

**AMİNLERİN SIVI
KROMATOĞRAFİSİNDE
POTANSİYOMETRİK TAYİNLERİ**

**RUKİYE AYDIN
DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AMİNLERİN SIVI KROMATOĞRAFİNDE POTANSİYOMETRİK
TAYİNLERİ

RUKİYE AYDIN

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. ADEM ASAN

SAMSUN – 2012

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından 29/03/2012 tarihinde yapılan sınav ile Kimya Anabilim Dalı'nda DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

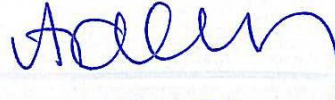
Başkan : Prof. Dr. Orhan ATAKOL



Üye : Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK



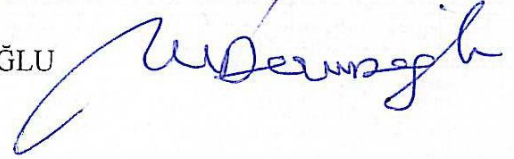
Üye : Prof. Dr. Adem ASAN



Üye : Prof. Dr. Ahmet UYANIK



Üye : Doç. Dr. Muhammed DERVİŞOĞLU



ONAY :

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

.../.../2012

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. Ümit Serdar

AMİNLERİN SIVI KROMATOĞRAFİSİNDE POTANSİYOMETRİK TAYİNLERİ

ÖZ

Farklı moleküler ve kimyasal özelliklere sahip iyonoforlar kullanılarak bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrotlar geliştirildi. Elektrotların durgun ve hareketli ortamda performansları test edildi. Ölçümlerde gümüş/gümüş klorür referans elektrot kullanıldı. Hazırlanan bütünüyle katı-hal kontakt PVC membran amin duyarlı elektrotların cevap zamanları kısa (10-15 s), kullanım ömürleri uzundu. Hazırlanan bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrotları sıvı kromatografisinde dedektör olarak kullanmak için mini boyutta mikro ölü hacme sahip akış hücreleri tasarlandı ve hareketli ortamda (AEA sisteminde) test edildi. Daha sonra bu elektrotlar yüksek basınç sıvı kromatografisinde dedektör olarak kullanıldı. Gradient elüsyon yapılan kromatografik sistemde altı aminin 30 dakika içinde iyi bir rezolüsyonla ayrımları gerçekleştirildi. Metot, peynir altı kazan suyu numunesine uygulandı Aminlerin peynir altı kazan suyu numunesinden geri alınabilirliği % 2.2-4.0 bağıl standart sapma ile % 88-101 düzeylerinde bulundu. Peynir altı kazan suyundaki etil amin, bütil amin ve hegzil aminin ortalama konsantrasyonları sırası ile, 6.45, 4.51, 8.37 µg/mL düzeylerinde olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: Amin Duyarlı Elektrot, Potansiyometrik Deteksiyon, Sıvı Kromatografi, Aminlerin Tayini.

POTENTIOMETRIC DETERMINATION OF THE AMINES WITH LIQUID CHROMATOGRAPHY

ABSTRACT

Completely solid-state contact PVC membrane amine sensitive electrodes were developed by using ionophores having different structure and chemical properties. The performance characteristics of the electrodes were tested under static and dynamic conditions. The potentiometric measurements were made by using silver/silver chloride reference electrode. The electrodes had a very short response time (10-15 s) and good reproducibility. The life time of electrodes were three months. Low dead volume micro-sized flow through cells were prepared and electrode used as a detector in flow injection analysis (FIA). Afterwards, completely solid-state contact PVC membrane amine sensitive electrode used as a detector in high pressure liquid chromatography. For six amines were separated with good resolution in chromatographic system with gradient elution. This electrodes were used successfully applied the analysis of amines in cheese sample and the relative standart deviation were range from% 2.2-4.0 and recoveries were ranged from % 88-101. Average concentration of ethylamine, butylamine and hexylamine in cheese water was determinated order with 6.45, 4.51, 8.37, $\mu\text{g/mL}$.

Keywords: Amine-Sensitive Electrodes, Potentiometric Detection, Liquid Chromatography, Determination of Amines.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora çalışmalarım boyunca, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, deneysel verilerin yorumlanmasında bana yardımcı olan, her konuda yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm, çalışmalarımın her anında ilgi ve desteğini esirgemeyen çok değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Adem ASAN'a** sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım süresince çalışmalarımı yakından takip eden, bize her türlü bilimsel imkanı sunan, deneysel bilgi ve tecrübelerini bizden esirgemeyen çok değerli hocam **Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK'a** sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen değerli hocam **Doç. Dr. Muhammed DERVİŞOĞLU'na** çok teşekkür ederim.

Bu tez 107 T 336 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir. Katkılarından dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Laboratuvar ortamını birlikte paylaşmakla kalmayıp ilerleyen zamanlarda kardeş gibi olup tüm üzüntü ve sevicilerimizi paylaştığımız, bu ortamı güzelleştiren arkadaşlarım **Deniz Karşlı SEMİZ'e**, **Araş. Gör. Sema ÖZTÜRK'e**, **Derya ALTUNTAŞ'a**, **Araş. Gör. Gülnur ERDOĞMUŞ'a**, **Nuray ŞENYÜZ'e**, **Araş. Gör. Rukiye DUMANLI'ya**, **Araş. Gör. Ceren UĞURLAR'a**, **Araş. Gör. Başak USTAOSMAN'a**, aynı odayı paylaştığım kader arkadaşım **Araş. Gör. Seyhan ÖZTÜRK'e** çok teşekkür ederim.

Her an yanımda ve bana destek olan çok değerli hayat arkadaşım **Erkan AYDIN'a** tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemin en büyük mimarları olan ve maddi manevi desteklerini esirgemeyen, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim Sevgili Babam **İsmail GÜRE'ye**, sevgisi ve şefkatiyle her zaman yanımda olan Sevgili Annem **Gülbahar GÜRE'ye** sonsuz minnettarlık ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Aminler ve Oluşumları	5
2.1.1. Alifatik Aminler.....	6
2.1.2. Aromatik Aminler.....	6
2.1.3. Aminlerin Fiziksel Özellikleri	6
2.2. Aminlerin Kullanım Alanları.....	7
2.2.1. Boyalar.....	7
2.2.2. Gaz Arıtımı	7
2.3. Biyojen Aminler	8
2.3.1. Histamin.....	8
2.3.2. Tiramin, Triptamin ve Feniletil amin	8
2.3.3. Putresin, Kadavarin, Spermin ve Spermidin.....	9
2.4. Halk Sağlığı Açısından Biyojen Aminlerin Önemi	9
2.4.1. Histamin.....	9
2.4.2. Tiramin.....	10
2.4.3. Putresin ve Kadavarin.....	10
2.4.4. Triptamin	11
2.5. Gıdalarda Biyojen Aminlerin Varlığı	11
2.6. Biyolojik Önemi Olan Bazı Aminler	12
2.6.1. Feniletil Aminler.....	12
2.6.2. Vitaminler ve Antihistaminler	13
2.7. Elektroanalitik Kimya.....	13
2.8. Potansiyometri	14
2.8.1. Potansiyometrik Tayin İlkesi	15
2.8.2. Referans Elektrotlar	17
2.8.2.1. Gümüş/Gümüş Klorür Referans Elektrot	18
2.8.3. İndikatör Elektrotlar.....	20
2.8.4. İyon Seçici Elektrotlar	20
2.8.5. İyon-Seçici Elektrotların Performansına Etki Eden Faktörler	21
2.8.5.1. Cevap Zamanı	21

2.8.5.2. Tayin Limiti	22
2.8.5.3. Seçicilik	22
2.8.5.4. Tekrarlanabilirlik	23
2.8.5.6. Kullanım Ömrü	24
2.8.6. İyon Seçici Elektrotların Avantaj ve Dezavantajları	24
2.8.6.1. İyon Seçici Elektrotların Avantajları	24
2.8.6.2. İyon Seçici Elektrotların Dezavantajları	25
2.8.7. İyon Seçici Elektrotların Uygulamaları	25
2.9. Akış Enjeksiyon Analizi (AEA)	25
2.9.1. Akış-Enjeksiyon Analizinde Numune ve Ayırıcın Sevkedilmesinde Kullanılan Sistemler	27
2.9.1.1. Enjeksiyon Vanası	28
2.9.1.2. Numune Enjektörleri ve Dedektörler	29
2.9.2. Akış-Enjeksiyon Analizini Etkileyen Faktörler	29
2.9.3. Akış-Enjeksiyon Analizi Tekniğinin Uygulamaları	30
2.9.4. ISE'lerin Hareketli Ortamda Dedektör Olarak Kullanımı	30
2.10. Kromatografi	32
2.10.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması	33
2.10.2. Kromatografik Ayırma Tekniği	34
2.10.3. Kromatografi Terimleri	35
2.10.3.1. Kromatogram	35
2.10.3.2. Dağılma Sabitleri	35
2.10.3.3. Alıkonma Zamanı	36
2.10.3.4. Kolonun Ayırım Gücü (Resolution)	37
2.11. Sıvı Kromatografi	38
2.11.1. Kolon	39
2.11.2. Dedektörler	39
2.12. İyon Değişimi Kromatografi	41
2.13. Gıda Analizlerinde Kullanılacak HPLC'nin Özellikleri	41
2.15. Aminlerin Tayinleri	42
3. MATERYAL VE YÖNTEM	43
3.1. Materyaller	43
3.1. 1. Kullanılan Kimyasallar	43

3. 1. 2. Kullanılan Cihazlar	43
3. 2. Metot.....	46
3. 2. 1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	46
3.2.2. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı PVC Membran Elektrotların Hazırlanması	48
3.2.3. Hareketli Ortam Akış Hücresinin Hazırlanması.....	52
3. 2. 4. Çalışma Yöntemi	54
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	56
4.1. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı PVC Membran Elektrotların Potansiyometrik Davranışları	56
4.1.1. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı PVC Membran Elektrodun Durgun Ortam Performansları	56
4.1.2. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı PVC Membran Elektrodun Tekrarlanabilirliği	66
4.1.3. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı PVC Membran Elektrodun Cevap Zamanı	67
4.1.4. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı PVC Membran Elektrodun Kullanım Ömrü	68
4.1.5. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı PVC Membran Elektrodun pH Çalışma Aralığı	69
4.1.6. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı PVC Membran Elektrodun Doğrusal Çalışma Aralığı ve Tayin Limiti	70
4.2. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı Elektrodun Hareketli Ortam Ölçümleri	72
4.2.1. Akış Enjeksiyon Analizi (AEA) Uygulamaları	72
4.2.2. Hareketli Faz Akış Hızının Etkisi	72
4.2.2. Enjeksiyon Hacminin Etkisi	73
4.2.3. pH' nın Etkisi.....	73
4.2.3. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı PVC Membran Elektrodun AEA Sisteminde HAc/Ac- Hareketli Fazının Kullanılmasıyla Elde Edilen Sonuçlar.....	74
4.2.4. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı PVC Membran Elektrodun AEA Sisteminde Metansülfonik Asit Hareketli Fazının Kullanılmasıyla Elde Edilen Sonuçlar	79

4.3. Kromatografik Sonuçlar	84
4.3.1. Amin Bileşiklerinin Alıkonma Zamanlarının Belirlenmesi.....	84
4.3.2. Akış Hızının Alıkonma Zamanına Etkisi.....	86
4.3.4. Etil Aminin Propil Aminden Ayrılması Çalışmaları	91
4.4. Gradient Elüsyon Uygulaması	94
4.5. Gerçek Numune Analizi	97
4.6. Geri Kazanım Çalışmaları	100
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	101
6. KAYNAKLAR	103
7. ÖZGEÇMİŞ	109

SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

AEA	Akış Enjeksiyon Analizi
DB 18-C6	Dibenzo 18-Crown 6
DOS	Bis (2-etil hegzil) Sebakat
HPLC	Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi
ISE	İyon Seçici Elektrot
IUPAC	International Union Pure and Applied Chemistry
KTpCIPB	Potasyum tetrakis(p-kloro)fenil borat
M	Molarite
PVC	Polivinil Klorür
THF	Tetra Hidro Furan

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Elektrokimyasal bir hücre.....	14
Şekil 2.2. Basit bir potansiyometrik sistem	15
Şekil 2.3. Gümüş/gümüş klorür referans elektrot	18
Şekil 2.4. Gümüş/gümüş klorür referans elektrotlu kombine cam elektrot	19
Şekil 2.5. IUPAC'a göre cevap zamanı	21
Şekil 2.6. IUPAC'a göre tayin limiti	22
Şekil 2.7. Seçicilik katsayısının kalibrasyon grafiği ile gösterimi.....	23
Şekil 2.8. AEA sisteminin blok şeması.....	26
Şekil 2.9. Enjeksiyon vanasının kullanımı; A: enjeksiyon halkasının doldurulduğu,..	28
B: harekete geçirme, C: enjeksiyon	28
Şekil 2.10. Hareketli ortamlarda kullanılan potansiyometrik akış hücresi a) PVC-	
membran b) Katı-hal kontakt c) Teflon boru tubing d) Metalik bağlantı	
(indikatör elektrot) e) Referans elektrot.....	32
Şekil 2.11. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması	34
Şekil 2.12. Kromatografik ayırma tekniğinin şematik gösterimi.....	35
Şekil 2.13. İki bileşenli bir numune için tipik bir kromatogram.....	36
Şekil 3.1. Çalışmada kullandığımız bilgisayar kontrollü potansiyel ölçüm sisteminin	
şematik gösterimi (RE: Referans Elektrot, ASE: Amin Seçici Elektrot).....	44
Şekil 3.2. AEA sisteminin genel şeması (H.F: Hareketli faz; P: Pompa; E.V:	
Enjeksiyon vanası; D: Dedektör; B: Bilgisayar; M: Monitör; Y: Yazıcı)	45
Şekil 3.3. Tasarladığımız akış hücresinde referans elektrotun ve bütünüyle katı-hal	
kontakt amin-duyarlı PVC-membran elektrotların bağlı olduğu hareketli ortam	
akış sistemi.....	45
Şekil 3.4. Kullanılan iyonoforların açık yapısı (A: potasyumtetrakis (p-klorofenil)	
borat; B: dibenzo-18-crown-6; C: Calix-6-arene-hegzaetilasetat).....	50
Şekil 3.5. Mini boyutlarda bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran	
elektrodun yapısı	51
Şekil 3.6. Mini boyutta bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran	
elektrot	51
Şekil 3.7. AEA sisteminde kullanılan akış hücresinin şekli	52

Şekil 3.8. Laboratuarda geliştirdiğimiz bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrotun ve referans elektrotun bulunduğu akış hücresi (tek kanallı)	53
Şekil 3.9. Farklı kompozisyonlarda hazırlanan birden çok elektrotun aynı akış yoluna yerleştirilmesiyle elde edilen elektrot dizisi (çok kanallı)	54
Şekil 4.1. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun etil amin çözeltisinin farklı derişimlerine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı	57
(a= 1×10^{-2} M, b= 1×10^{-3} M, c= 1×10^{-4} M, d= 1×10^{-5} M, e= 1×10^{-6} M).....	57
Şekil 4.2. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun propil amin çözeltisinin farklı derişimlerine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı	58
Şekil 4.3. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun bütül amin çözeltisinin farklı derişimlerine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı	59
Şekil 4.4. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun pentil amin çözeltisinin farklı derişimlerine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı	60
Şekil 4.5. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun hegzil amin çözeltisinin farklı derişimlerine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı	61
Şekil 4.6. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun heptil amin çözeltisinin farklı derişimlerine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı	62
Şekil 4.7. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun oktil amin çözeltisinin farklı derişimlerine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı	63
Şekil 4.8. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun kadavarin çözeltisinin farklı derişimlerine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı	63
Şekil 4.9. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun spermin çözeltisinin farklı derişimlerine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı	64

- Şekil 4.10.** Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun dimetil amin çözeltisinin farklı derişimlerine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı 65
- Şekil 4.11.** Bütünüyle katı-hal kontankt amin duyarlı PVC membran elektrodun tekrarlanabilirliği ($a=1 \times 10^{-2}$ M, $b= 1 \times 10^{-3}$ M, $c= 1 \times 10^{-4}$ M bütül amin çözeltisi) 67
- Şekil 4.12.** Bütünüyle katı-hal amin-duyarlı elektrot için cevap-zamanı grafiği (hegzil amin çözeltisi) 68
- Şekil 4.13.** Bütünüyle katı-hal kontankt amin duyarlı PVC membran elektrotun zamana bağlı olarak eğiminde meydana gelen değişim (etil amin çözeltisi)..... 69
- Şekil 4.14.** Bütünüyle katı-hal kontankt amin duyarlı PVC membran elektrotun pH çalışma aralığı (hegzil amin çözeltisi) 70
- Şekil 4.15.** Pik yüksekliğine akış hızının etkisi(Hareketli faz: 1×10^{-2} M HAc/Ac⁻ (pH:5.0) tampon çözeltisi; Enjeksiyon hacmi: 20 µL, 1×10^{-3} M bütül amin çözeltisi) 73
- Şekil 4.16.** Hareketli faz pH'sının pik yüksekliğine etkisi (Enjeksiyon hacmi: 20 µL, Akış hızı: 1 mL/dak) 74
- Şekil 4.17.** Standart etil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri. Hareketli faz: 1×10^{-2} M HAc/Ac⁻ tampon çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk; Enjeksiyon hacmi: 20 µL. 75
- Şekil 4.18.** Standart propil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri. Hareketli faz: 1×10^{-2} M HAc/Ac⁻ tampon çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk; Enjeksiyon hacmi: 20 µL. 75
- Şekil 4.19.** Standart bütül amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri. Hareketli faz: 1×10^{-2} M HAc/Ac⁻ tampon çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk; Enjeksiyon hacmi: 20 µL. 76
- Şekil 4.20.** Standart pentil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri. Hareketli faz: 1×10^{-2} M HAc/Ac⁻ tampon çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk; Enjeksiyon hacmi: 20 µL. 76
- Şekil 4.21.** Standart hegzil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri. Hareketli faz: 1×10^{-2} M HAc/Ac⁻ tampon çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk; Enjeksiyon hacmi: 20 µL. 77

- Şekil 4.22.** Standart heptil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri.
Hareketli faz: 1×10^{-2} M HAc/Ac⁻ tampon çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk;
Enjeksiyon hacmi: 20 µL 77
- Şekil 4.23.** Standart oktil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri.
Hareketli faz: 1×10^{-2} M HAc/Ac⁻ tampon çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk;
Enjeksiyon hacmi: 20 µL 78
- Şekil 4.24.** Standart kadavarin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri.
Hareketli faz: 1×10^{-2} M HAc/Ac⁻ tampon çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk;
Enjeksiyon hacmi: 20 µL 78
- Şekil 4.25.** Standart etil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri.
Hareketli faz: 1×10^{-2} M metansülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk;
Enjeksiyon hacmi: 20 µL 79
- Şekil 4.26.** Standart propil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri.
Hareketli faz: 1×10^{-2} M metansülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk;
Enjeksiyon hacmi: 20 µL 80
- Şekil 4.27.** Standart bütil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri.
Hareketli faz: 1×10^{-2} M metansülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk;
Enjeksiyon hacmi: 20 µL 80
- Şekil 4.28.** Standart pentil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri.
Hareketli faz: 1×10^{-2} M metansülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk;
Enjeksiyon hacmi: 20 µL 81
- Şekil 4.29.** Standart hegzil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri.
Hareketli faz: 1×10^{-2} M metansülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk;
Enjeksiyon hacmi: 20 µL 81
- Şekil 4.30.** Standart heptil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri.
Hareketli faz: 1×10^{-2} M metansülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk;
Enjeksiyon hacmi: 20 µL 82
- Şekil 4.31.** Standart oktil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri.
Hareketli faz: 1×10^{-2} M metansülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk;
Enjeksiyon hacmi: 20 µL 82
- Şekil 4.32.** Standart kadavarin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri.
Hareketli faz: 1×10^{-2} M metansülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk;
Enjeksiyon hacmi: 20 µL 83

- Şekil 4.33.** Her biri 1×10^{-3} M derişimde standart amin çözeltilisi içeren karışımdan 20 μ L enjeksiyon ile elde edilen kromatogram (Hareketli faz: % 10 asetonitril içeren 27 mM metan sülfonik asit çözeltilisi; Akış hızı: 1.0 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) (1) etil amin; (2) propil amin; (3) bütül amin; (4) pentil amin; (5) hegzil amin; (6) heptil amin 85
- Şekil 4.34.** Her biri 1×10^{-3} M derişimde standart amin çözeltilisi içeren karışımdan 20 μ L enjeksiyon ile elde edilen kromatogram (Hareketli faz: % 10 asetonitril içeren 27 mM metan sülfonik asit çözeltilisi; Akış hızı: 0.75 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) (1) etil amin; (2) propil amin; (3) bütül amin; (4) pentil amin; (5) hegzil amin. 87
- Şekil 4.35.** Her biri 1×10^{-3} M derişimde standart amin çözeltilisi içeren karışımdan 20 μ L enjeksiyon ile elde edilen kromatogram (Hareketli faz: % 10 asetonitril içeren 27 mM metan sülfonik asit çözeltilisi; Akış hızı: 1.5 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) (1) etil amin; (2) propil amin; (3) bütül amin; (4) pentil amin; (5) hegzil amin. 87
- Şekil 4.36.** Her biri 1×10^{-3} M derişimde standart amin çözeltilisi içeren karışımdan 20 μ L enjeksiyon ile elde edilen kromatogram (Hareketli faz: %5 asetonitril içeren 27 mM metan sülfonik asit çözeltilisi; Akış hızı: 1.0 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) (1) etil amin; (2) propil amin; (3) bütül amin; (4) pentil amin; (5) hegzil amin..... 89
- Şekil 4.37.** Her biri 1×10^{-3} M derişimde standart amin çözeltilisi içeren karışımdan 20 μ L enjeksiyon ile elde edilen kromatogram (Hareketli faz: % 2 asetonitril içeren 27 mM metansülfonik asit çözeltilisi; Akış hızı: 1.0 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) (1) etil amin; (2) propil amin; (3) bütül amin; (4) pentil amin. 89
- Şekil 4.38.** Her biri 1×10^{-3} M derişimde standart amin çözeltilisi içeren karışımdan 20 μ L enjeksiyon ile elde edilen kromatogram (Hareketli faz: % 5 asetonitril içeren 20 mM metansülfonik asit çözeltilisi; Akış hızı: 1.0 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) (1) etil amin; (2) propil amin; (3) bütül amin; (4) pentil amin; (5) hegzil amin; (6) heptil amin; (7) oktil amin; (8) kadavarin. 90
- Şekil 4.39.** Her biri 1×10^{-3} M derişimde standart amin çözeltilisi içeren karışımdan 20 μ L enjeksiyon ile elde edilen kromatogram (Hareketli faz: % 5 asetonitril içeren 20 mM metansülfonik asit çözeltilisi; Akış hızı: 1.0 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) (1) etil amin; (2) propil amin; (3) bütül amin; (4) pentil amin. 91

- Şekil 4.40.** Her biri 1×10^{-3} M derişimde standart amin çöztisi ieren karışimdan 20 μ L enjeksiyon ile elde edilen kromatogram (Hareketli faz: % 5 asetonitril ieren 15 mM metansülfonik asit çöztisi; Akış hızı: 1.0 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) (1) etil amin; (2) propil amin; (3) büt il amin; (4) pent il amin. 92
- Şekil 4.41.** Her biri 1×10^{-3} M derişimde standart amin çöztisi ieren karışimdan 20 μ L enjeksiyon ile elde edilen kromatogram (Hareketli faz: % 5 asetonitril ieren 10 mM metan sülfonik asit çöztisi; Akış hızı: 1.0 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) (1) etil amin; (2) propil amin; (3) büt il amin; (4) pent il amin. 93
- Şekil 4.42.** Her biri 1×10^{-3} M derişimde sekiz standart amin çöztisi ieren karışimdan 20 μ L enjeksiyon ile elde edilen kromatogram (Hareketli faz: A pompası: % 5 asetonitril ieren 10 mM metan sülfonik asit çöztisi; B pompası: % 5 asetonitril ieren 50 mM metan sülfonik asit çöztisi; Akış hızı: 1.0 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) (1) etil amin; (2) propil amin; (3) büt il amin; (4) pent il amin; (5) hegz il amin; (6) hept il amin. 95
- Şekil 4.43.** Aminler için çiz ilen kalibrasyon eğrisi 96
- Şekil 4.44.** 100 mL Peynir altı kazan suyundan elde edilen kromatogram (Hareketli faz: A pompası; % 5 asetonitril ieren 10 mM metansülfonik asit çöztisi; B pompası; % 5 asetonitril ieren 50 mM metansülfonik asit çöztisi; Akış hızı: 1.0 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) (1) etilamin; (3) büt ilamin; (5) hegz ilamin, Enjeksiyon hacmi: 20 μ L enjeksiyon) 98

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 3.1. Kullanılan amin bileşikleri ve bazı özellikleri.....	46
Çizelge 3.2. Kullanılan amin bileşiklerinin açık formülleri	47
Çizelge 3.3. Hazırlanan bütünüyle katı-hal kontakt amin-duyarlı PVC-membran elektrotların membran bileşimleri.....	50
Çizelge 4.1. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun amin çözeltileri için ortalama ve standart sapma değerleri ile verilen ölçüm sonuçları	66
Çizelge 4. 2. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı PVC Membran Elektrodun Durgun Ortamda Potansiyometrik Performans Özellikleri.....	71
Çizelge 4.3. Her bir standart amin çözeltisi içeren karışımdan 20 µL enjeksiyonu; Akış hızı: 1.0 mL sonucu elde edilen kromatogramdan belirlenen alıkonma zamanları (Hareketli faz: % 10 asetonitril içeren 27 mM metan sülfonik asit çözeltisi /dk).....	86
Çizelge 4.4. Her biri 1×10^{-3} M derişimde sekiz standart amin çözeltisi içeren karışımdan 20 µL enjeksiyon ile elde edilen kromatogramdan belirlenen alıkonma zamanları (Hareketli faz: A pompası: % 5 asetonitril içeren 10 mM metansülfonik asit çözeltisi; B pompası; % 5 asetonitril içeren 50 mM metansülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1.0 mL/dk)	96
Çizelge 4.5. Peynir altı kazan suyundan elde edilen kromatogramdan hesaplanan aminlerin miktarları. Verilen miktarlar ortalama değerlerdir. [$\bar{x} = \mu\text{g/mL}$, standart sapma $(t_s/\sqrt{N} \times 100)$, n=5 için % 95 güvenilirlik derecesinde elde edilen veriler]	99
Çizelge 4.6. 100 mL peynir altı kazan suyu numunesinden aminlerin geri alınabilirlikleri.....	100

1. GİRİŞ

Amino bileşikler, alkil veya aril gruplarının amonyaktaki 1. 2. veya 3. hidrojen atomunun yerini almasıyla oluşan temel azotlu bileşiklerdir. Amino bileşikler, aminoasitlerin indirgenme ve sentezlerinde de önemli olduklarından biyolojik sistemlerde geniş bir dağılım gösterirler. Alifatik aminler; boyaların, ilaçların, emülgatörlerin, korozyon inhibitörlerinin sentezinde öncüller olarak endüstride önem taşırlar (Windholz ve ark., 1976). Ayrıca alifatik aminler, tümör belirleyici olarak hazırlanabilir ve kanserin teşhis ve tanınması için kullanılabilirler (Matsumoto ve Tsuda, 1990). Alifatik aminlerin tayinleri, organ naklinde dokunun kabul etmemesinin izlenmesinin temelini oluşturmaktadır (Hoekstra ve Johnson, 1998). Biyolojik sistemlerde geniş bir dağılım göstererek aminoasitlerin indirgenmesinde ve sentezinde önemlidirler. Gıdalarda poliamin içeriği özellikle balık ve etin bozulmasının yararlı bir göstergesi olarak önemlidir (Trevino ve ark., 1997; Sadain ve Koropchak, 1999). Poliaminler, nitrillerle kanserojenik nitrozamin formuna dönüşüm reaksiyonları verebildikleri için sağlık açısından tehlikelidirler (Oliveira ve ark., 1995). Ayrıca, bu bileşikler koordinasyon kimyası, biyokimya ve polimer kimyasında da geniş kullanım alanı bulan önemli bileşiklerdir.

Amino bileşikler genellikle ters-faz (Krasnova ve ark., 1997), iyon-etkileşim (Matsumoto ve Tsuda, 1990; Krasnova ve ark., 1997) ve katyon-değişim (Kertsen, 1992) sıvı kromatografi teknikleri ile dedektör olarak UV ve floresans deteksiyon yöntemi kullanılarak tayin edilir. Amino bileşiklerin çok önemli bir kısmının yeterli derecede UV ve floresans aktif olmayışları arzu edilen duyarlılıkta tayinler için önemli engel oluşturmaktadır. Duyarlılığı artırmak için çoğunlukla derivatizasyon işlemi yapılmaktadır. O-ftalaldehit, dansilklorür ve fluorescamine, pre-kolon ve post-kolon derivatizasyon işlemlerinde yaygın olarak kullanılan reaktiflerdir. Ancak derivatizasyon işlemleri, reaksiyonun hızlı olmaması veya tamamlanamaması gibi dezavantajlar nedeniyle sıkıntılıdır. Diğer taraftan derivatizasyon reaktiflerinin bir kısmının zehirli ve kararsız olmaları da dezavantaj oluşturmaktadır.

Amino bileşiklerin tayininde elektrokimyasal deteksiyon teknikleri ilgi çeken bir alternatif oluşturmaktadır. İletkenlik, iyon kromatografi için geleneksel deteksiyon metotlarından biridir (Bag, 1985). Amperometrik deteksiyon bu amaçla sıkça uygulama

alanı bulmaktadır. Potansiyometrik deteksiyon yaygın değildir. Literatürde sadece birkaç uygulamada potansiyometrik deteksiyon göze çarpmaktadır.

Potansiyometrik esasa dayalı iyon-seçici elektrotlar son yıllarda üzerinde yoğun çalışmaların yapıldığı elektrokimyanın önemli bir konusu haline gelmiştir. Yoğun çalışmalara rağmen, mikro boyutlarda potansiyometrik sensör sistemlerinin hazırlanmasına literatürde çok az rastlanmaktadır. Mikro boyutlarda potansiyometrik sensör sistemlerinin ve akış hücrelerinin tasarımı ve üretimi geliştirdiğimiz yeni bir hazırlama teknolojisi ile laboratuvarlarımızda sağlanmaktadır. Hazırladığımız iyon-seçici elektrot membranların birçoğunda disiklo ve dibenzo-8-crown-eter bileşikleri veya calix-[6]-aren hegzester bileşikleri aktif bileşenler olarak (host-guest interaction) kullanılmaktadır. Bu aktif bileşikler kullanılarak hazırlanan iyon-seçici elektrot sistemlerle yaptığımız çalışmalarda elektrotların protonlanmış amin bileşiklerine karşı oldukça önemli duyarlılık sergiledikleri gözlenmiştir. Yani protonlanmış amin bileşikleri membran içindeki host-guest aktif bileşiklerin sahip oldukları kavitiye ilgi göstermektedir. Aynı bileşiklerin kullanıldığı iyon-seçici elektrot sistemlerde benzeri davranışlara literatürde de rastlanmıştır.

Bu nedenle, tez çalışmamızda, yukarıda sözü edilen host-guest aktif bileşikler ve diğer amin duyarlı iyonofor bileşikler kullanılarak iyon-seçici elektrot sistemleri hazırlandı ve potansiyometrik performans karakteristikleri test edildi. Daha sonra bu elektrotlar sıvı kromatografik sistemde amin bileşiklerinin tayini için detektör olarak kullanıldı. Tez çalışmamızda geliştirilen sıvı-kromatografi-potansiyometrik deteksiyon sistem ile amin bileşiklerinin oldukça basit, duyarlı ve ekonomik analizleri sağlandı.

Aminler, (özellikle biyojen aminler) doğal olarak insan, hayvan, bitki ve mikroorganizmaların metabolizmalarında bulunan düşük molekül ağırlıklı organik bazlardır. Bu aminlerin, balık ve balık ürünleri, peynir, et ve et ürünleri, çikolata, şarap ve bira gibi gıdalarda işleme, olgunlaşma ve depolama sırasında, proteinlerin biyokimyasal ve/veya mikrobiyolojik etkileşimlerine bağlı olarak genellikle serbest kalan aminoasitlerin dekarboksilasyonu sonucu oluştukları belirlenmiştir (Askar, 1986). Ayrıca, fermente gıdalarda kullanılan başlatıcı kültürlerin de, gıdalardaki normal mikrobiyal flora ile etkileşimleri sonucu direkt veya indirekt olarak biyojen aminlerin oluşumunda etkili oldukları rapor edilmiştir (Scheuer, 1995; Sıla 1996). İçerdikleri amin sayısına göre monoamin veya poliamin olarak adlandırılan biyojen aminlerin büyük bir

kısının gıdaların pişirilmesi sırasındaki ısıya dayanıklı oldukları belirtilmiştir (Lehanel, 2000; Knut, 2002).

Bazı biyojen aminler, insan vücudunda özellikle sinir sisteminde ve kan basıncının kontrolünde önemli metabolik fonksiyonlara sahiptir. Bu aminlerden histaminin düz kasların kasılmasına, damarları genişleterek kan basıncının düşmesine, kapiler permeabilitenin ve mide asidi sekresyonun artmasına yol açtığı, nörotransmitter olarak işlev gördüğü ve ayrıca alerjik reaksiyonlarda da rol aldığı bildirilmektedir (Joosten, 1988; Halasz, 1994). Tiramin, triptamin ve feniletilamin gibi biyojen aminlerin hipertansif etkiye sahip oldukları, bunlardan tiramin ve triptaminin düz kasların kasılmasına yol açtıkları bildirilmiştir (Ramantanis, 1984; Joosten, 1988). Bazı poliaminler (putresin, kadaverin, spermidin, spermin) de, hücreler için esansiyel bileşikler olup, protein sentezinde, nükleik asit fonksiyonlarının yenilenmesinde ve hücre membranının kararlılığında önemli rol oynarlar (Loser, 2000). Gıdalarda bulunan biyojen aminlerin analizi için çeşitli metotlar kullanılmaktadır. Bu yöntemler nadiren de olsa kullanılan gaz kromatografisi (Slemr, 1984) ve çok kullanılan sıvı kromatografisi özellikle de yüksek basınç sıvı kromatografisi yöntemidir (Salazar, 2000; Shannon, 2006). Bu aminlerden yedi alifatik diaminin düşük düzeylerdeki tayini HPLC-UV ile başarıyla gerçekleştirilmiştir (Asan, 1999).

Amino bileşiklerin tayininde elektrokimyasal tayin metotları ilgi çekici görünmektedir. İletkenlik, iyon kromatografisi için geleneksel bir tayin metodudur. Baskılayıcı kolon, duyarlılığı artırmak ve hareketli fazın iletkenliğini düşürmek için iletkenlik tayininde uygun bir şekilde kullanılmaktadır. Alifatik aminlerin sıvı kromatografide amperometrik tayini nikel temelli cam karbon elektrot (Casella, 1998) ve bir kobalt tel elektrot ile yapılmıştır (Hidayet, 1997). Ayrıca, altın elektrotlarla voltametrik puls tekniğinde aminlerin tayininde kullanılmıştır (Dobberpuhl, 1996; Hoekstra, 1998).

Chen ve Alexander (Chen, 1997), iyon-etkileşim kromatografisi tekniği kullanarak aminlerin potansiyometrik tayinini bir metalik bakır elektrot kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Scnierle ve arkadaşları (Schnierle, 1998), bir karışımdaki üç alkilamin bileşimini kapiler elektroforezle sistemde membran kaplı tel iyon-seçici elektrot kullanarak belirlemişlerdir. Bu amaçla, analitle spesifik reaksiyon vermeyen PVC temelli elektrot membran içerisinde bir lipofilik katyon-değiştirici kullanmışlardır. İyonik organik maddelerin belirlenmesinde kromatografik metotlarla birlikte

potansiyometrik deteksiyon nadiren kullanılmıştır. Poels ve Nagels (Poels ve Nagels, 2001), organik iyonların analizi için sıvı kromatografi sisteminde iyon-seçici elektrotları detektör olarak kullanmışlardır.

Tez ęalıřmamızda, farklı amin duyarlı iyonofor reaktifler kullanılarak bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC-membran elektrotlar geliştirildi ve bu elektrotların laboratuvarında tasarımı yapılan akış hücrelerine yerleştirilmesi sonucu kromatografide detektör olarak kullanılmasıyla aminlerin tayini geręekleřtirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Aminler ve Oluşumları

Aminler baz özelliği gösteren ve amonyağın hidrojenlerinin alkil veya aril gruplarıyla yer değiştirmesi ile oluşmuş bileşiklerdir. Aminler, azot atomuna doğrudan bağlı karbon sayısına göre birincil (doğrudan bir karbon bağlı), ikincil (doğrudan iki karbon bağlı) ve üçüncül (doğrudan üç karbon bağlı) olarak sınıflandırılır (Yıldırım, 2011). Amin azotuna dört karbonun bağlı olduğu tuz yapısındaki bileşikler de kuaterner amonyum tuzları olarak adlandırılırlar. Doğada amin grubu içeren ve birçoğu biyolojik etkinlik gösteren pek çok bileşik vardır. Bunlar, canlıların yapıtaşlarını oluşturan aminoasitlerden, canlıların ölümünden sonra çürümesinden ya da bozunmasından kaynaklanan kötü kokuları veren moleküllere kadar yaşamın her yerinde doğal olarak bulunurlar; biyolojik etkinliklerinden dolayı pek çok ilaçta yer alırlar. Yine bu bileşikler, bazı bitkilerin kendilerini böcek ve diğer canlılara karşı korumak için kullandıkları biyokimyasal silahlarını oluştururlar. Bazı önemli amin bileşikleri aşağıda verilmiştir.

Efedrin; Kronik astım, bronşit gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan bir alkaloiddir. Doping maddesi olarak kabul edildiğinden sporcular tarafından yarış öncesi kullanımı yasaklanmıştır.

Nikotin; Tütünde bulunan ve oldukça toksik olan bir alkaloiddir. 150-200 mg nikotinin bir insana damardan verilmesi o insanı öldürebilir. Kullananlarda bağımlılık yapma etkisi vardır.

Dopamin; Vücutta doğal olarak üretilir. Sempatik sinir sistemindeki etkileri nedeniyle ilaç olarakta (kalp atışlarını hızlandırmak ve kan basıncını yükseltmek) kullanılır.

Histamin; İnsan ve hayvan hücrelerinin çoğunda bulunur; genel doku hasarı yapan maddeler (yılan veya arı zehiri, deterjanlar gibi) tarafından hücre dışına çıkarıldığında, alerji deniler reaksiyonlara yol açarlar.

Amino bileşikler aminoasitlerin indirgenme ve sentezlerinde de önemli olduklarından biyolojik sistemlerde geniş bir şekilde dağılım gösterirler. Yapısal olarak aminler NH_3 ' e benzerler ama bir veya daha fazla H atomu, alkil yada aril gibi organik

gruplarla yer değiştirmiştir. Bu kuralın önemli bir istisnası $RC(O)NR_2$ tipi bileşiklerdir. Bunlara amin yada amid denir. Amidler ve aminlerin yapıları ve özellikleri farklı olduğu için bu ayırım kimyasal olarak önemlidir.

2.1.1. Alifatik Aminler

NH_3 ' teki 3 H atomundan biri organik bir grup ile yer değiştirirse bir birincil amin ortaya çıkar. İkincil aminlerde N'ye iki organik grup ve bir H bağlıdır. Üçüncül aminlerde 3 H' nin yerine organik gruplar vardır. Bu terimler yerine sırasıyla primer amin, sekonder amin ve tersiyer aminde kullanılır.

2.1.2. Aromatik Aminler

N atomu bir aromatik halkaya bağlıdır. Aromatik halka üzerindeki diğer gruplara bağlı olarak, aminin bazlığını büyük oranda azaltır. Bir amin grubu, elektron verici özelliklerinden dolayı bağlı olduğu aromatik halkanın reaktivitesini kuvvetle artırır. Aromatik aminlerin rol aldığı bir organik tepkime Golberg tepkimesidir.

Birincil aminlere örnek; Metil amin, etil amin, tris amin

İkincil aminlere örnek; Dimetil amin, metil etanol amin (2-metil amino etanol)

Üçüncül aminlere örnek; Tri metil amin, dimetil etanol amin

2.1.3. Aminlerin Fiziksel Özellikleri

Aminler, azot atomlarının karbon atomlarından daha elektronegatif olmaları ve ortaklaşmamış elektron çiftleri nedeniyle polar yapıya sahiptirler ve dipol momentleri oldukça yüksektir. Bu nedenle de, yapılarında $-OH$ ve $-NH$ grubu bulunduran bileşiklerle hidrojen bağları yapabilirler.

Polar olmaları nedeniyle birincil aminlerin çoğu suda çözünür. Çözünürlük, ikincil ve üçüncül aminlere doğru gidildikçe azalır. Suda çözünürlüğü zayıf olan ya da hiç çözünmeyen aminler seyreltik asit çözeltilerinde, tuz oluşturarak tamamen çözünürler. Bu özelliklerinden dolayı aminler, seyreltik asit çözeltilerine alınarak polar olmayan diğer bileşiklerden ayrıştırılabilirler.

Aminler kendilerine özgü ölü balık kokusuna sahiptirler. Kaynama noktaları benzer molekül kütleli yalnız elektron çiftine sahip olmayan bileşiklerinkinden daha yüksektir.

2.2. Aminlerin Kullanım Alanları

2.2.1. Boyalar

Birincil aromatik aminler azo boya yapımı için başlangıç malzemesi olarak kullanılır. HNO_2 ile tepkimeye girerek diazonyum tuzları oluşturur, buda birleşme tepkimesi sonucunda azo bileşiği oluşturur. Azo bileşikleri renkli olduklarından boya endüstrisinde yaygın olarak kullanılırlar.

Bu maddelere bazı örnekler; Metil turuncu, gün batımı sarısı, ponceua kırmızısı örnek olarak verilebilir.

2.2.2. Gaz Arıtımı

Suda çözülmüş monoetanol amin, diglikol amin, dietanol amin ve metil dietanol amin endüstride yaygın olarak kullanılır. Doğal gaz hatlarından ve rafineri atıklarından CO_2 ve H_2S gazlarını arıtmak için kullanılırlar. Ayrıca bacalardan CO_2 'tin arıtılması için de kullanılabilirler ve sera etkisinin önüne geçme potansiyelleri vardır.

Ayrıca monoetanol amin; madeni yağ, mum ve reçineyi eriterek sabunu meydana getirir. Bu çeşit eriyikler tekstil üretiminde, metal kesiminde ve evde kullanılan parke cilalarında kullanılır. Gaz absorbe edici olarak kullanılır ve tekstil imalatındaki son işlemlerde, deterjan ve böcek ilacı imalatında kullanılır.

Suda çözülmüş dietanol amin; CO_2 'ti diğer gazlardan ayırmak için sanayide boya ve temizlik malzemelerinin elde edilmesinde kullanılır. Bir sentetik ağrı dindirici dietanol aminden yapılır.

Trietenol amin; otomobil radyatörlerine konan antrifize karıştırılarak paslanmaya karşı, dokuma sanayinde elyafların yağlanmasında sabun olarak ve parke cilalarında kullanılır. Ayrıca kozmetik, böcek ilacı ve petrolden çıkan kimya maddelerinde asit tesirini azaltıcı olarak kullanılır.

2.3. Biyojen Aminler

Biyojen aminler, aminoasitlerin dekarboksilasyonu veya aldehit ve ketonların aminasyon ve transaminasyonu ile oluşan azotlu bileşiklerdir (Maijala ve ark 1993; Santos, 1996; Gingerich ve ark. 1999). Bu aminler kimyasal olarak alifatik (putresin, kadavarin, spermin, spermidin), aromatik (tiramin, β -fenilettilamin) veya heterosiklik (histamin, triptamin) yapıda olabilir. Aynı zamanda içerdikleri azot sayısına göre de monoaminler, diaminler ve poliaminler olarak gruplandırılırlar. Hayvan, bitki, insan ve mikroorganizmaların metabolizmasında bulunan düşük molekül ağırlıklı organik bazlardır. Bu aminler; balık ve balık ürünleri, peynir, et ve et ürünleri, çikolata, şarap ve bira gibi gıdalarda işleme, olgunlaşma, depolama sırasında genellikle serbest kalan aminoasitlerin dekarboksilasyonu sonucu oluşur (Aksar ve ark, 1986). Ayrıca fermente gıdalarda kullanılan starter kültürlerinde gıdalardaki normal mikrobiyal flora ile etkileşimleri sonucu direkt ve indirekt olarak biyojen aminlerin oluşumunda rol aldıkları bilinmektedir (Scheuer ve Rodel, 1995; Beutling, 1996; Santos, 1996).

Gıdalarda uygun ısı (20-30 °C) ve pH (5-7) ile yeterli miktarda (1g' da $> 10^6$) amin oluşturabilen organizma olması durumunda amin oluşumu hızlanır, tuz oranının % 5 ten fazla olması durumunda biyojen amin oluşumu azalır (Beutling, 1996).

Biyojen aminler gıdaların pişirilmesinde ısıya dayanıklıdırlar (Aksar ve Treptow, 1986; Knut, 2002; Lehane, 2002). Bazı biyojen aminler, insan vücudunda özellikle sinir sisteminde ve kan basıncının kontrolünde önemli metabolik fonksiyonlara sahiptir.

2.3.1. Histamin

Düz kasların kasılmasına, damarları genişleterek kan basıncının düşmesine, kapiler permeabilitenin (kandaki bazı maddelerin dokulara geçme özelliği) ve mide asidi sekresyonunun (salgı) artışına yol açar, alerjik reaksiyonlarda rol oynar (Halasz, 1994; Jooesten, 1998).

2.3.2. Tiramin, Triptamin ve Fenilettil amin

Hipertansif etkiye (hipertansiyona yol açan, kan basıncını yükselten) sahiptirler. Tiramin ve triptamin düz kasların kasılmasına yol açar.

2.3.3. Putresin, Kadavarin, Spermin ve Spermidin

Hücreler için esansiyel bileşiklerdir. Protein sentezinde, nükleik asitlerin fonksiyonlarının düzenlenmesinde ve hücre membranının stabilizasyonunda rol oynar (Scheuer, 1995; Santos, 1996; Loser, 2000).

2.4. Halk Sağlığı Açısından Biyojen Aminlerin Önemi

İnsan ve hayvanların biyolojik fonksiyonlarında önemli role sahip olan biyojen aminler gıdalarda fazla miktarlarda alındıklarında toksik etkiler gösterebilir (Santos, 1996; Shalably, 1996). Genel olarak biyojen aminlerin neden olduğu en sık görülen toksik etkiler; ciddi baş ağrıları, hipo ve hipertansiyon, çeşitli alerjik reaksiyonlardır. Daha ciddi durumlarda ölüm olayları da meydana gelebilir.

2.4.1. Histamin

Normal olarak ağızdan alınan histamin çeşitli vücut dokularındaki histamin düzeyini etkilemez. Histamini düzenleyen mekanizma, alınan histaminin tamamını regüle etmede yetersiz ise, örneğin aşırı derecede histamin alınmış veya diğer toksik maddeler ile histamin metabolizması bozulmuş ise histamin zehirlenmesi ortaya çıkmaktadır.

Histamin zehirlenmesinde ilk belirtiler birkaç dakika veya 3 saat içinde ortaya çıkar. İlk önce yüzde ve boyunda kızarıklık meydana gelir ve genellikle bunu şiddetli baş ağrısı izler. Kalp çarpıntısı, baş dönmesi, baygınlık, hızlı veya yavaş nabız atışı, mide ve bağırsak şikayetleri, bronş spazmları ve solunum sıkıntısı gibi diğer semptomlarda bildirilmiştir (Stratton ve ark 1991; Joosten, 1998; Bakırcı, 2000).

Histamin, biyolojik olarak vücutta bir takım değişimler meydana getirebilir. Kalbi uyarabilir, ekstrasvasküler yüzey kaslarının kasılmasına veya gevşemesine neden olabilir ve gastrik asit salgılanmasını kontrol edebilir. Histamin zehirlenmesinin sıklığını belirlemek zordur. Çünkü birçok ülkede gıdalardaki histamin düzeyi belirlenememiştir. Ayrıca hafif seyrettiği ve belirtileri gıda alerjisine benzediğinden ayırt edilememektedir (Stratton ve ark, 1991; Joosten, 1998).

Histamin, histidin dekarboksilaz enzimine sahip mikroorganizmaların gıdalarda gelişmesiyle oluşmaktadır. Serbest histidince zengin gıdalar yüksek miktarlarda

histamin içerebilir. Fazla bekletilmiş balıklarda ve peynirde bulunan histaminin, sulu çözeltilerindeki histaminden daha fazla toksik olduğu görülmüştür. Bu olay bağırsakta histamin emilimini engelleyen histamini enzim mekanizmasının inhibitörlerinin bulunması ile açıklanabilir. Bu inhibitörler “putrefactive” (çürütücü) aminler olarak isimlendirilir ve bu aminlere örnek olarak putresin ve kadavarin verilebilir. Yani histaminin gıda zehirlenmesindeki etkinliği putresin ve kadavarin varlığı ile daha da artmaktadır (Stratton ve ark, 1991; Rodriquez-Jerez ve ark, 1994).

Hafif seyreden belirtilerde 1,5 mmol/kg dozda, histamin zehirlenmesinin belirtileri elde edilir. Bununla beraber gıdalarda toksik olarak histamin düzeyinin saptanması mümkün değildir.

2.4.2. Tiramin

Tirozinin biyojen amin türevi olan tiramin, birçok gıdada doğal olarak bulunur. Tiramin, tirozinin dekarboksilasyonu sonucu ve süt proteinlerinin bakteriyel parçalanmasıyla peynir yapımı sırasında oluşmaktadır. Tiramin genellikle çok büyük miktarlarda alınmaz ise herhangi bir tehlikesi yoktur.

Histaminin aksine tiramin vücutta önemli bir metabolit değildir ve çok düşük konsantrasyonlarda bulunur. Tiramin genellikle kan basıncının artmasına, kalp çarpıntısına ve baş ağrısına neden olur. Tiramin aynı zamanda yüksek dozlarda alındığında kan şekeri düzeyini artırmaktadır (Jooesten, 1998). Tiramin zehirlenmesi peynir reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır.

3 mmol doz seviyesine kadar sistolik kan basıncında meydana gelen artışın önemli olmadığı tespit edilmiştir. Toksik olabilmesi için çok fazla miktarlarda tiramin alınması gerektiği yapılan araştırmalar sonucunda elde edilmiştir (Jooesten, 1998).

2.4.3. Putresin ve Kadavarin

Gıdalarda bu bileşenlerin bulunmasının en önemli sonucu, diğer biyojen aminlerin toksitesini artırmasıdır. Histaminin gıda zehirlenmesindeki etkinliği bu iki amin varlığında artmaktadır (Rodriquez-Jerez ve ark, 1994; Jooesten, 1998). Çok büyük miktarlarda putresin ve kadavarin alınması toksik etkiye neden olabilir. Zehirlenme belirtileri olarak düşük tansiyon ve nefes darlığı bildirilmiştir.

Putresin, kadavarin gibi diaminler, nitrillerle reaksiyona girme yatkınlıkları ve potansiyel kanserojen nitrozaminler oluşumu nedeni ile, mutajenik öncüller olarak değerlendirilmektedir (Hernandez-Jover ve ark, 1997; Nakamura ve ark, 1997; Ordonez ve ark, 1997; Bover-Cid, 2000). Bu aminler, ısıyla nitrozopirolidin ve nitrozopiperidin meydana getirerek, pirolidin ve piperidine dönüşür (Shalably, 1996; Nakamura ve ark, 1997). Bu yüzden pişirme (kızartma) ile çiğ ürünlerde bulunan serbest nitrozamin oluşumu artmaktadır.

2.4.4.Triptamin

Tiramine benzer bir farmakolojik etkiye sahiptir. Ancak triptaminden kaynaklanan yüksek tansiyon krizleri ve zehirlenmeler bildirilmemiştir. Bunun nedeni gıdalarda yüksek miktarlarda triptamin bulunmamasıdır (Jooesten, 1998).

Biyojen aminlerin toksisitesi, bireysel karakterler ve diğer aminlerin konsantrasyonlarına bağlı olduğundan, bunların toksik düzeylerinin belirlenmesi zordur.

Gıdalarda > 100 mg/kg histamin; > 100-800 mg/kg tiramin; > 30 mg/kg feniletıl amin toksikasyona yol açar.

Alkollü içeceklerde > 2 mg/L histamin toksikasyona yol açar.

2.5. Gıdalarda Biyojen Aminlerin Varlığı

Biyojen aminlere, mikrobiyel ve biyokimyasal aktivite için uygun koşulların olduğu durumlarda serbest aminoasit veya protein içeren bütün gıdalarda rastlanabilir (Brink, 1990). Özellikle balık ve balık ürünleri, et ve et ürünleri, peynir gibi çeşitli gıdalarda bira, şarap, lahana turşusu gibi fermente ürünlerde önemli miktarlarda oluştukları bilinmektedir.

Balık ve balık ürünleri, histamin zehirlenmesinden sorumlu tutulan başlıca gıda olarak değerlendirilmektedir. Omura ve arkadaşları (Omura,1978) tarafından yapılan bir çalışmada ton balıkları beş gün süreyle oda sıcaklığında (20-25 °C) bırakıldıktan sonra histamin miktarı 7140 mg/kg olarak saptanmıştır.

Veciano-Noques ve arkadaşları (Veciana-Nogues ve ark, 1978) yarı konserve hamsilerde üretim ve depolamada oluşan değişiklikler üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Salamurada ve yağda paketlenen hamsilerde oda sıcaklığında depolama işleminde,

yüksek histamin ve triptamin oluşumu gözlenmiş, dondurarak muhafazanın ise amin oluşumunu önlediği bildirilmiştir.

Smith ve arkadaşlarının (Smith ve ark, 1993) yaptığı bir çalışmada 120 gün 1 °C de depolanan vakum paketlenmiş sığır etlerinde biyojen amin oluşumu araştırılarak depolamanın 20. gününden itibaren önemli seviyelerin tespit edildiği bildirilmiştir.

Nakamura ve arkadaşlarının (Nakamura ve ark, 1997) yaptığı bir çalışmada domuz etinin poliamin (spermidin, spermin, putresin ve kadavarin) içeriği incelenerek taze domuz eti örneklerinde bu aminlerin miktarları oldukça düşük (0,1-6,9 mg/100 g) bulunmuştur. Buna karşılık, bozulmuş domuz etlerinde spermin, spermidin, putresin, kadavarin miktarlarının sırasıyla 2796, 1013, 351 ve 40,8 mg/100 g seviyelerinde olduğu belirtilmektedir.

Peynirde oluşan en önemli biyojen aminler; tiramin, histamin, putresin, kadavarin, triptamin ve feniletil amin olup bu aminlerin miktarları olgunlaşma süresince artmaktadır (Shalably, 1996; Ordonez ve ark, 1997).

Bira ve şarap gibi fermente içkiler, çeşitli biyojen aminleri önemli miktarlarda içermektedir. Lahana turşusunda da biyojen aminler önemli miktarlarda bulunabilmektedir.

Mandalina, portakal, limon, ahududu, çilek, üzüm ve greyfurttan elde edilen meyve suları ve nektarları, değişik konsantrasyon ve yapıda biyojen amin içerebilmektedirler. Bunların başında ise putresin gelmektedir (Santos, 1996). Ayrıca kakao tanelerinde ve kakaodan yapılan çikolata, çikolata ürünleri ve şekerlemelerde doğal olarak feniletil amin bulunabilmektedir. Alglerden yapılan karamela veya şekerlemelerde ise histamin ve kadavarine rastlanmıştır (Santos, 1996).

2.6. Biyolojik Önemi Olan Bazı Aminler

Tıbbi ve biyolojik önemi olan bileşiklerin çoğu amindir. Aşağıda böyle aminlere bazı örnekler verilmiştir.

2.6.1. Feniletil Aminler

Pek çok feniletilamin bileşiğinin güçlü ve fizyolojik etkileri vardır. Adrenalin ve nöradrenalin adrenal salgı bezinden salgılanan iki hormondur. Bir hayvan bir tehlike hissettiğinde kana verilen adrenalin kan basıncını ve kalp atış hızını artırır, akciğer

hava geçiş yollarını genişletir. Bütün bu etkiler hayvanı savaşmaya ya da kaçmaya hazırlar. Noradrenalin de kan basıncını arttırır ve dürtülerin bir sinir ucundan diğerine geçmesinde görev üstlenir. Dopamin ve serotonin beyindeki önemli sinir ileticileridir. Beyindeki dopamin düzeyindeki anormallikler, Parkinson hastalığı dahil, pek çok psikolojik hastalığa neden olur. Dopamin hareketlerin, motivasyonun ve duyguların kontrolünde ve düzenlenmesinde başlıca rol oynar. Serotonin ilginç bir bileşiktir. Zihinsel aktiviteleri artırdığı bilinmektedir. şizofreni gibi zihinsel bozuklukların serotonin metabolizması ile ilgili olduğu düşünölmektedir.

2.6.2. Vitaminler ve Antihistaminler

Aminlerin bir çoğu vitamindir. Bunlardan bazıları nikotinic asit ve nikotinamid, pridoksin ve tiamin klorürdür. Nikotin tütünde bulunan zehirli bir alkaloidtir ve sigara alışkanlığını yapan bileşiktir. Klorfeniramin bir “antihistamindir” ve soğuk algınlığının tedavisinde ilaç bileşeni olarak kullanılır. Başka bir zehirli amin olan histamin vücudun bütün dokularında proteinlere bağlanmış olarak bulunur. Histaminin serbest kalması alerjik tepkimelere ve soğuk algınlığına neden olur.

2.7. Elektroanalitik Kimya

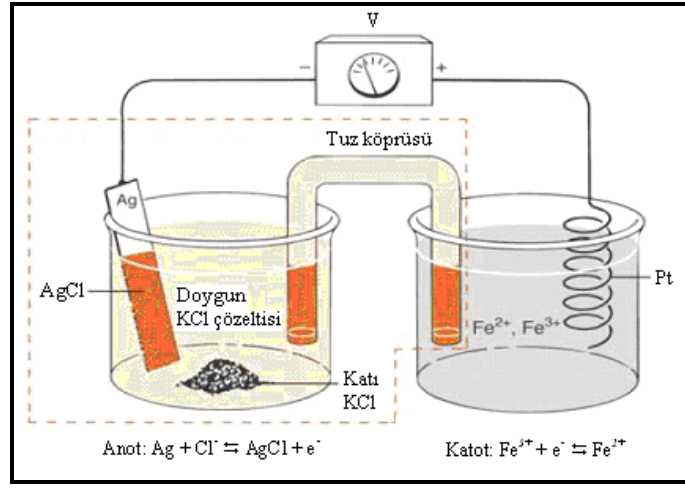
Elektroanalitik kimya, çözeltilerin elektrokimyasal hücrelerin bir kısmı haline getirildikten sonra, elektriksel özelliklerinin ölçülmesi ve ölçülen bu özelliklerinden yararlanılarak maddenin tayin edilmesi üzerine kurulmuş olan metotlar topluluğudur. Bu metotlar topluluğu çok sayıdaki maddenin tayinine imkan verir. Ayrıca, bunlar öteki analitik metotlara da bir takım üstünlükler sağlarlar. Bu üstünlükler şunlardır:

- 1) Elektroanalitik metotlarla genel olarak bir maddenin veya iyonun birden fazla yükseltgenme basamağı varsa sadece bir yükseltgenme basamağı tayin edilir.
- 2) Elektroanalitik kimya alanında kullanılan cihazlar basit ve ucuzdur.
- 3) Elektroanalitik metotlar, iyonun konsantrasyonunun değil, aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılır. Bu durum konsantrasyon ölçülmesinden daha anlamlıdır.

Elektroanalitik kimya başlıca dört bölüme ayrılır (Gündüz T., 2002). Bunlar:

- 1) Potansiyometri
- 2) Kulometri
- 3) Kondüktometri
- 4) Voltametri

Şekil 2.1’de elektroanalitik kimyada kullanılan elektrokimyasal bir hücre yer almaktadır.



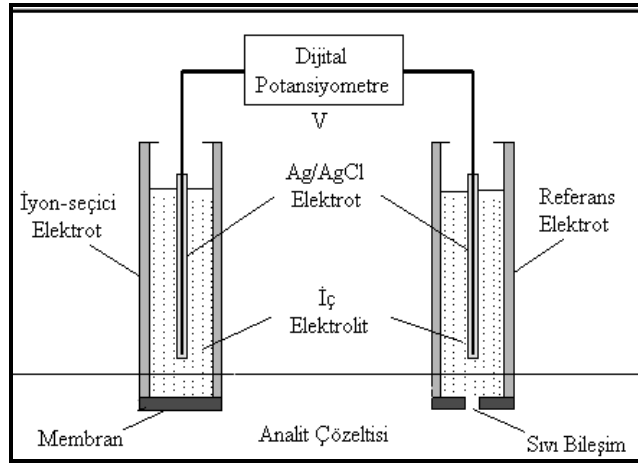
Şekil 2.1. Elektrokimyasal bir hücre

Laboratuarda geliştirdiğimiz bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrot potansiyometrik olarak cevap gösterdiği için potansiyometrik yöntemi ele alalım.

2.8. Potansiyometri

Potansiyel ölçümüne dayalı analitik metotlar “potansiyometrik metotlar” olarak adlandırılır. Akımın çok az geçtiği veya hiç geçmediği sistemlerde, indikatör elektrotun referans elektroda karşı gösterdiği, konsantrasyon değişimine bağlı olarak değişen potansiyelin ölçüldüğü tayin yöntemidir. Değişken direncin ayarlanması ile standart voltajın bilinen kısmı bilinmeyen voltaja karşı işaretlenir. İki voltaj eşit olduğu an, galvanometreden herhangi bir akım geçmez. Böylelikle bilinmeyen voltaj, değişken direncin pozisyonundan okunabilir (Covington, 1974). Potansiyometrik sistem; bir test

hücresi (analit çözeltisi), buna bağlantılı olan indikatör elektrot (değişken potansiyel) ve referans elektrot (sabit potansiyel) ile kararlı bir potansiyometreden oluşur. Bunlara “potansiyometrik hücre elemanları” da denir. Analit çözeltisine daldırılan indikatör elektrotta, mevcut iyon veya iyonların konsantrasyonuna bağlı olan bir potansiyel değişimi meydana gelir. Dolayısıyla potansiyel değişimi ölçülerek iyonların konsantrasyonları tayin edilebilir. Şekil 2.2’de basit bir potansiyometrik sistem görülmektedir.



Şekil 2.2. Basit bir potansiyometrik sistem

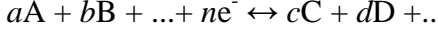
İyon-seçici elektrotlar son yıllarda önem kazanmış ve günümüzde geniş bir kullanım alanına sahip ve iyi bilinen, alternatif bir yöntemdir (Captian-Vallvey ve ark., 2003). İyon-seçici elektrotların kullanıldığı potansiyometri, sürekli ve otomatik analizlerde kullanıma uygun bir tekniktir. Buna ilaveten kemometrik yaklaşımlar ve akış enjeksiyon sistemleri kullanılarak iyon-seçici elektrotların analizlerde kullanımı her geçen gün gelişim göstermektedirler (Saurina ve ark., 2002; Moreno ve ark., 2006). İyon-seçici elektrotlar oldukça basit, ucuz ve yerinde ölçümlere uygulanabilir özelliklere sahiptirler (Saurina ve ark, 2002).

2.8.1. Potansiyometrik Tayin İlkesi

Modern bir iyon seçici elektrotta, iyon-seçici membran iç standart ve test çözeltisindeki iyonları birbirinden ayırır. Elektronlar, basit iyonlar veya test edilen iyonun yüklü ya da nötral kompleksleri, membranın iç kısımlarına doğru iç standart

çözeltinin kompozisyonuyla orantılı olarak taşınırlar. Böylece oluşan elektrostatik motor kuvveti (EMK), standart referans elektrot yarı hücresiyle membran elektrot yarı hücresi birleştirilerek ölçülür (Skoog ve ark., 1990).

Konsantrasyon ile elektrot potansiyeli arasındaki ilişki aşağıdaki gibidir;



tersinir yarı reaksiyonu ele alındığında, bir elektrodun potansiyel farkı (E), Nernst (Nernstian) Eşitliğiyle verilmiştir.

$$E = E^0 \pm \frac{2,303RT}{nF} \log \frac{a_2}{a_1}$$

E = İndikatör elektrot potansiyeli

E° = Standart elektrot potansiyeli

R = Gaz sabiti, 8,314 J.mol⁻¹.K⁻¹

T = Sıcaklık, Kelvin (0 °C için 273,15 K)

F = Faraday sabiti (96486 J.volt⁻¹)

a_A^a, a_B^b, a_C^c ve a_D^d = Elektrotta hissedilen iyon aktiviteleri

a, b, c ve d = yarı reaksiyonda yer alan her bir türün mol sayısı

n= Alınıp-verilen elektron sayısı veya membrandaki aktif iyon yüküdür.

a_i iyon aktivitesi olmak üzere, eşitlik tek bir iyon için yazılırsa, aşağıdaki gibi olur.

$$E = E^0 \pm \frac{RT}{nF} \ln a_i \quad (\pm) ; \text{Anyonlar için } (-), \text{katyonlar için } (+) \text{ olur}$$

Eğer iyon aktivitesi a_1 'den a_2 'ye değişirse potansiyel değişimi aşağıdaki gibi olur.

$$E = E^0 \pm \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_2}{a_1}$$

Eşitliğe göre, çözeltilerde iyon aktivitesinin artması sonucu elektrodun cevabı logaritmik olarak gözlenir.

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_C^c \cdot a_D^d \dots}{a_A^a \cdot a_B^b \dots}$$

Eğer ölçümler 25°C’de alınırsa, sabit sayılar yerine yazıldığında Nernst Eşitliği aşağıdaki gibi olur.

$$E = E^0 \pm \frac{0,0592}{n} \log \frac{a_2}{a_1}$$

Buna göre 25°C’de E-log(a) ilişkisinin teorik değişimi n yüklü iyonlar için 59,2/n mV’dir. Bu değişim genel olarak katyonlar için pozitif anyonlar için negatiftir. Dolayısıyla tek yüklü, iki yüklü ve üç yüklü iyonlar için bu değer sırasıyla 59,2, 29,6 ve 19,8 mV olur (Haddad ve Jackson, 1990). Kalomel ve gümüş/gümüş klorür elektrotlar bir hücreye indikatör elektrotlara karşı konabildikleri gibi son zamanlarda kombine elektrotlar da yapılmaktadır.

Bir iyon-seçici elektrot hücresindeki potansiyel değişimi şematik olarak aşağıdaki gibi gösterilebilir.

İç referans elektrot / İç referans çözelti // İyon-seçici membran elektrot // Test çözeltisi / Dış referans elektrot veya;

İç referans elektrot (bakır tel) / Katı-hal kontakt // iyon-seçici membran elektrot // Test çözeltisi / Dış referans elektrot

2.8.2. Referans Elektrotlar

Referans elektrotlar, elektrot potansiyeli tam olarak bilinen bir yarı hücredir. Bir hücrede kullanımı esnasında potansiyeli değişmeden kalabilen elektrotlardır. Bunlara standart elektrotlar da denir. Referans elektrodun potansiyeli numune çözeltisinde bulunan analitin ve diğer iyonların konsantrasyonuna bağlı değildir. Potansiyometrik ölçümlerde referans elektrot genellikle anot işlevi görür.

Referans elektrotların potansiyelleri sıcaklık değişimlerinden etkilenir ve bir miktar değişir.

İdeal bir referans elektrodun sahip olması gereken özellikler şöyle sıralanabilir (Gündüz T., 2002):

1) Değeri tam olarak bilinen, örnek çözeltisinin bileşiminden hiç etkilenmeyen ve zamana bağımlı olmayan sabit bir potansiyel vermelidir.

- 2) Çözeltiden küçük akımların geçmesinden hemen sonra eski potansiyeline geri dönebilmelidir.
- 3) Tekrarlanabilen sonuçlar vermeli (tersinir) ve Nernst denkleminde uymalıdır.
- 4) Kolay kullanılabilirdir.

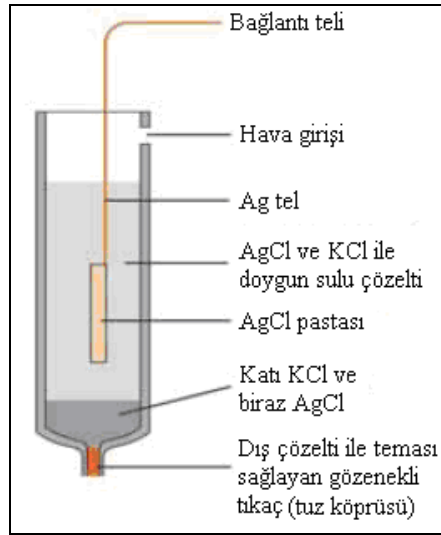
En yaygın kullanılan referans elektrotlar, referans hidrojen elektrodu, kalomel referans elektrot ve gümüş/gümüş klorür referans elektrotlardır.

Biz çalışmamızda Ag/AgCl referans elektrodu kullandığımız için bu elektrodun çalışma mekanizmasını açıklayacağız.

2.8.2.1. Gümüş/Gümüş Klorür Referans Elektrot

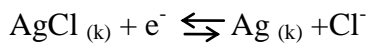
Yaygın olarak kullanılan referans elektrotlardan biri de gümüş/gümüş klorür referans elektrottur. Bir gümüş/gümüş klorür elektrot, genellikle gümüş veya platin bir telin yüzeyine gümüş klorürün kaplanmasıyla hazırlanır. Elektrot ile hücre arasındaki temas gözenekli cam ile sağlanır.

Bir gümüş/gümüş klorür referans elektrot Şekil 2.3’de görülmektedir.



Şekil 2.3. Gümüş/gümüş klorür referans elektrot

Elektrota gerçekleşen reaksiyon şu şekildedir:



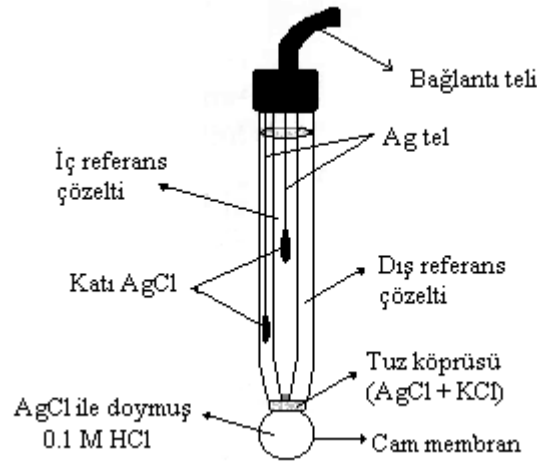
$$E = E^\circ_{\text{AgCl/Ag}} - 0,059 \log [\text{Cl}^-]$$

Tepkimeye göre elektrot potansiyeli klorür iyonu derişimine bağlıdır. Ortamda bulunan KCl, elektrotta gerçekleşen indirgenme ya da yükseltgenme tepkimeleri sonucunda elektrodun potansiyelinde oluşabilecek değişime karşı tampon görevi görür. Ayrıca KCl, pH ölçümlerinde girişim yapmaması ve potasyum iyonu ile klorür iyonu mobilitelerinin eşit derecede birbirine yakın olması sebebiyle bu elektrotta çok kullanılan bir elektrolittir. Elektrodun hücreyle olan teması gözenekli bir cam ile sağlanmaktadır.

Gümüş/gümüş klorür elektrodun standart hidrojen elektroduna karşı 25 °C sıcaklıktaki elektrot potansiyeli 0,199 V'tur. Gümüş/gümüş klorür elektrodun potansiyeli sıcaklıktan çok az etkilenir. Bu sayede elektrot, 275 °C'ye kadar kullanılabilme avantajına sahiptir.

Gümüş/gümüş klorür elektrot, kalomel elektrotta kullanılan cıvanın toksik özellik taşıması nedeniyle daha çok tercih edilir. Ayrıca oldukça küçük boyutlarda gümüş/gümüş klorür elektrot yapılabilmesi avantajı birçok çalışmada kolaylık sağlar.

Kalomel ve gümüş/gümüş klorür referans elektrotlar bir hücreye indikatör elektrotlara karşı konabildikleri gibi son zamanlarda kombine elektrotlar halinde de yapılmaktadır. Kalomel elektrot ile indikatör elektrot veya gümüş/gümüş klorür elektrot ile indikatör elektrot yan yana bir tüp içerisine yerleştirilerek Şekil 2.4'deki gibi bir kombine elektrot sistemi yapılmıştır.



Şekil 2.4. Gümüş/gümüş klorür referans elektrotlu kombine cam elektrot

2.8.3. İndikatör Elektrotlar

Potansiyometrik bir hücrede referans elektrotla birlikte kullanılan, tayini yapılacak iyonun aktivitesindeki meydana gelen değişimi ölçen elektrotlara indikatör elektrotlar denir. Bunlar iyon-seçici elektrotlardan oluşur. Bir indikatör elektrot, analizi yapılacak iyonun aktivitesindeki değişimlere çok kısa sürede cevap verir. Bu tür elektrotlar belirli bir iyonla karşı seçicilik göstermesine rağmen diğer iyonlara karşı da tamamen duyarsız değildir. Son zamanlarda bazı iyonlar için iyi derecede seçicilik gösteren çeşitli indikatör elektrotlar yapılmıştır (Gündüz T., 2002).

İndikatör elektrotlar; metalik indikatör elektrotlar ve membran indikatör elektrotlar olarak iki grupta incelenmektedir (Gündüz T., 2002).

2.8.4. İyon Seçici Elektrotlar

Birçok iyon yanında sadece tek bir iyonla cevap sergileyen elektrotlara “iyon-seçici elektrotlar (ISE) denir. İyon-seçici elektrotlar, serbest iyonun aktifliğine duyarlıdır. İyonik şiddet sabit tutulursa konsantrasyon aktiflikle doğru orantılı olduğundan ISE ile konsantrasyonlar ölçülmüş olur. Hiçbir elektrot sadece tek bir iyon çeşidine cevap vermez, mutlaka ortamdaki diğer iyonların girişimleri söz konusudur. Fakat bir iyonla karşı bilinen bir seçicilik gösterir.

Potansiyometrik iyon-seçici elektrotları oluşturan membranlarda bulunması istenen bazı özellikler vardır. Buna göre ideal bir membran;

- 1) Diğer birçok iyonun yanında sadece analit iyonla seçici davranır.
- 2) Analit çözeltisi içinde çözünmez veya çözünmesi ihmal edilebilecek seviyededir.
- 3) Membranın bir yüzeyi ile diğeri arasında bir miktar iletkenlik gösterir.

İyon-seçici elektrotların sınıflandırılması aşağıdaki gibi yapılır.

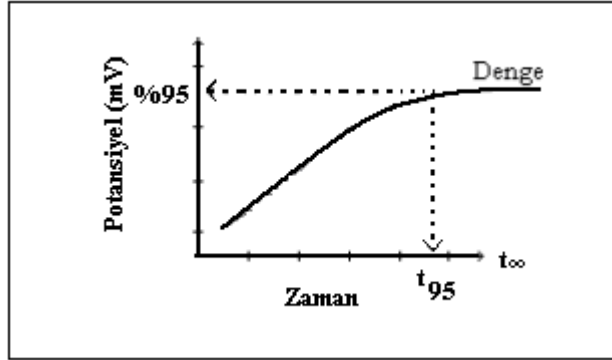
- ❖ Cam iyon-seçici elektrotlar
- ❖ Metalik (katı-hal) iyon-seçici membran elektrotlar (I., II. ve III. Sınıf)
- ❖ Kaplama tel elektrotlar
- ❖ Sıvı-hal iyon-seçici elektrotlar
- ❖ Gaz ve enzim elektrotlar
- ❖ İyon-seçici alan etki transistörleri (ISFET)

- ❖ Kompozit elektrotlar
- ❖ Sıvı-membran iyon-seçici elektrotlar (polimer-membran elektrotlar)

2.8.5. İyon-Seçici Elektrotların Performansına Etki Eden Faktörler

2.8.5.1. Cevap Zamanı

İyon-seçici elektrotlarda cevap zamanı genel olarak membranın duyarlı kısmıyla çözültideki iyonun dengeye gelmesi için geçen zaman olarak bilinir. Uluslararası Kuramsal ve Uygulamalı Kimya Birliği'ne (IUPAC, 1994) göre dengeye gelme zamanının % 95'i olarak alınır ve t_{95} olarak gösterilir (denge potansiyelinin de % 95'ine karşılık gelir). Şekil 2.5'de IUPAC'a göre cevap zamanı grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.5. IUPAC'a göre cevap zamanı

Girişim yapan iyonlar, bir Nernst potansiyel farkı oluşması için taşınması gereken iyonların aktif elektrot yüzeyine ulaşmalarını geciktirir ve cevap zamanını etkiler.

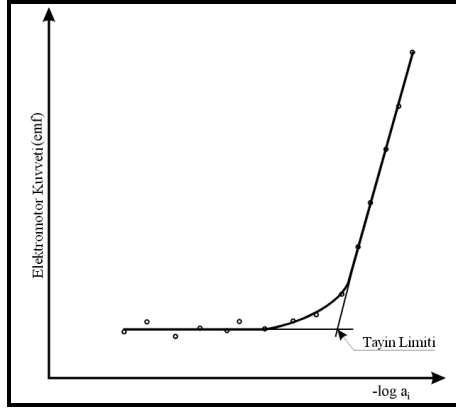
Elektrotların cevap süreleri aşağıdaki işlemlerle kısaltılabilir;

1. Etkili karıştırma (veya akış hızının artırılması)
2. Membran yüzeyinden kirliliklerin uzaklaştırılması veya çok küçük membran yüzeyli mikroelektrotlar kullanılması
3. Ölçüm sırasında çözelti konsantrasyonunun düşükten yükseğe doğru olması.

2.8.5.2. Tayin Limiti

İyon-seçici elektrotların tayin limiti, membran ara fazında ölçülebilir bir potansiyel farkı meydana getiren en düşük iyon konsantrasyonu olarak tanımlanır (IUPAC, 1994). Şekil 2.6'da IUPAC'a göre tayin limiti grafiksel olarak gösterilmiştir.

Çoğu iyon-seçici elektrot için tayin limiti 10^{-6} mol.L⁻¹ civarındadır. Bazılarında ise 10^{-8} mol.L⁻¹'e kadar düşebilir. Bu limitler, ortamda bulunan girişim yapan iyonlar ve moleküller ile ters yönde etkilenebilir (konsantre sulu çözeltilerde su molekülleri iyonların hidrofobik membrana girişini önler ve tayin limiti ters yönde etkilenir).



Şekil 2.6. IUPAC'a göre tayin limiti

2.8.5.3. Seçicilik

İdeal olarak sadece tek bir iyonla duyarlı bir elektrot yoktur. X iyonunu ölçmek için kullanılan bir elektrot Y iyonuna da duyarlı olabilir. Diğer iyonların varlığı elektrot performansını önemli ölçüde etkiler. Bu iyonların girişimi, elektrot membranının yapısına bağlı olarak çeşitli şekillerde olabilir.

Seçicilik ilk kez Nicolsky tarafından hidrojen ve sodyum iyonlarına duyarlılık gösteren cam elektrot için kullanılmış ve aşağıdaki eşitlikle verilmiştir. Pek çok ISE çoğunlukla aşağıdaki eşitliğe uygun davranır (Kolycheva ve Muller, 1991)

$$E = E^0 + \frac{0,0592}{n} \log \left[a_x + \sum \left(k_{x,y}^{pot} a_y^{n_x/n_y} \right) \right]$$

a_x = Ölçülecek iyonun aktivitesi

a_y = Girişim yapan iyonun aktivitesi

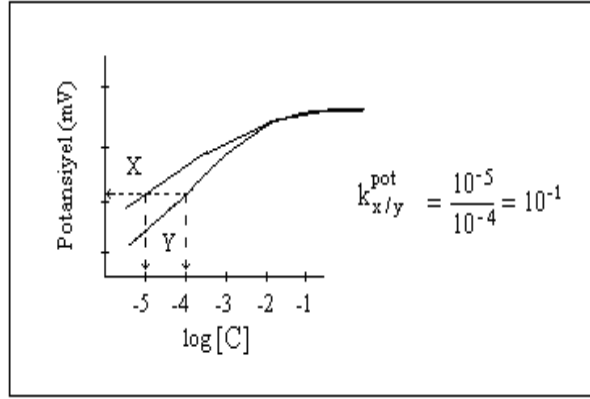
n_x, n_y = Herbir türün yükü

$k_{x,y}^{pot}$ = Seçicilik katsayısı

Seçicilik katsayısı ($k_{x,y}^{pot}$) büyüdükçe elektrodun ölçülecek iyon duyarlılığı azalır ve log a_x -potansiyel grafiği yataya doğru gider. Girişim yapan iyonun yokluğunda Nernst değişimi gözlenir. Seçicilik katsayısı;

1. Ayrı çözelti metodu,
2. Ana iyonun girişim yapan iyon çözeltisine ilavesi metodu,
3. Girişim yapan iyonun ana iyon çözeltisine ilavesi metodu ile hesaplanabilir.

Seçicilik katsayısının hesaplanmasında metotlardan herhangi birisi kullanılabilir. Ayrı çözelti metodunda, elektrodun hem ana iyon karşı hem de girişim yapan iyon karşı kalibrasyonu alınır ve Şekil 2.7'de gösterildiği gibi kalibrasyon grafikleri karşılaştırılarak seçicilik katsayısı hesaplanabilir.



Şekil 2.7. Seçicilik katsayısının kalibrasyon grafiği ile gösterimi

2.8.5.4. Tekrarlanabilirlik

Hazırlanan iyon seçici elektrotların tekrarlanabilir potansiyeller vermesi analiz işlemlerinde hataların en aza indirilebilmesi ve analizin güvenilirliği yönlerinden arzu edilen bir özelliktir.

Tekrarlanabilirlik, farklı konsantrasyonlardaki standart çözeltilerde elektrodun uzaklaştırılıp yıkandıktan sonra tekrar çözeltilere daldırılmasıyla sergilediği bir seri potansiyel değerlerinin standart sapması olarak verilebilir.

2.8.5.6. Kullanım Ömrü

Bir ISE için kullanım ömrü en önemli karakteristik özelliklerden birisidir. Elektrotların kullanım ömürleri Nernst cevabı sergiledikleri süre olarak bilinir (Özkan ark., 2000). Elektrotların kullanım ömürleri on katlık konsantrasyon değişiminde belirli periyotlarla sergiledikleri potansiyel farklar incelenerek belirlenir. Ölçülen bu potansiyel farklar kullanılarak zamana karşı grafikler oluşturulur. Eğitimde önemli bir farkının meydana geldiği süre kullanım ömrü olarak verilebilir.

2.8.6. İyon Seçici Elektrotların Avantaj ve Dezavantajları

2.8.6.1. İyon Seçici Elektrotların Avantajları

İyon seçici elektrotlar aşağıdaki avantajlara sahiptirler:

1. Elektrotlar, pek çok kimyasal tür için geniş bir konsantrasyon aralığında doğrusal olarak değişim gösterirler.
2. Bilinmeyen numunenin bozunmasına neden olmazlar. Sadece numuneyi ihmal edilebilir ölçüde kirletirler.
3. Elektrotların cevap süreleri genellikle kısadır (saniye ve dakika seviyelerinde). Bu nedenle klinik ve endüstriyel numunelerin tayininde kullanılırlar.
4. Spektrofotometrik ölçümlere uygun olmayan, koyu renkli ve bulanık çözeltiler elektrotlarla kolaylıkla ölçülebilirler.
5. Özel olarak hazırlanan elektrotlar ile canlı hücrelerin içi gibi değişik yollarla ulaşılamayan zor ortamlarda ölçüm yapılabilir.
6. Elektrotlar, kromatografik ve akış yolu-enjeksiyonu analiz yöntemlerinde dedektör olarak kullanılabilirler.
7. Hem pozitif ve hem de negatif iyonların derişimi ölçülebilir.
8. Hızlı ve kolay bir biçimde kullanılabilirler. Tamamıyla katı-hal kontakt ve jel dolgulu modelleri sağlam ve kararlıdır.

2.8.6.2. İyon Seçici Elektrotların Dezavantajları

İyon-seçici elektrotların avantajlarının yanı sıra bazı dezavantajları da vardır. Bunlar şöyle sıralanabilir:

1. Elektrotlarla çalışılırken olumlu sonuç elde edebilmek için çok dikkatli olmak gerekir.
2. İyon seçici elektrotlarla yapılan ölçümlerin kesinliği nadiren % 1'den daha iyi olup, genellikle daha düşüktür.
3. Elektrotlar, potansiyellerin kararsız olmasına ve kaymasına yol açacak şekilde, proteinler ve diğer organik maddeler vasıtasıyla kirlenebilirler.
4. Bazı iyonik türler girişim yapar veya elektrotları zehirlerler.
5. Elektrotlar kompleks halde olmayan serbest haldeki iyonlara cevap verirler. Bu nedenle ISE'lerle yapılan ölçümler ortamda ligant bulunmamasını, varsa da varolan ligantların maskelenmesini gerektirir.
6. İyonların tayininin doğruluğu açısından ölçümler sırasında ortamın iyonik şiddetinin sabit tutulması gerekir.

2.8.7. İyon Seçici Elektrotların Uygulamaları

İyon-seçici elektrotlar genellikle dört farklı analitik uygulamada yaygın olarak kullanılır. Bunlar;

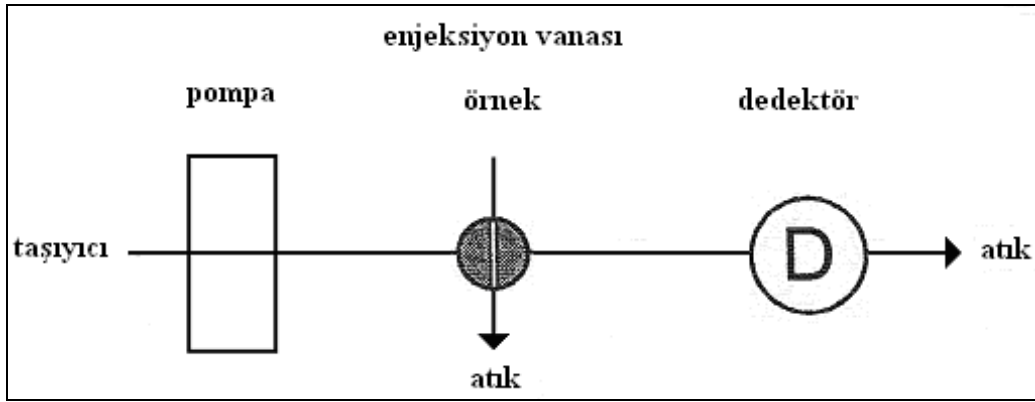
1. Doğrudan ölçümlerde,
2. Potansiyometrik titrasyonların dönüm noktalarının tayininde,
3. Denge sabiti ve buna bağlı fiziksel sabitlerin hesaplanmasında hareketli ortamlarda dedektörler olarak kullanılırlar.

2.9. Akış Enjeksiyon Analizi (AEA)

Akış Enjeksiyon Analiz (AEA) tekniği ilk olarak 1975 yılında Ruzicka ve Hansen tarafından tanımlanmıştır. Seri halinde olan denemeleri otomatikleştirmek için tasarlanan AEA, genel bir çözelti boşaltma ve toplama tekniği olarak ortaya çıkmıştır. Ruzicka ve Hansen'in Danimarka'da, Stewart'ın Amerika'da aynı zamanlarda aldıkları patentlerle başlatılan bu yeni teknoloji, hızlı bir şekilde dünyada büyük kabul görek rutin analizlerde yaygın uygulama alanları bulmuştur (Skoog, 1998).

Akış enjeksiyon analizi, daha önceleri kan ve idrar analizlerinde kullanılan segmentli akış analizinin bir devamıdır. Segmentli akış analiz cihazlarında numuneler dedektör içinde yan yana hava kabarcıkları bulunan bir sulu çözelti vasıtasıyla götürülürdü. Burada kullanılan hava kabarcıklarının görevi; numunenin dağılmasını önlemek, numuneyle ayırıcın karışmasını kolaylaştırmak, numune yolunu temizlemek ve böylece ard arda analizi yapılan numunelerin birbirlerini kirletmelerini önlemektir (Gündüz T., 2002).

AEA; basit temelli, oldukça ucuz donanımlı, elle gerçekleştirilen seyreltme, deriştirme, karıştırma, çözücü ekstraksiyonu vb. pek çok analitik işlemin otomasyonunu sağlayan, hızlılık, kesinlik, doğruluk açısından mükemmel sonuçları elde edebilme kapasitesine sahip, çok amaçlı kullanıma uygun bir tekniktir. AEA sistemi çok basittir ve arzu edilen herhangi bir ihtiyacı karşılamak için karmaşık değişiklikler gerektirmemektedir. Aynı zamanda sistemin optimizasyonunu ve kimyasal değişkenlerin kontrolünü sağlamak çok kolaydır. Genel olarak tek kanallı bir AEA sisteminin blok şeması şekil 2.8’de görülmektedir.



Şekil 2.8. AEA sisteminin blok şeması

AEA tekniği belirli hacimdeki örnek çözeltisinin uygun bir taşıyıcı faz içerisine enjeksiyonuna dayanmaktadır. Enjekte edilen örnek, bir bölge oluşturur ve dedektöre doğru taşınır. Bu taşınma sırasında reaktif ile karşılaşır ve kimyasal reaksiyona girerek dedekte edilebilir türlerine dönüşürler. Olay, örnek bölgesinin taşınması nedeniyle sürekli olarak değişen absorbans, elektrot potansiyeli gibi parametreleri devamlı olarak kaydeden dedektörde geçici bir pik oluşumu ile sonuçlanır. Pik yüksekliği veya alanı

derişimle orantılıdır ve bilinen derişimdeki örneklerle karşılaştırılarak kantitatif tayin amaçlı kullanılır.

Kısaca AEA tekniğinin başarılı bir şekilde çalışması ve uygulanması için bazı temel özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bunlar;

- 1) Kesintisiz sürekli akış,
- 2) Tekrarlanabilir örnek enjeksiyonu
- 3) Örnek bölgesinin kontrollü kısmi dağılması,
- 4) Tekrarlanabilir işlem zamanlaması, şeklinde sıralanabilir.

Akış-enjeksiyon analiz cihazlarında hava kabarcıkları kullanılmaksızın numunenin dağılması ve birbirlerini kirletmeleri tamamen önlenmiştir. Ayrıca, hava kabarcığı kullanılmadan numune ve ayıracın karıştırılması da daha iyi olacak şekilde ayarlanmıştır. Böylece hava kabarcıklarının ortadan kaldırılması ile akış-enjeksiyon metodu bir takım avantajlar kazanmıştır. Bunlar:

1. Birim zamanda çok sayıda analiz yapılması,
2. Dedektörden cevap alma süresinin kısaltılması,
3. Analize başlama ve kapatma zamanı kısaltılması,
4. Enjeksiyon sistemi hariç cihazın bütün kısımlarının basit olmasıdır.

Cihazın özellikle son iki avantajı çok önemlidir. Çünkü bunlar sayesinde metot, rutin olmayan birkaç numuneye de uygulanabilmiştir. Diğer bir ifadeyle devamlı-akış metodu artık rutin analizlere değil, az da olsa rutin olmayan analizler de uygulanabilir hale gelmiştir. Sayılan avantajlarının sonucu olarak akış-enjeksiyonlu metotlar, segmentli akış metotlarının yerlerini almaya başlamıştır (Gündüz T., 2002).

2.9.1. Akış-Enjeksiyon Analizinde Numune ve Ayıracın Sevkedilmesinde Kullanılan Sistemler

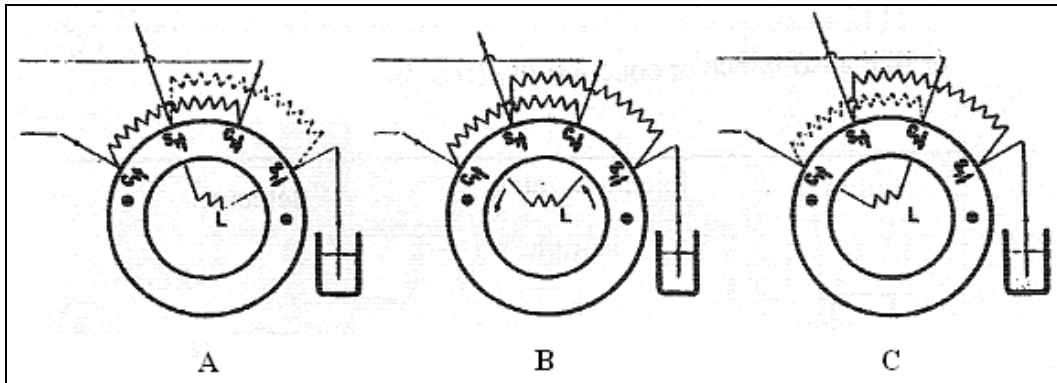
Akış-enjeksiyonlu analizde çözelti peristaltik bir pompa vasıtasıyla sisteme sevkedilir. Peristaltik pompada gaz veya sıvı akışkan plastik bir boruda bulunan çözelti dönen çok küçük silindirler vasıtasıyla sıkıştırılarak nakledilir. Pompada yayla bastırılan

dönen silindirler içinde çözelti bulunan çok esnek bir hortum üzerine basınç yaparak çözeltinin silindirlerin döndükleri yöne doğru çözeltiyi sevkeder. Böylece devamlı bir akış meydana gelir. Modern pompalar bir daire çerçevesinde genel olarak 8-10 silindir ihtiva eder. Dönme esnasında herhangi bir anda bunların yarısı, hortum üzerine basınç yapar. Bu sayede çözelti akımı büyük ölçüde pulssuz yani devamlıya çok yakın olur. Çözelti akımının silindirleri döndüren motorun hızına ve hortumun iç çapına göre ayarlanır. Bu amaçla kullanılan hortumların iç çapları genel olarak 0,25-4 mm arasında değişir. Bunun sonucu çözelti akış hızı dakikada 0,0005-40 mL'ye ayarlanabilir. Dönen silindirler uzun olduklarından aynı zamanda birçok hortumun çalışmasını sağlayabilirler (Gündüz T., 2002).

Akış-enjeksiyonlu sistemler genel olarak bir de spiral kolon kısmı ihtiva eder. Spiralli kolonun görevi numuneyle ayırıcın iyice karışmasını sağlamaktır. Bu sayede reaksiyon tam olur ve denge kurulur. Bunun bir sonucu olarak da simetrik pikler elde edilir. Spiral kolonların boru iç çapları genel olarak en fazla 1 cm'dir (Gündüz T., 2002).

2.9.1.1. Enjeksiyon Vanası

Enjeksiyon vanası, AEA tekniğinde örneklerin tekrarlanabilir enjeksiyonunda önemlidir. En fazla kullanılan enjeksiyon vanalarından birinin şekli Şekil 2.9'da gösterilmiştir (Manuel,5102-001).



Şekil 2.9. Enjeksiyon vanasının kullanımı; A: enjeksiyon halkasının doldurulması, B: harekete geçirme, C: enjeksiyon

2.9.1.2. Numune Enjektörleri ve Dedektörler

Akış enjektörlü analiz cihazlarında kullanılan enjektörler ve dedektörler HPLC’de kullanılanların aynıdır. Akış-enjektörlü sistemlerde kullanılan numune miktarı 5-200 μL arasında değişir. Ancak genel olarak kullanılan miktar 10-30 μL ’dir. İyi bir sonuç almak için enjeksiyon çok önemlidir. Enjeksiyon süratli bir puls halinde veya hortuma bir tıkaç şeklinde yapılmalı ve hortumdaki taşıyıcı akımı engellememelidir (Gündüz T., 2002).

Akış enjektörlü analiz sistemlerinde dedektör olarak atomik absorpsiyon, emisyon cihazlarıyla, florometreler, elektrokimyasal sistemler, refraktometreler, spektrofotometreler ve fotometreler kullanılabilir. Bunlar içinde en iyisi de fotometrelerdir (Gündüz T., 2002).

2.9.2. Akış-Enjeksiyon Analizini Etkileyen Faktörler

Akış-enjeksiyon analizinde numunenin enjeksiyonu numune musluğu (valfi) vasıtasıyla yapılır. Enjeksiyon yapıldıktan hemen sonra numune konsantrasyonu borudaki akım sisteminde bir silindir şeklini alır. Numune akım içinde ilerledikçe numunenin silindir şekli bozulmaya başlar. Buna dispersiyon denir. Dispersiyonun başlıca iki nedeni vardır:

- 1) Konveksiyon
- 2) Difüzyon

Konveksiyon bir boru içinde hareket eden numunenin orta kısımlarının borunun duvarlarına yakın olan kısımlarından daha hızlı hareket etmesi olayıdır. Buna laminer akım denir. Laminer akım nedeniyle numunenin ön cephesi parabolik bir hal almaya başlar. Numune daha çok ön cephede toplanır ve numune yamulmaya başlar.

Numunenin şeklinin bozulmasının ikinci nedeni difüzyondur. Difüzyon iki tiptir. Bunlar:

- 1) Radyal (akış yönüne dik olan),
- 2) Boyuna (akış yönüne paralel olan)

Dar borularda boyuna difüzyonun etkisi yok denecek kadar azdır; ancak radyal difüzyonun etkisi özellikle de düşük akış hızlarında çok etkilidir ve numunenin şeklinin bozulmasında konveksiyon gibi önemli bir rol oynar. Böyle durumlarda numune

yuvarlağımsı bir şekle yaklaşır. Akış-enjeksiyon cihazlarındaki dispersiyon hem konveksiyonun hem de radyal difüzyonun etkisi vardır.

Konveksiyon ve difüzyonun etkisi altında kalan numuneden elde edilen pikler genel olarak bir tarafa meyletmiş haldedir.

Boru iç cidarında meydana gelen radyal difüzleme borularda bulunan analit taneciklerini çözeltinin orta kısımlarına getirir. Bu çok önemli bir olaydır. Böylece borunun iç cidarı temizlenmiş ve bir sonraki analiz karıştırılmamış olur (Gündüz T.2002).

2.9.3. Akış-Enjeksiyon Analizi Tekniğinin Uygulamaları

AEA tekniğinin uygulamalarının yaklaşık üçte birini kirlilik oluşturan maddelerin tayininde kullanım oluşturmaktadır. Bu alandaki çalışmalar kısaca şu şekilde özetlenebilir (Yadigaroglu, 2002); deniz suyunda eser miktardaki Cd, Zn, Pb gibi ağır metallerin tayini, atık sularda, toprak ekstraktlarında, havada ve gübrede nitrat tayini, endüstriyel atık sularda ve nehir sularında Al tayini, doğal sularda Cr (VI) tayini, amonyum, sülfat, klorür, florür, fosfat tayini.

Klinik kimyanın ihtiyaçlarına uyarlanabilirliği nedeniyle bu alanda da çok geniş uygulama alanı bulmuştur. Bu alandaki uygulamalar da şu şekilde özetlenebilir; Hansen tarafından gerçekleştirilen kan serumunda kalsiyum tayini, idrarda sülfat tayini, karaciğer koması ve Reye's sendromunun tanısında kullanılan, kandaki amonyak düzeyi tayini, Mottala ve Rmasemy tarafından gerçekleştirilen insan serumunda bakır tayini, lityum terapisi psikiyatristlerin çeşitli sinir hastalıklarının tedavisinde kullandıkları tekniklerden birisidir. Bu teknik kullanılarak kan ve serumda lityum tayini (Karlberg ve Pacey, 1989) serumda toplam karbondioksit tayini.

Endüstri ve yiyecek maddeleri üzerine az sayıda çalışma vardır. Az sayıda da farmakolojik madde tayininde kullanılmıştır.

2.9.4. ISE'lerin Hareketli Ortamda Dedektör Olarak Kullanımı

Elektrotların potansiyometrik bir dedektör olarak hareketli ortamlarda kullanımı yaygınlaşmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, PVC temelli ve iç referans çözeltinin kullanılmadığı katı-hal kontakt tipi sıvı-membran iyon seçici elektrotların yaygınlık kazandığı gözlenmektedir. İyon kromatografi ve akış-enjeksiyon yöntemleri

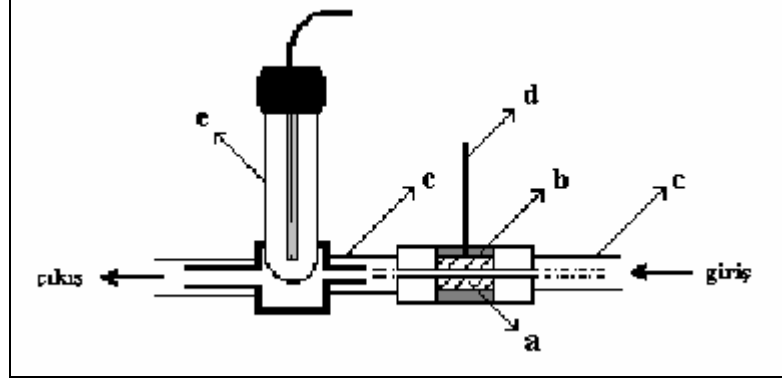
ile potansiyometrik tayinlerde en fazla iyon-seçici elektrotlar kullanılmaktadır (Isildak ve Covington, 1993).

Anyon ve katyona duyarlı iyon-seçici elektrotlar aşağıdaki yollarla üretilmektedirler:

İ referans çözeltilinin kullanıldığı sıvı membran elektrotlar; iç referans çözeltili kullanımı bu tip elektrotların minyatürize olmasına ve uygun hücre tasarımına engel oluşturmaktadır. Bu elektrotlar iyon kromatografide dedektör olarak kullanılabilir (Deelder ve ark. 1981; Nomura ve ark. 1988; Isildak ve Covington, 1993; Isildak ve Asan, 1999).

- 1) Tümüyle katı-hal kontakt üzerine sıvı membran kaplanmış elektrotlar; minyatür akış hücresi oluşumuna izin verir ancak sıvı membranın katı-kontaga iyi yapışmaması ve çözeltiliyle direkt temas halinde olması ömrünün kısa olmasına neden olmaktadır. Bu elektrotlarda iyon kromatografide dedektör olarak başarıyla uygulanabilmektedir (Yiğit, 1996; Isildak ve ark., 1996; Isildak ve Asan, 1999).
- 2) Sıvı-membranın veya az çözünen bir inorganik veya organik tuzun katı-hal kontakt içinde kullanımıyla oluşturulan kompozit türü elektrotlar; bu şekilde hazırlanan bir elektrotun, görev yapması halinde, ömrünün uzun olacağı ve kolayca minyatürize edilebileceğı düşünölmektedir (Ünal, 1998).

IUPAC'a göre (IUPAC, 1976) düşünöldüğünde yukarıda bahsi geçen katı-hal kontakt PVC-membran elektrotların ölçüm yapılan tek yüklü iyonlara karşı tayin limitleri (her iyon için bir miktar değışmekle beraber) 5×10^{-6} mol.L⁻¹ civarında seyretmektedir. Hazırladığımız elektrotların özellikle hareketli ortamlarda dedektör olarak kullanılıp kullanılmayacağını görebilmek amacıyla Şekil 2.10 'da gösterilen çok küçük hücre hacmine sahip (≤ 5.0 µl) potansiyometrik akış hücreleri kullanılmaktadır.



Şekil 2.10. Hareketli ortamlarda kullanılan potansiyometrik akış hücresi a) PVC-membran b) Katı-hal kontakt c) Teflon boru tubing d) Metalik bağlantı (indikatör elektrot) e) Referans elektrot

İyon seçici elektrotların hareketli ortamlarda potansiyometrik dedektör olarak kullanılabilirdiği yapılan çalışmalar sonucunda ortaya çıkmıştır (Isildak ve Covington, 1993; Isildak ve Asan, 1999).

Son yıllarda iyon seçici elektrotların potansiyometrik dedektör olarak kullanıldıkları akış-enjeksiyon analiz sistemleri birçok alanda yaygın uygulama alanı bularak kullanılabilir hale gelmiştir. Bu amaçla yeni akış-enjeksiyon analiz sistemlerini geliştirme yönündeki çalışmalar hız kazanmıştır.

2.10. Kromatografi

Kromatografi, bir karışımdaki iki ya da daha fazla bileşenin, hareketli (taşıyıcı) bir faz yardımıyla, sabit (durgun) bir faz arasından değişik hızlarda hareket etmeleri esasına dayanır. Kromatografik yöntemlerle, kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın bileşenlerden oluşan karışımları, tümüyle, kolayca ve kısa sürede ayırmak olanaklıdır.

Kromatografi 1903 yılında Rus bilim adamı Tswett tarafından keşfedilmiştir. Tswett bitki pigmentlerini ayırmak için kromatografiyi kullanmıştır. Yaptığı çalışmada toz kalsiyum karbonat ile doldurulmuş bir cam kolon kullanmıştır. Bu cam kolondan bitki pigmentlerini içeren çözeltiyi geçirerek klorofil ve ksantofil gibi birçok bitki pigmentini ayırmayı başarmıştır. Ayrılan maddeler kolonda renkli bantlar halinde gözüktüğü için yöntemine kromatografi adını vermiştir. Kromatografi Yunanca'da chroma "renk" ve graphein "yazmak" anlamına gelmektedir (Skoog ve ark., 1998).

1938 yılında, Izmailov ve Schraiber ince tabaka kromatografisinin (TLC) temellerini atmış, bu yöntem 1958’ de Stahl tarafından geliştirilmiştir. 1941’ deki çalışmalarında Martin ve Synge teorik tabaka sayısı kavramını kromatografik yöntemin veriminin bir ölçümü olarak uygulamışlardır. Bu kavram sadece sıvı kromatografisi tekniklerinde devrim yaratmamış, gaz ve kağıt kromatografisinin gelişimi için de aşama kaydetmiştir.

Martin ve James’ in 1952’ de yayımlanan ilk gaz kromatografik çalışması bu tekniğin hızlı gelişiminin bir başlangıcı olmuştur.

Klasik kolon kromatografisinden türetilen yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC), günümüzde kullanılan modern enstrümental analitik teknikler arasında yer almaktadır (Weiss, 1989).

2.10.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Kromatografi farklı şekillerde sınıflandırılabilir (Özçimder ve Demirci, 2009);

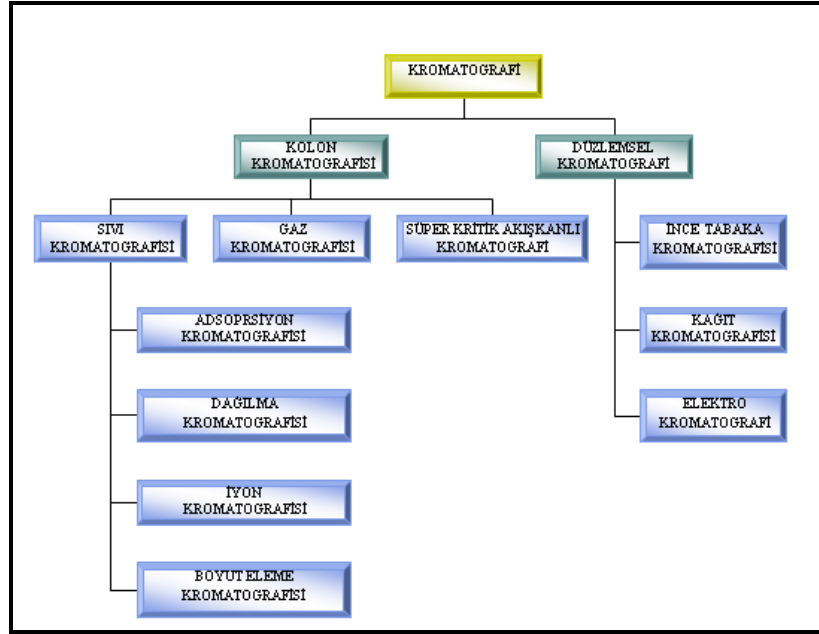
- a) Kromatografik ortamın fiziksel şekline göre,
- b) Örneğin kromatografik ortama veriliş biçimine göre,
- c) Kromatografik ayırım mekanizmasına göre,
- d) İki fazın polarlık durumlarına göre,
- e) İki fazın fiziksel durumuna göre,

Kromatografik ortamın fiziksel durumu dikkate alınarak yapılan sınıflandırma iki sınıfa ayrılır:

- Kolon Kromatografisi
- Düzlemsel Kromatografi

Kolon kromatografide, sabit faz yüksek basınçta dayanıklı bir kolona tutturulur ve hareketli faz basınç altında, bu sabit faz arasından geçmeye zorlanır.

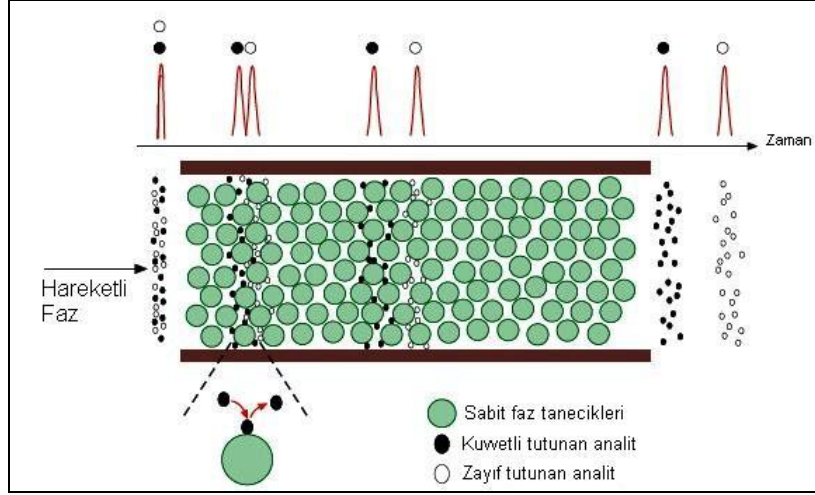
Düzlemsel kromatografide, sabit faz düz bir plaka üzerine veya bir kağıdın gözenekleri arasına tutturulur ve hareketli faz durgun faz arasından kapiler etkisiyle veya yer çekimi etkisiyle hareket eder (Weiss, 1989). Şekil 2.11’de kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması verilmiştir.



Şekil 2.11. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

2.10.2. Kromatografik Ayırma Tekniği

Hareketli fazın ilerlemesiyle çözünen maddelerin sabit faz üzerinden sürüklenmelerine elüsyon, kullanılan çözücüye elüent adı verilir. Şekil 2.12’de kromatografik ayırma tekniğinin şematik gösterimi görülmektedir (Lewis, 2005). Kolona çözücünün sürekli verilmesi, hareketli ve durgun faz arasında sürekli madde aktarımı yaparak, çözünen madde moleküllerini kolondan sürükler. Numune enjeksiyon sonrasında kolona gelir ve numunenin bileşenleri kolonun iki fazı arasında dağılır. Kolona katılan hareketli faz numunenin bir bölümünü içeren çözücü kolonda ilerlemeye zorlar.



Şekil 2.12. Kromatografik ayırma tekniğinin şematik gösterimi

2.10.3. Kromatografi Terimleri

2.10.3.1. Kromatogram

Çözünen maddenin derişimlerine cevap veren bir dedektör, kolon çıkışına yerleştirilirse ve dedektör sinyali zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilirse bir seri pik elde edilir. Kromatogram olarak adlandırılan bu grafikler, hem kalitatif hem de kantitatif analiz için kullanılır. Zaman eksenindeki piklerin yerleri, numune bileşenlerini tanımda kullanılabilir. Pik alanları her bir bileşenin miktarının kantitatif bir ölçüsüdür (Asan, 1999).

2.10.3.2. Dağılma Sabitleri

Çoğu zaman, kromatografide dağılma dengeleri analitin hareketli ve durgun fazlar arasında aktarımı ile ilgili nisbeten basit eşitliklerle tanımlanır. Bu nedenle bir A çözünüeni için

$$A_{hareketli} \leftrightarrow A_{durgun}$$

yazılabilir.

Reaksiyonun denge sabiti K dağılma sabiti, bölüşüm oranı veya bölüşüm katsayısı olarak adlandırılır ve

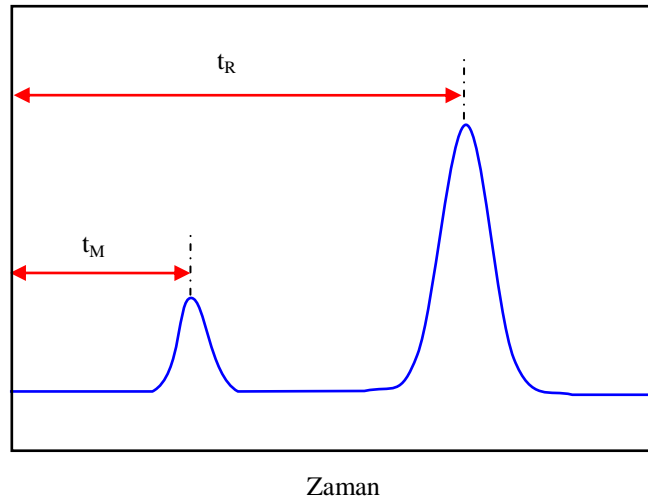
$$K = \frac{c_S}{c_M}$$

olarak gösterilir. Bu eşitlikte c_S çözünenin durgun fazdaki molar derişimi, c_M ise hareketli fazdaki molar derişimidir. İdealde, K geniş bir çözünen derişim aralığında sabittir; bu nedenle c_S , c_M ile doğru orantılıdır. Yukarıdaki eşitliğin geçerli olduğu kromatografiye doğrusal kromatografi denir ve simetrik Gauss tipi pikler vermesi ve alıkonma zamanlarının enjekte edilen analit miktarından bağımsız olması gibi özellikleri vardır.

K değerinin büyük oluşu, maddenin sabit fazda iyi tutulduğunu ve bu yüzden kolon boyunca yavaş ilerlediğini gösterir. Tersi durumda yani K değerinin küçük oluşunda ise maddenin sabit fazda az tutulduğunu ve böylece kolon içinde hızlı ilerlediği anlamına gelir. Bir karışımda bulunan bileşenlere ait K değerlerinin farklı oluşu, bunların kolon boyunca birbirlerine göre farklı hızlarda ilerlemelerine yol açar. Bu yüzden bileşenler, kolonun sonlarına doğru birbirlerinden ayrılmış olurlar ve kolonu farklı zamanlarda terk ederler (Asan, 1999).

2.10.3.3. Alıkonma Zamanı

Şekil 2.13'de iki bileşen içeren bir numune için tipik bir kromatogram görülmektedir.



Şekil 2.13. İki bileşenli bir numune için tipik bir kromatogram

Numune enjeksiyonundan sonra, analit pikinin dedektöre ulaşması için geçen zamana alıkonma zamanı denir ve t_R sembolü ile gösterilir. Soldaki küçük pik kolondan tutulmayan bir tür içindir. Çoğu zaman numune veya hareketli faz kolonda tutulmayan bir tür içerir. Eğer böyle bir madde numune veya hareketli fazda bulunmuyor ise pik tanımlamalarını kolaylaştırmak için ortama uygun bir tür katılabilir. Bazen kolonda tutulmayan maddenin dedektöre ulaşması için geçen zamana ölü zaman (t_M) denir. Tutulmayan türün kolonda göç hızı, hareketli faz moleküllerinin ortalama hareket hızına eşittir.

Çözünen maddenin ortalama doğrusal göç hızı \bar{v}

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R}$$

dir. Bu eşitlikte L kolon dolgusu uzunluğudur. Benzer şekilde, hareketli faz moleküllerinin ortalama doğrusal hareket hızı u ,

$$u = \frac{L}{t_M}$$

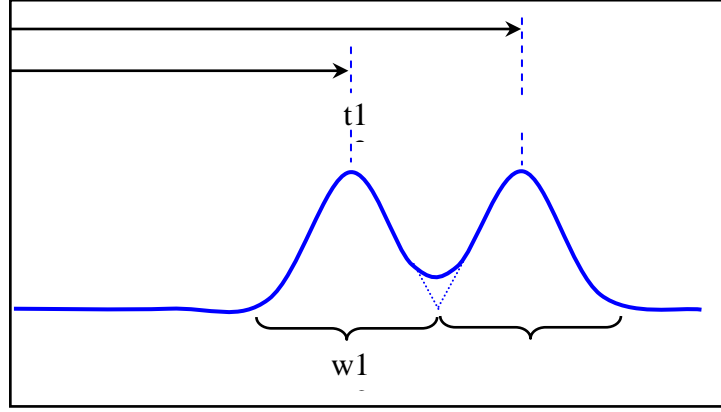
dir. Bu eşitlikte t_M ölü zamandır. t_M bir hareketli faz molekülünün kolondan geçmesi için gerekli ortalama süredir (Asan, 1999).

2.10.3.4. Kolonun Ayırım Gücü (Resolution)

Kromatografik yöntemin uygulanmasıyla, karışımdaki maddelerin birbirinden ayrılmasının amaçlandığı daha önceden açıklanmıştı. Maddelerin birlerinden ne derece ayrılabilirlikleri, bir yazıcı üzerinde her madde için elde edilen pikler ile izlenir. Piklerin varlığı tek başına bir anlam ifade etmez. Pikler geniş görülmesine rağmen maddeler birbirlerinden ayrılmış, keskin dik pikler görülmesine rağmen de maddeler birbirlerinden ayrılmamış olabilir. Bu durumda hangi kromatogramdaki maddelerin tam olarak ayrıldığını belirleyebilmek için ayırım gücü terimi " R_s " yi dikkate almak gerekir.

R_s aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlenebilir;

$$R = \frac{(2)(t_{R_1} - t_{R_2})}{(w_1 + w_2)}$$



Şekil 2.14. Kromatografide piklerin ayırımının gösterimi

R_s : Ayırım gücü

t_{R1} , t_{R2} : İki farklı maddenin alıkonma zamanları

w_1 , w_2 : Bu iki madde pikinin taban genişliklerini göstermektedir.

İki madde pikinden faydalanılarak bulunan değerler yerine konursa ayırım gücü hesaplanabilir. Ayırım gücünün hesaplanabilmesi için Şekil 2.14’de gösterildiği gibi Gaussian piklerin elde edilmesi gereklidir. Genellikle bir kromatogramda elde edilen ardışık iki pik arası için;

$R_s > 1.5-2$ ise pikler % 100 ayrılmıştır.

$R_s = 1$ ise % 97.5 yeterli ayırım vardır.

$R_s < 1$ ise yeterli ayırım sağlanamamış demektir.

Bu durumda şartlar yeniden gözden geçirilmelidir (Asan, 1999)

2.11. Sıvı Kromatografi

Sıvı kromatografi bir ayırma tekniğidir. Bir sıvıda çözülmüş ayrılacak bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşmelere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Kolonu değişik zamanlarda terk ederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Burada taşıyıcı faz olan sıvı, pompalarla kolona basıldığından yüksek akış hızındadır. Bu nedenle ayırma daha kısa sürede ve tam olarak gerçekleşmektedir. Ayrılan bileşik, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tespit edilip miktarıyla orantılı olarak kaydedilir. Yüksek hızda gerçekleştirilen ayırmaların yapıldığı sıvı kromatografi sistemlerine, Yüksek Basınç Sıvı Kromatografi (HPLC) denir.

Sıvı kromatografi aşağıdaki temel birimlerden oluşur;

- a) Hareketli/ Taşıyıcı Faz Deposu
- b) Taşıyıcı Faz Hareket Birimi; Pompa(lar)
- c) Enjeksiyon (Örnek Yükleme) Birimi
- d) Ayırma Birimi; Kolon(lar)
- e) Ölçüm Birimi; Dedektör(ler)
- f) Yazım Birimi; kaydedici, İntegratör

2.11.1. Kolon

Adsorpsiyon kromatografisinde kullanılan kolonların uzunluğu genellikle 0,5 cm ile 50 cm arasındadır. Kolonlar basınç ve korozyona dayanıklı paslanmaz çelikten yapılırlar. Analitik amaçlar için kullanılan çapları 2-6 mm kadardır. Kolonların hazırlanması genellikle süspansiyon halindeki dolgu maddesinin yüksek basınç altında pompalanması ile yapılır.

Ayırma işlemi için kullanılan kolonlara analitik kolon adı verilir. Kolonların ön ve arka kısmında frit adı verilen filtreler bulunur. Bunlar hem hareketli faz süzerler hem de sabit fazın kolondan ileri geri ilerlemesini engellerler. Örnek içindeki safsızlıkların, partiküllerin kolona ulaşmasını en aza indirmek için ön kolonlar kullanılır. Bunların boyutları 0.5-10 cm kadardır. Genellikle analitik kolon dolgusu ile doldurulurlar. Örneğin kirlilik derecesine göre sık sık değiştirilirler. Böylece analitik kolonun ömrü uzatılır.

2.11.2. Dedektörler

Elektronik bir aygıt olan dedektör, içinden geçmekte olan hareketli sıvı fazın belli bir özelliğini (kırılma indis, ışın absorpsiyonu, ışın emisyonu, yükseltgenme-indirgenme potansiyeli) izler. İzlenen bu özellik önce analitik, sonra elektronik sinyal haline dönüştürülür. Bu sinyal zamana karşı bir çizgi halinde kaydedilir. Enjeksiyonla verilen örnek içindeki maddeler birbirlerinden ayrılmış olarak dedektöre ulaştıkları zaman hareketli fazın özelliğinde bir değişme meydana gelir. Bu değişme gelen maddenin derişimi veya miktarı ile orantılı olarak dedektörde temel çizgiden farklı bir elektronik sinyal oluşmasına neden olur. Bu elektronik sinyal dedektörün bağlı olduğu

bir kaydedici cihazda analog sinyal şeklinde otomatik olarak temel çizginin üzerine bir pik olarak çizilir. Dedektörde ard arda gelen maddelerin miktarlarının belirlenmesinde kullanılan kromatogram adı verilen şekil elde edilmiş olur.

Sıvı kromatografi dedektörleri için aşağıdaki özellikler önemlidir.

- 1) Seçicilik,
- 2) Duyarlılık,
- 3) En küçük tayin sınırı,
- 4) Doğrusal çalışma bölgesi,
- 5) Tekrarlanabilirlik,

Dedektör maddenin derişimi ile doğru orantılı bir özelliğini ölçmelidir. Bu amaçla;

- ✓ Absorbans Dedektörü,
- ✓ Floresans Dedektörü,
- ✓ Kırılma İndisi Dedektörü,
- ✓ Elektrokimyasal Dedektör
- ✓ İletkenlik Dedektörü kullanılabilir.

Absorbans dedektörleri, akış hücrelerinden geçen sıvının sabit ya da istenilen değere ayarlanabilir dalga boyundaki- ışığı absorpsiyonunu ölçerler.

Floresans dedektörler, belli bir dalga boyunda ışığı absorpladıktan sonra başka bir dalga boyunda ışın yayan yani floresans özellik gösteren maddelerin yaydığı ışık şiddetini ölçerler.

Kırılma indisi dedektörleri ise akış hücrelerinden geçen akımın kırılma indisini ölçerler. Absorbans dedektörü kullanılırken seçilen dalga boyunun, ışığın % 90'ının absorplandığı dalga boyu olarak tanımlanan, çözücü uv-cut off değerinden yüksek olmamasına dikkat edilmelidir. Bu durum, özellikle düşük dalga boylarında absorpsiyon yapan örnekler için önemlidir. Akış hücresine gelen madde derişimi ve/veya cinsi değiştiğinde dedektör sinyalinde değişiklik olur. Kaydedici, zamana göre dedektörden gelen sinyali (voltaj değişimini) kaydeder.

2.12. İyon Değişimi Kromatografi

Çözeltideki iyonların ters yüklü destek katısı iyonlarına olan ilgisine dayalı bir ayırmadır. Durgun faz zayıf ya da kuvvetli, katyon ya da anyon değiştirici bir reçinedir. Reçinenin sabit yükü (-) ise buna 'katyon değiştirici reçine', (+) ise de 'anyon değiştirici reçine' adı verilir. Analiz sırasında reçinenin tamamen iyonlaşmış durumda olması gerekmektedir. Hareketli faz genellikle tamponlanmış: istenen iyonların oluşmasına neden olan belli bir pH değerinde sulu çözeltidir ve yükü katının sabit yükünün tersi olan 'zıt iyonu' içerir. Yükü, hareketli fazın zıt iyonları ile aynı olan iyonik yapıdaki örnek bileşenleri katıya bağlanmak için zıt iyonlarla yarışır. Zıt iyonu yerinden ederek katıya kuvvetle bağlanan –uygun yükte- bileşenler kolonda uzun süre kalırken, katıya zayıfça bağlanan, uygun yükte olmayan veya yüksüz olan bileşenler kolonu çabuk terkeder.

2.13. Gıda Analizlerinde Kullanılacak HPLC'nin Özellikleri

Bütün kromatografik analiz şekilleri, gıda analizlerindeki kapsayacak şekilde birçok bilimsel alanda organik bileşiklerin tayininde artan dozda kullanılmaktadır. HPLC, son 20 yılda gelişmiş kromatografik tekniklerden biridir. HPLC, gaz kromatografisi kadar yüksek rezolüsyona sahip olmamakla birlikte, pek çok alanda gaz faz kompozisyonuna kıyasla daha uygundur. HPLC'nin en büyük avantajı ısıya dayanıklı olmayan ve uçucu olmayan bileşiklerin analiz edebilmesidir. Türevlendirmeyle pek çok bileşik gaz kromatografik analiz için uçucu hale getirilebilir. Fakat HPLC'de buna ihtiyaç duyulmaması bir üstünlüğüdür.

HPLC'de uygun şartlar sağlanmak suretiyle analiz süresi genellikle kısadır. Bu özellik diğer kromatografik teknikler arasında onu bu bakımdan üstün yapar. HPLC, gaz kromatografisi kadar ekstraksiyon, temizleme, türevlendirme, konsantrasyon gibi örnek hazırlama basamaklarında detaylı çalışmayı genellikle istemez. HPLC kantitatif kesinlik bakımından üstünlük sağladığı gibi oldukça duyarlı bir tekniktir.

2.15. Aminlerin Tayinleri

Aminlerin tayininde elektrokimyasal tayin metotları ilgi çekici görünmektedir. Alifatik aminlerin sıvı kromatografide amperometrik tayini nikel temelli cam karbon elektrot (Casella, 1998) ve bir kobalt tel elektrot ile yapılmıştır (Hidayet ve ark., 1997). Ayrıca, altın elektrotlarla voltametrik puls tekniğinde aminlerin tayininde kullanılmıştır (Dobberpuhl, 1996; Hoekstra, 1998).

Chen ve Alexander (Chen ve ark.,1997), iyon-etkileşim kromatografisi tekniği kullanarak aminlerin potansiyometrik tayinini bir metalik bakır elektrot kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Scnierle ve arkadaşları (Schnierle ve ark., 1998), bir karışımdaki alkil amin bileşimini kapiler elektroforezle sistemde membran kaplı tel elektrot kullanarak belirlemişlerdir. Bu amaçla, analite spesifik reaksiyon vermeyen PVC temelli elektrot içerisinde bir lipofilik katyon değiştirici kullanmışlardır. Luhua ve arkadaşları (Luhua ve ark., 2004) kirli sularda iyon kromatografisinde indirekt kondüktometrik deteksiyon ile amin tayini yapmışlardır.

Son yıllarda hareketli ortamlarda çalışan polimer membran iyon seçici elektrotların dedektör olarak kullanıldığı kromatografik sistemlere olan ilgi her geçen gün daha da artmaktadır. Bu nedenle tez çalışmamızda, bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrotlar hazırlanarak sıvı kromatografide dedektör olarak kullanıldı. Potansiyometrik dedektörler; hızlı, tekrarlanabilir, düşük düzeylerde madde analizine imkan sağlayan ve mikro düzeyde tasarımı yapılabilmesi gibi önemli avantajlara sahiptirler. Ayrıca potansiyometrik dedektör sistemlerinde dedektörün duyarlılığı, elektrodun yüzey alanına bağlı olmadığından mini veya mikro düzeyde tasarımı yapılmış bir ölçüm hücresi kullanılmasına olanak tanır. Ayrıca laboratuvarımızda geliştirdiğimiz elektrotlar tamamıyla katı halde olduklarından iç referans çözelti gerektirmemektedir. Bu avantajlarının yanında kromatografide kullanılan hareketli fazlardan etkilenmeden çalışan elektrotların hazırlanması diğer dedektör sistemlerine göre daha verimli sonuçların elde edilmesine imkan tanımaktadır.

Bu nedenle tez çalışmamızda, bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrotlar sıvı kromatografide dedektör olarak kullanarak aminlerin ayırımı ve analizini yapıldı.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

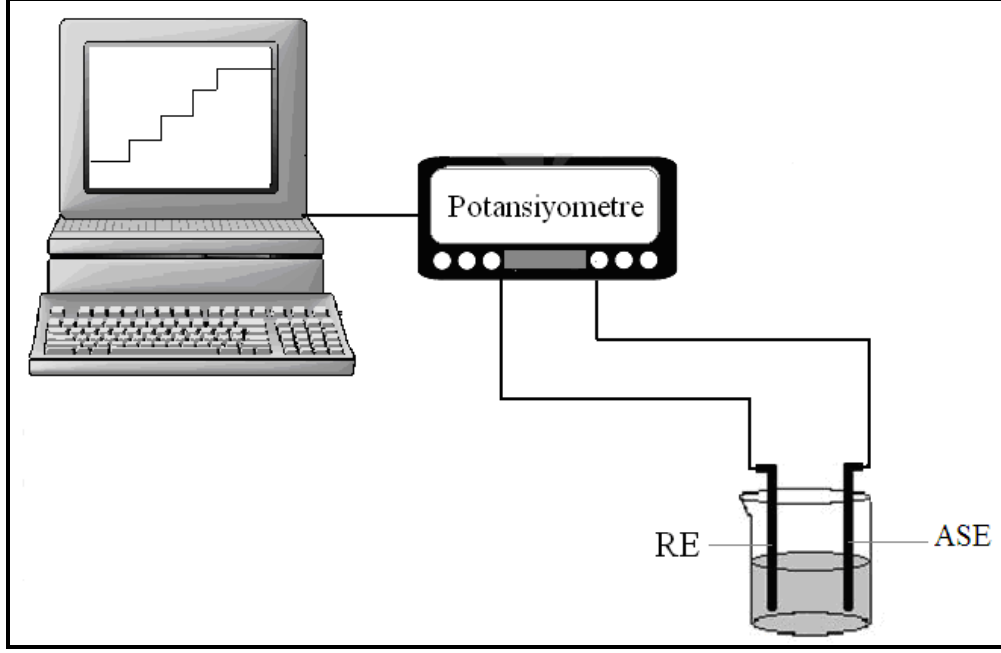
3.1. 1. Kullanılan Kimyasallar

Membranların hazırlanmasında çözücü olarak kullanılan Tetrahidrofuran (THF), membran polimeri olarak kullanılan yüksek molekül ağırlıklı polivinilchlorür (PVC), iyonofor olarak kullanılan potasyumtetrakis p-klorofenilborat (KTpCIPB), dibenzo18 crown-6 (DB18-C6) ve calix-6-aren hegz a etilasetat, plastikleştirici olarak kullanılan bis (2-etil hegzil) sebakat (DOS) Fluka firmasından temin edildi. Katı kontakların hazırlanmasında kullanılan epoksi (Macroplast Su 2227) Henkel (İstanbul A.Ş.) ve sertleştirici (Desmodur RFE) Bayer AG (Germany) firmasından temin edildi.

Çalışmada kullanılan bütün amin bileşikleri (etil amin, propil amin, büt il amin, pentil amin, hegz il amin, heptil amin, oktil amin, kadavarin, fenilet il amin, spermin) Fluka firmasından, asetik asit, metansülfonik asit Merck (Darmstadt, Germany) firmasından, asetonitril Carla Erba firmasından temin edildi.

3. 1. 2. Kullanılan Cihazlar

Durgun ve hareketli ortamdaki potansiyometrik ölçümler, tasarımı ve program yazılımı laboratuvarımızda gerçekleştirilen, bilgisayar kontrollü çok kanallı potansiyometrik ölçüm sistemi kullanılarak alındı. Potansiyel ölçümlerinde referans elektrot olarak laboratuvarımızda üretilen Ag/ACl referans elektrot kullanıldı. Şekil 3.1'de laboratuvarımızda kullandığımız potansiyel ölçüm sisteminin şematik gösterimi verilmiştir.



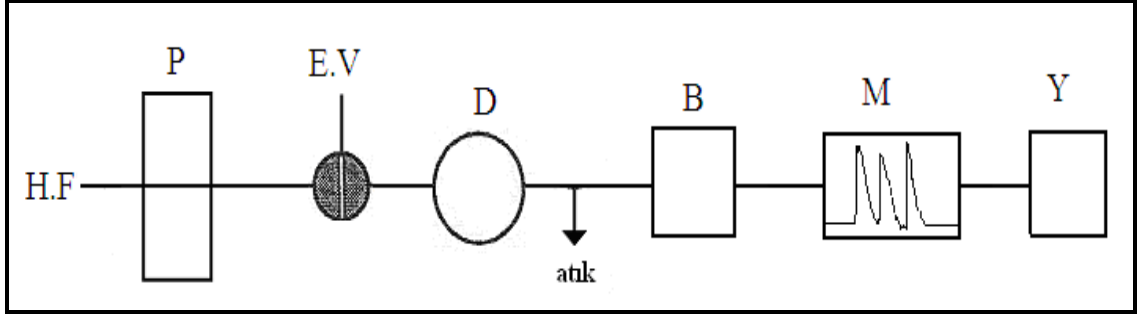
Şekil 3.1. Çalışmada kullandığımız bilgisayar kontrollü potansiyel ölçüm sisteminin şematik gösterimi (RE: Referans Elektrot, ASE: Amin Seçici Elektrot)

Çözeltilerin pH ölçümleri iyon metreye (Jenway 3040, İngiltere) bağlanmış olan cam pH elektrot (Schott, Almanya) kullanılarak yapıldı. Çözeltilerin ve hazırlanan membranların homojenleştirilmesinde ultrasonik karıştırıcı (Ultrasonic LC30, Almanya) kullanıldı. Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan ultra saflıktaki deiyonize su, normal saf suyun Simplicity UV deiyonize su sisteminden (Millipore, ABD) geçirilmesiyle elde edildi.

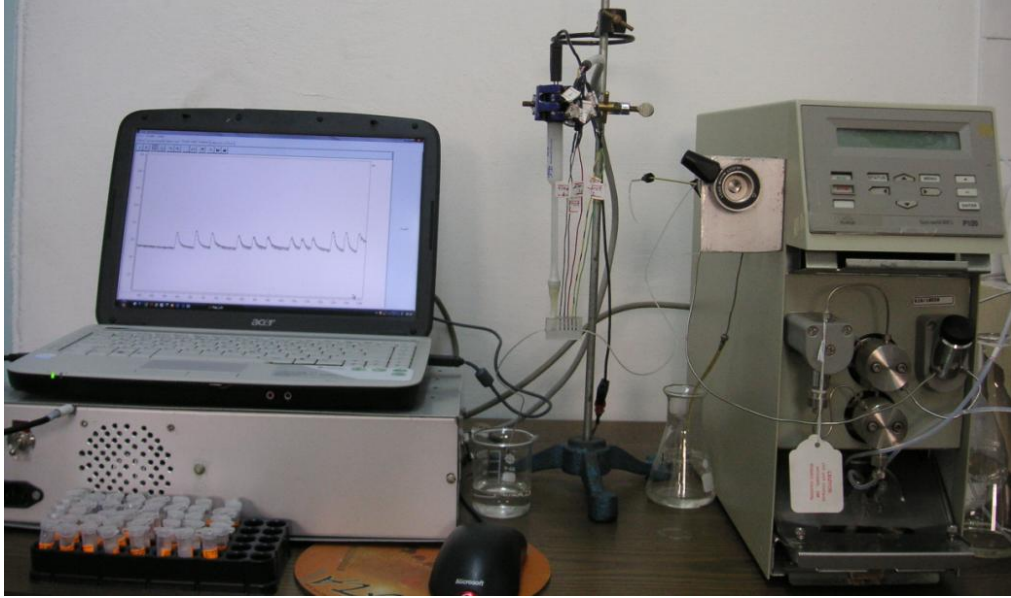
Tartım işlemlerinde, Avery Berkel (Model VA 304) analitik terazi kullanıldı. Çözeltilerin küçük hacimlerinin alınmaları ve aktarılmalarında 10-100 μL ve 100-1000 μL hacim aralıklarına sahip mikro pipetler (Brand, ABD) kullanıldı.

Akış enjeksiyon analizi ölçümleri, Rheodyne enjeksiyon vanası bulunan Spectra Series P 100 pompa sistemi kullanıldı. Ayrıca enjeksiyonlarda Hamilton cam enjektör (100 μL 'lik) kullanıldı. Akış hücrelerinin hazırlanmasındaki delik açma, kesme ve yüzey düzeltme gibi işlemler için torna matkabı ve zımparası kullanıldı.

Akış enjeksiyon analizi ölçümlerinde bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrotların dedektör olarak kullanıldığı sistemin blok şeması Şekil 3.2'de ve fotoğrafı Şekil 3.3'de verildi.



Şekil 3.2. AEA sisteminin genel şeması (H.F: Hareketli faz; P: Pompa; E.V: Enjeksiyon vanası; D: Dedektör; B: Bilgisayar; M: Monitör; Y: Yazıcı)



Şekil 3.3. Tasarladığımız akış hücresinde referans elektrotun ve bütünüyle katı-hal kontakt amin-duyarlı PVC-membran elektrotların bağlı olduğu hareketli ortam akış sistemi

Aminlerin kromatografik analizlerinde Spectra Series P100 pompası, Dionex CSA12 kolonu ve elektrotların dedektör olarak yerleştirildiği bilgisayar kontrollü potansiyometrik ölçüm sistemi kullanıldı.

3. 2. Metot

3. 2. 1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

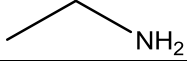
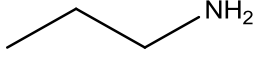
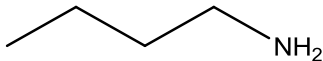
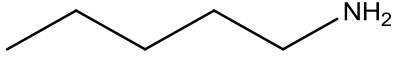
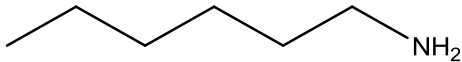
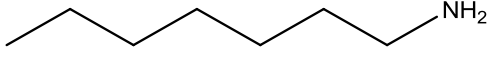
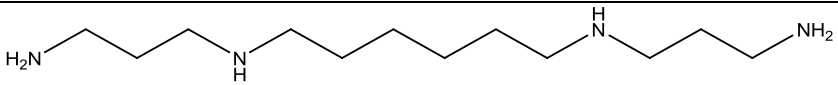
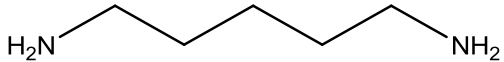
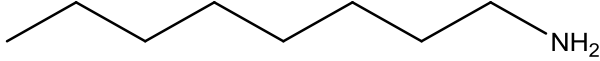
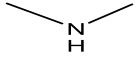
Analizi yapılacak amin bileşiklerinin bütünüyle katı-hal kontakt PVC membran amin duyarlı elektrotlarla tayin edilebilmesi için nötral olan söz konusu aminlerin katyonik forma dönüştürülmeleri gerekir. Bu nedenle her bir amin bileşiğinin 1×10^{-2} M stok çözeltisi pH'sı 5.0 olan 0.1 M $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ (HAc/Ac⁻) tampon çözeltisinde hazırlandı. Kullanılan aminlerin formülleri ve pK_a değerleri Çizelge 3.1'de verildi.

Çizelge 3.1. Kullanılan amin bileşikleri ve bazı özellikleri

Kimyasal Adı	Kapalı Formülü	pK _a	Molekül Ağırlığı (g/mol)
Etilamin	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}_2$	10.81	45.08
Propilamin	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$	10.70	59.11
Bütilamin	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$	10.77	73.14
Hegzilamin	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$	10.56	101.9
Heptilamin	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$	10.67	115.22
Pentilamin	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$	10.63	87.17
Spermin	$\text{C}_{10}\text{H}_{26}\text{N}_4$	11.50	202.35
kadavarin	$\text{C}_5\text{H}_{14}\text{N}_4$	9.13	102.18
Oktilamin	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{NH}_2$	10.65	129.55
Dimetilamin	$(\text{CH}_3)_2\text{NH}$	10.73	45.08

Söz konusu aminlerin açık formülleri ise Çizelge 3.2'de gösterildiği gibidir.

Çizelge 3.2. Kullanılan amin bileşiklerinin açık formülleri

Kimyasal Adı	Açık Formülü
Etilamin	
Propilamin	
Bütilamin	
Pentilamin	
Hegzilamin	
Heptilamin	
Spermin	
kadavarin	
Oktilamin	
Dimetilamin	

Hazırlanan stok çözeltiler renkli şişelerde ve karanlıkta saklandı. İstenilen konsantrasyonlarda amin çözeltileri asetik asit tamponu ile seyreltilerek kullanılmadan hemen önce hazırlandı. Elektrotların pH çalışma aralıklarının belirlenmesinde fosfat tamponu kullanıldı.

pH=2.0-5.0 aralığındaki fosfat tampon çözeltileri 5×10^{-3} M H_3PO_4 / NaH_2PO_4 , pH=6.0-8.0 aralığındaki fosfat tampon çözeltileri 5×10^{-3} M NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 çiftleri kullanılarak hazırlandı. Elektrotların pH çalışma aralıklarının belirlenmesinde her bir amin bileşiği 1×10^{-2} M olacak şekilde tampon çözelti içinde sabit tutuldu.

3.2.2. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı PVC Membran Elektrotların Hazırlanması

Çalışma süresince kullanılan bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrotların hazırlanması dört ana basamaktan oluşmaktadır.

- Katı kontaktların hazırlanması,
- Elektrot membranlarının hazırlanması,
- Membranların katı kontakt yüzeyine kaplanması,
- Elektrotların şartlandırılması,

Katı kontaktların hazırlanması; Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrotların hazırlanmasında katı-kontakt ara yüzey kullanıldı. Bu amaçla birçok farklı kompozisyonda katı kontakt karışımlar hazırlanarak test edildi. Elde edilen sonuçlardan bütün farklı iyonoforların kullanıldığı membran bileşimleri için en uygun katı kontakt bileşiminin kütlece % 50 grafit % 35 epoksi ve % 15 sertleştirici karışımı olduğu belirlendi. Kütlece % 50 grafit, % 35 epoksi ve % 15 sertleştirici 1 mL THF içinde çözüldü. Karışım iyice homojenize edildi. Bu işleme THF tamamen uçurulup uygun kıvama ulaşıncaya kadar devam edildi.

Hazırlanan katı kontaktlar istenilen kıvama ulaştıktan sonra elektrot gövdesini teşkil eden bakır kablolar kaplandı. Elektrotların hazırlanmasında, çapları yaklaşık 0.6 mm olan 10 cm uzunluğunda bakır kablolar kullanıldı. Uç kısımları zımparalanarak aktif hale getirilen bakır yüzeyine katı kontakt materyal kalınlığı yaklaşık 0.5 mm olacak şekilde kaplandı. Katı-kontakt ile kaplanan bakır teller, 24 saat süreyle oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

Elektrot membranlarının hazırlanması; Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrotların membranlarının hazırlanmasında destek maddesi olarak PVC kullanıldı. Membranın polaritesini artırmak ve buna bağlı olarak iyonoforların çözünürlüğünü iyileştirmek için membrana plastikleştirici ilave edildi. PVC içeren membranlar, bis (2-etil hegzil) sebakat gibi kaynama noktası yüksek olan organik sıvı ile plastikleştirildi. Kullanılan bis (2-etil hegzil) sebakat, iyonların dağılımını kolaylaştırmak için membranın polarlığını artırır ve iyonoforlara hareketlilik sağlar. Membranların hazırlanmasında, analiti tersinir bir şekilde seçici olarak

bağlayarak membrana seçicilik kazandırmak için farklı iyonoforlar kullanıldı. Amin duyarlı uygun membran kokteylinin bulunabilmesi için polimer, plastikleştirici ve farklı iyonoforlar değişen oranlarda karıştırıldı ve THF içerisinde homojen olarak çözüldü. Elde edilen sonuçlardan en iyi membran bileşiminin % 31 PVC, % 64 bis (2-etil hegzil) sebakat , % 1 potasyumtetrakis (p-klorofenil) borat ve % 4 calix-6-arene-hegzaetilasetat olduğu belirlendi. Hazırlanan elektrotların membran bileşenleri Çizelge 3.3'de gösterildi.

Membranların katı kontakt yüzeyine kaplanması; Yüzeyleri katı-kontakt ile kaplanmış olan bakır teller hazırlanan membran kokteyline yaklaşık 0.1-0.2 mm kalınlığında membran kalınlığı elde edilene kadar birkaç kere daldırılarak kaplandı. Membran kaplaması sırasında, elektrot uçlarında hava kabarcıkları kalmamasına özen gösterildi. Kaplanan membran elektrotlar oda sıcaklığında bir gece kurumaya bırakıldı.

Elektrotların şartlandırılması; Membranla kaplanan elektrotlar kuruduktan sonra 6 saat 10^{-2} M'lık amin çözeltilerinde bekletilerek şartlandırıldı. Elektrotlar kullanılmadığı sürelerde normal oda koşullarında saklandı. Kullanımdan önce her bir PVC membran elektrot 10^{-2} M'lık amin çözeltilerinde yaklaşık 30 dakika şartlandırıldı.

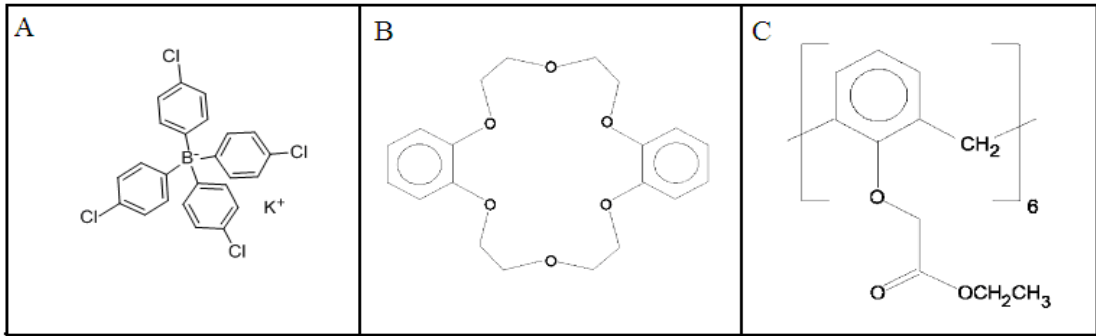
Her ölçümden önce bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı elektrot ve referans elektrot çifti deiyonize su ile yıkandı. Ölçümler değişen konsantrasyonlarda hazırlanan amin çözeltilerinde alındı.

Çizelge 3.3. Hazırlanan bütünüyle katı-hal kontakt amin-duyarlı PVC-membran elektrotların membran bileşimleri

Elektrotlar	Polimer	Plastikleştiri	% iyonofor 1	% iyonofor 2	% iyonofor 3
Elektrot 1	% 32 PVC	% 66 DOS	2	-	-
Elektrot 2	% 31 PVC	% 64 DOS	1	4	-
Elektrot 3	% 31 PVC	% 64 DOS	1	-	4

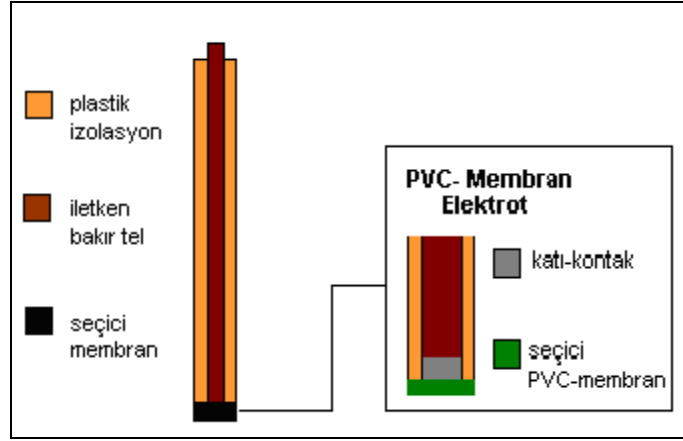
- PVC: Polivinil klorür
- DOS: bis (2-etil hegzil) sebakat
- İyonofor 1: Potasyumtetrakis (p-klorofenil) borat
- iyonofor 2: Dibenzo-18-crown-6
- iyonofor 3: Calix-6-arene-hegzaetilasetat

Kullanılan iyonoforların açık yapısı Şekil 3.4’de görüldüğü gibidir.



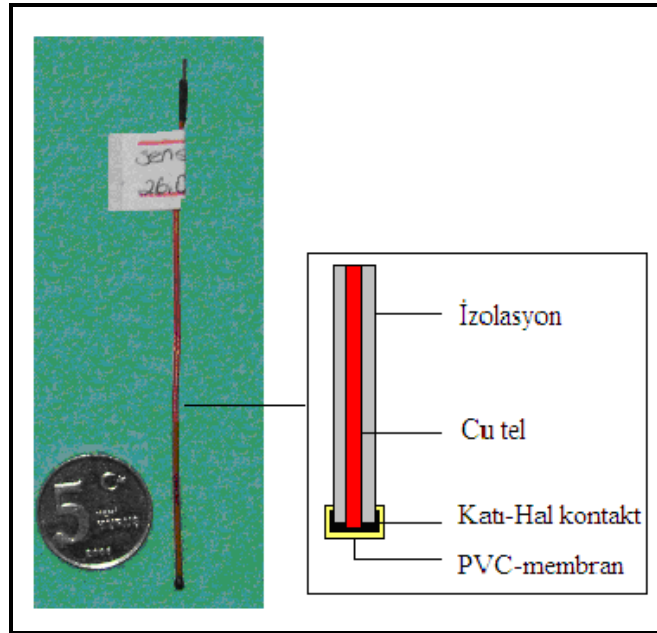
Şekil 3.4. Kullanılan iyonoforların açık yapısı (A: potasyumtetrakis (p-klorofenil) borat; B: dibenzo-18-crown-6; C: Calix-6-arene-hegzaetilasetat)

Hazırlanan kompozit ve PVC-membran elektrotların yapısı Şekil 3.5’de görülmektedir.



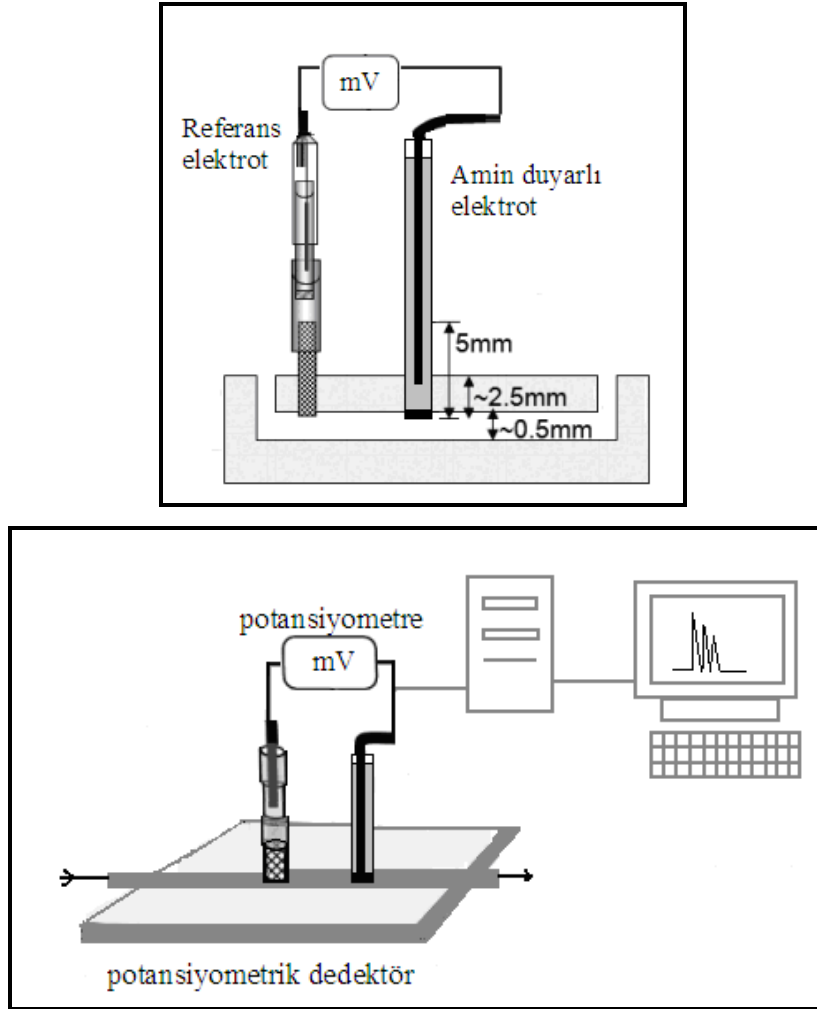
Şekil 3.5. Mini boyutlarda bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun yapısı

Hazırlanan mini boyutta bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrot Şekil 3.6’da görülmektedir.



Şekil 3.6. Mini boyutta bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrot

Laboratuvarda hazırladığımız bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrotların dedektör olarak kullanıldığı akış hücresi Şekil 3.7’de görüldüğü gibidir.

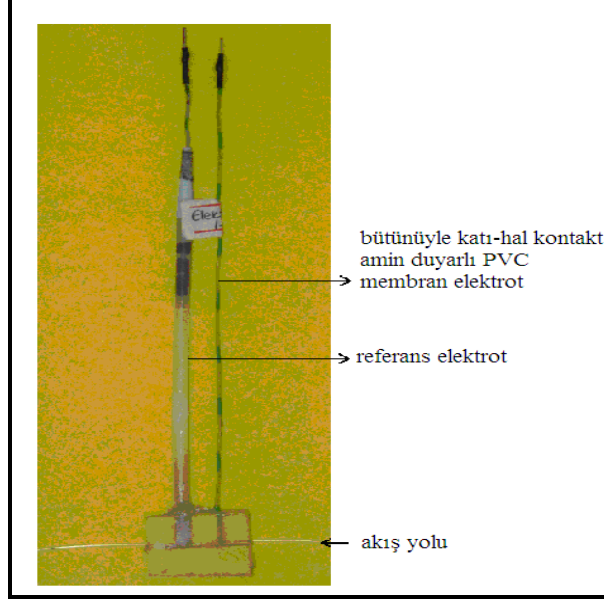


Şekil 3.7. AEA sisteminde kullanılan akış hücresinin şekli

3.2.3. Hareketli Ortam Akış Hücresinin Hazırlanması

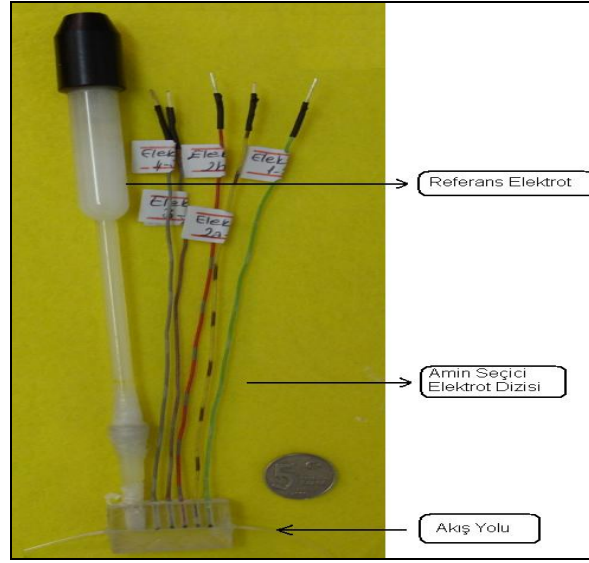
Laboratuvarda geliştirdiğimiz bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrotların akış hücreleri 2x2,5x1 cm boyutlardaki polikarbonat polimer blokların destek materyali olarak kullanılması ile tasarlandı. 0.5 mm çapında akış yolu ve elektrot boyutlarına uygun çaplardaki delikler akış yoluna gelecek şekilde el matkabı kullanılarak açıldı. Akış yolunun her iki tarafına bu yolla aynı çapta olan ince borular bağlandı. Elektrotlar deliklere yerleştirilerek akış hücresi hazırlandı. Böylece, elektrotların hem ölçüm esnasında zarar görmemesi hem de referans elektroda eşit

mesafede olmaları sağlanmış oldu. Şekil 3.8 ve Şekil 3.9’da hazırlanan tek kanallı ve çok kanallı akış hücreleri görülmektedir.



Şekil 3.8. Laboratuarda geliştirdiğimiz bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrotun ve referans elektrotun bulunduğu akış hücresi (tek kanallı)

Laboratuarda farklı kompozisyonlarda hazırladığımız bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrotların bir dizisi aynı akış yolu üzerinde tasarlanarak bilgisayar kontrollü çok kanallı bir potansiyometre ile aynı anda elektrotlarla ölçüm alınabilmektedir. Söz konusu elektrot dizisi 5 yeni kuruş ile kıyaslamalı olarak Şekil 3.9’da gösterildiği gibidir.



Şekil 3.9. Farklı kompozisyonlarda hazırlanan birden çok elektrotun aynı akış yoluna yerleştirilmesiyle elde edilen elektrot dizisi (çok kanallı)

3. 2. 4. Çalışma Yöntemi

Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrotların potansiyometrik karakteristikleri (doğrusal çalışma aralıkları, tayin limitleri, tekrarlanabilirlikleri, seçicilikleri, cevap zamanları ve pH çalışma aralıkları) durgun ortam ölçümleriyle belirlendi. Elektrotlar ölçüm alınmadığı zamanlarda kuru olarak oda sıcaklığında saklandı ve her ölçüm alınmadan önce ana iyon çözeltilerinde yarım saat kadar şartlandırıldı (doyuruldu). Durgun ortamlarda alınan ölçümlerde, elektrotların potansiyel değişimleri, bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrotların iyon seçici elektrot ve referans elektrotun 20 mL'lik çözeltiliye aynı derinlikte daldırılmasıyla ölçüldü. Her ölçümden önce elektrotlar deiyonize su ile yıkandı. Böylece, durgun ortamda elde edilen değerlerden elektrotların performanslarındaki değişim ve kullanım ömürleri araştırıldı.

Durgun ortamda test edilen bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrotların hareketli ortamdaki davranışlarını araştırmak için, durgun ortamda test edilen elektrotlar laboratuvarında hazırladığımız mikro düzeyde tasarlanan potansiyometrik akış hücrelerine yerleştirildi. Gerekli bağlantılar yapıldıktan sonra sistem ölçüme hazır hale getirildi. Akış enjeksiyon analiz (AEA) sisteminde, hareketli faz olarak asetik asit ve metansülfonik asitin çeşitli kompozisyonlardaki çözeltileri

kullanılarak aminler için AEA sistemi optimize edildi. Akış yolu üzerine yerleştirilen potansiyometrik akış hücreleri vasıtasıyla aminlerin hızlı ve tekrarlanabilir tayinleri, düşük örnek hacimlerinde (20 μ L) gerçekleştirildi. Farklı hacimdeki numune ve akış hızı denemeleri sonucunda; enjeksiyon hacmi 20 μ L ve akış hızı 1 ml/dak olarak seçildi. Hazırlanan bütün elektrotlar hem durgun ortamda hem de AEA ortamında test edildi.

Laboratuvarda tasarımı yapılan mini boyuttaki akış hücresine yerleştirilen bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrotlar HPLC sisteminde dedektör olarak kullanılarak peynir altı kazan suyundaki aminler tayin edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmada elde edilen bulgular aşağıda belirtilen ana başlıklar altında sunulmuştur.

1. Elektrotların durgun ortamdaki potansiyometrik performans özellikleri,
2. Elektrotların hareketli ortam ölçümleri,
3. Elektrotların sıvı kromatografik sistemde dedektör olarak kullanılması ve gerçek numunelere uygulanması.

4.1. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı PVC Membran Elektrotların Potansiyometrik Davranışları

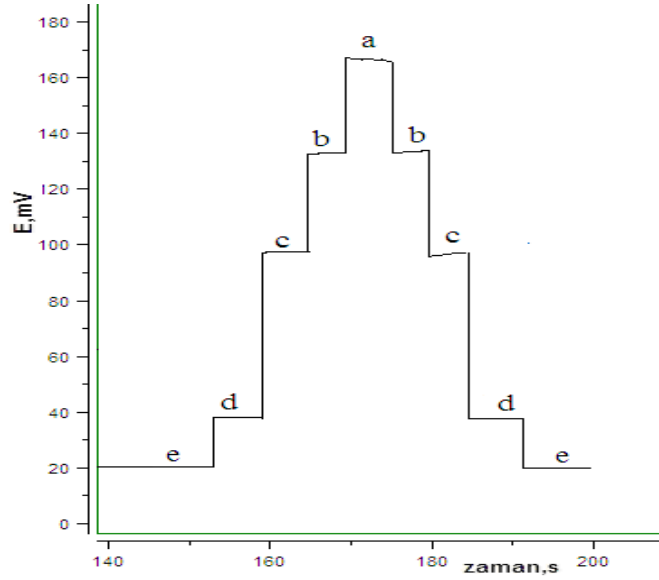
Çizelge 3.3'te görüldüğü gibi üç farklı kompozisyonda bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrotlar hazırlandı. Hazırlanan elektrotların potansiyometrik performans özellikleri incelendi. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde % 31 PVC (polimer), % 64 DOS (plastikleştirici), % 1 potasyumtetrakis (p-klorofenil) borat (iyonofor 1) ve % 4 calix-6-aren-hegzaetilasetat (iyonofor 3) karışım 3 kullanılarak hazırlanan bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun (Çizelge 3.3'te elektrot 3 olarak gösterildi) diğer elektrotlara göre daha iyi performans gösterdiği belirlendi. Bu nedenle çalışma boyunca AEA ve kromatografik analizlerde bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrot için bu kompozisyonlar kullanılarak hazırlandı. Bu elektrot için bundan sonra bütünüyle katı –hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrot deyimi kullanılacaktır.

4.1.1. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı PVC Membran Elektrodun Durgun Ortam Performansları

% 31 PVC (polimer), % 64 DOS (plastikleştirici) ve % 1 potasyumtetrakis (p-klorofenil) borat (iyonofor 1) ve % 4 calix-6-aren-hegzaetilasetat (iyonofor 3) kullanılarak hazırlanan bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrot ile farklı amin çözeltilerinin 1×10^{-2} - 1×10^{-6} M derişim aralığında değişen derişimlerine karşı ölçümler alındı. Ölçümler düşük derişimden yüksek derişime ve sonra tekrar

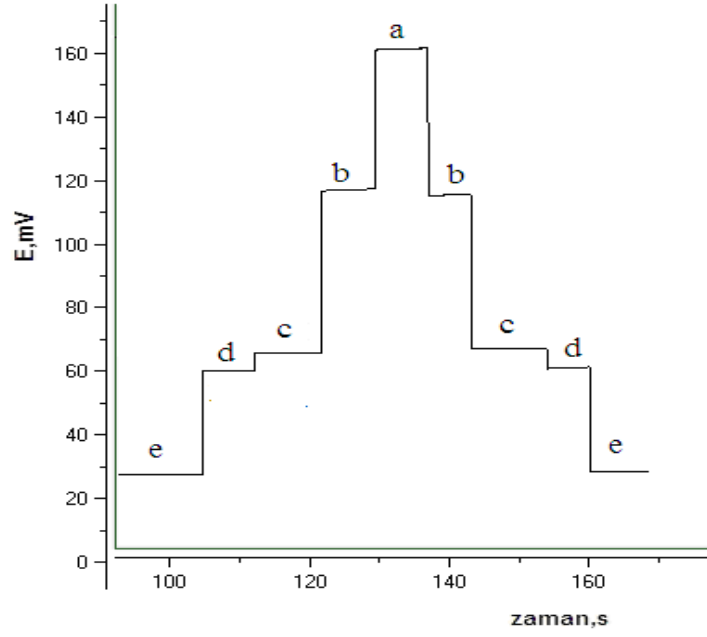
düşük derişime doğru alındı. Bu ölçümler sonucunda elektrodun her bir amin çözeltisine karşı göstermiş olduğu potansiyometrik performans özellikleri belirlendi.

Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun amin çözeltilerinin değişen derişimlerine karşı sergilediği potansiyometrik davranışlar Şekil 4.1-10'da görüldüğü gibi bilgisayar ekranında görülen şeklin yazıcıdan çıkan hali ile verilmiştir.



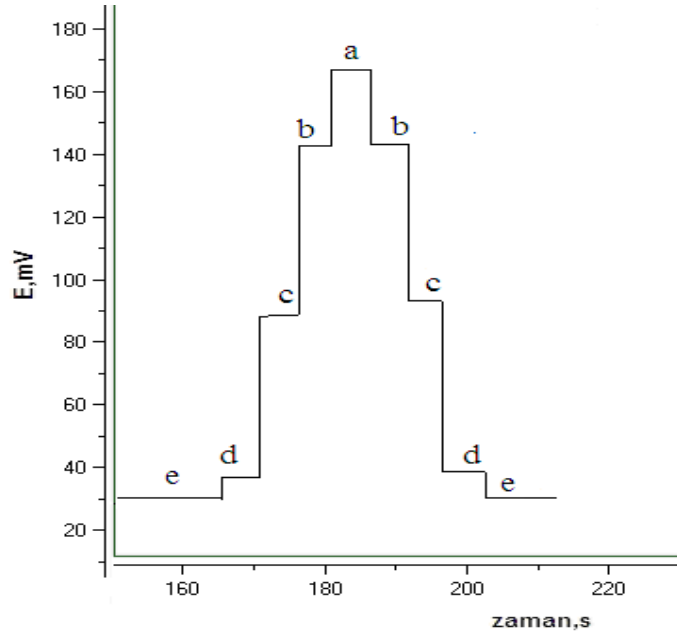
Şekil 4.1. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun etil amin çözeltisinin farklı derişimlerine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı (a= 1×10^{-2} M, b= 1×10^{-3} M, c= 1×10^{-4} M, d= 1×10^{-5} M, e= 1×10^{-6} M)

Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun farklı derişimlere sahip etil amin çözeltisine ait potansiyel-zaman grafiği incelendiğinde elektrodun farklı konsantrasyonlar arasındaki geçişlerde yüksek konsantrasyonlardan düşük konsantrasyonlara yada düşük konsantrasyonlardan yüksek konsantrasyonlara geçişlerde bir miktar farklılık gösterebilir genel olarak etil amin çözeltilerine karşı oldukça hızlı cevap zamanı ile tekrarlanabilir davranış sergilediği görülmektedir.



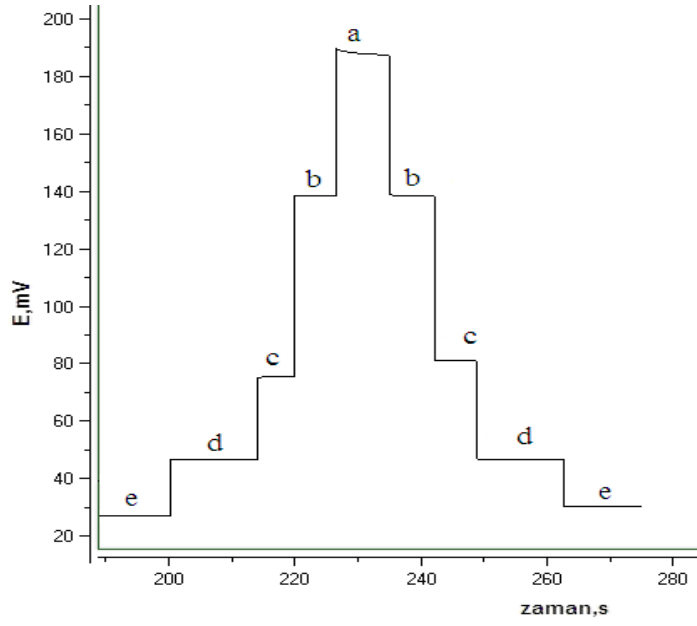
Şekil 4.2. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun propil amin çözeltisinin farklı derişimlerine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı ($a=1 \times 10^{-2}$ M, $b=1 \times 10^{-3}$ M, $c= 1 \times 10^{-4}$ M, $d= 1 \times 10^{-5}$ M, $e= 1 \times 10^{-6}$ M)

Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun değişen derişimlerdeki propil amin çözeltilerine karşılık gelen potansiyometrik davranışı incelendiğinde elektrodun 10^{-4} - 10^{-5} M arasında 6 mV'luk bir potansiyel fark verdiği görülmektedir. 10^{-4} - 10^{-5} M arasında elektrot bütül amine daha düşük duyarlılık göstermektedir.



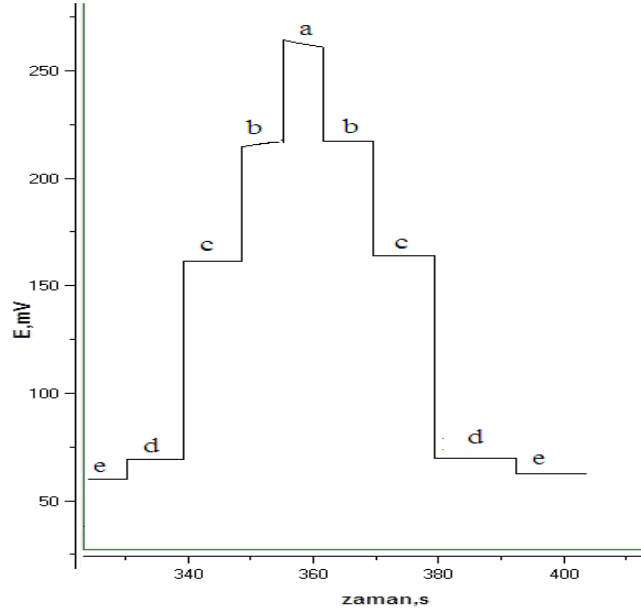
Şekil 4.3. Bütünöyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun bütöl amin çözültisinin farklı derişimlerine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı (a= 1×10^{-2} M, b= 1×10^{-3} M, c= 1×10^{-4} M, d= 1×10^{-5} M, e= 1×10^{-6} M)

Bütünöyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun değişen derişimlerdeki bütöl amin çözültisine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı incelendiğinde elektrodun 10^{-5} - 10^{-6} M arasında 8 mV'luk bir potansiyel fark verdiği görölmektedir. Düşük derişimlerde potansiyel farkın azalması bütöl amin derişimi azaldıkça bütöl aminin katyonik forma dönüşmesinin daha az olmasından kaynaklanmaktadır.



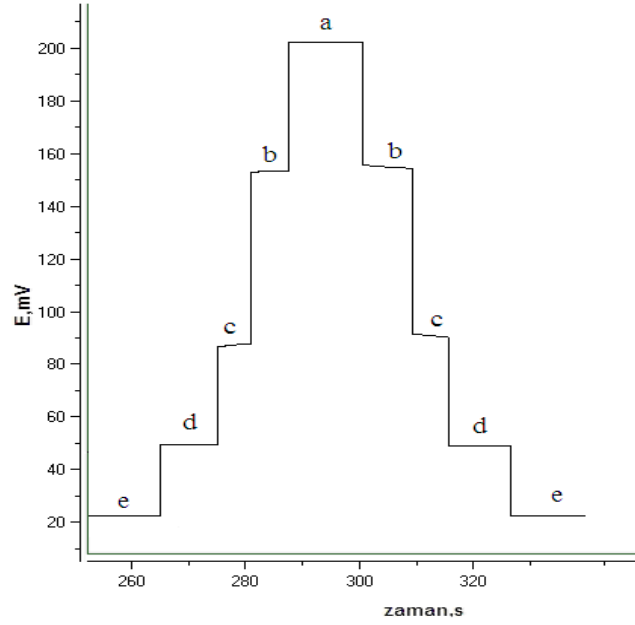
Şekil 4.4. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun pentil amin çözeltisinin farklı derişimlerine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı (a= 1×10^{-2} M, b= 1×10^{-3} M, c= 1×10^{-4} M, d= 1×10^{-5} M, e= 1×10^{-6} M)

Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun değişen derişimlerdeki pentil amin çözeltisine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı incelendiğinde elektrodun pentil amine karşı duyarlı olduğu görölmektedir.



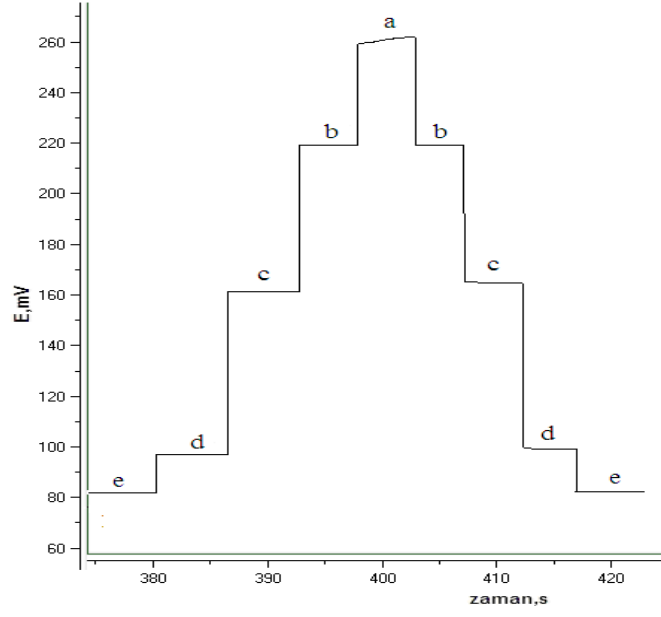
Şekil 4.5. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun hegzil amin çözeltisinin farklı derişimlerine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı ($a=1 \times 10^{-2}$ M, $b=1 \times 10^{-3}$ M, $c= 1 \times 10^{-4}$ M, $d= 1 \times 10^{-5}$ M, $e= 1 \times 10^{-6}$ M)

Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun değişen derişimlerdeki hegzil amin çözeltisine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı incelendiğinde 10^{-5} - 10^{-6} M arasında elektrodun performansının ve duyarlılığının azaldığı görülmektedir. Elektrot her on katlık derişim değişimine karşılık 56 mV'luk bir potansiyel fark göstermektedir.



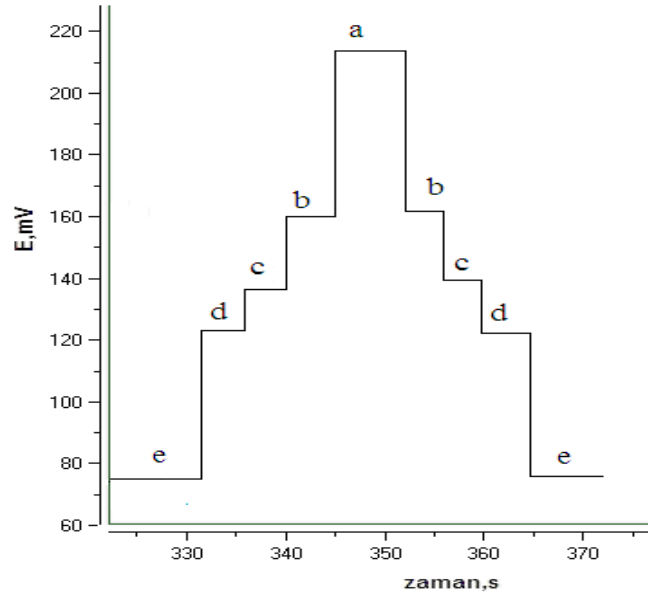
Şekil 4.6. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun heptil amin çözeltisinin farklı derişimlerine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı (a= 1×10^{-2} M, b= 1×10^{-3} M, c= 1×10^{-4} M, d= 1×10^{-5} M, e= 1×10^{-6} M)

Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun değişen derişimlerdeki heptil amin çözeltisine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı incelendiğinde elektrodun heptil amine karşı duyarlı olduğu görülmektedir.

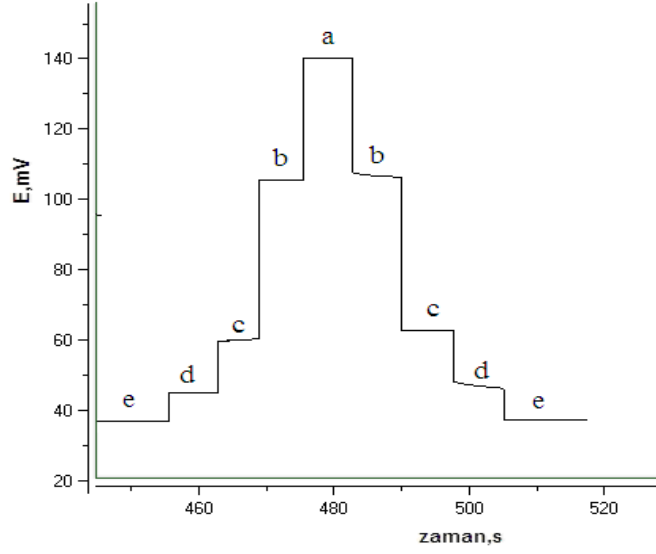


Şekil 4.7. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun oktil amin çözeltisinin farklı derişimlerine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı (a= 1×10^{-2} M, b= 1×10^{-3} M, c= 1×10^{-4} M, d= 1×10^{-5} M, e= 1×10^{-6} M)

Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun değişen derişimlerdeki oktil amin çözeltisine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı incelendiğinde elektrodun oktil amine karşı duyarlı olduğu görülmektedir.

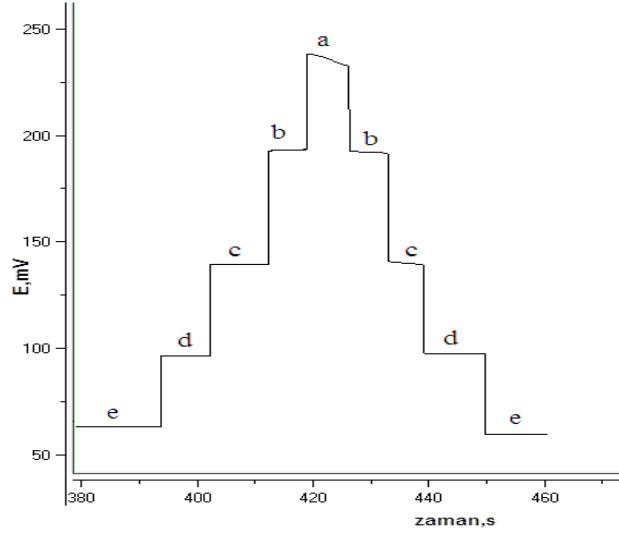


Şekil 4.8. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun kadavarin çözeltisinin farklı derişimlerine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı (a= 1×10^{-2} M, b= 1×10^{-3} M, c= 1×10^{-4} M, d= 1×10^{-5} M, e= 1×10^{-6} M)



Şekil 4.9. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun spermin çözeltisinin farklı derişimlerine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı (a= 1×10^{-2} M, b= 1×10^{-3} M, c= 1×10^{-4} M, d= 1×10^{-5} M, e= 1×10^{-6} M)

Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun değişen derişimlerdeki kadavarin ve spermin çözeltilerine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı incelendiğinde elektrodun spermin ve kadavarine beklenen seviyede performans göstermediği görülmektedir. Bu duruma tampon ortamında spermin ve kadavarinin sahip olduğu katyonik yükün dört azot atomu tarafından paylaşılması ve iyonoforun kavitesi ile tam olarak etkileşmemesi neden olmaktadır.



Şekil 4.10. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun dimetil amin çözeltisinin farklı derişimlerine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı (a= 1×10^{-2} M, b= 1×10^{-3} M, c= 1×10^{-4} M, d= 1×10^{-5} M, e= 1×10^{-6} M)

Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun değişen derişimlerdeki dimetil amin çözeltisine karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı incelendiğinde elektrodun dimetil amine karşı duyarlı olduğu görölmektedir.

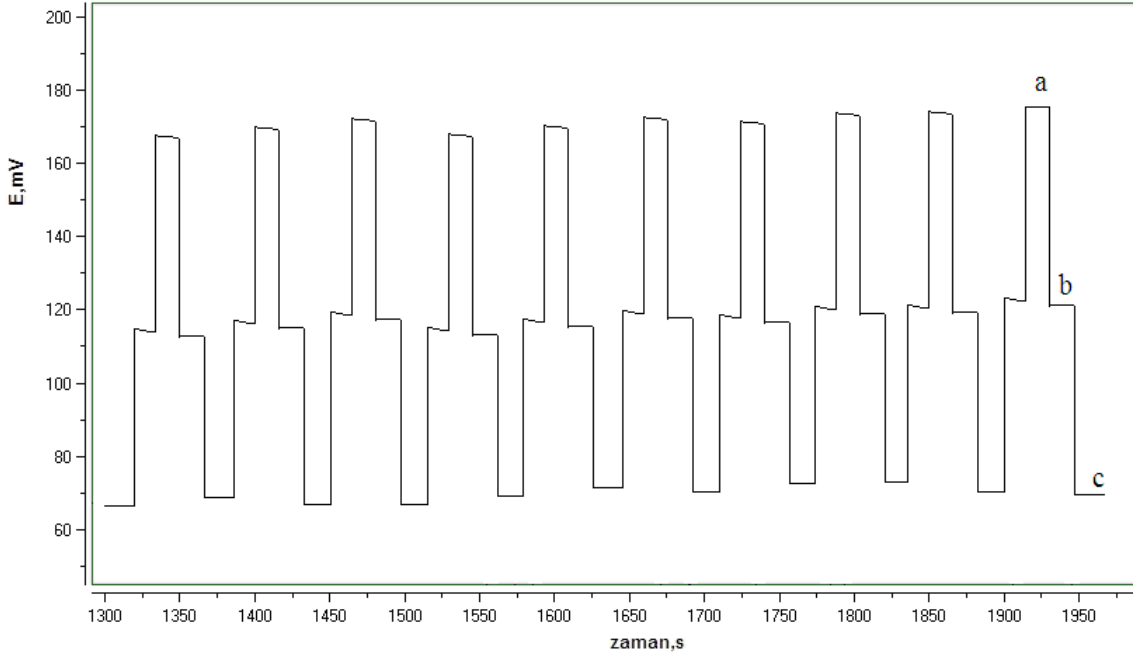
Geliştirilen bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun tekrarlanabilirliği farklı amin çözeltilerinin 1×10^{-3} M çözeltileri ile dört kez alınan ölçümlerin ortalaması ve standart sapması kullanılarak verildi. Herbir iyon için elde edilen ölçüm değerleri, ölçüm değerlerinin ortalaması ve standart sapması Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1.Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun amin çözeltileri için ortalama ve standart sapma değerleri ile verilen ölçüm sonuçları

Çözelti 10^{-3}molL^{-1}	Ölçümler (mV)				Ortalama ve Standart Sapma
	1.	2.	3.	4.	
Etil amin	119.00	118.00	119.00	119.00	118.75 ± 0.50
Propil amin	151.00	150.00	152.00	151.00	151.00 ± 0.81
Bütil amin	144.00	143.00	144.00	148.00	144.75 ± 2.21
Pentil amin	211.00	210.00	210.00	212.00	210.75 ± 0.95
Hegzil amin	195.00	196.00	196.00	195.00	195.00 ± 0.57
Heptil amin	232.00	233.00	232.00	230.00	231.75 ± 1.26
Spermin	81.00	82.00	80.00	81.00	81.00 ± 0.82
Kadavarin	116.00	115.00	116.00	117.00	116.00 ± 0.82
Oktil amin	259.00	258.00	258.00	259.00	258.50 ± 0.57
Dimetil amin	113.00	112.00	112.00	110.00	111.75 ± 1.26

4.1.2. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı PVC Membran Elektrodun Tekrarlanabilirliği

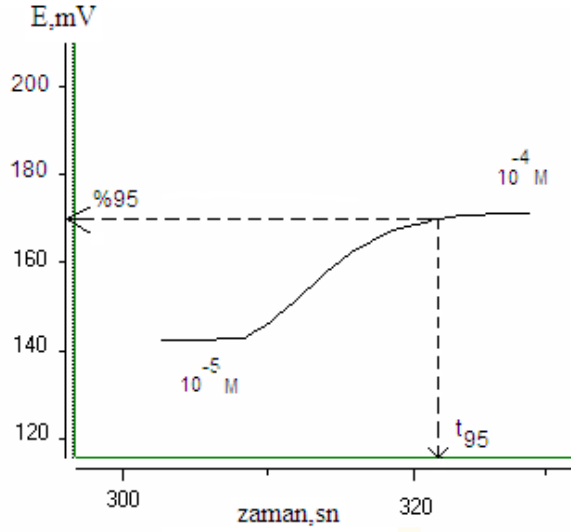
Şekil 4.11'deki grafik 10^{-2} , 10^{-3} , ve 10^{-4} M'lık bütil amin çözeltilerinden ard arda alınan ölçümlerde bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun tekrarlanabilirliğini göstermektedir. Bu ölçümlerde 10^{-2} , 10^{-3} , ve 10^{-4} M'lık bütil amin çözeltilerinden elde edilen ortalama potansiyel değerleri standart sapmaları ile birlikte % 95'lik güven aralığında sırasıyla 169.25 ± 0.96 , 116.75 ± 0.50 , 68.50 ± 0.58 mV olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.11. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun tekrarlanabilirliği ($a=1 \times 10^{-2}$ M, $b=1 \times 10^{-3}$ M, $c=1 \times 10^{-4}$ M bütül amin çözeltisi)

4.1.3. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı PVC Membran Elektrodun Cevap Zamanı

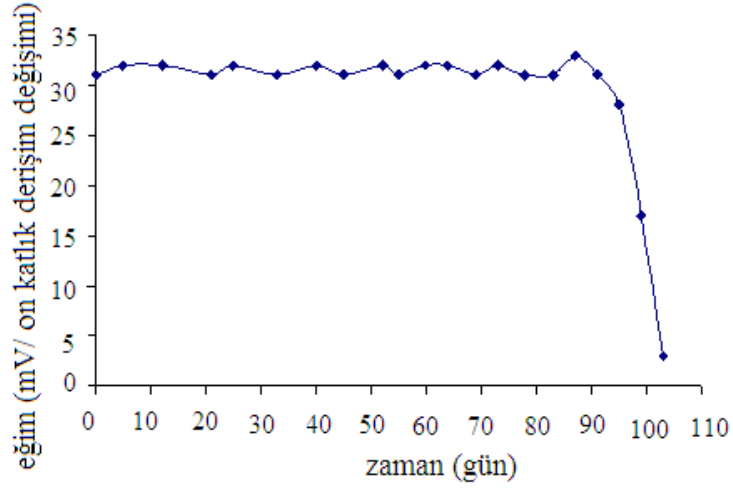
Bir elektrodun cevap zamanının, elektrodun analitik amaçlarla etkin bir şekilde kullanılması için oldukça kısa olması istenir. Bu nedenle, laboratuvarımızda hazırladığımız bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrot için cevap zamanları araştırıldı. Bunun için 1×10^{-5} M hegzil amin çözeltisinden 1×10^{-4} M hegzil amin çözeltisine geçişte elektrodun dengeye gelme zamanının % 95'ne karşılık gelen süre hesaplanarak cevap zamanı 12 s olarak bulundu. Şekil 4.12'de bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrot için 1×10^{-5} - 1×10^{-4} M hegzil amin çözeltilerindeki denge potansiyeline geçiş süresi grafiksel olarak gösterilmektedir ve Çizelge 4.2'de bütünüyle katı-hal kontakt amin-duyarlı PVC membran elektrodun gözlenen cevap zamanları saniye olarak verilmiştir.



Şekil 4.12. Bütünüyle katı-hal amin-duyarlı elektrot için cevap-zamanı grafiği (hegzil amin çözeltisi)

4.1.4. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı PVC Membran Elektrodun Kullanım Ömrü

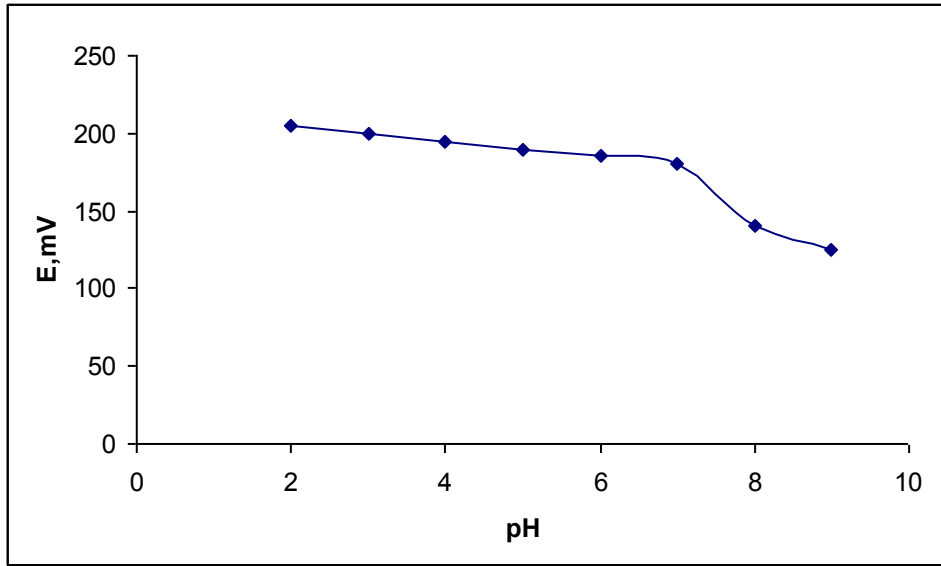
Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı elektrodun kullanım ömrü zamana bağlı olarak 1×10^{-3} - 1×10^{-6} M aralığında her bir amin çözeltilerinden alınan ölçümlerle çizilen kalibrasyon grafiklerinin eğimindeki değişim dikkate alınarak belirlenmiştir. Şekilde 4.13.'de bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun etil amin çözeltisinde izlenen 100 günlük davranışı görülmektedir. Ölçümlerde kullanılan bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrot, her ölçümden önce yaklaşık 20 dakika süresince 1×10^{-2} M'lık amin çözeltisinde şartlandırıldı. Şekil 4.13'den de görüleceği gibi 3. aydan sonra alınan ölçümlerde eğimler arasındaki önemli farklar söz konusudur. 80 gün boyunca elektrodun eğimi 31 mV civarında iken, 80 günden sonra elektrodun eğimi hızla azalmaya başlamıştır. Bu eğim değerlerine göre laboratuvarında hazırladığımız bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun kullanım ömrünün yaklaşık 3 ay olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4.13. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrotun zamana bağlı olarak eğiminde meydana gelen değişim (etil amin çözeltisi)

4.1.5. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı PVC Membran Elektrodun pH Çalışma Aralığı

Hazırlanan bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun pH çalışma aralığı, amin konsantrasyonu 1×10^{-2} M da sabit tutulan pH'sı 2.0-9.0 arasında değişen 5×10^{-3} M fosfat tamponundaki çözeltilerde alınan ölçümlerle belirlendi. Şekil 4.14'te görüldüğü gibi hazırlanan bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun potansiyeli 2.0-7.0 arasındaki pH'larda önemli derecede değişmemiştir. Bu pH aralığının dışında, ortamdaki amin derişimi aynı olmasına rağmen potansiyel değerleri önemli derecede farklılaşmıştır. Elektrot, pH'nın 2.0-7 aralığında olduğu ortamlarda pH'dan etkilenmeden çalışabilmektedir. Elektrodun diğer amin çözeltilerinde de benzer davranışı sergilediği gözlemlendi.



Şekil 4.14. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrotun pH çalışma aralığı (hegzil amin çözeltisi)

4.1.6. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı PVC Membran Elektrodun Doğrusal Çalışma Aralığı ve Tayin Limiti

Bütünüyle katı-hal kontakt amin-duyarlı PVC-membran elektrot için, derişimi 1×10^{-3} - 5×10^{-7} M arasında değişen standart amin çözeltileri 0.1 M $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ tampon çözeltisi içinde (pH:5.0) hazırlandı ve durgun ortamda potansiyometrik ölçümler alındı. Elde edilen kalibrasyon grafiklerinden IUPAC sistemine göre hesaplanan tayin limitleri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Farklı kompozisyonda farklı iyonoforlar kullanılarak hazırlanan elektrotlar için hesaplanan tayin limitleri her bir amin için farklılık göstermektedir. Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun doğrusal çalışma aralığı genel olarak 1×10^{-2} - 1×10^{-6} M arasında değişmektedir.

Çizelge 4. 2. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı PVC Membran Elektrodun Durgun Ortamda Potansiyometrik Performans Özellikleri

Amin	Tayin limiti (mol L ⁻¹)	Cevap zamanı, t ₉₅ (s)	Doğru denklemi	r ²	Kullanım ömrü (hafta)	pH çalışma aralığı
Etil amin	7.3x10 ⁻⁵	12	E= -39.0 [C] + 247.2	0.9806	12	2-7
Propil amin	3.4x10 ⁻⁵	13	E= -32.0 [C] + 214.4	0.9468	12	2-7
Bütil amin	9.8x10 ⁻⁵	14	E= -37.3 [C] + 243.6	0.9572	12	2-7
Pentil amin	2.1x10 ⁻⁵	14	E= -41.7 [C] + 262.8	0.9694	12	2-7
Hegzil amin	3.1x10 ⁻⁶	12	E= -56.0 [C] + 376.4	0.9563	12	2-7
Heptil amin	5.6x10 ⁻⁵	12	E= -46.4 [C] + 289.0	0.9766	12	2-7
Oktil amin	8.9x10 ⁻⁶	11	E= -48.0.[C] + 356.8	0.9744	12	2-7
Kadavarin	7.9x10 ⁻⁶	11	E= -31.7 [C] + 268.8	0.9624	12	2-7
Spermin	7.6x10 ⁻⁵	11	E= -27.1 [C] + 185.8	0.9352	12	2-7
Dimetil amin	9.1x10 ⁻⁵	13	E= -44.8 [C] + 324.0	0.9965	12	2-7

E; mV olarak potansiyel, C; ilgili amin derişimi, mol L⁻¹

4.2. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı Elektrodun Hareketli Ortam Ölçümleri

4.2.1. Akış Enjeksiyon Analizi (AEA) Uygulamaları

AEA metodunun iyi bir şekilde optimize edilmesi, sonuçların kalitesi üzerine önemli etkilere sahip olup, sistemin bileşenlerine bağlı olarak çok sayıda deneysel parametrenin incelenmesini mecburi kılar. Bu deneysel parametreler; pH, sıcaklık ve reaktif konsantrasyonu gibi kimyasal parametreler, enjeksiyon hacmi, karıştırma çemberinin özellikleri, bağlantıların uzunluk ve şekilleri gibi AEA parametreleri ya da elektrodun şekli, akış hücresinde düzenlenmesi ve akış hücresinin ölü hacmi gibi tayin parametrelerinden oluşabilir (Calatayud, 2003).

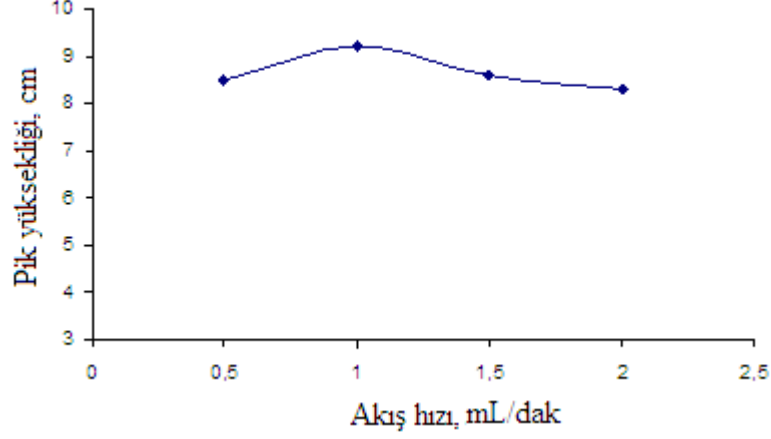
Optimizasyonun en temel amacı; duyarlılık, doğruluk ve tekrarlanabilirlik gibi analitik özellikleri iyileştirmektedir. Örnekleme sayısı, örnek ve reaktif tüketimi, çalışma maliyeti yukarıda sayılanlara göre daha geri planda kalmaktadır (Calatayud, 2003).

Bölüm 3.2.3'de açıklandığı gibi bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrot için akış hücreleri hazırlandı ve AEA sisteminde dedektör olarak kullanıldı. Aminler nötral bileşikler oldukları için hazırlanan elektrot sistemi ile ölçülebilmeleri için nötral halden katyonik hale dönüştürülmeleri gerekir. Bu nedenle hareketli faz olarak protonlama özelliği olan asetik asit ve metansülfonik asit çözeltileri ayrı ayrı kullanılarak test edildi. AEA sisteminde hareketli ortamda elektrodun performansını belirlemek için önce sistem optimize edildi.

4.2.2. Hareketli Faz Akış Hızının Etkisi

Laboratuvarda hazırlanan bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun AEA sisteminde dedektör olarak kullanılması ile elde edilen amin piklerine hareketli faz akış hızının etkisi araştırıldı. Bunun için hareketli faz akış hızı 0.5 ile 2.0 mL/dak arasında değiştirilerek elde edilen piklerin durumları incelendi. Şekil 4.15'ten de görüleceği gibi gerek pik şekilleri ve gerekse pik yükseklikleri dikkate alındığında optimum akış hızınının 1 mL/dak olduğu görüldü. Yüksek akış hızlarında pik yüksekliğinin azalmasının nedeni enjekte edilen amin bileşiğinin kısa sürede

protonlanmadığını göstermektedir. Optimum piklerde 1 mL/dak akış hızında sağlandığı için kromatografik çalışmalarda da bu akış hızı kullanıldı.



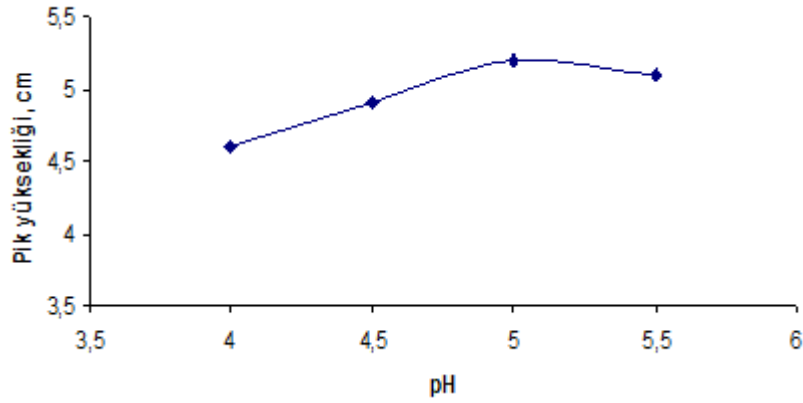
Şekil 4.15. Pik yüksekliğine akış hızının etkisi(Hareketli faz: 1×10^{-2} M HAC/Ac⁻ (pH:5.0) tampon çözeltisi; Enjeksiyon hacmi: 20 μ L, 1×10^{-3} M bütül amin çözeltisi)

4.2.2. Enjeksiyon Hacminin Etkisi

Akış hızı 1 mL/dak olarak belirlendikten sonra, bu akış hızında farklı enjeksiyon hacimlerinde (20, 50, 100 μ L) hareketli faza 1×10^{-3} M derişimde aminlerin enjeksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen pik yükseklikleri ve pik genişliklerindeki değişim incelendi. Piklerin boyları ölçümlerin duyarlılığı yönünden önemli iken, genişlikleri de birim zamanda gerçekleştirilebilecek analiz sayısı yönünden önemlidir. Elde edilen pikler değerlendirildiğinde sisteme en uygun enjeksiyon hacminin 20 μ L olduğu belirlendi ve çalışma boyunca bu akış hızı kullanıldı.

4.2.3. pH' nın Etkisi

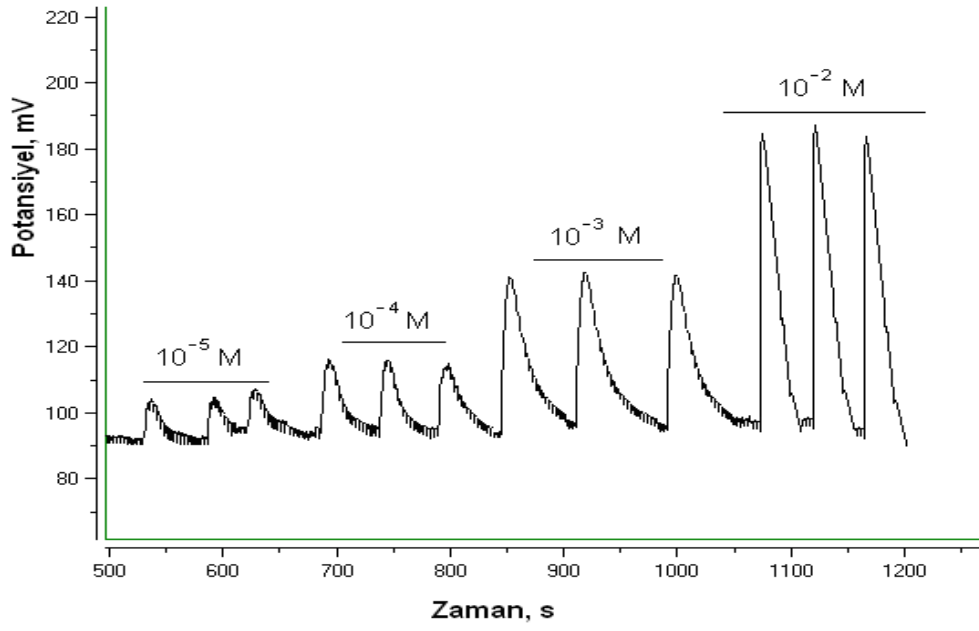
Hareketli faz pH'nın pik şekli ve pik yüksekliği üzerindeki etkisini araştırmak için pH' sı 4.0, 4.5, 5.0 ve 5.5 olan HAC/Ac⁻ tampon çözeltisi ile hareketli fazın pH'sı değiştirildi. Şekil 4.16'dan da görüldüğü gibi en uygun pH'nın 5.0 olduğu belirlendi.



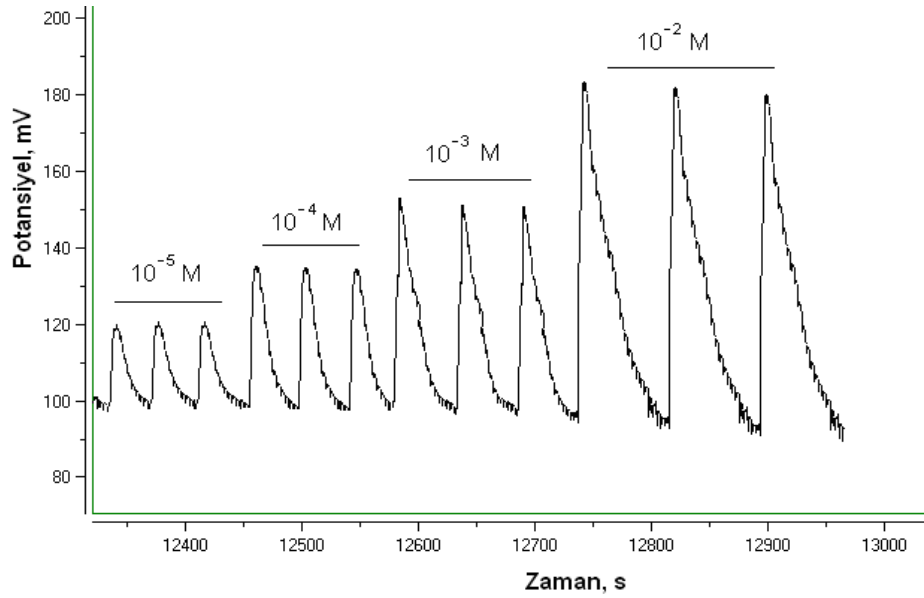
Şekil 4.16. Hareketli faz pH'sının pik yüksekliğine etkisi (Enjeksiyon hacmi: 20 μ L, Akış hızı: 1 mL/dak)

4.2.3. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı PVC Membran Elektrodun AEA Sisteminde HAc/Ac⁻ Hareketli Fazının Kullanılmasıyla Elde Edilen Sonuçlar

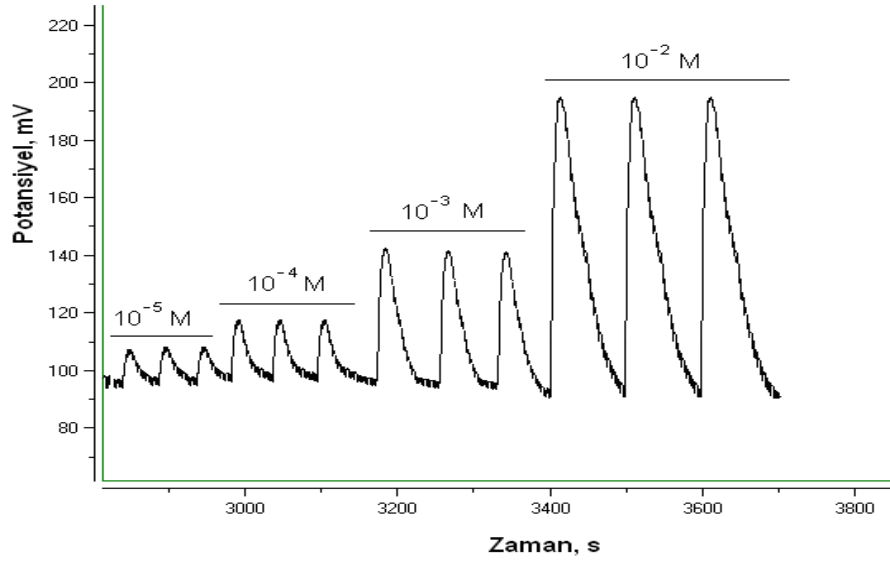
AEA sistemi optimize edildikten sonra hareketli faz olarak 1×10^{-2} M HAc/Ac⁻ tampon çözeltisi kullanılarak alınan ve elektrotların yaklaşık 1×10^{-5} M seviyesine kadar duyarlı olduğu standart amin çözeltilerine karşı sergiledikleri davranışlar bilgisayar ekranından izlendi ve elde edilen sonuçlar direkt bilgisayar çıktısı olarak verildi. Amin çözeltilerinin değişen derişimlerinin enjeksiyonu ile elde edilen flogramlar şekil 4.17-24'de gösterildi.



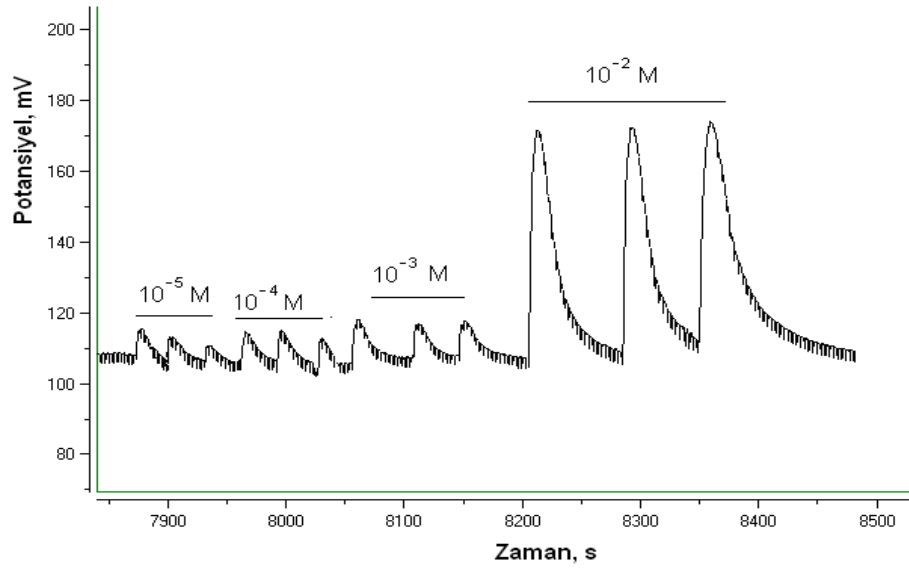
Şekil 4.17. Standart etil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri. Hareketli faz: 1×10^{-2} M HAc/Ac⁻ tampon çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk; Enjeksiyon hacmi: 20 μ L.



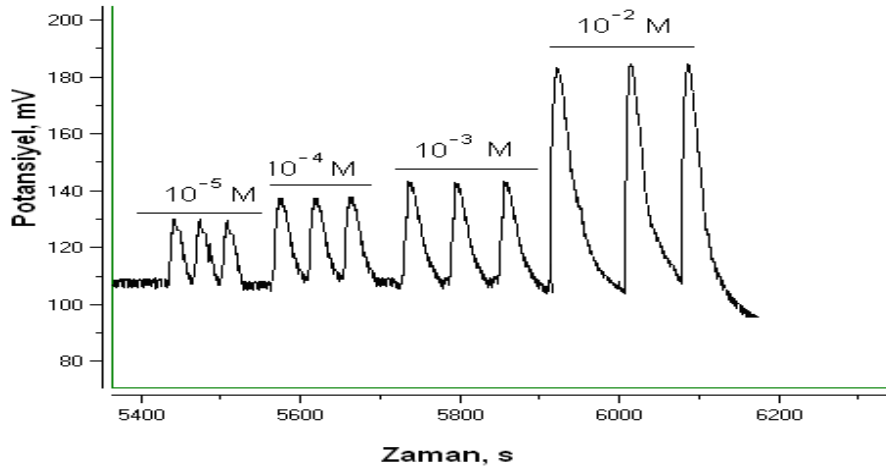
Şekil 4.18. Standart propil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri. Hareketli faz: 1×10^{-2} M HAc/Ac⁻ tampon çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk; Enjeksiyon hacmi: 20 μ L.



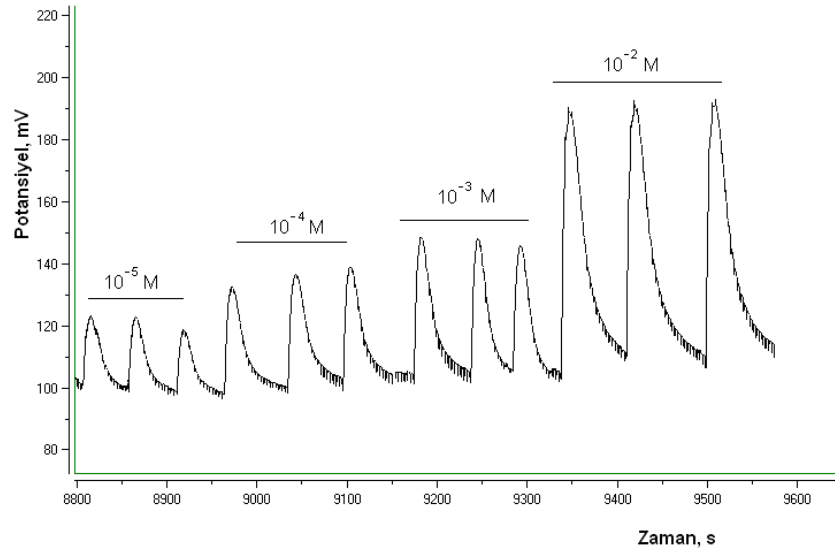
Şekil 4.19. Standart bütül amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri. Hareketli faz: 1×10^{-2} M HAc/Ac⁻ tampon çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk; Enjeksiyon hacmi: 20 μ L.



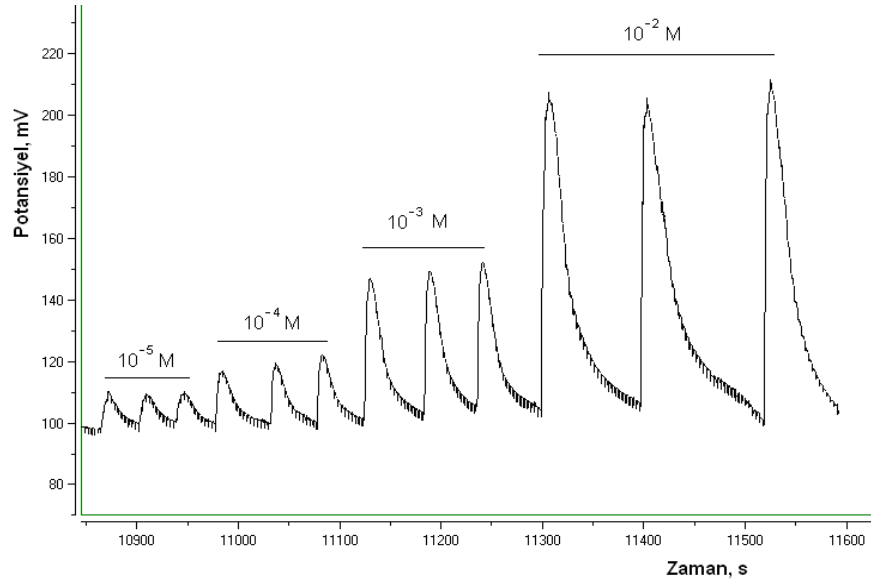
Şekil 4.20. Standart pentil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri. Hareketli faz: 1×10^{-2} M HAc/Ac⁻ tampon çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk; Enjeksiyon hacmi: 20 μ L.



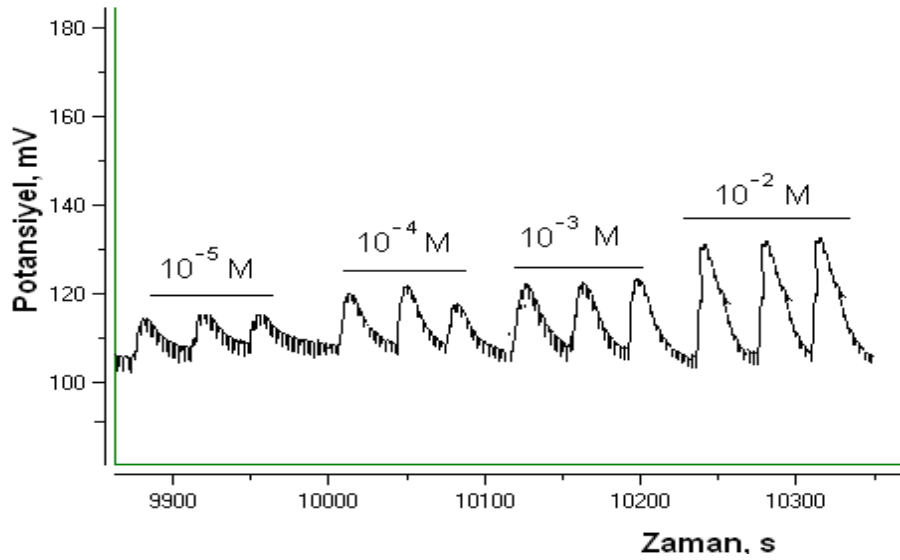
Şekil 4.21. Standart hegzil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri. Hareketli faz: 1×10^{-2} M HAc/Ac⁻ tampon çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk; Enjeksiyon hacmi: 20 μ L.



Şekil 4.22. Standart heptil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri. Hareketli faz: 1×10^{-2} M HAc/Ac⁻ tampon çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk; Enjeksiyon hacmi: 20 μ L.



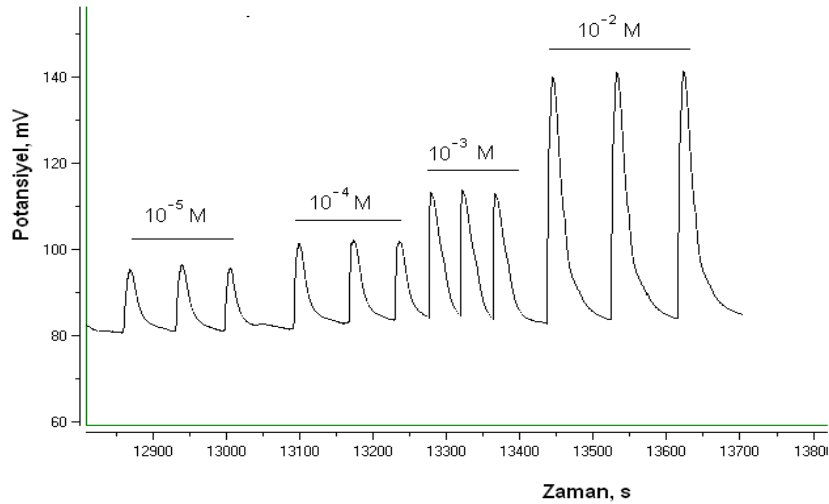
Şekil 4.23. Standart oktil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri. Hareketli faz: 1×10^{-2} M HAc/Ac⁻ tampon çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk; Enjeksiyon hacmi: 20 μ L.



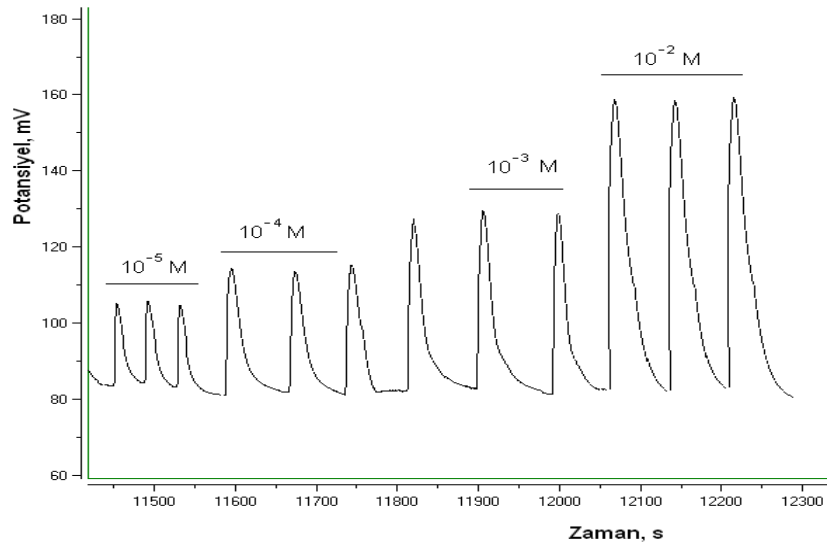
Şekil 4.24. Standart kadavarin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri. Hareketli faz: 1×10^{-2} M HAc/Ac⁻ tampon çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk; Enjeksiyon hacmi: 20 μ L.

4.2.4. Bütünüyle Katı-Hal Kontakt Amin Duyarlı PVC Membran Elektrodun AEA Sisteminde Metansülfonik Asit Hareketli Fazının Kullanılmasıyla Elde Edilen Sonuçlar

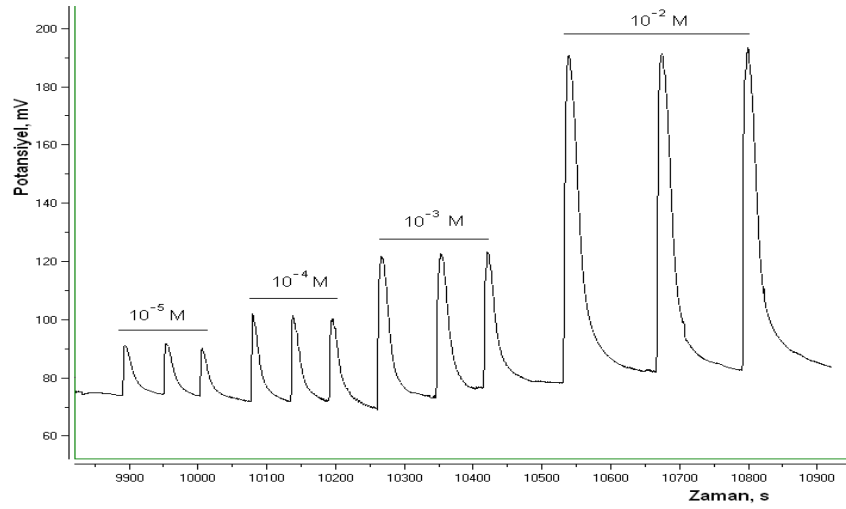
HAc/Ac⁻ tampon hareketli fazı kullanılarak elde edilen sonuçlardan sonra protonlama potansiyeli farklı olan metansülfonik asit çözeltisi kullanılarak iki hareketli fazdan elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı. Bu nedenle 1×10^{-2} M metansülfonik asit çözeltisi hareketli faz olarak kullanıldığında elektrodun standart amin çözeltilerine karşı sergiledikleri davranışlar bilgisayar ekranından izlendi ve elde edilen sonuçlar direkt bilgisayar çıktısı olarak verildi. Amin çözeltilerinin değişen derişimlerinin enjeksiyonu ile elde edilen flogramlar şekil 4.25-32’de gösterildi.



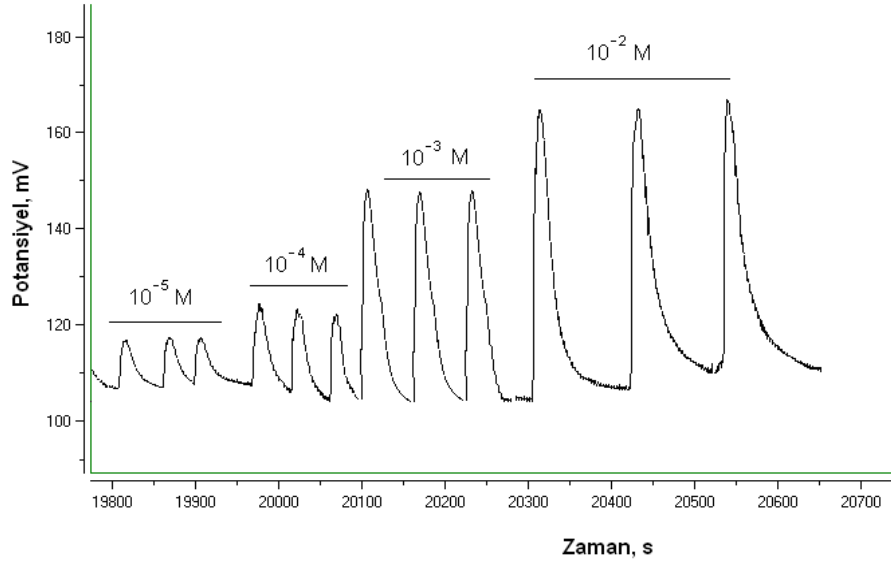
Şekil 4.25. Standart etil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri. Hareketli faz: 1×10^{-2} M metansülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk; Enjeksiyon hacmi: 20 μ L.



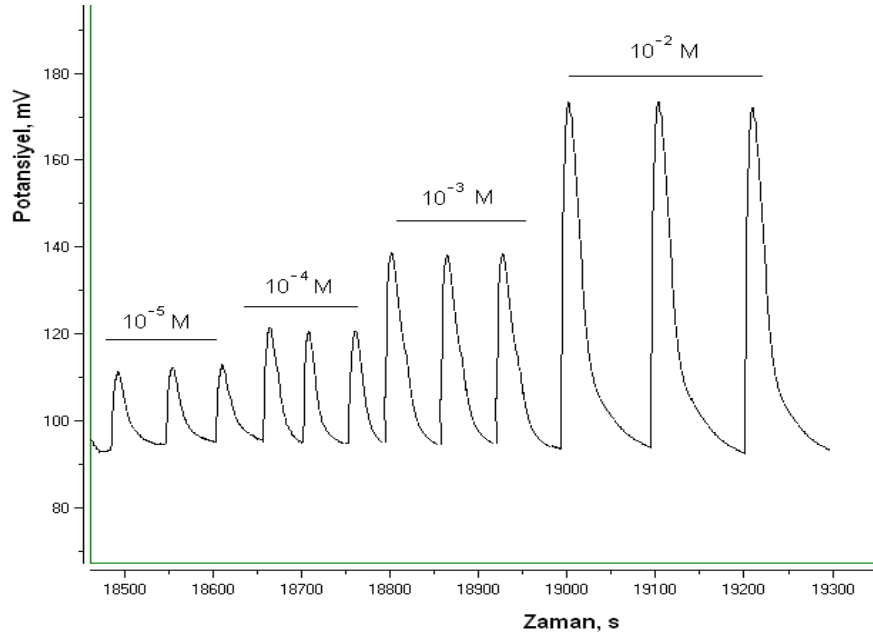
Şekil 4.26. Standart propil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri. Hareketli faz: 1×10^{-2} M metansülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk; Enjeksiyon hacmi: 20 μ L.



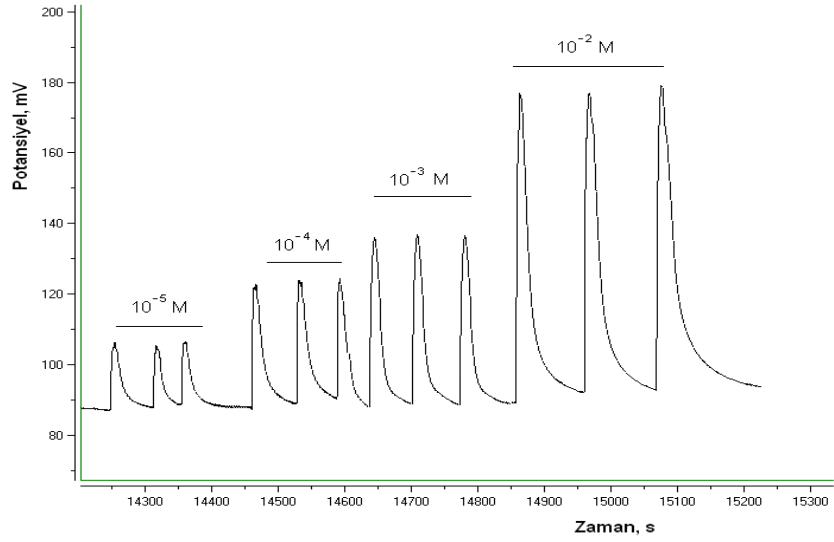
Şekil 4.27. Standart bütül amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri. Hareketli faz: 1×10^{-2} M metansülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk; Enjeksiyon hacmi: 20 μ L.



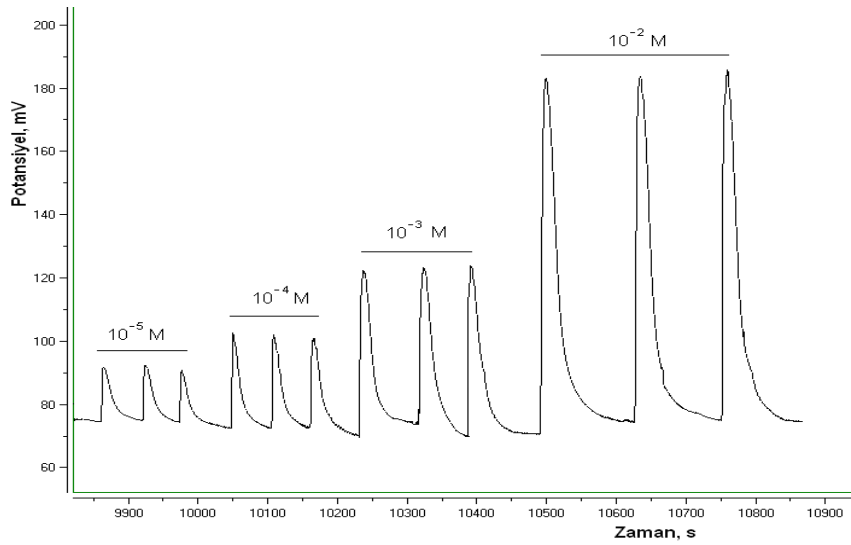
Şekil 4.28. Standart pentil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri. Hareketli faz: 1×10^{-2} M metansülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk; Enjeksiyon hacmi: 20 μ L.



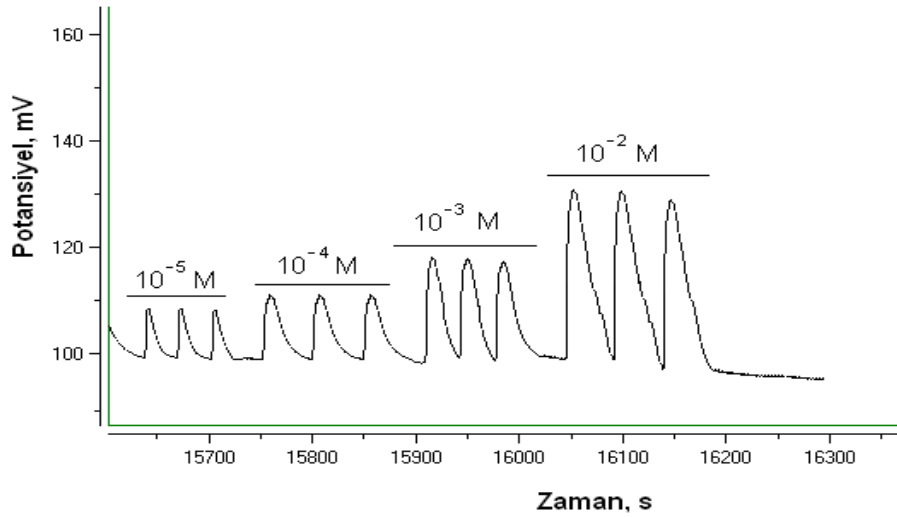
Şekil 4.29. Standart hegzil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri. Hareketli faz: 1×10^{-2} M metansülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk; Enjeksiyon hacmi: 20 μ L.



Şekil 4.30. Standart heptil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri. Hareketli faz: 1×10^{-2} M metansülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk; Enjeksiyon hacmi: 20 μ L.



Şekil 4.31. Standart oktil amin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri. Hareketli faz: 1×10^{-2} M metansülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk; Enjeksiyon hacmi: 20 μ L.



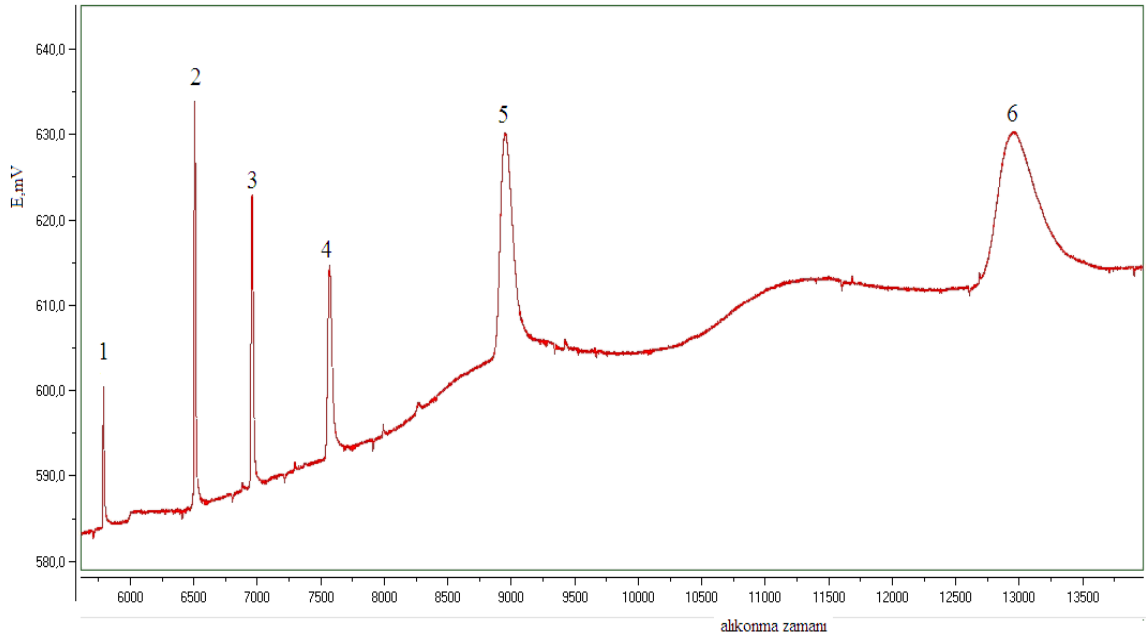
Şekil 4.32. Standart kadavarin çözeltisinin değişen derişimlerine ait AEA pikleri. Hareketli faz: 1×10^{-2} M metansülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1 mL/dk; Enjeksiyon hacmi: 20 μ L.

Bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun HAc/Ac^- ve metansülfonik asit hareketli fazları kullanılarak değişen derişimlerde amin çözeltilerinin enjeksiyonu ile elde edilen flogramlar incelendiğinde metansülfonik asitin uygun hareketli faz olduğu görülmektedir. Pik yükseklikleri dikkate alındığında HAc/Ac^- hareketli fazında elektrodun özellikle 1×10^{-5} M'lık amin çözeltilerinde duyarlılığının çok az olduğu görülmektedir. Elektrodun HAc/Ac^- hareketli fazında kadavarine karşı performansının beklenen seviyede olmadığı görülmektedir. Derişim değişmesi ile pik boyları fazla değişmemektedir. Bunun nedeni kadavarinde bulunan çift azotun katyonik yükün iki azot atomu tarafından paylaşılması ve iyonoforun kavitesi ile tam olarak etkileşmemesi ve hareketli ortamda yükün paylaşılmış olduğu, bu katyonik aminin iyonofor ile etkileşecek yeterli zamanı bulamamış olmasıdır. Metansülfonik asit hareketli fazının kullanılması ile elde edilen flogramlar incelendiğinde elde edilen pik boyları dikkate alındığında elektrodun değişen derişimlerdeki amin çözeltilerine daha duyarlı olduğu görülmektedir. Ayrıca elektrot tekrarlanabilir sonuçlar vermektedir. HAc/Ac^- hareketli fazında kadavarin için elde edilen flogramla kıyaslandığında elektrodun kadavarine duyarlı olduğu görülmektedir. Bu nedenle kromatografik analizlerde hareketli faz olarak metansülfonik asit kullanılacaktır.

4.3. Kromatografik Sonuçlar

4.3.1. Amin Bileşiklerinin Alıkonma Zamanlarının Belirlenmesi

Kromatografik analizin en önemli parametrelerinden birisi analitin alıkonma zamanının belirlenmesidir. Bunun için ilk olarak aminlerin alıkonma zamanları belirlenmeli ve metod optimize edilmelidir. Bu amaçla hazırlanan her bir amin bileşiminin 1×10^{-3} M derişimdeki çözeltilisinden 20 μL enjeksiyon yapıldı ve buradan elde edilen piklerden her bir amin için alıkonma zamanları belirlendi. Alıkonma zamanları belirlenen her bir amin bileşimi içeren bir karışım hazırlandı ve bütün çalışmalar bu amin çözeltileri karışımı üzerinden yürütüldü. Aminler için alıkonma zamanlarının belirlenmesi için hareketli faz seçiminde elektrotların durgun ve hareketli ortamlarda test edilmesinde kullanılan ve aminlerin ayırımı için Dionex Ionpac CS12A ayırım kolonu için uygun olan metansülfonik asit çözücüsü temel alınarak çeşitli alternatifler denenerek ayırım için en uygun hareketli faz kompozisyonu belirlenmeye çalışıldı. Bunun yanı sıra analitin alıkonma zamanını etkileyen akış hızı da test edildi ve en uygun akış hızı belirlendi. Aminlerin ayırımı için çalışmaya, 1 mL/dk akış hızında % 10 asetonitril içeren 27 mM metan sülfonik asit çözeltilisi (pH:2.0) kullanılarak başlandı. Bu akış hızı ve hareketli faz kullanılarak elde edilen kromatogramın direkt çıktısı bilgisayardan alındı. Söz konusu kromatogram Şekil 4.33'de gösterildi. Bütün kromatogramlarda yatay eksen saniye olarak alıkonma zamanını, dikey eksen ise mV olarak potansiyel değişimini göstermektedir.



Şekil 4.33. Her biri 1×10^{-3} M derişimde standart amin çözeltileri içeren karışımından $20 \mu\text{L}$ enjeksiyon ile elde edilen kromatogram (Hareketli faz: % 10 asetonitril içeren 27 mM metan sülfonik asit çözeltileri; Akış hızı: 1.0 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) (1) etil amin; (2) propil amin; (3) bütül amin; (4) pentil amin; (5) hegzil amin; (6) heptil amin

Yukarıdaki kromatogramdan da görüldüğü gibi 27 mM metan sülfonik asit , % 10 asetonitril hareketli fazında çözeltileri karışımında bulunan altı amin bileşiği 53 dakikada başarıyla ayrıldı. Ancak, büyük moleköl ağırlıklı oktil amin ve kadavarin bu hareketli fazda kolonda büyük oranda dağıldığı için bu süre içinde gözlenemedi. Elde edilen kromatogramdaki piklerin alıkonma zamanları daha önce tek tek enjekte edilen pikler ile karşılaştırdı. Belirlenen alıkonma zamanları Çizelge 4.3'de verilmiştir.

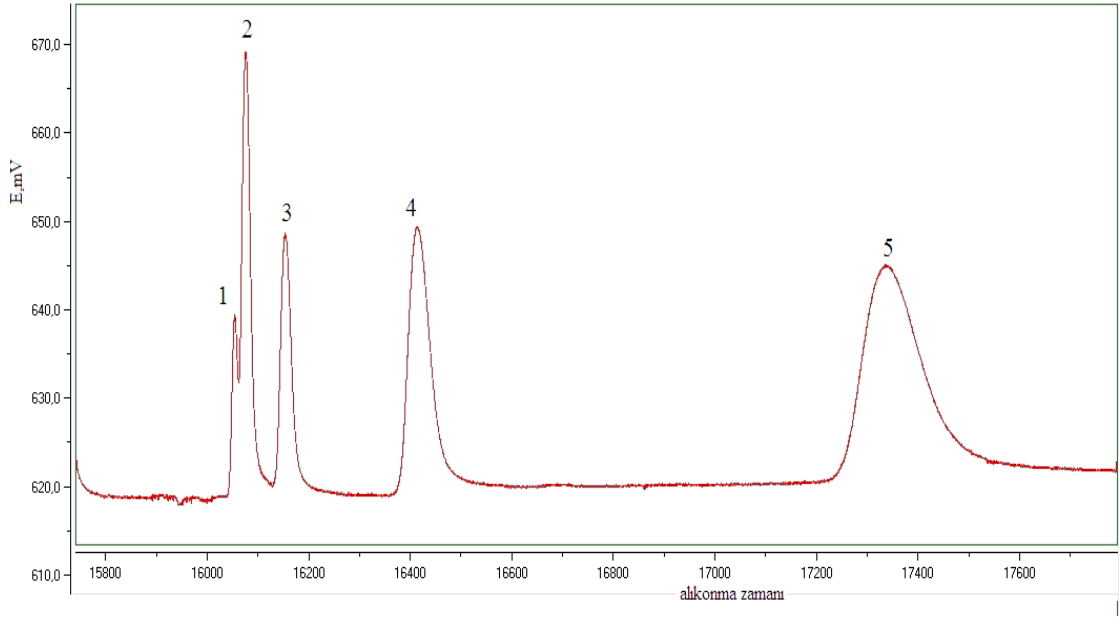
Çizelge 4.3. Her bir standart amin çözeltisi içeren karışımdan 20 µL enjeksiyonu; Akış hızı: 1.0 mL sonucu elde edilen kromatogramdan belirlenen alıkonma zamanları (Hareketli faz: % 10 asetonitril içeren 27 mM metan sülfonik asit çözeltisi /dk)

Amin bileşiği	Alıkonma Zamanı (dakika)
Etil amin	5.9
Propil amin	6.7
Bütil amin	9.6
Pentil amin	11.2
Hegzil amin	21.6
Heptil amin	52.8
Oktil amin*	-
Kadavarin*	-

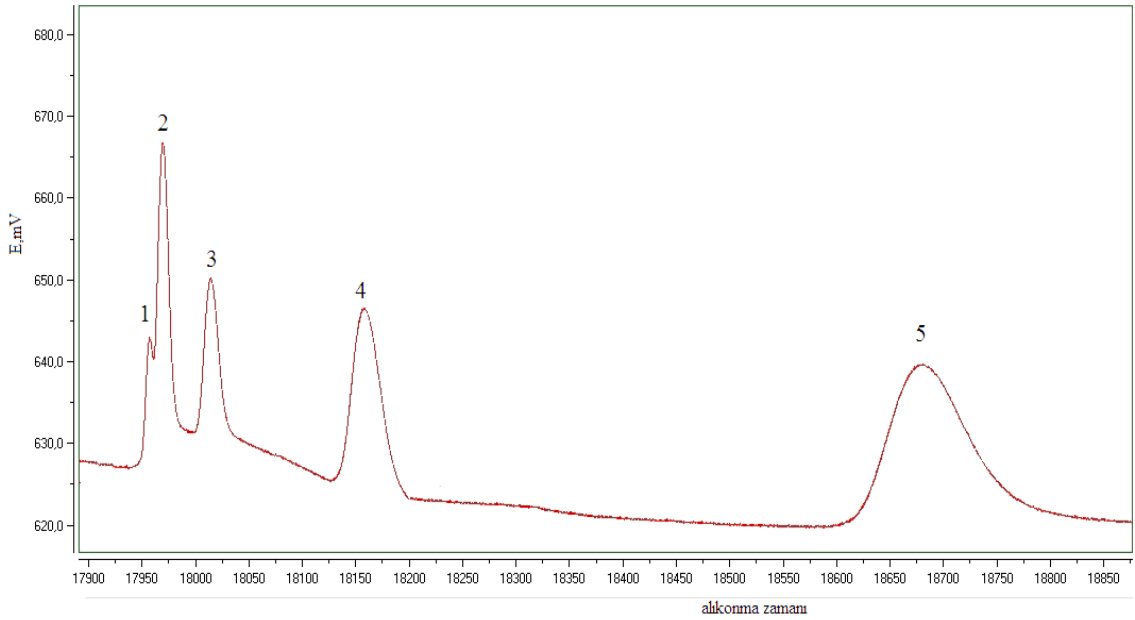
* 52 dakikalık analiz süresi içinde pikleri gözlenmedi.

4.3.2. Akış Hızının Alıkonma Zamanına Etkisi

Yukarıdaki çizelgede verilen aminlerin alıkonma zamanları 1 mL/dak akış hızında belirlendi. Kromatografik analizde temel hedef en kısa sürede en iyi ayırımı gerçekleştirmek olduğundan hareketli faz bileşimi % 10 asetonitril içeren 27 mM metan sülfonik asit çözeltisi olarak sabit tutularak akış hızı değiştirildi. Optimum akış hızı belirlendi. Aşağıda şekil 4.34 ve şekil 4.35'te, akış hızı 0.75 mL/dk ve 1.5 mL/dk yapılarak elde edilen kromatogramlar gösterildi.



Şekil 4.34. Her biri 1×10^{-3} M derişimde standart amin çöztisi içeren karışımından 20 μ L enjeksiyon ile elde edilen kromatogram (Hareketli faz: % 10 asetonitril içeren 27 mM metan sülfonik asit çöztisi; Akış hızı: 0.75 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) (1) etil amin; (2) propil amin; (3) bütül amin; (4) pentil amin; (5) hegzil amin.

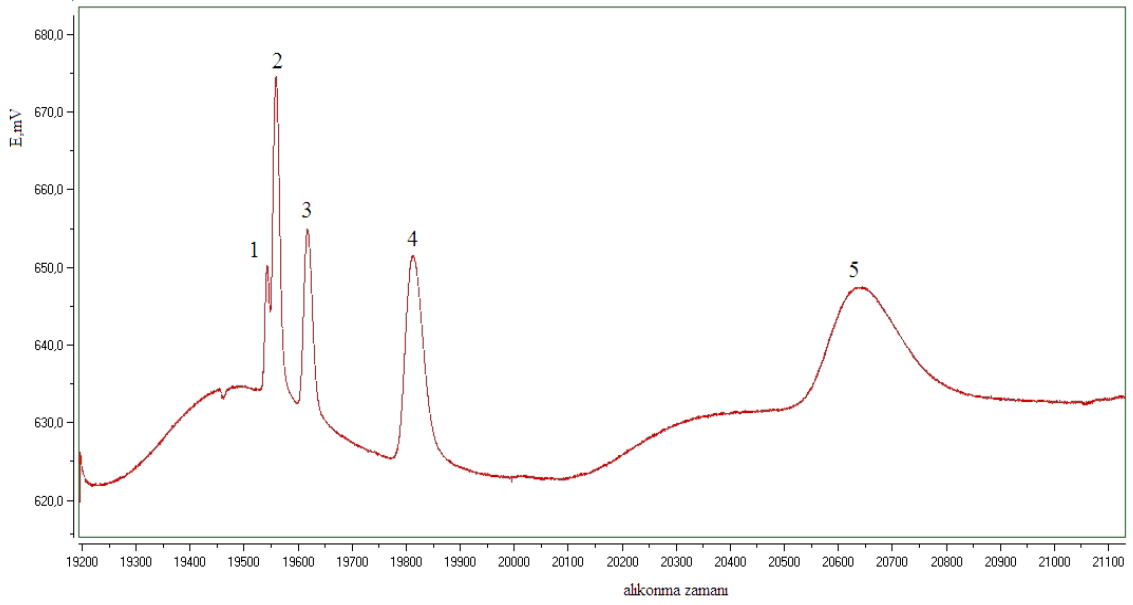


Şekil 4.35. Her biri 1×10^{-3} M derişimde standart amin çöztisi içeren karışımından 20 μ L enjeksiyon ile elde edilen kromatogram (Hareketli faz: % 10 asetonitril içeren 27 mM metan sülfonik asit çöztisi; Akış hızı: 1.5 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) (1) etil amin; (2) propil amin; (3) bütül amin; (4) pentil amin; (5) hegzil amin.

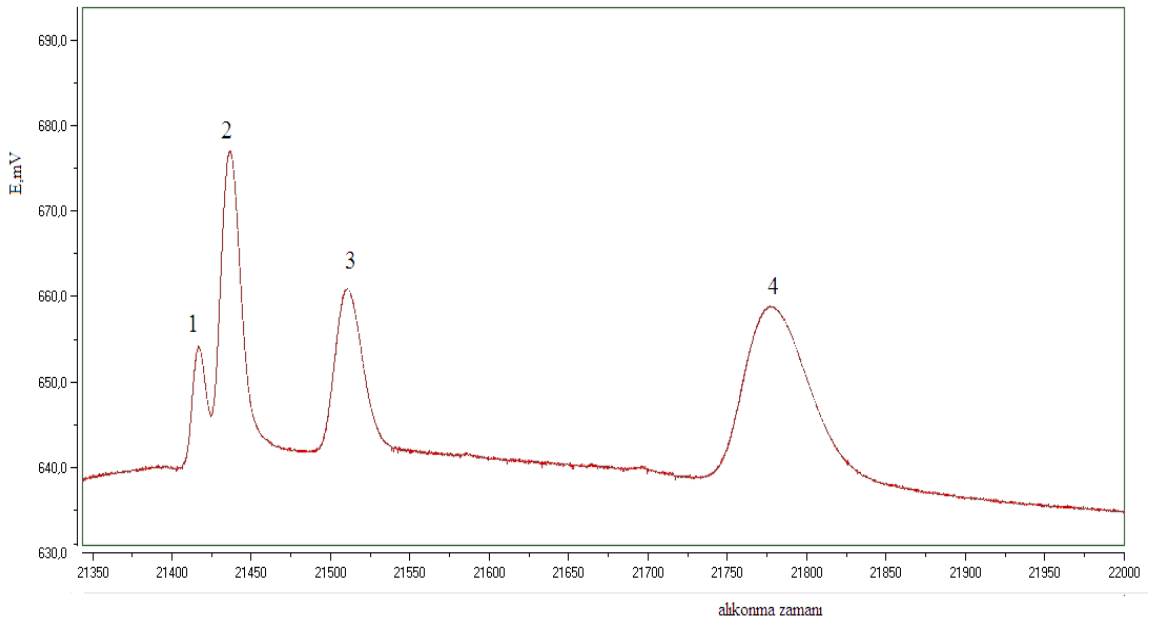
Yukarıdaki kromatogramlar incelendiğinde akış hızı 0.75 mL/dk olduğunda elde edilen piklerin alıkonma zamanları, 1.0 mL/dk akış hızında elde edilen piklerin alıkonma zamanlarından daha uzun olduğu görüldü. Ayrıca 1 ve 2 nolu pikler birbirine yaklaşmış ve heptil amine ait olan 6. pik gözlenememiştir. Bu durum akış hızının yavaşlamasıyla 6 nolu pik olan büyük molekül ağırlıklı heptil aminin kolondan sürüklenmesinin zor olacağı sonucunu doğurdu. Akış hızı 1.5 mL/dk iken elde edilen pikler incelendiğinde alıkonma zamanının diğer akış hızlarında elde edilen piklerin alıkonma zamanından daha kısa olduğu gözlemlendi. Ama şekil 4.35.'den de görüldüğü gibi 1 nolu etil amin piki 2 nolu propil amin pikine girişim yapmaktadır. Ayrıca pik boylarında da azalma görüldü. Bunun sebebi ise kolondan ayrılarak bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı elektroda gelen madde yeterli dengeyi meydana getiremeden hareketli faz ile sürüklenmesidir. Bunu elektrotların durgun ortamda yapılan cevap zamanları testleri desteklemektedir. Yine akış hızı 1.5 mL/dk iken 6 nolu heptil amin piki gözlenemedi. Büyük molekül olan heptil amin kolonda geniş bir dağılım göstermekte ve elektrot bu maddeye yeterince cevap sergileyemedi. Elde edilen sonuçlardan aminlerin ayırımı için en uygun akış hızının 1.0 mL/dk olduğu belirlendi ve çalışmalar boyunca bu akış hızı kullanıldı.

4. 3. 3. Hareketli Faz Türünün Etkisi

Amin bileşikleri için en uygun akış hızı 1.0 mL/dk olarak belirlendikten sonra en iyi ayırımı sağlamak için farklı hareketli faz kompozisyonları denendi. Bu nedenle farklı hareketli faz kompozisyonlarından elde edilen kromatogramlar incelendi. 27 mM metansülfonik asit sabit tutularak karışımdaki asetonitril yüzdeleri değiştirildi ve bu değişimin etkisi incelendi.



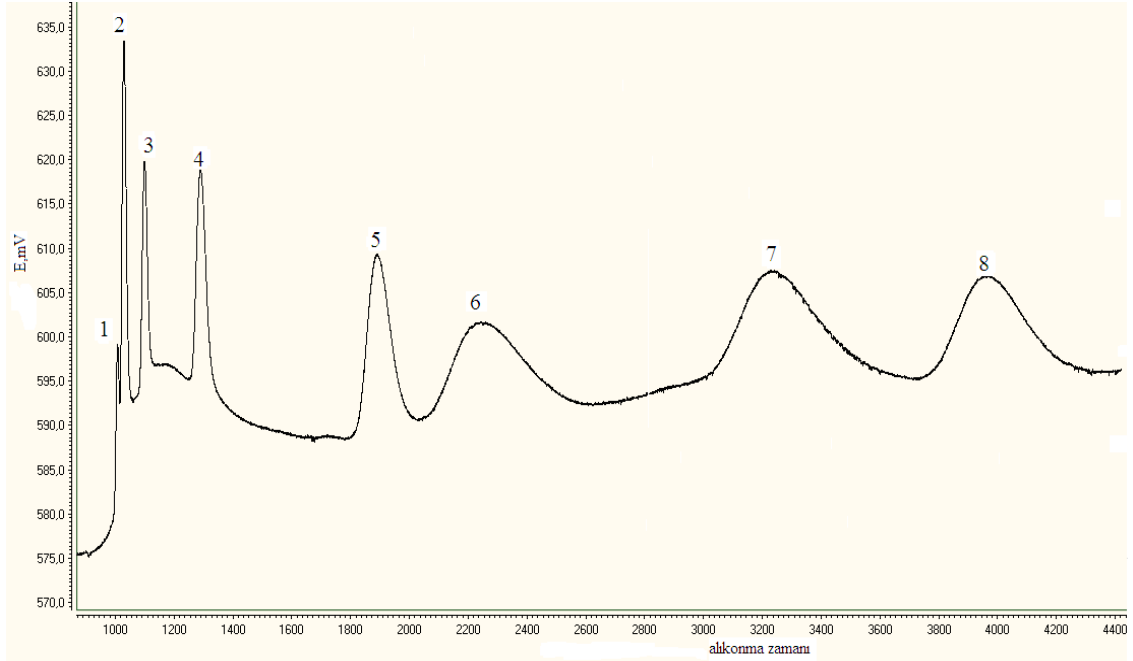
Şekil 4.36. Her biri 1×10^{-3} M derişimde standart amin çözeltilisi içeren karışımından 20 μ L enjeksiyon ile elde edilen kromatogram (Hareketli faz: %5 asetonitril içeren 27 mM metan sülfonik asit çözeltilisi; Akış hızı: 1.0 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) (1) etil amin; (2) propil amin; (3) bütül amin; (4) pentil amin; (5) hegzil amin



Şekil 4.37. Her biri 1×10^{-3} M derişimde standart amin çözeltilisi içeren karışımından 20 μ L enjeksiyon ile elde edilen kromatogram (Hareketli faz: % 2 asetonitril içeren 27 mM metansülfonik asit çözeltilisi; Akış hızı: 1.0 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) (1) etil amin; (2) propil amin; (3) bütül amin; (4) pentil amin.

Kromatogramlar incelendiğinde gerek pik şekilleri gerekse pik boyları dikkate alındığında hareketli fazdaki asetonitril konsantrasyonunu belirlemek için yapılan çalışma sonucunda en iyi hareketli fazın 27 mM metansülfonik asit içeren % 5 asetonitril olduğu belirlendi. 27 mM metansülfonik asit içeren % 2 asetonitril çözeltisi hareketli faz olarak kullanıldığında ilk dört bileşenin alıkonma zamanlarında azalma oldu ancak hegzil amin piki gözlenemedi. Bu sonuç asetonitril derişiminin azalmasıyla kolondaki maddelerin yeterince toparlanamayacağını gösterdi.

Akış hızını 1.0 mL/dk ve asetonitril miktarını % 5 olarak belirledikten sonra hareketli fazdaki metansülfonik asit derişimi değıştirildi. Bunun için etil amin, propil amin, bütül amin, pentil amin, hegzil amin, heptil amin, oktil amin ve kadavarinden oluşan karışımın 1×10^{-3} M derişimdeki çözeltisi 20 mM metansülfonik asit içeren % 5 asetonitrilin hareketli faz olarak kullanıldığı bir karışım hazırlandı ve bu karışımından sisteme 20 μ L enjeksiyon yapıldı. Elde edilen kromatogram şekil 4.38’de verildi.



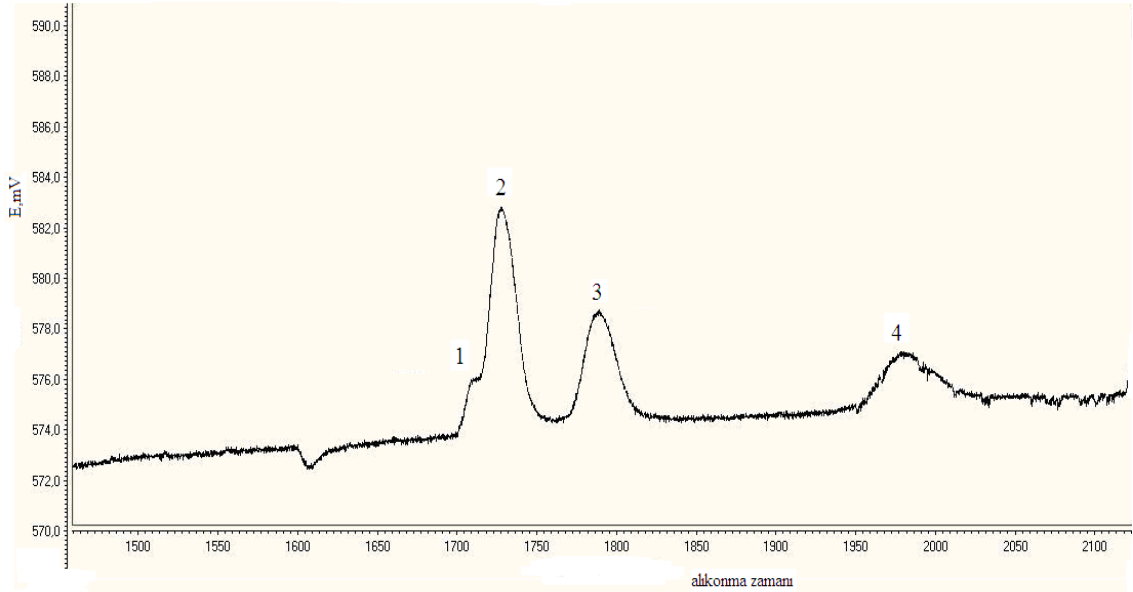
Şekil 4.38. Her biri 1×10^{-3} M derişimde standart amin çözeltisi içeren karışımından 20 μ L enjeksiyon ile elde edilen kromatogram (Hareketli faz: % 5 asetonitril içeren 20 mM metansülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1.0 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) (1) etil amin; (2) propil amin; (3) bütül amin; (4) pentil amin; (5) hegzil amin; (6) heptil amin; (7) oktil amin; (8) kadavarin.

Elde edilen kromatogram incelendiğinde sekiz amin piki gözlemlendi. Ancak toplam analiz yaklaşık 1 saatte tamamlandı. 1 nolu etil amin pikinin boyunun kısılması ve

neredeşye propil amin pikine girişim yapması araştırıldı. Bu nedenle 1 nolu pikin diğer maddelerden tam olarak ayrılması için hareketli faz kompozisyonu değiştirilerek elde edilen pikler incelendi. Bunun için her biri 1×10^{-3} M derişimde olacak şekilde etil amin, propil amin, bütıl amin ve pentil aminden oluşan dörtlü karışım hazırlandı. Farklı hareketli faz derişimleri denenerek piklerin ayırımına çalışıldı.

4.3.4. Etil Aminin Propil Aminden Ayrılması Çalışmaları

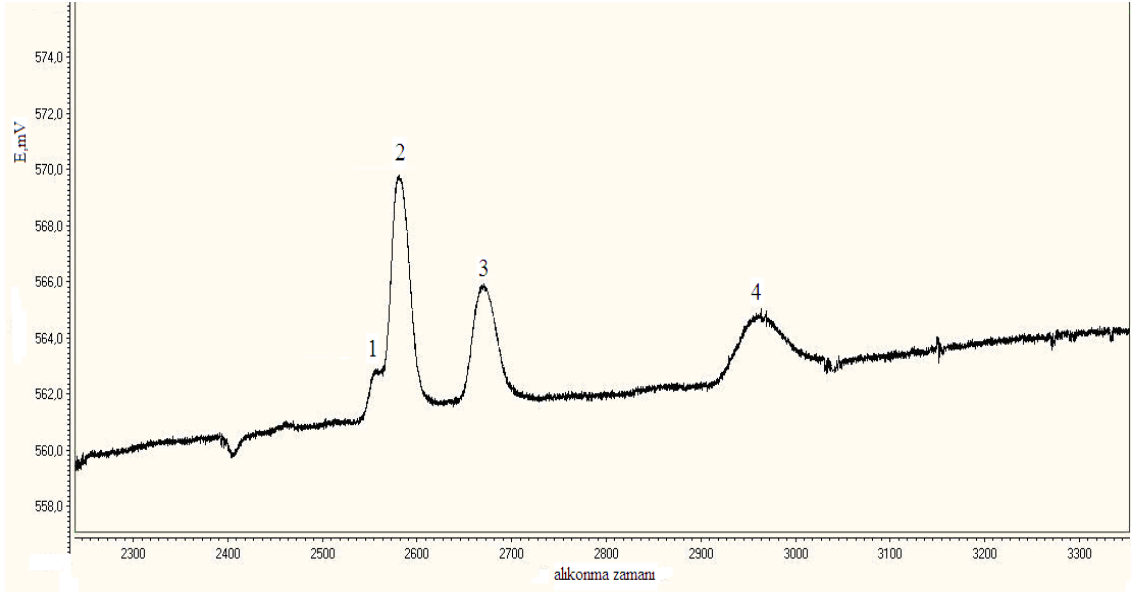
Etil aminin propil aminden yeterince ayrılması ve pik boyunun artırılması için hareketli faz kompozisyonu üzerinde denemeler yapıldı. Bunun için üç farklı bileşimde metan sülfonik asit-asetonitril çözeltisi hazırlandı. Her biri 1×10^{-3} M derişimde olacak şekilde etil amin, propil amin, bütıl amin ve pentil aminden oluşan karışım hazırlandı. Bu karışımından farklı kompozisyonlarda hareketli fazlarda enjeksiyonlar yapılarak kromatogramlar elde edildi. Elde edilen kromatogramlar şekil 4.39-41’de verildi.



Şekil 4.39. Her biri 1×10^{-3} M derişimde standart amin çözeltisi içeren karışımından 20 μ L enjeksiyon ile elde edilen kromatogram (Hareketli faz: % 5 asetonitril içeren 20 mM metansülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1.0 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) (1) etil amin; (2) propil amin; (3) bütıl amin; (4) pentil amin.

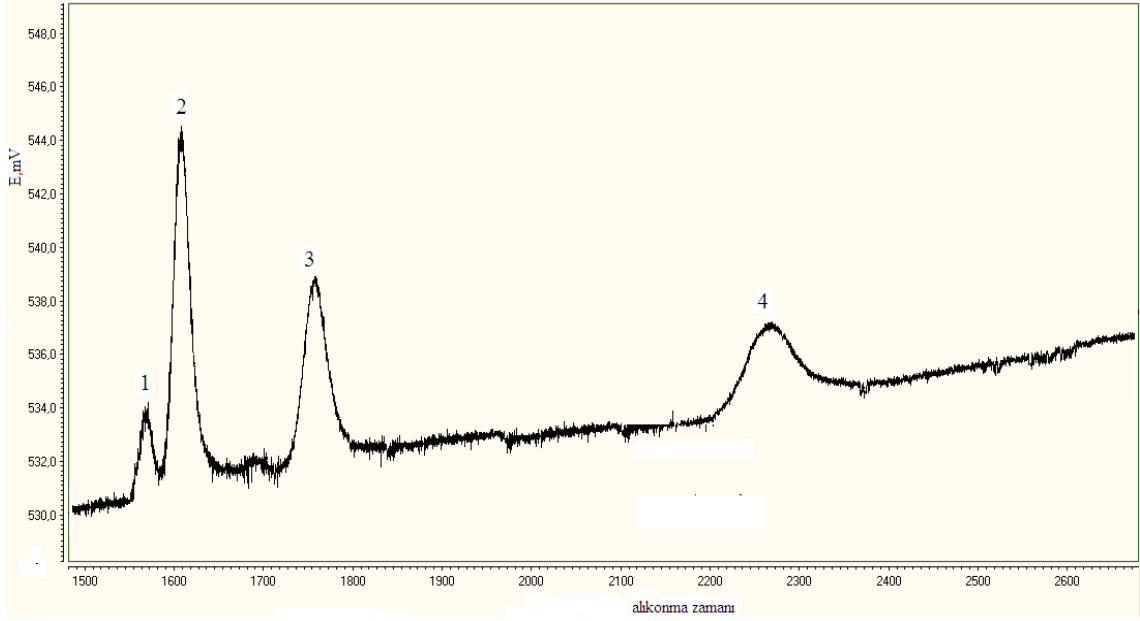
Yukarıdaki kromatogram incelendiğinde, % 5 asetonitril içeren 20 mM metansülfonik asit çözeltisi hareketli faz olarak kullanıldığı durumda 1 nolu etil amin

pikinin 2 nolu propil amin pikinin başlangıcında bir omuz şeklinde ortaya çıktığı görüldü. Çünkü küçük moleküllü etil amin yüksek asitli bir hareketli fazda tam katyonik forma dönüşmeden bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı elektrottan geçtiği ve bunun elektrot tarafından tam olarak hissedilmediği sonucunu doğurduğu şeklinde açıklandı. Bu nedenle hareketli fazdaki metan sülfonik asit derişiminin azaltılması gerekir. Bu amaçla % 5 asetonitril içeren 15 mM metansülfonik asit çözeltisi hareketli faz olarak kullanıldı ve aşağıdaki kromatogram elde edildi.



Şekil 4.40. Her biri 1×10^{-3} M derişimde standart amin çözeltisi içeren karışımdan 20 μ L enjeksiyon ile elde edilen kromatogram (Hareketli faz: % 5 asetonitril içeren 15 mM metansülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1.0 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) (1) etil amin; (2) propil amin; (3) bütil amin; (4) pentil amin.

Yukarıdaki kromatogram incelendiğinde, 1 nolu etil amin pikinde % 5 asetonitril içeren 15 mM metansülfonik asit hareketli fazında bir değişiklik meydana gelmediği görüldü. Ayrıca % 5 asetonitril içeren 15 mM metansülfonik asit hareketli fazında pik boylarında azalmalar görüldü. Bu nedenle hareketli faz içerisindeki metan sülfonik asit derişimi azaltıldı. % 5 asetonitril içeren 10 mM metansülfonik asit hareketli fazında elde edilen kromatogram aşağıda gösterildi.

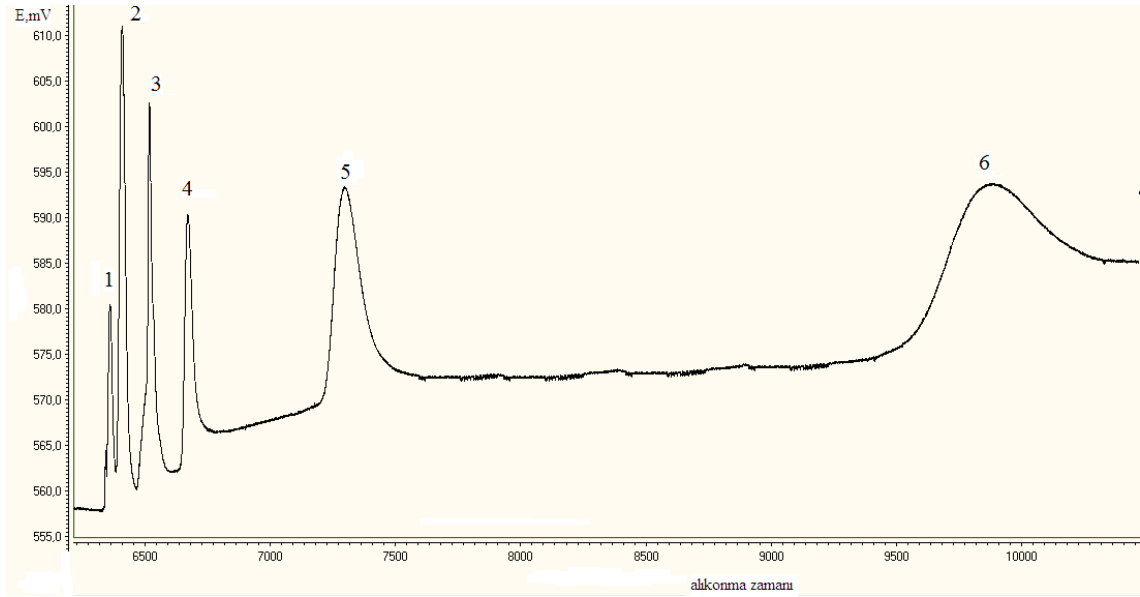


Şekil 4.41. Her biri 1×10^{-3} M derişimde standart amin çözeltileri içeren karışımdan $20 \mu\text{L}$ enjeksiyon ile elde edilen kromatogram (Hareketli faz: % 5 asetonitril içeren 10 mM metan sülfonik asit çözeltilisi; Akış hızı: 1.0 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) (1) etil amin; (2) propil amin; (3) bütül amin; (4) pentil amin.

Yukarıdaki kromatogram incelendiğinde 1 nolu etil amin pikinin 2 nolu propil aminden tamamen ayrıldığı görüldü. Ayrıca pikler ayrılırken pik boylarının arttığı belirlendi. Alternatif olarak % 5 asetonitril içeren 5 mM metansülfonik asit çözeltilisi hareketli fazı hazırlandı ve karışım çözeltilisinden $20 \mu\text{L}$ enjeksiyon yapıldı. Elde edilen kromatogram incelendiğinde pik boylarının azaldığı görüldü. 1 nolu etil amin pikinin propil aminden ayrımının yapıldığı en uygun faz olarak % 5 asetonitril içeren 10 mM metansülfonik asit çözeltilisi hareketli faz olarak belirlendi. Bu hareketli fazda etil amin ve propil amin piklerinin ayrımı sağlandı. Ancak aynı hareketli faz kullanımı karışımdaki bütün aminlerin ayrımı için alıkonma zamanları ve pik boyları dikkate alındığında uygun değildi. Bu nedenle basamaklı elüsyon olarak bilinen gradient elüsyon yaparak en ideal ayrımın yapıldığı kromatogram elde edilmeye çalışıldı.

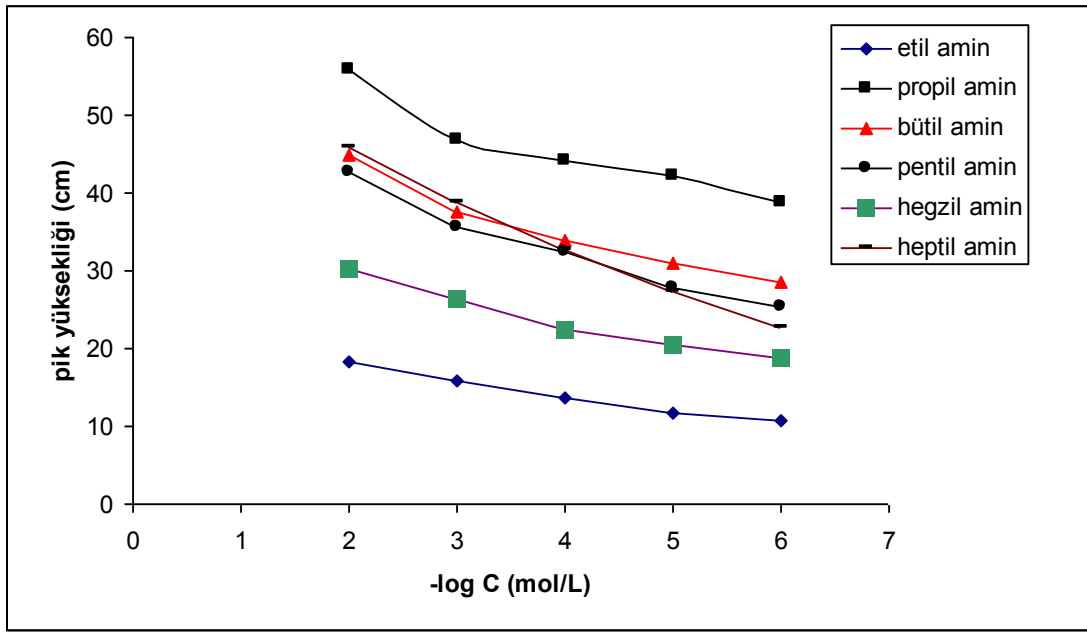
4.4. Gradient Elüsyon Uygulaması

En kısa sürede en iyi ayırımı sağlamak için çeşitli hareketli faz kompozisyonları test edildiğinde özellikle büyük moleküller olan heptil amin, oktil amin ve kadavarin kolonda geniş bir dağılım gösterdikleri için bu maddelerin alıkonma zamanları oldukça yüksektir. Bu durumun ortadan kaldırılması için ilk dört madde olan etil amin, propil amin, bütil amin ve pentil amin için daha önce belirlenen % 5 asetonitril içeren 10 mM metansülfonik asit çözeltisi sabit tutularak diğer aminlerin en kısa sürede ayırmak için çeşitli hareketli faz kompozisyonları test edildi. Söz konusu ilk dört pikin yaklaşık 15 dakika içerisinde ayırımları yapıldı. Bu nedenle ilk 15 dakika A pompasından % 5 asetonitril içeren 10 mM metansülfonik asit çözeltisi gönderildi. Bu dakikadan sonra geride kalan diğer amin bileşiklerini ayırmak için B pompasından farklı hareketli faz kompozisyonları göndererek elde edilen pikler değerlendirildi. Elde edilen pikler değerlendirildiğinde ilk dört maddeden sonraki maddelerin ayırımı ve minimum alıkonma zamanlarının sağlanması için en uygun hareketli fazın % 5 asetonitril içeren 50 mM metansülfonik asit çözeltisi olduğu tespit edildi. Ancak, yapılan bütün testlere rağmen yedinci ve sekizinci pik olan oktil amin ve kadavarin için çok net ayırımlar sağlanamadı. Bunun nedeni daha önce de ifade edildiği gibi son derece büyük molekül olan bu bileşiklerin kolondan sürüklenmesinin oldukça zor olması ve kolonda geniş bir dağılım göstermeleri ve bu şartlarda amin duyarlı elektrotların bu maddelere olan duyarlılığının az olmasıydı. Bütün bu gerekçeler bu iki madde için gerek durgun ortamda derişim değişimine karşı yeterince potansiyel değişim göstermemesi ve gerekse akış-enjeksiyon analizinden elde edilen piklerin boylarının kısa olması ile desteklenmektedir. Ayrıca, elde edilen kromatogramlar değerlendirildiğinde özellikle B pompası devreye girdiğinde düzgün bir baze-line elde edilememesinin nedeninin bu maddelerden kaynaklandığı söylenebilir. Şekil 4.42, her biri 1×10^{-3} M derişimde olan standart sekiz amin çözeltisinin gradient elüsyonu sonucu elde edilen kromatogramını göstermektedir.



Şekil 4.42. Her biri 1×10^{-3} M derişimde sekiz standart amin çözeltisi içeren karışımından 20 μ L enjeksiyon ile elde edilen kromatogram (Hareketli faz: A pompası: % 5 asetonitril içeren 10 mM metan sülfonik asit çözeltisi; B pompası; % 5 asetonitril içeren 50 mM metan sülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1.0 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) (1) etil amin; (2) propil amin; (3) bütül amin; (4) pentil amin; (5) hegzil amin; (6) heptil amin.

Yukarıdaki kromatogram incelendiğinde pik boyları ve alıkonma zamanları dikkate alındığında amin bileşikleri için yapılan çalışmalardan elde edilen en iyi kromatogram (Hareketli faz: A pompası: % 5 asetonitril içeren 10 mM metan sülfonik asit çözeltisi; B pompası; % 5 asetonitril içeren 50 mM metan sülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1.0 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) olduğu görüldü. Her bir amin bileşiginden sisteme farklı konsantrasyonlarda enjeksiyonlar yapılarak pikler elde edildi. Elde edilen piklerden her bir amin için kalibrasyon grafiğı çizildi. Çizilen kalibrasyon grafikleri şekil 4.43'te ve kalibrasyondan elde edilen analitik parametreler Çizelge 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.43. Aminler için çizilen kalibrasyon eğrisi

Çizelge 4.4. Her biri 1×10^{-3} M derişimde sekiz standart amin çözeltisi içeren karışımdan $20 \mu\text{L}$ enjeksiyon ile elde edilen kromatogramdan belirlenen alıkonma zamanları (Hareketli faz: A pompası: % 5 asetonitril içeren 10 mM metansülfonik asit çözeltisi; B pompası; % 5 asetonitril içeren 50 mM metansülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1.0 mL/dk)

Amin bileşiği	Alıkonma Zamanı (dak)	Doğrusal Aralık (mg/L)	R^2	Regresyon Eşitliği ^a	Tayin Limiti (mg/L) ^b
Etil amin	6.6	2.61-450.80	0.9952	$y = -2.09 [X] + 22.32$	3.92
Propil amin	7.5	3.25-59.11	0.9002	$y = -3.86 [X] + 61.08$	4.67
Bütil amin	10.2	2.05-73.14	0.9446	$y = -3.95 [X] + 50.94$	6.51
Pentil amin	12.5	4.79-305.09	0.9705	$y = -4.28 [X] + 49.96$	6.19
Hegzil amin	16.6	5.09-1019.00	0.9633	$y = -2.84 [X] + 35.04$	6.83
Heptil amin	28.3	4.03-115.22	0.9945	$y = -5.81 [X] + 56.76$	4.38

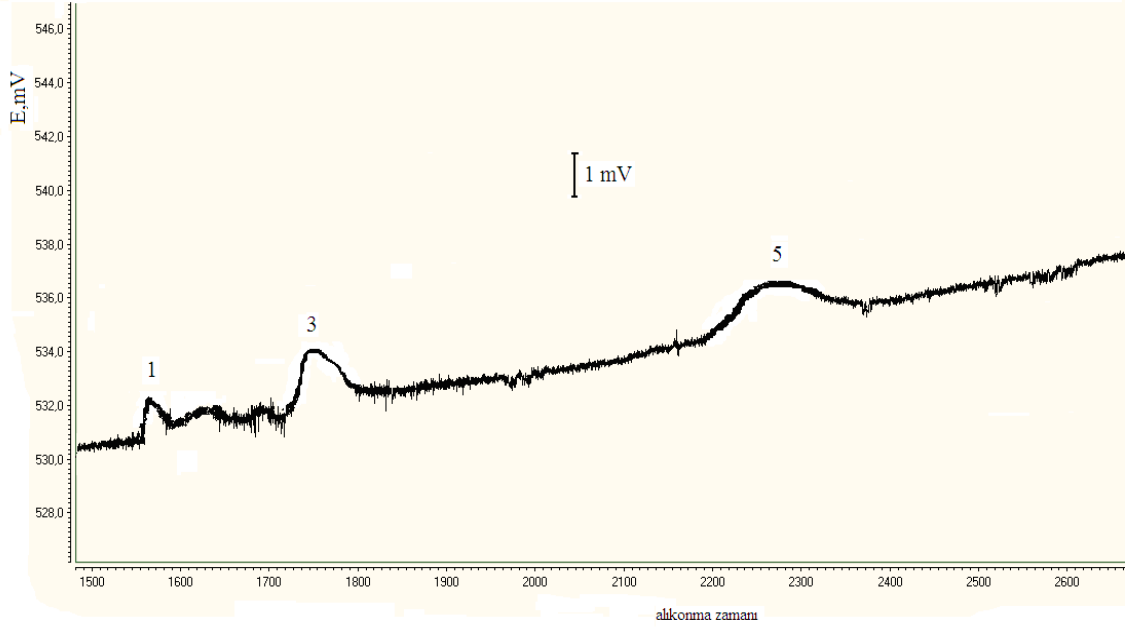
^a y: pik yüksekliği (cm); X: amin derişimi (mg/L)

^b Sinyal-gürültü oranının üç katı dikkate alındı.

İzokrotik elüsyon kullanılarak sekiz amin için analiz süresi bir saat olarak belirlendi. Ayrıca izokrotik elüsyon sonunda elde edilen kromatogramda oktil amin ve kadavarinin oldukça yayvan pikler oluşturduğu ve pik boylarının da küçük olduğu görüldü. Gradient elüsyon sonunda elde edilen kromatogram incelendiğinde altı amin bileşiğinin ayırımı yarım saat içerisinde gerçekleştirildi.

4.5. Gerçek Numune Analizi

Metodun gerçek numunelere uygulanması için peynir altı kazan suyu analiz edildi. Bu amaçla Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesinde üretimi yapılan peynirlerden 100 mL kazan suyu alındı. Kazan suyu önce SIBITA (micro filter) süzme sisteminde 0.45 µm gözenek ve 47 mm çapında bir membran kullanılarak süzüldü ve standartlara uygulanan işlemlerin aynısı numuneye de uygulandı. Böylece, numunede düşük seviyede bulunan aminlerin tayini gerçekleştirildi. Aminlerin standart çözeltileriyle yapılan kromatografik çalışmalar sonucu metodun optimizasyonu (hareketli faz kompozisyonu, akış hızı vs.) sağlandıktan sonra, aynı şartlarda standartlara uygulanan işlemler gerçek numuneye de uygulanarak sonuçlar elde edildi. Sisteme numuneden 20 µL enjeksiyon sonucu elde edilen kromatogram şekil 4.44'te görüldüğü gibidir.



Şekil 4.44. 100 mL Peynir altı kazan suyundan elde edilen kromatogram (Hareketli faz: A pompası; % 5 asetonitril içeren 10 mM metansülfonik asit çözeltisi; B pompası; % 5 asetonitril içeren 50 mM metansülfonik asit çözeltisi; Akış hızı: 1.0 mL/dk; Ionpac CS12A kolonu) (1) etilamin; (3) bütilamin; (5) hegzilamin, Enjeksiyon hacmi: 20 μ L enjeksiyon)

Bu kromatogram, metodun duyarlılığını ve amin bileşiklerin doğrudan tayin yapılabileceğini göstermektedir. Elde edilen kromatogramda etil amin, bütil amin ve hegzil amin pikleri görülmektedir. Standart amin çözeltilerinden farklı derişimlerde çözeltiler hazırlanmış ve elde edilen pik boylarından kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Kromatogramdaki pik boylarından elde edilen bu aminlerin miktarları Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Peynir altı kazan suyundan elde edilen kromatogramdan hesaplanan aminlerin miktarları. Verilen miktarlar ortalama değerlerdir. [$\bar{x} = \mu\text{g/mL}$, standart sapma $(ts/\sqrt{N} \times 100)$, $n=5$ için % 95 güvenilirlik derecesinde elde edilen veriler]

Amin	Ortalama değer (\bar{x})	% Standart sapma (ts)
(1) etil amin	6.45	2.94
(3) bütül amin	4.51	1.63
(5) hegzil amin	8.37	2.31

4.6. Geri Kazanım Çalışmaları

Gerçek numunelerdeki aminlerin tayini için 100 mL peynir altı kazan suyuna bilinen miktarlarda aminlerden ilave edildi. Standart amin çözeltilerine uygulanan işlemlerin aynısı bu numunelere de uygulanarak analiz gerçekleştirildi. Kromatogramı elde edilen aminler için peynir altı kazan suyundan geri alınabilirlik Çizelge 4.6'da gösterildiği gibi % 2.2-4.0 bağıl standart sapma ile % 88-101 olarak belirlendi.

Çizelge 4.6. 100 mL peynir altı kazan suyu numunesinden aminlerin geri alınabilirlikleri

Amin	İlave edilen	Geri alınan*	geri alınabilirlikleri	BSS** (%)
Etil amin	60	58	97	2.2
Propil amin	74	75	101	2.3
Bütil amin	88	81	92	2.2
Pentil amin	102	90	88	2.7
Hegzil amin	116	108	93	3.5
Heptil amin	130	115	88	4.0

*Beş deneyin ortalaması. Normal peynir altı kazan suyu örneği (N) ve ilave edilen peynir altı kazan suyu örneği (S) arasında farklı miktarlardaki % geri alınabilirlik= $[(s-N)/A] \times 100$. Burada A ilave edilen miktardır.

**Bağıl standart sapma

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Farklı moleküler ve kimyasal özelliklere sahip iyonoforlar kullanılarak bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrotlar geliştirildi. Hazırlanan bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrotların durgun ortamda potansiyometrik performans özelliklerini belirlemek için değişen derişimlerdeki amin çözeltilerine karşılık potansiyeller ölçüldü. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, hazırlanan elektrotların spermine karşı performansının beklenen seviyede olmadığı görülmektedir. Bu duruma tampon ortamında spermının sahip olduğu katyonik yükün dört azot tarafından paylaşılması ve iyonoforun kavitesi ile tam olarak etkileşmemesi neden olabilir. Elde edilen veriler incelendiğinde % 31 PVC (polimer), % 64 DOS (plastikleştirici), % 1 potasyumtetrakis (p-klorofenil) borat (iyonofor 1) ve % 4 calix-6-arene- hegzetilasetat (iyonofor 3) kullanılarak hazırlanan elektrodun en iyi performans gösteren elektrot olduğuna karar verilmiştir.

Hazırlanan bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun cevap zamanının kısa, kullanım ömrünün uzun ve tayin limitinin düşük olması gibi potansiyometrik performans özellikleri dikkate alındığında, bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrot, AEA sisteminde detektör olarak başarıyla kullanılmıştır. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun hareketli ortamda bütün aminlere 1×10^{-5} M civarında cevap sergilediği gözlemlenmiştir. Ayrıca, elektrodun hareketli ortamda kadavarine karşı performansının beklenen seviyede olmadığı görülmektedir. Bunun nedeni olarak kadavarinde bulunan çift azotun katyonik yükün iki azot atomu tarafından paylaşılması, iyonoforun kavitesi ile tam olarak etkileşmemesi ve hareketli ortamda yükün paylaşılmış olduğu bu katyonik aminin iyonofor ile etkileşecek yeterli zamanı bulamamış olması düşünülmektedir. Dolayısıyla analizi yapılan amin bileşikleri içinde kadavarin söz konusu durum nedeniyle tayininde zorluklar yaşanmaktadır.

Sonraki çalışmalarda tekli akış hücresi kullanılarak hazırlanan bütünüyle katı-hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrot, detektör olarak kullanılarak kromatografik analiz yapılmıştır. Geliştirilen yöntem peynir altı kazan suyuna başarıyla uygulanmış ve etil amin, bütül amin ve hegzil amin tayin edilmiştir.

Laboratuvarımızda hazırlanan bütünüyle katı hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun cevap zamanı kısa, kullanım ömrü uzun olup elektrodun maliyeti oldukça ucuz, kolay hazırlanabilir, mekaniksel olarak sağlam ve minyatürize olabildiğinden akış hücresine yerleştirilerek akış enjeksiyon analizlerinde kullanılabilir. Hazırlanan bütünüyle katı hal kontakt amin duyarlı PVC membran elektrodun dedektör olarak kullanıldığı HPLC sisteminde aminlerin tayinlerinin farklı örneklerle uygulanması alanının genişletilmesi mümkündür.

6. KAYNAKLAR

- Aksar, A., 1986, Treptow H; Biogene amine in Lebensmitteln, Vorkommen, Bedeutung und Bestimmung, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart,
- Asan. A., 1999; Alifatik aminlerin ve suda çözünen yaygın fenollerin HPLC ile ayırımı ve UV-Görünür Spektrofotometrik Tayinleri, Doktora Tezi, 19 Mayıs Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun
- B. Kertsen, 1992, Ion chromatography of polyhydroxy aliphatic amines of pharmaceutical interest, 34,607.
- Bakırcı, İ., 2000. Peynirlerde biyojen amin oluşumu ve etkili faktörler. Süt Mikrobiyolojisi ve katkı maddeleri, 7. Süt ve süt ürünleri sempozyumu tebliğler kitabı, 328-336, Tekirdağ.
- Beutling D., 1996, Biogenic amine in der Ernährung. Arch. Lebensmittelhyg;47:97-101
- Bover-Cid S, Hugas M, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou MC, 2000: Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid decarboxylase starter culture for fermentation of fuesy sausages. J. Food Protect., 63 (2): 237-243
- Brink B, Dammk C, Joosten HMLJ, Huis Int. Veid JHJ, 1990: Occurrence and formation of biologically active amines in foods. Int. J. Food Microbiol., 11: 73-84
- C. P. Oliveira, M.B.A. Gloria, J.F. Barbour, R.A. Scanlan, 1995, Nitrate, Nitrite, and Volatile Nitrosamines in Whey-Containing Food Products, 43, 967-969.
- Calatayud, J. M., 2003, Flow injection analysis of pharmaceuticals automation in the laboratory. Taylor and Francis, 394 s, Bristol.
- Captian-Vallvey, L.F., Fernandez-Ramos, M.D., 2003. Characterization of a transparent optical test strip for quantification of water hardness, Analytica Chimica Acta, 481, 139-148.
- Casella I. G., Rosa S., Desimoni E., 1998, Electrooxidation of aliphatic amines and their amperometric detection in flow injection and liquid chromatography at a nickel-based glassy carbon electrode, Electroanalysis 10, 1005-1009.
- Chen Z. L., Alexander P. W., 1997, Potentiometric detection of aliphatic amines by flow injection analysis and ion-interaction chromatography with a metallic copper electrode, J. chromatogr. A 758, 227-233.

- Covington A.K., 1974. CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry, Ion-Selective Electrodes, Anal. Chem., 355-406.
- Deelder R.S., Linssen H.A., Koen J.G. and Beeren A.B., 1981. A Potentiometric Membrane Cell as Detector in Liquid Chromatography, J. Chromatogr., 203, 153.
- Dobberpuhl D. A., Hoekstra J. C., Johnson D. C., 1996, Pulsed electrochemical detection at gold electrodes applied to monoamines and diamines following their chromatographic separation, Anal. Chim Acta, 322, 55-62.
- Erdem A., Özkan D., Kerman K., Meriç B., Dalbastı T., Özsöz M., 2000. Ion-Selective Membrane Electrode for the Determination of a Novel Phenylpiperazine Antidepressant, Nefazodone, Turk J Chem., 24, 353-360.
- Gingerich T.M., Lorca T, Flick G.J., Pierson M.D., Mc Nair H.M., 1999, Biogenic amine survey and organoleptic changes in fresh, store and temperature-abused bluefish. J. Food Protect 62 (9): 1033-1037
- Gündüz T., 2002, İnrümentel Analiz, Gazi Kitabevi, Ankara.
- Haddad P.R., Jackson P.E., 1990, Ion chromatography: Principles and Applications, Elsevier Science Publishers B.V., 775.
- Halasz A., Barath A., Simon-sarkadi L., Holzapfel W., 1994, Biogenic amines and their production by microorganism in food, Trends Food Sci. technol., 5, 42-48.
- Hernandez-Jover T, Izquierdo-Pulido M, Veciana-Noques T, Marine-Font A, Carmen Vidal-Carow M, 1997, Effect of starter cultures on biogenic amine formation during fermented sausage producyion. J. Food Protect, 60 (7): 825-830.
- Hidayet A., Hibbert D.B., Alexander P.W., 1997, Amperometric detection of amines using cobalt electrodes after seperation by ion-moderated partition chromatography, Talanta, 44 239-248.
- Hoekstra J. C., Johnson D. C., 1998, Comparison of potential-time waveforms for the detection of biogenic amines in complex mixtures following their separation by liquid chromatography, Anal Chem., 70, 83-88.
- I. N. Krasnova, I.V. Kolmakova, L. A. Kartsova, 1997, Determination of neurotransmitter amino acids and biogenic amines in cerebrospinal fluid by reversed-phase high-performance liquid chromatography, 52, 693-697.
- Isildak I. And Asan A., 1999, Simultaneous Detection of Monovalent Anions and Cations using all Solid-State Contact PVC Membrane Anion and Cation

- Selective Electrodes as Detectors in Single Column Ion Chromatography, *Talanta*, 48, 967-978.
- Isildak I. And Covington A.K., 1993, Ion-Selective Electrode Potentiometric Detection in Ion-Chromatography, *Electroanalysis*, 5, 815-824.
- Isildak I., Yigit C. And Bati H., 1996, Construction and Response Characteristics of a Sulfite/Hydrogensulfite-Selective all-Solid-State Contact Electrode Based on the 4-Methylpiperidinedithiocarbamate Complex of Mercury (II), *Analyst*, 121, 1873-1876.
- IUPAC Analytical Chemistry Division, Commission on Analytical Nomenclature, 1976, Recommendations for nomenclature of Ion-selective Electrodes, *Pure Appl. Chem.*, 48, 127.
- IUPAC, 1994, Analytical Chemistry Division, Commission on Electroanalytical Chemistry, Recommendations for nomenclature of Ion-selective Electrodes, *Pure Appl. Chem.*, 66, 2527-2536.
- Joosten, H. M. L. J. 1998, The biogenic amines contents of Dutch cheese and their toxicological significance. *Neth. Milk Dairy. J.*, 42: 25-42.
- Karlberg B. And Pacey G.E., 1989, *A Practical Guide*, Elsevier, Amsterdam, 457s.
- Luboch E., Cygan A., Lernat J.F., 1990. The Synthesis of some Aromatic Crown Ethers Derivatives and Their Ion-Selective Electrode Properties, *Tetrahedron*, 46(7), 2461-2472.
- Knut A. E., Ragnhild R., Unni R., Hece F. R., 2002, Dietary polyamines, *Food Chemistry*, 78 (3), 273-280.
- Kolycheva N. and Muller H., 1991, Flow-Through Calcium-Selective Electrode Application in Flow-Injection Analysis and Ion Chromatography, *Anal. Chim. Acta.*, 242, 65-72.
- Lehanel., 2000, Update on histamine fish poisoning, *Med. J. Aust.*, 173 (3), 149-152.
- Lewis, A.C., 2005, Chromatographic Techniques, *Encyclopedia of Life Science*, 1-7.
- Loser, C., 2000, Polyamines in human and animal milk. *Br. J. Nutr.*; 84: Suppl. I. 55-58
- Luhua L., Jianke Z., Qiang Y., Jingxia L., 2004) Determination of amines with indirect conductometric detection by ion chromatography, 7-9.
- Maijala R.L., Eerola S.H., Aho M.A., Hirn J.A., 1993, The effect of GLD-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *J. Food Protect*, 56 (2): 125-129

- Manual: AEA star 5102-001 Injector, Tecator, Sweden.
- Moreno L., Merlos A., Abramova N., 2006, Multi-sensor array used as an “electronic tongue” for mineral water analyses, *Sensors and Actuators B*, 116, 130-134.
- Nakamura M, Wada Y, Sawaya H, Kawabata T, 1997, Polyamine content in fresh and processed pork. *J. Food Sci.* 44 (2): 515-517
- Nomura T., Hikichi Y., Nakagawa G., 1988, Determination of Iodide-Ion using Alkali-Free Lead Phosphate-Glasses as Potentiometric Detector Sensors in Non Suppressed Ion Chromatography, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 61, 2993-2995.
- Omura Y, Price R.J, Olvott HS, 1978, Histamine-forming bacteria isolated from spoiled skipjack Tuna and Jack Mackerel. *J. Food. Sci.* 43: 1779-1781.
- Ordonez AI, Ibanez FC, Torre P, Barcina Y, 1997, Formation of biogenic amines in Idiazabal ewes milk cheese; *protect.*, 60 (11): 1371-1375.
- Özçimder M., Demirci A., 2009, *Kromatografik Yöntemler, Kromatografi serisi-3*.
- Poels I., Nagels L. J., 2001, Potentiometric detection of amines in ion chromatography using macrocycle-based liquid membrane electrodes, *Anal. Chim. Acta*, 440, 89-98.
- Ramantanis S., 1984, Histamin, tyramin und triptamin in lebensmitteln. *Arch. Lebensmittelhyg*, 35, 75-80.
- Rodriguez-Jerez, J.J.E.I., Lopez-Sabater. A.X., Roig-Sagues, M.T., Mora-Ventura, 1994, Histamine, cadaverine and putrescine forming bacteria from Ripened Spanish Semipreserved Anchovies. *Journal of Food Science*, 59 (5): 998-1001
- S. P. Bag, 1985, Determination of trace organic dicarboxylic acids and amines by ion-chromatography, 32, 779.
- S.S. Hecht.: Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*:1991, 91 (14): 1194-1210
- Sadain K., J. A. Koropchak, 1999, Condensation nucleation light scattering detection for biogenic amines separated by ion-exchange chromatography, *Journal of Chromatography A*, 844, 111-118.
- Salazar M. T., Smith T. K., Haris A., 2000, HPLC performance liquid chromatographic method for determination of biogenic amines in feedstuffs, complete feeds and animal tissues, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1708-1712.
- Santos S., 1996, Biogenic amines; their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol*, 29: 213-231.

- Saurina J., Lopez-Aviles E., Le Moal, Santiago A., 2002, Determination of calcium and total hardness in natural waters using a potentiometric sensor array, *Analytica Chimica Acta*, 464, 89–98.
- Scheuer R., Rödel W., 1995, Bestimmung von biogenen aminen in fermentierten fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft*, 75, 73-75.
- Schnierle P., Kappes T., Hauser T. P. C., 1998, Capillary electrophoretic determination of different classes of organic ions by potentiometric detection with coated-wire ion-selective electrodes, *Anal. Chem.*, 70, 3585-3589.
- Shalaby AR, 1996, Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.*, 29 (7): 675-690.
- Shannon L. H., Jay H., 2006, An improved method for the separation and detection of biogenic amines in adult drosophila brain extracts by high performance liquid chromatography, *J. of Neuroscience*, 153, 243-249.
- Silla S., Mahyre H., 1996, Biogenicamines, their importance in foods, *Int. J. Food Microbiol.*, 29, 213-231.
- Skoog D. A., Nieman T. A., Holler F. J., 1998, Harcourt Brace and Company, *Instrumental Analysis*, 849.
- Skoog D.A., West D.M. and Holler F.J., 1990, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Saunders College Publishing, Rinehart and Winston Inc., 496 s.
- Slemr J., Beyermann K., 1984, Determination of biogenic amines in meat by combined ion-exchange and capillary gas chromatography, *J. Chromatography*, 283, 241-250.
- Smith J.S, Kennedy PB, Kasmer CL, Moore MM, 1993, Biogenic amine formation in fresh vacuum packaged beef during storage at 1 C° for 120 days. *J. Food Protect.*, 56: 497-500.
- Stratton, J.E., R.W., Hutkns, Taylor , S.L., 1991, Biogenic amines in cheese and other fermented food: A Review. *Journal of Food Protection*, 54; 460-470.
- T. Matsumoto, T.Tsuda, 1990, Polyamine determination in clinical laboratories by high-performance liquid chromatography, 9, 292-297.
- Trevino E., D. Beil, H.Steinhardt, 1997, Formation of biogenic amines during the maturity process of raw meat products, for example of cervelat sausage, 60,521-526.

- Ünal H., 1998, Hareketli Oratmlarda Kullanılabilen Düşük Hücre Hacimli Katı-Hal Kompozit Elektrotların Hazırlanması, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Veciana-Nogues MT, Albala-Hurtado S, Marine-Font A. Vidal-Corau MC, 1996, Changes in biogenic amines during manufacture and storage of semi-preserved anchovies. *J.Food Protect.*, 59 (11): 1218-1222.
- Weiss, J., 1989, Handbook on ion chromatography, Dionex Corporation Sunnyvale, California, 3, 30-31 p.
- Windholz M., Budavari S., Lorraine Y., Margaret N., David B. Sabine, Fertig and Merck & Co, 1976, The Merck index, *Microchemical Journal*, 24, 577.
- Yadigaroğlu Ç., 2002, Akış Enjeksiyon Analiz Tekniğinin Temel Prensipleri Uygulamaları, Yüksek Lisans Semineri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Yıldırım Y., 2011, Organik Kimya, Bilim Yayıncılık, Ankara
- Yiğit C., 1996, Tamamıyla Katı-Hal Kontakt Sülfid Seçici Elektrotların Hazırlanması ve Test Edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 39, Samsun.

ÖZGEÇMİŞ

- Adı Soyadı:** Rukiye Aydın
- Doğum Yeri:** Osmancık/Çorum
- Doğum tarihi:** 12.12.1980
- Medeni Hali:** Evli
- Bildiği Yabancı Diller:** İngilizce
- Lise:** Atatürk Anadolu Lisesi, 1998, Samsun
- Lisans:** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü, 2003, Samsun
- Yüksek lisans:** Analitik Kimya, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, 2005,
Samsun
- Tezsiz Yüksek lisans:** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,
2005, Samsun
- Çalıştığı kurum:** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- İletişim bilgileri:**
- Email:** rukiye.aydin@omu.edu.tr
- Cep tel:** 0 542 6223636