaları (Zuman ve ark., 1969).....	155
Şekil 5.2.	3-NT 'nin indirgenmesi ile öngörülen mekanizma.....	156

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.1.	3-NT ve tirozin için pKa değerleri.....	4
Çizelge 2.2.	Değişkenler ve Düzeyleri.....	58
Çizelge 2.3.	Deneysel Sonuçta Elde Edilen %Verim.....	58
Çizelge 2.4.	Etkileşimleri ve Verimi Gösteren Deneysel Tasarım.....	59
Çizelge 3.1.	Kullanılan kimyasal maddeler.....	61
Çizelge 3.2.	Kare dalga parametreleri için seçilen değerler.....	64
Çizelge 3.3.	Deneysel Tasarım Şeması.....	64
Çizelge 3.4.	AdSKDV ile 3-NT geri alınabilirliğini incelemek için yapılan deneyde kullanılan veriler.....	68
Çizelge 3.5.	AdSKDV ile plazmada 3-NT geri alınabilirliğini incelemek için yapılan deneyde kullanılan veriler.....	69
Çizelge 3.6.	AdSKDV ile özütleme işlemi yapılmış plazma analizlerinde kullanılan protein miktarları.....	70
Çizelge 3.7.	AdSKDV ile özütleme işlemi yapılmış BOS analizlerinde kullanılan protein miktarları.....	71
Çizelge 3.8.	CTAB ile büyük hacimli örnek sıkıştırmada çalışma değerlerinin kodlanmış düzeyleri.....	73
Çizelge 3.9.	$4,054 \times 10^{-5}$ M 3-NT için Çizelge 3.9' da verilen değerler kullanılarak hazırlanan tasarım şeması.....	73
Çizelge 3.10.	Belirtilen enjeksiyon sürelerinde $50 \mu\text{m}$ iç çaplı 62cm boyundaki kolonun dolma oranları.....	74
Çizelge 3.11.	DETA ile büyük hacimli örnek sıkıştırmada çalışma değerlerinin kodlanmış düzeyleri.....	75
Çizelge 3.12.	$4,054 \times 10^{-5}$ M 3-NT için Çizelge 3.12. de verilen değerler kullanılarak hazırlanan tasarım şeması.....	75
Çizelge 3.13.	Belirtilen enjeksiyon sürelerinde $75 \mu\text{m}$ iç çaplı 57 cm boyundaki kolonun dolma oranları.....	76
Çizelge 4.1.	KDV ile $1,98 \times 10^{-5}$ M 3-NT için farklı destek elektrolitlerde ve pH tamponlarında elde edilen piklerin potansiyelleri ve akım farkı değerleri.....	84
Çizelge 4.2.	KDV ile $1,00 \times 10^{-5}$ M 3-NT için farklı pH değerlerinde elde edilen akım farkları.....	84
Çizelge 4.3.	KDV ile $1,0 \times 10^{-8}$ M 3-NT için pH 9,00 değerinde farklı tampon derişimlerinde elde edilen akım farkları.....	85
Çizelge 4.4.	Kemometrik tasarlanmış deney sonucunda $6,00 \times 10^{-7}$ M 3-NT için elde edilen etkileşim, akım farkı ve b katsayıları.....	87
Çizelge 4.5.	Kare dalga yöntemi ile 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 3-NT için elde edilen değerler.....	88
Çizelge 4.6.	Civa elektrotta $3,68 \times 10^{-7}$ M 3-NT için dönüşümlü voltametri çalışmalarından elde edilen değerler.....	90
Çizelge 4.7.	GCE da $1,50 \times 10^{-4}$ M 3-NT için dönüşümlü voltametri çalışmalarından elde edilen değerler.....	93

Çizelge 4.8.	AdSKDV yöntemi ile fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $2,36 \times 10^{-8}$ M 3-NT için farklı damla boyutları kullanıldığında elde edilen değerler.....	96
Çizelge 4.9.	AdSKDV yöntemi ile fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $2,36 \times 10^{-8}$ M 3-NT için farklı karıştırma hızları kullanıldığında elde edilen değerler.....	97
Çizelge 4.10.	AdSKDV yöntemi ile fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $2,36 \times 10^{-8}$ M 3-NT için 1000 rpm karıştırma hızında farklı biriktirme potansiyelleri kullanıldığında elde edilen değerler.....	99
Çizelge 4.11.	AdSKDV yöntemi ile fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $1,59 \times 10^{-8}$ M 3-NT için -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 1000 rpm karıştırma hızında farklı biriktirme süreleri kullanıldığında elde edilen değerler.....	100
Çizelge 4.12.	AdSKDV yöntemi ile 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V potansiyelde 20s biriktirme sonucu 3-NT için elde edilen akım farkı değerleri.....	101
Çizelge 4.13.	Fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $8,02 \times 10^{-9}$ M 3-NT için 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde geri alınabilirlik deneylerinde bulunan derişim değerleri.....	102
Çizelge 4.14.	Yöntemin sağlamlığı ve güçlülüğünü belirlemek için yapılan çalışmalarda bulunması gereken değerler ile bulunan değerlerin kıyaslanması.....	103
Çizelge 4.15.	AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde standart 3-NT için elde edilen değerler.....	106
Çizelge 4.16.	AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde eklenmiş plazmada 3-NT için elde edilen değerler.....	106
Çizelge 4.17.	AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde plazma numuneleri için elde edilen değerler.....	108
Çizelge 4.18.	AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde BOS numuneleri için elde edilen değerler.....	115
Çizelge 4.19.	CTAB kullanılan sıkıştırma yönteminde farklı pH değerlerinde $4,052 \times 10^{-5}$ M 3-NT için elde edilen pik boyları ve alıkonma süreleri.....	121
Çizelge 4.20.	Farklı CTAB derişimlerinde dimetilsülfoksit kullanılarak hesaplanan EOF hızları.....	122
Çizelge 4.21.	Kemometrik tasarlanmış deney sonucunda elde edilen etkileşim, pik yüksekliği ve b katsayıları.....	124

Çizelge 4.22.	Belirtilen enjeksiyon sürelerinde $8,108 \times 10^{-7}$ M 3-NT için 50 μ m iç çaplı 62cm boyundaki kolonun dolma oranları ve okunan pik yüksekliği değerleri.....	125
Çizelge 4.23.	BHÖS yönteminde 0,5mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında 3-NT için elde edilen değerler.....	126
Çizelge 4.24.	DETA kullanılan sıkıştırma yönteminde farklı pH değerlerinde $4,054 \times 10^{-6}$ M 3-NT için elde edilen pik boyları ve alıkonma süreleri.....	128
Çizelge 4.25.	Farklı DETA derişimlerinde 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 25 °C ve -20 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 30s enjeksiyon koşulunda dimetilsülfoksit kullanılarak hesaplanan EOF hızları.....	130
Çizelge 4.26.	Kemometrik tasarlanmış deney sonucunda 1 mM DETA içeren 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 25 °C ve -20 kV ayırma potansiyelinde 50mbar 300 s enjeksiyon koşulunda elde edilen etkileşim, pik yüksekliği ve b katsayıları.....	131
Çizelge 4.27.	Belirtilen enjeksiyon sürelerinde 1 mM DETA içeren 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 25 °C ve -20 kV ayırma potansiyelinde 50mbar basınçta 75 μ m iç çaplı 57 cm boyundaki kolonun dolma oranları ve elde edilen pik yüksekliği değerleri.....	132
Çizelge 4.28.	Standart 3-NT çözeltileri için 1 mM DETA içeren 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 20 °C ve -30 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 300s enjeksiyon süresinde elektroforegramlardan okunan pik alanı ve pik yükseklikleri.....	137
Çizelge 4.29.	Geri alınabilirlik denemelerinde 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında $1,014 \times 10^{-8}$ M derişimde 3-NT için bulunması beklenen derişim ve bulunan derişim değerlerinin kıyaslanması.....	137
Çizelge 4.30.	0,05 mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında $1,014 \times 10^{-8}$ M derişimde 3-NT için yöntemin sağlamlığı ve güçlülüğünü belirlemek için yapılan çalışmalarda bulunması gereken değerler ile bulunan değerlerin kıyaslanması.....	138
Çizelge 4.31.	Doğrudan enjekte edilen plazma numuneleri için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen değerler.....	141
Çizelge 4.32.	Fosfat tamponunda (0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0) 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında 3-NT hidrolizatı için elde edilen değerler.....	143
Çizelge 4.33.	Fosfat tamponunda (0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0) 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında eklenmiş plazma numuneleri için elde edilen değerler.....	144

Çizelge 4.34.	BHÖS- KE yönteminde fosfat tamponunda (0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0) 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında plazma numuneleri için elde edilen değerler.....	145
Çizelge 4.35.	Doğrudan BOS analizleri için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında alınan sonuçlar.....	150
Çizelge 4.36.	Özütleme işlemi yapılmış BOS numuneleri için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen değerler.....	154
Çizelge 5.1.	Kare dalga yöntemi için kalibrasyon eğrisi ile yapılan çalışmalar sonucu elde edilen değerler.....	156
Çizelge 5.2.	Plazma numuneleri için AdSKDV yöntemi ve BHÖS KE yöntemiyle elde edilen sonuçlar.....	158

1. GİRİŞ

Serbest radikallerin biyolojik materyallerdeki varlığı yaklaşık 50 yıl kadar önce keşfedilmiştir (Çakatay ve ark., 2004). Serbest radikaller, hücrelerde iç ve dış kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Serbest radikaller veya serbest radikallerin canlı yapısında oluşturduğu ürünler, oluşumuna neden olan maddelerin belirteci olabileceğinden toksikolojik açıdan da önemlidir (Mercan, 2004). DNA' nın radikal etkili hasarının önemi, son yıllarda bu konudaki çalışmaların sayısının artışından anlaşılabilir (Breen ve Murphy, 1995).

Radikal aracılı protein oksidasyonu XX. yy. ın ortalarından beri araştırılmasına rağmen, oksidasyon tepkime ürünlerinin; *in vivo* oksidatif hasarın belirteçleri olarak kullanılması ancak son yıllarda gerçekleşmiştir. Bunun nedeni oluşan ürünlerin yapılarının bilinmemesi ve bu ürünleri biyolojik materyalde saptayacak duyarlı yöntemlerin var olmamasıdır (Davies ve ark., 1999).

Oksidasyon araştırmalarında bugün en büyük iddialardan biri *in vivo* oksidatif stresin tayinidir. Proteinler tüm hücre ve dokularda yer almaları ve oksidatif modifikasyona duyarlı olmaları nedeniyle oksidatif stresin faydalı bir işaretleyicisi olarak hizmet edebilirler. Reaktif oksijen türleri biyolojik moleküllerin tümüne zarar verebilir. Bununla birlikte proteinler muhtemelen oksidatif hasara en duyarlı moleküllerdir ve hasarın etkisi diğer moleküllere göre oldukça fazladır (Gülbahar, 2007).

Pek çok sayıda mekanizmanın, protein oksidasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan başlıca moleküler mekanizmalar: protein karbonil (PCO) oluşumu ile karakterize edilen metal katalizli protein oksidasyonu, protein tiyol (P-SH) gruplarının kaybı, 3-nitrotirozin (3-NT) ve ileri oksidasyon ürünlerinin oluşumu olarak sıralanabilir (Kayalı ve ark., 2004). Burada bahsi geçen bu maddeler biyoişaretleyici olarak tanımlanmaktadırlar (Çakatay ve Kayalı, 2004).

Yapılan bu çalışmada, son dönemde Alzheimer hastalığı, Amiyotrofik lateral skleroz ve Parkinson gibi yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen hastalıklarda biyoişaretleyici özellik gösterdiği belirtilen (Çakatay ve Kayalı, 2004) 3-NT analiz edilmek üzere seçilmiştir.

Denemeler için iki farklı teknikten faydalanılmıştır. Bunlardan ilki basit ve ucuz, elektrokimyasal tekniklerden biri olan voltametridir. Diğer teknik ise karmaşık ve düşük

düzeydeki maddelerin analizi için küçük hacimlerde örnek kullanımına olanak veren, otomasyonu kolay, ucuz ve yüksek ayırıcılık özelliğine sahip kapiler elektroforez tekniğidir. Çalışmada bu iki teknik kullanılarak dört farklı yöntem geliştirilmiştir. Voltametri ile kare dalga voltametrisi (KDV) ve adsorptif sıyırma kare dalga voltametrisi (AdSKDV) ile analiz yöntemleri, kapiler elektroforez ile de büyük hacimli örnek sıkıştırma (BHÖS) yöntemi geliştirilmiştir. BHÖS yöntemi için iki farklı elektroosmotik akış değiştirici kullanarak çalışmalar yapılmıştır. Tüm yöntemlerde deneysel koşulların belirlenmesinde kemometrik yöntemlerden faydalanılmıştır. Elde edilen sonuçlar istatistiksel yöntemlerle kıyaslanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Bu başlık altında 3-NT oluşumu, kimyasal özellikleri ve analiz yöntemleri hakkında bilgilendirme yapılmıştır. Devam eden kısımda bu tez çalışmasında yararlanılan teknikler olan voltametri, kapiler elektroforez ve deney tasarımı ve koşullarının belirlenmesinde kullanılan kemometri ilkeleri açıklanmıştır.

2.1. 3-Nitrotirozin (3-NT)

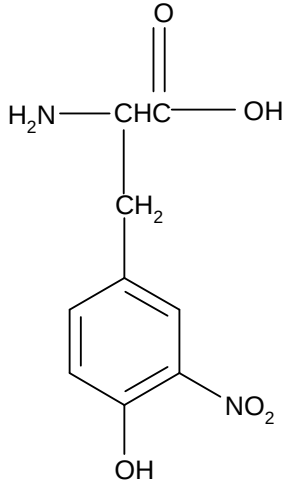
Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle süperoksit grubuna ($O_2^{\cdot-}$) indirgenir. Azot oksit radikali de ($NO^{\cdot}$), farklı ve karmaşık biyolojik süreçlerde yer alan bir diatomik serbest radikaldir. $NO^{\cdot}$ atmosferik azot gazlarının yanma süreci sonunda esas ürün olarak oluşur. Ayrıca, L-arjininden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile ve reaktif azot türlerinin (RNS) karışımının olduğu midede, asit ile azotun tepkimesi gibi enzimatik olmayan tepkimelerden *in vivo* olarak üretilebilir (Pagliai ve ark., 1998).

Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), azot oksit ($NO^{\cdot}$) ile güçlü bir yükseltgeyici olan peroksinitriti oluşturmak için reaksiyon verebilir.



Peroksinitritin kanser hücrelerine karşı savunmada veya parazitler, virüsler, bakteri ve kanserli hücrelerin neden olduğu enfeksiyona karşı, iltihaplı hücreler tarafından üretildiğine inanılır. Fakat peroksinitrit hücrenin kendisine ve dokulara da zarar vermektedir (Duncan, 2003).

Peroksinitrit serbest veya proteine bağlı tirozin kalıntısı ile kararlı bir ara ürün olan 3-NT (Şekil 2.1) oluşturmak üzere tepkime verir. 3-NT bir çok çalışmada, özel bir protein nitratlayıcı ajan olan tetranitrometan uygulanmış deney hayvanlarında, serum proteinlerinde (albumin dahil) doza bağlı artış göstermesi nedeniyle; $NO^{\cdot}$ ortamlı doku tahribini belirlemek için uygun bir işaretleyici olarak önerilmektedir (Pagliai ve ark., 1998).



Şekil 2.1. 3-nitrotirozinin açık yapısı

2.1.1. 3-Nitrotirozinin Kimyasal Yapısı

Çizelge 2.1’ de, 3-nitrotirozin için kaynaklarda verilen pKa değerleri sunulmuştur. Bu değerler amino asitlerin, özellikle tirozinin pKa değerlerine yakın değerlerdir (Maeso ve ark., 2004)

Çizelge 2.1. 3-NT ve tirozin için pKa değerleri

	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃
3-NT	2,20	7,20	9,11
Tirozin	2,20	9,11	10,07

2.1.2. 3-Nitrotirozinin Tayin Yöntemleri

3-NT’ nin tayini ve belirlenmesi için immün teknikler, çeşitli belirleme tekniklerinin birlikte kullanıldığı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve tek basamaklı veya tandem kütle spektrometrisi (MS) ile eşleştirilmiş gaz (GC) veya sıvı kromatografiyi (LC) içeren çeşitli yöntemler kullanılır. Biyolojik örneklerde 3-NT analizi için yapılan denemeler, düşük alt teşhis sınırını, kesinliği ve doğruluğu ve ayrıca bu konularla ilgili olarak geçerlilik parametrelerini sağlamalıdır. Ayrıca 3-NT’ nin deneysel koşullar nedeniyle oluşması, analizi daha karmaşık hale getirmektedir ve bu durum tüm verileri geçersiz kılacak potansiyele sahiptir.

2.1.2.1. İmmün Yöntemler

İmmün yöntemlerden doku ve sıvılarda 3-NT tayini için oldukça çok veri elde edilmiştir. Girault ve ark., (2001) yaptıkları çalışmalarda yeni bir anti-nitrotirozin

monoklonal antikor geliştirip, karakterize etmişlerdir ve hem bu nitratlama reaksiyonlarından etkilenen merkezlerin belirlenmesi; hem de kapsamlı bir analitik teknik vasıtasıyla bu antikorun özgünlüğünü teyit etmek için bir iltihabi modele uygulamışlardır. Başka bir grup ELİSA denemelerini kullanarak diabetik plazmada artan 3-NT oluşumunu bildirmişlerdir (Ceriello ve ark., 2001). Tüm bu çalışmalarda, titiz geçerlilik denemelerinin yokluğu, hasta dokuda veya eklenmiş örnekte immunoreaktif proteinlerin arasındaki fark araştırmacılar da yöntemin seçiciliğinde şüpheler oluşturur. Ayrıca bu çalışmaların çoğunda, yöntemin güvenilirliğinin anlaşılması zordur ve alt teşhis sınırı (LOD), alt tayin sınırı (LOQ) ve doğrusalılık gibi bazı anahtar parametreler belirtilmemiştir. Bunun yanı sıra, yöntemin karmaşık bir matrikste yalnızca nitratlanmış türleri özel olarak ölçme yeteneği açıkça belirtilemez. Çünkü bu durum, antikorun yapısı, örneğin türü, miktarı, örnekteki diğer bileşenler ve zaman gibi birçok etkene bağlıdır ve her bir deneme için seçiciliğin belirtilmesi gereklidir. Seçicilik, doğruluk ve kesinliği titizlikle belirtmeyen bu yöntemler yarı-nicel olarak düşünülürler (Duncan, 2003). Khan ve ark. (1998) da kendi yarışmalı ELISA yaklaşımlarının sınırlarını belirlemişler ve yarı-nicel olarak tanımlamışlardır.

2.1.2.2. Kromatografik Yöntemler

Kromatografik yöntemler, canlı bileşenleri ve canlı vücudunda bulunabilecek bileşenleri tayin etmede rutin olarak kullanılabilen yöntemlerdir. 3-NT' nin analizi için de çeşitli kromatografik teknikler kullanılmıştır. Bunlar gaz kromatografik (GC), sıvı kromatografik (LC) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografik (HPLC) tekniklerdir. Bu teknikler kullanılırken yapılan çalışmalarda farklı detektörler kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar temel olarak şöyle sınıflandırılabilir:

2.1.2.2.a. Kütle Spektrometrik (MS) Detektörlü Analiz Yöntemleri

- **GC-MS (-MS)** GC-MS ile yapılmış bir çalışmada 3-NT düzeyi ile Alzheimer hastalığı ve amiyotrofik lateral skleroz (ALS) hastalığı arasında ilişki kurulmaya çalışılmış, bu amaçla beyin omurilik sıvısında (BOS) denemeler yapılmıştır (Ryberg ve ark., 2004). Benzer bir hastalık ilişkisi çalışması da Larstad ve ark. (2005) tarafından GC-MS-MS tekniği kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada astım hastalarında nefeste 3-NT düzeyi incelenmiş ve hastalık ile 3-NT düzeyi arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır. Crowley ve ark. (1998) da 3-NT yi GC-MS tekniğini kullanarak sığır

serum albüminde ve fare kalbinde analiz etmiştir. Bu yöntemde 3-NT iyon değişim kromatografisi ile izole edildikten sonra 3-aminotirozine indirgenmiş, türevlendirilmiş ve analiz edilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada MS detektör için yeni bir yöntemle sentezlenmiş farklı bir iç standart kullanılmıştır (Jiang ve ark., 1998). Çalışmada 3-NT, pentafloro benzil türevi olarak kan pıhtısında tayin edilmiştir. Tsikas ve ark. (2005) çalışmalarında 3-NT' yi nitrit, nitrat ve L-tirozinden ayırıp belirlemeyi amaçlamışlardır. Gönüllülerden aldıkları idrar numunelerinde çalışmışlar ve 3-NT alımını takiben maddenin ne kadar süre sonunda sıvıda belirlenebildiğini izlemeye çalışmışlardır.

- **LC- MS** Delatour ve ark. (2002) yaptıkları denemelerde fare plazma proteinlerinde 3-NT ve tirozin düzeylerini eşzamanlı belirlemek ve yapay 3-NT oluşumunu incelemek için LC-MS tekniğini kullanmışlardır. Bu amaçla $^{13}\text{C}_9$ izotopu ile işaretlenmiş tirozin ve 3-NT kullanılmıştır. Başka bir çalışmada da yoğunlaştırılmış nefeste katı faz özütlemeye ile temizleme ve önderiştirme yapıldıktan sonra 3-NT, LC-MS tekniği ile analiz edilmiştir (Göen ve ark., 2005). Elde edilen sonuçları GC-MS/MS tekniğinden elde edilen sonuçlarla karşılaştırmışlar ve birçok yönden LC-MS tekniğinin üstün olduğu sonucuna varmışlardır.

- **HPLC- MS (-MS)** Kütle spektrometre belirleme yöntemi HPLC tekniği ile eşleştirilerek de kullanılmıştır. Orhan ve ark. (2004) nın yaptığı çalışmada 3-NT idrar numunelerinde hiçbir ön muamele gerektirmeksizin analiz edilmiştir. Ayrıca 3-NT yanında tirozinden oluşabilecek birçok bileşenin de tayinini başarmışlardır.

Kütle spektrometresi kullanılarak yapılmış olan bu çalışmaların oldukça başarılı görünmelerine rağmen çalışma açısından bu yöntemlerin de birçok eksikliği vardır. Örneğin gaz kromatografik yöntemlerde gerekli uçuculuğu sağlamak oldukça önemlidir. Bunun yapılabilmesi için madde ve numune üzerinde birçok işlemin yapılması gerekmektedir. Benzer şekilde HPLC ve LC tekniklerinde analizin yapılabilmesi için numunenin analiz kolonuna enjekte edilmeden önce temizlenmesi ve bileşenin hazır hale getirilmesine ihtiyaç duyulur. Bu aşamalarda da ilave edilen asit ve diğer kimyasalların etkisiyle yapay 3-NT oluşumu söz konusudur. Bu da analiz için istenmeyen bir durumdur, çünkü oluşan bu yapay form, 3-NT düzeyine katkıda bulunmaktadır. Bunların yanında kütle spektrometresi ve kromatografik tekniklerle çalışmanın maliyetinin çok yüksek olduğu da göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca kütle spektrometresi ile belirlemenin yapılabilmesi için, özel ve pahalı olan izotopların elde edilmesi gereklidir.

2.1.2.2.b. UV Detektörlü Analiz Yöntemleri

- **LC-UV** Kromatografik yöntemler daha ekonomik olmaları nedeniyle UV belirleme yöntemleriyle çok eşleştirilmiştir. Bu şekilde eşleştirilmiş LC-UV tekniği ile 3-NT tayini için yapılmış çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmalara bir örnek olarak Du ve ark. (2004) nın yaptığı çalışma gösterilebilir. Du, 3-NT ve tirozinin izomerleri için bir tayin yöntemi geliştirmiş ve idrar numunelerinde denemeler yapmıştır. Bu amaçla yüzey aktif maddeleri kullanarak özütleme ve önderiştirme yapmış ve bu işlem sonrasında numune enjekte edilerek analiz başarılmıştır.

Kromatografik yöntemlerin dezavantajlarının yanısıra UV belirleme yönteminin çok düşük düzeylere inememesi bu yöntemler için ilave bir eksiklik doğurmuştur.

2.1.2.2.c. Elektrokimyasal Detektörlü (ECD) Analiz Yöntemleri

Elektrokimyasal detektörlü analiz yöntemleri düşük teşhis ve tayin sınırları dolayısıyla son zamanlarda sıklıkla kullanılan yöntemler arasındadır. Bu nedenle düşük düzeydeki 3- NT tayini için ilgi çekici olmuştur. Yapılan bir denemede sıgır serum albümin ve fare karaciğerinde 3-NT analizi için HPLC-ECD yöntemi geliştirilmiştir (Sodum ve ark., 2000). Bu amaçla 3-NT önce bir amalgam elektrotta indirgenmiş, ardından bir camı karbon elektrotta (GCE) de yükseltgenerek elde edilen akım değerleri okunmuştur. Alt teşhis sınırı 50 fmol olarak belirlenmiştir. Benzer bir çalışma Hensley ve ark. (2000) tarafından hücre kültürü, beyin dokusu ve beyin ince damarlarında 3-NT tayini için yapılmıştır. Çalışmada 3-NT yanında 5-nitro- γ -takoferol de incelenmiştir. Aynı kişiye ait başka bir çalışmada da proteine bağlı 3-NT belirlemesi için HPLC-ECD yöntemi kullanılmıştır (Hensley ve ark., 1997). Yapılmış diğer çalışmalarda 3-NT öncelikle 3-amino-tirozin şekline indirgenmiş, daha sonra elektrokimyasal detektör kullanarak analiz edilmiştir (Shigenaga ve ark., 1997, Ohshima ve ark. 1999).

Elektrokimyasal detektör ile belirleme yapılırken genelde önce 3-NT' nin 3-amino-tirozine dönüşümü yapılır, daha sonra analiz aşamasına geçilir. 3-NT' nin indirgenme aşamasındaki işlemler de yapay 3-NT oluşumuna sebep olabileceği için analizde hataya neden olabilir. Bu yöntemlerde elektrokimyasal detektörlerin kromatografik cihazlarla eşleştirilmesi, kromatografik cihazların pahalılığından kaynaklanan olumsuzlukları da barındırmasını sağlar.

2.1.2.3. Elektroforetik Teknikler

Elektroforetik teknikler birçok üstünlüğünün yanı sıra son zamanlarda bu alandaki gelişmeler nedeniyle tercih edilir teknikler haline gelmiştir. 3-NT analizi için de bu tekniklerin kullanılması ile yeni analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Maeso ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada büyük hacimli örnek sıkıştırma sistemini kullanarak fare idrarında 3-NT analizi için yöntem geliştirmiştir. Bu yöntemde belirleyici olarak UV detektörü kullanılmıştır. Cihazda ters faz polarite kullanılmıştır. Benzer bir çalışmada da 3-NT yanında 3-klorotirozin, orto-tirozin, meta-tirozin, 3-hidroksifenilasetik asit, tirozin, fenilalanin, dihidroksifenilalanin ve triptofan da analiz edilmiştir (Tábi ve ark., 2005).

Kapiler elektroforez aminoasit gibi iyonlaşabilen türler için en uygun ayırma tekniğidir. Örnek türevlendirmesi gibi aşamaları içermez ve yüksek ayırma verimi sağlar. Ayrıca analiz için geçen zaman daha kısadır (Tábi ve ark., 2005). Karmaşık matrikslerde bile ön işlem olmadan örneği ayırma yeteneğine sahiptir. Çok küçük numune hacimleri analiz için yeterli olabilmektedir. Buna ek olarak analiz için kullanılan kimyasalların hacimleri de özellikle kromatografik teknikler ile karşılaştırıldığında çok azdır (Maeso ve ark., 2004). Fakat bu tekniğin en büyük eksikliği duyarlılığın düşük olmasıdır (Landers, 1997a). Bunun nedeni de kullanılan kapiler kolonlardır.

2.2. Voltametri

Elektrokimyasal yükseltgenme-indirgenme süreci tabiatta canlı yapısından, inorganik yapılara kadar birçok olayda yer almaktadır. Örneğin hücresel yükseltgenme indirgenme süreci, çok sayıda biyokimyasal tepkimede yer alır ve birçok patolojik olayda ve klinik durumlarda anahtar rol oynar. Biyolojik kısımlarda var olan tüm yükseltgenme-indirgenme olaylarının açıklığa kavuşması farmasötik olayları tam olarak anlamamıza ve yönlendirmemize yardımcı olacaktır (Hrbac ve Kohen, 2000). Bu nedenle biyokimyasal yükseltgenme-indirgenme olaylarını gözlemlemek ve bu amaçla yardımcı çalışmaların başarılabilmesi için yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur. Benzer şekilde diğer süreçlerde olayların açığa çıkarılmasında elektrokimyasal yükseltgenme-indirgenmenin aydınlığa kavuşturulması gerekli görülmüştür. Bu nedenle konu birçok araştırmacının dikkatini çekmiş ve incelemelerin gerçekleştirilebilmesi için de uygun teknikler geliştirilmiştir. Bu tekniklerden biri elektrokimyasal analizdir.

Elektrokimyasal teknikler içerisinde yer alan voltametri de bu amaçla sıklıkla başvurulan bir yöntemdir.

2.2.1. Voltametri Cihazı

Elektrokimya teknikleri potansiyelin bir fonksiyonu olarak akım ölçümlerine dayanır. Voltametri de bu tekniklerden biridir. Tarihsel olarak, voltametri Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından 1920' lerin başında bulunan voltametrinin özel bir tipi olan polarografiden geliştirilmiştir (Skoog ve ark., 1997a).

Cihaz üç ana kısımdan oluşur:

1. Voltaj Kaynağı
2. Akım Ölçme ve Kayıt Sistemi
3. Hücre

Hücre polarografik/voltametrik aletin özüdür. Hücre ölçüm kabından ve üç elektrottan oluşur:

1. Çalışma Elektrodu (ÇE)
2. Karşılaştırma Elektrot (KE)
3. Karşıt elektrot (AE)

Çalışma elektrodu yüzeyinde indirgenme-yükseltgenmenin gerçekleştiği mikroelettottur. Yüzey alanı, akım akışını sınırlamak için birkaç milimetre karedir. Karşılaştırma elektrodu, sabit potansiyel referansıdır. Karşıt elektrot, redoksta hiçbir rolü olmayan fakat devreyi tamamlayan inert materyaldir. Voltametrik hücrenin diğer önemli unsuru da destek elektrolitidir. Destek elektrolit elektrotlarla tepkimeye girmeyen fakat iletkenliğe sahip çözeltilerdir.

Akımın en düşük düzeyde tutulduğu ve iki elektrot arasında potansiyel farkının ölçüldüğü potansiyometrik sistemlerden farklı olarak, voltametrik hücrede üç elektrot kullanılarak akım belirlenmektedir. Fakat bu sistemde de elektrottan akım alınırken potansiyel düşüşü olur. Bu durum IR düşüşü olarak tanımlanır. Voltametrik sistemlerde dikkat edilen diğer bir durum da karşılaştırma elektrodu yüzeyinde akımın en aza indirilmesidir. Bunları sağlamak için voltametrinde potansiyostat adı verilen sistem kullanılır.

Potansiyostat hücreyi çalıştırırken çalışma ve karşıt elektrot arasında gerek duyulan potansiyeli, çalışma ve karşılaştırma elektrodu arasında belirleyerek sağlar (Skoog ve ark., 1997b).

2.2.1.1. Mikroelektrotlar (Skoog ve ark., 1997c)

Elektrotların çalışma aralıkları kullanılan destek elektrolite göre değişir. Örneğin C, Au, Pt ve Hg' nin her biri belirli çözelti/voltaj aralığı içerisinde kullanışlıdır.

Elektrokimyada genel olarak suda çözünerek hazırlanan destek elektrolitler kullanılır. Bu nedenle elektrotların çalışma sınırları, suyun indirgenip yükseltgendiği aralıklarla belli edilir. Negatif potansiyel için sınır, suyun yükseltgenmesidir:



2.2.1.2. Aşırı Gerilim (Skoog ve ark., 1997d)

Elektrotların çalışmasında diğer bir etken de aşırı gerilimdir. Aşırı gerilim η , akım geçerken daima kuramsal hücre potansiyelini azaltır.

$$\eta = E_{\text{akım}} - E_{\text{denge}} \quad (2.4)$$

Aşırı gerilim (aşırı voltaj) elektrot polarizasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkar. Bu polarizasyon kaynakları aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- Derişim polarizasyonu, kütle transferinin olması nedeniyle ortaya çıkar
- Adsorpsiyon-desorpsiyon polarizasyonu, analitin yüzeye tutunması/tutunmaması ile ilgilidir.
- Yük-transfer polarizasyonu, indirgenme-yükseltgenme tepkimesinin hızının sınırlı olması nedeni ile ortaya çıkar.
- İndirgenme-yükseltgenme polarizasyonu, indirgenme-yükseltgenme tepkimesinden önce veya sonra gerçekleşen kimyasal tepkime hızının sınırlı olmasından kaynaklanır.

Aşırı gerilim, indirgenme-yükseltgenme kimyası oluşmadan önce daha büyük potansiyel uygulanması gerektiği anlamına gelir. Bu nedenle elektrot seçiminde bu etken kesinlikle göz önünde tutulmalıdır. Hg elektrot bu anlamda çok kullanışlıdır. Çünkü Hg elektrot kullanıldığında, negatif potansiyel sınırlarında hidrojenin aşırı gerilimi büyüktür. Diğer önemli faydası ise temiz yüzey hazırlamanın kolay oluşudur (Skoog ve ark., 1997c).

2.2.2. Voltamogramlar (Skoog ve ark., 1997e)

Voltamogramlar (voltametrik dalgalar) uygulanan voltaja karşı (E_{uyg}), oluşan akımın (i) ölçülmesiyle elde edilen grafiklerdir. Verilen örnekte bir A türünün bir P

türüne indirgendiği tepkime ile ilgili doğrusal taramalı bir voltamogram görülmektedir. Bu tepkime için

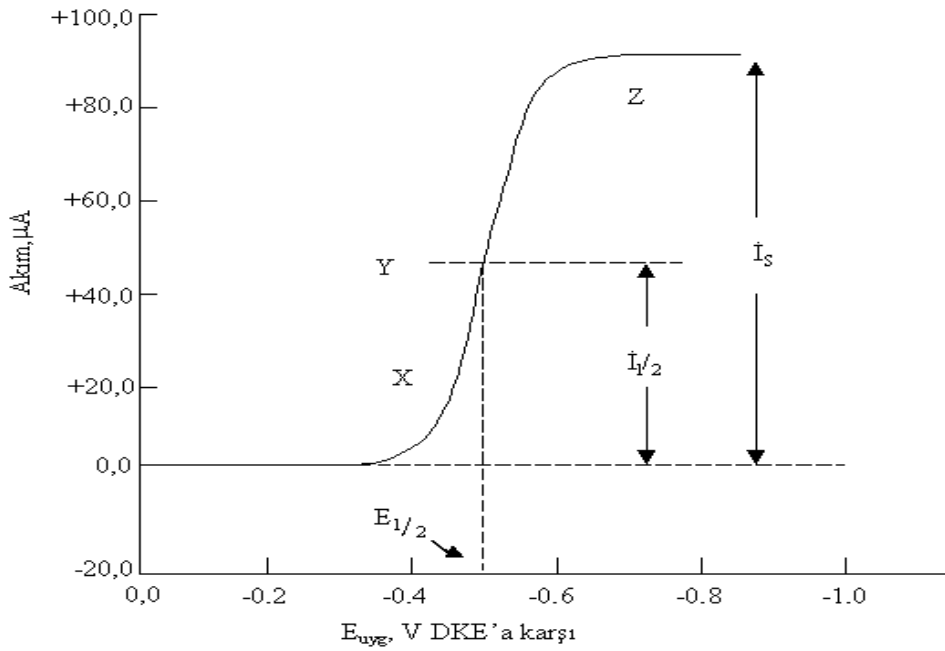


kabul edilmiştir.

Bir voltamogram üzerinde bilinmesi gereken terimler vardır. Bunlardan biri sınır akımıdır. Grafikte dik artıştan sonra gelen sabit akıma, sınır akımı denir. Oluşan bu düzlükte, indirgenme-yükseltgenme tepkimesi artık sonlanmıştır ve gözlenen bu akım, indirgenmiş veya yükseltgenmiş olan analitin, mikroelettrot yüzeyine difüzyonundan kaynaklanır. Sınır akımları genellikle analitin derişimi ile doğru orantılıdır. Buradan:

$$i_s = k.C_A \quad (2.6)$$

yazılabilir. Bu denklemde C_A analit derişimi ve k analite bağlı sabittir.



Şekil 2.2. Doğrusal taramalı voltamogram örneği (Skoog ve ark., 1997e).

Bilinmesi gereken diğer bir terim de artık akımdır. Artık akım, voltametik çalışmada istenmeyen bir akım türüdür. Analitin indirgenme-yükseltgenme tepkimesi ile ilgili, bir başka deyişle Faradaik değildir. Artık akımın iki nedeni olabilir. Bunlardan ilki çözeltilerde bulunabilecek safsızlıklardır. Diğerisi ise cıva damlasının yüklenmesinden kaynaklanan akımdır. Cıva elektrot negatif potansiyel aralıklarında daha çok kullanılır ve bu negatif potansiyelin sağlanması için elektrodun güç kaynağının negatif ucuna bağlandığı varsayılır. Bu negatif potansiyel sonucunda cıva

damlası negatif yükle yüklenir. Bu olay sonucunda elektrot çözelti ara yüzeyinde pozitif yüklerin elektroda doğru bir göçü olacaktır ve yük farkından kaynaklanan bir akım ortaya çıkacaktır.

Verilen örnekte negatif potansiyel sonunda Hg mikroelettrot katot olarak davranır. Çünkü uygulanan potansiyel tüm A türlerini indirgeyip P türüne dönüştürecektir.

2.2.3. Voltametrik Yöntemler

2.2.3.1. Oksijen Dalgaları (Skoog ve ark., 1997f)

Çözünmüş oksijen bir mikroelettrotta kolaylıkla indirgenir. Bu nedenle incelenen madde üzerinde bozucu etki yapabilir. Voltametrik incelemelerin daha iyi yapılabilmesi için çözünmüş oksijenin uzaklaştırılması gerekir. Bunun için kullanılan en yaygın yöntem çözeltiden inert bir gaz geçirilmesidir. İnert gaz olarak çoğunlukla azot gazı kullanılır. Böylelikle oksijenin uzaklaştırılması sağlanır.

2.2.3.2. Polarografi

Polarografi, ilk kullanılan voltametrik tekniktir. Polarografiyi voltametri içerisinde ayrı kılan özelliği kullanılan elektrodun damlayan cıva elektrot olmasıdır. Polarografinin hidrodinamik voltametriden diğer bir farkı karıştırmanın olmamasıdır. Akım sadece difüzyon kontrollüdür. Cıva damlası büyürken ve düşerken akım değişir.

Polarografide uygulanan potansiyel pozitif veya negatif yönde arttırılır. Her potansiyele karşı bir akım gözlenir. Potansiyel yeteri kadar büyük olduğunda, analitik elektrotta akıma neden olan bir indirgenme veya yükseltgenme olur. Elektrot hızlı bir şekilde, oluşan ürün tarafından doyurulur. Akım analitin elektroda difüzyonu ile sınırlıdır.

Polarografide indirgenen veya yükseltgenen türler cıva elektrodunun yüzeyini değiştirir. Cıva yüzeyi, problemleri önlemek için taze bir yüzey sağlayan bir damla düşürücü ile yenilenir (<http://ull.chemistry.uakron.edu/analytical/Voltammetry/>, 12.08.08)

2.2.4. Dönüşümlü Voltametri

Polarografik sonuçları geliştirmek, mahsurlarını ortadan kaldırabilmek ve yeni yaklaşımları incelemek için klasik polarografide çeşitli değişiklikler yapılmıştır. Bu

değişiklikler sonucunda geliştirilen yöntemlerden biri de dönüşümlü voltametridir. Bu yöntemde potansiyel bir damla süresince her iki yönde taranır (tipik olarak $< 1s$). DME, camı karbon veya Pt elektrotlar kullanılabilir. Yöntem, eğer tepkime tersinir ise hem yükseltgenme hem de indirgenmeyi inceler. Yöntem organik ve organometalik maddelerin yükseltgenme-indirgenme süreçlerini çalışmak için kullanılır.

Eğer tepkime tam tersinir bir tepkime ise, simetrik görünen bir voltamogram elde edilir. Tepkimenin tersinirliği azaldıkça simetrik görünüm de bozulmaktadır. Ayrıca ileri ve geri yöndeki tepkimelere ait olan yarı dalga potansiyelleri arasındaki fark da gitgide artmaktadır. Tersinir bir tepkimede beklenen, ileri ve geri yöndeki tepkimelere ait olan akımların birbirine eşit büyüklükte olmasıdır. Tersinirlik azaldıkça bu durumda da değişme olur. İleri ve geri yöndeki tepkimelere ait olan akımların büyüklüğü birbirinden farklılaşır (<http://ull.chemistry.uakron.edu/analytical/Voltammetry/>, 12.08.08)

2.2.5. Kare-Dalga Voltametrisi

Kare-dalga voltametrisi için bir potansiyel eğrisi üzerinde hem ileri yönde hem de geri yönde pulslar uygulanır. Bu pulslarla birlikte akım da ileri ve geri yönde olmak üzere iki yönde örneklenir. İleri ve geri yönde okunan akım değerlerinin farkı, ölçüm sonucu olarak verilir. Her bir voltaj pulsundan sonra akım bileşenlerinden faradaik olmayan akım zamanla faradaik akımla birlikte artar. Puls ömrünün sonuna doğru her iki bileşende de azalma olur fakat faradaik olmayan akım, faradaik akımdan daha hızlı azalır. Böylece faradaik olmayan akım içermeyen bir zaman boyunca ölçümlerin yapılması sağlanır. Pulslu dalga şekli nedeniyle aynı analit türlerinin indirgenme ve yükseltgenmesi tekrarlandığından duyarlılık zenginleşir. Kare-dalga voltametrisi hızlı bir tekniktir, bu nedenle kromatografik detektör olarak kullanılabilir. Bu yöntem kullanıldığında alt teşhis sınırı 10^{-7} - $10^{-8}M$ aralığında sağlanır (<http://www.cem.msu.edu/~cem333/Week12.pdf>, 12.08.08)

Bu yöntem aynı zamanda kinetik bilgi de sağlar. Kare- dalga voltametrisi ileri ve geri akımları net akım kadar iyi analiz edebildiğinden, tepkimenin tersinirliği ve elektrot yapısı hakkında kolaylıkla bilgi verebilir (<http://www.cem.msu.edu/~cem333/Week12.pdf>, 12.08.08).

2.2.6. Sıyırma Voltametrisi (Kissinger ve Heineman, 1996a)

Çevresel, klinik veya endüstriyel karmaşık örneklerde eser ve ultra eser bileşenlerin tayini, modern analitik kimyanın önemli bir görevidir. Bu gibi seyreltik örneklerin analizinde sıklıkla gerçek tayin öncesinde bazı önderiştirme basamaklarına ihtiyaç duyulur. Bu genelde analit derişimi, kullanılan enstrümental tekniğin teşhis sınırının altında ise olur. Önderiştirme basmağı, zenginleştirmenin yanı sıra analitin karmaşık matriksten alınmasını da sağlar ve böylece duyarlığı ve kararlılığı artırır.

Elektrolitik biriktirme eser bileşenlerin zenginleştirilmesi ve ayrılması için etkin bir yoldur. Bu yöntem hiç ayraç eklememek ya da çok az miktarda ayraç kullanmak gibi bir üstünlüğe sahiptir, böylece kirlenme riski en aza iner. Elektrokimyasal önderiştirme işlemi birçok enstrümental teknikle eşleştirilebilir.

Sıyırma voltametrisi, elektrolitik önderiştirme basamağının kullanıldığı en iyi bilinen analitik yöntemdir. Bu teknik oldukça düşük alt teşhis ve alt tayin sınırları ($\sim 10^{-10}$ - 10^{-11} M), çoklu element ve türleme etkinliğı, sürekli ve yerinde ölçüm sistemine uygunluk ve düşük maliyet üstünlüklerine de sahiptir.

Sıyırma teknikleri iki ayrı basamak içerir: bir önderiştirme basamağı ve bir sıyırma basamağı. Önderiştirme basamağında, esas analit çalışma elektrodu üzerine veya içerisine biriktirilir. Sıyırma basamağında, birikmiş madde yükseltgeyerek ya da indirgeyerek çözeltiye geri alınır. Bu aşama boyunca kaydedilen cevap elektrot yüzeyinde veya içerisindeki dolayısıyla örnek çözeltisindeki analitin derişimi ile orantılıdır. Önderiştirme ve sıyırma basamaklarının doğasına bağılı farklı sıyırma analizleri vardır.

2.2.6.1. Adsorptif Sıyırma Voltametrisi (AdSKDV) (Kissinger ve Heineman, 1996b)

Adsorptif sıyırma voltametrisi (AdSV) karıştırmalı sıyırma işlemleri ile tayin karmaşık ya da mümkün olmayan birçok eser metal için oldukça duyarlı bir yöntem olarak gösterilmektedir. Yöntem, metalin elektrot yüzeyine kontrollü birikmesini takiben uygun bir metal şelat oluşumunu kullanır; ardından adsorplanan metal şelat negatif-yönlü bir potansiyel taraması uygulanarak indirgenir. İndirgenme kompleksin metali ya da ligandı üzerinden olabilir. Analitin yüzeydeki derişimi (Γ) ana çözeltideki derişimi ile orantılı olduğundan elde edilen adsorptif sıyırma cevabı karşılık gelen adsorpsiyon izotermi yansıtır. En sık kullanılan izoterm Langmuir' dir.

$$\Gamma = \Gamma_m \left(\frac{BC}{1 + BC} \right) \quad (2.7)$$

Burada Γ_m tek tabakalı kaplamaya karşılık gelen yüzey derişimi ve B adsorpsiyon katsayısıdır. Bu yüzden kalibrasyon grafiğı tüm yüzey kaplamasına karşılık gelen “yüksek” derişimlerde ($>10^{-7}M$) doğrusallıktan sapma gösterir. Yüzey-sınırlı kompleks, sabit bir katodik akım kullanan kronopotansiyometrik yaklaşımla ölçülebilir.

Adsorptif biriktirme, kısa adsorpsiyon süreleri ile yüksek duyarlıkta ölçümlere (10^{-10} M düzeyinden aşağıda) izin veren çok etkin bir önderiştirme ile sonuçlanır. Bu gibi yüksek duyarlığı başarmak için kuvvetli adsorpsiyonu sağlayan çalışma koşullarının (pH veya biriktirme potansiyeli gibi) en iyi hale getirilmesi önemlidir. Bu yol sıyırma analizinin kapsamını, uranyum, krom, vanadyum, demir, molibden, paladyum, alüminyum ve itriyum gibi önemli metallere doğru genişletir. Ayrıca, biyolojik, farmasötik ve çevresel öneme sahip birçok yüzey aktif organik bileşik kontrollü olarak elektrot yüzeyinde biriktirilebilir ve eser düzeylerde ölçülebilir. Büyük biyolojik moleküllerde adsorptif biriktirme, yükseltgenme-indirgenme merkezi ve elektrot arasında elektron aktarımı ile gerçekleşen yapısal değişikliklerle sonuçlanabilir. Adsorptif biriktirme, sonradan gelen tensammetrik (Faradaik olmayan) cevaplar üzerinden elektro aktif olmayan yüzey aktiflerin eser ölçümleri için de kullanılabilir.

Duyarlı adsorptif sıyırma işlemleri, son zamanlarda geliştirilen katodik ve adsorpsiyon süreçlerinin eşleşmesi ile oluşan bütünü temel alır. Bu tip çifte yükselticili yöntem, 10^{-12} M’lık düşük alt teşhis sınırları ile sonuçlanır.

2.2.7. Voltametrinde Biyolojik Materyal Analizi

Polarografi ve voltametri için çok çeşitli alanlarda uygulamalar vardır. Yüksek tekrarlanabilirlik ve duyarlılık nedeniyle polarografik ve voltametrik tekniklere analizin birçok alanında başvurulur. Uygulamaları içeren ana alanlar;

- İlaç Endüstrisi
- Plastik ve Polimer Endüstrisi
- Gıda ve Su Endüstrisi
- Kağıt Endüstrisi ve Kozmetik
- Kaplama (ya da Galvanizleme) Endüstrisi

Bütün bu endüstriler içerisinde ilaç endüstrisi insan sağlığıyla oldukça ilintilidir. İlaç üretimi gerçekleştirirken farmasötik özellikteki madde ticari preparatta analiz

edilebildiği gibi, biyoyararlanım ve ilaç kinetiği gibi çalışmaların gerçekleştirilebilmesi için biyolojik sıvılarda da analiz edilebilir. Bu çalışmalar ilerledikçe biyolojik sıvılarda yaşamsal önemi olan maddelerin de elektrokimyasal analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu tür analizlerde de voltametri oldukça sık kullanılan bir tekniktir. Literatüre bakıldığında bununla ilgili birçok çalışmaya rastlamak mümkündür.

2.3. Kapiler Elektroforez

2.3.1.Elektroforez (Xu, 1996)

Elektroforez bir elektrik alanı etkisi altında iyonların göçü olarak tanımlanır. Elektrik alanı tarafından verilen kuvvet ($F_E=qE$) etkin yük q ve elektrik alan kuvveti E ile doğru orantılıdır. İyonun elektrik alan etkisiyle hareketi, iyonun hızı v_{ep} ve sürtünme katsayısı f ile orantılı olan geriletici bir sürtünme kuvveti ($F_f=fv_{ep}$) ile karşılaşılır. İyon hemen hemen bir durgun durum hızına ulaştığında, hızlandıran kuvvet sürtünme kuvvetine eşittir.

$$qE = fv_{ep} \quad (2.8)$$

Bu eşitliğin yeniden düzenlenmesiyle:

$$v_{ep} = qE/f = \mu_{ep}E \quad (2.9)$$

Burada μ_{ep} iyonun hızı ve elektrik alan şiddeti arasında orantılı bir sabit olan iyonun elektroforetik mobilitesidir. Bu elektroforetik hız, iyonun yüküyle doğru orantılı, sürtünme katsayısı ile ters orantılıdır. Sürtünme katsayısı, hareket eden iyonun hidrodinamik yarıçapı (r) ve çevreleyen ortamın viskozitesi (η) ile ilgilidir.

$$f = 6\pi\eta r \quad (2.10)$$

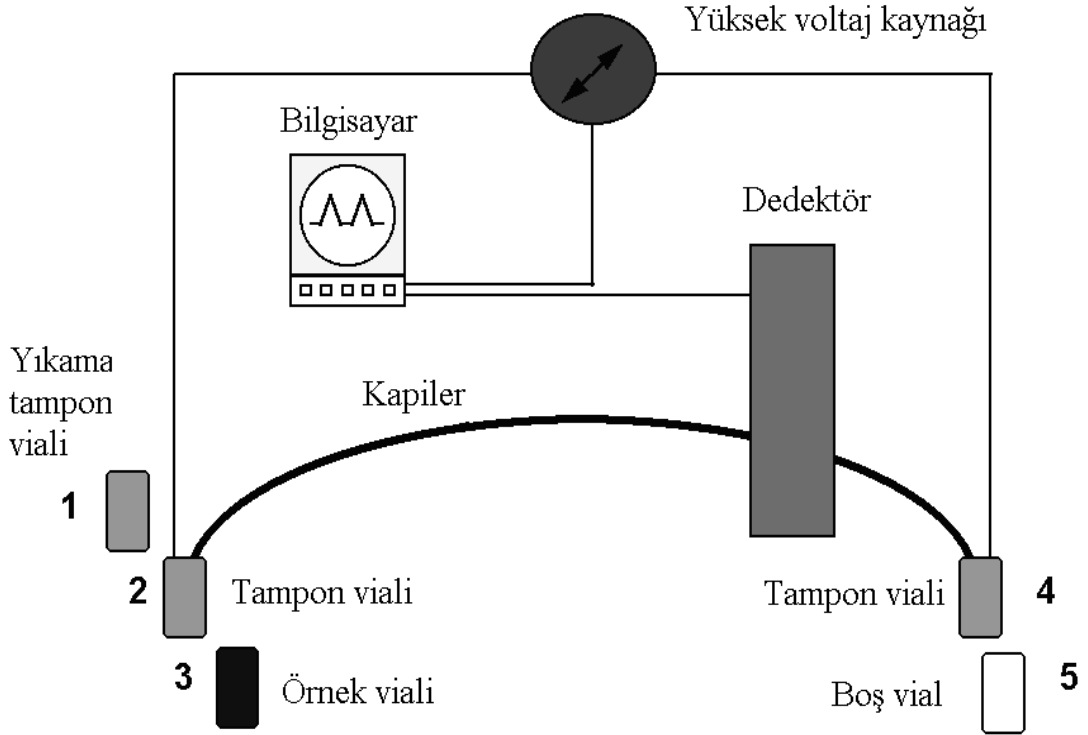
Çünkü $\mu_{ep} = q / f$, daha büyük hidrodinamik yarıçap daha düşük elektroforetik hız demektir.

$$\mu_{ep} = q/6\pi\eta r \quad (2.11)$$

Elektroforetik hız, elektroforezi anlamak için belki de en önemli kavramdır. Çünkü verilen herhangi bir iyon veya çözünen için elektroforetik hız, karakteristik bir özelliktir ve daima sabit olacaktır. Dahası, göç hızlarının belirlenmesinde belirleyici faktördür. Farklı iyonlar ve çözünenler, farklı elektroforetik hızlara sahip olacağı için aynı elektrik alan altında farklı göç hızlarına sahip olacaklardır. Böylelikle, elektroforetik hız farkları nedeniyle elektroforez kullanılarak, bunları ayırmak mümkün olacaktır.

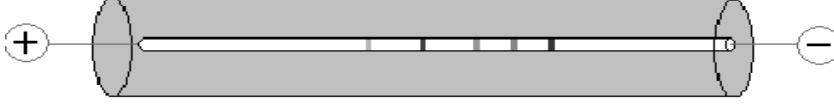
2.3.2. Enstrüman ve Kapiler Elektroforez Analizi

Bir kapiler elektroforez cihazının temsili bir görüntüsü şekilde sunulmaktadır (Şekil 2.3). Temel bileşenler, bir yüksek voltaj güç kaynağı (0- 60 kV), <200µm iç çaplı bir poliiimid kaplı kapiler, hem kapiler hem de güç kaynağına bağlı elektrotları alabilen iki tampon kabı ve bir detektörü içerir. Kapilerin sıcaklığının sabit tutulması etkin ve tekrarlanabilir ayrımlar için önemlidir. Bu yüzden, bazı kapiler sıcaklık sabitleyici sistemler kullanılmalıdır. Bir kapiler kuşak elektroforetik ayrımını yapabilmek için, kapiler istenen pH da uygun bir ayırma tamponu ile doldurulur ve girişten örnek verilir. Kapilerin her iki ucu ve yüksek voltaj kaynağına bağlı elektrotlar tampon kaplarına yerleştirilir ve sisteme 30 000 V a kadar güç uygulanır. Örnek tükacındaki iyonik türler, yükleri ve kütleleri ile belirlenen bir elektroforetik mobilitayla (yön ve hız) göç ederler ve bilginin bir veri toplama/ analiz sistemi tarafından toplandığı ve saklandığı bir detektörden sırayla geçerler (Landers, 1997b).



Şekil 2.3. Bir CE analiz sisteminin genel görünümü

2.3.3. Kapiler Kolon (Landers, 1997c)



Şekil 2.4. Bir kapiler kolonda ayırmanın basit bir gösterimi

Elektroforez, iyonik maddelerin ayrımı ve analizi için en yaygın olarak kullanılan tekniklerden biridir. Elektroforezin hemen hemen tüm türleri, analit bantlarının konveksiyonel dağılımını önlemek için katı desteklerin bazı formlarını kullanır. Bu kağıt formunda (amino asit ve diğer küçük organik moleküllerin yüksek voltajlı ayrımı) veya daha yaygın olarak hem protein hem de DNA/RNA analizi için yaygın olarak kullanılan poliakrilamid veya agaroz jellerdir. Elektroforezin bu geleneksel formları karmaşık sistemlerin bileşenlerini ayırabilme yeteneğine rağmen, çeşitli olumsuzluklar içerir. Burada, en açık olumsuzluk Joule ısınması (akım içinden geçerken iletici ortamın ısınması) ile sınırlanan ayırma hızıdır. Joule ısınmasının düzlemsel sistemlerde oldukça zayıf dağıtımı, elektrik alanı kullanımını düşük potansiyellerle sınırlar. Ayrıca, yöntemsel bir bakış açısından incelendiğinde, düzlemsel elektroforez başlangıç aşamasından, sonuçların elde edildiği son aşamasına kadar birçok zahmetli ve zaman harcıyıcı basamak içeren bir süreçtir. Bu süreç jelin hazırlanmasını, örneğin hazırlanması ve verilmesini, jelin kirlendiğinde değiştirilmesi gibi birçok işlemi içerir. Ayrıca bu süreç otomatikleştirmeyi de zorlaştırır. Bunlardan başka diğer problemler zayıf tekrarlanabilirlik ve analite bağlı farklılıklardan oluşan problemlerdir.

Biyolojik makro molekülleri içeren analitlerin ayrımı için elektrogöç kanalı olarak kapillerlerin (Şekil 2.4) kullanımı, sadece ayırım için faydalı bir yaklaşım sunmaz, ayrıca standart katı destek yaklaşımı üzerinde çeşitli üstünlükler sağlar. Özellikle, dar çaplı kapillerlerin fiziksel özellikleri, bunları elektroforez için ideal kılar. CE de kullanılan fused-silika kapillerler genel olarak 20–100 µm iç çapa, 20–100 cm uzunluğa sahiptir ve yaygın olarak çok kırılğan olabilecek kapillerin esnekliğini sağlayan bir polimer madde olan poliimid ile kaplıdır. Bu çaplarla kapillerlerin yüksek yüzey/hacim oranı, uygulanan büyük alanlarla oluşan Joule ısısının oldukça etkili dağıtımına izin verir. Bu ıyı dağıtabilme yeteneğinin bir sonucu olarak, kapiler dış çevresi oda

sıcaklığında olan kapilerlerle 30 000 V a kadar olan elektrik alanlar kolaylıkla uygulanabilir.

Kapillerlerin elektroforez için kullanımı; Joule ısını etkin bir şekilde dağıtma yeteneğinden başka birçok üstünlük sağlar. Tipik bir CE kapillerinin sahip olduğu küçük çaplar, toplam kolon hacminin mikrolitre aralığında olmasına yol açar. Böylece tamponun sadece mililitre seviyesinde miktarının kullanımı gerekir. Ayrıca, temel kromatografik kurallara göre kolona verilen örnek hacmi toplam kolon hacminin % 1–5'i ile sınırlanır. Bu durumda kapilere verilen örnek hacmi nanolitre aralığında olur (0,2 nL kadar düşük). Sonuç olarak, 5 µL kadar küçük hacimde bir örnek, bazı ticari cihazlarda tekrarlı analizler için yeterli olacaktır. Kapiler kolonun küçük tampon ve örnek ihtiyacı düşünülecek olursa, yüksek elektrik alan uygulamasıyla (30 kV) daha hızlı analiz süresi elde edilebilir. Sonuç olarak kapiler elektroforez çok sayıda analitik problemin uyarlanması ve çözümü için muazzam bir potansiyele sahiptir.

2.3.4. Joule Isınması (Xu, 1996)

Joule ısınması, çözeltinin akım geçişine direncinin bir sonucudur. Üretilen ısı H , elektrotlar arasına uygulanan potansiyel V , elektrik akımı I ve zaman t ile doğrudan orantılıdır.

$$H = VI t \quad (2.12)$$

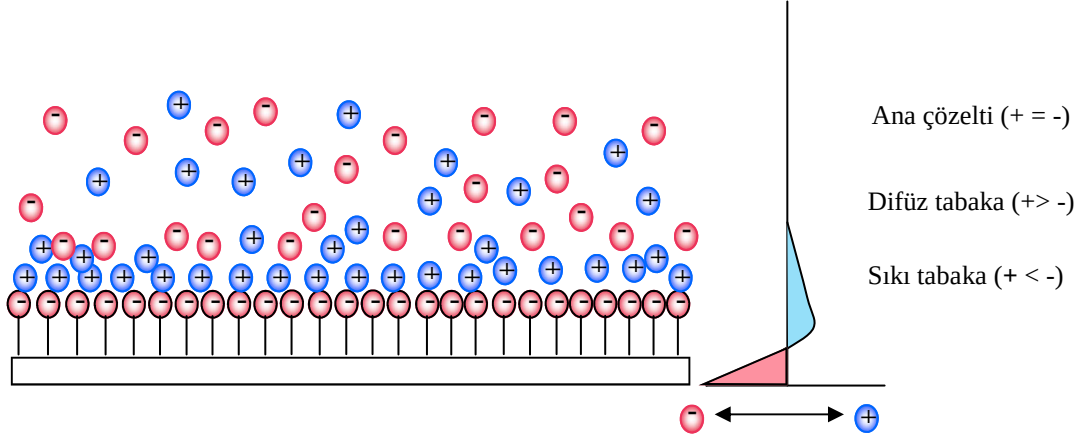
Eğer ısı sistemden yeterli olarak uzaklaştırılmazsa, artan sıcaklık ve yoğunluk gradientleri ayırma verimini azaltır. CE de kullanılan kapillerlerin duvarları, ısıyı geleneksel elektroforezde kullanılan düz jellerden daha büyük yüzey alanı/ hacim oranına sahip olduğu için daha iyi dağıtır. Sonuç olarak, CE' de yüksek potansiyeller uygulanabilir. Şimdiki teknolojiyle aşırı hızlı ve verimli ayırmalar için 30 kV a kadar potansiyel uygulanabilir.

2.3.5. Elektroozmos (Landers, 1997d)

Elektroozmotik akış (EOF) ilk defa Helmholtz tarafından 1800'lü yılların sonunda, sulu bir tuz çözeltisi barındıran yatay bir cam tüpe, elektrik alanı uygulaması içeren deneyler sonucunda belirlendi. Helmholtz iç duvarın iyonik karakteri ve iyonların hareketi hakkında bilgi edinmek için gerçekleştirdiği deneylerin sonucunda, uygulanan bir elektrik alanı altında tüpün iç yüzeyindeki silikanın, katoda doğru net sıvı akışına

izin veren negatif yüklü bir tabaka verdiğini buldu. Bir yüzyıl sonra bu olay kapiler elektroforetik analizde önemli bir rol oynadı.

Helmholtz' un öncü çalışmasının bir devamı olarak, EOF' taki temel ilkeler büyük ölçüde incelenmiştir. Şekil 2.5' de bir kapilerin iç duvarının genişletilmiş kısmında gösterildiği gibi, kapiler duvarındaki iyonize silanol grupları (SiO^-) katyonik türleri tampondan çeker.



Şekil 2.5. Kapiler yüzeyinde oluşan elektriksel çift tabakanın görünümü (Li, 1992a)

Analizde kullanılan tampon pH sı, iyonize olacak silanol gruplarının kesrini belirler. Oluşan iyonik tabaka, duvardan uzaklık arttığında üstel olarak azalan bir pozitif yük yoğunluğuna sahiptir. Yüzeye en yakın oluşan çift tabaka, “Helmholtz İç Tabaka” veya “Stern Tabaka” olarak adlandırılır ve statiktir (durgun). Stern tabaka dışında oluşan daha difüz tabaka, “Dış Helmholtz Tabaka” (OHP) olarak adlandırılır. Uygulanan elektrik alanı altında OHP’ deki katyonlar katot yönünde su hidratlarını taşıyarak göç eder. Hidrasyon sularının H bağlarının ana çözeltideki su moleküllerine birleşme doğası, çözeltinin tamamının katoda doğru çekilmesine yol açar. Bu EOF veya “çözelti akışı”, içerikteki analitlerin elektroforetik göçlerinin farkından belirlenen ayırımla, detektöre doğru tüm molekülleri ileri sürmek için bir pompalayıcı mekanizma olarak rol oynar. Elektroforetik göç olduğunda, tüm analitler çözelti akışı ile detektöre doğru sürüklenir. EOF yeterince kuvvetli iken, her bir analitin karşılık gelen elektroforetik hızları, analitlerin detektöre doğru hareketinde zamanla ayrılmış kuşakların oluşumuna izin verir. EOF yavaşsa analit kuşaklarının difüzyonu önemli bir bant genişlemesiyle sonlanabilir ve çok düşük EOF şartları altında bazı analitler uygun analiz süresi içinde detektöre ulaşamazlar.

2.3.5.1. EOF Mobilitesini Etkileyen Faktörler

EOF mobilitesini etkileyen faktörler tamponun dielektrik sabiti, viskozitesi ve dolayısıyla zeta potansiyel büyüklüğüdür. Tampon ilavelerinin kullanımı ve/veya tampon bileşiminin değiştirilmesi dielektrik sabiti ve viskoziteyi etkileyebilir. Tampon viskozitesi ayrıca CE ayırmalarının yapıldığı sıcaklığa da bağlıdır.

2.3.5.1.a. Zeta Potansiyeli

Zeta potansiyelini etkileyen başlıca etmenler tampon bileşimi ve ilaveleri, çözeltinin dielektrik sabiti, viskozitesi ve ortamın sıcaklığıdır. Tüm bunlarla birlikte çözeltinin pH sı da oldukça büyük bir etmendir. Bu da şöyle açıklanabilir:

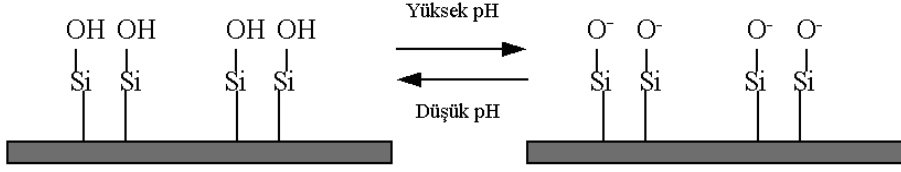
Elektroozmotik akışın doğrusal hızı v şöyle verilir:

$$v = \frac{\epsilon}{4\pi\eta} E\zeta \quad (2.13)$$

Burada ζ tabakalar arasındaki potansiyeldir ve zeta potansiyeli olarak adlandırılır. Helmholtz eşitliği ile verilir:

$$\zeta = \frac{4\pi\eta\mu_{eo}}{\epsilon} \quad (2.14)$$

Burada η viskozite, ϵ çözeltinin dielektrik sabiti ve μ_{eo} elektroozmotik akış için katsayıdır. Zeta potansiyeli pH ya bağımlı olarak kapiler duvarındaki yük yoğunluğu ile orantılıdır. Böylece, EOF mobilitesi tampon pH sına göre değişecektir. Yüksek pH da EOF mobilitesi, düşük pH dakinden oldukça büyük olacaktır. Şekil 2.6 tipik bir fused (işlenmiş) silika kapiler için EOF mobilitelerinin pH ile değişimini gösterir (<http://www.rsc.org/pdf/books/capelectrosc.pdf>, 23.06.2004). pH 9 un üstünde, silanol grupları tamamen iyonize olur ve EOF mobiliteleri büyüktür. pH 4 ün altında silanollerin iyonizasyonu düşüktür ve EOF mobilitesi önemli değildir. Zeta potansiyeli ayrıca tamponun iyonik kuvvetine bağlıdır, çünkü iyonik şiddet artırıldığında çift tabaka baskılanır ve bu da zeta potansiyelinde azalma ve EOF mobilitesinde düşme ile sonuçlanır (http://www.ceandcec.com/ce_theory.htm, 23.06.2004).

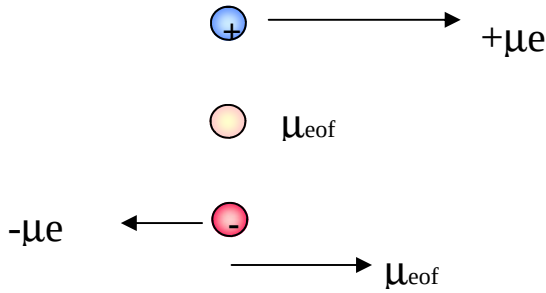


Şekil 2.6. Kapiler iç yüzeyinde silanol gruplarının iyonlaşmasının pH ile değişimi (http://www.chemsoc.org/exemplarchem/entries/2003/leeds_chromatography/chromatography/eof.htm, 28.02.2004)

pH > 7 de, EOF mobilitesi, iyonların birçoğunun, yüklerine rağmen katoda doğru net göçünü sağlamak için yeterlidir. Bu yüzden, bir çözünenin gözlenen hızı onun elektroforetik hızıyla doğrudan ilgili olmayabilir. Onun yerine, hem elektroforetik mobilite hem de EOF mobilitesinin bir birleşimi ile ilgilidir. Bu yüzden, bir çözünenin gözlenen hızından hesaplanan görünen elektroforetik mobilitesi ($\mu_{gö}$), onun gerçek (veya etkin) elektroforetik mobilite (μ_{ep}) ve EOF mobilitesinin (μ_{EOF}) vektörel toplamıdır.

$$\mu_{gö} = \mu_{ep} + \mu_{EOF} \quad (2.15)$$

Örnekler normal olarak anottan verildiğinde ve EOF anottan katoda doğru hareket ettiğinde, katyonlar pozitif μ_{ep} 'ye, nötraller sıfır μ_{ep} 'ye ve anyonlar negatif μ_{ep} 'ye sahip olurlar. Başka bir deyişle Şekil 2.7' deki gibi katyonlar EOF' dan daha hızlı ve anyonlar EOF' dan daha yavaş göç ederler. Nötral olanlar da EOF ile aynı hızda hareket ederler (http://www.ceandcec.com/ce_theory.htm, 23.06.2004).

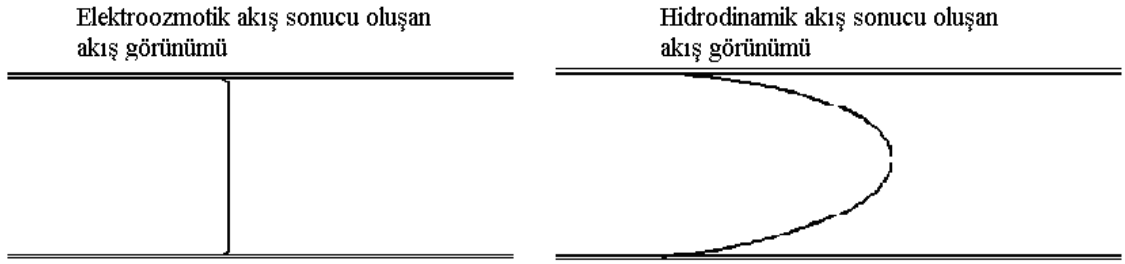


Şekil 2.7. Yüklü ve yüksüz maddelerin EOF varlığındaki hareket ve yönlenmeleri

2.3.6. Kapiler Elektroforezde Akış Profili

EOF' un önemli bir kilit noktası düz tıkaç akış görünüşüne sahip olmasıdır (Şekil 2.8). HPLC için kullanılan harici bir pompayla oluşturulan parabolik akış görünüşünün yanında EOF, düz bir akış görünüşüne sahiptir. Çünkü yürütücü kuvvet

(kapiler duvarındaki yük) kapiler boyunca basınç etkisi kullanılmadan dengeli bir biçimde dağıtılır, akış hızı da kapiler boyunca değişmez. Bu, HPLC de olduğu gibi bir parabolik veya laminar akış görünüşüne yol açarak, kolon duvarlarında bir basınç düşüşüne neden olan, sürtünme kuvvetlerinin olduğu basınç-yürütücü akışa zıttır. EOF' un bu tıkaç görünüşü önemlidir. Çünkü bu akış şekli bant genişlemesini en aza indirir ve % 0,05 kadar küçük bir hız farkını temel alan ayırmalara izin veren yüksek ayırma verimlerini sağlar.

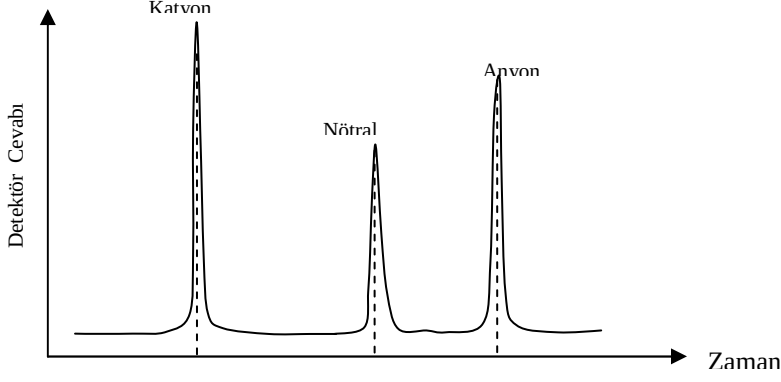


Şekil 2.8. Elektrozotik ve HPLC' de geçerli olan hidrokinamik akış görünüşlerinin bir karşılaştırması (Li, 1992a)

2.3.7. Elektrofogram

CE' de alınan veriler, kromatograma benzeyen bir elektrofogram formunda verilir. Bir elektrofogram göç zamanına karşı detektör cevabının bir grafiğidir. Detektör cevabı genelde UV-görünür absorpsiyon veya floresans gibi derişime bağlıdır. Katyonik, anyonik ve nötral çözünenlerin bir karışımının ayırımı için tipik bir elektrofogramın görünümü Şekil 2.9' da gösterilmiştir (Xu, 1996).

Burada analit kuşağının görünümünün bir pik şeklinde olduğu görülmektedir. Elektroferezin başlangıç şartları altında, tampon çözeltisi ile çözünen karışımı arasındaki sınır, uygulanan akım yönü ve göç yönüne doğru açılarda, son derece küçük kalınlıkta bir kuşak oluşturur. Göç başladığı zaman, bu başlangıç kesin sınırı şekil itibariyle adım adım ilerleyen bir bozulmaya gider (Landers, 1997e).



Şekil 2.9. Tipik bir elektroforegramın görünümü

Bu süreçte en önemli etken difüzyondur, çünkü başlangıç şartları, kuşaksal sınıra karşı ayrı bir derişim gradienti verir. Ficks in ikinci difüzyon kanunlarının uygulanmasıyla, Weber, göç yönünde çözünen derişiminin değişimini şu eşitlikle verdiğini göstermiştir:

$$C_{x,t} = \frac{k}{2(D_i \pi t)^{1/2}} e^{-\frac{(x-v_i t)^2}{4D_i t}} \quad (2.16)$$

Burada C, t süre sonra başlangıç pozisyonundan x kadar uzaklıkta çözünen derişimidir, V_i çözünenin elektroforetik hızıdır, D_i çözünenin difüzyon katsayısı ve k bir sabittir. İntegrasyonla başlangıçta $t=0$ da $x=\infty$ iken, $c=0$ sınır şartlarıyla ve $t>0$ ikinci bir zamanla, $x=0$ ve $dc/dx=0$ ile derişim profillerinin matematiksel bir tarifini elde ederiz. t zaman sonra başlangıçtan x uzaklığında çözünen göç ederken, kuşak Gauss eğrisi ile tanımlanmaktadır (Landers, 1997e).

Gauss görünümünün karakteristikleri pik maksimumu ve pik genişliğini tanımlar. Maksimum, çözünenin başlangıç derişimi ile orantılıdır. Genişlik başlangıçtan (sisteme verilmesinden) örneğin detektöre ulaşmasına kadar geçen sürenin uzunluğuna ve difüzyon katsayısı D_i ' ye bağlıdır. Genişlik $2/(2D_i t)^{1/2}$ durumumuzda çekim noktaları arasındaki uzaklıkla verilebilir. Mümkün hesaplamalarla benzetme sonucu, Gauss eğrisinin genişliği standart sapma σ ile adlandırılır.

$$\sigma = (2D_i t)^{1/2} \quad (2.17)$$

Standart sapmanın karesi varyans olarak adlandırılır.

$$\sigma^2 = 2D_i t \quad (2.18)$$

Süre aynı zamanda şu eşitlikle verilebilir:

$$t = L_d / V_i = L_d L_r / \mu_{gö} V = L_d / \mu_{gö} E \quad (2.19)$$

Burada L_d başlangıçtan detektöre olan uzaklıktır ve L_t kapilerin toplam boyudur (uygulanan elektrik alanının boyu). Eşitlik 2.19 Eşitlik 2.18' e uyarlanırsa şu elde edilir:

$$\sigma^2 = 2D_i L_d / \mu_{gö} E \quad (2.20)$$

Burada pik şeklini etkileyen bir süreç olması sebebiyle yalnızca difüzyon olayı tartışılmıştır. Elektroforegramda gözlenen bant genişlemesi için katkıda bulunan diğer faktörler, varyansın pratik sonuçlarıdır (Landers, 1997e).

2.3.8. Ayırıcılık ve Verim (Landers, 1997f)

İki bileşenin ayrımını karakterize etmek için en basit yol ayırıcılığı (Ayr) elde etmek için pik ortalamasıyla göçteki farklılığı belirtmektir.

$$Ayr = 2(X_{i2} - X_{i1}) / (W_1 + W_2) \quad (2.21)$$

Burada X_i , i analitinin göç uzaklığı ve 2 yavaş hareket eden bileşeni belirtir ve W de zemin çizgisi üzerindeki pik genişliğidir. Buradan X_i pikinin pozisyonunun elektroforetik mobilite ile belirlendiğini görebiliriz. Pik genişliği W, difüzyon ve diğer süreçlerle belirlenir. İki komşu pik için $W_1 = W_2$ ise

$$Ayr = (X_{i2} - X_{i1}) / W_2 \quad (2.22)$$

Bir gauss eğrisini tanımlayan eşitlikten, $\Delta X_i = W_2 = 4\sigma$ ve $Ayr = 1$ olduğunda iki pik zeminde dokunur ve

$$Ayr = \Delta X_i / 4\sigma \quad (2.23)$$

Uzaklığın hız ve zamanla çarpımına eşit olduğu hatırlanarak ($X_i = V_i \cdot t$) ve Eşitlik 2.17 Eşitlik 2.13' e yerleştirilirse aşağıdaki eşitlik elde edilir.

$$Ayr = (\Delta \mu_{gö} E) t / 4(2D_{i,ort} t)^{1/2} \quad (2.24)$$

Burada $\Delta \mu_{gö}$ iki çözünenin görünen mobilitelerinin farkıdır ve $2D_{i,ort}$ iki çözünenin difüzyonlarının ortalamasıdır.

İşlem için verimin bir ölçüsünü elde etmede olasılık teorisini kullanabiliriz. Uzunluğuna rastgele bir ilerleme işlemi için, n adım uygulandığında varyans şöyle verilebilir:

$$\sigma = l(n)^{1/2} \quad (2.25)$$

l her bir adımın uzunluğudur. Eğer her bir adım diğerinden bağımsızsa, her bir işlem toplam değişime katkıda bulunur.

$$\sigma_{toplam}^2 = \sum \sigma_i^2 \quad (2.26)$$

Eşitlik 2.25' e yerleştirilirse ve düzenleme yapıldığında

$$l/n=L^2/\sigma_{\text{toplām}}^2=N \quad (2.27)$$

Rasgele işlemde adımların toplamı n, işlem için verimin bir ölçümü olan teorik tabaka sayısı N ile ters ilişkilidir.

Açıklama için Eşitlik 2.27' de L ve σ için yerleştirilirse

$$N=(\mu_{\text{ort}}E)^2t^2/(2D_{\text{it}}) \quad (2.28)$$

Burada μ_{ort} iki çözünenin ortalama mobilitesidir. N belirlemesi ve Ayırıcılık eşitliğinin bir karşılaştırmasıyla teorik tabaka sayısı ile ayırıcılığı ilişkilendiren bir eşitlik elde ederiz.

$$\text{Ayr}=(1/4)(\Delta\mu_{\text{gö}}/\mu_{\text{ort}})/V^{1/2} \quad (2.29)$$

Eşitlik 2.29' un kullanımı ayırıcılığı etkileyen iki faktör olan seçicilik ve verimin bağımsız olarak incelenmesine izin verir. Ayırma işleminin verimi N ile belirtilirken, seçicilik analit(lerin) mobilitesiyle temsil edilir.

Eğer ayırıcılık=1 ise:

$$N=16/(\Delta\mu_{\text{gö}}/\mu_{\text{ort}})^2 \quad (2.30)$$

N için diğer bir eşitlik, Eşitlik 2.24' den Gausyan pikin yarı yüksekliğindeki genişlik olarak kullanılarak türetilir.

$$N=5,54(L/W_{1/2})^2 \quad (2.31)$$

Burada $5,54=8 \ln 2$ ve $W_{1/2}$ yarı yükseklikteki genişliktir.

Elektroforezde, bir karışımındaki bileşenlerin ayrımı, uygulanan bir elektrik alanı altında yüklerinin, kütlelerinin ve şekillerinin bir fonksiyonu olan göreceli mobiliteleri ile belirlenir. Yalnız teorik tabaka, analitik pik şeklini tanımlamak ve ayrımı etkileyen faktörleri belirlemek için uygun bir kavramdır.

2.3.9. Değişim Kaynakları (Landers, 1997g)

N, teorik tabaka sayısı kolonlar veya laboratuvarlar arası ayrımın verimini karşılaştırmak için kullanışlı bir kavramken, verimi etkileyen faktörleri anlamak için kullanışlı güçtür. Bunun nedeni, ayırma işlemi süresince tek bir bileşenin olması ve iki bileşenin ayrımı veya bir kapilerin ayırıcı gücünü tanımlama için uygun olmamasıdır. Daha kullanışlı bir parametre HETP, (height equivalent of a theoretical plate) bir teorik tabakanın denge yüksekliğidir.

$$\text{HETP}=L/N=\sigma_{\text{toplām}}^2/L \quad (2.32)$$

HETP analit tarafından kullanılan kapilerin kesri olarak düşünülebilir. Ayırma veriminin bir çizelgesi olan HETP yi ölçmek, HETP ye katkıda bulunan özel bileşen

olan tek olarak incelenen ve tüm bir değeri belirlemek için birleştirilen N'i ölçmekten deneysel olarak daha kolaydır. Analit üzerindeki çoklu dağılma olayının değişimi şöyle özetlenebilir:

$$\sigma_{\text{topl}}^2 = \sigma_{\text{dif}}^2 + \sigma_{\text{T}}^2 + \sigma_{\text{int}}^2 + \sigma_{\text{duvar}}^2 \quad (2.33)$$

σ_{topl}^2 ' ı etkileyen tüm faktörler düşünüldüğünde, σ_{topl}^2 yalnızca difüzyonu değil, ayrıca Joule ısınmasıyla oluşan difüzyon veya mobilitedeki farklılıkları, örneğin ince bir disk olarak değil sınırlı çapların bir tıkaç olarak verildiği gerçeğini ve analitlerin kapiler duvar etkileşimlerini de içermelidir. Bu faktörlerin her biri, basit bir davranışta ayrı ayrı belirtilir.

2.3.9.1. Sıcaklık (Landers, 1997g)

Sıcaklık kontrolü önemlidir, çünkü kapiler belirli bir sıcaklıktayken verim etkilenebilir veya tampon iyonik türlerinin seçimiyle veya iyonik kuvvetlerin değişimi ile etkilenebilir. Bu sebeple, deneysel bakış açısından düşünüldüğünde, tekrarlanabilir elektroforegramlar elde etmede sıcaklık kontrolünün önemli olduğu görülür.

$$\sigma_{\text{T}}^2 = r^6 E^4 C_b^2 B^2 \Lambda^2 t / 1536 D_i k_b^2 T^4 \quad (2.34)$$

σ_{T}^2 ' nin kapilerin yarıçapına (r^6) ve alan kuvvetine (E^4) olan güçlü bağımlılığı, yüksek voltajlı elektroforetik ayrımların dar-çaplı kapilerlerde yapılmasının önemini gösterir. Bu durum sadece örnek yayılımını değil, buna ek olarak çözünen mobilitelerini etkilemekten kaçınmada termal etkileri önlemek için, etkili bir kapiler soğutmasının gerekliliğini gösterir.

2.3.9.2. Sınırlı Örnek Verme Hacmi (Landers, 1997g)

Kapiler elektroforezde çözünen maddenin kolona bir kuşak veya bir bant oluşturacak şekilde ince bir disk olarak sunulduğu farz edilir. Gerçekte, örnek kapilere silindirik bir tıkaç olarak verilir. Sternberg örnek verilmesi nedeniyle değişimi tanımlayan yaygın olarak kullanılan eşitliği türetmiştir.

$$\sigma_{\text{ö.verme}}^2 = l_{\text{ö.verme}}^2 / 12 \quad (2.35)$$

Burada $l_{\text{ö.verme}}^2$ örnek verim tıkaçının boyudur. Bu formül örneğin, CE için belirli bir yaklaşım olan dikdörtgen bir tıkaç şeklinde verilebildiğini varsayar. Tıkaç sınırlı bir hacme sahip olduğundan, ölçülebilir uzunluktadır. Sonuç olarak, örnek verme hacmi ve tıkaç boyu, CE' de gözlenen bant genişlemesinde en önemli faktörlerdir.

2.3.9.3. Analit- Duvar Etkileşimi (Landers, 1997g)

Analit-kapiler duvarı etkileşimleri veya örnek çözeltisindeki bileşenler, çok sayıda kompleks ve örneğe özeldir. Adsorbsiyon nedeniyle oluşan bant genişlemesini anlamada en iyi yaklaşım McManigill ve Swedberg' in yaklaşımıdır (Mc Manigill, Swedberg, 1989; Landers, (1997g)' den)

$$HETP = l^2 / 12L + 2D_{i,T} / u + [k' \mu / (l + k')^2] [r_0^2 / 4D_{i,T} + 2/k_d] \quad (2.36)$$

Burada l , enjekte edilen tıkaçın boyu, L , kapilerin toplam boyu, u , akış hızı, k' kapasite faktörü, r_0 kapilerin yarıçapı, $D_{i,T}$, belirli sıcaklıkta tasarlanan çözücünün difüzyon katsayısı, k_d , yüzeyin birinci dereceden ayrışma sabitidir.

Dikkatlice tasarlanan ve yürütülen deneylere rağmen, farklı akış hızlarında k' için bir değer belirlenebilir ve tabaka yüksekliğine etkisi hesaplanabilir. McManigill ve Swedberg herhangi bir koşul altında k' değerinin sıfır olmadığını ve 0,001 kadar düşük k' değerinin pikin şeklini ve sonuç olarak ayırımın verimini etkileyebileceğini göstermişlerdir.

2.3.10. Örnek Verilmesi

Kapiler elektroforezin yüksek verim yeteneklerini korumak için kullanılan enjeksiyon sistemi, önemli bir kuşak genişlemesine neden olmamalıdır. Kullanılan örnek enjeksiyon yöntemi, örneğin küçük hacimlerini verimli ve tekrarlanabilir bir şekilde kolona vermektir (Li, 1992b).

CE için kullanılan en yaygın numune verme yöntemleri elektrokinetik enjeksiyon ve hidrodinamik enjeksiyon gibi doğrudan kolona uygulama yöntemleridir. Bu tip enjeksiyon yöntemlerinin her ikisinde de kapilerin bir ucu, doğrudan olarak örnek enjektörü olarak kullanılır, böylece örnek enjeksiyon vanaları bağlantısı nedeniyle oluşan kuşak genişlemesi giderilmiş olur (Li, 1992b).

Hidrodinamik enjeksiyon, kapilerin her iki ucu arasına bir basınç farkının uygulanmasıyla sağlanır. Enjekte edilen örnek miktarı Poisevil eşitliği ile hesaplanabilir:

$$v_c = \frac{\Delta P \pi d^4 t}{128 \eta L_t} \quad (2.37)$$

Burada v_c hesaplanan enjeksiyon hacmi, ΔP kapiler uçları arasındaki basınç farkı, d kapilerin iç yarıçapı, t enjeksiyon süresi, η örnek viskozitesi ve L_t kapilerin toplam boyudur (Xu, 1996).

Kapiler elektroforez sistemlerinde kapilere verilen örnek miktarı (Q) genel olarak şöyle ifade edilir:

$$Q = (\text{hacim})_{\text{verilen}} (\text{derişim}) = \pi r^2 l [C_i] \quad (2.38)$$

Burada r kapilerin iç çapı, l örnek tıkaçının uzunluğu ve $[C_i]$ örneğin derişimidir. Hidrodinamik enjeksiyon yapılıyorsa bu formül şu şekilde ifade edilir:

$$Q = \pi r^2 [\Delta P r^2 t_{\text{enj}} / (8 \eta L)] [C_i] \quad (2.39)$$

Bu eşitlikte ΔP basınç farkı, r kapilerin iç yarı çapı, t_{enj} enjeksiyon süresi, η örnek çözeltisinin viskozitesi ve L kolon uzunluğudur (Landers, 1997h).

Elektrokinetik enjeksiyon belirli bir süre boyunca potansiyelle basit dönüşlerle uygulanır. Enjekte edilen her bir analitin mol sayısı Q_i , analitin görünen hızı $v_{gö}$, enjeksiyon süresi t ve ayırma tamponu ve örneğin iletkenliklerinin oranı k_t / k_a ile belirlenir.

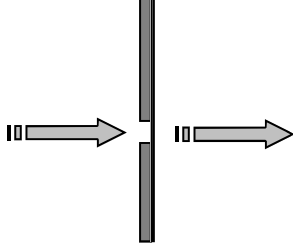
$$Q_i = v_{gö} \left(\frac{k_t}{k_a} \right) t \pi r^2 C_i \quad (2.40)$$

Burada r kapilerin çapı ve C_i i ninci analitin molar derişimidir. Her analit farklı mobilitelere sahip olduğu için, elektrokinetik enjeksiyon yanlıdır. Kalitatif analiz için genelde bu bir problem değildir. Kantitatif analiz için, enjekte edilen örneğin derişimi, esas örneğinkinden farklı olur. Buna rağmen, kapiler jel elektroforez için elektrokinetik enjeksiyon kullanışlıdır. Kapiler jel elektroforezde kapiler içindeki polimer, hidrodinamik enjeksiyon için çok viskozdur (Xu, 1996).

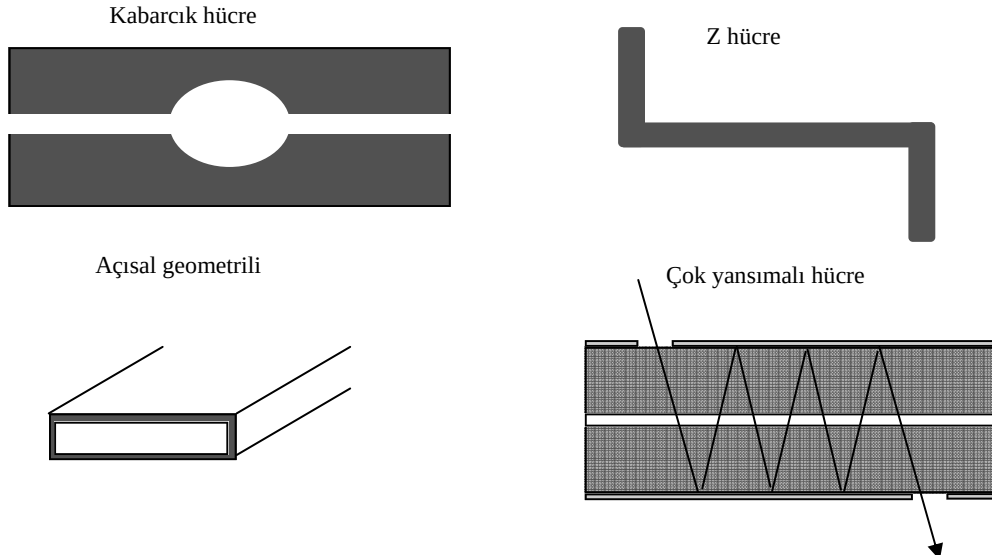
2.3.11. Belirleme Yöntemleri (Li, 1992a)

HPLC belirleme yöntemlerinin çoğu bazı değişikliklerle CE' ye uygulanabilir. Fakat CE' de alt teşhis sınırları (LOD), kapiler içinde belirleme yapıldığı durumda, kapiler kesiti ile sınırlanmaktadır (Şekil 2.10). Mümkün bir çözüm lazer-indüklenmiş floresans veya elektrokimyasal ölçümler için yüksek duyarlılıkta detektörler kullanmaktır. Bununla birlikte, bu detektörler pahalıdır veya birçok analit doğal olarak floresans özellikte veya elektrokimyasal olarak aktif olmadığı için uygulanamaz. Diğer bir çözüm de Şekil 2.11' de gösterilen kabarcık hücre veya Z tipi hücre gibi ayırıcılıkta

minimum azalmayla, duyarlılıkta 3–10 kat artış sağlayabilen uzatılmış optik ışın yollu hücrelerin kullanımıdır.



Şekil 2.10. Spektroskopik yöntemler kullanıldığında ışın yolunun kapillerin çapı ile belirlenmesinin gösterilişi



Şekil 2.11. Alt teşhis sınırı (LOD) değerini iyileştirmek için geliştirilen hücre tasarımları (Li, 1992a)

2.3.12. Ayırma Yöntemleri ve İlkeleri (Li, 1992b)

Elektroforetik ayrımlar sürekli veya kesikli elektrolit sistemlerinde uygulanabilir. Sürekli elektrolitin kullanıldığı durumlarda zemin elektrolit olarak adlandırılan çözelti göç yolu boyunca bir süreklilik oluşturur. Bu süreklilik zamanla değişmez ve elektrik akımının akışı ve göç yolu boyunca elektrik alanının oluşumu için, elektriksel olarak iletici bir ortam sağlar. Bu zemin elektroliti genelde hızları seçici olarak etkileyebilen bir tampondur. Zemin elektroliti sistemin özelliklerinin göç yolu boyunca değiştirilmesiyle ayırım kinetik veya durgun durum süreci olarak çalıştırılabilir.

Kinetik işlemden, zemin elektrolit bileşimi göç yolu boyunca sabittir. Uygulanan elektrik alanı ve dolayısıyla ayrılan maddelerin etkili hızları da sabittir. Sonuç olarak,

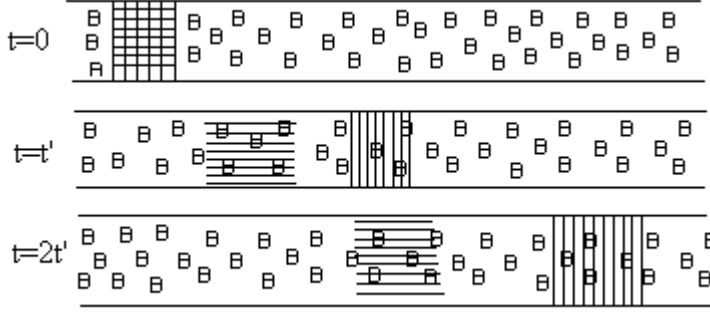
farklı maddeler sabit hızla göç ederler fakat sistemden akım geçirildiğinde farklı hızlar sağlanır. Kapiler kuşak elektroforezi (CZE), kapiler jel elektroforez (CGE), miselli elektrokinetik kromatografi (MEKC) ve kapiler elektrokromatografi (CEC) bu tip ayırma işlemlerine örnektir.

Durgun durum sürecinde, zemin elektrolitin bileşimi sabit değildir. Hem elektriksel alan hem de etkili hızlar, göç yolu boyunca değişebilir. Bu tip ayırım işleminin en yaygın pratik uygulaması göç yolu boyunca pH gradienti oluşturulmasıdır. Belirli bir zaman aralığından sonra örneğin belirli bileşenleri (örn: amfolitler) göç edemezler ve izoelektrik noktalarına göre belirli karakteristik pozisyonlarda odaklanırlar. Sonuç, elektrik akımının geçişi süresince göç yolu boyunca belirli yerlere odaklanan maddelerin durgun durumlarının elde edilmesidir. Kapiler izoelektrik odaklama (CIEF) bu tip ayırma işleminin bir örneğidir.

Kesikli elektrolit sistemlerinin olduğu durumlarda, örnekler belirli tek kuşaklar halinde bulunan iki farklı elektrolit arasında göç ederler. Sürekli olmayan elektrolit bir öncü ve bir artçı elektrolitten oluşur. Öncü elektrolit ilk kuşaktır ve artçı elektrolit de son kuşaktır. Kapiler izotakoforez (CITP) sürekli olmayan elektrolit sistemlerinde elektroforetik ayırımın bir örneğidir.

2.3.12.1. Kapiler Kuşak Elektroforezi (CZE) (Landers, 1997o)

Kapiler kuşak elektroforezi sadece CE' nin en basit formu değil, ayrıca en yaygın kullanılanıdır. Bu yöntemin tartışılması CE için cihazın genel tasarımının anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Sadece ayırma tamponuna özelleştirilmiş ayraçların ilavesi ile; örneğin yüzey aktif maddelerin eklenmesi ile MEKC, amfolitlerin ilavesi ile CIEF ve gözenekli matriksin ilavesi ile CGE için aynı cihaz kullanılabilir. Bu yöntemde örnek uygun yöntem kullanılarak kapiler kolona verilir. Analiz için belirli bir potansiyel değeri uygulanır ve örnek bileşenleri bu potansiyel altında Şekil 2.12' de gösterildiği gibi elektroforetik hızlarına göre ayrılırlar.

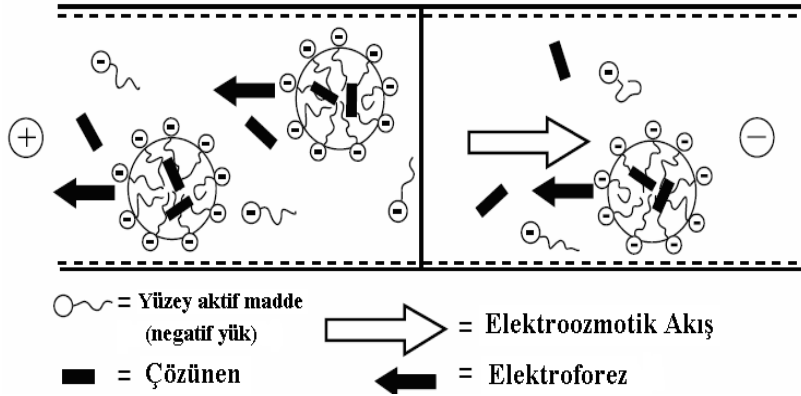


Şekil 2.12. Kapiler kuşak elektroforezde karışımın analiz süresince niteliği değişmeyen bir tampon içerisinde ayrılması (Li, 1992c)

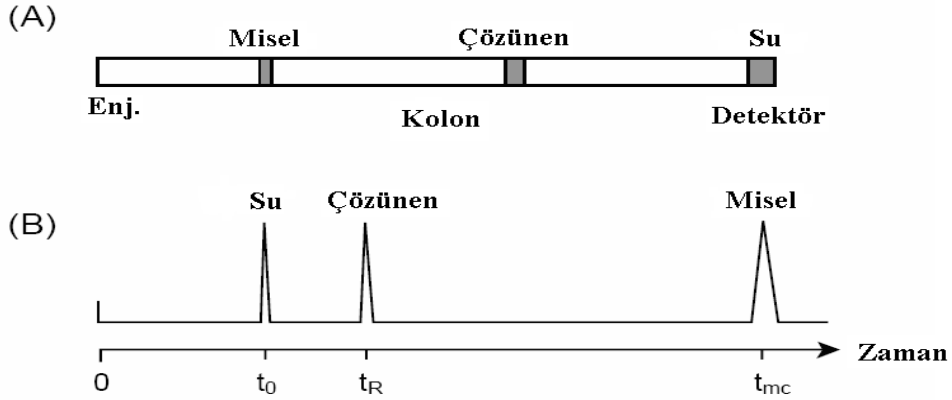
2.3.12.2. Miselli Elektrokinetik Kromatografi (MEKC)

MEKC' de kapiler kuşak elektroforez tamponlarına kritik misel derişiminin (cmc) üzerinde sodyumdodesil sülfat (SDS) eklenir. Anyonik karakterde miseller oluşur ve bunlar, anoda doğru bir elektroforetik mobiliteye sahip olurlar. Analitler sulu faz ve misel fazı arasında dağılır (Şekil 2.13). MEKC en çok katoda doğru elektroozmotik akışla uygulanır. Genel olarak, SDS misellerinin elektroforetik mobilitesi, elektroozmotik mobilitelerinden daha düşüktür ve yavaşça katoda doğru hareket ederler. Miseller ayırma süresince aktif olarak hareket ettiği için bir göç penceresi oluşur. Nötral analitler için bu göç penceresi, elektroozmotik akış zamanı t_0 ve misel göç zamanı t_{mc} ile belirlenir. Misel fazıyla zaman harcamayan nötral bir analit t_0 da göç ederken, tüm zamanını miselle harcayan analit t_{mc} süresinde göç eder (Şekil 2.14). Her iki faz arasında dağılan nötral analitler orta bir zamanda göç ederler (Terabe, 2004).

SDS' li ayırmalar hidrofobiklik, hidrojen bağı ve yükteki farklılıkları temel alır. Bunlar, yüzey aktif derişimi (15-200 μm), pH (2-12) ve metanol, asetonitril gibi (%0-30 (V/V)) organik ilavelerle değiştirilebilir. MEKC' in çekici özelliklerinden biri de en iyi ayırma şartlarında, tabaka sayısının küçük moleküller için 100.000 i aşmasıdır. Bu özellik seçicilikte küçük bir fark sergileyen bileşiklerin ayırmasına izin verir. Diğer bir özelliği de misellerin çözme gücüdür. İdrar ve plazma gibi karmaşık örnek matrisleri doğrudan enjekte edilebilir. t_{mc} de göç eden yüksek molekül ağırlıklı proteinler, ilgili küçük bileşenlerden ayrılırlar. Geleneksel kromatografide olduğu gibi ayırıcılık, tabaka sayısı, dağılma ve seçiciliğin bir fonksiyonudur. Bunlara ilaveten, ayırıcılık göç penceresinin genişliğine de bağlıdır (Landers, 1997).



Şekil 2.13. Anyonik yüzey aktif madde ilavesinde ayırımın şematik görünümü (Terabe, 2004)



Şekil 2.14. A) MEKC de kuşak ayırım şematik gösterimi ve B) elektroforegram

2.3.12.2.a. MEKC' de Seçiciliğin ve Ayırıcılığın Kontrolü

MEKC ayırımı kromatografik ayırmayı temel aldığından, optimizasyon stratejileri klasik CE' ye göre daha yönlüdür.

MEKC ayırıcılık eşitliği:

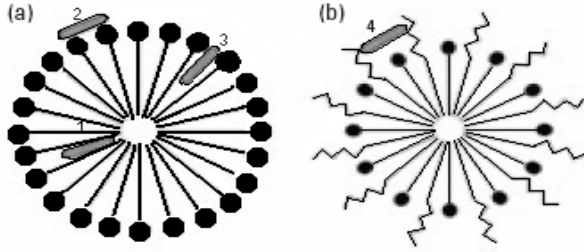
$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) \cdot \left(\frac{1 - t_0/t_{mc}}{1 + (t_0/t_{mc}) \cdot k_1} \right) \quad (2.41)$$

Burada N tabaka sayısı ve $\alpha = k_2/k_1$ olan seçicilik katsayısıdır. Eşitlik 2.41 sağ taraftaki son terim dışında, geleneksel kromatografide kullanılan denkleme benzerdir. Bu değişken de kapiler içinde miselin göçü veya yalancı sabit fazdan gelir; çünkü bu yalancı sabit fazın göçü kolon boyunun azalmasına neden olur. Eğer misel göçü tamamen baskılanırsa veya t_{mc} sonsuz olursa, ayırıcılık eşitliği kromatografideki eşitlikle aynı olur (Terabe, 2004).

Ayrımı etkilemek için α değiştirilmelidir. Ters faz sıvı kromatografide genelde ayırım sabit fazın değişimiyle değiştirilemez, çünkü C₁₈ kabul edilen en yaygın sabit

fazdır. Bununla birlikte MEKC’ de yalancı sabit fazlar misellerdir ve miselleri oluşturmak için birçok farklı yüzey aktif maddeler kullanılabilir (Terabe, 2004).

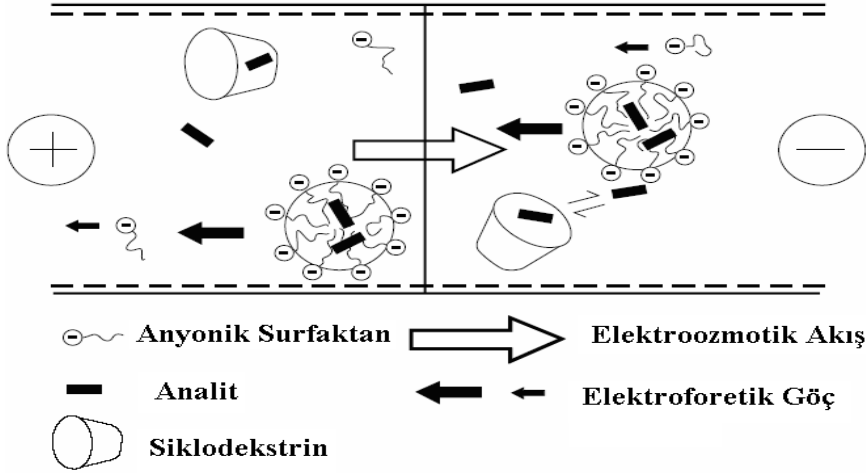
Karışık misellerin kullanımıyla, özellikle iyonik ve noniyonik veya iyonik ve zıt çift yüklü iyoniklerin birleşimleri, seçiciliği değiştirmek için diğer mümkün seçenekleri oluşturur. Yüzey aktif madde moleküllerinin polar gruplarının kimyasal yapısı, seçiciliği, miselin hidrofobik kısmı veya yüzey aktif madde moleküllerinin lipofilik gruplarından daha çok etkiler. Çünkü analitlerin çoğu miselle yüzeyde etkileşir. Polioksietilen gruplarıyla yüzeyleri kaplı karışık miseller farklı yüzey karakteristiklerine sahiptirler ve bu nedenle SDS misellerinden farklı seçiciliğe sahiptirler (Terabe, 2004).



Şekil 2.15. (a) İyonik misel ve (b) iyonik ve noniyonik yüzey aktiflerin (1) içerden, (2) yüzeyde, (3) kosurfaktan olarak ve (4) noniyonik yüzeyle etkileşimiyle karışık misel (Terabe, 2004)

Doğrusal çözünme enerji ilişkisine göre analitin hidrofobikliği, seçiciliği belirleyen başlıca etkidir. Seçiciliği etkileyen ikinci faktör de analitin hidrojen bağı bazıklığı veya yüzeyin hidrojen bağı asitliğidir. Birçok durumda yalnızca sulu tampon kullanılır fakat aşırı hidrofobik analitin sulu faza olan çözünürlüğünü arttırmak için misel çözeltisine metanol veya asetonitril gibi organik bir çözücü ilave edilebilir. Aşırı hidrofobik analitleri analiz etmek MEKC’ in kendini gösteren bir özelliğidir (Terabe, 2004).

Misel çözeltisine β - veya γ - siklodekstrinleri (CD) ilave etmek de çok etkilidir. CD’ ler elektriksel olarak nötral olmasına ve sulu faz gibi davranmasına rağmen, analitin büyüklüğüne ve kendisinin boşluğuna bağlı olarak hidrofobik etkileşimlerle analitleri bağlar. Buna ilave olarak, CD’ ler kiral bileşiklerdir ve akiral yüzey aktif maddelerle MEKC’ de, özellikle nötral olanlarda enantiyomerlerin ayrımı için kullanışlı ilavelerdir (Terabe, 2004).



Şekil 2.16. Siklodekstrin ilavesinde MEKC ayırımının şematik bir gösterimi (<http://www.ceandcec.com/266924%20-%20CE%20Primer%203.pdf> , 28.02.2005)

Yüksek derişimde üre ilavesi hidroforbik bileşiklerin sulu çözeltideki çözünürlüğünü artırır. Üre 7,0 M a kadar suda çok çözünebilir. Ayrıca çözelti bu kadar yüksek derişimde bile UV geçirendir ve viskozitesi yüksek değildir.

Kolayca oluşabilen yalancı sabit faz olarak, farklı seçicilikler sergileyen nötral yüzey aktif maddelerin bir grubu olan safra asidi tuzları da kullanılabilir. Safra asidi tuzlarının misel yapısı geleneksel uzun alkil zincirli yüzey aktif maddelerden çok farklı olarak farz edilir. Örneğin, steroid hormonlarının çoğu doğal olarak hidroforbiktir fakat sodyum kolat kullanımıyla kolayca ayrılabilirler. Yüksek bir sıcaklığın kullanımıyla aşırı hidroforbik analitlerin ayrımı iyileştirilebilir, çünkü dağılma katsayısı yüksek sıcaklıkta genelde düşüktür (Terabe, 2004).

2.3.12.3. Kapiler Jel Elektroforez (CGE) (Xu, 1996)

Kapiler jel elektroforez geleneksel düzlemsel jel elektroforezin kapiler formatına bir adaptasyonudur; polimerik bir jel ortamında uygulanan kapiler kuşak elektroforezidir. CGE benzer yük/kütle oranları dolayısıyla aynı elektroforetik göç hızına sahip olan proteinler ve DNA' lar gibi büyük biyolojik moleküllerin ayrımı için kullanışlıdır. CGE molekülleri, konvektif olmayan bir ortamda boyutlarına göre ayırır. Ayırma ortamı çapraz bağlı polimerler veya poliakrilamid ve agaroz jeller gibi jeller kadar, doğrusal poliakrilamid, polietilenglikol ve selüloz türevleri gibi çapraz bağlı olmayan polimerleri de içerir.

Kapiler, içindeki karışık polimer ağı içinde küçük moleküllerin büyüklerden daha hızlı göç ettiği bir moleküler elek olarak davranır. Polimer ağı çözünenin difüzyon

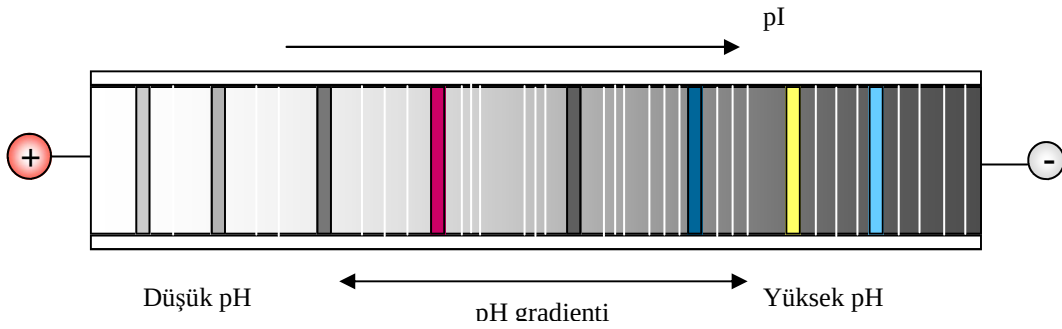
hızını azaltır ve elektroozmotik akışı baskımlarken çözünenin kapiler duvarına adsorbsiyonunu azaltır. Çapraz bağlı polimerlerle, kapilerin ayırıcılığı, toplam monomer derişiminin ve çapraz bağlamanın derecesinin değişimiyle molekül ağırlıkların verilen bir aralığı için kolaylıkla optimize edilebilir. Bununla beraber, çapraz bağlı olmayan polimerler bir problem ortaya çıktığında (örn: kapiler içinde bir hava kabarcığı tuzağı) kapilerden kolayca geçirilebilir ve her bir ayırmada taze bir kapiler oluşturmak için yeniden yüklenebilir.

2.3.12.3.a. CGE' de Jel Bileşiminin Etkisi

Moleküllerin jelden geçebilme yeteneği jeldeki boşlukların şekli ve büyüklüğüne, elenen moleküllerin büyüklük ve şekilleri ve moleküllerle jel matriksi arasında olan iyon değişimi veya adsorpsiyon gibi etkileşimlere bağlıdır. Farklı derişim ve bileşimlerdeki jellerde var olan boşlukların boyut aralığı bilgisi, CGE için doğru tip ortamın seçilmesinde kullanışlıdır. Uygun boşluklu bir karışımın bileşenlerinin göreceli mobiliteleri ve var olan moleküllerin boyut aralığı düşünülerek seçim yapılabilir.

İlaveten çözücü içeren jeller belirli uygulamalarda kullanılabilir. Belirli sınıf proteinlerin çözünmesini sağlayan maddeler içeren akrilamid jellerin kullanımı, diğer yöntemlerle başarılması çok zor olan birçok ayırmaya izin verir. Bu çözücülere örnek olarak üre ve sodyum dodesil sülfat verilebilir.

2.3.12.4.Kapiler İzoelektrik Odaklama (CIEF)

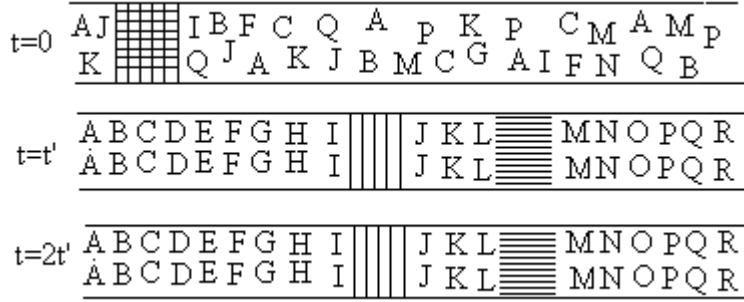


Şekil 2.17. Kapiler izoelektrik odaklama yönteminde ayırma tamponunda kolon boyunca pH değişimi oluşturulması

Kapiler izoelektrik odaklama proteinler, peptitler, aminoasitler ve farmasötikler gibi amfoterik maddelerin serbest çözeltide olduğu kadar polimer matriksinde de ayırımı için kullanılır. CIEF' de ayırım, görünen hızdaki farklılıktan çok örnek bileşenlerinin

izoelektrik noktalarındaki (pI) farklılıkları temel alır. Çift yüklü iyonların bir serisi (amfolitler olarak adlandırılır) kapilerin odaklanmasında bir pH gradienti oluşturmak için kullanılır. Pozitif yüklü amfolitler katoda doğru göç ederlerken negatif yüklüler anoda göç ederler. Böylece, kapilerin katot tarafında pH artar ve anot tarafında azalır (Şekil 2.17).

Bir amfolit kendi pI noktasına vardığında artık yüklü değildir ve göçü durur. Sonuç olarak kararlı bir pH gradienti oluşturulur. Eğer net bir pozitif yüke sahipse, katoda göç eder. Göçü boyunca, net sıfır yüke sahip olduğu bir pH ile karşılaşır ve göçü durur (Şekil 2-18). Daha çok sayıda amfolit kullanıldığı zaman pH gradienti daha az keskin olur. Tamponların tampon kabından kapilere göçünü engellemek için katottaki elektrolitin pH' sı, tüm bazik amfolitlerin pI' larından daha yüksek olmalı ve anottaki tamponun pH' sı, tüm asidik amfolitlerin pI' larından daha küçük olmalıdır (Landers, 1997i).



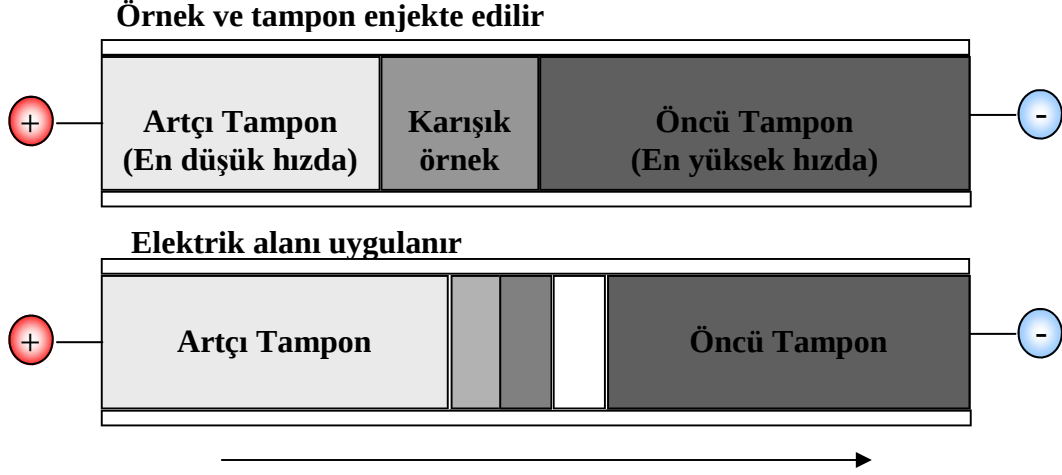
Şekil 2.18. Kapiler izoelektrik odaklama yönteminde karışım ayrılırken çözeltide de yönelmeler oluşur, bu da pH değişimine neden olur

Elektroozmotik akış ve diğer konvektif kuvvetler giderildiğinde veya büyük ölçüde baskılandığında CIEF daha etkindir. Bununla birlikte, elektroozmos varlığında CIEF uygulaması, kapiler içindeki çözeltinin elektroozmotik hızı analitlerin elektroforetik hızını aşmadığı sürece mümkündür (Landers, 1997i).

CIEF doğru bir odaklama tekniğidir. Eğer odaklanmış banttı bir çözünen molekülü kuşak merkezinden difüzyonla uzaklaşacak olursa, hemen proton kaybeder veya kazanır ve böylece yüklü hale geçer. Yüklü durumdaki çözünen kuşak merkezine doğru göç eder. Sonuç olarak, kuşaklar sabit ve kesin olarak odaklandığında kararlı bir duruma ulaşılır (Xu, 1996).

2.3.12.5. Kapiler İzotakoforez (CITP) (Xu, 1996)

İzotakoforez “izo” (aynı) + “tako” (hız) + “forez” (elektroforez) terimlerinden gelir. Ayrıca yerinden çıkarma elektroforezi veya çok kuşaklı elektroforez olarak da bilinir. Kapiler izotakoforez bir kapilerde uygulanan izotakoforezdır.



Şekil 2.19. Kapiler izotakoforez yönteminde ayrımın şematik gösterimi

CITP’ de örnek, bir öncü elektrolit ve bir artçı elektrolit arasına elektroozmotik akış olmaksızın yerleştirilir. Öncü elektrolit örnek kuşağındaki iyonların mobilitelerinden daha büyük mobilitelere, artçı elektrolit de daha küçük mobilitelere sahiptir.

CITP’ de ayrım örnek kuşağındaki analitlerin hızları v_i farkını esas alır.

$$v_i = \mu_{ep,i} E_{s,z} \quad (2.42)$$

Burada $\mu_{ep,i}$, i türünün elektroforetik mobilitesi ve $E_{s,z}$ ayrım öncesi örnek kuşağının elektrik alan şiddetidir. Geçici ayırma işlemi süresince, tüm analit iyonları sabit elektrik akımı ve sıcaklık altında art arda bantlara ayrılırlar. Ohm kuralına göre, elektrik alan şiddeti iyon bantlarının mobilitesi azaldığı için artar. Ayrımdan sonra, farklı bantlardaki her bir analit iyonları aynı hızda v hareket eder, böylece bantların kararlı durumu oluşur.

CITP anyon ve katyonların aynı sürede ayrımı için kullanılamaz. Belirleme yöntemleri iletkenlik, diferansiyel iletkenlik veya direkt UV absorpsiyonunu temel alır. Son durumda, boşluklar analit bantları arasına yerleştirilir. Boşluklar UV’ de absorpsiyon yapmayan çözünenleri içerir ve iki komşu bandın arasında bir mobilitelere sahiptir.

2.3.13. Önderiştirme (Sıkıştırma) Yöntemleri

2.3.13.1. Elektrokinetik Önderiştirme Teknikleri

2.3.13.1.a. İzotakoforetik Önderiştirme (Landers, 1997j)

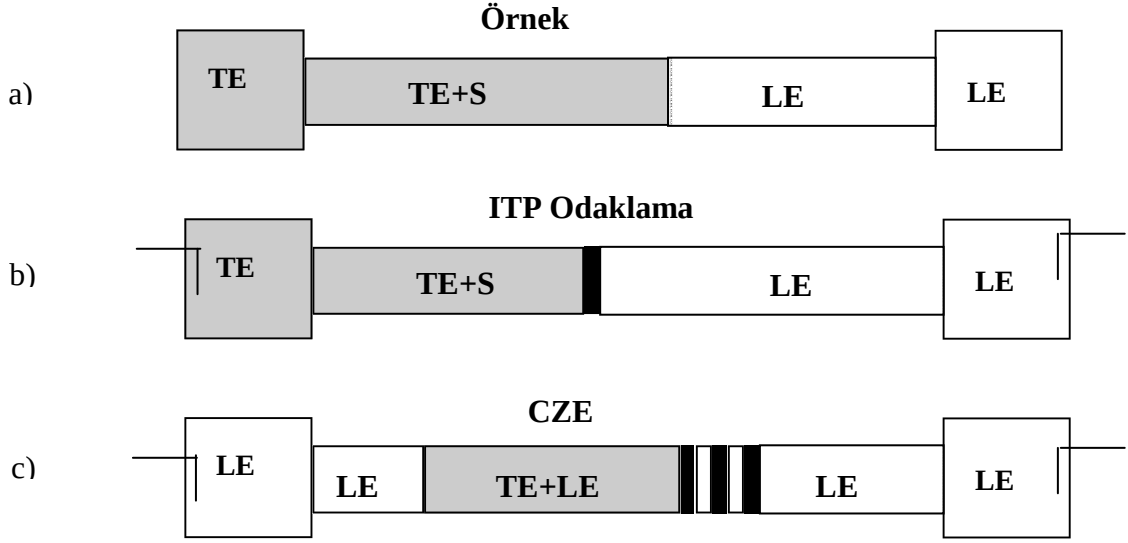
CE ile gerçekleştirilen önderiştirme işlemlerinden biri de izotakoforetik önderiştirme işlemidir. İzotakoforetik önderiştirme ile ilgili temel iki yöntemden söz edilebilir. Yöntem 1 destek veya zemin tamponunda bir öncü tampon (LE) kullanır. Örnek LE içerisinde çözünür ve büyük bir hacmi kolona enjekte edilir. Ardından kapilerin enjeksiyon yapılan ucu, artçı tampon (TE) içeren bir kaba yerleştirilir. Keskin ITP bantları içerisinde örneği odaklamak için belirli bir zaman potansiyel uygulanır. Örnek odaklandıktan sonra kapiler, TE tampon kabından çıkarılır ve destek tampon kabına yerleştirilir. Normal CE süreci ile örneği ayırmak için tekrar potansiyel uygulanır.

Odaklama basamağı LE' nin örnekten ve TE' den daha yüksek mobiliteye sahip olduğunu farz etmektedir. Odaklama ve ayırma basamakları için gereken süre, enjekte edilen tampona ve örnek tamponun derişimine bağlı olduğundan tekrarlanabilir alıkonma zamanları için enjeksiyon sürecinde dikkatli olunmalıdır. Ayrıca örnekteki esas bileşenlerin derişimi örnekten örneğe çok fazla değişirse göç zamanları kendiliğinden değiştirebilir. Bazı durumlarda örnek kuşağındaki karşı-iyonların derişimini kontrol etmek için desalting (tuzdan arındırma) gerekebilir. Kuşakların belirlenmesinde sabit bir hızı sağlamak için sabit potansiyel yerine sabit akım tavsiye edilir.

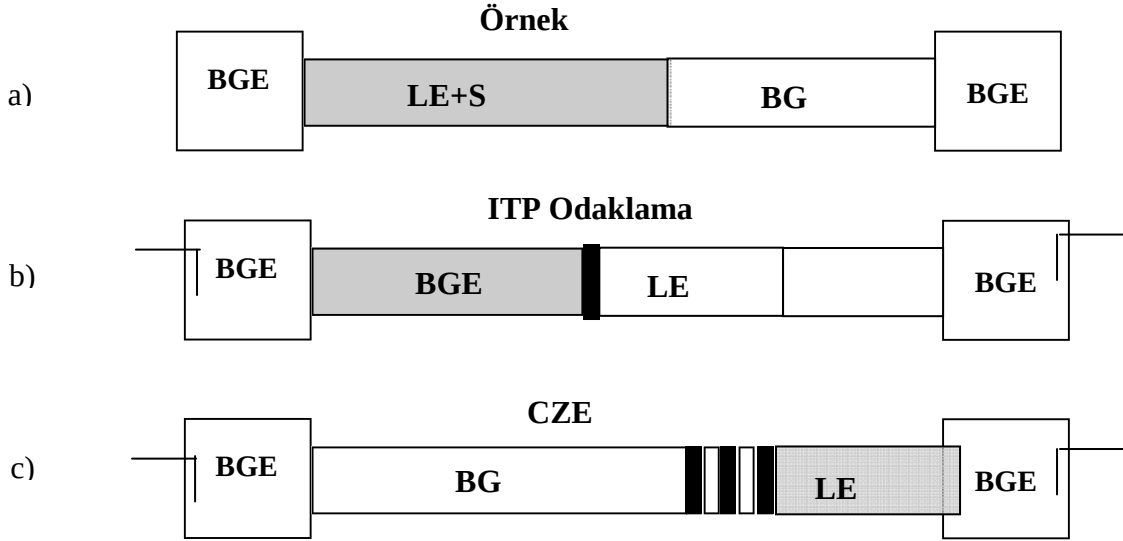
Yöntem 2 hem ITP odaklama hem de elektroforetik ayırma aşamasında sadece tek bir elektrotuz kullanır. Örnek tamponu benzer yüke ve yüksek mobiliteye sahiptir ve geçici ITP aşaması boyunca TE olarak rol oynar. Akım uygulandıktan sonra örnek kuşağındaki yüksek mobilitedeki karşı-iyonlar LE olarak öne hareket edeceklerdir ve örnek bileşenleri bir izotakoforetik süreçle kuşağın ardında sıkışacaklardır. Zamanla LE destek tamponunda dağılacaktır ve örnek kuşakları gevşeyecektir ve normal CE süreci ile göç etmeye ve ayrılmaya devam edeceklerdir.

Her iki yöntemin uygulanması temel olarak Şekil 2.20' de anlatılmıştır.

Yöntem 1



Yöntem 2



Şekil 2.20. CZE de geçici ITP örnek önderiştirilmesinin şematik diyagramı Yöntem 1 : öncü elektrolit (LE) destek tamponu veya zemin tamponunda kullanılır. Yöntem 2 : Örnek tamponu öncü iyonlar içerir ve zemin tamponundaki karşı yanlar artçı elektrolit (TE) olarak rol oynarlar; (BGE: Zemin elektrolit, S: Örnek)

Yöntem 1 veya 2 olarak tanımlanan sürekli geçici ITP örnekleme önderiştirilmesi için güçlü bir araçtır. Büyük örnek hacimleri enjekte edilebilir ve bir adımda önderiştirme yapılabilir ve belirleme duyarlılığındaki gelişme 100 kat veya daha üstünde olabilir. Bununla birlikte tampon sisteminin doğru seçimi başarılı bir ITP için oldukça önemlidir.

Ayırma basamağı için enjeksiyon tıkaçının uzunluğu kapilerin etkin uzunluğu üzerinde bir sıkıntı olduğundan, göç zamanı enjeksiyondan enjeksiyona değişir. Sonuç olarak bir iç standardın kullanımı tavsiye edilmektedir. Bunun yanı sıra, örnek kuşakları arasındaki ayırıcılık, elektroforetik ayırma basamağı boyunca kapilerde harcanan zaman azaldığından, kaybolur. Bu problemi çözmek için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan biri kapilerin enjeksiyon ucunda odaklanmış kuşağı tutmak için karşı akım oluşturulmasıdır. Bu yöntemde odaklama adımı süresince örnek kuşağının hızı ve akım arasındaki ilişki ITP' de örnek hızını dengelemek için gereken basınç ve ITP kuşakları enjeksiyon ucunun kıyısında tutularak tekrarlanabilir CE göç zamanları elde edilebilir.

2.3.13.1.b. Sürekli Tampon Sistemlerinde Alan Arttırılması

Alan arttırımlı CE' nin en basit formunda; düşük derişimli tamponda hazırlanan analit iyonlarını içeren öneğin uzun bir tıkaçı, yüksek derişimli tamponla şartlanmış kapiler içerisine enjekte edilir. Kapilere yüksek potansiyel uygulandığında elektroforez meydana gelir ve düşük derişimli bölgede bulunan iyonlar daha büyük bir elektrik alan şiddeti ile karşılaşılır ve yüksek derişimli bölgede bulunan iyonlardan daha hızlı hareket ederler. İyonlar düşük ve yüksek iyonik şiddetli bölgeler arasındaki derişim sınırına geldiklerinde daha düşük elektrik alan şiddetiyle karşılaşılır ve elektroforetik hızları düşer. Elektroozmotik akış yok ise derişim sınırından iyonların dışarı akışı, içeri akışı ile eşit olacaktır. Sonuç olarak difüzyon etkisi ihmal edildiğinde derişim sınırı sabittir. Bu durumda derişim sınırının görünen hızı, ana çözeltinin elektroozmotik hızından kaynaklanır. Bu yalancı –durağan derişim sınırı, sabit bir tampon sisteminde alan arttırımlı CE ile izotakoforez arasındaki başlıca farkı oluşturur. Kapiler boyunca farklı bölgelerde farklı elektroliz çözeltileri bulunan izotakoforezde elektrik alanları, her bir bölgede bulunan iyonların etkin mobiliteleri ile ters orantılıdır (Landers, 1997k).

Alan-arttırımlı kapiler elektroforezde L uzunluğunda bir kapiler kolon, aynı elektrolitin iki farklı derişimdeki tamponu ile doldurulur. Kolonun xL kadar kısmının derişim 1 çözeltisi ile (1-x)L kadar kısmının da derişim 2 çözeltisi ile doldurulduğu farz edildiğinde ki burada $0 \leq x \leq 1$ dir, kolonun toplam direnci (R);

$$R = (\rho_1 X + \rho_2 (1 - X)) \frac{L}{A} \quad (2.42)$$

olacaktır. Burada ρ_1 ve ρ_2 sırasıyla tampon 1 ve tampon 2 nin öz direnci ve A' da kolon en kesit alanıdır. Kolon boyunca V potansiyeli uygulandığında elektrik akımı I şu değeri alır:

$$I = \frac{VA}{L(\rho_1 X + \rho_2(1 - X))} \quad (2.44)$$

Bu eşitlik düzenlenip x için çözülürse:

$$X = \frac{(I_2/I) - 1}{(I_2/I_1) - 1} \quad (2.45)$$

Burada $I_1 = VA/\rho_1 L$ ve $I_2 = VA/\rho_2 L$ dir. Bu değerler kolon tamamen sırasıyla derişim 1 ve derişim 2 çözeltileri ile doldurulduğunda elde edilen akımlardır. Eşitlik 2.45, I_1 ve I_2 değerlerinin bilindiği durumda karışık sistemin akım değerinin izlenerek doldurulmuş X uzunluğunun hesaplanıp kontrol edilebileceğini gösterir (Chien ve ark., 1991).

Elektrik alan şiddeti E akım yoğunluğu ve direncin çarpımı olduğu için, farklı derişimli iki kısmın yerel alan şiddetleri E_1 ve E_2 aşağıdaki eşitlikle verilir:

$$E_{1,2} = \frac{E_{o_{\rho_{1,2}}}}{\rho_1 X + \rho_2(1 - X)} \quad (2.46)$$

Burada $E_o = V/L$ tampon 1 veya tampon 2 ile doldurulmuş tek sistemin alan şiddetidir. Eşitlik (4) düşük dirençli kısımdaki elektrik alan şiddetinin gerçek tek sistemin alan şiddetinden daha büyük olduğunu gösterir (Chien ve ark., 1991).

Birinci ve ikinci kısımdaki elektrik alan şiddetinin kesin değeri X değerine bağlı iken, oranları sabittir ve sadece öz dirençlere bağlıdır.

$$E_1/E_2 = \rho_1/\rho_2 \quad (2.47)$$

Genelde, aynı tampon bileşimi için öz dirençler ρ , derişimle ters orantılıdır. Bu yüzden, düşük derişimli kısımdaki iyonlar daha yüksek elektrik alan şiddeti ile karşılaşılır ve yüksek derişimli kısımdaki iyonlardan daha hızlı hareket ederler. Derişim sınırına geldikleri zaman, daha düşük elektrik alan şiddetiyle karşılaşılır ve yavaşlarlar (Chien ve ark., 1991).

Kapiler kolonda elektroozmotik akış yoksa derişim sınırı dışında iyonların değişimi tamamen aynı olacaktır. Sonuç olarak, bu derişim sınırı difüzyon etkisi ihmal edildiğinde durağan olacaktır. Başka bir deyişle, alan-arttırımalı kapiler elektroforezde

derişim sınırının görünen hareketi yalnızca tüm çözeltinin elektroozmotik akışından gelir. Bu yalancı-durağan derişim sınırı, alan- arttırılmalı kapiler elektroforez ile izotakoforez arasındaki esas farktır (Chien ve ark., 1991).

Alan arttırılmalı CE' nin başlıca üstünlüğü basitliğidir. Örnek; düşük derişimli bir elektrolitte çözüldüğü ve kapiler içerisine enjekte edildiğinden, bu deriştirme yöntemi herhangi bir elektroliz sistemine evrensel olarak uygulanabilir. Teorik olarak sıkıştırma miktarı, alan artırma faktörü ile orantılıdır; derişimler arasında ne kadar büyük fark olursa o kadar keskin pikler ve daha iyi sıkıştırma sonucu elde edilir. Bu yüzden sonsuz bir ince kuşak içerisine sıkıştırma dolayısıyla oldukça düşük derişimli tampon veya suda çözünmüş analitten oluşan uzun bir örnek tıkaçı ile maksimum sıkıştırmanın gerçekleştirilebileceği beklenebilir. Bununla birlikte yerel elektroozmotik hızlar ve çözeltideki hızlar arasındaki karşılaşma nedeniyle kapiler içersinde laminer bir akış (geri basınç etkisi) oluşabilir. Laminer akış sıkıştırma süreci ile oluşturulan keskin kuşağın genişlemesiyle sıkıştırma etkinliğini düşürecektir. Sonuçtaki laminer akış, derişimdeki fark ile orantılıdır. Sıkıştırma ve genişlemeden oluşan bu birbirine karşı iki etki nedeniyle, iyi ayırıcılığın başarılabilmesine yine de izin veren kapiler içerisine verilmiş optimum su tıkaçı vardır. Başlıca bir kural olarak ayırma tamponu örnek tamponundan 10 kat daha derişik olmalıdır. Bu difüzyon-sınırlı pik genişlemesini sağlayan normal bir enjeksiyondan 10 kat daha uzun örnek tıkaçının enjeksiyonuna izin verir (Landers, 1997k).

Sıkıştırmada bant genişlemesinin diğer bir kaynağı, yüksek alan şiddetinden kaynaklanan örnek tıkaçındaki sıcaklık artışıdır. Genelde ısınma derecesi kapiler uzunluğu boyunca termal gradient oluşturan ayırma tamponu içersindeki ısınan bölge ile tıkaç uzunluğunun bir fonksiyonudur. Bu termal gradient sadece bant genişlemesine neden olmaz ayrıca ısıya dirençli olmayan örneklerin bozulmalarına da yol açabilir. Ayırma tamponu olarak yüksek derişimli inorganik tamponlar kullanıldığında dikkatli olunmalıdır (Landers, 1997k).

2.3.13.1.c. Alan-Arttırılmalı Kapiler Elektroforezde Elektroozmotik Özellikler

Çift tabaka modelinde elektroozmotik hız, silika su ara yüzeyinde zeta potansiyeli ile orantılıdır. Bu zeta potansiyeli, yüzeydeki yükün ve iyonik şiddetin karekökü veya derişimle ters orantılı olan Debye kalınlığının basit bir çarpımıdır.

Derişim arttırıldığında, elektroozmotik hız azalır. Belirli derişimde tek bir tamponla doldurulmuş bir kolonda, elektroozmotik hız, elektrik alan şiddeti ile elektroozmotik mobilitenin çarpımına eşittir ve tüm kolon uzunluğu boyunca sabit olur (Chien ve ark., 1991).

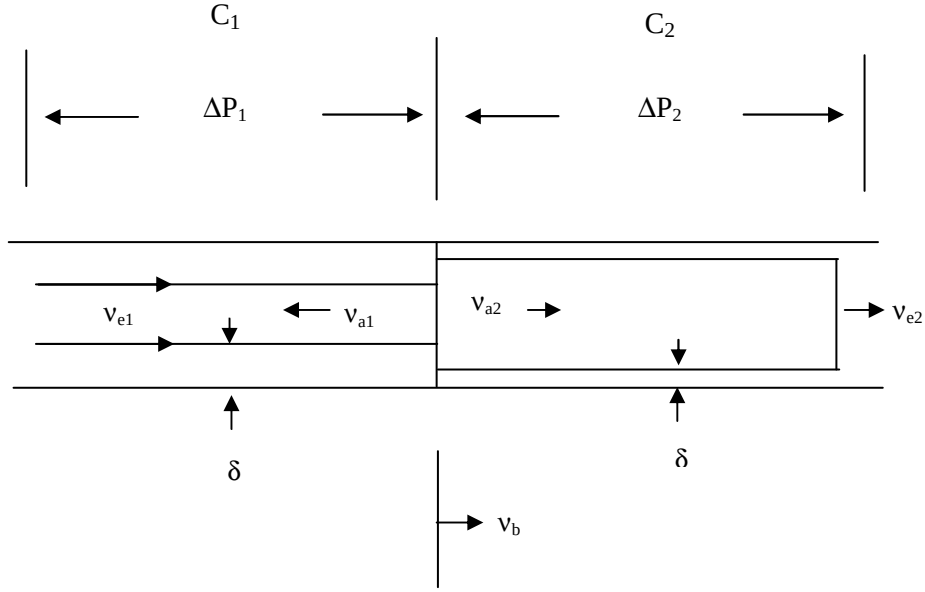
Derişim sınırının olduğu durumda, elektrik alan şiddeti Eşitlik 2.46' ya göre dağılacaktır. İki bölge arasında yerel elektroozmotik hızlarda farkın arttığı düşük derişimli bölgede elektroozmotik mobilite daha büyük olur. Yine de, kolonun herhangi bir kesitinde akan bileşimin miktarı, sıkıştırılamayan sıvıların süreklilik ilkesine göre aynıdır. Bunun anlamı ana çözelti ve derişim sınırının ortalama bir hızda v_b hareket etmesidir. Yerel elektroozmotik hızlar ve ana çözelti hızı arasındaki fark, Şekil 2.21' de gösterildiği gibi yerel bölgeler arasında hidrostatik bir basınç oluşturur (Chien ve ark., 1991).

Giriş kısmının daha yüksek elektroozmotik hızı kolon eksenı boyunca sıvıyı geri çeken hidrostatik basınç tarafından dengelenirken, ikinci kısımdaki sıvı ise elektroozmotik akıştan yavaş olarak eksen boyunca ileri itilir (Chien ve ark., 1991).

Fiziksel olarak söylemek gerekirse, derişim sınırı farklı derişimdeki iki bölge arasında yumuşak bir duvar olarak davranır. Eğer öncü tampon; çözelti hızından daha düşük elektroozmotik hıza sahipse, bu yumuşak duvar geriden gelen tampon tarafından ileri itilecektir. Diğer taraftan öncü tampon daha hızlı elektroozmotik hıza sahipse, yumuşak duvarı çeker (Chien ve ark., 1991).

Laminer akış hızına direncin elektroozmotik dirençten daha düşük olduğu durumda, iki çözelti bölgesinde çözelti hızı v_b ve kısmi elektroozmotik hızlar arasında basit bir ilişkiye sahip oluruz. Kaynakta verilen eşitliklerden:

$$v_b = x v_{e_1} + (1 - x) v_{e_2} \quad (2.48)$$



Şekil 2.21. Bir kolonda iki farklı derişimde (C_1 ve C_2) yerel elektroozmotik hızlar (v_{e_1}, v_{e_2}) ve çözelti akışı (v_b) karşılaşmasından oluşan laminar akışlar (v_{a_1}, v_{a_2}) ve basınç düşüşleri ($\Delta P_1, \Delta P_2$). δ çift tabaka kalınlığıdır (Chien ve ark., 1991).

Burada v_{e_j} , $j=1$ veya 2 dir, yerel elektroozmotik hızlardır. Bu eşitlik derişim sınırının elektroozmotik hızların ağırlıklı ortalaması ile hareket edeceğini gösterir (Chien ve ark., 1991).

Yerel elektroozmotik hız v_{e_j} , Eşitlik 2.46' da verilen yerel elektrik alan ile doğru orantılıdır, böylece:

$$v_{e_j} = \frac{v_{eo_j} \rho_j}{\rho_1 x + \rho_2 (1-x)} \quad (2.49)$$

Burada v_{eo_j} , yalnızca belirli bileşimde tek bir tampon j ile doldurulmuş bir kolondaki elektroozmotik hızdır. Eşitlik 2.49, Eşitlik 2.48' e yerleştirilirse:

$$v_b = \frac{\rho_1 x v_{eo_1}}{\rho_1 x + \rho_2 (1-x)} + \frac{\rho_2 (1-x) v_{eo_2}}{\rho_1 x + \rho_2 (1-x)} \quad (2.50)$$

Eşitlik 2.50 sistemin ortalama hızının sadece bileşenlerin doldurulduğu uzunluğa değil ayrıca onların yerel dirençlerine de bağlı olduğunu gösterir. Bu, düşük derişimli tamponun küçük bir tıkcının, sistemin ortalama çözelti elektroozmotik hızını oldukça etkileyeceği anlamına gelir (Chien ve ark., 1991).

2.3.13.2. Elektroozmotik Akış ve Kolonda Deriştirme (Landers, 1997l)

Geleneksel elektroforezde ve izotakoforezde genel olarak elektroozmotik akış (EOF) istenmeyen bir özellik olarak düşünülür. EOF elektroforetik mobilitelerin kesin değerlerinin doğru olarak belirlenmesini engeller ve bant genişlemesinin ana nedenidir. Elektroozmotik akışı tamamen elimine etmek için büyük çabalar sarf edilmiştir. Jorgenson ve ark. nın 1981' deki çalışması bu durumu değiştirdi, elektroosmoz ve elektroforezin bileşkesinden oluşan serbest kuşak elektroforezi ortaya çıkardı. Ayrıca tayin edilecek pozitif ve negatif yüklü iyonların tayinine ve daha hızlı ayırma sürelerinin sağlanmasına imkân veren elektroozmotik akışın kullanım üstünlüklerini öne çıkardılar.

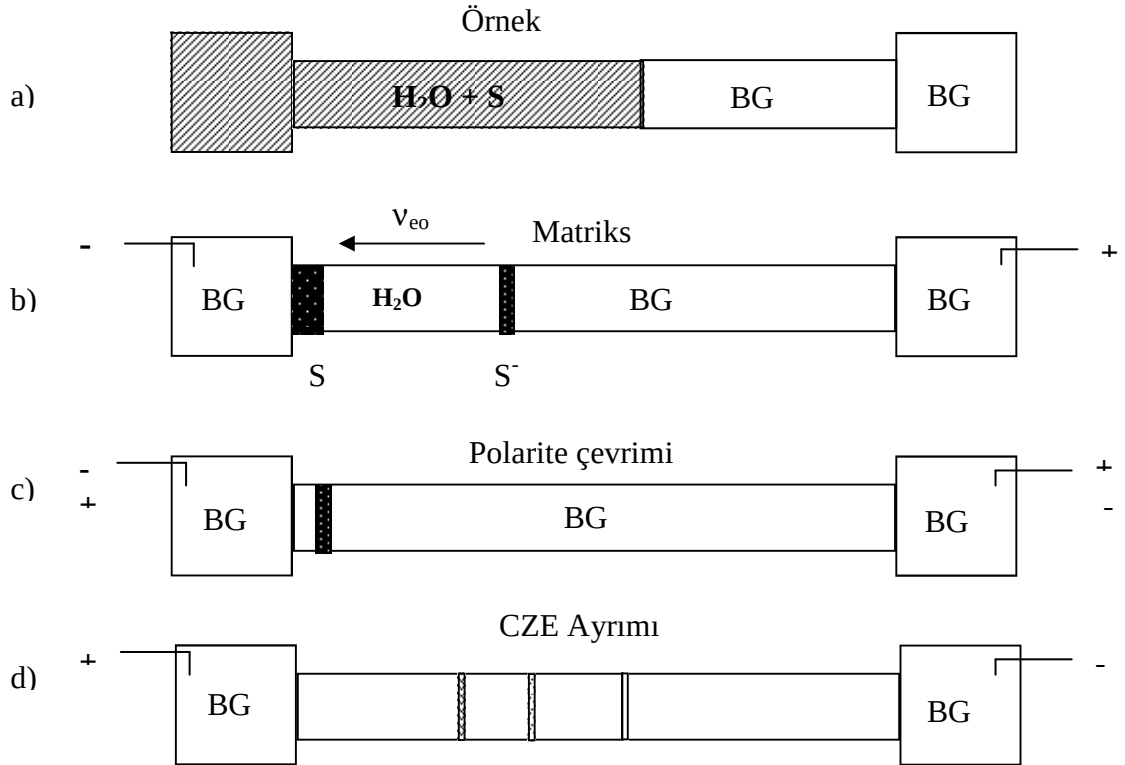
Elektroozmotik akış kolonda örnek deriştirme için önemlidir. Tüm elektro kinetik sıkıştırma teknikleri, tampon değişimini içerir. Bu alan-arttırmalı kapiler elektroforezdeki gibi aynı tamponun farklı derişimlerini kullanarak ya da izotakoforezde olduğu gibi farklı bileşimde tamponların kullanımıyla yapılabilir. Kapiler içerisinde farklı tamponlar kullanılarak oluşturulan çoklu kuşaklar, farklı zeta potansiyellerine sahiptirler ve heterojen elektrik alanı dağılımı oluşur. Bütün bu etkilerin sonucu piklerin genişlemesinin kaynağı olan bir hidrodinamik akış ve oluşturulan ortalama bir elektroozmotik akıştır. Elektroozmotik akışın detaylı anlaşılması optimum örnek sıkıştırmanın başarılmasında destekleyicidir. Akışı değiştirmek için elektroozmotik ve elektroforetik akışlar arasında temel farklar olmalıdır: bu durum öncelikle ana çözeltinin özelliklerine bağılyken, ikincil olarak yerel çevreye bağılıdır. Bir yapılandırmada çözelti akışından daha yavaş elektroforetik hıza sahip olan bir iyon, başka bir yapılandırmada tamamen daha farklı bir hıza sahip olabilir ve potansiyel olarak, elektroozmotik akış hızından daha hızlı olabilir.

2.3.13.2.a. Polarite Dönüşümü ile Örnek Sıkıştırması (Landers, 1997l)

Alan- arttırmalı örnek sıkıştırmanın 100 nL kadar oldukça kısa örnek tıkaçlarına göre daha etkin çalıştığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, daha büyük örnek enjeksiyonları için kapiler boyunca elektrik alanının düzenli olmayan dağılımı, farklı yerel elektroozmotik akış hızlarına yol açacaktır. Elektroozmotik akıştaki bu fark, pik genişlemesine neden olur. Sıkıştırma süreci tamamlandıktan sonra örnek tamponu çıkarılmalıdır. Bunu yapmak için bilinen bir yöntem bir çevirme düğmesi kullanmak ve sıkıştırılmış kuşağı örnek tamponundan destek tamponuna (çalışma tamponuna) doğru

fiziksel olarak hareket ettirmektir. Diğer bir yöntem, elektroozmotik akışı kullanarak örnek tamponunu kapilerden dışarı pompalayarak çıkarmaktır. Elektroozmotik akışın üstünlüğünü alan pompalama tekniği, Şekil 2.22’ de gösterilmektedir. Polarite dönüşümü ile örnek sıkıştırması yöntemi aşağıdaki gibidir:

- 1- Düşük iletkenlikteki tamponda bulunan analitin uzun bir tıkaçı hidrodinamik olarak verilir.
- 2- Örnek enjeksiyonundan hemen sonra, elektrotların polaritesi normal ayırım şeklinden tersine çevrilir. Negatif yüklü silika duvarıyla, negatif örnek iyonları örnek tamponu tıkaçının geri ucunda sıkıştırılır ve ters elektrik alanı altında enjeksiyon ucundan dışarı hareket eden tıkaçı izler.
- 3- Örnek tamponu kapilerden tamamen dışarı çıkarıldığında (bu elektrik akımı ölçülerek izlenir) polarite normal şekline geri çevrilir
- 4- Sıkışmış negatif analitlerin ayrımı ve belirlenmesi



Şekil 2.22. Polarite dönüşümü kullanımıyla örnek deriştirme işleminin şematik diyagramı

Nielen bu deriştirme tekniğini çevresel örneklerin zenginleştirilmesi için uygulamıştır. Ayrıca ters-polarite aşaması süresince örnek tüpü ile tampon tüpünün yer değıştirdiğı benzer bir alan-arttırmalı enjeksiyon tekniğini keşfetmiştir. Bu teknik, örnek tamponunun çıkarılması ile ilgili olduğundan, ana çözelti elektroozmotik akışı kapiler içerisinde ve sadece negatif mobilitelerdeki iyonlar ayrılabilir ve belirlenebilir. Örnekteki pozitif yüklü türleri ayırmak için silika duvar yüzeyindeki yük, setiltirimetilamonyumbromür (CTAB) eklenerek pozitif yapılır, böylece elektroozmotik akışın yönü değışir. Örneğin kapilere göç ettiğı süre miktarı artar, dolayısıyla bazı difüzyon-sınırlı bant genişlemesi oluşabilir, fakat örnek enjeksiyonunda 100 kat iyileştirme sağlanır.

2.3.13.2.b. Polarite Dönüşümü Olmaksızın Örnek Sıkıştırması (Landers, 1997m)

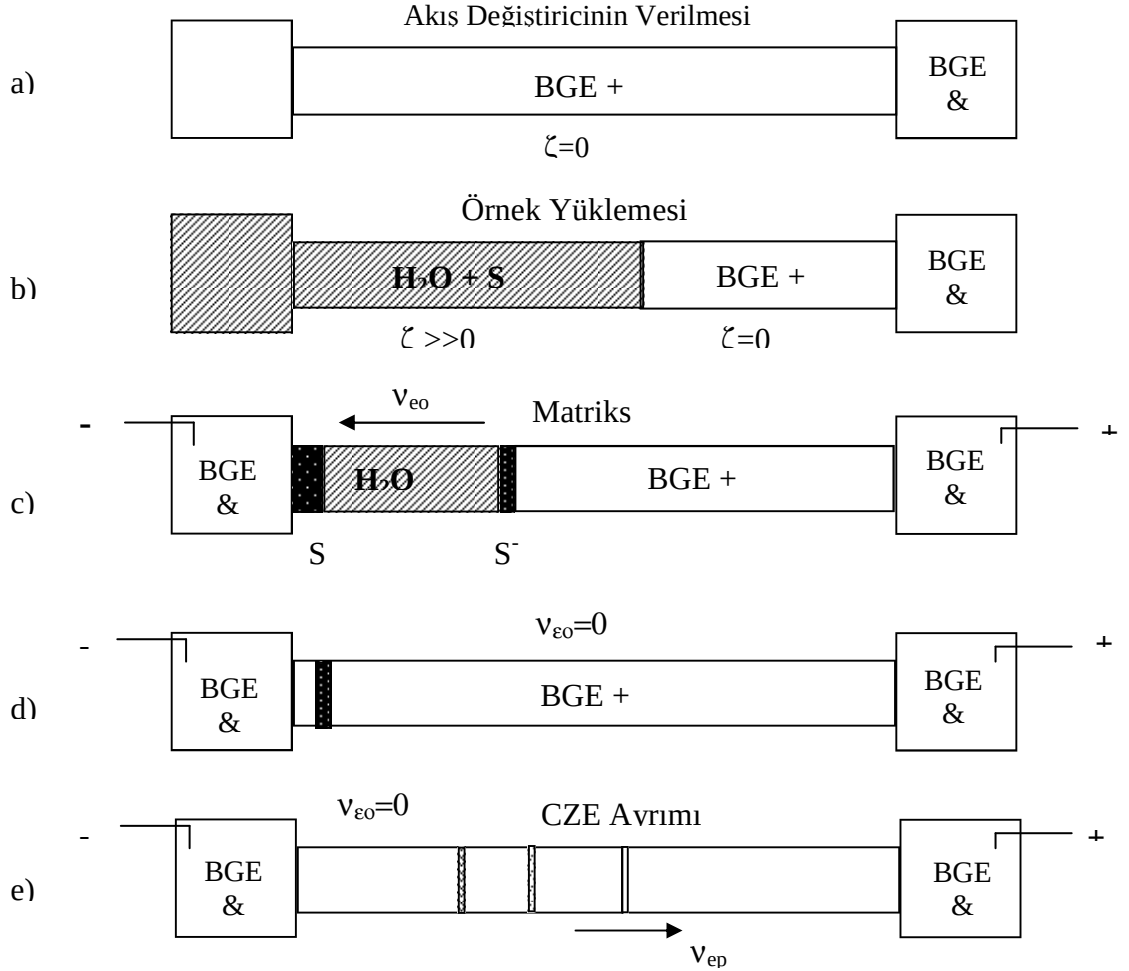
Büyük su tıkaçının çıkarılması, akım izlenemiyor ve doğru olarak kontrol edilemiyorsa, polarite çevrilmesiyle yapılması tekrarlanamayan sonuçlara yol açabilir. Polarite çevrimi olmadan büyük hacimli sıkıştırma için farklı bir şema Chien ve Burgi (1992) tarafından önerilmiştir. Yöntem, elektroozmotik akış düzenleyicisi olan dietilentriamin (DETA) kullanımını içerir. Şekil 2.23 suyun kendi kendine kapilerden nasıl pompalandığını gösteren şematik bir diyagramdır.

Pompa olarak elektroozmotik akış değıştirici kullanımı için süreç aşağıdaki gibidir:

- 1- DETA yaklaşık 1mM olacak şekilde çalışma elektrolitine eklenir ve kapiler tampon ile doldurulur. DETA kapiler duvarını kaplayarak ya da zeta potansiyelini azaltarak elektroozmotik akışı baskılar.
- 2- Suda hazırlanmış örnek kapiler içerisine enjekte edilir. Örnek verildiğinde, duvara adsorplanmış olan DETA örnek tıkaçındaki su içinde çözünür ve örnek bölgesinde zeta potansiyelini artırır.
- 3- Voltaj uygulandıktan sonra, örnek bölgesindeki yerel elektroozmotik akış sistemin anoduna doğru ana çözeltiyi hareket ettirecektir. Aynı zamanda, örnek bölgesindeki iyonlar örnek bölgesi ve destek tampon bölgesi arasındaki sınıra doğru sıkışır.
- 4- İyonlar, su tıkaçı kapilerden dışarı pompalanana dek sınırdaki kalırlar. Chien ve Helmer' in (1991) belirttiğı gibi, çözeltinin tümünün hızı yüksek elektrik alan

şiddetine karşı olduğundan kısa bir su tıkaçının yerel hızına oldukça duyarlıdır. Su tıkaçı kapilerden tamamen çıkarılınca, elektroozmotik akış kesilir.

- 5- Su kapileri terk ettikten sonra, uygulanan alan, destek tamponu kısmı boyunca (tüm kapiler boyunca) düşer ve iyonlar teker teker ayrılmaya başlar. Tüplerden kapilere çekilen destek tamponu kısmı, kapiler duvarında zeta potansiyelini yeniden baskılayan DETA içerir.

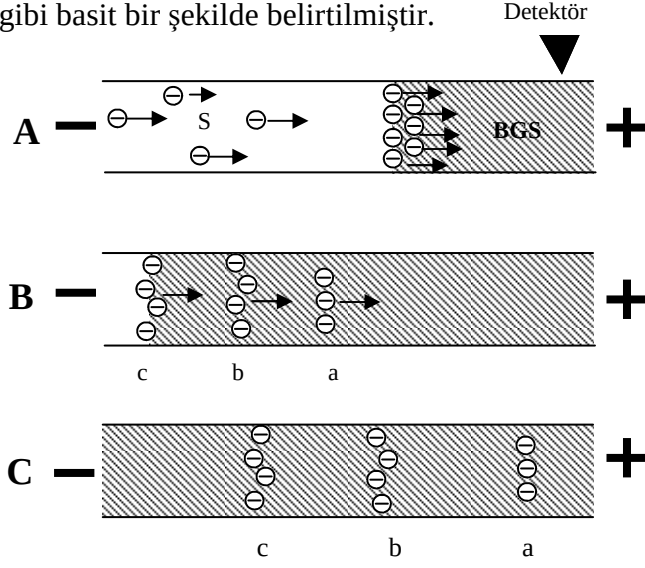


Şekil 2.23. Pompa olarak elektroozmotik değıştiricinin kullanıldığı örnek deriştirme işleminin şematik gösterimi

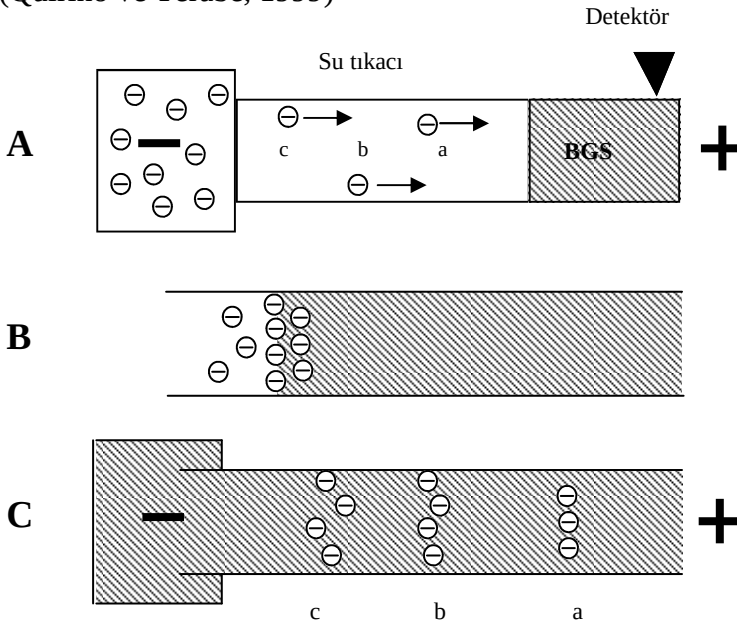
Burgi çalışmasında bu yöntemi kullanarak klorür, nitrat, sülfat ve okzalat anyonlarının analizini yapmıştır. Çalışmada enjeksiyon süresi uzatılarak kolona daha çok maddenin verilmesi sağlanmış ve potansiyel uygulaması ile birlikte numunedeki analitler sıkıştırılmış ve böylece derişmesi sağlanmıştır (Dean ve ark., 1993).

Quirino ve Terabe (1999) da hızlı hareket eden anyonların pH baskılanmış elektroozmotik akış ile kapiler kuşak elektroforezde örnek sıkıştırmasını çalışmışlardır. Çalışmada büyük hacimli örnek sıkıştırma (LVSS) ve alan artırmalı örnek sıkıştırma

(FESI) yöntemleri de karşılaştırılmıştır. Çalışmada yöntemlerin farklılıkları da aşağıdaki gibi basit bir şekilde belirtilmiştir.



Şekil 2.24. Asidik pH da büyük hacimli örnek sıkıştırma çalışmasında örnek çözeltisi (S) ve ayırma çözeltisinde (BGS) anyonik türlerin değişimi. A, başlangıç durumu (sudaki örneğin enjeksiyonu ve voltaj uygulanması); B, örnek matrisinin tamamen çıkarılmasından önce ayrı bir sıkışmış kuşak oluşur; C, kuşaklar detektöre doğru hareket etmeye göç etmeye ve ayrılmaya başlar; elektroforetik büyüklüklerin sırası $a > b > c$ (Quirino ve Terabe, 1999)



Şekil 2.25. Asidik pH da alan-arttırımlı örnek enjeksiyonu çalışmasında su tıkacı ve BGS kuşaklarında anyonik türlerin değişimi. A, başlangıç durumu (su tıkacının enjeksiyonu) ardından inlet pozisyonunda S ile negatif polaritede voltaj uygulanması (anyonlar su tıkacına elektrokinetik olarak enjekte edilirler); B, voltaj akımının belirli bir yüzdesinde kapanır (bu da anyonların derişim sınırında odaklandığını, anyonların su tıkacında bulunduğunu ve su tıkacının kısmen çıkarıldığını gösterir); C, ayırım ve odaklanmış kuşakların belirlenmesi (Quirino ve Terabe, 1999)

LVSS' de öncelikle örnek verilir ve potansiyelle birlikte örnekteki analitlerin odaklanması gerçekleşir. Aynı zamanda örnek matrisinin kolondan çıkarılması da gerçekleştirilir ve matris çıkarımının ardından sabit potansiyel altında analitlerin ayrımı gerçekleşir. FESI' da ise öncelikle kapilerin çalışma elektroliti ile şartlandırılması sağlanır. Kolona suda çözünmüş örnek elektrokinetik enjeksiyon ile verildikten sonra ayırım amacıyla potansiyel uygulaması yapılır. Daha düşük iletkenlikteki kısımda bulunan anyonların tümü, ayrı kuşaklar oluşturmaksızın derişim sınırında sıkışır ve bu esnada su tıkcının kolondan çıkarılması gerçekleşir. Suyun uzaklaştırılmasının ardından anyonların çalışma elektroliti içerisinde elektroforetik hızlarına bağlı olarak ayrımı başarılıdır. Quirino ve Terabe anyonlarla ilgili yaptıkları bu çalışmada LVSS yönteminde 100 kat iyileştirme gözlemlerken, FESI yönteminde 1000 kat iyileştirme gözlemlemişlerdir (Quirino ve Terabe, 1999).

Örnek sıkıştırma yöntemleri sadece inorganik anyonlara uygulanmamıştır. Anyonik forma sahip olabilen organik türlerin de deriştirilerek analizinin yapılması mümkündür. Llamas ve ark. (2003) Cd ve Hg gibi hayati olmayan eser elementlerin detoksifikasyonundan (zehirsizleştirilmesinden) sorumlu olabileceği düşünülen ve yüksek sisten içeriğine sahip olan metalletiyonin analizini LVSS yöntemini kullanarak başarmışlardır. Bunun için tavşan karaciğerinden elde edilen metalletiyonin standartlarını kullanarak analiz yöntemi geliştirmişler ve yılanbalığı karaciğeri sitozolik özütünde metalletiyonin analizini yapmışlardır. Benzer şekilde yapılan bir çalışmada da gıdalarda renklendiricilerin analizi için klasik CE yöntemine göre 100 kat daha hassas bir yöntem geliştirilmiş ve geliştirilen yöntem satışta olan gıda ürünlerinde denenmiştir.

Kapiler elektroforezde LVSS ve FESI yöntemleriyle örnek deriştirme sadece klasik kuşak kapiler elektroforezde değil diğer tekniklerde de yapılabilmektedir. He ve ark. (2006) nın çalışması bu duruma örnek teşkil etmektedir. He ve ark. yapılan denemeler sonucunda miselli elektrokinetik kapiler kromatografi tekniğinde LVSS kullanarak, kozmetik ürünlerde koruyucu olarak kullanılan parabenlerin analizini gerçekleştirmişlerdir. Nötral yapıda olan parabenler, SDS misellerinde çözünerek anyonik hale gelmişler ve sıkıştırma yönteminin kullanımına izin vermişlerdir. Sıkıştırma tekniğinin kullanıldığı MEKC' de, klasik MEKC yönteminde ölçülebilen 300 kat daha düşük derişimdeki parabenler tayin edilebilmiştir.

2.3.13.2.c. Hidrodinamik Karşıdengeleyici Akış (Landers, 1997n)

Tek bir kapiler kullanarak ITP-CZE yaklaşımıyla büyük hacimli örnek sıkıştırma için başka bir yöntem Reinhoud ve ark. (1993) tarafından tanımlanmıştır. Odaklama adımı süresince artçı tamponu çıkarmak için elektroozmotik akışın üstünlüklerinden faydalanarak hidrodinamik geri basıncı kullanmışlardır. Süreç şu şekildedir;

1. Kapilere ITP anot viali (ayrıca CZE katot viali) öncü tampon ile doldurulur. Artçı tampon içersinde hazırlanan örneğin uzun bir tıkaçı hidrodinamik olarak kapilere enjekte edilir. Enjeksiyondan sonra kapiler girişine bir artçı tampon yerleştirilir.
2. Analizi odaklamak için bir hidrodinamik geri basınç ile birlikte yüksek negatif potansiyel uygulanır. Bu odaklama sürecinde hidrodinamik hız öncü iyonlarının hızını örnek kuşağı ön sınırının önünde karşıdengeleyer. Örnek kuşağının art sınırı geri basınç nedeniyle öne doğru göç eder ve böylece analiz deriştirmesi ile sonuçlanır.
3. Kısa bir odaklama sürecinden sonra artçı tamponu içeren giriş kabı CZE tamponu olarak da kullanılan öncü tamponla yer değıştirir. Hidrodinamik geribasinç olmaksızın negatif bir yüksek potansiyel uygulanır. Artçı tampon hala kapilerin içersinde olduğundan, bu aşama gerçek izotakoforetik şartlar altında yapılmış olur. Bununla birlikte elektroozmotik akış elektroforetik akıştan daha büyük olduğu için artçı tampon, kapilerin giriş ucundan dışarı pompalanır.
4. Artçı tampon kapilerden tamamen dışarı pompalandığında örnek kuşağı girişe yaklaşır, potansiyel normal polariteye çevrilir. Örneğı kapilerin içersinde tutmak ve aynı zamanda artçı tamponun miktarını en aza indirmek için voltajı değıştirme zamanını doğru belirlemek önemlidir. Artçı tamponun büyük bir tıkaçı CZE kapileri boyunca elektrik alan dağılımının düzgün oluşunu engeller ve pik genişlemesine neden olur.
5. Normal CZE ayırımı uygulanır.

2.3.14. Kapiler Elektroforez ile Biyolojik Materyal Analizi

Kapiler elektroforez, teknikteki son gelişmelerle oldukça fazla uygulama alanı bulmuştur. Bulardan biri de klinik uygulamalardır. Literatüre bakıldığında bu konu ile ilgili yapılmış birçok çalışmaya rastlamak mümkündür. Bu kısımda bu çalışmalardan kısa örnekler verilecektir.

Tripodi ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada serbest ve bağlı formda 15 safra kesesi asidinin insan serumunda analizini gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla miselli elektrokinetik kromatografi yöntemini kullanmışlardır. Serum örneklerini analiz edebilmek için C-18 kartuşla ön özütleme işlemini gerçekleştirmişlerdir. Manaenkov ve ark. (2003) da ön türevlendirme olmaksızın 11 aminoasidin karışımını kapiler elektroforez yöntemi ile analiz etmişlerdir. Phillips (2004) de kafa travmalı hastaların beyin omurilik sıvısında ateşlenmeye neden olan sitokinlerin derişimlerinin hızlı ölçümünü gerçekleştirmek için çip-esaslı bir kapiler elektroforez sistemi tasarlamıştır. Sonuç olarak bu çip-esaslı sürecin hızlı ve doğru bir analiz için uygun olduğuna karar verilmiştir. Farklı bir çalışma da Sun ve ark. (2004) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada fare kemik iliğinin fibroblast hücrelerinde, alkalın fosfataz enziminin tayini için, kapiler içerisinde enzim katalizli bir tepkimenin ve elektrokimyasal belirleme yönteminin kullanıldığı bir yöntem geliştirmişlerdir. İnsan vücudunda da bu şekilde tayinlerin yapıldığı diğer bir çalışma da Hiraoka ve ark. (2000) nın çalışmasıdır. Hiraoka ve ark. çeşitli nörolojik hastalıklara sahip hastalardan aldıkları serum ve beyin omurilik sıvılarında α_2 -makroglobulin (α MG) ve albümin (Alb) derişim oranlarını ölçmek için sodyum dodesil sülfat kapiler jel elektroforez yöntemini geliştirmişlerdir. α MG ve Alb derişim oranlarını pik alanlarını oranlayarak belirlemişler ve elde ettikleri bu α MG indeksi değerinin hastalığı olanlarda önemli derecede farklı olduğunu belirlemişlerdir. Böylece α MG indeksinin ölçülmesinin kan-beyin fonksiyonlarının biyokimyasal olarak ölçülmesinde kullanışlı olduğunu görmüşlerdir. Saavedra ve Barbas da (2002) kemometrik yaklaşımlarla birlikte MEKC ile laktik asidin enantiyomerlerini ayırmak için bir yöntem geliştirmişler ve geliştirdikleri yöntemi plazma, idrar, amniyotik sıvı ve beyin omurilik sıvılarında kullanmışlardır. Sbrana ve ark. (2004) da çalışmalarında HIV virüsü bulunduran hastalarda indirgenmiş glutation ve sistein miktarını ölçmek için klasik kapiler kuşak elektroforezini kullanmışlardır. Sonuç olarak glutation ve sistein miktarındaki azalmanın hastalanma süreci ile ilgili olabileceğini bildirmişlerdir. Bessonova ve ark. (2007) albüminin idrarda analiz esnasında deriştirme tekniği ile elektroforetik tayinini başarmışlardır. Ön deriştirme için alan arttırmalı örnek sıkıştırma (FESI), kolon başı alan arttırmalı örnek sıkıştırma (HC-FESI), bir polimer çözeltisi ile sıkıştırma, dinamik pH sınırı ve ters polariteli büyük hacimli örnek sıkıştırma (LVSS) gibi deriştirme tekniklerini denemişler ve en iyi sonuca LVSS yöntemi ile ulaşmışlardır. Yöntem optimize edildikten sonra 15 μ g/mL alt teşhis

sınırı ile insan serumunda ve idrarda analizleri gerçekleştirmişlerdir. Ramautar ve ark. da (2007) kapiler elektroforez ile nörolojik hastalıklar ve metabolik rahatsızlıkların işaretçisi olarak bilinen BOS taki organik asitlerin analizini gerçekleştirmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemle BOS örneklerini hiçbir işleme tabi tutmaksızın doğrudan enjekte etmişler ve analizini başarmışlardır.

2.4. Kemometri (Karakartal M., 2004)

Kemometri; bilgisayar yardımıyla, istatistiksel ve matematiksel yöntemlerin kimyasal verilere uygulanmasıdır.

Tüm bu yöntemlerin sınırları ve varsayımları tam olarak anlaşılmadan kimyasal sorunların çözümüne yönelik istatistiksel yolların kullanılması uygun olmamaktadır. Kimyasal veriler tek değişkenli olabildiği gibi çoğu zaman birçok değişkene bağlı olabilmektedir. Bu değişkenlerin her birinin analiz başlangıcında eşit öneme sahip olduğu önemle düşünülen bir noktadır. Çok değişkenli verilerin analizinde çoğu zaman kemometrik veriler kullanılmaktadır. Deneysel parametrelerin klasik yöntemlerle iyileştirilmesinde değişkenlerden biri sabit tutulurken diğer değişkenler farklı oranlarda alınarak bu değişkenlerin etkileri incelenir. Bu işlem her bir değişken için tekrarlanır. Fakat klasik yöntemlerde etkenler arasında da etkileşim olabileceği ve eğer etkileşim oluyorsa bu iki etken arasındaki etkileşimin diğerlerini etkileyebileceği hesaplanamamaktadır. Bu nedenle yöntem yeterli değildir. Kemometrik tekniklerde ise; hangi faktörler etkilidir, bu faktörlerin etkisi ne kadardır ve bu faktörlerin etkileşim miktarları ne ölçüdedir gibi sorulara yanıt aranmaktadır. Bu amaca yönelik birçok kemometrik iyileştirme tekniği geliştirilmiştir. Kemometrik iyileştirme tekniklerinde en uygun koşulların sağlanabilmesi için deneysel tasarımlar oluşturulur. Bu tasarımlar deneysel çalışmanın planlı bir şekilde zaman kaybı olmaksızın yeterli sayıda yapılmasını sağlar. Değişik amaçlara yönelik çeşitli deneysel tasarımlar vardır.

Verilerin kemometrik analizi için bilgisayar programlarına ihtiyaç duyulmaktadır. En yaygın kullanılan programlama ortamları arasında MATLAB, VISUAL BASIC ve C⁺⁺ sayılabilir.

Kemometrik analizde oluşturulan deneysel tasarımlardan faktörlerin birbiri ile etkileşimlerini dikkate alarak yüzde verimi hesaplamak için çeşitli satır ve sütunlardan oluşan matrisler hazırlanır. Bu yüzden matris hesaplamalarına gerek duyulur.

2.4.1. Matris Hesaplamaları

Vektörler ve matrisler skalar büyüklüktür ve bir sayıdır.

Vektör örneği: χ Genellikle italik olarak gösterilir.

Örnek: $\chi=5,7$ gibi

Vektör bir seri sayıdan da oluşabilir. IUPAC' a (International Union of Pure and Applied Chemistry) göre koyu ve italik gösterilir.

Satır vektör örneği: $\chi = (7 \ 8 \ 11 \ -5)$

Kolon vektör ise;

$$y = \begin{pmatrix} 1,2 \\ -3,6 \\ 0,5 \end{pmatrix}$$

Kolon ve satırlar yanyana gelerek en genel matrisler oluşur. Büyük harfle koyu ve italik gösterilirler. Örnek X :

$$X = \begin{pmatrix} 7 & 11 & 0 \\ 2 & 8 & 5 \end{pmatrix}$$

Bu X matrisinin boyutu 2×3 dür. Boyutların gösterilişi önce satırlar daha sonra kolonlar şeklindedir, bu nedenle yukarıdaki matris $X_{2,3}$ şeklinde gösterilir.

Satır ve sütun sayısı eşit olan matrislere kare matris denir, aşağıda 3×3 boyutunda bir kare matris örneği görülmektedir.

Örnek:

$$Y = \begin{pmatrix} 3 & 9 & -2 \\ 6 & 0 & 8 \\ -10 & 4 & 1 \end{pmatrix}$$

Köşegen elemanları 1 olan kare matrise “Birim Matris” denir.

Örneğin:

$$I = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix}$$

Bir matriste satır ve sütunların aralarında yer değiştirmesiyle bir matrisin tranpozu (transpozisi, tersi) elde edilir. Örneğin:

$$\mathbf{Z} = \begin{pmatrix} 3,1 & 0,2 & 6,1 & 4,8 \\ 9,2 & 3,8 & 2,0 & 5,1 \end{pmatrix} \text{ matrisi için}$$

$$\mathbf{Z}^T = \begin{pmatrix} 3,1 & 9,2 \\ 0,2 & 3,8 \\ 6,1 & 2,0 \\ 4,8 & 5,1 \end{pmatrix} \text{ matrisi } \mathbf{Z}'\text{'nin transpozudur.}$$

2.4.1.1. Matris Çarpımı

Herhangi iki matris çarpılamaz, iki matrisin çarpılabilir olması gerekir. Bunun için aşağıdaki çarpılabilir olma kuralları sağlanmalıdır:

- Birinci matristeki sütun sayısı ikinci matristeki satır sayısına eşit olmalıdır.
- Çarpım sonucunda elde edilen son matristeki satır sayısı ilk matristeki satır sayısına eşit olmalıdır,
- Çarpım sonucunda elde edilen son matristeki sütun sayısı ikinci matristeki sütun sayısına eşit olmalıdır.

3 x 2 boyutlu bir matrisin 2 x 4 boyutlu bir matris ile çarpılmasıyla 3 x 4 boyutlu bir matris elde edilir.

Matris çarpımında sıra önemlidir. Genellikle değişme özelliği yoktur.

$$A.B \neq B.A$$

Çarpma işleminde grupta yapılabilir yani birleşme özelliği vardır.

$$A.B.C = (A.B).C = A.(B.C)$$

A matrisinin boyutu $I \times J$, B'nin boyutu $J \times K$ ise C'nin boyutu $I \times K$ 'dir C matrisinin elemanları aşağıdaki şekilde yazılabilir.

$$c_{ij} = \sum_{k=1}^J a_{ik} b_{kj}$$

Örnek:

$$\begin{pmatrix} 1 & 7 \\ 9 & 3 \\ 2 & 5 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} 6 & 10 & 11 & 3 \\ 0 & 1 & 8 & 5 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 6 & 17 & 67 & 38 \\ 54 & 93 & 123 & 42 \\ 12 & 25 & 62 & 31 \end{pmatrix}$$

Bir A matrisinin ters matrisi A^{-1} ile gösterilir.

$$A.A^{-1} = I$$

Bir matriks ve onun tersinin çarpımı birim matriksi verir. Bazı kare matrikslerin tersi yoktur.

2.4.2. Tam Faktöriyel Tasarım

Kimyada en basit tasarımlardan birisi de faktöriyel tasarımıdır. Faktöriyel tasarımda yanıtı etkileyen bütün deneysel değişkenler, faktörler ve bunların etkileşimleri incelenir. Tam faktöriyel tasarımın uygulama şekillerinden biri de 2^k tam faktöriyel tasarım biçimidir.

Deneysel yanıtı etkileyecek k adet faktör iki seviyede incelenmek istendiğinde faktöriyel tasarım 2^k deney sayısına sahip olacaktır. Burada iki maksimum (+) ve iki minimum (-) faktör seviyelerini gösterir, k ise toplam faktör sayısıdır. 2 ve 3 faktör içeren faktöriyel tasarım tabloları aşağıda verilmiştir. Deney sayısı, 2 faktör için 4; 3 faktör için 8 ve 4 faktör için ise 16'dır (örnek= $2^4=16$). Faktör 1 ve faktör 2 arasındaki etkileşimlerin işareti iki faktörün işaretlerinin çarpımıyla bulunur. İlave olarak bütün faktörlerin orta seviyede olduğu (0) bir deney daha yapılabilir. Tasarım tablosu kodlanmış değerlere göre oluşturulur.

(a) 2 faktörlü tasarım

Deney	x_1	x_2
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1

(b)3 faktörlü tasarım

Deney	x ₁	x ₂	x ₃
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

Üç değişkenli tasarım örneği;

Organik senteze dayalı bir tepkime ile ilgili değişkenler Çizelge 2.2’ de deneysel tasarım ve verim olarak elde edilen sonuçlar Çizelge 2.3’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Değişkenler ve Düzeyler

Değişkenler	(-) seviye	(0) seviye	(+) seviye
Katalizör konsantrasyonu (%)	0,1	0,2	0,3
Tepkime sıcaklığı (°C)	60	70	80
Tepkime süresi (dk)	20	30	40

Çizelge 2.3. Deneysel Sonuçta Elde Edilen %Verim

Deney	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄
1	0,1	60	20	73
2	0,3	60	20	71
3	0,1	80	20	79
4	0,3	80	20	82
5	0,1	60	40	78
6	0,3	60	40	89
7	0,1	80	40	83
8	0,3	80	40	93
9	0,2	70	30	81

Çizelge 2.4. Etkileşimleri ve Verimi Gösteren Deneysel Tasarım

Deney	x_0	x_1	x_2	x_3	x_1x_2	x_1x_3	x_2x_3	$x_1x_2x_3$	y
1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	73
2	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	71
3	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	79
4	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	82
5	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	78
6	+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	89
7	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	83
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	93

Parametrelerin etkisini belirlemek için aşağıda verilen denklem hazırlanır ve bu doğrusal denklemdeki b katsayıları hesaplanır.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 - b_3x_3 + b_{1,2}x_1x_2 + b_{1,3}x_1x_3 + b_{2,3}x_2x_3 - b_{1,2,3}x_1x_2x_3 \quad (2.51)$$

Burada b katsayıları ne kadar büyük ise x, y üzerine o kadar etkilidir. Birden küçük b katsayıları ihmal edilebilir. Katsayıların önünde eksi olması ve değerinin birden büyük olması o faktörün tepkimeye aksi etkide bulunacağını gösterir.

Eğer oluşturulan tasarım kare matris şekline olursa b katsayılarını hesaplamak için aşağıdaki formülü kullanılır.

$$y = bX \quad (2.52)$$

şeklindedir.

Buradan b katsayısı;

$$b = yX^{-1} \quad (2.53)$$

ile hesaplanır. Oluşturulan tasarım kare matris şeklinde değilse b katsayısı;

$$b = (X'X)^{-1}X'y \quad (2.54)$$

formülünden hesaplanır. Doğru denkleminde b katsayıları yerine konulur. Bu denklemden her bir b katsayısını hesaplamak için, örneğimizde sekiz satır ve sekiz sütundan oluşan $X_{8,8}$ matrisinin tersinin alınıp; sekiz satır ve bir sütundan oluşan $Y_{8,1}$ matrisi ile çarpılması gereklidir.

Çizelge 2.4'de verilen organik sentezde yüzde verim için etkileşim ve sonuç tablosuna göre b katsayıları hesaplandığında elde edilen denklem:

$$y = 81 + 2,8x_1 + 3,2x_2 + 4,9x_3 + 0,5x_1x_2 + 2,5x_1x_3 - 1,5x_2x_3 - 0,8x_1x_2x_3 \quad (2.55)$$

şeklindedir.

b_0 = sabit tutulan parametre katsayısı

b_1 = katalizör derişimini gösteren katsayı

b_2 = tepkime sıcaklığını gösteren katsayı

b_3 = tepkime süresini gösteren katsayı

b_{12} = katalizör derişimi ile tepkime sıcaklığı arasındaki ilişkiyi gösteren katsayı

b_{23} = tepkime sıcaklığı ile tepkime süresi arasındaki ilişkiyi gösteren katsayı

b_{123} = katalizör derişimi, tepkime sıcaklığı ve tepkime süresi arasındaki ilişkiyi gösteren katsayı.

Denklemden de görüldüğü gibi en büyük katsayı b_0 parametresine ait. Bu yüzden en önemli faktör sabit tutulan değerdir. Daha sonraki en önemli etken ise tepkime süresidir. Tepkime süresi artarsa elde edilen yüzde verim artar. Denklemden görülen negatif değerler ise tepkime verimine aksi yönde etki yaparlar. Başka bir deyişle tepkime süresi ile tepkime sıcaklığının artırılması tepkime verimini azaltır.

2.5. Alt Teşhis ve Alt Tayin Sınırlarının Belirlenmesi (Miller ve ark., 1993)

Alt teşhis (Limit of Detection- LOD) değerleri; boş örnek için ölçülen değerin veya kalibrasyon eğrisinin kesim noktasının standart sapmasının üç katının bulunması ve bu değerin, kalibrasyon eğrisinin eğimine bölünmesi ile hesaplanır. Benzer şekilde alt tayin (Limit of Quantification- LOQ) değerleri; boş örnek için ölçülen değerin veya kalibrasyon eğrisinin kesim noktasının standart sapmasının on katının bulunması ve bu değerin, kalibrasyon eğrisinin eğimine bölünmesi ile hesaplanır.

$$LOD = 3x(S_{xy} / b) \quad (2.56)$$

$$LOQ = 10x(S_{xy} / b) \quad (2.57)$$

S_{xy} : Boş örneğin standart sapması

b: Kalibrasyon eğrisi eğimi

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 3.1’ de sunulmaktadır.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Üretici Firma	Kimyasal Madde	Üretici Firma
3-nitrotirozin	Sigma	Kalsiyum klorür	Merck
Pronaz	Sigma	Fosforik asit	J.T. Baker
Sodyum asetat	Fluka	CTAB	Aldrich
Dietilentriamin	Riedel de Hâën	Aseton	Merck
Sodyum hidroksit	Merck	Asetik asit	Merck
Dimetilsülfoksit	Carlo Erbaa	Hidroklorik asit	Merck
Borik asit	Merck	Potasyum Klorür	Merck
Civa	Merck	Alümina	Metrohm

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Voltametrik denemeler, bilgisayar kontrollü Metrohm cihazı (757 VA Computrace) (Herisau, İsviçre) ile yapılmıştır. Sistem bir Ag/AgCl- 3M KCl karşılaştırma elektrodu ve bir platin karşıt elektrodu içermektedir. Çalışma elektrodu olarak asılı civa damla elektrodu (HMDE), statik civa damla elektrodu (SMDE) ve damlayan civa elektrodun (DME) basit bir yapıda birleştirildiği çok amaçlı bir elektrot kullanılmıştır. pH ölçümleri Jenway 3040 İyon Analizci Dijital pH Metre ve Cyberscan 2100 ile yapılmıştır. Tüm işlemler için Millipore Simplicity® UV su saflaştırıcı sistemden elde edilen ultra saf su kullanılmıştır.

Kapiler elektroforetik denemeler Agilent marka bir 3D kapiler elektroforez cihazı ile yapılmıştır. Detektör olarak Diode Array Dedector olarak isimlendirilen çoklu ışın kullanan UV detektör kullanılmıştır. Kapiler elektroforetik analizler için 50 µm ve 75 µm iç çaplı fused (işlenmiş) silika kapiler kolonlar kullanılmıştır.

Numunelerin özütleme işlemleri için MSE Mistral 2000 marka santrifüj cihazı kullanılmıştır.

Analiz için kullanılan plazma numuneleri Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezi'nden, beyin omurilik sıvısı numuneleri de Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Bölümü'nden temin edilmiştir. Bu numuneler için etik kurul raporu alınmış olup rapor örneği EK 2' de sunulmuştur.

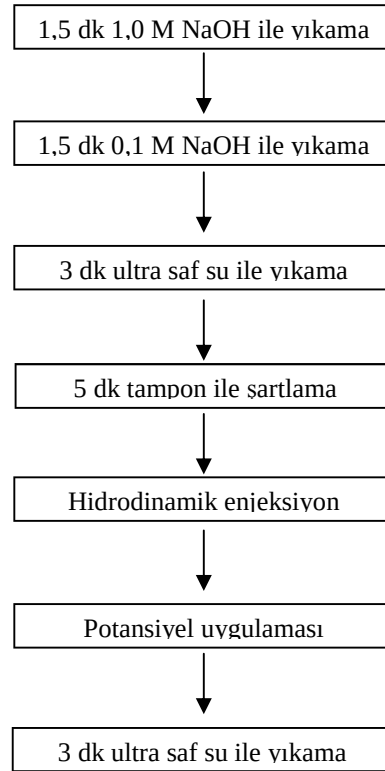
3.1.3. Voltametri Yönteminde Kullanılan Deneysel İşlem

Voltametrik hücreye konan 10 mL destek elektrolit çözeltisinden 5dk saf azot gazı geçirilmiştir. Bu çözeltinin voltamogramı alındıktan sonra maddenin standart çözeltisinden ilave yapılmasının ardından 2 dk daha azot gazı geçirilerek tekrar voltamogram kaydedilmiştir.

Dönüşümlü voltametri çalışmaları da aynı destek elektrolit ile farklı tarama hızlarında yapılmıştır.

3.1.4. Kapiler Elektrophorez Yönteminde Kullanılan Deneysel İşlem

Analizde kullanılan kolon, ilk kullanılacağı denemede 20 dk 1 M NaOH ile yıkama, 20 dk 0,1 M NaOH ile yıkamayı içeren ön işleminden geçirilmiştir. Bir analiz süresinde sırasıyla yapılan işlemler Şekil 3.1' de gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Kapiler elektrophorezde analiz öncesi, analiz ve analiz sonrası uygulamaları gösteren şema

Analiz işlemlerine birkaç gün ara verilmek zorunda kalındığı durumda kapiler kolon öncelikle su ile yıkanmakta, ardından hava geçirilerek kuruması sağlanmakta ve bu şekilde cihazdan çıkarılmaktadır.

3.2.Voltametrik Çalışmalar

3.2.1.Kare Dalga Yöntemi

3.2.1.1. Destek Elektrolitin Seçimi

3-NT nin kare-dalga yöntemi ile tayini için en uygun destek elektrolit araştırılmıştır. Bu amaçla sodyum hidroksit (1,0 M), hidroklorik asit (1,0 M), potasyum klorür (1,0 M) çözeltileri ve asetat (0,5 M), borat (0,5 M), fosfat (0,5 M) ve Britton-Robinson tamponları denenmiştir. Denemelerde $1,01 \times 10^{-3}$ M standart 3-NT çözeltisinden ilaveler yapılarak ölçümler alınmıştır.

3.2.1.2. pH Seçimi

Seçilen destek elektrolit çözeltisi 2,00; 4,04; 6,00; 8,00; 8,50; 9,00; 9,50 ve 10,00 pH değerlerine ayarlanarak pik akımına etkisi incelenmiştir. pH ayarlamalarında destek elektrolit çözeltileri ve sodyum hidroksit çözeltisi kullanılmıştır. Daha sonra da pH' sı ayarlanmış bu destek elektrolit çözeltilerinde Bölüm 3.1.3' de anlatılan işlem uygulanmış ve voltamogramlar alınmıştır.

3.2.1.3. Destek Elektrolit Derişiminin Belirlenmesi

Kullanılan destek elektrolit tamponunun en iyi sonucu verdiği derişim değerini bulmak için 0,15; 0,20; 0,30; 0,35; 0,40 ve 0,50 M derişimlerde çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltilerde maddeye ait voltamogramlar incelenerek uygun derişim değeri belirlenmiştir.

3.2.1.4. Kare Dalga Şartlarının Kemometrik Yaklaşım ile Seçilmesi

KDV yönteminin uygulanmasında dalgayı oluşturan şartların da incelenmesi ve en iyi çalışma şartlarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla kemometrik yöntemden faydalanılmıştır. Uygulamada kare dalga yönteminin etkenleri için Çizelge 3.2' de bildirilen en düşük ve en yüksek değerler deneysel çalışma ile saptanmış, Çizelge 3.3' de gösterilen deneysel tasarım şeması oluşturulmuştur. Bu şemaya uyularak yapılan deneyler sonucunda elde edilen veriler ile matematiksel bir eşitlik

ortaya çıkarılmıştır. Denklemden elde edilen değerlere göre en iyi şartları sağlayan etkenler belirlenmiştir.

Çizelge 3.2. Kare dalga parametreleri için seçilen değerler

Parametre	En Düşük Değer	En Yüksek Değer
Potansiyel Adımı (V)	0.001	0.01
Genlik (V)	0.01	0.1
Frekans (Hz)	5	50

Çizelge 3.3. Kare dalga voltametrisi için deneysel Tasarım Şeması

Potansiyel Adımı (V)	Genlik (V)	Frekans (Hz)
0.001	0.01	5
0.001	0.01	50
0.001	0.1	5
0.001	0.1	50
0.01	0.01	5
0.01	0.1	5
0.01	0.01	50
0.01	0.1	50

3.2.1.5. Kare Dalga Yöntemi ile Elde Edilen Kalibrasyon Eğrisi

3-NT' nin $2,027 \times 10^{-3} \text{ M}$ lık stok çözeltisinden seyreltme yoluyla $4,05 \times 10^{-6}$, $2,03 \times 10^{-5}$ ve $5,07 \times 10^{-5} \text{ M}$ derişimlerinde 3-NT çözeltileri hazırlanmıştır. Belirlenen destek elektrolit çözeltisi üzerine ilaveler yapılarak karşılık gelen pik akımları okunmuştur. Kalibrasyon eğrisi çizilerek doğru denklemi ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır.

3.2.2. Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

3-NT' nin elektrokimyasal davranışının açıklanmasında dönüşümlü voltametri çalışmalarından faydalanılmıştır. Cıva damla elektrodu ve camı karbon elektrotta yapılan çalışmalarda akımın türü, tepkimenin tersinirliği ve mekanizma ile ilgili bilgiler edinilmeye çalışılmıştır.

3.2.2.1. Cıva Elektrotta Yapılan Çalışmalar

3-NT' nin cıva elektrot yüzeyinde indirgenmesini incelemek amacıyla cıva elektrot yüzeyinde dönüşümlü voltamogramları alınmıştır. Tarama hızı 0,005 – 10 V/s aralığında değiştirilmiş ve voltamogramlar alınmıştır. Bu voltamogramlarda pik potansiyeli ve pik akım farkı değerleri okunmuştur. Elde edilen veriler literatürde verilen ampirik formüller ile değerlendirilerek sonuçlara ulaşılmıştır.

3.2.2.2. Camsı Karbon Elektrotta Yapılan Çalışmalar

3-NT' nin indirgenme mekanizmasına yol göstermesi amacıyla camsı karbon elektrotta da çalışmalar yapılmış, tarama hızı 0,01 – 10 V/s aralığında değiştirilerek voltamogramlar kaydedilmiştir. Elde edilen veriler cıva elektrotla yapılan çalışmalarda olduğu gibi incelenmiş ve değerlendirilerek yorumlanmıştır.

3.2.3. Adsorptif Sıyırma Voltametrisi Yöntemi

3.2.3.1. Damla Boyutu Seçimi

Çalışma elektrodu olarak kullanılan cıva elektrot bir multimod (çokamaçlı) elektrottur. Kare dalga yöntemini çalışmak için kullanılan asılı cıva damla elektrodunun büyüklüğü, bilgisayar kontrollü olarak seçilebilmektedir. Cihazda cıva damlasının boyutu (yüzeyi) $1(0,15 \text{ mm}^2)$ – $9(0,60 \text{ mm}^2)$ değerleri arasındadır. En iyi sonucun alındığı damla boyutunu belirlemek için her bir cıva damlası ölçeğinde denemeler yapılmıştır.

3.2.3.2. Karıştırma Hızı Seçimi

Elektrotta biriktirme işlemi yapılırken analitin elektroda ulaşımını sağlamak için eşzamanlı olarak hücredeki çözelti de karıştırılmaktadır. Karıştırma hızı değeri olarak 200 – 2000 rpm değerleri ve arası değerler seçilerek ölçümler alınmış, karıştırma hızının biriktirme sürecine etkisi incelenmiştir.

3.2.3.3. Biriktirme Potansiyeli Seçimi

Adsorptif sıyırma yapabilmek için 3-NT' nin indirgenmesine neden olmayan daha pozitif potansiyelde biriktirme yapılması gerektiği görülmüştür. Bu amaç için -0,13V - -0,40 V potansiyel aralığında potansiyel değerleri incelenmiş, en yüksek pik akımı değerinin elde edildiği potansiyel biriktirme potansiyeli olarak seçilmiştir.

3.2.3.4. Biriktirme Zamanı Seçimi

Sıyırma işlemlerinde uygun potansiyelin seçiminin ardından, maddenin elektrot yüzeyinde birikmesi için yeterli olacak süre de belirlenmelidir. Bu amaçla 5- 50s aralığında değişen biriktirme süreleri kullanılarak ölçümler alınmış sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.2.3.5. Adsorptif Sıyırma Voltametrisi ile Elde Edilen Kalibrasyon Eğrisi

Belirlenmiş adsorptif sıyırma şartları kullanılarak 3-NT' nin hangi seviyelerde ölçülebildiğini incelemek için $1,62 \times 10^{-7}$, $8,11 \times 10^{-7}$ ve $4,05 \times 10^{-5}$ M derişimlerinde çözeltiler hazırlanarak, 10^{-10} - 10^{-5} M derişim aralığında ölçümler alınmış, değişimin doğrusal olduğu derişim aralığı belirlenmiştir. Elde edilen verilerle kalibrasyon eğrisi çizilerek doğru denklemi ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır.

3.2.3.6. Geri Alınabilirlik Çalışmaları

Yöntemde standart maddeler ile çalışmalar yapılmış ve ölçülen madde için % geri alınabilirlik hesabı yapılmıştır. Standart maddeler ile yapılan geri alınabilirlik denemelerinde şu işlem sırası uygulanmıştır. Voltametrik hücreye 10,0 mL destek elektrolit (0,3 M pH 9,0 olan fosfat tamponu) çözeltisi konmuş 5 dk azot gazı geçirildikten sonra 20 s -0,15 V (Ag/AgCl referans elektroda karşı) da biriktirme yapılmıştır. Daha sonra (0,1V)–(-1,2 V) potansiyelleri arasında potansiyel taraması uygulanmış ve destek elektrolit ile ilgili voltamogram elde edilmiştir. Çözelti ortamına 100,0 μ L $8,11 \times 10^{-7}$ M standart çözelti eklenmiştir. Bu çözelti için 2 dk azot gazı geçirilmesinden sonra biriktirme yapılmış ve potansiyel uygulanarak voltamogram elde edilmiştir. Aynı standart çözelti ile 50,0 μ L eklemeler sonucu voltamogramlar da alınmıştır. İlk ilave edilen madde standart ekleme yöntemi için bilinmeyen olarak kabul edilmiştir. Diğer ilavelerde eklenen standart madde derişimleri hesaplanmış, tüm bu değerler kullanılarak doğrusal bir grafik oluşturulmuştur. Bu grafikte eğrinin X eksenini kestiği noktada ölçülen değer, bilinmeyen madde derişimini göstermektedir. Bu bilgiden yola çıkılarak ölçülen derişim ile bilinen derişim karşılaştırılmış ve geri alınabilirlik yüzdesi hesaplanmıştır.

3.2.3.7. Yöntemin Sağlamlığı ve Güçlülüğü

Geliştirilen yöntemin şartlara bağlı olarak sonuçlarının kararlı olup olmadığını görmek için de bir seri inceleme yapılır. Yöntem için belirlenen şartlarda bazı parametrelerde bilinçli değişiklikler yapılarak geri alınabilirlik yüzdesinin ne ölçüde değiştiğine bakılır. Sonuçlarda büyük farklılıklar yok ise yöntemin sağlam olduğuna karar verilir (*TheUSA Pharmacopeia*, 2003, *The National Formulary*, USP 26).

Yöntemin sağlamlığı belirlendikten sonra güçlülüğü de incelenmelidir. Bu amaçla yapılan incelemeler şöyledir:

- a) Farklı bir cihazda aynı şartlarda elde edilen sonuçları karşılaştırmak
- b) Farklı günlerde aynı şartlarda elde edilen sonuçları karşılaştırmak
- c) Farklı çalışanlarla aynı şartlarda elde edilen sonuçları karşılaştırmak

Geliştirilen yöntemin sağlamlığının incelenmesi amacıyla destek elektrolit tamponu bileşiminde (Fosfat Tamponu- Britton-Robinson Tamponu) , destek elektrolit tampon pH' sında (pH 9,0 – pH 8,5) , biriktirme süresi değerinde (20s – 30s) değişiklikler yapılarak geri alınabilirliklere bakılmıştır. Yöntemin güçlülüğü çalışması da farklı günlerdeki geri alınabilirlik değerleri kıyaslanarak yapılmıştır.

3.2.3.8. Plazmada Analizler

3.2.3.8.a. Doğrudan Plazma Analizleri

Geliştirilen yöntem 3-NT'nin analizi için sağlıklı kişilerden alınan plazmalarda denenmiştir. Bu amaçla yapılan denemelerde öncelikle plazma numuneleri doğrudan analiz edilmeye çalışılmıştır. Hiçbir ön işlem yapılmaksızın plazma numuneleri seyreltilmiş ve Bölüm 3.1.3' de anlatıldığı gibi analiz edilmiştir.

3.2.3.8.b. Özütleme İşlemi Yapılmış Plazma Analizleri

Plazma analizleri için literatürde bildirilen bir özütleme yöntemi kullanılmıştır (Sodum ve ark., 2000). Özütleme işlemi için şu aşamalar takip edilmiştir: Alınan plazma örneği üzerine 3 kat hacimde % 0,2 HCl içeren soğuk aseton ilave edilmiş ve çöktürülen proteinler santrifüjle toplanmıştır. Çökelek 3 kat hacimli soğuk aseton ile 5 kez yıkanmış ve yavaş azot gazı akıntısında kurutulmuştur. Kurutulan protein örneği pH

7,0 -7,5 olan 0,2 M sodyum asetat çözeltisinde 10-15 mg/mL olacak şekilde çözölmüştür. Enzimatik olarak aminoasitlere hidrolizlemek için 10 mM CaCl_2 varlığında pronaz (1-2 mg/mL) enzimi ilave edilmiş ve 50 °C sıcaklıkta bir gece boyunca hidrolizleme işlemine tabi tutulmuştur. Hidrolizat 8 kat seyreltildikten sonra Bölüm 3.1.3' de anlatıldığı gibi 3-NT tayini için analiz edilmiştir. Analiz sonuçları kalibrasyon eğrilerine göre değerlendirilmiştir. Okunan pik akım farkı değeri kalibrasyon eğrisinde yerine konmuş, derişim değeri hesaplanmıştır.

Özütleme işleminin 3-NT miktarında bir kayba sebep olup olmadığının araştırılması için standart madde kullanılarak uygulaması yapılmıştır. Bu amaçla özütleme işleminde hidroliz basamağından başlanarak deney yapılmıştır. 3-NT standart katısından Çizelge 3.4' de verilen miktarlarda alınmış, hidrolizleme işlemine tabi tutulmuştur. Her bir hidrolizat için akım farkı ölçümleri alınmış, bu ölçümler kalibrasyon eğrisi denkleminde yerine konarak 3-NT' nin derişimi hesaplanmıştır. Hesaplanan derişim değerinden faydalanılarak 3-NT' nin tayin edilebilen miktarı bulunmuş, deney için kullanılan miktarlar ile karşılaştırılarak geri alınabilirlik yüzdesi hesaplanmıştır. Bu aşamada ve diğer deneylerde, geri alınabilirlik yüzdesinin hesaplanmasında literatürden destek alınmıştır (Burn ve ark., 2002).

Çizelge 3.4. AdSKDV ile 3-NT geri alınabilirliğini incelemek için yapılan deneyde kullanılan veriler

Numune	Eklenen 3- NT Miktarı ($\text{gx}10^2$)
NT1	1,02
NT2	1,06
NT3	1,04

3-NT için plazmada geri alınabilirlik çalışmaları da yapılmıştır. Bu amaçla kurutulmuş plazma protein örneğinden Çizelge 3.6' da belirtilen miktarlarda alınmış, üzerine yine Çizelge 3.5' de belirtilen miktarda 3-NT standardından konmuş ve hidrolizleme işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen hidrolizat seyreltildikten sonra analiz edilmiş, 3-NT standardı ile yapılan işlemin benzeri yapılarak tayin edilebilen 3-NT miktarı hesaplanmıştır. Plazmaya 3-NT eklenmeden yapılan deneysel işlem için de 3-NT miktar tayini yapılmıştır. Standart 3-NT' ye uygulanan hidrolizleme işlemindeki

geri alınabilirlik yüzdesinden faydalanılarak tayin edilen 3-NT miktarları bulunmuştur. Plazma için ölçülen 3-NT miktarı, 3-NT eklenmiş plazma için ölçülen 3-NT miktarından çıkarılarak eklenen standart madde miktarı belirlenmiştir. Son olarak belirlenen bu miktar plazmaya eklenen standart madde miktarı ile karşılaştırılmış ve geri alınabilirlik yüzdesi hesaplanmıştır.

Çizelge 3.5. AdSKDV ile plazmada 3-NT geri alınabilirliğini incelemek için yapılan deneyde kullanılan veriler

Numune	Protein Miktarı ($\text{gx}10^2$)	Eklenen 3- NT Miktarı ($\text{gx}10^2$)
SP1	1,05	1,30
SP2	1,17	1,32
SP3	1,33	1,33

Geliştirilen yöntemle plazmalarda 3-NT tayini için denemeler yapılmıştır. Bu amaçla plazma numunelerinden 3,0 mL 9,0 mL soğuk-aseton eklenerek çöktürülmüş ve çökelekler santrifüj ile toplanmıştır. Çökelekler 9,0 mL soğuk aseton ile 5 defa yıkanmış, ardından yavaş $\text{N}_2(\text{g})$ akıntısında kurutulmuştur. Analiz etmek üzere bu numunelerden Çizelge 3.6’ da belirtilen miktarlarda alınmış, hidrolizleme işlemi yapıldıktan sonra seyreltilerek analiz edilmiştir.

Tüm bu işlemlerde alınan cevabın 3-NT’ e ait olup olmadığının tespiti için hidrolizat üzerine standart madde ilave edilerek ölçümler alınmıştır. Pik potansiyeli göz önünde tutularak kalitatif tayin sağlanmıştır.

Çizelge 3.6. AdSKDV ile özütleme işlemi yapılmış plazma analizlerinde kullanılan protein miktarları

Numune	Kullanılan Protein Miktarı(g)	Numune	Kullanılan Protein Miktarı (g)
	0,0229		0,1150
P1	0,0223	P4	0,1150
	0,0286		0,1110
	0,0231		
	0,0250		0,1305
P2	0,0280	P5	0,1300
	0,0290		0,1380
	0,0230		
	0,0221		0,1325
P3	0,0230	P6	0,1350
	0,0231		0,1360
	0,0249		

3.2.3.9. Beyin Omurilik Sıvısında (BOS) Analizler

3.2.3.9.a. Doğrudan BOS Analizleri

Geliştirilen yöntemin beyin omurilik sıvısında 3-NT tayinine izin verip vermediği de incelenmiş, bu nedenle öncelikle doğrudan BOS'larda analiz için denemeler yapılmıştır. BOS numuneleri doğrudan Bölüm 3.1.3' de anlatıldığı gibi analiz edilmiştir.

3.2.3.9.b. Özütleme İşlemi Yapılmış BOS Analizleri

Özütleme işlemi yapılmış BOS numunelerindeki analizler de Bölüm 3.2.3.8.b' de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Çöktürülen proteinlerden Çizelge 3.7' de belirtilen miktarlarda alındıktan sonra hidrolizleme işlemi yapılmıştır. Numuneler ile ilgili cevap değerlendirmesi yapılırken literatürdeki bir çalışmada olduğu gibi (Saavedra ve Barbas, 2002) plazma numuneleri için belirlenen geri alınabilirlik değerlerinden faydalanılmıştır.

Çizelge 3.7. AdSKDV ile özütleme işlemi yapılmış BOS analizlerinde kullanılan protein miktarları

Numune	Kullanılan Protein Miktarı (gx10 ³)
BOS1	4,9
BOS2	1,7
BOS3	1,9
BOS4	2,7
BOS5	1,4
BOS6	Tartılamadı
BOS7	Tartılamadı
BOS8	8,4
BOS9	1,8

3.3. Kapiler Elektroforetik Çalışmalarda Yöntem Geliştirme

3.3.1. Setiltrimetilamonyumbromür (CTAB) Kullanılan Çalışmalar

3.3.1.1. Mor Ötesi Spektrum Veri Eldesi

Kapiler elektroforez için sıkıştırma yöntemi çalışmalarında iki farklı EOF değiştirici kullanılmıştır. İlk çalışmada EOF' u tersine çeviren CTAB, ikinci aşamada da EOF' u baskılayan DETA kullanılmıştır. Öncelikle CTAB' da çalışıldığı için dalga boyu seçimi de başlangıç için bu yöntemde yapılmıştır. Bu amaçla yapılan denemelerde kapiler elektroforez cihazının içerisinde mevcut olan spektrum okuma sistemlerinden faydalanılmıştır. 214,40 ve 208,50 nm dalga boylarındaki elektroforegramlar ve bu elektroforegramlarda gözlenen piklere ait spektrumlar incelenerek dalga boyu seçilmiştir.

3.3.1.2. pH Seçimi

Analizlere başlanırken çalışma elektroliti olarak fosfat tamponu seçilmiştir. Bunun sebebi voltametrik çalışmalarda kullanılan tamponun da fosfat tamponu olmasıdır. Literatürde verilen öncü çalışmada da (Maeso ve ark., 2004) fosfat tamponunun kullanılması tercihte etkili olmuştur. Seçilen elektrolitte en iyi cevabın alındığı pH değerini belirlemek için 6,4; 6,6; 7,0; 7,5; 8,0 ve 8,5 pH değerlerine

ayarlanmış çözeltilerde analizler yapılmıştır. Sonuçlar değerlendirilerek uygun pH değeri seçilmiştir.

3.3.1.3. CTAB Derişimi Etkisinin İncelenmesi

EOF baskılayıcıları ya da değıştiricilerinin derişimi incelenirken farklı bir yöntem kullanılmıştır. Literatüre bakıldığında EOF değıştirici ya da baskılayıcı madde kullanıldığında farklı derişimlerde değıştirici ya da baskılayıcı madde kullanarak EOF hızının değışiminin incelendiğı ve elde edilen sonuca göre karar verildiğı gözlenmiştir (Albert ve ark., 1997).

EOF hızını ölçebilmek için de yine literatürden edinilen bilgiler kullanılmıştır (Landers, 1997 l). Bu kaynağı göre EOF hızı şu şekilde ölçülmektedir:

Bir analitin hızı v_i , elektrik alan uygulama süresi boyunca göç ettiğı uzaklıktır. Hız; mobilite μ_i dolayısıyla alan şiddeti ile $E = H/L$ ilgilidir. Böylece

$$v_i = \mu_{\text{görünen}} H/L = \mu_{\text{görünen}} E \quad (3.1.)$$

Bir elektroforegramdan ölçülen görünen mobilite $\mu_{\text{görünen}}$; analitin mobilitesi ve elektroozmotik akışın toplamıdır.

$$\mu_{\text{görünen}, i} = \mu_{ep} + \mu_{eo} \quad (3.2.)$$

$$= L_d L_t / t_{\text{görünen}, i} H \quad (3.3)$$

$$= L_d L_t / H (1/t_{\text{görünen}, i} - 1/t_{\text{referans}}) + \mu_{\text{referans}} \quad (3.4.)$$

Burada L_d detektöre olan uzaklık, L_t kapilerin toplam boyu ve eğer referans olarak kullanılan madde yüksüz ise $\mu_{\text{referans}} = 0$ alınır.

Yapılan denemelerde yüksüz standart olarak dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılmış ve verilen eşitlikler yardımıyla EOF değıştirici olarak CTAB' ın kullanıldığı yöntemde 0; 0,5; 1,0; 1,5 mM CTAB derişimlerinde EOF hızları hesaplanmıştır.

3.3.1.4. H₃PO₄ Derişimi, Sıcaklık ve Ayırma Potansiyelinin Kemometrik Yaklaşımla Seçimi

Tampon çözelti olarak kullanılan fosforik asit (H₃PO₄) derişimi, ayırma potansiyeli ve sıcaklık kemometrik olarak çalışılmış, Çizelge 3.8' de sunulan parametreler kullanılarak Çizelge 3.9' daki genişletilmiş deneysel tasarım şeması oluşturulmuştur. Bu şemaya uygun olarak denemeler yapılmış, her bir ölçüm için beş kez sonuç alınmıştır.

Çizelge 3.8. CTAB ile büyük hacimli örnek sıkıştırma çalışmaları için kodlanmış düzeyleri

Parametre	En Düşük Değer(-1)	En Yüksek Değer(+1)
H ₃ PO ₄ derişimi (M)	0,10	0,20
Ayırma Potansiyeli (kV)	-10	-20
Sıcaklık (°C)	20	30

Çizelge 3.9. 4,054x10⁻⁵ M 3-NT için Çizelge 3.8’ de verilen değerler kullanılarak hazırlanan tasarım şeması

H ₃ PO ₄ derişimi (M)	Ayırma Potansiyeli (kV)	Sıcaklık (°C)
0,10	-10	20
0,20	-10	20
0,10	-20	20
0,20	-20	20
0,10	-10	30
0,20	-10	30
0,10	-20	30
0,20	-20	30
0,15	-15	25

3.3.1.5. Enjeksiyon Süresinin Seçimi

Enjeksiyon süresinin belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır. Literatürde sıkıştırma yöntemlerinde analiz için kullanılan kolonun ne kadarının doldurulduğunun belirlenmesi gerektiği bildirilmektedir (Albert ve ark., 1997). İncelenen şartlarda kolonun doldurulma oranı Bölüm 2.3.10’ da verilen Eşitlik 2.39 yardımıyla belirlenmiştir.

Yapılan deneyde örnek çözeltisinin viskozitesi suyun viskozitesi ile eşit tutulmuştur. Çünkü örnek çözeltisi ile ilgili olarak hazırlanan tüm çözeltiler oldukça seyreltik çözeltilerdir. Yapılan araştırmada su için viskozite değerinin analizlerin yapıldığı 20 °C de 1,002 centipoise (cp) olduğu belirlenmiştir (CRC Handbook). Bulunan bu viskozite değeri diğer belirli değerler de yerine konularak hesaplamada kullanılmış ve sistemin 1 s de ne kadar hacimde numune enjekte ettiği hesaplanmıştır. Bu değer kullanılarak her bir enjeksiyon süresi için kolonun ne kadarının dolduğu

bulunmuş, bulunan değerler Çizelge 3.10' da sunulmuştur.

Çizelge 3.10. Belirtilen enjeksiyon sürelerinde 50 µm iç çaplı 62 cm boyundaki kolonun dolma oranları

Enjeksiyon süresi (s)	Verilen Numune Hacmi (nL)	Kolonun toplam hacmine oranı %
200	309,0	25,38
300	463,5	38,07
400	618,0	50,76
500	772,5	63,46
600	927,0	76,15
$\Delta P = 4,98075 \times 10^{-3} \text{ N/m}^2$ $\eta = 7,975 \times 10^{-4} \text{ Ns/m}^2$ $L = 0,56 \text{ m}$ $r = 25 \times 10^{-6} \text{ m}$		

3.3.1.6. Kalibrasyon Eğrisi

Geliştirilen yöntem için en iyi çalışma şartları belirlendikten sonra doğrusal derişim aralığını tespit etmek üzere çeşitli derişimlerde ölçümler alınmıştır. Bu amaçla 3-NT nin $2,027 \times 10^{-3} \text{ M}$ lık standart çözeltisinden seyreltme yoluyla $10^{-13} - 10^{-5} \text{ M}$ derişim aralığında bir seri çözelti hazırlanmış, bu çözeltilerin enjeksiyonları sonucu elde edilen veriler değerlendirilerek kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır.

3.3.2. Dietilentriamin (DETA) Kullanılan Çalışmalar

3.3.2.1. pH Seçimi

DETA kullanılarak yapılan sıkıştırma çalışmasında Bölüm 3.3.1.2' de bahsedilen sebeplerden dolayı fosfat tamponunda devam edilmiştir. En iyi cevabın alındığı pH değerini belirlemek üzere 5,0; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 ve 9,0 pH değerlerindeki fosfat tampon çözeltilerinde incelemeler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirilerek en iyi cevabın alındığı pH değeri çalışma için seçilmiştir.

3.3.2.2. DETA Derişimi Etkisinin İncelenmesi

Bölüm 3.3.1.3' de EOF değiştirici veya baskılayıcı maddelerin derişiminin nasıl belirlendiği anlatılmıştır. Benzer işlemler yapılarak 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 ve 5,0 mM DETA derişimlerinde dimetilsülfoksit ile EOF hızı ölçülerek sonuçlar elde edilmiş, sonuçların incelenmesiyle hangi derişim değerinde çalışılması gerektiği belirlenmiştir.

3.3.2.3. H_3PO_4 Derişimi, Sıcaklık ve Ayırma Potansiyelinin Kemometrik

Yaklaşımın Seçimi

Tampon çözelti olarak kullanılan fosforik asit (H_3PO_4) derişimi, ayırma potansiyeli ve sıcaklık için genişletilerek kemometrik olarak çalışılmış Çizelge 3.11’ de sunulan parametreler kullanılarak Çizelge 3.12’ de sunulan deneysel tasarım şeması oluşturulmuştur. Bu şemaya uygun olarak deneyler yapılmış, her bir ölçüm için beş kez sonuç alınmıştır.

Çizelge 3.11. DETA ile büyük hacimli örnek sıkıştırma çalışmada çalışma değerlerinin kodlanmış düzeyleri

Parametre	En Düşük Değer(-1)	En Yüksek Değer(+1)
H_3PO_4 derişimi (M)	0,05	0,07
Ayırma Potansiyeli (kV)	-20	-30
Sıcaklık ($^{\circ}C$)	20	30

Çizelge 3.12. $4,054 \times 10^{-5}$ M 3-NT için Çizelge 3.12. de verilen değerler kullanılarak hazırlanan tasarım şeması

H_3PO_4 derişimi (M)	Ayırma Potansiyeli (V)	Sıcaklık ($^{\circ}C$)
0,05	-20	20
0,07	-20	20
0,05	-30	20
0,07	-30	20
0,05	-20	30
0,07	-20	30
0,05	-30	30
0,07	-30	30

3.3.2.4. Enjeksiyon Süresinin Seçimi

Enjeksiyon süresi Bölüm 3.3.1.5’ de anlatıldığı gibi belirlenmiştir. Bu yöntemde 75 μm iç çaplı kapiler kolon kullanılmış, hesaplamalar da ona göre yapılmıştır. Her bir enjeksiyon süresinde kolonun dolma oranları Çizelge 3.13’ de sunulmuştur.

Çizelge 3.13. Belirtilen enjeksiyon sürelerinde 75 µm iç çaplı 57 cm boyundaki kolonun dolma oranları

Enjeksiyon süresi (s)	Verilen Numune Hacmi (nL)	Kolonun toplam hacmine oranı %
50	338,5	13,44
100	677,0	26,88
150	1015,5	40,33
200	1354,0	53,77
250	1692,5	67,21
300	2031,0	80,65
350	2369,5	94,09

$\Delta P = 4,98075 \times 10^3 \text{ N/m}^2$ $\eta = 1,002 \times 10^{-3} \text{ Ns/m}^2$ $L = 0,57 \text{ m}$ $r = 37,5 \times 10^{-6} \text{ m}$

3.3.2.5. Kalibrasyon Eğrisi

Geliştirilen yöntem için en iyi çalışma şartları belirlendikten sonra doğrusal derişim aralığını tespit etmek üzere çeşitli derişimlerde ölçümler alınmıştır. Bu amaçla 3-NT' nin $2,027 \times 10^{-3} \text{ M}$ lık standart çözeltisinden seyreltme yoluyla $10^{-15} - 10^{-4} \text{ M}$ derişim aralığında bir seri çözelti hazırlanmış, bu çözeltilerin enjeksiyonları sonucu veriler alınmıştır.

3.4. Kapiler Elektroferezde Analizler

3.4.1. Geri Alınabilirlik Çalışmaları

Geliştirilen yöntem için standart maddeler kullanılarak geri alınabilirlik yüzdesi hesaplanmıştır. Bu amaçla kalibrasyon eğrisinden faydalanılmıştır. $1,014 \times 10^{-8} \text{ M}$ derişimde 3-NT' nin ölçümleri alınmış, alınan cevap kalibrasyon eğrisi denkleminde yerine konarak derişim hesaplanmıştır. Belirlenen derişim ile bilinen derişim değeri kıyaslanarak geri alınabilirlik yüzdesi hesaplanmıştır.

3.4.2. Yöntemin Sağlamlığı ve Güçlülüğü

Bölüm 3.2.3.7' de anlatıldığı gibi farklı parametrelerde bilinçli değişiklikler yapılarak geliştirilen yöntemde cevap incelenmektedir. Elde edilen sonuçlar kıyaslanarak yöntemin sağlamlığı konusunda hüküm verilmektedir. Geliştirilen yöntemle ilgili olarak sıcaklık ($25^\circ\text{C} - 30^\circ\text{C}$), pH ($\text{pH } 7,0 - \text{pH } 7,5$) ve H_3PO_4 ($0,10 \text{ M} - 0,15 \text{ M}$) derişimi parametrelerinde değişiklikler yapılarak ve farklı günlerde ölçümler alınarak yöntemin sağlamlığı ve güçlülüğü incelenmiştir. Bu incelemeler $1,014 \times 10^{-8} \text{ M}$ derişimde 3-NT için yapılmıştır. Her bir farklı koşul için elektroforegramlarda pik yüksekliği değerleri okunmuş, kalibrasyon eğrisi denkleminde yerine konarak tayin edilebilen 3-NT derişimi hesaplanmıştır. Ölçülen standart madde derişimi ile

hesaplanan standart madde derişimi karşılaştırılmış ve geri alınabilirlik yüzdesi hesaplanmıştır.

3.4.3. Plazmada Analizler

3.4.3.a. Doğrudan Plazma Analizleri

Geliştirilen sıkıştırma yöntemi ile 3-NT' nin biyolojik sıvıda analizi için denemeler yapılmıştır. Bu denemelerde kapiler elektroforez yönteminin aynı zamanda bir ayırma yöntemi olması nedeniyle plazma numunelerinin doğrudan analizi yapılmıştır. Yapılan analizlerde gözlenen pikin 3-NT' ye ait olup olmadığının anlaşılabilmesi için plazma örneği üzerine standart maddeler eklenerek elektroforegramları alınmıştır. Plazma örneklerinin seyreltilme oranlarını belirlemek için de 214,40 nm ve 204,50 nm dalga boylarındaki elektroforegramlar ve bu elektroforegramlarda gözlenen pikler için okunan spektrumlar karşılaştırılmıştır.

3.4.3.b. Özütleme İşlemi Yapılmış Plazma Analizleri

Plazma, eklenmiş plazma ve standart 3-NT numuneleri Bölüm 3.2.3.8.b' de belirtildiği gibi hazırlanmış, seyreltikten sonra da geliştirilen yöntem ile analiz edilmiştir.

Elde edilen cevapta gözlenen pikin 3-NT' ye ait olup olmadığının anlaşılması için alıkonma zamanından yararlanılmış, yanı sıra plazma örneği üzerine standart maddeler ilave edilerek elektroforegramlar alınmış ve karşılaştırılmıştır.

Ayrıca geliştirilen yöntemde plazma numunesi için gözlenen pikin 3-NT yanında başka maddeler de içerip içermediğinin anlaşılması için farklı pH da (pH 8,5) elektrolit çözeltisinde de deneme yapılmış, pikler karşılaştırılarak incelemelere devam edilmiştir.

3.4.4. BOS ta Analizler

3.4.4.a. Doğrudan BOS Analizleri

BOS numunelerini doğrudan analiz edebilmek için plazma numunelerine uygulanan işlemin benzeri yapılmıştır. Seyreltilmiş numuneler için 214,40 nm ve 204,50 nm dalga boylarında farklı elektroforegramlar kullanılmış, burada gözlenen pikler için gözlenen spektrumlar kaydedilmiş ve seyreltme oranının belirlenmesi için yorumlanmıştır.

3.4.4.b. Özütleme İşlemi Yapılmış BOS Analizleri

BOS numuneleri Bölüm 3.2.3.9.b' da belirtildiği gibi hazırlanmış ve analiz edilmiştir. BOS ortamında elde edilen pikin 3-NT' ye ait olup olmadığının anlaşılabilmesi için hem alıkonma zamanından faydalanılmış hem de standart çözeltiden ilave yapılarak pik yüksekliğinde artış olup olmadığı incelenmiştir. Numunelerdeki miktarlar hesaplanırken Bölüm 3.2.3.9.b' de anlatılan voltametrik yöntemdeki gibi plazma için belirlenen geri alınabilirlik değerlerinden faydalanılmıştır.

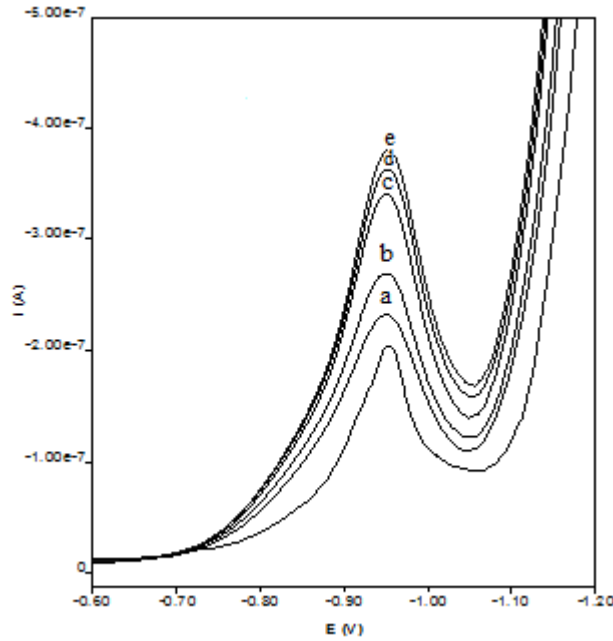
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Voltametrik Çalışmalar

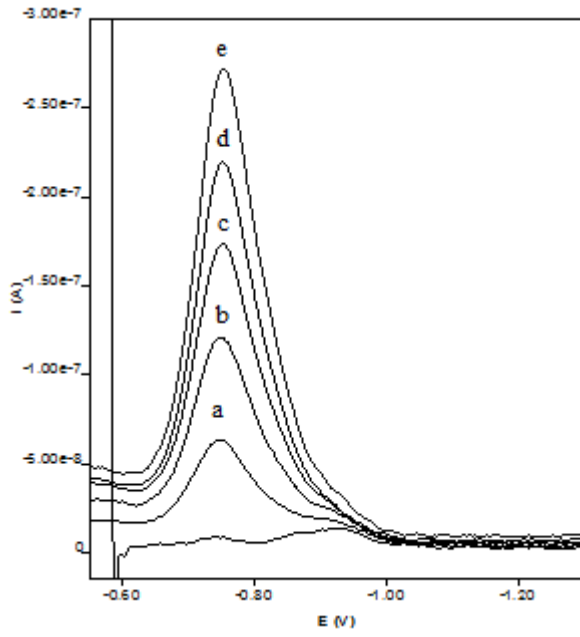
4.1.1. Kare Dalga Yöntemi

4.1.1.1 Destek Elektrolit Seçimi

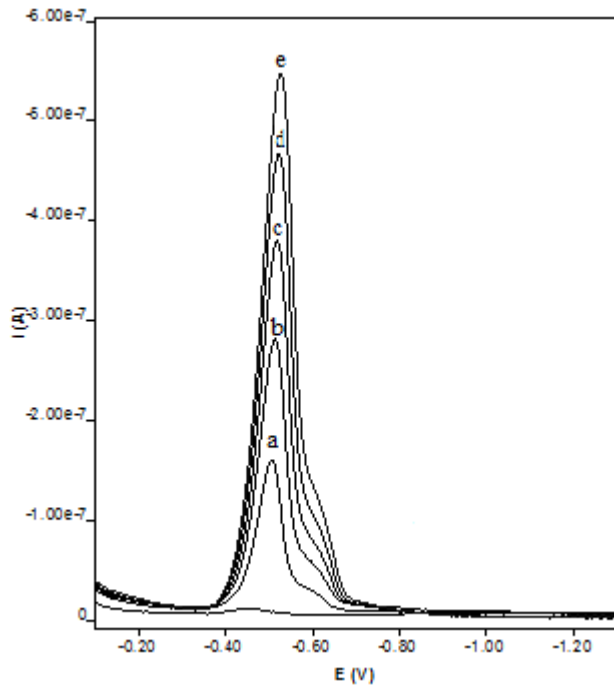
Destek elektrolit çözeltisinin seçilmesi amacıyla yapılan denemeler sonucu HCl, NaOH, KCl çözeltileri ve asetat, borat, fosfat ve Britton-Robinson tamponlarında alınmış voltamogramlar sırasıyla Şekil 4.1-9' da verilmiştir. Şekillerde a: $5,04 \times 10^{-6}$ M b: $1,00 \times 10^{-5}$ M c: $1,50 \times 10^{-5}$ M d: $1,98 \times 10^{-5}$ M e: $2,47 \times 10^{-5}$ M standart 3-NT çözeltileri için alınan voltamogramlar sunulmuştur.



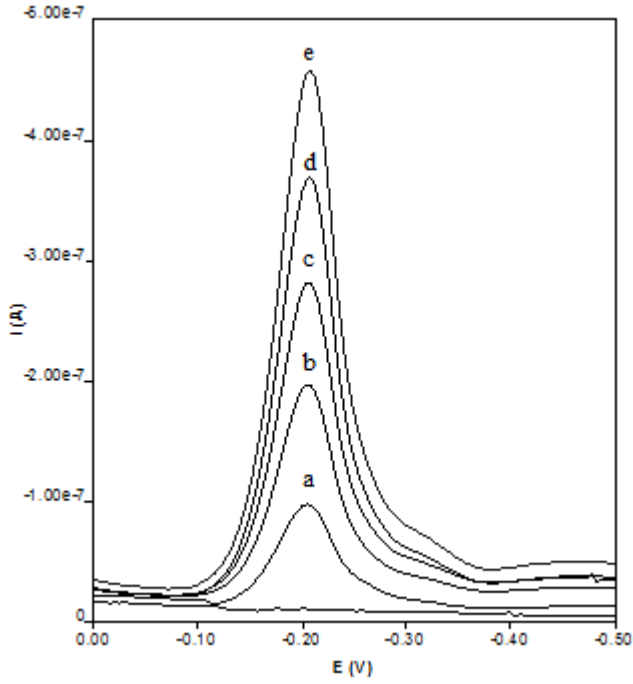
Şekil 4.1. KDV ile 1 M HCl destek elektrolitinde a: $5,04 \times 10^{-6}$ M b: $1,00 \times 10^{-5}$ M c: $1,50 \times 10^{-5}$ M d: $1,98 \times 10^{-5}$ M e: $2,47 \times 10^{-5}$ M standart 3-NT çözeltileri için alınan voltamogramlar



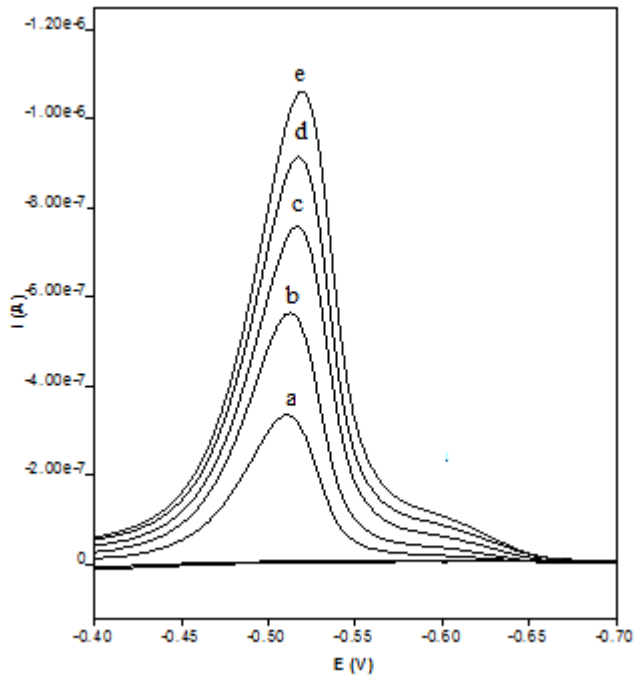
Şekil 4.2. KDV ile 1 M NaOH destek elektrolitinde a: $5,04 \times 10^{-6}$ M b: $1,00 \times 10^{-5}$ M c: $1,50 \times 10^{-5}$ M d: $1,98 \times 10^{-5}$ M e: $2,47 \times 10^{-5}$ M standart 3-NT çözeltileri için alınan voltamogramlar



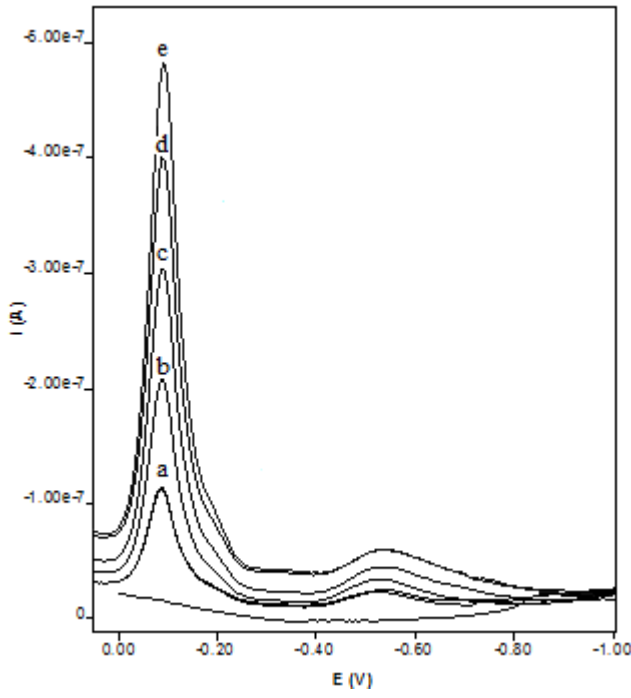
Şekil 4.3. KDV ile 1 M KCl destek elektrolitinde a: $5,04 \times 10^{-6}$ M b: $1,00 \times 10^{-5}$ M c: $1,50 \times 10^{-5}$ M d: $1,98 \times 10^{-5}$ M e: $2,47 \times 10^{-5}$ M standart 3-NT çözeltileri için alınan voltamogramlar



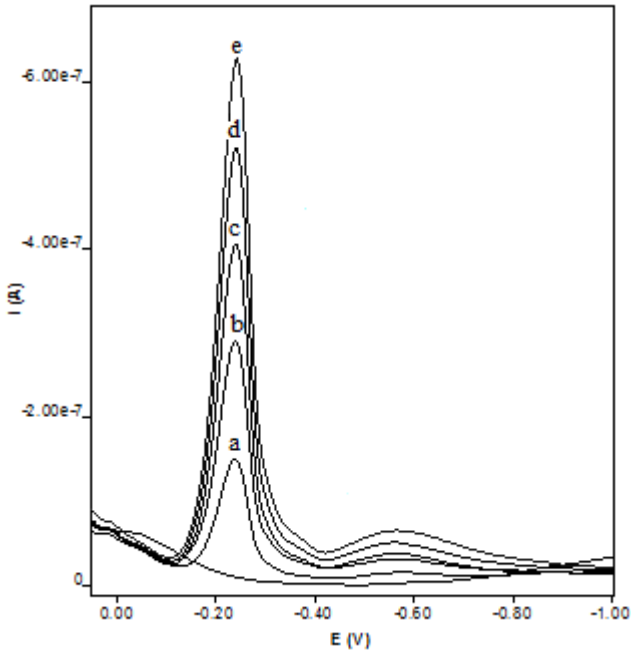
Şekil 4.4. KDV ile 0,5 M pH 4 asetat tamponunda a: $5,04 \times 10^{-6}$ M b: $1,00 \times 10^{-5}$ M c: $1,50 \times 10^{-5}$ M d: $1,98 \times 10^{-5}$ M e: $2,47 \times 10^{-5}$ M standart 3-NT çözeltileri için alınan voltamogramlar



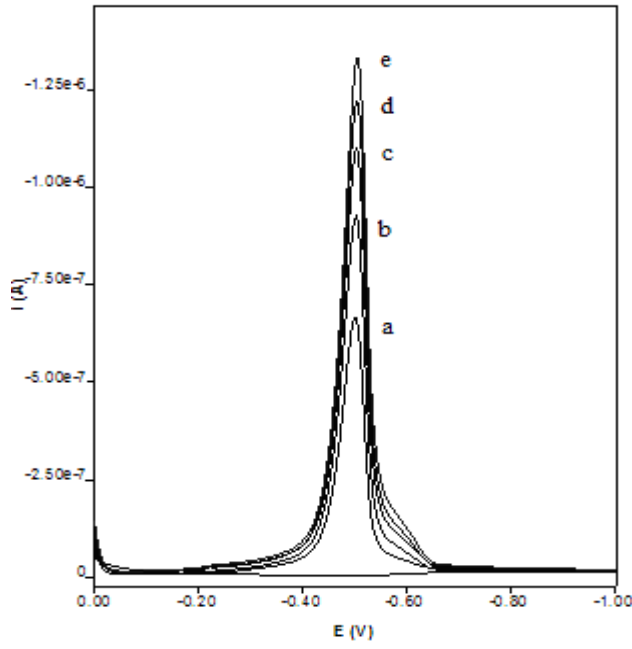
Şekil 4.5. KDV ile 0,5 M pH 9 borat tamponunda a: $5,04 \times 10^{-6}$ M b: $1,00 \times 10^{-5}$ M c: $1,50 \times 10^{-5}$ M d: $1,98 \times 10^{-5}$ M e: $2,47 \times 10^{-5}$ M standart 3-NT çözeltileri için alınan voltamogramlar



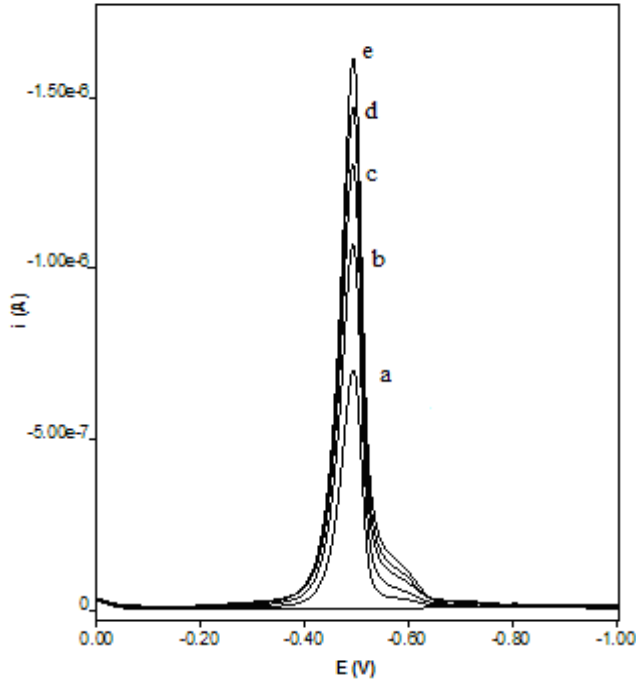
Şekil 4.6. KDV ile 0,05 M pH 1,90 BRT tamponunda a: $5,04 \times 10^{-6}$ M b: $1,00 \times 10^{-5}$ M c: $1,50 \times 10^{-5}$ M d: $1,98 \times 10^{-5}$ M e: $2,47 \times 10^{-5}$ M standart 3-NT çözeltileri için alınan voltamogramlar



Şekil 4.7. KDV ile 0,05 M pH 4,80 BRT tamponunda a: $5,04 \times 10^{-6}$ M b: $1,00 \times 10^{-5}$ M c: $1,50 \times 10^{-5}$ M d: $1,98 \times 10^{-5}$ M e: $2,47 \times 10^{-5}$ M standart 3-NT çözeltileri için alınan voltamogramlar



Şekil 4.8. KDV ile 0,05 M pH 9 BRT tamponunda a: $5,04 \times 10^{-6}$ M b: $1,00 \times 10^{-5}$ M c: $1,50 \times 10^{-5}$ M d: $1,98 \times 10^{-5}$ M e: $2,47 \times 10^{-5}$ M standart 3-NT çözeltileri için alınan voltamogramlar



Şekil 4.9. KDV ile 0,5 M pH 9 fosfat tamponunda a: $5,04 \times 10^{-6}$ M b: $1,00 \times 10^{-5}$ M c: $1,50 \times 10^{-5}$ M d: $1,98 \times 10^{-5}$ M e: $2,47 \times 10^{-5}$ M standart 3-NT çözeltileri için alınan voltamogramlar

Şekil 4.1 - Şekil 4.9' da gösterilen tüm voltamogramlardan $1,98 \times 10^{-5}$ M 3-NT için okunan kare dalga voltametrik akım farkı ve pik potansiyeli değerleri Çizelge 4.1' de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. KDV ile $1,98 \times 10^{-5}$ M 3-NT için farklı destek elektrolitlerde ve pH tamponlarında elde edilen piklerin potansiyelleri ve akım farkı değerleri (n=3)

pH	Derişim (M)	Destek Elektrolit	Pik Potansiyeli(V)	Akım Farkı (A)
-	1	HCl	-0,949	$2,47 \times 10^{-7}$
-	1	NaOH	-0,749	$1,94 \times 10^{-8}$
-	1	KCl	-0,509	$4,59 \times 10^{-7}$
4,0	0,5	Asetat	-0,204	$3,43 \times 10^{-7}$
9,0	0,5	Borat	-0,509	$9,07 \times 10^{-7}$
1,9	0,05	BRT	-0,090	$3,41 \times 10^{-7}$
4,8	0,05	BRT	-0,240	$4,93 \times 10^{-7}$
6,15	0,05	BRT	-0,320	$6,02 \times 10^{-7}$
8,0	0,05	BRT	-0,464	$9,61 \times 10^{-7}$
9,0	0,05	BRT	-0,516	$1,14 \times 10^{-6}$
10,0	0,05	BRT	-0,607	$8,08 \times 10^{-7}$
2,0	0,5	Fosfat	-0,0818	$2,98 \times 10^{-7}$
4,04	0,5	Fosfat	-0,181	$3,23 \times 10^{-7}$
6,0	0,5	Fosfat	-0,297	$5,12 \times 10^{-7}$
8,0	0,5	Fosfat	-0,432	$9,95 \times 10^{-7}$
9,0	0,5	Fosfat	-0,492	$1,46 \times 10^{-6}$
10,0	0,5	Fosfat	-0,551	$1,16 \times 10^{-6}$

Şekil 4.1- 4.9' da verilen voltamogramlar incelendiğinde en düzgün pik şeklinin pH 9,0 olan fosfat tamponunda elde edildiği gözlenmiştir. Çizelge 4.1' de $1,98 \times 10^{-5}$ M 3-NT için ölçülen pik akım farkı değerleri karşılaştırılmış, en yüksek pik akım farkı değerinin yine pH 9,0 olan fosfat tamponunda elde edildiği gözlenmiştir. Bu nedenle çalışmaların fosfat tamponunda sürdürülmesine karar verilmiştir.

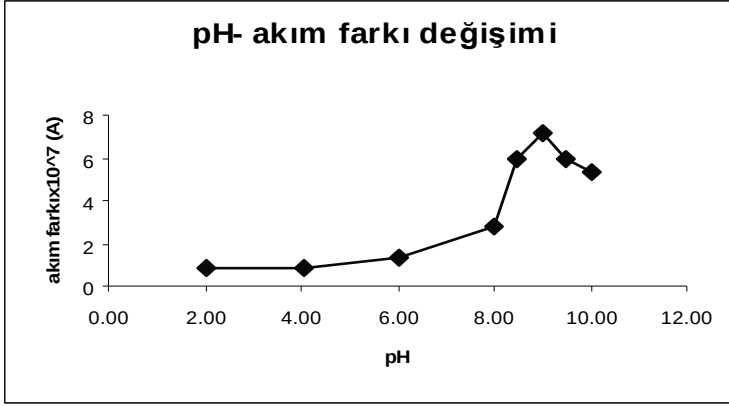
4.1.1.2. pH Seçimi

Tampon seçimi çalışmalarında pH değerleri kabaca belirlenmiştir. Ortamın pH değerini belirlemek için daha titiz bir çalışma yapılmıştır. Bölüm 3.2.1.2' de verilen pH değerlerinde fosfat tamponları hazırlanmış ve alınan sonuçlar Çizelge 4.2' de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. KDV ile $1,00 \times 10^{-5}$ M 3-NT için farklı pH değerlerinde elde edilen akım farkları (n=3)

pH	Akım Farkı ($A \times 10^{-7}$)
2,00	1,54
4,04	1,65
6,00	2,68
8,00	4,94
8,50	7,32
9,00	11,00
9,50	9,14
10,00	8,27

Çalışılan pH değerlerinde elde edilen sonuçlar grafiğe geçirilip pH ile akım farkı değişimi izlenmiş, bu değişim Şekil 4.10' da sunulmuştur.



Şekil 4.10. KDV ile $1,00 \times 10^{-5}$ M (2,26 mg/L) 3-NT için 0,5 M fosfat tamponunda pH değişim grafiği

Şekil 4.10' a bakıldığında akım farkı değerinin düşük pH değerlerinde düşük olduğu, bazik pH değerlerinde daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Bazik pH bölgesinde en yüksek akım farkı değeri pH' nın 9,00 olduğu durumda elde edilmiştir. Tüm bu veriler ışığında, çalışma pH' sı olarak pH 9,00 değeri seçilmiştir.

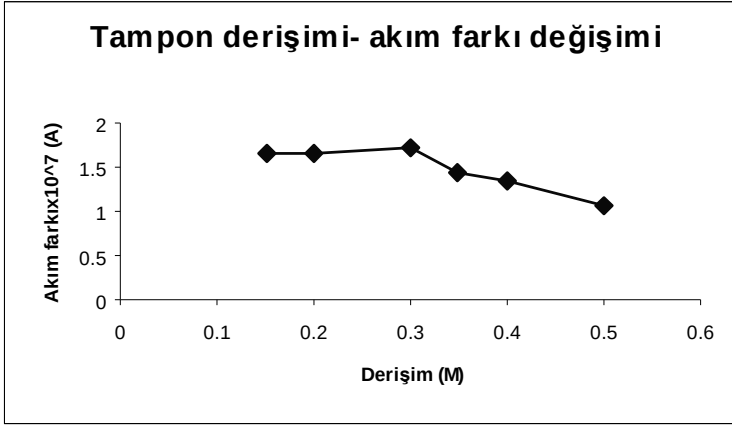
4.1.1.3. Tampon Derişimi Seçimi

Kullanılan destek elektrolit tamponunun en iyi sonucu verdiği derişim değerini bulmak için Bölüm 3.2.1.3'de belirtilen derişimlerde fosfat tamponları hazırlanmıştır. Her bir tampon çözeltisi içerisinde $1,0 \times 10^{-8}$ M 3-NT için pH 9,00 olduğu durumda elde edilen akım farkları kaydedilmiş, alınan veriler Çizelge 4.3' de sunulmuştur.

Çizelge 4.3. KDV ile $1,0 \times 10^{-8}$ M 3-NT için pH 9,00 değerinde farklı tampon derişimlerinde elde edilen akım farkları (n=3)

Tampon Derişimi (M)	Akım Farkı ($A \times 10^8$)
0,15	1,65
0,20	1,67
0,30	1,71
0,35	1,44
0,40	1,33
0,50	1,07

Tampon derişimi değiştirilerek elde edilen sonuçlar grafiğe geçirilmiş, oluşturulan grafik Şekil 4.11' de sunulmuştur.



Şekil 4.11. KDV ile $1,0 \times 10^{-8}$ M 3-NT için pH 9,00 değerinde tampon derişimi ile akım farkının değişimi

Tampon derişimi ile akım farkının değişimi incelendiğinde, 0,30 M' a kadar olan tampon derişimlerinde akım farkında küçük artışlar gözlenmişken, 0,30 M dan daha büyük derişimli tampon çözeltilerde akım farkı değerlerinde azalma gözlenmektedir. En yüksek akım farkı değerini veren 0,30 M derişimdeki fosfat tampon çözeltisi çalışmak üzere seçilmiştir.

4.1.1.4. Kare Dalga Şartlarının Kemometrik Yaklaşım ile Seçilmesi

KDV yönteminde uygulanacak pulsların özelliklerinin belirlenmesi için Bölüm 3.2.1.4' de verilen Çizelge 3.3' deki şemaya uygun olarak deneyler yapılmıştır. Bu deneylerin sonucu olarak Çizelge 4.4' de tasarım şeması, etkileşimler ve b katsayıları gösterilmektedir. Deneysel tasarım şeması 1 ve -1 ile gösterilen değerlerle kaydedilmiştir. Burada 1 sayısı seçilen etken için en yüksek değeri, -1 sayısı ise en küçük değeri göstermektedir. Derişim değeri sabit olduğu için 1 ile gösterilmiştir. Çizelge 4.4' de 1 numaralı deneyde tüm etkenler için -1 sayısı gösterilmektedir. Bu durum burada seçilen potansiyel adımı, genlik ve frekans için en küçük değerler olan 0,001 V, 0,01 V ve 5 Hz değerlerinin kullanıldığını göstermektedir.

Çizelge 4.4. Kemometrik tasarlanmış deney sonucunda $6,00 \times 10^{-7} \text{ M}$ 3-NT için elde edilen etkileşim, akım farkı ve b katsayıları (n=3)

Deney	x_0	x_1	x_2	x_3	x_1x_2	x_1x_3	x_2x_3	$x_1x_2x_3$	Akım Farkı		
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	$1,15 \times 10^{-9}$	$2,36 \times 10^{-8}$	b_0
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	$4,67 \times 10^{-9}$	$1,82 \times 10^{-8}$	b_1
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	$2,07 \times 10^{-9}$	$1,11 \times 10^{-8}$	b_2
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	$1,17 \times 10^{-8}$	$1,87 \times 10^{-8}$	b_3
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	$5,57 \times 10^{-9}$	$9,04 \times 10^{-9}$	b_{12}
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	$3,86 \times 10^{-8}$	$1,49 \times 10^{-8}$	b_{13}
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	$1,28 \times 10^{-8}$	$9,09 \times 10^{-9}$	b_{23}
8	1	1	1	1	1	1	1	1	$1,12 \times 10^{-7}$	$7,51 \times 10^{-9}$	b_{123}

Kemometrik yaklaşımın uygulanmasında Çizelge 4.4’ de verilen tabloda 8 satır 8 sütunlu etkileşim matrisi ters çevrilip 8 satır 1 sütunlu sonuç matrisi ile çarpılmıştır. Elde edilen denklem aşağıda sunulmuştur.

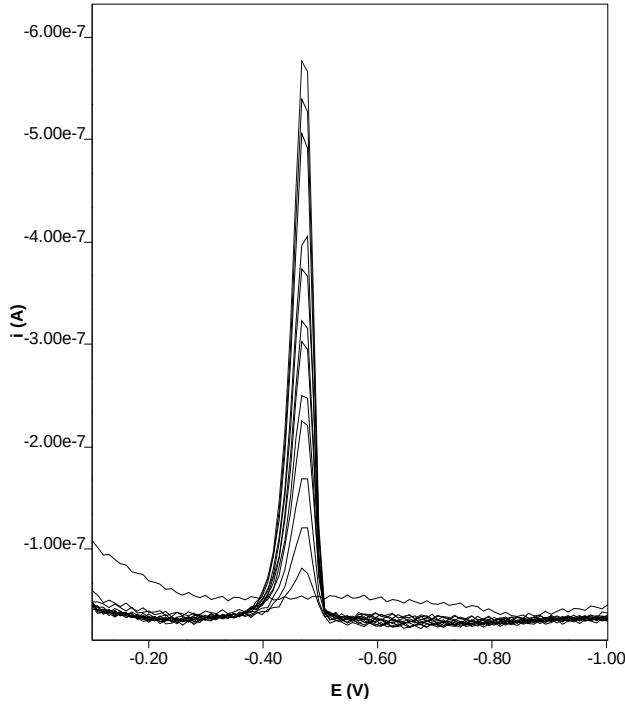
$$y = 23610^8 + 18210^8 x_1 + 11110^8 x_2 + 18710^8 x_3 + 90410^9 x_1x_2 + 14910^8 x_1x_3 + 90910^9 x_2x_3 + 75110^9 x_1x_2x_3 \quad (4.1.)$$

Denklem incelendiğinde seçilen parametrelerin sonuca birbirine yakın oranda ve doğrusal katkıda bulunduğu görülmektedir. Bu nedenle parametrelerin hepsinin en yüksek değerlerinin seçildiği tasarımın en iyi sonucu vereceği görülmüş ve analizlerimizde kullanılmak üzere seçilmiştir. Modelin geçerliliğinin ispatlanması için denklemdeki veriler yerine konarak tekrar hesaplama yapılmış ve akım farkı değerlerine karşı, denklemden hesaplanan değerler grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen doğrunun korelasyon katsayısı 0,85 değerinden büyük ve 1’ e eşittir. Literatürde verilen bilgiye göre (Alpar R., 2003) bu sonuç modelin geçerliliğini ispatlamaktadır.

Tüm incelemeler sonucunda KDV ile 3-NT analizi için en uygun çalışma koşulları şunlardır: 0,30 M pH 9,0 fosfat tamponu, kare dalga pulsu için 0,01 V potansiyel adımı, 0,1 V genlik ve 50 Hz frekans değerleridir.

4.1.1.5. Kare Dalga Yöntemi ile Elde Edilen Kalibrasyon Eğrisi

Geliştirilen yöntemde potansiyel adımı için 0,01 V, genlik için 0,1 V ve frekans için 50 Hz değerleri kullanılarak oluşturulan kare dalga ile 0,30 M pH 9,0 olan fosfat tamponunda 3-NT’ nin hangi seviyelerde ölçülebildiğini incelemek için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Elde edilen voltamogramlar Şekil 4.12’ de, voltamogramlardan okunan akım farkları ve standart sapmaları Çizelge 4.5’ de verilmiştir.



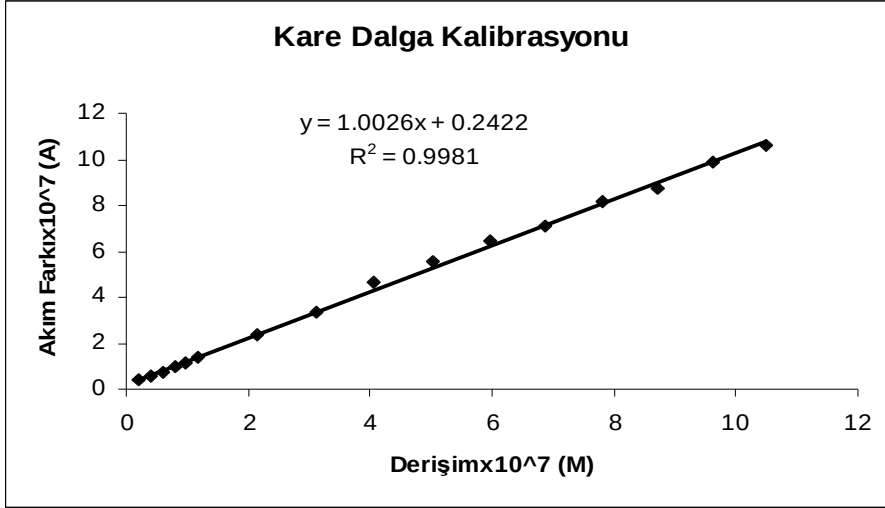
Şekil 4.12. Genliğin 0,1 V, frekansın 50 Hz ve potansiyel adımının 0,01 V olduğu kare dalga şartlarında pH 9,0 0,3 M fosfat tamponunda $2,02 \times 10^{-8}$ – $1,05 \times 10^{-6}$ M 3-NT için elde edilen voltamogramlar

Çizelge 4.5. KDV yöntemi ile 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 3-NT için elde edilen değerler (n=5)

Derişim ($M \times 10^7$)	Akım Farkı $\pm$ S.S. *($A \times 10^7$)	Derişim ($M \times 10^7$)	Akım Farkı $\pm$ S.S. *($A \times 10^7$)
0,202	$0,369 \pm 0,038$	4,070	$4,650 \pm 0,240$
0,401	$0,580 \pm 0,010$	5,020	$5,530 \pm 0,608$
0,599	$0,766 \pm 0,007$	5,950	$6,420 \pm 0,275$
0,795	$1,020 \pm 0,028$	6,880	$7,080 \pm 0,636$
0,988	$1,180 \pm 0,007$	7,800	$8,200 \pm 0,141$
1,180	$1,360 \pm 0,007$	8,700	$8,710 \pm 0,148$
2,150	$2,370 \pm 0,169$	9,610	$9,870 \pm 0,162$
3,120	$3,310 \pm 0,240$	10,500	$10,600 \pm 1,131$

*Standart sapma değerleri (Beş ölçüm için)

Çizelge 4.5' de verilen değerler grafiğe geçirilmiş, kalibrasyon eğrisi Şekil 4.13' de verilmiştir.



Şekil 4.13. Genliğin 0,1 V, frekansın 50 Hz ve potansiyel adımının 0,01 V olduğu kare dalga şartlarında pH 9,0 0,3 M fosfat tamponunda $2,02 \times 10^{-8}$ – $1,05 \times 10^{-6}$ M 3-NT derişimleri arasında elde edilen kalibrasyon eğrisi grafiği

Oluşturulan eğrinin $2,02 \times 10^{-8}$ – $1,05 \times 10^{-6}$ M derişimleri arasında doğrusal olduğu gözlenmiştir.

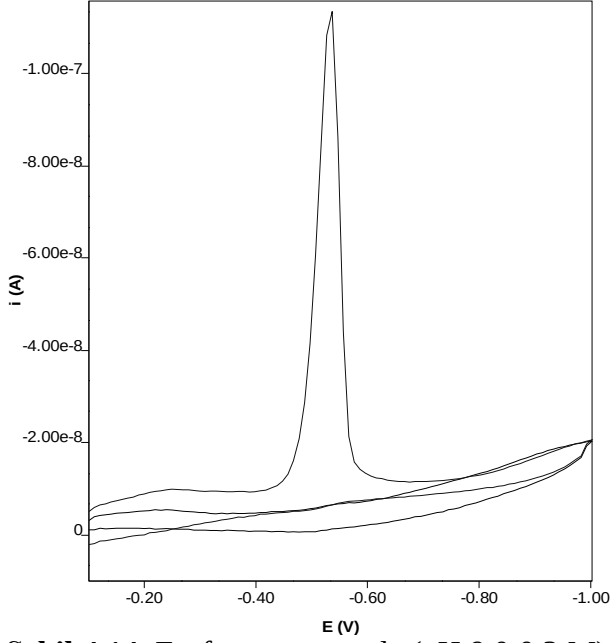
4.1.2. Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

3-NT' nin elektrokimyasal davranışının açıklanması için yapılan incelemelerde dönüşümlü voltametri çalışmalarından faydalanılmıştır. Cıva elektrot ve camsı karbon elektrotta (GCE) yapılan denemelerde pik akım yüksekliği ve pik potansiyeli değerleri kaydedilmiştir.

4.1.2.1. Cıva Elektrotta Yapılan Çalışmalar

Şekil 4.14' de belirlenen koşullarda $3,68 \times 10^{-7}$ M derişiminde 3-NT için elde edilen dönüşümlü voltamogram verilmiştir. Bu voltamogramda yükseltgenme yönünde pik gözlenmeyişi, elektrokimyasal tepkimenin tersinmez olduğunun kanıtıdır.

Bu çalışmada pik akım yüksekliği ve pik potansiyeli değerleri kaydedilmiştir. Literatürde verilen ampirik formüller ile inceleme ve değerlendirme yapabilmek için Çizelge 4.6' da verildiği gibi tarama hızı değerlerinin karekökü ve logaritması, pik akım yüksekliği değerlerinin de logaritmaları alınmıştır.

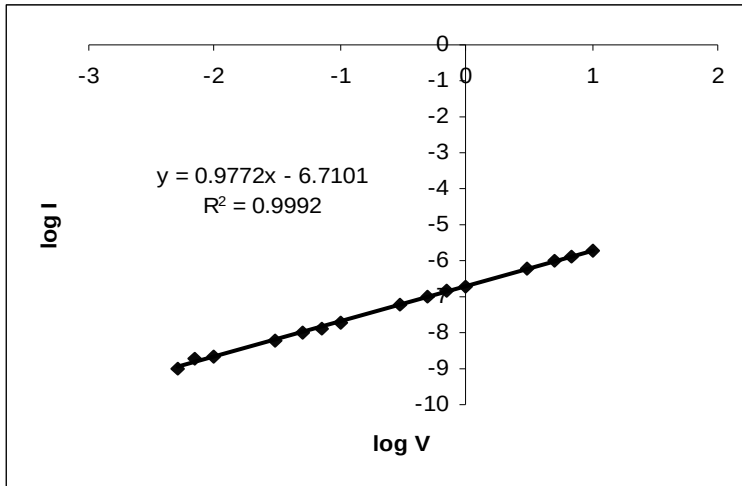


Şekil 4.14. Fosfat tamponunda (pH 9,0 0,3 M) 5 V/s tarama hızında $3,68 \times 10^{-7}$ M 3-NT için elde edilen dönüşümlü voltamogram

Çizelge 4.6. Civa elektrotta $3,68 \times 10^{-7}$ M 3-NT için dönüşümlü voltametri çalışmalarından elde edilen değerler (n=3)

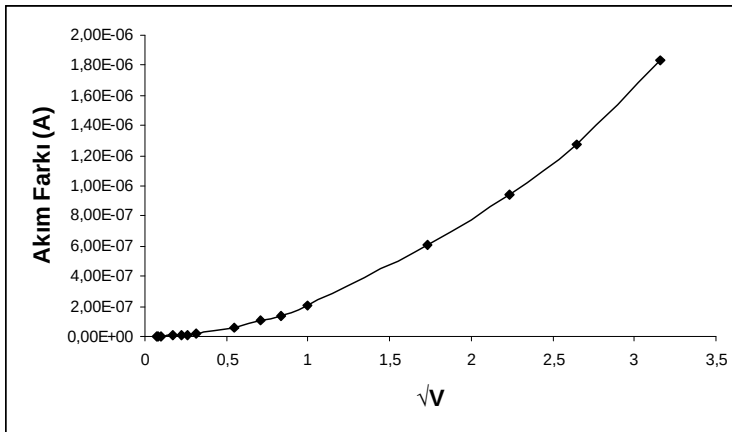
Tarama hızı (V)	$\sqrt{V}$	Log V	Akım farkı I ($A \times 10^8$)	log I	Pik Potansiyeli(V)
0,005	0,0707107	-2,30103	0,105	-8,97881	-0,457
0,007	0,083666	-2,154902	0,186	-8,73049	-0,457
0,01	0,1	-2	0,216	-8,66555	-0,467
0,03	0,1732051	-1,5228787	0,618	-8,20901	-0,487
0,05	0,2236068	-1,30103	0,939	-8,02733	-0,497
0,07	0,2645751	-1,154902	1,35	-7,86967	-0,497
0,1	0,3162278	-1	1,91	-7,71897	-0,507
0,3	0,5477226	-0,5228787	6,03	-7,21968	-0,526
0,5	0,7071068	-0,30103	10,3	-6,98716	-0,536
0,7	0,83666	-0,154902	14,1	-6,85078	-0,536
1	1	0	20,1	-6,6968	-0,546
3	1,7320508	0,47712125	60,7	-6,21681	-0,566
5	2,236068	0,69897	94,4	-6,02503	-0,576
7	2,6457513	0,84509804	127	-5,8962	-0,586
10	3,1622777	1	183	-5,73755	-0,586

Literatüre bakıldığında dönüşümlü voltametri yöntemi ile yapılan çalışmalarda tarama hızının logaritma değerine karşı akım farkının logaritma değerleri grafiğe geçirildiğinde eğimin 0,5 değerinden büyük olması, bileşiğin elektrot yüzeyine adsorblandığını göstermektedir (Bond, 1980). Elde edilen verilerden Şekil 4.15’ deki grafik çizilmiştir ve grafiğe ait eğim değerinin 0,5 değerinden oldukça büyük olduğu (0,977) görülmektedir.



Şekil 4.15. Fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $3,68 \times 10^{-7}$ M 3-NT için tarama hızının logaritmasına karşı akım farkının logaritma değeri grafiği

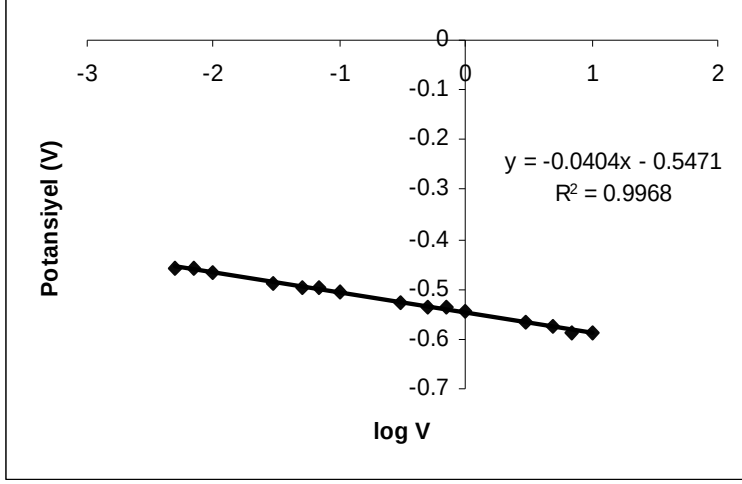
Dönüşümlü voltametri yönteminde, tarama hızının karekökü ve pik akımının değişiminin incelenmesi ile de akım türü ile ilgili gözlem yapılabilir. Bu verilerin doğrusal olarak değişmesi difüzyon kontrollü süreci göstermektedir (Bond, 1980). Bu değişimin izlenmesi için yapılan çalışmada Şekil 4.16' da gösterildiği gibi ilgili verilerin değişiminin doğrusal olmadığı ($R^2=0,946$) görülmüştür. Bu durum akımın adsorpsiyon kontrollü olarak değiştiğini desteklemektedir.



Şekil 4.16. Fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $3,68 \times 10^{-7}$ M 3-NT için tarama hızının kareköküne karşı akım farkı değeri grafiği

Yine literatürde verilen bilgiye göre tarama hızının logaritma değerine karşılık pik potansiyelleri grafiğe geçirildiğinde doğrusal bir ilişki elde ediliyorsa, bu durum adsorpsiyonun bir göstergesidir (Wang ve ark., 1986). Yapılan incelemede dönüşümlü voltamogramlardan alınan veriler Şekil 4.17' de gösterildiği gibi grafik haline getirilmiş

ve verilerin doğrusal olarak değiştiği görülmüştür. Bu durum da sürecin adsorpsiyon kontrollü olduğunu desteklemektedir.

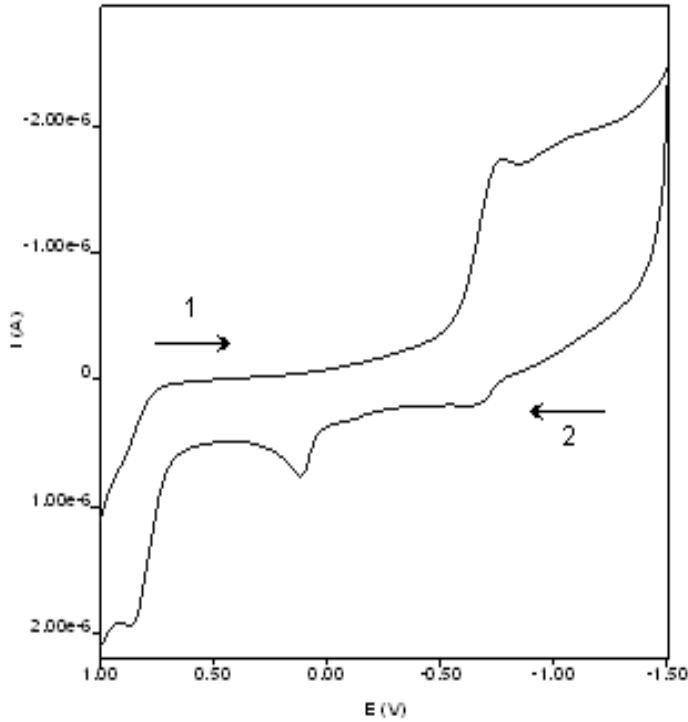


Şekil 4.17. Fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $3,68 \times 10^{-7}$ M 3-NT için tarama hızının logaritmasına karşı potansiyel değeri grafiği

Dönüşümlü voltametri sonuçları ve elde edilen grafikler incelendiğinde; 3-NT' nin cıva elektrot yüzeyinde indirgenmesi ile ilgili akımın adsorpsiyon kontrollü olduğu görülmüştür.

4.1.2.2. Camsı Karbon Elektrotta Yapılan Çalışmalar

GCE' de dönüşümlü voltametri ile yaptığımız çalışmalar sonucunda Şekil 4.18' de görüldüğü gibi indirgeme yönünde -0,756 V' a (Ag/AgCl' e karşı) karşılık gelen bir pik ve ardından uygulanan yükseltgeme yönünde -0,656 V, 0,120 V ve 0,871 V potansiyellerinde üç adet pik gözlenmiştir. Bu piklerden indirgeme yönündeki pik incelenerek akımla ilgili çalışmalar yapılmıştır. Diğer piklerin incelenmemesinin nedeni; piklerin 3-NT' nin indirgenmesinden sonra oluşan maddenin yükseltgenmesi sonucu ortaya çıkmalarıdır.



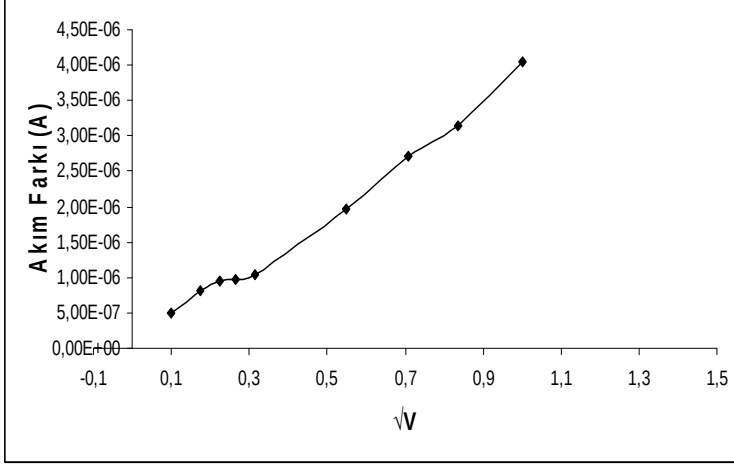
Şekil 4.18. GCE de 0,03 V/s tarama hızında 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunda $1,50 \times 10^{-4}$ M 3-NT için elde edilen dönüşümlü voltamogram 1-ilk uygulanan indirgeme yönü 2-yükseltgeme yönü

Bu çalışmadan elde edilen tarama hızı, tarama hızı değerlerinin karekökleri, tarama hızı değerlerinin logaritmaları, pik akımları, pik akımı değerlerinin logaritmaları ve pik potansiyelleri Çizelge 4.7’ de verilmiştir. Bu verilerin değerlendirilmesi ile akım türü ile ilgili sonuçlara ulaşılmıştır.

Çizelge 4.7. GCE da $1,50 \times 10^{-4}$ M 3-NT için dönüşümlü voltametri çalışmalarından elde edilen değerler (n=3)

Tarama hızı (V)	$\sqrt{V}$	Log V	Akım farkı I ($A \times 10^6$)	log I	Pik Potansiyeli(V)
0,01	0,1	-2	0,497	-6,30364	-0,775
0,03	0,1732051	-1,5228787	0,813	-6,08991	-0,756
0,05	0,2236068	-1,30103	0,951	-6,02182	-0,756
0,07	0,2645751	-1,154902	0,964	-6,01592	-0,756
0,1	0,3162278	-1	1,05	-5,97881	-0,756
0,3	0,5477226	-0,5228787	1,96	-5,70774	-0,756
0,5	0,7071068	-0,30103	2,72	-5,56543	-0,766
0,7	0,83666	-0,154902	3,15	-5,50169	-0,766
1	1	0	4,05	-5,39254	-0,775
3	1,7320508	0,47712125	1,06	-4,97469	-0,815
5	2,236068	0,69897	1,49	-4,82681	-0,845
7	2,6457513	0,84509804	1,89	-4,72354	-0,845
10	3,1622777	1	2,14	-4,66959	-0,885

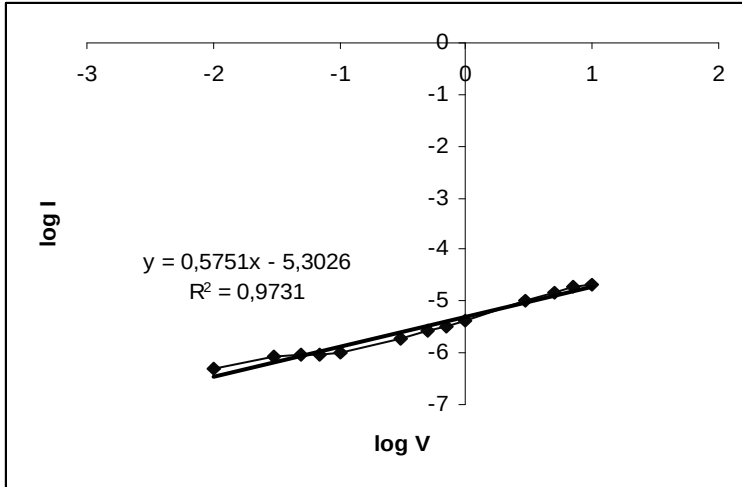
Cıva elektrot için yapılan akım türü belirleme çalışmaları, camı karbon elektrotta elde edilen veriler için de yapılmıştır.



Şekil 4.19. Fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $1,50 \times 10^{-4}$ M 3-NT' in GCE de dönüşümlü voltamogramlarında tarama hızının kareköküne karşı akım farkı değişimi

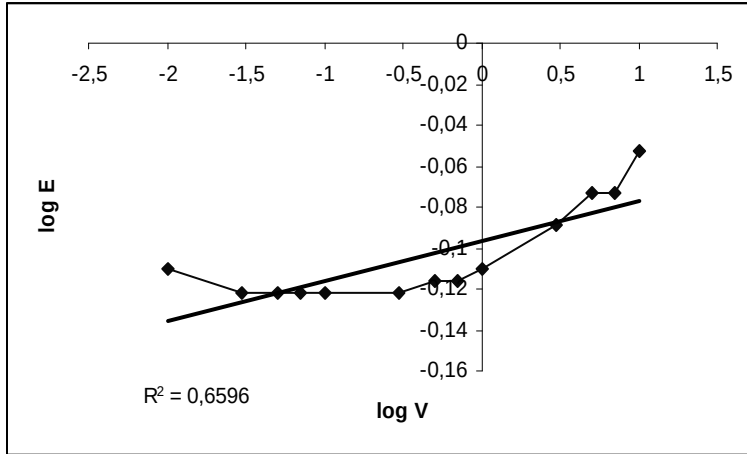
Tarama hızının kareköküne karşı akım değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilen grafiğin doğrusallıktan uzak olduğu ($R^2=0,983$) Şekil 4.19' da görülmektedir. Bu sonuca göre akımın difüzyon kontrollü olduğu söylenememektedir.

Diğer bir bilgi de tarama hızının logaritmasına karşı akım değerlerinin logaritmasının grafiğe geçirilmesinden elde edilmiştir. Düzenlenen grafikte (Şekil 4.20) eğim değeri 0,5751 olarak hesaplanmıştır. Bu değer 0,5 değerinden büyük olduğu için akımın adsorpsiyondan etkilendiği söylenebilir.



Şekil 4.20. Fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $1,50 \times 10^{-4}$ M 3-NT' in GCE' de dönüşümlü voltamogramlarında tarama hızının logaritmasına karşı akım değerlerinin logaritmasının değişimi

Tarama hızının logaritma değerlerine karşılık potansiyel değerlerinin logaritması grafiğe geçirildiğinde, Şekil 4.21’ deki grafik elde edilmiştir. Grafikte regresyon katsayısı $R^2 = 0,6596$ olarak hesaplanmıştır. Bu değer, verilerin birbiri ile ilişkisinin doğrusallıktan oldukça uzak olduğunu göstermektedir. Bu nedenle akımın difüzyon kontrollü olduğu sonucuna varılamamaktadır.

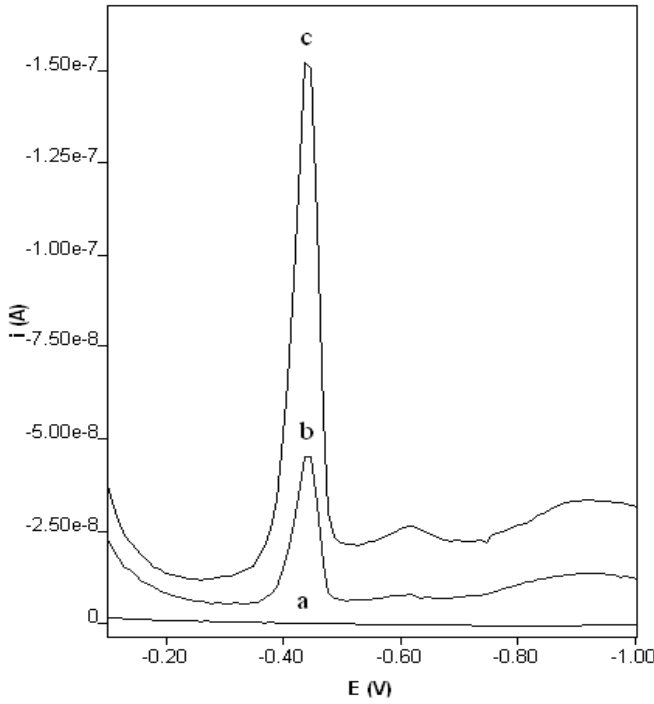


Şekil 4.21. Fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $1,50 \times 10^{-4}$ M 3-NT’ in GCE’ de dönüşümlü voltamogramlarında tarama hızının kareköküne karşı pik potansiyelinin logaritma değerlerinin değişimi

Elde edilen bu sonuçlar, GCE üzerinde de 3-NT’ nin indirgenmesinin adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermektedir.

4.1.3. Adsorptif Sıyırma Voltametrisi Yöntemi

Dönüşümlü voltametri ile yapılan çalışmalar sonucu 3-NT’ nin indirgenmesinin adsorpsiyon kontrollü olduğunun ortaya çıkmasıyla, daha düşük derişimlerde tayine izin veren adsorptif sıyırma yönteminin denenmesine karar verilmiş ve bununla ilgili çalışmalar yapılmıştır. KDV ve adsorptif sıyırma kare dalga voltametrisi (AdSKDV) sonuçlarının bir karşılaştırması Şekil 4.22’ de sunulmuştur.



Şekil 4.22. Fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $6,33 \times 10^{-8}$ M 3-NT için KDV ve AdSKDV ile elde edilen voltamogramların karşılaştırılması a) Destek elektrolit çözeltisi voltamogramı b) $6,33 \times 10^{-8}$ M 3-NT için KDV ile elde edilen voltamogram c) $6,33 \times 10^{-8}$ M 3-NT için AdSKDV ile elde edilen voltamogram

AdSKDV ile daha düşük derişimde daha yüksek yüksek akım farkı değerlerinin elde edilmesi, çalışmaların bu yöneme kaydırılmasına neden olmuştur. AdSKDV için çalışma şartlarının (damla boyutu, karıştırma hızı, biriktirme potansiyeli, biriktirme süresi) incelenmesi gerekmektedir.

4.1.3.1. Damla Boyutu Seçimi

Bölüm 3.2.3.1’ de anlatıldığı gibi farklı cıva damla boyutları seçilmiş ve çalışılmıştır. Bu çalışma için ölçülen akım farkları Çizelge 4.8’ de verilmiştir.

Çizelge 4.8. AdSKDV yöntemi ile fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $2,36 \times 10^{-8}$ M 3-NT için farklı damla boyutları kullanıldığında elde edilen akım farkı değerleri (n=3)

Damla Boyutu	Akım Farkı ($A \times 10^7$)
1	0,72
2	1,11
4	1,46
5	1,62
6	1,82
8	2,11
9	2,36

Çizelge 4.8’ de sunulan veriler grafiğe geçirilmiş ve damla boyutu ile akım farkının değişimi incelenmiştir. Bu değişim Şekil 4.23’ de gösterilmektedir.



Şekil 4.23. AdSKDV yöntemi ile fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $2,36 \times 10^{-8}$ M 3-NT için damla boyutu ile akım farkı değişimi

Şekil 4.23’ de gösterilen değişim incelendiğinde damla boyutu arttıkça akım farkı değerinin de arttığı görülmektedir. Bu durumun sebebi cıva damlasının boyutunun artışıyla, maddenin tutunacağı yüzey alanının artışıdır. Bu nedenle cihazda 9 numara ile gösterilen $0,60 \text{ mm}^2$ yüzey alanına sahip cıva damlası boyutu çalışma için seçilmiştir.

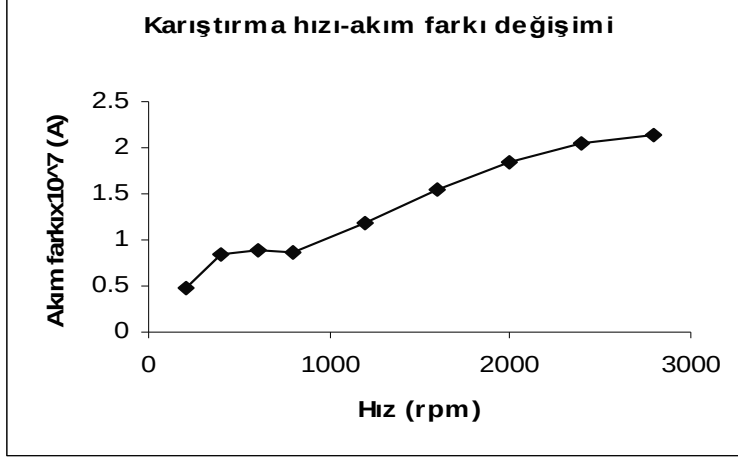
4.1.3.2. Karıştırma Hızı Seçimi

Adsorptif sıyırma voltametrisinde maddenin elektroda ulaşmasını sağlayan fizikokimyasal etkenlerden biri de karıştırma hızıdır. Bu sebepten ötürü karıştırma hızının da belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla farklı karıştırma hızlarında yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9’ da sunulmuştur.

Çizelge 4.9. AdSKDV yöntemi ile fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $2,36 \times 10^{-8}$ M 3-NT için farklı karıştırma hızları kullanıldığında elde edilen akım farkı değerleri (n=3)

Karıştırma Hızı (devir/dk- rpm)	Akım Farkı ($A \times 10^7$)
200	0,473
400	0,841
600	0,895
800	0,873
1200	1,19
1600	1,54
2000	1,84
2400	2,05

Çizelge 4.9’ da sunulan veriler karıştırma hızı ile akım farkının değişimi grafiğe geçirilmiş, Şekil 4.24’ de sunulmuştur.



Şekil 4.24. AdSKDV yöntemi ile fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $2,36 \times 10^{-8}$ M 3-NT için karıştırma hızı ile akım farkı değişimi

Çalışmalarda karıştırma hızı arttıkça daha çok maddenin elektroda ulaşması sebebiyle, daha yüksek akım farkı değerleri elde edilmiştir. Fakat bu durum cıva damlası tarafından kısıtlanmıştır. Belirli büyüklükte seçilmiş olan cıva damlacığı, yüksek karıştırma hızında kılcal ucunda tutunamayıp sürüklenmiştir. Bu nedenle biriktirme yapılamamıştır. Bu durum göz önüne alındığında 1000 rpm karıştırma hızı en uygun değer olarak seçilmiştir.

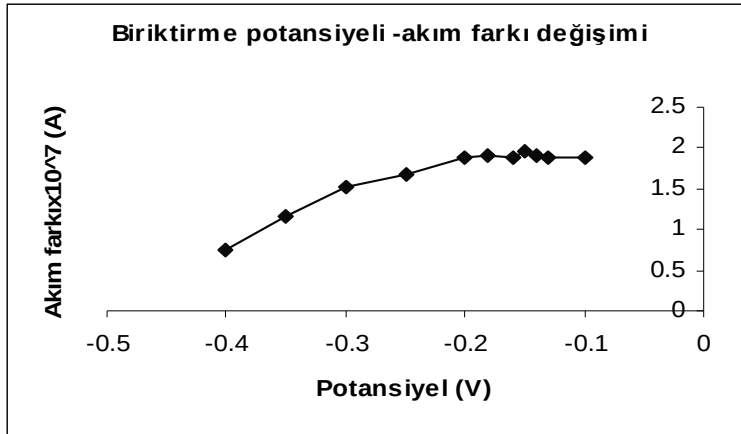
4.1.3.3. Biriktirme Potansiyeli Seçimi

3-NT’ nin kare dalga voltametrisi ile incelenmesi sonucunda -0,487 V (Ag/AgCl(3 M KCl)) potansiyel değerinde bir indirgenme piki gözlenmiştir. Adsorptif sıyırma için 3-NT’ nin indirgenmesine neden olmayan daha pozitif potansiyelde biriktirme yapılarak alınan sonuçlar Çizelge 4.10’ da sunulmuştur.

Çizelge 4.10. AdSKDV yöntemi ile fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $2,36 \times 10^{-8}$ M 3-NT için 1000 rpm karıştırma hızında farklı biriktirme potansiyelleri kullanıldığında elde edilen akım farkı değerleri (n=3)

Biriktirme Potansiyeli (V)	Akım Farkı ($A \times 10^{-7}$)
-0,13	1,89
-0,14	1,92
-0,15	1,96
-0,16	1,87
-0,18	1,90
-0,2	1,84
-0,25	1,67
-0,30	1,51
-0,35	1,15
-0,40	0,75

Çizelge 4.10' da sunulan veriler grafiğe (Şekil 4.25) geçirilmiş biriktirme potansiyeli ile akım farkı değişimi incelenmiştir.



Şekil 4.25. AdSKDV yöntemi ile fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $2,36 \times 10^{-8}$ M 1000 rpm karıştırma hızında biriktirme potansiyeli ile akım farkı değişimi

Veriler incelendiğinde -0,15 V potansiyel değerine kadar akım farkı değerlerinde küçük bir artış gözlenmiştir. Bu potansiyel değerinden daha negatif potansiyellerde ise akım farkı değerlerinin azaldığı görülmektedir. Değerlendirme sonucu -0,15 V potansiyel değerinde biriktirmenin en iyi sonuca ulaşmaya izin verdiği görülmüştür. Sonraki çalışmalar için bu değer seçilmiştir.

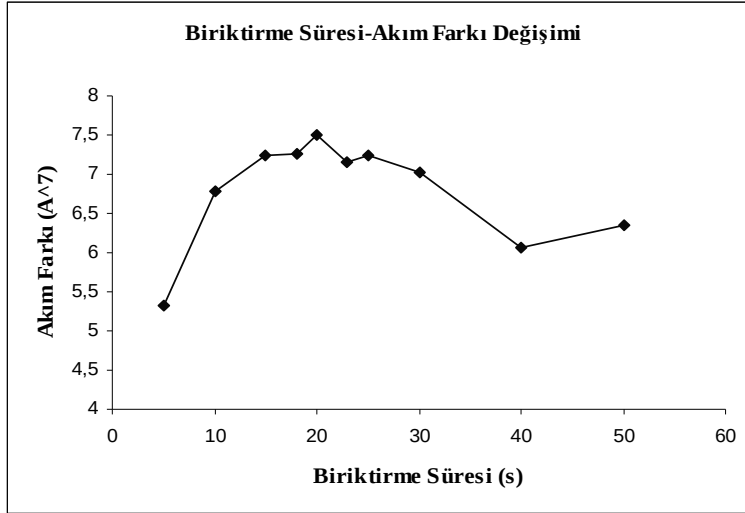
4.1.3.4. Biriktirme Süresi Seçimi

Sıyırma işlemi için uygun potansiyelin seçilmesinin ardından en yüksek akım farkı değerinin gözlemlendiği biriktirme süresi için de denemeler yapılmış alınan sonuçlar Çizelge 4.11' de sunulmuştur.

Çizelge 4.11. AdSKDV yöntemi ile fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $1,59 \times 10^{-8}$ M 3-NT için -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 1000 rpm karıştırma hızında farklı biriktirme süreleri kullanıldığında elde edilen akım farkı değerleri (n=3)

Biriktirme Süresi (s)	Akım Farkı ($A \times 10^{-8}$)
5	5,32
10	6,79
15	7,25
18	7,27
20	7,49
23	7,16
25	7,24
30	7,02
40	6,06
50	6,34

Çizelge 4.11’ de sunulan veriler grafiğe geçirilmiş, biriktirme süresinin akım farkına etkisi incelenmiştir. Değişimi gösteren grafik Şekil 4.26’ da sunulmaktadır.

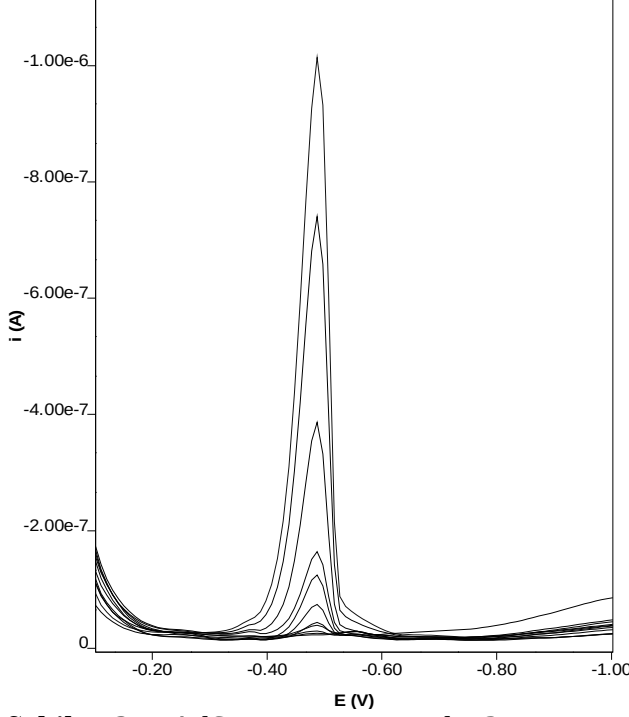


Şekil 4.26. AdSKDV yöntemi ile fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $2,36 \times 10^{-8}$ M 3-NT için -0,15 V biriktirme potansiyelinde 1000 rpm karıştırma hızında biriktirme zamanı ile akım farkı değişimi

Değişim incelendiğinde 20 s’ den düşük biriktirme sürelerinde akım farkı, süre arttıkça artmıştır. 20 s’ den daha büyük biriktirme süresinde ise akım farkı değerlerinin azaldığı gözlenmektedir. Değerlendirmelerden yola çıkılarak 20 s biriktirmenin, en yüksek akım farkı değerini elde etmede yeterli olduğu sonucuna varılmıştır.

4.1.3.5. Adsorptif Sıyırma Voltametrisi ile Elde Edilen Kalibrasyon Eğrisi

Geliştirilen yöntemin hangi derişim aralığında çalıştığı ve ne duyarlıkta cevap verdiğinin belirlenmesi için kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Elde edilen voltamogramlar Şekil 4.27’ de sunulmuştur. Voltamogamlarda ölçülen akım farkı değerleri ve standart sapmaları da Çizelge 4.12’ de sunulmaktadır.



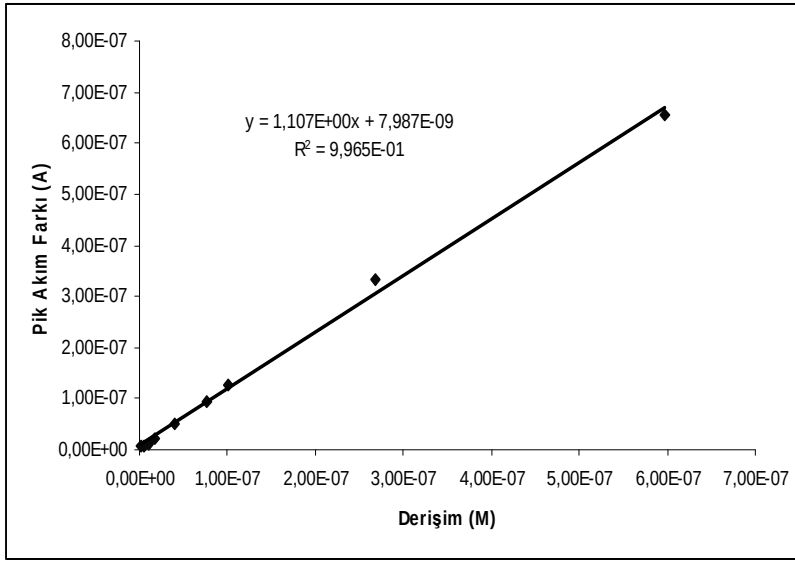
Şekil 4.27. AdSKDV yöntemi ile 3-NT için $2,39 \times 10^{-9}$ - $5,97 \times 10^{-7}$ M derişimleri arasında 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyelinde 20 s biriktirme sonucu elde edilen voltamogramlar

Çizelge 4.12. AdSKDV yöntemi ile 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V potansiyelde 20s biriktirme sonucu 3-NT için elde edilen akım farkı değerleri (n=5)

Derişim (M)	Ortalama Akım Farkı $\pm$ S.S.* (A)	Derişim (M)	Ortalama Akım Farkı $\pm$ S.S.* (A)
0	$4,63 \times 10^{-9} \pm 1,96 \times 10^{-10}$	$3,94 \times 10^{-8}$	$4,98 \times 10^{-8} \pm 9,96 \times 10^{-9}$
$2,39 \times 10^{-9}$	$5,57 \times 10^{-9} \pm 1,39 \times 10^{-9}$	$7,59 \times 10^{-8}$	$9,44 \times 10^{-8} \pm 1,57 \times 10^{-8}$
$4,72 \times 10^{-9}$	$7,90 \times 10^{-9} \pm 1,70 \times 10^{-9}$	$1,00 \times 10^{-7}$	$1,25 \times 10^{-7} \pm 1,99 \times 10^{-8}$
$9,89 \times 10^{-9}$	$1,24 \times 10^{-8} \pm 1,73 \times 10^{-9}$	$2,67 \times 10^{-7}$	$3,35 \times 10^{-7} \pm 4,71 \times 10^{-8}$
$1,80 \times 10^{-8}$	$2,19 \times 10^{-8} \pm 6,26 \times 10^{-9}$	$5,97 \times 10^{-7}$	$6,55 \times 10^{-7} \pm 9,67 \times 10^{-8}$

*Standart sapma değerleri (Beş ölçüm için)

Çizelge 4.12’ deki veriler grafiğe geçirilmiş ve Şekil 4.28’ de gösterilen kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.



Şekil 4.28. AdSKDV yöntemi ile 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V potansiyelde 20 s biriktirme sonucu 3-NT için $2,39 \times 10^{-9}$ - $5,97 \times 10^{-7}$ M derişimleri arasında elde edilen kalibrasyon eğrisi

4.1.3.6. Geri Alınabilirlik Çalışmaları

Bölüm 3.2.3.6' da anlatıldığı gibi yöntem için geri alınabilirlik denemelerinde alınan sonuçlar Çizelge 4.13' de sunulmuştur.

Çizelge 4.13. Fosfat tamponunda (0,30 M pH 9,00) $8,02 \times 10^{-9}$ M 3-NT için 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde geri alınabilirlik deneylerinde bulunan derişim değerleri

Deney	Akım Farkı ($A \times 10^8$)	Bulunması Beklenen Derişim (M $\times 10^9$)	Derişim (M $\times 10^9$)	% Geri Alınabilirlik
R 1	1,63	8,02	7,54	93,92
R 2	1,67	8,02	7,88	98,15
R 3	1,63	8,02	7,55	94,05
R 4	1,68	8,02	7,95	99,02
Ortalama			$7,73 \pm 0,215$	$96,29 \pm 2,32$

Ortalama geri alınabilirlik yüzdesi $\% 96,29 \pm 2,32$ olarak bulunmuştur. Yapılan diğer analizlerde bu değer göz önünde bulundurulmuştur.

4.1.3.7. Yöntemin Sağlamlığı ve Güçlülüğü

Geliştirilen yöntemin sağlamlığı ve güçlülüğü Bölüm 3.2.3.7' de anlatıldığı gibi incelenmiştir. Denemelerden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.14' de sunulmuştur.

Çizelge 4.14. Yöntemin sağlamlığı ve güçlülüğü belirlenmek için yapılan çalışmalarda bulunması gereken değerler ile bulunan değerlerin kıyaslanması

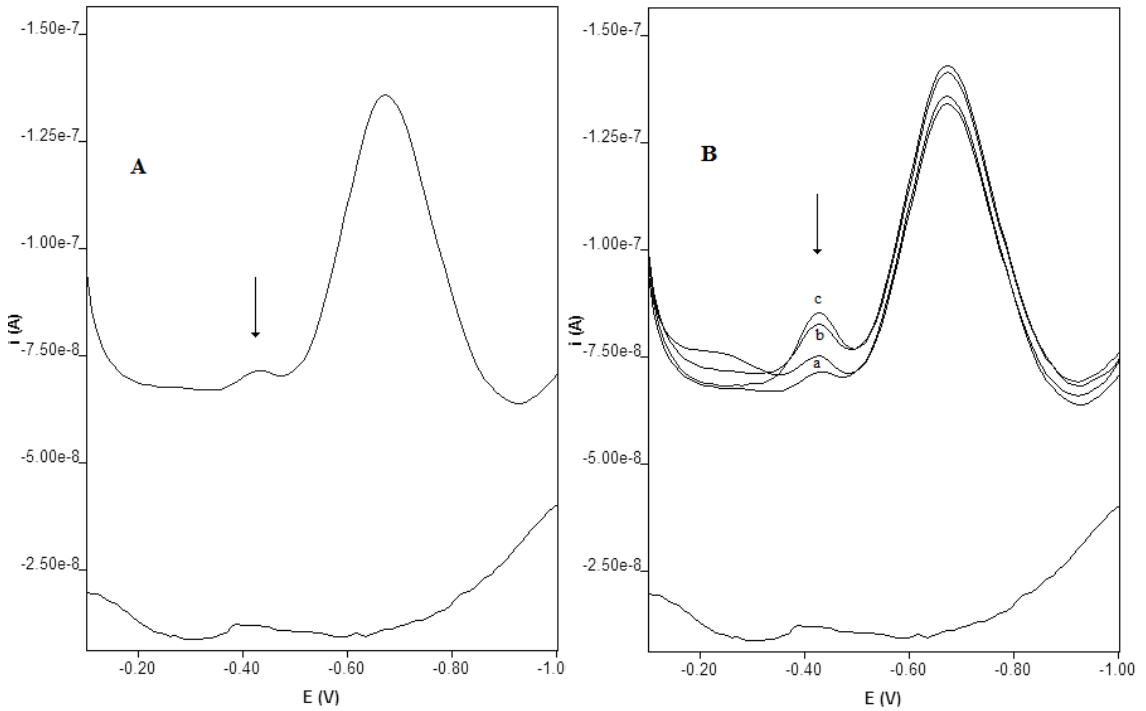
Bulunması Beklenen				
Şartlar	Beklenen Değişim ($M \times 10^9$)	Bulunan Değişim ($M \times 10^9$)	% Geri Alınabilirlik	Değişmeyen Parametreler
Tampon 1 (Fosfat 0,3M)	8,02	$7,73 \pm 0,21$	$96,29 \pm 2,32$	pH 9, Tarama Hızı
Tampon 2 (Britton-Robinson 0,05M)	8,02	$8,58 \pm 0,25$	$106,85 \pm 3,14$	pH 9, Tarama Hızı
pH (9,0)	8,02	$7,73 \pm 0,21$	$96,29 \pm 2,32$	Tampon 1, Biriktirme Süresi (20 s)
pH (8,5)	8,02	$8,19 \pm 0,84$	$101,95 \pm 10,53$	Tampon 1, Biriktirme Süresi (20 s)
Biriktirme Süresi (20 s)	8,02	$7,73 \pm 0,21$	$96,29 \pm 2,32$	Tampon 1, pH 9,0
Biriktirme Süresi (30 s)	8,02	$8,61 \pm 0,31$	$107,26 \pm 3,295$	Tampon 1, pH 9,0
Gün 1	8,02	$7,73 \pm 0,21$	$96,29 \pm 2,32$	Tampon 1, Biriktirme Süresi (20s), pH 9,0
Gün 2	8,02	$7,47 \pm 0,33$	$93,07 \pm 4,10$	Tampon 1, Biriktirme Süresi (20s), pH 9,0

4.1.3.8. Plazmada Analizler

Plazma numunelerinde analiz yapılırken iki farklı uygulama şekli denenmiştir. Öncelikle geliştirilen yöntemin basitliğini, uygulamada kolaylığını koruması için numune doğrudan analiz edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla sadece seyreltme işlemi yapılarak analizler yapılmıştır. Buradan elde edilen sonuçlara göre bir özütleme işlemi araştırılmış ve numunelere uygulanmıştır.

4.1.3.8.a. Doğrudan Plazma Analizleri

Geliştirilen AdsKDV yönteminde plazma numunelerinin sadece seyreltilerek (100 kat seyreltme) analizi yapılmaya çalışılmış elde edilen voltamogram örneği Şekil 4.29' da sunulmuştur.



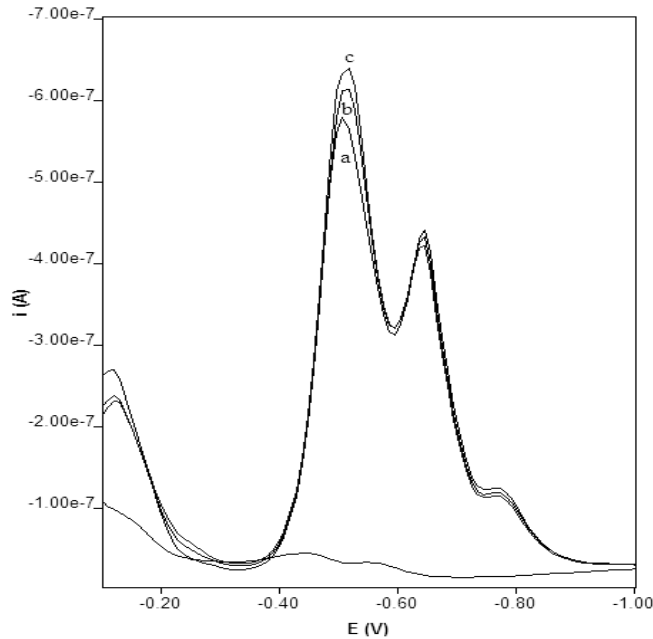
Şekil 4.29. Destek elektrolit olarak 0,30 M pH 9,0 fosfat tamponunun kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde plazma numunelerinin doğrudan AdSKDV yöntemi ile analizi sonucu elde edilen voltamogramlar A) 100 µl Plazma numunesi için elde edilen voltamogram B) A + a: $4,00 \times 10^{-9}$ M b: $7,95 \times 10^{-9}$ M c: $1,18 \times 10^{-8}$ M derişimlerinde standart 3-NT eklenmesi ile elde edilen voltamogramlar

Alınan voltamogramlarda, standart 3-NT ile yapılan çalışmalarda gözlenen -0,497 V' daki pik gözlenmemiştir. Fakat plazma numunesinde Şekil 4.29' da ok ile

gösterilen farklı potansiyelde ve standart madde ilavesi ile yine de artış gösteren benzer bir pik gözlenmiştir. Potansiyelinin uygun olmaması nedeniyle kalitatif analize imkan vermeyen bu pikin ölçülen akım farkı değeri ($2,39 \times 10^{-9}$), doğrusal derişim aralığı sınırlarına dahil olmamaktadır. Plazmada ölçümün yapılabilmesi için numunenin daha da derişik olması gerekmektedir. Bu nedenle geliştirilen voltametrik yöntemde biyolojik sıvıda doğrudan analiz mümkün olmamaktadır. Biyolojik sıvıda analizlerin başarılabilmesi için bir özütleme yönteminin kullanılması gerekmektedir.

4.1.3.8.b. Özütleme İşlemi Yapılmış Plazma Analizleri

Standart 3-NT' de, eklenmiş plazma numunelerinde ve plazma numunelerinde Bölüm 3.2.3.8.b' de anlatılan işlemler uygulanmış, analizler sonucu elde edilen veriler Çizelge 4.15, Çizelge 4.16 ve Çizelge 4.17' de verilmiştir. Plazma numunelerinde gözlenen pikin 3-NT' e ait olup olmadığının anlaşılabilmesi için Şekil 4.30' da gösterildiği gibi pik potansiyelinden ve standart madde ilavesi ile pik yüksekliğinin artışından faydalanılmıştır.



Şekil 4.30. Plazma numunesinde özütleme işlemi yapıldıktan sonra 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde AdSKDV yöntemi ile elde edilen voltamogramlar a) Plazma numunesi b) a+ $4,0 \times 10^{-7}$ M 3-NT c) a+ $7,91 \times 10^{-7}$ M 3-NT

Standart 3-NT' nin hidrolizleme işleminin ardından hidrolizat seyreltilerek analiz edilmiş, alınan voltamogramlarda akım farkı değerleri okunduktan sonra AdSKDV için oluşturulan kalibrasyon eğrisi denkleminde faydalanılarak voltametrik hücredeki 3-NT miktarı bulunmuştur.

Çizelge 4.15. AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde standart 3-NT için elde edilen değerler

Numune	Akım ($A \times 10^7$)	Farkı	Bulunması Gerekten Miktar ($gx10^2$)	Bulunan Miktar ($gx10^3$)	%Geri Alım
NT-1	1,16		1,02	4,43	43,43
NT-2	1,89		1,06	7,80	73,58
NT-3	1,27		1,05	4,91	46,76
Ortalama					$54,59 \pm 16,53$

Standart madde ile yapılan denemeler sonucu hidrolizlenmiş 3-NT için geri alınabilirlik yüzdesi $54,59 \pm 16,53$ olarak belirlenmiştir. Bu aşamadan sonra plazma numunelerinde 3-NT için geri alınabilirlik deneyleri yapılmış, standart madde deneylerinde hesaplanan bu değer, plazmadaki analizlerde madde miktarını hesaplamak için kullanılmıştır. Plazma numunelerinden alınan 3,0 mL' lik kısma Çizelge 3.5' de verilen miktarlarda standart maddeden ilave edilmiştir. Eklenmiş plazma için elde edilen toplam 3-NT miktarından, plazmada bulunan 3-NT miktarı çıkarılmış, eklenen standart madde miktarına göre geri alınabilirlik yüzdesi hesaplanmıştır.

Çizelge 4.16. AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde eklenmiş plazmada 3-NT için elde edilen değerler

Numune	Akım Farkı ($A \times 10^8$)	Plazma İçin Hesaplanan Toplam Derişim ($gx10^4$)	Eklenen 3- NT Miktarı ($gx10^2$)	Eklenmiş Plazmada Bulunan Miktar ($gx10^3$)	Plazmada 3-NT İçin % Geri Alım
SP1	9,69	2,14	1,30	9,89	256,15
SP2	1,09	1,96	1,32	11,30	286,36
SP3	8,73	2,19	1,33	8,78	222,56
Ortalama					$255,02 \pm 31,91$

Burada hesaplanan geri alınabilirlik yüzde değeri ($255,02 \pm 31,91$) oldukça büyük bir değer olmasına rağmen şaşırtıcı değildir. Bunun sebebi literatürde de bildirildiği gibi (Duncan, 2003) 3-NT' in analizi sırasında biyolojik sıvılarda kullanılan

özütleme işlemlerinde, yapay olarak 3-NT' in oluşabilmesidir. Bu aşamadan sonra plazma ve BOS numunelerinde analiz yapılırken burada hesaplanmış olan bu değer göz önünde bulundurulmuş ve 3-NT miktarları bu değere göre hesaplanmıştır. Hesaplamalara ayrıntılı bir örnek EK 1' de sunulmuştur.

Plazma hidolizatlarının analizinde, kullanılan protein miktarlarından yola çıkılarak plazmada bulunan 3-NT derişimine geçilmiştir. Bunun için de plazmadaki protein derişiminden faydalanılmıştır. Plazmadaki protein derişimi 7 g/100 mL olarak verilmektedir (<http://www.bibilgi.com/PLAZMA>). Kullanılan protein miktarında belirlenen 3-NT miktarı, plazma proteinleri derişimi ile oranlanmış ve plazmada bulunan 3-NT miktarına geçilmiştir. Hesaplamalarda plazma için elde edilen geri alınabilirlik değerinden de faydalanılmıştır.

Çizelge 4.17. AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 devir/dk karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde plazma numuneleri için elde edilen değerler

Numune	Hidroliattaki 3-NT Derişimi ($M \times 10^{-4}$)	Hesaplanan Derişim* ($M \times 10^{-4}$)	Kullanılan Protein Miktarı (g)	Proteinde Hesaplanan 3-NT Miktarı ($gx10^{-5}$)	Plazmadaki 3-NT Derişimi ($gx10^{-4}/mL$)	Plazmadaki Ortalama 3-NT Derişimi($gx10^{-4}/mL$)
P1	4,31	1,69	0,0229	7,65	2,34	2,78 $\pm$ 0,34
	5,53	2,17	0,0223	9,82	3,08	
	6,26	2,45	0,0286	11,08	2,71	
	5,60	2,20	0,0231	9,95	3,00	
P2	3,74	1,47	0,0250	6,65	1,86	2,02 $\pm$ 0,19
	5,18	2,03	0,0280	9,18	2,30	
	4,54	1,78	0,0290	8,05	1,94	
	3,70	1,45	0,0230	6,56	1,99	
	7,40	2,90	0,0221	13,12	4,16	
P3	8,64	3,39	0,0230	15,33	4,67	4,38 $\pm$ 0,22
	7,93	3,11	0,0231	14,07	4,27	
	8,88	3,48	0,0249	15,74	4,42	

* Geri Alınabilirlik değeri kullanılarak hesaplanan 3-NT derişimi

Çizelge 4.17. (DEVAMI) AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 devir/dk karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde plazma numuneleri için elde edilen değerler

Numune	Hidroliizattaki 3-NT Derişimi (Mx10 ⁴)	Hesaplanan Derişim* (Mx10 ⁴)	Kullanılan Protein Miktarı (g)	Proteinde Hesaplanan 3-NT Miktarı (gx10 ⁵)	Plazmadaki 3-NT Derişimi (gx10 ⁴ /mL)	Plazmadaki Ortalama 3-NT Derişimi (gx10 ⁴ /mL)
P4	8,50	3,33	0,1150	75,32	4,58	4,38 ± 0,17
	8,00	3,14	0,1150	71,02	4,32	
	7,60	2,98	0,1110	67,40	4,25	
P5	9,40	3,69	0,1305	83,46	4,48	5,38 ± 0,94
	13,30	5,22	0,1300	118,07	6,36	
	11,80	4,63	0,1380	104,73	5,31	
P6	11,90	4,67	0,1325	105,63	5,58	5,91 ± 0,28
	13,10	5,14	0,1350	116,26	6,03	
	13,40	5,25	0,1360	118,75	6,11	

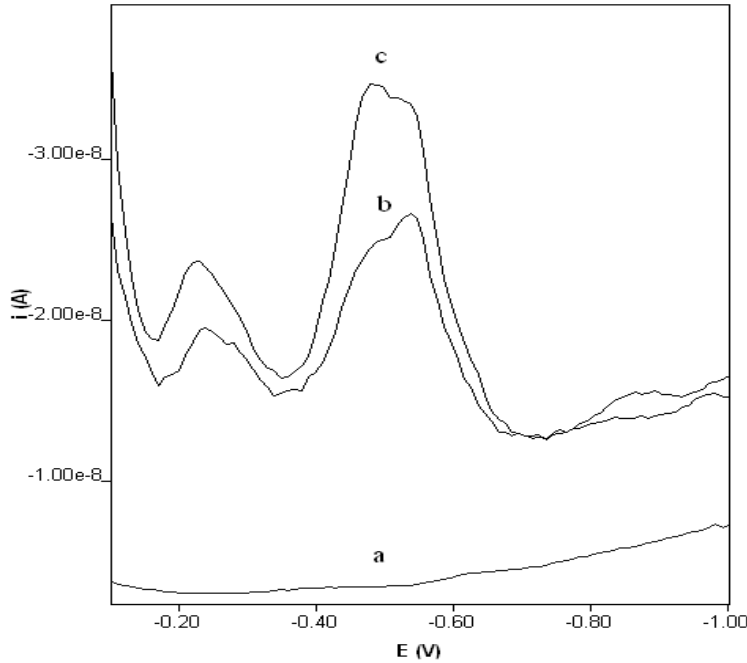
* Geri Alınabilirlik değeri kullanılarak hesaplanan 3-NT derişimi

4.1.3.9. Beyin Omurilik Sıvısında (BOS) Analizler

3-NT' in biyoışaretleyici özellikte olduğundan ve bazı hastalıkların göstergesi olabileceğinden Bölüm 1' de bahsedilmiştir. Bu hastalıkların birçoğu sinir sistemini etkileyen hastalıklar olduğu için 3-NT öncelikle, sinir sistemini barındıran biyolojik sıvılarda aranmalıdır. Bu hususta akla ilk gelen, nörolojik hastalıkların tespitinde de kullanılan beyin omurilik sıvısıdır. Geliştirilen AdSKDV yönteminde bu numunelerde de analizler yapılmıştır. Öncelikle plazma numunelerinde olduğu gibi yöntemin kolay uygulanabilir niteliğini korumak için doğrudan BOS analizleri yapılmıştır.

4.1.3.9.a. Doğrudan BOS Analizleri

Doğrudan BOS numunelerinin voltametrik hücrede analizi yapılmış, elde edilen voltamogramlara bir örnek Şekil 4.31' de sunulmuştur.

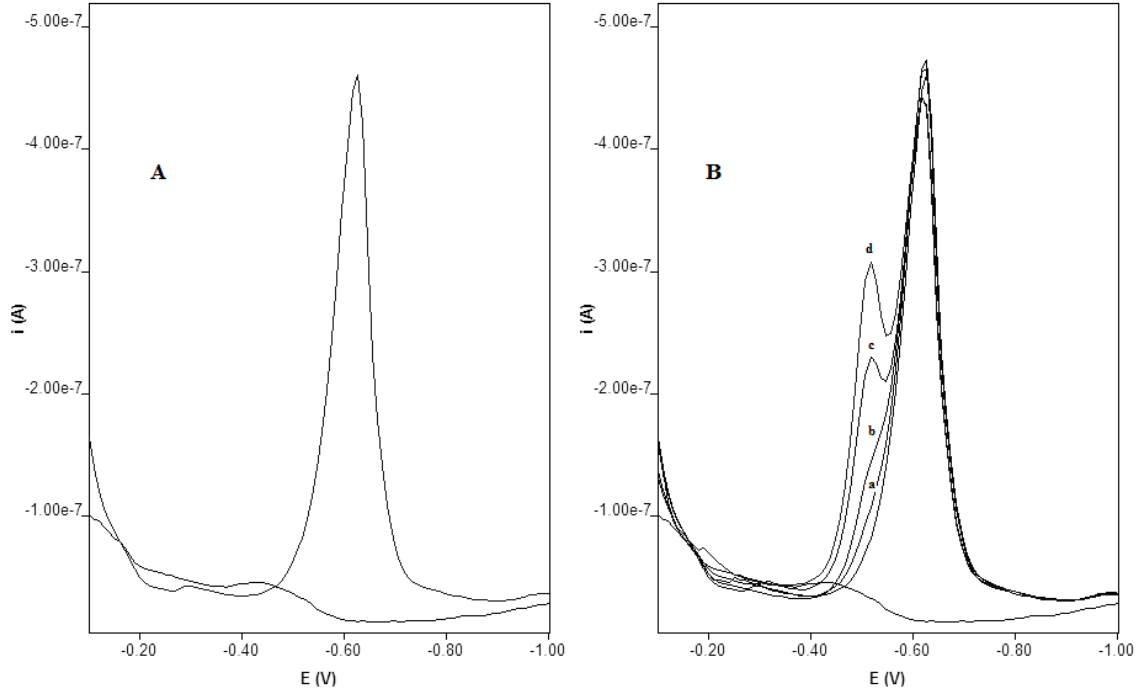


Şekil 4.31. AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde BOS numunelerinin doğrudan adsorptif sıyırma yöntemi ile analizi sonucu elde edilen voltamogramlar a) Destek elektrolit çözeltisi b) 50 µl BOS numunesi c)100 µl BOS numunesi

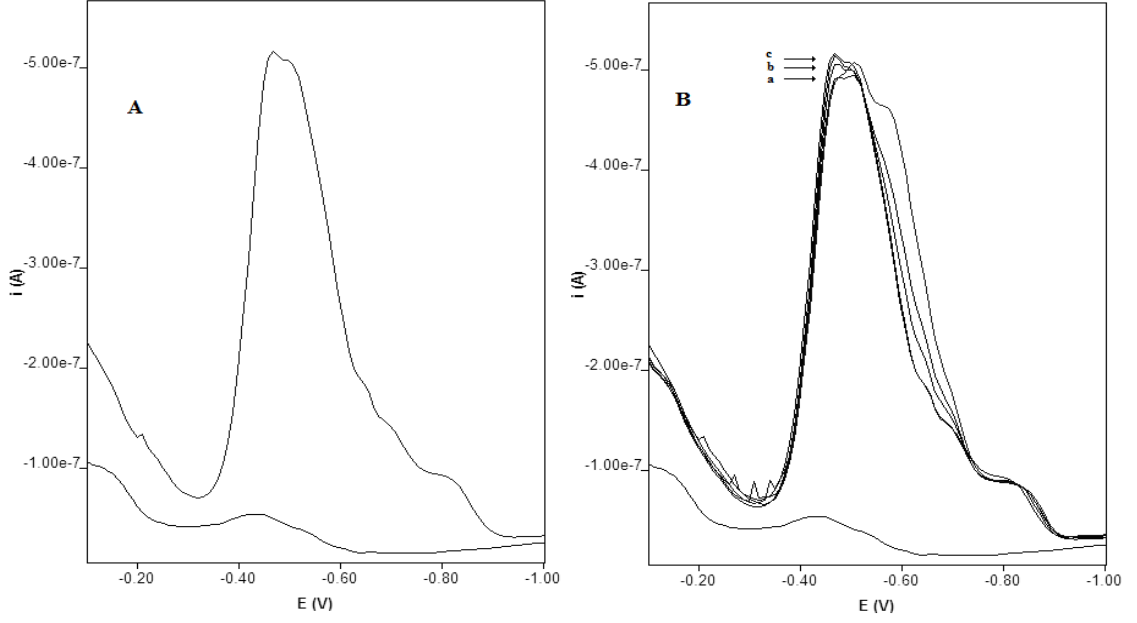
Plazma numuneleri için doğrudan analiz denemelerinde sonuca gidilemediğinden, BOS numuneleri için de benzer uygulama yapılmıştır. Ayrıca BOS numunelerinde analizler yapılırken, plazma numuneleri için belirlenen geri alınabilirlik yüzde değerleri kullanılacağından özütleme işleminin uygulanması gerekmektedir.

4.1.3.9.b. Özütleme İşlemi Yapılmış BOS Analizleri

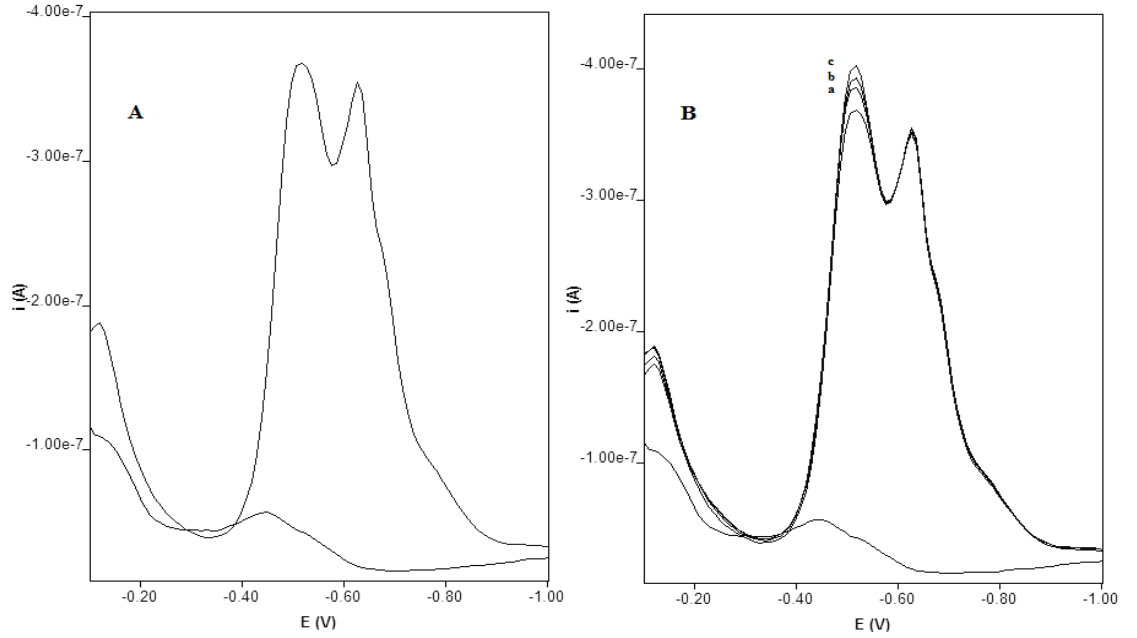
Özütleme işlemi yapılan BOS numuneleri için yapılan analizlerde elde edilen hidrolizat doğrudan analiz edilmiştir. BOS numuneleri için 6 ve 7 nolu numunelerde, çöktürme işlemi sonucunda yeteri kadar çökelek elde edilemediği için ölçüm alınamamıştır. Analiz edilebilen her bir BOS numunesi için alınan voltamogramlar Şekil 4.32 – Şekil 4.38’ de, analiz sonuçları Çizelge 4.18’ de sunulmuştur.



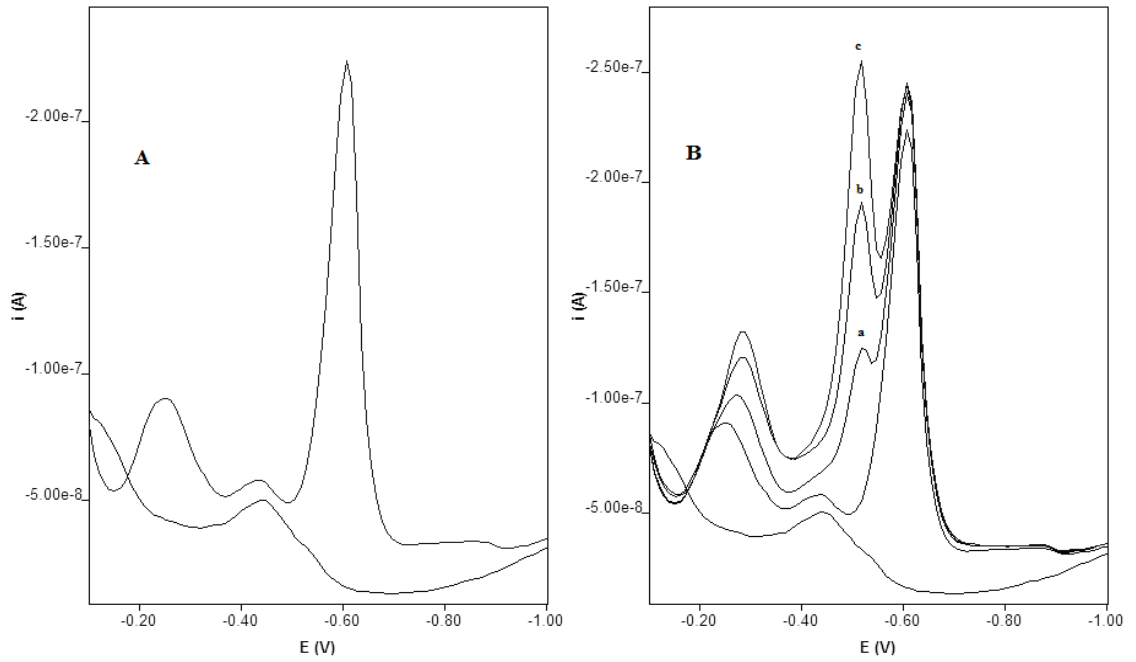
Şekil 4.32. BOS1 hidrolizatı için AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde elde edilen voltamogram A) BOS1 hidrolizatı voltamogramı B) BOS1 hidrolizatı üzerine a: $1,00 \times 10^{-7}$ b: $3,00 \times 10^{-7}$ c: $6,85 \times 10^{-7}$ d: $1,15 \times 10^{-6}$ M derişimlerinde standart 3-NT eklenmesi ile elde edilen voltamogramlar



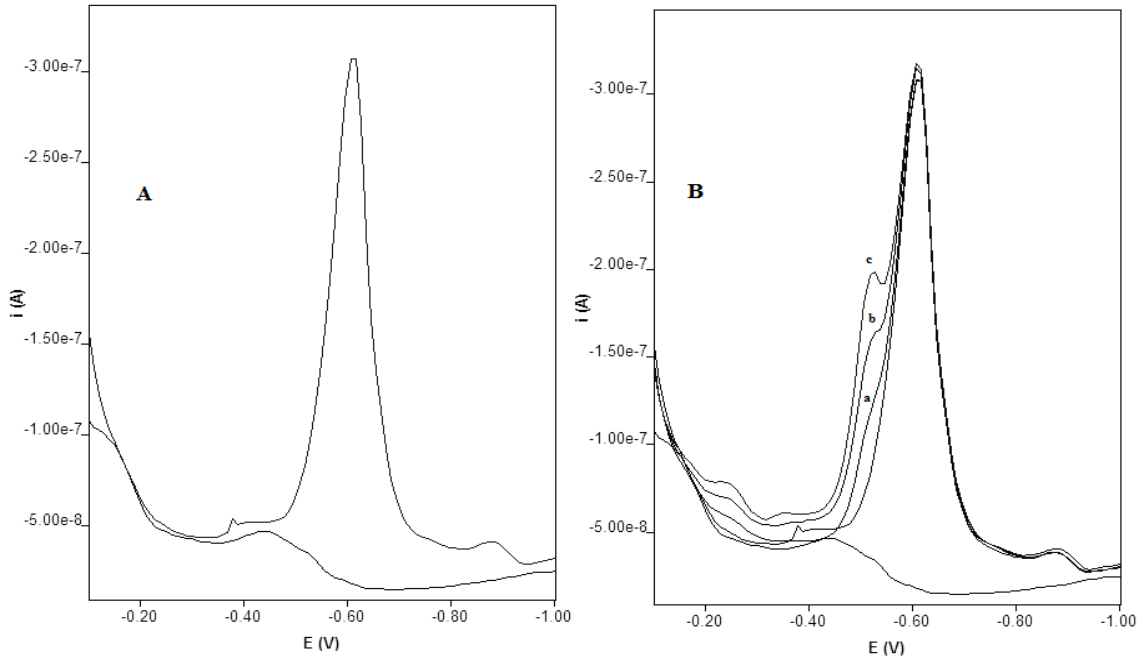
Şekil 4.33. BOS2 hidrolizati için AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde elde edilen voltamogram A) BOS2 hidrolizati voltamogramı B) BOS2 hidrolizati üzerine a: $2,02 \times 10^{-6}$ b: $4,01 \times 10^{-6}$ c: $7,95 \times 10^{-6}$ M derişimlerinde standart 3-NT eklenmesi ile elde edilen voltamogramlar



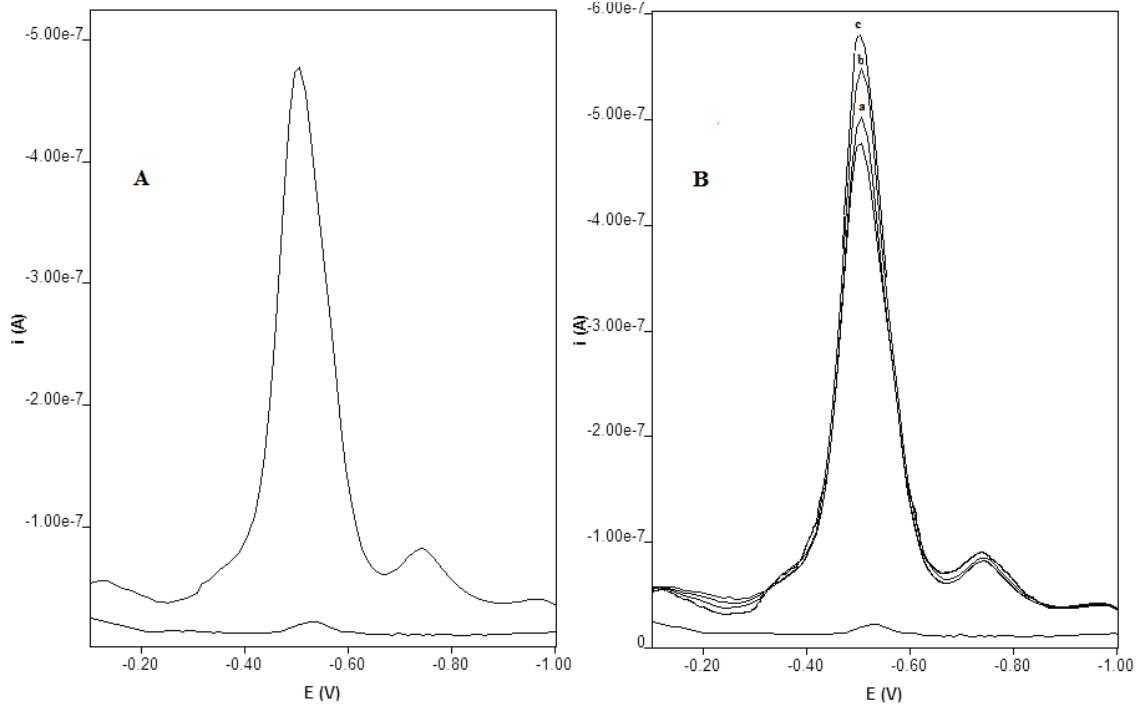
Şekil 4.34. BOS3 hidrolizati için AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde elde edilen voltamogram A) BOS3 hidrolizati voltamogramı B) BOS3 hidrolizati üzerine a: $2,02 \times 10^{-6}$ b: $4,01 \times 10^{-6}$ c: $7,95 \times 10^{-6}$ M derişimlerinde standart 3-NT eklenmesi ile elde edilen voltamogramlar



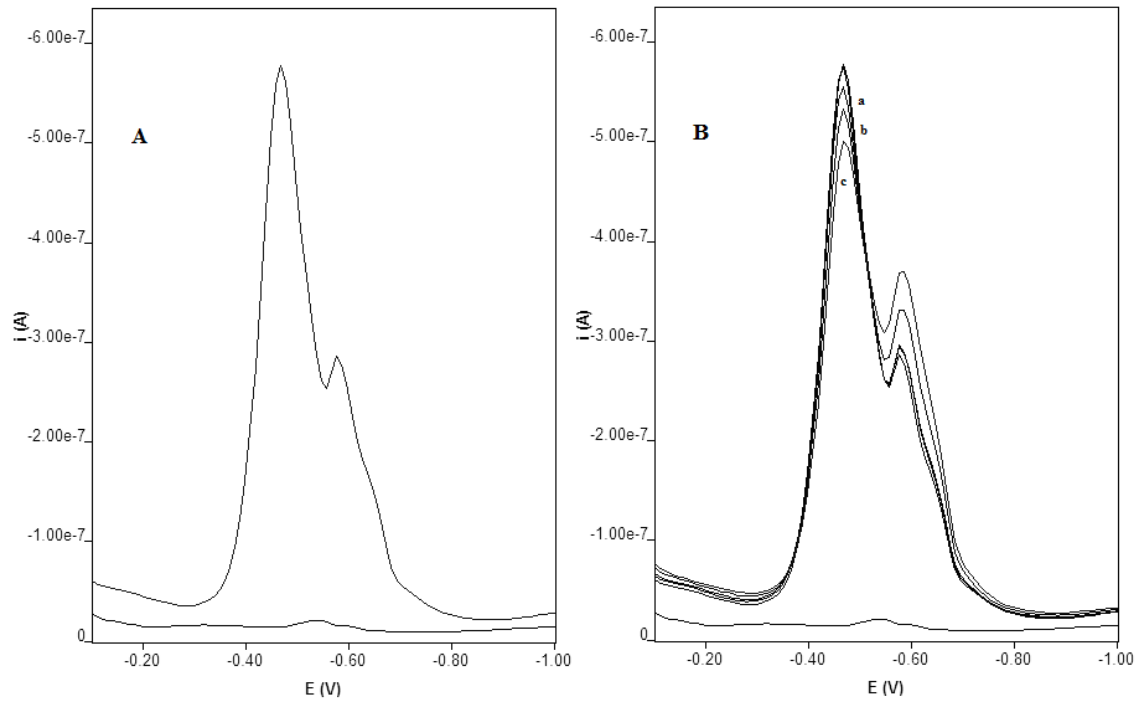
Şekil 4.35. BOS4 hidrolizatu için AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde elde edilen voltamogram A) BOS4 hidrolizatu voltamogamı B) BOS4 hidrolizatu üzerine a: $2,02 \times 10^{-6}$ b: $4,01 \times 10^{-6}$ c: $7,95 \times 10^{-6}$ M derişimlerinde standart 3-NT eklenmesi ile elde edilen voltamogramlar



Şekil 4.36. BOS5 hidrolizatu için AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde elde edilen voltamogram A) BOS5 hidrolizatu voltamogamı B) BOS5 hidrolizatu üzerine a: $2,02 \times 10^{-6}$ b: $4,01 \times 10^{-6}$ c: $7,95 \times 10^{-6}$ M derişimlerinde standart 3-NT eklenmesi ile elde edilen voltamogramlar



Şekil 4.37. BOS8 hidrolizati için AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde elde edilen voltamogram A) BOS8 hidrolizati voltamogamı B) BOS8 hidrolizati üzerine a: $2,02 \times 10^{-6}$ b: $4,01 \times 10^{-6}$ c: $7,95 \times 10^{-6}$ M derişimlerinde standart 3-NT eklenmesi ile elde edilen voltamogramlar



Şekil 4.38. BOS9 hidrolizati için AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde elde edilen voltamogram A) BOS9 hidrolizati voltamogamı B) BOS9 hidrolizati üzerine a: $2,02 \times 10^{-6}$ b: $4,01 \times 10^{-6}$ c: $7,95 \times 10^{-6}$ M derişimlerinde standart 3-NT eklenmesi ile elde edilen voltamogramlar

Elde edilen voltamogramlarda 3-NT varlığı yalnızca 2, 3 ve 8 numaralı BOS numunelerinde gözlenmiştir. Gözlenen bu pikler için pik potansiyeli ve derişim artışı ile cevapta artış standart 3-NT çözeltisi ($4,05 \times 10^{-5}$ M) eklenerek 3-NT'e ait olduğu teyit edilmiştir. Bölüm 3.2.3.9.b' de belirtildiği gibi numune içerisindeki 3-NT miktarları hesaplanırken, eklenmiş plazma numuneleri için hesaplanan geri alınabilirlik yüzdesinden faydalanılmıştır. Özütleme işlemi uygulanmış BOS numunelerinde 3-NT miktarı hesaplandıktan sonra sonuçlar aralık içerisinde verilmiştir. Bunun nedeni ise BOS içerisinde bulunan protein miktarının belirli bir değerde değil bir aralık içerisinde verilmesidir. BOS' ta protein % 15-45 mg kadardır (www.mustafaaltinisik.org.uk/56-shmyo-14.ppt). Bu aralık değerlerine göre hesaplama yapıldığı için BOS' daki 3-NT değeri derişim aralığı olarak verilmiştir.

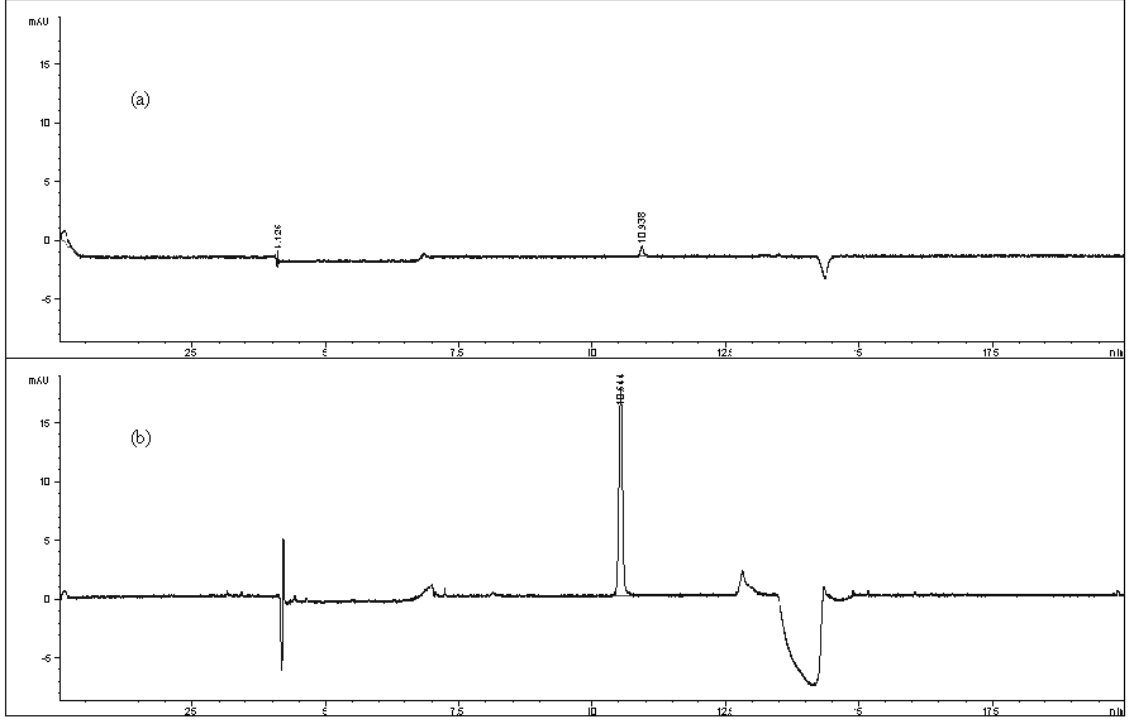
Çizelge 4.18. AdSKDV yönteminde 0,3 M pH 9,0 fosfat tamponunun destek elektrolit olarak kullanıldığı ortamda 1000 rpm karıştırma hızında -0,15 V biriktirme potansiyeli ve 20 s biriktirme süresinde BOS numuneleri için elde edilen değerler (n=5)

Numune	Akım ($A \times 10^7$)	Farkı	Hidrolizatta Bulunan Derişim Değeri (M)	Hesaplanan Derişim Değeri (M)	BOS' daki 3-NT Derişimi ($gx10^5/100mL$)
BOS1	Gözlenemedi	-	-	-	-
BOS2	$4,57 \pm 0,05$	$1,74 \times 10^{-4}$	$9,50 \times 10^{-5}$	$1,63- 4,88$	
BOS3	$3,30 \pm 0,02$	$1,25 \times 10^{-4}$	$6,82 \times 10^{-5}$	$1,05 -3,15$	
BOS4	Gözlenemedi	-	-	-	-
BOS5	Gözlenemedi	-	-	-	-
BOS6	Analiz Edilemedi	-	-	-	-
BOS7	Analiz Edilemedi	-	-	-	-
BOS8	$4,26 \pm 0,02$	$1,62 \times 10^{-4}$	$8,84 \times 10^{-5}$	$1,44- 4,32$	
BOS9	Gözlenemedi	-	-	-	-

4.2. Kapiler Elektroforetik Çalışmalarda Yöntem Geliştirme

Kapiler elektroforez ile yapılan çalışmalarda büyük hacimli örnek sıkıştırma (BHÖS) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin kullanılmasının nedeni, klasik kapiler elektroforez yöntemlerine göre daha düşük derişimleri tayin edebilme yeteneğidir. Literatür araştırmalarında karşılaşılan CTAB ile büyük hacimli örnek sıkıştırma

yöntemi öncü çalışma olarak değerlendirilmiş (Maeso ve ark., 2004), buradaki deneysel şartlardan yola çıkılarak ön denemeler yapılmıştır. Şekil 4.39’ da klasik yöntemle ve sıkıştırma yöntemi ile yapılan denemelerde elde edilen elektroforegramlara örnek verilmiştir. Kullanılan cihazda uygulanabilecek en yüksek basınç değeri 50 mbar değeridir. Bu nedenle sıkıştırma işlemlerinde bu basınç değeri kullanılmıştır.



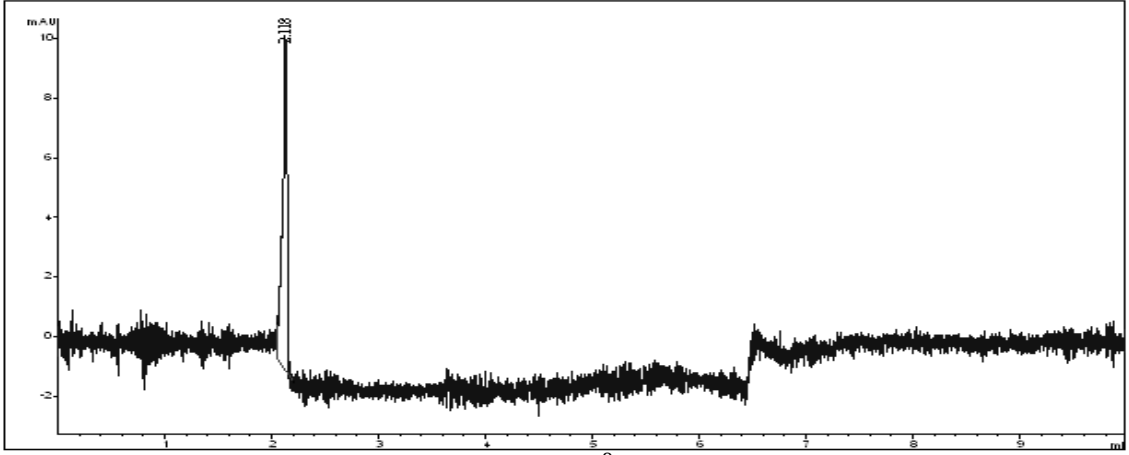
Şekil 4.39. Klasik kapiler elektroforez ve BHÖS yönteminin basit bir karşılaştırması; $4,052 \times 10^{-5}$ M 3-Nitrotirozin için 0,5 mM CTAB içeren 0,15 M pH 7 fosfat tamponunda 25°C ve -15 kV ayırma potansiyelinde (a) Klasik kapiler elektroforez (b) BHÖS-CE yönteminde elde edilen elektroforegramlar

BHÖS yöntemi denenirken klasik kapiler elektroforezdeki uygulamanın aksine EOF değiştirici kullanılır. Sıkıştırma tekniği denenirken EOF baskılayıcı CTAB ve EOF değiştirici DETA kullanılarak iki farklı yöntem geliştirilmiştir.

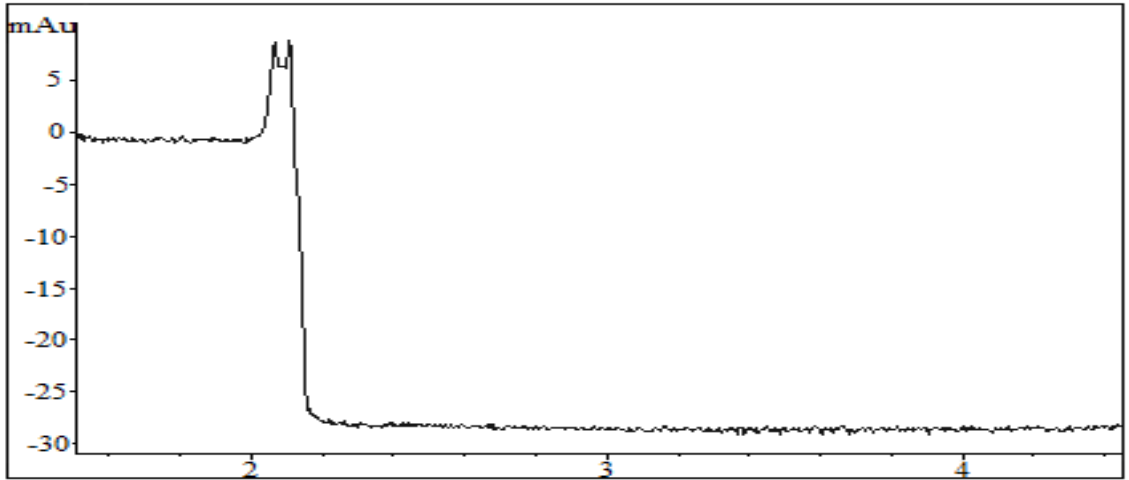
4.2.1. Setiltrimetilamonyumbromür (CTAB) Kullanılan Çalışmalar

4.2.1.1. Mor Ötesi Spektrum Çalışmaları

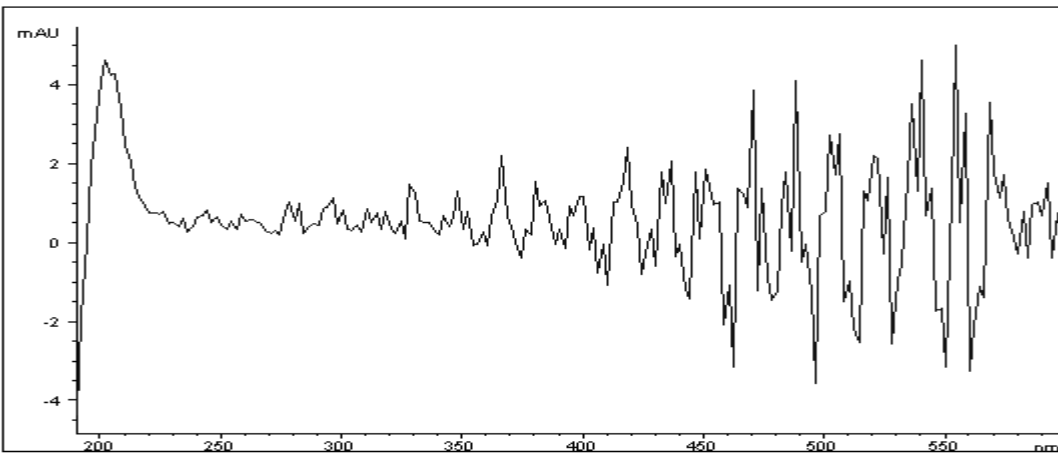
Çalışılacak dalga boyunu belirlemek için yapılan denemelerde 3-NT’ nin spektrumunda düşük dalga boyunda cevap verdiği gözlenmiştir. Seçilen iki farklı dalga boyunda elektroforegramlar alınmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır.



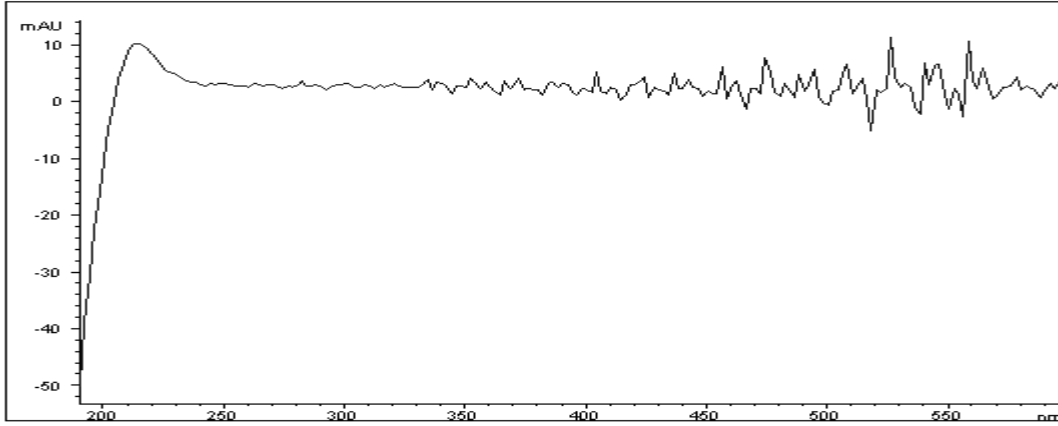
Şekil 4.40. Standart 3-NT çözeltisi ($2,027 \times 10^{-8}$ M) için 214,40 nm dalga boyunda elde edilen elektroforegram



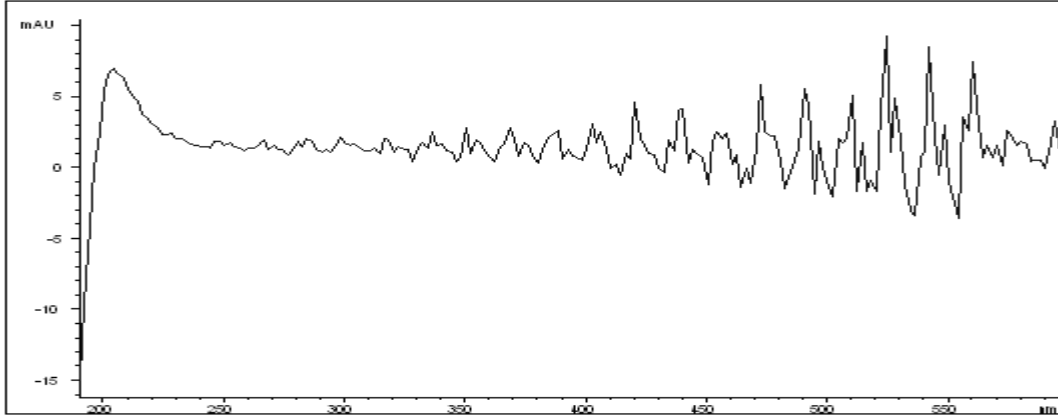
Şekil 4.41. Standart 3-NT çözeltisi ($2,027 \times 10^{-8}$ M) için 208,50 nm dalga boyunda elde edilen elektroforegram



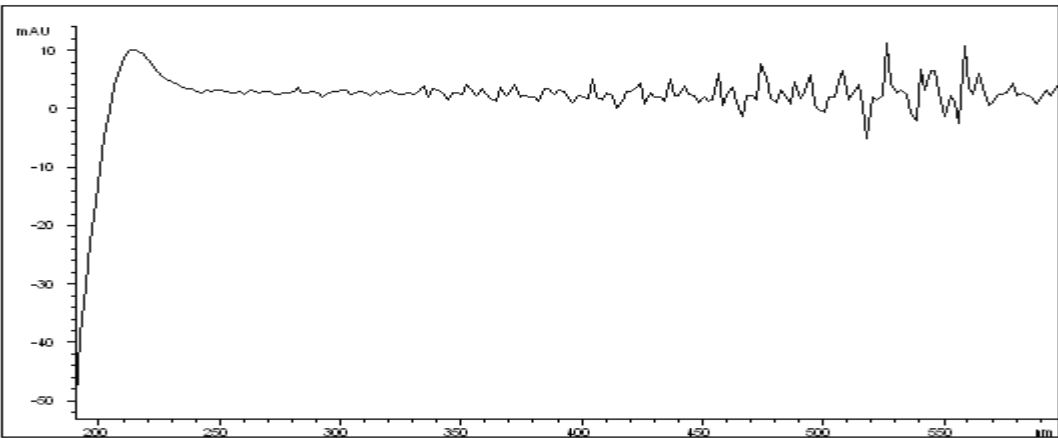
Şekil 4.42. Standart 3-NT çözeltisi ($2,027 \times 10^{-8}$ M) için 214,40 nm dalga boyunda elde edilen elektroforegramda 2,070. dk daki spektrum



Şekil 4.43. Standart 3-NT çözeltisi ($2,027 \times 10^{-8}$ M) için 214,40 nm dalga boyunda elde edilen elektroforegramda 2,140. dk daki spektrum



Şekil 4.44. Standart 3-NT çözeltisi ($2,027 \times 10^{-8}$ M) için 208,50 nm dalga boyunda elde edilen elektroforegramda 1. pik için gösterilen spektrum

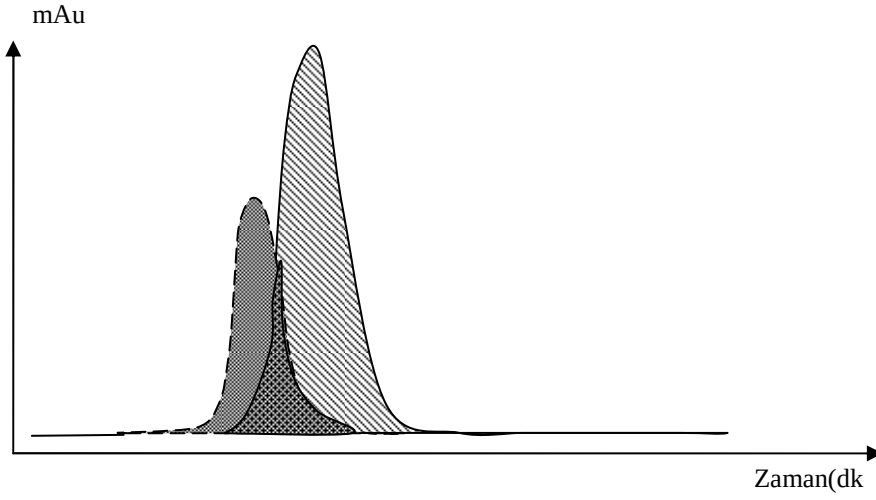


Şekil 4.45. Standart 3-NT çözeltisi ($2,027 \times 10^{-8}$ M) için 208,50 nm dalga boyunda elde edilen elektroforegramda 2. pik için gösterilen spektrum

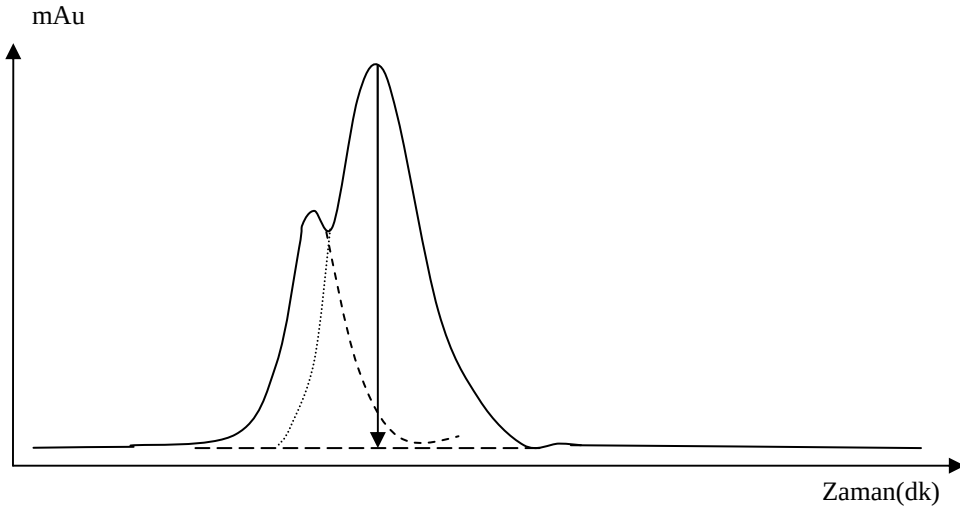
Standart çözelti ile yapılan çalışmalarda elektroforegramlardan görüldüğü üzere Şekil 4.41’ de gösterilen 208,50 nm dalga boyundaki elektroforegramda 3-NT e ait olduğu düşünülen pik ikiye yarılmıştır. Şekil 4.40’ da gösterilen 214,40 nm dalga boyundaki elektroforegramda ise böyle bir durum söz konusu değildir. Bu dalga boyunda (214,40 nm) alınan elektroforegramda 3-NT piki için farklı zamanlardaki spektrumlar (Şekil 4.42 - Şekil 4.43) hem birbirleri ile hem de 208,50 nm dalga boyunda elde edilen elektroforegramdaki 1. ve 2. pikin spektrumları (Şekil 4.44 – Şekil 4.45) ile karşılaştırılmıştır. Spektrumlar incelendiğinde maddelerin birbirinden farklı olmadığı gözlenmiştir. Bu durum kullanılan 3-nitro-L-tirozin standardının yeteri kadar saf olmadığı ve bu maddenin D formunu da içerebileceği sonucuna varılmasını sağlamıştır. Deneylerde işlemlerin daha kolay ve anlamlı yürütülebilmesi için analiz yapılacak dalga boyu olarak 214,40 nm dalga boyu seçilmesine karar verilmiştir.

4.2.1.2. Kapiler Elektroforezde Cevapların Değerlendirilmesi

Kapiler elektroforetik çalışmalarda cihaz kullanım programında elektroforegramlardaki piklere ait cevaplar, pik alanı ve pik yüksekliği olarak iki şekilde verilmektedir. Çalışmada cevapların değerlendirmesi pik yükseklikleri üzerinden yapılmıştır. Dalga boyu seçimi çalışmalarında standart 3-NT’ e ait pikte 3-NT’ in D formuna ait olduğu düşünülen bir omuz gözlenmiştir. Cevaplar değerlendirilirken pik alanlarının kullanımı, 3-NT’ e ait cevabın değerlendirmesinde hataya neden olmaktadır (Şekil 4.46). Çünkü pik alanları hesaplanırken omuza ait olan pikteki alan da dahil edilmektedir. Oysaki yükseklik hesaplanırken böyle bir durum söz konusu değildir (Şekil 4.47). Ayrıca pik alanlarının kullanılabilmesi için pik şeklinin tam bir Gauss eğrisi şeklinde olması gerekmektedir (Xu, 1996). Değerlendirme sonucu pik yüksekliklerinin kullanımının, pik alanların kullanımına göre daha doğru bir yaklaşım olduğu görülmüştür. Bu nedenle cevapların değerlendirmesinde pik yükseklikleri esas alınmıştır.



Şekil 4.46. Standart 3-NT analizi ile elde edilen pikte gözlenen omuzun 3-NT pik alanına katkısı olmaktadır



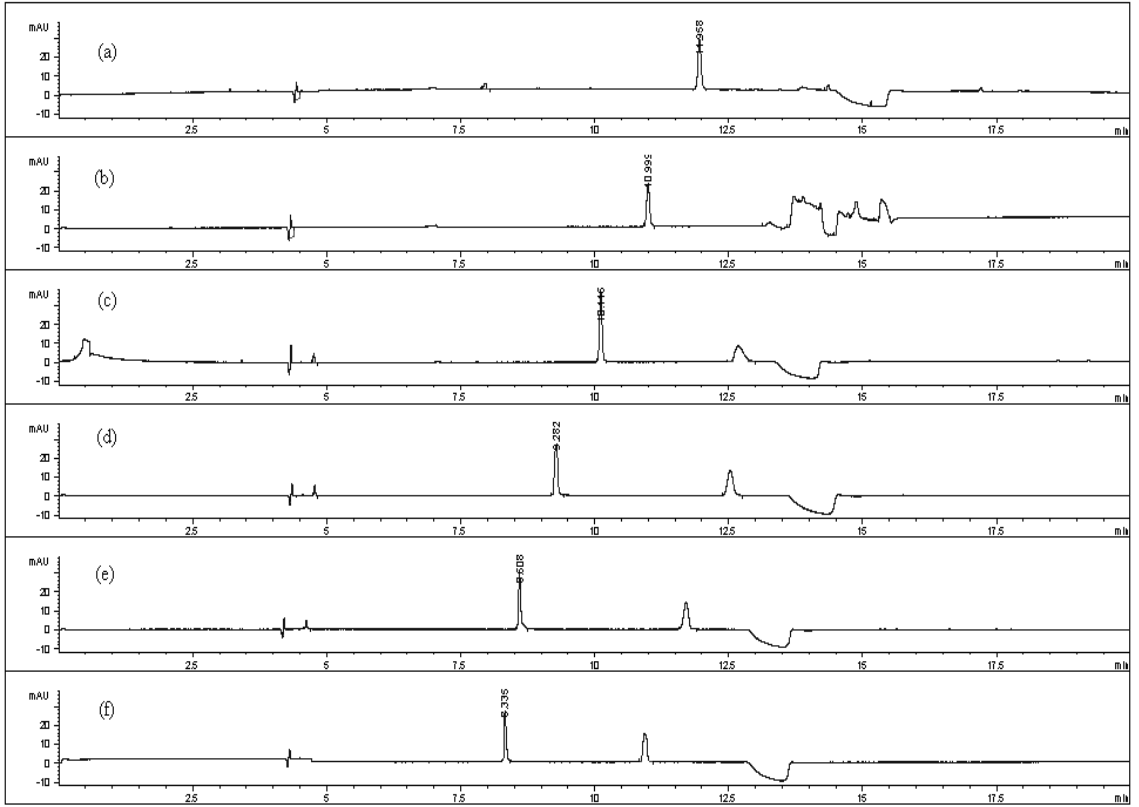
Şekil 4.47. Standart 3-NT analizinde pik yüksekliği esas alındığında, standart maddede gözlenen omuzun cevaba katkısı olmamaktadır

4.2.1.3. pH Seçimi

Denemelerde Bölüm 3.3.1.2' de belirtilen pH değerlerinde 3-NT için gözlenen pik yüksekliği incelenmiş, alınan veriler Çizelge 4.19' da, elektroforegramlar da Şekil 4.48' de sunulmuştur.

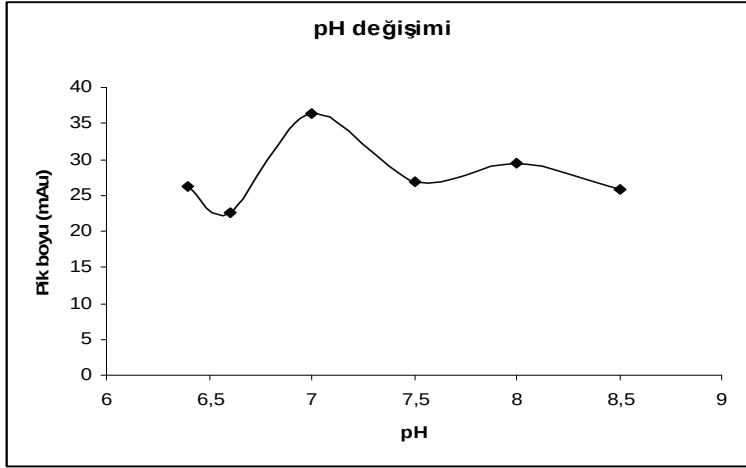
Çizelge 4.19. CTAB kullanılan sıkıştırma yönteminde farklı pH değerlerinde $4,052 \times 10^{-5}$ M 3-NT için elde edilen pik boyları ve alıkonma süreleri (n=3)

pH	Alıkonma süresi (dk)	Pik boyu (mAu)
6,4	11,958	26,3
6,6	10,999	22,6
7,0	10,116	36,3
7,5	9,282	26,9
8,0	8,608	29,5
8,5	8,335	25,7



Şekil 4.48. Farklı pH değerlerinde $4,052 \times 10^{-5}$ M 3-NT için 0,5 mM CTAB içeren 0,15 M fosfat tamponunda 25°C ve -15 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 30s enjeksiyon koşulunda elde edilen elektroforegramlar. a) 6.4 b) 6.6 c) 7.0 d) 7.5 e) 8.0 f) 8.5

Çizelge 4.19' da sunulan veriler grafiğe geçirilerek pH ile pik yüksekliğinin değişimi incelenmiş, grafik Şekil 4.49' da sunulmuştur.



Şekil 4.49. Farklı pH değerlerinde $4,052 \times 10^{-5}$ M 3-Nitrotirozin için 0,5 mM CTAB içeren 0,15 M fosfat tamponunda 25°C ve -15 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 30s enjeksiyon koşulunda elde edilen pik boylarının karşılaştırılması

Verilen değerler ve Şekil 4.49' daki grafik incelendiğinde, 3-NT için en büyük pik yüksekliği değeri pH 7,0 değerinde gözlenmiştir. Bu değeri aynı zamanda fizyolojik pH değeri olarak da bilinmektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004). Bu nedenle sonraki çalışmalar için pH 7,0 değeri uygun değeri olarak belirlenmiştir.

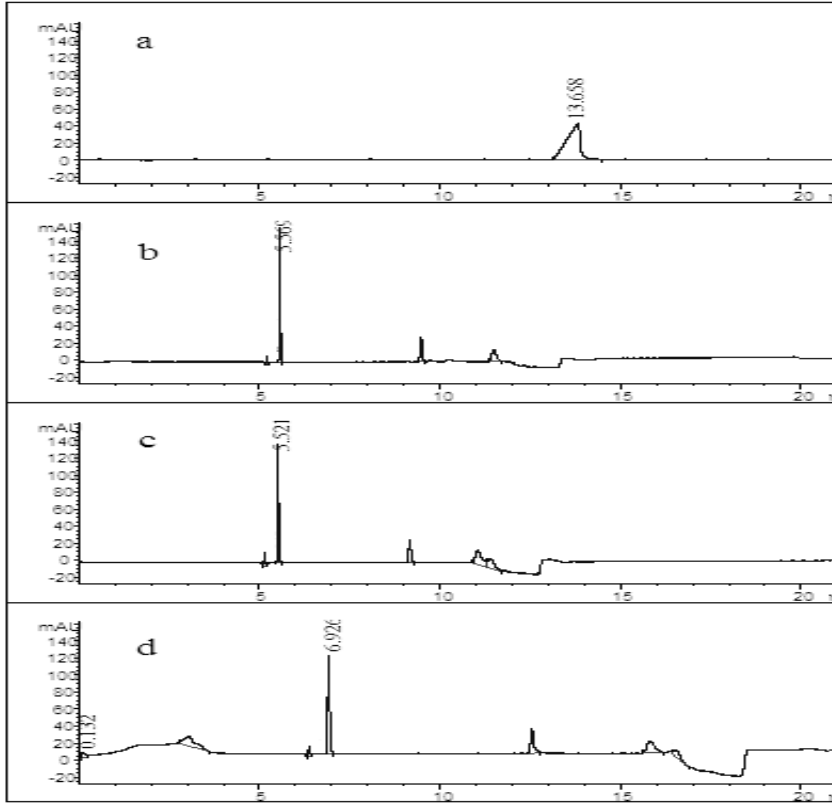
4.2.1.4. CTAB Derişimi Etkisinin İncelenmesi

EOF baskılayıcı olarak kullanılan CTAB' ın etkisini incelemek için farklı CTAB derişimlerinde elektroosmotik akışın hızı ölçülmüş, alınan veriler Çizelge 4.20' de, elde edilen elektroforegramlar da Şekil 4.50' de sunulmuştur.

Çizelge 4.20. Farklı CTAB derişimlerinde dimetilsülfoksit kullanılarak hesaplanan EOF hızları

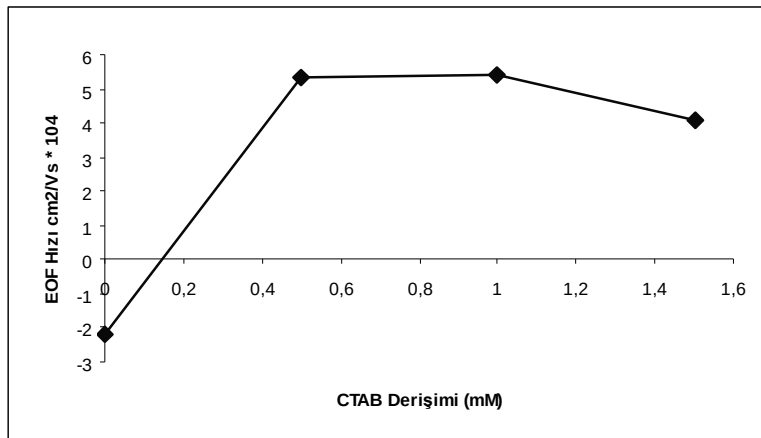
CTAB derişimi (mM)	0	0,5	1	1,5
EOF hızı (cm^2/Vs)* 10^4	-2,168	+5,340	+5,388	+4,066

- EOF hızlarının işareti EOF un uygulanan potansiyel ile aynı yönde olup olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.50. Farklı CTAB derişimlerinde 0,15 M fosfat tamponunda 25 ⁰C ve -15 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 30s enjeksiyon koşulunda dimetilsülfoksit için alınan elektroforegramlar a) CTAB içermeyen elektrolit b) 0,5 mM CTAB c) 1 mM CTAB d) 1,5 mM CTAB içeren elektrolit

Çizelge 4.20’ de sunulan veriler, değışimi görmek amacıyla grafiğe geçirilmiş, oluşturulan grafik Şekil 4.51’ de sunulmuştur.



Şekil 4.51. Farklı CTAB derişimlerinde 0,15 M pH 7,0 fosfat tamponunda 25 ⁰C ve -15 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 30s enjeksiyon koşulunda dimetilsülfoksit kullanılarak hesaplanan EOF hızlarının CTAB derişimi ile değışimi

Çizelge 4.20' de sunulan veriler ve Şekil 4.51' deki değişime göre 0,5 mM CTAB, EOF hızını tersine çevirmek ve değiştirmek için yeterlidir. Bu nedenle 0,5 mM CTAB içeren fosfat tamponu kullanılmasına karar verilmiştir.

4.2.1.5. H₃PO₄ derişimi, Sıcaklık ve Ayırma Potansiyelinin Kemometrik Yaklaşım ile Seçimi

Bölüm 3.3.1.4' de Çizelge 3.8' de verilen değerler kullanılarak Çizelge 3.9' da sunulan deneysel tasarım şeması uygulanmış, alınan sonuçlar ile Çizelge 4.21' de gösterilen etkileşim ve b katsayıları hesaplanmıştır. Çizelge 4.21' de Bölüm 4.1.1.4' deki gibi uygulama yapılmıştır.

Çizelge 4.21. Kemometrik tasarlanmış deney sonucunda elde edilen etkileşim, pik yüksekliği ve b katsayıları (n=3)

Deney	x ₀	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁ x ₂	x ₁ x ₃	x ₂ x ₃	x ₁ x ₂ x ₃	Pik Yüksekliği		
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	13,600	16,38	b ₀
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	13,950	0,2075	b ₁
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	16,475	1,7625	b ₂
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	17,650	0,9625	b ₃
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	15,300	0,06875	b ₁₂
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	15,625	-0,14375	b ₁₃
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	19,200	0,11875	b ₂₃
8	1	1	1	1	1	1	1	1	19,250	-0,1375	b ₁₂₃

Çizelge 4.21' de sunulan veriler kullanılarak bulunan denklem Eşitlik 4.2' de verilmiştir.

$$y = 1638 + 0,2075x_1 + 1,7625x_2 + 0,9625x_3 + 0,06875x_1x_2 - 0,14375x_1x_3 + 0,11875x_2x_3 - 0,1375x_1x_2x_3 \quad (4.2)$$

Burada da modelin ispatı için Bölüm 4.1.1.4' deki gibi işlem yapılmış R² değeri 0,9998 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuç modelin uygun olduğunu göstermektedir.

Kemometrik yöntemden yararlanılarak tasarlanan deneylerden yola çıkarak; sonuçlar üzerinde en etkili parametrenin derişim olduğu anlaşılmaktadır. En büyük pik yüksekliği değerinin 0,5 mM CTAB içeren 0,1 M fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta, -20 kV ayırma potansiyelinde elde edildiği gözlenmiştir. Devam eden çalışmalarda bu değerler kullanılmıştır.

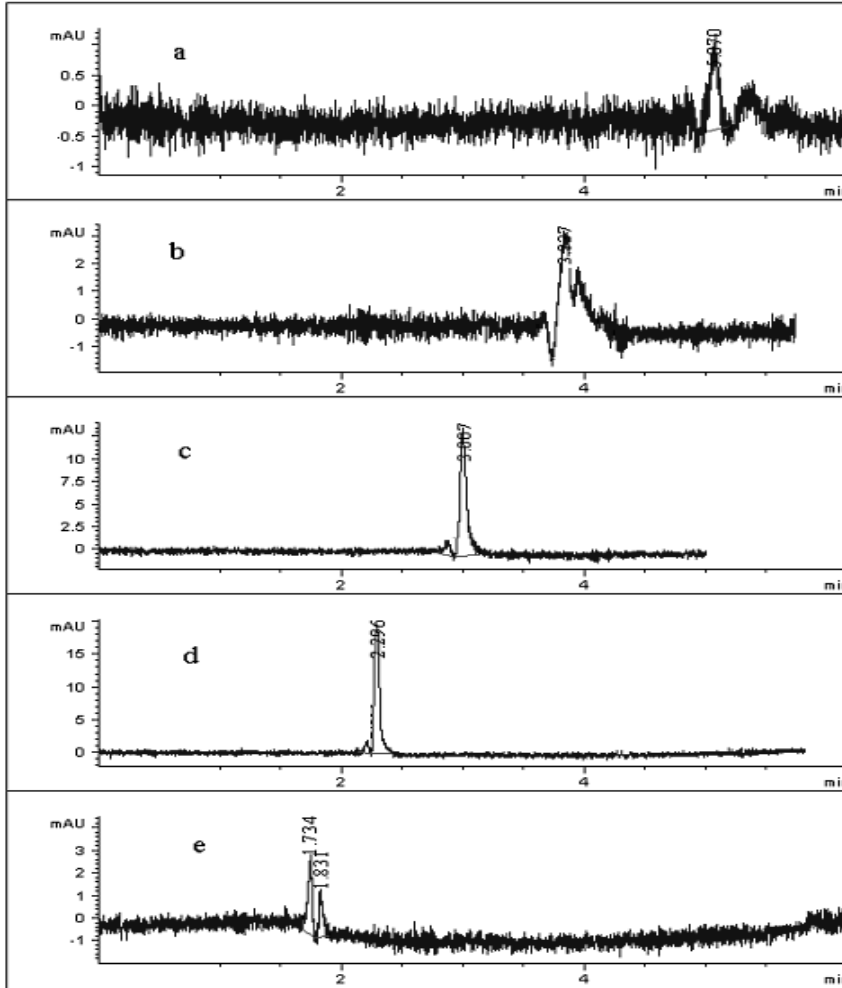
4.2.1.6. Enjeksiyon Süresinin Seçimi

Bölüm 3.3.1.3' de anlatıldığı gibi enjeksiyon süreleri ile ilgili çalışmalar

yapılmıştır. Çizelge 3.10' da verilen süreler kullanılmış, her bir enjeksiyon süresinde okunan pik yükseklikleri Çizelge 4.22' de, elde edilen elektroferogramlar da Şekil 4.52' de sunulmuştur.

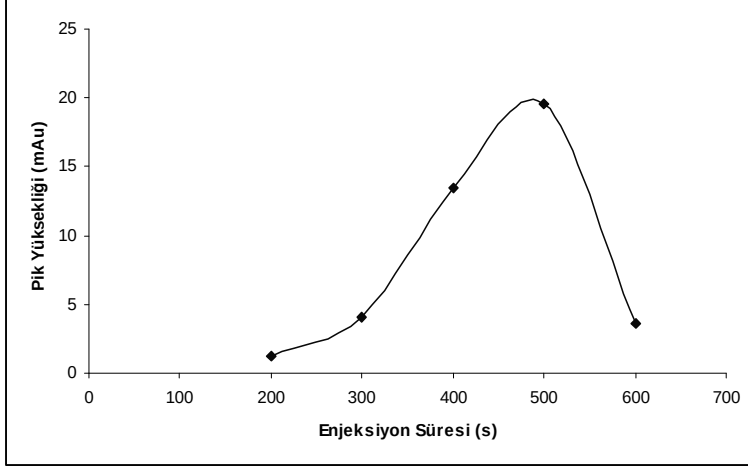
Çizelge 4.22. Belirtilen enjeksiyon sürelerinde $8,108 \times 10^{-7} \text{ M}$ 3-NT için 50 μm iç çaplı 62 cm boyundaki kolonun dolma oranları ve okunan pik yüksekliği değerleri (n=3)

Enjeksiyon süresi (s)	Kolonun toplam hacmine oranı %	Pik Yüksekliği (mAu)
200	25,38	1,2
300	38,07	4,1
400	50,76	13,5
500	63,46	19,6
600	76,15	3,6



Şekil 4.52. Farklı enjeksiyon sürelerinde $8,108 \times 10^{-7} \text{ M}$ 3-NT için 0,5 mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C ve -20 kV ayırma potansiyelinde elde edilen elektroferogramlar a) 200 s b) 300 s c) 400 s d) 500 s e) 600 s

Çizelge 4.22’ de sunulan veriler grafiğe geçirilmiş, enjeksiyon süresi ile pik yüksekliğinin değişimi Şekil 4.53’ de sunulmuştur.



Şekil 4.53. Farklı enjeksiyon sürelerinde 0,5 mM CTAB içeren 0,15 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30 °C ve -20 kV ayırma potansiyelinde pik yüksekliğinin değişimi

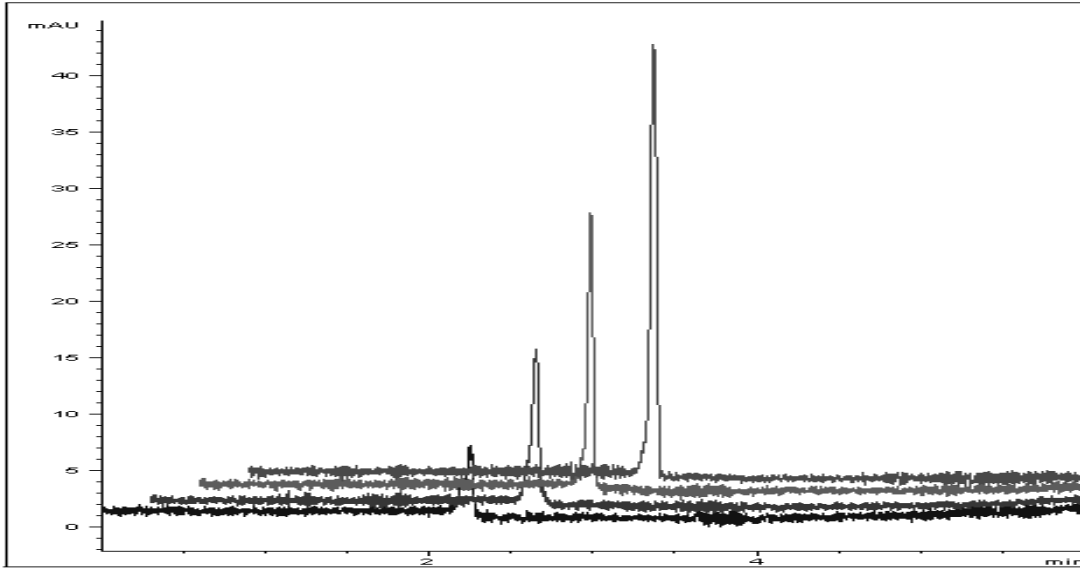
Çizelge 4.22’ de verilen değerler ve Şekil 4.53’ de gösterilen değişim incelendiğinde çalışma için en uygun enjeksiyon süresinin 500 s olduğu görülmüştür. CTAB ile büyük hacimli örnek sıkıştırma yönteminde çalışma koşulları şu şekilde verilebilir: 0,5 mM CTAB içeren 0,10M pH 7,0 fosfat tamponunda 30 °C sıcaklık ve -20 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar basınçta 500 s enjeksiyon süresi kullanılarak analizler yapılmalıdır. Çalışma için en uygun çalışma koşulları belirlendikten sonra kalibrasyon grafiğinin çizilebilmesi için denemeler yapılmıştır.

4.2.1.7. Kalibrasyon Eğrisi

Geliştirilen yöntem için $10^{-13} - 10^{-5}$ M derişim aralığında 3-NT için ölçümler alınarak doğrusal derişim aralığı bulunmuştur. Çalışmada alınan veriler Çizelge 4.23’ de, elde edilen elektroforegramlar ise Şekil 4.54’ de sunulmuştur.

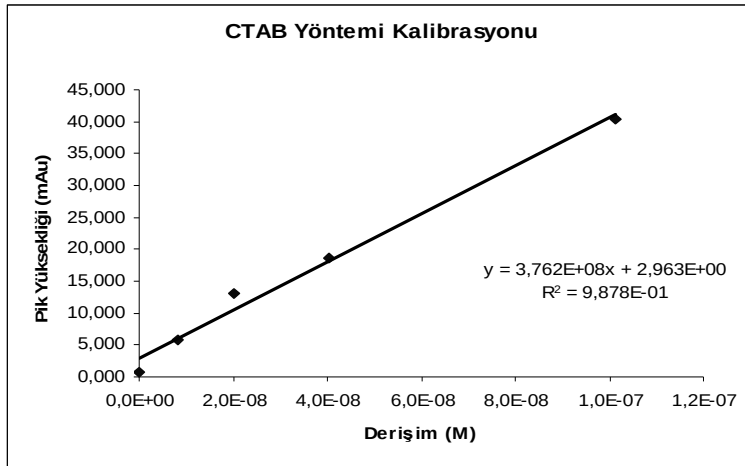
Çizelge 4.23. BHÖS yönteminde 0,5mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında 3-NT için elde edilen değerler (n=5)

Derişim (M)	Pik Yüksekliği $\pm$ S.S. (mAu)
0	0,778 $\pm$ 0,078
8,108 x10 ⁻⁹	5,920 $\pm$ 0,55
2,027 x10 ⁻⁸	13,038 $\pm$ 0,36
4,054 x10 ⁻⁸	18,733 $\pm$ 0,20
1,014 x10 ⁻⁷	40,400 $\pm$ 3,80



Şekil 4.54. Kalibrasyon eğrisi için 3-NT için $8,108 \times 10^{-9}$ – $1,014 \times 10^{-7}$ M derişim aralığında 0,5 mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyonla elde edilen elektroforegramlar

Çizelge 4.23' de sunulan veriler kullanılarak oluşturulan kalibrasyon grafiği Şekil 4.55' de sunulmaktadır.



Şekil 4.55. CTAB ile BHÖS kapiler elektroforez yönteminde 3-NT için 0,5mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyonla $8,108 \times 10^{-9}$ – $1,014 \times 10^{-7}$ M derişim aralığında elde edilen kalibrasyon eğrisi

EOF değiştirici olarak CTAB kullanılan BHÖS yönteminin, 0,5mM CTAB içeren 0,10 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında 3-NT için $8,108 \times 10^{-9}$ – $1,014 \times 10^{-7}$ M derişim aralığında doğrusal derişim gösterdiği belirlenmiştir.

4.2.2. Dietilentriamin (DETA) Kullanılan Çalışmalar

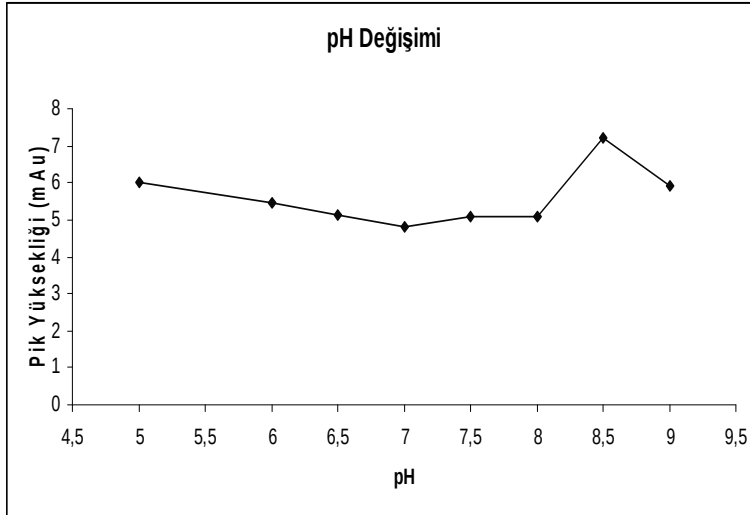
4.2.2.1. pH Seçimi

Denemelerde Bölüm 3.3.2.1’ de belirtilen pH değerlerinde 3-NT pik yüksekliği incelenmiş, sonuçlar Çizelge 4.24 ve Şekil 4.56’ da sunulmuştur.

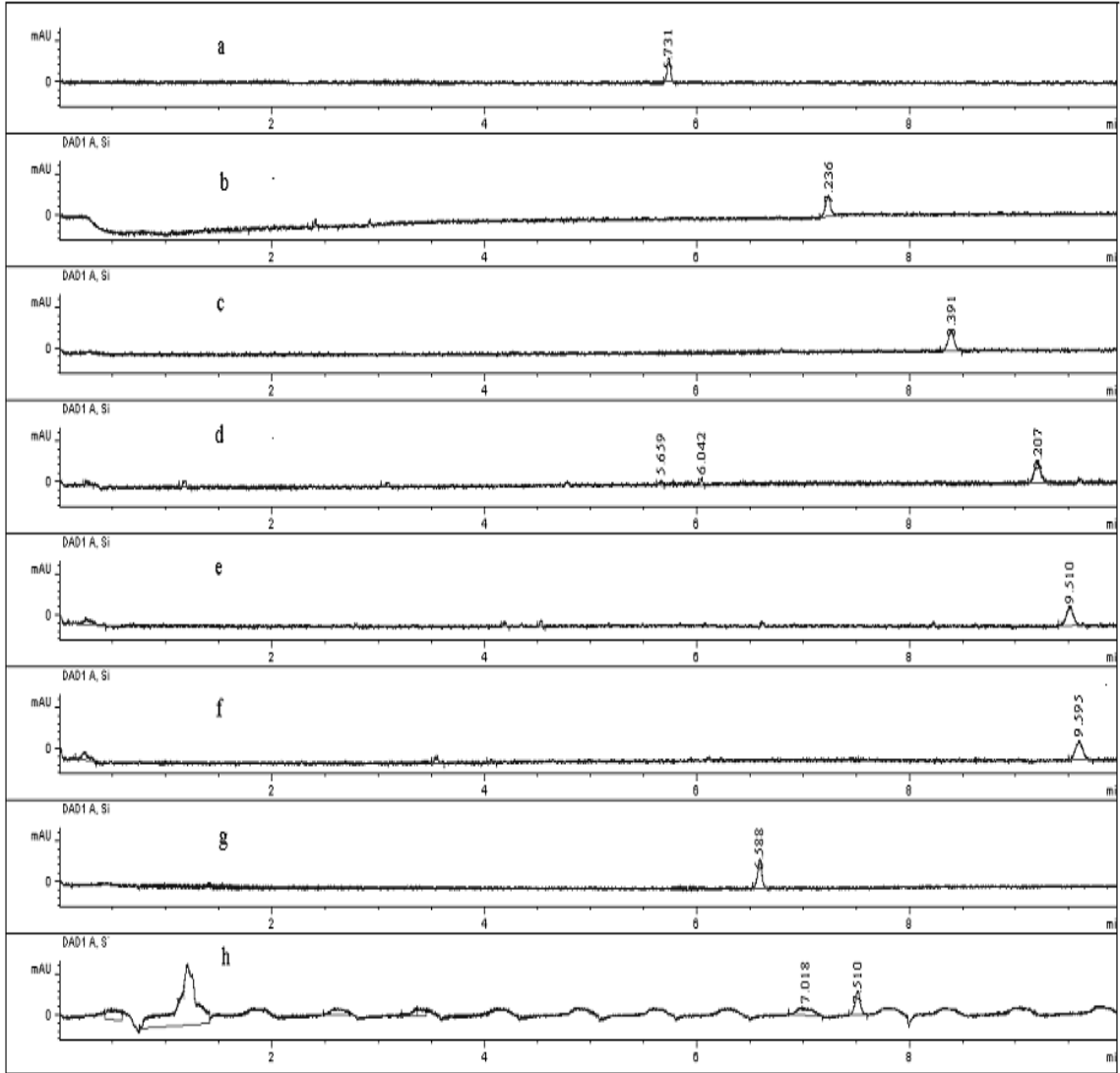
Çizelge 4.24. DETA kullanılan sıkıştırma yönteminde farklı pH değerlerinde $4,054 \times 10^{-6}$ M 3-NT için elde edilen pik boyları ve alıkonma süreleri (n=3)

pH	Alıkonma süresi (dk)	Pik boyu (mAu)
5,0	5,732	6,00
6,0	7,230	5,47
6,5	8,388	5,13
7,0	9,203	4,83
7,5	9,506	5,10
8,0	9,594	5,10
8,5	6,589	7,20
9,0	7,419	5,90

Çizelge 4.24’ de sunulan veriler grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafik Şekil 4.57’ de sunulmaktadır.



Şekil 4.56. Farklı pH değerlerinde $4,054 \times 10^{-6}$ M 3-Nitrotirozin için 1 mM DETA içeren 0,05 M fosfat tamponunda 25 °C ve -20 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 30s enjeksiyon koşulunda elde edilen pik boylarının karşılaştırılması



Şekil 4.57. Farklı pH değerlerinde $4,052 \times 10^{-6}$ M 3-Nitrotirozin için 1 mM DETA içeren 0,05 M fosfat tamponunda 25°C ve -20 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 30s enjeksiyon koşulunda elde edilen elektroforegramlar. a) 5,0 b) 6,0 c) 6,5 d) 7,0 e) 7,5 f) 8,0 g) 8,5 h) 9,0

Şekil 4.56' daki grafik incelendiğinde, pH değişimi ile pik yüksekliği değeri büyük oranda değişmemiş fakat pH' nın 8,5 olduğu durumda 3-NT' e ait en büyük pik yüksekliği değeri gözlenmiştir. Bundan sonra devam eden çalışmalar için pH 8,5 değeri kullanılmıştır.

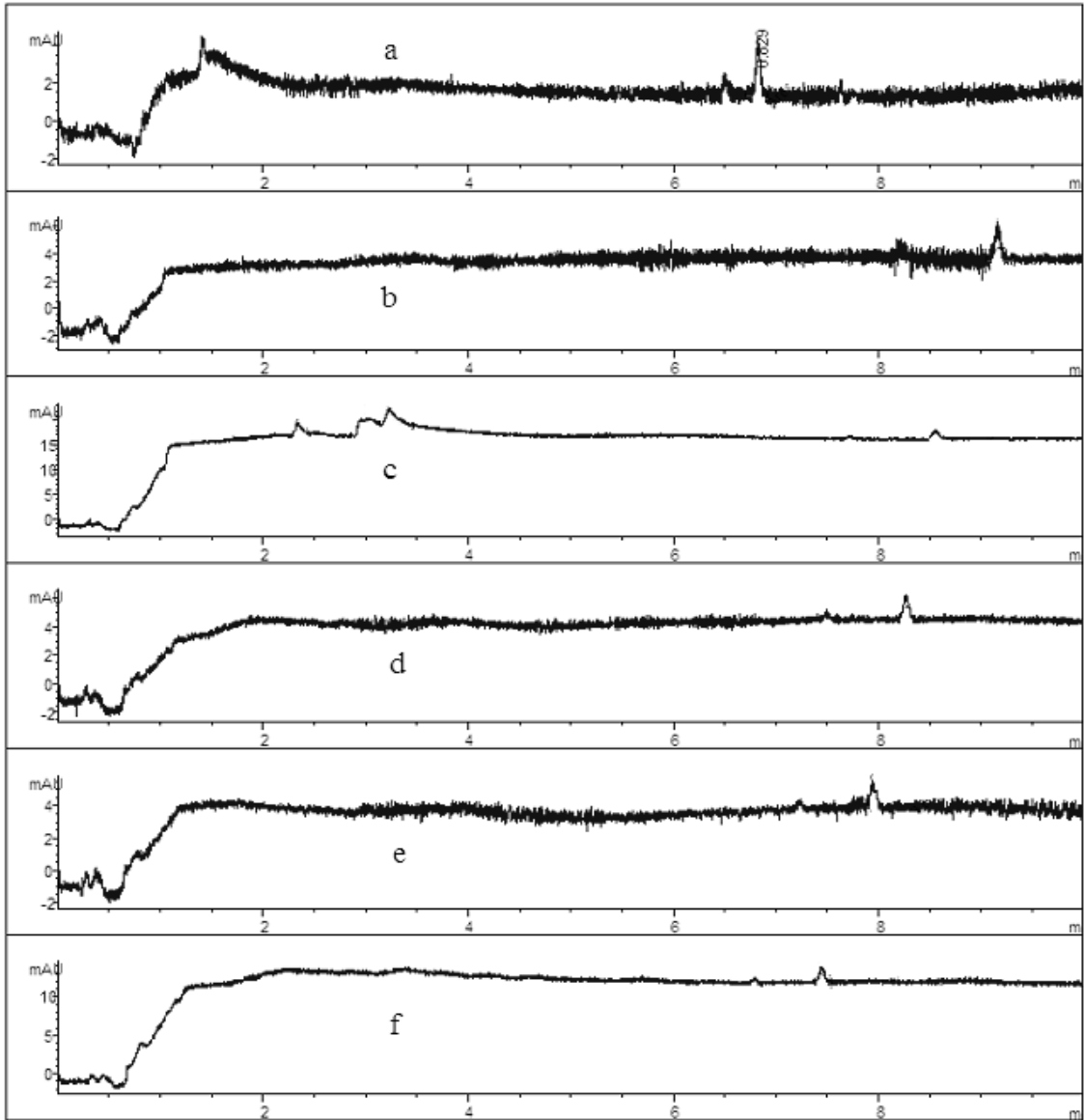
4.2.2.2. DETA Derişimi Etkisinin İncelenmesi

DETA derişim etkisinin incelenmesi için Bölüm 3.3.2.2' de belirtilen DETA derişimlerinde elektroosmotik akışın hızı ölçülmüş, alınan veriler Çizelge 4.25' de, elde edilen elektroforegramlar ise Şekil 4.58' de sunulmuştur.

Çizelge 4.25. Farklı DETA derişimlerinde 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 25 °C ve -20 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 30s enjeksiyon koşulunda dimetilsülfoksit kullanılarak hesaplanan EOF hızları

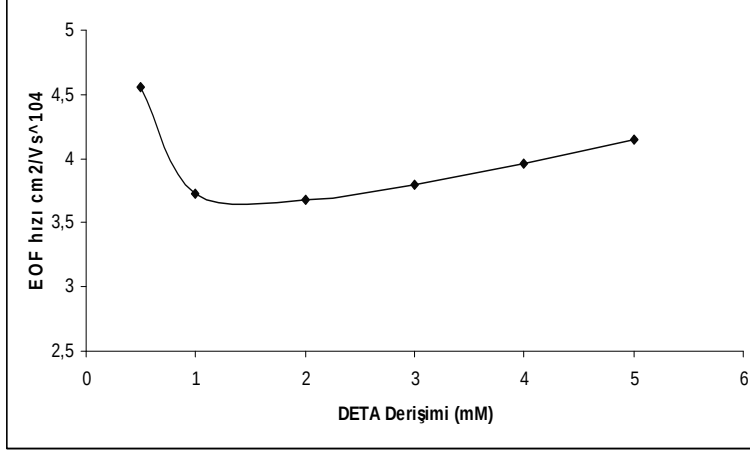
DETA derişimi (mM)	0,5	1	2	3	4	5
EOF hızı $\text{cm}^2/\text{Vs} \cdot 10^4$	+4,56	+3,73	+3,68	+3,80	+3,96	+4,15

* EOF hızlarının işareti EOF un uygulanan potansiyel ile aynı yönde olup olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.58. Farklı DETA derişimlerinde 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 25 °C ve -20 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 30s enjeksiyon koşulunda dimetilsülfoksit kullanılarak hesaplanan EOF hızlarının belirlenmesi ile ilgili elektroforegramlar a) 0,5 mM b) 1mM c) 2 mM d) 3 mM e) 4 mM f) 5 mM

Çizelge 4.25’ de sunulan veriler grafiğe geçirilmiş, oluşturulan grafik Şekil 4,59’ da sunulmuştur.



Şekil 4.59. Farklı DETA derişimlerinde dimetilsülfoksit kullanılarak ölçülen EOF hızlarının değışimi

Çizelge 4.25’ deki veriler ve Şekil 4.59 incelendiğinde 1 mM DETA derişiminin EOF’ u tersine çevirmek için yeterli olduğu gözlenmiştir. Devam eden çalışmalarda elektrolit çözeltisinde DETA derişimi 1 mM olarak ayarlanmıştır.

4.2.2.3. H₃PO₄ derişimi, Sıcaklık ve Ayırma Potansiyelinin Kemometrik

Yaklaşımın Seçimi

Bölüm 3.3.2.3’ de belirtilen Çizelge 3.11’ deki etkenlerin kullanımıyla Çizelge 3.12’ de sunulan deneysel tasarım şemasına uygun olarak denemeler yapılmıştır. Yapılan deneyler sonucu elde edilen etkileşim, pik yüksekliği ve b katsayıları Çizelge 4.26’ de sunulmuştur. Çizelge 4.26’ da Bölüm 4.1.1.4’ deki gibi uygulama yapılmıştır.

Çizelge 4.26. Kemometrik tasarlanmış deney sonucunda 1 mM DETA içeren 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 25 °C ve -20 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 300 s enjeksiyon koşulunda elde edilen etkileşim, pik yüksekliği ve b katsayıları (n=3)

D deney	x ₀	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁ x ₂	x ₁ x ₃	x ₂ x ₃	x ₁ x ₂ x ₃	Pik Yüksekliği		
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	4,73	3,765	b ₀
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	4,73	-0,6775	b ₁
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	5,25	0,0475	b ₂
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	2,47	-0,53	b ₃
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	3,66	-0,2	b ₁₂
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1,75	0,0175	b ₁₃
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	4,13	0,4825	b ₂₃
8	1	1	1	1	1	1	1	1	3,40	0,495	b ₁₂₃

H₃PO₄ derişimi, sıcaklık ve ayırma potansiyelinin seçimi ile ilgili olarak izelge 4.26’ da sunulan verilerden elde edilen denklem aşağıda verilmektedir.

$$y = 3,765 - 0,6775x_1 + 0,0475x_2 - 0,53x_3 - 0,2x_1x_2 + 0,0175x_1x_3 + 0,485x_2x_3 + 0,495x_1x_2x_3 \quad (4.3)$$

Bölüm 4.1.1.4’ deki gibi model geğerliliği ispatı için çalışma yapıldığında R²=1 bulunmuş, modelin çalışma için uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

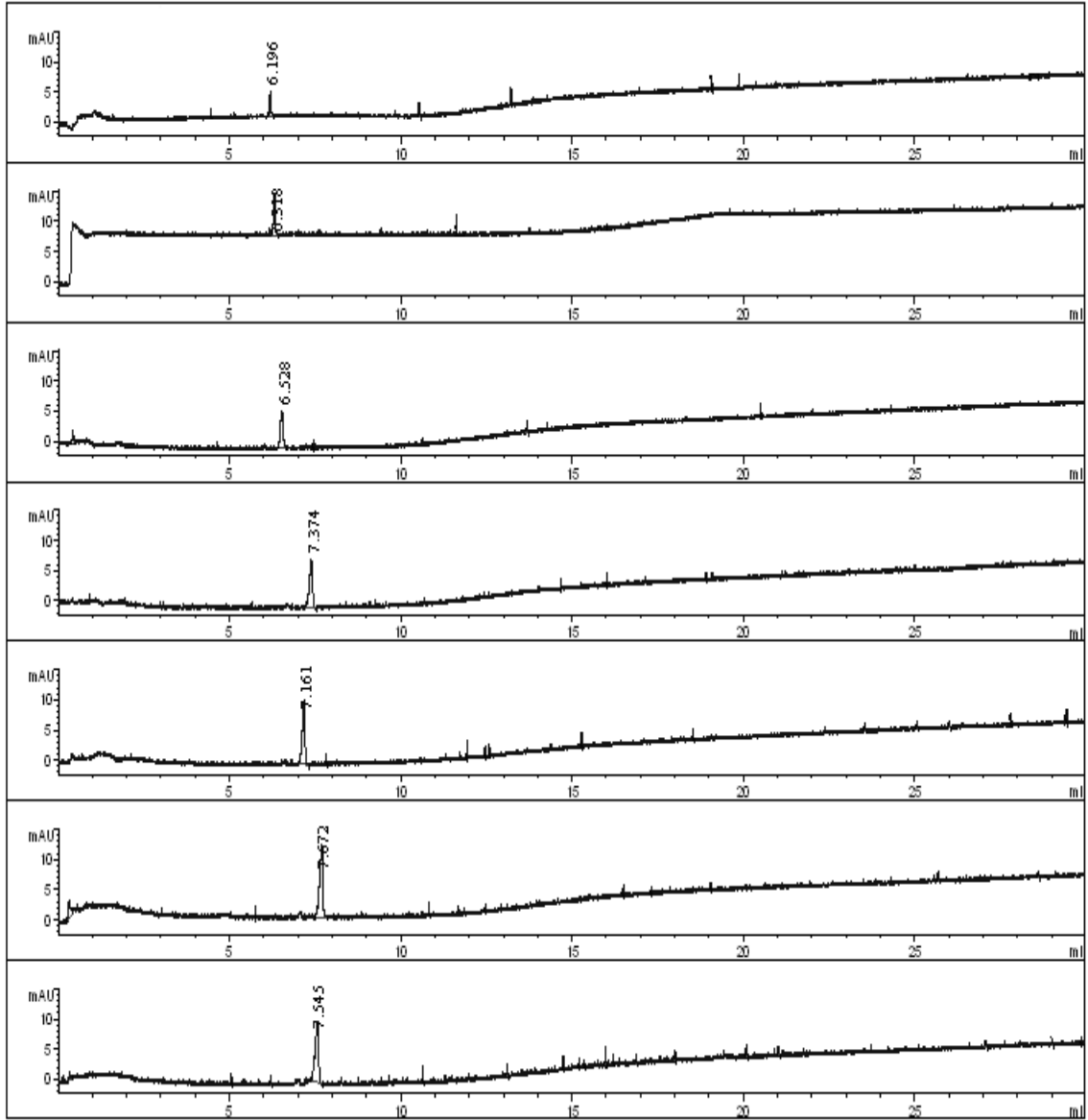
Bu denkleme göre derişim sabit tutulduğunda sıcaklık artışı ve H₃PO₄ derişimi değerindeki artış sonuca olumsuz yönde katkıda bulunurken, ayırma potansiyelinin artışı sonuca olumlu yönde etki etmektedir. Verilen koşullardan 20°C sıcaklık, 0,05 M H₃PO₄ derişimi ve -30 kV ayırma potansiyelinin kullanıldığı deney şartlarında en büyük pik yüksekliği değeri gözlenmektedir. Çalışma şartları olarak da bu değerler seğilmiştir.

4.2.2.4. Enjeksiyon Süresinin Seçimi

Bölüm 3.3.2.4’ de izelge 3.13’ de gösterilen enjeksiyon sürelerinde numune kolona verilmiş, bu sürelerde kolonun ne kadarının olduğu hesaplanmış ve pik yüksekliklerine bakılarak en uygun enjeksiyon süresi belirlenmiştir. Alınan sonuçlar izelge 4.27’ de, elektroforegramlar ise şekil 4.60’ da sunulmuştur.

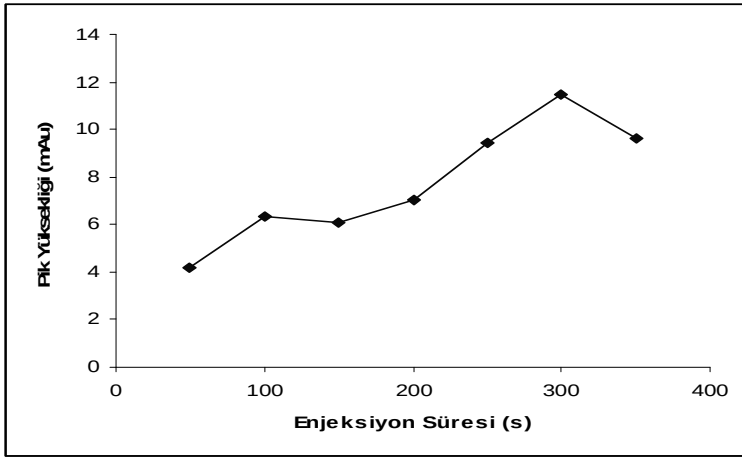
Çizelge 4.27. Belirtilen enjeksiyon sürelerinde 1 mM DETA içeren 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 25 °C ve -20 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar basınçta 75 µm i çaplı 57 cm boyundaki kolonun dolma oranları ve elde edilen pik yüksekliği değerleri (n=3)

Enjeksiyon süresi (s)	Kolonun toplam hacmine oranı %	Pik Yüksekliği (mAu)
50	13,44	4,20
100	26,88	6,35
150	40,33	6,07
200	53,77	7,03
250	67,21	9,45
300	80,65	11,45
350	94,09	9,60



Şekil 4.60. Farklı enjeksiyon süreleri kullanıldığında 1 mM DETA içeren 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 25 °C ve -20 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar basınçta elde edilen elektroforegramlar

Çizelge 4.27’ de sunulan veriler grafiğe geçirilmiş, enjeksiyon süresi ile pik yüksekliği değişimi Şekil 4.61’ de gösterilmiştir.

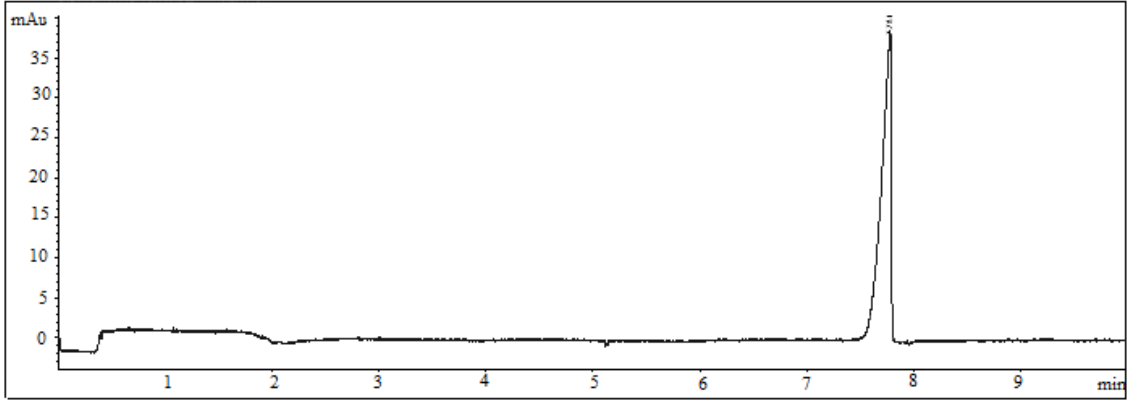


Şekil 4.61. Farklı enjeksiyon sürelerinde $4,054 \times 10^{-6}$ M M 3-NT için 1 mM DETA içeren 0,05 M fosfat tamponunda 25 $^{\circ}\text{C}$ ve -20 kV ayırma potansiyelinde pik yüksekliğinin değişimi

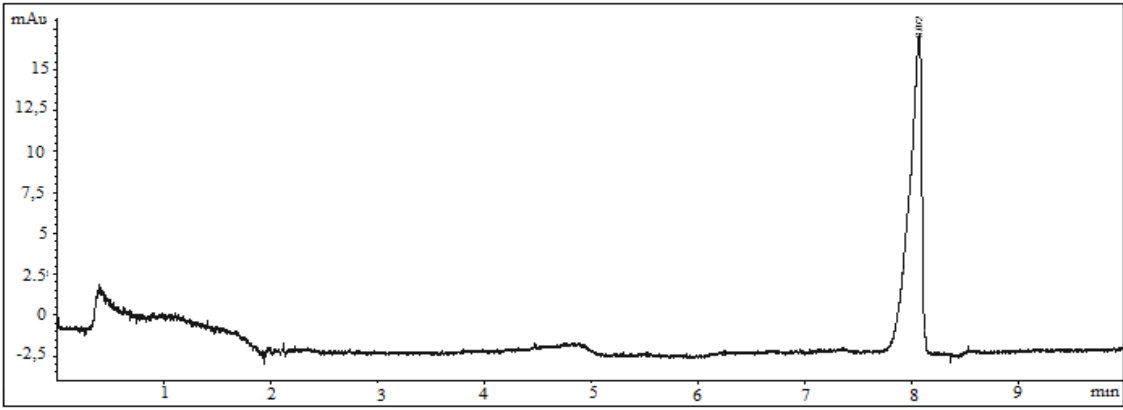
Çizelge 4.27 ve Şekil 4.61 incelendiğinde enjeksiyon süresinin artışı ile pik yüksekliğinde artış olduğu gözlenmiştir. Fakat 300 s' den daha uzun süre enjeksiyon yapıldığında pik yüksekliği değerinde azalma görülmüştür. Değerlendirme sonucu analiz için enjeksiyon süresi olarak 300 s değerinin seçilmesine karar verilmiştir. Bu çalışma ile birlikte DETA ile sıkıştırma yöntemi için elde edilen en iyi ayırma şartları şu şekildedir: 1 mM DETA içeren 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 20 $^{\circ}\text{C}$ ve -30 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 300 s enjeksiyon koşuludur.

4.2.2.5. Kalibrasyon Eğrisi

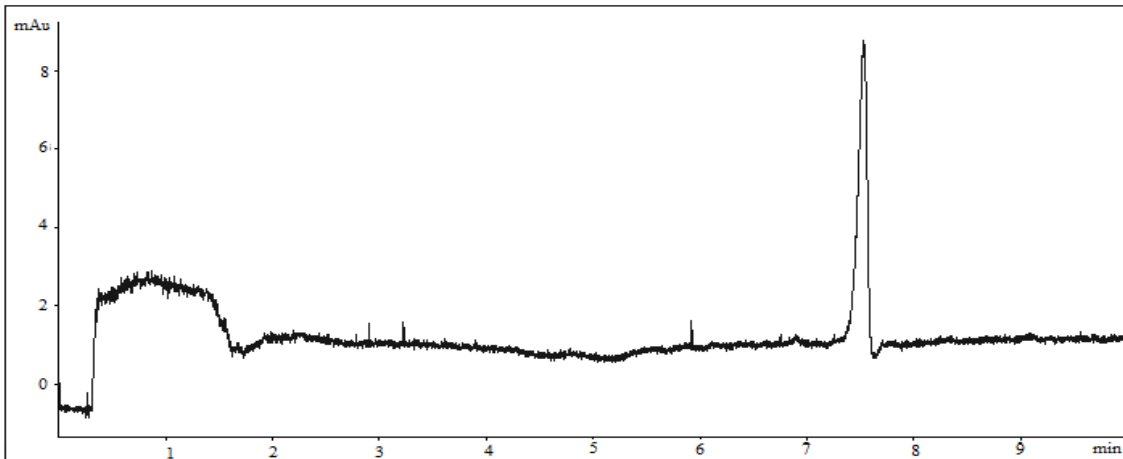
Geliştirilen yöntemde en iyi ayırma şartları sağlandıktan sonra kalibrasyon eğrisi çizilmesi için çeşitli denemeler yapılmıştır. Elde edilen elektroforegramlardan bazıları Şekil 4.62-67 de, ilgili piklerde derişimle olan değişim de Çizelge 4.28' de sunulmuştur.



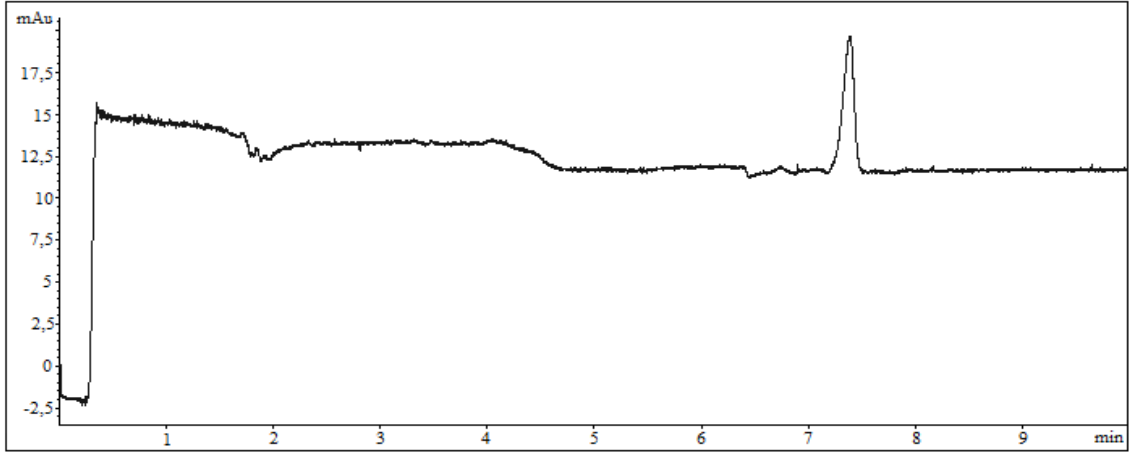
Şekil 4.62. Standart 3-NT çözeltisi için ($2,027 \times 10^{-12}$ M) 1 mM DETA içeren 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 20°C ve -30 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 300 s enjeksiyon süresinde elde edilen elektroforegram



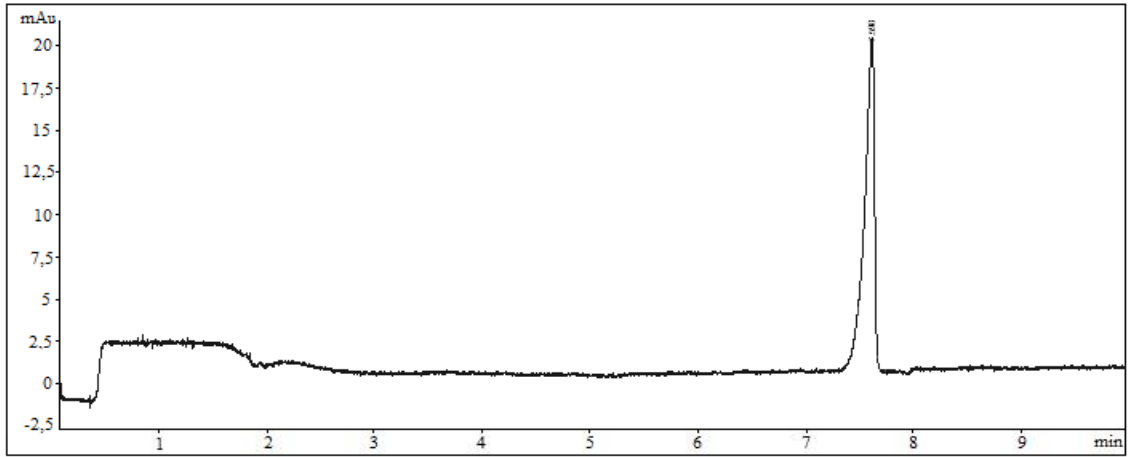
Şekil 4.63. Standart 3-NT çözeltisi için ($4,054 \times 10^{-12}$ M) 1 mM DETA içeren 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 20°C ve -30 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 300 s enjeksiyon süresinde elde edilen elektroforegram



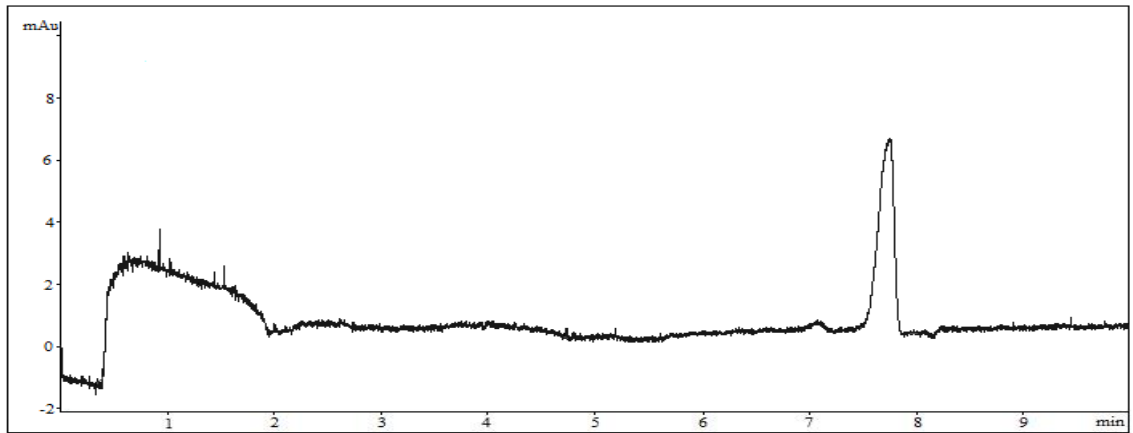
Şekil 4.64. Standart 3-NT çözeltisi için ($2,027 \times 10^{-11}$ M) 1 mM DETA içeren 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 20°C ve -30 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 300 s enjeksiyon süresinde elde edilen elektroforegram



Şekil 4.65. Standart 3-NT çözeltisi için ($4,054 \times 10^{-11}$ M) 1 mM DETA içeren 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 20°C ve -30 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 300 s enjeksiyon süresinde elde edilen elektroforegram



Şekil 4.66. Standart 3-NT çözeltisi için ($8,108 \times 10^{-11}$ M) 1 mM DETA içeren 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 20°C ve -30 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 300 s enjeksiyon süresinde elde edilen elektroforegram



Şekil 4.67. Standart 3-NT çözeltisi için ($2,027 \times 10^{-10}$ M) 1 mM DETA içeren 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 20°C ve -30 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 300 s enjeksiyon süresinde elde edilen elektroforegram

Çizelge 4.28. Standart 3-NT çözeltileri için 1 mM DETA içeren 0,05 M pH 8,5 fosfat tamponunda 20 °C ve -30 kV ayırma potansiyelinde 50 mbar 300s enjeksiyon süresinde elektroforegramlardan okunan pik alanı ve pik yükseklikleri

Derişim (M)	Pik Alanı (dkxmAu)	Pik Yüksekliği (mAu)
$2,03 \times 10^{-12}$	245,6	38,5
$4,05 \times 10^{-12}$	159,6	19,6
$2,03 \times 10^{-11}$	59,0	8,1
$4,05 \times 10^{-11}$	129,4	19,7
$8,11 \times 10^{-11}$	125,6	14,0
$2,03 \times 10^{-10}$	59,6	6,2

Elektroforegramlar ve Çizelge 4.28’ deki veriler incelendiğinde DETA kullanılarak yapılan sıkıştırma yönteminde kalibrasyon eğrisi çalışmalarında derişimle orantılı bir değişim gözlenememiştir. Ayrıca bu düzensiz değişime ilaveten sonuçların tekrarlanabilir özellikte olmadığı da anlaşılmıştır. Bu nedenle DETA kullanılarak yapılan sıkıştırma yönteminden vazgeçilmiş, CTAB’ ın kullanıldığı sıkıştırma yöntemi ile ilgili çalışmalara geçilmiştir.

4.3. Kapiler Elektroferezde Analizler

4.3.1. Geri Alınabilirlik Çalışmaları

Geliştirilen yöntemde Bölüm 3.4.1’ de anlatılan işlemler uygulanmış ve yöntem için geri alınabilirlik yüzdesi hesaplanmıştır. Deneyde elde edilen veriler Çizelge 4.29’ da sunulmaktadır.

Çizelge 4.29. Geri alınabilirlik denemelerinde 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında $1,014 \times 10^{-8}$ M derişimde 3-NT için bulunması beklenen derişim ve bulunan derişim değerlerinin kıyaslanması

Deney	Pik Yüksekliği (mAu)	Bulunması Beklenen Derişim ($M \times 10^8$)	Bulunan Derişim ($M \times 10^8$)	Geri Alınabilirlik Yüzdesi (%)
D1	$6,50 \pm 0,33$	1,014	0,940	92,75
D2	$7,40 \pm 0,40$	1,014	1,170	115,44
D3	$7,17 \pm 0,35$	1,014	1,120	110,51
Ortalama			$1,07 \pm 0,12$	$106,23 \pm 11,93$

Çizelge 4.29’ da verilen sonuçlar incelendiğinde yöntemde 3-NT için geri alınabilirlik yüzdesinin $106,23 \pm 11,93$ olduğu saptanmıştır.

4.3.2. Yöntemin Sağlamlığı ve Güçlülüğü

Bölüm 3.4.2’ de belirtilen ve yöntemin sağlamlığı ve güçlülüğünü gösteren deneyler ile ilgili bulgular Çizelge 4.30’ da verilmiştir.

Çizelge 4.30. 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında $1,014 \times 10^{-8}$ M derişimde 3-NT için yöntemin sağlamlığı ve güçlülüğünü belirlemek için yapılan çalışmalarda bulunması gereken değerler ile bulunan değerlerin kıyaslanması

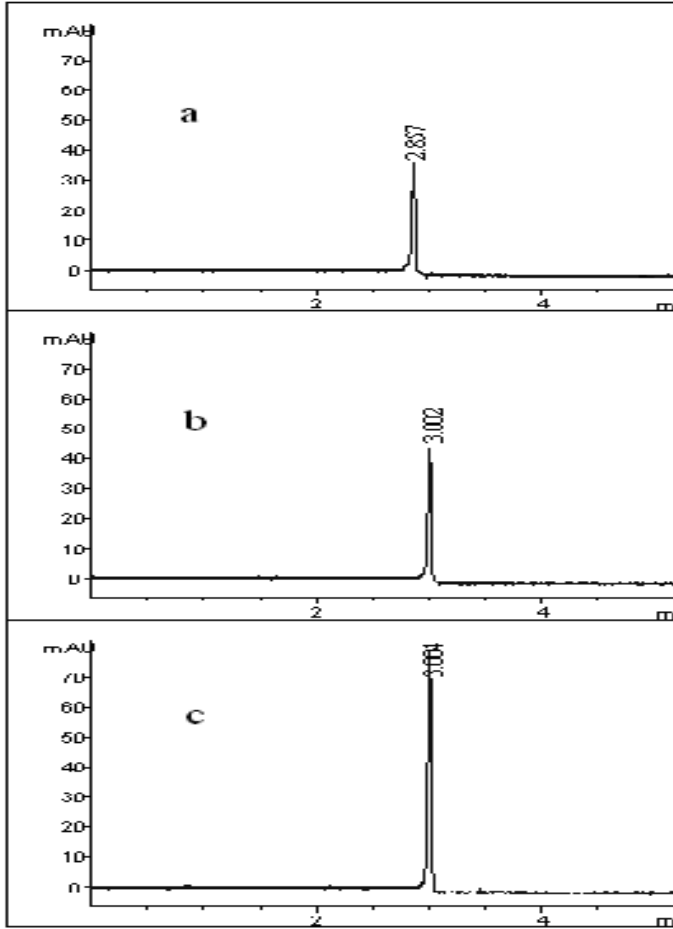
Şartlar	Bulunması Beklenen Derişim ($M \times 10^6$)	Bulunan Derişim ($M \times 10^6$)	Geri Alınabilirlik Yüzdesi (%)	Değişmeyen Parametreler
Sıcaklık (30°C)	1,014	$1,07 \pm 0,12$	$106,23 \pm 11,93$	pH 7,0, H_3PO_4 Derişimi (0,1 M)
Sıcaklık (25°C)	1,014	$0,94 \pm 0,02$	$95,41 \pm 0,01$	pH 7,0, H_3PO_4 Derişimi (0,1 M)
pH (7,0)	1,014	$1,07 \pm 0,12$	$106,23 \pm 11,93$	Sıcaklık (30°C), H_3PO_4 Derişimi (0,1 M)
pH (7,5)	1,014	$1,11 \pm 0,07$	$109,85 \pm 7,40$	Sıcaklık (30°C), H_3PO_4 Derişimi (0,1 M)
H_3PO_4 Derişimi (0,1 M)	1,014	$1,07 \pm 0,12$	$106,23 \pm 11,93$	Sıcaklık (30°C), pH 7,0
H_3PO_4 Derişimi (0,15 M)	1,014	$0,922 \pm 0,06$	$91,03 \pm 6,60$	Sıcaklık (30°C), pH 7,0
Gün 1	1,014	$1,07 \pm 0,12$	$106,23 \pm 11,93$	Sıcaklık (30°C), H_3PO_4 Derişimi (0,1 M), pH 7,0
Gün 2	1,014	$0,967 \pm 0,05$	$98,01 \pm 28,35$	Sıcaklık (30°C), H_3PO_4 Derişimi (0,1 M), pH 7,0

4.3.3. Plazmada Analizler

Kapiler elektroforez tekniği sadece bir tayin tekniği olmayıp aynı zamanda kromatografik tekniklerde olduğu gibi bir ayırma tekniğidir. Bu özellik göz önünde bulundurulduğunda, kapiler elektroforez yönteminde numunelerin doğrudan enjeksiyonu ile analizi mümkündür. Plazma numunelerinde analiz yapılırken bu özellik düşünülmüş ve plazmaların hem doğrudan analizi, hem de voltametrik yöntemde kullanılan özütleme işlemi uygulanmış şekli ile analizi yapılmıştır.

4.3.3.a. Doğrudan Plazma Analizleri

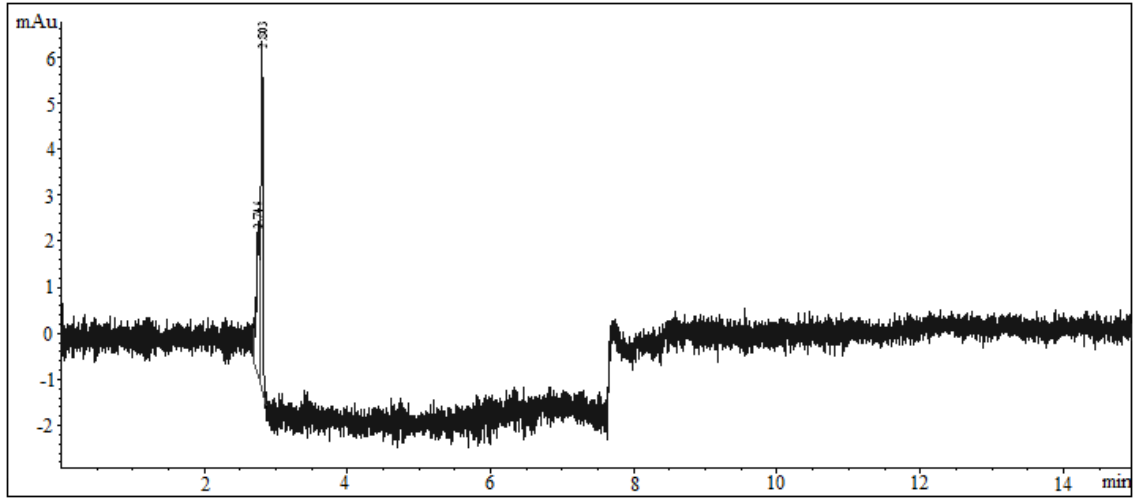
Geliştirilen yöntemde plazmada 3-NT analizinin yapılabilmesi için doğrudan plazma numuneleri ile enjeksiyonlar yapılmıştır. Gözlenen pikin 3-NT' e ait olup olmadığının belirlenmesi için alıkonma zamanı ve standart maddeler ile ilavelerin karşılaştırması kullanılmıştır.



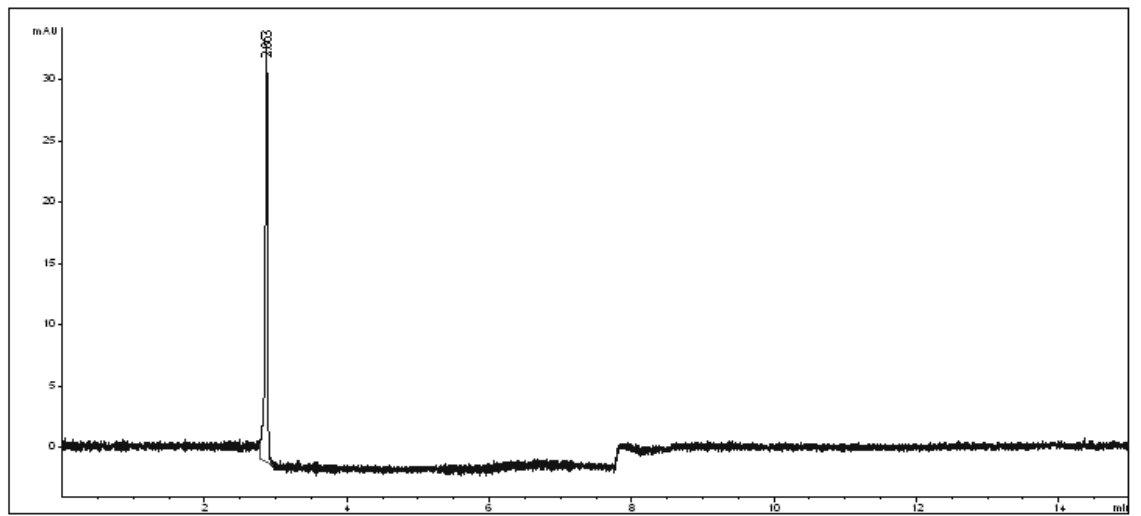
Şekil 4.68. Fosfat tamponunda (0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0) 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında plazma üzerine standart maddeler ilave edilerek elde edilen elektroforegramlar a) Seyreltilmiş plazma b) a+ $1,014 \times 10^{-7}$ M 3-NT c) a+ $4,05 \times 10^{-7}$ M 3-NT

Şekil 4.68’ deki elektroforegramlar karşılaştırıldığında pikler için gözlenen alıkonma zamanları 2,857, 3,002 ve 3,004. dk lardır. Bu alıkonma zamanları standart 3-NT için çalışıldığında elde edilen piklerin alıkonma zamanları ile uyumludur.

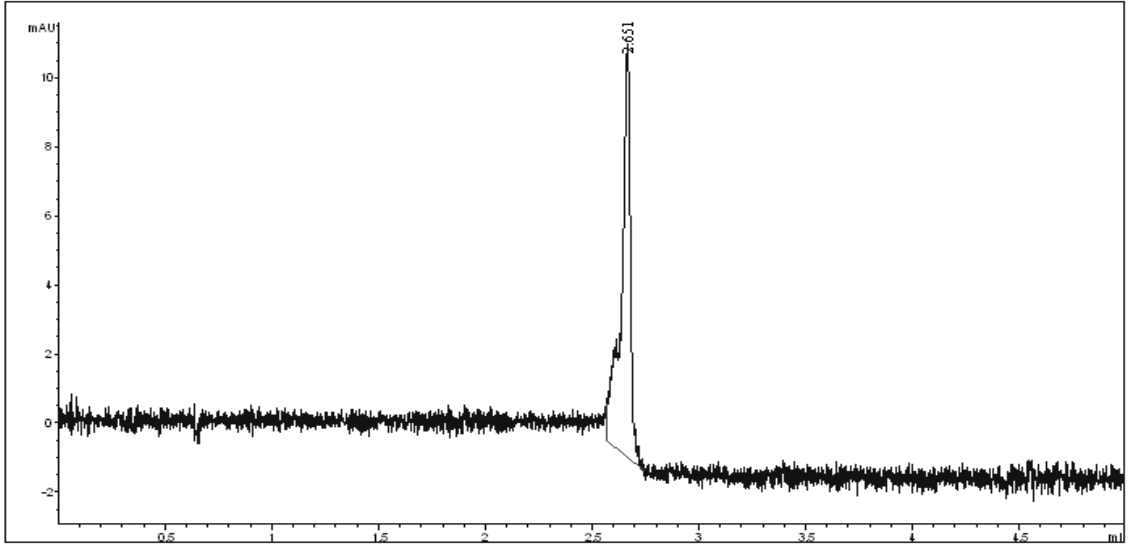
Seyreltilmiş plazma numuneleri için yapılan analiz sonucu elde edilen elektroforegramlar Şekil 4.67, Şekil 4.68 ve Şekil 4.69’ da, hesaplanan değerler de Çizelge 4.31’ de sunulmuştur. Bu değerlerin hesaplanmasında yöntem için belirlenen geri alınabilirlik yüzde değeri olan $106,23 \pm 11,93$ kullanılmıştır.



Şekil 4.69. Plazma 4 numunesi için (1:1000 oranında seyreltme) 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram



Şekil 4.70. Plazma 5 numunesi için (1:1000 oranında seyreltme) 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram



Şekil 4.71. Plazma 6 numunesi için (1:1000 oranında seyreltme) 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram

Çizelge 4.31. Doğrudan enjekte edilen plazma numuneleri için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen değerler

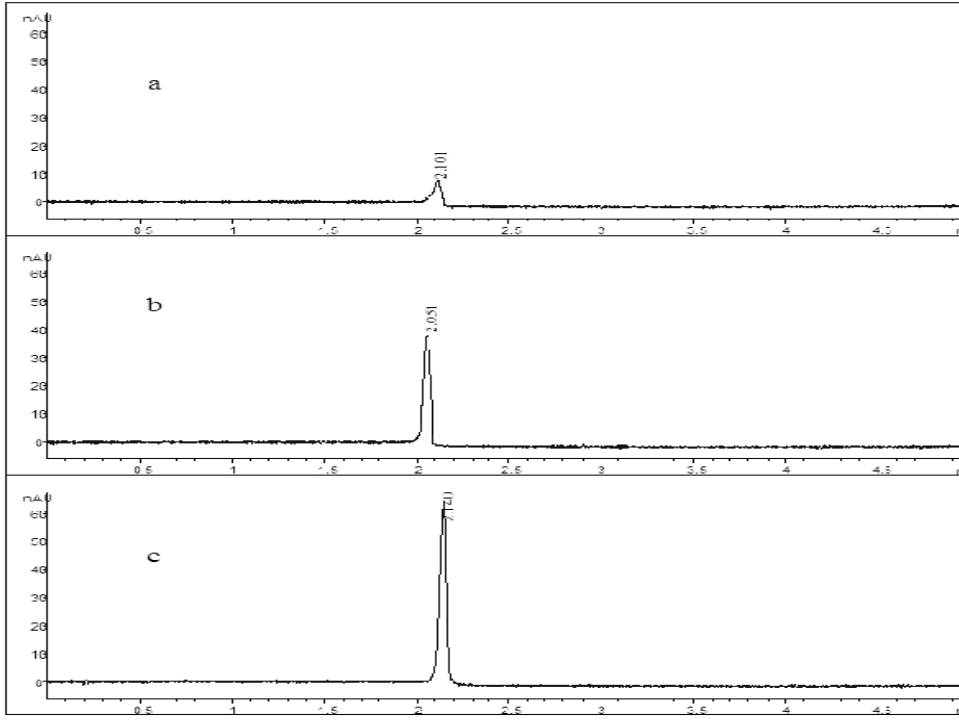
Numune	*Hesaplanan Derişimi ($M \times 10^6$)	3-NT	Plazmada 3-NT ($gx10^4/100$ mL)	Hesaplanan Derişimi	Ortalama Derişimi	3-NT ($gx10^4/100$ mL)
P4	4,09		0,93		$1,30 \pm 1,08$	
	2,00		0,45			
	11,2		2,53			
P5	23,3		5,27		$4,87 \pm 0,42$	
	21,7		4,91			
	19,6		4,43			
P6	18,6		4,21		$4,67 \pm 0,42$	
	22,1		5,03			
	21,2		4,77			

* Kalibrasyon eğrisi ve geri alınabilirlik değeri kullanılarak hesaplanan 3-NT derişimi

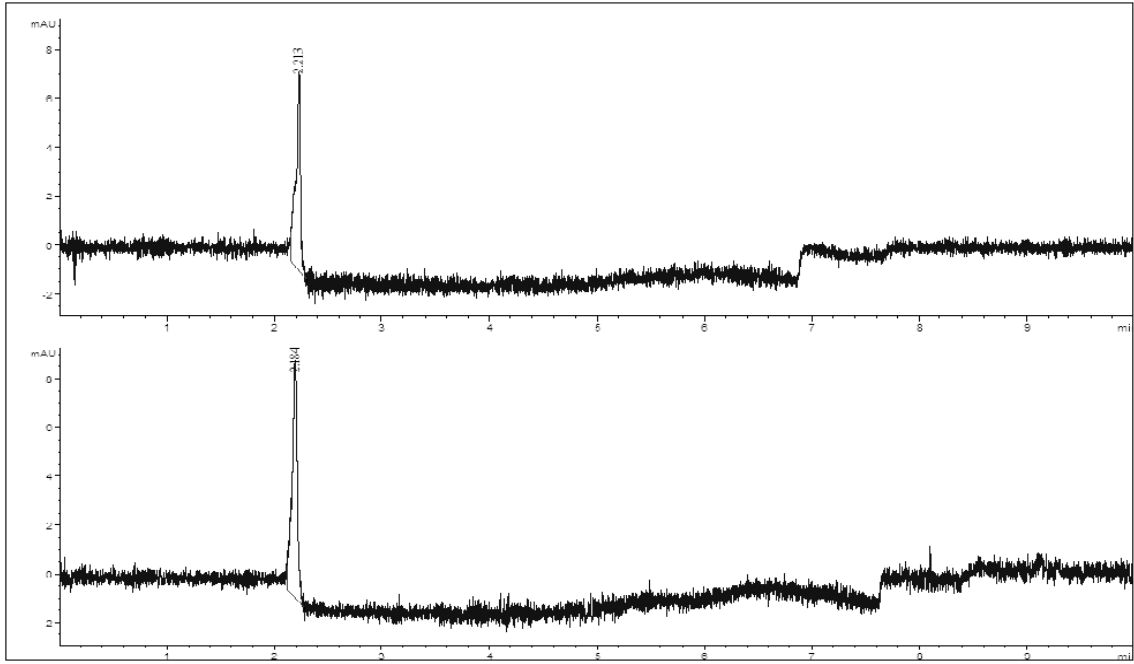
4.3.3.b. Özütleme İşlemi Yapılmış Plazma Analizleri

Özütleme işlemi yapılmış plazma numunelerinde öncelikle gözlenen pikin 3-NT ye ait olup olmadığı ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların sonuçları Şekil 4.70' de gösterilmektedir.

Hidrolizattan elde edilen elektroforegramda pikin 3-NT' e ait olup olmadığını anlayabilmek için ayrıca ortam pH sı değiştirilerek de analiz yapılmıştır. Bunun sebebi plazma analizlerinde gözlenen tek pikin üst üste gelmiş iki ya da daha fazla farklı madde olabileceği düşüncesidir. pH değişiminde ortamdaki farklılıktan dolayı maddelerin mobilitelerinde fark olabileceği ve böylece aynı çalışma şartlarında ayrılacağı düşünülmüştür. Deneme sonucunda pH değeri değiştirildiği halde alınan elektroforegramda yine tek bir pik gözlenmiştir. Böylece bu pikin 3-NT' e ait olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.72. Fosfat tamponunda (0,05mM CTAB içeren 0,10 M pH 7,0) 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında plazma hidrolizatu üzerine standart maddeler ilave edilerek elde edilen elektroforegramlar a) Özütleme işlemi uygulanıp seyreltilmiş plazma b) a+ $2,53 \times 10^{-9}$ M 3-NT c) a+ $3,80 \times 10^{-9}$ M 3-NT



Şekil 4.73. Fosfat tamponunda (0,05mM CTAB içeren 0,10 M) 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında plazma numunesi için elde edilen elektroforegramlar a) pH 7,0 b) pH 8,5

Şekil 4.70 ve Şekil 4.71 de gösterilen elektroforegramlarda gözlenen pikler alıkonma zamanlarına göre karşılaştırılmıştır.

3-NT standardı, eklenmiş plazma numuneleri ve plazma numunelerinde özütleme yapıp seyreltikten sonra denemeler yapılmış ve sonuçlar sırasıyla Çizelge 4.32, Çizelge 4.33 ve Çizelge 4.34' de verilmiştir.

Çizelge 4.32. Fosfat tamponunda (0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0) 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında 3-NT hidrolizatı için elde edilen değerler

Numune	Pik Yüksekliği (mAu)	Bulunması Gereken Miktar ($\text{gx}10^2$)	Bulunan Miktar ($\text{gx}10^4$)	% Alım	Geri
NT-1	$5,28 \pm 0,10$	1,02	2,79	2,74	
NT-2	$5,48 \pm 0,15$	1,06	3,03	2,86	
NT-3	$5,40 \pm 0,12$	1,05	2,93	2,79	
Ortalama				$2,79 \pm 0,06$	

Çizelge 4.33. Fosfat tamponunda (0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0) 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında eklenmiş plazma numuneleri için elde edilen değerler

Numune	Pik Yüksekliği (mAu)	Plazma Hesaplanan Miktar (gx10)	İçin Deney Sonucu Bulunan 3-NT Miktarı (gx10 ²)	3-NT Alımı %	Geri
SP1	3,16 ± 0,03	0,021	0,017	80,95	
SP2	3,10 ± 0,03	0,017	0,012	70,60	
SP3	3,16 ± 0,03	0,023	0,017	74,41	
Ortalama				75,32 ± 5,23	

Plazma numunelerinin analizinde eklenmiş plazma deneylerinin sonucuna göre elde edilen bu geri alınabilirlik değeri kullanılmıştır.

Çizelge 4.34. BHÖS-KE yönteminde fosfat tamponunda (0,05 mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0) 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında plazma numuneleri için elde edilen değerler

Numune	Hidrolizattaki 3-NT Derişimi (Mx10 ⁴)	Hesaplanan Derişim* (Mx10 ⁴)	Kullanılan Protein Miktarı (g)	Proteinde Hesaplanan 3-NT Miktarı (gx10 ⁵)	Plazmadaki 3-NT Derişimi (gx10 ⁴ /mL)	Plazmadaki Ortalama 3-NT Derişimi (gx10 ⁴ /mL)
P1	4,00	3,01	0,0229	1,36	4,16	3,42 ± 0,75
	3,21	2,42	0,0223	1,09	3,42	
	3,21	2,42	0,0286	1,09	2,67	
P2	5,08	3,83	0,0250	1,73	4,84	4,24 ± 0,80
	4,90	3,69	0,0280	1,67	4,18	
	4,50	3,39	0,0290	1,53	3,69	
P3	3,52	2,65	0,0221	1,20	3,80	3,78 ± 0,05
	3,70	2,79	0,0230	1,26	3,83	
	3,61	2,72	0,0231	1,23	3,72	

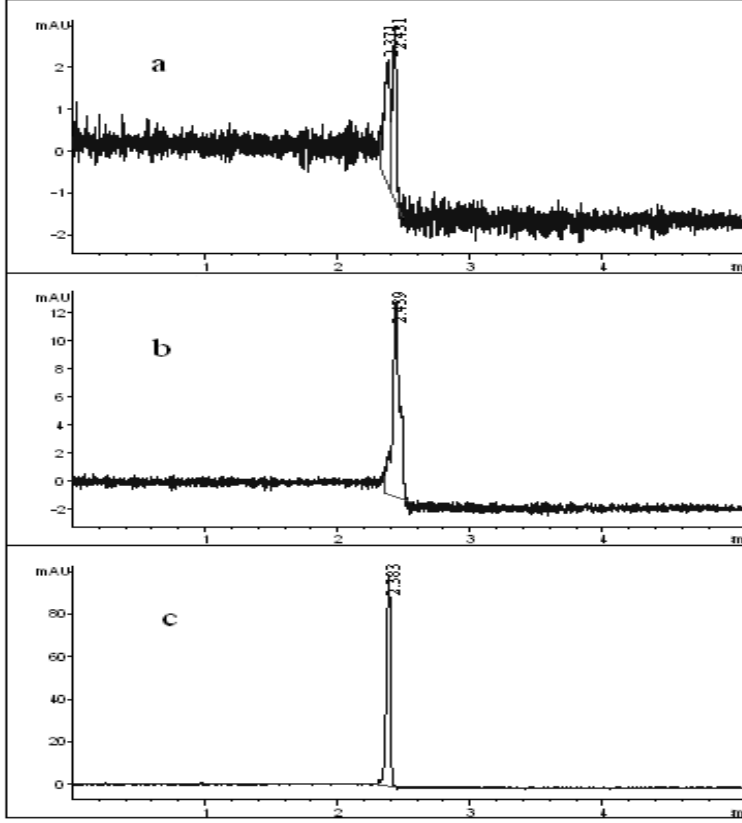
* Geri Alınabilirlik değeri kullandılarak hesaplanan 3-NT derişimi

4.3.4. BOS' ta Analizler

Bölüm 4.2.1.9' da belirtilen nedenlerden dolayı BOS numuneleri de öncelikle doğrudan analiz edilmiştir. Özütleme işlemi uygulanan BOS numunelerinde de analizler yapılmıştır.

4.3.4.a. Doğrudan BOS Analizleri

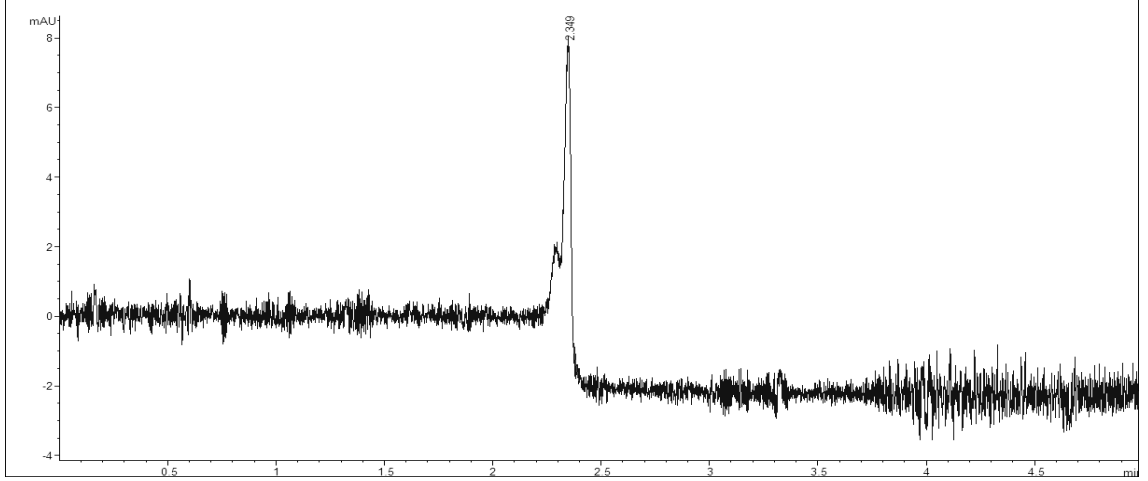
Doğrudan BOS analizlerinde öncelikle gözlenen piklerin 3-NT' e ait olduğunun belirlenebilmesi için ölçümler alınmıştır. Bu amaçla alıkonma zamanından ve standart madde ilavesi ile pik yüksekliğinde gözlenen artıştan faydalanılmıştır. Bu çalışma ile ilgili olarak elde edilen elektroforegramlar Şekil 4.72' de sunulmuştur.



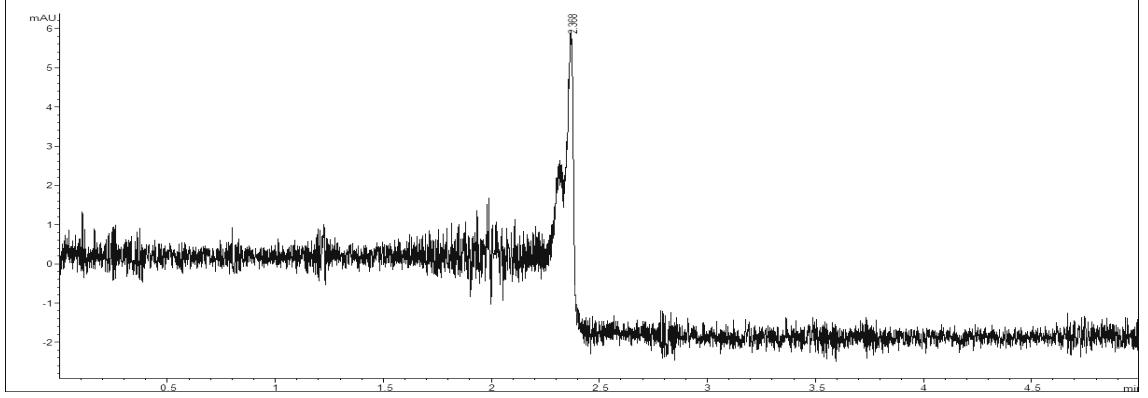
Şekil 4.74. Fosfat tamponunda (0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0) 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında BOS numunesi üzerine standart madde ilavesinde elde edilen elektroforegramlar a) BOS numunesi b) a+ $2,03 \times 10^{-7}$ M 3-NT c) a+ $4,05 \times 10^{-7}$ M 3-NT

Şekil 4.74' deki elektroforegramlarda gözlenen piklerin alıkonma zamanları karşılaştırılmıştır. Ayrıca standart 3-NT çözeltisi ilavesinde pik yüksekliklerinde de artış gözlenmiştir. Bu durum BOS numunesi için gözlenen pikin 3-NT' e ait olduğunu göstermektedir.

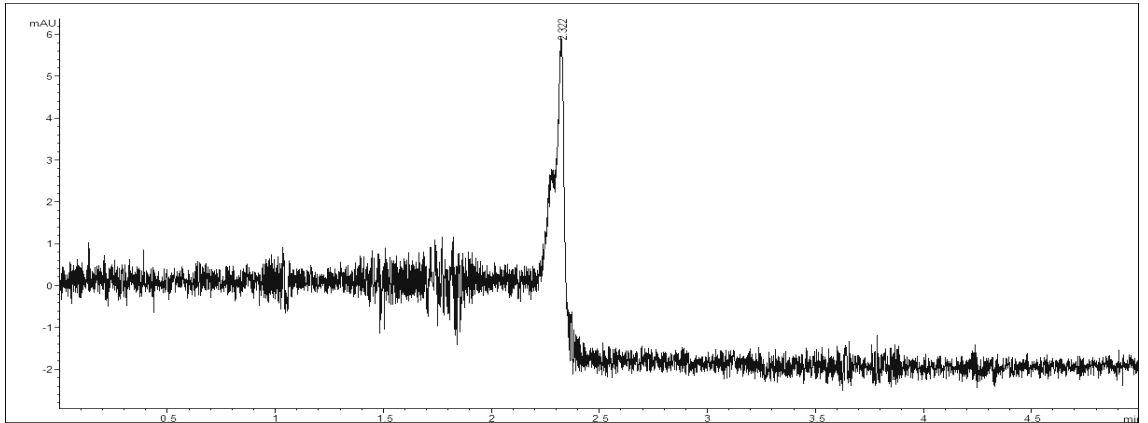
BOS numuneleri seyreltildikten sonra denemeler yapılmış, elde edilen elektroforegramlar Şekil 4.73- 82' de ve sonuçlar Çizelge 4.35' de sunulmuştur. Okunan cevaplardan CTAB kullanılan büyük hacimli örnek sıkıştırma yöntemi için elde edilen kalibrasyon eğrisi ile 3-NT derişimi hesaplanmıştır. Bu denemelerde yöntem için hesaplanan geri alınabilirlik yüzde değeri $106,23 \pm 11,93$ kullanılmıştır.



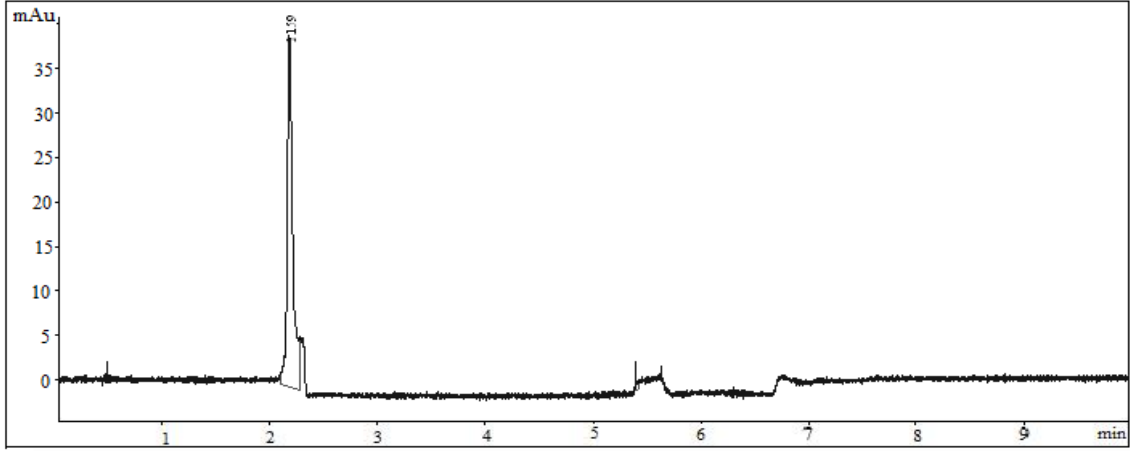
Şekil 4.75. BOS1 numunesi için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram



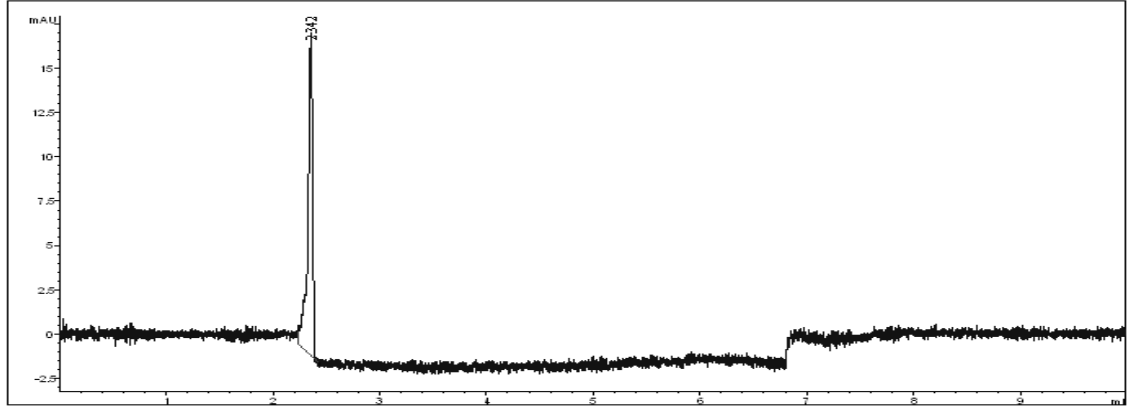
Şekil 4.76. BOS2 numunesi için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram



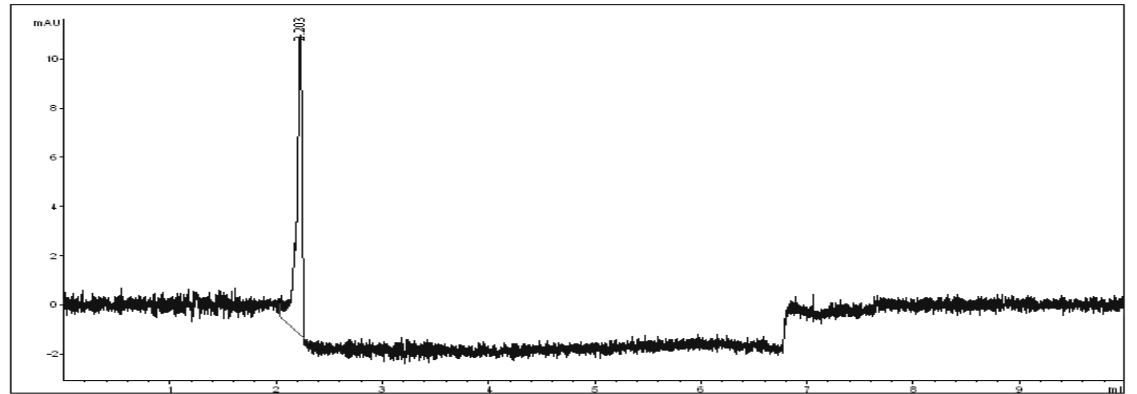
Şekil 4.77. BOS3 numunesi için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram



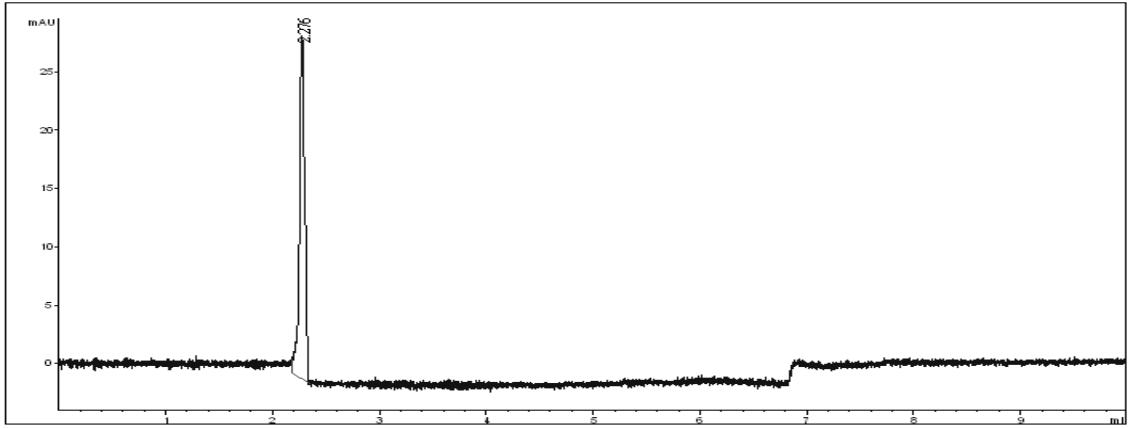
Şekil 4.78. BOS6 numunesi için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram



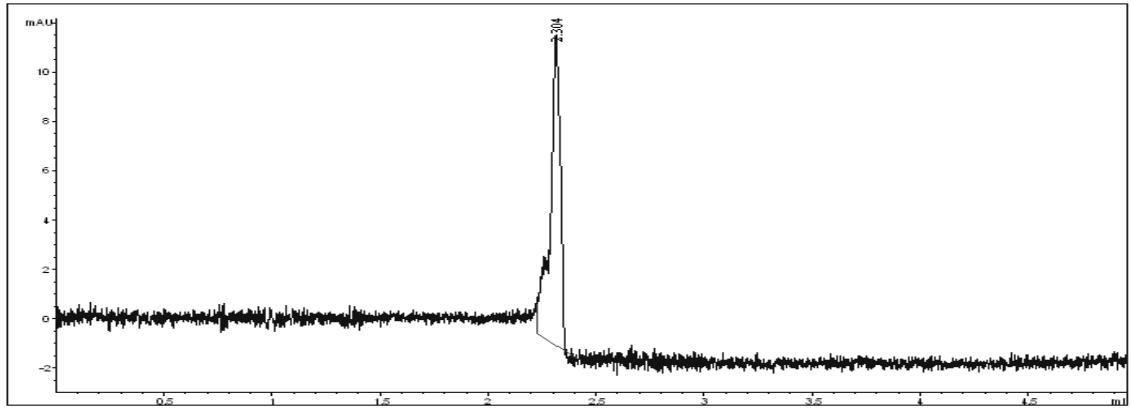
Şekil 4.79. BOS8 numunesi için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram



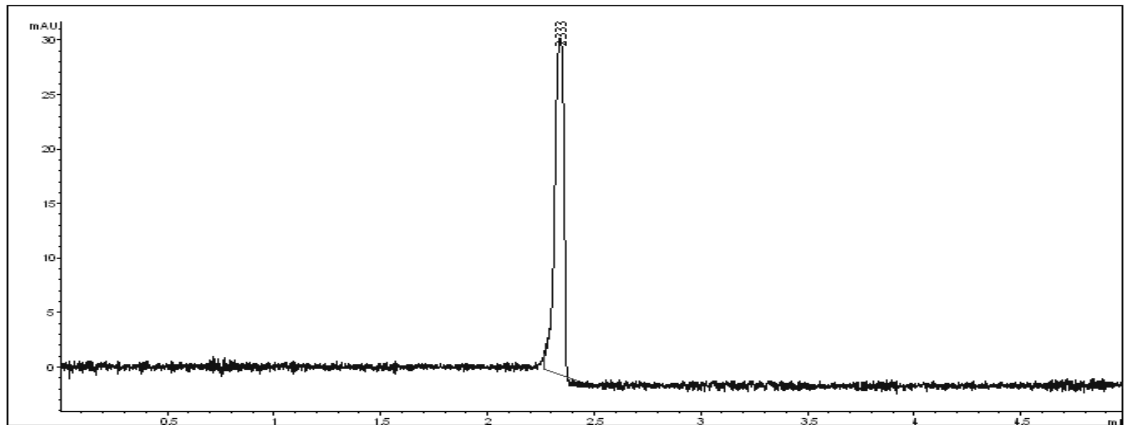
Şekil 4.80. BOS10 numunesi için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram



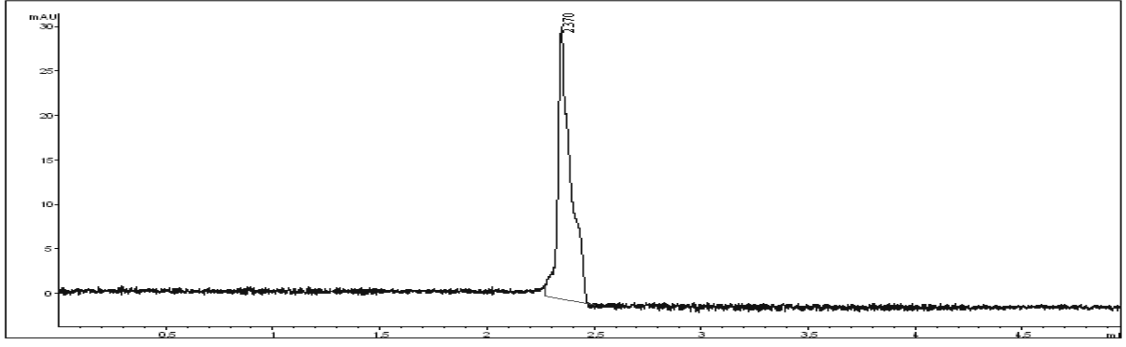
Şekil 4.81. BOS11 numunesi için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram



Şekil 4.82. BOS12 numunesi için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram



Şekil 4.83. BOS13 numunesi için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram



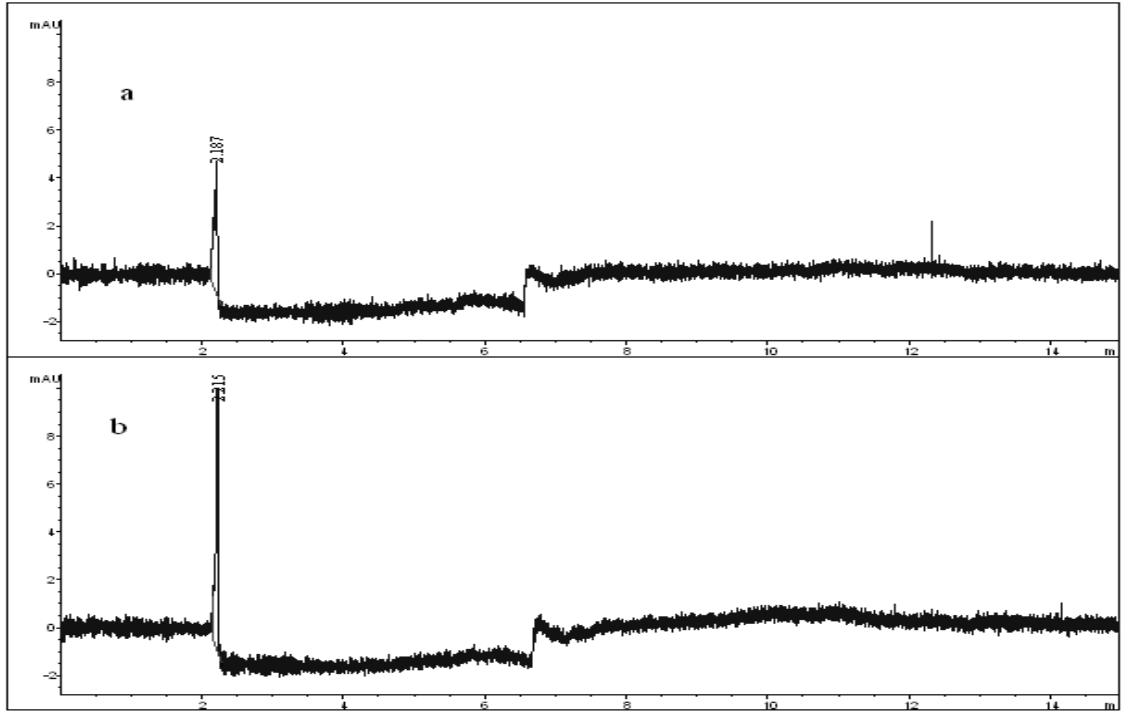
Şekil 4.84. BOS14 numunesi için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram

Çizelge 4.35. Doğrudan BOS analizleri için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında alınan sonuçlar

Numune	Pik yüksekliği (mAu)	Hidroizatta Bulunan Derişim ($M \times 10^5$)	Hesaplanan Derişim ($M \times 10^5$)	Hesaplanan 3- NT Derişimi ($gx10^4 / 100 \text{ mL}$)
BOS1	$7,87 \pm 0,51$	2,61	3,46	7,83
BOS2	$7,07 \pm 0,21$	2,18	2,90	6,56
BOS3	$6,90 \pm 0,20$	2,09	2,78	6,30
BOS6	$39,97 \pm 5,06$	49,7	46,8	105,86
BOS8	$15,30 \pm 2,95$	16,6	15,6	35,28
BOS10	$12,10 \pm 1,32$	12,3	11,6	26,24
BOS11	$26,73 \pm 6,73$	32,0	30,1	68,08
BOS12	$9,06 \pm 0,55$	8,18	7,70	17,42
BOS13	$57,63 \pm 5,42$	106,0	99,8	225,73
BOS14	$28,77 \pm 2,30$	38,4	36,1	81,65

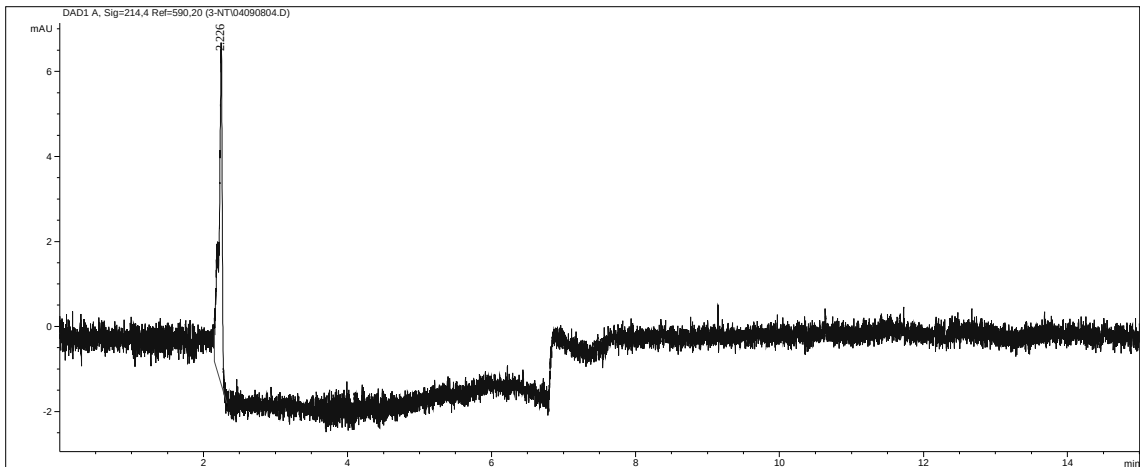
4.3.4.b. Özütleme İşlemi Yapılmış BOS Analizleri

Özütleme işlemi uygulanmış BOS numunelerinde öncelikle alıkonma zamanı ve standart madde ilavesi ile pik yüksekliğindeki artış incelenmiş ve 3-NT piki tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmaya bir örnek Şekil 4.83' de gösterilmektedir.

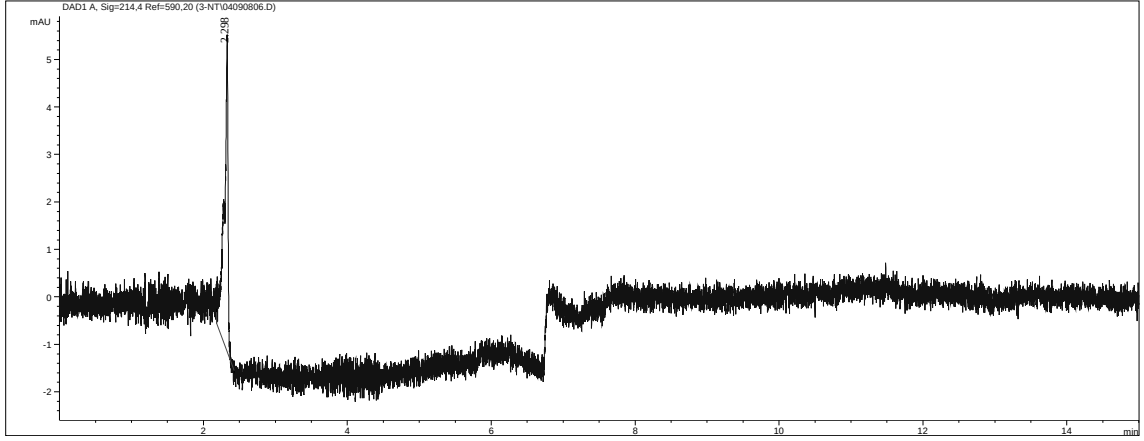


Şekil 4.85. Fosfat tamponunda (0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0) 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegramlar a) BOS hidrolizatu b) a+ $8,11 \times 10^{-8}$ M 3-NT

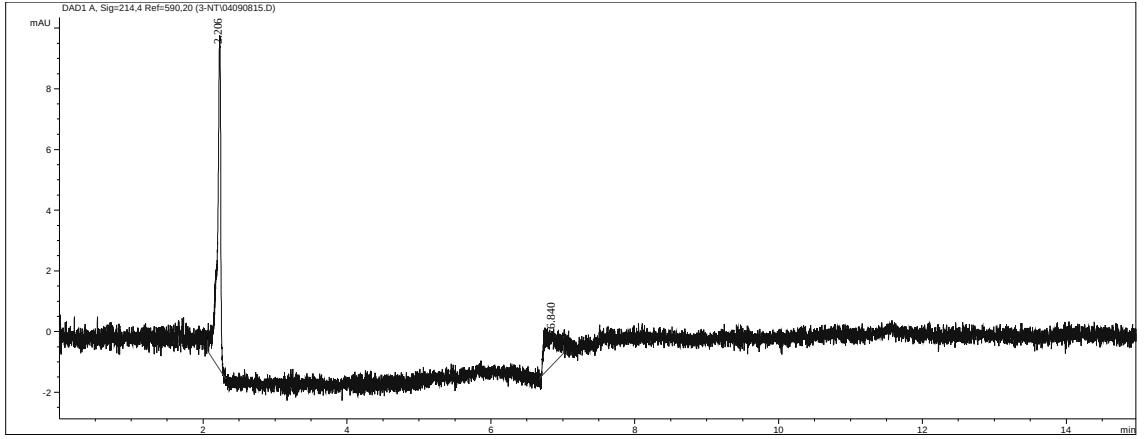
BOS numunelerinde özütlenme yapıp seyreltildikten sonra denemeler yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.36' da verilmiştir. BOS numunelerinde analiz sonuçları verilirken derişim aralığı verilmek zorunda kalınmıştır. Bunun nedeni BOS numunelerinde protein miktarının 15-45 mg/ 100 mL olarak bir aralıkta verilmesidir. Bu nedenle bu protein oranları esas alınarak 3-NT' nin bulunduğu derişim aralığı verilmiştir.



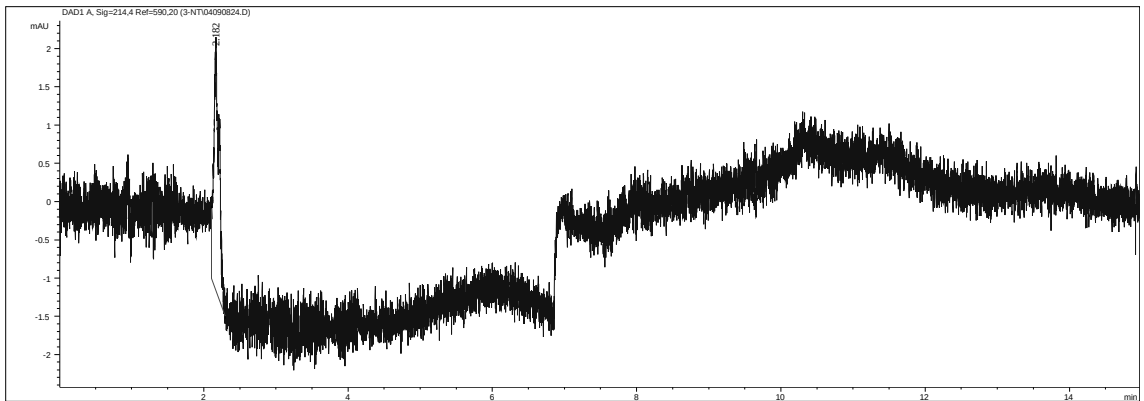
Şekil 4.86. BOS1 hidrolizatu için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram



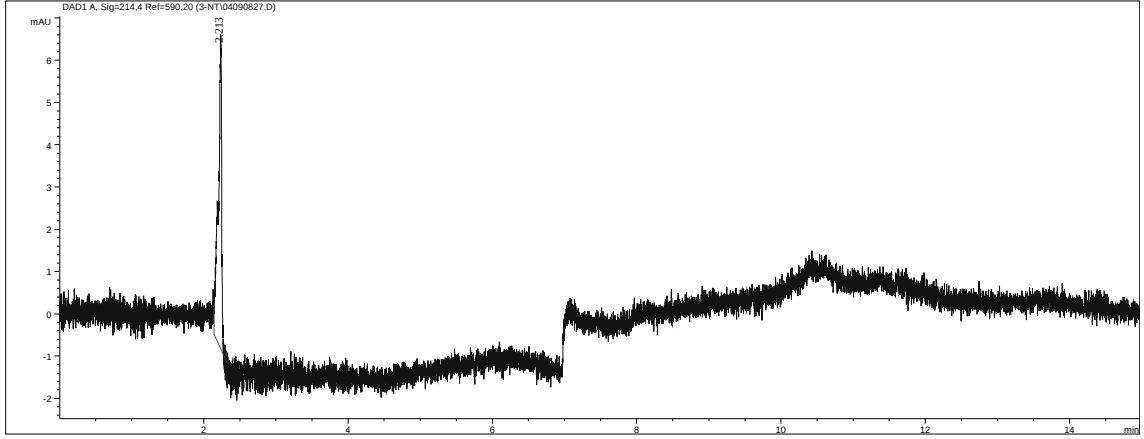
Şekil 4.87. BOS2 hidrolizatı için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram



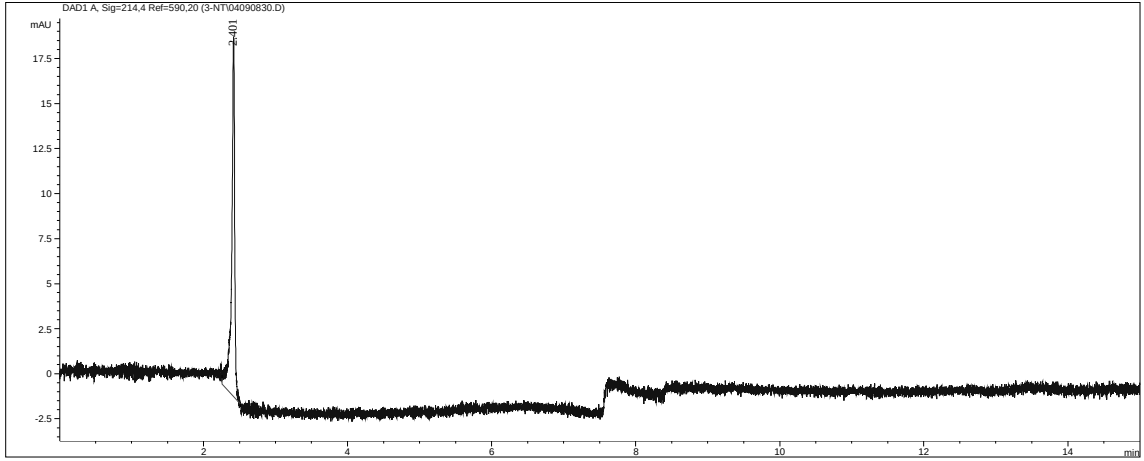
Şekil 4.88. BOS3 hidrolizatı için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram



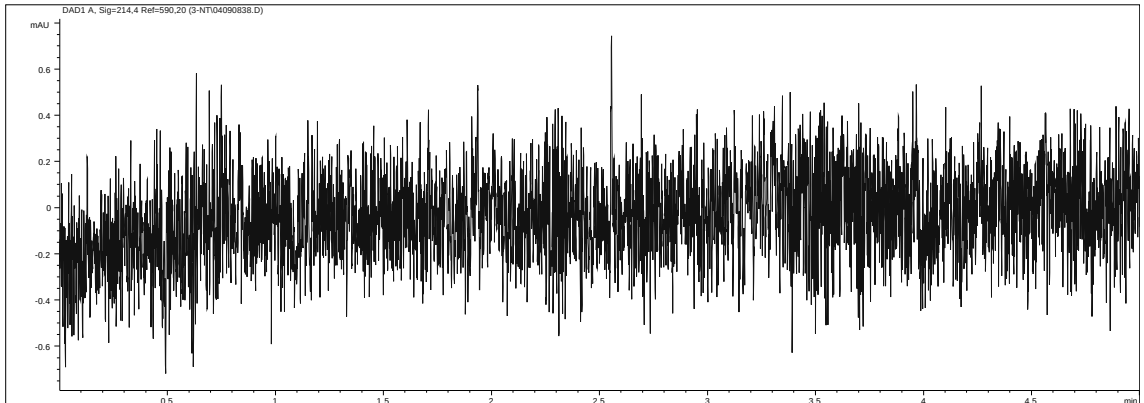
Şekil 4.89. BOS4 hidrolizatı için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram



Şekil 4.90. BOS5 hidrolizatı için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram



Şekil 4.91. BOS8 hidrolizatı için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram



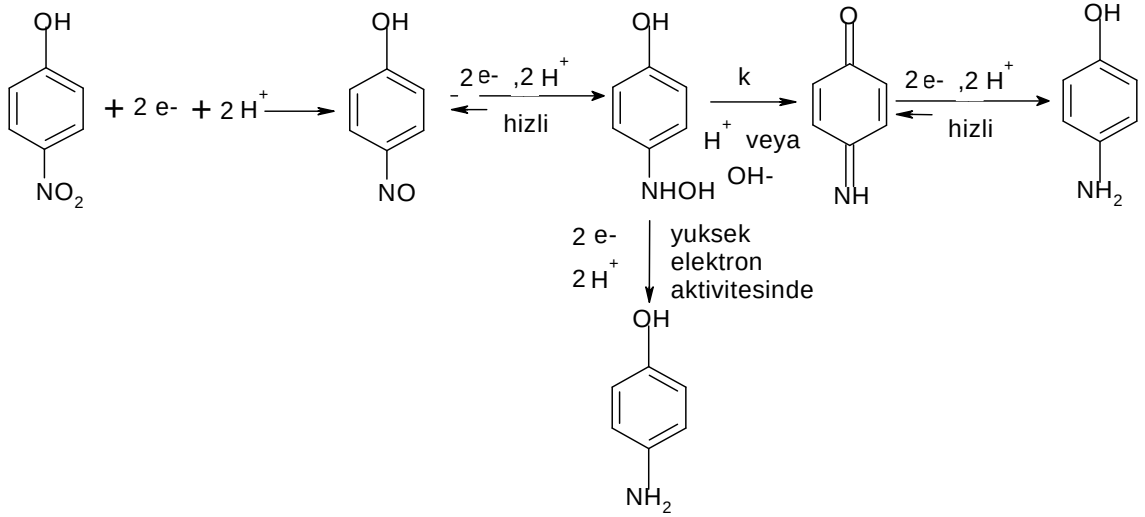
Şekil 4.92. BOS9 hidrolizatı için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen elektroforegram

Çizelge 4.36. Özütleme işlemi yapılmış BOS numuneleri için 0,05mM CTAB içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta -20 kV ayırma potansiyeli ve 500 s enjeksiyon şartında elde edilen değerler (n=5)

Numune	Pik Yüksekliği (mAu)	Hidrolizatta Bulunan Derişim (Mx10 ⁴)	Hesaplanan Derişim (Mx10 ⁴)	3-NT Derişimi (gx 10 ⁴ / mL)	BOS Hesaplanan 3- NT Derişimi (gx10 ⁴ /100mL)
BOS1	7,57 ± 0,49	12,23	16,23	1,28	3,92 – 11,76
BOS2	6,70 ± 0,90	9,92	13,17	0,36	3,18 – 9,53
BOS3	10,83 ± 0,47	21,73	28,85	0,78	6,16 – 18,47
BOS4	3,23 ± 0,06	0,71	0,94	0,04	0,22 – 0,67
BOS5	7,13 ± 0,38	11,08	14,71	0,25	2,68 – 8,04
BOS8	19,47 ± 0,47	43,9	58,28	7,38	13,18 – 39,54
BOS9	Gözlenemedi	-	-	-	-

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmada protein oksidasyonunun sonucunda ortaya çıkan 3-NT' in tayini için voltametrik ve kapiler elektroforetik tekniklerle analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Voltametrik çalışmalarda yöntem geliştirmenin yanı sıra, 3-NT' nin indirgenmesi ile ilgili mekanizma da araştırılmıştır. Elektrokimyasal kaynaklardan nitrofenol bileşiklerinin indirgenmesi araştırıldığında, 6 veya 4 elektron aktarımlı tek adımlı tepkimelerin olduğu bilgisine ulaşılmaktadır. Dört elektron aktarımlı tepkimenin sonucunda hidroksilaminofenol (HAF) oluşmaktadır. Dehidrasyon basamağının yeterince hızlı olduğu durumlarda ise altı elektron aktarımlı tepkimenin ortaya çıktığı ve son ürünün amin bileşiği olduğu bildirilmektedir. Asit veya bazda o-nitrofenolün o-aminofenole indirgendiği de belirtilmektedir (Zuman ve ark., 1969). Açıklanan mekanizmalarla ilgili tepkimeler Şekil 5.1' de gösterilmektedir



Şekil 5.1. Nitrofenollerin indirgenmesi ile ilgili tepkime mekanizmaları (Zuman ve ark., 1969)

Yapılan çalışmada kare dalga voltametrisi ile elde edilen tek pikin, literatürde verilen bilgiye uygun olarak tek basamaklı dört elektron aktarımlı tepkime (Şekil 5.2) sonucu 3-NT' in hidroksilaminofenol bileşiğine dönüşümü nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Çizelge 5.1 incelendiğinde AdSKDV yönteminin, diğer yöntemlere göre daha düşük düzeylerde çalışmaya izin verdiği görülmektedir. Ayrıca kalibrasyon eğrisini oluşturan veriler için hesaplanan korelasyon katsayısının, diğer yöntemlerdeki değerlerle kıyaslandığında 1' e daha yakın olduğu, dolayısıyla değişimin daha doğrusal olduğu gözlenmiştir. Eğim değerlerinin incelenmesi sonucu kapiler elektroforetik yöntemin diğerlerine göre daha hassas olduğu düşünülebilir. Fakat burada eğimin bu denli büyük oluşunun sebebi sadece, derişimle karşılaştırıldığında ölçülen pik yüksekliklerinin sayısal olarak daha büyük değerde oluşudur. Farklı teknikler olduğu için kare dalga voltametrisi ve adsorptif sıyırma kare dalga voltametrisi yöntemleri, bu bakımdan kapiler elektroforetik teknikle karşılaştırılmamalıdır. Ancak voltametri tekniği ile geliştirilen KDV ve AdSKDV yöntemleri kendi aralarında eğim değerleri karşılaştırılarak kıyaslanabilir. Bu durumda da yine daha yüksek eğim değerine sahip olduğu için AdSKDV yönteminin daha duyarlı olduğu söylenebilir.

Geliştirilen yöntemlerin karşılaştırılması için yapılması gereken diğer bir işlem de analiz sonuçlarını istatistiksel olarak kıyaslamaktır. Bu amaçla aynı numuneler için elde edilen analiz sonuçları ve standart sapmaları kullanılır. Yapılan çalışmada özütleme işlemi uygulanmış plazma numunelerinde ortalama değerlerin birbirinden farklı olup olmadığının anlaşılabilmesi için % 95 güven seviyesinde *student t testi* uygulanmıştır. Test uygulanırken “null hipotezi” her iki yöntemde elde edilen sonuçların ortalamasının aynı olduğu üzerine kurulmuştur. Hesaplama ile bulunan *t* değeri tabloda verilen *t* değeri ile karşılaştırılmış ve yorumlanmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmada kullanılan veriler Çizelge 5.2’ de sunulmuştur.

Özütleme işlemi uygulanmış plazma numunelerinin analizlerinde elde edilen sonuçlar için uygulanan testin sonucuna göre; iki yöntemde elde edilen sonuçlar % 95 güven seviyesinde birbirinden önemli derecede farklıdır. Geliştirilen yöntemde aynı numuneler için ölçülen 3-NT miktarları birbirinden farklıdır. Hangi yöntemin daha doğru sonuç verdiği ise ancak referans bir yöntem ile belirlenebilir. Elimizdeki imkânlar buna izin vermediğinden geliştirilen yöntemlerin referans yöntemle kıyaslanması yapılamamıştır.

BHÖS –KE yönteminde özütleme işlemi uygulanmış ve doğrudan analiz edilmiş BOS numunelerinin analizi sonucu elde edilen değerlerin kıyaslanması ile olumlu bir sonuca ulaşılmıştır. Bu sonuç da bu şekilde elde edilen değerlerin birbirleri ile uyumlu olmasıdır. BOS numunelerinin doğrudan analiz edilmesi ile alınan sonuçlar, özütleme

işlemi uygulandıktan sonra analiz edilen numunelerde alınan sonuç aralığı içerisinde. Örneğin BOS 1 numunesinde doğrudan analiz yöntemi ile 3-NT derişimi $7,83 \times 10^{-4}$ g/100 mL olarak bulunan değer, özütleme işlemi sonucu elde edilen $3,92-11,76 \times 10^{-4}$ g/100 mL aralığının içerisinde. Böylelikle kapiler elektroforez tekniği ile geliştirilen BHÖS-KE yönteminin doğrudan numuneleri analiz etmedeki başarısı ortaya çıkmış olmaktadır. Bu, bir analitik yöntem için oldukça istenen bir durum ve geliştirilen BHÖS-KE yönteminin tercihi için apaçık bir nedendir.

Çizelge 5.2. Plazma numuneleri için AdSKDV yöntemi ve BHÖS KE yöntemiyle elde edilen sonuçlar

Numune	AdSKDV* (gx10 ⁴ / mL)	BHÖS KE** (gx10 ⁴ / mL)	Hesaplanan t Değeri	% 95 Güven Seviyesinde Tablo Değeri
P1	2,34	4,16	15,03	2,57
	3,08	3,42		
	2,71	2,67		
	3,00			
P2	1,86	4,84	15,46	2,57
	2,30	4,18		
	1,94	3,69		
	1,99			
P3	4,16	3,80	61,76	2,57
	4,67	3,83		
	4,27	3,72		
	4,42			

* Adsorptif Sıyırma Kare Dalga Voltametri ** Büyük Hacimli Örnek Sıkıştırılmalı Kapiler Elektroforez

Çalışmada 3-NT' in plazma ve beyin omurilik sıvısında analizi için üç farklı yöntem geliştirilmiş, bunlardan ikisi analizler için kullanılmıştır. Yöntemlerden AdSKDV yöntemi en düşük doğrusal derişim aralığına sahip olmasına rağmen, aynı zamanda bir ayırma tekniği olan BHÖS-KE yöntemi yanında güçsüz kalmıştır. Çünkü AdSKDV yöntemde biyolojik sıvıda analizlerin başarılabilmesi için bir özütleme işlemine gereksinim duyulmaktadır. Literatürde de belirtildiği gibi 3-NT' in özütleme işlemlerinde yapay olarak 3-NT oluşumu da mümkün olmaktadır. Bu nedenle özütleme

yapılmaksızın analizlerin başarılabildiği BHÖS-KE yöntemi daha üstün görünmektedir. İlerleyen aşamalarda AdSKDV yöntemi için daha iyi bir özütleme yönteminin kullanılması, analiz için daha iyi geri alınabilirlik değerlerinin elde edilmesini sağlayabilir. Geliştirilen AdSKDV yöntemi bu dezavantajların yanında çok önemli bir üstünlüğe sahiptir. Bu da 3-NT' nin daha önce bu yöntemle hiç analiz edilmemiş olmasıdır. Çalışmamız 3-NT' in AdSKDV yöntemi ile analizi konusunda öncü niteliktedir.

6. KAYNAKLAR

- Albert M., Debusschere L., Demesmay C., Rocca J.L., 1997**, Large volume stacking for quantitative analysis of anion in capillary electrophoresis II. Large volume stacking without polarity switching, *Journal of Chromatography A*, 757, 291-296
- Alpar R., 2003**, “*Uygulamalı çok değişkenli istatistiksel yöntemlere giriş*”, Nobel, Ankara
- Bessonova E.A., Kartsova L.A., Shumukov A.U., 2007**, Electrophoretic determination of albumin in urine using on-line concentration techniques, *J. Chromatography A*, 1150 (1-2), 332-8
- Beyin- Omurilik Sıvısı Biyokimyası**, <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/56-shmyo-14.ppt>, 13.09.08
- Bond A.M., 1980**, “*Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry*”, Marcel Dekker, New York, p. 196
- Breen A. P., Murphy J.A., 1995**, Review: Reactions of Oxyl Radicals with DNA, *Free Radic. Biol. Med.*, 18, 1033-1077
- Burn D.T., Danzer K., Townshend A., 2002**, Use of the terms “recovery” and “apparent recovery” in analytical pocedures, *Pure Appl., Chem.*, Vol. 74, No. 11, 2201-2205
- Capillary Electrophoresis**, <http://www.rsc.org/pdf/books/capelectrosc.pdf>, 23.06.2004
- Capillary Electrophoresis**, http://www.ceandcec.com/ce_theory.htm, 23.06.2004
- Capillary Electrophoresis**, http://www.chemsoc.org/exemplarchem/entries/2003/leeds_chromatography/chromatography/eof.htm, 28.02.2004
- Ceriello A., Mercuri E., Quagliaro L., Assaloni R., Motz E., Tanutti L., Tabaga C., 2001**, Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative strass, *Diabetologia*, 44, 834- 838
- Chien R.L., Helmer J.C., 1991**, Electroosmotic Properties and Peak Broadening in Field-Amplified Capillary Electrophoresis, *Analytical Chemistry*, 63, 1354-1361
- Chien R.L., Burgi D.S., 1992**, Sample stacking of an extremely large injection volume in high-performance capillary electrophoresis, *Anal. Chem.*, 64, 1046-1050
- CRC Handbook of Chemistry and Physics**, 60 th edition, CRC pres, Florida, USA, F-51
- Crowley J.R., Yarasheski K., Leeuwenburgh C., Turk J., Heinecke J.W., 1998**, Isotope dilution mass spectrometric quantification of 3-nitrotyrosine in proteins and tissues is facilitated by reduction to 3-aminotyrosine, *Analytical Biochemistry*, 259, 127-135
- Çakatay U., Kayalı R., 2004**, Protein Oksidasyonunun Klinik Önemi, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi, Cilt (Sayı) 32 (3)*, 140-149
- Davies M.J., Fu S., Wang H., Dean R.T., 1999**, Stable markers of oxidant damage to proteins and their applications in the study of human disease, *Free Radic. Biol. Med.*, 27, 1151-1163
- Delatour T., Richoz J., Vouros P., Turesky R.J., 2002**, Simultaneous determination of 3-nitrotyrosine and tyrosine in plasma of rats and assessment of arifactual tyrosine nitration, *Journal of Chromatography B*, 779, 189-199
- Dean S. Burgi, 1993**, Large Volume Stacking of Anions in Capillary Electrophoresis Using an Electroosmotic Flow Modifier as a Pump, *Analytical Chemistry*, 65, 3726-3729

- Du M., Wu W., Ercal N., Ma Y., 2004**, Simultaneous determination of 3-nitrotyrosine, o-, m-, and p-tyrosine in urine samples by liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection with pre-column cloud point extraction, *Journal of Chromatography B*, 803, 321-329
- Duncan M.W., 2003**, A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine, *Amino Acids*, 25, 351- 361
- Girault I., Karu A.E., Schaper M., Hoff M.H.B., Hagen T., Vogel D.S., Ames B.N., Christen S., Shigenaga M.K., 2001**, Immunodetection of 3-nitrotyrosine in the liver of Zymosan-treated rats with a new monoclonal antibody: comparison to analysis by HPLC, *Free Radical, Biology and Medicine*, 31 (11), 1375- 1387
- Göen T., Lux A.M., Dewes P., Musiol A., Kraus T., 2005**, Sensitive and accurate analysis of free 3-nitrotyrosine in exhaled breath condensate by LC_MS/MS, *Journal of Chromatography B*, 826(1-2), 261-266
- Gülbahar Ö., 2007**, Protein oksidasyonunun mekanizması, önemi ve yaşlılıkla ilgisi, *Turkish Journal of Geriatrics*, 10 (1):43-48
- He S., Zhao Y., Zhu Z., Liu H., Li M., Shao Y., Zhuang Q., 2006**, Comparative Study for the Analysis of Parabens by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography with and without Large-Volume Sample Stacking Technique, *Talanta*, 69, 166-171
- Hensley K., Maitt M.L., Pye Q.N., Stewart C.A., Wack M., Tabatabare T., Floyd R.A., 1997**, Quantitation of Protein-bound 3-nitrotyrosine and 3,4-dihydroxyphenylalanine by High- Performance Liquid Chromatography with Electrochemical array Detection, *Analytica Biochemistry*, 251, 187- 195
- Hensley K., Williamson K. S., Floyd R. A., 2000**, Measurement of 3-nitrotyrosine and 5-nitro- γ -tocopherol by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 28, No. 4, 520-528
- Hiraoka A., Tominaga I., Hori K., 2000**, Sodium dodecylsulfate capillary gel electrophoretic measurement of the concentration ratios of albumin and α_2 -macroglobulin in cerebrospinal fluid and serum of patients with neurological disorders, *Journal of Chromatography A*, 895, 339-344
- Hrbac J. ve Kohen R., 2000**, Biological redox activity: Its importance, methods for its quantification and implication for health and disease, *Drug Development Research* 50: 516-527
- Jiang H., Balazy M., 1998**, Detection of 3-nitrotyrosine in human platelets exposed to peroxynitrite by a new gas chromatography/mass spectrometry assay, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, Vol. 2, No. 5, 350-359
- Jorgenson J.W., Lukacs K.D., 1981**, Zone electrophoresis in open tubular glass capillaries, *Anal. Chem.*, 53, 1298; **Landers J.P., 1997**, *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, 485
- Karakartal M., 2004**, Organoklorürlü Pestisitlerle Poliklorobifenillerin Ayırımı, 2004, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 81
- Kayalı R., Çakatay U., 2004**, Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 35 (2), 83-89
- Keha E.E., Küfrevioğlu Ö.İ., 2004**, *Biyokimya*, 3. Baskı, Aktif Yayınevi, Erzurum, 9
- Khan J., Brennan D.M., Bradley N., Gao B., Bruckdorfer R., Jacobs M., 1998**, 3-nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method, *Biochem. J.*, 330, 795- 801

- Kissinger P.T., Heineman W.R., 1996a**, *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker Inc., New York, 719
- Kissinger P.T., Heineman W.R., 1996b**, *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker Inc., New York, 720
- Landers J.P., 1997a**, *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, 381
- Landers J.P., 1997b**, *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, 7
- Landers J.P., 1997c**, *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, 4
- Landers J.P., 1997d**, *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, 9
- Landers J.P., 1997e**, *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, 11
- Landers J.P., 1997f**, *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, 12
- Landers J.P., 1997g**, *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, 13
- Landers J.P., 1997h**, *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, 868
- Landers J.P., 1997i**, *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, 52
- Landers J.P., 1997j**, *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, 480
- Landers J.P., 1997k**, *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, 483
- Landers J.P., 1997l**, *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, 485
- Landers J.P., 1997m**, *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, 487
- Landers J.P., 1997n**, *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, 488
- Landers J.P., 1997o**, *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, 7
- Lärstad M., Söderling A.S., Caidahl K., Olin A.C., September 2005**, Selective quantification of free 3-nitrotyrosine in exhaled breath condensate in asthma using gas chromatography/ tandem mass spectrometry, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, , Vol. 13,Is. 2, 134-144
- Llamas G.A., Cea A.R., Campa M.R. F., Medel A.S., 2003**, Large Volume Sample Stacking Capillary Electrophoresis for Methallothioneins Analysis in Eel Liver, *Analytica Chimica Acta*, 486, 183-190
- Li S.F.Y., 1992a**, *Capillary Electrophoresis, Principles, Practices and Applications*, Elsevier Science Publishers, Netherlands, , s 14.
- Li S.F.Y., 1992b**, *Capillary Electrophoresis, Principles, Practices and Applications*, Elsevier Science Publishers, Netherlands, , s 5.
- Li S.F.Y., 1992c**, *Capillary Electrophoresis, Principles, Practices and Applications*, Elsevier Science Publishers, Netherlands, , s 8.

- Maeso N., Cifuentes A., Barbas C., 2004**, Large-volume sample stacking-capillary electrophoresis used for the determination of 3-nitrotyrosine in rat urine, *Journal of Chromatography B*, 809, 147-152
- Manaenkov O.V., Sidorov A.I., Sul'man E.M., 2003**, Rapid determination of amino acids by capillary electrophoresis without preliminary derivatization, *Journal of Analytical Chemistry*, 58,10,979-982
- Mc Manigill D., Swedberg S.A., 1989**, Factors affecting plate height in high performance zonal capillary electrophoresis (HPZCE), in *Tech. in Protein Chem.*, Hugli T. Ed., Academic Press, San Diego, 468; **Landers J.P., 1997g**, *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, 13
- Mercan U., 2004**, Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi, *YYÜ, Vet. Fak. Derg.*, 15 (1-2): 91-96
- Micellar Electrokinetic Chromatography**, <http://www.ceandcec.com/266924%20-%20CE%20Primer%203.pdf> , 28.02.2005
- Miller J.C., Miller J.N., 1993**, *Statistics for Analytical Chemistry*, 3rd Edn. Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK, 115
- Nielen M.W.F., 1993**, Trace enrichment of environmental samples in capillary zone electrophoresis, *Trends in Anal. Chem.*, 63, 1354, **Landers J.P., 1997**, *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, 486
- Ohshima H., Celan I., Chazotte L., Pignatelli B., Mower H.F., 1999**, Analysis of 3-nitrotyrosine in Biological Fluids and Protein Hydrolyzates by High Performance Liquid Chromatography Using a Postseparation, On-line Reduction Column and Electrochemical Detector: Results with Various Nitrating Agents, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, Vol. 3, No.2, 132- 141
- Orhan H., Vermeulen N.P.E., Tump C., Zappey H., Meerman J.H.N., 2004**, Simultaneous determination of tyrosine, phenylalanine and deoxyguanosine oxidation products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry as non-invasive biomarkers for oxidative damage, *Journal of Chromatography B*, 799, 245-254
- Pagliai C.H., Kotecha S., Shuker D.E.G., 1998**, Analytical methods for 3-nitrotyrosine as a Marker of Exposure to Reactive Nitrogen Species: A Review, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, Vol. 2, No. 5, 324–336
- Phillips T.M., 2004**, Rapid analysis of inflammatory cytokines in cerebrospinal fluid using chip-based immunoaffinity electrophoresis, *Electrophoresis*, 25, 1652-1659
- Plazma**, <http://www.bibilgi.com/PLAZMA>, 24.10.2008
- Quirino J.P., Terabe S., 1999**, Sample Stacking of Fast-Moving Anions in Capillary Zone Electrophoresis with pH-Supressed Electroosmotic Flow, *Journal of Chromatography*, 850, 339-344
- Ramautar R., Somsen G.W., Jong G.J., 2007**, Direct sample injection for capillary electrophoretic determination of organic acids in cerebrospinal fluid, *Anal. Bioanal. Chem.*, 387, 293-301
- Reinoud N., Tjaden U.R., van der Greef J., 1993**, Automated on-capillary isotachophoretic reaction cell for fluorescence derivatization of small sample volumes at low concentration followed by capillary zone electrophoresis, *J., Chromatography*, 673, 225

- Ryberg H., Söderling A., Davidsson P., Blennow K., Caidahl K., Persson L. I., 2004**, Cerebrospinal fluid levels of free 3-nitrotyrosine are not elevated in the majority of patients with amyotrophic lateral sclerosis or Alzheimer's disease, *Neurochemistry International*, 45, 57-62
- Saavedra L., Barbas C., 2002**, Optimization of the separation lactic acid enantiomers in body fluids by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography B*, 766, 235-242
- Sbrana E., Paladini A., Bramanti E., Spinetti M.C., Raspi G., 2004**, Quantitation of reduced glutathione and cysteine in human immunodeficiency virus-infected patients, *Electrophoresis*, 25, 1522-1529
- Shigenaga M.K., Lee H.H., Blount B.C., Christen S., Shigeno E.T., Yip H., Ames B.N., April 1997**, Inflammation and NO_x-induced nitration: Assay for 3-nitrotyrosine by HPLC with electrochemical detection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 3211- 3216
- Skoog D. A., Holler F. J. ve Nieman T. A., 1997a**, *Enstrümantal Analiz İlkeleri*, Birinci Baskı, , Bilim Yayıncılık, Ankara, 639
- Skoog D. A., Holler F. J. ve Nieman T. A., 1997b**, *Enstrümantal Analiz İlkeleri*, Birinci Baskı, , Bilim Yayıncılık, Ankara, 630
- Skoog D. A., Holler F. J. ve Nieman T. A., 1997c**, *Enstrümantal Analiz İlkeleri*, Birinci Baskı, , Bilim Yayıncılık, Ankara, 642
- Skoog D. A., Holler F. J. ve Nieman T. A., 1997d**, *Enstrümantal Analiz İlkeleri*, Birinci Baskı, , Bilim Yayıncılık, Ankara, 585
- Skoog D. A., Holler F. J. ve Nieman T. A., 1997e**, *Enstrümantal Analiz İlkeleri*, Birinci Baskı, , Bilim Yayıncılık, Ankara, 644
- Skoog D. A., Holler F. J. ve Nieman T. A., 1997f**, *Enstrümantal Analiz İlkeleri*, Birinci Baskı, , Bilim Yayıncılık, Ankara, 650
- Sodum R.S., Akerkar S.A., Fiala E.S., 2000**, Determination of 3-Nitrotyrosine by High-Pressure Liquid Chromatography with a Dual-Mode Electrochemical Detector, *Analytical Biochemistry*, 280, 278-285
- Sun X., Jin W., Li D., Bai Z., 2004**, Measurement of alkaline phosphatase isoenzymes in individual Mouse bone marrow fibroblast cells based on capillary electrophoresis with on-capillary enzyme-catalyzed reaction and electrochemical detection, *Electrophoresis*, 25, 1860-1866
- TheUSA Pharmacopeia**, 2003, The National Formulary, USP 26
- Tábi T., Magyar K., Szöko E., 2005**, Trace analysis of oxidized, nitrated and chlorinated aromatic amino acids by capillary electrophoresis with electroosmotic flow modification allowing large-volume sample stacking, *Electrophoresis*, 26, 1940- 1947
- Terabe S., 2004**, Micellar Electrokinetic Chromatography, *Analytical Chemistry*, July1, 240-246
- Tripodi V.P., Lucangroli S.E., Scroscia S.L., Conducci C.N., 2003**, Simultaneous determination of free and conjugated bile acids in serum by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography, *Journal of Chromatography B*, 785, 147-155
- Tsikakos D., Mitschke A., Suchy M.T., Gutzki F.M., Stichtenoth D.O., 2005**, Determination of 3-nitrotyrosine in human urine at the basal state by gas chromatography-tandem mass spectrometry and evaluation of the excretion after oral intake, *Journal of Chromatography B*, 827 (1), 146-156
- Voltammetry**, <http://ull.chemistry.uakron.edu/analytical/Voltammetry/>, 12.08.08

Voltammetry, <http://www.cem.msu.edu/~cem333/Week12.pdf>, 12.08.08

Wang J., Tuzhi P., Lin M.S., Tapia T., 1986. Trace measurements of the antineoplastic agent methotrexate by adsorptive stripping voltammetry. *Talanta* 33, 707

Xu Y., 1996, Tutorial: Capillary Electrophoresis, *The Chemical Educator*, Vol.1, No: 2

Zuman P., Charles L.P., 1969, *Organic Polarography*, John Wiley&Sons, USA, 253

EK 1:

Bu kısımda yapılan analizlerde elde edilen veriler kullanılarak plazma numunelerinde 3-NT miktarının hesaplanması basit olarak anlatılmıştır. Bu amaçla plazma 1 numunesi için okunan değer örnek olarak verilmiştir.

P1 numunesi için adsorptif sıyırma voltametrik yöntemde elde edilen akım farkı değeri $3,05 \times 10^{-7}$ A dir. Bu yöntem için kalibrasyon eğrisi denklemi şöyle verilmiştir:

$$y = 1,107x + 7,987 \times 10^{-9}$$

$$3,05 \times 10^{-7} = 1,107x + 7,987 \times 10^{-9} \quad x = 2,68 \times 10^{-7} M$$

Burada bulunan derişim özütleme ve hidrolizleme işlemi sonucunda elde edilen seyreltilmiş plazma hidrolizatının voltametrik hücreye konduktan sonraki derişimidir. Voltametrik hücrede 10,0 mL destek elektrolit tamponu bulunmaktadır. Seyreltilmiş plazma hidrolizatından da 50,0 µL kullanılmıştır. Derişim şu şekilde hesaplanır:

$$\frac{50 \times 10^{-6} \cdot C}{(10^{-2} + 50 \times 10^{-6})} = 2,68 \times 10^{-7} M \quad C = 5,39 \times 10^{-5} M$$

Bu şekilde seyreltilmiş plazma hidrolizatının derişimi bulunmuş olur. Plazma hidrolizati 8 kat seyreltilmiş olduğuna göre plazma hidrolizatının derişimi

$$5,39 \times 10^{-5} \cdot 8 = 4,31 \times 10^{-4} M \text{ dir.}$$

Plazma numuneleri için geri alınabilirlik değeri %255,02 olarak hesaplanmış idi. Bu değer kullanılarak gerçek değer bulunur.

$$ax \frac{255,02}{100} = 4,31 \times 10^{-4} \quad a = 1,69 \times 10^{-4} M \text{ dir.}$$

Protein İçindeki Miktar:

Plazma 1 numunesi için 0,0229 g çöktürölüp kurutulmuş protein örneğinden alınmış ve gerekli işlemler sonrasında 2 mL çözelti elde edilmiştir. Hesaplanan son derişim değeri kullanılarak 2 mL çözeltideki 3-NT miktarı hesaplanır.

$$m_{3-NT} = M \cdot V \cdot M_A = 1,69 \times 10^{-4} \times 2 \times 10^{-3} \times 226,19 = 7,65 \times 10^{-5} g / 0,0229 g \text{ protein}$$

Plazma İçindeki Miktar:

Literatüre göre plazmadaki protein miktarı 7g/100mL dir(<http://www.bilgi.com/PLAZMA>). Bu değer ve kullanılan protein miktarı kullanılarak plazmadaki 3-NT derişimi hesaplanabilir:

$$m_{3-NT_{plazma}} = \frac{7,65 \times 10^{-5} \cdot 7}{0,0229 \cdot 100} = 2,34 \times 10^{-4} g / mL$$

EK 2:

**ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI**

Sayı: EK: 309

25.09.2006

Sayın Prof.Dr. Nur ONAR

Etik kurulumuza sunmuş olduğunuz “3-Nitrotirozin İçin Nicel Tayin Yöntemi Geliştirilmesi” başlıklı **Hasta materyal** nitelikli araştırma projeniz ile ilgili değerlendirme çalışmaları sonuçlandırılmıştır. Projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamalarınızı dikkate alarak değerlendirilmiş olup, OMÜ Tıp Fakültesi Etik Kurul yönergesinin 5. maddesi gereği sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere bu araştırmanın uygulanmasında herhangi bir etik sakıncanın olmadığına ve araştırma tamamlandıktan sonra sonucunun etik kurulumuza bildirilmesi gereğine 25.09.2006 tarihli etik kurulumuzda oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.



Prof.Dr.Yüksel KESİM
Etik Kurul Başkanı

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ebru TÜRKÖZ ACAR

Doğum Yeri : Samsun – Bafra

Doğum Tarihi : 03.10.1977

Medeni Hali : Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Bafra Lisesi (1991-1994)

Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya ğretmenliği

Yüksek Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü

Çalıştığı Kurum/ Kurumlar ve Yıl: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen- Edebiyat
Fakültesi Kimya Bölümü (2001- 2008)

İletişim Bilgileri:

Elektronik Posta Adresi: eturkoz@omu.edu.tr, ebruturkozacar@hotmail.com

İkamet Ettiği Adres : Altayçeşme Mah. Begonya S. Umut Ap. No:73 Maltepe –
İstanbul