

**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İYON KROMATOĞRAFI KULLANARAK ÇEŞİTLİ ÖRNEKLERDE  
PERKLORAT ANALİZİ  
(MUSLUK SUYU, HAVUZ SUYU, YÜZEY SUYU, SÜT)**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Burcu UÇAR**

**Anabilim Dalı : Kimya**

**Programı : Kimya**

**EYLÜL 2011**



**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İYON KROMATOĞRAFI KULLANARAK ÇEŞİTLİ ÖRNEKLERDE  
PERKlorat ANALİZİ  
(MUSLUK SUYU, HAVUZ SUYU, YÜZEY SUYU, SÜT)**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Burcu UÇAR  
(509091033)**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 26 Ağustos 2011  
Tezin Savunulduğu Tarih : 23 Eylül 2011**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Gülçin Gümüş Yılmaz (İTÜ)  
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Birsen Demirata Öztürk (İTÜ)  
Yrd. Doç. Dr. Kevser Sözgen (İÜ)**

**EYLÜL 2011**



*Herşeyimi borçlu olduğum canım aileme,*



## ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince bana en doğru yolu gösteren, yardımlarını asla esirgemeyen ve her konuda bana duyduğu güveniyle güçlü hissettiren çok değerli hocam Sn. Doç. Dr. Gülçin GÜMÜŞ YILMAZ' a;

Analitik Kimya Anabilim Dalı' nın tüm imkanlarından yararlanmama olanak sağlayan ve tezimin jürisine katılarak değerli yorumlarıyla çalışmamın kıymetini arttıran bölüm başkanımız Sn. Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK' e;

Etkili ve değerli yorumlarıyla tez savunma sınavı jürimde yer almasından onur ve mutluluk duyduğum Sn. Yrd. Doç. Dr. Kevser SÖZGEN' e;

Laboratuvar çalışmalarında bana destek veren Araş. Gör. Orhan DESTANOĞLU' na, tüm analitik kimya anabilim dalı asistanlarına; Bıçak ve Topçu Lab.' daki tüm arkadaşlarıma ve dostlukları gülümsemeyle hatırlanacak uno grubuna;

Bu tezin hazırlanmasında yardımlarını bir an bile esirgemediği için değerli arkadaşım Anıl YILMAZ' a;

Doğumuyla hayatıma renk katan, daima ailemin bir bireyi olarak gördüğüm manevi kardeşim Halil Can ÖÇGÜDER ve değerli ailesine, bana böylesine inandıkları, güvendikleri ve maneviyatları için;

Tanıştığımız ilk andan itibaren hayatımı en güzel kılan ve en zor anlarımda en yakınımda olan, en sevgi dolu insan Kayhan GÖÇER' e;

Yaşamımın her anında maddi manevi desteklerini daima hissettiğim, haklarını asla ödeyemeyeceğim çok kıymetli ailem, babam Nihat UÇAR, annem Semiya UÇAR, ablam Şenay ERDEM ve benim için bir abiden farkı olmayan eniştem Uğur ERDEM' e;

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ağustos 2011

Burcu Uçar  
(Kimyager)





## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vii
KISALTMALAR .....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xv
SUMMARY .....	xvii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORİK KISIM .....</b>	<b>3</b>
2.1 Kromatografi .....	3
2.1.1 Kromatografinin genel tanımı.....	3
2.1.2 Kromatografinin ilkeleri .....	4
2.1.3 Kromatografik teknikler .....	4
2.2 İyon-Değiştirme Kromatografi (Ion-Exchange Chromatography, IE).....	5
2.2.1 Dolgu materyalleri .....	6
2.2.2 Alıkonma parametreleri .....	9
2.2.3 Bant genişliği .....	9
2.2.4 Kolon verimliliği .....	10
2.2.5 İyon-değiştirme dengeleri .....	11
<b>3. ICS-3000 SİSTEMİ .....</b>	<b>15</b>
3.1 IonPac AS20 Anyon Değiştirici Kolon .....	19
3.2 AS20 Kolonunun Özellikleri.....	22
3.3 Cryptand C1 Konsantrator Kolon.....	23
3.4 IonPac Cryptand C-1 Konsantratör Kolonunun Özellikleri .....	25
<b>4. ANYONLAR VE ANYON ANALİZLERİNİN ÖNEMİ .....</b>	<b>27</b>
4.1 Perklorat İyonu ve Özellikleri .....	27
4.2 Hipokloritin Bozunması Üzerine Çalışmalar .....	28
4.3 Perkloratın Vücuda Alınımı ve Atılımı .....	30
4.4 Perkloratın Biyolojik Etkisi.....	30
4.5 NIS Proteini Ve Anyonların Bu Proteine Etkileri .....	34
4.5.1 Nıs proteini hakkında genel bilgi.....	34
4.5.2 Sodyum / İyodür Symporter (NIS) inhibitörleri .....	35
4.5.3 Hipotiroidizm veya hipotiroxinemia'nın oluşması.....	36
4.5.4 NIS inhibisyonunu tolare etmede iyodürle beslenmenin rolü .....	36
4.5.5 Herbir NIS stresörün etkisinin değerlendirilmesi .....	38
4.5.6 İyodürle zayıf beslenmede azalan toplam NIS inhibisyon yüklenmesinin etkisinin değerlendirilmesi .....	38
<b>5. DENEYSEL KISIM .....</b>	<b>41</b>
5.1 Kullanılan Kromatografi Sistemi .....	41
5.2 Kullanılan Kimyasallar ve Araçlar .....	42

5.3 Standartların Hazırlanması .....	42
5.4 Musluk Suyu ve Havuz Suyunun Analize Hazır Hale Getirilmesi .....	42
5.4.1 Havuz suyu ve musluk suyu analizleri için optimizasyon çalışmaları ....	43
5.4.2 Musluk suyunda perklorat anyonu tayini.....	45
5.4.3 Havuz suyunda perklorat anyonu tayini .....	47
5.5 Süt Örneğinin Analize Hazır Hale Getirilmesi.....	48
5.5.1 Süt analizi için optimizasyon çalışmaları .....	49
5.5.2 Sütte perklorat anyonu tayini .....	51
5.6 Yüzey Suyunun Analize Hazır Hale Getirilmesi.....	53
5.6.1 Yüzey suyu için optimizasyon çalışmaları (Cyptand C1 Konsantratör Kolonu ile).....	53
5.6.2 Yüzey suyunda perklorat anyonu tayini .....	55
5.7 Perklorat anyonu tayinine tiyosiyanat etkisi.....	56
<b>6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>59</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>61</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>65</b>

## KISALTMALAR

<b>CR-ATC</b>	: Continously Regenerated-Anion Trap Column
<b>Diğ.</b>	: Diğerleri
<b>EG</b>	: Eluent Generator
<b>FIA</b>	: Flow injection analysis
<b>IC</b>	: Ion chromatography
<b>ISE</b>	: İyon seçici elektrot
<b>KKDR</b>	: Kuvvetli katyon değiştirici reçine
<b>MF</b>	: Melamin Formaldehit
<b>MMS</b>	: MikroMembran Suppressor
<b>NIS</b>	: Na <sup>+</sup> /I <sup>-</sup> Symporter
<b>OIG</b>	: Office of Inspector General
<b>RFIC</b>	: Reagent-Free Ion Chromatography
<b>SPEC</b>	: Serum perchlorate equivalent concentration
<b>SRS</b>	: Self-Regenerating Suppressor
<b>T<sub>3</sub></b>	: Triiodothyronine
<b>T<sub>4</sub></b>	: Thyroxine
<b>TIU</b>	: Total Iodide Uptake
<b>TSH</b>	: Tiroid Salgılatıcı Hormon
<b>U.S. EPA</b>	: United States Environmental Protection Agency
<b>UP</b>	: Ultra Pure, Ultra Saf



## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

<b>Çizelge 2.1</b> : Durağan faz ile bileşenler arasındaki etkileşime göre kromatografik yöntemler.....	5
<b>Çizelge 2.2</b> : Yaygın olarak kullanılan iyon değiştirici gruplar.....	9
<b>Çizelge 4.1</b> : Perklorat, tiyosiyanat ve nitrat anyonlarının NIS' a nispi etkileri.....	35
<b>Çizelge 4.2</b> : NIS inhibisyonunu tolare etmede iyodürle beslenmenin rolü .....	37
<b>Çizelge 4.3</b> : İyodür miktarı ile vücudun toplam NIS inhibisyon yüklenmesi arasındaki ilişki.....	38
<b>Çizelge 5.1</b> : Perklorat anyonuna ait kalibrasyon grafiği için hazırlanan çözelti sonuçları. ....	46
<b>Çizelge 5.2</b> : Musluk suyundan perklorat anyonunun geri kazanımı .....	47
<b>Çizelge 5.3</b> : Havuz suyundan perklorat anyonunun geri kazanımı .....	49
<b>Çizelge 5.4</b> : Sütten perklorat anyonunun geri kazanımı.....	52
<b>Çizelge 5.5</b> : Yüzey suyundan perklorat anyonunun geri kazanımı .....	56



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1 : Proteinlerin iyon değişimi ile ayrılması .....	7
Şekil 3.1 : Suprasörün kimyasal olarak çalışma mekanizması .....	17
Şekil 3.2 : Analitlerin suprasörlü ve suprasörsüz kromatogramlarının karşılaştırılması .....	18
Şekil 3.3 : İletkenlik dedektörü kararlılığı .....	18
Şekil 3.4 : Suprasör ve iletkenlik dedektörü .....	19
Şekil 3.5 : Otoörnekleyici ile aynı anda iki analiz takibi .....	20
Şekil 3.6 : Yüzey modifikasyonunun kavramsal örneği .....	21
Şekil 3.7 : AS20 kolonunda ayrılmış yirmi üç anyonunun kromatogramı .....	21
Şekil 3.8 : AS16 ve AS20 kolonlarında perkloratın kromatografik ayırımı .....	22
Şekil 3.9 : Cryptand C1 reçinesinin oluşumu .....	24
Şekil 3.10: Eser miktarda perklorat analizi için sistem akış diyagramı .....	24
Şekil 3.11: Cryptand C-1 konsantratör kolonu ile içme suyunda perklorat analizine ait kromatogram .....	25
Şekil 4.1 : Tiroid bezinde NIS' in iyodürü taşınma mekanizması .....	34
Şekil 5.1 : 10 µg/L ve 100 µg/L ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup> eklenmiş musluk suyu örneklerinin kromatogramları .....	44
Şekil 5.2 : 10 µg/L ve 100 µg/L ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup> eklenmesiyle hazırlanan musluk suyu çözeltilerinin kromatogramları .....	45
Şekil 5.3 : 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250; 500 µg/L konsantrasyonlarındaki çözeltilerin analizlenmesiyle elde edilen kalibrasyon grafiği .....	45
Şekil 5.4 : 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250; 500 µg/L standart ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup> çözeltilerinin kromatogramları .....	46
Şekil 5.5 : Çeşme suyu örneğinde perkloratın olmadığını gösteren kromatogram .....	46
Şekil 5.6 : Çeşme suyu örneğine 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250; 500 µg/L perklorat ilavesi sonucu elde edilen kromatogramlar .....	47
Şekil 5.7 : Havuz suyunun doğrudan ölçülmesi sonucu elde edilen kromatogramlar .....	48
Şekil 5.8 : Havuz suyuna 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 µg/L perklorat ilavesi yapıldıktan sonra elde edilen kromatogram .....	48
Şekil 5.9 : 1 mg/L ve 5mg/L standart perklorat ilavesiyle hazırlanan süt örneklerine ait kromatogram .....	49
Şekil 5.10: 1 mg/L ve 5mg/L standart perklorat ilavesiyle hazırlanan süt örneklerine ait kromatogram .....	50
Şekil 5.11: 1 mg/L ve 5mg/L standart perklorat ilavesiyle hazırlanan süt örneklerine ait kromatogram .....	50
Şekil 5.12: 10; 25; 50; 100; 250 ve 500 µg/L standart perklorat çözeltilerinin kalibrasyon grafiği (R <sup>2</sup> = 0,999) .....	51
Şekil 5.13: Perkloratın standart 10; 25; 50; 100; 250 ve 500 µg/L konsantrasyonlarının kromatogramları .....	51

<b>Şekil 5.14:</b> (a) 500 µg/L perklorat eklenmiş süt örneği, (b) direkt süt örneğinin kromatogramları .....	52
<b>Şekil 5.15:</b> (a) 500 µg/L perklorat eklenmiş süt örneklerinin kromatogramları, (b) bu örneklere ait kalibrasyon grafiği ( $R^2=0,998$ ).....	52
<b>Şekil 5.16:</b> Farklı pH' larda hazırlanan perkloat çözeltilerinin verdiği alana karşı grafiği .....	53
<b>Şekil 5.17:</b> 2,5; 5; 10; 20 ve 40 µg/L standart perklorat çözeltilerinin analizlenmesiyle elde edilen kalibrasyon grafiği .....	54
<b>Şekil 5.18:</b> Yüzey suyunda perklorat anyonu varlığını gösteren kromatogram .....	55
<b>Şekil 5.19:</b> 2,5; 5; 10; 20 ve 40 µg/L standart perklorat çözeltilerine ait kromatogramlar .....	55
<b>Şekil 5.20:</b> Yüzey suyunda perklorat anyonu varlığını gösteren kromatogram ile 5 µg/L perklorat ilave edilmesinden sonra elde edilen kromatogram .....	56
<b>Şekil 5.21:</b> 25 µg/L $ClO_4^-$ ve (a) 100 µg/L $SCN^-$ (b) 500 µg/L $SCN^-$ (c) 1000 µg/L $SCN^-$ (d) 2500 µg/L $SCN^-$ (e) 5000 µg/L $SCN^-$ çözeltilerinin kromatogramları .....	57



## İYON KROMATOĞRAFİ KULLANARAK ÇEŞİTLİ ÖRNEKLERDE PERKLORAT ANALİZİ

### ÖZET

Perklorat bulunduğu su ve besinlerle vücuda giriş yapabilir. Suda kolaylıkla çözüdüğü için mide ve bağırsaklara çok hızlı geçiş yapar ve buradan kan dolaşımına katılır. Kan dolaşımı yoluyla vücudun bütün bölümlerine taşınır. Pek çok iç organ (örneğin; tiroid, meme dokusu ve tükürük bezleri) kan dolaşımından perkloratın nispeten büyük miktarını alır. Kandan böbreklere geçen perklorat daha sonra idrarla bırakılır. İnsanlarda perklorat toksisitesi için temel hedef organ tiroid bezidir.

Peklorat anyonu tiroid bezlerinin sodyum iyodür simporter (NIS) proteini tarafından iyodür alımını yarışmalı olarak inhibe eder ve çok yüksek düzeyde, metabolik aktivite için gerekli iki iyot hormonunun [triiodotironin(T<sub>3</sub>) ve tiroksin(T<sub>4</sub>)] üretimini engelleyebilir. İyot tiroid hormonlarının sentezi için bir yapı bloğu olarak gereklidir. Kana bırakılan tiroid hormonları bazı vücut fonksiyonlarını düzenler. Uzun süre perklorata maruz kalan insanlarda tiroid hormanlarını azaltıcı etkisi olduğu söylenmektedir. Tıbbi olarak hipotiroidizm adı verilen bu durumda, kandaki tiroid hormonlarının daha düşük miktarı hipofiz hormonlarında artmaya sebep olur ve böylece tiroid bezlerinde bir büyüme meydana gelir. Tıbbi olarak bu duruma guatr denir. Fetuslar ve bebekler perklorat maruziyetine karşı, nöral beyin ve iskelet olarak kısmen risk altındadırlar. Hamile ve emziren kadınlar perkloratı plasental ve meme NIS sistemi tarafından sırasıyla transfer ederler.

Perklorat su ve süt, bazı yiyecek örneklerinde bulunmuştur. Bazı bitkilerde, özellikle lifli sebzelerde yüksek miktarda perklorat bulunmuştur. Bitkiler perklorat içeren su ile sulandığında, bitkinin yapraklarından su buharlaştığında geriye perklorat kalır. İnekler perklorat içeren yemleri yiyebilir ve perklorat sütlerine geçebilir. Bunlara ek olarak, roket üretim ya da test alanının yakınında yaşayan, yapımında çalışan kişiler veya havai fişekler, diğer fişek ve patlayıcı türlerinin yapıldığı tesislerde çalışan kişiler için bu alanlar potansiyel perklorat kaynağıdır. Üretim ve askeri tesislerde perklorat yer altı ve yüzey sularına sızıntı ile bulaşabilir. Bu alanlarda perklorata maruz kalınabilir.

Süt insan sağlığı açısından özellikle yeni doğan ve çocuklar için çok önemli olduğu bilinir, çünkü perkloratın tespit edildiği tiroid bezleri beyin gelişiminde çok önemlidir. Bu çalışmada süt örneklerinde tespit edilebilir miktarda perklorat bulunmuştur. Perkloratın temel kaynağı olarak, sığırların beslendiği yem ve su kaynakları görülebilir. Türkiye de su örneklerinde perklorat kirliliğini ölçmek için çeşitli su örnekleri (havuz, musluk, yüzey suyu) analizlendi. Bu örneklerde ya çok düşük miktarlarda tespit edilmiş ya da hiç tespit edilememiştir. Çalışmamız su örneklerinde perklorat kirliliğinin çok yaygın olmadığını göstermektedir.



## **ANALYSIS OF PERCHLORATE IN VARIOUS SAMPLE USING ION CHROMATOGRAPHY**

### **SUMMARY**

Perchlorates can enter the body after you have swallowed food or water containing them. Since they easily dissolve in water, they quickly pass through the stomach and intestines and enter the bloodstream. The bloodstream carries perchlorate to all parts of the body. A few internal organs (for example, the thyroid, breast tissue, and salivary glands) can take up relatively large amounts of perchlorate from the bloodstream. The main target organ for perchlorate toxicity in humans is the thyroid gland.

Perchlorate anion ( $\text{ClO}_4^-$ ) competitively inhibits iodide uptake by the thyroid gland's sodium-iodide symporter (NIS) protein and, at high levels, may disrupt production of two iodine hormones [triiodothyronine ( $\text{T}_3$ ) and thyroxine ( $\text{T}_4$ )] essential for metabolic activity. Iodine is required as a building block for the synthesis of thyroid hormone. Thyroid hormones regulate certain body functions after they are released into the blood. Although not demonstrated in humans, it is anticipated that people exposed to excessive amounts of perchlorate for a long time may develop a decreased production of thyroid hormones. The medical name for this condition is hypothyroidism. In hypothyroidism, the lower amounts of thyroid hormones in blood cause increases in pituitary hormones that can lead to an increase in the size of the thyroid gland. The medical name for this condition is goiter. Perchlorates have been found in food, water samples and milk. Some plants, especially leafy green vegetables, have been found to have elevated levels of perchlorate. When water containing perchlorate is used to irrigate the plants, perchlorate is left behind when water evaporates from the leaves of the plants. Cows may eat fodder containing perchlorate and pass them on in their milk. Additional potential sources of perchlorate may be found if you live near a rocket manufacturing or testing facility, if you live near or work at a factory where they are made, or if you live near a factory that makes fireworks, flares, or other explosive devices. Production and military facilities have contaminated ground and surface waters through leaching, seepage, and improper disposal of material past its shelf life. It is universally known that milk is important for human health, especially for infants and children because the thyroid hormone is essential for the development of the brain detected perchlorate.

The study showed that detectable perchlorate was present in milk samples. The main source of perchlorate in milk may be forage and water that are fed to the cattle. The perchlorate in various water samples (pool, surface, tap water etc.) were also analyzed to assess the perchlorate pollution in Turkey water samples were investigated. Consequently, there is no or low concentration of perchlorate in analyzed water samples. Our study showed that water samples have not been extensively polluted by perchlorate.



## 1. GİRİŞ

İyon kromatografisi (IC), hassasiyeti, perkloratı diğer iyonlardan ayırma kabiliyeti ve birçok laboratuarda bulunabilme özelliklerinden dolayı perklorat tayini için en yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (Tian ve diğ., 2004). İyon-değiştirme kromatografisi (IC) çoğu zaman iyon kromatografisi olarak kısaltılır. İyon değiştirici reçinelerin kullanımına dayanan iyonların ayrılması ve tayini için modern ve etkili bir yöntemdir. İyon-değiştirme olayları, çözeltideki iyonlar ile çözünmeyen, yüksek moleköl ağırlıklı bir katının yüzeyindeki benzer işaretili iyonlar arasındaki değiştirme dengesi temeline dayanmaktadır (Destanoğlu, 2009). Bu çalışmada kullanılan Dionex ICS-3000 cihazı, verimi, üretkenliği ve öncesine göre on kat daha yüksek performansı ile gelişmiş bir sistemdir. Bu sistemde aynı anda iki analiz tek bir otoörnekleyiciden tek bir uygulama ile yapılabilir. Ayrıca pompa hem isokratik hem de gradient olarak çalışabilir. Dual sistemlerde üretimlilik, esneklik, hassasiyet ve seçicilik artar ve ekonomik avantajlar önemli ölçüde göze çarpar (Dionex Ref. Lib., 2007). İnsan dahil tüm canlılar yaşamak için mutlak suretle suya ihtiyaç duymaktadırlar. İhtiyaç karşılanırken suların belli bir asgari kaliteyi sağlaması gerekmektedir. İçme sularında yaygın anorganik anyonların tayini IC'nin dünyada en önemli uygulamalarından birisidir (Dionex Corporation, 2004). İçme sularında IC ile analizler musluk yüzey ve havuz sularına göre daha kolay yapılabilir. Çünkü matriksteki aşırı anyon konsantrasyonlarında eser anyonların analizleri zorlaşır. Bu yüzden bu su örneklerinde perklorat analizi için öncelikle ortamdan katyonlar kuvvetli katyon değiştirici reçine ile uzaklaştırılmaya çalışılmıştır. Yüzey musluk ve havuz suyu örneklerinde olduğu gibi süt örneklerinde de bazı anyonların IC analizleri doğrudan yapılamamaktadır. Sütün matriksinde bulunan proteinler, karbonhidratlar, yağlar, mineraller ve diğer tuzlar gibi bileşenler iletkenlik değerini arttırarak eser perklorat anyonu analizini önemli ölçüde engellemektedirler. Bunun için öncelikle proteinler ve katyonlar ortamdan uzaklaştırdıktan sonra sütün diğer bileşenlerinin elimine etmek amacıyla ekstraksiyon çalışmaları yapılmıştır (Kirk ve diğ., 2003).

Yeni doğan bebeklerin ve çocukların en fazla tükettiği besin maddesi olan sütte NIS inhibitörleri ile iyodür anyonlarının analizleri genel toplum sağlığı açısından hassas bir konudur. Çünkü NIS, kandan tiroid bezine iyodür yerine inhibitörleri taşıdığında tiroid hormonlarının üretimini azaltarak bebeklerde ve çocuklarda zamanla zeka, gelişim ve büyüme gibi bazı sorunlar ortaya çıkar (Blasini ve diğ., 2007). Matriksteki anyonların konsantrasyonların yüksek olması ile oluşan girişimin yanı sıra kromatografi kolonomuzda çok yakın hatta aynı alıkonma zamanlarında çıkabilen anyonlarında ayırımı için ICS-3000 iyon kromatografi cihazında optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

## **2. TEORİK KISIM**

### **2.1 Kromatografi**

Kimyasal bileşik karışımlarını ayırmak ve arıtmak için, analitik kimyacıların kullandıkları iki teknik vardır: damıtma ve kromatografi. Damıtma, farklı sıcaklıklarda kaynayan bileşikleri ayırır. Ne var ki, birçok karışımın bileşenleri (özellikle biyolojik örnekler), ısıtıldıkları zaman bozulurlar; bazıları aynı sıcaklıkta kaynar; bir bölümü de çok küçük miktarlarda bulunur. Bu nedenle, karışımların, sıvılardaki çözünürlüklerinden ya da katı maddelerin yüzeylerine tutunma farklılıklarından yararlanarak ayrılmasını sağlayan kromatografi geliştirilmiştir. İlk kromatografi yöntemleri, öteki yöntemlerle çözülmesi güç ya da olanaksız olan karmaşık doğal ürünlerin incelenmesi için geliştirildi. XIX. yüzyıl ortalarında şeker çözeltileri, kömür tabakalarından süzülerek arıtılıyordu (bu da, temelde bir kromatografi yöntemidir). XIX. yüzyıl sonlarında Amerikalı D. T. Day, ham petrolü bir kil (Fuller toprağı) sütunundan geçirerek, çeşitli bölümlerine ayırdı. 1903 yılında Rus botanikçisi M. Tsvett, yapraklardan çıkarılan çeşitli boya maddelerini bir kalsiyum karbonat sütunundan geçirerek, çeşitli renklerdeki bölümlere ayırdı. Böylece teknik, adını, yunanca renk anlamına gelen ‘chroma’ ile aldı (Tian ve diğ., 2004).

#### **2.1.1 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 akışkanı 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 (Şahin ve diğ., 2005).

### **2.1.2 Kromatografinin ilkeleri**

Kromatografi, bir hareketli, taşıyıcı faz (bir sıvı ya da bir gaz), ile bir hareketsiz sıvı ya da katı faz arasında, karışımın bileşenlerinin ayrılmasıdır. Kromatografi sürecinde örnek karışımını taşımada kullanılan hareketli faz, ya bununla karışmayan bir başka fazdan ya da hareketsiz kalan bir tutunma yüzeyinden geçirilir. Karışımdaki çeşitli kimyasal bileşenler, hareketli fazdan hareketsiz faza ve yeniden hareketli faza geçerler. Geçiş yolu boyunca bu işlem birçok kez yinelenir. Karışımı oluşturan maddeler arasında çözünebilirlik ya da yüzeye tutunma farklılıkları olduğu için, daha çözünür ya da yüzeye daha çok tutunabilir olanlar, daha az çözünür ya da daha az tutunabilir olanlardan geri kalacaklardır. Ayırıcı madde içinden yeterli bir geçiş süresinden sonra, tam bir ayırma sağlanmış olur ve karışımdaki çeşitli bileşenler toplanarak belirlenir.

### **2.1.3 Kromatografik teknikler**

Kromatografi kelimesi Yunanca “Chroma” renk ve “Graphein” yazmak kelimelerinden kaynaklanmıştır. İlk defa yirminci yüzyılın başlarında gözle görünen, renkli bitki pigmentlerinin ayrılmasında kullanılmış bir tekniktir. Kromatografi farklı bileşiklerin değişken bir şekilde farklı fazlarda dağılmasına dayanır. Bir durağan faz (stasyoner faz) ve bir de hareketli faz (mobil faz) vardır. Hareketli faz durağan fazın üzerinden geçer ve ayrılması istenen maddeyi de beraberinde sürükler. Ayrılacak madde bileşenleri farklı derecede durağan fazla etkileşime girerler. Durağan fazla etkileşimi fazla olan bileşenler daha ağır, etkileşimi az olan bileşenler ise daha çabuk hareket ettiklerinden bileşenler birbirlerinden ayrılırlar. Bileşiklerin bileşenlerine ayrılmasında, durağan faz ile bileşenler arasındaki etkileşimin tabiatına göre farklı kromatografik yöntemler geliştirilmiştir (Çizelge 2.1). Bu etkileşim molekül büyüklüğüne, polariteye, spesifik bağlanma özelliklerine veya elektrostatik çekim gücüne dayanabilir.



**Çizelge 2.1:** Durağan faz ile bileşenler arasındaki etkileşime göre kromatografik yöntemler.

Moleküler Özellik	Kromatografi Yöntemi
Polarite	Dağılım Kromatografisi
Yük	İyon Değişim Kromatografisi
Moleküler ağırlık	Jel filtrasyon Kromatografisi
Hidrofobik özellikler	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi
Spesifik molekül bağlama özellikleri	Affinite Kromatografisi

## 2.2 İyon-Değiştirme Kromatografisi (Ion-Exchange Chromatography, IE)

İyon değişim kromatografisi, modern sıvı kromatografi yöntemleriyle geniş bir biçimde kullanılan sıvı kromatografi yöntemlerinden ilkidir. Otomasyon sistemli, yüksek çözünürlüklü iyon değişim kromatografisi 1960 yılından itibaren amino asit analizlerinde kullanılmıştır. Daha sonra bu teknik yüzlerce farklı fizyolojik bileşiğin (ör: üre ve serum ) 10- 70 saat arası süren analizlerinde kullanılmak üzere kapsamı genişlemiştir. Aynı tarihlerde protein karışımlarının analizinde ve ayrılmasında iyon değişim kromatografisi yöntemleri biyokimyasal platformda çok önem taşıyordu (Şekil 2.1). Buna karşın yakın zamana kadar iyon değişim kromatografisi ile yapılan protein analizi geleneksel düşük basınç sıvı kromatografisi yöntemlerine göre yapılmıştır. 1960' lı yılların sonlarından itibaren sıvı kromatografisindeki devrim ile nükleik asit ve bazlar, nükleositler ve zar kaplamalı (peliküler) iyon değiştiricilerde nükleotitlerin ayrılması ve analizi gerçekleşmiştir. Bazı çeşitli pratik sebeplerden dolayı diğer kromatografik yöntemlere göre daha az kullanışlı olan iyon değişim kromatografisi, son zamanlarda iyon çifti kromatografisinin gelişimiyle bazı geleneksel kullanım alanlarını kaybetmektedir. Buna karşın bazı ayırma problemleri iyon değişim kromatografisini hala geçerli kılmaktadır. Yeni nesil kolon dolgu materyalleriyle birlikte yüksek molekül ağırlıklı iyonik örneklerin ayrılmasıyla iyon değişim kromatografisine yeni olanaklar sunulmaktadır. İyon değişim kromatografisi fonksiyonel grup taşıyan dolgu materyalleriyle yürütülür. Genel tutunma mekanizması sabit fazdaki yüklü gruplar R ile mobil fazdaki Y iyonları ile örneğe ait X iyonları arasındaki basit iyon değişimidir.





Anyon değişim kromatografisi için, X<sup>-</sup> rnek iyonu mobil fazdaki Y<sup>+</sup> iyonu ile iyon değiştirici zerindeki R<sup>+</sup> iyonik bölgeleri için rekabete girer. Aynı Şekilde kasyon değişim kromatografisinde X<sup>+</sup> rnek katyonları mobil fazdaki Y<sup>+</sup> iyonu ile iyon değiştirici zerindeki R<sup>-</sup> iyonik bölgeleri için yarışır. İyon değiştiriciyle mobil faz varlığında zayıf bir etkileşime giren örnek iyonları kolonda zayıf bir Şekilde tutunup, çabuk olarak elüsyona uğrar. Daha kuvvetli etkileşime giren örnek ise daha geç bir sürede kolondan çıkar. İyon değişim kromatografisi bazı durumlarda iyonik bileşenleri ayırmada kullanılsada genellikle organik asit ve bazların yani uygun pH' ta iyon durumundaki bileşenleri ayırır.



Asit ve bazların iyon değişim kromatografisi sisteminde iyonlaşması mobil fazın pH'ının değişimiyle ayarlanabilir. pH'taki artış asitlerin iyonlaşmasını arttırırken bazların azaltır ve pH değişimindeki azalım durumu tersine çevirir. İyonlaşmadaki artış her durum için örneğin tutulma süresini arttırır. Sıvı kromatografisinde birçok iyon değiştirici, fonksiyonel grup içeren polimerik sabit fazdan oluşur. (kasyon değiştiriciler için -SO<sub>3</sub> grubu ve anyon değiştiriciler için -N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup> grubu) Diğer dolgular ise silika yüzeyine organik bağlayıcılar ile tutunmuş fonksiyonel gruplardır. Her iki durumda iyon değiştirici tarafından tutunma işlemi iki sıralı prosesin sonucu sayılabilir:

1. rnek bileşenlerinin mobil faz ve sabit faz arasında dağılımı,
2. İyonik bölgelerle sabit faz arasındaki reaksiyon.

rnek tutulumu, her iki prosese de bağlıdır ve ayırma kontrolü her iki prosesi ayrı etkileyen deneysel faktörler bağlamında anlaşılabilir. İyon değişim kromatografisinde örneğin dağılım ve ayrımı mobil ve sabit fazda var olduğu için, iyonik olmayan bileşenler bile iyon değişim kromatografisi kolonlarında tutulup ayrılabilir.

### 2.2.1 Dolgu materyalleri

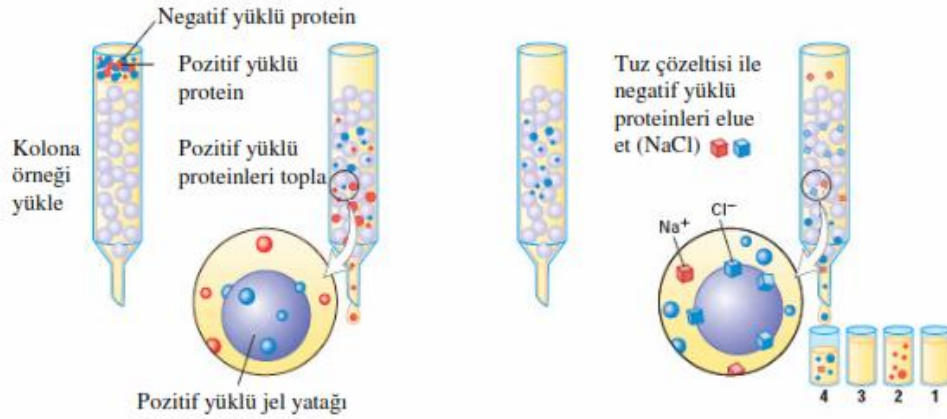
Birçok farklı iyon değiştirici dolgu maddesi, iyon değişim kromatografisinde kullanılmaktadır. Protein gibi makromoleküllerin ayrılmasında kullanılan yumuşak materyallerden inorganik iyon ve küçük moleküllerin ayrılmasında kullanılan katı

maddelere kadar iyon değişim kromatografisi uygulamalarında aşağıdaki Őekillerde kolon dolgusu kullanılır.

Gözenekli polimerik partiküller (geleneksel iyon değiştirici reĀineler),

Kimyasal yollu bağlı silika bazlı filmsi partiküller (Bonded-Phase Pellicular particules),

Kimyasal yollu bağlı silika bazlı gözenekli partiküller (Bonded-Phase Porous particules).



**Şekil 2.1:** Proteinlerin iyon değişimi ile ayrılması.

GeĀmiőte, gözenekli polimerik partiküller, amino asit, peptit ve karbonhidratların ayrılmasında geniş biĀimde kullanılmıştır. Bu dolgular 10  $\mu\text{m}$  Āapında, mikrogözenekli, PS–DVB kopolimeri formunda ve fonksiyonel iyonik grubu taőımaktadır. Yakın zamana kadar, iyonik fonksiyonel grubun yokluğunda tüm sabit fazlar hidrofobik temelde olmuőtur. (PS, silikon). Protein, nükleik asit ve diğer büyük moleküllerin bu tür iyon değişim kromatografisinde kullanımında Āeőitli bilinen problemler vermiştir. Daha yakın zamanda iri gözenekli silika partiküllerleriyle hidrofilik kaplamalar, büyük moleküllerin iyon değişim kromatografisinde hızlı biĀimde ayrılmasına olanak sađlamıőtır. Modern iyon değişim dolgu materyalleri, Āeőitli partikül boyutlarında, Şeklinde ve fonksiyonlarda bulunur. BirĀok farklı iyonik değiştirici iyon değiştiricilerde kullanılır, fakat genelde uygulamalar sülfonat veya trialkil amonyum grupları ile olur. Bu güçlü anyon ve katyon değiştiriciler sırasıyla SCX (güĀlü katyon değiştirici) veya SAX (güĀlü anyon değiştirici) etiketini taőır. Bazen zayıf anyon ve katyon değiştirici olarak (COO<sup>-</sup>) karboksilat veya amin (NH) kullanılır. Diğer yer değiştirici gruplar sıvı kromatografisinde önemli kullanım alanı

henüz bulamamıştır. Tamamı polimerik olan iyon değiştiriciler suyu içine ekerler ve sulu mobil faz varlığında şişerler. Bağlı şişme gözenekliliğin ve büyük moleküller için iyon değiştirme kapasitesinin bir göstergesidir. şişmenin büyümesi ile gözenekler büyür ve daha büyük örnek molekülleri partikül içine girer ve iyon değişimi gerçekleşir. şişmenin derecesi eklenen çapraz bağlayıcı DVB miktarına bağlıdır ve yüksek konsantrasyonlarda daha katı partikül oluşumu ve böylece daha az şişmeye yol açar. Aynı zamanda partikül dayanıklılığı DVB miktarının artışıyla artar. Geleneksel polimerik iyon değiştiriciler % 4-12 DVB içerir ve % 8 çapraz bağlı partiküller en bilinendir. Bağlı rnek tutulumu ve maksimum örnek boyutu kolon dolgu materyalinin iyon değiştirme kapasitesinin artmasıyla artar. Bu partikül içindeki ölçülebilir (titre edilebilir)  $R^{\pm}$  iyonik gruplarına bağlıdır, fakat pH' la değişir. Dolayısıyla düşük pH' da proto eklenmesiyle katyon değiştiriciler nötralize olurlar.



Yüksek pH' da aynı Şekilde anyon değiştiriciler baz ile nötralize olurlar.



Kuvvetli katyon değiştiricilerin iyon değiştirme kapasitesi düşük pH' da sıfıra düşeceği için bu dolgular pH 1'in altında kullanılamazlar. Zayıf katyon değiştiriciler pH 6'nın üzerinde kullanılamazlar. Benzer Şekilde güçlü anyon değiştiriciler sadece pH 1'in altında çalışırken, zayıf anyon değiştiriciler pH 8 ve altındaki değerler sınırlandırılmıştır. Bu etkiler pH' ın u noktalarında  $H^+$  ve  $OH^-$  iyonlarının artan rekabetinin örnek iyonları uzaklaştırmasıyla açıklanır. Çizelge 2.2' de yaygın olarak kullanılan iyon değiştirici grupları görülmektedir.

Bu Şekilden görüleceği gibi kuvvetli iyon değiştiriciler zayıf iyon değiştiricilere göre daha geniş bir pH aralığında kullanılabilir, bu da kuvvetli değiştiricilerin bilinirliğinin sebebini verir. Sonuçta geniş bir aralıkta kuvvetli değiştiricilerde bileşikler ayrılabilir ve daha fazla bileşik basit pH gradyent elsyonunda ayrılabilir.

**Çizelge 2.2** Yaygın olarak kullanılan iyon değiştirici grupları.

<b>iyonik Grup</b>	<b>pH Aralığı</b>	<b>Fonksiyonel Grup</b>	<b>Karşı İyon</b>
<b>Zayıf Anyon Değiştiriciler</b>			
Aminoetil(AE)	2- 9	-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>
Diethylaminoetil(DEAE)	2- 9	-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> H(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Cl <sup>-</sup>
<b>Kuvvetli Anyon İyon Değiştirici</b>			
Kuaterner aminoetil(QAE)	2- 10	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub>	Cl <sup>-</sup>
<b>Zayıf Katyon Değiştirici</b>			
Karboksimetil(CM)	3- 10	-OCH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>	Na <sup>+</sup>
<b>Kuvvetli Katyon değiştirici</b>			
Sülfopropil(SP)	2- 12	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Na <sup>+</sup>

### 2.2.2 Alıkonma parametreleri

Kromatografik alıkonma, örneğin kolona enjekte edildiği noktadan kolon boyunca ilerleyen bileşiğin dedektörde verdiği maksimum cevap arasındaki zamandır. Bu zamana alıkonma zamanı (retention time, t) denir. Alıkonma zamanı sürekli faz akış hızı ile ters orantılıdır. Diğer bir parametre alıkonma hacmidir (V). Alıkonma hacmi, bir bileşenin kolondan çıkması için gerekli olan elüent miktarıdır. Alıkonma süresi ve sürekli faz akış hızının çarpımına eşittir. Akışkanın hızına bağlı değildir, ancak partiküllerin geometrik şekli yani gözenek büyüklüğüne bağlıdır.

### 2.2.3 Bant genişliği

Bir kromatografik analiz sırasında örneğin sisteme enjekte edilmesinden sonra kolon içindeki akışkanın hareketi sırasında kromatografik piklerin aralığı genişler. Daha büyük kolon bant genişliği, belli bir zaman aralığında daha az miktarda bileşenin ayrışması anlamına gelir. Başka bir deyişle piklerin keskinliği kolon veriminin ne kadar iyi olduğunu gösterir. Kolonda bant genişlemesi üç ana sebepten kaynaklanır.

1. Kolon içinde ilerleyen bir bileşene ait moleköl veya iyonların farklı yollar izlemesi: Bu parametre sürekli fazın akış hızından bağımsızdır. Kolon dolgu maddesinin çok küçük tanecikli olarak alınması bu parametrenin etkisini azaltabilir.

2. Fazlar arasındaki kütle transferi etkisi: Bileşenlerin sabit faz ile hareketli faz arasında dağılma dengesine ulaşması için belirli bir süreye ihtiyaç vardır. Eğer akış hızı yüksekse ve örneğin kolona güçlü bir afinitesi varsa, hareketli fazdaki örnek sabit fazdaki örneğin önüne geçecektir. Bu da dengenin tam olarak kurulamamasına

yani bant genişlemesine neden olacaktır. Hareketli faz viskozitesi düşürmek ve kolon sıcaklığını arttırmak bu terimin etkisini azaltabilir.

3. Kolonda bileşenlerin yüksek derişimli bölgelerden düşük derişimli bölgelere doğru difüzyonla dağılması: Örnek konsantrasyonu kolon kenarlarında kolon merkezinde olduğundan daha düşüktür. Örnek kolon merkezinden dışarıya doğru difüzenir. Bu etki düşük akış hızlarında daha da önem kazanır. Ayrıca bu parametre bileşenlerin hareketli faz içindeki difüzyon katsayılarının değerleri ile doğru orantılı olarak artar. Hareketli fazın akış hızını düşürmek, örneğin kolonda daha az zaman harcaması ve bu da difüzyonun daha az olması demektir. Ayrıca sıcaklığın düşürülmesi de bu etkiyi azaltıcı yönde etki yapar.

#### **2.2.4 Kolon verimliliği**

Bir kromatografik analizde optimum bir ayırma gerçekleştirmek yani kolon veriminin en üst seviyede olduğunu göstermek için keskin ve simetrik piklerin eldesi şarttır. Kolon verimliliği tayin edilirken pik genişliği, teorik tabaka sayısı, indirgenmiş plaka yüksekliği, seçicilik ve çözünürlük gibi parametreler göz önüne alınır. Pikin genişliği, pikin keskinliğini ve kolon verimini gösterir. Bununla beraber pik genişliği kolonun uzunluğu, akış hızı ve partikül büyüklüğü gibi birçok parametreden etkilenir. Aynı kolonda yapılan analizlerde akış hızı değiştirilebilecek tek parametre olduğundan, akış hızı kolon verimliliğinin en iyi olacağı değerde seçilmelidir. Teorik tabaka sayısı; damıtma prosesindeki benzerlikten gelir. Kolonun hızlı çalışmasının önemli bir göstergesidir. Elde edilen kromatografik piklerin keskinliği bir kolonun verimini gösteriyorsa, bu verimin nicel ölçüsü de teorik tabaka sayısıdır. Tabaka sayısı ya da diğer adıyla teorik tabaka sayısı N ile gösterilmektedir ve aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$N = 16 \times (t / W)^2 \quad (2.6)$$

$$N = 5.54 \times (t / W_{1/2})^2 \quad (2.7)$$

Burada t; bileşimin alıkonma süresini, W; bileşik pikinin taban genişliğini ve W; pik yüksekliğinin yarısındaki taban genişliğini ifade etmektedir. Bir kolonda teorik tabaka sayısı ne kadar yüksekse kolonun verimi o kadar yüksek demektir. Kolon boyu arttıkça teorik tabaka sayısında da artış gözlenir. İndirgenmiş tabaka yüksekliği; h ile gösterilir. Kolonun ne kadar hızlı ve etkili çalıştığını gösterir. N ile ters orantılıdır. Bir kolonda N değeri ne kadar büyükse yani h değeri ne kadar küçükse

kolonun verimi o kadar yüksektir. Daha düşük indirgenmiş tabaka yüksekliği ve daha fazla teorik tabaka sayısı kısa sürede kromatografik sonuçların elde edilmesi demektir. h değerini büyüten her etken kolon verimini düşürür ve pik genişlemesine neden olur. h değeri aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$h = (L / N \times d_p) \quad (2.8)$$

burada h; indirgenmiş tabaka yüksekliği, L; kolon boyu ve  $d_p$  de partikül çapıdır. Seçicilik, her bir pikin kapasite oranları veya bunların düzenlenmiş alıkonma zamanlarının oranıdır. Seçicilik karışımdaki bileşenlerin partikül yüzeyine adsorplanmasındaki ilgisi olarak ifade edilmektedir. Bu parametre kolonun veriminden bağımsızdır. Sadece bileşenin doğal yapısına, elüent tipine, elüent bileşimine ve yüzey adsorbansına bağlıdır. Genellikle iki bileşiğin seçiciliği 1' e ne kadar yakınsa iki pikin birbirinden ayrılması o kadar güçleşir. Aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$\alpha = \frac{t_{r,B} - t_0}{t_{r,A} - t_0} \quad (2.9)$$

Burada  $t_{r,B}$  ve  $t_{r,A}$  sırasıyla B ve A bileşenlerinin alıkonma sürelerini,  $t_0$  ise kolondaki boşluk hacmi yani kolonla etkileşime girmeden hareketli bir fazın kolondan çıkması gerekli olan süreyi ifade etmektedir. Çözünürlük (ayırıcılık, R), kromatografide iki pikin birbirinden ayrılma derecesine denir. İki pikin birbirinden ayrıldığını kabul etmek için  $R = 1$  olması gerekir ve bu çözünürlük değeri iki bandın birbiri ile % 2 oranında örtüştüğü anlamına gelir. Bu değer 1,5' den büyük ise pikler tamamen ayrılmış ve iyi bir çözünürlük elde edilmiş demektir. Çözünürlük aşağıdaki formül ile hesaplanmaktadır:

$$R_{(i+1)/(i)} = 2 \times (t_{i+1} - t_i) / (W_i + W_{i+1}) \quad (2.10)$$

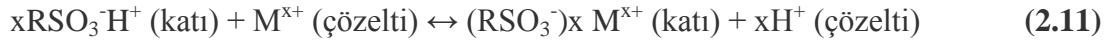
Burada  $t_i$  ve  $t_{i+1}$ ; sırasıyla i ve i+1 no'lu bileşenlerin alıkonma süreleri,  $W$  ise sırasıyla i ve i+1 no'lu bileşenler için elde edilen taban genişliklerini ifade etmektedir.

### 2.2.5 İyon-değiştirme dengeleri

İyon-değiştirme olayları, çözeltilerdeki 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 üretildi. Katyon değiştirici reçinelerin en genel aktif bölgeleri, kuvvetli bir asit olan sülfonik asit (-SO<sub>3</sub>-H<sup>+</sup>) ve zayıf bir asit olan (-COO-H<sup>+</sup>)'dur. Anyonik iyon değiştiriciler, kuvvetli bir baz olan tersiyer amin grupları (-N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>OH) veya daha zayıf bir baz olan primer amin gruplarını (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>OH) içermektedir.

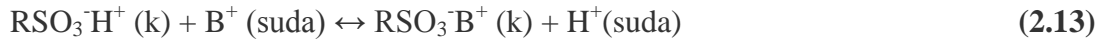
Sülfonik asit tipi bir iyon değiştirici, M<sup>x+</sup> katyonunu içeren bir sulu çözelti ile temas ettiği zaman, aşağıdaki gibi gösterilebilen bir yer değiştirme dengesi meydana gelir:



Burada, xRSO<sub>3</sub>H<sup>+</sup> büyük bir polimer molekülüne tutunmuş çok sayıdaki sülfonik asit grubundan bir tanesidir. Benzer şekilde, kuvvetli bazik iyon değiştirici, A<sup>x-</sup> anyonu ile, aşağıdaki denklemde gösterildiği gibi etkileşebilir:



Kütle etkileşimi kuralının iyon-değiştirme dengesine uygulamasının bir örneği olarak, tek yüklü B<sup>+</sup> iyonu ile bir kromatografik kolondaki sülfonik asit reçinesi arasındaki reaksiyonu dikkate alalım. Nötral bir çözülden, aşağıdaki reaksiyon sebebiyle, kolonun baş kısmında, B<sup>+</sup> iyonları tutulur:



Burada (k) ve (suda), sistemin bir katı veya suda olduğunu ifade etmektedir. Hidroklorik asidin seyreltik çözeltisi ile elüsyon, durgun fazdaki B<sup>+</sup> 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. Denge için denge sabiti K<sub>değ.</sub> (2.14)' deki gibi yazılabilir:

$$\frac{[\text{RSO}_3\text{B}^+]_k [\text{H}^+]_{\text{suda}}}{[\text{RSO}_3\text{H}^+]_k [\text{B}^+]_{\text{suda}}} = K_{\text{değ.}} \quad (2.14)$$

Burada [RSO<sub>3</sub>B<sup>+</sup>]<sub>k</sub> ve [RSO<sub>3</sub>H<sup>+</sup>]<sub>k</sub>, B<sup>+</sup> ve H<sup>+</sup>'nın Katı fazdaki derişimleridir (en doğru anlamda aktiviteridir). Bu ifade yeniden düzenlenirse (2.15) elde edilir. Elüsyon sırasında, hidrojen iyonlarının sulu fazdaki derişimleri, B<sup>+</sup> iyonlarına göre çok daha büyüktür. Ayrıca, B<sup>+</sup> sayısı yanında, reğinedeki yer değiştirme bölgesi sayısı çok daha yüksektir.

$$\frac{[\text{RSO}_3\text{B}^+]_k}{[\text{B}^+]_{\text{suda}}} = K_{\text{değ.}} \frac{[\text{RSO}_3\text{H}^+]_k}{[\text{H}^+]_{\text{suda}}} \quad (2.15)$$



Böylece,  $[H^+]$  suda ve  $[RSO_3^-H^+]_k$  derişimleri Eşitlik 2.15' deki kaymalardan fazla etkilenmez. Bu sebeple  $[RSO_3^-H^+]_k \gg [RSO_3^-B^+]_k$  ve  $[H^+]_{suda} \gg [B^+]_{suda}$  olduğu zaman (2.16)' nın sağ tarafı hemen hemen sabittir ve

$$[RSO_3^-B^+]_k / [B^+]_{suda} = K = C_s / C_m \quad (2.16)$$

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

$K_{deg.}$ ' in büyük olduğu zaman katı faz için  $B^+$  iyonunu alıkoymak için kuvvetli bir meyil gösteriyor demektir.  $K_{deg.}$ ' in küçük olduğu durumda bunun tersi doğrudur.  $H^+$  gibi genel bir referans iyon seçerek, verilen bir 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,  $K_{deg.}$  değerleri şu sırada azalmaktadır:  $Tl^+ > Ag^+ > Cs^+ > Rb^+ > K^+ > NH_4^+ > Na^+ > H^+ > Li^+$ . İki yüklü katyonlar için sıra şöyledir:  $Ba^{2+} > Pb^{2+} > Ca^{2+} > Ni^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+} > Co^{2+} > Zn^{2+} > Mg^{2+}$ . Anyonlarda, kuvvetli bazik reçineler için  $K_{deg.}$  şu sırada azalır:  $SO_4^{2-} > C_2O_4^{2-} > I^- > NO_3^- > Br^- > Cl^- > HCO_2^- > CH_3CO_2^- > OH^- > F^-$ . Bu sıra, bazı durumlarda reçinenin tipine ve reaksiyon şartlarına bağlı olduğundan, sadece bir yaklaştırma olarak dikkate alınmalıdır.



### 3. ICS-3000 SİSTEMİ

Dionex marka ICS-3000 cihazı, verimi, üretkenliği ve öncesine göre on kat daha yüksek performansı ile geliştirilmiş bir sistemdir. ICS-3000 sistemi bütün modüllerinde bileşenlere kolayca ulaşılabilmesi için özel dizayn edilmiştir. Bu sayede eskiye göre 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 cihaz 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 hidrosit 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 başarılıdır.

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 suppressör 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 başarılıdır.

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

ICS-3000 EG (Eluent Generator) modülü RFIC sisteminin kalbidir. Bu modül ile eluentleri artık hazırlamaya gerek kalmamıştır. Burada UP (Ultra Pure) su ile isteğe bağlı yüksek kalitede ve kesin konsantrasyonda eluent hazırlanır. Bu, sıradışı bir güven ve manuel eluent hazırlanması ile oluşan farklılıkları elimine etmeyi sağlar. Tekrarlanabilir sonuçlar haftadan haftaya, aydan aya ve laboratuvarından laboratuvara elde edilir. Ayrıca gradient çalışması ile de örneklerin ayrılmasında optimum bir zaman ayarlanabilir. 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 hidrokisit 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 Hidrokisit eluenti ile rejenere edilmelidirler.

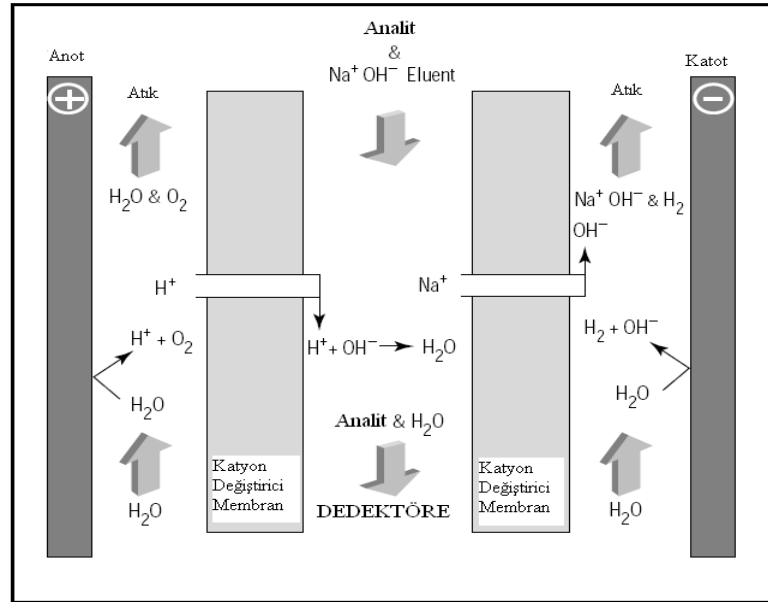
Dionex 1975' te packed-bed kimyasal suppressyonu tanıtarak modern iyon kromatografinin kurucusu oldu. Suppressyon arkaplan (background) iletkenliğini azaltırken iyonun yanıtını arttırması sebebiyle devrim yarattı. Packed-bed kimyasal suppressyon ile kimyagerler hassasiyet ve seçicilik hususunda düşük  $\mu\text{g/L}$  ile  $\text{mg/L}$  konsantrasyonları arasında çalışabilmektedirler.

Dionex, suppressyonun lideri olarak 1981'de oyuk fiber suppressörler üretti. Bu suppressörler sürekli yani online çalışabilmektedirler. Dionex, 1985' de MikroMembran Suppressör (MMS) üretti. Bunlar dinamik kapasiteye ve gradient elüsyon kullanımına daha çok izin vermektedirler. 1992'de ise kendini rejenere edebilen suppressörleri (Self-Regenerating Suppressör (SRS)) otomatik suppressyon ile tanıttı. Bunlar, rejenerant kaynağı olarak elektroliz kullanan korozif rejenerantların hazırlanmasını gerektirmeyen suppressörlerdir.

SRS ULTRA II suppressörü ile Dionex, 2003' te suppressör teknolojisini bir adım daha öne aldı. Bu, ultra düşük gürültü, düşük ve kararlı zemin (background), üstün dinamik kapasite ve geniş dinamik aralık sunar. Yeni gelişmeler ile arka basınç eski modellerine göre üç kat fazla tolare edilmektedir.

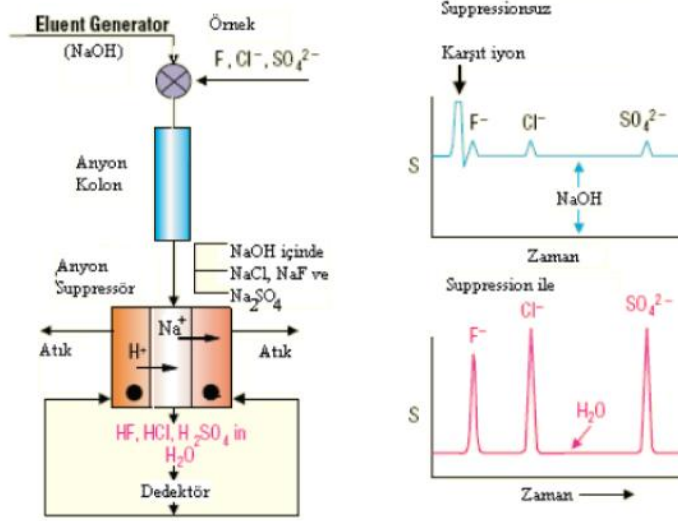
SRS'ler MMS'lere yapı olarak çok benzerler. Ancak elektrotlar rejenerant odalarına yerleştirilmiştir. Elektrotlara bir güç kaynağı bağlanıp suppressörden akım geçirildiğinde rejenerant iyonları suppressörde sudan üretilir. Buna otomatik suppressyon denir. Bu işlem için suyun odalardan sabit bir hızda geçmesi şarttır. Şekil 3.1' de suprasörün kimyasal olarak nasıl çalıştığı açıkça gösterilmiştir. Şekil 3.1' de ise analitlerin suprasörlü ve suprasörsüz kromatogramları karşılaştırılması sistemin akış şeması ile açıkça gösterilmiştir.

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



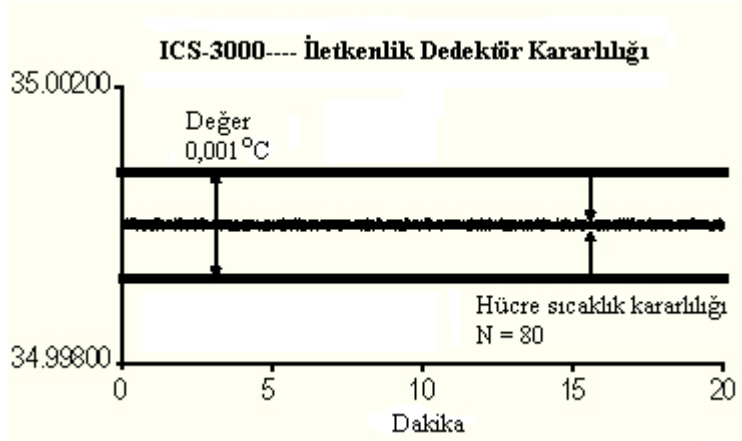
**Şekil 3.1:** Suprasörün kimyasal olarak çalışma mekanizması.

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 3.2' den de görüldüğü gibi, kolondan ayrılan anyonlar eluentin katyonu olan  $\text{Na}^+$  (veya  $\text{K}^+$ ) ile tuzlarını oluşturup suppressöre girerler ve burada bir kation değişimi meydana gelerek anyonların iletkenlikleri yüksek asitleri ve su dedektöre girer.



**Şekil 3.2:** Analitlerin suprasörlü ve suprasörsüz kromatogramlarının karşılaştırılması.

Oluşan saf su baselinesinde ilerlerken anyonların piklerinde gözle görülür bir artış meydana gelir. ICS-3000 sisteminin elektronik kısımları ve dizaynı değişen sıcaklıklarda dedektörün kararlı çalışmasını sağlar (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3:** İletkenlik dedektörü kararlılığı.

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



**Şekil 3.4:** Suprasör ve iletkenlik dedektörü.

Şekil 3.4' de beyaz kısım suprasör 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.

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.

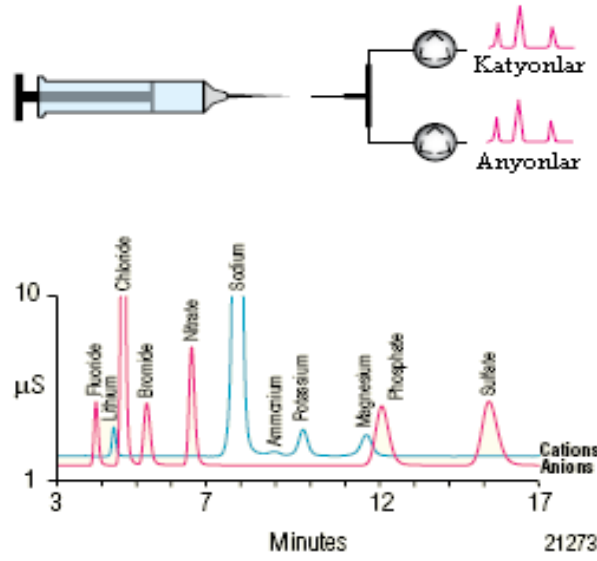
Bilgi analizi için Chromeleon TabletStation bütünleşik olarak dünyanın en iyi kromatografi sistemidir.

Otoörnekleyicinin yolları ve vialleri inert olduğu için ve hazne bölmesinin sıcağa duyarlı örnekleri belli sıcaklıkta saklayabildiği için örnekler bileşimi korunmaktadır.

Şekil 3.5' de görüldüğü aynı anda iki analiz takibi yapılabilmektedir.

### **3.1 IonPac AS20 Anyon Değiştirici Kolon**

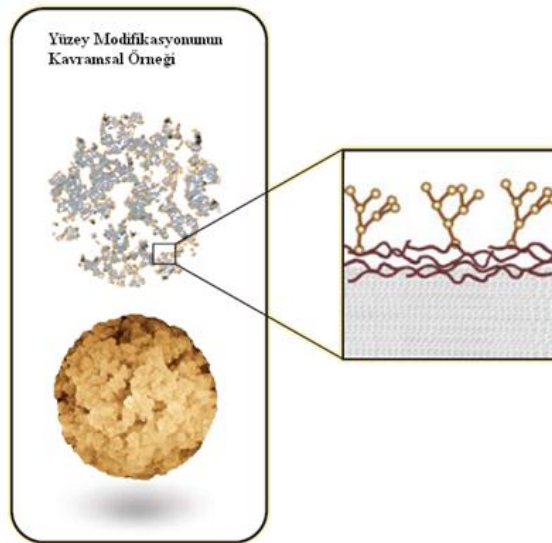
IonPac AS20 kolonu yüksek kapasitede, hidroksit seçici, anyon değiştirici bir kolon olarak su örneklerinde çok yüksek konsantrasyonlardaki klorür, sülfat ve karbonat anyonları varlığında bile  $\mu\text{g/L}$  seviyesinde perkloratın tayini için oldukça kullanışlıdır. Hatta sulara eser miktar perklorat 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.



**Şekil 3.5:** Otoörnekleyici ile aynı anda iki analiz takibi.

IonPac AS 20 kolonu eşsiz bir polimer bağlama teknolojisi ile geliştirilmiş ve üretilmiştir. Bu polimer oldukça hidrofilitir ve hidroksit eluentlerinde çok seçicidir. Eluent konsantrasyonunun yüksek olmasına gerek duymaz. Şekil 3.6’ da bu kolonda meydana gelen kavramsal yüzey modifikasyonu örneği verilmiştir.

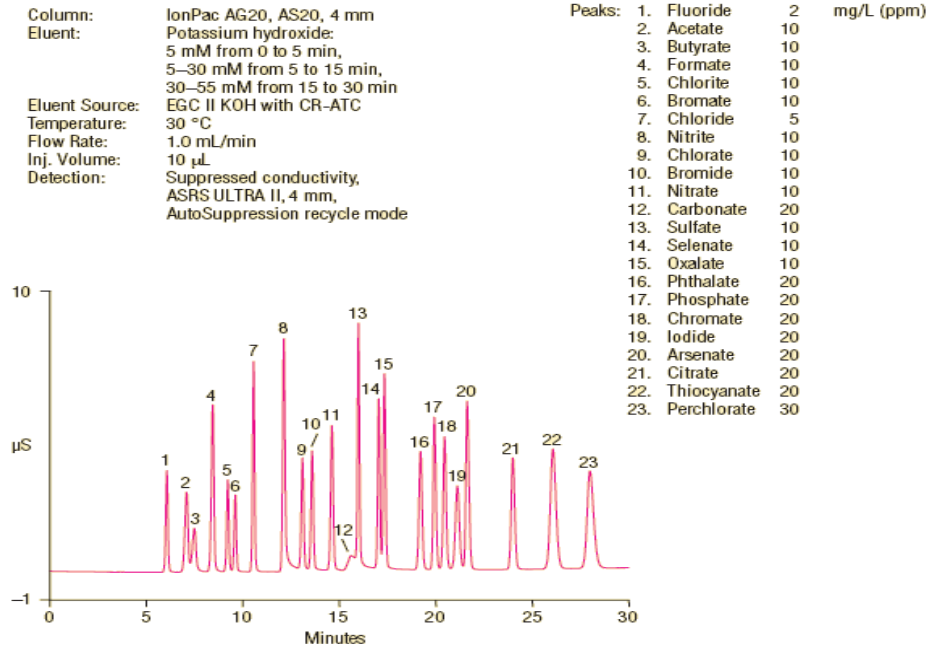
AS20 kolonunun RFIC sistemlerinde kullanılması tavsiye edilir. Ultra saf su ile yüksek saflıkta hidroksit eluenti hazırlayan EGC-NaOH ile bu kartuşu sürekli saflaştırılan CR-ATC’ den kolona gelen eluent karbonatsız bir hidroksit eluentidir. Karbonat varlığı, zeminde kaymaya ve analit iletkenliğini düşürür.



**Şekil 3.6:** Yüzey modifikasyonunun kavramsal örneği.



Şekil 3.7’ de AS20 kolonunda ayrılmış yirmiüç anyonun kromatogramı ve verileri verilmiştir.

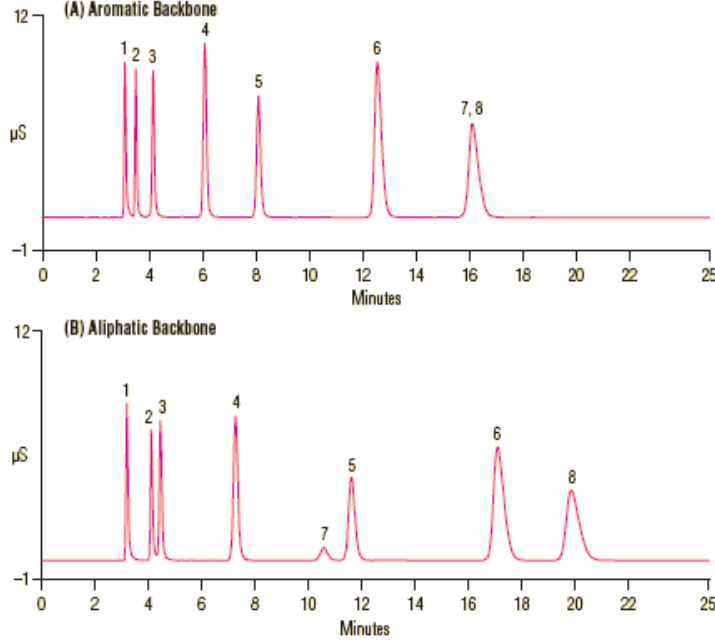


21114

Şekil 3.7: AS20 kolonunda ayrılmış yirmiüç anyonun kromatogramı.

Şekil 3.8’ de ise (A) kromatogramında AS16 kolonunda perklorat pikinin 4-klorobenzen sülfonat anyonundan ayrılamadığı halde (B) kromatogramında AS20 kolonunda ayrıldığı net bir biçimde görülmektedir.

Columns:	(A) IonPac AG16, AS16, 2 mm (B) IonPac AG20, AS20, 2 mm	Peaks:	
Eluent:	35 mM sodium hydroxide	1. Fluoride	2 mg/L (ppm)
Eluent Source:	EGC II NaOH cartridge with CR-ATC	2. Chloride	3
Flow Rate:	0.25 mL/min	3. Sulfate	5
Temperature:	30 °C	4. Thiosulfate	10
Inj. Volume:	2.5 µL	5. Iodide	20
Detection:	Suppressed conductivity, ASRS ULTRA II, 2 mm, AutoSuppression recycle mode	6. Thiocyanate	20
		7. 4-Chlorobenzene sulfonate	5
		8. Perchlorate	30



Şekil 3.8: AS16 ve AS20 kolonlarında perkloratın kromatografik ayırımı.

### 3.2 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

#### 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).

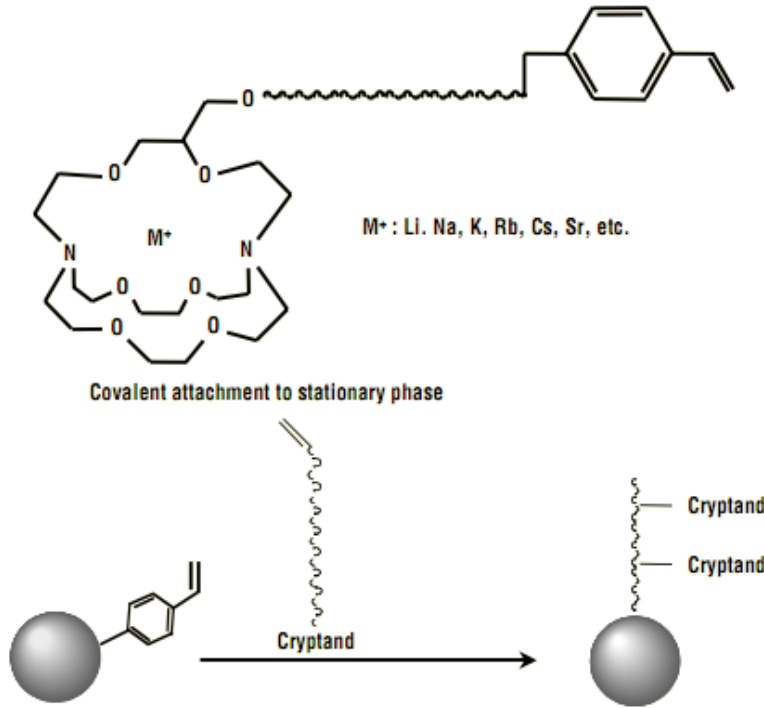
### **Kolon Yapılışı:**

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

AS20 kolonları ekonomi ve kullanımda kolaylık bakımından ASRS ULTRA II Suppresörleri ile kullanılmalıdır. Kolon sıcaklığı tekrarlanabilirlik açısından kontrollü olmalıdır (Dionex Ref. Lib., 2007).

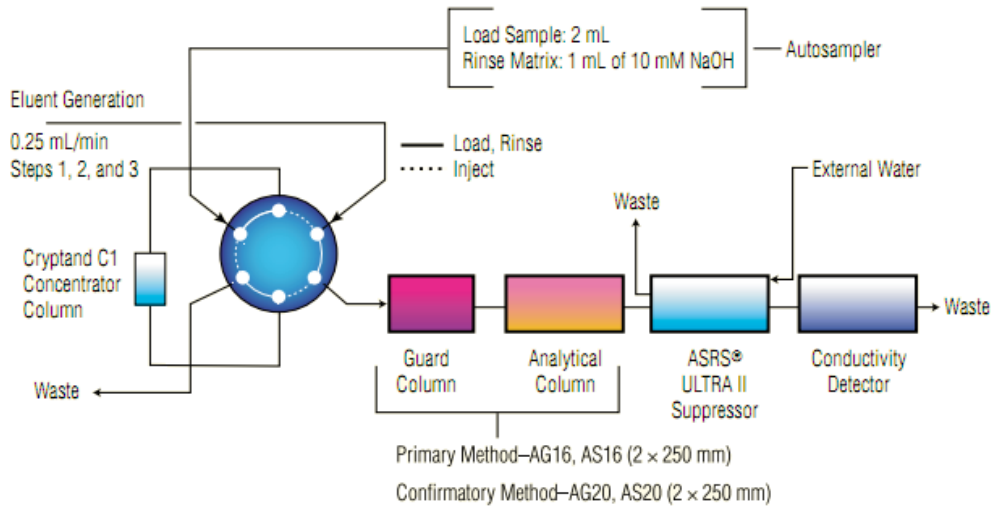
## **3.3 Cryptand C1 Konsantrator Kolon**

IonPac Cryptand C1 konsantratör kolonu, Şekil 3.9' da görüldüğü gibi bir cryptand bileşiğinin stirendivinilbenzen makroporoz bileşiğine kovalent olarak bağlandığı bir reçine teknolojisidir. Cryptand molekülü potasyum, sodyum, lityum gibi metal katyonları ile kompleks oluşturabilen bisiklik bir bileşiktir. Minimum iyon değiştirme kapasitesine sahiptir. Metal katyonlarının varlığında bileşikte pozitif yüklü bir bölge meydana gelir ki bu bölge anyon değiştirici olarak fonksiyon gösterir. Böylece geleneksel iyon değiştirmeye benzer şekilde bir anyon değişimi gerçekleşir. Kompleksleşme için çok fazla metal katyonu kullanılabilmesine rağmen, çoğu uygulamada lityum hidroksit ve sodyum hidroksit başarılı olarak kullanılır. Kullanılan metal katyonunun bağ sabiti değeri çok düşük ise (bağ sabiti değeri yaklaşık 1 olan lityum gibi) çok az iyon değiştirme bölgesi meydana gelir ve bu yüzden konsantratör kapasitesi çok düşüktür. Ancak kullanılan metal katyonunun bağ sabiti değeri daha yüksek ise (bağ sabiti değeri yaklaşık 3,9 olan sodyum gibi) çok fazla iyon değiştirme bölgesi meydana gelir ve bu yüzden konsantratör orta derecede iyon değiştirme kapasitesine sahiptir.



17141

**Şekil 3.9:** Cryptand C1 reçinesinin oluşumu.

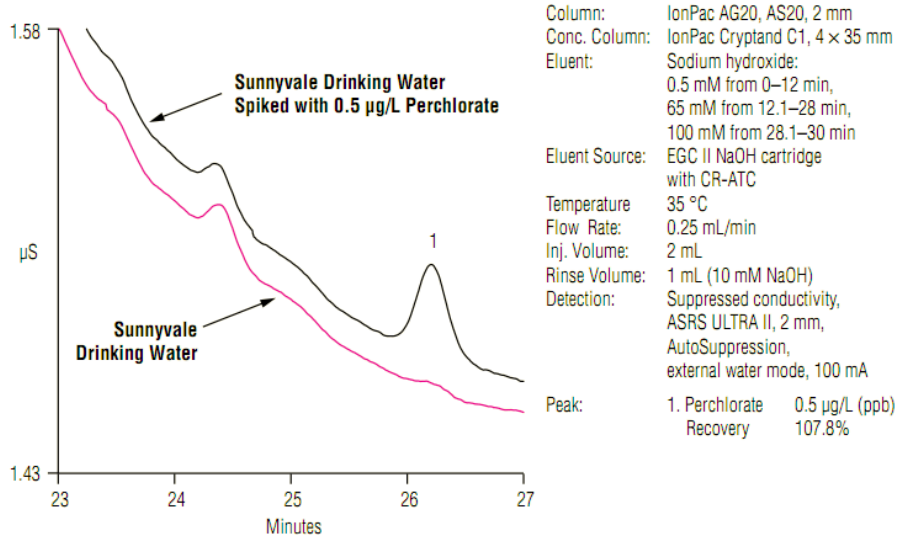


**Şekil 3.10:** Eser miktarda perklorat analizi için sistem akış diyagramı.

U.S. E.P.A Metod 314.1' e göre eser miktarda perklorat analizi için sistem akış diyagramı Şekil 3.11' de görüldüğü gibidir. Örnek ilk olarak cryptand C1 konsantratör kolonuna bir otoörnekleyici ile ya da manual olarak gönderilebilir.

Çoğu çevresel su örneği 10 mg/L' den 1000 mg/L' ye kadar klorür, sülfat ve karbonat formunda çözünmüş katılar içerebilir. Bu çözünmüş katıların çok büyük bir kısmı, 10 mM' lık NaOH ile yıkama basamağında uzaklaştırılır. Çünkü perklorat

çözünmüş katılara nispeten kolonda korunur, yoksa perkloratın tamamı kolonda kalır.



**Şekil 3.11:** Cryptand C-1 konsantratör kolonu ile içme suyunda perklorat analizine ait kromatogram.

### 3.4 IonPac Cryptand C-1 Konsantratör Kolonunun Özellikleri

**Boyutları:** 4×35 mm

**Uygulanabilen maksimum basınç:** 4000 psi

**Mobil Faz Uyumu:** pH 0-14; % 0-100 HPLC solventleri

#### **Substrat Karakteristikleri:**

Süpermakropor reçine

Tanecik çapı : 17,5 µm

Por büyüklüğü : 100 Å

Çapraz bağlanma (%DVB) : % 55

#### **İyon Değiştirici Grup:**

Cryptand (bağlı metal katyonu ile)

#### **Fonksiyonel Grup Karakteristikleri:**

Farklı Hidrofobisiteelerde (eluate bağlı)

#### **Kapasite:**

30 µeq (4x35 mm kolon) (sodyum formu).

#### **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.



## 4. ANYONLAR VE ANYON ANALİZLERİNİN ÖNEMİ

Biyokimyasal döngü ve genel toplum sağlığı açısından bazı anyonların su ve besinlerde belli konsantrasyonların üzerinde olması sakıncalıdır.

### 4.1 Perklorat İyonu ve Özellikleri

Perklorat anyonu, klor atomu ve buna bağlı dört adet oksijen atomundan oluşan negatif yüklü bir iyondur. Molekül formülü  $ClO_4^-$  tür. Perklorat tuzları perklorat anyonuna bağlı pozitif yüklü gruplardan; örneğin amonyum, alkali veya toprak alkali metallere bağlı oluşan inorganik bileşiklerdir. Perkloratlar renksiz ve kokusuzdur. Büyük miktarlarda üretilen beş perklorat: magnezyum, potasyum, amonyum, sodyum ve lityum perklorattır. Perkloratlar doğada katı halde veya sulu çözeltilerde bulunurlar. Perkloratlar normal sıcaklıkta kararlıdır; ama yüksek sıcaklıklara ısıtılırlarsa reaksiyon vermeye başlarlar. Reaksiyon vermeye başladıklarında büyük miktarda ısı üretirler. Isı üretimi devam ettikçe reaksiyon vermeye devam ederler ve bu zincirleme reaksiyon patlama oluncaya kadar devam eder. Perkloratlar bu şekilde reaksiyon verdikleri için roket motorları, havai fişek, işaret fişekleri, barut ve patlayıcı maddeler yapımında kullanılırlar. Yüksek sıcaklıkta hızlı bir şekilde reaksiyon vermeleri nedeniyle çevrede bulunmaları istenmez. Ama normal sıcaklıklarda çok yavaş reaksiyona girerler. Birkaç yıl boyunca reaksiyon vermeden kalabildikleri bilinmektedir (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2008).

Perklorat; potasyum, sodyum, amonyum perklorat gibi tuzların iyonlaşmış formudur ve suda çok iyi çözünür. Bulunduğu ortamda uzun süre sabit kalabilir. Potasyum perklorat uzun süre tıpta hipertiroid tedavisinde kullanılmıştır. Günümüzde daha çok fişeklerde ve otomobil hava yastıklarında kullanılmaktadır. Sodyum perklorat sıvı patlayıcıların üretiminde, amonyum perklorat ise yaygın şekilde roket, füze ve havai fişek yapımında kullanılmaktadır (Soldin ve diğ., 2001). Yüksek konsantrasyonlarda ilk olarak 1990'ların başında Kaliforniya'daki su kuyularında tespit edilen perkloratların tiroid bezi tarafından iyodür alımını inhibe ettiği bilinmektedir.

Perkloratlar tiroid folikül epitelyum hücrelerinde iyot alımından sorumlu olan sodyum iyodür simporteri (NIS) adlı taşıyıcı proteine bağlanarak iyot alımını engeller. Bilinen tüm etkilerinin, bu proteinin inhibe edilmesi, dolayısıyla da tiroid hormonu üretiminin engellenmesi sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (Wolff, 1998). Yer altı ve yüzey suyu kirleticisi olarak perklorat Amerika’ da çok yaygın bir problemdir. Uygun koşullar sağlandığında, perklorat atmosferde hipoklorit veya klorürden doğal olarak oluşabilmektedir(Dasgupta ve diğ., 2005). Yağmur suyunda da ölçülebilir miktarda bulunan perklorat, deniz suyunda düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır(Martilengo ve diğ., 2006). HOCl atmosferde bulunan önemli bir klorür rezervi olarak düşünülebilir (Tanakaa ve diğ.,1998). Atmosferik HOCl oluşum ve yıkım prosesleri arasında önemli bir ilgi vardır.

#### 4.2 Hipokloritin Bozunması Üzerine Çalışmalar

1874’ te yapılan çalışmaların ilkinde, O<sub>3</sub> hipoklorik asit veya hipoklorit çözeltisinden geçirilir ve böylece perklorik asit oluşturulur (T.Fairley, 1874).

Bu basamağı, hipokloritten klorat oluşum basamağı takip eder (Forester ve diğ., 1917).



(4.1) numaralı basamak çok hızlı ve (4.2) numaralı basamak yavaş basamak olduğu için HCIO konsantrasyonu sabit kalır.

Hipokloröz astinin (HOCl + OCI<sup>-</sup>) bozunmasında, pH 4-14 aralığında yapılan çalışmalar sonucunda Chapin, (1934), seyreltik hipoklorit çözeltisinin pH 13.1 değerinde en kararlı ve nötral pH değerinde (pH 6.7) en az kararlı olduğunu bulmuştur. Bazik çözeltilerde; klorit önemli miktarlarda bulunmuştur. Asidik çözeltilerde; hipokloritin bozunması üçüncü dereceden bir reaksiyon ile olur ve hız basamağını Forester’ in bulgularına göre (4.2) yavaş basamak belirler. Bazik çözeltilerde, bozunma ikinci dereceden klorit oluşumuna neden olur ve aşağıdaki reaksiyonlarda görüldüğü gibi klorit anında klorota dönüşür(Lister, 1956; Adam ve diğ., 1992).





Çünkü reaksiyon (4.4) çok hızlıdır. Adam ve Gordon (1992) hipoklorit iyonu bozunmasını pH 9-10 aralığında klorür iyonu ile katalizlemiştir.

Yokoyama ve Takayasu (1967) ise reaksiyon derecesi gözlemlerine dayanan, HOCl bozunma reaksiyonları üzerine nötral pH' da aşağıdaki mekanizmayı önermiştir.

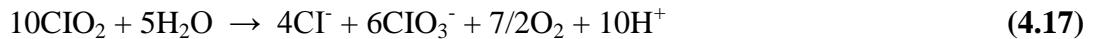


Adam ve arkadaşları (Adam ve diğ., 1992) hız kanunu ve sitokiyometri gözlemlerine dayanan, HOCl bozunma reaksiyonları üzerine pH 5-8 aralığında ve 90 °C' da aşağıdaki mekanizmayı önermiştir.



pH 6' nın üzerinde (4.8) OCl<sup>-</sup> den HCl<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup> oluşumu için ve pH 6' nın altında (10) daki paralel reaksiyon bu mekanizma için hız belirleyen basamaktır. (4.9), (4.11), (4.12), (4.14) ve (4.15) numaralı reaksiyonlar son derece hızlı reaksiyonlardır. Bazik çözeltilerde HOCl' nin bozunma hızının maksimum değeri pH 8 olarak belirlenmiştir.

Klor dioksit ve klorun fotobozunması sonucu ürün olarak klor ve kloratın üretildiği reaksiyonlar aşağıda gösterilmiştir (Leitner ve diğ., Part I 1992).



Kloritin fotobozunması üzerine kinetik çalışmaların sonuçları (Leitner ve diğ., Part II 1992), klorit konsantrasyonunu 50% azaltmak için yaklaşık 9000 J/m<sup>2</sup> lik ışınlama dozunun gerekli olduğunu göstermiştir. 200-250 J/m<sup>2</sup> lik ışınlama dozunda ise klorit konsantrasyonunda önemli bir azalma olmadığı gözlemlenmiştir. Nitrat ve titanyum dioksit varlığında, birkaç gün UV ışığına maruz bırakılan kuru klorit tuzlarının

perklorat ürettiği gösterilmiştir. (Miller ve diğ., 2004) Nitrat ve titanyum dioksidin her ikisinin de UV ışık altında hidroksil radikali ürettiği biliniyordu.

#### **4.3 Perkloratın Vücuda Alınımı ve Atılımı**

Perklorat içeren su veya yiyecekler tüketildiklerinde vücuda girerler. Su içinde kolayca çözünebildikleri için hızlı bir şekilde mide ve bağırsaktan geçerek kana karışırlar. Deri yoluyla doğrudan vücuda giremezler; fakat ellerde bulunurlarsa el-ağız aktivitesiyle oral yoldan alınabilirler.

Kan sistemiyle perkloratlar bütün vücuda taşınabilir ve vücut içinde değişime uğramazlar. Birkaç iç organ; örneğin tiroid, meme doku ve tükürük bezleri, kan sistemindeki büyük miktarda perkloratı alabilir ve birkaç saat içinde bu organları terk ederler.

Perkloratlar yutuldukları zaman küçük bir kısmı dışkıyla atılır. Ağız yoluyla alınan %90' dan fazlası kana geçer. Kandaki perklorat, böbreklere geçer ve buradan da idrarla vucuttan atılırlar. Vücuda giren perkloratın büyük bir kısmı hızlı bir şekilde elimine edilmesine rağmen birçok yiyecek ve içme suyu kaynaklarında bulunan perklorat varlığı perklorata maruz kalmanın devam etmesi anlamına gelmektedir (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2008).

#### **4.4 Perkloratın Biyolojik Etkisi**

Perkloratın esas hedef dokusunun tiroid bezi olduğu bilinmektedir. Tiroid bezi yetişkinlerde metabolizma hızının düzenlenmesinde görev yapar. Çocuklarda ise metabolizma hızının düzenlenmesine ek olarak, büyümenin ve sinirsel gelişimin istenilen seviyede gerçekleşebilmesi için hayati öneme sahiptir. Özellikle hamilelerde tiroid fonksiyonlarının bozulması, fetüsün gelişimini olumsuz yönde etkileyecektir (Glincoer, 2000). Çeşitli türlerde yapılmış olan çalışmalarda, perkloratların tiroid bezi üzerine etkisi ortaya konmuş ve tiroid hormonlarının temel bileşeni olan iyodür alımını engellediği saptanmıştır (EPA, 2002). Perkloratın omurgalılarda tiroid bezinin yapısı ve çalışmasına etkisine ilişkin çok sayıda çalışma mevcuttur (Theodorakis ve diğ., 2006).

Perklorat tiroid bezi tarafından iyoda benzer şekilde depolanır fakat tiroid bezi ya da çevredeki dokular tarafından metabolize edilemez. Sıçanlar ve insanlarda yapılan

çalışmalar perkloratın çoğunluğu idrar yoluyla olmak üzere (>%90) hızlı bir şekilde elimine edildiğini ve bu süreçte herhangi bir değişime uğramadığını göstermiştir (Anbar ve diğ.,1959; Eichler ve Hackenthal, 1962). Perkloratın asıl hedef dokusu olan tiroid bezi çok sayıda foliküllerden oluşur. Foliküllerin içini dolduran kolloidi oluşturan başlıca madde, molekülü içinde tiroid hormonlarını da tutan büyük bir glikoprotein olan tiroglobulindir (Tg) (Barrington, 1964; Zoeller, 2003). Tiroid hormonları tiroglobuline bağlı olarak folikül içindeki kolloidde depolanır. Bu depo vücudun 1-3 aylık ihtiyacını karşılamaya yeterlidir. Bu hormonlar tiroglobulinden ayrılarak serbest hormon şeklinde kana salgılanır ve tamamına yakını plazma proteinlerine bağlanır. Tiroid hormonlarından tetraiyodotironin (tiroksin) veya T<sub>4</sub>, iki adet tirozin aminoasitine toplam 4 tane iyot atomunun bağlanmasıyla oluşur. Triiyodotironin veya T<sub>3</sub>; tiroksinden sadece 1 adet daha az iyot atomu içerir. T<sub>3</sub>, tiroid hormonlarının hedefi olan hücrelerde, T<sub>4</sub>' den 1 adet iyot atomunun çıkarılmasıyla oluşur; bu işlem özgün bir enzim olan deiyodinaz yardımıyla gerçekleşir. Tiroksin ve triiyodotironin sekresyonunun artmasıyla metabolizma hızı % 60-100 oranında artabilir. Salgının ortadan kalkması ise metabolizma hızını normalin % 40 altına düşürür.

Tiroid hormonlarının oluşumu eksojen iyot alımına bağlıdır. Gastrointestinal yolla alınan iyot iyodür halinde hücreler arası mesafeye geçer. Bunun 4/5'i idrarla atılır. Kalan 1/5' i geçici olarak tiroid bezi tarafından tutulur. Tiroid hücrelerinin bazal membranı iyodürü hücre içine taşıyan özel bir yeteneğe sahiptir. Bu olaya 'iyot tutulması' denir. İyodür (I) ve sodyum (Na) iyonları hücrelere basolateral membranda yer alan sodyum (Na) / İyodür (I) simporterleri (NIS) tarafından taşınır. NIS iyodüre karşı yüksek afinite gösterir (Kolbaşı, 2008).

Aynı zamanda iyodüre benzer şekil ve elektrik yüküne sahip diğer iyonları da taşıyabilir. Bu iyonlara bir örnek; perklorattır. NIS' in bu moleküllere afinitesi, iyodüre karşı gösterdiğinden yüksektir. Bu nedenle bu moleküller tiroid hücrelerine iyodürün girişini bloke edebilirler. Bu durum hücrelerde iyodür konsantrasyonunun azalmasına ve T<sub>4</sub> / T<sub>3</sub> hormonlarının üretimi için gerekli olan iyodürün yeterince bulunamamasına yol açar. Perklorat tiroid bezinin iyodür alımını engelleyince azalan tiroid hormon üretimi negatif feed back mekanizmasının devreye girmesine neden olur. Böylece hipofiz bezi daha fazla TSH (Tiroid Uyarıcı Hormon) salgılar. Bu durum, tiroid foliküllerinde kolloid azalması, foliküler hipertrofi, foliküler hiperplazi

ve foliküler lümen boyutunda azalma gibi değişimlere yol açar (Despopoulos, 1997; EPA, 2002; LANL, 2003).

Ayrıca, perkloratın tiroid foliküllerinde anjiyogenesise sebep olduğu da gösterilmiştir (Patino, 2003; Karayazı, 2005). Tiroidin metabolizmayı düzenleyici temel organolmasından hareketle tiroid fonksiyonlarını bozan herhangi bir durumun, karaciğer, böbrek, kalp gibi organları da etkileyeceği çıkarımı yapılabilir. Perkloratların böbrek yapısında da değişikliklere yol açtığına dair bulgular mevcuttur (Capps, 2003; Cheng ve diğ., 2007). Ancak kalp ve karaciğer üzerine etkisi detaylı bir şekilde incelenmemiştir. Perkloratların karaciğerde oluşturabilecekleri düşünölen etkiler çerçevesinde öncelikle tiroid-karaciğer etkileşimlerinin gözden geçirilmesi yerinde olacaktır. Normal durumda tiroid bezi her gün 110 nmol T salgılar (Larsen, 1975). Karaciğer, deiyodinyasyondaki enzim sistemlerinin üretim merkezlerinden başlıcası olmasının yanı sıra tiroid hormonlarının taşınması ve metabolizmasında da çok önemli görevler üstlenmektedir. Radyoaktif iyodür (I) ile yapılan çalışmalara göre karaciğer her seferinde plazmadaki T' ün % 5-10' unu dışarı atar. Hücre içindeki serbest hormon miktarı plazmadakine oranla yüksektir. Bu nedenle sözkonusu süreç enerjiye gereksinim gösterir (Hennemann ve diğ., 2001). Dolaşımdaki T ve T' ün yaklaşık %70' i tiroksin bağlayıcı globuline (TBG), %5' i prealbumine ve az bir kısmı albumine bağlı olarak taşınır ve bu şekilde hormonların % 99' undan fazlası dolaşıma katılmış olur. Böyle bir taşınma mekanizması tiroid hormonlarının hedef dokulara varmadan önce metabolize edilerek vücuttan atılmasını önlemektedir (Christian ve Trenton, 2003). Karaciğer, lipofilik tiroid hormonlarına bağlanan bu proteinleri de üretir. Plazmada serbest haldeki hormonlar, proteine bağlanmış hormonlarla denge halindedir ve hormonun biyolojik aktivitelerini gerçekleştiren, bu serbest kısımdır. T4 ve T3' ün plazmadaki miktarı belli değerler arasında sabit olduğu için dokular aynı konsantrasyondaki hormona maruz kalırlar. Ancak farklı dokulardaki hormon miktarı, o dokudaki taşıma ve deiyodinaz aktivitesi ile bağlantılı olarak değişir (Bianco ve diğ., 2002). Balıklarda tiroid hormonlarının taşınmasında lipoproteinler de önemli rol oynar (Power ve diğ., 2001). Kısaca tiroidin hedef dokulara etkisi sadece hormonlarının sentez ve salınma miktarlarına ve bu bağlamdaki deiyodinyasyona değil, ayrıca taşınmaya, T<sub>4</sub>' ün nuklear reseptörlere bağlanması uzantısında da reseptör dağılımına ve çalışmasına bağlıdır.

Malik ve Hodgson (2002), normal büyüme, gelişim ve hücre içi enerji metabolizması için çok önemli olan tiroid fonksiyonlarının, normal bir tiroid-karaciğer eksenini oluşmasına bağlı olduğunu rapor etmekte; tiroid ve karaciğerin intrasellüler sinyal iletimi çerçevesindeki ilişkilerini, normal ve kronik hastalık durumlarında tiroid metabolizmasını ve tiroid hastalıklarında ortaya çıkan karaciğer anomalilerini geniş bir derlemeyle sunmaktadırlar. Tiroid bezi ve karaciğerin karşılıklı etkileşimlerini belirlemeye yönelik olarak özellikle memelilerde çok sayıda araştırma yapılmıştır. Etkileşimin ilk örneği tiroid hormonlarının öncül maddesi olan tirozinin, dışarıdan besinlerle alınabileceği gibi, karaciğerde fenilalaninin değişime uğraması sonucu da oluşturulabilmesidir. Sindirim kanalında proteinlerin sindirimi sonucu serbest hale geçen tirozin, karaciğerde zehirsizleştirildikten sonra idrarla atılır. Hipotiroidi ve hipertiroidi, tiroid işlevlerini etkileyen iki farklı olgu olarak çok değişik araştırmalarda ele alınmıştır. Sıçanlarda hipotiroidi safra akımını yavaşlatıp (Layden ve Boyer, 1976) safrayla atılan bilirubin miktarını azaltırken (Van Steenbergen v.dğ., 1989); karaciğerin üre sentezleme kapasitesini artırmaktadır (Marti ve dğ., 1988).

Hipertiroidizm ise bazal metabolizma hızını ve hepatik oksijen kullanımını artırmaktadır (Iossa ve dğ., 1992). Hipotiroidi ve hipertiroidi, karaciğer glikojen metabolizmasında da etkilidir. Holness ve Sugden, (1987), yine sıçanlarda hipertiroidizm durumunda karaciğerde glikojen sentezinin bloke edildiğini ortaya koymuşlardır (Demartino ve Goldberg, 1978). Sıçanlarda tiroid bezinin salgıladığı hormonların karaciğer ve iskelet kaslarındaki lizozomal enzim aktivitesini kontrol ettiğini öne sürmüşlerdir. Akut ya da kronik karaciğer hastalığı olan insanlarda ise serum T ve TBG seviyelerinde artma olduğu tespit edilmiştir (Babb, 1984; Huang, 1990). Bu bilgilere rağmen, memelilerde hipertiroidi durumunda karşılaşılan karaciğer hasarının, daha ziyade kalp yetmezliği, dengesiz beslenme, enfeksiyon gibi nedenlerle oluşan ikincil bir sorundan kaynaklandığını öne süren raporlar da bulunmaktadır (Klion v.dğ., 1971; Sheridan , 1983; Sellin ve Vasilopoulou, 2000; Özdemir, 2005).

## 4.5 NIS Proteini Ve Anyonların Bu Proteine Etkileri

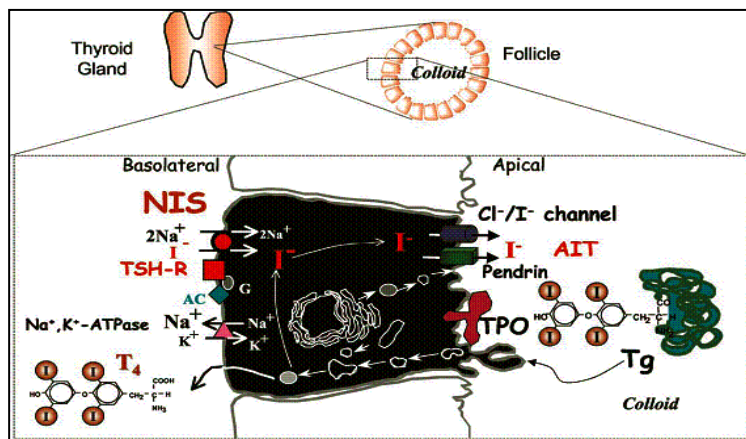
### 4.5.1 Nis proteini hakkında genel bilgi

NIS inhibitörü anyonlar tiroide gelmesi gereken toplam iyodür alımını düşürerek thyroxine (T<sub>3</sub>) ve triiodothyronine (T<sub>4</sub>) hormonlarının tiroide üretimini azaltırlar. Bütün NIS inhibitörlerinin zehirlenme mekanizmaları benzerdir. T<sub>4</sub> hormonunun hamilelik boyunca az üretilmesi cenin beyninin düzgün olarak gelişmesinde problem çıkarır. Bu yüzden hamilelikte düşük bir TIU çocuklarda kalıcı zihinsel eksikliklere neden olur. Toplam NIS girişim yüklenmesi toplam guatr yüklenmesi olarak bilinir. Ayrıca iyodürün beslenme yolu ile yeterince alınmaması tiroide benzer zehirlenme mekanizması oluşmasına neden olur. Bu yüzden TIU seviyesini beslenme ile alınan iyodür miktarı ve NIS inhibitörlerinin miktarı belirler (Niemann ve diğ., 2008).

NIS ayrıca, emzirme ile besin ihtiyaçlarının karşılanması amacıyla memeli bezlerinde de bulunmuştur (European Reference Materials, 2006).

Bilimsel araştırmalar TIU' nun % 25'in altına düşmesi ile şunların bağlantılı olduğunu bulmuştur:

- Dikkat eksikliği ve hiperaktiflik düzensizlikleri (ADHD)
- Düşük, sözlü zeka katsayısı (IQ)
- Düşük toplam IQ
- Düşük motor performansı



Şekil 4.1: Tiroide bezinde NIS' in iyodürü taşıma mekanizması.

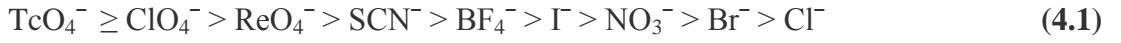
ÖIG bilimsel verileri US' de doğan bebeklerin % 6,9' unun TIU değerlerinin % 25' ten daha düşük olduğunu tespit etmiştir (US da yılda 276000 bebek doğar). Ancak

OIG' nin çalışmalarına göre TSH' ı yüksek seviyelerde olan ve reaksiyon gecikmesi olan çocuklarda % 25-50 TIU değeri olanların normal çocuklar olabileceği saptanmıştır.

#### 4.5.2 Sodyum / İyodür Symporter (NIS) inhibitörleri

NIS, kan serumundan tiroidin follikuler hücrelerine sodyum ve iyodür iyonlarını aktif olarak taşıyan bir trans-fosfolipid membran proteindir.

NIS, iyodür anyonuna büyük ilgiye sahip olmasına rağmen çoğu tek değerlikli anyonu da taşıyabilir. (De Groef, 2006; Carrasco, 2005). Şu anyonlar tiroid bezinde birikir veya NIS'ı inhibe eder: Perteknetat ( $TcO_4^-$ ), perklorat ( $ClO_4^-$ ), perrenat ( $ReO_4^-$ ), tiyosiyanat ( $SCN^-$ ), bor tetraflorür ( $BF_4^-$ ), iyodür ( $I^-$ ), nitrat ( $NO_3^-$ ), bromür ( $Br^-$ ), klorür ( $Cl^-$ ), klorat ( $ClO_3^-$ ), selenosiyanat ( $SeCN^-$ ), periyodat ( $IO_4^-$ ) ve bromat ( $BrO_3^-$ ) (Carrasco, 2005; Wolff, 1998; Dohan, 2007). İyodür, NIS' a en yüksek ilgiyi gösteren anyon değildir. İlgi sırası ise şöyledir:



Bu sıralamadan görüldüğü gibi perklorat iyodüre göre daha fazla seçimlidir.

1953' ten bu yana yapılan çalışmalarda NIS inhibitörleri olan perklorat, tiyosiyanat ve nitrat için nispi etkileri Çizelge 4.1'deki gibidir (Niemann ve diğ., 2008).

**Çizelge 4.1:** Perklorat, tiyosiyanat ve nitrat anyonlarının NIS' a nispi etkileri.

Çalışma	Çalışma açıklaması	NIS inhibitörlerinin nispi etkileri(molar konsantrasyona bağlı)		
		Perklorat	Tiyosiyanat	Nitrat
Tonnacchera 2004	İnsan NIS'ını ifade eden in vivo Çin Hamster Yumurta hücreleri	1	15	240
Alexander 1966	In vivo Farelerde tiroidin ağırlığının % 50 artması	1	20	550
Alexander 1966	In vitro fare tiroid parçası	1	20	400
Greer 1966	In vitro fare tiroidleri	1	20	240
Wyngaarden 1953	In vivo fare	1	10	300

Tonnacchera NIS modelinde iyodür alımını, iyodür, perklorat, tiyosiyanat ve nitrat anyonları varlığında hesaplayan bir formül geliştirilmiştir. Bu formülde toplam iyodür alımı şu oranla bulunmaktadır:

$$[I^-] / (1.22 + ([ClO_4^-] + [NO_3^-]/240 + [serbest SCN^-]/15)) \quad (4.2)$$

[ ], her bir anyonun  $\mu\text{mol/L}$  cinsinden konsantrasyonudur. Bu eşitlik dört anyonun farklı konsantrasyonları ile oluşabilecek zehirlenmeleri belirleme açısından son derece faydalıdır. Hamilelik ve emzirme döneminde toplam iyodür alımındaki azalma ile doğrudan oluşabilecek kötü sonuçlar bağlantılıdır. Bu model ile hesaplanmış spesifik toplam iyodür alımı seviyesi ile spesifik kötü sonuçlar arasındaki bağıntı yapılıdır (Niemann ve diğ., 2008).

#### **4.5.3 Hipotiroidizm veya hipotiroxinemia' nın oluşması**

Cenin beyin gelişiminin düzgün ilerlemesi için gebelik boyunca T4 hormonunun yeterli düzeyde alınması gerekir. Cenin, gebeliğin ortalarında veya ilerleyen zamanlarında anne T<sub>4</sub> üne tamamıyla bağımlıdır (Glinoe, 2005). Annenin hipertiroidizmi çocuk için toksiktir.

Hipotiroidizm düşük iyodür alımından kaynaklanmasına rağmen perklorata maruz kalmaya bağımlı değildir. Tonacchera modeli göstermiştir ki kandaki iyodür miktarı ile NIS ile alınan iyodür miktarı arasında doğrudan bir ilişki vardır. Bu yüzden beslenmedeki iyodür eksikliği zehirlenmenin benzer etkisini gösterir ve NIS' in yüksek derecede inhibe edilmesine neden olur.

NIS inhibitörü olan tiyosiyanat, nitrat ve perkloratın NIS inhibisyonu için sinerjik veya ters etkileriyle ilgili kesin bir kanıt yoktur. Sadece bu anyonların molar etkileri toplam inhibisyonu belirler. OIG, şu üç epidemiyolojik çalışmaların sonucunu vermiştir:

Şiddetli hypothyroxinemia, siyanüre maruz kalan elektrokaplama endüstrisindeki çalışanlarındaki NIS inhibitörü tiyosiyanata maruz kalınması ile oluşabilir (Banerjee, 1997). Hypothyroxinemia, tiyosiyanatlı koruyucu içeren sütleri tüketen bayanlarda görülebilir (Banerjee, 1997).

Hypertrophy, okul çağındaki çocukların nitrata maruz kalması ile oluşabilmektedir (Niemann ve diğ., 2008).

#### **4.5.4 NIS inhibisyonunu tolare etmede iyodürle beslenmenin rolü**

Tonacchera Modeli, iyodür alımının NIS' a etkisini de incelemiştir. UIC' nin 50; 72,5 ve 145  $\mu\text{g/L}$  konsantrasyonlarının 1,501  $\mu\text{mol/L}$ 'deki kısımlarına bağılı olan 0,34, 0,50 ve 1,00 değerleri iyodür seviyesi olarak kullanılır. UIC'nin 50, 72,5 ve 145  $\mu\text{g/L}$  konsantrasyonları iyodür yetersizliği için sınır değerleridir (Niemann ve diğ., 2008).



**Çizelge 4.2:** NIS İnhibisyonunu Tolare Etmede İyodürle Beslenmenin Önemli Sonuçları.

Normal %TIU Seviyesi	İyodürle Beslenmenin Normal kısmı	SPEC(% TIU) $\mu\text{mol/L}$	US Normal++ TIU Seviyesine Ulaşmak için İlave SPEC ( $\mu\text{mol/L}$ )	Belirlenmiş TIU seviyesini oluşturmak için NIS inhibitör ilavesinin yüzde artışı (%)
% 10	0,34*	8,03	6,53	% 435
% 15	0,34*	4,94	3,45	% 230
% 20	0,34*	3,41	1,90	% 127
% 22,7	0,34*	2,85	1,35	% 90
% 25	0,34*	2,48	0,98	% 65
% 30	0,34*	1,86	0,36	% 24
% 34	0,34*	1,501	0	% 0,0
% 10	0,50†	12,38	10,88	% 725
% 15	0,50†	7,85	6,35	% 423
% 20	0,50†	5,58	4,08	% 272
% 22,7	0,50†	4,77	3,27	% 218
% 25	0,50†	4,22	2,72	% 181
% 30	0,50†	3,32	1,81	% 121
% 34	0,50†	2,78	1,28	% 85
% 50	0,50†	1,501	0	% 0,0
% 15	1,00	16,92	15,41	% 1027
% 20	1,00	12,38	10,88	% 725
% 22,7	1,00	10,77	9,27	% 618
% 25	1,00	9,66	8,16	% 544
% 34	1,00	6,78	5,28	% 352
% 50	1,00	4,22	2,72	% 181
% 100 (normal TIU)	1,00	1,501	0	% 0,0

#### 4.5.5 Herbir NIS stresörün etkisinin değerlendirilmesi

İyodürle beslenme halk sağlığı açısından kritik bir öneme sahiptir. Tonacchera Modeli, iyodür miktarı ile vücudun toplam NIS inhibisyon yüklemesi (SPEC ile ölçülen) arasındaki ilişkiyi basitleştiren iki eşitlik yayınlamıştır.

**Çizelge 4.3:** İyodür Miktarı İle Vücudun Toplam NIS İnhibisyon Yüklemesi Arasındaki İlişki

Normal %TIU Seviyesi	Normal İyodür Beslenmesi (%)	SPEC $\mu\text{mol/L}$	US Normal*inden TIU Seviyesine Ulaşmak için SPEC de azalma ( $\mu\text{mol/L}$ )	Toplam NIS inhibitör yüklenmesinde yüzde değişiklik
% 99	% 100	1,528	0,027	% 1,8
% 99	% 99	1,501	0,0	% 0,0
% 100	% 100	1,501	0,0	% 0,0
(normal TIU)				
% 100	% 99,4	1,468	0,015	% -1,0
% 100	% 99	1,474	0,027	% -1,8
% 101	% 100	1,474	0,027	% -1,8

İyodür eksikliği NIS stresörleri arasında en baskındır. Beslenme ile alınan iyodürdeki % 1' lik azalma vücudun toplam NIS inhibisyon yüklenmesinde % 1,8' lik azalmaya yakın bir etki gösterir. Yani iyodürdeki azalma diğer NIS inhibitörlerine göre TIU'da iki kat fazla etki gösterir.

Tonacchera Modeli, TIU' ya etkide dört anyonunda hesabını içerir. Şu sıralama stresörlerin halk sağlığı etkilerini karşılaştırılması bakımından önemlidir.

İyodür eksikliği >  $\text{SCN}^-$  >>  $\text{NO}_3^-$  >>>  $\text{ClO}_4^-$

Herbir NIS stresörün bu nispi etkisi halk sağlığı açısından alınacak önlemler için oldukça faydalıdır (Niemann ve diğ., 2008).

#### 4.5.6 İyodürle zayıf beslenmede azalan toplam NIS inhibisyon yüklenmesinin etkisinin değerlendirilmesi

Tonacchera Modeli, TIU seviyesi normal ayarlansın diye iyodürle fakir beslenmeyi telafi etmek için vücudun azalan toplam NIS inhibisyon yüklenmesi değerlendirmesini açıklayabilir. İyodür beslenmesinde % 1 düşüş (UIC' nin 143,6  $\mu\text{g/L}$  konsantrasyonuna denk gelen) vücudun toplam NIS inhibisyon yüklenmesinin 0,027  $\mu\text{mol/L}$  azalmasına neden olur. % 7,5 azalma ile 0,176  $\mu\text{mol/L}$  ve akıl iyodür

eksikliği sınır değeri olan % 31 azalma ile ise vücudun toplam NIS inhibisyonu yüklenmesinde 0,843 µmol/L SPEC azalışı gözlenir.

Sonuç olarak NIS inhibitörlerine ortalama maruz kalmada azalma iyodür eksikliğinin telafisi için etkili bir çözüm değildir. Bunun tek telafi yolu besin ile iyodür alımının arttırılmasıdır (Niemann ve diğ., 2008).



## 5. DENEYSEL KISIM

### 5.1 Kullanılan Kromatografi Sistemi

Bu çalışmada DIONEX ICS-3000 ( Dionex Corporation, USA ) İyon Kromatografi Sistemi kullanılmıştır. Bu sistem, DP-1 çiftli pompa ( çalışmada isokratik pompa kullanıldı), tek ve çift pompa sistemlerine uygun EG-2 Eluent Üreteç, DC-2 Dedektör-Kromatografi Modülü ve AS Oto-örnekleyici kısımlarından oluşmaktadır. Otoörnekleyicinin örnek alma hacmi 250 µL, sample loop hacmi 100 ve 10 µL' dir. Eluent üreteç kartuşu, RFIC-Eluent Gaz Giderici ve devamlı rejenere olan CR-ATC Anyon Tuzak Kolonu kısımlarını içeren EG-2 eluent üretici, istenilen zamanda istenilen konsantrasyonda eluent ( çalışmada NaOH ) hazırlayarak, bu eluenti kolona gazı giderilmiş ve kirliliklerden arındırılmış olarak verir. DC-2 modülü kromatografik ayırım bölümünde, RFIC TM IonPac AS20 Analitik ( 2 X 250 mm ) anyon değiştirici kolon ve RFIC TM IonPac AG20 Guard ( 2 X 50 mm ) ön-koruma kolonu ile dedektör bölümünde ASRS ULTRA II-2mm suprasör ve iletkenlik dedektörü parçaları bulunmaktadır. AS20 kolonunun reçinesi 7,5 µm partikül çapında, fonksiyonel grubu kuaternar amonyum grubu olan divinilbenzen ile çapraz-bağlı süpermakroporöz polivinilbenzil amonyum polimeridir. AS20, polarize olabilen anyonları kısa sürede ayırabilen hidroksit seçici anyon değiştirici bir kolondur. AG20 ise, 11 µm partikül çapında reçine bileşimi mikroporöz polivinilbenzen ve fonksiyonel grubu kuaternar amonyum grubu olan guard kolondur. AG20 mikroporöz yapılı olduğundan uzun süre optimum performans göstermektedir. Ayrıca, bu modülde analiz güçlüğü yaşanan eser anyonlar için Cryptand C1 konsantratör kolonu kullanılmaktadır. Bu kolon, bir cryptand bileşiğinin stirendivinilbenzen makroporoz bileşiğine kovalent olarak bağlandığı bir reçine teknolojisidir. Cryptand molekülü potasyum, sodyum, lityum gibi metal kationları ile kompleks oluşturabilen bisiklik bir bileşiktir. Minimum iyon değiştirme kapasitesine sahiptir. Dedektör olarak, CD iletkenlik dedektörü ve suprasör olarak kendini rejenere edebilen ASRS ULTRA II 2 mm kullanılmıştır.

## 5.2 Kullanılan Kimyasallar ve Araçlar

Eluent (NaOH), sistemde on-line olarak EG-2 (DIONEX, USA) elektrolitik eluent üreteç modülünde multigradient-çok eğimli biçimde oluşturulmuştur.

1000 mg/L'lik sertifikalı standart Perklorat çözeltisi Alltech'ten ( Deerfield, IL, USA) satın alınmıştır.

10 mM NaOH baz çözeltisi için, 0, 020 gr Merck marka katı NaOH tartıldı ve 50 mL' lik balon jodede hazırlandı.

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

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

Kuvvetli katyon değiştirici reçine Merck'den (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany) ve C-18 katı faz ekstraksiyon kartuşları Waters-Millipore' dan temin edildi.

## 5.3 Standartların Hazırlanması

1000 mg/L'lik standart perklorat çözeltisinden 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250 ve 500 µg/L konsantrasyonlarında standart çözeltiler 25 mL' lik balon jodelere hazırlandı.

## 5.4 Musluk Suyu ve Havuz Suyunun Analize Hazır Hale Getirilmesi

**Musluk Suyunun Analize Hazır Hale Getirilmesi:** Öncelikle şebeke suyu alma kurallarına uygun olarak çeşme suyu alındı. Çeşme suyunun doğrudan ölçümü yapılmadan önce analize hazır hale gelmesi için çeşitli ön işlemlerden geçirildi. Anyon analizlerinde, analizi yapılacak örneklerin katyon içermemesi istenir. Çünkü katyonlar kromatogramlarda gürültüyü artırabilir ve pik verebilirler. Bu nedenle alınan çeşme suyu belirli miktarda KKDR ( kuvvetli katyon değiştirici reçine ) ( 1gr KKDR / 10 mL örnek ) ile 20 dk. boyunca çalkalayıcı da çalkalandı. Reçine kullanılmadan önce 1 M NaOH ile yıkanıp bir gece bekletildi. Nötralleştikten sonra bir gece de 1 M HCl de bekletildi. Sonra reçine klorür kalmaması için saf suyla yıkandı ve süzüntüye klorür varlığı kontrolü için, AgNO<sub>3</sub> testi yapıldı. Organik kirlilikleri uzaklaştırmak için, aseton ile yıkanan reçine su ile muamele edildikten

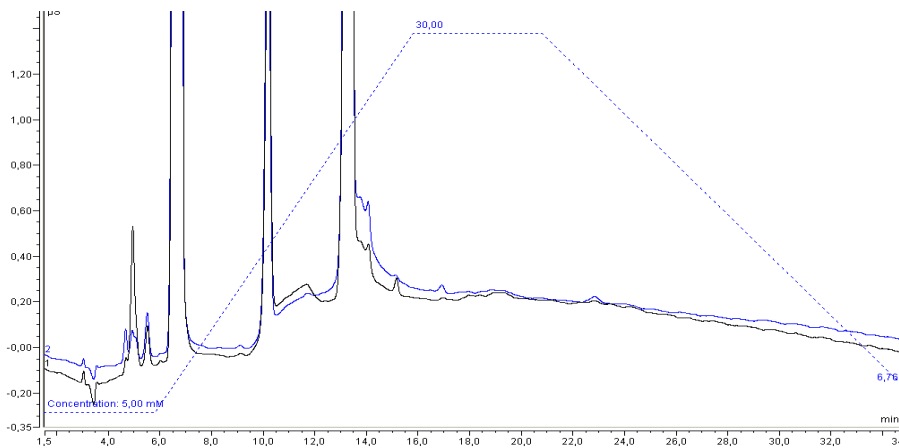
sonra süzülerek kullanıldı. Örnekte bulunması muhtemel polar organik bileşiklerin uzaklaştırılması için, C-18 kartuşlar kullanıldı. Bu kartuşların şartlandırılması, yaklaşık 0,25 mL/dk hızla 2' şer mL hekzan, aseton ve su ile yapıldı. Hazırlanan konsantrasyonlarda çeşme suyu örnekleri, küçük taneciklerin tutulup kolonun tıkanmasını önlemek amacıyla PES 0,20 µm'lik filtrelerden süzülerek viallere dolduruldu ve cihazın AS (autosampler) bölümüne uygun programda analizlenmek üzere yerleştirildi.

Şebeke suyu ile 25 mL' lik balon jöjelere son konsantrasyonları 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250 ve 500 µg/L olacak şekilde  $\text{ClO}_4^-$  sulu çözeltileri hazırlandı (spike). Yukarıdaki işlemlerin aynısı uygulanarak analizi yapılması için cihaza verildi. %' de geri kazanım miktarlarına bakıldı.

**Havuz Suyunun Analize Hazır Hale Getirilmesi:** İ.T.Ü. Spor Tesisleri Kapalı Yüzme Havuzu' ndan, su örneği toplama kurallarına uygun olarak alınan, yaklaşık 200 mL havuz suyu örneğine yukarıdaki işlemlerin birebir aynısı uygulandı. %' de geri kazanım miktarlarına bakıldı.

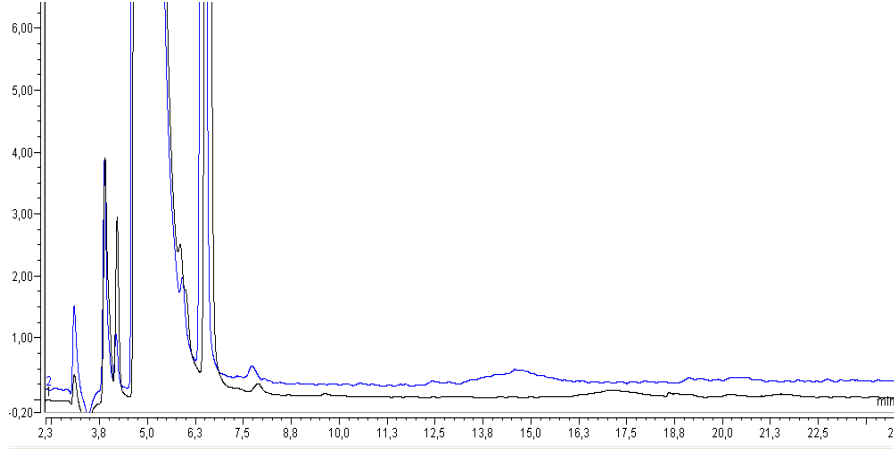
#### 5.4.1 Havuz suyu ve musluk suyu analizleri için optimizasyon çalışmaları

Eluent konsantrasyonu, 0-5 dk 5 mM NaOH; 5-15 dk 30 mM NaOH; 15-20 dk 30 mM NaOH; 20-35dk 5 mM NaOH, suprasör akımı 19 mA, kolon sıcaklığı 40 °C programında, 10 µg/L ve 100 µg/L konsantrasyonlarında hazırlanan musluk suyu çözeltilerinin kromatogramları şekil (5.1)' de gösterilmiştir.



**Şekil 5.1 :** 10 µg/L ve 100 µg/L  $\text{ClO}_4^-$  eklenmiş musluk suyu örneklerinin kromatogramları.

Eluent konsantrasyonu, 0-25 dk 35 mM NaOH; suprasör akımı 22 mA, kolon sıcaklığı 30 °C programında, 10 µg/L ve 100 µg/L std. ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> eklenmesiyle hazırlanan musluk suyu çözeltilerinin kromatogramları şekil (5.2)' de gösterilmiştir.



**Şekil 5.2:** 10 µg/L ve 100 µg/L ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> eklenmesiyle hazırlanan musluk suyu çözeltilerinin kromatogramları.

Her iki programla yapılan analizlerin kromatogramları incelendiğinde, perklorat analizi için kesinlikle uygun olmadığı görülebilir.

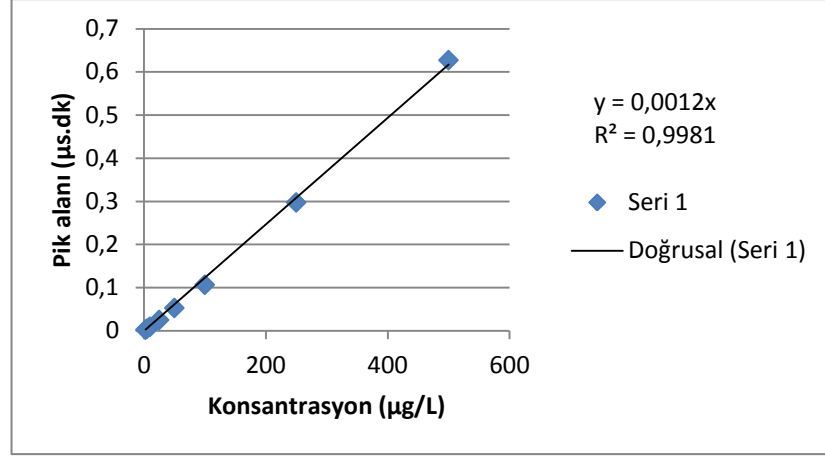
**Havuz suyu ve musluk suyu analizleri için kromatografi koşulları:** Eluent konsantrasyonu 0-7 dakikalar arası 0,5 mM NaOH; 7,1-15 dakikalar arası 60 mM NaOH; 15,1-25 dakikalar arası 0,5mM NaOH; suprasör akımı 38mA, kolon sıcaklığı 40 °C, akış hızı 0,25 mL/dk ve sample loop hacmi 100 µL' dir.

Bütün standart ve numuneler cihazdan da gelebilecek hatalara bağlı olarak en az 3' er defa analizlenmiştir.

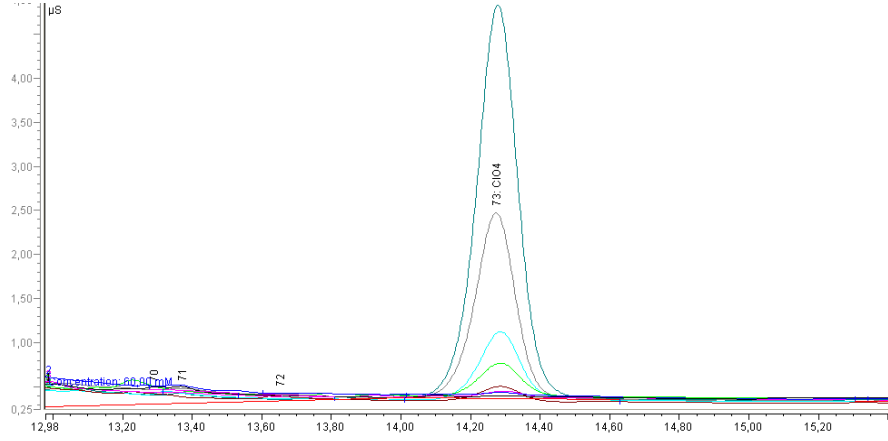
Bu optimize koşullarda, perklorat için 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250 ve 500 µg/L konsantrasyonlarındaki çözeltilerin analizlenmesiyle elde edilen kalibrasyon grafiği şekil (5.3) 'deki gibidir. Bu grafiğe göre korelasyon katsayısı 0,9981 olarak bulundu.

Şekil (5.4)'de 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250 ve 500 µg/L standart ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> çözeltilerinin kromatogramları gösterilmektedir.





Şekil 5.3: 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250 ve 500 µg/L konsantrasyonlarındaki çözeltilerin analizlenmesiyle elde edilen kalibrasyon grafiği.



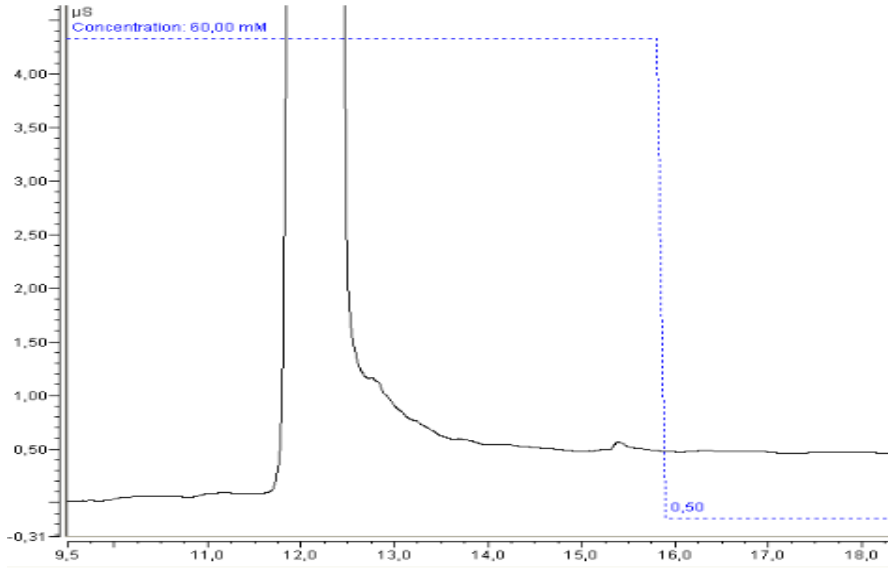
Şekil 5.4: 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250 ve 500 µg/L standart ClO₄⁻ çözeltilerinin kromatogramları.

#### 5.4.2 Musluk suyunda perklorat anyonu tayini

Perklorat anyonu için kalibrasyon çözeltileri hazırlanmış ve sonuçlar çizelge 5.1' de verilmiştir.

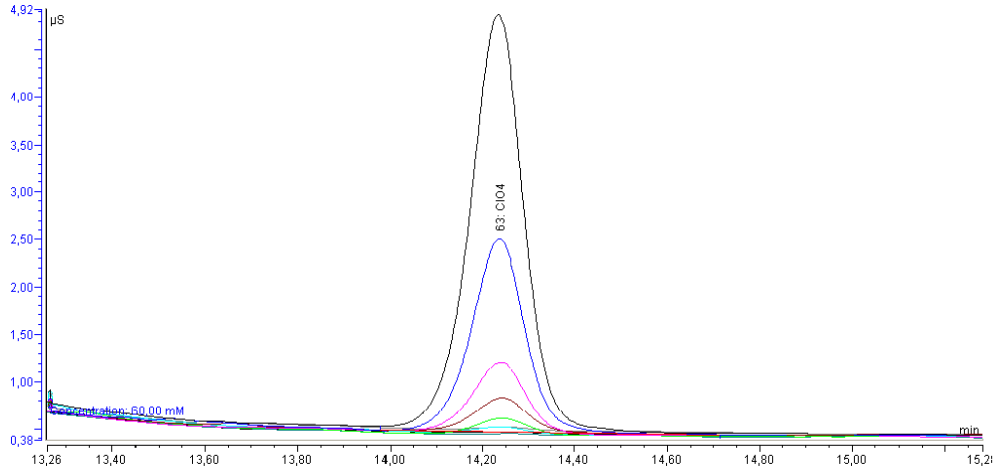
Çizelge 5.1: Perklorat anyonuna ait kalibrasyon grafiği için hazırlanan çözeltiler ve sonuçları.

Anyon	İstatistik	2,5 (µg/L)	5 (µg/L)	10 (µg/L)	25 (µg/L)	50 (µg/L)	100 (µg/L)	250 (µg/L)	500 (µg/L)	Korelasyon Katsayısı
ClO₄⁻	Ortalama (µg/L)	2,917	4,000	7,667	20,833	44,000	88,833	247,833	522,667	0,9981
	Std. Sapma	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,004	0,005	0,006	
	% Std. Sapma	28,997	13,772	4,348	3,547	3,267	3,711	1,806	1,006	



**Şekil 5.5:** Çeşme suyu örneğinde  $\text{ClO}_4^-$  ün olmadığını gösteren kromatogram.

Şekil (5.5)' deki kromatogramda görüldüğü gibi, çeşme suyu örneğinde perklorat t. Çeşme suyu numunesine 0,0025; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 ve 0,5 mg/L perklorat ilavesinden sonra elde edilen kromatogramlar şekil (5.6)' da gösterilmiştir. % geri kazanımlar sırasıyla %91,6, %85,4, %91,3, %84,6, %92,5, %93,8, %95,6 ve %95,2 olarak bulunmuş ve Çizelge 5.2' de gösterilmiştir.espit edilememiştir



**Şekil 5.6:** Musluk suyu örneğine 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250 ve 500  $\mu\text{g/L}$  perklorat ilavesi sonucu elde edilen kromatogram.

**Çizelge 5.2:** Musluk suyundan perklorat anyonunun geri kazanımı.

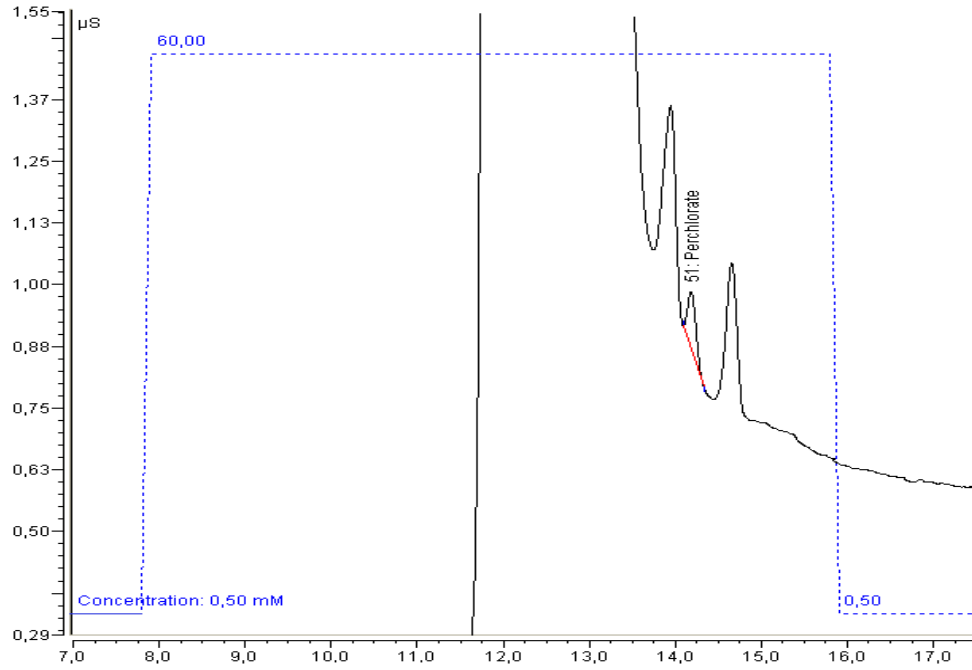
Anyon	Konsantrasyon ( $\mu\text{g/L}$ )	% Geri Kazanım
$\text{ClO}_4^-$	2,5	91,6
	5	85,4
	10	91,3
	25	84,6
	50	92,5
	100	93,8
	250	95,6
	500	95,2

Perklorat için standart çözelti ile tayin sınırı kontrol edilmiştir. LOD değeri 2,79  $\mu\text{g/L}$  ve LOQ değeri 9,3  $\mu\text{g/L}$  olarak bulunmuştur.

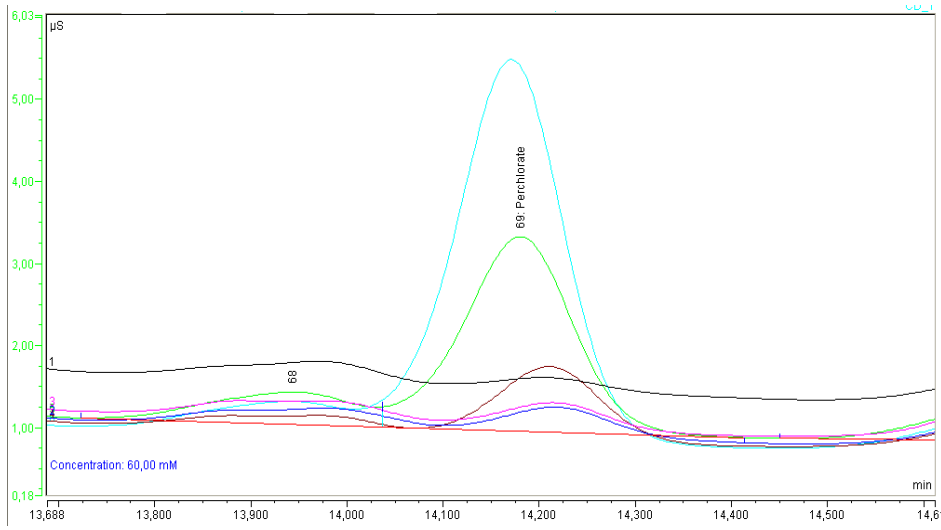
#### 5.4.3 Havuz suyunda perklorat anyonu tayini

Analize hazır hale getirilen havuz suyu doğrudan ölçülmüş ve  $10,66 \pm 0,01$   $\mu\text{g/L}$  perklorat tespit edilmiştir.

Havuz suyunun doğrudan ölçümü ve  $\text{ClO}_4^-$  eklenmesinden sonra elde edilen kromatogramlar da sırasıyla şekil (5.7) ve (5.8)' de gösterilmiştir.



**Şekil 5.7:** Havuz suyunun doğrudan ölçülmesi sonucu elde edilen kromatogram.



**Şekil 5.8:** Havuz suyuna 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 µg/L ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> ilavesi yapıldıktan sonra elde edilen kromatogram.

Çizelge 5.3’ de gösterildiği gibi 1 ve 25 µg/L perklorat ilave edilmesinden sonra %’ de geri kazanımlar sırasıyla %92,6 ve %109,6 olarak tespit edilmiştir.

**Çizelge 5.3:** Havuz suyundan perklorat anyonunun geri kazanımı.

Anyon	Konsantrasyon (µg/L)	Ölçülen Ortalama Konsantrasyon (µg/L)	% Geri Kazanım
ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1	11,9	96,2
	25	28,8	109,6

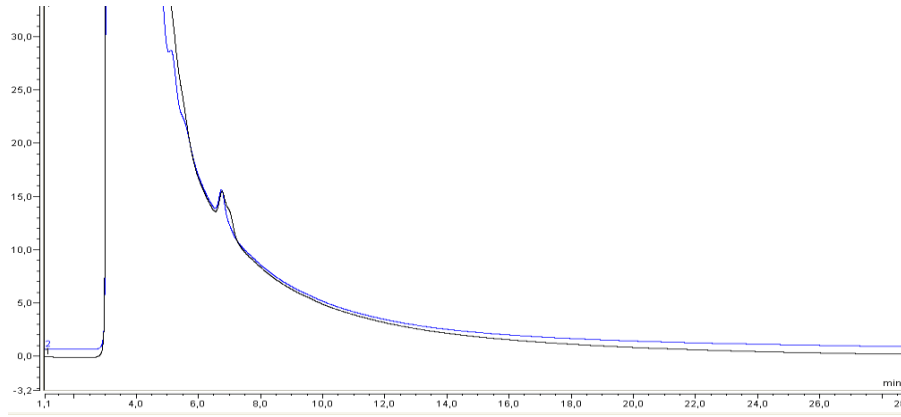
### 5.5 Süt Örneğinin Analize Hazır Hale Getirilmesi

1000 mg/L’ lik stok ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> çözeltisinden mikropipet yardımıyla 10; 25 ve 50 µL çekilerek 100 mL’ lik balon jojelerde 100; 250; 500 µg/L’ lik süt örnekleri hazırlandı. Hazırlanan süt örnekleri ve perklorat ilave edilmemiş süt örneği derin dondurucuda bir gece bekletildi. Bozulan örnekler 30 °C’ da bir gece daha bekletildi. Böylece büyük oranda yağ ve proteinlerinden arınmış sütün sıvı sarımtırak orta kısmı bir enjektör yardımıyla PES filtreden çekildi. 10 mL supernatant süzöldükten sonra 2 gram H<sup>+</sup> formunda kuvvetli asit katyon değiştirici reçineden geçirilerek protolizlenen moleküllerden uzaklaştırıldı . 3500 rpm’ de 30 dk. boyunca 4 °C’ da santrifüjlendi. Üst kısımdaki yağ tabakasından aşağı doğru şırınga dikkatlice

daldırılarak sulu kısmından yaklaşık 5 mL çekildi. Hidrofobik bileşenlerin uzaklaştırılması için C18-SPE kartuş ve 0,20 mikronluk PES filtreden geçirilerek viallere dolduruldu ve analizi yapılmak üzere cihaza verildi. %' de geri kazanım miktarlarına bakıldı.

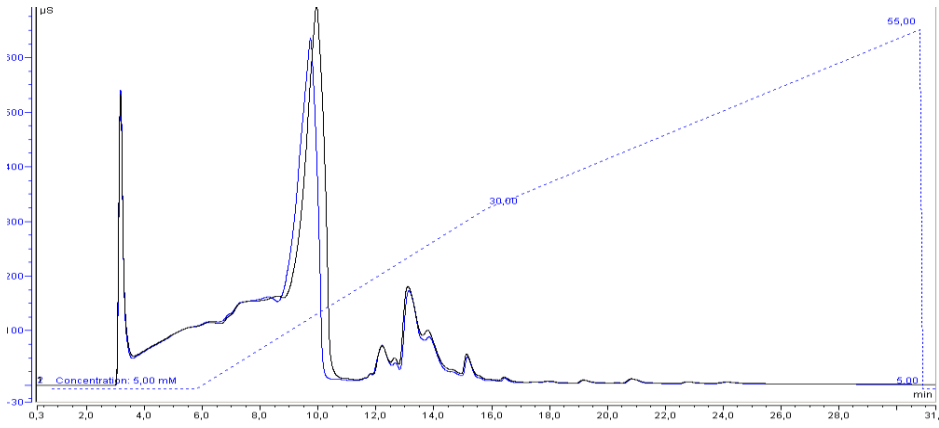
### 5.5.1 Süt analizi için optimizasyon çalışmaları

Eluent konsatrasyonu, 0-30 dk 35 mM NaOH; suprasör akımı 22 mA, kolon sıcaklığı 20 °C programında, 1 mg/L ve 5 mg/L konsantrasyonlarında hazırlanan süt örneklerinin kromatogramları şekil (5.9)' da gösterilmiştir.



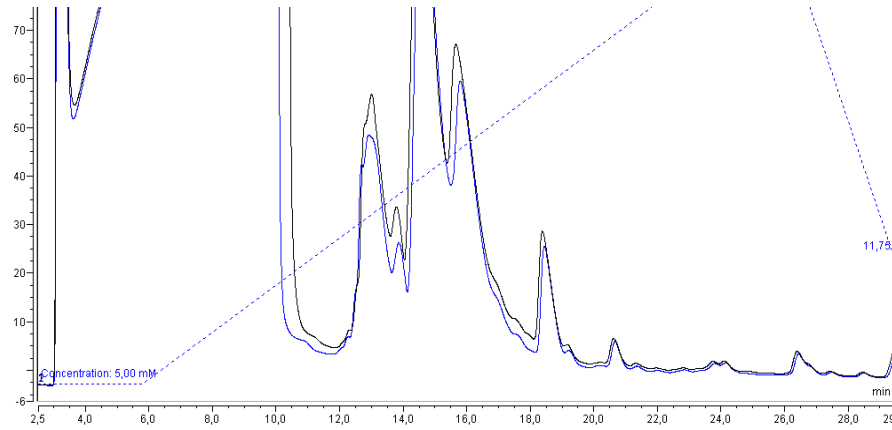
**Şekil 5.9:** 1 mg/L ve 5 mg/L std.  $\text{ClO}_4^-$  eklenmesiyle hazırlanan süt örneklerine ait kromatogramlar.

Eluent konsatrasyonu, 0-5 dk 5 mM NaOH; 5-15 dk 30 mM NaOH; 15-30 dk 55 mM NaOH; 30-30,1 dk 5 mM NaOH, suprasör akımı 35 mA, kolon sıcaklığı 25 °C programında, 1 µg/L ve 5 µg/L konsantrasyonlarında hazırlanan süt örneklerinin kromatogramları şekil (5.10)' da gösterilmiştir.



**Şekil 5.10 :** 1 mg/L ve 5 mg/L std.  $\text{ClO}_4^-$  eklenmiş süt örneklerine ait kromatogram.

Eluent konsantrasyonu, 0-5 dk 5 mM NaOH; 5-15 dk 30 mM NaOH; 15-20 dk 30 mM NaOH; 20-35 dk 5 mM NaOH, suprasör akımı 19 mA, kolon sıcaklığı 40 °C programında, 10 µg/L ve 100 µg/L konsantrasyonlarında hazırlanan süt örneklerinin kromatogramları şekil (5.11)' de gösterilmiştir.

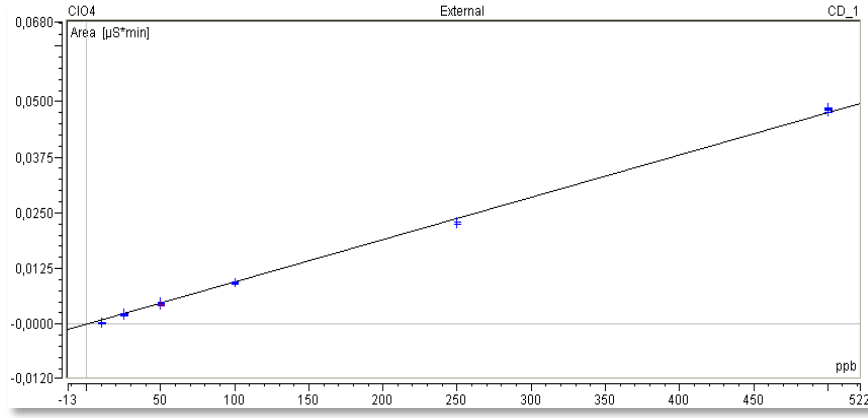


**Şekil 5.11 :** 1 mg/L ve 5 mg/L std.  $\text{ClO}_4^-$  eklenmesiyle hazırlanan süt örneklerine ait kromatogramlar.

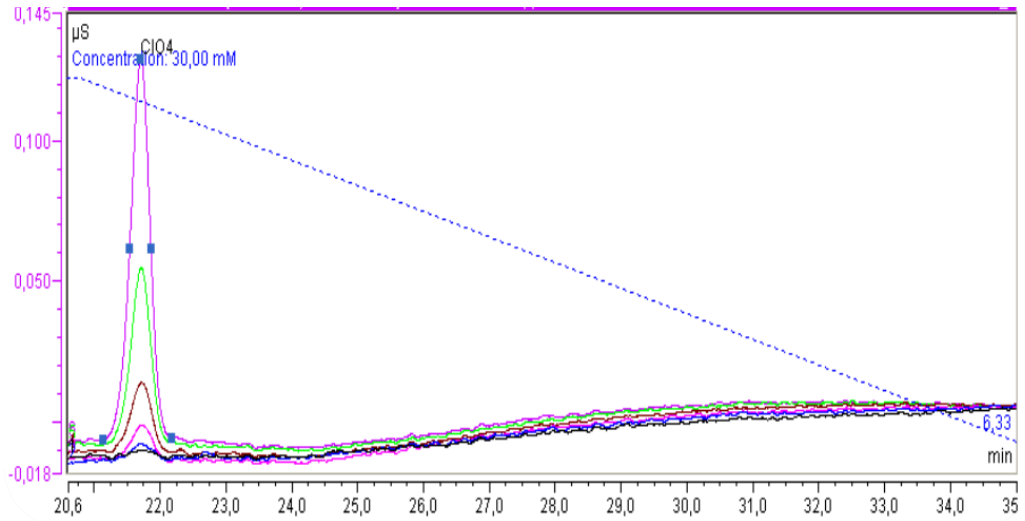
**Süt analizi için kromatografi koşulları:** Eluent Konsantrasyonu 0-5 dakikalar arası 5mM NaOH, 15-20 dakikalar arası 30 mM NaOH, 20-35 dakikalar arası 5mM NaOH, suppressör akımı: 8 mA, kolon sıcaklığı: 40 °C, akış hızı 0.25 mL/dk sample loop hacmi: 10 µL' dir.

Bu optimize koşullarda, perklorat için 10; 25; 50; 100; 250 ve 500 µg/L konsantrasyonlarındaki çözeltilerin analizlenmesiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (5.12)' deki gibidir. Bu grafiğe göre korelasyon katsayısı 0,999 LOD: 15µg/L olarak

bulundu. Şekil (5.13)' de 10; 25; 50; 100; 250 ve 500 µg/L standart  $\text{ClO}_4^-$  çözeltilerinin kromatogramları gösterilmektedir.



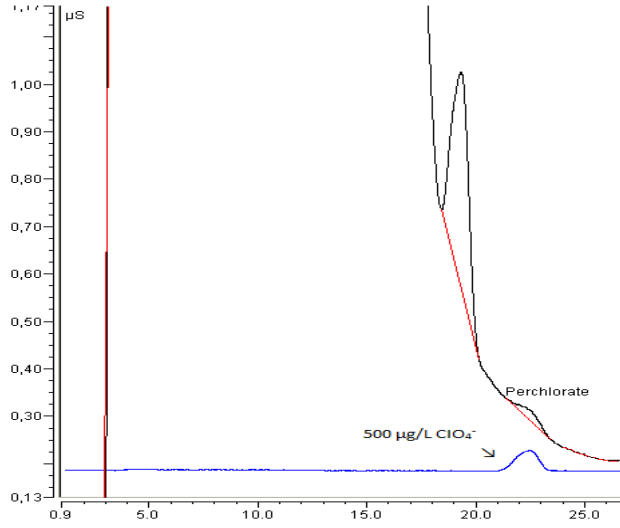
Şekil 5.12: 10; 25; 50; 100; 250 ve 500 µg/L standart perkloratın çözeltilerinin kalibrasyon grafiği ( $r^2=0,999$ ).



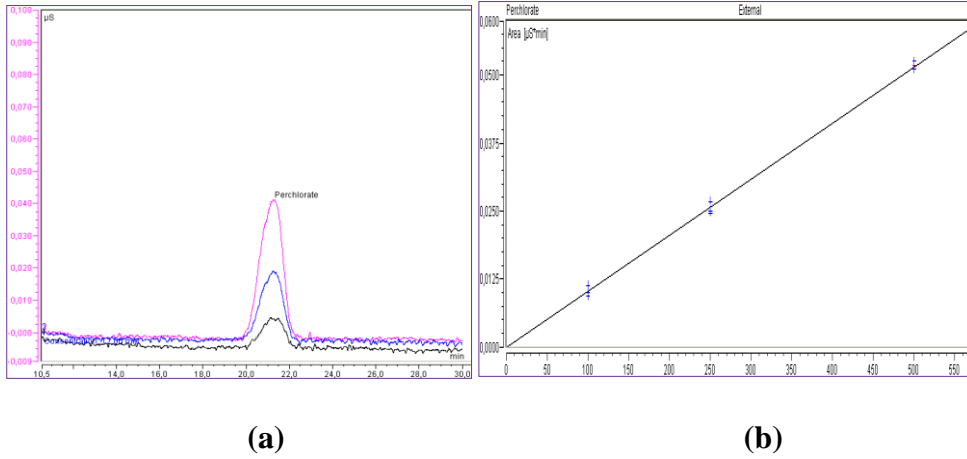
Şekil 5.13: Perkloratın standart 10; 25; 50; 100; 250 ve 500 µg/L konsantrasyonlarının kromatogramları.

### 5.5.2 Sütte perklorat anyonu tayini

Analize hazır hale getirilen süt örneği ile 100; 250; 500 µg/L  $\text{ClO}_4^-$  eklenmiş süt örneklerinin analizleri yapılmış ve örnekteki perklorat konsantrasyonu  $213,3 \pm 5,3$  µg/L olarak bulunmuştur.



**Şekil 5.14:** a) 500 µg/L ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> eklenmiş süt örneği b) direkt süt örneğinin kromatogramları.



**Şekil 5.15:** (a) 100; 250; 500 µg/L ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> eklenmiş süt örneklerinin kromatogramları, (b) bu örneklere ait kalibrasyon grafiği (R<sup>2</sup>=0,998)

Çizelge 5.4' de 100; 250; 500 µg/L ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> eklenmiş süt örneklerinin geri kazanım değerleri verilmiştir.

**Çizelge 5.4:** Sütte perklorat anyonunun geri kazanımı.

Anyon	Konsantrasyon (µg/L)	Ölçülen Ortalama Konsantrasyon (µg/L)	% Geri Kazanım
ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	100	99,22	99,22
	250	247,08	98,83
	500	503,56	100,71

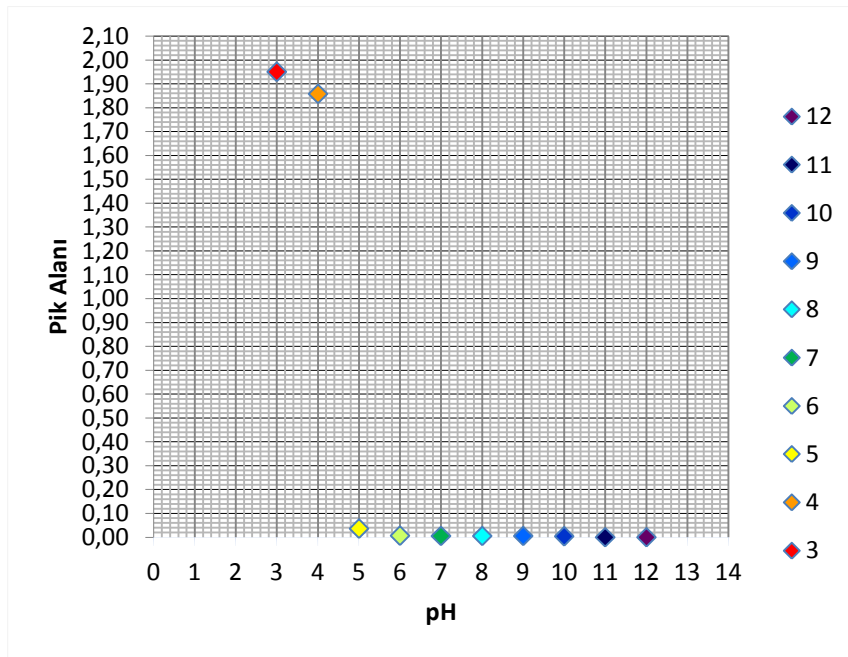


## 5.6 YüzeY Suyunun Analize Hazır Hale Getirilmesi

Kırklareli Askeri Atış Sahası Bölgesi'nden, örnek alma kurallarına uygun olarak alınan yüzeY suyu örneğine yine aynı ön işlemler uygulandı. Bu örnek için önceki bölümlerde anlatılan Cryptand-C1 Concentrator kolonu kullanılarak daha hassas analiz gerçekleştirildi. %'de geri kazanım miktarlarına bakıldı.

### 5.6.1 YüzeY suyu için optimizasyon çalışmaları (Cryptand C1 Konsantratör Kolonu ile):

Cryptand C1 konsantratör kolonu, pH, sıcaklık, eluent konsantrasyonu gibi kromatografik koşulların değişimine karşı çok duyarlıdır. Doğru bir analiz gerçekleştirmek için öncelikle farklı pH'lerde hazırlanan 50 µg/L standart perklorat çözeltileri kolona gönderildi. Çözelti pH değerlerine karşı pikin alanını veren grafik şekil (5.16)'daki gibidir:



**Şekil 5.16:** Farklı pH'lerde hazırlanan perklorat çözeltilerinin verdiği alana karşı grafiği.

Elde edilen bu grafiğe göre; Cryptand C1 konsantratör kolonu pH 3-5 aralığında yüksek kapasitede fonksiyon göstermektedir. Ancak 3 gibi düşük pH değerlerinin kolon dolgu maddesine zarar vereceği düşünülmüş ve çalışmalar pH 4-5 aralığında yürütülmüştür.

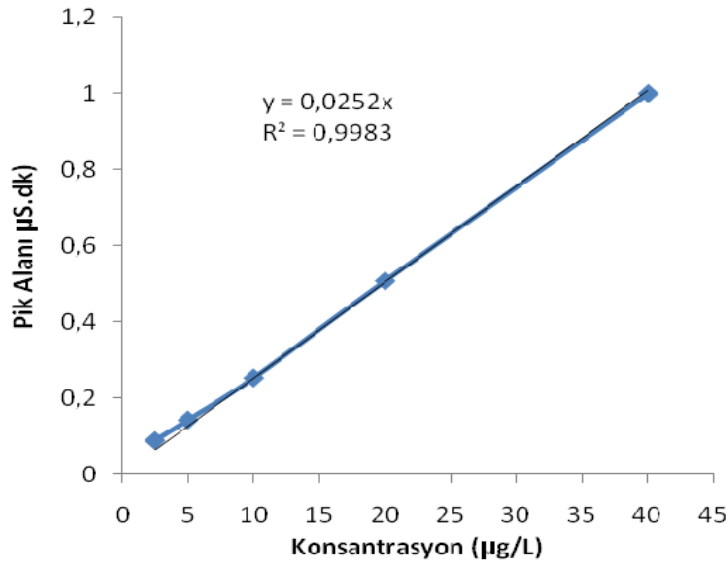
pH 4-5 aralığında çalışmak için örneği asitlendirmek gerekmektedir. Ancak bu amaçla sarfedilen HCl asit çözeltisinden kaynaklanan Cl<sup>-</sup> anyonlarının

kromatogramda verdiği pik  $\text{ClO}_4^-$  anyonunun pikini örtmekte ve analiz imkansız hale gelmektedir.

Her iki sorun düşünüldüğünde Cryptand C1 konsantratör kolonunu önceden asitlendirmek gerektiği düşünüldü. Bu amaçla, kolona 2ml pH 4-5 HCl asit çözeltisi kolona enjekte edildi ve hemen ardından 2 ml UP su enjekte edilerek kolondaki  $\text{Cl}^-$  anyonlarının büyük kısmı atık olarak alındı. Son olarak 2 mL analize hazır yüzey suyu örneği ve 2 mL 10 mM NaOH kolona enjekte edildi. Böylece hem yüksek kolon kapasitesi hem de kromatografik olarak uygun analiz ortamı sağlanmış oldu.

**Yüzey suyu analizi için kromatografi koşulları:** Eluent Konsantrasyonu 0-5 dakikalar arası 0,5mM NaOH, 15-20 dakikalar arası 15 mM NaOH, 20-35 dakikalar arası 0,5mM NaOH, suppressör akımı: 8 mA, kolon sıcaklığı: 40 °C, akış hızı 0.25 mL/dk sample loop hacmi: 10  $\mu\text{L}$ ' dir.

Bu optimize koşullarda, perklorat için 2,5; 5; 10; 20 ve 40  $\mu\text{g/L}$  konsantrasyonlarındaki çözeltilerin analizlenmesiyle elde edilen kalibrasyon grafiği şekil (5.17)' deki gibidir. Bu grafiğe göre korelasyon katsayısı 0,998 olarak bulundu.

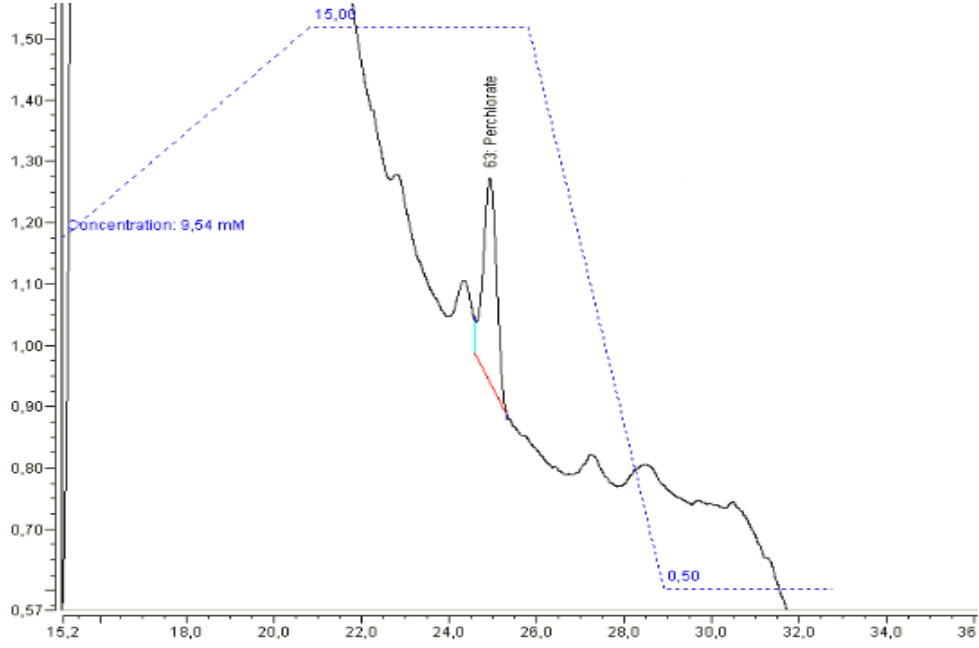


**Şekil 5.17 :** 2,5; 5; 10; 20 ve 40  $\mu\text{g/L}$  std.  $\text{ClO}_4^-$  çözeltilerinin kalibrasyon grafiği.

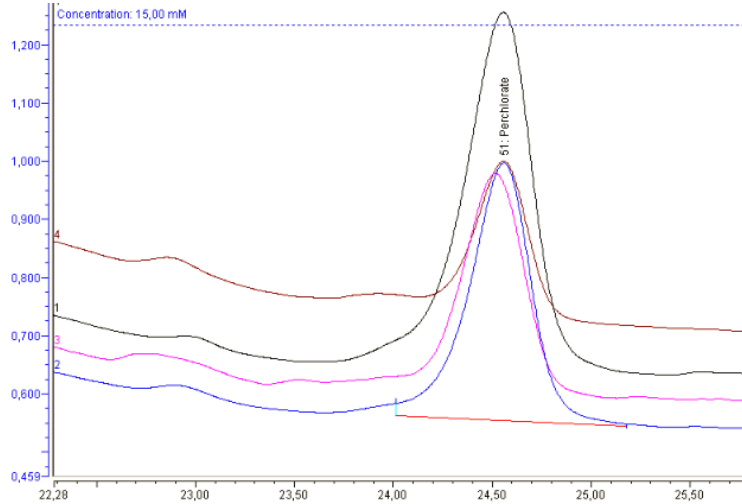
### 5.6.2 Yüzey suyunda perklorat anyonu tayini

Analize hazır hale getirilen 2 mL yüzey suyu örneği doğrudan ölçülmüş ve ortalama 4,68 µg/L perklorat tespit edilmiştir.

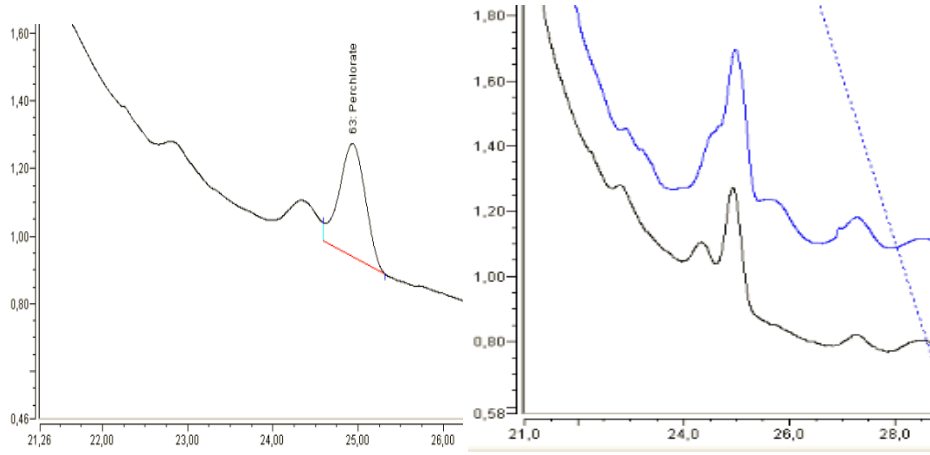
Yüzey suyu örneğine  $\text{ClO}_4^-$  ilavesi yapılmadan ve yapıldıktan sonra elde edilen kromatogramlar da sırasıyla şekil (5.18) ve (5.19)' da gösterilmiştir.



Şekil 5.18: Yüzey suyunda perklorat anyonu varlığını gösteren kromatogram.



Şekil 5.19: 2,5; 5; 10; 20 ve 40 µg/L standart  $\text{ClO}_4^-$  çözeltilerine ait kromatogramlar.



**Şekil 5.20:** Yüzey suyu örneğinde perklorat varlığını gösteren kromatogram ile 5 µg/L perklorat ilave edilmesinden sonra elde edilen kromatogram.

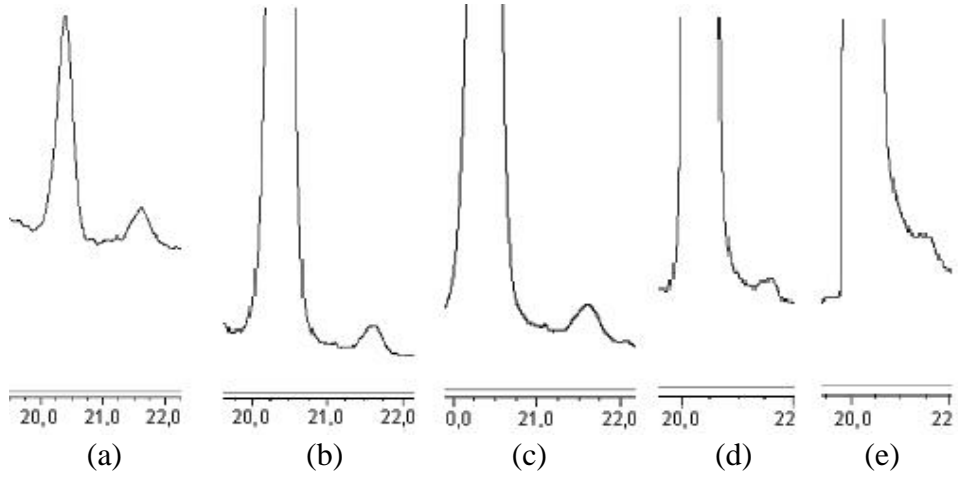
Çizelge 5.5’ de de gösterildiği gibi 5 µg/L perklorat ilave edilmesinden sonra % geri kazanım %80 olarak tespit edilmiştir.

**Çizelge 5.5:** Yüzey suyundan perklorat anyonunun geri kazanımı.

Anyon	Konsantrasyon (µg/L)	Ölçülen Ortalama Konsantrasyon (µg/L)	% Geri Kazanım
$\text{ClO}_4^-$	5	0,2302	80

### 5.7 Perklorat anyonu tayinine tiyosiyanat etkisi

25 µg/L perklorat ve artan konsantrasyonlarda tiyosiyanat içeren çözeltilerde tiyosiyanatın perklorat tayinine etkisi incelendi. Şekil (5.21)’ deki kromatogramlarda da görüldüğü gibi, perkloratın 100 kat fazla tiyosiyanat varlığında bile kantitatif tayin edilebildiği, bundan fazlasında ise interfere ettiğini söyleyebiliriz. 25 µg/L  $\text{ClO}_4^-$  ve 100 µg/L  $\text{SCN}^-$ ; 500 µg/L  $\text{SCN}^-$ ; 1000 µg/L  $\text{SCN}^-$ ; 2500 µg/L  $\text{SCN}^-$ ; 5000 µg/L  $\text{SCN}^-$  çözeltilerinin kromatogramları şekil (5.21)’ de görülmektedir.



**Şekil 5.21:** 25 µg/L  $\text{ClO}_4^-$  ve (a) 100 µg/L  $\text{SCN}^-$  (b) 500 µg/L  $\text{SCN}^-$  (c) 1000 µg/L  $\text{SCN}^-$  (d) 2500 µg/L  $\text{SCN}^-$  (e) 5000 µg/L  $\text{SCN}^-$  çözeltilerinin kromatogramları.



## 6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yapılan çalışmayla musluk, havuz, yüzey suyu ve sütte perklorat anyonu hassas ve kesin bir şekilde analizlendi. IC analiz sonuçlarının iyi çıkması için örnekler ön işlemlerden geçirildi ve IC sisteminde bazı parametrelerde optimizasyonlar yapıldıktan sonra belirlendi.

Musluk ve havuz suyu için eluent konsantrasyonu, 0-7 dakikalar arası 0,5 mM NaOH; 7,1-15 dakikalar arası 60 mM NaOH; 15,1-25 dakikalar arası 0,5 mM NaOH suppressör akımı, 38mA, kolon sıcaklığı 40°C, fırın sıcaklığı 45°C, akış hızı 0,25 mL/dk ve sample loop hacmi 100 µL'dir. Bu yöntemle perklorat anyonu için LOD: 2,79 µg/L bulundu.

Yüzey suyu için eluent konsantrasyonu, 0-5 dakikalar arası 0,5mM NaOH, 15-20 dakikalar arası 15 mM NaOH, 20-35 dakikalar arası 0,5mM NaOH, suppressör akımı: 8 mA, kolon sıcaklığı, 40 °C, akış hızı 0.25 mL/dk sample loop hacmi: 10 µL' dir. Bu yöntemle perklorat anyonu için LOD: 1,12µg/L bulundu.

Süt için eluent konsantrasyonu, 0-5 dakikalar arası 5mM NaOH, 15-20 dakikalar arası 30 mM NaOH, 20-35 dakikalar arası 5mM NaOH, suppressör akımı: 8 mA, kolon sıcaklığı: 40 °C, akış hızı 0.25 mL/dk sample loop hacmi: 10 µL' dir. Bu yöntemle perklorat anyonu için LOD: 15 µg/L bulundu.

Sonuç olarak, çeşme suyunda perklorat anyonu tayin edilemezken, havuz suyunda 10,66 µg/L, yüzey suyunda 4,68 µg/L, sütte 213,3 µg/L konsantrasyonunda perklorat saptanmıştır.

Perklorat, hipoklorit, klorit, klorat ve klorürün yer aldığı homojen veya heterojen reaksiyonların bir sonucu olarak oluşturulabilir. Zamanla yüksek konsantrasyondaki ClO<sup>-</sup> (yaklaşık %5 ClO<sup>-</sup> içeren çamaşır suyu) çözeltilerinden oluşabilir. UV ışığına maruz bırakılması durumunda çok hızlı, karanlıkta bekletme ile daha yavaş olarak klorat (ClO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ve hipokloritden (ClO<sup>-</sup>) oluşabilir. Çamaşır suyu (doğal pH' nda, pH 8 ve 12 de), pool shock yüzme havuzu dezenfektanı (%12 ClO<sup>-</sup>), %1 w/v ClO<sub>3</sub><sup>-</sup>, %5

w/v  $\text{ClO}_3^-$  + %0.5  $\text{ClO}^-$  gibi pek çok örnek karanlık yerlerde veya gün ışığına maruz kalma durumunda perklorat oluşturma yeteneğine sahiptir. Daha yüksek hipoklorit konsantrasyonu, zamanla oluşan daha yüksek perklorat miktarı anlamına gelir. Zamanla yaklaşık 20 ppb/gün olan çamaşır suyundan perklorat oluşum hızı, UV' ye maruz bırakılan örneklerde 80ppb/dk' ya kadar önemli derecede artış gösterir. Çamaşır sularında bulunan  $\text{ClO}_3^-$  ve  $\text{Cl}^-$  UV ye maruziyet sonucunda perkloratı orantılı olarak arttırırsa da klorit,  $\text{ClO}_4^-$  oluşturma hızı en yüksek oksiklorin türüdür (G.Gümüş ve diğ., 2005).

Havuz sularında kullanılan dezenfektanların yukarıda anlatılan koşullar sağlandığında önemli bir perklorat kaynağı olduğu düşünülmektedir.

$\text{HOCl}$  atmosferde bulunan önemli bir klorür rezervi olarak düşünülebilir (Tanakaa ve diğ.,1998). Uygun koşullar sağlandığında, perklorat atmosferde hipoklorit veya klorürden doğal olarak oluşabilmektedir (Dasgupta ve diğ., 2005). Yağmur suyunda da ölçülebilir miktarda bulunan perklorat, deniz suyunda düşük konsantrasyonda bulunmaktadır (Martilengo ve diğ.,2006).

Bu çalışmalar doğrultusunda yüzey suyunda bulduğumuz perkloratın,yağmur veya toprak yoluyla oluştuğunu söyleyebiliriz. Bitkiler perklorat içeren su ile sulandığında, bitkinin yapraklarından su buharlaşan sudan geriye perklorat kalır. İnekler perklorat içeren yemleri yiyebilir ve perklorat sütlerine geçebilir. Bunlara ek olarak, roket üretim ya da test alanının yakınında yaşayan, yapımında çalışan kişiler veya havai fişekler, diğer fişek ve patlayıcı türlerinin yapıldığı tesislerde çalışan kişiler için bu alanlar potansiyel perklorat kaynağıdır. Üretim ve askeri tesislerde perklorat yer altı ve yüzey sularına sızıntı ile bulaşabilir. Bu alanlarda çevrede doğal düzeyde perklorat meydana gelmesi sebebiyle,perklorata maruz kalınabilir.



## KAYNAKLAR

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry**, 2008. *Toxicological Profile for Perchlorates*. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Adam L.C., Fabian, I., Suzuki, K., Gordon, G.**, 1999. *Hypochlorous Acid Decomposition in the pH 5-8 Region*. Inorg. Chem. 1999, 38, 3534-3541.
- Adam, L. C.; Gordon, G.**, 1999. *Hypochlorite iondecomposition: effects of temperature, ionic strength, and chloride ion*. Inorg. Chem. 1999, 38, 1299- 1304
- Anbar M, Guttmann S, Lweitus Z.**, 1959. *The Mode of Action of Perchlorate Ions On The Iodine Uptake of The Thyroid Gland*. Int J Appl Radiat Isot 7:87-96.
- Antonio C. Bianco, Domenico Salvatore, Balázs Gereben, Marla J. Berry and P. Reed Larsen**, 2002. *Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, and Physiological Roles of the Iodothyronine Selenodeiodinases*
- B. Kirk, E. E. Smith, Kang Tian, T. A. Anderson, P. K. Dasgupta**, 2003. *Perchlorate in Milk*. Environ. Sci. Tech. 2003, 37, 4979-4981.
- Chapin, R. M.**, 1934. *The Effect of Hydrogen-Ion Concentration on the Decomposition of Hypohalites*. J. Am. Chem. Soc. 1934, 56, 2211-2215.
- Cheng Q., Smith E.E., Liu, F., Gentle A., Hooper M.J., Anderson T.A.**, 2007, *Effects of Perchlorate on Sodiumiodide Symporter and Pendrin Gene Expression in Deer Mice*, Env. Tox. 22(4): 390 – 398.
- Dasgupta, P.K.; P.K.; Jackson, W.A; Anderson, T.A.; Tian, K.; Tock, R.W.; Rajagopalan, S.**, 2005. *The origin of naturally occurring perchlorate: the role of atmospheric processes*. Environ. Sci. Technol. 2005, 39, 1569- 1575.
- DeMartino, G. N. and Goldberg, A. L.**, 1978. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 1369-1373.
- Despopoulos, A., Selbernagl, S.**, 1997. *Tiroid Hormonları, Renkli Fizyoloji Atlası*. Prof. Dr. H. Çavuşoğlu (Der.), 4. Edisyon, Nobel & Yücel Yayınları, İstanbul, 250 - 253.
- Destanoğlu O.**, 2009. *Kompleks Matriksli Örneklerde IC ile Anyon Tayini (Süt, İçme Suyu, Deniz Suyu)*, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Dionex Corporation**, 2004. *Determination of Inorganic Anions in Drinking Water by Ion Chromatography. Application Note 133, LPN 1192-03 PDF 10/04*

- Dionex Reference Library, Support**, 2007. (CD-ROM).
- Erdem Ö.**, 2005, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, *Prof.Dr. Ali Tuncel, Synthesis and chromatographic performance of strong cation exchangers for liquid chromatography.*
- Forester, F.; Dolch, P.**, 1917. *Electrochem.* 23,137.
- G. Miller, R. Kempley, G. Awadh, K. Rickman**, 2004. *Photo-oxidation of chloride to perchlorate in the presence of titanium dioxide and nitrate.* Fall 2004 ACS Abstract.
- Georg Hennemann, Roelof Docter, Edith C. H. Friesema, Marion de Jong, Eric P. Krenning and Theo J. Visser**, 2001. *Plasma Membrane Transport of Thyroid Hormones and Its Role in Thyroid Hormone Metabolism and Bioavailability.*
- Glinoe D.**, 2000. *Thyroid Disease During Pregnancy In: Braverman LE, Utiger RD, eds. Werner and Ingbar's the Thyroid: A fundamental and Clinical Text. 8<sup>th</sup> ed.* Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Gümüş G., Martinelengo K., Dasgupta P.**, 2005. *Tehe extent of formation of pechlorate from hypochlorite an chlorate on aging/UV treatment.* Texas Tech University, Department of Chemistry and Biochemistry, Research Associate.
- Gürses FP.**, 2006. *Klorlanmış İçme Ve Havuz Sularında Sıvı-Sıvı Ekstarksiyonu Ve İyon Kromatografisi İle Karsinojenik Dezenfeksiyon Yan Ürünlerinin Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.*
- K. Tian,P. K. Dasgupta, T. Anderson**, 2003. *Determination of trace perchlorate in high-salinity water samples by ion chromatography with on-line preconcentration and preelution.* Anal. Chem. 75, 701- 706.
- Kolbaşı B.**, 2008. *Sodyum Perkloratın Poecilia Sphenops (Moli Balığı) Karaciğer ve Tiroid Histolojisi Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.*
- L. V. Blasini, B. C. Blount, A. Delinsky**, 2007. *Quantification of iodide and sodium-iodide symporter inhibitors in human urine using ion chromtography tandem mass spectrometry.* *Journal of Chromatography A*, 1155 (2007) 40-46.
- Leitner N. K. V.; Laat, J.D.; Dore, M.**, 1992. *Photodecomposition of chlorine dioxide and chlorite by U.V.-irradiation- Part I. Photo-products.* Wat.Res. 1665-1664.
- Lister, M. W.**, 1956. *Decomposition of sodium hypochlorite: the uncatalyzed reaction.* Can. J Chem. 34, 465-478.
- Malik, R., and H. Hodgson**, 2002. *The relationship between the thyroid gland and the liver.* Q. J. Med. 95: 559-569
- Mark J. HOLNESS and Mary C. SUGDEN**, 1987. *Continued glucose output after re-feeding contributes to glucose intolerance in hyperthyroidism.*

Department of Chemical Pathology, London Hospital Medical College, Turner Street, London E1 2AD, U.K.

- Martinelengo, P.K.; Tian, K.; Dasgupta, P.K.,** 2006. *Perchlorate in seawater. Bioconcentration of iodide and perchlorate by various seaweed species.* Anal. Chem. Acta 567 100-107.
- P. K. Martinelango, J. L. Anderson, P. K. Dasgupta, D.W. Armstrong, R.S. Al-Horr, R. W. Slingsby,** 2005. *Gas-phase ion association provides increased selectivity and sensitivity for measuring perchlorate by mass spectrometry.* Anal. Chem. 77 4829- 4835.
- R. S. Kirk,** 2003. *The impact of Anguillicola crassus on European eels.*
- Richard A. Niemann, and David L. Anderson,** 2008. *Determination of iodide and thiocyanate in powdered milk and infant formula by on-line enrichment ion chromatography with photodiode array detection.* Journal of chromatography A, Vol. 1200, issue 2, p 193-197.
- Rutala, W.A.; Weber, D.J.,** 1997. *Uses of Inorganic Hypochlorite (Bleach) in Health-Care Facilities Clinical Microbiology Reviews* 1997,10, 597-610.
- Şahin M.,** 2005. *Çevresel ve Biyolojik Numunelerde Anyon ve Katyonların İletkenlik-İyon, Spektrofotometrik-İyon, Potansiyometrik-İyon Kromatografik Hibrit Sistemleriyle Tayinlerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.*
- Soldin OP, Braverman LE, Lamm SH.,** 2001. *Perchlorate clinical pharmacology and human health: a review.* Ther Drug Monit 23(4):316-331.
- Steven M. Larson, Patricia Charache, Marianne Chen, and Henry N. Wagner Jr.,** 1973. *Automated Detection of Haemophilus influenzae.*
- T. Fairley,** 1874. *On perchloric acid;* Br. Assoc. Rept. (Transaction of the Sections).
- Tanakaa, Y.; Kawasaki, M., Matsumi, Y., Fujiwara, H.; Ishiwata, T.; Rogers, L.J.; Dixon, R.N.; Ashfold, M. N. R.,** 1998. *The ultraviolet photodissociation of Cl<sub>2</sub>O at 235 nm and of HOCl at 235 and 266 nm.* J. Chem. Phys. 109, 1315- 1323.
- Theodorakis C, Rinchar J, Anderson T, et al.,** 2006. *Perchlorate in Fish From a Contaminated Site in East-Central Texas.* Environ Pollut 139:59-69.
- Tian K., Canas JE., Dasgupta PK., Anderson TA.,** 2004. *Preconcentration/Preelution Ion Chromatography for The Determination of Perchlorate in Complex,* 750-755.
- Van Steenbergen, W. M., Kusin, J. A., Kardjati, S. and De With, C.,** 1989. *Energy supplementation in the last trimester of pregnancy in East Java, Indonesia: effect on breast milk output.* Am. J. Clin. Nutr. 50: 274–27.
- Yang Cao, Benjamin C. Blount, Liza Valentin-Blasini, Judy C. Bernbaum, Terry M. Phillips, Walter J. Rogan,** 2007. *Goitrogenic Anions, Thyroid-Stimulating Hormone, and Thyroid Hormone in Infants.*
- Yokoyama, T., Takayasu, O.,** 1997. *Kogyo Kagaku Zasshi* 70, 1619-1624.



## **ÖZGEÇMİŞ**

**Ad Soyad:** Burcu UÇAR

**Doğum Yeri ve Tarihi:** Bakırköy – 07.07.1987

**Adres:** İSTANBUL

**Lisans Üniversite:** Trakya Üniversitesi





