

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İYON KROMATOĞRAFI KONDÜKTİVİTE DEDEKTÖRÜ İLE OROTİK
ASİDÜRİLİ HASTA İDRARINDA OROTİK ASİT TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Damla ZEYDANLI

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

OCAK 2013

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İYON KROMATOĞRAFİ KONDÜKTİVİTE DEDEKTÖRÜ İLE OROTİK
ASİDÜRİLİ HASTA İDRARINDA OROTİK ASİT TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Damla ZEYDANLI

509101054

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Gülçin G. YILMAZ

OCAK 2013

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 509101054 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Damla ZEYDANLI**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı **“İYON KROMATOĞRAFI KONDÜKTİVİTE DEDEKTÖRÜ İLE OROTİK ASİDÜRİLİ HASTA İDRARINDA OROTİK ASİT TAYİNİ”** başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Gülçin G. YILMAZ** .
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Birsen D. ÖZTÜRK**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. İkbâl KOYUNCU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : 17 Aralık 2012

Savunma Tarihi : 25 Ocak 2013

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım süresinde bana destek olan, bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren saygıdeğer hocam Doç.Dr. Gülçin Gümüş Yılmaz'a, yüksek lisans çalışmalarım esnasında bana yardımcı olan Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki tüm öğretim görevlisi ve başta Orhan Destanoğlu olmak üzere araştırma görevlisi hocalarıma, her zaman manevi desteğini hissettiğim sevgili ailem ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürler.

Ocak 2013

Damla ZEYDANLI

(Kimyager)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. İYON KROMATOĞRAFI	3
2.1 Kromatografi	3
2.1.1 Giriş.....	3
2.1.2 Kromatografinin genel tanımı	3
2.1.3 Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması	4
2.1.4 Kolonlarda elusyon kromatografi	4
2.1.5 Analitin seyrelmesi.....	5
2.1.6 Kromatogramlar	5
2.2 İyon-Değiştirme Kromatografi.....	6
2.2.1 Genel bilgi	6
2.3 İyon-değiştirme Dengeleri	7
2.4 İyon-değiştirici Dolgular.....	10
2.5 Deneyde Kullanılan IC Sisteminin Ana Bölümleri.....	12
2.5.1 ICS-3000 sistemi.....	12
2.5.2 IonPac AS20 anyon değiştirici kolon.....	18
3. OROTİK ASİT	23
4. METABOLİK HASTALIKLAR	27
4.1 Organik Asidemiler.....	27
4.2 Orotik Asidüri	28
4.2.1 Orotik asidüri tip I.....	28
4.2.2 Orotik asidüri tip II.....	29
5. İDRAR ÖRNEKLERİ	31

5.1 İdrar Toplanması ve Saklanması	31
5.1.1 Sabah ilk idrarı	31
5.1.2 24 Saatlik idrar toplanması.....	31
5.2 İdrarın Fiziksel Özellikleri	32
5.2.1 İdrar rengi	32
5.2.2 İdrarın berrak olması	32
5.2.3 İdrarın kokusu.....	32
5.3 İdrarın Kimyasal Özellikleri.....	32
5.3.1 Dansite-özellik ağırlık	32
5.3.2 pH	33
6. DENEYSEL KISIM	35
6.1 Kimyasallar ve Araçlar.....	35
6.2 Kullanılan Kromatografi Sistemi	35
6.3 Standart Çözeltilerin Hazırlanması	36
6.4 Ön Denemeler	36
6.5 Metot Geliştirme ve Optimizasyon	38
6.5.2 Kreatinin ölçümü.....	42
6.6 Kalibrasyon Grafiği	43
6.7 Geri kazanma ve tekrarlanabilirlik çalışmaları	44
7. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	47
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ	52

KISALTMALAR

ATP	: Adonizin Trifosfat
CR-ATC	: Continously Regenerated-Anion Trap Column
CZE	: Capiller Zone Electrophoresis
EG	: Eluent Generator
FIA	: Flow Injection Analysis
HPLC	: High Pressure Liquid Chromatography
IC	: Ion Chromatography
ISE	: İyon Seçici Elektrot
KKDR	: Kuvvetli Katyon Değişirici Reçine
MMS	: Mikro Membran Supresör
NIS	: Na ⁺ /I ⁻ Symporter
OA	: Orotik Asit
OIG	: Office of Inspector General
OPD	: Oratat Monofosfat Dekarboksilaz
OPRT	: Orotat Fosforibozil Transferaz
RFIC	: Reagent-Free Ion Chromatography
SPEC	: Serum Perchlorate Equivalent Concentration
SRS	: Self-Regenerating Suppressor
UMP	: Üridin-5'-monofosfat
UP	: Ultra Pure

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Kolon kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması.....	8
Çizelge 3.1 : İnsan idrarındaki orotik asit miktarının referans değerleri.....	24
Çizelge 6.1 : Farklı konsantrasyonlardaki OA standart çözeltilerinin %geri kazanım ve % RSD değerleri.	45
Çizelge 6.2 : Tekrarlanabilirlik çalışması için hazırlanan 0.5 mgL ⁻¹ ve 1.0 mgL ⁻¹ OA standart çözeltilerinin gün-içi ve günler- arası %RSD değerleri... ..	45

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : (a) Kolon elüsyon kromatografisi ile A ve B bileşenlerinin ayrılma diyagramı. (b) (a)'da gösterilen elüsyonun çeşitli basamaklarında dedektör sinyali	6
Şekil 2.2 : Şekilde 2.1' deki A ve B bileşen bantlarının kolonda iki değişik göç zamanındaki derişim profilleri. t1 ve t2 zamanları Şekil 2.1'de gösterilmiştir.	7
Şekil 2.3 : Çapraz-bağlı polistiren iyon değıştirici reçinenin yapısı. —SO ₃ ⁻ H ⁺ grubu yerine, —COO ⁻ H ⁺ , —NH ₃ ⁺ OH ⁻ ve —N(CH ₃) ₃ ⁺ OH ⁻ grupları bağlayarak elde edilen benzer reçinelerde kullanılır.	11
Şekil 2.4 : Supresörde meydana gelen iyon değışimi.	14
Şekil 2.5 : Supresörlü sistemde anyonların artan hassasiyeti.	15
Şekil 2.6 : Dedektörün sıcaklık kararlılığı.	15
Şekil 2.7 : İletkenlik dedektörü (siyah) ve Supresör (beyaz).	16
Şekil 2.8 : ICS-3000 sisteminin AS otoörnekleyicisinden aynı anda iki analiz yapılabilir.	17
Şekil 2.9 : ICS-3000 sisteminin modül ve parçaları.	17
Şekil 2.10 : IonPac AS20 kolon dolgusunun yapısı	18
Şekil 2.11: AS20 kolonunda ayrımı yapılmış yirmiüç anyon.	19
Şekil 2.12: Anyonların AS16 ile AS20 kolonlarında ayrılmaları.	20
Şekil 3.1 : Orotik asidin molekül yapısı.	24
Şekil 3.2 : E. coli and Salmonella'da pirimidin biyosentez şeması.	24
Şekil 4.1 : Orotik asidürinin kalıtsal aktarım modeli	28
Şekil 4.2 : Orotik asidüri ve sağlıklı insandaki UMP biyosentezine dahil olan enzimlerin özet gösterimi.	29
Şekil 6.1 : Farklı pH'lardaki 1µg/L orotik asit çözeltisinin C18 kartuştan geçirilmesiyle elde edilen geri kazanımlar.	37
Şekil 6.2 : 1:250 seyreltilmiş patolojik idrar numunesinin a) 80 mM isoc b) 70 mM isoc c) 60 mM isoc alınan kromatogramlar	38
Şekil 6.2 : 1:100 seyreltilmiş patolojik idrar numunesinin a) 80mM NaOH izoc b) 70 mM izoc c) 60 mM izoc d) 50 mM isoc yöntemleriyle alınan kromatogramları (t _R sırasıyla; 6,1, 6,9, 8,1, 10,0 dk).	40

Şekil 6.4 : 1:100 seyreltilmiş patolojik idrar (siyah kromatogram) ve OA standardı eklendikten sonra aynı idrar örneğinin kromatogramları (kırmızı kromatogram).	42
Şekil 6.5 : a) 10 – 1000 µg/L orotik asit standart çözeltilerinin 60mM NaOH eluenti ile alınan kromatogramları; b) 10 – 10000 µg/L kalibrasyon eğrisi ($R^2=0,9994$).	43

İYON KROMATOĞRAFİ KONDÜKTİVİTE DEDEKTÖRÜ İLE OROTİK ASİDÜRİLİ HASTA İDRARINDA OROTİK ASİT TAYİNİ

ÖZET

Son on yılda, biyolojik, klinik ve besin örneklerindeki organik asitlerin ölçülmesi büyüyen bir ilgi alanıdır. İnsan kan serumunda ya da idrarında bulunan bazı organik asitlerin konsantrasyonu ile bağlantılı olarak birçok hastalığın teşhisinin mümkün olduğu bilinmektedir.

Orotik asit, de nova pirimidin sentezinin dördüncü ara ürünüdür. Bu sentez, glutamin, 2 mol ATP ve CO₂ den meydana gelen karbomil fosfat ile başlar. Merkez bileşik üridin 5'-monofosfat (UMP)'dır. Bu bileşik iki enzim ile katalizlenir; orotat fosforibozil transferaz (OPRT) ve orotat monofosfat dekarboksilaz (OPD).

Orotik asit B13 vitamini olarak bilinir. Birçok deneysel çalışma orotik asidin karsinogenesis, böbreklerde yağ depolanması ile ilgili olduğunu gösterdiği için orotik asidin biyolojik etkisi üzerine odaklanılmıştır. Orotik asidin tekrarlanan dozlarının tümör formlarının gelişmesini tetiklediği kabul edilmiştir. Orotik asidin idrar ile atılması söz konusu olduğundan kan plazmasında tayin edilmesinden idrarda tayin edilmesi daha olasıdır.

Orotik asidin aşırılığının orotik asidüri denilen rahatsızlığa sebep olduğu bilinmektedir. Yetişkinlerde üre döngüsünde aksamaya sebep olur. Çocuklarda ise DNA ve RNA sentezinde kısıtlamaya yol açarak fiziksel ve sinirsel hasara sebep olabilir.

Bu önemli hastalıkların teşhisinde güvenilir ve hassas bir metod geliştirilmesi gereklidir. Bu çalışmada, iyon kromatografi/suppressorlü iletkenlik dedektörü cihazı kullanarak insan idrarındaki orotik asidin miktarının tayini için seçici, güvenilir ve hassas bir yöntem geliştirilmesine çalışılmıştır. İdrar numunelerinin analizi için temizleme prosesi geliştirilmiştir. Numunelere santrifuj, kuvvetli katyon değiştirici ile muamele ve katı faz ekstraksiyon işlemleri süre ve miktar optimizasyonu yapılarak uygulanmıştır. Öncelikle idrardaki süspansiyon halindeki katı parçacıkları uzaklaştırmak için santrifüj kullanılmıştır. İdrar örneklerindeki katyonları uzaklaştırmak için kuvvetli katyon değiştirici reçine kullanılmıştır. Katı faz ekstraksiyon prosedürü, idrar örneklerindeki orotik asidin ayrımının daha iyi gözlenebilmesi amacıyla uygulanmıştır. Ayrıca iyon kromatografi/suppressorlü iletkenlik dedektörü cihazı kullanarak idrardaki orotik asit miktarının hızlı, ucuz ve doğa dostu bir metodla belirlenebilmesi için kromatografik şartlar optimize edilmiştir.

Optimum koşullar tespit edildikten sonra idrarın analize hazırlanması ve IC ile hızlı bir şekilde dedekte edilmesi sağlanmıştır.

DETERMINATION OF OROTIC ACID IN OROTIC ACIDURIA PATIENT'S URINE SAMPLES WITH ION CHROMATOGRAPH / CONDUCTIVITY DETECTOR

SUMMARY

In the latest decade, a growing interest has been noted for the determination of organic acids in biological, clinical and food samples. Some of organic acids found in human serum or urine have known in relation to their concentrations in biological fluids, since they are intermediates formed at various stages of amino acid as indicators of a variety of disease.

Orotic acid (1,2,3,6-tetrahydro-2,6-dioxo-4-pyrimidinecarboxylic acid; uracil-6-carboxylic acid) is a minor component of the diet. It is found in whey and root vegetables, such as carrots and beets. In contrast to sheep's and goat's milk, cow's milk contains a relatively large amount of orotic acid, while human milk lacks this compound.

The biological effects of orotic acid have been focus on considerable attention, because recent experimental studies have demonstrated that it has effects of carcinogenesis, hepatic lipid storage and renal toxicity. Several studies have shown that repeated dosing of orotic acid promotes the formation of tumours initiated by various known carcinogenic substances. Because renal excretion of orotic acid is very efficient and urinary values integrate changes over time, orotic acid measurements are more relevant in urine than in plasma.

Orotic acid is an intermediate product in pyrimidine biosynthesis. It is a heterocyclic compound and an acid; it is also known as pyrimidinecarboxylic acid. It was originally introduced as a vitamin, called vitamin B13, but essentiality has not been demonstrated. It is not actually a vitamin, but was originally classified as such after being added to the diets of laboratory animals in the 1960s. The addition of it to their food encouraged heart health and showed other vitamin-like benefits.

Orotic acid is a very important substance but difficult to analyze in biological samples. New insights into the importance of pyrimidine biosynthesis and metabolism in humans followed the recognition of the first genetic defect, hereditary orotic aciduria.

Orotic acid is an intermediary metabolite in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides. The acid is present in healthy adults urine only at trace concentrations in urine. However, at the deficiency of enzyme uridine monophosphate synthase, which participates in the synthesis of uridylic acid from orotic acid, the excretion of orotic acid into urine increases (orotic aciduria). It may be about 1000 times higher in urine of patients having orotic acid as a diagnostic metabolite. To diagnose inborn error of organisms, it is important to use a method enabling for determination of both increased and normal levels of OA.

Organic acidemias, also known as organic acidurias, are a group of disorders characterized by increased excretion of organic acids in urine. A spectrum of disorders characterized by enzymatic defects in biochemical pathways leading to toxic accumulations of molecules normally metabolized and safely excreted from the body. Numerous types of organic acidemias exist, with methylmalonic aciduria, propionic acidemia and isovaleric acidemia among the most prevalent forms. They result primarily from deficiencies of specific enzymes in the breakdown pathways of amino acids or from enzyme deficiencies in beta oxidation of fatty acids or carbohydrate metabolism. Children with an organic acidemia are susceptible to metabolic decompensation during episodes of increased catabolism, such as intercurrent illness, trauma, surgery, or prolonged episodes of fasting.

Defects of pyrimidine metabolism can lead to a variety of symptoms. The determination of the urinary orotic acid is very important to diagnose some inborn errors of metabolic pathways such as pyrimidine synthesis and urea cycle. Pyrimidines and purines are the building blocks of DNA and RNA. The pyrimidines also function as intermediates in synthesis of energy sources and essential elements of cell surface structures. Pyrimidines are heterocyclic, six-membered, nitrogen-containing carbon ring structures, with uracil, cytosine and thymine being the basal structures of ribose-containing nucleosides (uridine, cytidine and thymidine respectively), or deoxyribose-containing deoxynucleosides, and their corresponding ribonucleotides or deoxyribonucleotides. Pyrimidines serve essential functions in human metabolism as ribonucleotide bases in RNA (uracil and cytosine), and as deoxyribonucleotide bases in DNA (cytosine and thymine), and are linked by phosphodiester bridges to purine nucleotides in double-stranded DNA, in both the nucleus and the mitochondria. Pyrimidines, similarly to purines, are synthesized *de novo* from simple precursors. Synthesis occurs in six steps, with cellular compartmentalization of specific steps in the cytosol or mitochondria, enabling changes in metabolic rate with need. Pyrimidine synthesis differs from purine synthesis, in that the single pyrimidine ring is assembled first and is then linked to ribose phosphate to form UMP. This gene encodes a uridine 5'-monophosphate synthase. The encoded protein is a bifunctional enzyme that catalyzes the final two steps of the *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway. The first reaction is carried out by the N-terminal enzyme orotate phosphoribosyltransferase which converts orotic acid to orotidine-5'-monophosphate. The terminal reaction is carried out by the C-terminal enzyme OMP decarboxylase which converts orotidine-5'-monophosphate to uridine monophosphate. Defects in this gene are the cause of hereditary orotic aciduria. The enzymes that catalyze UMP synthesis, CAD [carbamoylphosphate synthetase II (CPSII), aspartate transcarbamoylase (ATCase) and dihydroorotase (DHOase)], dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) and uridine monophosphate synthase (UMPS), are encoded by only three genes – CAD, DHODH and UMPS are encoded by only three genes.

An excess of orotic acid leads to a condition known as orotic aciduria. This condition can be hereditary or brought on by excessive consumption. In adults, it causes an interruption of the urea cycle. In children, it can cause inhibition of DNA and RNA synthesis leading to mental or physical damage. Increased urinary orotic acid has been observed in patients and heterozygotes with hereditary metabolic disease. Severe trauma, pregnancy and a number of drugs have also increased the excretion of urinary orotic acid. The biological effects of orotic acid have been the focus of

considerable attention, because recent experimental studies have demonstrated that it has effects of carcinogenesis, hepatic lipidstorage and renal toxicity.

Orotic aciduria results from deficiency of either or both of the last two enzymes: orotate phosphoribosyl transferase and OMP decarboxylase as mentioned before, both these enzyme activities are present on a single protein as domains. Mutation in the phosphoribosyl transferase impairs its association with the other domain, resulting in loss of activity of both. This produces type I situation (orotic aciduria type I). This deficiency is treated by taking supplements of the compound uridine. In the type II, mutation in the decarboxylase occurs, but it does not effect its aggregation with phosphoribosyl transferase. In this case, only decarboxylase is inactive, whereas activity of phosphoribosyl transferase is not affected. This deficiency has been successfully treated with chronic uridine therapy.

Orotic aciduria is a rare disease that is characterized by megaloblastic anemia. A devastating response to what is usually mild infection may be seen in any of the megaloblastic anemias of early life. The feature which led to the original recognition of the condition was crystalluria. Crystals of orotic acid have caused urethral and ureteral obstructions hematuria and azotemia.

Disorder related to pyrimidine synthesis is hereditary orotic aciduria caused by deficiency of uridine monophosphate synthase (UMPS), a bifunctional protein having two catalytic activities: orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) and orotidine monophosphate decarboxylase (ODC). A defect in both the activities is classified as orotic aciduria type I while ODC defect is denoted orotic aciduria type II. In most cases, orotic aciduria arises from inherited defects of enzymes involved in the urea cycle after synthesis of intramitochondrial carbamoyl phosphate. Excessive production of OA may also occur in deficiency of ornithine transcarbamoylase, a urea cycle enzyme. It leads to accumulation of carbomyl phosphate, which is diverted for enhanced synthesis of OA. Increased urinary excretion of this compound follows, hence this defect is considered as a secondary orotic aciduria.

Orotic acid excretion is also elevated by ammonia intoxication, during feeding of diets high in protein and in patients treated with diets high in protein and in patients treated with allopurinol or 6-azauridine.

Suitable chromatographic conditions and pre-treatment method was developed for reliable analysis of orotic acid in urine in this study. Samples were analyzed by ion chromatography / conductivity detector equipped with a Dionex Ion Pac® AS20 analytical column (2x250 mm) and a Dionex Ion Pac® AG20 guard column (2x50 mm) using gradient and isocratic NaOH elution.

Interferences from matrix in urine were removed by strongly cation exchange resin and solid-phase extraction after centrifugation and dilution. The calibration curves showed good linearity in the ranges of 10-10000 µg/L with the r^2 values of 0.999. Significant results were obtained for various spiked urine samples with % recovery in the range of 85-95 %. The method was applied to urine samples collected from both healthy volunteers and patients with orotic aciduria. The value of urinary OA excretion, expressed in µmol/mmol of creatinine are reported in both healthy volunteers and patient with orotic aciduria. The advantages of the method described herein are: (i) it allows determining trace amount of orotic acid from human urine samples, (ii) the sample preparation is overly simple, inexpensive, and (iii) the test is not time demanding and could be employed in routine analysis.

1. GİRİŞ

Son on yılda, biyolojik, klinik ve besin örneklerindeki organik asit analizleri büyük ilgi çekmektedir. İnsan kan serumunda ya da idrarında bulunan bazı organik asitlerin konsantrasyonu ile bağlantılı olarak birçok hastalığın teşhisinin mümkün olduğu bilinmektedir. Organik asitler, karbonhidrat, lipit ve proteinlerin metabolizmadaki en önemli işaretçileri arasındadırlar. Biyolojik sıvılardaki organik asitlerin anormal konsantrasyonlardaki varlıkları metabolizmadaki belirli bozuklukların kesin teşhisinde önemli bir rol oynar [1].

İdrardaki orotik asit primidin sentezini belirlemede metabolik bir işaretçiyken kan serumunda ölçülemeyecek değerdedir. İdrarda artan orotik asit değerleri kalıtsal metabolik bir hastalığın belirtisidir. Şiddetli travma, hamilelik ve bir çok ilaç da idrardaki orotik asit seviyesini artırır. Orotik asit idrar ile vücuttan atıldığı için kan plazması yerine idrardaki tayini tercih edilir.

Organizmadaki doğuştan gelen hastalıkların teşhisinde, yüksek konsantrasyondaki ve normal konsantrasyondaki orotik asit seviyelerinin idrardaki analizlerinde kullanılacak etkin yöntem geliştirmek önemlidir. Bu ölçümler yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC), nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR), kapiler elektroforez gibi yöntemlerle yapılmaktadır. Literatürde orotik asidin biyolojik örneklerde tespiti üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Ters faz kromatografik prosedürlerde orotik asit tespiti pKa değerinden dolayı, iyon çifti kromatografisinde kararsız çözünürlük değerlerinden dolayı, iyon-değişim kromatografisinde ise yükselen alıkonma zamanları sebebiyle yöntemlerin uygulanma güçlükleri belirtilmiştir.

Uzun süreli yüksek konsantrasyondaki orotik aside maruz kalma sağlığa zararlı etkilere yol açabilir. Farelerin beslenmesine eklenen orotik asidin karaciğer yağlanmasına sebep olduğu gözlemlenmiştir [2].

İnsan idrarında yapılan analizlerle orotik asidin tayini özellikle kalıtsal bazı rahatsızlıkların teşhisinde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca başta karaciğer olmak

üzere kanserojen yapıların ilerlemesi ile idrardaki orotik asit miktarının bağlantısı vardır. Bu nedenle birçok rahatsızlığın erken teşhisinde idrardaki orotik asit miktarının doğru ve hızlı ölçümü önemlidir.

Bu çalışmada, iyon kromatografi/suppressorlü iletkenlik dedektörü cihazı kullanarak insan idrarındaki orotik asidin miktarının tayini için seçici, güvenilir ve hassas bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. İYON KROMATOĞRAFI

2.1 Kromatografi

2.1.1 Giriş

Genellikle, kimyasal tayin yöntemleri seçici olup belki çöz azı spesifikdir. Bunun sonucu olarak, analitik işlemlerde girişim yapabilecek maddelerden ayrılması çoğu zaman zorunludur. Yirminci yüzyılın ortalarına kadar analitik ayırmalar çöktürme, damıtma ve ekstraksiyon gibi klasik yöntemlerle yapıyordu. Günümüzde, analitik ayırmalar, özellikle numune çok bileşenli ve karmaşık ise, çoğunlukla kromatografi ve elektroforez ile yapılmaktadır.

Kromatografi, bilimin tüm dallarında uygulaması bulunan güçlü bir ayırma yöntemidir. Kromatografi yirminci yüzyılın başında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından bulunmuş ve onun tarafından isimlendirilmiştir. Tswett bu tekniği, toz kalsiyum karbonat doldurulmuş bir cam kolondan bitki pigmentleri çözeltisini geçirerek klorofil ve ksantofil gibi birçok bitki pigmentini ayırmada kullanmıştır. Ayrılan maddeler kolonda renkli bantlar şeklinde gözüktüğünden, yöntem için kromatografi adını kullanmıştır (Yunancada chroma “renk” ve graphein “yazma” anlamına gelmektedir.).

Son yıllarda hem birçok yeni kromatografik teknik geliştiği hem de bilimcilerin karmaşık karışımları ayırmak için daha iyi tekniklere gereksinimleri arttığı için, kromatografik uygulamalar çok büyük oranda artmıştır. Bu yöntemlerin bilime büyük katkılar yapması sonucu bu alandaki buluşlarına karşılık 1952 yılında A.J.P. Martin ve R.L.M. Synge’ye Nobel ödülü verilmiştir. Daha da önemlisi 1937 ile 1972 yılları arasında alınan 12 Nobel Ödülü kromatografinin önemli rol aldığı çalışmalara verilmiştir. Şüphesiz, günümüze kadar bu sayı da artmıştır.

2.1.2 Kromatografinin genel tanımı

Kromatografi kompleks karışımlarda bulunan birbirine yakın özellikteki maddeleri ayırmak için kullanılan birçok yöntemi içerir; bu ayırmaların çoğu başka yöntemlerle

yapılamamaktadır. Bütün kromatografik ayırmalarda numune gaz, sıvı veya bir süperkritik akışkan olan hareketli faz ile taşınır. Bu hareketli faz bir kolonda veya bir katı yüzeyde sabitleştirilmiş kendisi ile karışmayan bir durgun faz içinden geçmeye zorlanır. Bu iki faz numunenin bileşenlerinin hareketli ve durgun fazlarda farklı oranlarda dağılacağı şekilde seçilir. Durgun faz tarafından kuvvetli tutulan numune bileşenleri, hareketli fazın akışıyla çok yavaş hareket ederler. Bu hareket hızlarının farklılığı sonucu, numune bileşenleri birbirlerinden kalitatif ve/veya kantitatif olarak analizlenebilen farklı bantlar veya bölgeler şeklinde ayrılırlar.

2.1.3 Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

Kromatografik yöntemler iki şekilde sınıflandırılabilir. Birincisinde, hareketli ve durgun fazların fiziksel olarak nasıl temas ettirildikleri esas alınır. Kolon kromatografide, durgun faz ince bir kolonda tutulur ve hareketli faz basınç altında bu durgun faz arasından geçmeye zorlanır. Düzlemsel kromatografide, durgun faz düz bir plaka üzerine veya bir kağıdın gözenekleri arasına tutturulur ve bu durumda hareketli faz durgun faz arasından kapiler etkisiyle veya yerçekimi etkisiyle hareket eder. Ancak, her iki tür kromatografinin dayandığı dengeler aynıdır ve kolon kromatografisi için geliştirilmiş kuramlar düzlemsel kromatografiye de kolaylıkla uygulanabilir.

Kromatografinin daha temel bir sınıflandırılması kullanılan durgun ve hareketli fazların tipleri ve fazlar arasında madde aktarımını sağlayan dengelerin cinslerine göre yapılır. Şekil 2.1’de kromatografinin üç temel tipi gösterilmektedir: sıvı kromatografisi, gaz kromatografisi ve süperkritik akışkan kromatografisi. Bu isimlerde de geçtiği gibi, bu üç teknikte hareketli faz sırası ile sıvı, gaz ve süperkritik akışkandır. Çizelgenin ikinci kolonunda görüldüğü gibi, birçok kromatografik yöntem ilk iki teknikten birine girmektedir.

Sadece sıvı kromatografisi, hem kolonlarla hem de yüzeyler üzerinde gerçekleştirilebilir; gaz kromatografisi ve süperkritik sıvı kromatografisi yalnız kolonlarda gerçekleştirilir ve kolonun iç yüzeyinde hareketli faz bulunur.

2.1.4 Kolonlarda elusyon kromatografisi

A ve B maddelerinin sıvı hareketli faz kullanarak bir kolonda elusyon kromatografisi ile ayrımı Şekil 2.1 de görülmektedir. Elusyon kromatografide, bir miktar numune

kolona konur (t_0) ve numunenin bileşenleri kolonun iki fazı arasında dağılır. Kolona katılan hareketli faz (eluent), numunenin bir bölümünü içeren çözücüyü kolonda ilerlemeye zorlar ve bu arada hareketli fazla durgun fazın yeni bölümleri arasında numune tekrar dağılır (t_1 zamanı). Aynı anda, numunenin kolona giriş tarafında, taze çözücü ile durgun faz arasında da dağılım gerçekleşir.

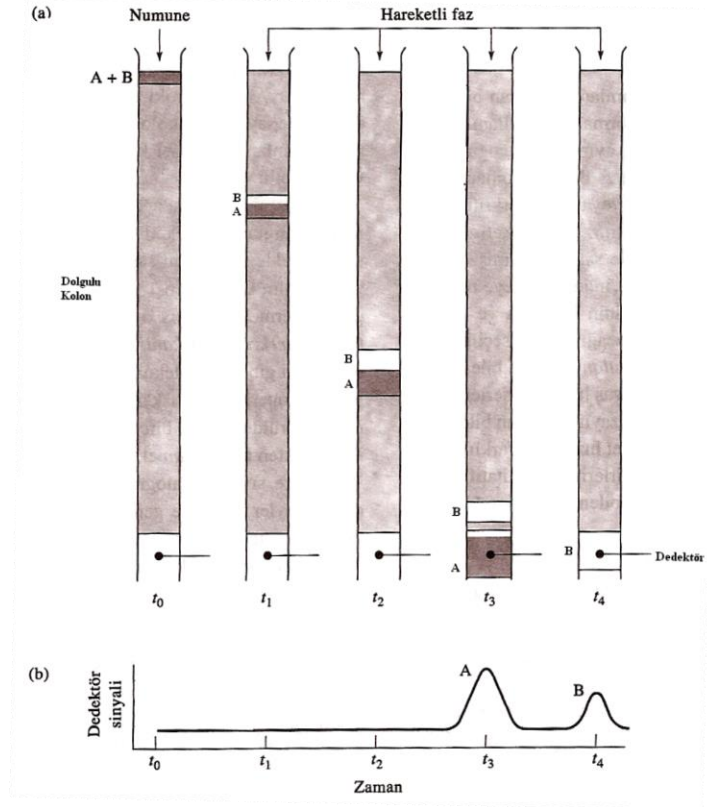
Kolona çözücünün sürekli olarak ilavesi, hareketli ve durgun faz arasında sürekli madde aktarımı yaparak, çözünen madde moleküllerini kolonda aşağıya doğru taşır. Fakat, çözünen madde hareketi sadece hareketli fazda olduğu için, çözünen maddenin kolonda göç ettiği ortalama hızı, onun hareketli fazda geçirdiği zaman kesri ile orantılıdır. Durgun fazın kuvvetli tuttuğu maddeler için, bu kesir küçük (B maddesi) ve hareketli fazda bulunma olasılığı daha fazla olan maddeler için (A bileşeni) ise büyüktür. İdeal olarak, hızlarda oluşan bu fark sonucu, karışımdaki bileşenler kolon boyunca bant veya bölgeler şeklinde ayrılırlar (t_2). Ayrılan bileşenler, kolondan yeterli miktarda hareketli faz geçirilerek izole edilir, bu sırada herbir bileşen için, onların tayin edilebileceği veya ayrı ayrı toplanabileceği bölgeler elde edilir (t_3 ve t_4).

2.1.5 Analitin seyrelmesi

Şekil 2.1, ayırma işleminin önemli genel özelliklerini göstermektedir. Özellikle, ayırma işlemlerinde hemen hemen daima analitlerin seyrelmesi söz konusudur. Bu nedenle, şekilde analitleri içeren orjinal bölgenin boyutu dedektöre ulaşan iki bölgeye göre oldukça küçüktür. Bu, ayırma sırasında analitlerin önemli oranda seyreltiğini gösterir. Bunun sonucu, herbir analit için kullanılan dedektör, ayırma yapılmadığı zamankilere göre genellikle daha duyarlı olmalıdır.

2.1.6 Kromatogramlar

Çözünen maddenin derişimlerine cevap veren bir dedektör, kolon çıkışına yerleştirilirse ve dedektör sinyali zamanın (veya kullanılan hareketli fazın hacminin bir fonksiyonu olarak kaydedilirse, Şekil 2.1'in alt bölümünde görüldüğü gibi bir seri pik elde edilir. Kromatogram olarak adlandırılan bu grafikler, hem kalitatif analiz için hem de kantitatif analiz için kullanılır. Zaman eksenindeki piklerin yerleri, numune bileşenlerini tanımda kullanılabilir; pik alanları herbir bileşenin miktarının bir ölçüsüdür.



Şekil 2.1 : (a) Kolon elüsyon kromatografisi ile A ve B bileşenlerinin ayrılma diyagramı. (b) (a)'da gösterilen elüsyonun çeşitli basamaklarında dedektör sinyali.

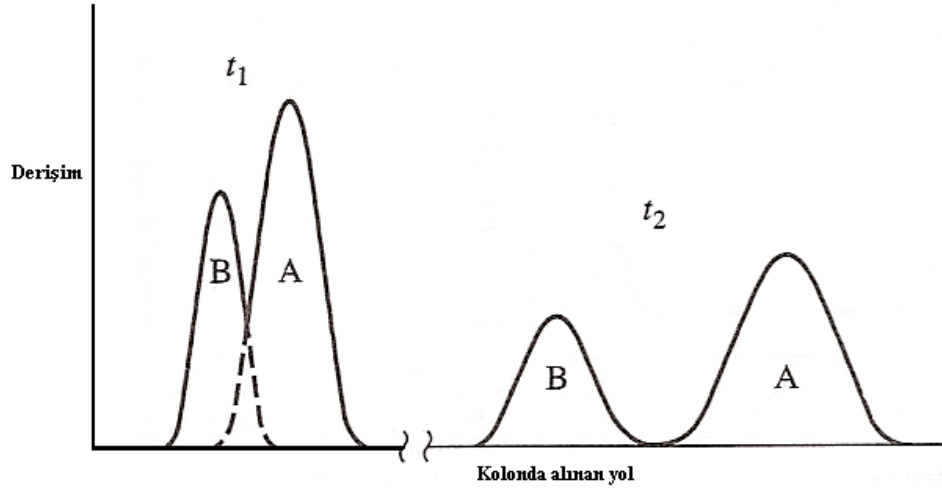
2.2 İyon-Değiştirme Kromatografisi

2.2.1 Genel bilgi

İyon-değiştirme kromatografisi çoğu zaman iyon kromatografisi (IC) olarak kısaltılır. İyon değiştirici reçinelerin kullanımına dayanan iyonların ayrılması ve tayini için modern ve etkili bir yöntemdir. İyon kromatografisi ilk olarak anyon-değiştirici veya katyon-değiştirici reçine ile doldurulmuş yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kolonlarında anyon ve katyon karışımlarının kolaylıkla ayrılabilceğinin farkedildiği 1970'li yılların ortalarında geliştirilmiştir. O yıllarda ölçümler genellikle iletkenlik dedektörüyle yapılmıyordu. Günümüzde, iyon kromatografisi için başka dedektörler de mevcuttur.

İyon kromatografisi, birbiriyle çok benzer olan nadir toprak katyonlarının katyon değiştirici reçinelerle ayrılması için geliştirilen Manhattan projesi sırasında ortaya

ıkan iyon-değiştirme kromatografisinin gelişmişidir. İyon-değiştirme ayırmaları için teorik temelleri ortaya koyan bu alışma, II. Dünya savaşından sonra, başka pek çok maddelere uygulanabilecek şekilde genişletildi; sonunda karmaşık karışımlardaki amino asitler ve diğer iyonik türlerin ayrılması ve belirlenmesi için otomatikleştirilmiş yöntemlere kadar yayıldı.



şekil 2.2 : şekilde 2.1’ deki A ve B bileşen bantlarının kolonda iki değişik g zamanındaki derişim profilleri.

Modern HPLC’nin gelişmesi 1960’lı yılların sonunda başladı, ancak bu yöntemlerin iyonik türlere uygulanmaları, alkali ve toprak alkali katyonlar, halojenürler, asetat ve nitrat gibi iyonik türlerin eluatlarının belirlenmesi için genel bir yöntemin eksikliği sebebiyle gecikti. Bu duruma, 1975 yılında, Dow Kimya Sanayi alışanları tarafından, iyonların konduktometrik belirlenmesini mümkün kılan bir “zc sinyali baskılama” tekniği ile are bulundu.

2.3 İyon-değiştirme Dengeleri

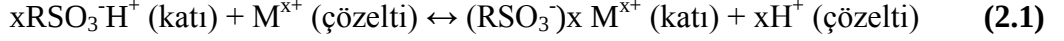
İyon-değiştirme olayları, çözeltideki iyonlar ve çözünmeyen, yüksek molekül ağırlıklı bir katının yüzeyindeki benzer işaretli iyonlar arasındaki değiştirme dengesi temeline dayanmaktadır. Killer ve zeolitler gibi doğal iyon-değiştiriciler uzun süredir bilinmekte ve son yıllarda kullanılmaktadır. Sentetik iyon değiştirici reçineler ilk olarak 1930’lu yılların ortalarında, su yumuşatma, su deiyonizasyonu ve çözelti saflaştırılması amacıyla retili.

Kasyon değiştirici reçinelerin en genel aktif bölgeleri, kuvvetli bir asit olan sülfonik asit ($-\text{SO}_3\text{-H}^+$) ve zayıf bir asit olan ($-\text{COOH}^+$)’dur. Anyonik iyon değiştiriciler, kuvvetli bir baz olan tersiyer amin grupları ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$) veya daha zayıf bir baz olan primer amin gruplarını ($-\text{NH}_3^+\text{OH}^-$) içermektedir.

Çizelge 2.1 : Kolon kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması.

Genel Sınıf	zel Yöntem	Durgun Faz	Denge Tipi
Sıvı Kromatografi (LC) (hareketli faz: sıvı)	sıvı-sıvı veya dağılma	katı üzerine adsorplanmış sıvı	Karışmayan sıvılar arasında dağılma
	Sıvı-bağlı faz	Katı yzeyeye bağlanmış organik türler	Sıvı ve bağlı yüzey arasında dağılma
	Sıvı-katı veya adsorpsiyon	Katı	Adsorpsiyon
	İyon değişimi Boyut eleme	İyon değiştirici reçine Polimer bir katının gözeneklerindeki sıvı	İyon değişimi Dağılma/eleme
Gaz kromatografi (GC) (hareketli faz: gaz)	Gaz-sıvı	Katı yüzeyine adsorplanmış sıvı	Gaz ve sıvı arasında dağılma
	Gaz-bağlı faz	Katı yüzeyine bağlanmış organik türler	Sıvı ve bağlı faz arasında dağılma
	Gaz-katı	Katı	Adsorpsiyon
Süperkritik-akışkanlı kromatografi (SFC) (hareketli faz: süper kritik sıvı)		Katı yüzeyine bağlanmış organik türler	Süper kritik akışkan ve bağlı yüzey arasında dağılma

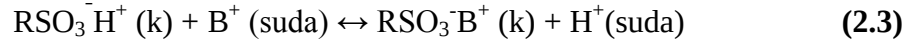
Sülfonik asit tipi bir iyon değiştirici, M^{x+} katyonunu içeren bir sulu çözelti ile temas ettiği zaman, aşağıdaki gibi gösterilebilen bir yer değiştirme dengesi meydana gelir:



Burada, $x\text{RSO}_3^-\text{H}^+$ büyük bir polimer molekülüne tutunmuş çok sayıdaki sülfonik asit grubundan bir tanesidir. Benzer şekilde, kuvvetli bazik iyon değiştirici, A^{x-} anyonu ile, aşağıdaki denklemde gösterildiği gibi etkileşebilir:



Kütlelerin Etkimesi Kanunu'nun iyon-değiştirme dengesine uygulamasının bir örneği olarak, tek yüklü B^+ iyonu ile bir kromatografik kolondaki sülfonik asit reçinesi arasındaki reaksiyonu dikkate alalım. Nötral bir çözeltiden, aşağıdaki reaksiyon sebebiyle, kolonun üst kısmında, B^+ iyonları tutulur:



Burada (k), katı anlamındadır. Hidroklorik asidin seyreltik çözeltisi ile elüsyon, durgun fazdaki B^+ iyonunu hareketli faza aktaracak şekilde Eşitlik 2.3'deki dengeyi sola kaydırır. Bu iyonlar daha sonra durgun ve hareketli faz arasında bir seri aktarım sonucunda kolondan aşağı doğru hareket eder.

Eşitlik 2.3'te gösterilen denge için denge sabiti $K_{\text{deg.}}$ şöyle yazılabilir:

$$\frac{[\text{RSO}_3^-\text{B}^+]_k [\text{H}^+]_{\text{suda}}}{[\text{RSO}_3^-\text{H}^+]_k [\text{B}^+]_{\text{suda}}} = K_{\text{deg.}} \quad (2.4)$$

Burada $[\text{RSO}_3^-\text{B}^+]_k$ ve $[\text{RSO}_3^-\text{H}^+]_k$, B^+ ve H^+ 'nın katı fazdaki derişimleri (en doğru anlamda aktiviteleleridir). Bu ifade yeniden düzenlenirse;

$$\frac{[\text{RSO}_3^-\text{B}^+]_k}{[\text{B}^+]_{\text{suda}}} = K_{\text{deg.}} = \frac{[\text{RSO}_3^-\text{H}^+]_k}{[\text{H}^+]_{\text{suda}}} \quad (2.5)$$

elde edilir. Elüsyon sırasında, hidrojen iyonlarının sulu fazdaki derişimleri, B^+ iyonlarınıninkine göre çok daha büyüktür. Ayrıca, B^+ sayısı yanında, reçinedeki yer değiştirme bölgesi sayısı çok daha yüksektir. Böylece, $[\text{H}^+]_{\text{suda}}$ ve $[\text{RSO}_3^-\text{H}^+]_k$ derişimleri Eşitlik 2.3'deki kaymalardan fazla etkilenmez. Bu sebeple $[\text{RSO}_3^-\text{H}^+]_k$

$\gg [\text{RSO}_3\text{-B}^+]_k$ ve $[\text{H}^+]_{\text{suda}} \gg [\text{B}^+]_{\text{suda}}$ olduğu zaman Eşitlik 2.5'in sağ tarafı hemen hemen sabittir ve

$$\frac{[\text{RSO}_3\text{-B}^+]_k}{[\text{B}^+]} = K = \frac{C_s}{C_m} \quad (2.6)$$

yazabiliriz. Burada; K, dağılma katsayısına denk gelen bir sabittir.

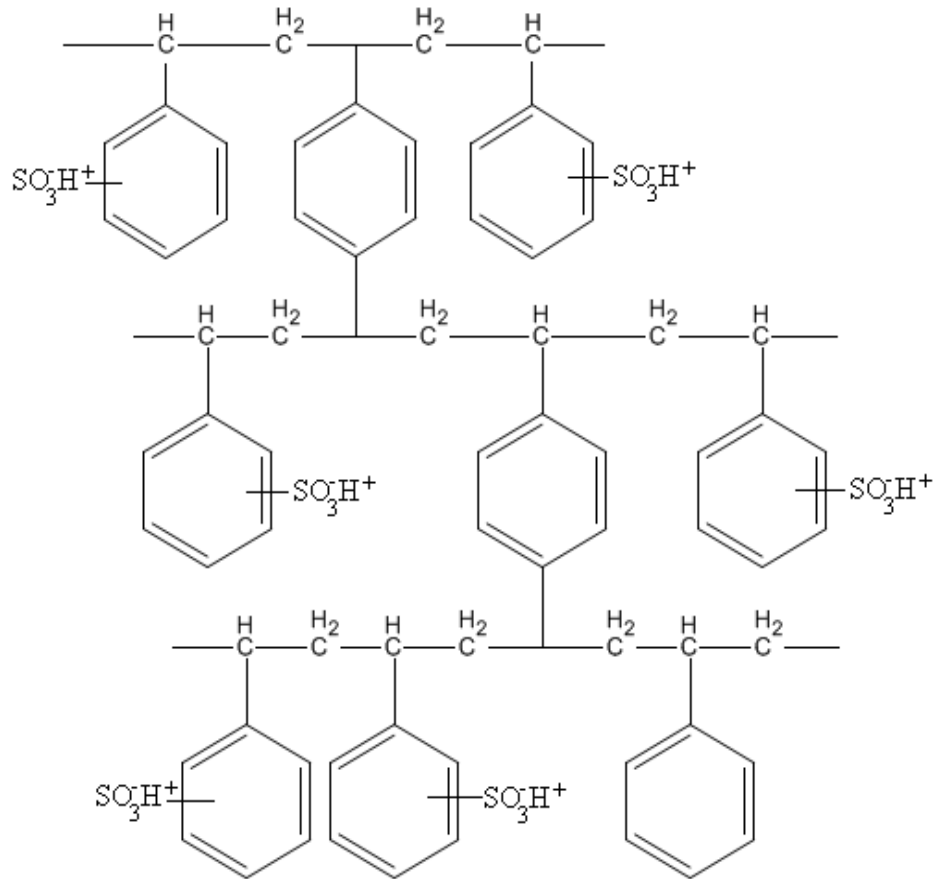
$K_{\text{değ.}}$ 'in büyük olduğu zaman katı faz için B^+ iyonunu alıkoymak için kuvvetli bir eğilim gösteriyor demektir. $K_{\text{değ.}}$ 'in küçük olduğu durumda bunun tersi doğrudur. H^+ gibi genel bir referans iyon seçerek, verilen tipteki reçinede farklı iyonlar için dağılma oranları deneysel olarak karşılaştırılabilir. Bu gibi deneyler, çok yüklü iyonların tek yüklü türlerine nazaran çok daha kuvvetli tutulduğunu göstermiştir. Ancak, verilen bir yük grubu içinde görülen farklılıklar, hidratlaşmış iyonun diğer özellikleri kadar boyutuyla da ilgilidir. Sonuç olarak, tipik bir sülfolanmış katyon değiştirici reçine için, $K_{\text{değ.}}$ değerleri şu sırada azalmaktadır: $\text{Ti}^+ > \text{Ag}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Li}^+$. İki yüklü katyonlar için sıra şöyledir: $\text{Ba}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$. Anyonlarda, kuvvetli bazik reçineler için $K_{\text{değ.}}$ şu sırada azalır: $\text{SO}_4^{2-} > \text{C}_2\text{O}_4^{2-} > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_2^- > \text{CH}_3\text{CO}_2^- > \text{OH}^- > \text{F}^-$. Bu sıra, bazı durumlarda reçinenin tipine ve reaksiyon şartlarına bağlı olduğundan, sadece bir yaklaştırma olarak dikkate alınmalıdır.

2.4 İyon-değiştirici Dolgular

Tarihsel olarak iyon-değiştirme kromatografisi, stiren ve divinilbenzenin emülsiyon kopolimerizasyonu sırasında oluşturdıkları küçük ve gözenekli tanecikli polimerlerle gerçekleşmiştir. Divinilbenzenin kullanılmasıyla (genellikle $\approx$ % 8) oluşan çapraz bağlanma taneciklerin mekanik dayanıklılıklarını sağlamaktadır. Polimeri iyonlara karşı aktif hale getirmek için, daha sonra, yapıya asidik ve bazik fonksiyonlu gruplar kimyasal olarak bağlanmıştır. En çok kullanılan gruplar, sülfonik asit ve kuvaterner aminlerdir.

Şekil 2.3, kuvvetli bir asit reçinesini göstermektedir. Burada, çapraz bağlanma doğrusal polistiren moleküllerini bir arada tutmaktadır. Diğer tipteki reçineler, aktif fonksiyonelli grupları hariç, benzer yapılara sahiptir. Gözenekli polimerik tanecikler kromatografik dolgu maddesi olarak tamamen uygun değildir; bunun sebebi, analit

moleküllerin mikrogözeneklerden geçmesi ve polimer matriksindeki difüzyonun yavaş olması ve matriksin sıkıştırılabilmesidir. Bu problemleri aşabilmek amacıyla iki yeni tip dolgu maddesi geliştirilmiş ve bunlar genel olarak gözenekli polimer tip membranlardan daha fazla kullanılmıştır. Bunlardan biri, yüzeyi bağıl olarak büyük (30-40 μm), gözenekli olmayan küresel sentetik reçine ile kaplanmış cam veya polimer tanelerden meydana gelen, zar kaplamalı (peliküler) yatak dolgusudur. İkinci bir tipteki dolgu maddesi, adsorpsiyon kromatografide kullanılan silisten ibaret gözenekli mikropartiküllerin, iyon değiştiricinin ince bir filmi ile kaplanmasıyla hazırlanır. Her iki tipte de, polimer film içindeki hızlı difüzyon, verimin artmasına neden olmaktadır. Diğer taraftan, bu taneciklerin numune kapasitesi, özellikle zar kaplamalı tip için daha düşüktür [3].



Şekil 2.3 : Çapraz-bağı polistiren iyon değiştirici reçinenin yapısı. $-\text{SO}_3^-\text{H}^+$ grubu yerine, $-\text{COO}^-\text{H}^+$, $-\text{NH}_3^+\text{OH}^-$ ve $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$ grupları bağlayarak elde edilen benzer reçinelerde kullanılır.

2.5 Deneyde Kullanılan IC Sisteminin Ana Bölümleri

2.5.1 ICS-3000 sistemi

Dionex marka ICS-3000 cihazı, verimli ve yüksek performanslı bir sistemdir. ICS-3000 sistemi bütün modüllerinde bileşenlere kolayca ulaşılabilmesi için özel dizayn edilmiştir. Bu sayede daha önceki modellere kıyasla ayarlamalar daha kolay yapılmaktadır. Akış yollarının kimyasal olarak inert olması sayesinde bu yollar aşırı pH değerlerine dayanıklıdır ve hassas örnekleri metal kirliliğine karşı korur. ICS-3000 sistemlerinin komple çiftli çalıştırılabilme özelliğinden dolayı ayrı bir cihaz ve otoörnekleyiciye gerek kalmadan daha ucuz şekilde güncellenebilir. Yani aynı anda iki analiz tek bir otoörnekleyiciden tek bir uygulama ile yapılabilir. Bu cihazda isokratik pompadan ultra saf su Eluent Üretici'ye gelir ve burada gradient olarak hidroksit veya karbonat/bikarbonat mobil faz elde edilir. Ayrıca pompa hem isokratik hem de gradient olarak çalışabilir. Yeni çıkan zeki otoörnekleyiciler örnekleri kromatografik sisteme sırayla veya eşzamanlı gönderebilir. Bu sayede örnek prekonsantasyonu ve matriks eliminasyonu eşsiz bir şekilde başılır.

Çiftli sistemlerde üretimlilik, esneklik, hassasiyet ve seçicilik artar ve ekonomik avantajlar önemli ölçüde göze çarpar. Bir otoörnekleyici ile örnekteki anyonlar ve katyonlar aynı anda ayrılabilirler. Buna bağlı çift kolon ve takiben çift dedektör özel yazılımı sayesinde kolayca kontrol edilebilmektedir.

RFIC (Reagent-Free Ion Chromatography) sistemlerinin güven ve performansı eluent yapıcı, safsızlık tuzağı ve Supresör kısımlarından ileri gelir. Ayrıca pompa kısmında da bir modülde iki pompadan faydalanılabilmektedir. Böylelikle örnek hazırlama, kolon temizliği veya şartlandırma ve reaktif ulaştırılması sürekli olarak herhangi bir zamanda yapılabilir. Tüm bunlar göz önüne alındığında başka bir benç yerini işgal etmeden ikili çalışma aynı anda tek bir cihazda başılır.

Pompalar son teknoloji ve inert olduklarından yüksek derecede doğru ve tekrarlanır bilgiler elde edilir. Piston sealleri sistemde sürekli olarak yıkandığından ömürleri uzundur.

ICS-3000 EG (Eluent Generator) modülü RFIC sisteminin kalbidir. Bu modül ile eluentleri artık hazırlamaya gerek kalmamıştır. Burada UP su ile isteğe bağlı yüksek kalitede ve kesin konsantrasyonda eluent sistem tarafından otomatik olarak

hazırlanır. Bu, manuel eluent hazırlanması ile oluşabilecek hataları elimine etmeyi sağlar. Tekrarlanabilir sonuçlar haftadan haftaya, aydan aya ve laboratuvarıdan laboratuvara elde edilir. Ayrıca bu sistem eluenti dereceli olarak otomatik ayarlayabildiğinden anyon analizlerinde optimum zamanın daha kısa sürede bulunabilmesi için avantaj sağlar. Gradient elusyon ile daha iyi ayırım, daha yüksek hassasiyet ve daha düşük tespit sınırları elde edilir. RFIC sistem sayesinde isokratik elusyona gradient elusyon kolaylıkla uygulanır. Gereken şey sadece UP sudur. EG modülü de ikili olduğundan bir kartuşta hidroksit diğeri de karbonat/bikarbonat eluentleri ile herhangi bir zamanda istenilen kartuş istenilen konsantrasyonda ayarlanıp kullanılabilir.

CR-ATC (Continuously Regenerated-Anion Trap Column), eluent generatör ile degas modülü arasına yerleştirilerek eluentten gelebilecek anyonik kontaminasyonlar engellenir. Bunlar periyodik olarak 2 M Hidroksit eluenti ile rejenere edilmelidirler.

Dionex 1975'te packed-bed kimyasal supresyonu tanıtarak modern iyon kromatografinin kurucusu oldu. Supresyon arkaplan (background) iletkenliğini azaltırken iyonun iletkenliğini artırması sebebiyle devrim yarattı. Packed-bed kimyasal supresyonun geliştirilmesi ile analizlerde $\mu\text{g/L}$ seviyelerine inilebilmektedir.

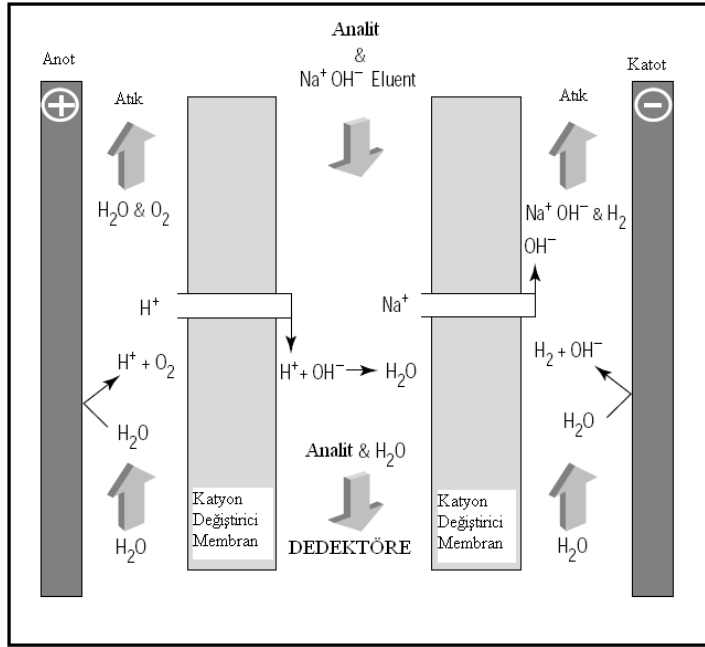
Dionex, supresyonun lideri olarak 1981'de oyuk fiber supresörler üretti. Bu supresörler sürekli yani online çalışabilmektedirler. Dionex, 1985'de MikroMembran Supresör (MMS) üretti. Bunlar dinamik kapasiteye ve gradient elusyon kullanımına daha çok izin vermektedirler. 1992'de ise kendini rejenere edebilen Supresörler (Self-Regenerating Supresör (SRS)) otomatik geliştirildi. Bunlar, rejenerant kaynağı olarak elektroliz kullanan korozif rejenerantların hazırlanmasını gerektirmeyen supresörlerdir.

SRS ULTRA II Supresörü ile Dionex, 2003'te Supresör teknolojisini bir adım daha öne aldı. Bu, ultra düşük gürültü, düşük ve kararlı zemin (background), üstün dinamik kapasite ve geniş dinamik aralık sunar.

SRS'ler MMS'lere yapı olarak çok benzerler. Ancak elektrotlar rejenerant odalarına yerleştirilmiştir. Elektrotlara bir güç kaynağı bağlanıp supresörden akım geçirildiğinde rejenerant iyonları supresörde sudan üretilir. Buna otomatik supresyon denir. Bu işlem için suyun odalardan sabit bir hızda geçmesi şarttır. Şekil 2.4'te

Supresörün kimyasal olarak nasıl çalıştığı açıkça gösterilmiştir. Şekil 2.5'te ise analitlerin supresörlü ve supresörsüz kromatogramları karşılaştırılması sistemin akış şeması ile açıkça gösterilmiştir.

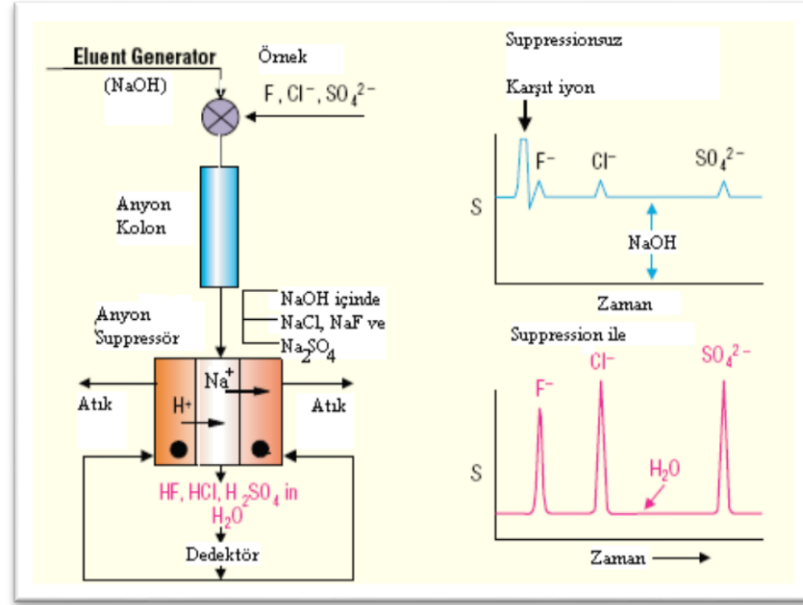
SRS herhangi bir sabitlenmiş rejenere olmuş supresörde en yüksek kapasiteye sahiptir. Bu da gradient eluentlerin tam supresyonuna izin verir. Ayrıca dedektör atığının rejenere olarak kullanılmasıyla suyun sabit akışı için ikinci bir pompaya gerek kalmamıştır. Bu supresör kullanım kolaylığı açısından yeni bir standart oluşturdu.



Şekil 2.4 : Supresörde meydana gelen iyon değişimi.

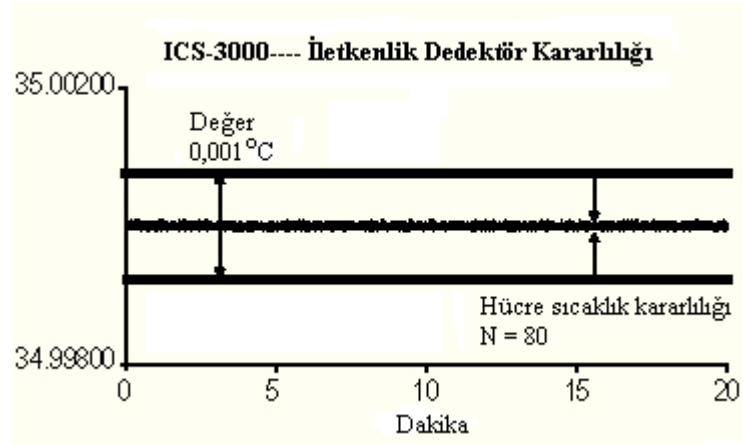
Supresyon sinyal/gürültü oranını önemli ölçüde yükselten bir yöntemdir. Supresörlerin farklı tipleri vardır. Hangi supresörün seçileceği eluentin organik bir çözücü olup olmadığına ve analit ve matriks konsantrasyonuna bağlıdır.

Şekil 2.5'den de görüldüğü gibi kolonda ayrılan anyonlar eluentin katyonu olan Na^+ (veya K^+) ile tuzları halinde supresöre girerler ve burada bir kation değişimi meydana gelir. Supresörde anyonlar iletkenlikleri yüksek asidik formlarına dönüşür ve NaOH den su oluşarak böylece dedektöre girerler. Oluşan saf su NaOH den gelen iletkenlik sinyallerini önlerken anyonların asidik formlarının iletkenlikleri arttığından piklerinde gözle görülür bir artış meydana gelir.



Şekil 2.5 : Supresörlü sistemde anyonların artan hassasiyeti.

ICS-3000 sisteminin elektronik kısımları ve dizaynı değişen sıcaklıklarda dedektörün kararlı çalışmasını sağlar (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 : Dedektörün sıcaklık kararlılığı.

Kesin sıcaklık kontrolü kaymaları (drift) elimine eder ve gürültüyü minimize eder. Ayrıca tespit hassasiyetini artırır ve kararlılık sağlar.

Şekil 2.7’de beyaz kısım supresör ve üstündeki siyah kısım ise iletkenlik dedektörüdür. Şekilden de görüldüğü gibi ara yollar kısadır.

Kolon ve dedektör arası da derli toplu biçimde dizayn edildiği için parça değişimi ve güncellemeler kolayca yapılır. Ayrıca kısa tubingler (borular) ve bağlantılar sayesinde ölü hacim minimize edilir. Bu sayede dağınık bir sistem ortaya çıkmaz.



Şekil 2.7: İletkenlik dedektörü (siyah) ve Supresör (beyaz).

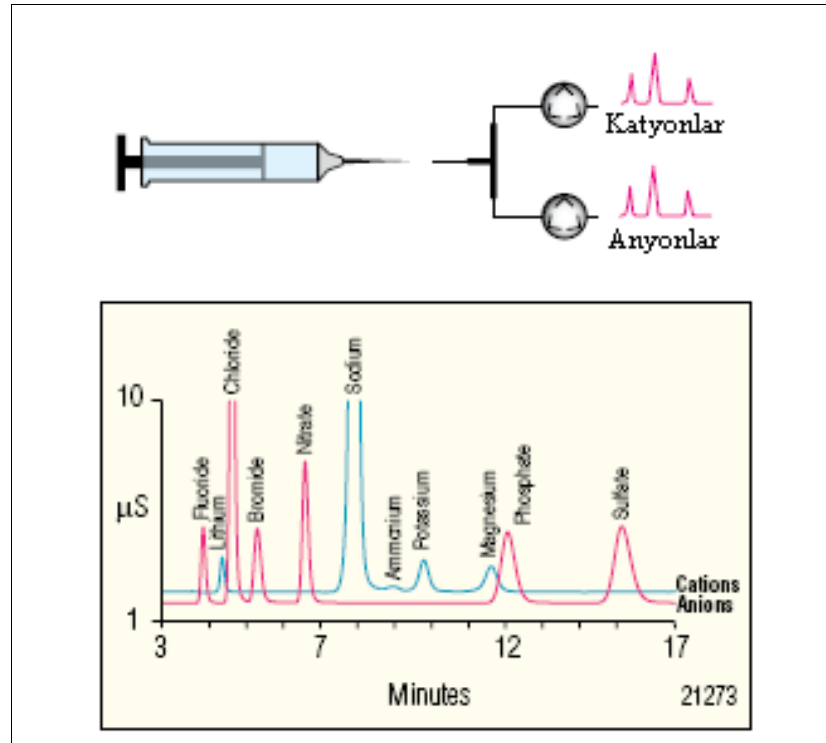
ICS-3000, biyomolekül analizleri ve iyon kromatografi için optimum seviyede bir sıvı kromatografisidir. %100 metalsiz sistem ile (otoörnekleyici, pompa, akış yolu ve dedektör) korozif mobil faz kullanan diğer paslanmaz çelik veya metal içeren kromatografi sistemlerinin sınırlamalarının üstesinden gelir. Metal akış yolları, bazı analitlerde denatürasyon veya adsorpsiyon gibi etkilere neden olabilir.

Termal kompartmanda ise sıcaklık kesin bir şekilde 5 ile 85 °C arasında ayarlanabilir. Opsiyonel eluent sıcaklık stabilizeri eluent sıcaklığının fırın ve kolonda kararlı kalmasına yardım eder ve kolonda daha kesin ayrımlar yapılır.

Kompleks analizlerin daha basit yapılabilmesi için cihazın Chromeleon yazılımı üzerinden bazı özel teknikler kolayca uygulanabilir. Bu özel teknikler yüksek hacim ve yüksek basınç örnek önderiştirme, matriks eliminasyonu, kolon temizliği, ve ön kolon iyileştirmesi gibi işlemlerdir.

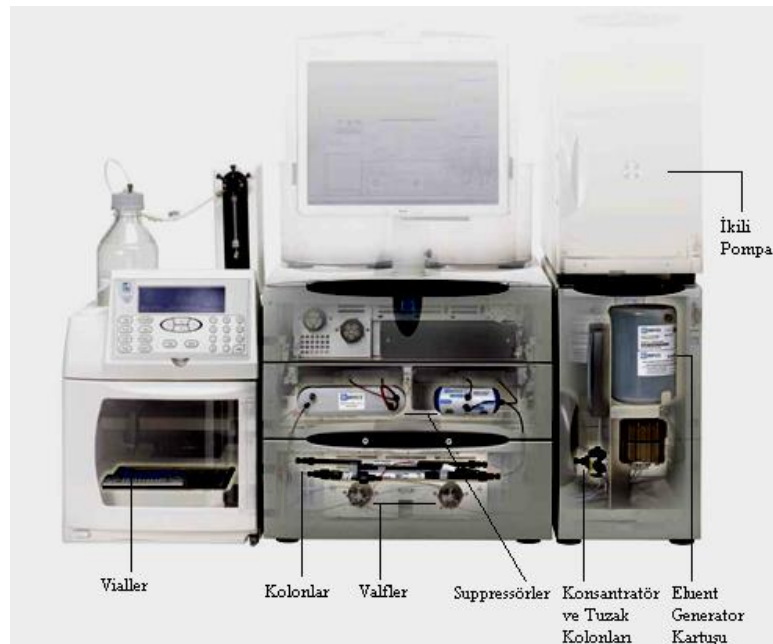
Bilgi analizi için Chromeleon Tablet Station kullanılmıştır.

Otoörnekleyicinin yolları ve vialleri inert olduğu için ve hazne bölmesinin ısıya duyarlı örnekleri belli sıcaklıkta saklayabildiği için örnekler bileşimi korunmaktadır. Şekil 2.8’de görüldüğü aynı anda iki analiz takibi yapılabilir.



Şekil 2.8: ICS-3000 sisteminin AS otoörnekleyicisinden aynı anda iki analiz yapılabilmektedir.

Şekil 2.9’da ise sistemin parçalarının nasıl yerleştirildiği açıkça anlaşılmaktadır.



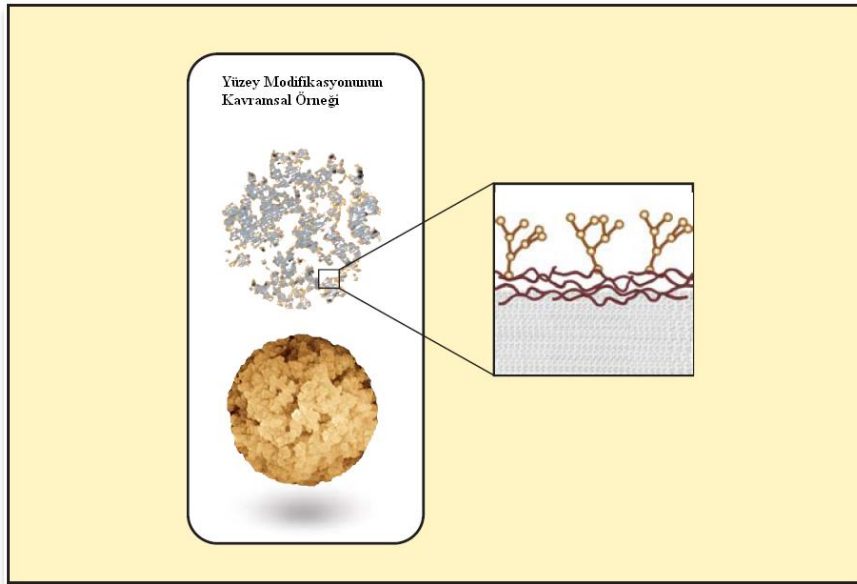
Şekil 2.9: ICS-3000 sisteminin modül ve parçaları

2.5.2 IonPac AS20 anyon değiştirici kolon

IonPac AS20 kolonu yüksek kapasitede, hidroksit seçici, anyon değiştirici bir kolon olarak su örneklerinde çok yüksek konsantrasyonlardaki klorür, sülfat ve karbonat anyonları varlığında bile $\mu\text{g/L}$ seviyesinde perkloratın tayini için oldukça kullanışlıdır. Hatta sularda eser miktar perklorat anyonu analizi için U.S. EPA 314.1 metodu olarak özelleştirilmiştir. Aynı metotta Cryptand C1 konsantrator kolon perkloratın prekonsantrasyonu için yer almaktadır. AS 20 kolonu $310 \mu\text{eq/kolon}$ değerinde yüksek bir kapasiteye sahiptir (4x250 mm kolon). Bu kolonun seçiciliği 35°C 'ye optimize edilmiştir.

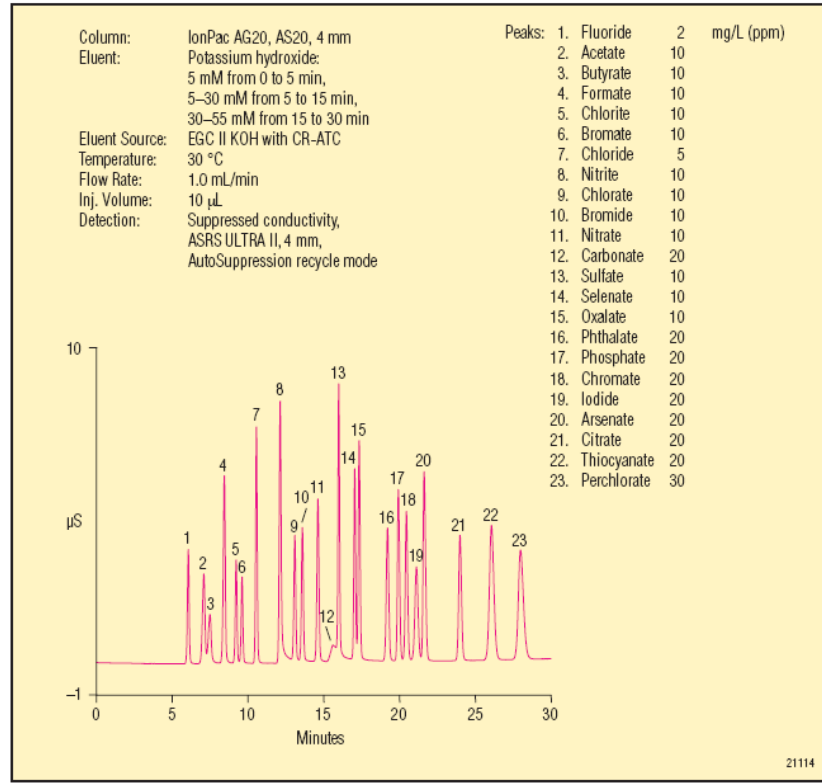
IonPac AS 20 kolonu eşsiz bir polimer bağlama teknolojisi ile geliştirilmiş ve üretilmiştir. Bu polimer oldukça hidrofiliktir ve hidroksit eluentlerinde çok seçicidir. Eluent konsantrasyonunun yüksek olmasına gerek duymaz.

AS20 kolonunun RFIC sistemlerinde kullanılması tavsiye edilir. Ultra saf su ile yüksek saflıkta hidroksit eluenti hazırlayan EGC-NaOH ile bu kartuşu sürekli saflaştıran CR-ATC'den kolona gelen eluent karbonatsız bir hidroksit eluentidir. Karbonat varlığı, zeminde kaymaya ve analit iletkenliğini düşürür.



şekil 2.10 : IonPac AS20 kolon dolgusunun yapısı.

Şekil 2.11’de AS20 kolonunda ayrılmış yirmiüç anyonun kromatogramı ve verileri verilmiştir.



Şekil 2.11 : AS20 kolonunda ayrımı yapılmış yirmiüç anyon.

Şekil 2.12’de ise (A) kromatogramında AS16 kolonunda perklorat pikinin 4-klorobenzen sülfonat anyonundan ayırlamadığı halde (B) kromatogramında AS20 kolonunda ayrıldığı net bir biçimde görülmektedir.

AS20 kolonunun özellikleri

Boyutları:

IonPac AS20 Analitik kolon : 4x250 mm

IonPac AG20 Guard kolon : 4x50 mm

IonPac AS20 Analitik kolon : 2x250 mm

IonPac AG20 Guard kolon : 2x50 mm

Uygulanabilen maksimum basınç: 3000 psi

Mobil faz uyumu : pH 0-14; % 0-100 HPLC solventleri

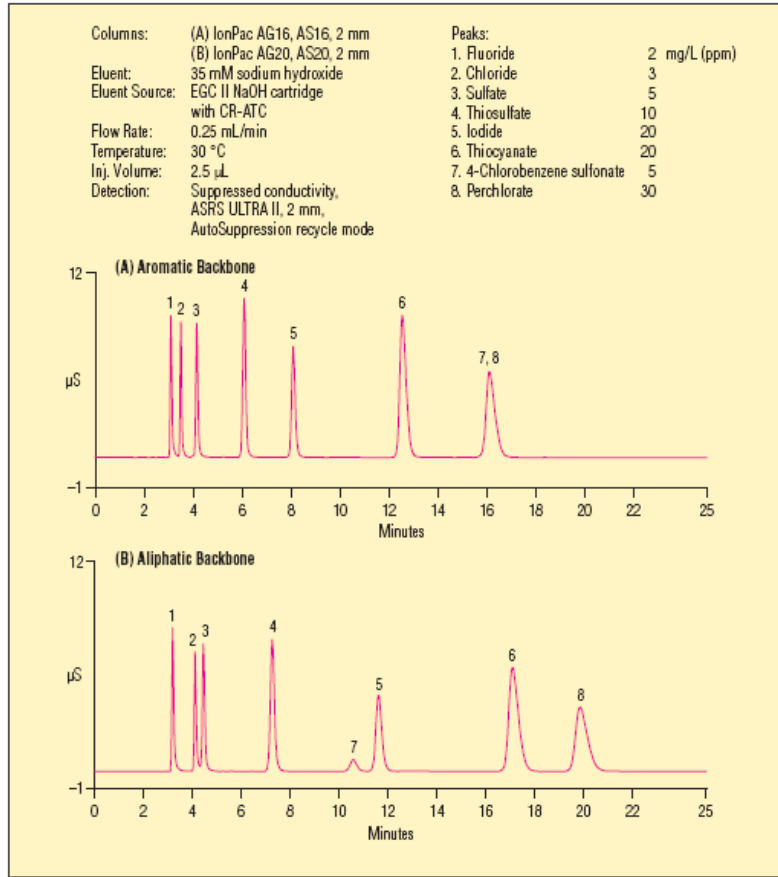
Substrat karakteristikleri (Analitik kolon için):

Süpermakropor reçine

Tanecik çapı : 7,5 μm

Por büyüklüğü : 2000 Å

Çapraz bağlanma (%DVB) : % 55



Şekil 2.12: Anyonların AS16 ile AS20 kolonlarında ayrılımları

Substrat karakteristikleri (Guard kolon için):

Mikropor reçine

Boncuk çapı : 11 μm

Por büyüklüğü : < 1 Å

Çapraz bağlanma (%DVB) : % 55

İyon değiştirici grup:

Fonksiyonel grup : Alkanol kuvaternar amonyum iyon

Fonksiyonel grup karakteristikleri:

Hidrofobikliği çok düşük

Kapasite:

77,5 µeq (2x250 mm kolon); 1,5 µeq (2x50 mm kolon); 310 µeq (4x250 mm kolon);
6 µeq (4x50 mm kolon).

Kolon yapılışı:

PEEK ile 10-32 dişli çember stilinde son bağlanma. Hiçbir bileşen metal değildir.

AS20 kolonları ekonomi ve kullanımda kolaylık bakımından ASRS ULTRA II Supresörleri ile kullanılmalılardır. Kolon sıcaklığı tekrarlanabilirlik açısından kontrollü olmalıdır [2].

3. OROTİK ASİT

Orotik asidin insanların beslenmesinde küçük bir yeri vardır. Süt kesğinde, havuç ve pancar gibi kök bitkilerde bulunur. İnek sütünde, keçi ve koyun sütüne kıyasla yüksek bir miktarda bulunurken anne sütünde bulunmaz [4,5].

Beslenmedeki önemi karaciğer için bir koruma ajanı olmasıdır. Orotik asit, yenidoğan sarılığında, hiperlipoproteinemi durumunda, dejeneratif retinal hastalık ve gut hastalığında tedavi edici olarak kullanılır [6,8] .

Beslenme yoluyla alınan orotik asidin kolesterol seviyesini düşürdüğü saptanmıştır. Fermente süt ürünleri baz alınarak orotik asidin kolesterol düşürücü etkisi üzerinde yapılan bir çalışma Novder ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar yağsız süt ve yağsız yoğurtlardaki orotik asit düzeylerini HPLC tekniğini kullanarak belirlemişler ve çalışma neticesinde yağsız sütte 106,2 ppm, yağsız yoğurtta ise 46,1 ppm düzeyinde orotik asit tespit etmişlerdir. Matyl ve ark. tarafından yağsız süt, yoğurt ve kefirde orotik asit düzeylerinin belirlenmesi üzerine yapılan bir başka çalışmada ise; orotik asit miktarları sırasıyla; yağsız sütte 0,783 mmol/l, yoğurtta 0,331 mmol/L ve kefirde 0,341 mmol/L olarak saptanmıştır. Fermente süt ürünlerinde önemli miktarlarda orotik asit düzeyleri tespit eden araştırmacılar, çalışmalarını orotik asit ve kolesterol arasındaki ilişkiye yöneltmişlerdir. Nitekim orotik asit ve kolesterol arasındaki ilişkiyi baz alan çalışmaların birinde; orotik asit ile beslenen farelerin karaciğerlerindeki yağ asitleri sentezinin azaldığı, triaçilgliserol, fosfolipid ve kolesteril ester miktarında azalma görüldüğü tespit edilmiştir [9].

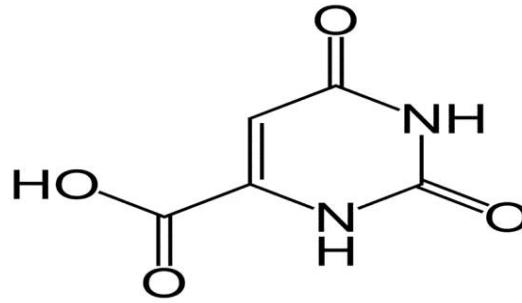
Orotik asit B13 vitamini olarak adlandırılrsa da insan metabolizmasında ve bağırsak florasında üretildiğinden tam olarak vitamin olarak tanımlanmaz [10].

Uzun süreli yüksek konsantrasyondaki orotik aside maruz kalma sağlığa zararlı etkilere yol açabilir. Farelerin beslenmesine eklenen orotik asidin karaciğer yağlanmasına sebep olduğu gözlemlenmiştir [2].

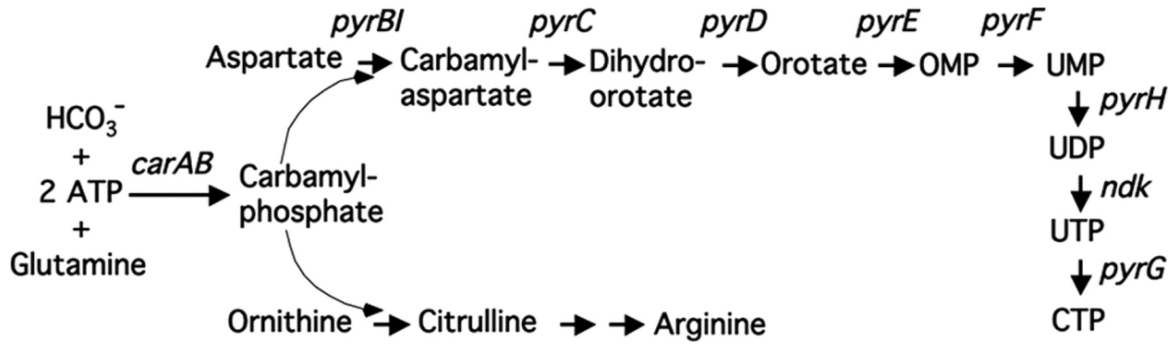
Çizelge 3.1 : İnsan idrarındaki orotik asit miktarının referans değerleri.

Age	n	Orotic acid ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine)	
		Mean	Range
6 days	25	1.77	1.13–2.46
6 months	33	2.61	0.76–4.10
1–5 years	53	1.46	0.68–2.24
6–10 years	47	1.32	0.47–2.19
11–15 years	30	0.66	0.32–0.96
16–40 years	69	0.58	0.41–0.75
≥ 41 years	97	0.76	0.95–1.05

Orotik asitin molekül yapısı Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1 : Orotik asidin molekül yapısı.



Şekil 3.2 : *E. coli* and *Salmonella*’da pirimidin biyosentez şeması.

Orotik asit, de nova pirimidin sentezinin dördüncü ara ürünüdür. Bu sentez, glutamin, 2 mol ATP ve CO_2 den meydana gelen karbomil fosfat ile başlar. Merkez

bileşik üridin 5'-monofosfat (UMP)' dır. Bu bileşik iki enzim ile katalizlenir; orotat fosforibozil transferaz (OPRT) ve orotat monofosfat dekarboksilaz (OPD).

Aiping Liu ve arkadaşları idrardaki organik asitlerin izolasyonunda iyi bir seçicilikte yüksek geri kazanım ve hassasiyette bir metot geliştirebilmek için katı faz ekstraksiyon yöntemini kullanmışlardır. Geliştirilen metotta idrar örneklerinden organik asitlerin izolasyonunu kuvvetli anyon değiştirici kolon kullanarak, miktar analizlerini ise GC/MS sistemi kullanarak gerçekleştirmişlerdir [11].

Shu-Ping Wang, ve Chiou-Shyi Liao kapiler elektroforez yönteminde dedeksiyon limitinin eser miktar analizlerinde tatmin edici olmadığını kaydetmiş ve çalışmalarında iyon çifti kromatografisi (IPC) ile kapiler zon elektroforez (CZE) yöntemlerini optimize ederek geliştirmeyi ve bu iki metodu kıyaslamayı amaçlamışlardır. Sonuçta, önerilen CZE metodu hızlı teşhis konmasında iyi, geri kazanımın yüksek olduğu, keskin ve temiz elektroferogram elde edilebildiği bir yöntem olduğu ve diğer metod olan ICP de halen geçerli kullanışlı ve evrensel bir aparat olduğu ortaya çıkmıştır [10,12,14].

Satoshi Sumi ve arkadaşları çalışmalarında çok sayıda insandan idrar örneği alarak HPLC ile idrardaki orotik asit seviyesini belirleyerek, orotik asidin biyolojik etkisi üzerine odaklanmışlardır [13].

Costantino Salerno ve Carlo Crifo, çalışmalarında insan metabolizmasında döngülerdeki bozuklukların, idrarda orotik asit seviyesindeki artışla bağlantılı olabileceğini göz önünde bulundurarak orotik asidin ayrıştırılması, tespit edilmesi, kantitatif ölçüm yöntemleri üzerinde durmuşlardır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, gaz kromatografisi ve kapiler elektroforez yöntemleri kullanarak yapılan orotik asit analizlerini incelemiş ve karşılaştırmışlardır [10].

Juraj Sevcik ve arkadaşları orotik asidin tayininde kapiler zon elektroforez yöntemini kullanarak, işlemiden geçmemiş idrar örneklerinde analiz yapmışlar ve geliştirdikleri yöntemde analiz süresini 5 dk ve LOQ değerini de 10 µmol/L olarak belirtmişlerdir [14].

A. Fioravanti ve arkadaşları ise yüksek performanslı sıvı kromatografisi C18 kolon ve UV dedektör kullanmış, orotik asidi analizden önce metillendirilmişlerdir [15].

Anja Baumeister, Stephanie Vogelmann ve Lutz Fischer, süt kesiiğinin suyunda yapılan çalışmalarında kuvvetli ve zayıf iyon değiştiriciler, zayıf baēlı metal iyonlarının giderilmesi için şelat kullanmış, orotik asidin baēlanma kapasitesini tespit etmek için farklı miktarlardaki adsorbanlar ile ölçümler yapmışlardır. Orotik asidin pH değişimleri ile okelmesi araştırılmış, ucuz kolay ulaşılabilir adsorbanlar ve ekipmanlar kullanılarak saflaştırma prosesinin uygulanabilirliēi incelenmiştir [16].

Literatürde verilen yöntemler, orotik asidin idrardaki kantitatif analizi için genellikle yüksek performanslı likit kromatografi ve gaz kromatografisi kullanılarak yapılmıştır.

4. METABOLİK HASTALIKLAR

İlk kez 1901’de Sir Archibald Garrod tarafından tanımlanan kalıtsal metabolik hastalık kavramından bugüne kadar teknik ve laboratuvar olanaklarının artmasıyla yaklaşık 200’ü aşkın metabolik hastalık tanımlanmıştır. Bu hastalıklardan bazıları son derece ender görülmekle birlikte, bir bütün olarak değerlendirildiklerinde çocuk sağlığı açısından önemli bir grup oluşturlar [17].

Kalıtsal metabolik hastalıklar yaşamın herhangi bir döneminde bulgu verebilirler, herhangi bir organ sistemini etkileyebilirler veya daha sık görülen birçok çocukluk çağı hastalığını taklit edebilirler.

Metabolik hastalıklar protein, karbonhidrat ve yağ asitlerinin sentezi ya da katabolizması ile ilgili olaylar sonucu gelişen patolojik tablolardır. Metabolik hastalıklar tek tek düşünüldüklerinde nadirdir. Ancak çok sayıda metabolik hastalığın olduğu düşünüldüğünde önemli bir hastalık grubunu oluşturmaktadır. Hemen hepsi otozomal resesif kalıtsal bu hastalıkların akraba evliliğinin yüksek oranda olduğu ülkemizde daha sıklıkla akla gelmesi gerekir.

4.1 Organik Asidemiler

Organik asidemiler amino asit, lipit ve karbonhidrat metabolizmalarındaki doğumsal bozukluklar sonucu gelişen bir grup hastalıktır [18].

Çoğu otozomal resesif geçişli olan bu hastalıklar psikososyal motor gerilik, kusma, sık enfeksiyon geçirme, hipotoni, hipoglisemi, konvülsiyon, metabolik asidoz, ketozis, hiperamonyemi, en-sefalopati, erken ve açıklanamayan ölüm gibi klinik ve laboratuvar bulgularıyla ortaya çıkabilirler [19].

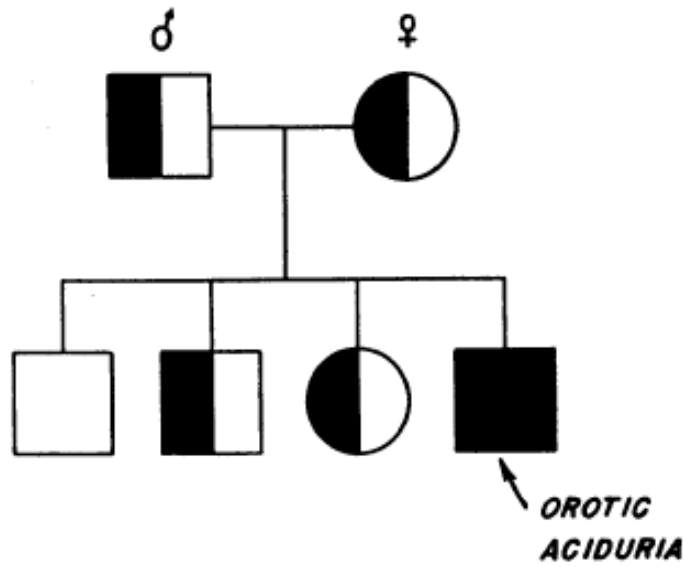
Diğer doğumsal metabolik hastalıklar gibi, organik asidemilerde de erken tanıyı izleyerek başlatılan acil uygun tedavi ile hastalığa bağlı kalıcı organ hasarları önlenilmekte ve ölüm riski azalmaktadır.

4.2 Orotik Asidüri

Pirimidin biyosentezindeki klasik bozukluk orotik asidürüdür. Kalıtsal bir hastalık olan orotik asidüri, gelişmenin gerilemesi ve megaloblastik anemi ile karakterizedir. Şekil 4.1’de orotik asidürinin kalıtsal olarak aktarım modeli gösterilmiştir.

İdrar ile aşırı orotik asit atılmaktadır. Pirimidin sentezinde görevli orotat fosforibozil transferaz ve orotat monofosfat dekarboksilaz enzimlerinin her ikisine veya sadece orotat dekarboksilazın eksikliğine bağlı olarak hastalık ortaya çıkmaktadır [20].

Orotik asit idrar ile vücuttan atıldığı için kan plazması yerine idrardaki tayini tercih edilir. Bu asidin, yetişkin idrarındaki varlığı eser konsantrasyonlarda olmalıdır.



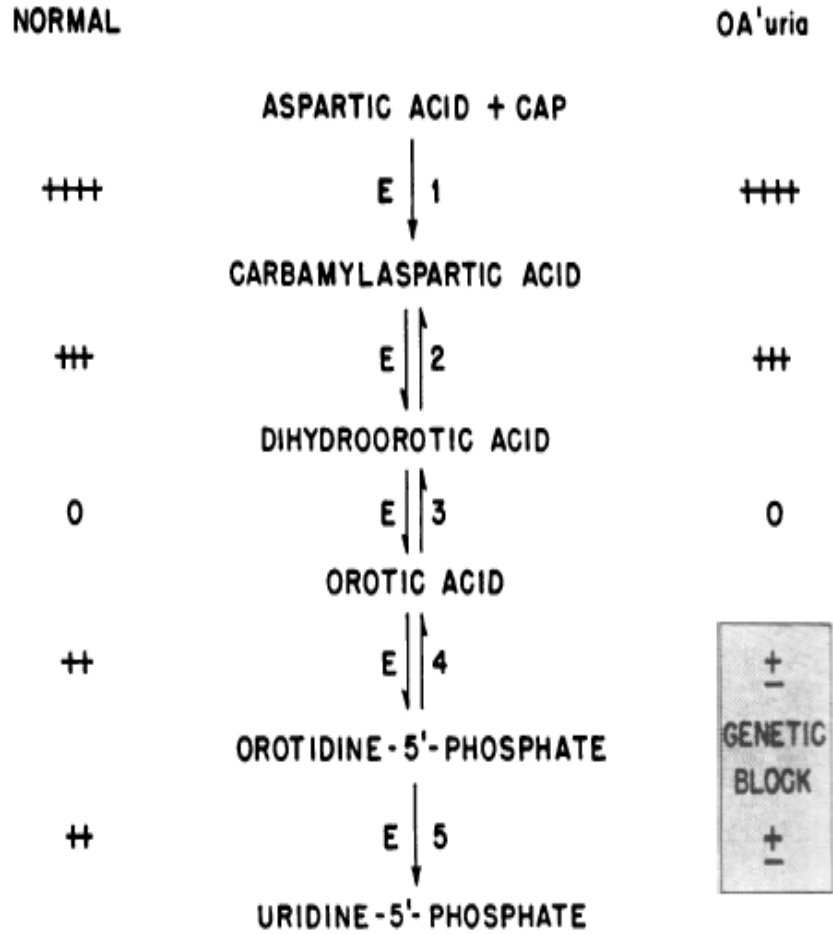
Şekil 4.1 : Orotik asidürinin kalıtsal aktarım modeli.

Şekil 4.2’de orotik asidüri ve sağlıklı insandaki UMP biyosentezine dahil olan enzimlerin özet gösterimi verilmiştir.

Orotik asidüri megaloblastik anemi ile karakterizedir. İlerlemiş durumlarda kristalüri görülür. Orotik asit kristalleri üretra ve üreteral obstriksiyon hematurisi ve azotemiye sebep olur. Fiziksel ve zihinsel gelişimde gecikme görülür [21].

2.2.1 Orotik asidüri tip I

Orotat fosforibozil transferaz ve orotat monofosfat dekarboksilaz enzimlerinde fonksiyon bozukluğu vardır. Hastada, orotik asit kristallüri, megaloblastik anemi, immün sistem bozukluğu bulguları vardır. Ağızdan üridin verilince iyileşir.



Şeki 4.2 : Orotik asidüri ve sağlıklı insandaki UMP biyosentezine dahil olan enzimlerin özet gösterimi. E1: aspartat karbomil transferaz, E2: dihidroorataz, E3: dihidrooroticdehidrogenaz, E4: OPRT, E5: OPD.

4.2.1 Orotik asidüri tip II

Sadece orotat monofosfat dekarboksilaz enziminde fonksiyon bozukluğu vardır. Orotidinüri, orotik asidüri ve megaloblastik anemi bulguları vardır. Ağızdan üridin verilince iyileşir [20].

5. İDRAR ÖRNEKLERİ

İdrarın % 95'ini su, kalan % 5'lik kısmını ise gıda ve metabolizma sonucu oluşan çözünmeyen artıklar oluşturur [22]. Bu artıkların analizi adeta böbrek biyopsisi gibi, böbrek fonksiyonu hakkında çok önemli bilgiler verir [23]. Rutin tanı laboratuvarlarında çalışılan örneklerin önemli bir kısmı idrar örnekleridir. Ucuz, kolay ve hızlı olması dolayısıyla rutinde idrar analizi sık istenmektedir [24].

5.1 İdrar Toplanması ve Saklanması

İdrar analizi için idrar 100 ml'lik, temiz, kuru, tek kullanımlık ve taşınacak ise kapaklı bir kaba konmalıdır. Rutin idrar kapları koruyucu madde içermemelidir. Özel test için koruyucu madde gerekli ise ilave edilmiş olmalı, bu koruyucu madde kabın etiketinde belirtilmelidir.

İdrar kabı üzerinde mutlaka hastaya ait bilgiler bulunmalıdır. Bu bilgiler asla idrar kabının kapağında değil, idrar kabına etiketlenmelidir [26-28]. İdeal olanı oda sıcaklığında 30 dakika içinde analiz yapmaktır. Ancak 2 saat içinde mutlaka analiz yapılmalıdır. Çalışılmıyorsa +4 °C'de 6-8 saat saklanabilir. Ancak analizden önce oda sıcaklığına getirilmelidir [25,26,28].

5.1.1 Sabah ilk idrarı

Rutin idrar analizi için tercih edilen en konsantre ve asidik idrardır. Özellikle hücrelerin değerlendirilmesi, nitrit, protein ve bilirubin tayini için uygundur.

5.1.2 24 Saatlik idrar toplanması

Hastaya 3-5 litrelik temiz, koyu renkli bir kap (polietilen kap tercih edilir) verilir. Sabah uyandıktan sonraki ilk idrar atılır ve saati kaydedilir. O gün ve gece içerisinde idrar toplanır. Ertesi gün aynı saatte yapılan idrar da alınarak laboratuvara ulaştırılır. Serin ve karanlık ortamda saklanmalı, kontaminasyon olmamasına dikkat edilmelidir [25-27].

5.2 İdrarın Fiziksel Özellikleri

5.2.1 İdrar rengi

Normal idrarın rengi sarının tonları şeklinde olabilir. Günlük çıkarılan idrar arttıkça rengi açılır. Konsantre idrar daha koyu, seyreltik idrar ise daha açık renklidir. Sarı tonları haricinde patolojik olarak eritrosit veya hemoglobinden dolayı kırmızı, miyoglobinden dolayı kırmızı-kahverengi renkte, melaninden dolayı siyah renkte görülebilir. İdrarda köpük beyaz ve az miktarda ise normal; beyaz ve büyük oranda ise protein; sarı ve büyük oranda ise bilirubin varlığına işaret eder.

5.2.2 İdrarın berrak olması

Normal idrar berraktır. Ancak üratlar, fosfatlar, karbonatlar, okzalatlar, radyografik maddeler, mukus, squamoz epitel hücreleri, spermatozoa, prostat sıvısı, fekal kontaminasyon, krem ve pudra bulaşması gibi durumlarda idrar bulanık olabilir [22]. Ayrıca idrarda patolojik olarak eritrosit, lökosit, mikroorganizma, renal epitel hücresi, lipid ve taş gibi maddelerin bulunması da idrarı bulanıklaştırır.

5.2.3 İdrarın kokusu

İdrarın kendine has bir kokusu vardır. Meyve kokusu Diabetes Mellitus'u; terli ayak kokusu izovalerik asidemi ve glutarik asidemi; karamela kokusu dallı zincirli amino asitler ve α -keto asitlerinin arttığı akçaağaç şurubu idrar hastalığını; fare idrarı kokusu fenilketonüriyi ve ekşime kokusu tirozinemiye akla getirmelidir [22,25,26].

5.3 İdrarın Kimyasal Özellikleri

İdrarın kimyasal analizi rutin laboratuvarlarda genellikle reaktif emdirilmiş pedler içeren idrar stripleri ile yapılmaktadır. Bu stripler dansite, pH, protein, nitrit, glikoz, bilirubin, ürobilinojen, keton, kan ve lökosit esteraz için reaktif pedlerini içerir.

5.3.1 Dansite-özellik ağırlık

Bir çözeltide birim hacimdeki solütlerin (NaCl, Sulfat, Fosfat, K, Cl) ölçümüdür. Birim hacimdeki idrarın dansitesinin, sabit sıcaklıkta eşit hacimdeki destile suyun birim hacimdeki dansitesine oranıdır. Normalde 1002-1025 arasındadır [28]. Böbreğin idrarı konsantre etme yeteneğini gösterir. Stripe emdirilmiş olan

elektrolitlerin pKa deęerinin deęiřimi prensibine dayanır. Açıęa çıkan H⁺ iyonları pH'yı dūřürür, bu da brom timol mavisinin, maviden sarıya renk deęiřtirmesine neden olur. İdrarda protein ve keton cisimlerinin varlıęında ve de dehidratasyonda idrar dansitesi artar. Diabetes Incipitus, renal yetmezlik, hiperkalsemi ve hipokalemi dūřük dansiteye neden olabilir [29,31].

5.3.2 pH

Normal diyetle beslenen yetişkin bir insanın idrar pH'sı 5-6 civarındadır. Normal idrar pH'sı 4.8 - 7.4 arasında değişebilir [30].

pH'ın ölçölmesi, böbrek enfeksiyonları, taşları ve bazı ilaçların etkilerinin izlenmesi için gereklidir [22,31].

2 saatten fazla bekletilen idrarda amonyak oluşumu sonucu pH artar. Proteinden zengin beslenme, uyku, metabolik asidoz, respiratuvar asidoz, diyare ve dehidratasyon asidik idrar oluşumuna neden olan faktörlerdir. Bikarbonat alınımı, meyve ve sebzelerle tek taraflı beslenme, üriner enfeksiyon, metabolik alkaloz, respiratuvar alkaloz, renal hastalık gibi nedenler de bazik idrar oluşumuna neden olabilir [22,29,31]

6. DENEYSEL KISIM

6.1 Kimyasallar ve Araçlar

Pellet halinde NaOH (pellets pure, min. 97 %) Merck'den (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany), Orotik Asit (≥ 98 %, titration, anhydrous) Sigma'dan (Switzerland) ve C-18 katı faz ekstraksiyon kartuşları Waters-Millipore'dan temin edildi. Kullanılan kuvvetli asit katyon değıştirici reçine Marathon C (Dowex, Italia).

Katı kimyasalların tartımları virgülden sonra dördüncü haneye kadar tartım yapabilen Radwag marka elektronik hassas terazide (Radwag 26-600 Radom, Bracka 28 Street, Poland) yapıldı.

Stok çözeltiler ve eluent için kullanılan ve direnci 18 M Ω 'dan az olmayan ultra saf su, New Human Power I Scholar UV (Human Corporation, Seoul, Korea) su saflaştırma sisteminden edinilmiştir.

6.2 Kullanılan Kromatografi Sistemi

Bu çalışmada DIONEX ICS-3000 (Dionex Corporation, USA) İyon Kromatografi Sistemi kullanılmıştır. Bu sistem, DP-1 çiftli pompa (çalışmada isocratic pompa kullanıldı), tek ve çift pompa sistemlerine uygun EG-2 eluent üreteç, DC-2 Dedektör-Kromatografi Modülü ve otomatik örnekleyici AS kısımlarından oluşmaktadır. Otoörnekleyicinin örnek alma hacmi 25 μ L, sample loop hacmi 10 μ L dir. Eluent üreteç kartuşu, RFIC-Eluent gaz giderici ve devamlı rejenere olan anyon tuzak kolonu CR-ATC kısımlarını içeren EG-2 eluent üreteci istenilen zamanda istenilen konsantrasyonda NaOH'i hazırlayarak eluenti kolona gazı giderilmiş ve anyonlardan arındırılmış olarak verir. DC-2 modülünde kromatografik ayırım bölümünde RFIC TM IonPac® AS20 Analitik (2 x 250 mm) anyon değıştirici kolon ve ön-koruma kolonu RFIC TM IonPac® AG20 Guard (2 x 50 mm) ile dedektör bölümünde ASRS ULTRA II-2 mm supresör ile CD iletkenlik dedektörü bulunmaktadır. AS20 kolonunun reçinesi 7,5 μ m partikül çapında, fonksiyonel grubu

kuaterner amonyum grubu olan divinilbenzen ile çapraz-bağlı süpermakroporöz polivinilbenzil amonyum polimeridir. AS20, polarize olabilen anyonları kısa sürede ayırabilen hidroksit seçici bir anyon değiştirici kolondur. AG20 ise 11 µm partikül çapında reçine bileşimi mikroporöz polivinilbenzen ve fonksiyonel grubu kuaterner amonyum grubu olan, kolonun ön kısmına takılan ve kolonun kirlenmesini önleyen koruyucu (Guard) kolondur. AG20 mikroporöz yapılı olduğundan uzun süre optimum performans göstermektedir. Dedektör olarak CD iletkenlik dedektörü ve supresör olarak da kendini rejenere edebilen ASRS ULTRA II 2 mm kullanılmıştır.

6.3 Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Yaklaşık olarak 0,0252 g orotik asitin UP su ile 250 mL'lik balonjojede çözülmesiyle 100,8 mg/L'lik orotik asit stok çözeltisi hazırlandı. 1M NaOH çözeltisi DI su ile günlük olarak hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler 4 °C 'de muhafaza edildi.

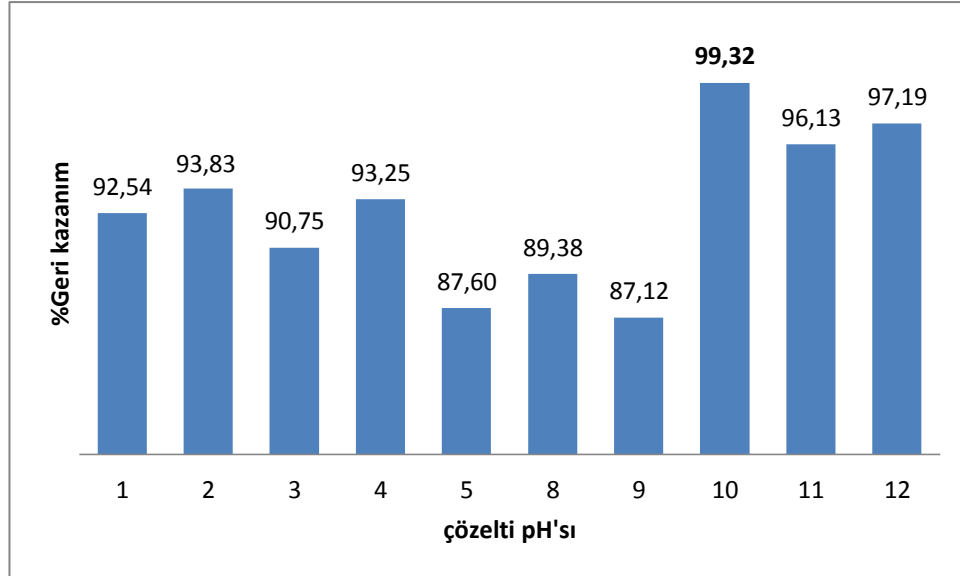
6.4 Ön Denemeler

İyon Kromatografi metoduyla kompleks matriksli örneklerde analizler, yüksek zemin cevabı nedeniyle zordur. Çünkü matriksten gelebilecek pikler orotik asit piki ile karışabilir. Ayrıca matriksin sisteme verebileceği kalıcı hasarlardan (kolon, dedektör ve ara bağlantılarda tıkanma gibi) kaçınmak için idrar gibi kompleks matriksli örnekler kromatografi cihazına verilmeden önce mümkün olabildiğince temizlenmeli ve aynı zamanda da temizleme aşamalarında tayini hedeflenen maddenin konsantrasyonunun azalmamasına dikkat edilmelidir. Bu nedenle idrar temizleme prosedürü oluşturabilmek amacıyla çalışmalarımızın başlangıcında ön denemeler yapılmıştır.

Bu amaçla, Alumina ve silika kartuşlar hazırlanarak 1µg/L orotik asit çözeltisi 1-2 mL/dk hızla bu kartuşlardan geçirildi. Yapılan denemeler sonunda orotik asitin alumina ve silika kartuşlarda önemli derecede ($\approx$ % 97) tutunduğu bulundu. Sırasıyla %5'lik formik asit ve 0,05, 0,1, 0,5 ve 1M NaOH çözeltileri ile kartuşlardan geri alınması denendi ancak eluent çözeltileri ile de yeterince geri alınamadığı ($\approx$ % 7-12) görüldü. Bu nedenle idrar temizleme işlemlerinde alumina ve silika kartuşlar kullanılmadı.

İki adet 10 mg/L orotik asit standart çözeltileri -20 °C’de bir gece bekletildi. Dondurulan çözeltilerden biri oda sıcaklığında çözülürken diğeri 70 °C sıcaklıktaki su banyosunda çözülüp oda sıcaklığına getirildi. Çözeltiler 0,2 mikron PES filtrelerden geçirilerek iyon kromatografi sisteminde analiz edildi. Geri kazanımlar sırasıyla; % 94 ve % 97 olarak belirlendi.

C-18 katı faz ekstraksiyon kartuşlarının hangi pH’larda kullanılmasının orotik asit tayini için uygun olduğunu belirlemek için pH’ları 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11 ve 12 olan 1 mg/L orotik asit çözeltileri hazırlandı. Farklı pH’lardaki bu çözeltiler 1-2 mL/dk hızla C-18 SPE kartuşlardan geçirilerek orotik asit miktarları tayin edildi. Efluent çözeltilerindeki orotik asit miktarları Şekil 6.1’de % geri kazanım olarak verilmiştir.



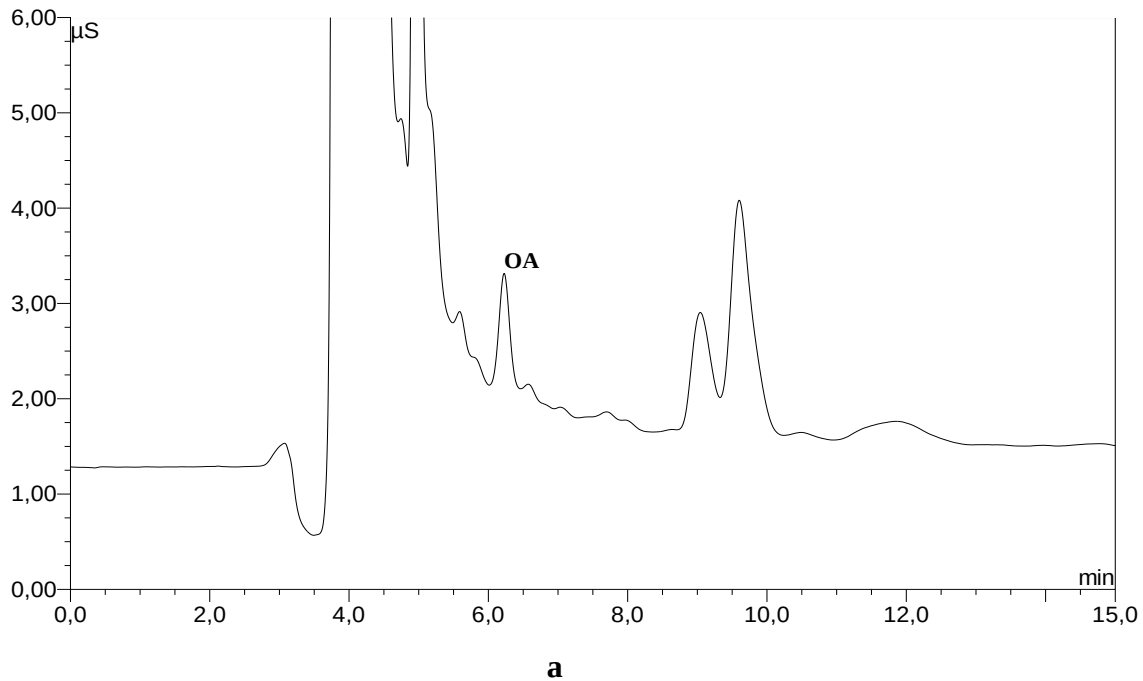
Şekil 6.1: Farklı pH’lardaki 1 µg/L orotik asit çözeltisinin C18 kartuştan geçirilmesiyle elde edilen geri kazanımlar.

İdrar temizleme prosedürlerinde, protonlanabilen amin gruplarını elimine etmek için genellikle katyon değiştirici reçineler kullanılır [32]. Çalışmalarımızda da katyon değiştirici reçinelerin kullanımının orotik asit tayinine uygulanıp uygulanamayacağını araştırmak amacıyla şişmiş kuvvetli katyon değiştirici reçine 0,2 mg/L orotik asit standart çözeltisiyle 20 dk muamele edildi ve orotik asit tayin edildi (% 95). Elde edilen sonuçlardan orotik asitin kuvvetli katyon değiştiricide tutunmadığı belirlendiği için temizleme prosedürünün bir aşamasında kullanılmasına karar verildi.

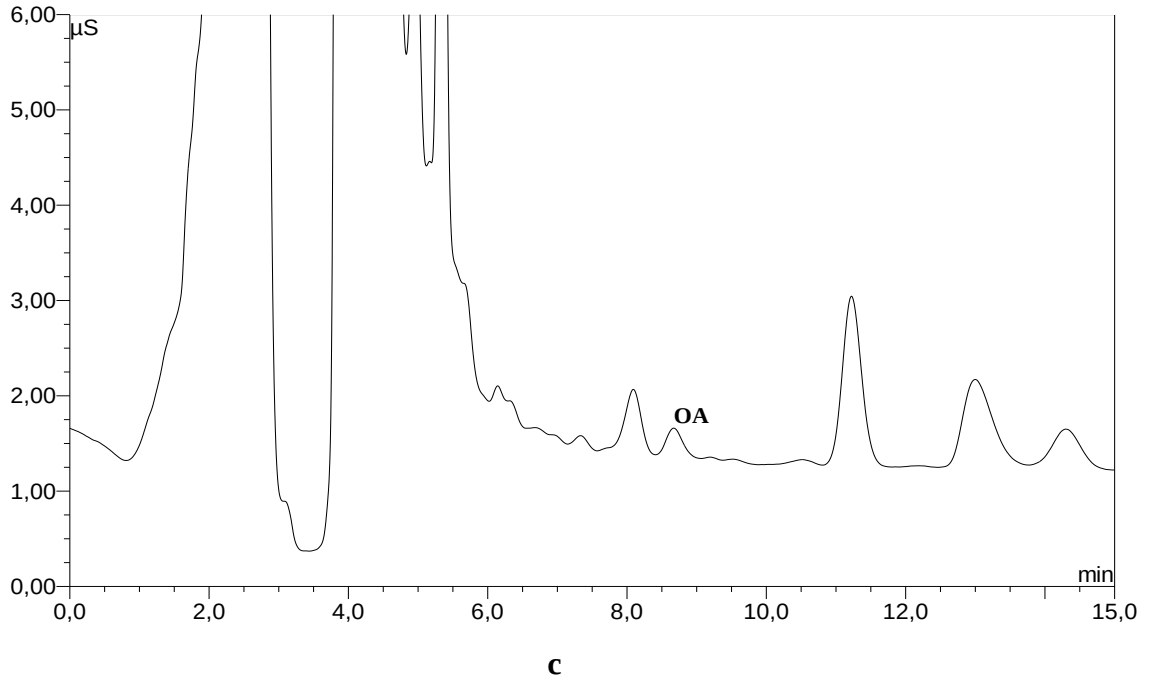
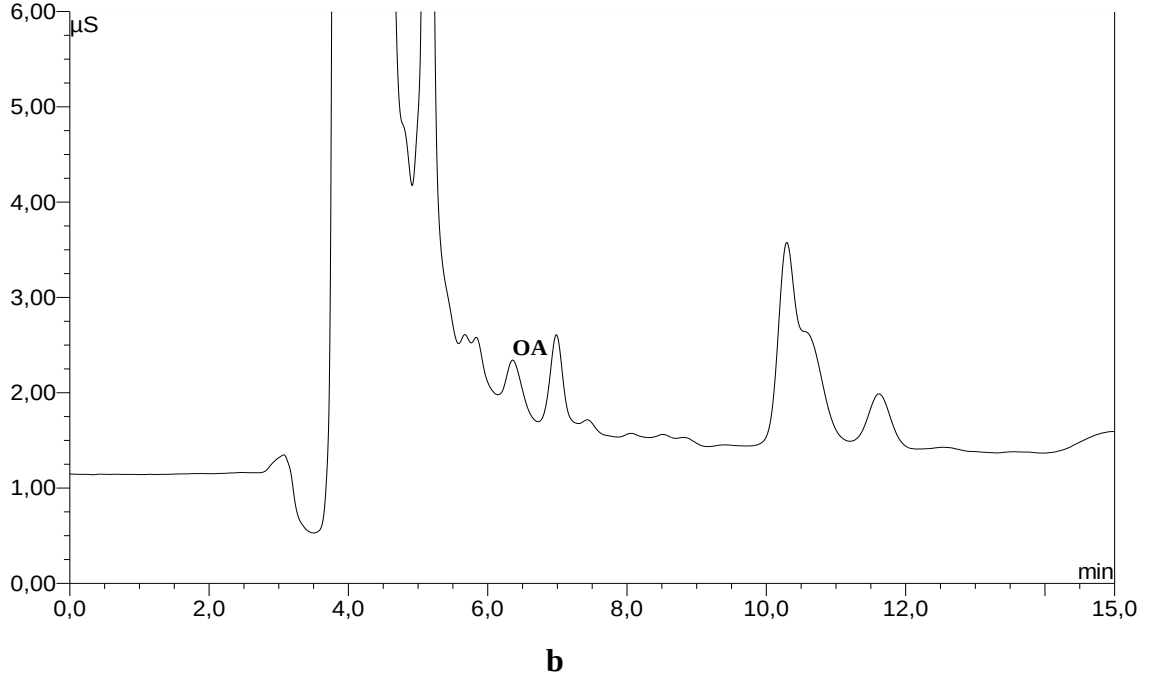
6.5 Metot Geliştirme ve Optimizasyon

6.5.1. İdrar örneklerinin analize hazır hale getirilmesi

Orotik asidüri hastalığı teşhis edilmiş erkek çocuğundan (gönüllü) alınan idrar örneği -20 °C’da donduruldu ve analiz edilene kadar bu şekilde saklandı. 70 °C’deki su banyosunda çözüldü ve oda sıcaklığına gelmesi için bekletildi. 12,250xg’de 40 dakika santrifüj edildi ve 0,2 mikron PES filtreden geçirildi. Filtrelenen örnekler 1:250 ve 1:100 oranında UP su ile seyreltildi. 5 mL seyreltilmiş örnek yaklaşık olarak 1,4 g şişmiş kuvvetli katyon değiştirici reçine ile 20 dk muamele edildi. NaOH çözeltisi ile pH’ları yaklaşık olarak 10’a ayarlanan örnekler C-18 katı faz ekstraksiyon kartuşundan 1-2 mL/dk hızla geçirilerek toplandı ve tekrar 0,2 mikron PES filtreden geçirildi. Çeşitli yöntemlerle iyon kromatografi-kondüktivite dedektör ile eluent konsantrasyonu 60 mM NaOH, supresor akımı 38 mA, kolon sıcaklığı 30 °C, dedektör hücre sıcaklığı 35 °C, akış hızı 0,250 mL/dk ve sample loop hacminin 100 µL olduğu 60 mM isoc yöntemi ile analiz edildi. 1:250 seyreltme oranında alınan kromatogramlar Şekil 6.5 de görülmektedir.

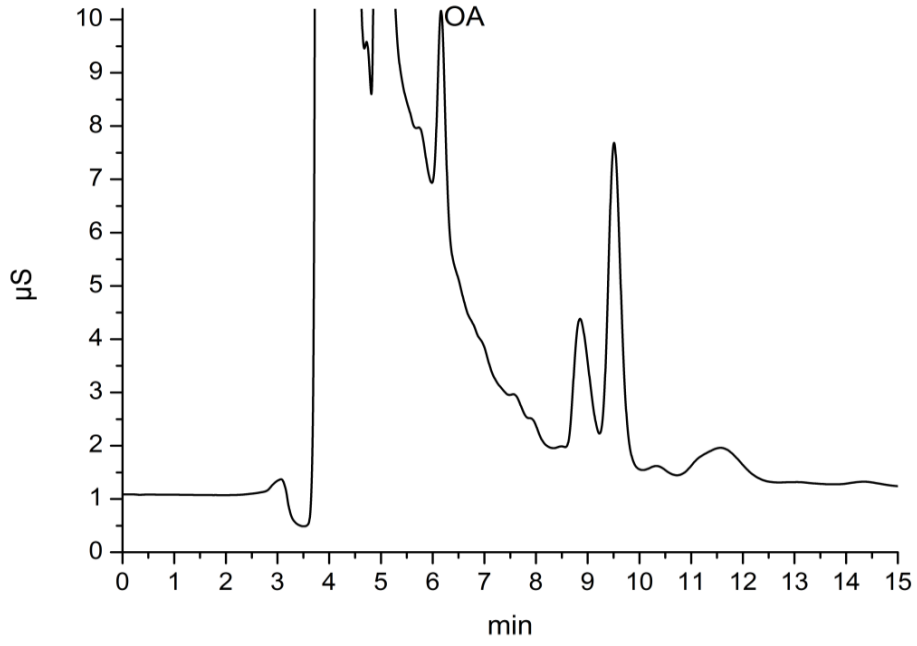


Şekil 6.2: 1:250 seyreltilmiş patolojik idrar numunesinin a) 80 mM isoc b) 70 mM isoc c) 60 mM isoc alınan kromatogramlar (tR sırasıyla; 6,2, 6,4, 8,5 dk).

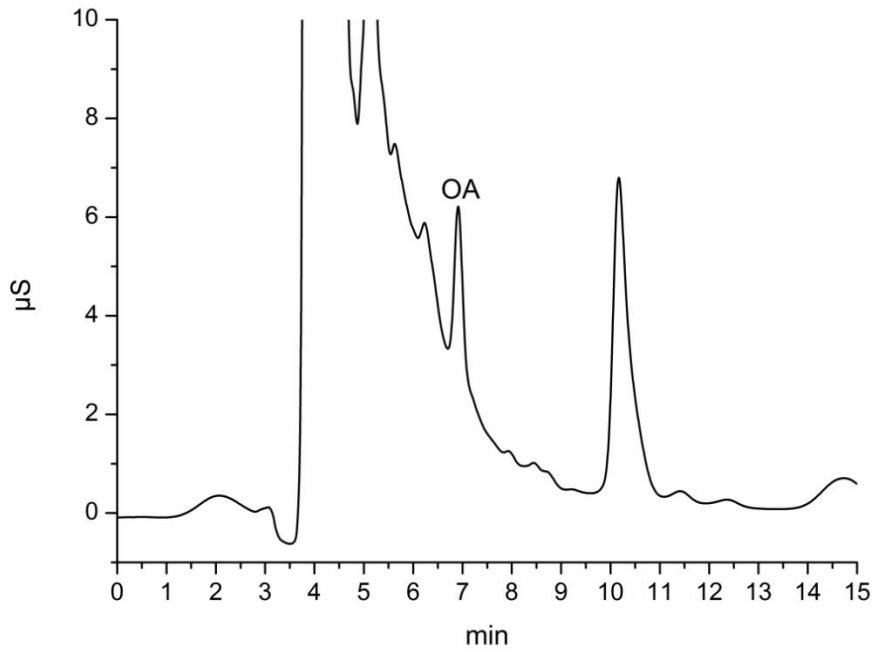


Şekil 6.2 (devam) : 1:250 seyreltilmiş patolojik idrar numunesinin a) 80 mM isoc b) 70 mM isoc c) 60 mM isoc alınan kromatogramlar (tR sırasıyla; 6,2, 6,4, 8,5 dk).

1:250 seyreltilmiş örneklerden alınan kromatogramlarda orotik asit piklerinin belirgin olmadığı görüldü. Bu nedenle aynı deneyler 1:100 seyreltme oranı için 60 mM isoc yöntemi ile yapıldı (Şekil 6.3).

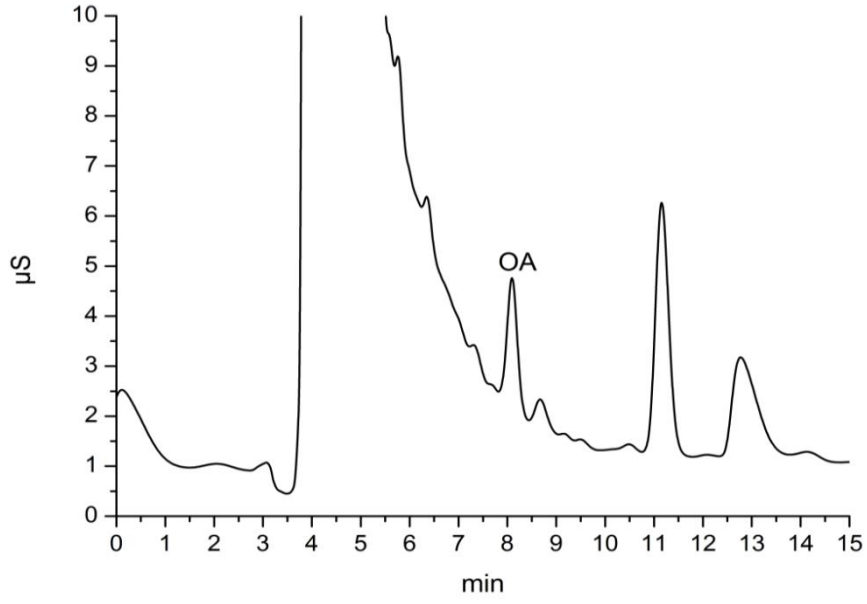


a

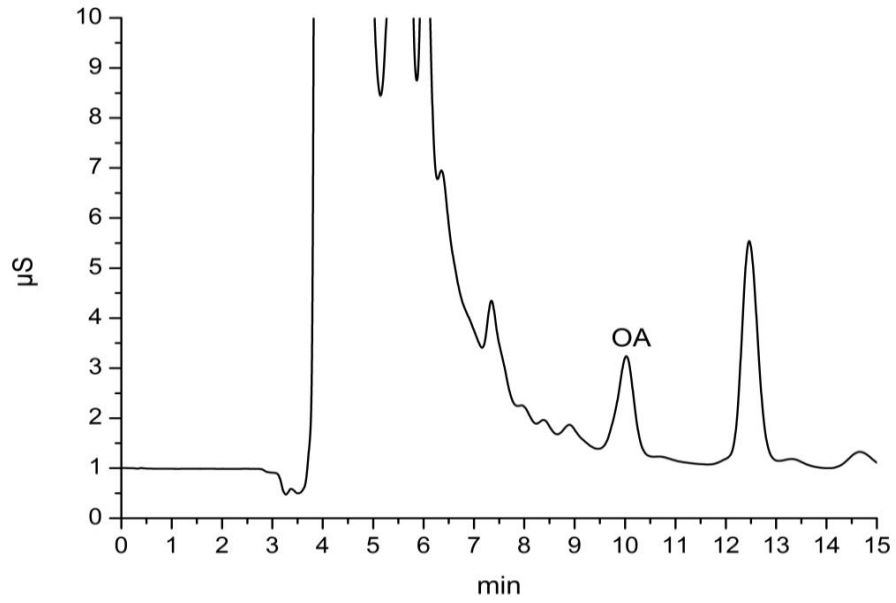


b

Şekil 6.3: 1:100 seyreltilmiş patolojik idrar numunesinin a) 80mM NaOH izoc b) 70 mM izoc c) 60 mM izoc d) 50 mM isoc yöntemleriyle alınan kromatogramları (t_R sırasıyla; 6,1, 6,9, 8,1, 10,0 dk).



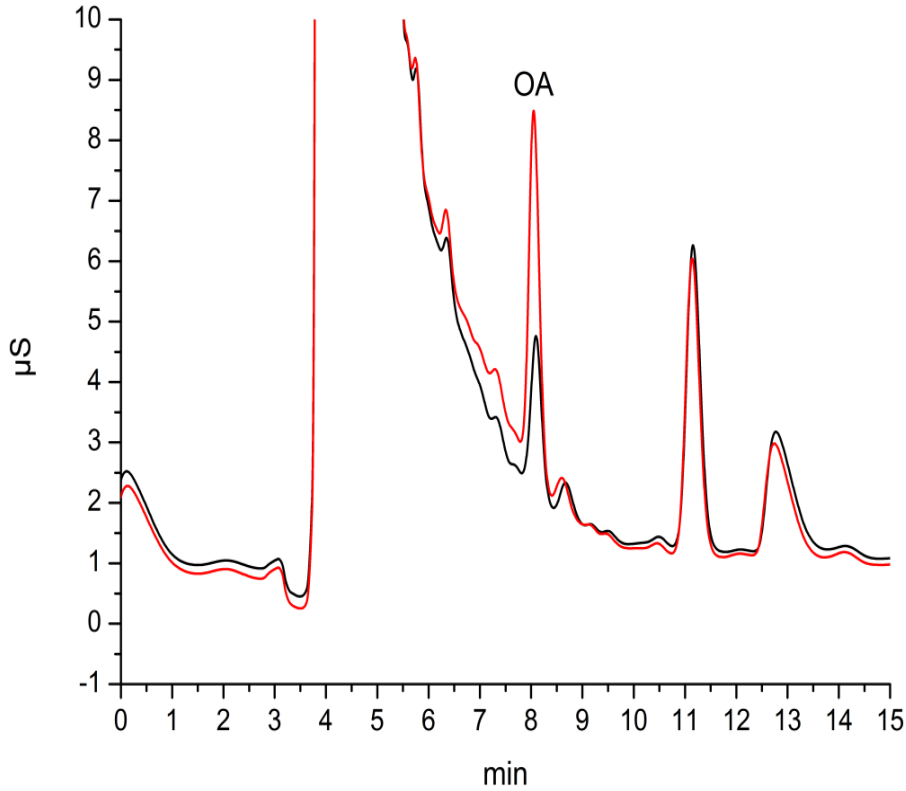
c



d

Şekil 6.3 (devam) : 1:100 seyreltilmiş patolojik idrar numunesinin a) 80mM NaOH izoc b) 70 mM izoc c) 60 mM izoc d) 50 mM isoc yöntemleriyle alınan kromatogramları (t_R sırasıyla; 6,1, 6,9, 8,1, 10,0 dk).

1:100 seyreltme oranının orotik asit tayini için uygun olduğu ve en doğru analizin eluent olarak 60 mM isoc yönteminin kullanıldığı şartlar olduğu bulundu. Orotik asit pikinin yerini belirlemek amacıyla aynı idrar örneğine OA standardı ilave edildi ve kromatogramı alındı (Şekil 6.4).



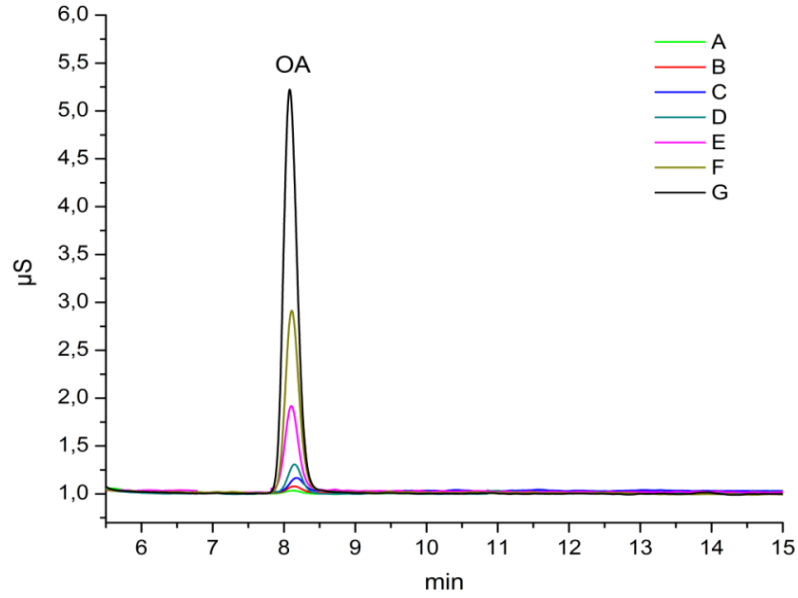
Şekil 6.4 : 1:100 seyreltilmiş patolojik idrar (siyah kromatogram) ve OA standardı eklendikten sonra aynı idrar örneğinin kromatogramları (kırmızı kromatogram).

6.5.2 Kreatinin ölçümü

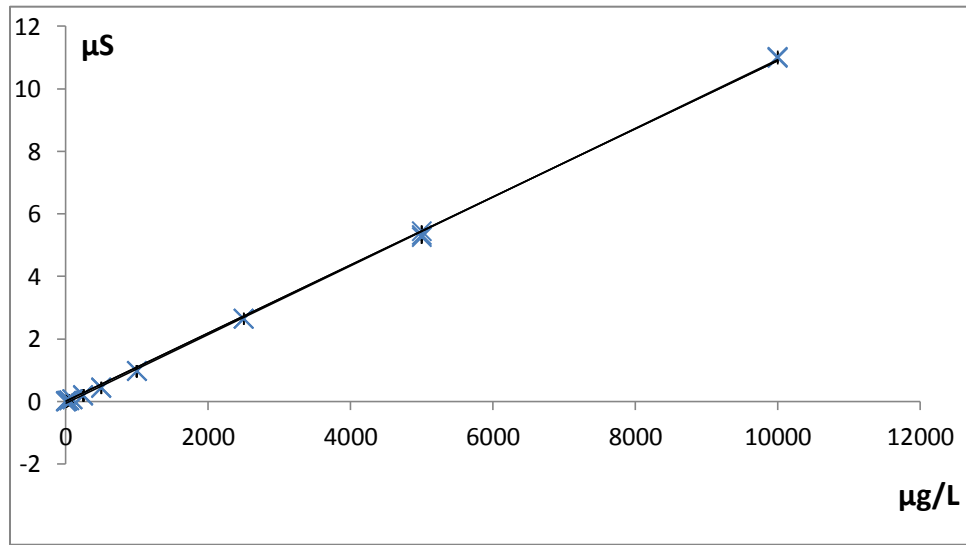
Hasta ve sağlıklı insandan toplanan idrar örneklerinde kreatinin değerleri İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Merkez Laboratuvarı'nda P800 Modular (Roche-Hitachi, Mannheim/Germany) kullanılarak, ticari kit ile analiz edildi. Yöntemin temeli Jaffe reaksiyonu ile Folin metoduna dayanmaktadır. Sağlıklı ve hasta idrarlarındaki kreatinin seviyeleri sırasıyla 8.5 mg/dL ve 88 mg/dL olarak ölçüldü. Çalışmada OA konsantrasyonları idrardaki kreatinin konsantrasyonları ile oranlanarak verildi ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatinin).

6.6 Kalibrasyon Grafiği

10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/L orotik asit standart çözeltilerinin 60 mM NaOH eluent kullanılarak alınan kromatogramları ve 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000 ve 10000 µg/L orotik asit standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi Şekil 6.5’de verilmiştir.



a



b

Şekil 6.5 : a) 10 – 1000 µg/L orotik asit standart çözeltilerinin 60mM NaOH eluenti ile alınan kromatogramları; b) 10 – 10000 µg/L kalibrasyon eğrisi ($R^2=0,9994$).

6.7 Geri Kazanma ve Tekrarlanabilirlik Çalışmaları

100 mg/L standart orotik asit çözeltisinden 300 µL ve 500 µL alınarak sağlıklı insandan alınan idrar örneği ile 10'ar mL'ye tamamlandı ve çalkalandı. Bir gece - 20 °C'de dondurulduktan sonra 70 °C'deki su banyosunda çözüldü. Oda sıcaklığına gelmesi için bekletildi. Oda sıcaklığına gelen spike yapılmış idrar örnekleri daha önce santrifüj için optimize edilen koşullar olan 12,250 g ve 40 dk'da santrifüj yapıldı. Santrifüj yapılan idrar örnekleri steril şırınga yardımıyla 0,2 mikron PES filtreden geçirildi. Örneklerden 1000 µl alınarak 10 mL'ye UP su ile seyreltildi. Homojen olana kadar çalkalandı. Aynı işlemler spike yapılmamış idrar örneklerine de uygulandı. 3 mg/L ve 5 mg/L spike yapılmış idrar örnekleri 1:10 seyreltildi. 1:10 seyrelme hesaba katıldığında spike konsantrasyonu 300 µg/L ve 500 µg/L olan idrar örnekleri, 10 mL kapaklı tüp içine alındı. Şişmiş kuvvetli katyon değiştirici reçine süzgeç kağıdı yardımıyla fazla sudan uzaklaştırıldı ve örneklerin bulunduğu her bir tüpe yaklaşık olarak 2,8 g reçine eklendi. 20 dk çalkalanarak muamele edildi. Bir kez daha filtreden geçirilen örneklerden 7 mL alınarak NaOH çözeltisi ile pH yaklaşık olarak 10'a yükseltildi. Örnekler C-18 katı faz ekstraksiyon kartuşundan 1-2 mL/dk hızla geçirilerek toplandı. Hazırlanan örnekler eluet konsantrasyonu 60 mM NaOH, supresor akımı 38 mA, kolon sıcaklığı 30 °C, dedektör hücre sıcaklığı 35 °C, akış hızı 0,250 mL/dk ve sample loop hacminin 100 µL kromatografi şartlarında analiz edilmek üzere IC cihazına verildi. Geri kazanım sırasıyla % 86,74 ve % 90,73 olarak hesaplandı. Çizelge 6.1'de farklı konsantrasyonlardaki OA standart çözeltilerinin geri kazanım çalışmalarının sonuçları verilmiştir.

Hasta idrarında 47,55 µmol/mmol kreatinin orotik asit bulundu. Yöntem için LOD değeri 32 nmol/L ve LOQ değeri ise 106,77 nmol/L olarak hesaplandı.

Tekrarlanabilirlik çalışmaları için ise 100 mg/L orotik asit standart çözeltisinden 500 µL ve 250 µL alınarak 25'er mL'ye UP su ile tamamlanarak 0,5 mg/L ve 1 mg/L konsantrasyonlarına seyreltildi. Bu çözeltiler PES filtreden geçirilerek 60 mM isoc yöntemi kullanılarak IC ile analiz edildi. Bu çalışma günler arası karşılaştırmalar yapılabilmesi için altı gün tekrarlandı. Alınan sonuçlar gün-içi ve günler-arası %RSD değerlerinin hesaplanması için kullanıldı. Çizelge 6.2'de tekrarlanabilirlik çalışması için hazırlanan 0.5 mgL⁻¹ ve 1.0 mgL⁻¹ OA standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası % RSD değerleri verilmiştir.

Çizelge 6.1 Farklı konsantrasyonlardaki OA standart çözeltilerinin % geri kazanım ve % RSD değerleri.

Farklı konsantrasyonlarda OA geri kazanımı			
Eklenen	Bulunan	% Geri kazanım	%RSD
5 mg/L	4,53 mg/L	90,73	1,54
3 mg/L	2,60 mg/L	86,74	0,61

Çizelge 6.2 : Tekrarlanabilirlik çalışması için hazırlanan 0.5 mgL⁻¹ ve 1.0 mgL⁻¹ OA standart çözeltilerinin gün-içi ve günler- arası %RSD değerleri.

	0.5 mgL ⁻¹ OA		1.0 mgL ⁻¹ OA	
	Alıkonma zamanı (dk)	Pik alanı (μS dk)	Alıkonma zamanı (dk)	Pik alanı (μS dk)
Ortalama	8.067	0.478	8.032	0.952
Gün içi RSD (% , n=6)	0.097	0.826	0.099	3.804
Günler arası RSD (% , n=6)	0.06	0.25	0.066	0.254

7. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

İnsan idrarında yapılan analizlerle orotik asidin tayini özellikle kalıtımsal bazı rahatsızlıkların teşhisinde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca başta karaciğer olmak üzere kanserojen yapıların ilerlemesi ile idrardaki orotik asit miktarının bağlantısı vardır. Bu nedenle birçok rahatsızlığın erken teşhisinde idrardaki orotik asit miktarının doğru ve hızlı ölçümü önemlidir.

Bu çalışmada, insan idrarında orotik asit tayini için güvenilir, hızlı ve basit bir kromatografik yöntem geliştirilmiştir. Literatürdeki diğer kromatografik yöntemlerle kıyaslandığında geliştirilen yöntem uzun örnek hazırlama ya da matrix temizleme işlemlerine ihtiyaç duymaz. Ayrıca mobil faz olarak organik çözücü içermediğinden atıklar çevreye zararlı değildir. Geliştirilen yöntem, kolay olması, yüksek hassasiyete sahip olması ve doğruluk açısından avantajlara sahiptir. Metod insan idrarında orotik asidin rutin klinik analizleri için uygundur.

Çalışmada gradient ve izokritik elüsyon kullanılan farklı kromatografik şartlar denenmiştir. Kromatografik şartlar en iyi ayrımın gözlenebildiği ve en kısa sürede cevap veren analiz gerçekleştirilene kadar geliştirilmiştir. Sonuç olarak eluent konsantrasyonu 60 mM, supresor akımı 38 mA, kolon sıcaklığı 30 °C, dedektör hücre sıcaklığı 35 °C, akış hızı 0,250 mL/dk ve sample loop hacminin 100 µL olduğu isoc 60 mM yöntemi en uygun method olarak belirlenmiştir. Bu yöntem ile patolojik idrarda kantitatif analizler yapılmıştır. Hesaplanan sonuçlar patolojik idrar örneğinde orotik asit miktarının 47,55 µmol/mmol kreatinin olduğunu göstermiştir. Sağlıklı insanlardan alından idrar örnkelerinde ise değerler değişmekle birlikte ortalama olarak 0,67 µmol/mmol kreatinin civarında bulunmuştur. Bu yöntemin avantajlarından biri de 1:100 seyrelme uygulandığında dahi anlamlı sonuçlar elde edilmektedir. Bu da küçük miktarlardaki idrar örnekleriyle bile çalışılabilme olanağını sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] **Marca, G., Casetta, B., ve Zammarchi, E.** (2003). Rapid determination of orotic acid in urine by fast liquid chromatography/tandem mass spectrometric method, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 788-793.
- [2] **Aoyama, Y., Wada, M., ve Morifuji, M.** (2001). Orotic acid added to casein, but not to egg protein, soy protein, or wheat gluten diets increases 1,2-diacylglycerol levels and lowers superoxide dismutase activities in rat liver, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 2166.
- [3] **Dionex Reference Library Support**, 2007. (CD-ROM).
- [4] **Empie, M. W. ve Melachouris, N.** (1978). Determination of orotic acid in whey and modified whey products, *J. Dairy Sci.*, **61**, 683-687.
- [5] **Grobner, W. ve Zollner, N.** (1977). The influence of dietary purines and pyrimidines on purine and pyrimidine biosynthesis in man, *Transfusion on Medicine and Hemotherapy*, **4**, 305-307.
- [6] **Hinkel, G. K., Kintzel, H. W. ve Schwarze, R.** (1971). The decrease in the serum bilirubin level in premature infants by orotic acid, *Acta Paediatrica*, **60**, 1-5.
- [7] **Muller, G.** (1984). Metabolic effects of orotic acid, *Z. Gesamte Inn. Med.*, **39**, 269-273.
- [8] **Collipp, P.** (1987). Orotic acid, inosine and nucleosides in the treatment of degenerative retinal diseases: a double blind study, *Curr. Ther. Res.*, **41**, 135-151.
- [9] **Navder, P. K., Fryer, E. B. ve Fryer, H. C.** (1990). Effects of skim milk, skim milk yogurt, orotic acid and uric acid on lipid metabolism in rats, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **1**, 640-646.
- [10] **Salerno, C. ve Crifo, C.** (2002). Diagnostic value of urinary orotic acid levels: applicable separation methods, *Journal of Chromatography B*, **781**, 57-71.
- [11] **Liu, A., Kushnir, M. M., Roberts, W. L. ve Pasquali, M.** (2004). Solid phase extraction procedure for urinary organic acid analysis by gas chromatography mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, **806**, 283-287.
- [12] **Huřková, R., Barták, P., Čáp, L., Friedecký, D. ve Adamb, T.** (2004). Analytical derivatization—a tool for determination of orotic acid, *Journal of Chromatography B*, **799**, 303-309.
- [13] **Sumi, S., Kidouchi, K., Imaeda, M., Asai, M., Ito, T. ve Wada, Y.** (1997). Urinary orotic acid in healthy adults and patients with various diseases, *Clinica Chimica Acta*, **266**, 195-197.

- [14] **Svevclik, J., Adam, T. ve Sfizelc, V.** (1977). A rapid and simple screening method for detection of orotic aciduria by capillary zone electrophoresis, *Clinica Chimica Acta*, **259**, 73-81.
- [15] **Fioravanti, A., Flaviani, M., Gambelunghe, C., Micheletti, A., Sposito, M. ve Rufini, S.** (1977). High-performance liquid chromatographic determination of orotic acid as its methyl derivative in human urine, *Journal of Chromatography B*, **703**, 263-266.
- [16] **Baumeister, A., Vogelmann, S. ve Fischer, V.** (2003). Concentration and purification of orotic acid directly from whey with an expanded bed adsorption system, *Journal of Chromatography A*, **1006**, 261-265.
- [17] **Clarke, J.** (1996). *A clinical guide to inherited metabolic disease*, UK: Cambridge University Press.
- [18] **Chalmers, R. A. ve Lawson, A. M.** (1982). *Organic acids in man*, London: Chapman and Hall.
- [19] **Brandt, N. J.** (1984). Symptoms and signs in organic acidurias, *J. Inher. Metab. Dis*, **7**, 1-23.
- [20] **Onat, T., Emerk, K. ve Sözmen, E. S.** (ed.) (2002). *İnsan biyokimyası*, Ankara: Palme Yay.
- [21] **Nyhan, W. L.** (2005). Disorders of purine and pyrimidine metabolism, *Molecular Genetics and Metabolism*, **86**, 25-33.
- [22] **Brunzel, N. A.** (2004). *Fundamentals of urine and body fluid analysis* (2. basım), PhiladelphiaPA: Elsevier.
- [23] **Abirami, K. ve Tiwari, S. C.** (2001). Urinalysis in clinical practice, *Indian Academy of Clinical Medicine*, **2**, 39-50.
- [24] **Memişoğulları, R., Yüksel H., Yıldırım H. A. ve Yavuz Ö.** (Baskıda) Performance characteristics of dipstick and microscopic urinalysis for diagnosis of urinary tract infection, *Eur J Gen Med*.
- [25] **Burtis, C. A., Ashwood, E. R. ve Bruns, D. E.** (2006). *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics* (6. basım), Missouri: Elsevier Saunders.
- [26] **Rabinovitch, A.** (2001). *Urinalysis and collection, transportation and preservation of urine specimens*, Wayne, Pa.: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- [27] **Lifshitz, E. ve Kramer, L.** (2000). Outpatient urine culture does collection technique matter?, *Arch Intern Med*, **160**, 2537-2540.
- [28] **Alan, H. B.** (2006). *Tietz clinical guide to laboratory* (4. basım.), USA: WB Saunders Company.
- [29] **Sözmen, E., Akçay, Y. ve Sezer, E.** (2004). *İdrar analizi ve klinik kullanımı*, İzmir: Meta Basım.
- [30] **Heil, W., Koberstain, R. ve Zawta, B.** (2004). *Referange ranges for adults and children Pre-Analytical considerations*, Mannheim: Roche diagnostics GmbH.

- [31] **Wilson, L. A.** (2005). Urinalysis, *Nursing Standard*, **19**, 51-54.
- [32] **Martinelango, P. K., Gümüş, G. ve Dasgupta, P. K.** (2006). Matrix interference free determination of perchlorate in urine by ion association ion chromatography/mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **567**, 79-86.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Damla ZEYDANLI

Doğum Yeri ve Tarihi: İSTANBUL 10.07.1985

Adres: Beylikdüzü/İstanbul

E-Posta: dzeydanli@itu.edu.tr

Lisans: Kocaeli Üniversitesi – 2010

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

Zeydanlı D., Destanoğlu O. ve Yılmaz G.G., ‘Ion chromatographic determination of orotic acid in urine samples after elimination of matrix effect.’ 29th International Symposium on Chromatography Torun, Poland. September 9-13, 2012