

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEŞİTLİ BİYOLOJİK VE ÇEVRE ÖRNEKLERİNDEKİ
KOBALT, BAKIR, NİKEL VE DEMİR GİBİ ESER
ELEMENTLERİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ İLE TAYİNİ**

HAZIRLAYAN

Harun ÇİFTÇİ

DANIŞMAN

Doç.Dr.Ali ÖLÇÜCÜ

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetimi (FÜBAP) tarafından, 1036 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

ELAZIĞ – 2007

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ BİYOLOJİK VE ÇEVRE ÖRNEKLERİNDEKİ
KOBALT, BAKIR, NİKEL VE DEMİR GİBİ ESER
ELEMENTLERİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ İLE TAYİNİ**

Harun ÇİFTÇİ

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

Bu tez,/....../2007 Tarihinde Aşağıda Belertilen Jüri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Başarılı/Başarısız Olarak Değerlendirilmiştir.

İMZA

Danışman : Doç. Dr. Ali ÖLÇÜCÜ

Üye : Prof. Dr. Satılmış KAYA

Üye : Doç. Dr. Habibe ÖZMEN

Üye : Doç. Dr. Ökkeş YILMAZ

Üye : Doç. Dr. İbrahim YILMAZ

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/....../2007 tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlamasında ve yürütülmesinde, çalışmalarım süresince benden destek ve ilgisini esirgemeyen, bilgi ve hoşgörülerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ali ÖLÇÜCÜ' ye sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarında kullandığım HPLC cihazıyla ilgili gerek teorik ve gerekse pratik bilgilerle destekleri esirgemeyen Doç. Dr. Fikret KARATAŞ'a ve Yard. Doç. Dr. Mustafa KARATEPE' ye, laboratuvar çalışmalarında imkan sağlayarak katkıda bulunan Doç.Dr. Vahit KONAR'a, Doç.Dr. Ökkeş YILMAZ'a, bilgi ve tecrübesinden yararlandığım hocam Prof. Dr. Mehmet YAMAN'a, örneklerin temininde ve çözünürleştirilmesinde sürekli birlikte çalıştığımız ziraat mühendisi İlkey AKCAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yaptığımız çalışmayı 1036 nolu proje kapsamında finanse eden Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Kuruluna (FÜBAP) teşekkürlerimi sunarım.

Harun ÇİFTÇİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER	I
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	IV
TABLoların LİSTESİ	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Koordinasyon Bileşikleri ve Şelatlar	2
2.1.1. Rezorsinol ve Türevlerinin Kimyasal Yapıları ve Özellikleri.....	4
2.2. Kromatografi	5
2.2.1. Kromatografide Kullanılan Temel Kavramlar	7
2.2.2. Kolon Etkinliğinin (Performansının) Optimizasyonu	9
2.3. Sıvı Kromatografi Teknikleri	10
2.3.1. Dağılma Kromatografisi (Normal ve zıt faz)	10
2.3.2. Zıt Faz iyon Degistirme Kromatografisi	10
2.3.3. İyon Degistirme Kromatografisi.....	11
2.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	11
2.4.1. Çözücü Dağıtma Sistemi	12
2.4.2. HPLC’de Kullanılan Kolon Dolgu Maddeleri.....	13
2.4.2.1. Kolonlarda Bulunması gereken Özellikler	14
2.4.2.2. Silika Esaslı Kolonlar	15
2.4.2.3. İyon Degistirici Reçineler.....	15
2.4.3. HPLC'de Kullanılan Elüsyon Teknikleri	20
2.4.4. HPLC ile Kantitatif Analiz.....	20
2.4.4.1. İç Standart Yöntemi.....	21
2.4.4.2. Dış Standart Yöntemi	21
2.4.4.3. Standart Katkı Yöntemi	21
2.4.5. Detektörler.....	22
2.4.5.1. Farklı Detektörlerin Kullanıldığı Çalışmalar.....	24
2.5. Eser Element Analizlerinde Yararlanılan Yöntemler ve Karşılaştırması	30
2.6. Alıkonma Üzerine Etki Eden Faktörler	32
2.7. Rezorsinol Kompleksleri ve HPLC ile Metal Analizlerinde Yapılan Çalışmalar	33
2.8. Eser Elementlerin Canlı Organizmalardaki Rolü ve Hastalıklarla ilişkisi	38

2.8.1. Ağır Metallerin Su Canlılarına Zararlı Etkileri.....	40
2.8.2. Kobalt	42
2.8.3. Nikel	44
2.8.4. Bakır	46
2.8.5. Demir.....	50
2.9. Kompleks Stokiyometrisinin Bulunması	51
2.9.1. Mol Oranı Yöntemi	51
2.9.2. Job veya Devamlı Degismeler Yöntemi	51
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR VE BULGULAR.....	53
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	53
3.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması ve Kullanılan Reaktifler	53
3.2.1. UV Spektrofotometresi ile Yapılan Çalışmalar.....	54
3.2.1.1. Co-PAR, Ni-PAR, Fe-PAR, Cu-PAR Komplekslerinin Olusturulması	54
3.2.1.2. 4-(2-piridilazo) rezorsinol Ligandının UV Görünür Bölge Spektrumu.....	54
3.2.1.3. Fe-PAR, Ni-PAR, Co-PAR, Cu-PAR Komplekslerinin UV Görünür Bölge Spektrumu.....	55
3.2.1.4. Dalgaboyu Taramalarında Gözlenen Sonuçlar.....	56
3.2.1.5. Kompleks Stokiyometrilere Tayinleri	57
3.2.1.5.1. Mol Oranı Yöntemi	57
3.2.1.5.2. Job veya Sürekli Degisme Yöntemi	58
3.2.1.2.3. Kompleks Stokiyometrilere Analizlerinde Gözlenen Sonuçlar... ..	60
3.2.1.6. Co-PAR, Ni-PAR, Fe-PAR ve Cu-PAR Komplekslerine pH Etkisinin incelenmesi.....	60
3.2.1.7. Co-PAR, Ni-PAR, Fe-PAR ve Cu-PAR Komplekslerinin Olusum Sürelerinin Belirlenmesi	63
3.2.1.8. Co-PAR, Ni-PAR, Fe-PAR ve Cu-PAR Komplekslerinin Molar Sogurma Katsayılarının Belirlenmesi.....	64
3.2.1.9. 4-(2-piridilazo) rezorsinol Ligandının Konsantrasyonun Co-PAR, Ni-PAR, Fe-PAR ve Cu-PAR Komplekslerine Etkisi.....	66
3.2.1.10. Co-PAR, Ni-PAR, Fe-PAR ve Cu-PAR Komplekslerinin Olusumuna Asetat Derisiminin Etkisi.....	66
3.2.2. HPLC ile Yapılan Çalışmalar	67
3.2.2.1. Mobil Faz Bilesimiyle ilgili Denemeler	67
3.2.2.2. Mobil Faz Denemelerinde Gözlenen Sonuçlar.....	105
3.2.2.3. Metanol Miktarının Alıkonma Süresine Etkisi	109

3.2.2.4. Mobil Faz pH'sının Metal Komplekslerinin Alıkonma Sürelerine Etkisi.	109
3.2.2.5. Mobil Faz pH'sının Metal Komplekslerinin Pik Yüksekliklerine Etkisi	110
3.2.2.6. Co-PAR, Fe-PAR ve Ni-PAR Komplekslerine Yabancı İyonların Etkisi.....	111
3.2.3. Örneklerin Çözünürleştirilmesi	114
3.2.4. Örneklerinin Analiz Edilmesi.....	115
3.2.4.1. Kalibrasyon Grafiklerinin Çıkartılması	116
3.2.4.2. Tayin Sınırının Hesaplanması	118
3.2.4. F-AAS ile Bitki Örneklerinde Demirin Analizi	121
4. SONUÇ ve TARTISMA.....	123
5. KAYNAKLAR.....	129

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

		<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1.	Kobalt(II) ve Kobalt (III) komplekslerinin orbital şemaları.....	3
Şekil 2.2.	4-(2-piridilazo) resorsinol ligandının kimyasal yapısı	4
Şekil 2.3.	Sulu çözeltilerde PAR'ın λ_{max} değerleri.....	5
Şekil 2.4.	Sıvı kromatografisinde elde edilen kromatogram örneği.....	8
Şekil 2.5.	HPLC sistemi ve enstrümanları	12
Şekil 2.6.	Çözücü programlama sistemi	13
Şekil 2.7.	Sitiren divinil benzen polimerinin oluşumu	18
Şekil 2.8.	Katyon değiştirici reçine.....	18
Şekil 2.9.	B12 vitaminin kimyasal yapısı	44
Şekil 2.10.	Mol oranı yöntemi ile kompleks stokiyometrisinin bulunması	52
Şekil 2.11.	Job veya devamlı değişmeler yöntemi ile kompleks stokiyometrisinin bulunması	52
Şekil 3.1.	4-(2-piridilazo)rezorsinol ligandının UV görünür bölge spektrumu	54
Şekil 3.2.	Co-PAR kompleksinin UV görünür bölge spektrumu	55
Şekil 3.3.	Ni-PAR kompleksinin UV görünür bölge spektrumu	55
Şekil 3.4.	Fe-PAR kompleksinin UV görünür bölge spektrumu.....	56
Şekil 3.5.	Cu-PAR kompleksinin UV görünür bölge spektrumu	56
Şekil 3.6.	Cu-PAR kompleksinin stokiyometrisi (mol oranı yöntemi).....	57
Şekil 3.7.	Co-PAR kompleksinin stokiyometrisi (mol oranı yöntemi).....	57
Şekil 3.8.	Ni-PAR kompleksinin stokiyometrisi (mol oranı yöntemi).....	58
Şekil 3.9.	Fe-PAR kompleksinin stokiyometrisi (mol oranı yöntemi).....	58
Şekil 3.10.	Cu-PAR kompleksinin stokiyometrisi (job yöntemi).....	59
Şekil 3.11.	Ni-PAR kompleksinin stokiyometrisi (job yöntemi).....	59
Şekil 3.12.	Fe-PAR kompleksinin stokiyometrisi (job yöntemi).....	60
Şekil 3.13.	Co-PAR kompleksinin stokiyometrisi (job yöntemi).....	60
Şekil 3.14.	4-(2-piridilazo)rezorsinol spektrumunun pH'a göre değişimi	61
Şekil 3.15.	Co-PAR kompleksinin spektrumunun pH'a göre değişimi	61
Şekil 3.16.	Fe-PAR kompleksinin spektrumunun pH'a göre değişimi	61
Şekil 3.17.	Ni-PAR kompleksinin spektrumunun pH'a göre değişimi.....	62
Şekil 3.18.	Cu-PAR kompleksinin spektrumunun pH'a göre değişimi	62

Şekil 3.19.	Fe-PAR Kompleksinin absorbansının süreye göre değişimi	63
Şekil 3.20.	Ni-PAR Kompleksinin absorbansının süreye göre değişimi	63
Şekil 3.21.	Co-PAR kompleksinin absorbansının süreye göre değişimi	64
Şekil 3.22.	Fe-PAR kompleksinin belirlenen dalga boyunda ϵ 'nin bulunması	64
Şekil 3.23.	Cu-PAR kompleksinin belirlenen dalga boyunda ϵ 'nin bulunması	65
Şekil 3.24.	Co-PAR kompleksinin belirlenen dalga boyunda ϵ 'nin bulunması	65
Şekil 3.25.	Ni-PAR kompleksinin belirlenen dalga boyunda ϵ 'nin bulunması	65
Şekil 3.26.	4-(2-piridilazo)rezorsinol ligandının konsantrasyonun Co-PAR, Ni-PAR, Fe-PAR ve Cu-PAR komplekslerine etkisi	66
Şekil 3.27.	Co-PAR, Ni-PAR, Fe-PAR ve Cu-PAR komplekslerinin oluşumuna Asetat çözeltisinin derişiminin etkisi.....	67
Şekil 3.28.	HPLC enjeksiyonunda kullanılan standart metal çözeltilerinin hazırlanma aşamaları	68
Şekil 3.29	Su mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: spelco, pH:7.....	70
Şekil 3.30.	Saf Metanol mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: spelco, pH:5.....	71
Şekil 3.31.	Etanol/Su/Asetat çözeltisi:/60/40 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: spelco, pH:6.5.....	72
Şekil 3.32.	Metanol/Su:/55/45 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: spelco, pH:6	73
Şekil 3.33.	Metanol/Su/Asetat çözeltisi:/60/35/5 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: spelco, pH:5.....	74
Şekil 3.34.	Metanol/Su/Asetat çözeltisi:/70/25/5 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: spelco, pH:3,4.....	75
Şekil 3.35.	Metanol/Su/Asetat çözeltisi:/60/30/10 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: spelco, pH:5.....	76
Şekil 3.36.	Metanol/Su/Asetat çözeltisi:/55/30/15 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: spelco, pH:4.5.....	77
Şekil 3.37.	Metanol/Su/Asetat çözeltisi:/50/30/20 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: spelco, pH:4.....	78
Şekil 3.38.	Etanol/Asetonitril/Asetat çözeltisi:/50/20/10 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: spelco, pH:6.5.....	79
Şekil 3.39.	Metanol/Su/Asetat çözeltisi:/55/40/5 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: phenomex, pH:7.7	80
Şekil 3.40.	Metanol/Su/Asetat çözeltisi:/52/43/5 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: phenomex, pH:5.2	81
Şekil 3.41.	Metanol/Su/Asetat çözeltisi:/60/35/5 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: phenomex, pH:7.2	82

Şekil 3.42.	Metanol/Su/KH ₂ PO ₄ Tamponu:60/35/5 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: phenomex, pH:6.7.....	83
Şekil 3.43.	Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çözeltisi:55/32/9/4 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: phenomex, pH:7.5	84
Şekil 3.44.	Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çözeltisi:63/27/5/5 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: phenomex, pH:4.5.....	85
Şekil 3.45.	Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çözeltisi:63/27/5/5 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: phenomex, pH:8.5.....	86
Şekil 3.46.	Metanol/Asetonitril/Su/Asetat çözeltisi:57/5/33/5 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: phenomex, pH:4.9.....	87
Şekil 3.47.	Metanol/Asetonitril/Su/Asetat çözeltisi:35/35/30/2,5 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: phenomex, pH:7.....	88
Şekil 3.48.	Metanol/Asetonitril/Su/Asetat çözeltisi:30/30/37/3 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: phenomex, pH:5.4.....	89
Şekil 3.49.	Metanol/Asetonitril/Su/Asetat çözeltisi:30/30/37/3 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: phenomex, pH:6.5.....	90
Şekil 3.50.	Metanol/Asetonitril/Su/Asetat çözeltisi:28/28/41/3 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: phenomex, pH:6.8.....	91
Şekil 3.51.	Metanol/Asetonitril/Su/Asetat çözeltisi:24/43/30/3 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: phenomex, p H:7.....	92
Şekil 3.52.	Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çözeltisi:55/40/2,5/2,5 mobil fazında maydonoz örneğinin çözünürleştikten sonra HPLC cihazında alınan kromatogram, kolon: phenomex, pH:7.5.....	93
Şekil 3.53.	Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çözeltisi:55/40/2,5/2,5 mobil fazında kobalt standartına çeşitli asitler ilave edilerek uygulanan çözünürleştirme parametrelerinden sonra Co-PAR' ın HPLC cihazında alınan kromatogramları, kolon: phenomex, pH:7.5.....	94
Şekil 3.54.	Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çözeltisi 55/40/2,5/2,5 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: phenomex, pH:4.5.....	95
Şekil 3.55.	Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çözeltisi 55/40/2,5/2,5 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: phenomex, pH:6.....	96
Şekil 3.56.	Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çözeltisi 55/40/2,5/2,5 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: phenomex, pH:7.5.....	97
Şekil 3.57.	Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çözeltisi 55/40/2,5/2,5 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: phenomex, pH:3.6.....	98

Şekil 3.58.	Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çözeltisi 60/35/2,5/2,5 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: phenomex, pH:5.1.....	99
Şekil 3.59.	Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çözeltisi 60/35/2,5/2,5 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: phenomex, pH:4.5.....	100
Şekil 3.60.	Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çözeltisi 55/35/2,5/2,5 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: phenomex, pH:5.3.....	101
Şekil 3.61.	Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çözeltisi 60/35/2,5/2,5 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: phenomex, pH:5.3.....	102
Şekil 3.62.	Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çözeltisi 60/35/2,5/2,5 mobil fazında alınan kromatogramlar, kolon: phenomex, pH:6.2.....	103
Şekil 3.63.	Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çözeltisi 55/35/2,5/2,5 mobil fazında kimyon örneğinin alınan kromatogramı, kolon: phenomex, pH:5.3.....	104
Şekil 3.64.	Metanol miktarının alıkonma süresine etkisi.....	109
Şekil 3.65.	Mobil faz pH'ının metal komplekslerinin alıkonma sürelerine etkisi	110
Şekil 3.66.	Mobil faz pH'ının metal komplekslerinin pik yüksekliklerine etkisi	111
Şekil 3.67.	1000 ppm Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının Co-PAR, Ni-PAR ve Fe-PAR komplekslerinin pik alanları üzerine etkisi	111
Şekil 3.68.	500 ppm Al^{+3} , Cr^{+3} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Pb^{+2} ve Cd^{+2} iyonlarının Co-PAR, Ni-PAR ve Fe-PAR komplekslerinin pik alanları üzerine etkisi	112
Şekil 3.69.	200 ppm Fe^{+3} iyonunun Co-PAR, Ni-PAR ve Fe-PAR komplekslerine etkisi	113
Şekil 3.70.	Mobil faz pH' ı 6,2' ye ayarlandıktan sonra 200 ppm Fe^{+3} iyonunun Co-PAR, Ni-PAR ve Fe-PAR komplekslerine etkisi	114
Şekil 3.71.	Analiz için örnek hazırlama aşamaları.....	115
Şekil 3.72.	Standart Co-PAR çözeltilerinin pH' ı 5,3' e ayarlı mobil fazda kalibrasyon eğrisi ...	116
Şekil 3.73.	Standart Co-PAR çözeltilerinin pH' ı 6,2' e ayarlı mobil fazda kalibrasyon eğrisi ...	116
Şekil 3.74.	Standart Ni-PAR çözeltilerinin pH' ı 5,3' e ayarlı mobil fazda kalibrasyon eğrisi.....	117
Şekil 3.75.	Standart Ni-PAR çözeltilerinin pH' ı 6,2' ye ayarlı mobil fazda kalibrasyon eğrisi...	117
Şekil 3.76.	Standart Fe-PAR çözeltilerinin pH' ı 6,2'ye ayarlı mobil fazda kalibrasyon eğrisi....	117
Şekil 3.77.	Standart Fe-PAR çözeltilerinin pH' ı 5,3' e ayarlı mobil fazda kalibrasyon eğrisi.....	118
Şekil 3.78.	Blank çözeltilesinin pH' ı 6,2'ye ayarlı mobil fazda kromatogramı.....	118
Şekil 3.79.	Blank çözeltilesinin pH' ı 5,3'e ayarlı mobil fazda kromatogramı.....	119
Şekil 3.80.	Demir için kalibrasyon eğrisi.....	121

TABLÖLARIN LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması.....	6
Tablo 2.2. Farklı tip kolon dolgu maddelerinin özellikleri ve karşılaştırılması.....	16
Tablo 2.3. HPLC için silika ve metal oksitli kolon dolgu maddelerinin avantajları ve dezavantajları	17
Tablo 2.4. Çeşitli iyon değiştirici reçineler	20
Tablo 2.5. HPLC’ de detektör tipleri ve kullanım alanları	25
Tablo 2.6. HPLC’nin uygulama alanları.....	25
Tablo 2.7. Bazı metal komplekslerinin HPLC de uygulamaları.....	26
Tablo 2.8. İçme sularında müsaade edilen maksimum ağır metal konsantrasyonları.....	41
Tablo 2.9 Kıtta içi sulara müsaade edilen maksimum ağır metal konsantrasyonları	42
Tablo 3.1. Ligand ve metal-PAR komplekslerinin λ max değerleri.....	56
Tablo 3.2 Metal iyonlarının mol kesirleri.....	59
Tablo 3.3. Kompleks stokiyo metrilere.....	60
Tablo 3.4. PAR ve metal-PAR komplekslerinin oluşumunda optimum pH aralıkları.....	62
Tablo 3.5. Metal-PAR komplekslerinin oluşum süreleri.....	64
Tablo 3.6 Metal-PAR komplekslerinin ϵ değerleri	66
Tablo 3.7 Mobil fazla ilgili denemeler	69
Tablo 3.8 Co-PAR, Ni-PAR ve Fe-PAR Komplekslerine ait tayin sınırları	118
Tablo 3.9 Analiz edilen örneklerdeki Co, Ni ve Fe miktarları	120
Tablo 3.10 Demir analizlerinde kullanılan F-AAS ile ilgili parametreler	121
Tablo 3.11 Örneklerdeki demir miktarlarının HPLC ve F-AAS ile karşılaştırılması	122
Tablo 4.1. HPLC analizlerinde optimize edilen şartlar.....	127

ÖZET

DOKTORA TEZİ

ÇEŞİTLİ BİYOLOJİK VE ÇEVRE ÖRNEKLERİNDEKİ KOBALT, BAKIR, NİKEL VE DEMİR GİBİ ESER ELEMENTLERİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE TAYİNİ

Harun ÇİFTÇİ

Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
2007, Sayfa: 138

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile Fe(III), Ni(II) ve Co(III) gibi geçiş metal iyonlarının, 4-(2-piridilazo) resorsinol (PAR) ligandı ile kompleksleri hazırlanılarak çeşitli bitkilerdeki analizleri gerçekleştirildi..

Fe(III), Ni(II), Co(III) ve Cu(II) iyonlarının PAR ligandı ile kompleks hazırlama şartları incelendi. Bahsedilen iyonların PAR ile oluşturdukları komplekslerin stokiyometrilere mol oranı ve job yöntemi kullanılarak Fe(III), Ni(II), Co(III) iyonları için (Metal/Ligand) 1:2, Cu(II) iyonu için 1:1 olduğu bulundu. Kompleks oluşum süreleri metanol-su ortamında Fe(III), Co(III), Ni(II) ve Cu(II) kompleksleri için 10-60 saniye arasında bulundu. Fe(III), Ni(II), Co(III) ve Cu(II) Komplekslerin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyları (λ_{max}) sırasıyla 490 nm, 504 nm, 510 nm ve 500 nm olarak bulundu. Kompleks oluşumu için en uygun pH değerleri Co-PAR için 5-8 aralığı, Fe-PAR için 4-6,5 aralığı, Ni-PAR için 6-10 aralığı ve Cu-PAR için 6-9 aralığı olduğu belirlendi.

Komplekslerin molar soğurma katsayıları (ϵ) Fe-PAR için $5,4 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Ni-PAR için $2,7 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Co-PAR için $6,5 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ve Cu-PAR için $4,2 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak bulundu. UV-Visible detektörü kullanılarak C₁₈ Luna ODS (250x4,6 mm 5 μ 100A) kolonunda optimize edilen kromatografik ayırma şartları; dalga boyu 500 nm, akış hızı 0.6 mL/dk, mobil faz bileşimi metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi (55/40/2,5/2,5 v/v), mobil faz pH'ı 5,3 olarak bulundu.

Optimize edilen şartlarda yöntemin tayin sınırları Fe-PAR, Ni-PAR ve Co-PAR için sırasıyla 4.45, 3.26, ve 1.86 $\mu\text{g L}^{-1}$ olarak bulundu.

Optimize edilen şartlarda HPLC ile bitki örneklerinde Fe(III), Ni(II), Co(III) iyonlarının tayinleri gerçekleştirildi.

Anahtar Kelimeler: HPLC, Eser Element, 4-(2-piridilazo) resorsinol, UV-Visible, Demir, Nikel, Kobalt, PAR, Rezorsinol.

ABSTRACT

PhD Thesis

THE DETERMINATION OF TRACE ELEMENTS AS COBALT, COPPER, NICKEL AND IRON IN DIFFERENT BIOLOGICAL AND ENVIRONMENTAL SAMPLES WITH HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Harun ÇİFTÇİ

Firat University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Chemistry
2007, Page: 138

The transition metal ions such as Fe(III), Ni(II) and Co(III) were materialized by high performance liquid chromatography (HPLC) analyses in various plants by preparing complexes with 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR) ligand.

The suitable conditions to prepare complex with PAR ligand of Fe(III), Ni(II), Co(III) and Cu(II) ions are investigated. The stoichiometries of complexes that formed ions above mentioned with PAR were determined that [Metal]/[Ligand] is 1:2 for Fe(III), Ni(II), Co(III) and is 1:1 for Cu ions by using molar ratios and job method. Complex formation periods for Fe(III), Ni(II), Co(III) and Cu(II) complexes were found as 10-60 seconds in presence of methanol-water.

The wavelengths of maximum absorbance for Fe(III), Ni(II), Co(III) and Cu(II) complexes were determined as 490 nm, 504 nm, 510 nm and 500 nm, respectively. The most suitable pH values of complex formation for Co-PAR, Fe-PAR, Ni-PAR and Cu-PAR were determined in 5-8, 4-6.5, 6-10 and 6-9 range, respectively.

The molar absorption coefficients of complexes for Fe-PAR, Ni-PAR, Co-PAR and Cu-PAR were found as $5,4 \times 10^4$, $2,7 \times 10^4$, $6,5 \times 10^4$, $4,2 \times 10^4$ mol L⁻¹ cm⁻¹, respectively. The pH of mobile phase was determined as 5,3 under chromatographical separation conditions optimized in column C₁₈ 5µ 100A Luna (250x4,6 mm) ODS by using UV-Visible detector: wavelength 500 nm, flow rate 0,6 mL/min, mobile phase composition; methanol/water/acetonitrile/acetate solution

Detection limits of process for Fe-PAR, Ni-PAR and Co-PAR under optimized conditions were found as 4.45, 3.26 and 1.86 µg.L⁻¹, respectively. The analysis of Fe, Ni and Co ions in plant samples under optimized conditions were carried out by HPLC.

Key Words: HPLC, Trace Element, 4-(2-pyridylazo)-resorcinol, UV-Visible, Iron, Nickel, Cobalt, PAR, Resorcinol.

1. GİRİŞ

Metal iyonları ve metal kompleksleri; organizmaların hayati fonksiyonlarında önemli rol oynayan materyallerden biridir. Bu nedenle bu maddelerin sentezi, yapıları, oluşumları ve kararlılıkları için çeşitli inorganik, organik, analitik ve fiziksel teknikler kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknikler arasında HPLC, organometalik ve metal koordinasyon karışımlarının hazırlanmasında analiz edilmesinde ve ayrılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Organometalik komplekslerin ayrılması için ilk HPLC uygulaması 1969 da Veening tarafından rapor edilmiştir (1). HPLC metodolojisindeki hızlı gelişmeler ve kararlı metal şelatlarının uygulama alanına girmesiyle metal iyonlarının ayrılması ve analiz edilmesinde HPLC'ye olan önem daha da artmıştır. Kolon öncesi ve kolon sonrası pyridilazo (2), thiazoliaz (3), 8-hidroksi quinolin (4), kompleksonlar (5) ve diketonlar (6,7) gibi ligandlarla metal şelatları oluşturularak HPLC'ye başarıyla uygulanmıştır.

Metal komplekslerinin kromatografik tayinlerinde geleneksel olarak kolon kromatografisi (CC) ve ince tabaka kromatografisi (TLC) kullanılması, analiz süresince bazı komplekslerin termal ya da fotokimyasal etkilerle oksidasyona uğraması nedeniyle metal tayinleri için uygun değildir. Ancak HPLC ile bu sorunlar giderilebilir. Ortam şartlarında sistemin (paslanmaz çelik kolon, bozunmayan mobil faz, inert çözücüler ve bunun gibi...) ışık ve atmosferden teması önlemiş olduğundan analizler daha hızlı ve verimli bir şekilde gerçekleşmiş olur. Bu sebeplerle HPLC kullanılması popüler ve kazançlıdır (8, 9).

Son birkaç yıllık süre zarfında kolonlardaki hızlı gelişmeler ve çeşitli detektör tekniklerinin artması yüksek hızlı, etkili verimli bir şekilde metal komplekslerinin ayrılması ve analiz edilmesinde uygun şartları oluşturmuştur (10).

Bu çalışmada ise HPLC ile çeşitli örneklerde metal iyonlarının analizi ve ayrılmasında 4-(2-piridilazo)-resorsinol (PAR) ligandı kullanılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Koordinasyon bileşikleri ve şelatlar

Çeşitli tipte ligandların geçiş metalleriyle oluşturdukları kompleksler konusunda ilk bilimsel çalışmalar A.Werner tarafından yapılmış ve koordinasyon kimyasının esas temelleri, bu bilim adamının 1910'lu yıllarındaki başarılı çalışmaları üzerine inşa edilmiştir. Bugün koordinasyon bileşiklerinin girmediği alan yok gibidir (11). Koordinasyon bileşiklerinin endüstrideki önemi giderek artmaktadır. Boyar madde ve polimer teknolojisinde, ilaç sanayinde, tıpta biyolojik olayların açıklanmasında, tarım alanında, roket yakıtı hazırlanmasında ve bunlardan başka daha birçok bileşiklerden farklı şekillerde yararlanabilmek için yeni sentezlerin yapılması yönündeki çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir (12). Koordinasyon bileşiklerinde metal iyonu, elektron veren bir grup ile bağ teşkil etmiş durumdadır. Bir metal iyonu elektron çifti verebilen ligandlar ile bağ yaptığında meydana gelen bileşiğe koordinasyon bileşiği veya kompleks adı verilir. Koordinasyon bileşiklerinde ligandlar, merkez atomuna donör atom denilen elektron verici atomlar vasıtasıyla bağlanır. Bazı hallerde, ligand molekülü içindeki π bağları da merkez atomu ile bağ oluşturmada kullanılabilir.

Ligandlar bir donör atomla merkez atomuna bağlanabildiği gibi iki veya daha çok sayıda donör atomla da bağlanabilir. Böyle hallerde ligandlara iki, üç, dört, ... uçlu şelat denir. Şelatların oluşturduğu kompleksler tek uçlu ligandlardan daha karardır. Birbirine çok benzeyen ligand ve şelatların aynı merkez atomuyla kompleks oluşturma reaksiyonlarının incelenmesi, reaksiyon entalpileri yönünden, şelatlı komplekslerin daha kararlı olduğunu göstermektedir (13).

Komplekslerin kararlılığı metal ve ligandların yapısına ve özelliklerine bağlıdır. Koordinasyon bileşiklerinin kararlılığını etkileyen metalin yapısıyla ilgili faktörler:

1. Metal iyonun büyüklüğü
2. İyonun yükü
3. İyonlaşma gerilimi

Elementlerin yapısına bağlı olan koordinasyon sayısı genellikle metalin değeriği ile doğru orantılı olarak değışmektedir, metalin değeriği ne kadar büyüktse koordinasyon sayısı da o kadar büyüktür. Dört veya altı koordinasyon sayısına sahip metallerin kompleks bileşikleri en kararlı ve en çok incelenenleridir.

Ligand yapısının kompleks kararlılığı üzerine etkileri şöyle sıralanabilir.

1. Ligandın taşıdığı donör atom sayısı
2. Ligand başına düşen metal şelat halka sayısı
3. Şelat halkalarının büyüklüğü
4. Ligandın yapısındaki sterik etkiler

5. Rezonans etkiler

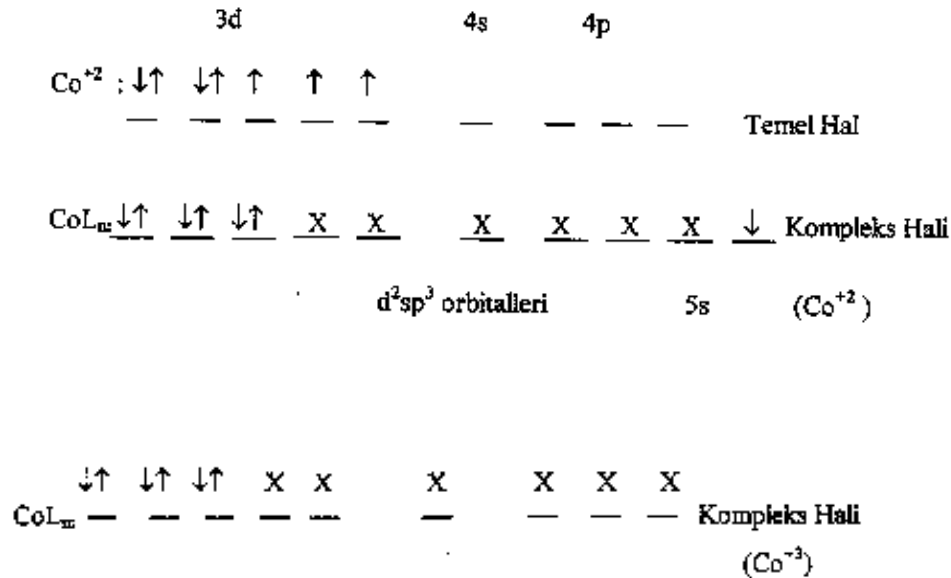
Geçiş metallerinde periyot boyunca ilerledikçe çekirdek etkin yükü artar. Bunun nedeni d orbitallerinin perdeleme etkisinin küçük olmasıdır. Çekirdek etkin yükündeki artış atom yarı çapının azalmasına, iyonlaşma enerjisi ve elektron ilgisinin artmasına neden olur.

Kobalt d^7 yapısındadır, geçiş metallerinde periyot boyunca ilerledikçe metalin yüksek değerlikli bileşiklerinin kararlılığı azalır. Değerliliğin +4 ve +5 olduğu bileşiklerin sayısı azdır. Kobalt(II) kompleksleri kararlı bileşiklerdir. Bu bileşiklerden birçoğunun oktahedral ve tetrahedral yapıda oldukları bilinmektedir. Kobalt(II) kompleksleri süstitüsyon reaksiyonlarına yatkın oldukları halde, kobalt(III) komplekslerinin birçoğu yatkın değildir. Kobalt(III) kompleksleri genellikle uygun kobalt(II) komplekslerinin yine uygun şartlarda yükseltgenmesiyle elde edilirler (14).

Sulu çözeltilerde kobalt bileşikleri genellikle pembe renkli olup uzun süre yükseltgenmeden kalabilir. Kobalt, bileşiklerinde genellikle Co(II) ve Co(III) basamağında bulunur. Kobaltın elektronik yapısı $_{27}\text{Co}:[1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^7 4s^2]$ şeklindedir.

Co (II) olması durumunda 4s'den 2 elektron, Co(III) olması durumunda 3d'den 1 elektron verilir. Co(II)'nin Co(III)'e yükseltgenmesi kompleks aşamasında daha kolay gerçekleşmektedir. Bu özellik Valans bağ teorisi ile kolay açıklanabilir.

$3d^7$ deki bir elektron ligandların bağ yapmaları ile kazanılan enerjinin etkisiyle daha yüksek enerjili üst orbitale geçer. Bulunduğu yüksek enerjili bu seviyeden kolaylıkla verilir ve Co(III) kompleksi haline dönüşür (15).



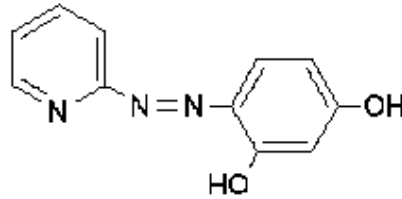
Şekil 2.1. Kobalt(II) ve kobalt (III) komplekslerinin orbital şemaları

3d orbitallerindeki elektron boşlukları nedeniyle kobalt, özellikle Co(III) olarak N-verici atomu içeren ligandları ile oldukça kararlı, sağlam, renkli ve kristal alan teorisine göre kuvvetli alan komplekslerini oluşturur (16).

Temel halde Nikel'in 3d orbitallerinde 8 elektronu vardır. Bileşiklerinin büyük bir çoğunluğu +2 değerliklidir. 0, +1, +3 değerliklerini aldığı özel durumlar da vardır. Nikel koordinasyon sayısı altı veya dört olan kompleksler yapabilir. Koordinasyon sayısının dört olması halinde nikel, tetrahedral ve kare düzlem yapısında kompleksler oluşturur.

Bu geometrilerden herhangi birinin tercih edilmesinde kristal alan kararlılık enerjisi etkili olmaktadır. Tetrahedral kompleksler yüksek spin, kare düzlem kompleksler ise düşük spinlidir. Bu nedenle kristal alan kararlılık enerjisinin yüksek olması halinde kare düzlem yapıda kompleksler meydana gelir. Ayrıca hacimce büyük olan ligandlar tetrahedral kompleksler oluşturmaya yatkındırlar (17).

Analitik kimyada eser elementlerin analizinde yaygın olarak kullanılmakta olan rezorsinol ve türevleri ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, hem azot hem de hidroksil grubu içeren, 4-(2-piridilazo) rezorsinol ligand olarak kullanılmıştır. 4-(2-piridilazo) rezorsinol'un suda, alkolde ve asetonitrilde kolay çözünmesi, metal şelatlarının kararlılık ve molar soğurma katsayılarının (2×10^4 - 9×10^4 L.mol⁻¹ cm⁻¹) yüksek olması (18) ile oluşum sürelerinin (10-40 sn) kısa olması nedeniyle görünür bölgede düşük konsantrasyonlarda olan metalleri analiz etmek mümkün olabilmektedir.



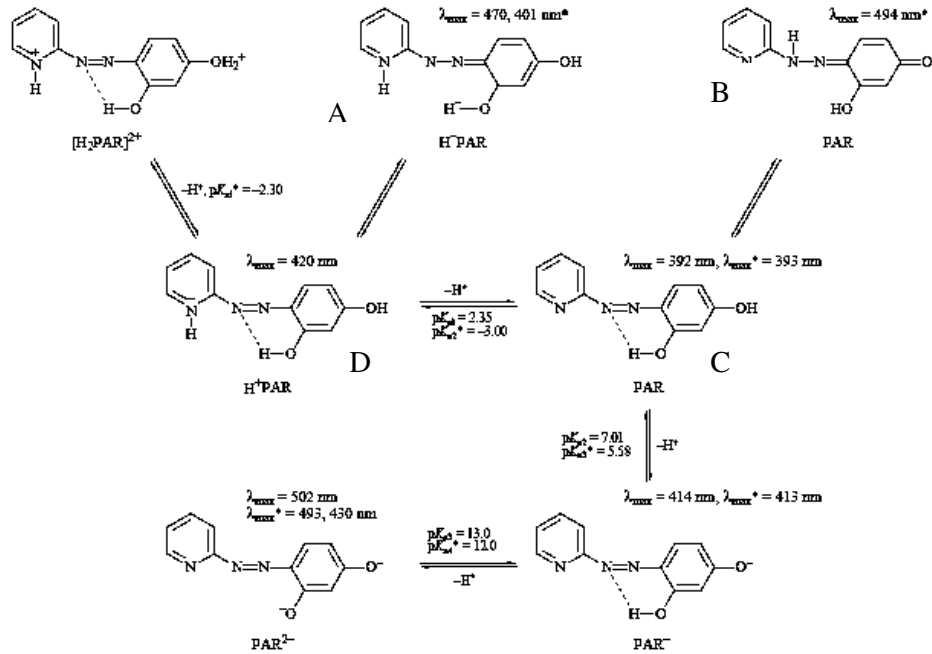
Şekil 2.2. 4-(2-piridilazo) rezorsinol ligandının kimyasal yapısı

2.1.1. Rezorsinol ve Türevlerinin Kimyasal Yapıları ve Özellikleri

Rezorsinol, beyaz iğnemsı kristaller halinde, tatlımsı, hava ve ışık tesiri ile rengi pembeleşen bir maddedir. Formaldehit reçinelerinin üretiminde, ilaç üretiminde, ağaç kaplamaları için yapışkan ve diğer bazı organik bileşiklerin üretiminde kullanılmaktadır. Rezorsinol insanlar üzerinde biyolojik etkiye sahip olduğu için hava ve su kirleticisi olarak kabul edilir. İnsanlar üzerinde zararlı etkileri vardır. Örneğin insan derisinde dökülmelere, egzamaya, nefes yolunda rahatsızlıklara, aşırı zayıflamaya,

hazımsızlık ve kan hastalıklarına sebep olur. Otomobillerin egzoz gazları, sigara dumanı ve petrol rafinerileri, rezorsinol'ün çevreye yayılmasına neden olmaktadır (19).

Rezorsinol'ün bazı türevleri analitik kimya da eser elementlerin analizi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlardan birisi de 4-(2-piridilazo) rezorsinoldür. 4-(2-piridilazo) rezorsinol, hem azot hem de hidroksil grubu içerdiğinden yüksek molar absorblayıcılığa sahiptir. 4-(2-piridilazo) rezorsinol kolay çözünme ve çok düşük konsantrasyonlarda metalleri belirlemeyi mümkün kıldığından eser haldeki bir çok metalin belirlenmesinde ve analiz edilmesinde kullanılmaktadır (20).



Şekil 2.3. Sulu çözeltilerde PAR'ın λ_{max} değerleri [λ_{max}^* ve pK_a^* değerleri alkol-su çözeltilerinde ölçülmüştür] (44).

Sulu çözeltilerde, 4-(2-piridilazo) rezorsinol ortamın pH'ına bağlı olarak dört ayrı yapıda bulunabileceği şekil 2.3'de görülmektedir. En ağırlıklı olarak oluşan mono-iyonik yapı olan C, pH 5.98-12.50 aralığında bütün çözeltilerde maksimum 414 nm'de ($\epsilon = 25900 \text{ L.mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon yapmaktadır. Protonlanmış yapı olan A, pH 1.72-2.44'de 420 nm'de maksimum ($\epsilon = 15700 \text{ L.mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon yaparken, D şekli 12.58'in üzerindeki pH değerlerinde 493 nm'de de maksimum ($\epsilon = 17300 \text{ L.mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon yapmaktadır.

2.2. Kromatografi

Kromatografi, bir karışımda bulunan bileşenleri birbirinden ayırmak için kullanılan yöntemlerin genel adıdır. Kromatografik yöntemlerde karışımdaki bileşenler,

gaz veya sıvı haldeki hareketli fazın akışı ile sabit faz boyunca taşınırlar. Bileşenlerin ayrılması, bileşenlerin ilerleme hızlarındaki farklılığa, bir başka ifade ile sabit faza olan ilgilerine dayanır.

Kromatografik yöntemler, hareketli fazın sıvı veya gaz olmasına göre, sıvı ve gaz kromatografisi olmak üzere sınıflandırılır. Tablo 2.1.'de çözünenin hareketli ve sabit fazlardaki dağılma dengesine bağlı olarak sıvı kromatografisi (LC) ve gaz kromatografisi (GC) türleri görülmektedir.

Tablo 2.1. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

Genel Sınıflandırma türü	Yöntem Adı	Sabit Faz	Denge Türü
Sıvı kromatografisi (LC) (hareketli faz: sıvı)	Sıvı-sıvı veya dağılma	Katı üzerine adsorblanmış sıvı	İki sıvıda dağılma
	Sıvı-katı veya adsorpsiyon	Katı	Adsorpsiyon
	İyon değiştirme	İyon değiştirici reçine	İyon değiştirme
Gaz Kromatografisi (GC) (hareketli faz: gaz)	Gaz-sıvı	Katı üzerine adsorblanmış sıvı	Gaz ve sıvıda dağılma
	Gaz-katı	Katı	Adsorpsiyon

Sıvı kromatografisi çeşitli alt gruplara ayrılır:

Adsorpsiyon kromatografisi,

Dağılma kromatografisi,

İnce tabaka kromatografisi,

Kağıt kromatografisi,

İyon değiştirme kromatografisi.

Eğer sabit faz dolgu maddesi üzerinde yayılmış bir sıvı film ise yönteme sıvı-sıvı kromatografisi denir. Bileşenler, sabit ve hareketli faz arasındaki farklı dağılma eğilimlerine göre birbirlerinden ayrılırlar. Bu yöntemde hem sabit faz, hem de hareketli faz birbiriyle karışmayan, polarlıkları farklı iki sıvıdır.

Sabit faz, bir sıvı ile kaplanmamış katı dolgu maddesi ise yöntem, sıvı-katı kromatografisi adını alır. Bileşenlerin katı yüzeydeki farklı adsorpsiyon ilgilerinden ötürü ayırma gerçekleşir.

Bu metotla ayırmaların çoğunda, analiz edilecek çözeltide bulunan bileşenler (iyonlar ve moleküller), sabit faz adını alan bir dolgu maddesi ile doldurulmuş belli uzunluktaki bir kolondan geçirilir ve uygun bir çözücü (hareketli faz) ile kolonun bir ucundan öteki ucuna kadar sürüklenerek taşınır. Taşıma sırasında adsorpsiyon kromatografisinde bileşenler sabit fazda adsorbe edilir. Ancak, her bileşenin adsorbe edilme hızı farklı olduğundan, bileşenler kolonda farklı tabakalarda kalırlar. Kolonun üstünden devamlı ilave edilen çözücü yardımıyla, en zayıf adsorbe edilen bileşen en önde olmak üzere bileşenler birbirlerinden ayrılarak farklı kaplara toplanırlar.

2.2.1. Kromatografide Kullanılan Temel Kavramlar

a) Dağılım Katsayısı

Kromatografide genel olarak analitin hareketli ve sabit fazlar arasındaki dağılım dengesi basit olarak, bir A bileşeni için



şeklinde yazılabilir (21). Bu ifadenin denge sabiti K, dağılım katsayısı olarak

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

formülü ile verilir. İdeal olarak bu oranın çok geniş bir derişim aralığında sabit olması istenir.

C_S = Analitin sabit fazdaki molar konsantrasyonu

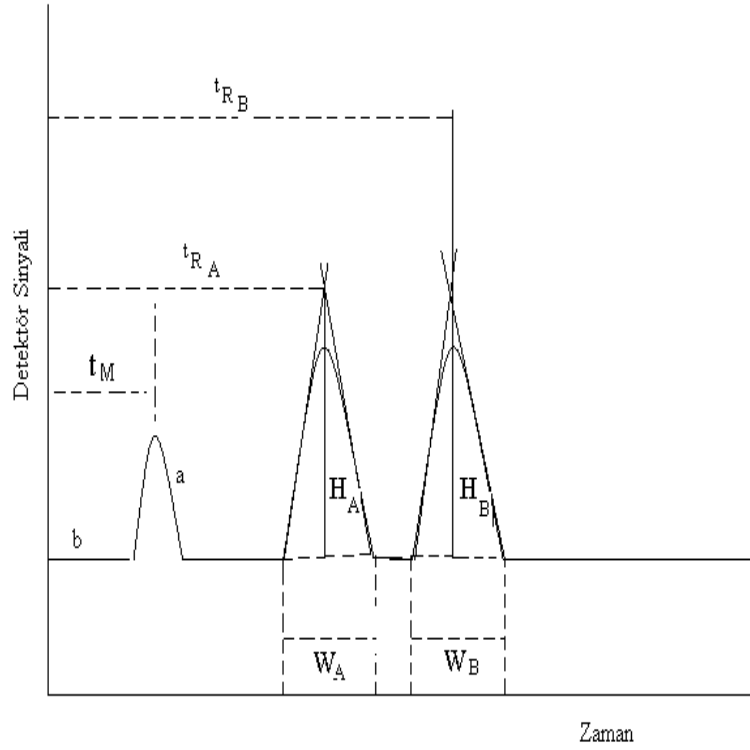
C_M = Analitin hareketli fazdaki molar konsantrasyonu

b) Kapasite Faktörü (k')

Analitin kolonda göç etme hızlarını tanımlamak için kullanılan bir büyüklüktür.

$$k_{A'} = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

formülü ile hesaplanır. Kapasite faktörünün 1-5 arasında bir değer göstermesi idealdir. Uygun bir kolonun seçilmiş olması halinde kapasite faktörünün değeri mobil fazın bileşimi değiştirilerek ayarlanabilir (21).



Şekil 2.4. Sıvı kromatografisinde elde edilen kromatogram örneği

$t_{R,A}, t_{R,B}$: A ve B maddelerinin alıkonma zamanları (retensiyon zamanları)

a : Kolonda tutulmamış çözünen piki

b : Temel çizgi (base line)

H_A, H_B : A ve B maddelerinin pik yükseklikleri

t_M : Ölü zaman (kolonda tutulmayan türün çıkma zamanı)

W_A, W_B : A ve B maddelerinin pik genişlikleri

c) Seçimlilik Faktörü (α)

Birbiri ile ilişkili iki pikin göreceli alıkonmalarına seçimlilik faktörü denir. A ve B bileşenleri için bir kolonun seçimlilik faktörü,

$$\alpha = \frac{K_A}{K_B} = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

formülünden hesaplanabilir. $\alpha=1$ ise pikler ayrılmamıştır. Mobil faz bileşimini değiştirerek veya çalışma sıcaklığını ayarlayarak seçimlilik faktörü 2 den büyük yapılabilir ve böylece en iyi ayırma sağlanır (21).

d) Rezolüsyon (Ayrışma)

Rezolüsyon, iki kromatografik pikin birbirinden ayrılma derecesini tanımlayan bir parametredir. Rezolüsyonun belirlenmesinde kullanılan formül,

$$R_S = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

şeklindeir. R'nin 1.5 olması durumunda iki bileşenin ayrılması tam olarak gerçekleşir. Bu durumda iki bileşenin sadece % 0.3'ü çakışır. Ayrışmanın 1.0 olduğu durumda ise A bileşenine ait pik % 0.4 B bileşeni, B bileşenine ait pik de aynı oranda A bileşeni içerir. Belli bir sabit faz için ayrışma kolon uzunluğunu arttırarak iyileştirilebilir. Fakat bu kez ayırma için gereken süre artar.

Ayrışma kolon etkinliğini belirleyen tüm faktörleri içerecek şekilde;

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_B'}{1 + k_B'} \right)$$

formülü ile ifade edilebilir.

Yukarıdaki formülden kolon verimliliğini tanımlamakta kullanılan N, teorik plaka sayısı;

$$N = 16 R_S^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + k_B'}{k_B'} \right)^2$$

formülü ile kolon verimliliğini tanımlamakta kullanılan diğer parametre H, plaka yüksekliği de;

$$H = \frac{L}{N} \quad \text{formülü ile hesaplanabilir (21).}$$

2.2.2. Kolon Etkinliğinin (Performansının) Optimizasyonu

İyi bir ayırma gerçekleştirebilmek için temel büyüklükler α , k' ve N (veya H)'ın az çok birbirinden bağımsız olarak değiştirebildiğini unutmamak gerekir, α ve k' sıcaklık ve mobil faz bileşimi ile kolaylıkla değiştirilebilir. Farklı bir kolon dolgu maddesinin kullanılması da daha az uygun olmakla birlikte bir seçenektir. N'i, kolon uzunluğunu ve H'i, mobil fazın akış hızını, dolgu maddesinin tanecik büyüklüğünü,

mobil fazın viskozitesini ve sabit fazı oluşturan adsorblanmış likit fazlarının kalınlığını değiştirerek istenen değere getirmek, en azından yaklaştırmak mümkündür.

Ayrışmayı iyileştirmenin en kolay yolu kapasite faktörünü (k') optimize etmektir. Likit kromatografisinde yukarıda bahsedildiği gibi çözücü bileşimini değiştirmek k' değerinde gereken değişimi genellikle sağlar. Seçimlilik faktörünü arttırabilmenin yolları ise azalan tercih edilebilirlik sırası ile: (a) pH değişikliklerini de içeren mobil faz bileşimini değiştirmek, (b) kolon sıcaklığını değiştirmek, (c) sabit fazın bileşimini değiştirmek, (d) özel kimyasal etkilere dayanarak yararlanmaktır (21).

2.3. Sıvı Kromatografi Teknikleri

Polarlık, çözünürlük ve molekül ağırlığı türüne göre miktar analizinde çeşitli spesifik uygulamalar için sıvı kromatografi türleri kullanılır.

Sıvı kromatografi türlerinde zıt faz, zıt faz iyon çifti, iyon değiştirme, jel geçirgen ve kiral kromatografisi türleri bulunur (22).

2.3.1. Dağılma Kromatografisi (Normal ve zıt faz)

Normal faz (NP) ve zıt faz (RP); hareketli ve sabit fazın polarlığına göre tanımlanır. İlk kromatografik ayırmalar polar alumina ya da sabit silika faz ve hegzan gibi çözücülerin kullanıldığı apolar fazlardır.

Bu tip kromatografi normal faz sıvı kromatografisi gibi belirtilir. Ancak bir polar mobil faz kullanılarak ve kısmi apolar durgun faz kullanıldığında benzer ayırmalar diğer ayırmaların zıttı ile elde edilebilir. Zıt faz sıvı kromatografisinin bugünlerde en popüler olanı ICP-MS detektörlü dağılım kromatografisi modülüdür.

Silika omurgalı durgun fazlar hidrofobik hidrokarbonların 2, 8 veya 18 karbonlu atomlarının zincirli formudur. Bu yüzden kolonlar C_2 , C_8 ve C_{18} olarak adlandırılır. Onlar ayrıca okdesilan (ODS) gibi hidrokarbonları kapsar. Analit dağılımı sabit faz ve mobil faz arasındaki farklı etkileşimden olur. Mobil faz içeriği ve miktarıyla ayırma kontrol edilebilir. Asetonitril ve metanol en yaygın olarak kullanılan mobil faz bileşimidir (22).

2.3.2. Zıt Faz İyon Değiştirme Kromatografisi

Zıt faz iyon çifti kromatografisi RP-kromatografisinin modifiye edilmiş şeklidir. RP mobil fazına iyon çifti ayırıcı eklenerek iyonik ve non iyonik karışımları ayırma kabiliyetine sahiptir. İyon çifti ayıraçları baş kısımları polar, kuyruk kısımları apolar gruplara sahiptir.

Tetra alkil amonyum tuzları (t-BABr, n-BABr), tri etil amonyum tuzları, tri flor asetik asit (TFA) ya da alkil sülfonatlar gibi anyonlar iyon çifti ayıraçların farklı

tipleridir. Onlar bir iyon çifti formunda iyonik analitlere bağlanarak tamamı elektriksel olarak nötral olan RP kolonu tarafından tutunurlar. Analit seçiciliği mobil faz içeriği değiştirilerek ayarlanabilir. İyon çifti ayırıcıları mobil faza 1×10^{-3} - 5×10^{-3} M arasındaki konsantrasyonlarda eklenir (23).

2.3.3. İyon Değiştirme Kromatografisi

İyon değiştirme bir analit iyonu ve mobil faz iyonunun sabit fazdaki zıt yüklü fonksiyonel grup iyonlarının etkileşim prosesidir. Enjeksiyonda mobil faz iyonları karşı fonksiyonel grup iyonlarıyla etkileşerek nötral olurlar. Analit enjeksiyonundan sonra bu iyonlar fonksiyonel grup kısımları için mobil fazdaki iyonlar yarıdır. Farklı formdaki analit iyonlarının ayrılması mobil faz iyonlarıyla analit iyon türlerinin yer değiştirmesiyle olur. Analit içerdiği iyonların küçük ya da büyük olmasına göre farklı sürede ayrılırlar. Büyük iyonların kolonda taşınımı daha yavaştır. Bu tür iyonların şelat oluşturularak pH'a bağlı olarak da ayrılma ihtimali vardır (24).

2.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yönteminde, sabit faz olarak kullanılan maddelerin tanecik boyutlarının önemli ölçüde küçültülmesi sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylece kolonun etkinliği artırılmış olur. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için bir basınç uygulanması gerekir. Bu yüksek verimdeki kolonların ve oldukça yüksek basınçların kullanıldığı HPLC, element türlendirilmesinde en yaygın biçimde uygulanan kromatografi türüdür.

HPLC günümüzde kimya, biyokimya, biyoteknoloji, farmakoloji, tıp kimyası, bitki kimyası, tarım ve kimya mühendisliğini içeren alanlarda ayırma ve analiz için vazgeçilmez bir araç olarak kabul edilmektedir. Bilhassa diğer kromatografik tekniklere uygun olmayan bileşiklerin ayrılması ve analizi için uygundur. Çevre sıcaklığında termal olarak kararsız bileşikleri ve yüksek polarlıktaki bileşikleri herhangi bir türevlendirme olmaksızın ayırabilir ve analiz edebilir (25).

HPLC'nin sıvı kromatografisinin diğer türlerinden üstünlükleri şunlardır.

- 1) HPLC kolonu, rejenerasyon olmaksızın pek çok kez kullanılabilir.
- 2) Böyle kolonlarda gerçekleştirilen ayırma, eski yöntemlerle elde edilenden çok daha çeşitlidir.
- 3) Bu teknik kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir.
- 4) Nicel analiz amaçları için de kullanılabilir.

5) Analiz süresi çok kısadır.

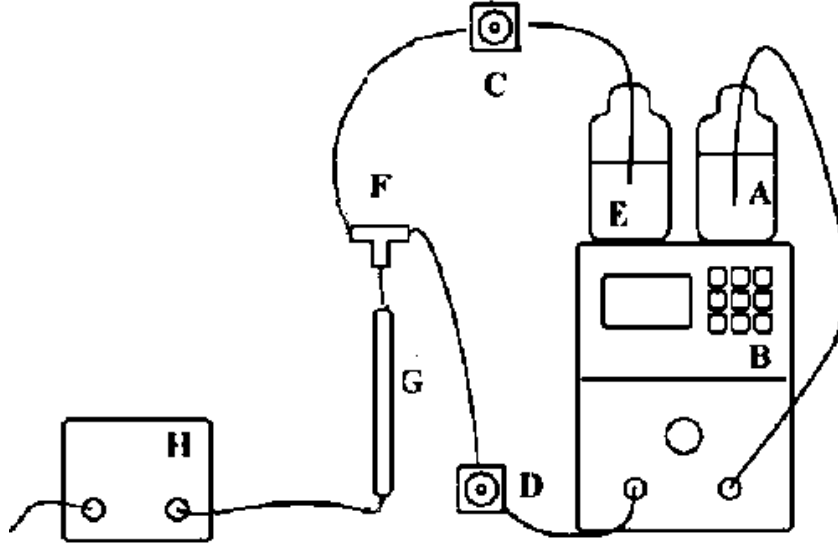
6) Duyarlık çok yüksektir, 1-2 µg'lık örnek bile, floresans, elektron yakalama ve ICP-MS detektörleri kullanılarak analiz edilebilir.

Şekil 2.5.'de görülen HPLC cihazı başlıca üç bölümden oluşur:

Çözücü dağıtma bölümü

Ayırma kolonu

Detektör ve kaydedici sistem



Şekil 2.5. HPLC sistemi ve enstrümanları A,E) Mobil faz depoları, B) Pompa kontrolörü,

C,D) Yüksek basınçlı pompa F) Mikser, G) Kolon, H) Detektör

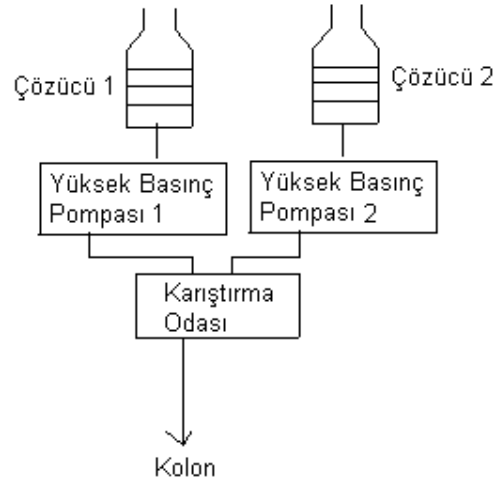
2.4.1. Çözücü Dağıtma Sistemi

HPLC cihazı, diğer sıvı kromatografisi cihazlarından, daha önce de belirtildiği gibi, kolon giriş ve çıkışı arasında oluşturulması gereken yüksek basınç nedeni ile farklılık gösterir. Bu basınç farkı, kolon girişine bir pompa yoluyla uygulanan basınç ile sağlanır. Çözücü pompalama sistemi belki de HPLC sisteminin en önemli kısmıdır. Pompanın performansı, analitik sonuçlardaki tekrarlanabilirliği, nicel değeri ve gözlenebilme sınırını büyük ölçüde etkiler.

Pompaların aynı zamanda çözücü oranlarını da değiştirebilecek şekilde programlanabilmesi, çözücü programlaması adı verilen ve çok daha etkin bir ayırmayı sağlayan tekniğin uygulanmasına olanak verir.

Çözücüler, ayırma kolonuna girmeden önce karıştırılırlar. Bu sistem gerekli ayırmayı sağlamakta kullanılan iki ve daha fazla hareketli faz için, iki ve daha fazla yüksek basınç pompasına sahiptir (Şekil 2.6). Bu amaçla kullanılacak hareketli fazların

tamamen karışabilir özellikte olması gerekir. Pompalar yoluyla çözücüler, ya difüzyon ya da mekanik olarak çalışan küçük hacimdeki karıştırma odalarında karıştırılırlar.



Şekil 2.6. Çözücü programlama sistemi

2.4.2. HPLC’de Kullanılan Kolon Dolgu Maddeleri

Kullanılan HPLC ayırma modülleri arasında normal faz (NP-HPLC), zıt faz (RP-HPLC) ve jel geçirgen sıvı kromatografisi (SEC) bulunmaktadır. HPLC ayırma modüllerinden RP-HPLC %80-90 daha yaygın olarak kullanılmaktadır (26).

Analizlerin birçoğu için uygulanan HPLC yönteminde de zıt faz (RP) seçici ayırmalarda yoğun olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda geliştirilen zıt faz kolonları ayırmayı hızlı, seçici, etkili ve verimli bir şekilde yaparak çözücü tüketimini düşürmekte kimyasal ve termal etkilere karşı daha kararlı yapıda olmaktadır. Günümüzde en fazla kullanılan zıt faz HPLC kolonları silika esaslıdır. Silika esaslı kolonların ayırma gücünün fazla olması çözücülere karşı yüksek mekanik özellik göstermesi nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak yüksek pH ve sıcaklık etkisinde çözünmeye uğraması istenmeyen özelliğidir. Bu durumun önüne geçmek için silika temelli sabit fazlara organik polimerler sentezlenerek modifiye edilmekte kimyasal ve termal yönden daha kararlı yapı kazandırılmaktadır. Ayrıca çeşitli deney şartlarında daha kararlı olan zirkona ve alumina esaslı sabit faz üzerinde de çalışılmaktadır (25).

Analiz edilecek maddelerin asidik, bazik ve nötral özelliklerine, kolonların bağlantı şekillerine, uzunluğuna, iç çapına, tanecik boyutuna ve omurga yapısına göre RP kolonları üretilmektedir (27).

Organik moleküllerin çoğu non-polar yapıya sahip oldukları için, yüzeyinde non-polar fonksiyonel gruplar olan sorbentlerde ayrılan maddenin alıkonulmasında non-polar etkileşimlerden yararlanılabilir. Kromatografik şartlar altında, alkil bağlı kısımlar kısmen veya tamamen mobil fazdaki organik molekülleri ile solvate edilmiş olabildiğinden ODS materyalindeki serbest silanol grupları hidrate haldedir. Sulu organik mobil fazlar kullanıldığı zaman sabit fazın alkil bağlı grupları ile analitin dispersif etkileşimi ve analitin hidrofilik etkisi nedeniyle alıkonulması kolaylaşır. Bileşiklerin alıkonulması pH'a, sıcaklığa, katı fazla etkileşime ve mobil fazın bileşimine bağlıdır (28).

2.4.2.1. Kolonlarda Bulunması Gereken Özellikler

- 1) Analiz edilecek örneğe göre seçici olmalı,
- 2) LC-MS gibi spesifik uygulamalar için çözücü tüketimi minimum olmalı, su oranı yüksek eluentlerde performansı artırmalı,
- 3) Akış karakteristikli yeni formlara özellikle düşük basınç şartlarında hız artışı için monolitik fazları karşılayabilme özelliğine sahip olmalı,
- 4) Partikül sentez metodu tekrarlanabilir özelliğe sahip olmalı,
- 5) Partikül büyüklük dağılımında katının çökme ve aşınma özelliğinin sınırlı olması,
- 6) Yeni dizayn edilecek yeni nesil kolon teknolojilerine uyumlu olmalı (29),
- 7) Polimer omurgalı ya da polimer esaslı sabit fazlarda minimum şişme özelliğinin sergilenmesi,
- 8) Kimyasal modifiyeli yüzeyin kolon boyunca homojen olması,
- 9) İyi bir kolon dolgu maddesi kararlı olmalıdır ve hem hareketli faz çözücülerine hem de örnek çözeltilere karşı inert olmalıdır. Geniş yüzey alanına, düzgün olarak dağılmış ve hareketli faza kolay erişebilir açık yapısal yüzeye sahip olmalıdır. Yüksek basınç ve yüksek akış hızlarından etkilenmemelidir (30).
- 10) Gözenekler analitin molekül büyüklüğü için uygun büyüklükte olmalı ve bağlantı kısımlarının hızlı kütle akışına müsaade edebilecek derecede iyi bağlantı özelliğine sahip olmalı (31).

Kolon verimi; kolon dolgu maddesi, ortalama tanecik çapı, kolonu doldurmak için kullanılan teknikler, kolonun iç çapı ve kolonun iç yüzeyinin geometrisi gibi pek çok faktör tarafından analiz edilir. Paslanmaz çelik kolonların, malzeme özellikleri açısından en uygun kolonlar olduğu ortaya konulmuştur. Analitik uygulamalarda, 2.1 mm, 3.2 mm ve 4.5 mm iç çapa sahip kolonlar 10-30 cm arasındaki uzunluklarda kullanılırlar. Bu tür kolonların teorik plaka sayısı 40.000 – 60.000 plaka/m civarındadır (32).

2.4.2.2. Silika Esaslı Kolonlar

HPLC çalışmalarında sabit faz olarak genellikle silikajel kullanılır. İçerdiği SiOH grupları nedeniyle zayıf asidik özellik gösteren silikajel, bazik özellik gösteren bileşikler için bazlık kuvvetlerine göre tutar. Yani, kuvvetli bazlar silikajel kolonlarda zayıf bazlara oranla daha kuvvetli tutulurlar. Silikajel doğrudan dolgu maddesi olarak kullanıldığı gibi bir katı yüzeyine film halinde kaplanabilir. Bu katının cam boncuk olması durumunda bu ince tabaka, yüzeye kimyasal bağlarla bağlanır. Asidik özellik gösteren bileşiklerin ayrılmasını sağlayan, yani bazik özellik taşıyan bir kolon dolgu maddesi de aluminadır. Bu dolgu maddesi de katı bir yüzeye film halinde kaplanarak kullanılır (33).

Silika esaslı kolonlarda taneciklerin düzgün dağılması mekanik dayanımının fazla olması, yüksek yüzeye sahip olması, gözenek dağılım büyüklüğünün kolaylıkla tolare edilmesi, silanol gruplarının yüzeylerinin zıt faz, normal faz, iyon değiştirme ve jel geçirgen kromatografisi için seçici grupların kovalent bağlanarak modifikasyona izin verebilmesi ve silika partikül sentezi, sabit faz sentezi ve silika kimyası hakkında fazla miktarda araştırmaların olması silika esaslı kolonların avantajlarıdır (33, 34, 35, 36, 37).

Silika esaslı kolonların çalışma pH aralığının dar olması nedeniyle silikaya alternatif olarak alümina, polimer ve poröz grafit esaslı destek maddeleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. pH 1-12 aralığında dayanıklılığa sahip olabildikleri için divinilbenzen (DVB), polistiren divinilbenzen (PS-DVB), polivinilalkol (PVA) gibi polimerik destek materyalleri ve bunlara alkil zincirleri bağlanmış kolon dolgu maddeleri ile ilgili yoğun çalışmalar vardır (38).

Alumina ve zirkona destek maddeleri silikayla karşılaştırıldığında daha kararlı kimyasal özelliğe sahiptir, pH aralıkları 2-13 arasındadır. Ayrıca termal kararlılıkları da oldukça yüksektir (150-200 °C) (31).

Poröz polimerler genellikle geniş pH aralığında yüksek örnek yükleme kapasitesine sahiptir. Non-polar polistiren divinilbenzen kopolimeri (PS-DVB) değiştirilebilir gruplar içermeyen polimer matrislerde hidrofobik etkileşimlerle adsorplar. Bileşiklerin analizinde alkali mobil faz kullanılması gerektiği zaman, yüksek pH'larda PS-DVB'nin stabil kalma avantajı vardır. Fakat ODS'a göre düşük rezolüsyon, düşük pik kararlılığı ve zayıf basınç direnci gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Ayrıca bazı solventlerle şişebilir veya büzülebilirler.

2.4.2.3. İyon Değiştirici Reçineler

Elementel türlendirme amacı ile kullanılan dolgu maddesi ise genellikle anyon veya katyonları tutan iyon değiştirici reçinelerdir. Bu reçinelerin kullanılması

durumunda örnekte iyon halinde bulunan türlerin birbirinden ayrılması sağlanabilir. Kullanılan iyon değiştirici reçineler doğrudan kolona doldurulabilen katı reçineler olabileceği gibi, bir katı yüzeyine kaplanmış sıvı reçineler de olabilir. İyonların bu reçinelere olan ilgilerine etki eden birçok faktör vardır. Bunlar; iyonların yükü ve büyüklüğü, pH, iyon şiddeti, kullanılan reçinenin gözenekliliği, çözücü cinsi, çözücü derişimi ve sıcaklıktır (39).

Tablo 2.2. Farklı tip kolon dolgu maddelerinin özellikleri ve karşılaştırılması

Özellik	SiO ₂	TiO ₂	Al ₂ O ₃	ZrO ₂	Değerlendirme
Boyut dağılımı	++	++	++	++	Küresel tanecik boyutu tüm oksitlerde aynıdır.
Gözenek yapısı	++	?	?	++	Silika ve zirkonanın gözenek bağlantıları uygundur. Titanianın ve zirkonanın yapıları belirtilmemiştir.
Yüzey alanı/Gözenek çapı	++++	++	+++	++	En geniş yüzey alanına sahip dolgu maddesi silikadır.
Düzenlenebilen yüzey kimyası	++++	?	?	+++	Silika silan kimyasıyla, metal oksitler polimer bağlanmasıyla, zirkona karbon bağlanmasıyla, titanın yüzey kimyası yeterince bilinmemektedir.
Mekanik dayanım	++	?	?	+++	Silika ve zirkonanın 10,000 Psi dan fazla basınç değerini tolere etmektedir.
Kimyasal kararlılık	-	++(?)	+++	++++	Silika pH : 2-8 (fosfat içermezse 11,5). Alumina pH 3-13, zirkona pH 1-14, titania için stabil çalışmalar yapılmamıştır.
Termal Kararlılık	-	?	?	+++	Silika 60-70 °C, zirkona 200 °C, alümina ve titan için termal kararlık bilgisi yetersizdir.
Kolon Verimi	+++	?	++	+++	Silika ve zirkonada kolon verimi yüksek iken aluminada düşüktür. Titana için belirtilmemiştir.
Homojenlik	++	+	+	+	Silika diğer metal oksitlerden daha homojendir.

Birkaç bileşenden oluşan bir karışımdaki her bileşen, farklı bir net yüke sahiptir ve bu yüzden kolondan ayrılması için farklı bir iyonik kuvvet gerektirir. İyonik kuvvet tamponun veya tampona eklenen tuzun artan derişimiyle artabilir. Böylece örneğin kolonda alıkonması azaltılabilir ve bileşikler farklı tuz derişimlerinde kolondan ayrılabilirler.

Örnek bileşenlerinin ayrılması, tamponun pH'ının değiştirilmesiyle sağlanabilir. Tamponun pH'ı molekülün pH'ına yaklaştığında molekül kendi yükünü kaybeder ve iyon değiştiriciden kurtulur. Katyon değiştirmede, örnekler kendi pH değerlerinin altında bir pH'da tutulduğundan, tampon pH'ının artırılmasıyla örnek kolondan daha çabuk ayrılır (40).

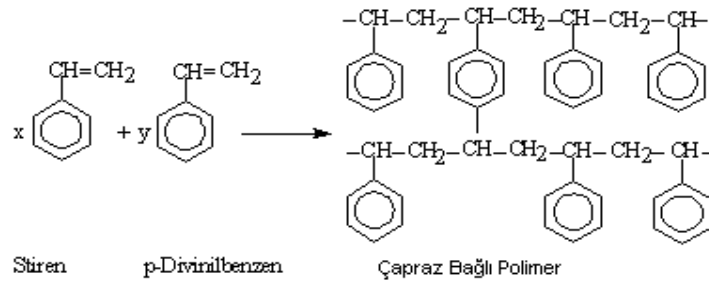
Tablo 2.3. HPLC için silika ve metal oksitli kolon dolgu maddelerinin avantajları ve dezavantajları (38).

Madde	Avantaj	Dezavantaj
Silika	Partikül büyüklüğü, gözenek çapı ve yüzey alanı uygunluğunda seçici kullanılır.	Yüksek ve düşük pH da kararlılığı yetersizdir. Termal kararlılığı yetersizdir. Nötral pH da inorganik tamponlara karşı duyarlıdır. Birçok amin türevi silika fazlarda pik verir. Sıcaklık yükselmesinde düşük organik içerikli mobil fazında hızlı HPLC için imkan sağlamaz.
Metal oksitler	Son derece yüksek sıcaklık şartlarına ve tüm pH değerlerinde kararlılığı yüksektir. Elektrolit olmayan karışımların ayrılmasında seçicidir. Hızlı HPLC uygulamaları için yüksek sıcaklık şartlarına ve düşük organik içerikli mobil fazlarla imkan verir. Asidik ve bazik karışımlar için silikaya göre daha seçicidir.	Silikadan farklı yüzey kimyası ve tanecik büyüklüğünün olması nedeniyle yüzey modifiyesi sınırlıdır. Kuvvetli levis asit ve karboksilli asit içerikli karışımların ayrılmasına imkan sağlamamaktadır.

HPLC destek maddeleri hem silika temelindeki maddeleri hem de türevlendirilmiş hidrofilik veya hidrofobik polimerleri kapsar.

a) Polimer temelli iyon değiştiriciler: Polimer temelindeki iyon değiştirici reçinelerin polimerik iskeleti polistirene çapraz bağlanmış divinilbenzenden sentezlenir. Bu iskelet genellikle bir stirendivinilbenzen (DVB) polimeri, polimetakrilat polimeri, metakrilik asit divinilbenzen (MA-DVB) polimeri veya akrilik asit

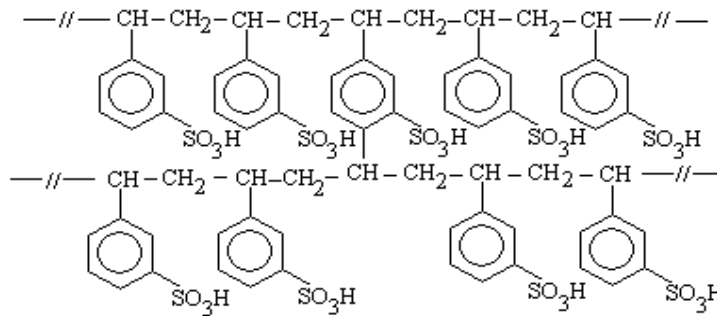
divinilbenzen (A-DVB) polimeridir. Bunlardan stirendivinilbenzen polimerinin oluşturulması aşağıdaki şekilde gerçekleştirilir.



Şekil 2.7. Stiren divinil benzen polimerinin oluşumu

Çapraz bağlanmanın miktarı, divinil benzen miktarı ile kontrol edilir. Genellikle her 11 mol stiren için 1 mol divinil benzen kullanılır. Çapraz bağlı polimerik zincirlerin oluşturulması için yaygın biçimde p-divinil benzen kullanılmakla birlikte, m-divinil benzen de aynı işlevi görür. Polistiren divinil benzen reçinesinin gözenekliliği ve mekanik kuvveti, çapraz bağlanma derecesinin bir fonksiyonudur. Yüksek dereceli çapraz bağlı reçineler (% 8-10) yüksek basınçta kullanılabilir, fakat küçük çapları yüzünden, makro moleküllerin geçmesine izin vermezler. Düşük dereceli çapraz bağlı reçineler (% 2-8), büyük moleküllerin matrikse geçmesine izin verir ve çözünürlüğü artırırlar. Fakat mekanik kararlılıkları düşüktür. Bu destek maddelerinin avantajı, pH 2 - 2 arasında kararlı olmalarıdır (41).

Kasyon değiştiriciler, polimere asidik fonksiyonel gruplar eklenerek, anyon değiştiriciler ise bazik fonksiyonel gruplar eklenerek elde edilirler. En çok kullanılan fonksiyonel gruplar kasyon değiştiriciler için sülfonat ($-\text{SO}_3^-$), anyon değiştiriciler için kuaterner amin, trimetilamonyum ($-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$); dimetil hidroksietil amonyum ($-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{C}_2\text{H}_4\text{OH}$) formundaki iyon değiştiricilerdir. Örneğin bir stiren divinil benzen polimeri H_2SO_4 tepkimeye girdiğinde $-\text{SO}_3\text{H}$ bağlı kasyon değiştirici oluşturur (42).



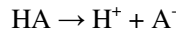
Şekil 2.8. Kasyon değiştirici reçine

b) Silika temelinde iyon değiştiriciler: Silika temelinde iyon değiştiren matriksler hidrofiliktir ve polimerik tabaka oluşması için kullanılan çapraz bağlayıcılar yüzünden düşük hidrofobik tutunma gösterirler. Küçük tanecik büyüklükleri ve sık dağılımları yüksek kaliteli bir ayırma sağlar. Gözenekli yüzeylerinden dolayı, hareketli faza önemli bir temas yüzeyi sağlarlar. Kimyasal ve mekanik olarak kararlı olan silika matriksleri, yüksek akış hızı gerektiren yüksek basına karşı iyi direnç gösterirler. 2.5-7 pH aralığındaki sulu tamponlar ve pek çok organik çözücüler, matrikste şişme veya büzülme olmaksızın kullanılabilirler. Bunlar mikro ve makro reçineler arasında orta bir yerde olarak düşünülür ve iyon değiştirme fazı ince polimerik ağa monomerik bağlanmış olabilir. Silika temelindeki reçinenin avantajı, polistiren temelindeki iyon değiştirici reçineden, mL kolon hacmi başına daha büyük değiştirme kapasitesine sahip olmasıdır. Bununla birlikte silika bazlı iyon değiştiricilerin birkaç sınırlaması vardır. Bunların bazik koşullar altında kullanımları sınırlıdır ve yüksek iyonik şiddet kolon ömrünü azaltır.

İyon değiştirici reçineler, polimere bağlanan asidik veya bazik fonksiyonel grupların kuvvetine göre de sınıflandırılırlar. Bu sınıflandırma kuvvetli bazik (kuvvetli anyon değiştirici), oldukça bazik, zayıf bazik, kuvvetli asidik (kuvvetli katyon değiştirici) ve zayıf asidik şeklindedir. Fonksiyonel grubun bazikliği veya asidikliği arttıkça ters yüklü örnek iyonlarını çekme gücü artar. Tablo 2.4’de çeşitli katyon ve anyon değiştirici reçineler görülmektedir.

İyon değiştirme kromatografisinde kullanılacak hareketli faz, diğer kromatografi türlerinde kullanılanlarla aynı genel özelliklere sahip olmalıdır. Yani kullanılacak hareketli faz, örnek maddesini çözmeli, uygun alıkonma sürelerini sağlamalı ve örnekte bulunan bileşenlerle seçimli olarak etkileşmelidir. İnorganik uygulamalar için kullanılacak hareketli fazlar genellikle sulu fazlar olmakla birlikte metanol gibi su ile karışabilen organik çözücüler de içerebilir.

Ayrılacak iyonların iyon değiştirici reçinelerdeki tutulmalarına etki eden en önemli faktör pH’ dır.



şeklinde gösterilen bir zayıf asit tepkimesi için anyon değiştirici kolondan geçen hareketli fazın pH’ı azaldıkça çözeltideki H^+ iyonu derişimi artar ve yukarıdaki tepkime sola kayar. Böylece kolondaki A^- iyonu sayısı, yani kolonda tutulan anyon miktarı azalır. Benzer şekilde bir zayıf bazın konjuge asidinin diğer bileşenlerden ayrılması için kullanılan katyon değiştirici kolonda pH azaldıkça katyonların bağıl sayısı ve buna bağlı olarak da tutunma miktarı artar. Bu nedenle hareketli fazın pH’ının kontrol edilmesi gerekir. Bu kontrol ile asidik veya bazik denge sabitleri birbirinden farklı olan iyonların birbirinden ayrılması ile mümkün olur.

Tablo 2.4. Çeşitli iyon değiştirici reçineler

Sınıflandırma	Fonksiyonel grup	Polimerik destek
Kuvvetli bazik (kuvvetli anyon değiştirici)	Tetra alkil-amonyum hidroksit -CH ₂ N(CH ₃) ₃ ⁺ Cl ⁻ -CH ₂ N(CH ₃) ₃ ⁺ OH ⁻ Tetra alkil-amonyum klorür	S-DVB S-DVB S-DVB S-DVB
Oldukça bazik	-N(CH ₃) ₂	S-DVB
Zayıf bazik	-NH ₂ -NH ₂	S-DVB S-DVB
Kuvvetli asidik (kuvvetli katyon değiştirici)	-SO ₃ H ⁺	S-DVB
Zayıf asidik	-SO ₃ Na ⁺ -COO ⁻ H ⁺ -COO ⁻ H ⁺	S-DVB S-DVB S-DVB

2.4.3. HPLC'de Kullanılan Ayırma Teknikleri

HPLC'de tek bir mobil faz kullanmak suretiyle yapılan ayırmaya isokratik elüsyon, analiz sırasında mobil fazın bileşiminde değişiklik yapılmasına gradient elüsyon adı verilir. Gradient elüsyonda mobil fazın elüsyon kuvvetinin, pH'ın, polaritenin ya da iyonik kuvvetlerin değiştirilmesi suretiyle çözünenin kolonda tutulma süresi yani analiz süresi kısaltılmış olur (43).

2.4.4. HPLC İle Kantitatif Analiz

Kantitatif analizde pik yükseklikleri veya pik alanlarından yararlanılır. Analit pikinin yüksekliği veya alanının bir veya birkaç standartın pik yüksekliği veya pik alanı ile karşılaştırılmasına dayanır. Kromatografide ayrılan türlerin kapladığı alan analitik parametre olarak kullanılır. Şartlar kontrol edildiğinde bu parametreler konsantrasyonla lineer olarak değişir. Pik yüksekliği kullanılarak yapılan analizlerde, kromatografik pikin yüksekliği; pikin her iki ucunu temel çizgi (base line) ile birleştiren doğrunun pikin tepe noktasına olan uzaklığının dik olarak ölçülmesiyle belirlenir. Pik yüksekliği pik genişliği ile ters orantılıdır. Kromatogramlardan doğru sonuç alınması, standartların ve örneklerin kromatogramlarının alınması sırasında kolon şartlarının pik genişliğinin değişmesine engel olacak şekilde kontrolüyle sağlanır. Bunlar, kolon sıcaklığı, akış hızı ve örnek enjeksiyon hızıdır. Pik alanları pik genişlemelerinden bağımsız olduğu için pik yüksekliğine göre daha uygun bir analitik parametredir. Diğer taraftan pik yüksekliği daha kolay ölçülür ve dar pikler için oldukça doğru analiz yapılabilir. Modern

kromatografik cihazlarda dijital elektronik integratörlerin kullanımıyla pik alanları çabuk ve doğru olarak hesaplanabilmektedir (21).

2.4.4.1. İç Standart Yöntemi

Yapı bakımından analizi yapılacak örneğe benzeyen, alıkonulma zamanı farklı olan ve miktarı bilinen bir standart, çözünenle birlikte sisteme enjekte edilir.

Bu yöntemde hem kalibrasyon eğrisi hazırlamak, hem de cevap faktörü elde etmek için iç standart dışında, analizi istenen madde ya da maddelerin de referans standartlarına ihtiyaç vardır (43).

$$F_r = \frac{(A_x) (W_{is})}{(A_{is}) (W_x)}$$

F_r : Cevap faktörü

A_x : Analizi yapılacak maddenin referans standartının pik alanı

A_{is} : İç standartın pik alanı

W_x : Analizi yapılacak maddenin referans standartının ağırlığı

W_{is} : İç standartın ağırlığı

W_s : Örneğin ağırlığı

Bilinmeyen maddenin % miktarı,

$$\% X = \frac{A_x \cdot F_r \cdot W_{is}}{A_{is} \cdot W_s} \cdot 100$$

2.4.4.2. Dış Standart Yöntemi

Ya miktar analizi yapılacak maddeye ait referans standardın belli bir miktarı sisteme enjekte edilerek bir kromatogram elde edilip bilinmeyen pik alanı ile kıyaslanır ya da referans standardın değişik konsantrasyonlardaki bir seri çözeltisi hazırlanır, her biri aynı hacimde sisteme enjekte edilir; pik alanlarını kullanmak suretiyle kalibrasyon grafiği çizilir (43).

2.4.4.3. Standart Katkı Yöntemi

Bir ya da iki maddenin analizi için uygulanan bu yöntemde önce örnek optimum şartlarda sisteme enjekte edilir, sonra analizi istenen maddenin referans

standardının belli bir miktarı ilave edilip enjeksiyon yapılır ve pik alanı farkından miktar analizine geçilir (43).

2.4.5. Detektörler

Son yıllardaki metal komplekslerinin analiz ortamında, zıt faz (RP) HPLC normal faz (NP) HPLC den daha yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Çeşitli RP-HPLC ve iyon çifti (IP) HPLC arasında RP-HPLC hızlı ve kazançlı olması bakımından çok popülerdir. İyon değiştirme HPLC ve jel geçirgen gibi diğer ayırma modülleri de ayrıca uygulanmaktadır.

HPLC de çok çeşitli detektörler kullanılmaktadır. Genel detektörler, hareketli faz ve örnek çözeltisinin özelliklerindeki değişimi ölçer. Seçici detektörler ise yalnız örnek çözeltisi için duyarlık ve seçicilik gösterir. Genel olarak elemental detektörler (AAS, AES, ICP-MS, Mikrodalga plazma) Optik detektörler (UV, UV/visible, IR/raman, optik aktif, refraktometrik) luminesent detektörler (flouresans-fosforesans, kimilumineasan-bioluminesence) elektrokimyasal detektörler (potansiyometrik, modifiye elektrotlar, array elektrotlar, kondüktivite, indirekt elektro kimyasal deteksiyon sistemleri) kütle spektrometri detektörleri (FTICR-MS (Forier Transform İon Cylotron Resonance Mass spektrometri) elektrosprey-termosprey, atmosferik basınçta iyonlaştırma) ve diğer detektör sistemleri(gas kromatografi detektörleri, NMR, radyoaktif dedektörler, immunokimyasal temelli detektörler ve viskozimetri) (45).

Genellikle yaygın olarak UV spektrofotometrik detektörler (UV visible ve fotodiyot array detektör (PDA)) kullanılmasına karşın metal kompleksleri için fluoeresans detektörler de kullanılır (46). UV detektörü, kolondan ayrılarak detektöre ulaşan bileşenlerin ultraviyole bölgede yaptığı absorpsiyon ölçümüne dayanır. Tek bir dalga boyunda çalışan detektörler kullanılabildiği gibi bir monokromatör ile çeşitli dalga boylarını seçerek çalışan detektörler de vardır. Tek dalga boyunda çalışan detektörlerde ışık kaynağı olarak genellikle 254 nm'de ışımaya yapan Hg lambası, çeşitli dalga boylarını ölçebilen detektörlerde ise döteryum lambası kullanılır. Spektrofotometrik ölçüm temeli ile çalışan bir başka detektör türü ise fotodiyot dizisidir. Ölçümlerin çok hızlı bir biçimde yapılmasının gerektiği analizlerde genellikle bu detektör kullanılır. UV detektörün karakteristikleri şunlardır:

- Örneklerin UV- görünür bölgede absorpsiyon yapması gerekir.
- Hareketli faz akış hızı ve sıcaklık değişimlerinden etkilenmez.
- Band genişletme etkisi küçüktür.
- Çok güvenilirdir, operasyonu kolaydır.
- Örnek çözeltiyi bozmaz.

UV ve refraktif indeksli gibi üniversal detektörler belirli metal türlerinin bulunduğu bir çok karışımların analizine imkan verir.

Floresans özellikleri taşıyan bileşiklerin analizinde ise spektrofotometrik detektörlere oranla duyarlılığı daha fazla olan floresans detektörlerin kullanılması mümkündür. Bu detektör ile 10^{-11} g/mL gibi çok düşük gözlenebilme sınırlarına inilebilmektedir. Luminesans özelliğine sahip olan ilaçların ve aminoasitlerin analizi yapılabilir ya da bazı biyokimyasal bileşikler floresans bir madde ile tepkimeye sokulup, yeni bir floresans ürün veya etiketlendirilmiş ürün oluşturulur. Örneğin; aminoasit ve proteinlerin bulunduğu bir karışım, 5-Dimetil aminonaftalin sulfonik asit klorürü ile dansil bileşiklere çevrilir ki bunlar keskin bir floresans gösterirler. Bu yolla bu bileşiklerin 10^{-16} M'a kadar analizi yapılabilir (47). 10^{-11} - 10^{-12} g/mL değerinde gözlenebilme sınırına ulaşılan elektro kimyasal detektörler, elektroliz sonucu akım ölçülmesi ilkesine göre çalışır. Burada ölçülen akım, örnek maddesinin elektrolizi sonucu olduğundan kullanılan çözücünün elektrik akımı vermemesi gerekir. Elektro kimyasal redoks tepkimelerine cevap veren ve polarografi ilkesine dayanan HPLC detektörü de yaygın olarak kullanılır (48). HPLC de detektör olarak alevli AAS, grafit fırınlı AAS de kullanılır. Yalnız GF-AAS F-AAS ye göre çok daha duyarlıdır. Bu detektörlerde arabirimler çok basit şekilde bağlanırlar (49).

UV gibi non-element spesifik detektörlü sıvı kromatografisi için daha düşük dedeksiyon limitine sahip ICP-MS metal miktarlarının analizinde büyük avantaj getirmiştir. Spesifik metal detektörleri belirli metallerin türlendirilmesi avantajına sahiptir.

ICP-AES detektörleriyle 1 ng/ml seviyesinde dedeksiyon limitine sahiptir. Fakat düşük çözücü miktarıyla uyum sıkıntısı vardır. Yüksek metanol ya da asetonitril (%10 dan fazla) içeriği kolaylıkla tolere edilemez. ICP-AES nin avantajı metallerle birlikte sülfürlerinde takip edilebilmesidir. ICP-AES plazma enstrümanları son zamanlarda geçiş metallerin analizinde düşük dedeksiyon limitlerinden dolayı ticari önem kazanmıştır. Polikromatör ekipmanların avantajı ile çok sayıda element analizi kabiliyetine sahiptir (50).

ICP-MS çok sayıda elementin karakterizasyonu için çok popülerdir. Düşük dedeksiyon limiti ve tek deneyde bir çok eser elementi aynı anda analiz edebilen eşsiz bir analitik metottur. Yalnız yüksek bakım maliyeti ve enstrümanlarının pahalı olması nedeniyle rutin analizlerin yapılmasında dezavantajlıdır (50).

İletkenlik detektörleri kolondan çıkan iyonik haldeki bileşenlerin ölçümünde kullanılır. Bu detektör organik sistemler için pek uygulanabilir değildir. Daha çok sulu sistemlere uygundur.

Tüm bileşenleri ölçebilen, yani seçimli olmayan kırılma indisi detektörü ile yapılan ölçümlerde, kırılma indisi sıcaklıkla değiştiğinden, çok iyi bir sıcaklık kontrolü yapılmalıdır. Çok yönlülüğü mükemmeldir, fakat duyarlılığı vasat olduğundan eser analizler için ideal değildir.

2.4.5.1. Farklı Detektörlerin Kullanıldığı Çalışmalar

Sutheimer ve Cabaniss (46) alüminyumun florid, sitrat, asetat ve silikat komplekslerini ve kompleks içermeyen alüminyum elüsyonunu katyon değiştirici HPLC ile ayırmışlardır. Kolon öncesi lumogallion reaktifi kullanılarak, Al-lumagallion kompleksleri flüoresans detektörle miktar analizi yapılmıştır. Wu ve arkadaşları (51) bir IP-RP-HPLC fluorimetrik dedeksiyonu ile bir ligand olan lumogallioni kullanarak serumda alüminyum analizini başarıyla uygulamışlardır. Daha sonraki bir çalışmada Al-lumagallion kompleksinin fluoresans ölçümleriyle idrar ve serumdaki alüminyum miktarı basit ve duyarlı HPLC metodu ile belirlenmiştir (52). Schuster ve Sando (53) N-Dansyl-N'-ethiltioure'li ağır metal iyonlarının şelatlarının analizi için fluorometrik detektörlü RP-HPLC metodunu kullanmışlardır. Ayrıca bazı metal kompleksleri kadar ligandında bozulma zamanını ilk fluoresans ölçümleriyle göstermişlerdir. Fulvik, kafeik, vanilik ve salisilik bakır kompleksleri Uv-visible PDA ve fluoresans detektörlü RP-HPLC tarafından zenginleştirilerek direkt kompleks esaslı metodu araştırılmıştır (54). Serbest Gd^{+3} iyonun $Gd(EDTA)^-$, $Gd(DTPA)^{-2}$ ve $Gd(DOTA)^-$ iyonik şelatları için fluoresans detektörlü bir RP-HPLC metodu geliştirilmiştir. Bu metotta serbest Gd^{+3} siklohegzan diamin tetra asetik asit (CDTA) ile kompleksleştirilmiştir (55).

Spektrofotometrik detektörlere karşı daha popüler olan elektro kimyasal, amperometrik ve diğer detektörler metal komplekslerinin analizi için uygulanmıştır. Weber, matriks karışımı ayrılmasında yardımcı olarak HPLC kullanılmasından sonra metal komplekslerini seçici olarak üç aşamalı pulsed amperometrik detektörünü ile belirlemişlerdir. Bu metodu meyve sularında Fe^{+3} laktad ve çeşitli otlardaki platinyum komplekslerini ekstrakte ederek uygulanmıştır. Fenol ya da sülfür gibi elektro aktif karışımlar içeren peptidlerde çeşitli parametreler optimize edilerek kesin sonuç veren seçici bazı metal komplekslerinin dedeksiyonu gerçekleştirilmiştir (56).

N-fenil benzohidrooksamik asit ile kompleks yapılarak vanadyum analizi için elektro kimyasal detektörlü duyarlı bir RP-HPLC metodu geliştirilmiştir. Bu metot iki nehir sularına ve homojene edilmiş midyelerdeki vanadyum analizi için uygulanmıştır (57). Polarizeli spektrofotometrik detektör (PPD) için siplit tipi jel hücre tasarlayarak için renkli aminoasit-bakır (II) komplekslerini genel polarimetrik detektörlü HPLC ile analiz etmeyi tartışmışlardır. Yeni çıkan bir çok detektör teknikleri ICP-AES, ICP-IDMS ve PB-MS HPLC ile birleştirilerek analitik araştırmalar da miktar analizi için kullanılmaktadır.

RP-HPLC ile eşleştirilmiş PB-MS detektör kullanılarak bazı dinükleer demir türevli bileşiklerin karakterizasyonu ve ayrılması sağlanmıştır (58). Bazı metal komplekslerinin HPLC’de uygulamaları Tablo 2.7’de gösterilmiştir.

Tablo 2.5. HPLC’de detektör tipleri ve kullanım alanları (62).

Kullanılan detektör tekniği	Kullanım (%)
Kütle spektrometresi (MS)	35,4
Tandem MS (MS-MS)	13,7
UV spektroskopisi	16,1
Floresans	11,8
Nükleer Mağnetik Rezonans (NMR)	5,6
Evaporative light scattering	3,7
Konduktiviti	2,5
ICP-MS, ICP-AES	5

Tablo 2.6. HPLC’nin uygulama alanları (62).

Alan	Kullanım (%)
İlaç endüstrisi	19.7
Protein çeşitleri	13.8
Biyolojik örnekler (kan, idrar, doku..)	12.1
Gıda ve içecek endüstrisi	10.1
Kiral karışımlar	7.6
Çevresel örnekler ve toksik maddeler	6.2
Aminoasit ve organik asit	6.0
Doğal ürünler	4.7
Organik kimyasallar	3.5
Diğer	3.5
Genom ve DNA	3.1
Polimerler	2.7
Pestisit ve herbisit	2.7
İnorganik iyonlar	1.6
Aminler ve biyojenik aminler	1.6
Vitaminler	1.2

ICP enstrümanlarının kullanıldığı detektör tiplerinde nebuluzer gaz akışında oksijen bulunduğunda (%10 v/v) sınırlı probleme yol açar. Çünkü oksijen çözücülerle

reaksiyona girerek CO₂ oluşturur. İlâveten bir çok nebulizar ekipmanları plazma girişinde önce ve nebulizardan sonra organik çözücü taşınımı için sprej odacığı içermelidir. Soğuma esnasında sprej odacığı 0 -5°C arasında plazma gücünü (1,7 KW) artırarak plazma kararlılığını sağlar. Boor ve Browner ICP enstrümanlarında organik çözücü etkilerini tartışmaktadır(59). Ek olarak, çözücü taşınımı için sprej odacıklar, membran desolvatörler organik çözücülerin %100 uzaklaştırma imkanına sahiptirler (60).

Larsen özellikle gradient çözücülerde sprej odacık ve nebulizer yanlışa sebep olduğunu belirtmektedir. Organik çözücü sprej odacık duvarlarında birikirse yüksek iyonizasyon elemetleri ile yüksek sinyâl şiddetini ortaya çıkacaktır. Mobil fazda tuz içeriğı %2'den fazla olduğunda ara yüzlerde tuz birikimine neden olduğu için duyarlılık azalabilir. Nitrik asidin kullanıldığı çalışmalarda kromatografik çalışmalarda tuz taşınımına yardımcı olur. İlâveten en küçük aralığa sahip (4,6 mm den daha az) kromatografik kolonların kullanımında organik çözücülerin miktarı ve ara yüzlerde tuz birikimlerinin plazma performansına etkisi azaltılmış olur (61).

Tablo 2.7. Bazı metal komplekslerinin HPLC de uygulamaları (9).

Kolon çeşidi	Metal Kompleksleri	Numune türü
IP-RP	4-2-(piridilazo) resorsinol ve 4-(2-thiazodilazo) resorsinol	Su örnekleri
RP	Trans-[RuCl ₄ (imidazol) ₂]	Nehir suları
RP	Cu(II), Co(III) ve Ni(II) dietilditiyokarbamik asid şelatları	Çok çeşitli alaşım örnekleri
RP	Metal-siyanür kompleksleri	Altın üretim çözeltisi
RP	[PtCl ₂ (dach)]	
RP	Nb-(4-(2-piridilazo)-rezorsinol) (PAR) şelatları	Kayaçlar
RP	[PtCl ₂]	Plazma
RP	Metal ditiyokarbamat kompleksleri	
RP	1,2-Diaminosikloheksanplatin(IV)	
RP	4-(5-nitro-2-piridilazo) rezorsinol (5-NO ₂ -PAR) Pd(II), Rh(II), Ru(III) ve Pt(II) kompleksleri	
RP	4-(2'-tiyazolilazo)rezasetofenon oksim Ru, Os ve Pd şelatları	Anod çamuru
RP	Dikloro(1,2-diariletilendiamin) platin(II)	
IP-RP	Rutenyum(II) diimin kompleksi 4,4' -bis(dimetilamino) tiyobenzofenon ile platin	Cisplatin veya karboplatinyum Analizleri
RP	Dietilditiyokarbamik asid ile kobalt ve nikel	Çok çeşitli alaşım örnekleri
RP	Metal α, (β, γ, δ-tetrakis (4-karboksifenil) porfin (TCPP)	Su örnekleri
RP	Titanyum, vanadyum, neobyum ve tantal'in hidrojen	

	peroksid ve 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol üçlü kompleksleri	
RP	Toprak ve sudaki ligandlarla metal kompleksleri Krom(III)-p-nikotinamid adenin-dinükleotid fosfat	Toprak ve su
RP	Manyetik mikrosfer-metotreksat konjuge türleri	İlaç
RP	Cd-Zn peptid kompleksleri	Yaprak ekstraktları
RP	α -hidroksi izobutirik asid(HTBA) ile Th ve U kompleksleri	Kayaçlar
RP	Platin kompleksleri(cisplatin, karboplatia, oksaliplatin, oksoplatin ve tetraplatin)	Tavşanların plazma ve idrarı
RP	2-asetilpiridin-4-fenil-3-tiyosemikarbazon (APPT) ile Cu(II), Co(III) ve Fe(III) kompleksleri	Farmasonik örnekler
RP	Çinko ve bakır pritiyon	Kozmetik preperatlar
IP-RP	4, 4'-bis(dimetilamino)tiyobenzofenon ile palladyum ve altın	Altın geri kazanım çözeltisi ve bakır eriyiğinin anod çamuru
RP	1,2-dimetil-3 -hidroksi-pirid-4-on demir kompleksleri	Serum ve İdrar
RP	Rodyum(III), iridyum(III) ve iridyum(II)'nin 1,4,5,8,9,12-hekzaazotrifenilen ile polimetallik kompleksleri	
RP	Pt-195m-radyoizotop cis-diammin (1,1 -siklobutandikarboksilato)platin(II) (karboplatin)	
RP	(Feofitin)civa(II) Kobalt kompleksleri	
RP	cis-diklorodiamminplatin(II), dietilditiyokarbamat ile platin ve nikel kompleksleri	Plazma
RP	4-(5-nitro-2-piridilazo) rezorsinol Nb(V), V(V), Co(III), Fe(III), Ni(II), Ru(III) ve Pd(II) şelatları	Yağmur ve atık su
	2-(6-metil-2-benzotiyazolilazo)-5-dietilaminofenol (MBTAE) ile platin metali ve olası diğer metal kompleksleri	
RP	V(V), Nb(V) ve Ta(V) ile 2-(5-nitro-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol	Mineral
RP	Bis(salisilaldehid)tetrametiletilen ile Co(II), Co(III), ve Fe(II) kompleksleri	Farmasotik örnekler
RP	Metal kompleksleri Platin kompleksi(cisplatin)	Tavşan böbreği ve karaciğeri
RP	Amonyum pirolidin ditiyokarbamat (PDC) ile Co(III), Ni(II), Cu(II) vePd(II)	Atıksu, kullanılır su, ve nehir suyu örnekleri
RP	Bi, Cd, Cu, in, Ni ve Pb ile Hekzametilenditiyokarbamat (HMDC)	Çok saf alimünyum
RP	2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(N-propü-N-sülfopropilamino) fenol (5-Br-PAPS) ile Cu(II), Ni(II) ve V(V)	Deniz suyu
IP-RP	Metal-EDTA türleri	Su örneklerinde, dağılmış Partiküller

		ve sediment içindeki pek çok tür
RP	Dietilentriaminpentaasetik asid bis-metilamid (DTPA-BMA) ile gadolinyum(III), sodyum, kalsiyum, çinko ve bakır kompleksleri	
RP	Sülfinat-S ligandı içeren Co(III) kompleksleri	
	2,2'-bipiridil-6-karbotiyoamid bakır(II) kompleksleri [BPYTA Cu(II)]	
	Phytocheiatins ile Hg(II) bağlanması	
	Dietilditiyokarbamat (DDTC)-Cu ⁺²	
	[Bis(asetato)amin-dikloro (sikloheksilamin)platin(IV)]	İnsan plazması
RP	Bis(asetilpivalilmetan)etilendiamin kobalt(II), demir(II) ve vanadyum(IV) kompleksleri	Ham petrol
IP-RP	[M(H ₂ PO ₄) ₃ Cu(II), Fe(II) ve U(VI) kompleksleri ve bunların nötral kompleksleri	Standart referans materyaller ve sentetik karışımlar
	Cr(III)-difenilkarbazon	Jeolojik örnekler
	Siderofor desferri-ferritiosin (DFFTH ₂) Al(III) kompleksi ve ve nordesferri-ferritiosin (NDDFFTH ₂) Cr(III) kompleksi	
	3 -difenilfosfinopropiyonilglisil-L-(S-benzil) sisteinil metil ester ligandı ile renyum(V) kompleksi	
RP	8-hidroksikinolin ile Mo(VI) ve Mn(II)	Deniz suyu
	AminopolifosfonatlarınCo(III)-poliamin kompleksleri	
RP	N,N'-etilenbis(salisilaldimin) ile Uranyum, demir, nikel ve bakır kompleksleri	Mineral filizi örnekleri ve fosfat kaya kalıntıları
IP-RP	Okside edilmiş klorofillerin Cu(II) kompleksleri	
RP	Aminoasit bakır kompleksleri	Valin fermentasyon ürünleri
RP	Demir(III) klorofilim	
RP	Peptid oksorenyum kompleksleri ve Tc-99m kompleksleri 2-(6-metil-2-benzotiyazolilazo)-5-dietilaminofenol Pt kompleksleri	
IP	3-hidroksimugineik asid, 2'-deoksimugineik asid ve mugineik asid demir kompleksleri	
IP-RP	Zr(IV) ve Mo(VI)'nın 4,5-dihidroksi benzen-1,3-disülfonik asit(Tiron) şelatları(IP rektifi: TBABr)	Ni esaslı alaşım
RP	Zr(IV) ve Hf(IV)'ün 5-Br-PADAP ve F ile üçlü kompleksleri	Amonyum Fe(II) sülfatta Zr ve Hf, hafniyum oksitte Zr analizi
RP	UO ₂ , Fe(II), Ni(II), Cu(II)'nin N,N'-etilenbis(salisilaldimin) kompleksleri	Mineral filizleri ve fosfat kayaları
IP-	Ru(III), Rh(III), Co(II) ve Cu(II)'nin PAN-6S şelatları	Bakır finnından

RP	(İP reaktifi: TBABr)	elde edilen anot çamuru
IP-RP	Pt(II), Ir(IV), Ru(III), Rh(III) ve Os(IV)'ün TADAP şelatları (IP reaktifi: TBABr)	
RP	Co(III), Ni(II) ve Fe(III)'ün TAM şelatları	Standart alaşımlar
RP	Co(III), Ni(II) ve Cu(II)'nin kinolilazo türevleri şelatları	Standart çelik örneği
RP	Fe(II) ve Cu(II)'nin 4,7-difenil-1,10-fenantrolin disülfonat şelatları	
RP	Cu(II); Fe(II), Ni(II), Co(III)' nin 2-(5-Nitro-2-piridilazo)-5-[N-propil-N-(3-sülfopropil) aminofenol (Nitro-PAPS) şelatları	Yağmur ve nehir suyu
IP-RP	Fe(II), Cu(II), Pb(II), Zn(II), Ni(II), Co(II), Cd(II)'nin tartarat kompleksleri 4-{2-piridilazo) rezorsinol (PAR) ile kolon sonrası renklendirme (IP olarak alkansulfonatlar)	Musluk ve yağmursuyu
IP-RP	Fe(II,III), Ni(II) ve Cu(II)'nin 4,7-difenil-1,10-fenantrolin (İP reaktifi: perklorik asit HClO ₄)	Musluk ve deniz suyunda Fe(II) ve Fe(III) analizi
RP	V(V), Nb(V) ve Ta(V)'in 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol (5-Br-PADAP) şelatları	Mineral
RP	V(V), Cu (II), Co(III), Pd (II), Fe (III) ve Ni(II)'nin 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol (5-Br-PADAP) şelatları	Mineral ve nehir su havzası (62)
IR	Ni(II), Co(II) ve Cu (II)' nin dietilditiyokarbamat (DDTC) kompleksleri	Cu alaşımında Ni ve Cu (63) analizi
IP-RP	V (V) ve Co (III)'ün 2-(5-Nitro-2-piridilazo)-5-[N-propil-N-(3-sülfopropil) amino]fenol (Nitro-PAPS) şelatları	Çelik, deniz suyu (64)
RP	Ru (III), Rh (III), Os (IV), Ir(IV), Pt (II), Co (U), Ni (II) ve Cu (II)' nin 2-(6-metil-2-benzotiyazolilazo) -5-dietilaminofenol(MBTAE) şelatları	Sentetik Örnek (65)
IIC-RP	Lantanitlerin α -hidroksi izobutirik asit (HEBA) kompleksleri ksilan oranj ile kolon sonrası renklendirme	
RP	Cd(II), Cu(II), Pb(II) ve Hg(II)'nin ditizon(Dz) kompleksleri	Saç (66)
RP-NP	Platinyum grubu metallerinin 8-hidroksi quinoline kompleksleri	Standart Çözeltiler (67)
RP	Al(III), Fe(III) Trisodyum 2-(2-hidroksi-3-karboksi-5-sülfonilazo)-1,8-dihidroksi-naphtalen-3,6-disülfonik asit) CALKS ve Cu(II), Ni(II) ve V(V) PAR Kompleksleri	Un ve Piring Örnekleri (68)
RP	Niobium(V) ve Tantalum PAR Kompleksleri	Jeolojik Örnekler (69)
RP	Fe(II) ve Fe(III) 2-(8-quinolaz)-4,5-difenilimidazol	Çevresel su

	(QAI) Kompleksleri	örnekleri (70)
IP-RP	Vanadyum PAR-H ₂ O ₂ ternary Kompleksleri	Kimyasal Gübreler (71)
RP	Cu,Pb,Co,Cd ve Mn iyonlarının kolon sonrası PAR Kompleksleri	İnsan Saçında (72)
IP-RP	Co(II), Ni(II), Cd(II) ve Mn(II) iyonlarının kolon sonrası PAR Kompleksleri	Nehir sularında (73)

2.5. Eser Element Analizlerinde Yararlanılan Yöntemler ve Karşılaştırması

Örneklerdeki derişimleri ppm (mg/L) veya daha düşük olan elementler eser elementler olarak bilinir. Çoğu kirleticinin çevresel konsantrasyonu bu düzeylerde dir. Bu miktarların belirlenmesinde yararlanılan çok değişik yöntemler mevcuttur.

Rutin analizlerin çoğu, örneğin kimyasal doğasına bakılmaksızın toplam metal içeriğinin bulunmasını gerektirir. Atomik spektrometrik yöntemleri metalin kimyasal türünden büyük oranda bağımsızdır. Diğer tekniklerin de çoğu sadece serbest metal iyonlarının kantitatif analizine olanak sağlar.

Metal analizleri için türlendirme analizleri bir seri halinde dikkatli planlama adımları gerektirir. Birincisi örneğin elde edilmesi ve örnek hazırlanması uygun olmalıdır. Doğru örnek analizi ve örnek hazırlama yöntemleriyle türlendirme analizleri, çevresel veya temel insan sağlığı açısından verilen kararlar için güvenilir bilgiler sağlayacaktır. Oksidasyon, şelat oluşturma ya da organometalik durum gibi beklenmeyen metal yük değişimi ortaya çıktığında açıklanan sonuç değişecek ve orjinal türe ait beklenen miktar elde edilemez. Böylece deneyin amacı boşa çıkmış olur. Aksine yüksek güvenilir bilgiler örnek hazırlama prosesleri ve örnekteki potansiyel kimyasal değişimlerin dikkatli şekilde göz önüne tutulmasıyla açıklanabilir. Örneğin türlendirme analizleri için örnek hazırlamada uygun olmayan güçlü oksidasyon özelliğine sahip maddelerin kullanımı nedeniyle sıklıkla metal analizleri toplam metal analizleri şekilde yapılır. Tercihen matriks içeren örnekten metallerin taşınımı uygun ekstraksiyon şartlarıyla mümkün olmaktadır. Örnek hazırlamada tutma, ekstraksiyon, destilasyon, leaching, stabilisation, süper kritik akışkan ekstarksiyon ve mikro dalga destekli ekstraksiyon yöntemleri uygulanır (74). Mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde atmosferik basınç şartları üzerinde ve yüksek sıcaklık şatlarından dolayı ekstraksiyon süresi kısalmaktadır (75).

Katı faz mikro ekstraksiyonu ve solvent ekstraksiyonu son yıllarda rapor edilmiştir. Biyolojik akışkanlarda, hayvan ve bitki dokularında, petrol örneklerinde çeşitli mild ekstraksiyon uygulamaları yapılmaktadır (74).

Sıvı kromatografisi metal veya element türlendirilmesi için uygun olarak kullanılmaktadır (76).

Elektrotermal AAS, ICP-OES ve ICP-MS gibi daha modern teknikler yeterince duyarlı ve birçok örnek için ayrıntılı bir ön işlem gerektirmeyecek şekilde girişimlerden etkilenmeyen yöntemlerdir. Diğer analitik tekniklerin çoğu eser miktarların analizinde bir ekstraksiyon/ derişiklendirme adımı gerektirir. Böyle bir adım ayrıca analitten daha yüksek konsantrasyonda bulunabilen, bozucu etki gösteren iyonların ortamdan uzaklaştırılması için de yardımcı olabilir. Yaygın olarak kullanılan yöntemlerin çoğu bir iyon ile nötral kompleks oluşturulması ve bunun bir organik çözücüye ekstraksiyonu şeklindedir (tek başına metal tuzları veya iyonik kompleksler ekstraksiyon gerektirmezler). Böyle bir işlemle bir aşamada konsantrasyonu 20-30 kat arttırmak olasıdır.

Diğer ekstraksiyon/derişiklendirme yöntemleri, şelat oluşturucu veya iyon-değişirici kolonların kullanıldığı yöntemlerdir. Metal iyonları önce kolon dolgu materyali ile kompleks oluşumu ya da iyon değişimi yoluyla kolonda tutulur daha sonra da genellikle sulu bir tampon çözelti kullanılarak derişiklenmiş bir ekstrakt halinde elue edilir.

Katı faz ekstraksiyon yöntemleri, bu tekniklere alternatif olarak, son zamanlarda geliştirilmiştir. Ekstraksiyon için yine nötral komplekslerin oluşturulması (tiyokarbamat kompleksleri, resorsinol kompleksleri gibi) gereklidir.

Atomik absorpsiyon spektrometresinin avantajları; hızlı bir teknik olması, rutin kullanımlar için basit bir yöntem olması, bütün metaller için standart reçetelerin olması, analizlerin bozucu etkilerden büyük ölçüde bağımsız olması ve kolaylıkla giderilebilmesi, sulu çevresel örneklerin bir ön hazırlık gerekmeksizin analiz edilebilmesi ve yüksek duyarlılığa sahip bir yöntem olması şeklinde özetlenebilir. Grafit fırınlı AAS ile daha düşük derişimlerin ($\mu\text{g/L}$) belirlenebilmesi, bir çözücü ekstraksiyon adımı gerektirmemesi nedeniyle analiz zamanının kısılması, çok az örnekle çalışılabilmesi gibi avantajları nedeniyle daha iyi sonuçlar alınması mümkündür.

Atomik absorpsiyon spektrometresi, çeşitli elementlerin, değişik derişimlerde yer aldığı örneklerin analizinde, bir defada ancak bir elementin analizine olanak sağlaması ve dolayısı ile çok sayıda elementin analizinin uzun zaman alması, bazı elementlerin (Sn, As, Sb, Hg) özel teknikler gerektirmesi gibi dezavantajlara sahip olduğundan bu tip durumlarda ICP tekniklerinden yararlanılır. ICP-OES ve ICP-MS tekniklerinin her ikisinde de örnek, plazma alevinde 6000-10 000 °K'de atomize edilir ve uyarılır. Önce ICP-OES ile emisyon spektrumu görüntülenir. Dalga boylarının belirlenmesiyle aynı anda 60 veya daha fazla element analiz edilebilir. ICP yönteminin dezavantajı yüksek bakım maliyeti ve cihaz enstrümanlarının pahalı olması nedeniyle rutin analizlerin yapılamamasıdır (50).

ICP-AES 1ng/ml seviyesinde çok düşük dedeksiyon limitine sahiptir. Fakat yüksek metanol ya da asetonitril (>%10) içeriği kolaylıkla tolere edilemez. ICP-AES nin avantajı metallerle birlikte sülfürlerinde takip edilebilmesidir. (50).

Atomik spektrofotometrik tekniklerin yaygın olarak kullanılmaya başlamasından önce metal iyonlarının analizinde görünür bölge teknikleri kullanılıyordu. Bütün metal iyonları için standart yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde renkli kompleksler oluşturan ayıraçlardan yararlanılmaktadır. Analizlerde seçimlilik üç şekilde gerçekleşmektedir

1-Çözücü ekstraksiyonu sırasında pH kontrolü ve maskeleyici maddelerin kullanımı.

2-Ekstraksiyon gerektirmeden seçimlilik ve duyarlılığı sağlayan kompleks oluşturma ayıraçlarının kullanımı.

3-Komplekslerin türev spektrumlarından yararlanma (77). Bu yöntemler atomik spektrofotometrik yöntemlerle karşılaştırıldığında AAS ile daha hızlı sonuç alınır. Doğal örneklerin analizi bir ön hazırlık gerektirir ve diğer metal iyonlarının varlığı bozucu etki gösterir.

Eser element analizlerinde yararlanılan diğer bir teknik de anodik sıyırma voltametresidir. Analizin elektro kimyasal olarak gerçekleştiği böyle bir sistem, çalışma elektrodu, referans elektrot ve zıt elektrot içeren bir elektrolitik hücreden oluşur. AAS ile karşılaştırıldığında bu yöntemin tek dezavantajı yavaş olmasıdır.

Eser element analiz tekniklerinden biri olan sıvı kromatografisi çok sayıda metalin aynı anda analizine olanak sağlaması açısından avantajlıdır. AAS ile yapılan analizlerde kompleks örnekler genellikle bir ekstraksiyon adımı gerektirir ve her bir element için farklı lamba kullanılması gerekir. Likit kromatografik analizlerde doğru kolon ve mobil faz seçimi ile bu işlem daha kısa sürede gerçekleştirilebilir. Her bir element için lamba değiştirmenin gerekmesi, kompleks karışımların analizinde, likit kromatografisinin AAS'ye göre daha hızlı bir teknik olduğu anlamına gelir Metal iyonları çevresel örneklerde çok farklı kimyasal formlarda bulunabilir. Bu türlerin analizinde AAS pek elverişli değil iken iyon kromatografisi ile bunların ayrılması ve kantitatif analizleri gerçekleştirilebilir (78).

2.6. Alıkonma Üzerine Etki Eden Faktörler

Alıkonma ve seçilme çözümleri HPLC de ayrılmalar için temel kontrol faktörleridir. Durgun faz ve çözücü karışımı gibi parametreler çözeltilerdeki maddelerin ayrılması ve alıkonmasını etkileyebilir. Son birkaç yıldır metal komplekslerinin alıkonması ve ayrılması üzerine etki eden faktörler tartışılmıştır. Tan ve arkadaşları (79) $M=Cr, Mo \text{ ve } W, P(CH_2)_n, (n=2-6) P=$ difenil fosfinil köprüsü içeren $(OC)_5M\{P(CH_2)_n\}_2M(CO)_5$ formundaki 6-dimetal dekarbonil komplekslerini içeren bir seri gruplu NP-HPLC yi ve bu homo metalik komplekslerinin alıkonması hakkında çeşitli faktörleri ifade etmiş ve tartışmışlardır. Kumar ve arkadaşları RP C₁₈ kolonlu HPLC

kullanarak bazı Gd(III) ve makrolitik poliamino karboksilat komplekslerinin liner kapasite faktörünü (k') ve ayrılma katsayısını ($\log P$) analiz etmişlerdir. Ayrılma katsayısı ($\log P$) n-butanol-su ve n-oktanol-su da ölçülmüş, kapasite faktörü %4 asetonitril içeren tamponlanmış su mobil fazında 28 bulunmuştur (80).

Careri ve arkadaşları HPLC-MS ile üst kısımdan köprülü binükleer demir karışımları hakkında bir çalışma yapmışlardır (58). Ligandlara kuvvetlice bağlanmış sübstüte grupların kromatografik şartlara etkilerini bulmuşlardır. Son bir çalışmada 5-sulfoquindine-8-ol (HQS) ligandını içeren birkaç metal kompleksleri IP-RP-HPLC kullanılarak araştırılmıştır. Alüminyum kompleksinin alıkonmasına kolon sıcaklığının, eluentteki anyonların HQS ligandının konsantrasyonun eluent pH'ının etkileri tartışılmıştır (81).

Platunyum metal komplekslerinin alıkonması hakkında yapılan bir çalışmada (82) mobil fazdaki metanol konsantrasyonunun, kolon sıcaklığının, toplam akış hızı ve yabancı iyonların etkileri araştırılmıştır. Kolon sıcaklığının ve mobil fazdaki metanol konsantrasyonunu kapasite faktörüne karşılıklı olarak etki ettiği bulunmuştur.

Nesterenko ve arkadaşları (83) RP-HPLC kromatografisi çalışmasıyla aside karşı duyarlı etilendi amin ve (N_2O) shift bazlı katyonik alkil kobalt (III) şelatlarının optimal şartları araştırılarak organometalik kobalt komplekslerinin miktar tayinlerini gerçekleştirmişlerdir.

2.7. Resorsinol Kompleksleri ve HPLC İle Metal Tayinlerinde Yapılan Çalışmalar

Analitik kimya da eser elementlerin tayininde kullanılan ve literatürde yer alan bazı önemli rezorsinol türevleri, 2,4-Dinitro rezorsinol, 4-(1'H-l',2',4'-triazol-3'-ilazo)-2-metil rezorsinol, 4-(4-metil—2-tiazolilazo) rezorsinol, 4-(2-Quinazolo) rezorsinol, 4-(4-nitro-2-thiazolilazo)-2-metil-rezorsinol, 4-(4-nitro-2-thiazolilazo) rezorsinol, 4-(5-metil-3'-izoksaloazolilazo) rezorsinol ve 4-(2-piridilazo) rezorsinoldur.

Bazı çelik örneklerindeki vanadyum ve kobalt 4-(1'H-l',2',4'-triazol-3'-ilazo)-2-metil rezorsinol (TrAMR) ile pH= 8.1'de kompleksleştirilerek stokiometrik olarak tayin edilmiştir. Bu yöntemle kobalt için tayin sınırının 1.20×10^{-1} - 1.18 mg L^{-1} olduğu belirlenmiştir (84).

Yağmur ve atık sulardaki demir, kobalt, vanadyum, nikel ve palladyum 4-(5-nitro-2-piridilazo) rezorsinol ile kompleksleştirip spektrofotometrik olarak tayin edilmiş ve tayin sınırı 2.0 mg L^{-1} olarak belirlenmiştir (85).

2,4-Dinitro rezorsinol (DNR) ligandı ile uranyum ve demirin spektrofotometrik olarak tayin edildiği ve sulu ortamdaki 2×10^{-3} - $4 \times 10^{-2} \text{ } \mu\text{g/mL}$ düzeyinde bulunan uranyum'un kantitatif tayini yapılabilmektedir (86). 2,4-Dinitro rezorsinol (DNR) ile Co, Fe, Ni ve Cu'nun tayin edilmesi için yapılan bir çalışmada DNR ile bu metallerin

komplekslerinin stokiyometrilere, sulu ortamdaki çalışma şartları ve komplekslerin kararlılık sabitleri tayin edilmiştir. 2,4-Dinitro rezorsinol (DNR) ligandı ile sulu ortamda Co^{+2} -DNR kompleksinin maksimum adsorbsiyon yaptığı dalga boyu 397 nm olarak gözlenmiştir. Co-DNR kompleksinin stokiyometrisini belirlemek için mol oranı ve Job yöntemi uygulanmıştır. Her iki yöntem ile kompleksin stokiyometrisi Co^{+2} -DNR (1:6) olarak bulunmuştur. pH'nın 7 olduğu ortamda ($\text{H}_2\text{PO}_4/\text{HPO}_4^{-2}$ tamponunda) kompleksin oluşum sabiti 3.403×10^{38} , lineer çalışma aralığının 1.0×10^{-2} - 3.0 mg L^{-1} , molar soğurma katsayısının $3.635 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ve tayin sınırının ise $1.0 \times 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ Co^{+2} olduğu bulunmuştur. Ni^{+2} , Cu^{+2} ve Fe^{+3} 'ün DNR ile kompleksleri incelenmiş, Ni-DNR, Cu-DNR ve Fe-DNR komplekslerinin stokiyometrilere, molar soğurma katsayıları ve kompleks oluşum sabitleri bulunmuş, bu komplekslerin stokiyometrilere mol oranı ve Job yöntemi ile tayin edilmiş; Ni-DNR (1:3), Cu-DNR (1:3) ve Fe-DNR (1:1) olarak belirlenmiştir. Kompleks oluşum sabitleri sırasıyla 1.035×10^{16} , 1.389×10^{15} ve 3.875×10^5 olarak bulunmuştur (87).

Yine aynı reaktif ile yapılan bir başka çalışmada Fe(III), Fe(II), kobalt(II), kobalt(III) ve Nikel(II)'nin 1:1, 1:2, 1:3 kompleksleri katı halde elde edilmiş, süzülüp ayrıldıktan sonra magnetik süsseptibilite, IR, elementel tayin, UV-görünür bölge spektroskopisi ile yapıları aydınlatılmıştır. IR çalışmaları metallerin bir hidroksil ve bir nitrozo grubundaki oksijenlerle koordinasyon yaptığını, ikinci nitrozo ve hidroksil gruplarının koordinasyona katılmadığını göstermiştir. Fe(II) ve Nikel(II) komplekslerinin magnetik momentleri, yapılarının tetrahedral veya bozulmuş oktahedral yapıda olduğunu gösterirken, Fe(II), Co(II), Co(III) komplekslerinin ise oktahedral yapıda olduğunu göstermektedir. Elektronik spektrumları ise bütün komplekslerin oktahedral yapıda olduğu sonucunu ortaya çıkarmaktadır (88, 89).

4-(2-piridilazo) rezorsinol, (PAR) bir çok metalin tayininde kullanılan önemli bir rezorsinol türevidir. Kalay minerali olan kasiteritten kalayın zenginleştirilmesi sonucu artık maddedeki uranyum PAR kullanılarak flow-injection yöntemi ile tayin edilmiştir. Bu metotta U^{+6} , 4-(2-piridilazo) rezorsinol ile kompleksleştirildikten sonra amin tamponu ile sağlanan pH-8'de 530 nm'de, oluşan renkli çözeltinin absorpsiyonu ölçülmektedir. Bu şartlarda bir çok metal iyonu PAR ile kompleks oluşturduğu için U^{+6} 'nın doğru tayin edilebilmesi amacıyla maskeleyici reaktif olarak CDTA (trans-1,2-diaminosikloheksan-N,N,N',N'-tetraasetik asit monohidrat) kullanılmıştır. HF- HNO_3 ile çözünür hale getirilen kalay minerallerindeki U^{+6} tayin edilebilmektedir. Tayin sınırı 0,28 mg U/L'dir (90).

Kasyonik ve iyonik olmayan karışık yüzey aktif maddelerin olduğu zayıf asidik bir ortamda Osmiyum(VIII) da PAR ile tayin edilebilmektedir. Böyle bir ortamda PAR ile Osmiyum(VIII) arasındaki kompleks oldukça karardır. Yüzey aktif madde olarak

N-hekzadesiltrimetil amonyum klorür (HTAC) ve Brij 58 (polioksietilen) laurileter'in kullanıldığı bir ortamda pH 6,0-7,2 aralığında Osmiyum(VIII)'ün PAR ile kompleksi oluşturulmuş ve oluşan komplekslerin absorbansı 540 nm'de ölçülmüştür. Elde edilen kalibrasyon grafiğinde 0-110 µg/10 mL aralığında tayinin lineer bölgede olduğu ve molar absorpsiyon katsayısının $\epsilon = 2,4 \cdot 10^4 \text{ L/mol.cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur (91).

Flow-injection yöntemi kullanılarak V(IV)'ün bulunduğu bir ortamda V(V)'in tayin edildiği bir çalışmada, V(V)'ün PAR ile renkli bir kompleks oluşturulmuş 550 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Ortamda bulunan V(IV)'ün bozucu etkisini gidermek amacı ile maskeleyici reaktif olarak 1,2-siklo hekzan daimin tetra asetik asit (CDTA) kullanılmıştır. V(V)'in 0,05-1,5 g/L aralığındaki miktarları tayin edilebilmiştir. Tayin üzerine ortamın pH'nın, reaksiyon süresinin ve CDTA konsantrasyonunun etkisi araştırılmıştır. Sulu çözeltide ortamın pH'ı PAR'ın farklı şekilde yapılanmasına neden olmaktadır (92).

4-(2-piridilazo) rezorsinolun kompleksleştirici özelliğinden faydalanılarak yapılan diğer bir çalışma da, ters akım sıvı kromatografisi kullanılarak, eser halde bulunan Zn^{+2} , Fe^{+2} , Ni^{+2} ve Co^{+2} iyonlarının ayrılması sağlanmıştır. Asidik veya tamponlanmış özellikteki hareketli faz kullanılmıştır. Ayırma işlemi üzerine hareketli fazın pH, PAR konsantrasyonunun ve sabit fazın etkisi incelenmiştir.

Bu çalışmada pH aralığı 2 ile 8 arasındadır. Ancak pH=2-4 arasında analitik seçicilik daha iyidir. Zn^{+2} , Fe^{+2} ve Co^{+2} için pH=2 ile 4 arasında yapılan çalışmada alıkonma süresinin etkisi incelendiğinde alıkonma süresinin bir ölçüsü olan kapasite faktörlerinin farklı iki grupta olduğu anlaşılmaktadır. Fe^{+2} ve Ni^{+2} için kapasite faktörü, hareketli fazın pH'ından bağımsız iken Co^{+2} ve Zn^{+2} için pH arttıkça artış göstermektedir. Söz konusu olan dört iyonun PAR ile verdiği kompleksler 1:2 şeklindedir. Yalnız Co^{+2} yükseltgenerek Co^{+3} kompleksine dönüşmektedir.

Hareketli fazdaki PAR konsantrasyonunun artması ile Zn^{+2} , Fe^{+2} ve Ni^{+2} için kapasite faktörünün artmasına neden olmaktadır (93).

Eser haldeki Fe^{+3} 'ün PAR ile oluşturduğu komplesten faydalanılarak polarografi ile tayinin gerçekleştirildiği çalışmada, asetik asit-sodyum asetat-EDTA tampon çözeltisi kullanılmış $1 \cdot 10^{-9}$ M ile $1 \cdot 10^{-7}$ M arasındaki Fe^{+3} damlayan cıva elektrodu ile tayin edilmiştir. Tanınma sınırı $2 \cdot 10^{-10}$ M olarak bulunmuştur (94).

Benzer bir çalışmada eser haldeki molibdenin PAR ile yaptığı kompleks diferansiyel puls polarografi metodu ile incelenmiş ve bu yolla molibdenin tayini gerçekleştirilmiştir. Tayin sonucu 0,22 µg/L olarak bulunurken, $1 \cdot 10^{-8}$ ile $1 \cdot 10^{-7}$ M arasındaki molibden tayin edilmiştir. Katyonların çoğunun molibdenin tayininde herhangi bir bozucu etkilerinin olmadığı gözlenmiştir (95).

NP-HPLC-PB-MS tekniği krom-karben kompleksleri gibi polar organometalik karışımların yapısı aydınlatılmıştır (96).

Jel geçirgen kolonlu bir HPLC sistemi ICP-MS ile eşleştirilerek doğal su sistemlerindeki numunelerden ağır metal komplekslerinin spesifik dağılımları belirtilmiştir. Kesin sonuçlar izotop seyreltikli kütle spektroskopisi (ID-MS) uygulamaları ile açıklanmıştır (97, 98).

Bir başka çalışmada Schoppenthau ve arkadaşları ICP-MS ve ICP-OES ile eşleştirilmiş sistemle iyon çifti oluşturma ve iyon değıştirme HPLC ile metal-EDTA ve metal-peptid komplekslerinin ayrılması sağlanmışır (99). HPLC-AES sistemi deniz ekosistemindeki eser miktardaki metaloorganik karışımların tayininde kullanılmışır (100). Cairns ve arkadaşları (101) RP-HPLC-ICP-MS ile çaydaki spesifik organometalik bileşiklerini tayin etmişlerdir. Suziki ve arkadaşları (102) ICP-MS li HPLC uygulamasıyla albumindeki bağlı Cu-tiomolibdatı tayin etmişlerdir. HPLC-ICP-MS' le ayrıca biyolojik ortamlardaki sulara cis-diklorodiamineplatunyum(II)' nin (cisplatin ya da CDDP) ayrılması sağlanmışır. HPLC koşullarında CDDP ile formik ya da fosforik asit içeren mobil fazın etkileşimi araştırılmışır (103). HPLC-ICP-MS in bir diğer uygulaması Suziki ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (104). Ratlardaki selenyum endojenin etkileri ve harici olarak sağlanan selenyumla biyolojik materyaller arasındaki dağılım profili araştırılmışır. Selenyum mono metil selenol ve trimetil selenyum iyonu ayrılıp tespit edilmiştir. Ebdon ve arkadaşları (105) tarafından farklı petrol katmanlarındaki nikel jeo porpirinlerin tayinlerini HPLC ile eşleştirilmiş UV ve ICP-MS detektörlerinin sonuçlarıyla karşılaştırmışlardır. Bu iki tekniğin sonuçlarının birbirini iyi kabul edilebilir derecede desteklediği açıklanmıştır.

Lion ve arkadaşları biyolojik ve çevre örneklerindeki Alüminyum, morin ile şelatlayarak (RP-HPLC) ile tayin etmişlerdir. Morinle Alüminyum ön kolon kompleks oluşturarak flüoresan detektörle direkt tayin gerçekleştirilmiştir. Morinle alüminyumun farklı iki kompleks yaptığı ifade edilmiştir (106).

Chung ve arkadaşları 4-(2-Thiazolilazo) resorsinol (TAR) ya da 5-metil-4-(2-thiazolilazo) resorsinol (5-M TAR) ligandlarıyla Co^{+2} iyonlarını (RP kapiler-HPLC) ile tayin etmişlerdir. Vgdok C₄ kolonu kullanılarak metanol-su mobil fazında tayini gerçekleştirmişlerdir. Mobil faz bileşiminde %30 metanol olduğu ve pH'ın 5,6 ya da 7 olduğu şartlar optimum şartlar olarak tespit edilmiştir. TAR kullanıldığında deteksiyon limitinin 11,8 ppb, 5-M TAR kullanıldığında 17,7 ppb bulunduğu bulunarak bu şartlarda mineral ve atık sulara Co^{+2} yi tayin edilmiştir (107). Okutani ve arkadaşları 2-(5-nitro-2-piridilazo)-5-[N-propil-N-(3-sulfatopropil) amino] fenol (Nitro-PAPS) ligandı ile Fe^{+3} , Ni^{+2} , Co^{+3} ve Cu^{+2} iyonlarını yağmur ve nehir sularında tayinlerini gerçekleştirmişlerdir. Optimum şartlar; mobil faz için THF-asetonitril- Su (15/10/75,

v/v), 10^{-2} M fosfat tamponu (pH=6) ve 2.10^{-7} M nitro-PAPS bulunması olarak tanımlamışlardır. UV detektöründe ODS kolonunda 570 nm'de tayinleri gerçekleştirmişlerdir. Deteksiyon limiti Cu^{+2} ve Fe^{+3} için 0,2 ng/cm³, Ni^{+2} için 0,04 ng/cm³, Co^{+3} için 0,01 ng/cm³ olarak bulunmuştur (108).

Szpunar HPLC-ICP-MS sistemi ile arsenik ve seleniyumu polipeptid ve polisakkarit ligandlarıyla komplekslerini bitki ve hayvan dokularında jel-geçirgen, iyon değişirme ve zıt-faz kolonlarıyla ayırarak tayinlerini gerçekleştirmişler (76).

Wang ve arkadaşları 2-(2-benzotiyolazo) 5-(3-sulfopropil) amino fenol (BTASPAP) ligandı ile Co^{+3} , Ni^{+2} , V^{+5} ve Fe^{+3} iyonlarını potasyum iodat ile kararlı yükseltgenme basamaklarına yükseltgeyerek negatif yüklü suda çözünen kararlı şelatları C₁₈ kolonunda asetronitril-Asetat-Su (36/1/63, v/v) mobil fazında (0,2 M Asetik asit-Asetat çözeltisi pH=3, 10^{-3} M TBABr) tayini gerçekleştirmişlerdir. Deteksiyon limiti 565 nm'de Co^{+3} , Ni^{+2} , V^{+5} ve Fe^{+3} için sırasıyla 0,3 , 0,8 , 0,3 ve 1 ng/ml olduğu bulunarak çelik standartlarına uygulanmıştır (109).

Moraes ve arkadaşları solvent ekstraksiyon prosesi ile hidrofobik iyonlarının varlığında α -hidroksibutirik asit mobil fazında C₁₈ RP kolonu ile nadir toprak elementlerini tayin etmişlerdir. Kolon sonrası kompleksleştirici olarak PAR kullanılmıştır. UV-Visible detektöründe ve 535 nm dalga boyunda tayinler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen değerler ICP-AES sonuçlarıyla karşılaştırılarak nadir toprak elementleri için yöntemin hassas ve duyarlılığının oldukça fazla olduğu belirtilmiştir (110).

Matsimuya ve arkadaşları sulfonilcalik (4) arenetetra sulfonat (SO_2CAS) ile Al^{+3} , Fe^{+3} ve Ti^{+4} şelatlarının tayinlerini RP-HPLC ile spektrofotometrik detektörleriyle gerçekleştirmişlerdir. Metal iyonlarının ile SO_2CAS asetat çözeltisinde (pH=4,7) şelatları elde edilmiş Silika tipi RP-18e kolonuyla ayırma sağlanmıştır. Mobil faz için optimum şartların metanol-su (50/ 50) n-BABr (7.10^{-3}M), asetat çözeltisi 5.10^{-3} M (pH=5,6) 10^{-4} M EDTA olduğu tespit edilmiştir. Optimize edilen şartlarda 21 çeşit metal iyonları arasında Al^{+3} , Fe^{+3} , Ti^{+4} iyonları seçici olarak tayin edilmiştir. Deteksiyon limiti Al^{+3} için 0,24 ng/ml, Fe^{+3} için 0,42 ng/ml ve Ti^{+4} için 0,8 ng/ml olarak bulunmuştur. Belirtilen iyonların tayini nehir ve içme sularında gerçekleştirilmiştir (111).

Vachirapatama ve arkadaşları V^{+5} 'in PAR ve hidrojen peroksit ternary komplekslerini iyon etkileşimli HPLC ile tayin etmişlerdir. Kolon olarak C₁₈ kolonu kullanılmıştır. Optimum mobil fazı metanol-su (32/68, v/v) 3.10^{-3} M TBABr, 5.10^{-3} M Asetik asit ve 5.10^{-3} M sitrat tamponu pH=7'e ayarlanarak, 540 nm'de Tayinler gerçekleştirilmiştir. Mol oranı yöntemi ile kompleksin stikometrisi $\text{V}^{+5}/\text{PAR}/\text{H}_2\text{O}_2$ (1/1/1) olarak bulunmuştur. Dedeksiyon limiti V^{+5} için 0,09 ng/ml olarak tespit

edilmiştir. Optimum şartlarda fosfat, nitrojen , fosforöz ve potasyum gübrelerindeki vanadyum tayini gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ICP–MS ile karşılaştırılarak kabul edilebilir değerler olduğu bulunmuştur (112).

Hu ve Yong Tetra–(4–Bromfenil)–Porpirinin (T₄BPP) kurşun ve cıva şelatlarını ön deriştirme kolonuyla zenginleştirilerek RP–18 (waters – xterra) genel amaçlı kolonda ayırmışlardır. Hg, Pb ve Cd’un T₄BPP şelatları zenginleştirme tamponunda %10 THF mobil fazında zenginleştirilerek 6 portlu valfli siwiç ile genel amaçlı kolonunda ayrılmıştır. Dedeksiyon limiti kurşun, kadmiyum ve cıva için sırayla 1, 0,5, 1 ng/lt olarak bulunmuştur. Belirtilen şartlarda, içme sularında tayinler gerçekleştirilmiştir (113).

Victor ve arkadaşları jel geçirgen kromatografisi ve AAS spektrofotometrisi ile salatalık dallarında geçiş metallerinin tayinlerini gerçekleştirmişlerdir. Bu sistemde HPLC ve GF–AAS birbirlerine bağlanarak kapalı sisteme dönüştürülmüş jel geçirgen (SEC) kolonu kullanılarak Fe, Cu, Mn ve Pb metallerinin ayrılmasına çalışılmıştır. Yalnız bu sistemle sap örneklerinde vanadyumun tayini yapılmamıştır (114).

Hongcheng ve arkadaşları mikro kolon kullanarak su ve gıdalarda HPLC ile yedi geçiş metalinin tayinini gerçekleştirmişlerdir. Kurşun, kadmiyum, cıva, nikel kobalt, gümüş ve kalay iyonları tetra–(4–aminofenil)–Porpirin (T₄–APP) ile renkli şelatları yapılarak C₁₈ kartüjlü zenginleştirme kolonuyla katı faz ekstraksiyonu yapmışlardır. Ekstrakte olunan şelatlar tetrahidrofuran (THF) ile elue edilerek mikro kolonlu HPLC ile ayrılmış ve foto diot dizisi detektör ile 350–600 nm arasında tayin yapmışlardır. Dedeksiyon limiti kurşun, kadmiyum, cıva, nikel, kobalt, gümüş ve kalay için sırasıyla 4, 3, 6, 5, 5, 6 ve 4 ng/L olarak standart örneklerde bulunmuştur (115).

Şenyuva ve arkadaşları kolon sonrası kompleksleştirme ile farmakolojik tabletlerde aynı anda Fe⁺² ve Fe⁺³, ü tayin etmişlerdir. HPLC sisteminde Ionpac C55A (4x250 mm) analitik katyon değiştirici kolonla piridin 2-6-dikarboksilik asit ile iyonlar ayrılarak kolon sonrasında PAR la kompleksleştirilerek elde edilen şelatlar UV detektörde 520 nm de tayin edilmiştir. Detektör limiti Fe⁺² için 0.1 mg/lt, Fe⁺³ için 0.2 mg/lt olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar F-AAS sonuçlarıyla karşılaştırılarak %99 uyumlu bulunmuştur (116).

2.8. Eser Elementlerin Canlı Organizmalardaki Rolü ve Hastalıklarla İlişkisi

Canlılar normal büyüme ve biyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmek için protein, karbonhidrat ve vitaminlere ilave olarak bazı elementlere de ihtiyaç duymaktadırlar. Canlı organizmalar için önemli rollere sahip olan ve miktarları mg/L ve µg/L ile ifade edilen elementlere eser element adı verilir. Bu elementlerden Fe, Zn, Co, Cu, Mo, Cr, Se, F, I, Br, Ni, Al gibi elementlere eser element, Ca, Mg, Na, K gibi

elementlere temel elementler denir. İnsan vücudunda 15 civarında hayati önem taşıyan eser element bulunmaktadır (117).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda eser elementlerin birçok hastalıkla ilişkisi olduğu da ortaya çıkarılmıştır. Örneğin; anemi hastalığında saç ve serumda çinko düzeyinin düştüğü, kadmiyumun kanserojen, nikelin bazı bileşiklerinin kanserojen olması ve kurşunun canlı organizmada birikerek çeşitli hastalıklara neden olduğu bilinmektedir (118).

Canlı organizmalarda önemli rolleri bulunan eser elementlerin tayin yöntemleri, farklı biyolojik ortamlardaki miktarlarının belirlenmesi, hastalıklarla ilişkilerinin ortaya çıkarılması günümüzde birçok araştırmaya konu olmuştur (119).

Son yıllarda bu metallerin bitki, hayvan ve insan üzerindeki olumlu ve olumsuz etkileri ve yaşamdaki spesifik rolleri yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Özellikle canlı yaşamı için eser seviyede gerekli olan elementler en fazla ilgi çekenlerden olmuştur. Pratikte bunlar, “eser metaller”, “eser organikler”, “ağır metaller”, “mikro elementler” ve “mikro besinler” şeklinde ve aynı şeyleri kastetmek üzere adlandırılmışlardır (120).

Bunların her birine mahsus olmak üzere belirli seviyedeki miktarları canlı bünyesinde bulunmaları gerekli iken belirli seviyeler aşıldığında ters etki yaparak toksik özellikler arz etmektedirler. Aynı şekilde bu elementlerin gereksinim seviyesi her canlı tipi için farklı olabilmektedir.

Esansiyel elementleri biyolojik rollerine göre sınıflandırmak mümkündür. Bunlardan sodyum ve potasyum vücut sıvılarında yüksek konsantrasyonlarında bulunur ve bünyede yaygın bir dağılım gösterirler. Bunlar “makro elementler” ve “mobil katyonlar” olarak adlandırılırlar. Bu elementler bir çok metabolik olayda yer aldıklarından başta beyin yoluyla sinir impuls iletimi işlevinde de rol oynarlar. Magnezyum ve kalsiyum da ikinci sıradaki mobil elementlerdir. Bunlar da fazla miktarda bulunurlar ve eser elementler içerisinde yer almazlar. Magnezyum, esas olarak hücre fonksiyonlarında rol oynar. Bu element nükleik asitlerle kompleks olarak bulunur ve sinir impuls iletimi, kasların kasılması ve metabolik işlemler için gereklidir. Bitkilerde de klorofilin yapısında bulunur.

Kalsiyum organizmada en fazla bulunan metalik element olup, iyonları magnezyum iyonlarından daha az mobildir. Kalsiyum iyonları oksijen içeren ligandlara karşı çok büyük bir ilgi gösterir. Bu durum da örneğin fosfat ve oksalat şeklinde çözünmeyen kalsiyum tuzlarının oluşmasıyla sonuçlanır. Kalsiyum tuzlarının çözünürlüğünün düşük oluşu, örneğin hidroksil apatit şeklinde $[Ca_5(PO_4)_3(OH)]$ kemik ve dişlerde birikmesini açıklar.

Diğer taraftan çinko dahil esansiyel geçiş metalleri, mobil olmayan protein moleküllerine kararlı koordinasyon bağları yaparlar. Bu metallerin esas fonksiyonları

enzimatik aktiviteyi teşvik edici veya artırıcı yönde katalitik etki yapmaktır. Bu durum bazı eser metalleri biyolojik fonksiyonları da açıklar. Esansiyel metallerin birbirinden iki ayrı fonksiyonu vardır.

1) Redoks reaksiyonları: Sadece tranzisyon metalleri kısmen dolu –d- orbitalleri içerdiğinden bunlar birbirinden bir birim farklı oksidasyon sayısına sahiptirler. Bu nedenle bunlar elektronun transfer edildiği işlemlerle yer alırlar. Örneğin Fe(II)/Fe(III), Cu(I)/Cu(II) ve Mo(V)/Mo(VI). Bu metaller proteinlere sıkıca birleştiklerinden, bunların redoks özellikleri koordine edilmiş ligandlar tarafından kontrol edilir.

2)Metalin direkt olarak reaksiyon mekanizmasını yönetecek şekilde iştirak etmesi: Bu özellikle kobalt ve çinkoyu kapsar (121).

2.8.1. Ağır Metallerin Suda Yaşayan Canlılara Etkileri

Canlı organizmalar için gerekli olan bazı eser elementler fazla miktarda alındığında vücutta birikerek toksik etki yaparlar. Toksik mekanizmaları aşağıdaki adımlarla gerçekleşir.

a) Protein molekülleri üzerindeki aktif merkezlerle ağır metallerin kararlı kompleksler oluşturması ve bu yolla gerçekleşen enzim inhibisyonu,

b) özellikle yüksek derişimlerde ağır metaller varlığında canlıların solunum yüzeylerinin hasar görmesi,

c) Ölümcül olmayan derişimlerde ağır metallerin daha uzun dönemde canlıların iç organlarına zarar vermesi.

Ağır metallerin canlı organizmalara geçişi gıdalarla, solunumla, sularla ve direkt temasla olmaktadır.

Çeşitli endüstriyel faaliyetlerden kaynaklanan atık suların içinde bazen eser miktarlarda bazen de yüksek konsantrasyonlarda ağır metaller bulunur. Ağır metaller boşaltım ortamlarındaki canlı yaşam üzerinde, konsantrasyonları ile orantılı olarak toksik etki yaparlar. Özellikle kadmiyum, cıva, kurşun ve krom gibi ağır metaller, besin zincirleriyle girdikleri canlı bünyelerinden atılamadıkları için canlılarda fizyolojik olarak birikime neden olurlar ve bünyede belirli sınır konsantrasyonların aşılması halinde toksik etki yaparlar. Bu birikim sonucunda sularda yaşayan balıklar ve diğer canlılar ölebilirler. Hatta bu tür su ürünleriyle beslenen insanların yaşamı bile tehlikeye girebilir. Örneğin, vücuttaki cıva birikimi 25 miligramı bulduğu zaman nörolojik bozukluklar, 25-100 miligram arasında görme ve işitme bozuklukları, denge bozuklukları ve parmak uçlarında dokunma hissinin azalması, 200 miligramın üzerindeki birikimlerde ise sağırılık, körlük, felç ve ölüm ortaya çıkmaktadır.

Çeşitli endüstriyel faaliyetlerden kaynaklanan yapay organik kimyasal maddeler, tarım alanlarında kullanılan pestisit ve herbisitler, suda doğal olarak güç

çözünen bileşiklerdir. Bir kısmı, canlı bünyelerinde yukarıda ağır metaller için anlatılanlara benzer şekilde birikime ve toksik etkenlere neden olurlar; diğer bir kısmı ise canlı bünyede mutejen ve kanserojen etkiler yaparlar. Geniş bir biçimde tarım yapılan arazilerde kullanılan tarım ilaçları genellikle çok dayanıklı olduklarından, ayrışmaları yıllarca sürebilir. Bunlar hem toprak kirlenmesine, hem de dolaylı olarak su kaynaklarının önemli ölçüde kirlenmelerine neden olmaktadır. Endüstrilerden kaynaklanan yapay organik maddelerin kolay çözünebilir cinsten olmaları halinde, bu tür maddeler sulardaki oksijen bilançosunu olumsuz bir biçimde etkilerler.

Ağır metallerin toksiklik derecesini etkileyen faktörler ise şunlardır:

a) Metalin formu (iyon, kompleks iyon, molekül, koloidal tanecik vb.)

b) Diğer metallerin ve toksinlerin varlığı : Bazı metaller, ortamda kendilerinden başka diğer metallerin veya toksinlerin varlığında tek başlarına iken gösterdikleri etkiden daha fazlasını ya da daha azını gösterirler; bunlara sinerjik veya antagonistik etkiler denir. Örneğin bakır bileşikleri varlığında cıvanın toksiklik düzeyinin artışı, sinerjik etkileşmeye örnektir.

c) Çevresel faktörler (sıcaklık, oksijen içeriği, pH gibi).

d) Canlının içinde bulunduğu yaşam evresi, cinsiyeti vb. (122).

Değişik atık su kaynaklarından gelen ağır metaller sulara karıştıktan sonra hidroksit, karbonat, sülfür, sülfat şeklinde çökerler ve dip kısımlarda hareketsiz kalırlar. Ancak biyokimyasal reaksiyonlar gibi CO₂'nin ortaya çıkıp O₂'nin azaldığı koşullarda veya anaerobik ortamlarda H₂S'in ortaya çıkıp pH'ı düşürmesi gibi durumlarda, ağır metaller yeniden çözünme ve çökme proseslerine uğrar ve böylece mobilize olabilirler.

Tablo 2.8. İçme sularında müsaade edilen maksimum ağır metal konsantrasyonları (mg/L).

Metal	USPHS (120)	WHO (123)	EPA (124)	TSE (125)
Arsenik	0.01	0.05	0.05	0.05
Baryum	1.00	1.00	1.00	-
Kadmiyum	0.01	0.01	0.01	0.005
Krom	0.05	0.05	0.05	0.05
Bakır	1.00	0.05	-	1.50
Kurşun	0.05	0.10	0.05	0.05
Cıva	-	-	0.002	-
Selenyum	0.01	0.01	0.01	0.01
Gümüş	0.05	-	0.05	0.05
Çinko	5.00	5.00	-	15.0

Tablo 2.9. Kıta içi sularda müsaade edilen maksimum ağır metal konsantrasyonları [$\mu\text{g/L}$] (126).

Metal	I. Kalite	II. Kalite	III. Kalite
Arsenik	20	50	100
Baryum	1000	2000	2000
Kadmiyum	3	5	10
Krom (VI)	-	20	50
Bakır	20	50	200
Kurşun	10	20	50
Cıva	0.1	0.5	2
Selenyum	10	10	20
Çinko	200	500	2000
Mangan	100	500	3000
Kobalt	10	20	200
Nikel	20	50	200
Demir	300	1000	5000

2.8.2. Kobalt

Kobalt; doğal ortamda bakır, nikel, mangan ve arsenikle birlikte bulunan, çelik grisi renginde çok sert ve suda çözünmeyen paramanyetik özellik gösteren bir geçiş metalidir. Kobalt, alaşımlara yüksek erime noktası, kararlı kristal yapı ve korozyona karşı direnç kazandırdığından süper alaşımların yapımında kullanılır. Boya endüstrisinde pigment olarak, gıda endüstrisinde köpük stabilizatörü olarak bira üretiminde sülfat tuzları halinde kullanılmaktadır (127).

Kobalt organizmada B_{12} vitamininin bir parçası olarak vitamine rastlanılan her yerde bulunur. Kobalt, özellikle hayvanlar için önemli bir besin faktörü olan B_{12} vitamininin yapısındaki porfirin halkasının ortasında merkez atom olarak bulunur. Kobalt atomu pirol halkalarındaki azot atomları ile koordine bir bağla 5,6 dimetilbenzimidazol'a bağlıdır. Bu bileşik kobalamin olarak bilinir. Kobalamin halkasında kobalt atomuna bir CN grubunun bağlanmasıyla B_{12} vitamini olarak bilinen siyanokobalamin oluşur. Bu vitaminin eksikliğinde anemi, gelişmede yavaşlama ve nörolojik hastalıklar oluşur (121).

Mineralin alınımı vitaminle beraber olmaktadır, ancak kobaltın çoğu B_{12} vitamini ile beraber emilmez. Vücuttaki kobaltın 1/10-1/12'si vitamin formunda,

kalani ise metabolizma sırasında vitaminden ayrılan ancak başka fonksiyonu olmadığı sanılan yapıdadır. Vücutta total olarak 1.1 mg bulunur.

Plazmada inorganik kobalt albümine bağlı olarak dağılır. Kemiklerde %14, kasta %43 oranında kalani da karaciğer başta olmak üzere diğer dokularda bulunur. Kandaki normal kobalt düzeyi eritrositlerde $10\mu\text{g/L}$ ' dir.

Emilmeyen kobalt dışkıyla atılır. Elementel kobaltın emilimi daha kolaydır ve tansportu demir gibi albumine bağlıdır. Emilim karaciğer hastalarında, demir yüklemesinde veya hemokromatozda artar. Demir yetersizliği ise, emilimi bozar.

Mineralin yetersizliği hayvanlarda saptanmıştır. İnsanlarındaki yetersizlik B_{12} vitaminiyle beraber bulunduğu için, mineralin spesifik ayrımını yapmak güçtür.

İnsanlar ortalama bir diyetle günde 5-10 μg mineral almaktadır. Normal gereksinimin günde 0.045 - 0.09 μg olduğu, bu miktarın pernisiyöz anemililerde kemik iliği oluşumunu karşılayacağı belirtilmektedir.

Doğada mineral olarak her yerde bulunur, ancak insanlar genellikle B_{12} kaynaklarıyla beraber alırlar. Bundan dolayı da en iyi kaynakların hayvansal yiyecekler olduğu söylenebilir. Hayvanlarda intestinal florada bakteriler tarafından da sentez edilir. Sebzeler ve tüm tahıllar mineralden zengindir, ancak buradaki yapısı suda az çözünür olduğundan alımı güçtür.

Aşırı alımı polisitemi "polycythemia"ye neden olur. Bu aşırı miktarda eritrosit oluşumuyla karakterizedir ve hemoglobin düzeyi bu kişilerde oldukça yüksektir. Kobalt toksisitesine çocuklarda daha sık rastlanır, 1 mg/kg vücut ağırlığı başına alınmasından kaçınılmalıdır (128).

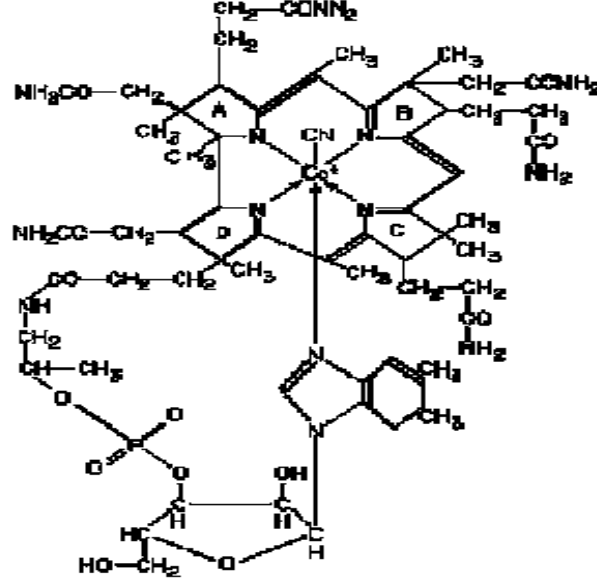
Kobalt havadan inhalasyon yoluyla, içme suları ve diyet yoluyla organizma tarafından alınır. Fazla miktarda alınması; soluk alıp verme mekanizmasında bozulmaya, kalp büyümesi ve genişlemesine, böbrek ve karaciğer rahatsızlıklarına, sinüs taşikardiye ve bağışıklık sistemine olumsuz yönde etki ederek astım krizlerine sebep olacağı belirtilmiştir (129).

Bazı araştırmacılar kobaltın havada ortalama olarak $0,0004\mu\text{g}/\text{m}^3$ konsantrasyonda bulunduğunu fakat endüstrinin yoğun olduğu ortamlarda alınan hava örneklerinde bu değerin $0,61\mu\text{g}/\text{m}^3$ 'e kadar ulaştığı belirtilmektedir. Yapılan bir çalışmada su örneklerinde ortalama olarak $2\mu\text{g}/\text{L}$ konsantrasyonda bulunduğu fakat bu değerin $107\mu\text{g}/\text{L}$ 'ye kadar çıkabileceği rapor edilmiştir (127).

Ratlar üzerinde yapılan bir araştırmada inhalasyon yoluyla alınan kobaltın oral yolla alınan kobalttan çok daha toksik etki gösterdiği belirtilmiştir (129).

İnhalasyon ve içme suyu yoluyla alınan kobalt miktarı ile ölümle sonuçlanan kanser vakaları arasında bir ilişkinin olmadığı EPA tarafından belirtilerek,

karsinogenetik sınıflandırmada kobalta yer verilmemiştir. Ratlarda deri altına veya kas altına yapılan direkt kobalt enjeksiyonlarında sadece enjeksiyon yapılan bölgelerde bronşların uzantısı olan alveollerde tümörlerinin oluştuğu tesbit edilmiştir (130).



Şekil 2.9. B12 vitaminin kimyasal yapısı

2.8.3. Nikel

Nikel gümüş renginde doğada silikat, sülfat ya da arsenit cevherleriyle birlikte bulunmaktadır. Nikel bileşiklerinin her bir formu farklı fiziksel özellikler göstermektedir. Suda çözünen nikel tuzları klorit, sülfat ve nitrat tuzlarıdır. Nikel karbonil bileşikleri oldukça kararsız olduklarından hızlı bir şekilde bozunurlar ve doğada bulunmazlar (131).

Nikel; çeşitli alaşımlarda, kaplamacılıkta, bataryalarda, madeni para yapımında, endüstriyel boru tesisatlarında, paslanmaz çelik üretiminde, krom nikel rezistans tellerinde kullanılır. Ayrıca çeşitli kimyasal proseslerde katalizör olarak kullanılır. Nikel karbonil bileşiklerinin kullanımı sınırlıdır (132).

Nikelin organizmada 10 mg kadar bulunduğu sanılmaktadır. Dağılımın yüksek olduğu yerler deri ve kemik özellikle kemik iliğidir. Bununla beraber diyetle alımından en fazla etkilenen karaciğer ve kaslardır. Plazmada nikel konsantrasyonu 1,1-1,6µg/L'dir.

Diyetle alımda emilim ancak %3 civarındadır, dolayısıyla en büyük atılım dışkıyla olur, ancak esas kayıp %60 ile idrar yoluyla. Bir miktar da terlemeyle atılır. Hamilelikte emilim azaldığından, hamilelerin serum düzeylerinin düşük olduğu rapor edilmiştir. Emilim alınan doza paralel olup mekanizması demir ve kobalta benzer. Nikel yetersizliği demir emilimini azaltırken, demir yetersizliği de nikelin emilimini etkiler. İn

vitro çalışmalarında TPP, PP, porfirin, protein ve peptitlere mineralin afinitesi olduğu ve RNA, DNA ile bağlandığı gösterilmiştir.

Nikel yetersizliğinde, karaciğer dehidrogenâz (DH) enzimlerinin azaldığı bilinmektedir. Bunlar glikoz-6-fosfat (DH) laktoz DH, isositrat, malat DH ve glutamat DH dir. Nikel yetersizliğinin, hepatosit ve mitokondrial yapıyı, endoplazmik retikulumu değiştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca arginaz ve deoksiribonükleaz enzim aktiviteleri de değişmektedir (128).

Nikel yer kabuğunda bulunan elementlerden biri olduğundan az miktarlarda gıda, su, toprak ve havada bulunur. Gıdalar nikel alımının ana kaynağıdır. Yetişkinler günlük 100 ile 300 µg arasında nikel almalıdır. Mesleki olarak nikel üretim proseslerinde, nikel içerikli mücevherat yapımlarında, paslanmaz çelik üretiminde çalışan kişiler nikel alımına maruz kalırlar. Ayrıca yemek pişirilen kaplarla ve içilen sigaralarla da nikel alımı mümkün olmaktadır.

Nikel hava ortamında, kömür ve petrol bileşiminde, metal rafinerinde, kanalizasyon atık çamurlarında ve diğer kaynaklarda çok az miktarda bulunur. Nikel karbonil bileşikler kararsız olduklarından son derece nadir bulunurlar.

Laboratuvar testlerinde kan, idrar ve saç örneklerinde nikel tayarları yapılmaktadır Yüksek miktarda nikel inhalasyonuna maruz kalan insanlarda akciğer böbrek problemleri görülmüştür. Nikel klorit, nikel sülfat gibi nikel içerikli suları kullanan kişilerde nörolojik etkiler gastrointestinal hastalıklar rapor edilmiştir. Nikel karbonil bileşiklerine kısa süreli maruz kalan hayvan ve insanlarda akciğer fibrosisi ve böbrek ödemi rapor edilmiştir. Ratlarda yapılan bazı testlerde suda çözünen nikel asetat gibi bileşikler suda çözünmeyen inorganik bileşiklerinden daha çok toksik olduğu tesbit edilmiştir (133).

Nikel alımına maruz kalan kişilerde kronik dermatidler oluşmuştur. Nikel dermatid durumlarında mesleki ve mesleki olmayan alımlara göre el, bilek ve parmakta kaşıntı hissi veren egzemalar görüldüğü rapor edilmiştir (133).

Kronik nikel inhalasyonuna maruz kalan kişilerde akciğer fonksiyonlarının azaldığı bronşit ve astım hastalıklarının arttığı tesbit edilmiştir (127).

Hayvanlar üzerinde araştırma yapanlar nikel oksit, nikel sülfat ve nikel sülfat heptahidrat gibi çözünmeyen ve çözünen nikel karışımları inhalasyon yoluyla alındığında akciğer ve bağışıklık sisteminin etkilendiğini belirtmişlerdir.

Suda çözünen nikel karışımlarının suda daha az çözünen nikel karışımlarından soluk alıp verme sistemi açısından daha toksik olduğu belirtilmiştir. Hayvanlarda oral yolla alınan nikel oksit ve nikel nitratın sperm sayısını azalttığı ve sperm anomalinin oluştuğu belirtilmiştir.

Günlük ortalama olarak $0,0002 \text{ mg/m}^3$ nikel alındığında insanlar için tehlikeli olduğu ancak kanser riski taşımadığı bildirilmiştir. İnhalasyonla nikel sülfatın alınması ve içme suları ile nikel asetatın alınması ratlarda karsinogenetik özellik göstermediği bildirilmiştir (132).

İnsanlar üzerinde araştırma yapan kişiler nikel rafinelerinde nikel tozlarına maruz kalan kişilerde akciğer ve nasal kanserlerin arttığını rapor etmişlerdir (133).

EPA nikel tozlarının $2,4 \cdot 10^{-4} \text{ } \mu\text{g/m}^3$ düzeyindeki inhalasyonda kanser riskinin oluşacağını belirtmiştir. Nikel sülfatlar için ise bu düzeyin $4,8 \cdot 10^{-4} \text{ } \mu\text{g/m}^3$ olduğu belirtilmiştir (136).

2.8.4. Bakır

Bakır kırmızı kahverengi renginde işlenebilen, ısı ve elektriksel iletkenliği yüksek olan, korozyona dayanıklı geçiş metalidir. Periyodik cetvelde I B grubunda bulunur. Bakır doğada metalik formunun yanında +1, +2 oksidasyon basamaklarında bulunur. Bakır tuzları hafif asidik çözeltilerde ve suda az çözünür. Fakat HNO_3 , H_2SO_4 , NH_4OH , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ çözeltilerinde daha fazla çözünür.

Bakır bitki ve hayvan dokularıyla ve suda doğal olarak bulunur. Solüsyon içinde ve canlı organizmada +2 ve +1 değerlidir. Nötral sulu ortamda bakır iyonu hidroksit formundadır. Redoks kimyasında moleküler oksijene elektron transfer eder ve böylece elektron transportu ve oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarına katılır.

Bakır doğal olarak en kararlı oksidasyon basamağı olarak +2 değerlikte bulunur. +1 yüklü iyonu kararlı kompleks formunda değilse oksitleyici maddelerden dolayı hızlı şekilde okside olur. Cu^{+2} iyonu H_2O , OH^- , CO_3^{-2} , SO_4^{-2} gibi inorganik ligandlarla oksijen yoluyla, organik ligandlarla ise fenolik ve karboksilik gruplar yoluyla bağlanır (134). Bu yüzden doğal örneklerdeki bakırın tamamı organik karışımlarla kompleks halinde olur (135).

Değişik kaynaklar vücuttaki bakır miktarını farklı oranlar içinde vermektedirler. Verilen değerler en düşük olarak 50 mg en yüksek olarak 150 mg'dır (ortalama 80-100 mg). Bu değerlerle bakır, demir ve çinkodan sonra vücutta en fazla bulunan mineraldir. Canlı organizmalarda gram başına 1-2 mg bulunur. Konsantrasyonunun fazla olduğu organ karaciğer, beyin, böbrek ve kalptir. Ayrıca çinko gibi saçta da bulunur. Dalak, akciğer, kalp ve kemikler orta derecede bakır içerirken hipofiz ve tiroid bezleri çok düşük konsantrasyonda bakır ihtiva ederler. Bakır bazı enzimlerde de bulunur. Kan ve kas konsantrasyonu 1 mg/g'dır. Serum değeri değişken olup ancak ortalama miktarı 70-140 $\mu\text{g/dl}$ dir. Kan ve kaslarda ise 1 $\mu\text{g/g}$ basınadır. Yeni doğan bebeklerin karaciğer, bakır konsantrasyonu 40 $\mu\text{g/g}$ olarak erişkinlerden çok daha yüksektir. Bu depo bakır altı ay içinde yeni dokular için kullanılır (136).

Normal ortalama bir diyetle günde 2-4 mg bakır alınmaktadır. Bu da erişkinler için yeterli miktardır. Bebek ve çocukların gereksinmesi 0.05 mg/kg gündür, RDA standartlarına göre erişkinlere 1,5-3,0 mg, bebeklere 0,4-0,7 mg çocuklarda 0.7-2.5 mg günde önerilmektedir (137).

Bakır bütün doğal yiyeceklerde bulunur. En zengin kaynakları ise, hayvansal yiyeceklerdir, bunlar arasında başta et kabuklu deniz ürünleri gelir. Bitkisel kaynakları ise, kuru yemişler, kuru baklagiller ve tahıllardır. Ancak diyet posası bitkisel kaynaklı bakırın alımını azaltır. Bununla beraber günlük enerjiyi karşılayabilecek karışık bir diyet tüketildiğinde yeterli miktarda mineral alınabilmektedir (138).

Bakır doğada pek çok sebze ve meyvede bulunur. Örneğin elmada ortalama 0,1 - 2,3 mg/kg bakır mevcutken, kuru erikte bu değer 3,7 - 5,0 mg/kg'a çıkar, ayçekirdeğinde ise 14,3 - 19 mg/kg bakır bulunur. Anne sütü ortalama 200-400 µg/L bakır içerir ve bebek ağırlığı başına 50 µg bakır alır (139).

Hemoglobin sentezinde katalizör görevi yaparak, kırmızı kan hücrelerinin oluşumuna yardım eder. Yani bakırın eksikliği demirin adsorpsiyonunu düşürerek hemoglobin sentezini azaltır (140).

Çözülmeyen doğal kubik iyon (Cu^{+2}) bileşikler tükürükte de bulunur. Ortalama bir günlük diyetle 1,2-1,7 mg alınır. Diyet posası emilimi etkileyerek dışkıyla atımını artırır. Bakır emilimi için Fe^{+2} ve Zn^{+2} ve diğer metal iyonlarıyla yarış eder, böylece ortamdaki metal iyonlarının konsantrasyonuna göre emilim değişir. Emilen bakırın mukozal hücreye transferinin fizyolojik değişikliklerle etkilendiği gösterilmiştir. Bunlar arasında kişinin östrojen düzeyi ve kanser gibi hastalıklar sayılmaktadır, intestinal epiteldeki "metallotionein" düzeyinin artması (yüksek çinkolu diyet veya östrojen) kana bakır transferini düşürmektedir. Kanserde ise bunun tersi olmaktadır.

Bakır depolama işini karaciğer üstlenmiştir. Karaciğer fazla bakırı safra yoluyla bedenden atar. Öyle ki, besinlerle aldığımız bakır miktarı yükselse bile bedendeki bakır miktarı aynı kalır. Bazı bakırlı enzimlerin beyin metabolizmasıyla ilgili olduğu bilinir. C vitamininin oksitlenmesinde de bakır rol oynar (141).

Bakır vücut fonksiyonları açısından önemli olmakla beraber özellikle saç, deri esnek kısımları, kemik ve bazı iç organların temel bileşenidir. Ayrıca amino asitler, yağ asitleri ve vitaminlerin normal koşullarda metabolizmadaki reaksiyonlarının vazgeçilmez öğesidir. Bir çok enzim ve proteinin yapısında bulunan bakır, demirin fonksiyonlarını yerine getirmesinde aktivatör görevi üstlenir. Bakır eksikliğinde hayvanlarda anomali, kansızlık, kemik hataları ve sinir sisteminde bozukluklar tespit edilmiştir (142).

Ayrıca bakır, kollajen oluşumunu, yaraların iyileşmesini sağlar ve sinir liflerinin etrafındaki zarın korunmasına katkıda bulunur. Bakır demirin +2 ve +3 oksidasyon

basamakları arasındaki dönüşüme dolaylı olarak katkıda bulunarak kritik bir rol oynar. Bu aynı zamanda solunum ve enerji üretimiyle ilgili bir çok reaksiyon için bakırın gerekli olduğu anlamına gelmektedir (143).

Yetersizliğinde serum bakır ve seruloplazmin düzeyi düşer, demir yetersizliği gibi anemi görülür, elastin üretiminde azalma, deride pigmentasyon azalması, hipodermi oluşur. Yetişkinlerdeki yetersizlik günde 25-40 mg CuSO_4 verilerek düzeltilebilmektedir.

Bakır eksikliğinde, demir eksikliğine benzer küçük hücreli (eritrositli) bir kansızlık (anemi) olur ve bu, demir vermekle düzelmez; ayrıca eritrositlerin yaşama süreleri de kısalmıştır; dokuların katalazlarının ve sitokrom C'lerinin, ve sitokrom oksidazlarının çalışmalarının azalışı da görülür. Büyüme azlığı, hipodermi, artan beyinsel dejenerasyon, saçlarda renk bozukluğu, plazmada bakır ve bakır oksidaz düzeyinin azaldığı görülür (145).

Bakır eksikliğinde insanlarda; wilson hastalığı, tavuk ve köpeklerde; raşitizm benzeri kemikleşme bozukluğu, sığırlarda; ishal, myokard enfarktüsü, kuzularda; enzootik ataksi görülür (146).

İki genetik hastalık bakır metabolizmasını etkiler, bunlardan biri yukarıda belirtildiği gibi Wilson hastalığıdır. Alınan bakır seruloplazmine bağlanamaz. Bu hastalarda karaciğerden safrayla bakır atımı bozulmuştur, dolayısıyla bakır birikerek karaciğer, beyin, böbrek ve korneaya zarar verir. Sinir sistemini etkileyerek jdimans (bunama) ve karaciğerin fonksiyon bozukluğuna yol açar. Hastalara penisilamin gibi bakır şelat ajanları verilir. İkinci hastalık ise menkes sendromu adı verilen "dolaşık saç sendromu"dur. Bu hastalıkta intestinal bakır emiliminde karışıklık söz konusudur. Burada bakırın transportunda (intestinal mukozadan) kan dolaşımına geçişinde problem vardır. Hücre içinde normal fonksiyonu plan kuproproteinlere katılamaz. Bu çocuklara intravenöz bakır verilmesinde çok dikkatli olunmalıdır. Çünkü mental geriliğe, anormal kemik oluşumuna, ısı değişimine ve enfeksiyona yol açabilir.

Kanserde bakır metabolizmasının değiştiği bilinmektedir. Serumda seruloplazmin ve bakır düzeyi yükselir, karaciğer ve böbrek bakır düzeyi, ve organizmadaki dönüşümü azalır, ayrıca emilimde de değişme olur. Bazı bakır şelatlarının tümörlü hücrelerin kromozomlarını tahrip ettiği dolayısıyla hücrenin ölümüne neden olduğu gösterilmiş inflamasyon koşullarında serum bakır ve seruloplazmin düzeyi %20-30 oranında yükselir. Bunun nedeni mineralin bağ dokusu tamirindeki rolü olarak gösterilmektedir.

İnsanda serum kolesterol ve bakır düzeyleri arasında ters bir korelasyon vardır. Bakırdan düşük, çinkodan yüksek diyet hiperkolesterolemiye yol açar. Buna

dayanılarak gelişmiş toplumlarda düşük bakır diyet tüketiminin hiperkolesterolemi, hiperglisemi dolayısıyla arteriosklerozu arttıracakı öne sürülmektedir (128).

Bakırın insan vücudu için akut bir toksik madde ve kanserojen olmadığı belirtilmektedir. Fakat bazik bakır karbonatın zehirli olduğu çok eskiden beri bilinmektedir. Bu nedenle bakır kaplar kalaylanarak kullanılır. Aşın miktarda bakır tuzlarının, özellikle bakır sülfatın ağız yoluyla alınması ölümle sonuçlanabilir (147).

Avustralya'da koyunlarda görülen bakır zehirlenmesi olayında, bakır eksikliğinin diyetteki molibden ve sülfatla ilgili olduğu açıklanmıştır (148).

Bu bulgu bakır, çinko ve diğer eser elementler arasında da ilişkiler bulunduğunu göstermektedir. Başka bir deyişle, bakır eksikliği ve bakır toksisitesi sadece bakırın alımına değil aynı zamanda Zn, Fe ve Ca'un diyetteki seviyesine de bağlıdır. Bakır toksisitesi Mo, Zn ve SO_4^{-2} almımındaki düşme ile artar (120).

Bakır iyonu bitkilerde çok az miktarda bazı enzimlerin oluşması için gereklidir. Aşırı miktardaki bakır su bitkileri için çok toksiktir. Su bitkileri için sadece cıva bakırdan daha toksiktir. Belirli seviyedeki bakır hücre zarlarındaki geçirgenliği artırarak potasyum kaybına yol açar. Bu şekilde ortamda bulunan diğer kirleticilere olan hassasiyeti artırır. 0.1 mg/l den daha düşük seviyelerde bile büyümeyi kötü yönde etkilemektedir. Bakır deniz alglerinde fotosentez sistemini, mavi - yeşil alglerde ise azot fiksasyonunu inhibe etmektedir. Bakır tatlı su ve deniz yumuşakçaları üzerinde de şiddetli toksik etkiye sahiptir. Suda kompleksleştirici maddelerin bulunması bakırın toksisitesini çok düşürür (147).

Bakırın tatlı sudaki toksisitesi deniz suyuna göre daha fazladır. Tuzlu suyun yüksek derecede kompleksleştirme etkisi deniz balıklarına karşı bakırın toksisitesini azaltır. Bitkilerde olduğu gibi yumuşakçalarda da suyun kompleksleştirici özelliği toksisiteyi düşürür ve mortaliteyi azaltır. Örneğin ortama hümitik maddeler ve EDTA ilavesi ölüm oranını % 10.8'den % 1.4'e düşürür (147).

Tarımsal kesimlerde havadaki ortalama bakır konsantrasyonu 5 to 50 ng/m³ iken endüstriyel kirlenmemiş bölgelerdeki deniz suyundaki bakır konsantrasyonu 0.15 µg/L ve tatlı suda ise 1-20 µg/L'dir. Doğal suların pH değerine bağlı olarak çözünürlük sınırlarındaki azalma sonucu suların dibinde çökelir ve doğal yeraltı tatlı suların çökeleklerinde yaklaşık 16–5000 mg/kg (kuru ağırlık) arasında ve deniz dibinde ortalama 2 - 740 mg/kg (kuru ağırlık) bakır bulunur. Kirlenmemiş toprakta bakır konsantrasyonu ortalama 30 mg/kg (sınır değeri 2-250 mg/kg) seviyelerindedir (149).

Bakırın bitkiler ve canlılar üzerindeki etkisi, kimyasal formuna ve canlının büyüklüğüne göre değişir. Küçük ve basit yapılı canlılar için zehir özelliği gösterirken büyük canlılar için temel yapı bileşenidir. Bu nedenle bakır ve bileşikleri fungusit,

biosit, anti bakteriyel madde ve böcek zehiri olarak tarım zararlılarına ve yumuşakçalara karşı yaygın olarak kullanılır (150).

Örneğin % 1-20 CuSO₄ içeren kireç sütü karışımı “bordokarışımı” olarak bilinir ve üzüm tarımında fungusit olarak kullanılır. Hastanelerde kapı kolları ve elle sıkça temas edilen bölgeler bakır alaşımlarından imal edilen malzemelerden yapılır ve malzemenin antiseptik özelliğinden yararlanılarak mikropların yayılması engellenir.

Akut bakır zehirlenmesi seyrek olarak gözlenir. Genelde yiyecek ve içeceklere kazayla bakır ihtiva eden maddelerin karışmasıyla veya kasten bakır tuzlarının yutulması sonucu zehirlenme gerçekleşir ve bakır çalığı olarak bilinir (149).

Ağız yoluyla alındığında akut zehirlenme insanlarda, LDLo, 100 mg/kg’dır, ancak 600 mg/kg’a kadar emilim olduğunda dahi tedavisi mümkündür. Akut bakır zehirlenmesinde gözlenen belirtiler tükürük salgılamının artması, mide ağrıları, bulantı, ishal gibi sindirim sistemi mukozasının tahriş olmasından kaynaklanır. Ayrıca alınan doza bağlı koma durumuna ve ölümlere sebebiyet verebilir. İçme sularında dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından açıklanan üst sınır değeri 2mg/L’dir. Gün içinde alınabilen maksimum bakır değeri kadınlarda 12mg, erkeklerde 10mg, 6-10 yaş grubu çocuklarda ise 3 mg’dır (150).

2.8.5. Demir

Erkeklerde 3,45 gr kadınlarda ise 2,45 gr olarak tüm vücuda dağılan demirin %60-70 kadarı kan hücrelerinde hemoglobin içinde, %10-12 kadarı kaslarda miyoglobinin içinde ve enzimlerde, %15-30 kadarı da karaciğer, dalak ve kemik iliğinde depolanmış olarak bulunur (151).

Önemli miktarı +3 değerli besin demirinin, yine besinlerdeki indirgen maddelerle daha çok çözünebilen +2 değere çevrildiği kabul edilmiştir (152).

Besinlerle alınan demir, çoğunlukla bu besinler içerisinde ferrik hidroksit veya ferrik organik bileşikler şeklinde bulunur. Fosfatça zengin besinlerin alınması demir absorpsiyonunu yavaşlatır. Kansızlıkta ise demir absorpsiyonu, birkaç katına çıkabilir. Demirin dokulardan kana salınabilmesi için bakıra gereksinim vardır. Bu amaçla organizma bakırı kapsayan "serulo plazmin" den yararlanır (121).

Demir eksikliği anemiye yol açar. Başlıca belirtileri dikkatsizlik, yorgunluk, çaba harcayınca kalp çarpıntısı, bazen ağrılı dil, dudak kenarlarında çatlaklar, yutma güçlüğü, konkav tırnaklardır. Çocuklarda iştahsızlık, yavaş büyüme ve enfeksiyona dirençsizlik de görülür. Demir eksikliğinden kaynaklanan anemide mide ve bağırsak yolunda anomaliler görülür. Bunlardan biri mide asidi azlığıdır. Kısacası, demir eksikliği mide asidinin azalmasına ve bedende yetersiz demir emilimine yol açtığı gibi, bu iki rahatsızlık da demir anemisine neden olabilir (153).

2.9. Kompleks Stokiyometrisinin Bulunması

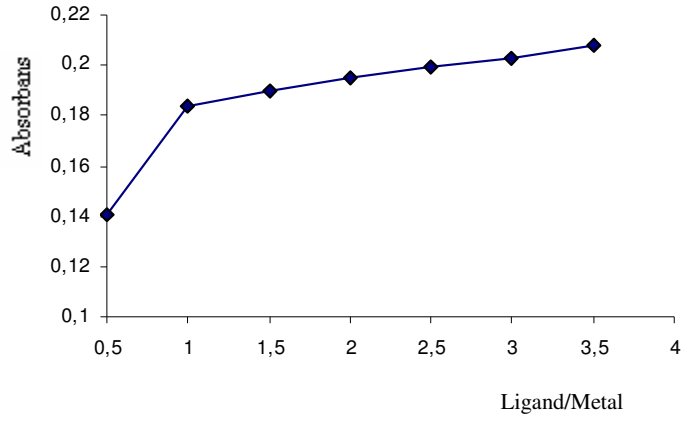
2.9.1. Mol Oranı Yöntemi

Mol oranı yönteminde, stokiyometrisi bilinmeyen kompleksin katyonunun uygun kontrasyonda bir çözeltisi yapıp spektrumu alınır (spektrofometrik konsantrasyonlar 10^{-3} - 10^{-7} M). Bu katyon, pratik olması nedeniyle M ile gösterilir. Bundan sonra da L ile gösterilen ligandın uygun konsantrasyonda bir çözeltisi hazırlanıp spektrumu alınır. Bu çözeltilerden alınan (örneğin 2 şer ml) çözeltiler karıştırılır ve karışımın spektrumu alınır. Spektrumdan komplekse ait absorpsiyon bandlarından (piklerinden) en şiddetlisinin dalga boyu tespit edilir. Bundan sonra ligandın katyona oranı (L/M) 1,2,3,... olan çözeltiler hazırlanır. Yukarıda sözü edilen dalga boyunda 1 cm kalınlıktaki hücrede sırayla bunların absorbansları ölçülür ve bu absorbanslar L/M ye karşı bir grafiğe geçirilir. Elde edilen grafikteki eğrilerden yararlanarak kompleksin stokiyometrisi bulunur.

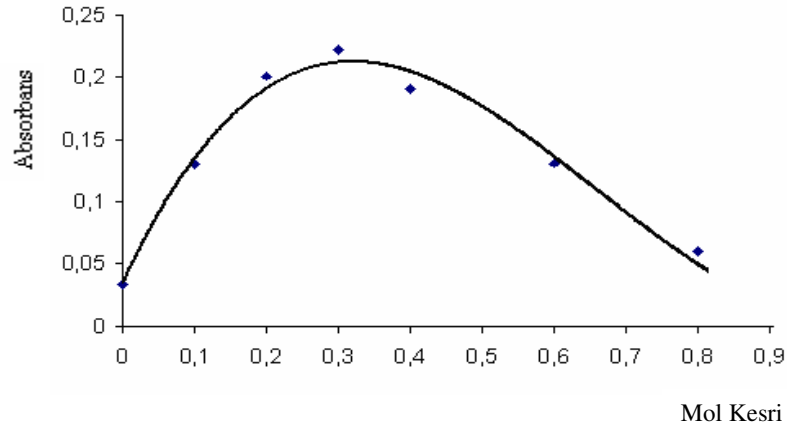
2.9.2. Job veya Devamlı Değişmeler Yöntemi

M ve L den meydana gelen kompleks için iyi bir çözücü ve iyi bir absorpsiyon maksimumu bulunabilirse böyle bir kompleksin kaç M ve kaç L'den meydana geldiği bulunabilir. Yöntem, Job tarafından geliştirildiğinden çoğu kez Job yöntemi adını alır. Bunun için M ve L den meydana gelen kompleksin bir spektrumu alınır ve bu spektrumun en şiddetli absorpsiyonunun dalga boyu (λ_{max}) tespit edilir. M ve L nin aynı konsantrasyonda birer çözeltisi hazırlanıp, birinin hacmi artarken diğerinin hacmi aynı oranda azalacak şekilde bir dizi kompleks çözeltileri hazırlanarak maksimum absorpsiyon dalga boyunda absorbansları ölçülür.

Ölçülen absorbans değerleri, alınan M veya L 'nin hacmine karşı grafiğe geçirilerek elde edilen eğrilere çizilen teğetlerin kesim noktasından hacim eksenine bir dikme inilerek kompleksin stokiyometrisi belirlenir.



Şekil 2.10. Mol oranı yöntemi ile kompleks stokiyometrisinin bulunması



Şekil 2.11. Job veya devamlı değişmeler yöntemi ile kompleks stokiyometrisinin bulunması

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR VE BULGULAR

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

ATI-UNİCAM 929 model atomik absorpsiyon spektrofotometresi (AAS) ve gerekli elementlerin oyuk katot lambaları

-Tartım işlemlerinde JL 180 model CHYO marka hassas elektronik terazi

-Çözeltilerin alınıp seyreltilmesinde cam pipetler

-Seyreltme ve standart çözelti hazırlama işlemlerinde değişik hacimlerde balon jojeler, erlen, beher ve deney tüpleri

-Otomatik pipet

-pH'ın ölçülmesi ve ayarlanmasında HI 8418 model HANNA marka pH metre

-Metal komplekslerinin çeşitli ortamlardaki absorpsiyonlarını ölçmek için SF 750 model SECOMAM marka UV-görünür bölge spektrofotometresi

-Standart çözeltilerdeki metal komplekslerinin ayrılma şartlarını belirlemek için CECİL 1100 serisi HPLC cihazı ve CECİL 1220 UV detektörü

-Optimize edilmiş şartlarda örneklerdeki metal tayinleri için SHİMADZU marka LC-9A serisi HPLC cihazı, SHİMADZU marka SPD-M10AVP serisi 200 ile 700 nm dalgaboyları arasında aynı anda ölçüm yapabilen foto diyot array (PDA) detektörü

-PHENOMEX marka LUNA C₁₈ (250x4,6mm 5µ), okda silan (ODS) kolon

-SPELCO marka C₁₈ (150x4,6mm 5µ) silika esaslı kolon

-Çözeltilerde çözünmüş çeşitli gazların giderilmesi için BRANSONİC 221 ultrasonik banyo

-PREMIER marka 800W a kadar ayarlanabilen mikrodalga fırın

-Sonuçların değerlendirilmesi için bilgisayar.

3.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması ve Kullanılan Reaktifler

Deneylerde kullanılan Zn, Cu, Fe, Cr, Al, Ca, Mg Cd, Mn, Co ve Ni elementlerine ait stok çözelti olarak analitik saflıkta Merck marka 1000 ppm'lik standart çözeltiler kullanıldı. Standart çözeltilerden belirli hacimlerde alınıp 1 mL derişik HCl ilave edildi ve saf suyla 50 mL ye tamamlanarak 1×10^{-3} , 1×10^{-4} ve 1×10^{-5} M'lık metal çözeltileri hazırlandı.

1×10^{-3} M'lık piridilazo resorsinol (PAR) çözeltisi: 0,011 g PAR tartılıp 0,1 M NaOH ile pH'ı 9'a ayarlı metanol-su (50% v/v) karışımıyla 50 mL 'ye tamamlandı. Bu çözeltiden belirli hacimlerde alınıp metanol-su karışımıyla belirli hacimlere tamamlanarak 1×10^{-3} , 1×10^{-4} ve 1×10^{-5} M'lık PAR çözeltileri hazırlandı.

1×10^{-2} M CH₃COONa çözeltisi: 0,82 g CH₃COONa tartılarak saf suyla 1L'ye tamamlandı.

1M NaOH çözeltisi: 40 g NaOH tartılıp saf suyla 1L'ye tamamlandı.

Mobil faz bileşimleri için Merck marka kromatografik saflıkta metanol, etanol ve asetonitril (Merck)

EDTA (Merck)

Asetik asit (Merck)

Sitrik asit (Merck)

Örneklerinin çözünürleştirilmesinde; derişik HCl, HNO₃, HClO₄ ve H₂O₂ (Merck) kullanıldı. Çalışmaların tamamında bidistile deiyonize su kullanıldı.

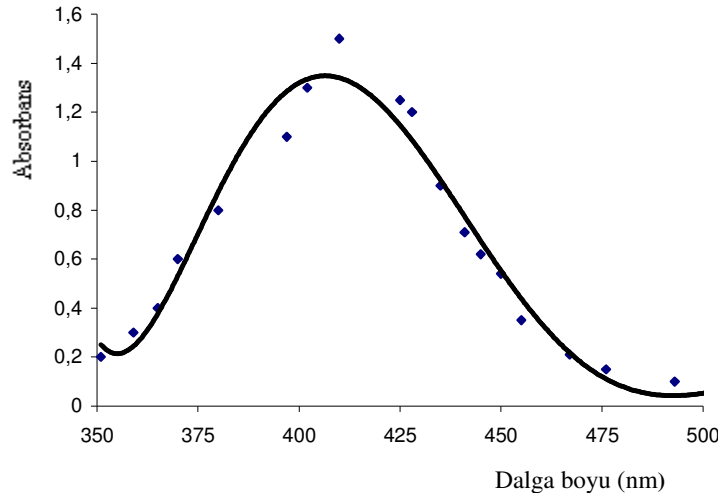
3.2.1. UV Spektrofotometresi ile Yapılan Çalışmalar

3.2.1.1. Co-PAR, Ni-PAR, Fe-PAR, Cu-PAR Komplekslerinin Oluşturulması

50 mL'lik balon jojelere 5 mL 1×10^{-4} M stok metal çözeltisi (Co⁺³, Cu⁺², Fe⁺³ ve Ni⁺²) ve 1×10^{-3} M PAR çözeltisinden 1ml ilave edilerek saf suyla 50 mL ye tamamlandı. Kör (blank) çözelti olarak kullanılmak üzere aynı şekilde metal iyonlarını içermeyen bir çözelti hazırlandı. Kör çözeltisi ile spektrofotometre sıfırlanarak metal-PAR komplekslerinin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyları tesbit edildi.

3.2.1.2. 4-(2-piridilazo) rezorsinol Ligandının UV Görünür Bölge Spektrumu

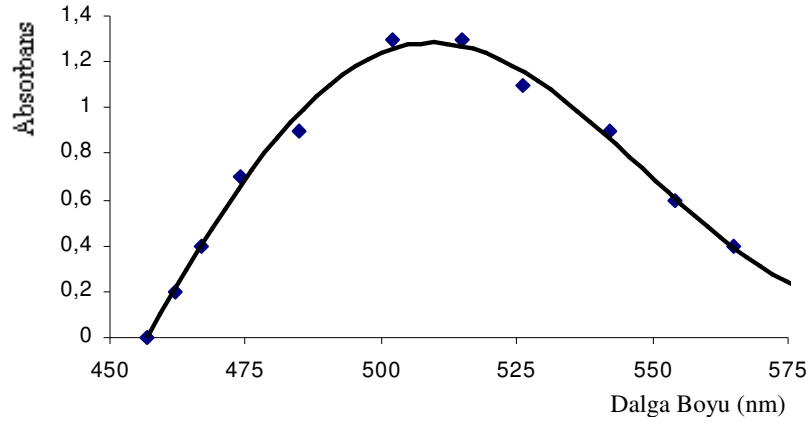
Yeni hazırlanmış 1×10^{-4} M'lık PAR çözeltisinden 2 mL alınarak saf suyla 10 mL ye tamamlandı. Elde edilen çözeltinin kullanılan çözücü ile sıfırlanmış UV spektrofotometresi ile 350-600 nm aralığında spektrumu alındı.



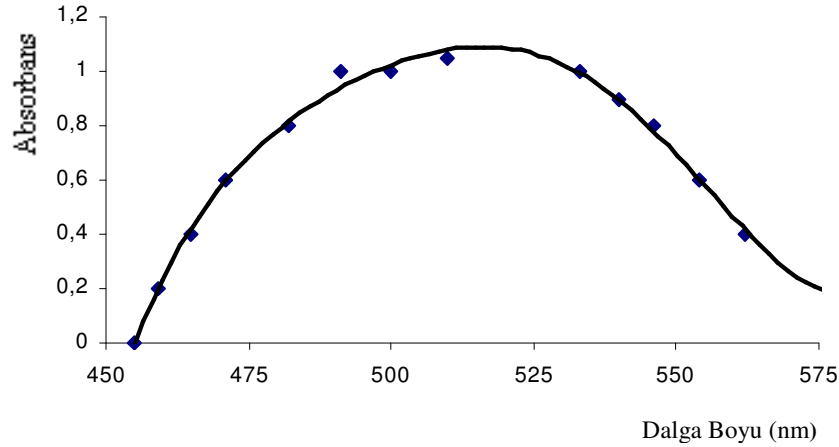
Şekil 3.1. 4-(2-piridilazo) rezorsinol ligandının UV görünür bölge spektrumu

3.2.1.3. Fe-PAR, Ni-PAR, Co-PAR, Cu-PAR Komplekslerinin UV Görünür Bölge Spektrumu

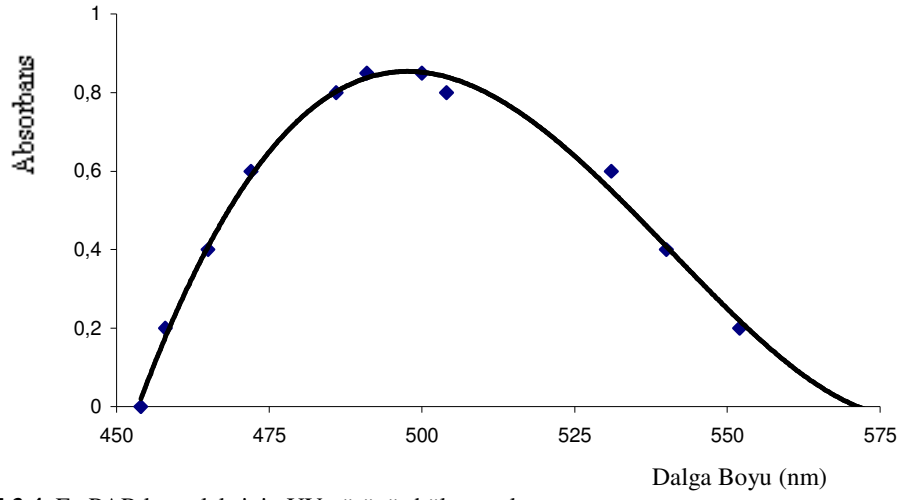
1×10^{-4} M stok metal çözeltilerden (Co^{+3} , Cu^{+2} , Fe^{+3} ve Ni^{+2}) 2 mL alınarak 10 mL lik kaplara aktarıldı. Her bir kaba 1×10^{-3} M stok PAR çözeltilisinden 1 mL ilave edilerek saf suyla 10 mL ye tamamlandı. Elde edilen çözeltilerin aynı şartlarda hazırlanan ve metal iyonlarını içermeyen PAR çözeltisi ile sıfırlanan UV spektrofotometresi ile 350-600 nm aralığında dalga boyu taramaları yapıldı. Komplekslerin maksimum absorpsiyon yaptığı dalgaboyları tesbit edildi.



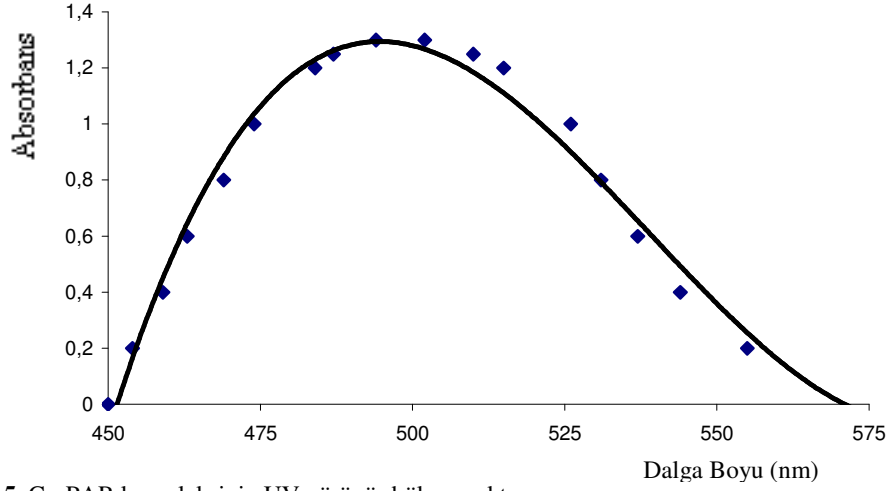
Şekil 3.2. Co-PAR kompleksinin UV görünür bölge spektrumu



Şekil 3.3. Ni-PAR kompleksinin UV görünür bölge spektrumu



Şekil 3.4. Fe-PAR kompleksinin UV görünür bölge spektrumu



Şekil 3.5. Cu-PAR kompleksinin UV görünür bölge spektrumu

3.2.1.4. Dalgaboyu Taramalarında Gözlenen Sonuçlar

Dalga boyu taramalarında standart reaktiflerin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyları (λ max) Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

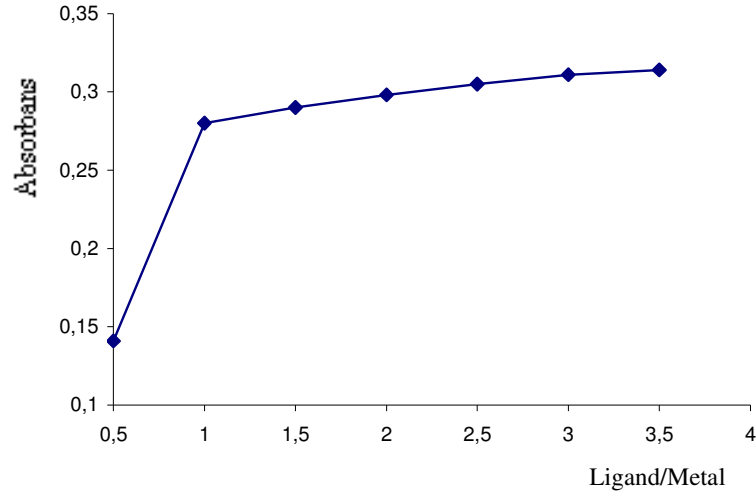
Tablo 3.1. Ligand ve metal-PAR komplekslerinin λ max değerleri

Reaktif	λ max (nm)	
PAR	414	Şekil 3.1
Co-PAR	510	Şekil 3.2
Ni-PAR	504	Şekil 3.3
Fe-PAR	490	Şekil 3.4
Cu-PAR	500	Şekil 3.5

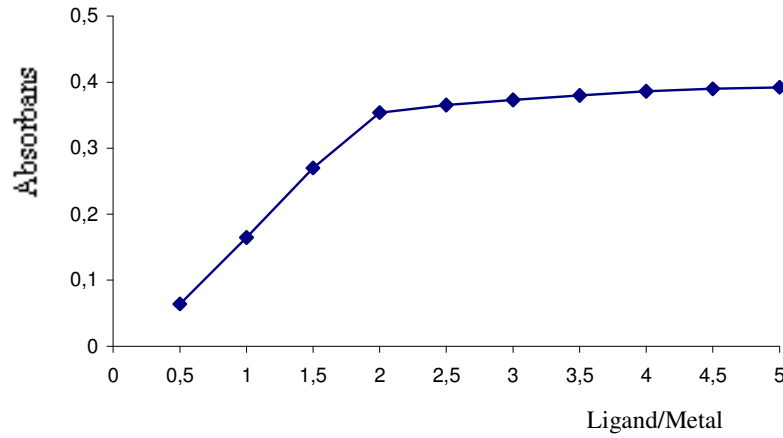
3.2.1.5. Kompleks Stokiyometrilerinin Tayinleri

3.2.1.5.1. Mol Oranı Yöntemi

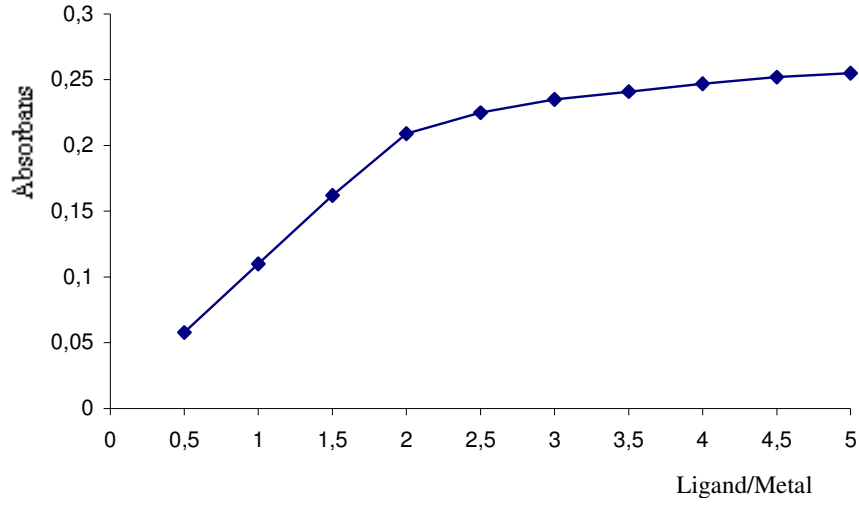
50 mL lik balon jojelere 1×10^{-4} M'lık stok metal çözeltilerinden 2 mL ve [PAR]/[Metal] oranı 1, 2, 3, 4, 5 olacak şekilde 1×10^{-4} M'lık stok PAR çözeltisinden çeşitli hacimlerde ilave edilerek saf suyla 50 mL ye tamamlandı. Komplekslerin maksimum absorpsiyon yaptığı dalgaboyunda çözeltilerden her birinin absorbansları okundu. [PAR]/[Metal] oranına karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek mol oranı yöntemiyle komplekslerin stokiyometrilere tesbit edildi.



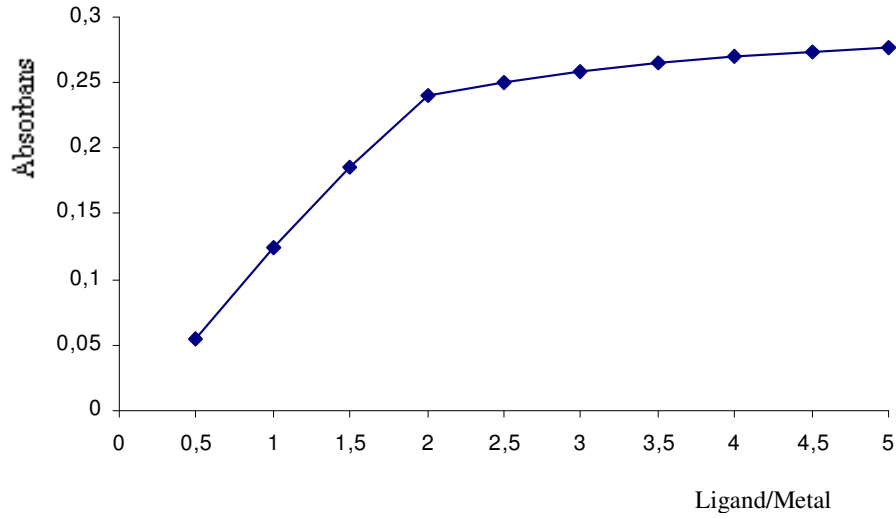
Şekil 3.6. Cu-PAR kompleksinin stokiyometrisi (mol oranı yöntemi)



Şekil 3.7. Co-PAR kompleksinin stokiyometrisi (mol oranı yöntemi)



Şekil 3.8. Ni-PAR kompleksinin stokiyometrisi (mol oranı yöntemi)



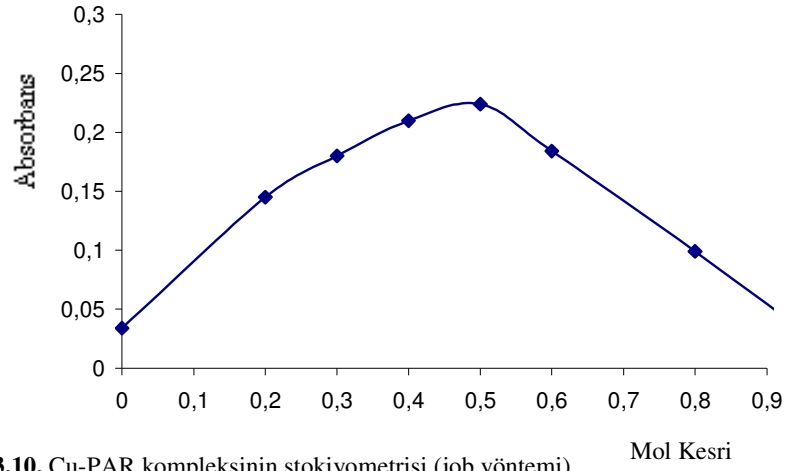
Şekil 3.9. Fe-PAR kompleksinin stokiyometrisi (mol oranı yöntemi)

3.2.1.5.2. Job veya Sürekli Değişme Yöntemi

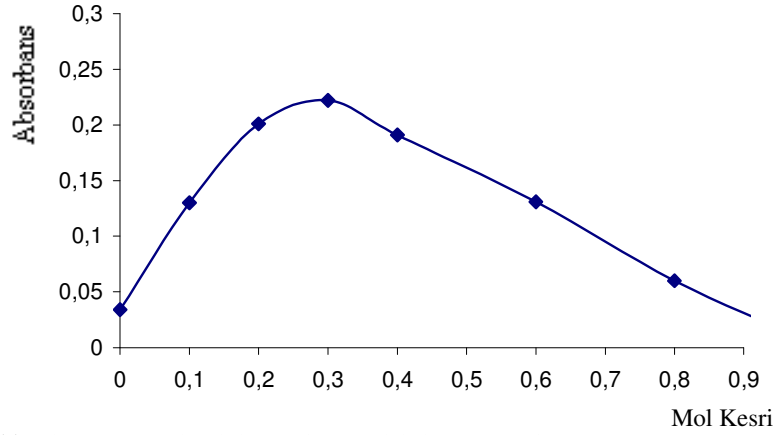
1×10^{-4} M stok metal çözeltileriyle 1×10^{-4} M PAR çözeltisi Tablo 3.2’de gösterilen hacimlerde karıştırılarak bir dizi çözelti hazırlandı. Kompleksler için belirlenen maksimum absorpsiyonun olduğu dalga boyunda çözeltilerin absorbans değerleri okunarak absorbansa karşılık metallerin mol kesri grafiğe geçirildi. Job yöntemiyle komplekslerin stokiyometrilere tayin edildi.

Tablo 3.2. Metal iyonlarının mol kesirleri

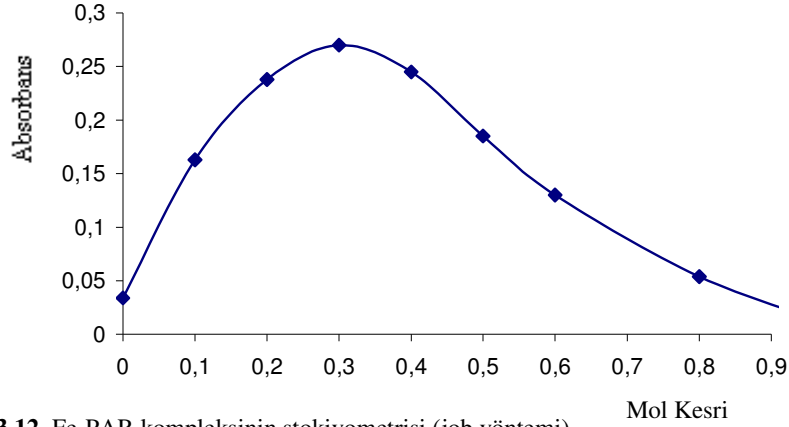
10^{-4} M stok metal çözeltisi (mL)	10^{-4} M PAR çözeltisi (mL)	Mol kesri (metal)
1	9	0.1
2	8	0.2
3	7	0.3
4	6	0.4
5	5	0.5
6	4	0.6
7	3	0.7
8	2	0.8
9	1	0.9
10	0	1



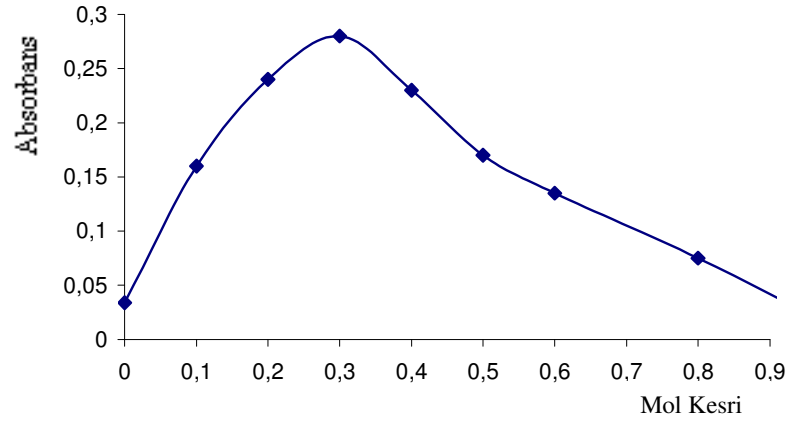
Şekil 3.10. Cu-PAR kompleksinin stokiyometrisi (job yöntemi)



Şekil 3.11. Ni-PAR kompleksinin stokiyometrisi (job yöntemi)



Şekil 3.12. Fe-PAR kompleksinin stokiyometrisi (job yöntemi)



Şekil 3.13. Co-PAR kompleksinin stokiyometrisi (job yöntemi)

3.2.1.2.3. Kompleks Stokiyometrilerinin Tayinlerinde Gözlenen Sonuçlar

Mol oranı ve job yöntemiyle bulunan kompleks stokiyometrilere Tablo 3.3'de belirtilmiştir.

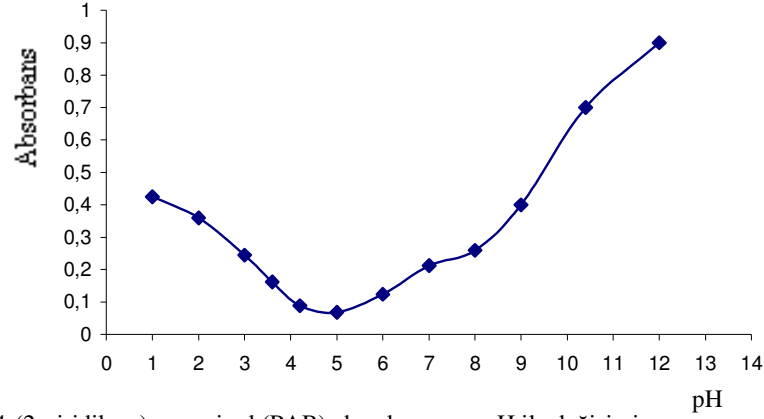
Tablo 3.3. Kompleks stokiyometrilere

Metal	[Metal:PAR]	
Bakır	1:1	Şekil 3.6. ve Şekil 3.10.
Kobalt	1:2	Şekil 3.7. ve Şekil 3.13.
Nikel	1:2	Şekil 3.8. ve Şekil 3.11
Demir	1:2	Şekil 3.9. ve Şekil 3.12

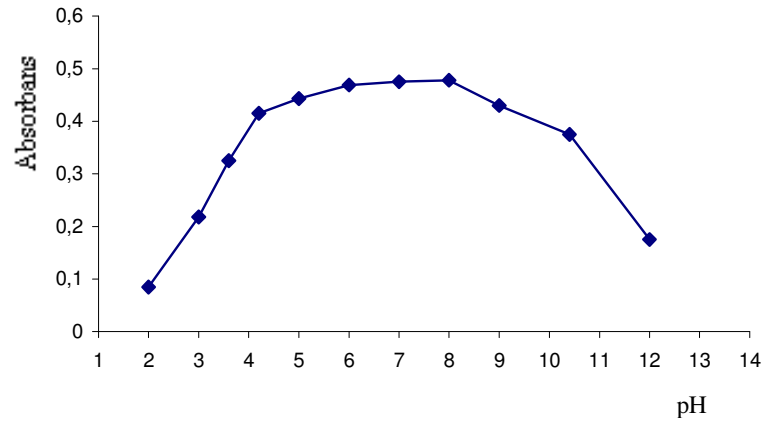
3.2.1.6. Co-PAR, Ni-PAR, Fe-PAR ve Cu-PAR Komplekslerine pH Etkisinin İncelenmesi

50 mL lik beherlere 1×10^{-3} M'lık standart metal çözeltilerinden 1mL ve 1×10^{-3} M'lık PAR çözeltisinden 4 mL ilave edildi. 0,1M HCl ve 0.1 M NaOH çözeltileri kullanılarak pH metre ile çözeltilerin pH'ları 2-12 aralıklarında ayarlandıktan sonra

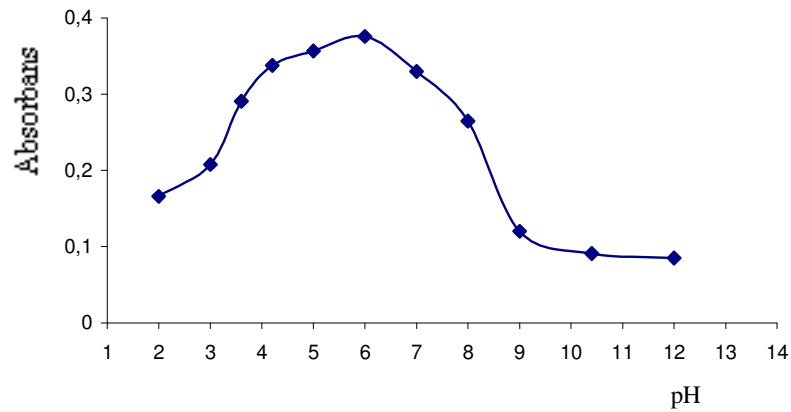
çözeltilerin hacimleri aynı pH'a ayarlı saf su ile 50 mL ye tamamlandı. Komplekslerin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boylarında çözeltilerin absorbans değerleri okunarak pH'a karşı grafiğe geçirildi. Metal kompleksleri için optimum pH aralığı tesbit edildi.



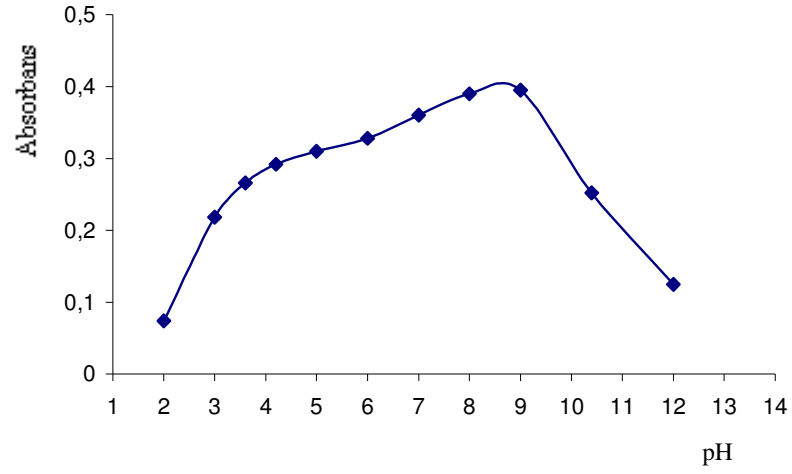
Şekil 3.14. 4-(2-piridilazo) rezorsinol (PAR) absorbansının pH ile değişimi



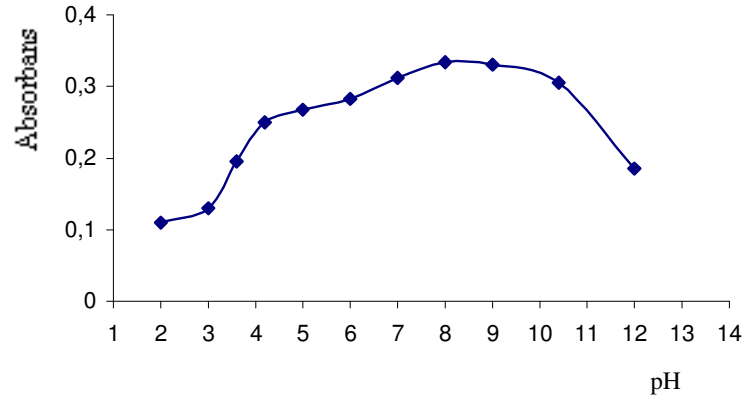
Şekil 3.15. Co-PAR kompleksinin absorbansının pH ile değişimi



Şekil 3.16. Fe-PAR kompleksinin absorbansının pH ile değişimi



Şekil 3.17. Ni-PAR kompleksinin absorbansının pH ile değişimi



Şekil 3.18. Cu-PAR kompleksinin absorbansının pH ile değişimi

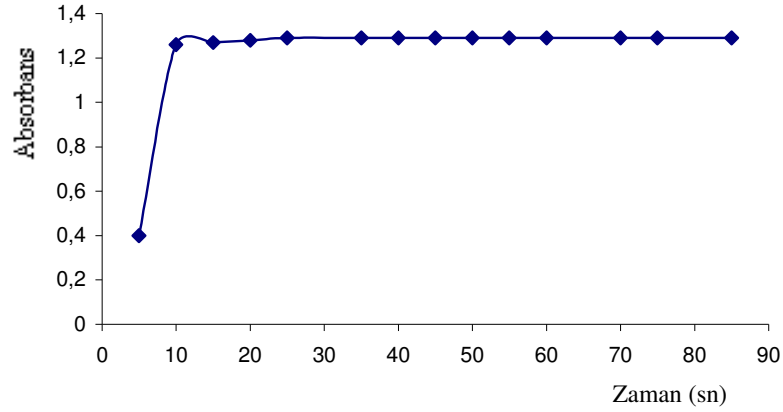
Ligand ve metal-PAR komplekslerinin oluşumunda optimum pH aralıkları Tablo 3.4’de verilmiştir.

Tablo 3.4. PAR ve metal-PAR komplekslerinin oluşumunda optimum pH aralıkları

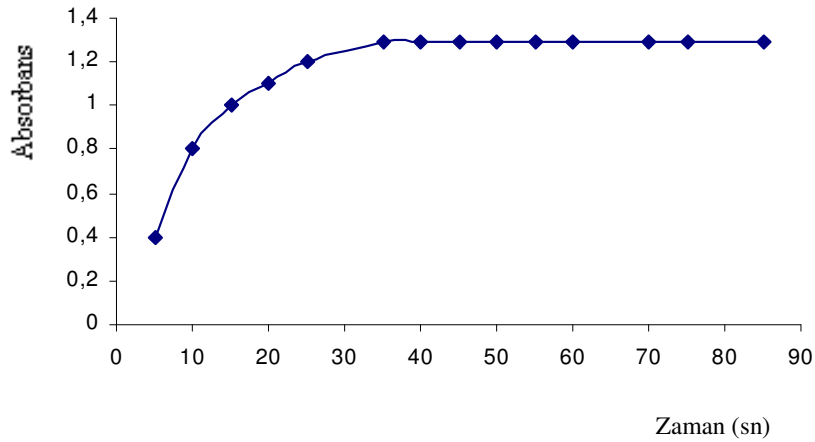
Madde	pH aralığı	
PAR	9-12	Şekil 3.14.
Co-PAR	5-8	Şekil 3.15.
Fe-PAR	4-6,5	Şekil 3.16.
Ni-PAR	6-10	Şekil 3.17.
Cu-PAR	6-9	Şekil 3.18.

3.2.1.7. Co-PAR, Ni-PAR ve Fe-PAR Komplekslerinin Oluşum Sürelerinin Belirlenmesi

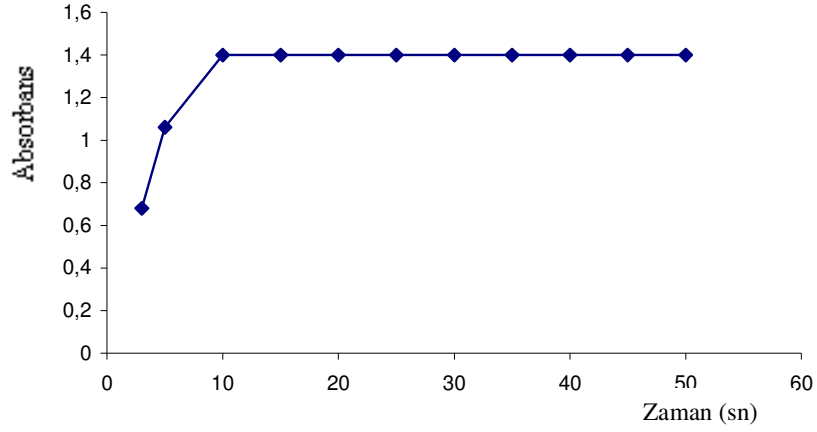
50 mL lik beherlere 1×10^{-3} M standart metal çözeltilerinden 1mL ve 1×10^{-3} M PAR çözeltilisinden 4 mL ilave edilerek çözeltilerin pH'ı 7'ye ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 50 mL ye tamamlandı. Farklı zaman aralıklarında maksimum absorpsiyonun görüldüğü dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Absorbanslara karşı süre grafiğe geçirilerek kompleks oluşum süreleri belirlendi.



Şekil 3.19. Fe-PAR Kompleksinin absorbansının zaman ile değişimi



Şekil 3.20. Ni-PAR Kompleksinin absorbansının zaman ile değişimi



Şekil 3.21. Co-PAR kompleksinin absorbansının zaman ile değişimi

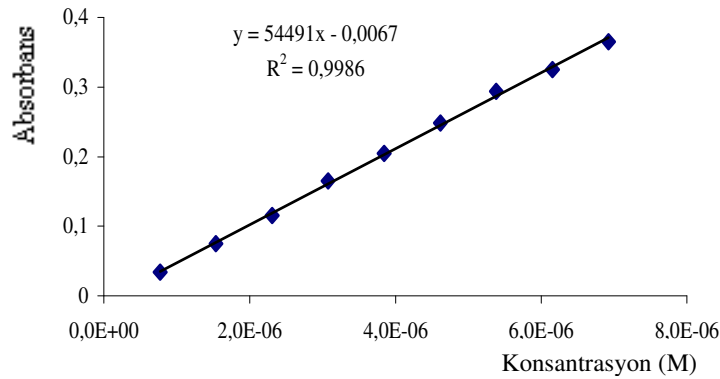
Metal-PAR komplekslerinin absorpsiyonuna sürenin etkisi Tablo 3.5’de verilmiştir.

Tablo 3.5. Metal-PAR komplekslerinin oluşum süreleri

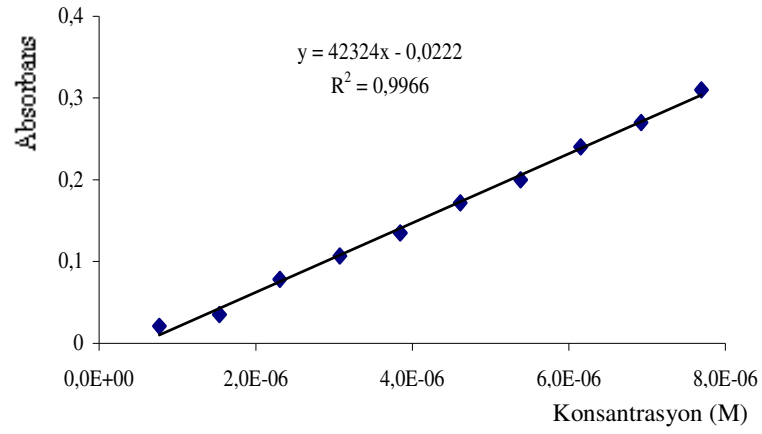
Kompleks	Zaman(sn)	
Fe-PAR	10	Şekil 3.19.
Ni-PAR	40	Şekil 3.20.
Co-PAR	10	Şekil 3.21.

3.2.1.8. Co-PAR, Ni-PAR, Fe-PAR ve Cu-PAR Komplekslerinin Molar Soğurma Katsayılarının Belirlenmesi

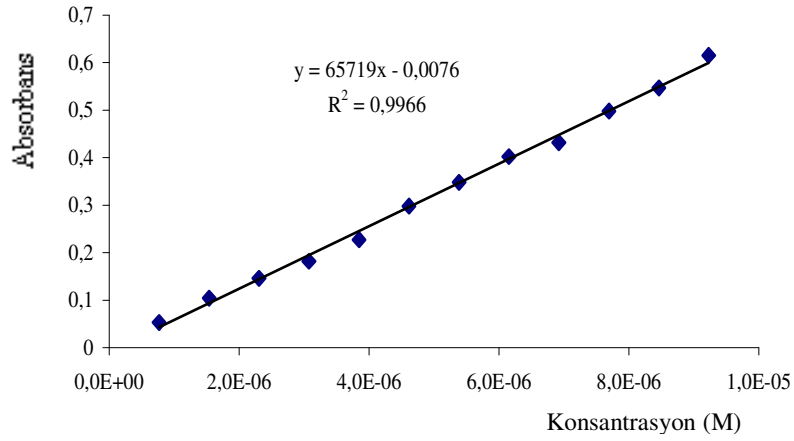
50 mL ’lik balon jöjelere 1×10^{-4} M metal çözeltilerinden 0,1 ile 1 mL arasında değişen hacimlerde ilave edildi, 1×10^{-4} M’lık PAR çözeltisinden 4 mL eklendikten sonra toplam hacim saf su ile 50 mL ye tamamlandı. Bu çözeltilerin belirlenen dalga boyunda absorbans değerleri okunarak kompleks derişimine karşı grafiğe geçirildi. Elde edilen doğruların denklemlerinden metal-PAR komplekslerinin molar soğurma katsayıları bulundu.



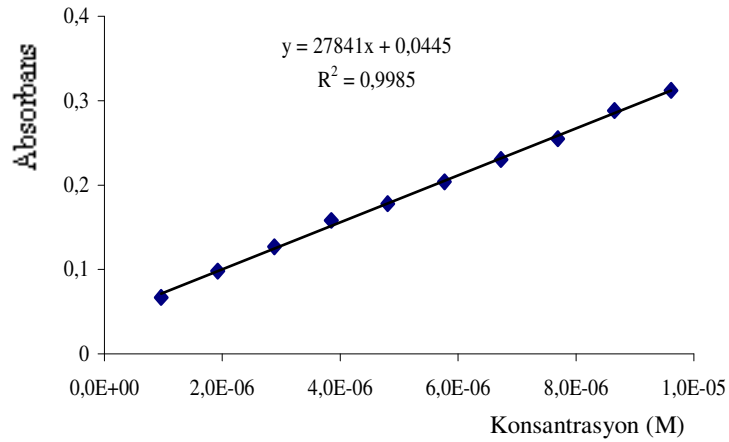
Şekil 3.22. Fe-PAR kompleksinin belirlenen dalga boyunda ϵ 'nin bulunması



Şekil 3.23. Cu-PAR kompleksinin belirlenen dalga boyunda ϵ 'nin bulunması



Şekil 3.24. Co-PAR kompleksinin belirlenen dalga boyunda ϵ 'nin bulunması



Şekil 3.25. Ni-PAR kompleksinin belirlenen dalga boyunda ϵ 'nin bulunması

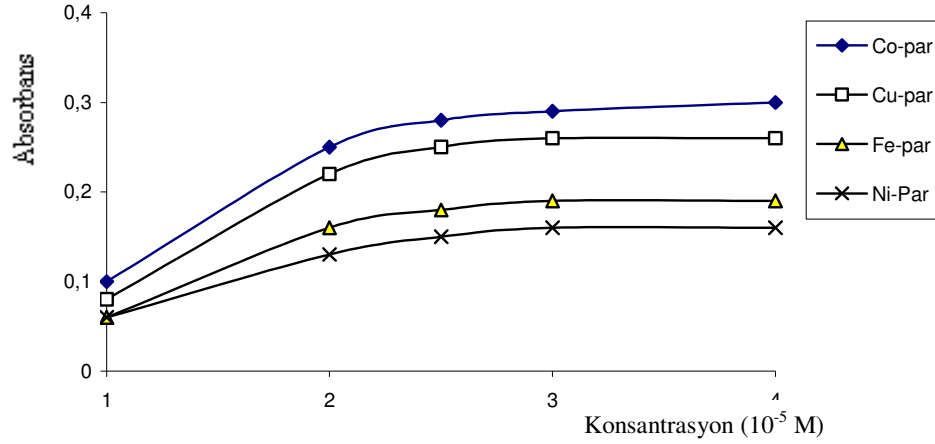
Metal-PAR komplekslerinin ϵ değerleri Tablo 3.6’da verilmiştir.

Tablo 3.6. Metal-PAR komplekslerinin ϵ değerleri

Kompleks	ϵ	
Fe-PAR	5.4×10^4	şekil 3.22.
Cu-PAR	4.2×10^4	şekil 3.23.
Co-PAR	6.5×10^4	şekil 3.24.
Ni-PAR	2.7×10^4	şekil 3.25.

3.2.1.9. 4-(2-piridilazo) rezorsinol Ligandının Konsantrasyonun Co-PAR, Ni-PAR, Fe-PAR ve Cu-PAR Komplekslerine Etkisi

50 mL lik erlenlere 1×10^{-4} M Fe^{+3} , Ni^{+2} , Cu^{+2} ve Co^{+3} çözeltilerinden 5 mL eklendi. 1×10^{-4} M PAR çözeltilisinden çeşitli hacimlerde (5, 10, 15, 20, ... mL) ilave edilerek toplam hacim saf su ile 50 mL ye tamamlandı. Çözeltilerin absorbsansları okunarak PAR konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirildi.



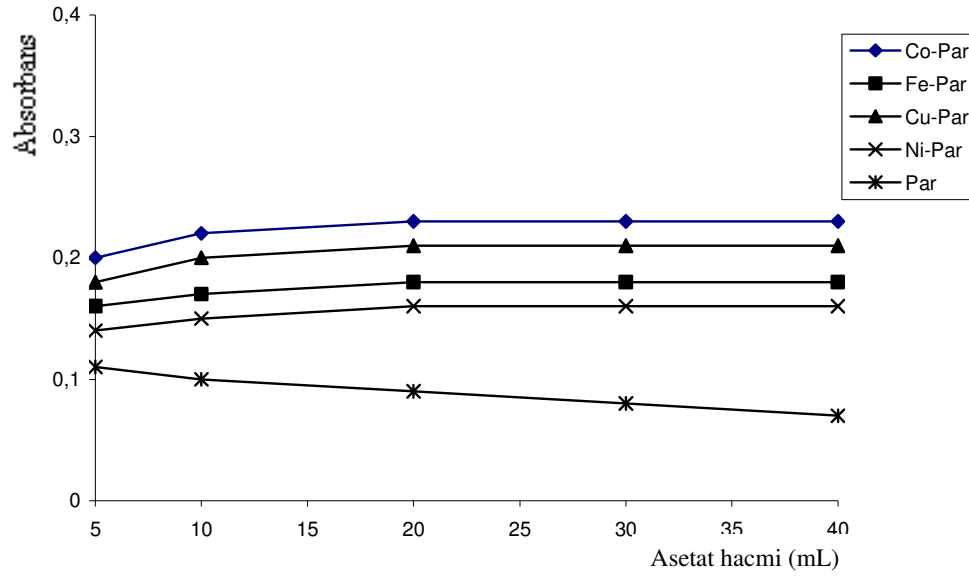
şekil 3.26. 4-(2-piridilazo) rezorsinol ligandının konsantrasyonun Co-PAR, Ni-PAR, Fe-PAR ve Cu-PAR komplekslerine etkisi

şekil 3.26’da görüldüğü gibi metal-PAR kompleksleri için gerekli olan optimum ligand (PAR) konsantrasyonu 1×10^{-5} M’lık metal konsantrasyonlarına karşılık 2.5×10^{-5} M bulundu ($[\text{PAR}]/[\text{Metal}]$ 2,5/1)

3.2.1.10. Co-PAR, Ni-PAR, Fe-PAR ve Cu-PAR Komplekslerinin Oluşumuna Asetat Derişiminin Etkisi

50 mL’lik erlenlere 1×10^{-4} M stok metal çözeltilerinden 1’er mL alındı. 1×10^{-4} M CH_3COONa çözeltilisinden farklı hacimlerde (5 ile 40 mL aralığında)

eklenerek saf suyla 50 mL ye tamamlandı. İlave edilen asetat çözeltisinin hacmine karşı Metal-PAR komplekslerinin absorbens değerleri grafiğe alındı.



Şekil 3.27. Co-PAR, Ni-PAR, Fe-PAR ve Cu-PAR komplekslerinin oluşumuna asetat çözeltisinin etkisi

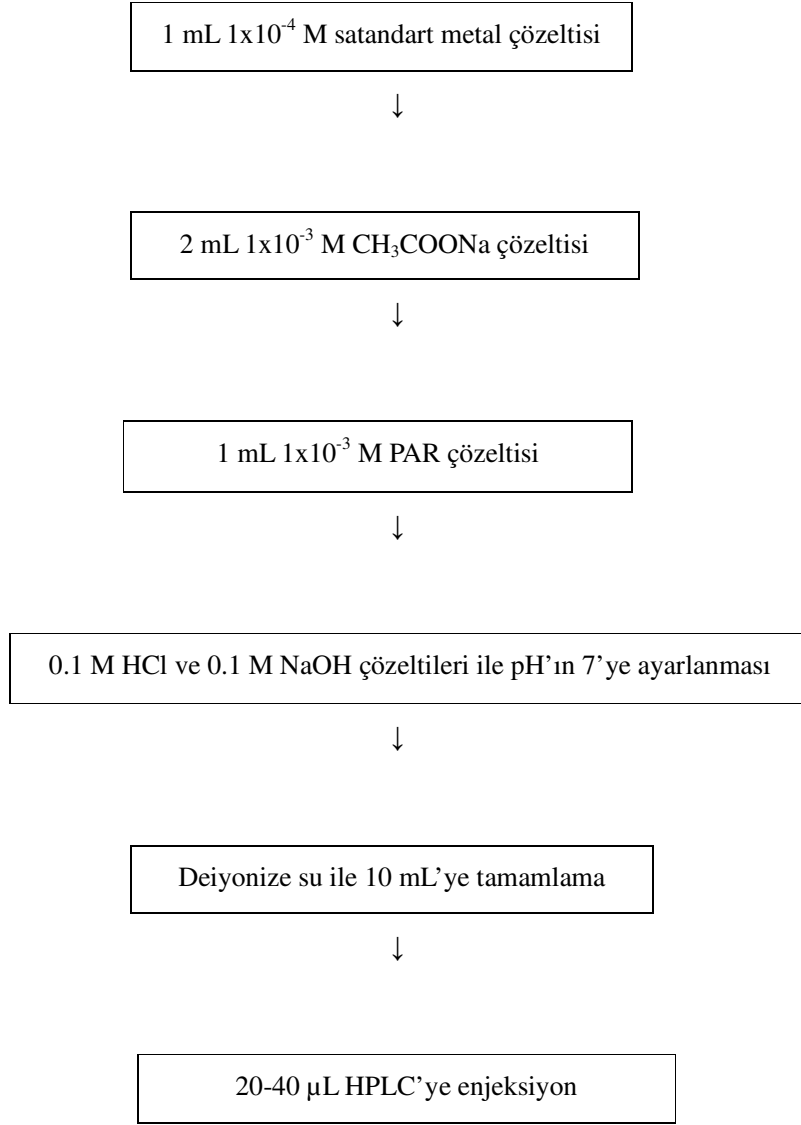
Şekil 3.27’de görüldüğü gibi 1mL, 1×10^{-4} M metal-PAR kompleksleri için gerekli olan optimum 1×10^{-4} M asetat çözeltisinin hacmi 20 mL bulundu. [Asetat]/[Metal] 20:1.

3.2.2. HPLC İle Yapılan Çalışmalar

3.2.2.1. Mobil Faz Bileşimiyle İlgili Denemeler

Co-PAR, Ni-PAR, Fe-PAR ve Cu-PAR komplekslerinin ayrılmasında C_{18} (ODS) kolonda alıkonma şartlarını belirlemek amacıyla mobil faz olarak metanol, asetonitril, su ve etil alkol reaktifleri farklı oranlarda karıştırılarak her bir mobil faz bileşimi için komplekslerin kromatogramları alındı. Mobil faz bileşiminin yanı sıra optimum ayırma şartlarını belirlemek için; akış hızı, dalga boyu, absorpsiyon aralığı, maskeleyici reaktifler ve pH değişim parametreleri araştırıldı. Mobil faz optimizasyonu için yapılan denemeler Tablo 3.7’de belirtilmiştir.

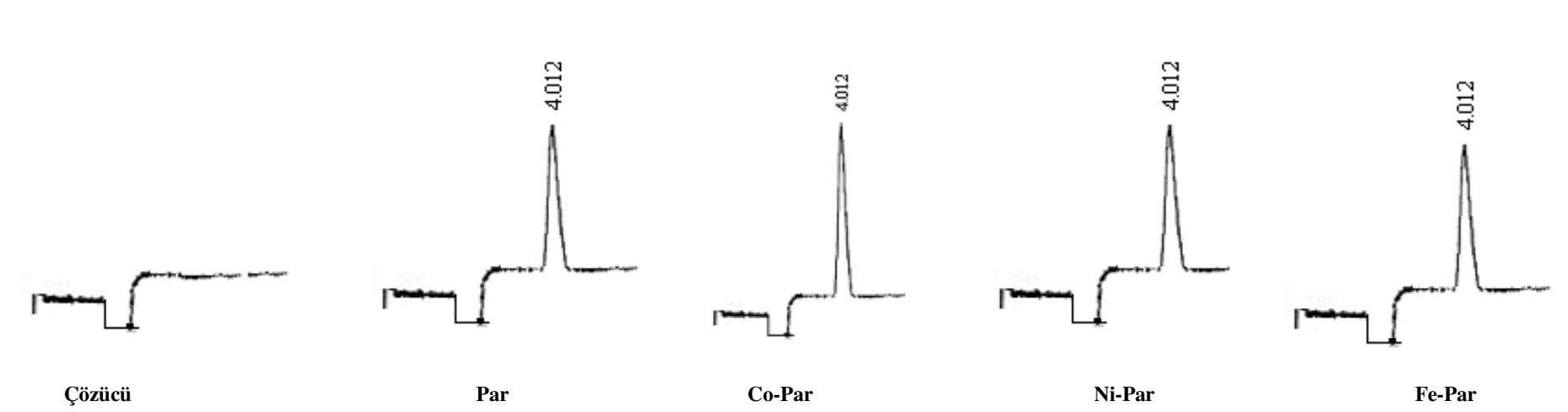
Enjeksiyonu yapılan standart çözeltilerin hazırlanma aşamaları şekil 3.28’de gösterilmiştir.



Şekil 3.28. HPLC enjeksiyonunda kullanılan standart metal çözeltilerinin hazırlanma aşamaları

Tablo 3.7. Mobil fazla ilgili denemeler

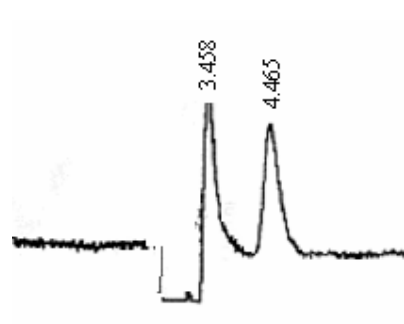
<u>Mobil faz bileşimi</u>	<u>Oran %(v/v)</u>	<u>Mobil faz pH'ı</u>	<u>Dalga Boyu (λ)</u>	<u>Akış hızı (mL/dk)</u>	<u>Kromatogramlar</u>	<u>Kolon</u>
Su	100	7,5	500	0,8	Şekil 3.29	Spelco
Metanol	100	5,5	500	0,8	Şekil 3.30	“
Etanol/su	60/40	6,5	500	0,8	Şekil 3.31	“
Metanol/Su	55/45	6	500	0,8	Şekil 3.32	“
Metanol/Su/Asetat çöz	60/35/5	5	500	0,8	Şekil 3.33	“
Metanol/Su/Asetat çöz	70/25/5	5	500	0,8	Şekil 3.34	“
Metanol/Su/Asetat çöz	60/30/10	5	500	0,8	Şekil 3.35	“
Metanol/Su/Asetat çöz	55/30/15	5,5	500	0,8	Şekil 3.36	“
Metanol/Su/Asetat çöz	50/30/20	4	500	0,8	Şekil 3.37	“
Etanol/Su/Asetonitril/Asetat çöz.	50/20/20/10	6,5	500	0,8	Şekil 3.38	“
Metanol/Su/Asetat çöz.	55/40/5	7,7	500	0,6	Şekil 3.39	Phenomex
Metanol/Su/Asetat çöz.	52/43/5	5,2	500	0,6	Şekil 3.40	“
Metanol/Su/Asetat çöz	60/35/5	7,2	500	0,6	Şekil 3.41	“
Metanol/Su/Fosfat çöz.	60/35/5	6,7	500	0,6	Şekil 3.42	“
Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çöz.	55/30/10/5	7,5	500	0,7	Şekil 3.43	“
Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çöz.	63/27/5/5	4,5	500	0,6	Şekil 3.44	“
Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çöz.	63/27/5/5	8,2	500	0,6	Şekil 3.45	“
Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çöz.	57/33/5/5	4,9	500	0,6	Şekil 3.46	“
Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çöz.	35/30/35/2,5	7	500	0,6	Şekil 3.47	“
Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çöz.	30/37/30/3	5,4	500	0,6	Şekil 3.48	“
Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çöz.	30/37/30/3	6,5	500	0,6	Şekil 3.49	“
Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çöz.	28/41/28/3	6,8	500	0,6	Şekil 3.50	“
Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çöz.	24/30/34/3	7	500	0,6	Şekil 3.51	“
Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çöz.	55/40/2,5/2,5	4,5	PDA	0,6	Şekil 3.52	“
Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çöz.	55/40/2,5/2,5	6	PDA	0,6	Şekil 3.53	“
Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çöz.	55/40/2,5/2,5	7,5	PDA	0,6	Şekil 3.54	“
Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çöz.	55/40/2,5/2,5	3,6	PDA	0,6	Şekil 3.55	“
Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çöz.	60/35/2,5/2,5	5,3	PDA	0,6	Şekil 3.56	“
Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çöz.	60/35/2,5/2,5	6,5	PDA	0,6	Şekil 3.57	“
Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çöz.	55/40/2,5/2,5	5,3	PDA	0,6	Şekil 3.58	“
Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çöz.	60/35/2,5/2,5	5,3	PDA	0,6	Şekil 3.59	“
Metanol/Su/Asetonitril/Asetat çöz.	60/35/2,5/2,5	6,2	PDA	0,6	Şekil 3.60	“



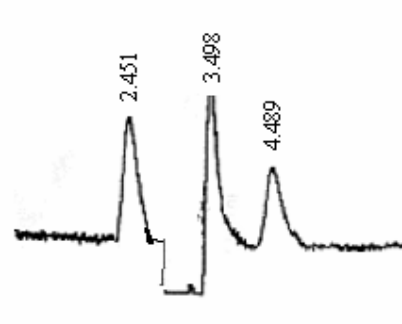
Şekil 3.29. Su mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,8 mL/dk, pH= 7 Kolon: Spelco



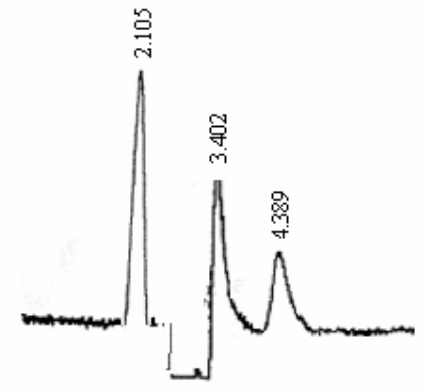
Çözücü



Par

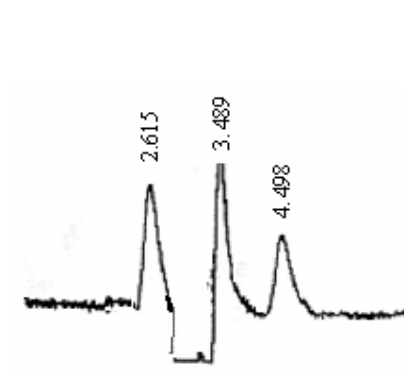


Co-Par

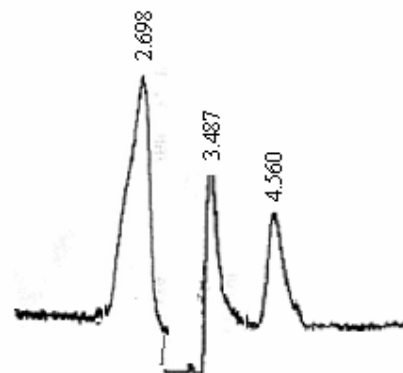


Ni-Par

17

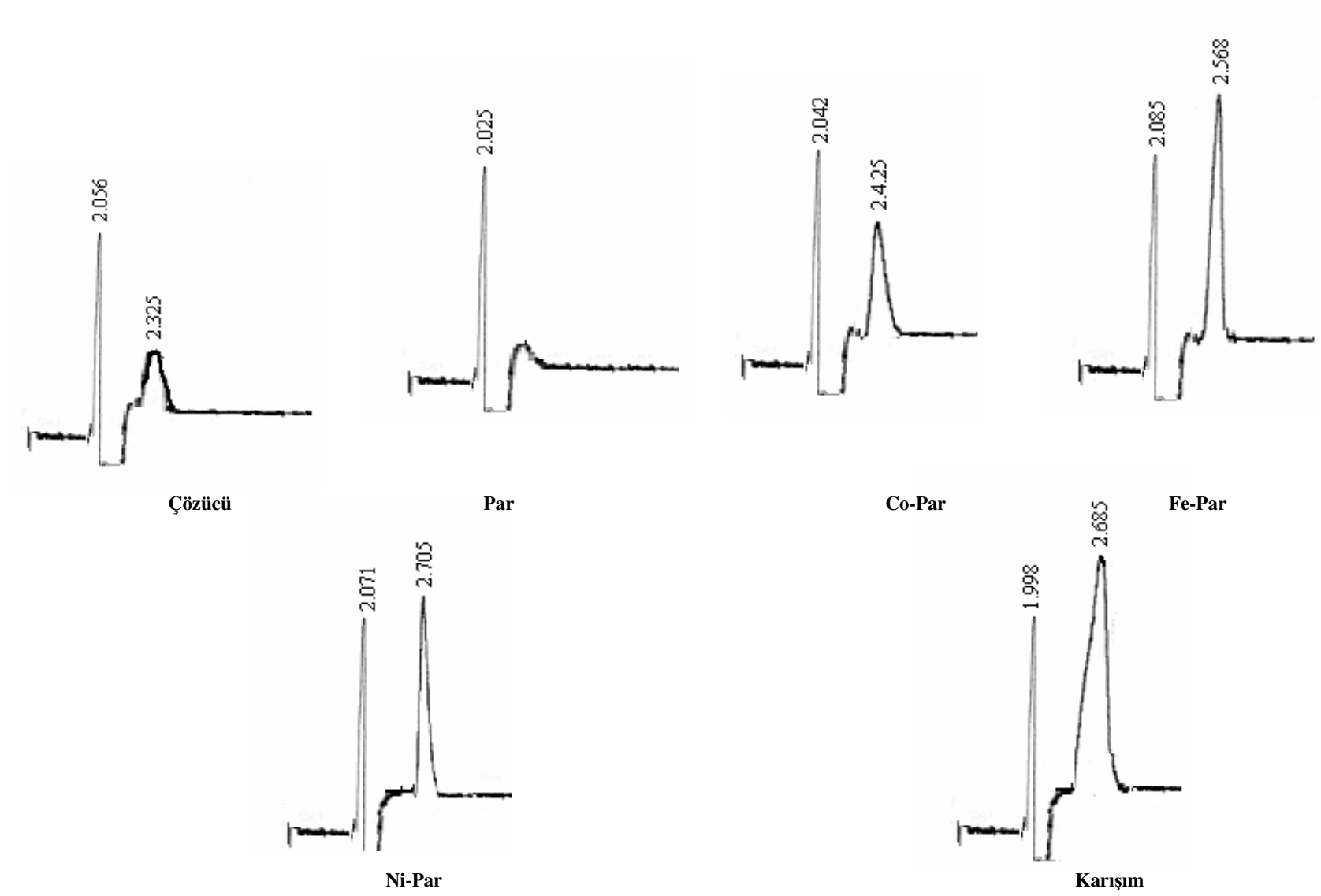


Fe-Par

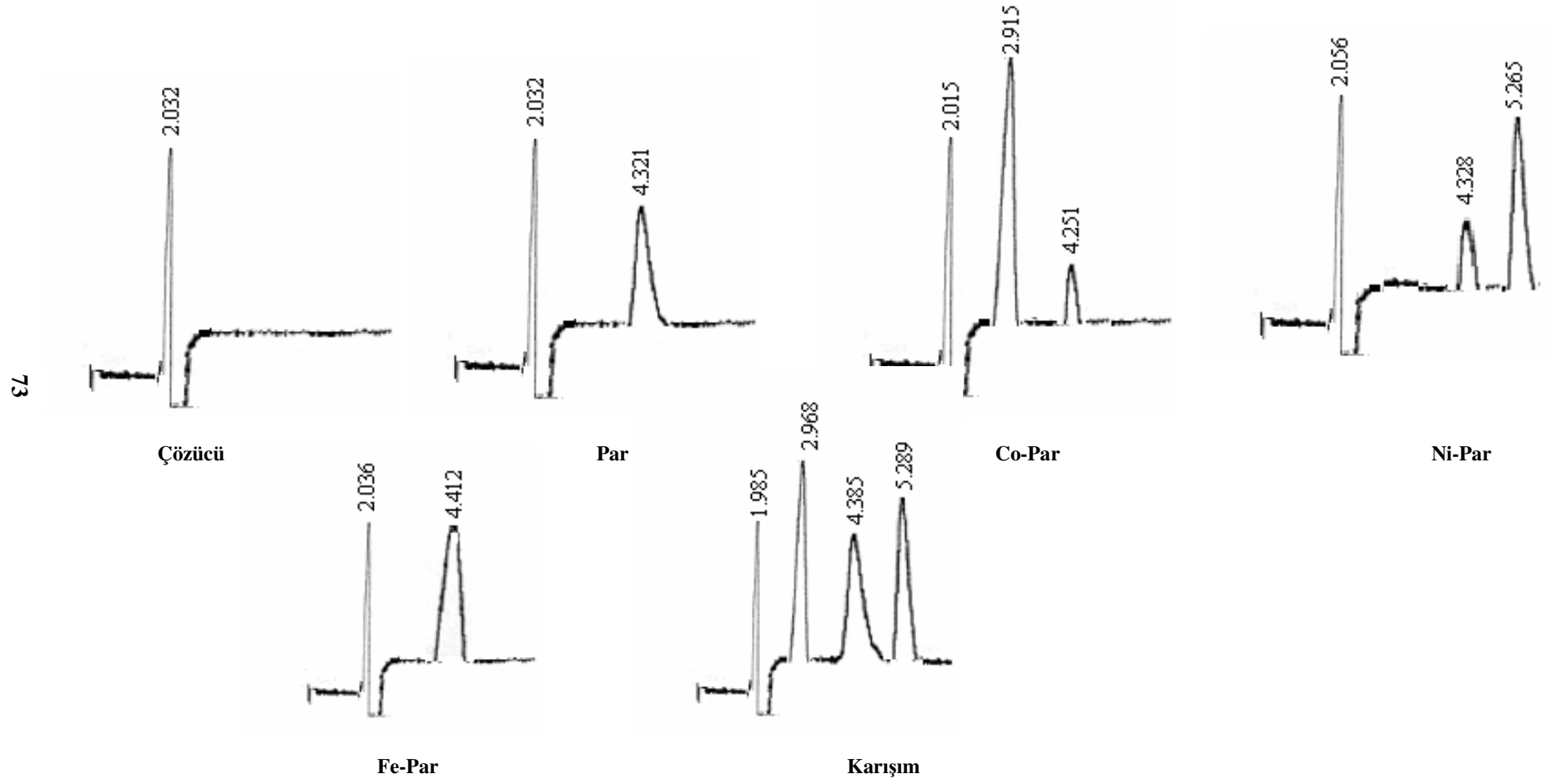


Karışım

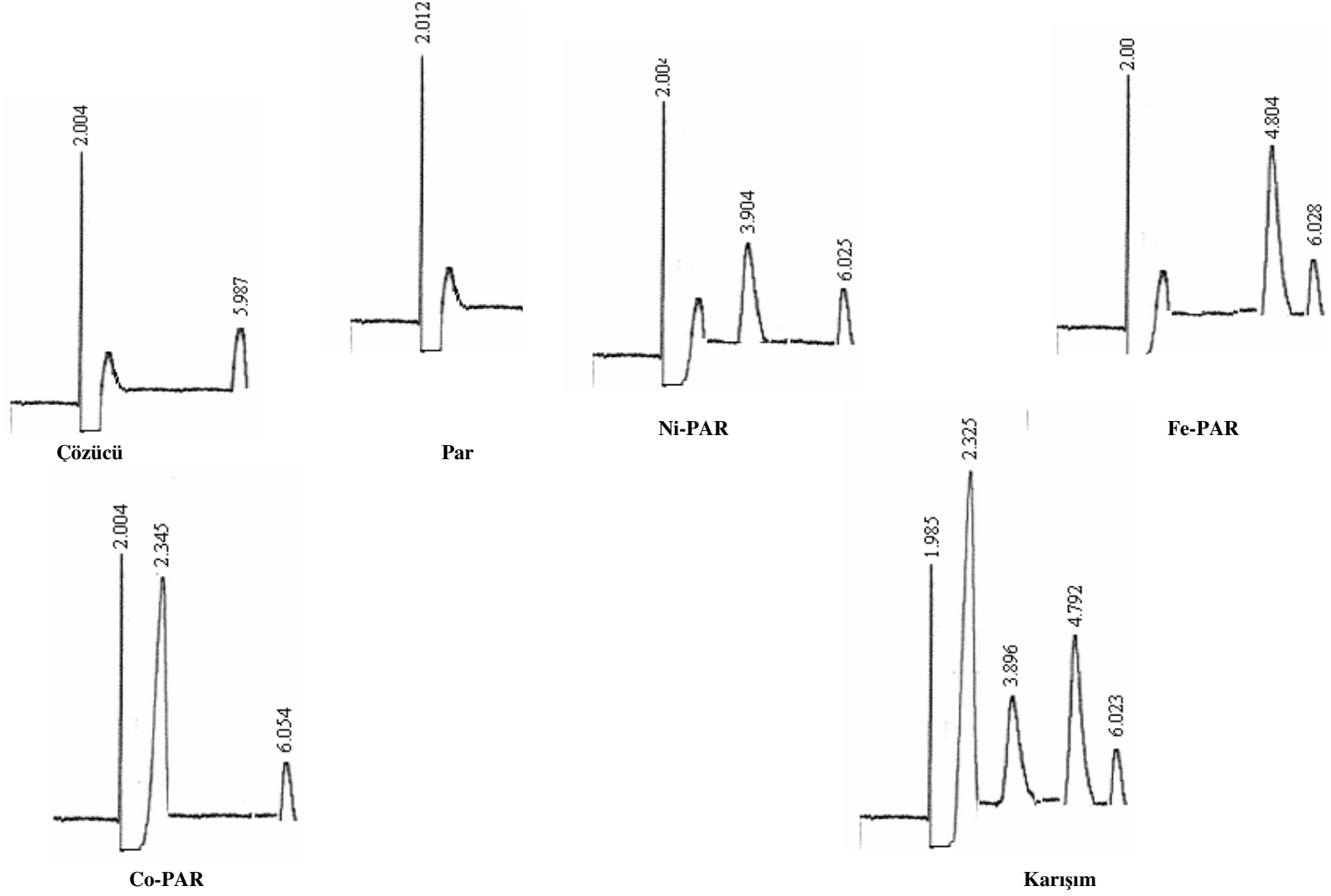
Şekil 3.30. Saf metanol mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,8 mL/dk, pH= 5,5 Kolon: Spelco



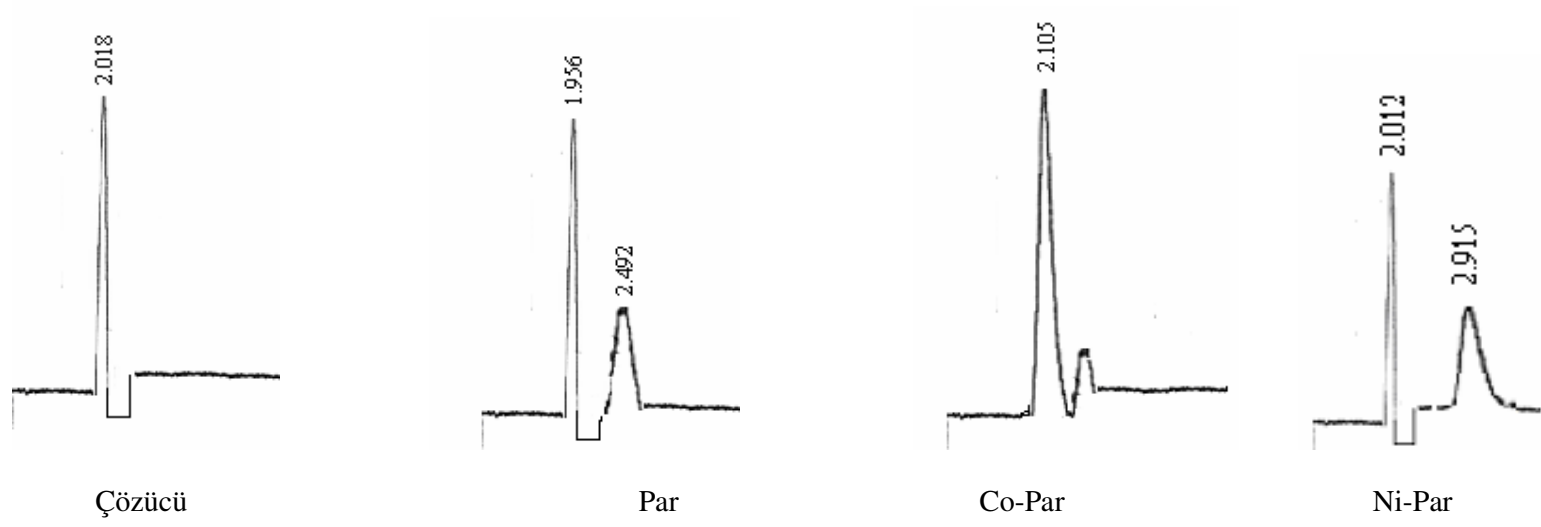
Şekil 3.31. Etanol/su/:60/40 mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,8 mL/dk, pH=6,5 Kolon: Spelco



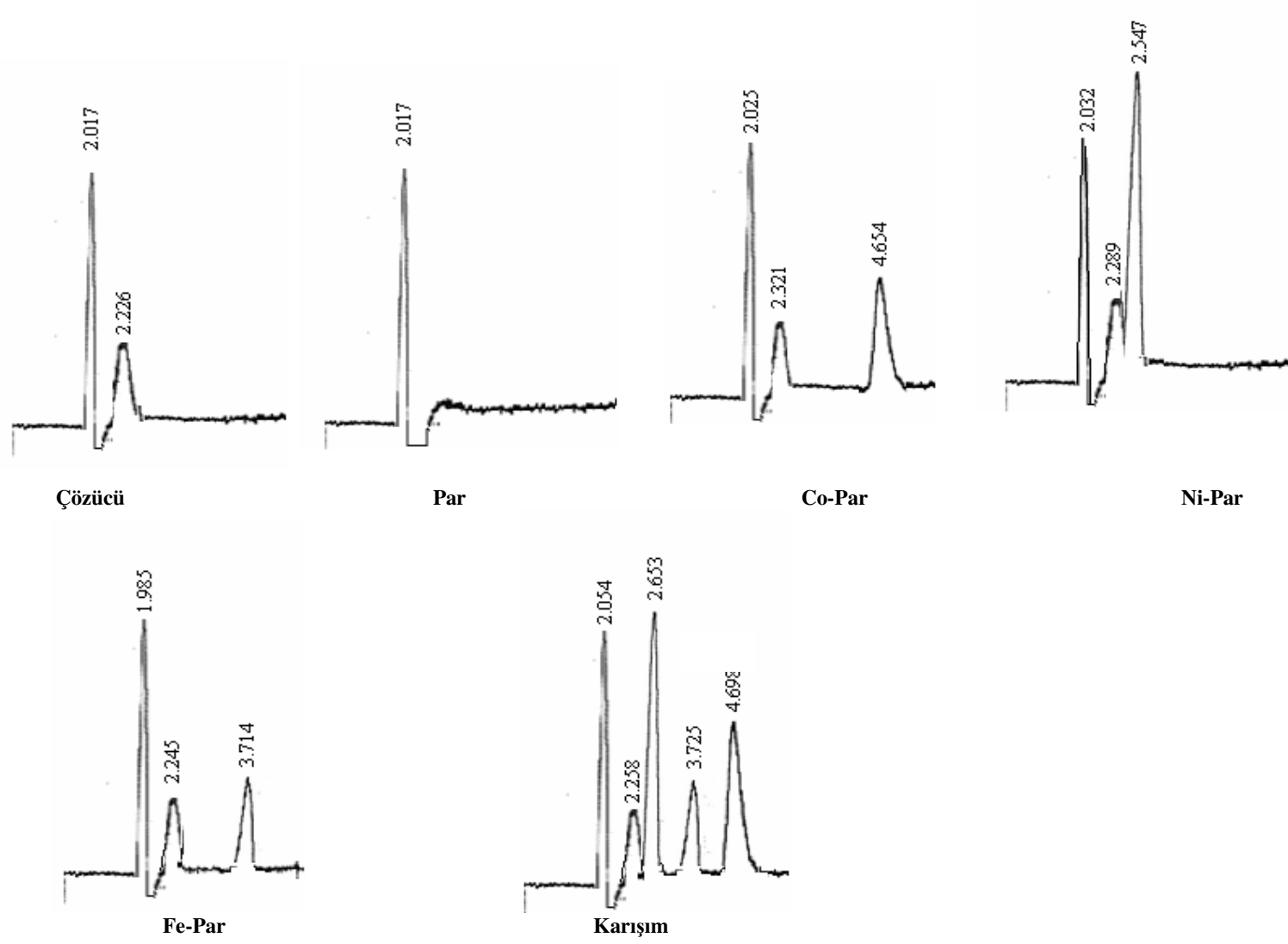
Şekil 3.32. Metanol/su/:55/45 mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,8 mL/dk, pH=6 Kolon: Spelco



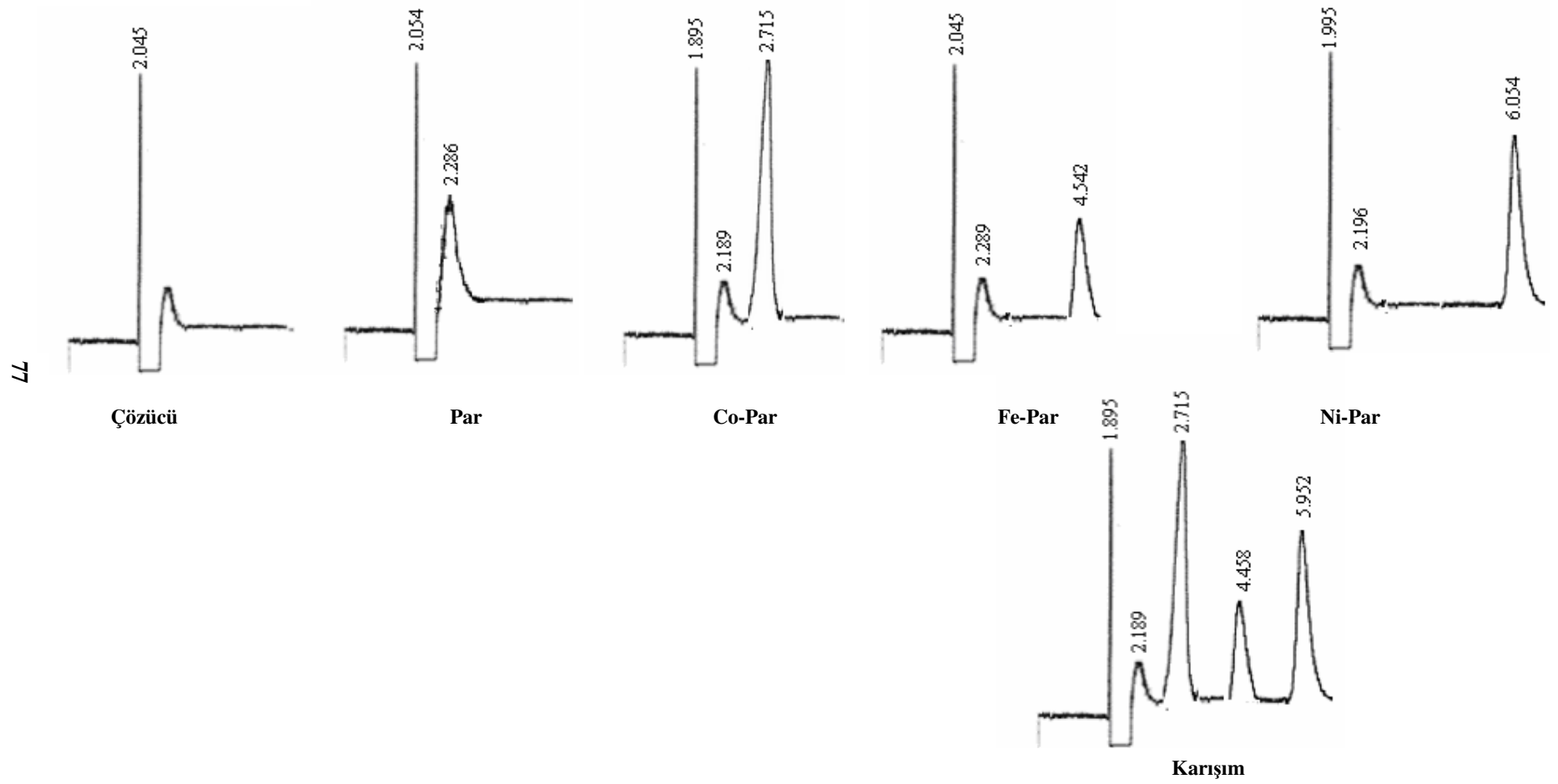
Şekil 3.33. Metanol/su/asetat çözeltisi/60/35/5 mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,8 mL/dk, pH=5 Kolon: Spelco



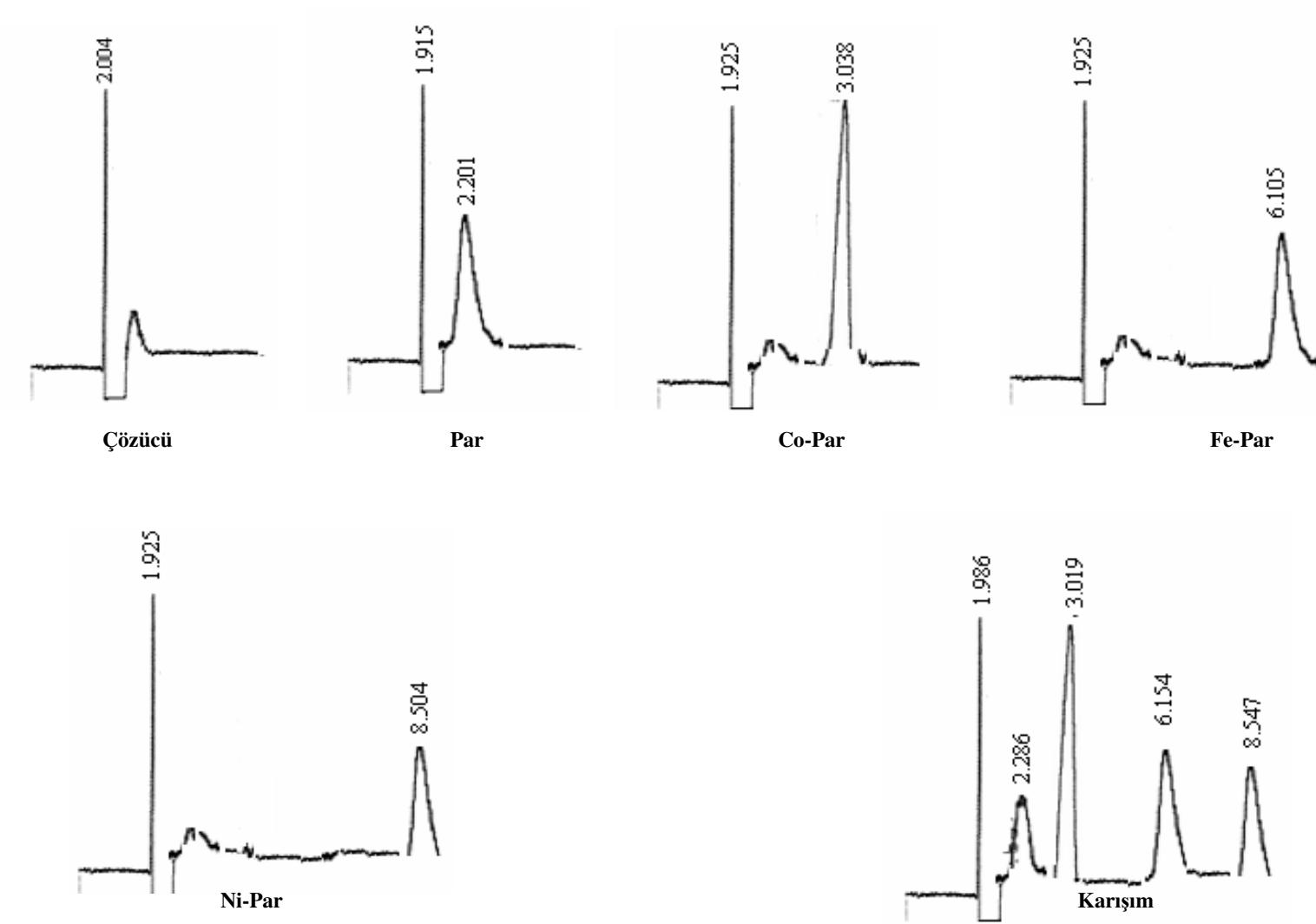
Şekil 3.34. Metanol/su/asetat çözeltisi:70/25/5 mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,8 mL/dk, pH=6 Kolon: Spelco



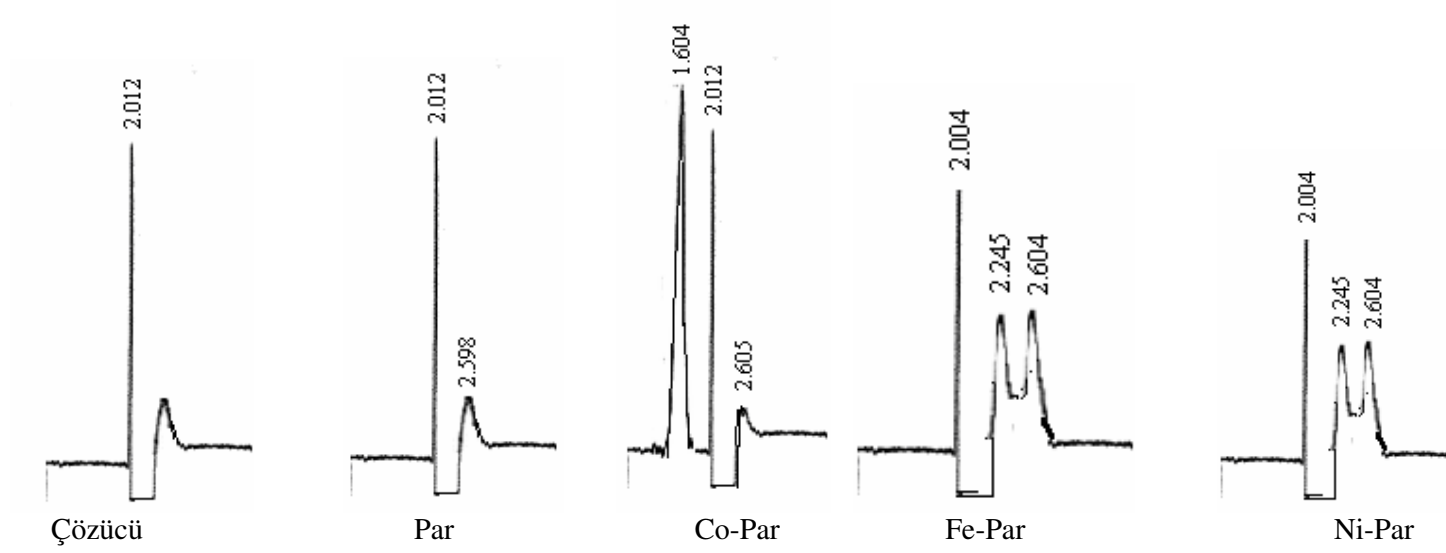
Şekil 3.35. Metanol/su/asetat çözeltisi/:60/30/10 mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,8 mL/dk, pH=5 Kolon: Spelco



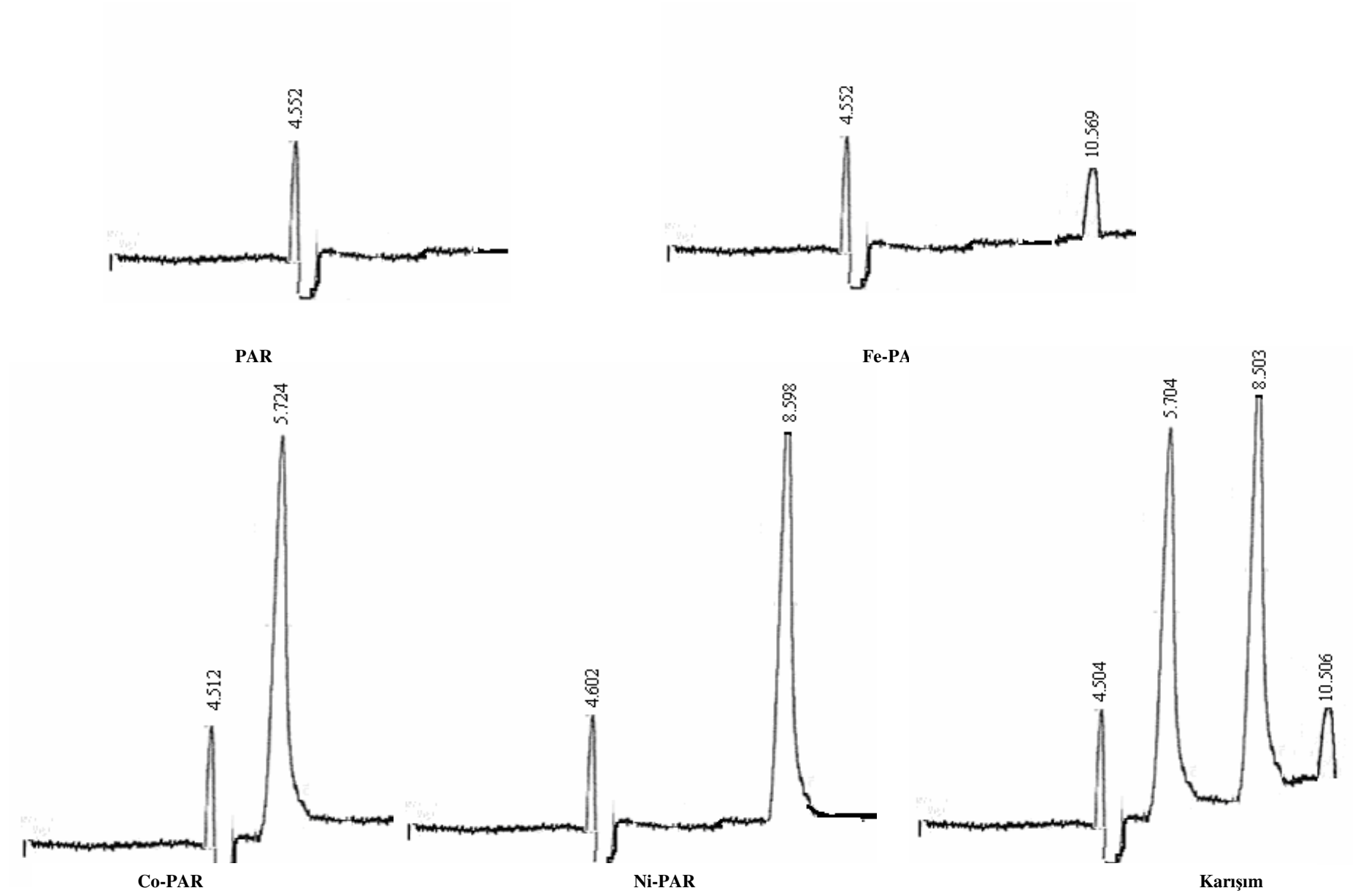
Şekil 3.36. Metanol/su/asetat çözeltisi/:55/30/15 mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,8 mL/dk, pH=4,5 Kolon: Spelco



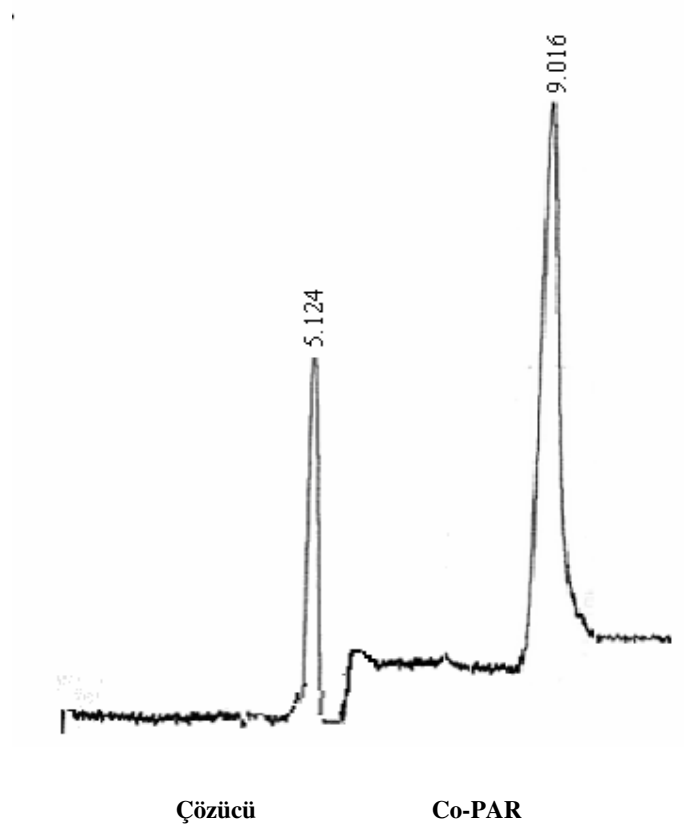
Şekil 3.37. Metanol/su/asetat çözeltisi/:50/30/20 mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,8 mL/dk, pH=4 Kolon: Spelco



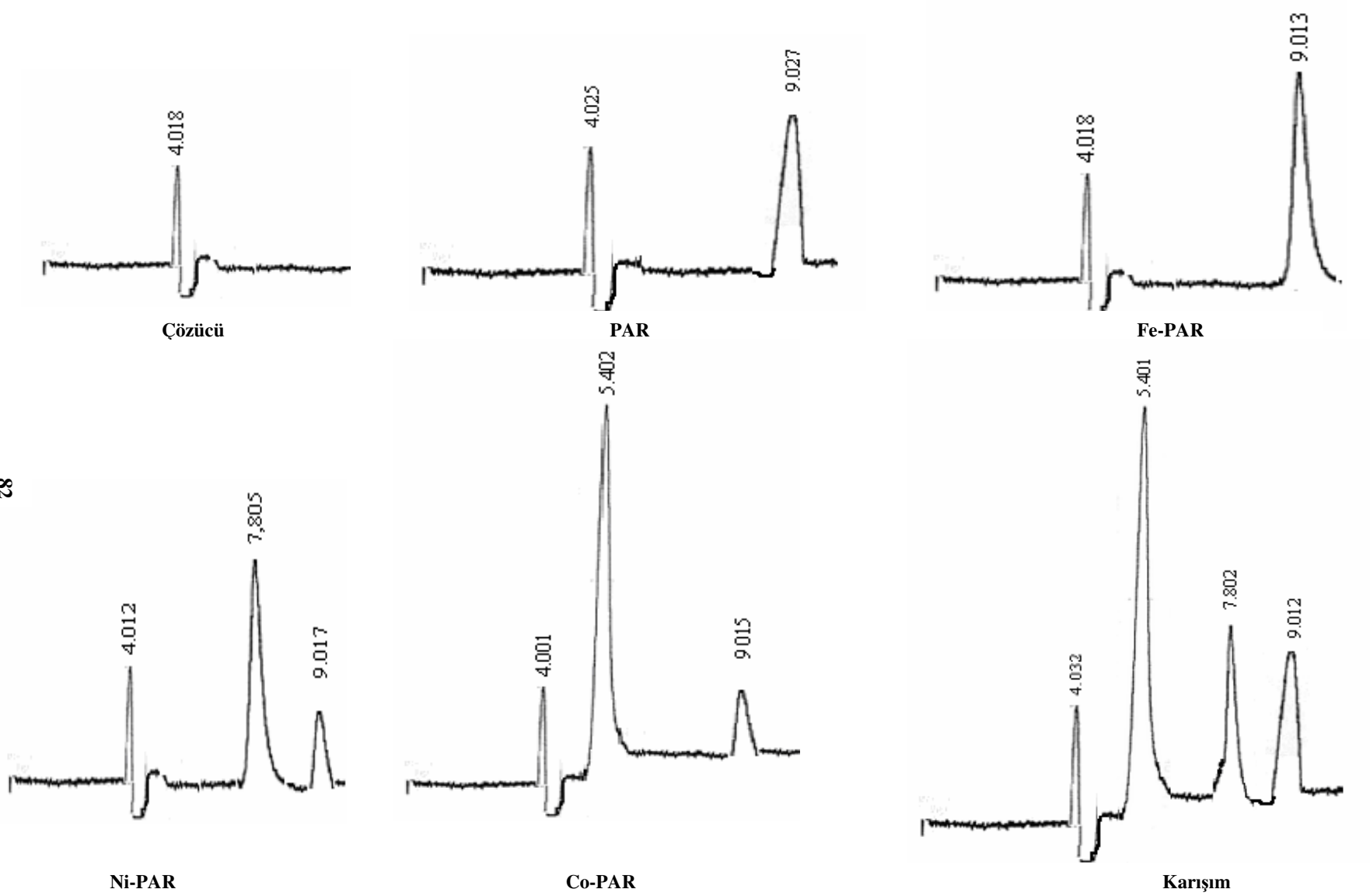
Şekil 3.38. Etanol/asetonitiril/asetat çözeltisi/:50/20/10 mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,8 mL/dk, pH=6,5 Kolon: Spelco



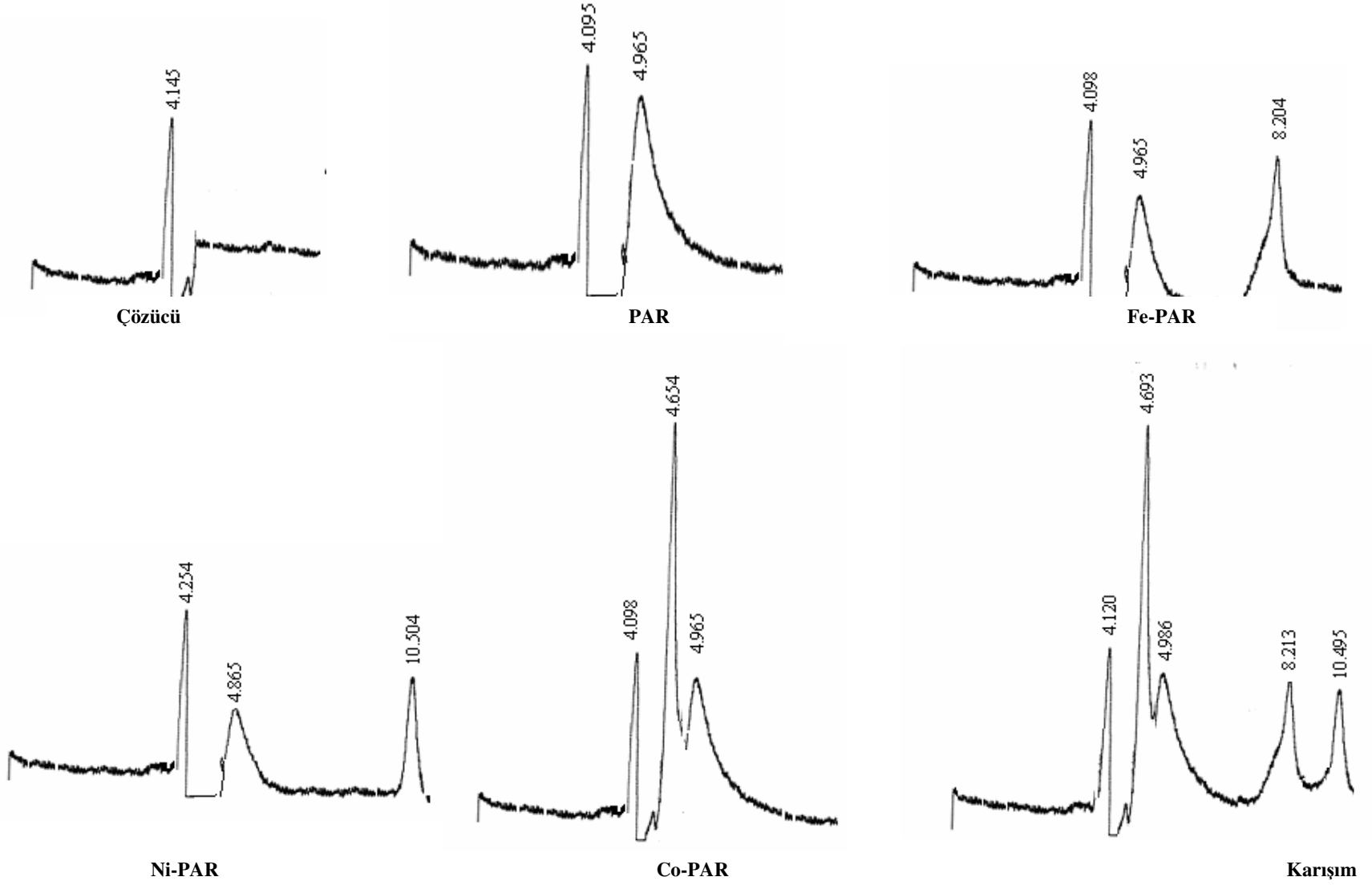
Şekil 3.39. Metanol/su/asetat çözeltisi: 55/40/5 mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,6mL/dk, pH=7,7 Kolon: Phenomex



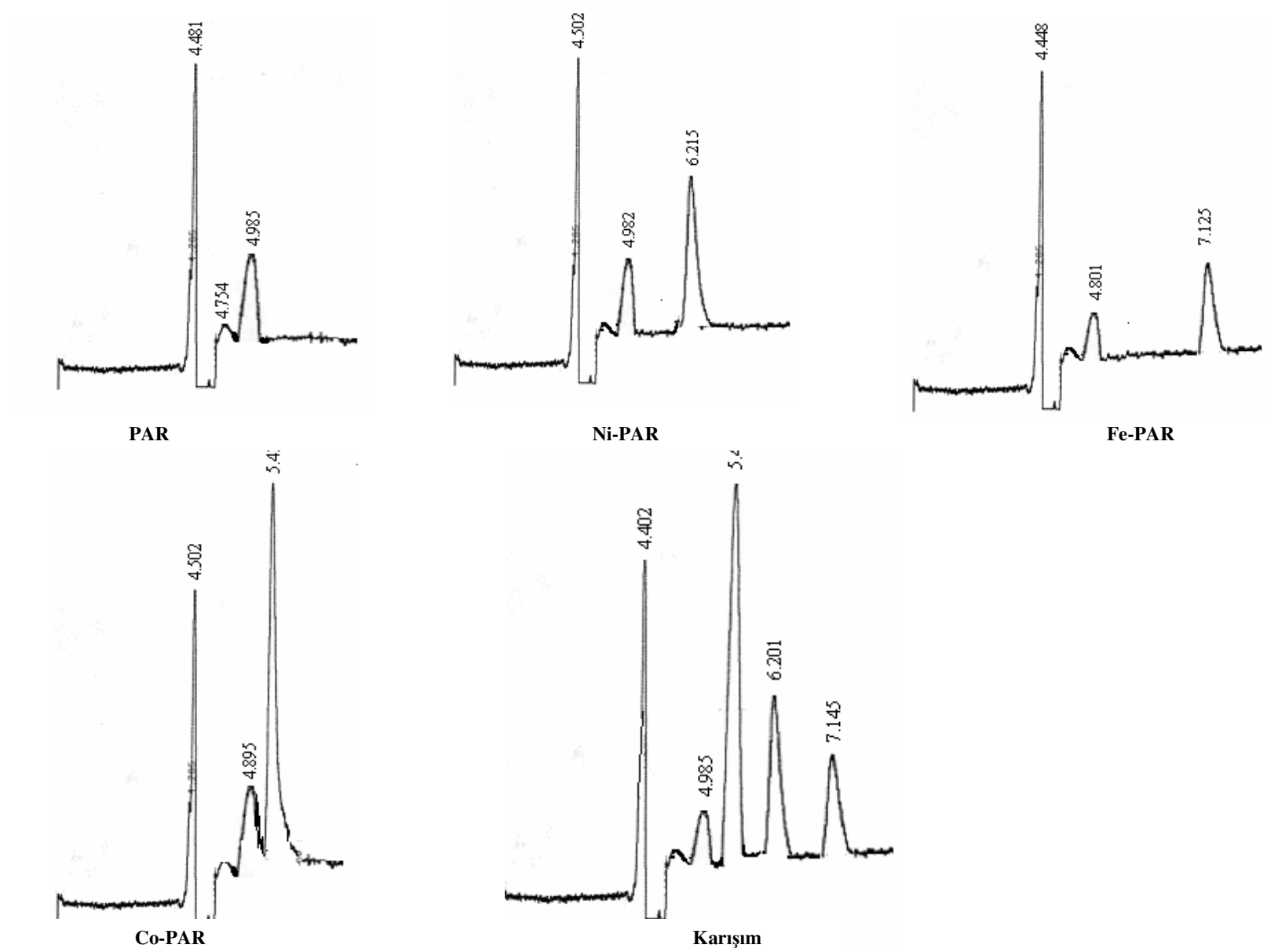
Şekil 3.40. Metanol/su/asetat çözeltisi:52/43/5 mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,6mL/dk, pH=5,2 Kolon: Phenomex



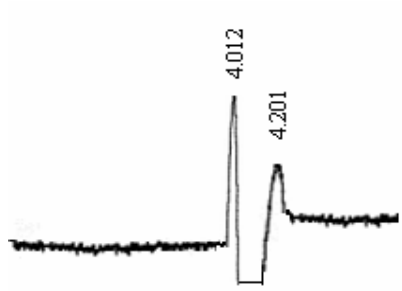
Şekil 3.41. Metanol/su/asetat çözeltisi :60/35/5 mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,6mL/dk, pH=7,2 Kolon: Phenomex



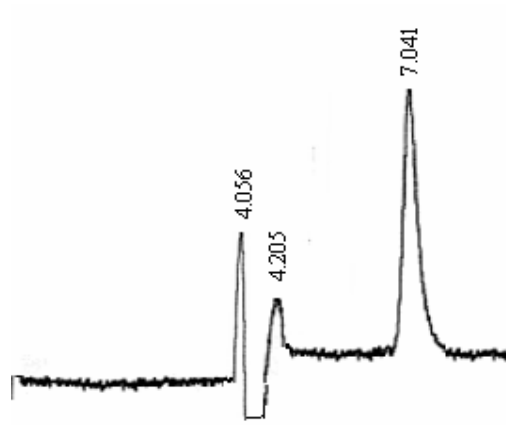
Şekil 3.42. Metanol/Su/KH₂PO₄ Tamponu:60/35/5 mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,6 mL/dk, pH=6,7 Kolon: Phenomex



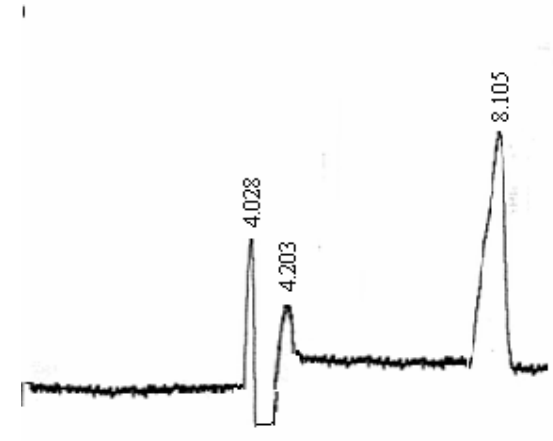
Şekil 3.43. Metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi:55/32/9/4 mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,7 mL/dk, pH=7,5 Kolon: Phenomex



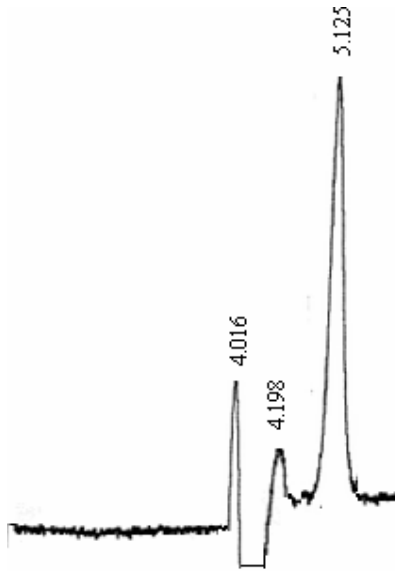
PAR



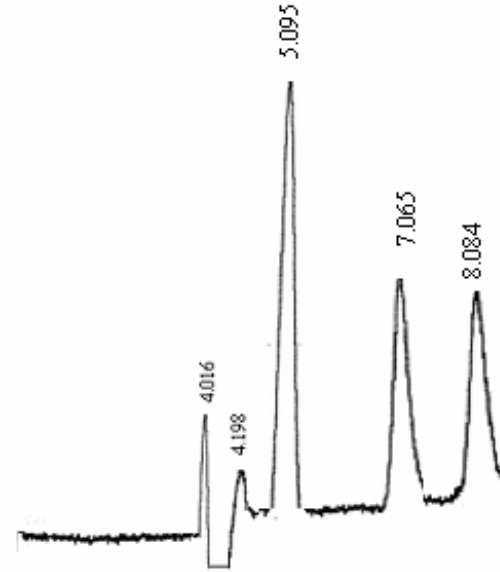
Fe-PAR



Ni-PAR

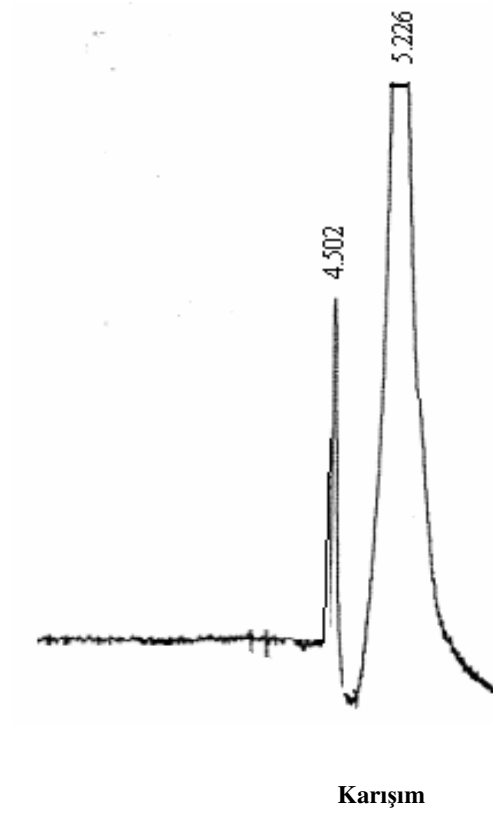


Co-PAR

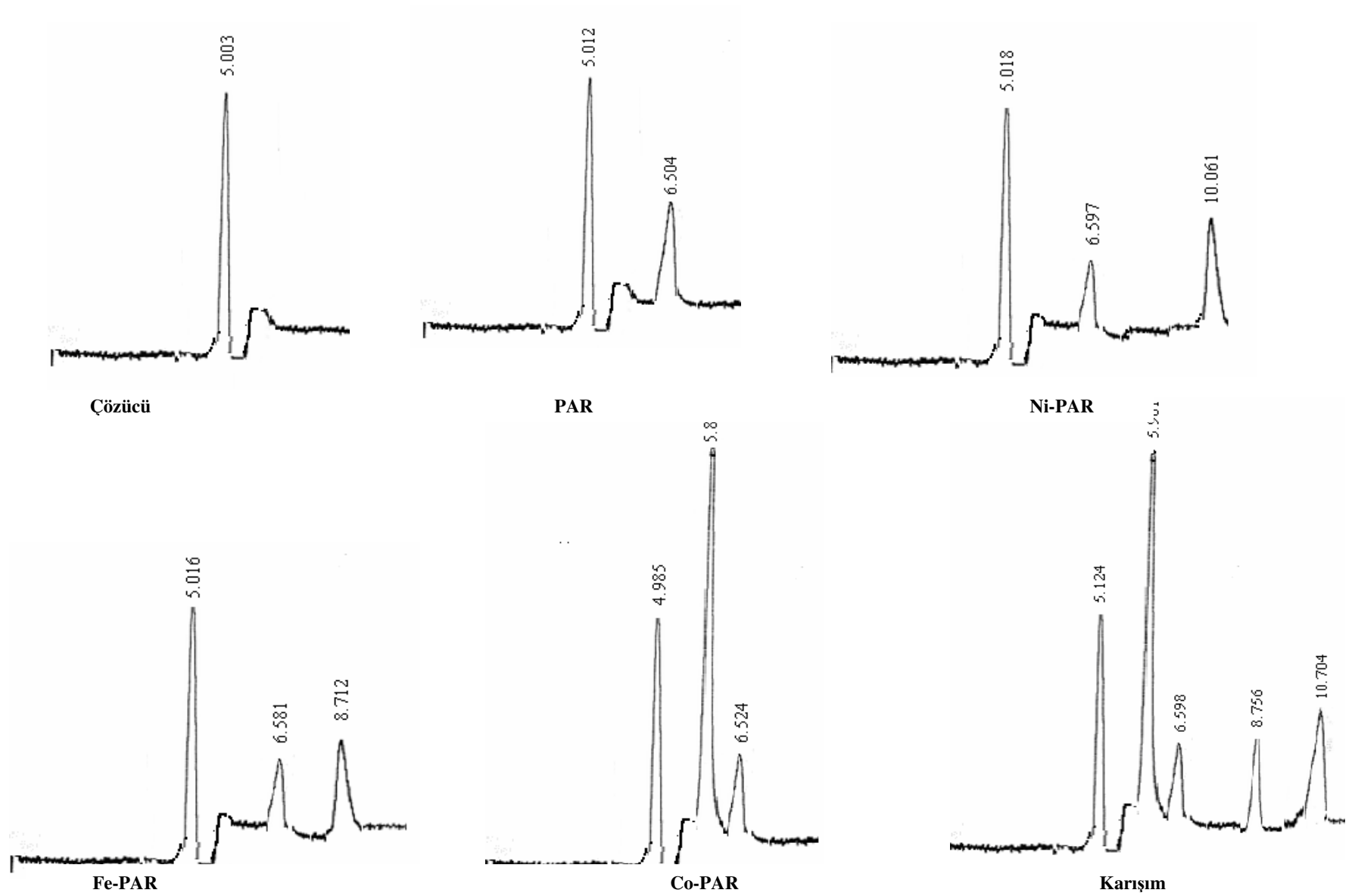


Karışım

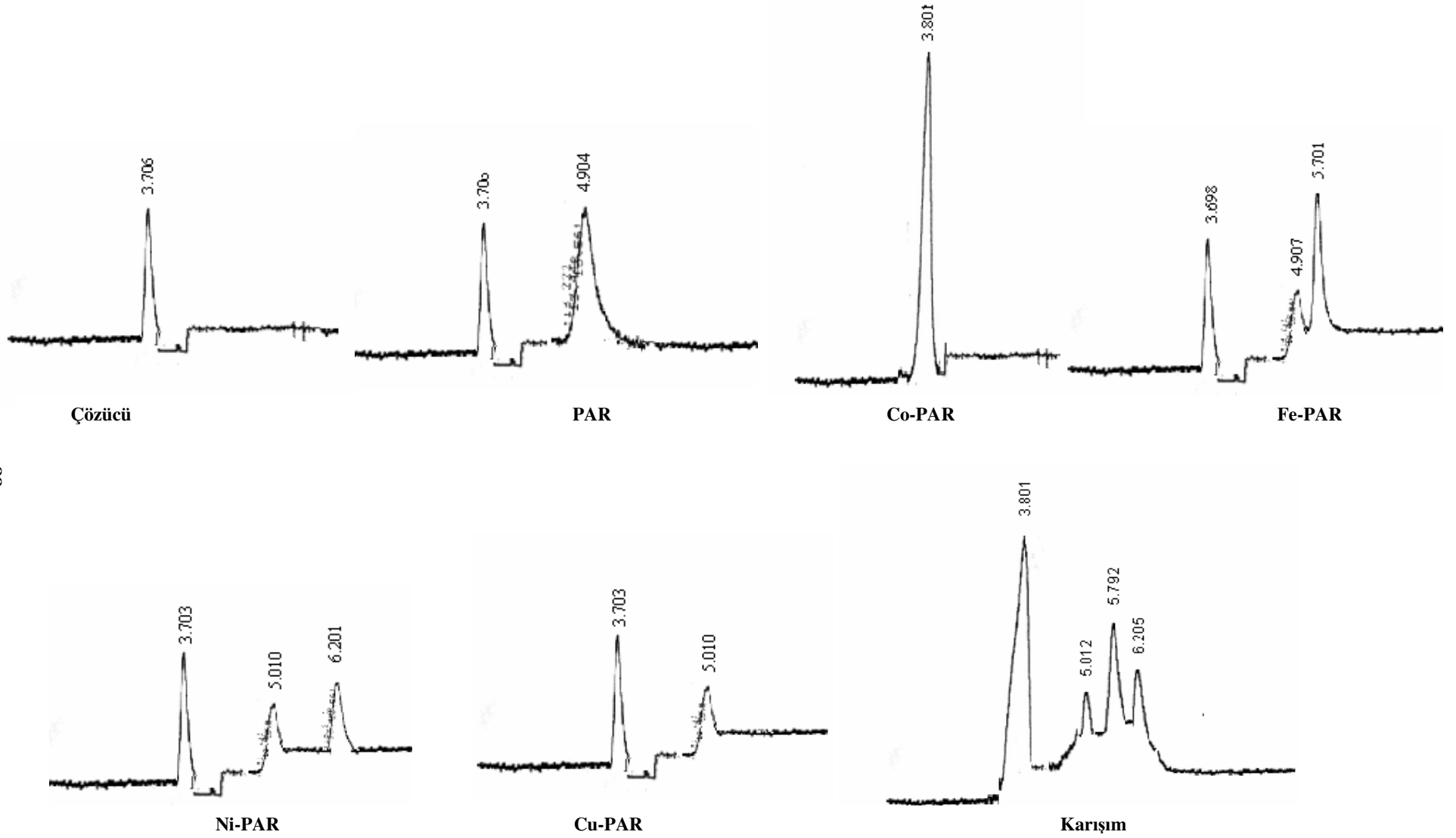
Şekil 3.44. Metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi:63/27/5/5 mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,6mL/dk, pH=4,5 Kolon: Phenomex



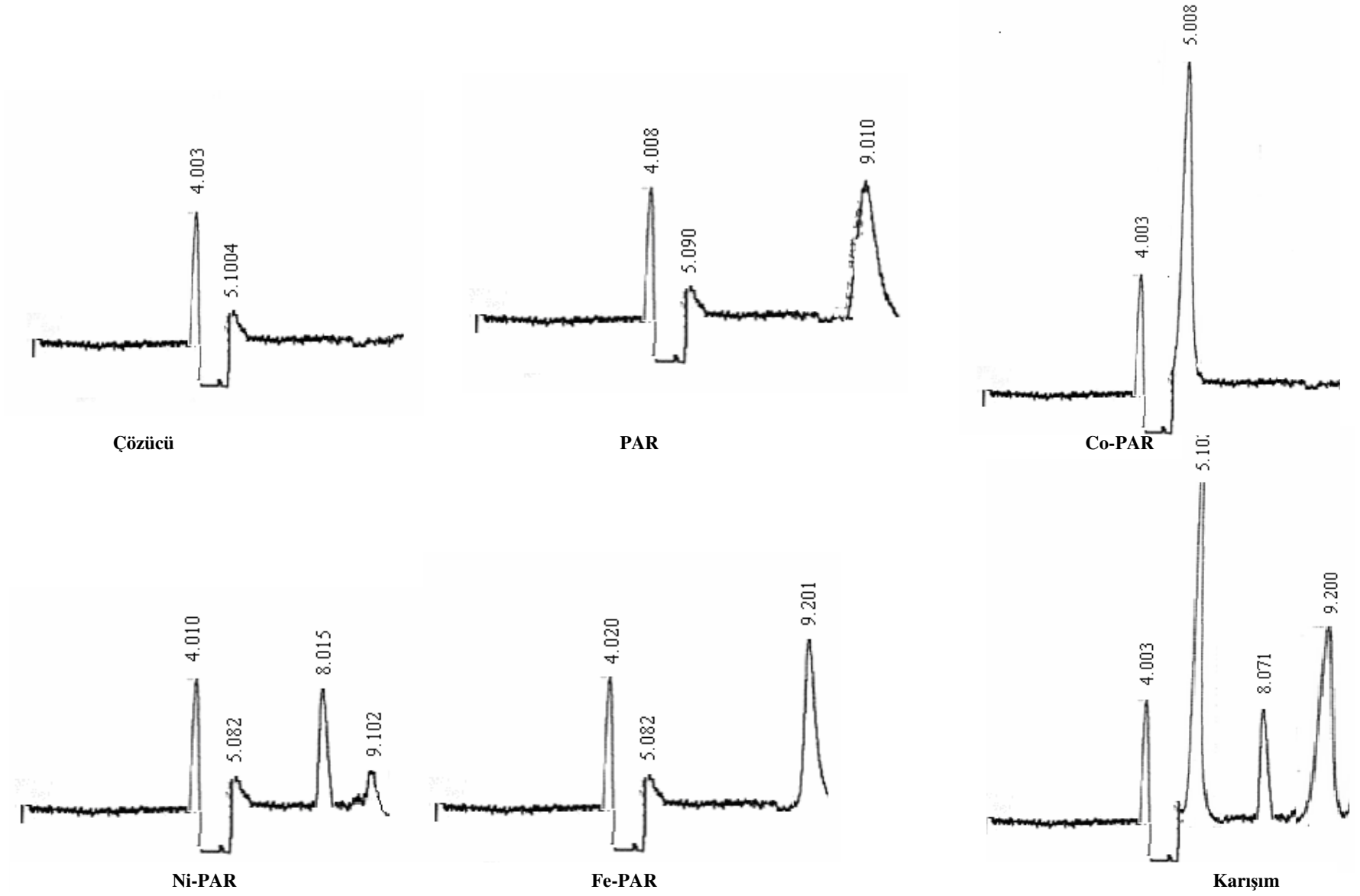
Şekil 3.45. Metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi:63/27/5/5 mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,6mL/dk, pH=8,5 Kolon: Phenomex



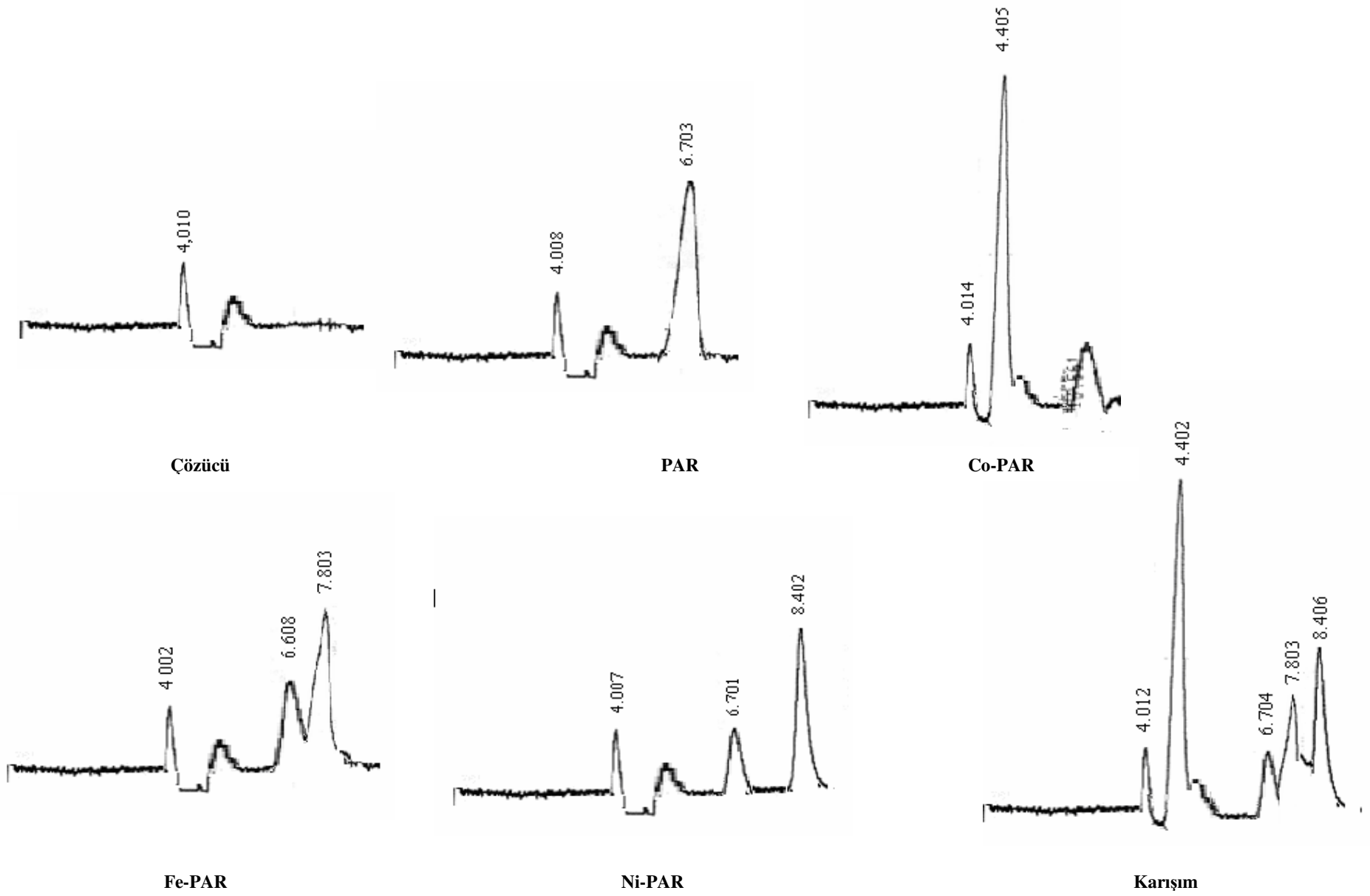
Şekil 3.46. Metanol/asetonitril/su/asetat çözeltisi:57/5/33/5 mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,6mL/dk, pH=4,9 Kolon: Phenomex



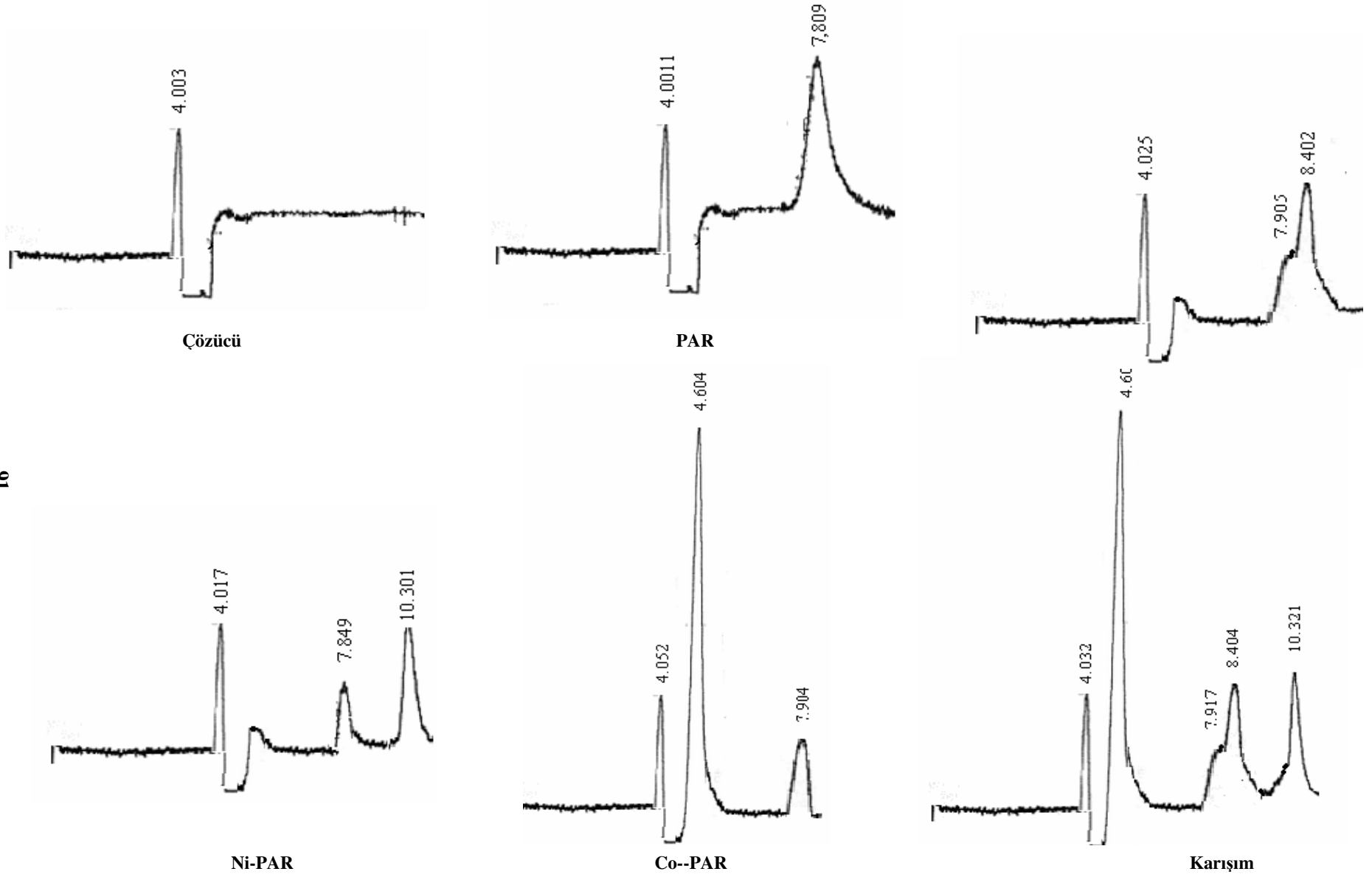
Şekil 3.47. Metanol/asetonitril/su/asetat çözeltisi:35/35/30/2,5 mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,6mL/dk, pH=7 Kolon: Phenomex



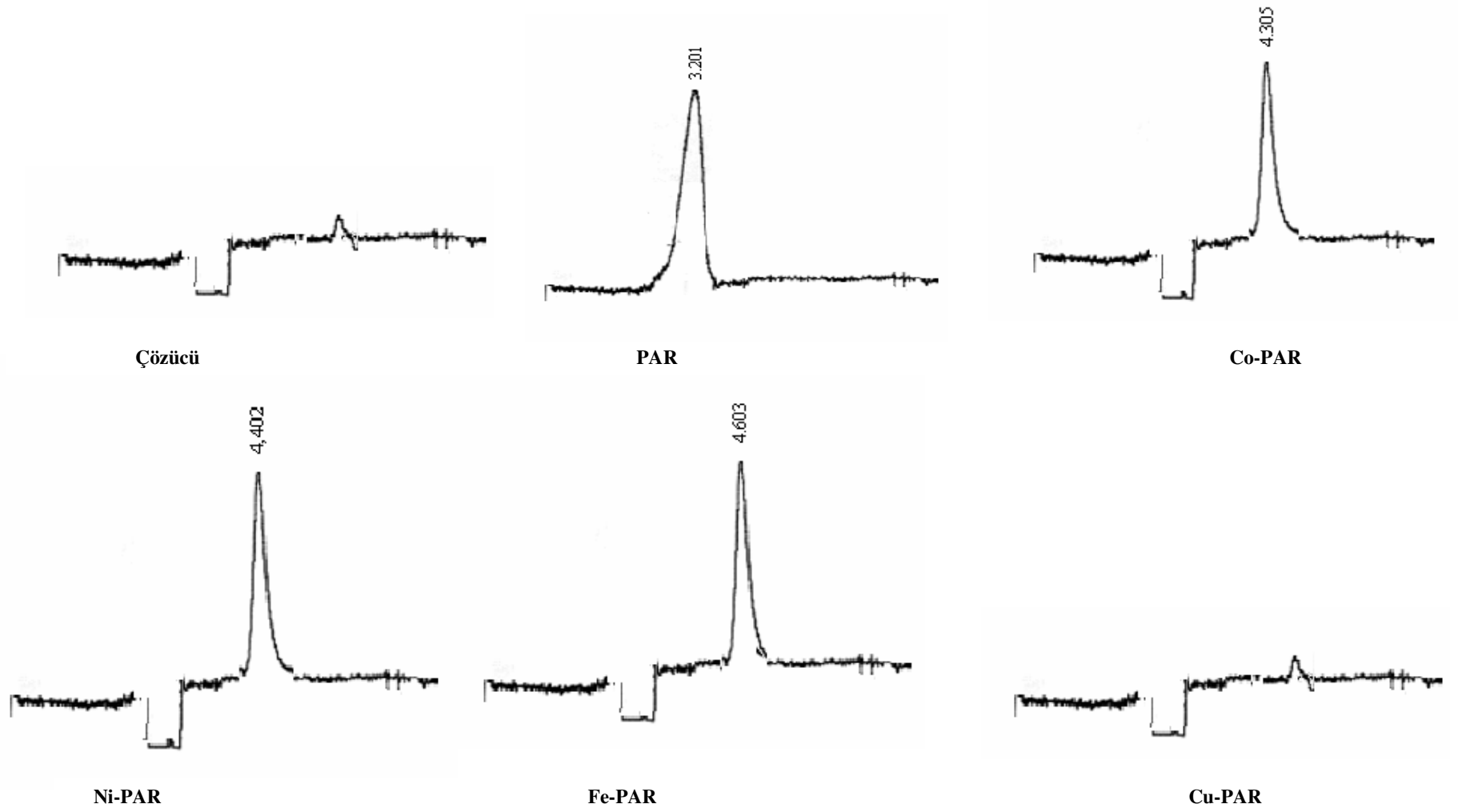
Şekil 3.48. Metanol/asetonitril/su/asetat çözeltisi:30/30/37/3 mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,6mL/dk, pH=5,4 Kolon: Phenomex



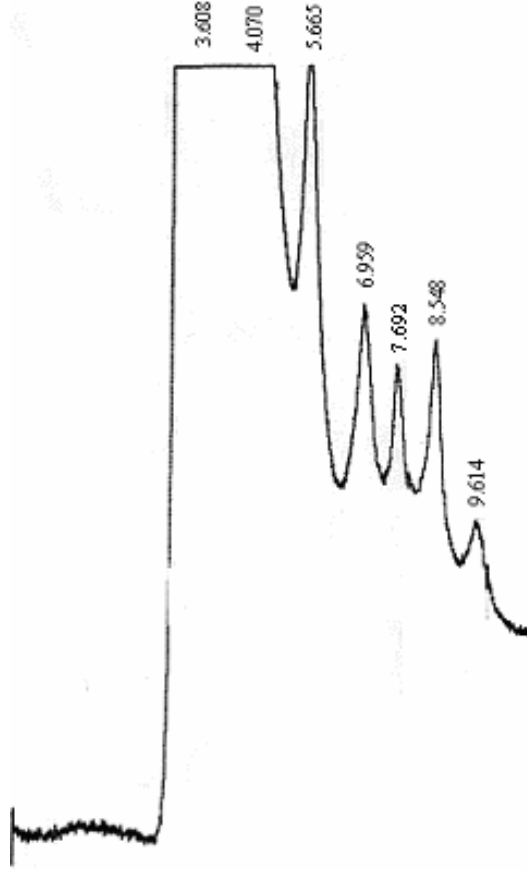
Şekil 3.49. Metanol/asetonitril/su/asetat çözeltisi:30/30/37/3 mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,6mL/dk, pH=6,5 Kolon: Phenomex



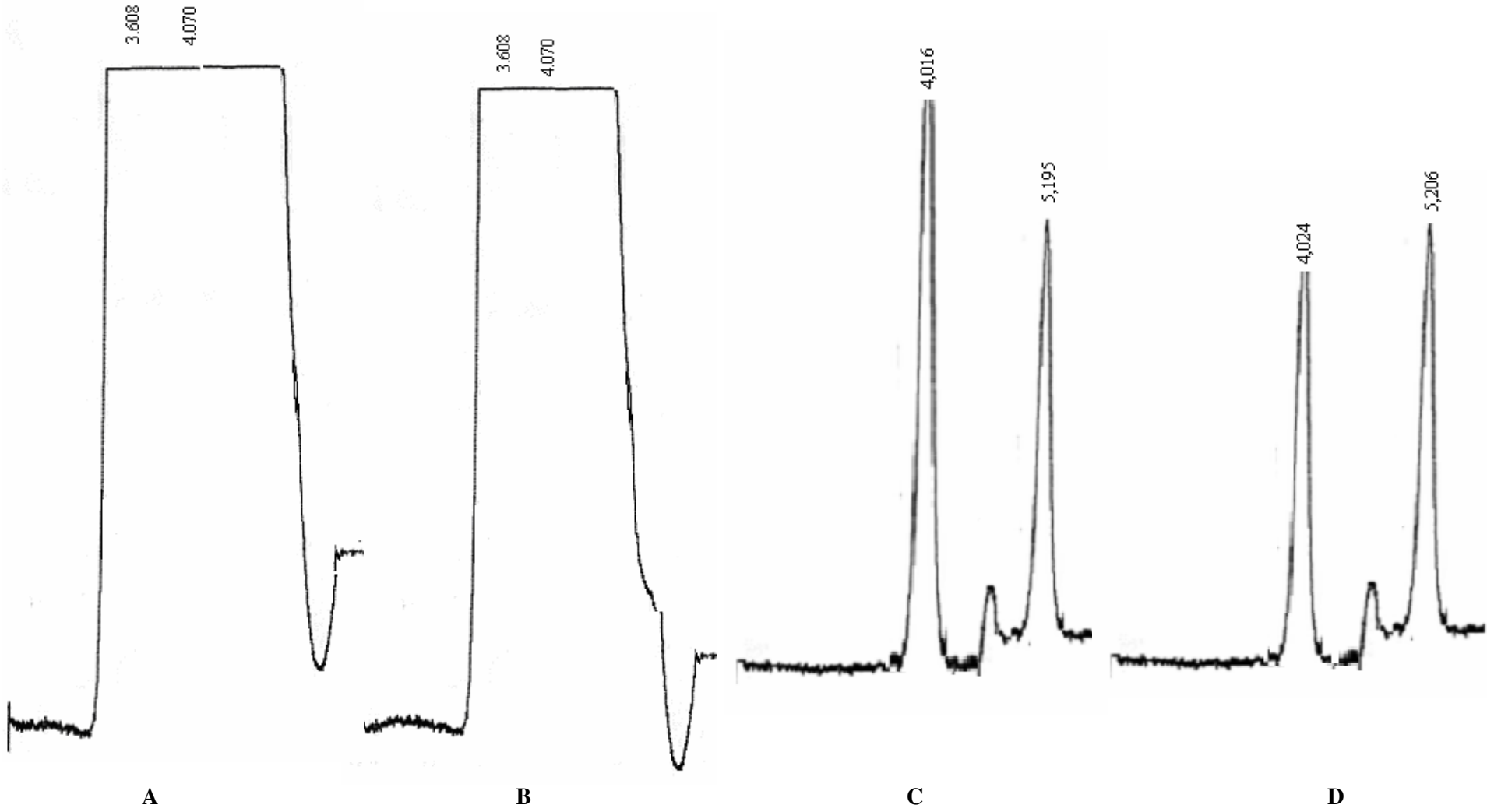
Şekil 3.50. Metanol/asetonitril/su/asetat çözeltisi:28/28/41/3 mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,6mL/dk, pH=6,8 kolon: Phenomex



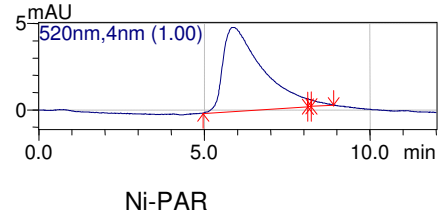
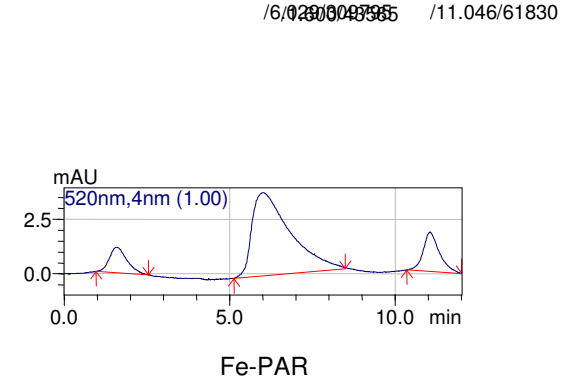
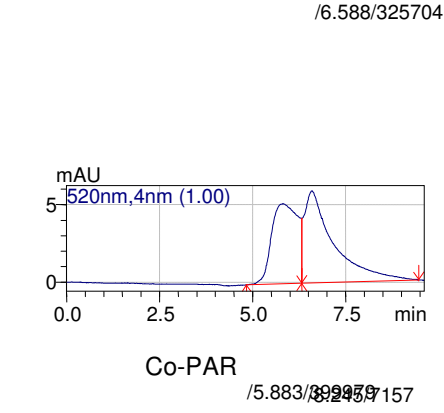
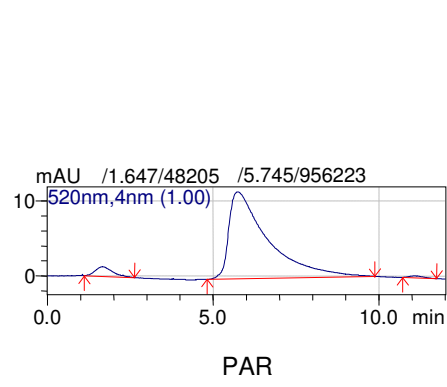
Şekil 3.51. Metanol/asetonitril/su/asetat çözeltisi:24/43/30/3 mobil fazında alınan kromatogramlar. $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,6mL/dk, pH=7 Kolon: Phenomex



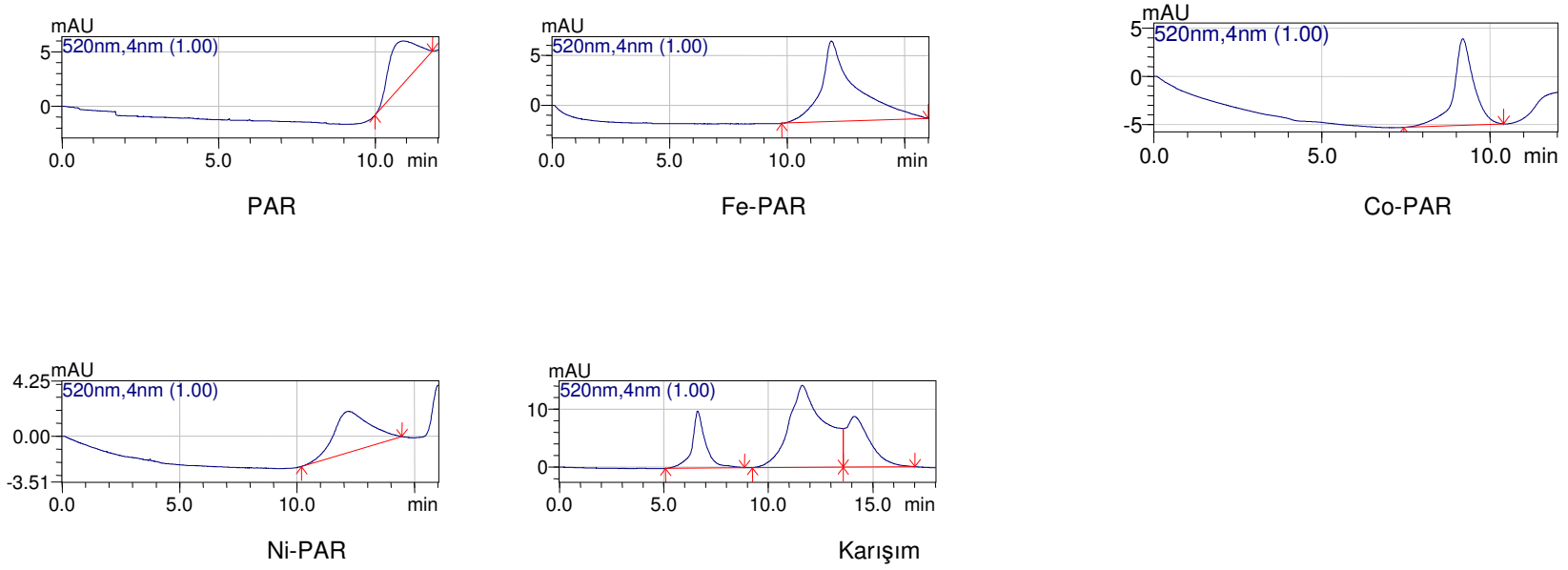
Şekil 3.52. Metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi:55/40/2,5/2,5 mobil fazında maydanoz örneğinin çözünürleştikten sonra HPLC cihazında alınan kromatogram
 $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,6mL/dk, pH=5,3 Kolon: Phenomex



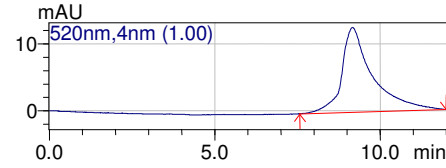
Şekil 3.53. Metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi:55/40/2,5/2,5 mobil fazında Kobalt standartına çeşitli asitler ilave edilerek uygulanan çözünürleştirme parametrelerinden sonra Co-PAR' ın HPLC cihazında alınan kromatogramları $\lambda=500$ nm, Akış Hızı= 0,6mL/dk, pH=5,3 Kolon: Phenomex A) H_2O_2 B) HNO_3 C) $HClO_4$ D) HCl



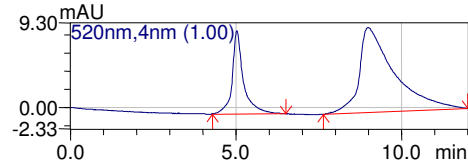
Şekil 3.54. Metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi 55/40/2,5/2,5 mobil fazında alınan kromatogramlar. PDA, Akış Hızı= 0,6 mL/dk, pH= 4,5 Kolon: Phenomex



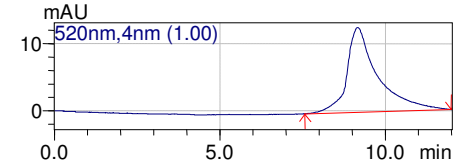
Şekil 3.55. Metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi 55/40/2,5/2,5 mobil fazında alınan kromatogramlar. PDA, Akış Hızı= 0,6 mL/dk, pH= 6 Kolon: Phenomex



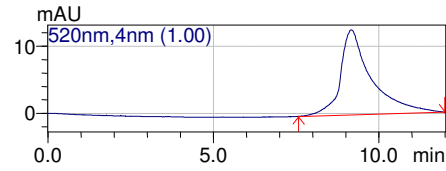
PAR



Co-PAR

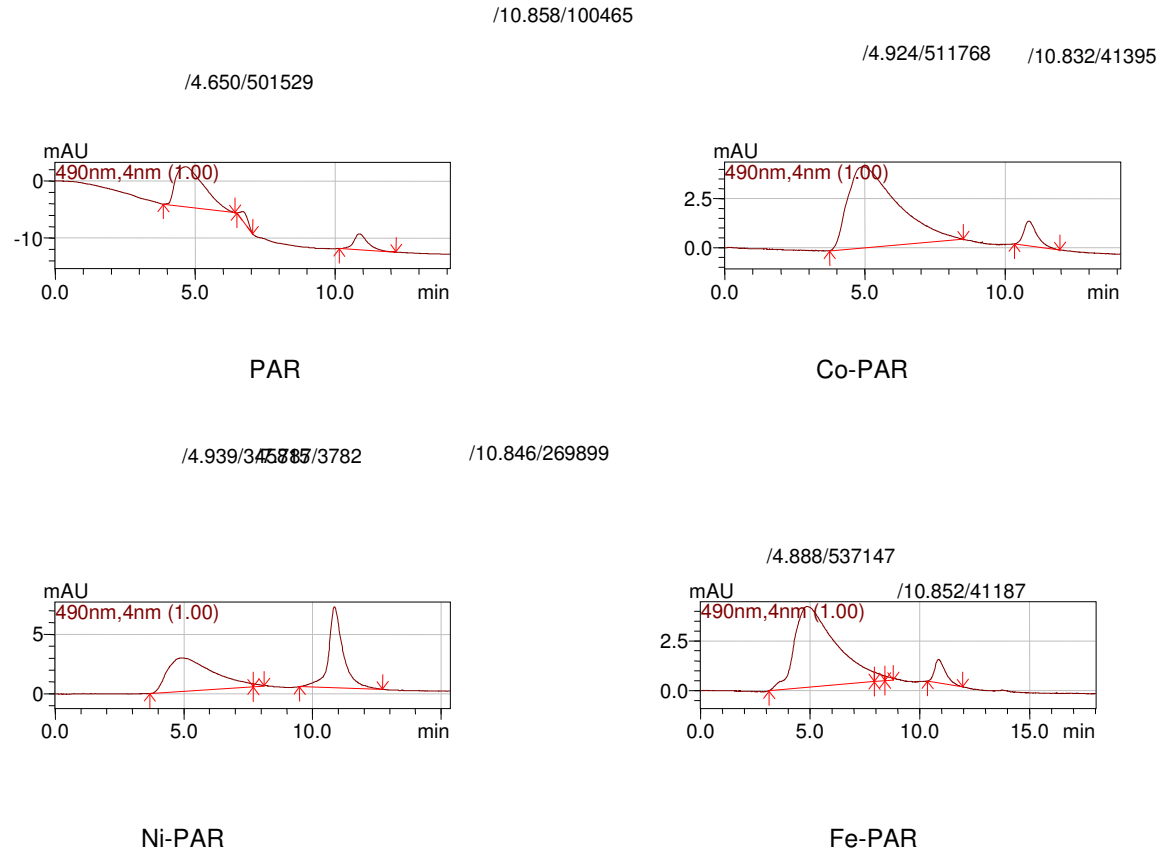


Fe-PAR



Ni-PAR

Şekil 3.56. Metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi 55/40/2,5/2,5 mobil fazında alınan kromatogramlar. PDA, Akış Hızı= 0,6 mL/dk, pH=7,5 Kolon: Phenomex

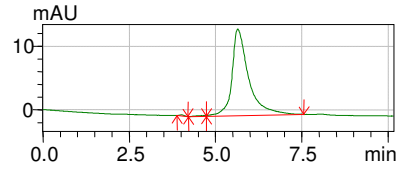


Şekil 3.57. Metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi 55/40/2,5/2,5 mobil fazında alınan kromatogramlar. PDA, Akış Hızı= 0,6 mL/dk, pH= 3,6 Kolon: Phenomex

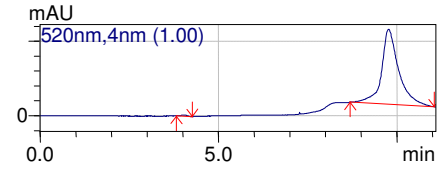
/5.635/462336

/4.034/2250

/9.764/339371



Co-PAR



Ni-PAR

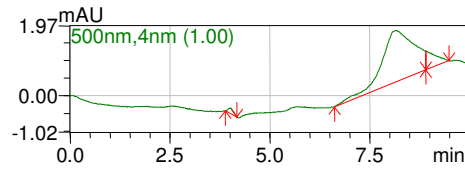
66

/

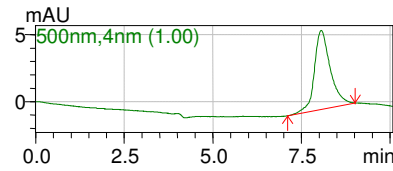
/9.681/225696

/8.049/184653

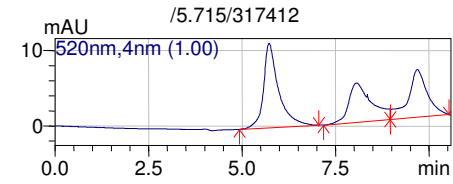
/8.057/221942



PAR

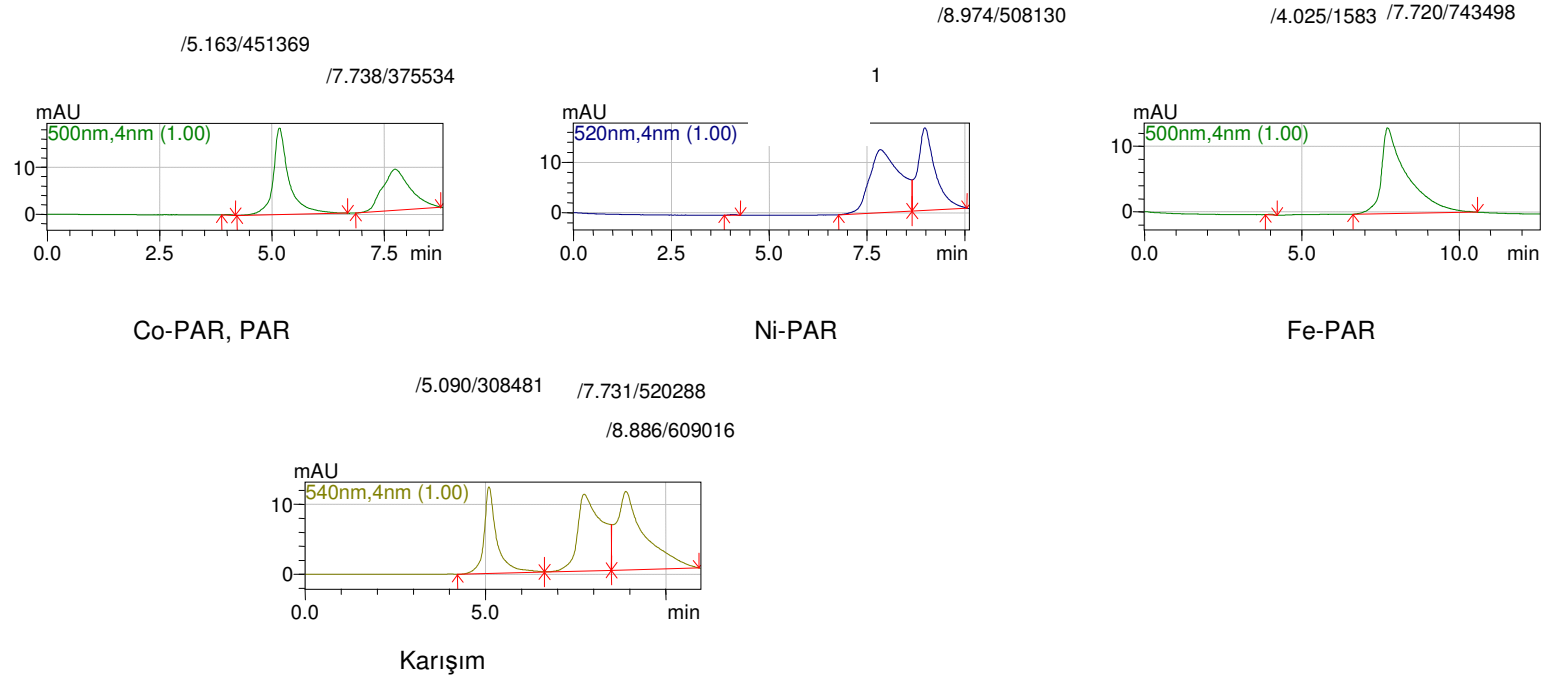


Fe-PAR

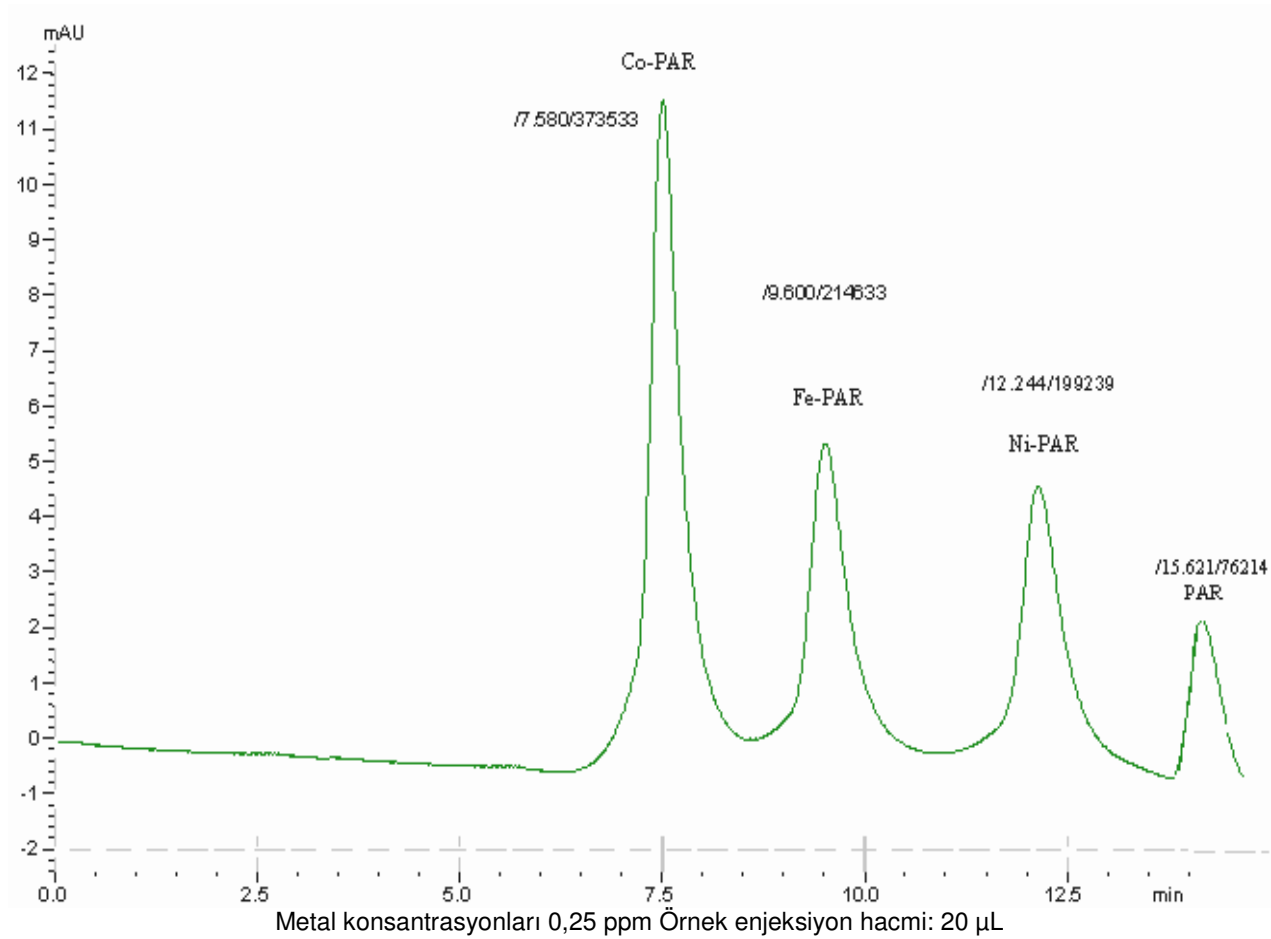


Karışım

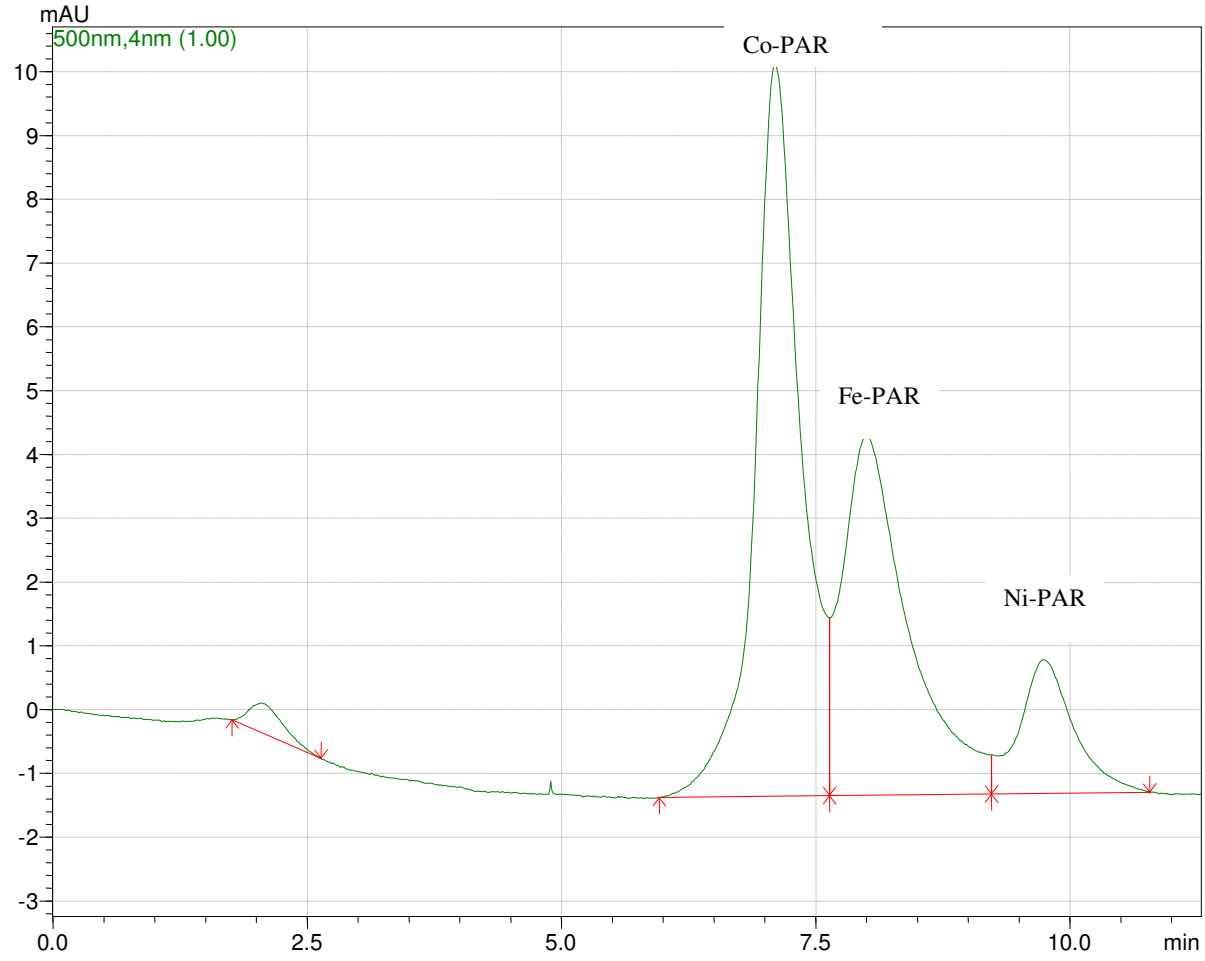
Şekil 3.58. Metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi: 60/35/2,5/2,5 mobil fazında alınan kromatogramlar. PDA, Akış Hızı= 0,6 mL/dk, pH= 5,1 Kolon: Phenomex



Şekil 3.59. Metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi: 60/35/2,5/2,5 mobil fazında alınan kromatogramlar. PDA, Akış Hızı= 0,6 mL/dk, pH= 6,5 Kolon: Phenomex

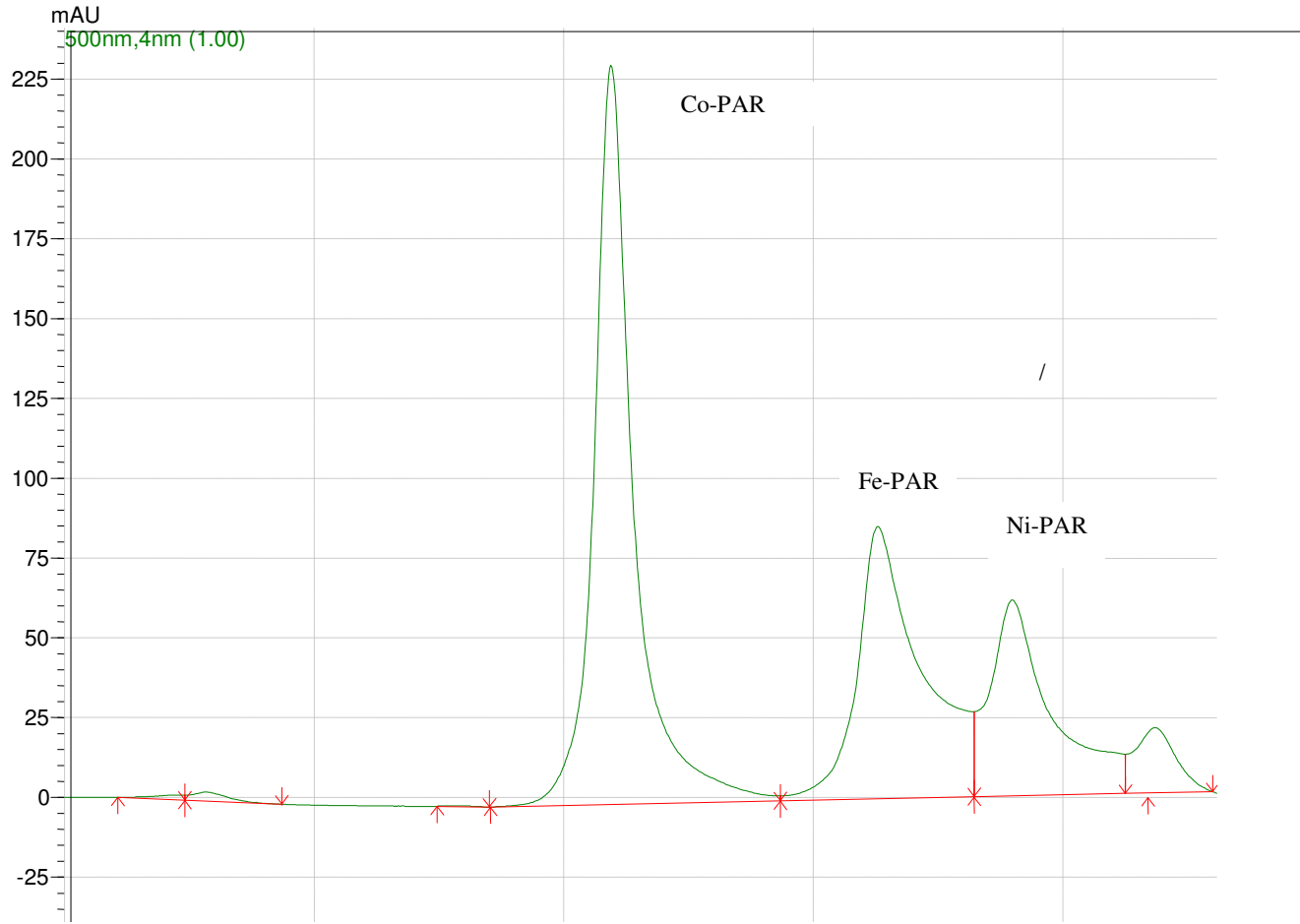


Şekil 3.60. Metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi 55/40/2,5/2,5 mobil fazında alınan kromatogramlar. PDA, Akış Hızı= 0,6 mL/dk, pH= 5,3 Kolon: Phenomex



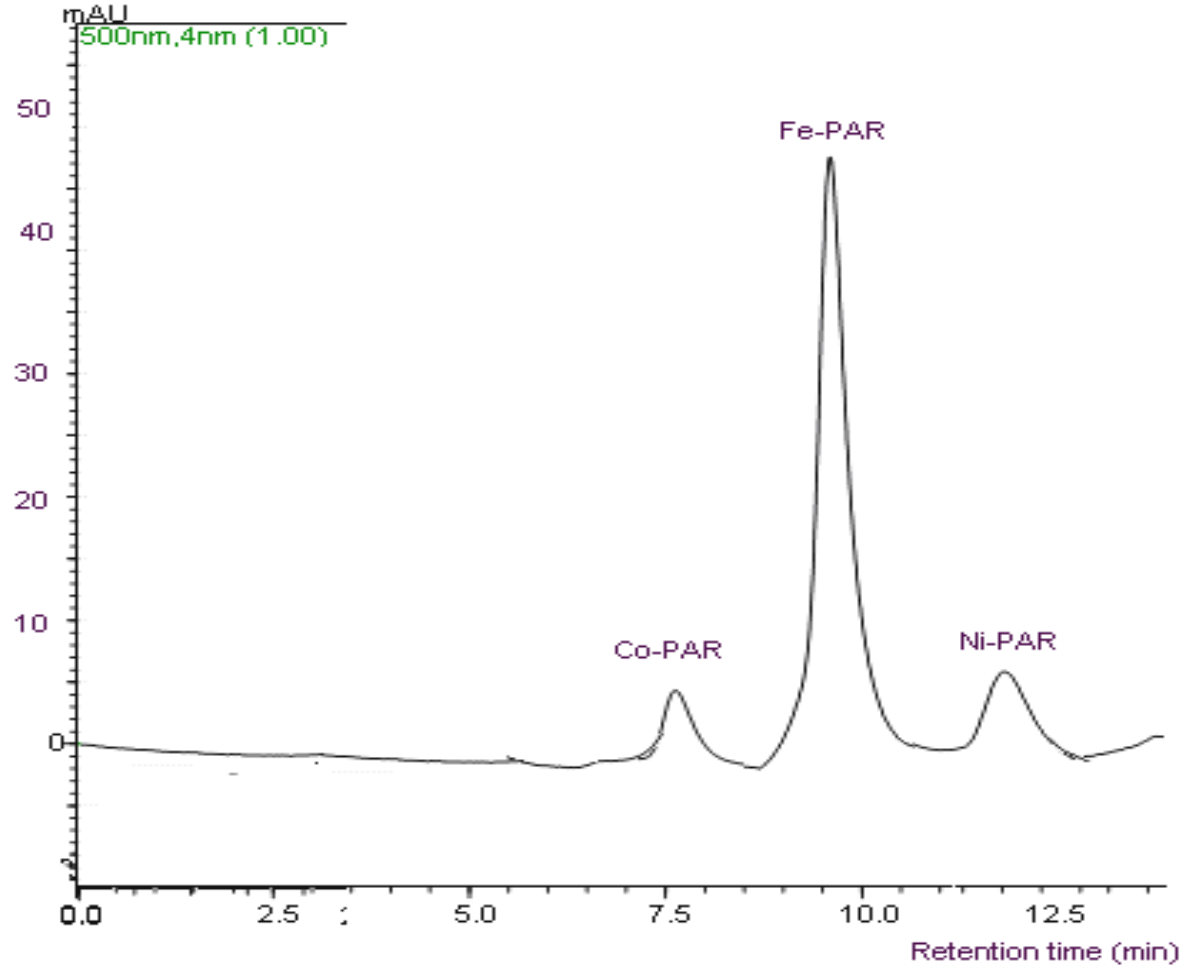
Metal konsantrasyonları 0,25 ppm Örnek enjeksiyon hacmi: 20 µL

Şekil 3.61. Metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi 60/35/2,5/2,5 mobil fazında alınan kromatogramlar. PDA, Akış Hızı= 0,6 mL/dk, pH= 5,3 Kolon: Phenomex



Metal konsantrasyonları Co: 2 ppm ,Fe ve Ni : 1,2 ppm, örnek enjeksiyon hacmi: 30 μ L

Şekil 3.62. Metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi 60/35/2,5/2,5 mobil fazında alınan kromatogramlar. PDA, Akış Hızı= 0,6 mL/dk, pH= 6,2 Kolon: Phenomex



Şekil 3.63. Metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi 55/40/2,5/2,5 mobil fazında kuşburnu örneğinin kromatogramı. PDA, Akış Hızı= 0,6 mL/dk, pH= 5,3 Kolon: Phenomex

3.2.2.2. Mobil Faz Denemelerinde Gözlenen Sonuçlar

Şekil 3.29'da saf su mobil fazında metal kompleksleri ve PAR'ın alıkonma süreleri aynı olduğu gözlemlendi ve pikler çakıştı.

Şekil 3.30'da saf metanol mobil fazında PAR'a ait 3,4. dk'da pik gözlemlendi. Fakat metal komplekslerinin alıkonma sürelerinin aynı olduğu gözlemlendi ve pikler çakıştı. Bu şartların uygun olmadığı belirlendi.

Şekil 3.31'de etanol/su (60/40 % v/v) mobil fazında metal kompleksleri ve PAR'ın alıkonma sürelerinin aynı olduğu gözlemlendi ve pikleri çakıştı.

Şekil 3.32'de Metanol/su (55/45 %v/v) mobil fazında Co-PAR'a ait 2,9. dk'da; PAR ve Fe-PAR'a ait 4,4. dk'da ve Ni-PAR'a ait pik 5,2. dk'da gözlenirken Cu-PAR'a ait pik gözlenmedi.

Şekil 3.33'de metanol/su/asetat çözeltisi (60/35/5 %v/v) mobil fazında Co-PAR'a ait pik 2,3. dk'da; Fe-PAR'a ait pik 3,9. dk'da; Ni-PAR'a ait pik 4,8. dk'da gözlenirken PAR'a ait pik 6. dk'da gözlemlendi. Metanol oranı artınca metal komplekslerine ait piklerin alıkonma sürelerinin kısaldığı, Co-PAR pikinin yüksekliğinin arttığı tesbit edildi. Asetat çözeltisi ilavesinde PAR'a ait pik Fe-PAR'dan uzaklaşarak girişimin ortadan kalktığı görüldü.

Şekil 3.34'de metanol/su/asetat çözeltisi (70/25/5 %v/v) mobil fazında Co-PAR piki çözücü pikiyle ve Fe-PAR, Ni-PAR ve PAR piklerinin birbirleriyle çakıştığı gözlemlendi. Metanol yüzdesi (v/v) %60'dan fazla olduğunda piklerin alıkonma sürelerinin azaldığı ve birbirleriyle çakıştığı gözlemlendi.

Şekil 3.35'de metanol/su/asetat çözeltisi (60/30/10 %v/v) mobil fazında PAR'a ait pik 2,2. dk'da; Co-PAR'a ait pik 2,6. dk'da; Fe-PAR'a ait pik 3,7. dk'da ve Ni-PAR'a ait pik 4,6. dk'da gözlemlendi. Co-PAR ve PAR piklerinin birbirine çok yakın olduğu tesbit edildi. PAR konsantrasyonu artırıldığında Co-PAR'la çakışacağı belirlendi.

Şekil 3.36'da metanol/su/asetat çözeltisi (55/30/15 %v/v) mobil fazında PAR'a ait pik 2,2. dk'da; Co-PAR'a ait pik 2,7. dk'da; Fe-PAR'a ait pik 4,5. dk'da ve Ni-PAR'a ait pik 6. dk'da gözlemlendi. Co-PAR piki PAR pikinden ayrıldı. Metanol oranı azaltılıp tampon oranı artırıldığında metal komplekslerine ait piklerin alıkonma sürelerinin arttığı PAR kompleksine ait pikin yüksekliğinin azaldığı tesbit edildi.

Şekil 3.37'de metanol/su/asetat çözeltisi (50/30/20 %v/v) mobil fazında PAR'a ait pik 2,2. dk'da; Co-PAR'a ait pik 3. dk'da; Fe-PAR'a ait pik 6.1 dk'da ve Ni-PAR'a ait pik 8,5. dk'da gözlemlendi. pH azalınca komplekslere ait alıkonma sürelerinin arttığı,

PAR, Co-PAR ve Ni-PAR'a ait pik yüksekliklerinin azaldığı Fe-PAR'a ait pik yüksekliğinin düştüğü gözlemlendi.

Şekil 3.38'de etanol/asetonitril/asetat çözeltisini (50/20/10 %v/v) mobil fazında PAR'a ait pik 2,5. dk'da; Co-PAR'a ait pik 1,6. dk'da; Fe-PAR ve Ni-PAR'a ait pikler 2,6. dk'da gözlemlendi. Co-PAR pik yüksekliği değişmezken diğer komplekslerin çakıştığı ve pik yüksekliklerinin azaldığı tesbit edildi.

Silika esaslı kolonun (Spelco 150x4,6 mm 5 μ) çalışmalarında pH aralığı (2-7) sınırlı olduğundan daha yüksek pH larda (2-9) çalışmak için sonraki çalışmalarda modifiye edilmiş silika kolon kullanıldı (Luna 250x4,6 mm 5 μ).

Şekil 3.39'da metanol/su/asetat çözeltisi (55/40/5 %v/v) mobil fazında PAR'a ait pik gözlenmezken Co-PAR'a ait pik 5,7. dk'da; Fe-PAR'a ait pik 10,5 dk'da ve Ni-PAR'a ait pik 8,5. dk'da gözlemlendi. pH yüksek olduğunda (pH:7,7) Co-PAR ve Ni-PAR piklerinin yüksekliğinin arttığı ve sonuçlarda tayin limitinin azalacağı belirlendi.

Şekil 3.40'da metanol/su/asetat çözeltisi (52/43/5 %v/v) mobil fazında pH:5,2'ye ayarlandığında sadece Co-PAR pikinin 9. dk'da gözlemlendiği diğer komplekslere ait piklerin gözlenmediği bu şartlarda Co-PAR ın girişimsiz tayin edilebileceği gözlemlendi.

Şekil 3.41'de metanol/su/asetat çözeltisi (60/35/5 %v/v) mobil fazında PAR'a ait pik 9. dk'da; Co-PAR'a ait pik 5,4. dk'da; Fe-PAR'a ait pik 9. dk'da ve Ni-PAR'a ait pik 7,8. dk'da gözlemlendi. Metanol oranı artırıldığında Co-PAR ve Ni-Par piklerinin alıkonma sürelerinin azaldığı gözlemlendi. PAR ve Fe-PAR piklerinin çakıştığı tesbit edildi.

Şekil 3.42'de metanol/su/fosfat tamponu (60/35/5 %v/v) mobil fazında PAR'a ait pik 4,9. dk'da; Co-PAR'a ait pik 4,7. dk'da; Fe-PAR'a ait pik 8,2. dk'da ve Ni-PAR'a ait pik 10,5. dk'da gözlemlendi. Co-PAR piki PAR piki ile kısmen çakıştı. Fosfat tamponu komplekslere ait pik yüksekliklerini azalttı. Ayrıca pH>7 ortamında mobil fazda Ca⁺² iyonu ile fosfat iyonunun çöktüğü gözlemlendi.

Şekil 3.43'de metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi (55/32/9/4 %v/v) mobil fazında PAR'a ait pik 4,9. dk'da; Co-PAR'a ait pik 5,4. dk'da; Fe-PAR'a ait pik 7,1. dk'da ve Ni-PAR'a ait pik 6,2 dk'da gözlemlendi. asetonitril kullanıldığında Co-PAR pik yüksekliğinin azaldığı tesbit edildi.

Şekil 3.44'de metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi (63/27/5/5 %v/v) mobil fazında pH 4,5'e ayarlandığında PAR'a ait pik 4,1. dk'da; Co-PAR'a ait pik 5,1. dk'da; Fe-PAR'a ait pik 7,1. dk'da ve Ni-PAR'a ait pik 8 dk'da gözlemlendi. Co-PAR ve PAR pik yükseklikleri düştü. Fe-PAR pik yüksekliği arttı. Komplekslerin ve PAR'ın birbirinden ayrıldığı gözlemlendi.

Şekil 3.45’de metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi (63/27/5/5 %v/v) mobil fazında pH 8,5’e ayarlandığında metal kompleksleri ve PAR pikleri 5,2. dk’da çakıştığı tesbit edildi. Bu şartların tayine uygun olmadığı görüldü.

Şekil 3.46’da metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi (57/33/5/5 %v/v) mobil fazında pH 4,9’a ayarlandığında PAR’a ait pik 6,5. dk’da; Co-PAR’a ait pik 5,9. dk’da; Fe-PAR’a ait pik 10,7. dk’da ve Ni-PAR’a ait pik 8,7. dk’da gözlemlendi. PAR ve Co-PAR pikleri birbirine yakın olduğu tesbit edildi.

Şekil 3.47’de metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi (35/30/35/2,5 %v/v) mobil fazında pH 7’ye ayarlandığında PAR’a ait pik 5. dk’da; Co-PAR’a ait pik 3,8. dk’da; Fe-PAR’a ait pik 5,8. dk’da ve Ni-PAR’a ait pik 6,2. dk’da gözlemlendi. Co-PAR piki çözücü piki ile çakıştı. PAR, Fe-PAR ve Ni-PAR pikleri birbirine yaklaştı. Asetonitril miktarı artırıldığında komplekslere ait alıkonma süreleri ve pik yükseklikleri azaldı. Bu şartların tayin için uygun olmadığına karar verildi.

Şekil 3.48’de metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi (30/37/30/3 %v/v) mobil fazında pH 5,4’e ayarlandığında PAR’a ait pik 9,1. dk’da; Co-PAR’a ait pik 5,1. dk’da; Fe-PAR’a ait pik 9. dk’da ve Ni-PAR’a ait pik 8. dk’da gözlemlendi. Co-PAR ve Ni-PAR piklerinin birbirinden ayrıldığı, PAR ve Fe-PAR piklerinin çakıştığı gözlemlendi.

Şekil 3.49’da metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi (30/37/30/3 %v/v) mobil fazında pH 6,5’a ayarlandığında PAR’a ait pik 6,7. dk’da; Co-PAR’a ait pik 4,4. dk’da; Fe-PAR’a ait pik 7,8. dk’da ve Ni-PAR’a ait pik 8,4. dk’da gözlemlendi. Co-PAR piki çözücü pikine yaklaştı. PAR, Fe-PAR ve Ni-PAR piklerinin birbirlerine yaklaştığı görüldü. pH artınca piklerin alıkonma sürelerinin azaldığı belirlendi.

Şekil 3.50’de metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi (28/41/28/3 %v/v) mobil fazında pH 6,8’a ayarlandığında PAR’a ait pik 7,8. dk’da; Co-PAR’a ait pik 4,6. dk’da; Fe-PAR’a ait pik 8,4. dk’da ve Ni-PAR’a ait pik 10,3. dk’da gözlemlendi. Co-PAR piki çözücü pikine yaklaştı. PAR, Fe-PAR pikleri kısmen çakıştı. Organik faz oranı azaltılıp su oranı artınca Co-PAR piki değişmezken diğer piklerin alıkonma sürelerinin arttığı gözlemlendi.

Şekil 3.51’de metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi (24/30/43/3 %v/v) mobil fazında pH 7’ye ayarlandığında PAR’a ait pik 3,2. dk’da; metal komplekslerine ait pikler ise 4,5. dk’da gözlemlendi. asetonitril oranı %30 dan fazla olunca komplekslere ait piklerin çakıştığı gözlemlendi. Bu şartların analize uygun olmadığına karar verildi.

Şekil 3.52’de metanol/su/asetonitril/asetat tamponu (55/40/2,5/2,5 %v/v) mobil fazında pH 4,5’a ayarlandığında PAR’a ait pik 5,7. dk’da , Co-PAR’a ait pik 6,5. dk’da, Fe-PAR’a ait pik 11. dk ‘da gözlenirken Ni-PAR’a ait pik gözlenmedi. Co-PAR pikinin PAR pikinden ayrıldığı gözlemlendi.

Şekil 3.53'de metanol/su/asetonitril/asetat tamponu (55/40/2,5/2,5 %v/v) mobil fazında pH 6'a ayarlandığında PAR'a ait pik 11,5. dk'da , Co-PAR'a ait pik 6,5. dk'da, Fe-PAR'a ait pik 11,8. dk 'da gözlenirken Ni-PAR'a ait pik 12,4. dk'da gözlemlendi. Co-PAR ve Ni-PAR piklerinin ayrıldığı, PAR ve Fe-PAR pikinin çakıştığı gözlemlendi.

Şekil 3.54'de metanol/su/asetonitril/asetat tamponu (55/40/2,5/2,5 %v/v) mobil fazında pH 7,5'a ayarlandığında PAR'a ait pik 9,1. dk'da , Co-PAR'a ait pik 5. dk'da, Fe-PAR, Ni-PAR ve PAR'a ait pikler 9. dk'da çakıştığı gözlemlendi. Co-PAR pikinin yüksekliğinin pH artırıldığında arttığı gözlemlendi. Co-PAR tayini için bu şartların uygun olduğuna karar verildi.

Şekil 3.55'de metanol/su/asetonitril/asetat tamponu (55/40/2,5/2,5 %v/v) mobil fazında pH 3,6'a ayarlandığında PAR'a ait pik 4,8. dk'da gözlenirken Co-PAR ve Ni-PAR'a ait pik gözlenmedi. Fe-PAR'a ait pik 10,8 . dk'da gözlemlendi. Fe-PAR tayinleri için uygun olduğuna karar verildi. pH azaldığında PAR pikinin alıkonma süresinin kısaltıldığı tesbit edildi.

Şekil 3.56'da metanol/su/asetonitril/asetat tamponu (60/35/2,5/2,5 %v/v) mobil fazında pH 5,1'e ayarlandığında PAR'a ait pik 8,1. dk'da gözlenirken Co-PAR piki 5,6. dk'da, Ni-PAR'a ait pik 9,7. dk'da ve Fe-PAR'a ait pik 8. dk'da gözlemlendi. Fe-PAR ve PAR pikleri çakıştı. Co-PAR ve Ni-PAR pikleri ayrıldı. Metanol oranı artırıldığında piklerin alıkonma sürelerinin kısaltıldığı tesbit edildi.

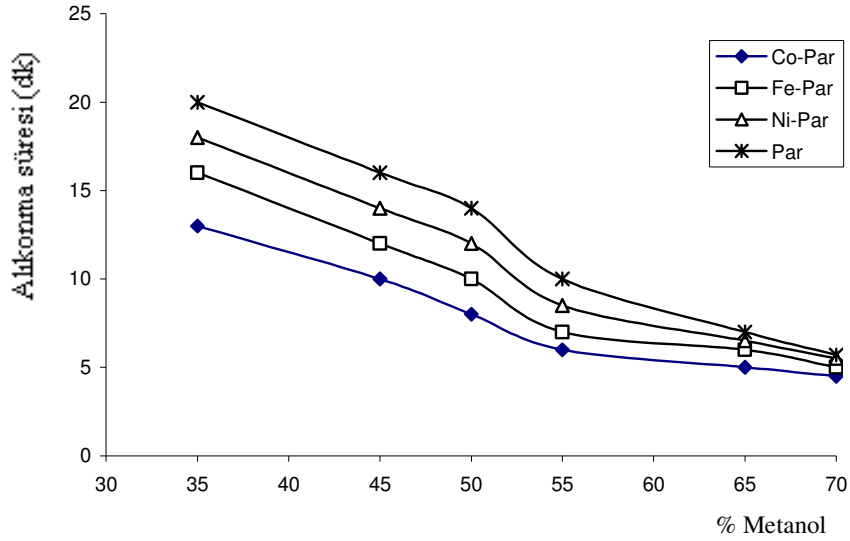
Şekil 3.57'de metanol/su/asetonitril/asetat tamponu (60/35/2,5/2,5 %v/v) mobil fazında pH 6,5'a ayarlandığında PAR'a ait pik 7,7. dk'da, Co-PAR piki 5,1. dk'da, Ni-PAR'a ait pik 9. dk'da gözlenirken Fe-PAR piki 7,7. dk da gözlenerek PAR pikiyle çakıştığı belirlendi.

Şekil 3.58'de Metanol/Su/asetonitril/asetat çözeltisi (55/35/2,5/2,5 %v/v) mobil fazında pH 5,3'e ayarlandığında PAR'a ait pik 16. dk'da gözlenirken Co-PAR piki 7,5, Fe-PAR piki 9,6. dk'da ve Ni-PAR'a ait pik 12,2. dk'da gözlemlendi. Bu şartlarda ligand ve metal komplekslerinin birbirlerinden ayrıldığı gözlemlendi.

Şekil 3.59'da Metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi (60/35/2,5/2,5 %v/v) mobil fazında pH 5,3'e ayarlandığında PAR'a ait pik 12,5. dk'da gözlenirken Co-PAR piki 7. dk'da, Fe-PAR'a ait pik 8. dk da ve Ni-PAR'a ait pik 9,7. dk'da gözlemlendi. Fe-PAR konsantrasyonu 200 ppm'i geçtiğinde Co-PAR pikiyle çakıştığı gözlemlendi. Bu durumda pH 6,2'ye ayarlandı ve aynı mobil fazda Co-PAR piki 5,4. dk'da gözlenerek Fe-PAR pikinden ayrıldı. (Şekil 3.60).

3.2.2.3. Metanol Miktarının Alıkonma Süresine Etkisi

Alıkonma süresine metanol miktarının etkisini incelemek amacıyla pH'ı 5,2'ye ayarlı metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi bileşimli mobil fazdaki metanol oranı %35 ile %70 arasındaki değerlere çıkartılıp aynı oran değerinde su hacmi azaltıldı. Her bir mobil faz türünde 1×10^{-5} M'lık Co-PAR, Fe-PAR ve Ni-PAR kompleksleri ile 1×10^{-4} M PAR'dan 20 μ L HPLC cihazına enjekte edilerek kromatogramları alındı. Gözlenen piklerin alıkonma süresine karşı metanol hacmi (%v) grafiğe geçirilerek şekil 3.64'de gösterildi.

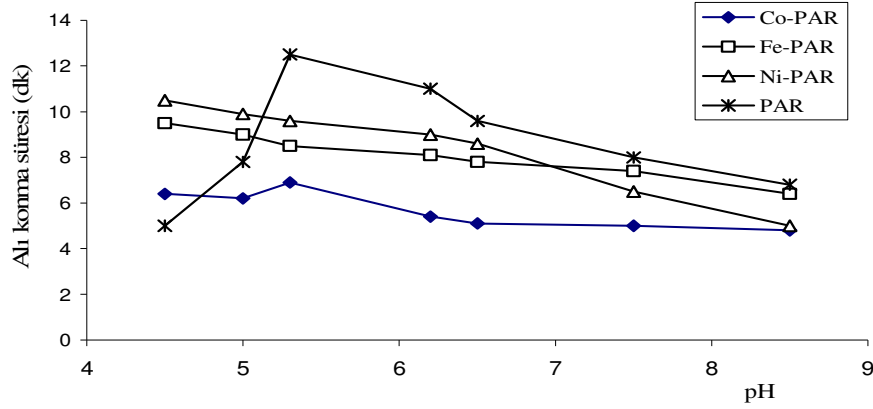


Şekil 3.64. Metanol miktarının alıkonma süresine etkisi

Metanol oranı artırıldığında şekil 3.64'de görüldüğü gibi metal komplekslerine ve liganda ait piklerin alıkonma sürelerinin kısaldığı metanol oranı %65 (v/v) den sonra piklerin birbirine yaklaştığı ve %70'den sonra tüm piklerin çakıştığı gözlemlendi. Metallerin derişimi artıkça pikler birbirleriyle çakışacağı için çalışmalarda metanol oranının %45 ile %60 arasında kullanılmasına karar verildi.

3.2.2.4. Mobil Faz pH'sının Metal Komplekslerinin Alıkonma Sürelerine Etkisi

Metal komplekslerinin alıkonma sürelerine mobil faz pH'ının etkisini incelemek amacıyla metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi (55/40/2,5/2,5 %v/v) bileşimli mobil fazın pH'ı asetik asit ve NaOH ile 4-8 arasında ayarlandı. pH'ı ayarlanmış her bir mobil fazda 1×10^{-5} M'lık Co-PAR, Fe-PAR ve Ni-PAR kompleksleri ile 1×10^{-4} M'lık PAR'dan 20 μ L HPLC cihazına enjekte edilerek kromatogramları alındı. Gözlenen piklerin alıkonma süresine karşı mobil faz pH'ı grafiğe geçirilerek şekil 3.65'de gösterildi.



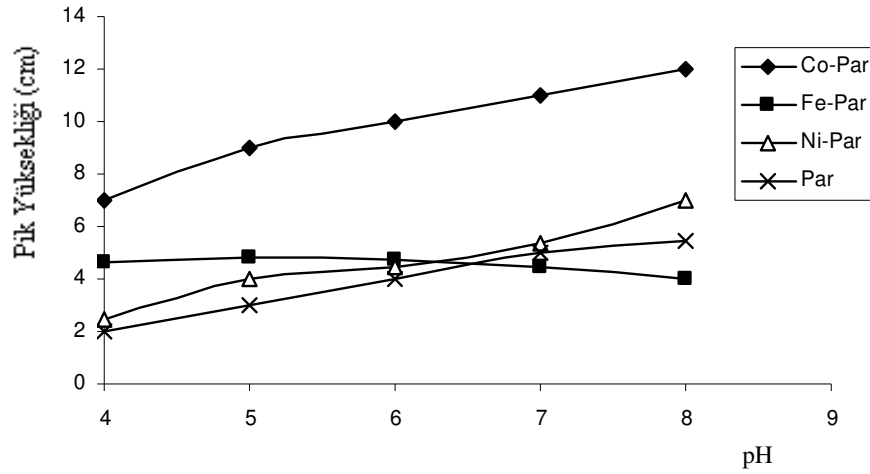
Şekil 3.65. Mobil faz pH'sının metal komplekslerinin alıkonma sürelerine etkisi

Metal komplekslerinin alıkonma sürelerinin şekil 3.65'de görüldüğü gibi mobil faz pH'ının artmasıyla azaldığı ve piklerin birbirlerine yaklaştığı tesbit edildi. 8,5. dk'da pH 6,8 ile 7,2 arasında Ni-PAR ve Fe-PAR piklerinin, 5. dk'da pH 7,8-8,5 arasında Co-PAR ile Ni-PAR pikleri ve 8. dk'da Fe-PAR ile PAR piklerinin çakıştığı gözlemlendi. Bu nedenle Metal kompleksleri ile ve PAR'a ait piklerin birbirinden ayrıldığı ve metal-PAR komplekslerinin konsantrasyonlarına bağlı olarak tayinlerin yapılabileceği pH değerleri 5,2 ile 6,3 arasında tesbit edildi.

3.2.2.5. Mobil Faz pH'sının Metal Komplekslerinin Pik Yüksekliklerine Etkisi

Mobil faz pH'ının, metal-PAR kompleksleri ile PAR'a ait piklerin yüksekliğine etkisini incelemek amacıyla metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi (55/40/2,5/2,5 %v/v) bileşimli mobil fazın pH'ı asetik asit ve NaOH ile 4-8 arasında ayarlandı. pH'ı ayarlanmış her bir mobil fazda 1×10^{-5} M'lık Co-PAR, Fe-PAR ve Ni-PAR kompleksleri ile 1×10^{-4} M'lık PAR çözeltisinden 20 μ L HPLC cihazına enjekte edilerek kromatogramları alındı. Gözlenen piklerin yüksekliğine karşı mobil fazın pH'ı grafiğe geçirilerek şekil 3.66'da gösterildi.

Şekil 3.66'te görüldüğü gibi mobil faz pH'ı artırıldığında metal kompleksleri ile PAR'a ait piklerin yüksekliğinin arttığı fakat pH 6,5'ten sonra Fe-PAR'a ait pikin yüksekliğinin azaldığı tesbit edildi.

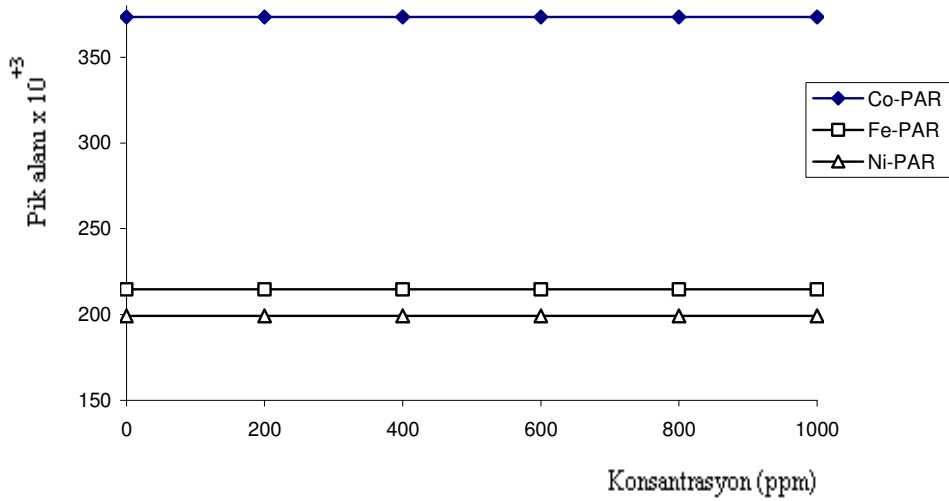


Şekil 3.66. Mobil faz pH'sının metal komplekslerinin pik yüksekliklerine etkisi

3.2.2.6. Co-PAR, Fe-PAR ve Ni-PAR Komplekslerine Yabancı İyonların Etkisi

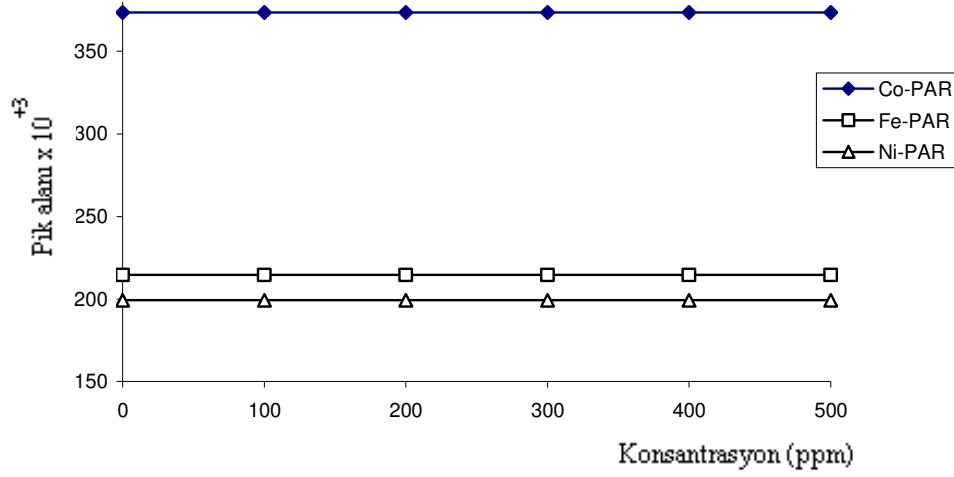
Bitki, toprak ve doku örneklerinde major ve minör seviyede bulunabilen Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} , Al^{+3} , Cr^{+3} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Pb^{+2} ve Cd^{+2} iyonlarının Fe-PAR, Ni-PAR ve Co-PAR piklerine etkisi incelenmiştir.

Ca^{+2} ve Mg^{+2} çözeltilerinden 1000 ppm, Fe^{+3} , Al^{+3} , Cr^{+3} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Pb^{+2} ve Cd^{+2} çözeltilerinden ise 500 ppm'lik çözeltiler analitik saflıktaki standart stok çözeltilerden hazırlanarak 0,1M HCl çözeltileriyle hacim tamamlama işlemleri yapılmıştır.



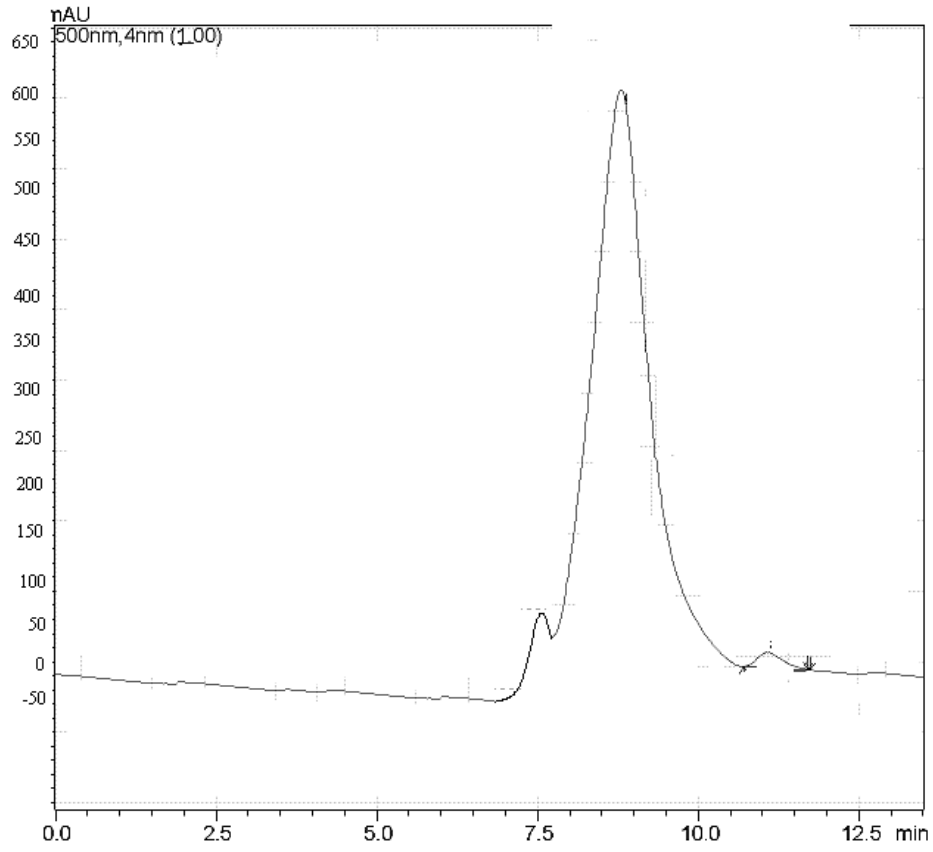
Şekil 3.67. 1000 ppm Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının Co-PAR, Ni-PAR ve Fe-PAR komplekslerinin pik alanları üzerine etkisi

Şekil 3.67’de görüldüğü gibi Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının konsantrasyonları 1000 ppm’e kadar 0,25 ppm’ lik Co-PAR, Fe-PAR ve Ni-PAR komplekslerinin pik alanlarına etkisinin olmadığı görülmüştür.



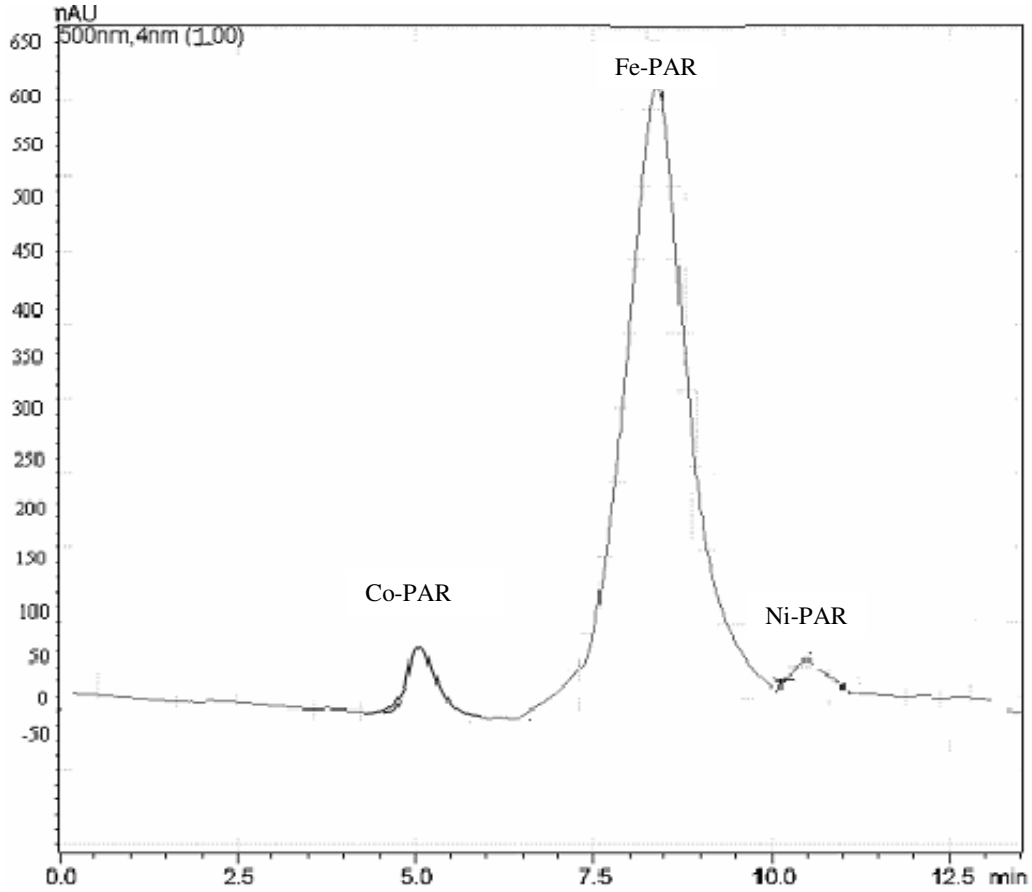
Şekil 3.68. 500 ppm Al^{+3} , Cr^{+3} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Pb^{+2} ve Cd^{+2} iyonlarının Co-PAR, Ni-PAR ve Fe-PAR komplekslerinin pik alanları üzerine etkisi

Şekil 3.68’de görüldüğü gibi 500 ppm Al^{+3} , Cr^{+3} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Pb^{+2} ve Cd^{+2} çözeltilerinin 0,25 ppm’ lik Co-PAR, Fe-PAR ve Ni-PAR komplekslerinin pik alanlarına etkisinin olmadığı görülmüştür.



Şekil 3.69. 200 ppm Fe^{+3} iyonunun Co-PAR, Ni-PAR ve Fe-PAR komplekslerine etkisi

Şekil 3.69’de görüldüğü gibi 200 ppm Fe-PAR çözeltisi 0,5 ppm lik Co-PAR pikiyle çakışmıştır. Bunu gidermek için mobil faz pH sı 5,3 den 6,2’ye çıkarılarak kromatogramlar alındı.



Şekil 3.70. Mobil faz pH' ısı 6,2'ye ayarlandıktan sonra 200 ppm Fe^{+3} iyonunun Co-PAR, Ni-PAR ve Fe-PAR komplekslerine etkisi

Co-Par'ın alıkonma süresi 7,6. dk dan 5,4. dk'a düşerek Fe-PAR kompleksinden ayrıldı. Bu durumda Ni-PAR ve Fe-PAR pikleri birbirlerine yaklaştı.

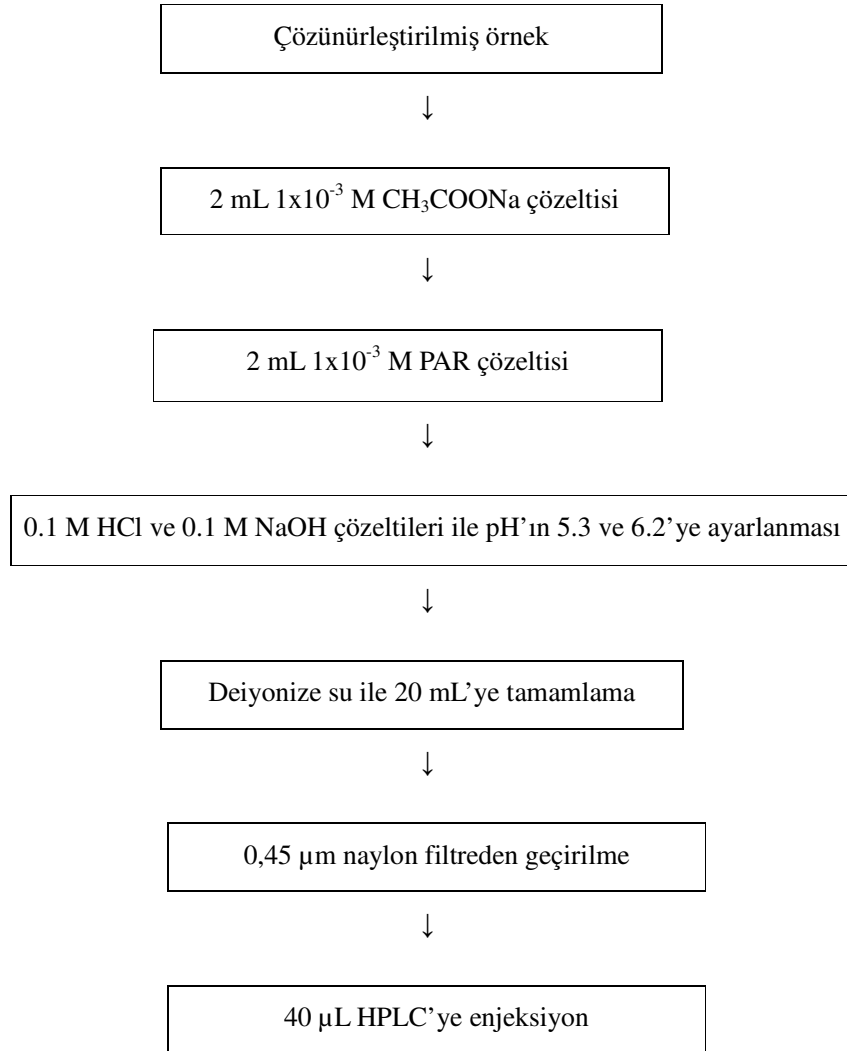
3.2.3. Örneklerin Çözünürleştirilmesi

Bu çalışmada örneklerin parçalanmasında mikrodalga üniteli kapalı sistem kullanıldı. Analizi yapılacak her bir örnekten 2 g lık üçer tane numune alınarak 80°C de sabit tartıma gelecek şekilde etüvde kurutuldu. Kurutulan örnekler havanda dövülerek toz haline getirildi ve bu örneklerden 0,4 g tartılarak teflon bombaya konuldu. Örnekler 1 mL derişik $HClO_4$ ve 4 mL derişik HNO_3 (155) tütün örneklerine ek olarak 1 mL derişik H_2O_2 ilave edildi. 1 saat bekletilerek teflon kapaklar sıkıca kapatıldı. Teflon bombalar mikrodalga ünitesine konarak parçalanma işlemi yapıldı. Mikrodalga ünitesi 150 W'da 1dakika çalıştırıldıktan sonra parçalanmada açığa çıkan gazları uzaklaştırmak için 5 dakika soğutuldu ve teflon kapaklar dikkatlice açıldı. Daha sonra teflon kapaklar tekrar kapatılıp mikrodalga ünitesi 150 W 'da 4 dakika, 300 W'da 3

480 W'da 2 dakika ve 650 W'da 2 dakika çalıştırıldı. Örneklerin soğuması için teflon bombalar 1 saat bekletilerek kapakları dikkatlice açıldı. Elde edilen berrak çözelti erlenlere aktarıldı. Erlenler ısıtıcıya konarak çeker ocakta kuruya yakın asitler buharlaştırıldı. Metal iyonlarını içermeyen blank çözeltisine de yukarıda belirtilen işlemler uygulandı.

3.2.4. Örneklerinin Analiz Edilmesi

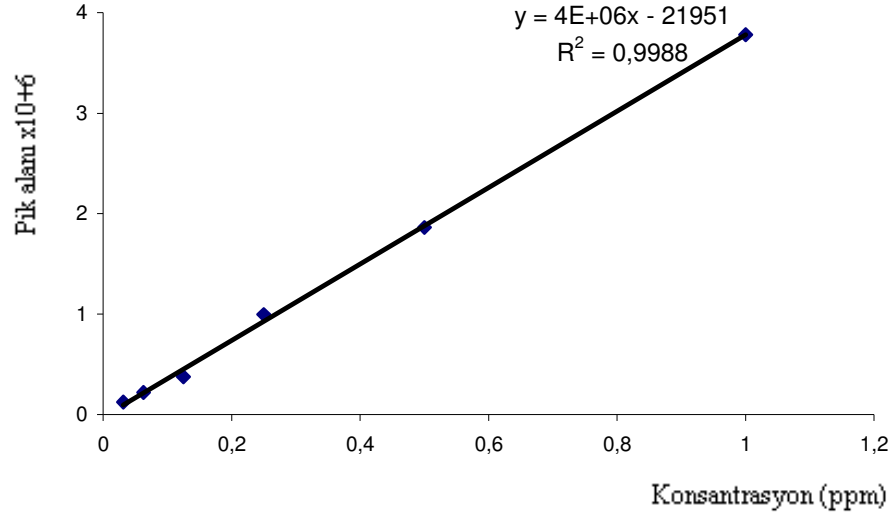
Çözünürleştirilen örnekler şekil 3.71'de gösterilen aşamalardan sonra örneklerdeki analizi yapılacak elementlerin kromatogramları alındı. Örneklerin pik alanlarından blank çözeltisinden elde edilen pik alanı çıkarılarak, kalibrasyon eğrisi yöntemi ile analizler gerçekleştirildi.



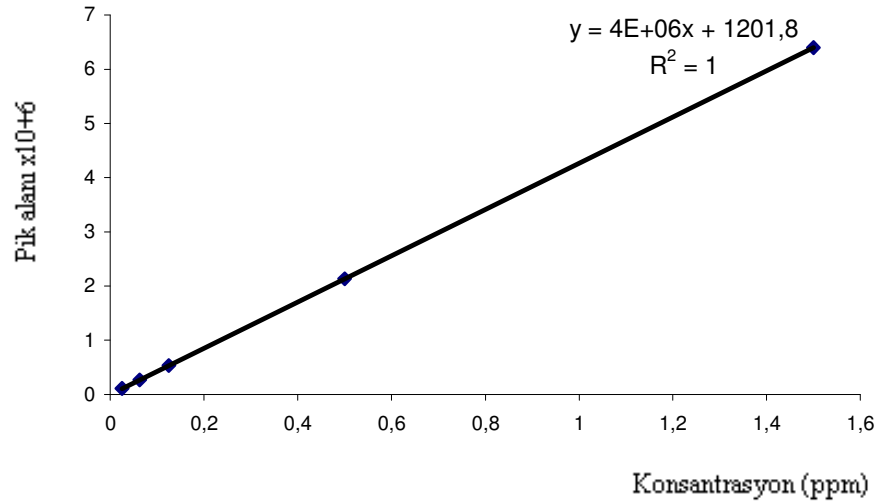
Şekil 3.71 Analiz için örnek hazırlama aşamaları

3.2.4.1. Kalibrasyon Grafiklerinin Çıkartılması

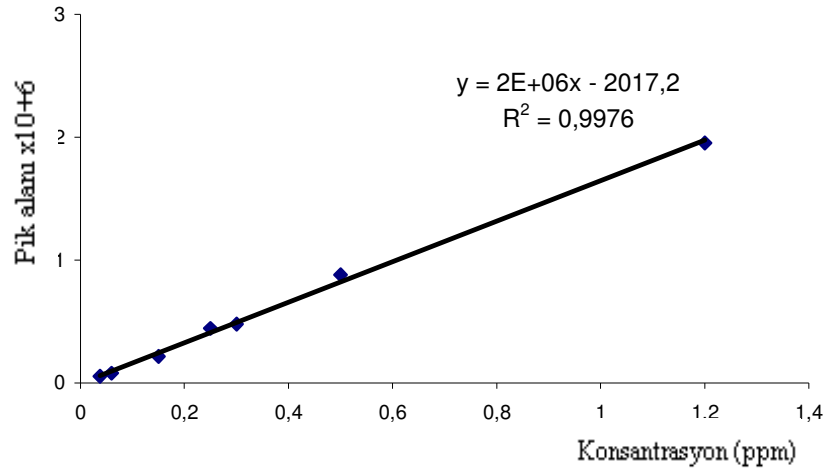
Co-PAR, Fe-PAR ve Ni-PAR çözeltilerinden farklı konsantrasyonlarda bir dizi (2 ppb–2 ppm) çözelti hazırlanarak optimize edilen şartlarda 40µL HPLC'ye enjekte edildi. Konsantrasyonlara karşı elde edilen piklerin alanları grafiğe geçirilerek çalışma grafikleri hazırlandı.



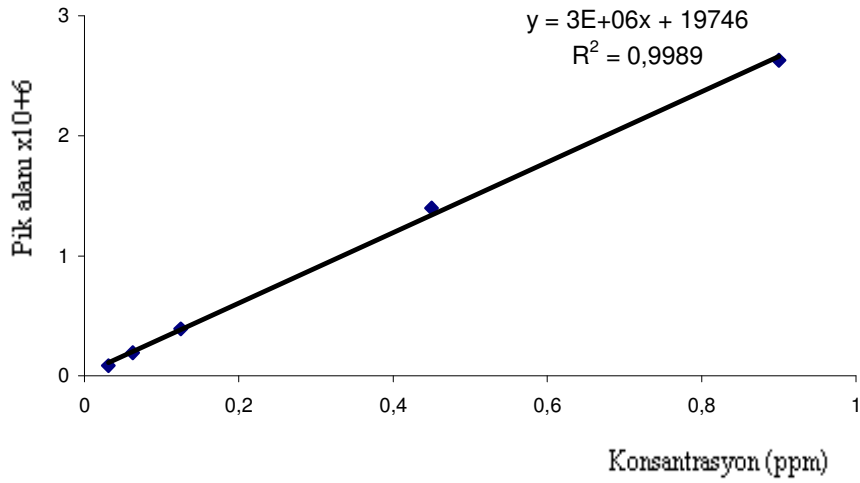
Şekil 3.72. Standart Co-PAR çözeltilerinin pH' ı 5,3'e ayarlı mobil fazda kalibrasyon eğrisi



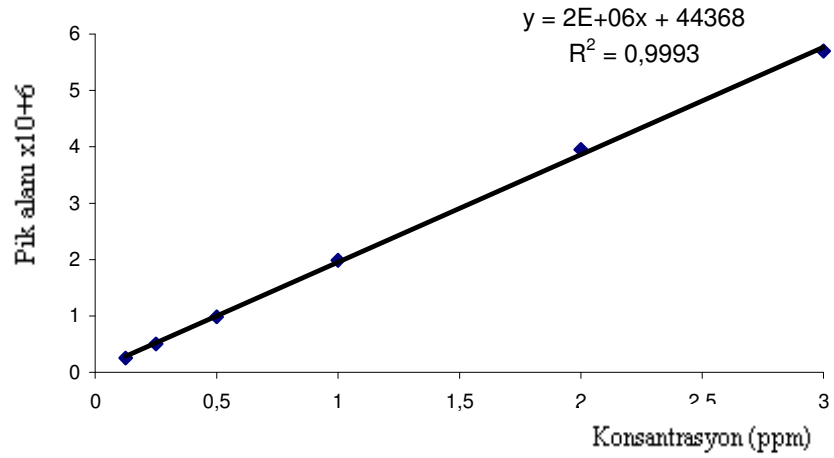
Şekil 3.73. Standart Co-PAR çözeltilerinin pH' ı 6,2'e ayarlı mobil fazda kalibrasyon eğrisi



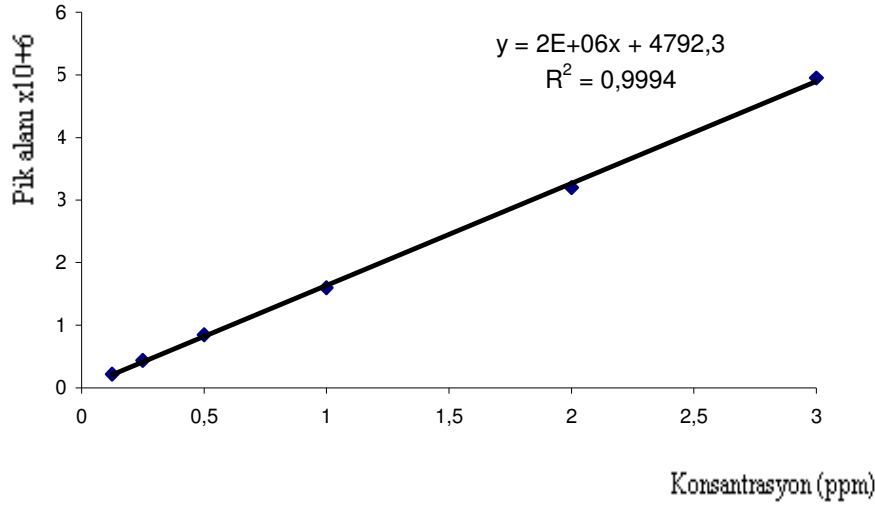
Şekil 3.74. Standart Ni-PAR çözeltilerinin pH' ı 5,3'e ayarlı mobil fazda kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.75. Standart Ni-PAR çözeltilerinin pH' ı 6,2'ye ayarlı mobil fazda kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.76 Standart Fe-PAR çözeltilerinin pH' ı 6,2'ye ayarlı mobil fazda kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.77. Standart Fe-PAR çözeltilerinin pH' ı 5,3'e ayarlı mobil fazda kalibrasyon eğrisi

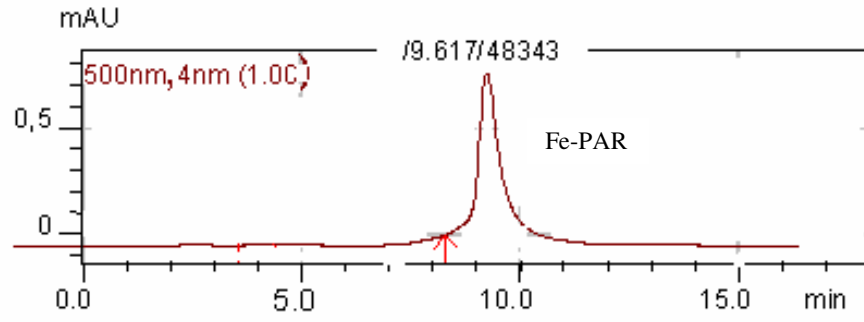
3.2.4.2. Tayin Sınırının Hesaplanması

Tayin sınırının hesaplanması amacıyla pH'ı 5,2'ye ayarlı metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi 55/40/2,5/2,5 mobil fazında, hazırlanan $250 \mu\text{g L}^{-1}$ Co-PAR, Ni-PAR ve Fe-PAR çözeltilerinden $40\mu\text{L}$ alınarak HPLC'ye enjekte edilerek kromatogramlar alındı. Bu işlem beş kez tekrarlanarak her seferinde alınan kromatogramların pik alanlarından, pik alanların ortalamaları ve pik alanlarının standart sapmaları hesaplanarak Tablo 3.8'de gösterildi.

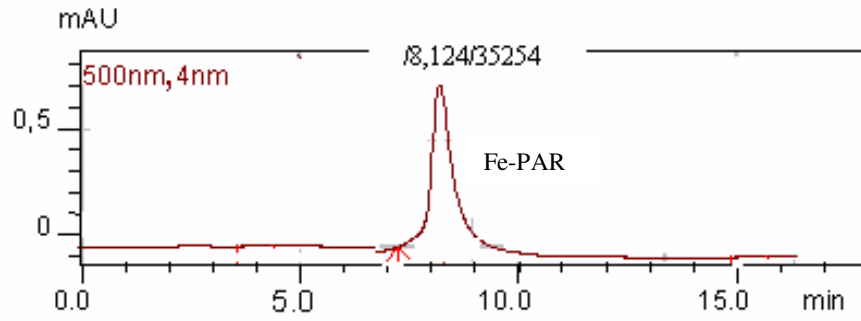
Tablo 3.8. Co-PAR, Ni-PAR ve Fe-PAR'a ait tayin sınırları

Enjeksiyon No	Co-PAR	Ni-PAR	Fe-PAR
1	995975	443356	513042
2	998086	442381	501222
3	992045	446124	507389
4	991137	445042	511421
5	990913	442340	502785
Ortalama	993631,2	443848,6	507171,8
Standart sapma	$\pm 2879,73$	$\pm 1501,60$	$\pm 4630,47$

Standart sapmaların üç katı tayin sınırı alan değerleri olarak kabul edildi (154). Bu alan değerleri Co-PAR, Ni-PAR ve Fe-PAR için çizilen lineer çalışma doğrusu denklemlerinde yerine konularak yöntemin tayin sınırları; Co-PAR, Ni-PAR ve Fe-PAR için sırasıyla $1,86$, $3,26$ ve $4,45 \mu\text{g L}^{-1}$ olduğu bulundu.



Şekil 3.78. Blank çözeltisinin pH' ı 6,2'ye ayarlı mobil fazda kromatogramı (40µL)



Şekil 3.79. Blank çözeltisinin pH' ı 5,3'e ayarlı mobil fazda kromatogramı (40µL)

Tablo 3.9. Analiz edilen örneklerdeki Co, Ni ve Fe miktarları (mg/kg kuru madde)

Örnek	Co (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Fe (mg/kg)
Altın otu		1.805±0.213	74.11±6.81
Ay çekirdeği		0.928±0.083	96.74±10.21
Biber			147.49±18.69
Bulgur		1.121±0.098	62.12±7.15
Çay		1.302±0.102	312.64±35.40
Ebe gümece	0.087±0.006	0.782±0.055	273.03±35.62
Hannup		3.420±0.285	78.26±9.47
Ihlamur		1.416±0.094	126.35±6.45
Isırgan		3.442±0.289	712.39±85.41
K.Fasulye		3.564±0.321	160.07±20.32
Kahve	0.072±0.006	1.476±0.156	51.63±4.25
Kakule		0.384±0.041	84.12±7.24
Kantaron		1.791±0.195	277.39±30.85
Kekik	0.350±0.038	6.938±0.564	498.62±65.98
Mercimek	0.224±0.017	2.627±0.185	151.06±11.23
Mersin Yapağı		4.464±0.389	206.46±16.84
Mısır		1.991±0.201	130.71±12.41
Nane		2.111±0.189	257.13±36.47
Nohut		2.743±0.195	148.95±9.82
Patlıcan		0.878±0.078	58.72±3.25
Pelin otu	0.168±0.015	3.728±0.026	264.53±21.98
Pirinç		0.576±0.048	41.58±3.45
Sigara A	1.744±0.125		562.55±64.52
Sigara B	0.542±0.065	1.511±0.012	497.12±55.61
Sigara C		2.847±0.214	246.69±25.45
Sumak		0.918±0.058	158.63±8.56
Şehriye			53.76±4.65
Şeker		1.735±0.132	65.49±7.45
Tarhana		3.463±0.251	51.96±6.32
Turp		1.582±0.021	94.84±10.58
Y. Fasulye	0.223±0.014		157.13±12.60
Yeşil çay		1.692±0.028	211.78±25.87
Zencefil		0.356±0.024	136.97±12.77

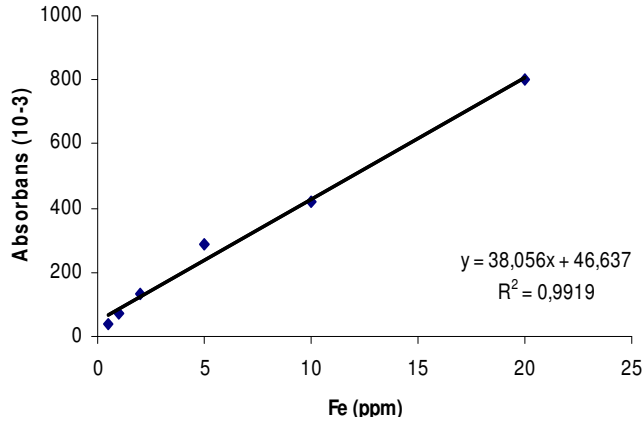
3.2.4. F-AAS ile Bitki Örneklerinde Demirin Tayini

Mikrodalga sistemi ile teflon bombalarla parçalanmış örnek çözeltilerinden 5 mL alındı. 1M'lık HNO_3 çözeltisi ile gerekli seyreltme işlemlerinden sonra örnekler Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresine (F-AAS) okutularak kalibrasyon eğrisi yöntemi ile demir tayinleri gerçekleştirildi.

Analiz edilen demirin standart stok çözeltisinden elementin lineer olduğu bölgeler göz önüne alınarak farklı demir derişimlerine karşı absorpsiyon şiddetleri grafiğe geçirildi ve kalibrasyon eğrisi çizildi.

Tablo 3.10. Demir analizlerinde kullanılan F-AAS ile ilgili parametreler

Analiz Hattı(nm)	248.3
Lamba Akım(mA)	15
Alev Türü	hava/asetilen
Yarık Genişliği(nm)	0.2



Şekil 3.80. Demir için kalibrasyon eğrisi

HPLC ile analiz edilen bazı örneklerdeki demir miktarları F-AAS ile de analizleri yapılarak karşılaştırıldı. Analiz edilen örneklerdeki kobalt ve nikel miktarı F-AAS' nin tayin sınırı altında olduğundan karşılaştırılamadı. Karşılaştırma Tablosu Tablo 3.11' de gösterilmiştir.

Tablo 3.11. Örneklerdeki demir miktarlarının HPLC ve F-AAS ile karşılaştırılması

Örnek	F-AAS (mg/kg)	HPLC (mg/kg)	Karşılaştırma %
Altınotu	86.21±9.32	74.11±6.81	85.9
Bulgur	63.62±5.25	62.12±7.15	97.6
Ayçekirdeği	98.47±12.45	96.74±10.21	98.2
Hannup	77.65±5.86	78.26±9.47	99.2
Ihlamur	124.36±15.47	126.35±6.45	98.4
Mercimek	153.85±8.25	151.06±11.23	98.1
Patlıcan	59.19±4.28	58.72±3.25	99.3
Pirinç	42.22±6.85	41.58±3.45	98.3
Nane	265.45±18.76	257.13±36.47	96.8
Mısır	129.24±7.46	130.71±12.41	98.8
Kahve	51.78±6.54	51.63±4.25	99.8

Tablo 3.11’de görüldüğü gibi HPLC sonuçlarıyla F-AAS sonuçları %98±1.8 uyumlu olduğu tesbit edilmiştir.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Yüksek performanslı sıvı kromatografisinin avantajlarından yararlanarak Fe(III), Ni(II), Co(III) ve Cu(II) gibi geçiş metal iyonlarının belirlenmesi ve çeşitli biyolojik ve çevresel ortamlardaki miktarlarının tayini için bir yöntem geliştirmeyi amaçlayan bu tez çalışmasında ligand olarak, daha önce pek çok metal iyonunu gerek spektrofotometrik olarak gerekse kromatografik olarak (2) tayinlerinde kullanılmış olan 4-(2-piridilazo) rezorsinol (PAR) ile çalışıldı.

Fe(III), Ni(II), Co(III) ve Cu(II) iyonlarının kromatografik tayinleri UV-görünür bölge detektörü ile yapılması amaçlandığından öncelikle Fe(III), Ni(II), Co(III) ve Cu(II) iyonlarının PAR kompleksi oluşumunda şartları optimize etmek üzere spektrofotometrik çalışmalar yapıldı. Metal-PAR komplekslerinin 300-650 nm arasında spektrumları alındı. Maksimum absorpsiyonun gözlemlendiği dalga boyları Co-PAR için 510 nm, Ni-PAR için 504 nm, Fe-PAR için 495 nm ve Cu-PAR için 500 nm olarak gözlemlendi (Tablo 3.1).

Kompleks oluşumunda pH etkisini incelemek için 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl çözeltileri kullanılarak, metal-PAR komplekslerinin pH'ları 2-12 arasında değişik değerlere ayarlandı. Komplekslerin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boylarında spektrumları alındı. Okunan absorbans değerleri ile pH arasında çizilen grafiklerden kompleks oluşumu açısından optimum pH değerleri Co-PAR için 5 - 8 aralığı, Fe-PAR için 4 - 6.5 aralığı, Ni-PAR için 6 - 10 aralığı ve Cu-PAR için 6 - 9 aralığı olduğu belirlendi (Tablo 3.4).

Fe(III)-PAR, Ni(II)-PAR, Co(III)-PAR ve Cu(II)-PAR komplekslerinin stokiyometrilere belirlenmek için mol oranı (Şekil 2.10) ve Job (Şekil 2.11) yöntemleri kullanıldı. Kompleks stokiyometrilere (Metal/Ligand) Fe(III)-PAR, Ni(II)-PAR ve Co(III)-PAR kompleksleri için 1:2, Cu-PAR kompleksi için 1:1 olduğu belirlendi.

Metal komplekslerinin oluşum sürelerini belirlemek amacıyla, elde edilen komplekslerin maksimum absorpsiyonun olduğu dalga boylarında çeşitli sürelerde absorbansları alınarak, süreye karşı grafiğe geçirildi. Absorbans değerlerinin sabit kaldığı süreler oluşum süreleri olarak belirlendi. Komplekslerin oluşum süreleri Fe-PAR, Cu-PAR ve Co-PAR için 10 sn, Ni-PAR için 40 sn olarak bulundu (Tablo 3.5).

Metal komplekslerinin molar absorplama katsayılarını (ϵ) belirlemek için komplekslerin konsantrasyonları ile okunan absorbans değerleri arasında çizilen grafiklerin eğiminden molar absorplama katsayıları Fe-PAR için $5,4 \times 10^4$, Cu-PAR için $4,2 \times 10^4$, Co-PAR için $6,5 \times 10^4$ ve Ni-PAR için $2,7 \times 10^4$ L.mol⁻¹.cm⁻¹ olarak bulundu (Tablo 3.6).

Ligand konsantrasyonunun kompleks absorpsiyonuna etkisini incelemek amacıyla 1×10^{-4} M'lık metal çözeltilerinin belirli hacmi ile aynı konsantrasyonda farklı hacimlerde ligand çözeltileri karıştırıldı ve saf su ile gerekli son hacime tamamlandı. Elde edilen komplekslerin absorbansları okunarak ligand hacimlerine karşı grafiğe geçirildi. Grafikte absorbansların sabit kaldığı noktadaki ligand çözeltisinin hacmi aynı konsantrasyondaki 1 mL metal çözeltilerine karşılık 2.5 mL olarak belirlendi (Şekil 3.26).

Asetat konsantrasyonunun kompleks absorbanslarına etkisini incelemek amacıyla belirli konsantrasyonlardaki metal çözeltilerine aynı konsantrasyonda farklı hacimlerde asetat çözeltileri eklenerek komplekslerinin absorbansları alındı. Okunan absorbanslara karşın asetat hacmi grafiğe geçirildi. Absorbans değerlerinin sabit kaldığı noktadaki asetat çözeltisinin hacmi 1 mL'lık metal çözeltilerine karşılık 20 mL olduğu bulundu (Şekil 3.27).

Fe(III)-PAR, Ni(II)-PAR, Co(III)-PAR ve Cu(II)-PAR komplekslerinin kromatografik tayinini gerçekleştirebilmek için alkil grupları ile modifiye edilmiş silika esaslı C₁₈ kolonunda alıkonulma ve ayırma şartlarını belirlemek amacıyla tekli, ikili ve üçlü farklı bileşim oranlarında mobil fazlar denendi. Organik bileşen olarak analitik ve kromatografik saflıkta metanol, asetonitril ve etanol ve polar bileşen olarak iki kez distillenmiş su kullanıldı.

Mobil faz olarak saf su ve metanolun yalnız başına kullanıldığı denemelerde ligand ve komplekslerin ayrılmadığı tesbit edildi (Şekil 3.29 ve Şekil 3.30).

Etanol-su karışımlarının mobil faz olarak kullanıldığı denemelerde metal komplekslerine ait piklerin çakıştığı gözlemlendi (Şekil 3.31).

Etanol-asetat çözeltisi-asetonitril karışımların mobil faz olarak kullanıldığı denemelerde Co-PAR kompleksine ait pikin ayrıldığı fakat diğer komplekslere ait piklerin çakıştığı belirlendi (Şekil 3.38).

Mobil faz olarak değişik yüzdelerde (v/v) metanol-su içeren karışımların kullanılması ile gerçekleştirilen denemelerde elde edilen kromatogramların değerlendirilmesi sonucu Cu-PAR kompleksi hariç diğer komplekslerin bozunmadan kolonda taşındığı, fakat ligand ve komplekslere ait piklerin birbirlerinden ayrılmadığı gözlemlendi (Şekil 3.32).

Metanol/su mobil fazına asetat çözeltisi ilave edildiğinde metal komplekslerine ve liganda ait piklerin ayrıldığı gözlemlendi (Şekil 3.33).

Metanol oranı artırıldığında ligand ve metal komplekslerinin alıkonma sürelerinin azaldığı, metanol oranı %65 üzerinde olduğunda ise piklerin ayrılmayarak çakıştığı belirlendi (Şekil 3.34). Bu nedenle analiz şartlarında metanol oranının maksimum %65 olmasına karar verildi. Ligand ve metal-PAR komplekslerinin ayrıldığı

optimum mobil faz bileşiminde hacimce %45 ile %60 arasında metanolün olmasına karar verildi (Şekil 3.64).

Mobil faz bileşimine asetonitril etkisini incelemek amacıyla metanol/su/asetat çözeltisi mobil fazına asetonitril ilave edildi. Asetonitril ilave edildiğinde zemin gürültüsüne ait sinyallerin azaldığı, sistem basıncının düştüğü ve metal komplekslerine ait piklerin alıkonma sürelerinin azaldığı gözlemlendi. Farklı hacimlerde asetonitril mobil faza ilave edilerek kromatogramlar alındı. Asetonitril oranı artırıldığında piklerin birbirine yaklaşması ile yüksek derişimdeki metal komplekslerine ait piklerin çıkışacağı belirlendi (Şekil 3.47). Asetonitril oranı %40' dan fazla olduğunda tüm piklerin alıkonma sürelerinin azalarak birbirleriyle çakıştığı belirlendi (Şekil 3.51).

Metal-PAR ve ligand komplekslerinin birbirinden ayrıldığı mobil faz bileşimi metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi 55/40/2,5/2,5 (%v/v) olarak tesbit edildi (Şekil 3.54).

Mobil faza pH etkisini incelemek için metanol/su/asetonitril/asetat çözeltisi 55/40/2,5/2,5 (%v/v) bileşimli mobil fazın pH ı 4,5-8,5 arasında olacak şekilde 0,1 M NaOH ve 0,1 M CH₃COOH çözeltileri ile ayarlandı. pH artıkça Co-PAR, Ni-PAR ve Fe-PAR komplekslerinin alıkonma sürelerinin kısaldığı, pH ın 6,7 den yüksek olduğu değerlerde Fe-PAR ve Ni-PAR piklerinin çakıştığı, pH ın 7,8 den yüksek olduğu koşullarda ise Fe-PAR ve PAR piklerinin çakıştığı fakat Ni-PAR ve Co-PAR piklerinin ayrıldığı gözlemlendi (Şekil 3.65). pH 8,5 değerine ayarlandığında kararsız baseline oluştuğu zemin gürültüsüne ait sinyallerin artığı ve kolon basıncının kararlı olmadığı Co-PAR ve Ni-PAR piklerinin çakıştığı Fe-PAR kompleksine ait pikin gözlenmediği belirlendi (Şekil 3.45).

pH değerinin düşürülmesiyle zemin gürültüsüne ait sinyallerin azaldığı, metal komplekslerine ait piklerin alıkonma sürelerinin artığı gözlemlendi (Şekil 3.65). Liganda ait pikin alıkonma süresinin pH 5,3'de maksimum olduğu bu değerden yüksek ve düşük pH değerlerinde ise alıkonma süresinin azaldığı tesbit edildi (Şekil 3.54). Bu duruma ligandın farklı pH değerlerinde farklı rezonans yapılarına dönüşmesinin neden olduğu belirlendi (Şekil 2.3).

Metal komplekslerine ait piklerle liganda ait pikin birbirinden ayrıldığı ve analiz için en uygun pH değerlerinin 5,2 ile 6,3 arasında olabileceğine karar verildi.

Mobil faz pH sı artıkça metal-PAR komplekslerine ait piklerle liganda ait piklerin yüksekliklerinin artığı pH 6,5 den sonra Fe-PAR pikinin yüksekliğinin azaldığı belirlendi (Şekil 3.56).

Metal-PAR komplekslerine diğer metal iyonlarının etkisi incelendiğinde optimize edilen şartlarda Ca⁺² ve Mg⁺² çözeltilerinden 1000 ppm, Al⁺³, Cr⁺³, Mn⁺², Zn⁺², Pb⁺² ve Cd⁺² çözeltilerinden ise 500 ppm' lik çözeltiler hazırlandı. Çözeltiler PAR'la kompleksleştirildikten sonra standart Fe-PAR, Co-PAR ve Ni-PAR

çözeltileriyle karıştırılıp HPLC sistemine enjekte edildiğinde standart metal-PAR komplekslerine ait piklerin alanlarında ve alıkonma sürelerinde değişikliğin olmadığı gözlemlendi. (Şekil 3.67 ve Şekil 3.68). Fe^{+3} konsantrasyonu 200 ppm' i aştığında Co-PAR pikiyle Fe-PAR piklerinin çakıştığı gözlemlendi (Şekil 3.68). Bu girişimi gidermek için mobil faz bileşiminin pH' ısı 5,2'den 6,3'e çıkarıldı. Co-PAR kompleksine ait pikin alıkonma süresi kısalarak Fe-PAR'dan ayrıldığı fakat Fe-PAR ile Ni-PAR piklerinin birbirine yaklaştığı tesbit edildi.

Fe^{+3} derişimi fazla olan toprak, cevher ve alaşım örneklerinde meydana gelecek girişimleri önlemek için 2 mL 1000 ppm lik standart Fe^{+3} çözeltisine 1 M' lık sodyum sitrat çözeltisinden 5 mL eklendiğinde Fe-sitrat kompleksinin oluştuğu belirlendi. Bu kompleksin olduğu ortama PAR ilave edilip optimize edilen şartlarda kromatogramlar alındığında Fe-PAR'a ait pik gözlenmedi. Fe-sitrat kompleksine PAR'ın bozucu etkisinin olmadığı tesbit edildi.

Aynı şartlarda Ni-PAR ve Co-PAR kompleksleri oluşturulup sitrat tamponu eklendiğinde komplekslerde değişikliğin olmadığı belirlendi

Optimize edilen şartlarda maydonoz örneğinin çözünürleştirilmesinden sonra HPLC'de kromatogramı alındığında, çözücü pikinin olduğu yerde büyük bir pik gözlenerek Co-PAR pikinde girişim yaptığı belirlendi (Şekil 3.52). Bu pikin oluşmasına neden olabilecek şartları tesbit etmek amacıyla, kobalt standart çözeltileri 4 farklı teflon kaba konarak her birine sırasıyla derişik HNO_3 , H_2O_2 , HClO_4 ve HCl asitlerinden 5 mL ilave edildi ve çözünürleştirme işlemlerindeki parametreler uygulandı. Kobalt standartlarının PAR'la kompleksleri yapıldıktan sonra HPLC'de kromatogramları alındı. HNO_3 , H_2O_2 kullanıldığında çözücü pikinin gözlemlendiği yerde oluşan büyük pikin Co-PAR kompleksine ait piki kapattığı görüldü. HClO_4 ve HCl asitleri kullanıldığında girişim yapan pikin oluşmadığı gözlemlendi (Şekil 3.53). Standart PAR çözeltisine 1 M'lık HNO_3 , H_2O_2 çözeltileri ilave edilip kromatogramları alındığında girişim yapan pikin oluştuğu, 1 M'lık HClO_4 ve HCl çözeltileri eklendiğinde girişim yapan pikin oluşmadığı belirlendi. Bu işlemlerin sonucunda HNO_3 , H_2O_2 çözeltilerinin PAR'ın yapısını bozduğu HClO_4 ve HCl çözeltilerinin ise PAR'ın yapısında değişiklik yapmadığı belirlendi. Çözünürleştirme işlemlerinde HNO_3 ve H_2O_2 çözeltileride kullanılacağından PAR'da meydana gelecek bozulmayı engellemek için, çözünürleştirme sonunda ortamdaki HNO_3 ve H_2O_2 nin tamamının buharlaştırılmasına karar verildi. Bu nedenle stok çözeltiler hazırlanırken ve örneklerin seyreltilmesinde 0,1M HCl çözeltisi kullanıldı.

Örneklerin analizinde optimum şartlar Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. HPLC analizlerinde optimize edilen şartlar

Mobil faz bileşimi (v/v)	metanol/su/asetonitril/(1×10^{-2} M)asetat çözeltilisi: 55/40/2,5/2,5
Kolon	LUNA C ₁₈ (250x4.6 mm 5 μ) ODS
Detektör	Foto diyot array (PDA)
Mobil faz pH'ı	5,3 - 6,2
Dalga boyu (nm)	490 – 510
Akış hızı (mL/dk)	0,5 – 0,7
Enjeksiyon hacmi (μ L)	20 – 40

Optimize edilen şartlarda, hazırlanan örnek çözeltileri PAR ile kompleks oluşturularak 4 saat içinde HPLC ile tayinleri gerçekleştirildi.

Analiz edilen örneklerde kobalt miktarı (kuru madde miktarına göre) 0,141 mg/kg ile 1,877 mg/kg arasında bulundu. En fazla kobalt sigara örneklerinde, kekikte, mercimekte, yeşil fasulyede ve pelin otunda belirlendi. Örneklerin çoğunda kobalt miktarı aletin tayin sınırı altında olduğundan belirlenemedi.

Nikel miktarı (kuru madde miktarına göre) 0,356 mg/kg ile 6,938 mg/kg arasında tesbit edildi. En fazla nikel sırasıyla kekik, mersin yaprağı, kuru fasulye ve pelin otunda belirlendi.

Demir miktarı (kuru madde miktarına göre) 712 mg/kg ile 62 mg/kg arasında tesbit edildi. En fazla demir miktarı 712,39 mg/kg ile ısırgan tohumunda ve 642,64 mg/kg ile sigara örneklerinde tesbit edildi. Sigaradan sonra en fazla demir miktarı sırasıyla kekik, pelinotu ve kantaronda tesbit edildi (Tablo 3.5).

HPLC ile yapılan bir çalışmada (70) sigara örneklerinde kobalt miktarları 0,107 mg/kg ile 0,139 mg/kg arasında ve nikel miktarları 0,5 mg/kg ile 4,27 mg/kg arasında bulunmuştur. Bizim çalışmalarımızda tütün örneklerinde kobalt miktarları 0,542 mg/kg ile 1,744 mg/kg arasında nikel miktarları ise 1,511 mg/kg ile 6,918 mg/kg arasında bulunmuştur. Farklı iklim ve toprak koşullarında yetiştirilen bitki örneklerindeki metal miktarlarının farklı olması beklenen bir sonuçtur.

Sebzeler üzerinde yapılan bir çalışmada (155) aktif karbonla zenginleştirilme işleminden sonra nikel miktarları F-AAS ile tayinlerde 1,10 mg/kg ile 6,60 mg/kg arasında bulunmuştur. Bizim çalışmalarımızda sebze örneklerindeki nikel miktarları zenginleştirme gerekmeksizin 0,576 mg/kg ile 6,918 mg/kg arasında bulunmuştur. Aynı çalışmada turp sebzesinde nikel 1,60 mg/kg bulunmuşken aynı bitkide yaptığımız çalışmada nikel 1,582 mg/kg tesbit edilmiştir.

Taze sebzeler üzerinde yapılan bir başka çalışmada (156) diferansiyel puls voltametresi ile nikel miktarları 9-160 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ (yaş madde miktarı), kobalt miktarları ise 1-127 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ (yaş madde miktarı) değerlerinde bulunmuştur. Bizim çalışmalarımızda kuru madde miktarı kullanıldığından, elde ettiğimiz sonuçlar literatürdeki değerlerle uyum içinde olduğu görülmektedir. Aynı çalışmada kuru madde miktarına göre fasulyede kobalt 0,170 mg/kg bulunmuşken bizim çalışmamızda fasulyede kobalt miktarı 0,225 mg/kg bulunmuştur.

Aynı anda demir, nikel ve kobalt tayinlerini gerçekleştirdiğimiz bu yöntemin seçici ve oldukça duyarlı olduğu, bir çok örnekte özellikle kobalt ve nikelin zenginleştirme basamağı gerektirmeksizin tayin edilebileceği belirlenmiştir. Bu yöntemin kobalt ve nikel tayinleri için pahalı olan ICP-AES ve ICP-OES aletlerine göre daha ekonomik metot olduğu belirlenmiştir.

HPLC sistemi, aynı anda farklı ligandlar kullanılarak elde edilen bir çok metal şelatlarının, foto diyot dizisi ve flüoresans detektörlerle zenginleştirme ve enterferans elimine basamağı gerektirmeksizin, aynı zamanda, çok düşük duyarlılıkta (0,1 $\mu\text{g/kg}$ ile 5 $\mu\text{g/kg}$ arasında) ve yüksek seçicilikteki tayinler için kullanılabilir.

5. KAYNAKLAR

- 1 Veening H., Greenwood J.M, Shanks W.H., Willeford B.R., J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1969) 1305.
- 2 Zhao Y. and. Fu C.G, Analyst, 116 (1991) 621.
- 3 Liu Q., Liu J., Tong Y.and Cheng J., Anal. Chim. Acta, 269 (1992) 223.
- 4 Nagaosa Y., Kawabe H. and. Bond A.M, Anal. Chem., 63 (1991) 28.
- 5 Marina M.L., Andres P.and Masa J.C., Chromatographia, 35 (1993) 621.
- 6 Dilli S., Haddad P.R and Htoon A.K., dietilditiokarbamit J. Chromatogr., 500 (1990) 313.
- 7 Ichinoki S. and Yamazak M. J. Chromatogr. Sci., 28 (1990) 258.
- 8 Willeford B.R., Veening H., J. Chromatogr. 251 (1982) 61.
- 9 Casoli A., Mangia A., Predieri G., Sappa E., Volante M., Chem. Rev. 89 (1989) 407.
- 10 1997 437 451 journal of Cromatography Review.
- 11 Bekaroğlu, Ö., Tan, N., (1988). Anorganik Kimya. Gazi Ünv. Fen Fakültesi Yayınlan, Ankara.
- 12 Zishen A., Pesavento S., (1987). Chemical Applications of Group Theory, Depertmant of Chemistry, Massachusetts Institute of Technology. Wiley-Interscience.
- 13 Tobe M.L.. (1972). "Inorganic Reaction Mechanism", Thomas Nelson and Sons Ltd.
- 14 Sharpe A.G., "Inorganic Chemistry", (1981). Logman,).
- 15 Gündüz T., (1994). "Koordinasyon Kimyası.
- 16 Greenwood, N.N., and Earnshaw, A., (1986). Chemistry of the Elements, Pergamon Pres, Oxford.
- 17 Mackay K.M., and Mackay R.A., (1981). "Introduction to Modern Inorganic Chemistry" İnîernatnal Text Book Corp, Third Edition.
- 18 Okutani, T.; Sakuragawa, A.; Murakami, M. Anal. Sci. 1991, 7 (Suppl.), 109.
- 19 Khalaf K.D., Hasan B.A., Rubio A.M., Guardia M.D., (1994). Spectrophotometric Determination of Phenol Resorsinol by Reaction With p-Aninophenol. Talanta.41, 4, pp.547-556.
- 20 Hulanicki. A, Ackermann G., Complexometric indicators Chracteristics and applications, Pure Appl. Chem., 1983., 55., 1137-230
- 21 Skoog D. A., Leary., 1992, Principles of Instrumental Analysis, fourth edition, Saunders College Publishing, Orlando, Florida.
- 22 Caruso, J.A., Sutton, K.L., Ackley, K.L. (Eds.), 2000. Elemental speciation: new approaches for trace element analysis, 1st Edition. Comprehensive Analytical Chemistry, Vol. 33. Elsevier, Amsterdam, p. 581.

- 23 B'Hymer, C., Brisbin, J.A., Sutton, K.L., Caruso, J.A., 2000. New approaches for elemental speciation using plasma mass spectrometry. *A. Lab* 32, 17–39.
- 24 Sutton, K.L., Caruso, J.A., 1999a. Liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 856, 243–258.)
- 25 *Journal of Chromatography A*, 1060 (2004) 23-41)
- 26 Neue u.D., *HPLC Columns: Theory, Technology and Practice*, Wilvy-VCH, New York, 1997
- 27 Wyndham K.D., O'gara J.E., walter T.H, Glose K.H., Lawrence N.L *Anal. Chem.* 75 (2003) 6781.
- 28 Siren. H, 1991, Studies on metal complexes of nitroso-naphtol sulphonates ion-paired with ammonium compounds by UV/Vis-liquid chromatography with liquid-liquid extraction and on-line derivatization, *Annales Scientiarum Fennica*, Helsinki.
- 29 Dunlap C.J., McNeff C.V., Stoll D., Carr P.W., *Anal. Chem.* 73 (21) (2001) A598.
- 30 Schomburg G., *Trends Anal. Chem.* 10 (5) (1991) 163.
- 31 *Journal of Chromatography A*, 1028 (2004) 1–30 Review PART I.
Chromatography using ultra-stable metal oxide-baset stationary phases for HPLC
J. Nawrocki , C. Dunlap , A. McCormick, P.W. Carr.
- 32 Tani K., Suzuki Y., *Chromatography A.* 38 (5–6) (1994) 291.
- 33 Buchmeiser M.R., *J. Chromatogr. A* 918 (2001) 233.
- 34 Nawrocki J., *Chromatographia* 31 (1991) 193.
- 35 Nawrocki J., *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 29.
- 36 Berthod A., *J. Chromatogr.* 549 (1991) 1.
- 37 Sander L.C., Wise S.A., *Crit. Rev. Anal. Chem.* 18 (1987) 299.
- 38 U.D. Neue, in: R.A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Wiley, 2000, p. 11450
- 39 Nawrocki J., Dunlap C., *Journal of Chromatography A*, 1028 (2004) 1-62.
- 40 Jaroniec C.P., Jaroniec M., Kruk M., *J. Chromatogr. A* 797 (1998) 93.
- 41 Katz E., Eksteen R., Schoenmakers P., Miller N. (eds), *Handbook of HPLC*, Marcel Dekker, New York, 1998.
- 42 Hiemstra T., De Wit J.C.M, Van Riemsdijk W.H., *J. Colloid Interface Sci.* 133 (1) (1989) 105.
- 43 Egenç N., Gürsoy A., Ateş Ö., 1989, İlaçların Tanınması ve Kantitatif Analizi, IV. Baskı, İstanbul Üniversitesi Yayınları, No:8566, Eczacılık Fakültesi No:55, İstanbul.
- 44 Geary W. J, Nickless G.and Pollard F. H., *Anal. Chim. Acta*, 1962.

- 45 Anal. Chem. 2002, 74, 2813-2832.
- 46 Sutheimer S.H.Cabaniss., S.E., Anal. Chem. 67 (1995) 2342.
- 47 Setford, S. J.; Saini S. J. Chromatography., A 2000, 867, 93-104.
- 48 Budnikov, G. K.; Kazakov, V. E. J. Anal Chem. 2000. 55 (2). 191-195.
- 49 Van-Beek H., Boars A. J., At. Spectrosc. 11,70 1990.
- 50 1999 UIPAC, Pure Appl. Chem. 71, 899-918.
- 51 Wu J., Zhou C.Y., Chi H., Wong MX., Lee HX., Ong H.Y, Ong C.N., J. Chromatogr. B 663 (1995) 247.
- 52 Lee B.L, Chua L.H., Ong H.Y., Yang H.G., Wu J., C.N. Ong, Clin. Chem. 42 (1996) 1405.
- 53 Schuster M., Sandor M. , Fresenius J. Anal. Chem. 356 (1996) 326.
- 54 Liao J.P, Saleh F.Y., Int. J. Environ. Anal. Chem. 56 (1994) 239.
- 55 Kumar K., Sukumaran K..V., Tweedle M.F., Anal. Chem. 66 (1994) 295.
- 56 Weber G, Fresenius J. Anal. Chem. 356 (1996) 242.
- 57 Nagaosa, Y Kimata Y., Anal. Chim. Acta 327 (1996) 203.). Yamamoto A., Matsunaga A., Mizukami E., Hayakawa K., Miyazaki M., Nishimura M., Kitaoka M., Fujita T., Analyst 120 (1995) 1137.
- 58 Careri M., Mangia A., Manini P., Predieri G., J. Organomet. Chem. 476 (1994) 127.
- 59 Boorn, A.W., Browner, R.F., 1982. Effects of organic solvents in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Anal. Chem. 54, 1402–1410.
- 60 Cairns, W.R.L., Ebdon, L., Hill, S.J., 1996. A high performance liquid chromatography inductively coupled plasma - mass spectrometry interface employing desolvation for speciation studies of platinum in chemotherapy drugs. Fresenius J. Anal. Chem. 355, 202–208.
- 61 Larsen, E.H., 1998. Method optimization and quality assurance in speciation analysis using high performance liquid chromatography with detection by ICP-MS. Spectrochim. Acta 53, 253–265.
- 62 Ronald E., (2003), 27th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques LC-GC North America (21) Number 9
- 63 San AndreaM. P., Soledad V, MarinaM. L., 1994, J. Chromatogr. A, 685, 271.
- 64 Chen B., Zhang Q., Minami H., Inoue S., 1999, J. Chromatogr. Sci., 37, 306.
- 65 Liu Q., Zhao T., Liu J., Cheng J., 1996, Mĭcrochim. Aĉta, 122, 2
- 66 ChaowuD., HuabinL., 1998, Sepu, 16(6), 545.
- 67 Sanchez j.M, Journal of Chromatography A, 871 (2000) 217-226.
- 68 Peng J., Liu S., Analytical Sciences (2005) Vol:21.

- 69 Vachirapatama N., Doble P., Journal of Chromatography A, 885 (2000) 369-375.
- 70 Miura J., Zhang C., Journal of liquid Chromatography 29 (2006), 137-145.
- 71 Vachirapatama N., Doble P., Journal of Chromatography A, 956 (2002) 221-227.
- 72 Agostinho A., Jun X., Talanta 50 (1999) 253-259.
- 73 Pobozy E., Halko R., Water Research 37 (2003) 2019-2026.
- 74 Caruso J.A., Montes-Bayon M./ Ecotoxicology and Environmental Safety 56 (2003) 148-163.
- 75 Ackley, K.L., B'Hymer, C., Sutton, K.L., Caruso, J.A., 1999. Speciation of arsenic in fish tissue using microwave-assisted extraction followed by HPLC-ICP-MS. J. Anal. Atom. Spectrom. 14, 845-850.
- 76 Szpunar, J., 2000. Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. J. Anal. Atom. Spectrom. 55 (7), 963-988.
- 77 Aginihatri N. K., Singh V. K., Sing H.B., 1997, Derivative spectrophotometric determination of copper (II) in non-ionic micellar medium, Talanta, 45, 331.
- 78 Xin Q.J. Varian Application Notes, AA-93, 1990. Determination of Cu, Zn, Fe, Ca, Mg, Na and K in Serum by Flame AAS.
- 79 Tan K.C., Hor T.S.A., Lee H.K., J. Liq. Chromatogr. 17 (1994) 3671.
- 80 Kumar K., Sukumaran K., Taylor S., Chang C.A., Nunn A.D., Tweedle M.F., J. Liq. Chromatogr. 17 (1994) 3735.
- 81 Feng Y.Q., Shibukawa M., Oguma K., Chromatographia 41 (1995) 532.
- 82 Liu W.P., Liu Q.P., Fresenius J. Anal. Chem. 350 (1994) 671.
- 83 Nesterenko P.N., Levitin I.Y., Tsikalova M.V., Volpin M.E., Inorg. Chim. Acta 240 (1995) 665.
- 84 Jimenez, R.A., Jimenez, F.A., and Arias, J., (1989). Simultaneous Second Order Analogue Derivative Spectrophotometric Determination of Vanadium and Cobalt in Steels, Analyst. 114, pp.93-96.
- 85 Wang. H., Miao Y., Mou. Y., 1994, Cheng J. K., Microchim. Acta, 117,65.
- 86 Rajamoorthi, K., Mohan, S.V., and Balasubramanian, R.G., (1981). Spectrophotometric Determination of Uranium and Using 2,4-Dinitrosoresorsinol. Analyst, 106, pp.641-646
- 87 Ölçücü, A.(1994). 2,4-Dinitrosoresorsinol ile Spectrophotometric Kobalt Analizi ve Kompleksometrik Metal Analizinde Kullanılan Ligandların XAD-7 Üzerine İmmobilizasyonu İle Fiber-Optik Kimyasal Sensör Geliştirmesi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü.
- 88 Awadallah, R., Mohamed, A.E., and EL Maghraby, M.A., (1990). Synthesis and Characterization of Complexes of Iron(II, III), Cobalt(II,III) and Nickel(II) with Dinitrosoresorsinol, Transition Met. Chem.15, 4, pp. 273-277.

- 89 Sosa, Z. and Arias, J.J., (1989). Spectrophotometric Study of The Complexation Equilibria and The Determination of Palladium(II) with 4-(5'-Methyl-3'Isloxazolylazo) Resorsinol, *Quim. Anal.* 8, 2, pp.197-202.
- 90 Grudpan, K., Sooksamiti, P., Laiwraunrant, S.(1995). Determination of Uranium in Tin Tailing Using 4-(2-Piridilazo) rezorsinol by Flow-İnjection Analysis. *Analytica Chimica Acta*, 314, pp.51-55.
- 91 Mori, I., Fujita, Y., Toyoda, M., and Hasegawa, Y., (1992). Improved Spectrophotometric Determination of Osmium(VIII) With 4-(2-Piridilazo) Resorsinol in Mixed Surfactants, *Talanta*. 39, 5, pp.535-539.
- 92 Taylor, M.J.C, Marshall, G.S., Williams., S.J.S, Staden, J.F.(1996) The Determination of Vanadium(V) in The Presence of Vanadium(IV) Using 4-(2 Piridilazo)Resorsinol İn a Flow-Injection Manifold, *Analytica Chimica Acta*. 329, pp.275-284.
- 93 Dinunzio, J.E., Yost, R.W., and Hutchison. E.R., (1985). Liquid Chromatographic Speration of Metals by On-Colum Chelation With 4-(2-Piridilazo)Resorsinol. *Talanta*. 32, 8B, pp.803-806.
- 94 Wong, L., Ma, C., Zhang, X., Wong, J., (1994). Adsorptive Voltmmetric Measurement of Trace Level of Iron(III) with 4-(2 Piridilazo)Resorsinol, *Analytical Letters*. 27, 6, pp.1165-U73.
- 95 He, H.B., Siow, Chi K.S., Ü, , Gao H., Hsieh Z.Q, (1995). Determination of Molybdenum Using Polarographic Catalytic Current, *Analytica Chimica Acta*. 309, pp.73-78.
- 96 Careri M., Mangia A., Manini P., Predieri G., Licandro E., Papagni A., J. *Chromatogr. A* 730 (1996) 231.
- 97 Rottmann L., Heumann K.G., *Anal. Chem.* 66 (1994) 3709.
- 98 Heumann K.G. , Rottmann L., Vogl J., J. *Anal. Atom. Spectrom.* 9 (1994) 1351.
- 99 Schoppenthau J., Dunemann L., Fresenius J. *Anal. Chem.* 349 (1994) 794.).
- 100 Mazzucotelli A., Rivaro P., *Microchem. J.* 51 (1995) 231.
- 101 Cairns W.R.L, Hill S.J., Ebdon L., *Microchem. J.* 54 (1996) 88.
- 102 Suzuki K.T., Ogra Y., Ohmichi M., J. *Trace Elem. Med. Biol.* 9 (1995) 170.
- 103 Heudi O. , Cailleux A.. Allain P. , *Chromatographia* 44 (1997) 19.
- 104 Suzuki K.T., Itoh M., Ohmichi M., *Toxicology* 103 (1995) 157.
- 105 Ebdon L., Evans E.H., Pretorius W.G, Rowland S.J., J. *Anal. Atom. Spectrom.* 9 (1994) 939.
- 106 Hong-Zhen L., Yu-Fen K., Arkin, Y., Shu-Ping B., Da-Lin S., Yi-Jun C., Le-Mei D., Li-Ching T., *Journal of Chromatography A*, 993 (2003) 179–185

- 107 Yongsoon C., and Wonseog C., Environmental Pollution 129 (2004) 69–78
Capillary-HPLC Determination of Co(III)-TAR Bull. Korean Chem. Soc. 2003,
Vol. 24, No. 12 1781
- 108 Okutani T., Yuuichi, T., Akio, S., Takehiro Y., Shiho, M., Multi-element trace
analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography followed by
on-line column enrichment as 2-(5-nitro-2-piridilazo)-5- [N-propyl-N-(3-
sulphopropyl)amino] phenol chelates Journal of Chromatography A, 788 (1997)
113-119
- 109 Zhi-Ling M , Yan-Ping W., Chun-Xu W., Feng-Zhi M., Wei-Xin M., Reversed-
phase ion-pair high performance liquid chromatographic determination of Co(III)-,
Ni(II)-,V(V)- and Fe(III)-2-(2-benzothiazolylazo)-5-(3-sulforpropyl) aminophenol
Chelates, Talanta 44 (1997) 743-748
- 110 Journal of Alloys and compounds 249 (1997) 133-135
- 111 Matsumiya H., Nobuhiko I., Sotaro, Sulfonylcalix[4]arenetetrasulfonate as pre-
column chelating reagent for selective determination of aluminum(III), iron(III),
and titanium(IV) by ion-pair reversed-phase high-performance liquid
chromatography with spectrophotometric detection, Talanta 62 (2004) 337–342.
- 112 Dicinoski, G., Ashley T., Haddad P., Determination of vanadium as 4-(2-
yridylazo)resorsinol–hydrogen peroxide ternary complexes by ion-interaction
reversed-phase liquid Chromatography Narumol Vachirapatama , Journal of
Chromatography A,956 (2002) 221–227
- 113 Qiufen H., Guangyu Y., Jiayuan, Y., Determination of trace lead, cadmium and
Merckury by on-line column enrichment followed by RP-HPLC as metal-tetra-(4-
bromophenyl)-porphyrin chelates Talanta 57 (2002) 751–756.
- 114 Victor, M., Eniko, T., Boglarka, K., Gyula, Z., Investigation of the transported
heavy metal ions in xylem sap of cucumber plants by size exclusion
chromatography and atomic absorption spectrometry Edit Cseh Journal of
Inorganic Biochemistry 81 (2000) 81–87.
- 115 Liu H., Er, Z., Li Q., Hu Q., Yin, J., Study on determination of seven transition
metal ions in water and food by microcolumn high-performance liquid
chromatography 694 Bull. Korean Chem. Soc. 2004, Vol. 25, No. 5.
- 116 Senyuva, H., Yurtsever S., Özden, T., Simultaneous Determination of Fe(II) and
Fe(III) in Pharmaceutical Samples by Post-Column Derivatization HPLC, J. Chem
26 (2002) , 425 (430) TUBITAK.
- 117 Kuñç, S., 1989, The Journal of Fırat University 2 (1), 1-9 .
- 118 Ölçücü, A., Çağlar, P., 1993, The Journal of Trace Elements in Experimental
Medicine, 6;141-145.

- 119 Ası, T., 1996, Tablolarla Biyokimya, İstanbul
- 120 Förstner, U., Wittmann, GTW., Metal Pollution in The Aquatic Environment, 2th Ed., Springer Verlag Co., Berlin 1983.
- 121 Bingöl, G., (1983). Biyokimya. Dördüncü baskı, hacetepe Taş yayıncılık Ankara.)
- 122 Apak R., 1998, Çevre kimyası Ders Notları, İ.Ü. Mühendislik Fakültesi, Kimya Bölümü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Avcılar, İstanbul.
- 123 WHO (1986). Ottawa Charter for Health Promotion. *Geneva*: World Health Organization.
- 124 Hammer, M.J., 1986, Water and Wastwater Tecnoogy, 2 th, Ed., John Wiley and Sans, New York
- 125 TS 266, 1986, İçme Suları TSE, Ankara.
- 126 Uslu, D., Türkmen, A., 1987, Su Kirliliği ve Kontrolü, T.C., Başbakanlık Çevre Genel Müdürlüğü Yayınları, İzmir.
- 127 Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Cobalt. Public Health Service, U.S. DePARTment of Health and Human Services, Atlanta, GA. 1992). California Environmental Protection Agency (CalEPA). Technical Support Document for the Determination of Noncancer Chronic Reference Exposure Levels. Draft for Public Comment. Office of Environmental Health Hazard Assessment, Berkeley, CA. 1997
- 128 Aksoy, M., Beslenme Biyokimyası ve İz Elementler, 2000 Ankara
- 129 U.S. DePARTment of Health and Human Services. Hazardous Substances National Toxicology Information Program, National Library of Medicine, Bethesda, MD. 1993
- 130 National Toxicology Program. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Cobalt Sulfate Heptahydrate (CAS No. 10026-24-1) in F344/N Rats and B6C3F₁ Mice (Inhalation Studies). TR No. 471. U.S. DePARTment of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. 1998.
- 131 U.S. Environmental Protection Agency. Health Assessment Document for Nickel. EPA/600/8-83/012F. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC. 1986.
- 132 Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Nickel (Update). Public Health Service, U.S. DePARTment of Health and Human Services, Atlanta, GA. 1997).
- 133 U.S. Environmental Protection Agency. Integrated Risk Information System (IRIS) on Nickel Carbonyl. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC. 1999.
- 134 Cotton, F.A., Wilkinson, G., (1989) Advanced inorganic chemistry. New York, John Wiley Sons Ltd, pp 755-775.

- 135 Allen HE & Hansen DJ (1996) The importance of trace metal speciation to water quality criteria. *Water Environ Res*, 68 (1), 42-54.
- 136 Anke M (1991) Trace element intake (zinc, manganese, copper, molybdenum, cobalt, and nickel) of humans in Thuringia and Brandenburg of the Federal Republic of Germany. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis*, 5, 69-74.
- 137 WHO (1986). *Ottawa Charter for Health Promotion*. Geneva: World Health Organization.
- 138 World Health Organization Geneva, 1998.
- 139 Trace Elements In Human Nutrition and Health", World Health Organization, Geneva, 1996.
- 140 Linder, M. C. (1991). *Biochemistry of Copper*. New York: Plenum Press.
- 141 Davics, S. and Dr. Slevvart, A., Hastalanmadan Yaşamak Bizim Elimizde ,61.93,)
- 142 Al-Akel AS (1987) Behavioural and the physiological changes in *Oreochromis niloticus* due to contamination of copper. *Z Angew Zool*, 74(4): 479-487.11.
- 143 Kelley DS, Daudu PA, Taylor PC, Mackey BE, & Turnlund JR (1995), Effects of low-copper diets on human immune response. *Am. J. Clin. Nutr*, 62: 412-416.
- 145 Yenson, M., 1995, İnsan Biyokimyası, 585, 586.
- 146 Subbaah, H., Obaid, A., 1996 2,4 – Disubstituted Thiazoles II. A Novel Class of Antitumor Agents, Synthesis and Biological Evaluation *Eur, J., Med, Chem.*, 31.1017 – 1021.
- 147 Moore, J.M. and Ramamoorthy, S., 1984, *Heavy Metals in Natural Waters*, 58-76, Springer-Verlag Co., New York.
- 148 Underwood, E. J., 1997, *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, 4th ed., Academic Press, 192 New York.
- 149 W. Mertz, "Trace Elements In Human and Animal Nutrition-Fifth Edition", Vol. 1, Academic Press, 1987.
- 150 F. Habashi, "Handbook of Extractive Metallurgy", Vol. 2, WILEY-VCH, Germany, 1997.
- 151 Onat. T, Emerk. K, Sözmen Y, İnsan biyokimyası, s 529-531 palme yayıncılık, 2002 Ankara.
- 152 Levine, M.M., Kleeman, C.R., 1987, *Hypercalcemia: Pathophysiology and Treatment*. *HospPract* 22:73
- 153 A.G. Gilman, T.W. Rall, A.S. Nies and P. Taylor, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*" pp. 1282-92., 8th ed. Pergamon Press.
- 154 *J. Chromatography A*, 885(2000) 369-375
- 155 Yaman, M., and Gucer, S., *Annali di Chimica*, 88, 1998, by Societa Chimica Italiana
- 156 Stegen, S., Queirolo, F., Carrasco, C., *Bol. Soc. Chil. Quím.*, 47, 279-287 (2002) ISSN0366-1644

ÖZGEÇMİŞİM

1975 Elazığ'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 1992 yılında Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği bölümüne kaydoldum. 1996 yılında aynı okulu bitirdim. 1996 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisansa başladım. “Çeşitli Sebzelerde Bulunan Folik Asitin HPLC İle Tayini” adlı yüksek lisans tezimi 1999'da tamamladım.

1996 yılından 2006 yılına kadar çeşitli özel öğretim kurumlarında kurucu, idareci ve kimya öğretmeni olarak çalıştım. Halen aynı görevleri devam ettirmekteyim.