İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAPİLER ELEKTROFOREZ – ÖRNEK SIKIŞTIRMA YÖNTEMİ İLE İDRARDA OROTİK ASİT TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve TAŞER

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nevin ÖZTEKİN

Temmuz 2020

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAPİLER ELEKTROFOREZ – ÖRNEK SIKIŞTIRMA YÖNTEMİ İLE İDRARDA OROTİK ASİT TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve TAŞER
509181289

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nevin ÖZTEKİN

TEMMUZ 2020

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 509281189 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Merve TAŞER, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "KAPİLER ELEKTROFOREZ – ÖRNEK SIKIŞTIRMA YÖNTEMİYLE İDRARDA OROTİK ASİT TAYİNİ" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Nevin ÖZTEKİN** .....
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Bedia E. BERKER** .....
İstanbul Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üye. Mehmet Şerif CANSEVER .....
İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa

Teslim Tarihi : 15 Haziran 2020
Savunma Tarihi : 14 Temmuz 2020

Aileme,

ÖNSÖZ

Eğitim ve öğrenim hayatım boyunca ve bu çalışmayı hazırlarken geçirdiğim süreçte benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen başta biricik annem Hatice TAŞER'e, babam İsmet TAŞER'e, abilerim Gökhan TAŞER ve Erkan TAŞER'e; bu süreçte daima yanımda olan Tamer SAYGILI'ya ve tez çalışmamda bilgi, birikim ve tecrübeleriyle yol gösterici olan değerli tez danışmanım Doç. Dr. Nevin ÖZTEKİN'e, bilgilerini, önerilerini ve ilgisini benden hiçbir koşulda esirgemeyen sevgili Veselina ADIMCILAR 'a sonsuz teşekkür ederim.

Haziran 2020

Merve TAŞER
Yüksek Kimyager

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ..... **vii**
İÇİNDEKİLER ..... **ix**
KISALTMALAR ..... **xi**
SEMBOLLER ..... **xiii**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **xv**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xvii**
ÖZET ..... **xix**
SUMMARY ..... **xxi**
1. GİRİŞ **1**
2. ELEKTROFOREZ **3**
3. KAPİLER ELEKTROFOREZ **5**
3.1 Tarihsel Süreç 6
3.2 Kapiler Elektroforez Yöntemleri 7
3.3 Kapiler Elektroforez ve Kullanım Alanları 11
3.4 Örnek Sıkıştırma Yöntemi 13
4. KAPİLER ELEKTROFOREZDE AYRILMA PRENSİBİ **15**
4.1 Elektroosmatik Akış 15
4.1.1 Zeta potansiyeli 18
4.1.2 Ayırma etkinliği ve rezolüsyon 19
4.2 Elektroosmatik Akışı Etkileyen Faktörler 20
4.2.1 Sıcaklık 20
4.2.2 Tampon konsantrasyonu 21
4.2.3 Tampon pH'ı 21
4.2.4 Organik çözücü ilavesi 22
4.2.5 Uygulanan Potansiyel 22
4.2.6 Tampona ilave edilen çeşitli maddeler 23
4.2.6.1 Yüzey aktif madde ilavesi 23
5. KAPİLER ELEKTROFOREZ CİHAZININ BÖLÜMLERİ **25**
5.1 Güç Kaynağı 25
5.2 Kapiler Boru 25
5.3 Enjeksiyon 25
5.3.1 Hidrodinamik enjeksiyon 26
5.3.2 Elektrokinetik enjeksiyon 26
5.4 Dedektör 26
5.4.1 İletkenlik (kondüktivite) dedektörü 27
5.4.1.1 Temassız iletkenlik dedektörü 27
5.5 Elektrotlar 29
6. OROTİK ASİT **31**
7. METABOLİK HASTALIKLAR **35**
7.1 Organik Asidemiler 35

7.1.1 Orotik asidüri 36
7.1.1.1 Orotik asidüri tip I ve tip II 37
8. İDRAR 39
8.1 İdrarın Kimyasal Özellikleri 39
8.2 İdrarın Fiziksel Özellikleri 39
8.3 İdrarın Toplanması ve Saklanması 39
9. LİTERATÜR İNCELEMESİ 41
10. DENEYSEL KISIM 43
10.1 Kimyasallar ve Çözeltilerin Hazırlanması 43
10.1.1 Kimyasallar 43
10.1.2 Standart çözeltilerin hazırlanması 43
10.1.3 Örnek çözeltilerin hazırlanması 43
10.1.4 Ön denemeler ve tampon çözeltinin hazırlanması 44
10.2 Cihazlar ve Çalışma Koşulları 44
10.3 Metot Geliştirme ve Optimizasyon 45
10.4 Kalibrasyon Grafiğinin Oluşturulması 47
10.5 LOD ve LOQ Değerleri 48
10.6 Tekrarlanabilirlik Ölçümleri 48
10.7 Metodun Örneğe Uygulanması 49
10.8 Geri Kazanım Değerleri 49
11. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 51
KAYNAKLAR 53
ÖZGEÇMİŞ 57

KISALTMALAR

CE : Kapiler Elektroforez
EOF : Elektoosmatik Akış
CZE : Kapiler Zon Elektroforez
CGE : Kapiler Jel Elektroforez
MEKC : Misel Elektrokinetik Kromatografi
ACE : Afinite Kapiler Elektroforez
ITP : İsotakoforez
UV : Ultra Viyole
LOD : Dedeksiyon Sınırı
LOQ : Tayin Sınırı
RSD : Bağıl Standart Sapma
OA : Orotik Asit
SSD : Sodyum Dodesil Sülfat
MES : Morfolinoetansulfonik Asit
HIS : Histidin
CTAB : Setrimonyum bromür
CAPSO : Siklohekzilamino hidroksi propansülfonik asit
NaOH : Sodyum Hidroksit
ACN : Asetonitril
UMP : Üridin Monofosfat
UMPS : Üridin Monofosfat Sentaz
Std : Standart

SEMBOLLER

E	**:** Elektriksel alan
μ_{eof}	**:** Elektroosmatik mobilite
ν_{eof}	**:** Elektroosmotik akış hızı
ζ	**:** Zeta potansiyeli
e	**:** Yüzey alana düşen yük
ε	**:** Tamponun dielektrik sabiti
δ	**:** Difüzyon tabakası kalınlığı
t_g	**:** Göç zamanı
N	**:** Teorik tabaka sayısı
w	**:** Pik genişliği
σ^2	**:** Pik dispersiyonu
V	**:** Voltaj
L_d	**:** Kapilerin dedektöre olan uzunluğu
R	**:** Rezolüsyon
D	**:** Analitin difüzyon katsayısı

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 4.1 : EOF'a etki eden faktörler. **20**
Çizelge 5.1 : Kapiler elektroforez dedektör türleri ve tayin sınırları. **27**
Çizelge 5.2 : C^4D dedeksiyonun avantaj ve dezavantajları. **28**
Çizelge 9.1 : Literatürdeki bazı çalışmaların yöntemleri, tamponları ve LOD değerleri. **41**
Çizelge 10.1: Su ve örnek ortamındaki kalibrasyon eğrilerinin karşılaştırılması. **48**
Çizelge 10.2 : Orotik asidin LOD ve LOQ değerleri. **48**
Çizelge 10.3 : 1 mg/L Orotik asidin gün içi ve günler arası zaman ve düzeltilmiş pik alanına bağlı %RSD değerleri. **49**
Çizelge 10.4 : % Geri kazanım değerleri. **50**
Çizelge 11.1 : İdrar örneklerinde orotik asit miktarları. **51**

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Elektroforez sisteminin basit bir gösterimi **4**
Şekil 3.1 : Basit kapiler elektroforez şeması. **6**
Şekil 3.2 : İzotakoforezde ayrılma prensibi. **8**
Şekil 3.3 : İzoelektrik fokus ayrılma prensibi. **9**
Şekil 3.4 : Misel elektrokinetik kromatografi ayrılma prensibi. **10**
Şekil 3.5 : Örnek sıkıştırma yönteminin şematik olarak gösterimi. **13**
Şekil 4.1 : Örnek CE ve HPLC'de akış ve pik profilleri. **16**
Şekil 4.2 : İyonların elektroforetik mobilite gösterimi. **16**
Şekil 4.3 : İyonların büyüklük ve yüklerine göre kapiler kolonda göç sıraları **17**
Şekil 4.4 : İyonların bir elektroferogramdaki geliş sırası. **17**
Şekil 4.5 : Kapiler elektroforez ayırma sisteminde elektroozmotik akış **18**
Şekil 4.6 : Tampon konsantrasyonunun EOF'a etkisi.. ..... **21**
Şekil 4.7 : Tampon pH'ının EOF'a etkisi.. ..... **22**
Şekil 4.8 : Uygulanan potansiyelin göç zamanına etkisi. **22**
Şekil 5.1 : Elektrokinetik ve hidrodinamik enjeksiyon karşılaştırması. **26**
Şekil 5.2 : Temassız iletkenlik dedektör hücresi. **28**
Şekil 6.1 : Orotik asidin molekül yapısı. **31**
Şekil 6.2 : Çeşitli metabolik yollarla ilişkili orotik asit: üre döngüsü, de novopirimidin sentez yolu. **32**
Şekil 7.1 : Sağlıklı ve orotik asidürili bireylerdeki UMP sentez aşamalarının gösterimi. **36**
Şekil 10.1 : Örnek sıkıştırma yöntemi. **46**
Şekil 10.2 : 5 mg/L orotik asit standardının elektroferogramı **47**
Şekil 10.3 : 1:50 oranında seyreltilmiş idrar örneği ve OA standardı ilave edildikten sonra aynı örneğin elektroferogramları.. ..... **49**

KAPİLER ELEKTROFOREZ – ÖRNEK SIKIŞTIRMA YÖNETİMİ İLE İDRARDA OROTİK ASİT TAYİNİ

ÖZET

Son yıllarda, klinik, biyolojik ve gıda örneklerindeki organik asit içeriklerinin belirlenmesinin önemi artmakta ve giderek büyüyen bir araştırma alanı oluşturmaktadır. Biyolojik örnek olarak insan kan ve idrarında bulunan çeşitli organik asitlerin konsantrasyon seviyesinin düşük ya da yüksek olmasına bağlı olarak birçok hastalığın teşhisinin mümkün olduğu bilinmektedir. Orotik asit de bu maddelerden biridir.

Orotik asit bir pirimidindion ve bir karboksilik asittir. Tarihsel olarak B vitamini kompleksinin bir parçası olduğuna inanılıyordu ve B13 vitamini olarak adlandırıldı, ancak günümüzde bir vitamin olmadığı bilinmektedir. İnsanlarda ve diğer organizmalarda, orotik asit, dihidroorotatı orotik aside dönüştüren dihidroorotat dehidrojenaz enzimi tarafından sentezlenir.

Kalıtsal orotik asidüri enzim eksikliğinden kaynaklanan ve pirimidinleri sentezleme yeteneğinin azalmasına neden olan bir hastalıktır. De novo pirimidin sentez yolunun bilinen tek enzim eksikliğidir. Orotik asidüri, orotik asidin üridin monofosfat (UMP)'a dönüştürülememesi nedeniyle idrarda aşırı orotik asit atılımı ile karakterizedir. Çocuklarda ise megaloblastik anemiye ve DNA ile RNA sentezinde kısıtlamaya yol açarak zihinsel ve fiziksel gelişimsel gecikmelere neden olur.

Etkin bir ayırma tekniği olan kapiler elektroforez bir elektrik alan altında en küçük yapıdaki iyonlardan en büyük biyomoleküllere kadar taneciklerin yüksek voltaj uygulanarak göç ederek ayrılması olayıdır. Diğer kromatografik yöntemlerle karşılaştırıldığında kapiler elektroforez yöntemi daha yenidir ve klinik araştırmalarında giderek artan bir yere sahiptir. CE'nin avantajları; yüksek ayırma etkinliği, kısa analiz süreleri, yüksek ayırma hızı, az miktardaki örnek ve çözücü olarak su kullanılmasıdır. Silika kaplı kapiler kolonlar ise kromatografik kolonlara göre çok ucuzdur, çalışma arasında kolayca yıkanır ve dolgu kolonlarda görünen matris kirlenmesi problemi yoktur.

Bu çalışmada, bahsedilen hastalıkların teşhisinde güvenilir ve hassas bir metod geliştirilmesi amaçlanmıştır. Kapiler zon elektroforez cihazı ile iletkenlik dedektörü kullanılarak insan idrarındaki orotik asidin miktarının kantitatif tayini için seçici, güvenilir ve hassas bir yöntem geliştiriImesi üzerine çalışılmıştır. Ayırıcı tampon olarak, 20 mM morfolinoetansulfonik asit (MES), 10 mM Histidin ve 0,1 mM CTAB kullanılmıştır (pH = 6,5). İdrar ortamındaki analiz sonucunda LOD ve LOQ değerleri 0,103 mg/L ve 0,344 mg/L olarak, su ortamındaki analiz sonucunda ise LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,014 mg/L ve 0,047 mg/L olarak hesaplanmıştır.

DETERMINATION OF OROTIC ACID IN URINE BY CAPILLARY ELEKTROPHORESIS – SAMPLE STACKING METHOD

SUMMARY

In recent years, the importance of determining organic acid content and levels in clinical, biological and nutrient samples has been gaining attention and is a growing area of research. As a biological example, it is known that many diseases can be diagnosed depending on whether the concentration level of various organic acids in human blood and urine is low or high. Orotic acid (1,2,3,6-tetrahydro-2,6-dioxo-4-pyrimidinecarboxylic acid; uracil-6-carboxylic acid) is one of these substances.

Orotic acid is a pyrimidinedione and a carboxylic acid. It was historically believed to be part of the vitamin B complex and was called vitamin B13, but it is known to be not a vitamin today. Although not found in breast milk, cow's milk and dairy products contain orotic acid. Root vegetables such as carrots and beets are among the richest vegetable food sources of orotic acid. Studies show that orotic acid is also present in kefir, a fermented milk product, and consumption of kefir increases the level of orotic acid in the blood.

In humans and other organisms, orotic acid is synthesized by the enzyme dihydroorotate dehydrogenase, which converts dihydrorotate to orotic acid. Many experimental studies show that orotic acid is related to carcinogenesis and fat storage in the kidneys.

It is seen in the literature that there are a limited number of studies on the relationship between cholesterol and orotic acid. Limited studies have shown that orotic acid has a lowering effect on blood cholesterol levels, prevents liver problems and premature aging, and also helps in the treatment of multiple sclerosis. Scientists argue that studies on the positive effects of orotic acid on health are not sufficient and that more and more scientific studies should be conducted on this subject.

Researchers who detected significant amounts of orotic acid levels in fermented dairy products directed their studies to the relationship between orotic acid and cholesterol. But in one of the studies based on the relationship between orotic acid and cholesterol; It has been found that the synthesis of fatty acids in the livers of mice fed with orotic acid decreases and the amount of triacylglycerol, phospholipid and cholesteryl ester decreases.

Hereditary metabolic diseases can present symptoms at any time in life, affect any organ system or mimic many more common childhood diseases. Metabolic diseases are pathological pictures that develop as a result of events related to the synthesis or catabolism of protein, carbohydrate and fatty acids.

Organic acidemias are a group of diseases that develop as a result of congenital disorders in amino acid, lipid and carbohydrate metabolism. These diseases, most of which are autosomal recessive, can occur with clinical and laboratory findings such as

psychosocial motor retardation, frequent infection, metabolic acidosis, ketosis, early and unexplained death.

As with other congenital metabolic diseases, in organic acidemias, with appropriate emergency treatment initiated by early diagnosis, permanent organ damage due to the disease can be prevented and the risk of death decreases.

Hereditary orotic aciduria is a disease caused by enzyme deficiency and decreasing the ability to synthesize pyrimidines. De novo is the only known enzyme deficiency of the pyrimidine synthesis pathway. Orotic aciduria is characterized by excessive excretion of orotic acid in the urine due to the inability to convert orotic acid to UMP. Since orotic acid is excreted in the urine, it is more likely to be determined in the urine than it is determined in blood plasma. It causes disruption in the urea cycle in adults. In children, it causes megaloblastic anemia and restriction in DNA and RNA synthesis, causing mental and physical developmental delays.

Orotic aciduria is divided into two types, type I and type II. It is called orotic aciduria type I, which is seen in the deficiency of both orotate phosphoribosyl transferase and orotate monophosphate decarboxylase enzymes involved in pyrimidine synthesis. Findings are seen as lack of development, megaloblastic anemia and orotic acid crystallurgy in urine. As a treatment, uridine is given by mouth.

Only in orotate monophosphate decarboxylase deficiency, orotic aciduria type II occurs. Findings of orotidinuria and megaloblastic anemia are seen. As treatment, uridine is given by mouth as in orotic aciduria type I.

Capillary electrophoresis, an effective separation technique, is the separation of particles from the smallest structure to the largest biomolecules by migration by applying high voltage under an electric field. Compared to other chromatographic methods, capillary electrophoresis method is newer and has an increasing place in clinical research. The main difference that distinguishes electrophoresis from other methods is the electric field application that causes the migration of charged particles towards one of the electrodes. The rate of migration varies according to the load / size ratio of the charged particles. In this way, it is possible to distinguish charged macromolecules commonly found in biochemical and biological research in the biotechnology industry.

Capillary electrophoresis (CE) is a technique that performs electrokinetic separation due to phase separation, electrophoretic mobility and molecular size differences or a few of them. This electrokinetic separation is made in cylindrical columns, the surface of which is called capillary, covered with silica, with two ends open, approximately 25-75 micrometers inner diameter and 15-100 cm long [1].

In electrophoresis, the migration rate and duration of the ion varies depending on different parameters. These parameters are; net charge, structure and size of the molecule, power of the electric field, buffer pH and concentration and ambient temperature. Electrophoretic mobility; It is directly proportional to the charge of ions and inversely proportional to the friction force. Thanks to the modifying agents of charged particles (ions) having two mobility very close to each other, the discrimination selection can be easily differentiated and the speed and direction of the electroosmatic flow can be controlled.

Capillary electrophoresis; gas chromatography is a modern analysis method developed by combining good and advantageous properties of HPLC and gel electrophoresis. Capillary electrophoresis makes it more advantageous than other electrophoresis

methods due to low substance consumption, high separation efficiency (resolution) due to the flat profile of the electrosmotic flow, different separation mechanisms and selectivity of different types, and the fact that the detection takes place during separation and quantitative analysis can be made. This analytical method is used for the sensitive separation of many substances such as inorganic anions and cations, amino acids, carbohydrates, vitamins, drugs and polynucleotides. Silica coated capillary columns are much cheaper than chromatographic columns, they are easily washed between the study and there is no matrix contamination problem seen in filling columns.

Capillary electrophoresis is used in food additives, organic acids, DNA molecule, drug, protein and hydrocarbon analysis. In recent years, it has found wide use as an effective and economical method in the analysis of molecules such as medicine, protein, nucleic acid in various fields such as biochemistry, genetics, microbiology, clinical and forensic medicine.

It is important to develop an effective method to be used in the analysis of orotic acid levels of high concentrations and normal concentrations in urine in the diagnosis of congenital diseases. These measurements are made by methods such as high pressure liquid chromatography (HPLC), gas chroamtography (GC), nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), capillary electrophoresis. Many studies have been conducted in the literature on the detection of orotic acid in biological samples.

Determination of orotic acid by analysis in human urine plays an important role especially in the diagnosis of some hereditary diseases. In addition, there is a connection between the progression of carcinogenic structures, especially the liver, and the amount of orotic acid in the urine. Therefore, accurate and rapid measurement of the amount of orotic acid in the urine is important in the early diagnosis of many ailments. In this study, it is aimed to develop a reliable and sensitive method in the diagnosis of said diseases. The developed method has advantages in terms of being easy, high precision and accuracy. The method is suitable for routine clinical analysis of orotic acid in human urine. It has been studied to develop a selective, reliable and sensitive method for the quantitative determination of the amount of orotic acid in human urine using a capillary zone electrophoresis device and conductivity detector. The conditions of the method were developed until the analysis with high resolution and responding as soon as possible. As a result of method development, electrokinetic injection was determined as the most appropriate method by using sample compression method. Sample compression is a method used to increase sensitivity in the capillary zone electrophoresis system. When analyzing in normal injection volume, it can be possible to decrease the determination limit obtained by using the sample compression method. With this method, quantitative analyzes in urine were performed. As separating buffer, 20 mM morpholinoethanesulfonic acid (MES), 10 mM Histidine and 0.1 mM CTAB were used (pH = 6.5). As a result of the analysis in urine environment, LOD and LOQ values were calculated as 0.103 mg / L and 0.344 mg / L, and as a result of the analysis in water environment, LOD and LOQ values were calculated as 0.014 mg / L and 0.047 mg / L, respectively.

1. GİRİŞ

Orotik asit (OA) analizi, klinik kimyada üre döngüsü bozuklukları ile ilişkili bazı hastalıkları teşhis etmek için kullanılır; ornitin transkarbamilaz eksikliği (OTCD) en sık görülen ve aynı zamanda kalıtsal orotik asidüridir. Kalıtsal orotik asidüri, üridin-5'-monofosfat (UMP) sentaz eksikliğinin neden olduğu bir pirimidin sentez kusurudur. Bu çoklu enzim, orotidin-5'-monofosfat yoluyla orotik asitten başlayarak UMP sentezini katalize eder. Bazı karakteristik klinik özellikler anemi, hematüri, solgunluk, ishal, yavaş ve kötü gelişimdir, laboratuvar endikasyonları ise çok yüksek üriner orotik asit atılımı içerir. Bu nedenle, idrarda orotik asit düzeylerinin belirlenmesi metabolik hastalıkların tanısında önemli bir yer tutmaktadır [2].

Elektroforez, yüklü taneciklerin elektriksel bir alan etkisiyle tampon çözeltide anot ve katot arasında göç ederken sahip olduğu bağıl hıza dayanan bir ayırma yöntemidir. Elektroforezin genel olarak biyoteknoloji endüstrisinde gerçekleştirilen biyolojik ve biyokimyasal araştırmalarda DNA gibi yüklü makromolekülleri ayırmada kullanılmaktadır. Proteinler, enzimler, nükleik asitler (DNA, RNA), antikorlar ve hormonlar için yıllarca vazgeçilmez bir ayırma yöntemi olan elektroforez, bu gibi bileşiklerin ayrılması için eşsiz bir yöntemdir [3].

Jel elektroforezin, birçok madde için fazlaca kullanılan bir analiz tekniği olmasına rağmen, düşük verimlilik, analiz süresinin uzunluğu ve düşük dedeksiyon sınırları gibi problemleri bulunmaktadır. Bu yüzden bu sistemi daha verimli ve kullanışlı hale getirebilmek için jel tabaka sistemine alternatif olarak kapiler borular veya çok dar iç çapa sahip tüpler kullanılmaya başlanmıştır. Küçük iç çapa sahip kapiler, kapiler boru içerisinde oluşabilecek ısı iletimine engel olmakta ve analit dispersiyonunun azaltılmasını sağlamaktadır. Bu sebeple analizi yapılan maddenin viskozitesi ve elektroozmotik akısın kontrol edilmesi açısından önem arz etmektedir. Jel ortamda ise bahsedilen avantajlar ve fonksiyonlar yerine getirilememektedir.

Kapiler elektroforez; gaz kromatografisi, HPLC ve jel elektroforez'in iyi ve avantajlı özelliklerinin bir araya getirilmesiyle geliştirilmiş modern bir analiz yöntemdir.

Kapiler elektroforez diğer ayırım tekniklerin avantajlarını içermesinin yanı sıra; yüksek ayırım gücü, birçok bileşiği eş zamanlı olarak analiz edebilme özelliği, az miktarda örnek ihtiyacı, kısa analiz süresi, yüksek kararlılık, ekonomik ve otomasyon özelliğinin olması gibi avantajları da sağlamaktadır.

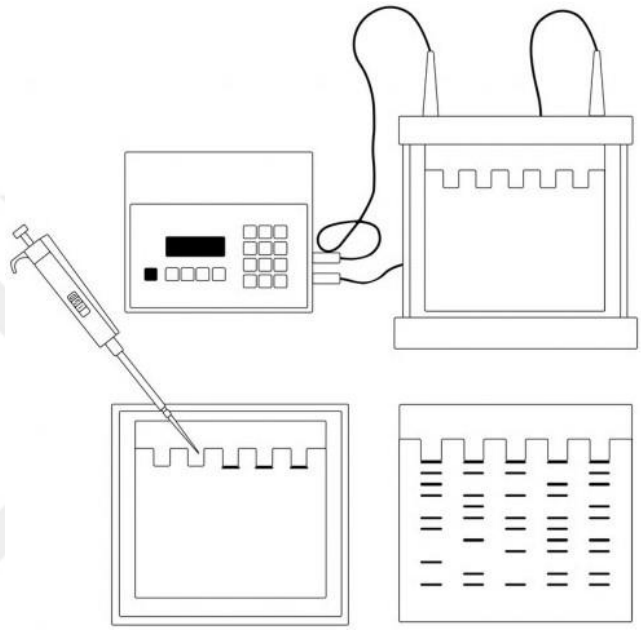
2. ELEKTROFOREZ

Elektroforez ilk olarak 1937 yılında İsveç kimyager Arne Tiselius tarafından sağlıklı ve hasta bireylerin serum proteinleri çalışmasında kullanılmıştır ve 1948 yılında Nobel ödülüne layık görülmüştür.

Elektroforez, elektriksel alan varlığında tampon çözelti içerisindeki farklı hızlara sahip yüklü parçacıkların göçünü esas alan bir ayırma yöntemidir. Bir süspansiyon ya da çözeltideki yüklü tanecikler uygulanan bir elektriksel gerilim farkı sebebiyle hareketlenmektedir. Elektriksel gerilim farkı sebebiyle oluşan bu hareketin hızı, eğer yüklü taneciklerin çaplarının eşit olduğu düşünülürse, sadece yüklerine bağlı olarak değişir. Yükü büyük olan tanecik daha yüksek hıza, küçük olan ise daha düşük hıza sahiptir. Yüksüz olanlar ise hareketsiz kalır. Tanecik hızlarındaki farklılık sebebiyle sıvının içerisinde derişikliği farklı bölgeler oluşur. Derişimdeki bu farklılık ışığın sıvıdaki kırılma indisini de değiştireceği için, bir optik düzenek vasıtasıyla, sıvının içindeki farklı tanecik türlerinin sayısı belirlenebilir. Bu ilkelere dayanan elektroforez düzenekleri Tiselius'dan önce de uygulanmaktaydı fakat bu düzenekler büyük molekülleri ayıracak duyarlılığa sahip değildi [4].

Oluşan yeni gereksinimlerin yanında, Arne Tiselus tarafından geliştirilen elektroforez yönteminin, birbirine oldukça benzer elektroforetik hıza sahip tanecikleri ayıramaması sorunu oluşmaktaydı. Bu sebeple 1940'lardan sonra düzeneğin geliştirilmesi söz konusu olarak, katı veya jel destek ortamlarının kullanılması gündeme gelmiştir. Bu ihtiyaç doğrultusunda, sıvı çözelti içerisinde moleküllerin serbestçe hareket etmesi yerine, katı veya jel ortamında moleküllerin belirli zonlar yani bölgeler oluşturarak tam anlamıyla ayrıştırılabilecekleri yeni yöntemler geliştirilmeye ve uygulanmaya başlandı. Bu işleme de zonal elektroforez adı verildi. Selüloz asetat, nişasta jeli, poliakrilamid jeli ve agaroz jel gibi malzemeler katı veya jel ortamı olarak kullanıldı [5].

Elektroforezi diğer yöntemlerden ayıran temel fark yüklü taneciklerin elektrotlardan birine doğru göçüne sebep olan elektrik alan uygulamasıdır. Yüklü taneciklerin yük/büyüklük oranına göre göç hızı değişmektedir. Bu sayede biyo-teknoloji endüstrisinde, biyokimyasal ve biyolojik araştırmalarda yaygın olarak bulunan yüklü makromoleküllerin ayrımı mümkün olmaktadır. Şekil 2.1'de elektroforez sisteminin basit bir şeması verilmektedir.



Şekil 2.1 : Elektroforez sisteminin basit bir gösterimi.

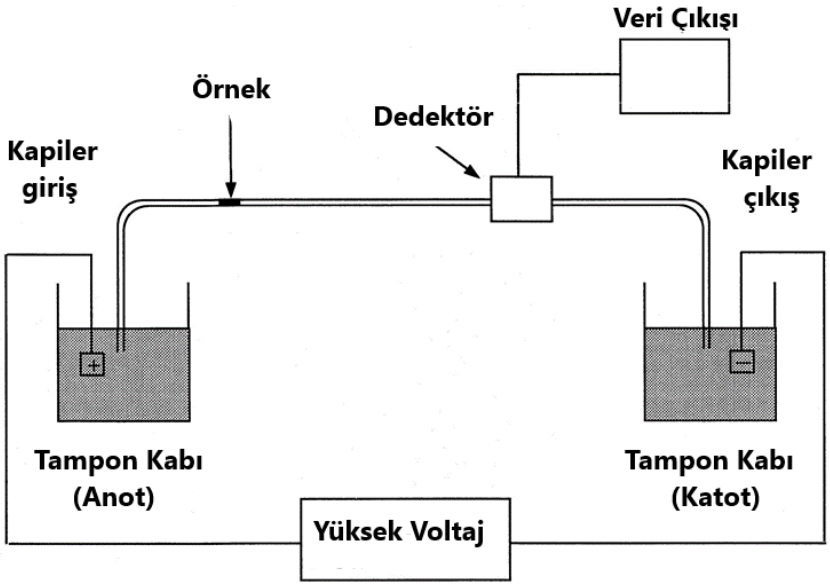
Bu yöntem ile çeşitli anorganik iyonlar, organik asitler, amino asitler, vitaminler, karbonhidratlar, peptidler, proteinler, nükleik asitler ve daha birçok türün analizi mümkündür.

3. KAPİLER ELEKTROFOREZ

Elektroforez jel tabakada ya da dar milimetre-altı iç çapa sahip kılcal bir kolon olan kapilerde gerçekleşmektedir. Fakat jel elektroforez ayırımı zor, işçiliği fazla, ayarlanması zaman alan ve kesin bir kantitatif bilgi veremeyen bir yöntemdir. Kapiler elektroforez, 1980'lü yılların sonlarına doğru geliştirilerek, analitik bir yöntem olarak sıkça kullanılmaya başlanmıştır. Çok sık olarak CE, kılcal bölge elektroforezi (CZE) anlamına gelir, ancak kılcal jel elektroforezi (CGE), kılcal izoelektrik odaklama (CIEF), kılcal izotakoforez ve misel elektrokinetik kromatografi (MEKC) de dahil olmak üzere diğer elektroforetik teknikler de bu yöntem sınıfına aittir [6]. CE yöntemlerinde, analitler bir elektrik alanının etkisi altında elektrolit çözeltileri yoluyla göç ederler. Analitler iyonik hareketliliğe göre ayrılabilir ve / veya kovalent olmayan etkileşimler yoluyla alternatif bir faza bölünebilir.

Kapiler elektroforez (CE), faz ayırımı, elektroforetik hareket kabiliyeti ve moleküler boyuttaki farklılıklara ya da bunların birkaçına birden bağlı olarak elektrokinetik ayırım gerçekleştiren bir tekniktir. Bu elektrokinetik ayırım kapiler adı verilen yüzeyi silika ile kaplanmış, iki ucu açık, yaklaşık 25-75 mikrometre iç çaplı ve 15-100 cm uzunluğunda, silindirik kolonlarda yapılır [1].

Düşük miktarlarda madde tüketimi, elektroosmotik akışın düz profilli olması nedeniyle yüksek ayırım etkinliği (rezolüsyon), farklı türlerinin farklı ayırım mekanizmaları ve seçiciliği, dedeksiyonun ayırım esnasında gerçekleşmesi ve nicel analiz yapılabilmesi kapiler elektroforezi diğer elektroforez yöntemlerinden daha avantajlı hale getirmektedir. Bu analitik yöntem inorganik anyon ve katyonlar, aminoasitler, karbonhidratlar, vitaminler, ilaçlar ve polinükleotidler gibi pek çok maddenin hassas seviyede ayırımı için kullanılmaktadır. Şekil 3.1'de kapiler elektroforez tasarımı basitçe gösterilmiştir.



Şekil 3.1: Basit kapiler elektroforez şeması [51].

Elektroforezde iyonun göç hızı ve süresi farklı parametrelere bağlı olarak değişmektedir. Bu parametreler; molekülün net yükü, yapısı ve büyüklüğü, elektriksel alanın gücü, tampon pH ve koonsantrasyonu ve ortam sıcaklığı olarak sıralanabilir. Elektroforetik mobilite; iyonların yükü ile doğru orantılı, sürtünme kuvveti ile ters orantılıdır. Birbirine çok yakın iki mobiliteye sahip yüklü parçacıkların (iyon), modifiye edici maddeler sayesinde ayrım seçimliliği kolaylıkla farklılaştırılabilmekte ve elektroozmatik akışın hızı ve yönü kontrol edilebilmektedir. Yüksek elektrik alan varlğında, kısa analiz süreleri ve yüksek ayırma gücü sağlanmaktadır.

Elektroforezde ayırım tampon olarak adlandırılan madde ya da birkaç madde bileşimi sayesinde sağlanmaktadır. Kapiler duvarı-örnek etkileşimini en aza indirmek için, duvar iç yüzeyi tampona eklenen dinamik maddeler ile kaplanmaktadır.

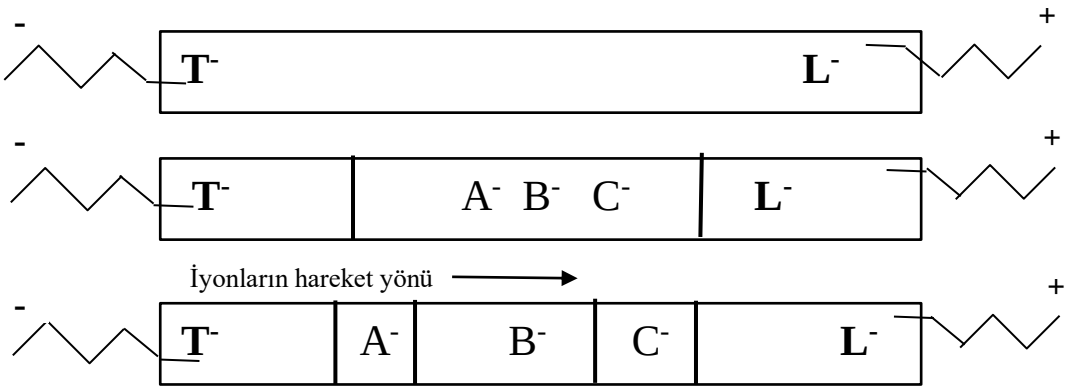
3.1 Tarihsel Süreç

- 1967’de Hjerten, çapı 3 mM olan basit bir bölgesel elektroforez aparatı geliştirmeye başlamıştır. Bu sayede bir çözelti içindeki bileşenlerin ayrı kısımlara toplanarak birbirinden ayrılması sağlanacaktır. Bu gelişimle beraber bilimin birçok dalında kullanılan bir analiz tekniği haline gelmiştir [1].
- 1974'te Virtanen tüp çapını 0,2 mM'ye indirerek, sistemde ısı kaybından dolayı görülen problemleri ortadan kaldırarak sistemin optimizasyonun güvenilirliği açısından önemli bir aşama kaydetmiştir [1].

- 1981 yılında Jorgensen ve Lukacs kolon çapını daha da daraltmıştır. Bununla birlikte elektroforez işleminde önemli bir gelişme kaydedilmiştir [1].
- 1990 – Zagurski ve McCormick ilk kez kapiler elektroforez yöntemini kullanarak DNA dizilimini raporlamıştır [7].
- 1991'de Swaile ve Sepaniak ilk kez doğal floresans görüntüleme kaydetmiştir. Böylelikle birçok biyolojik aminoasit doğal floresans özelliklerinden dolayı elektroforez yöntemiyle görüntülenebilmiştir.
- 90'lı yılların ortalarından itibaren sistemin çalışma koşullarının gelişimine yönelik birçok ilerleme kaydedilmiştir.
- 1999'da kapiler elektroforez enstrümanları otomotikleştirilmiş ve yaygın olarak kullanılan analitik yöntemler arasında yerini almıştır [7].

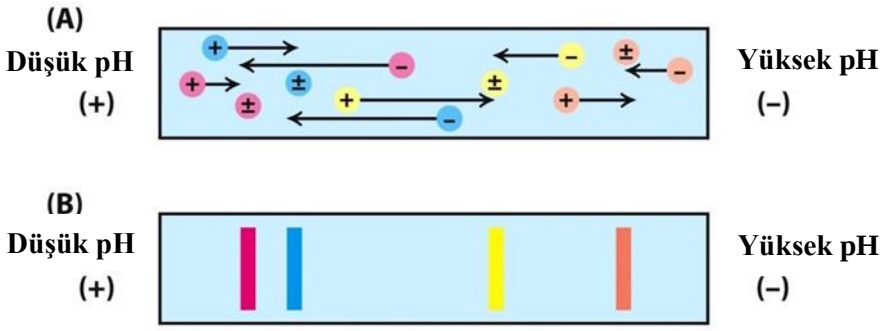
3.2 Kapiler Elektroforez Yöntemleri

İzotakoforez kelime olarak izo; aynı ve tach; hız anlamına gelmektedir. Bu yöntemde tüm analitin bantları aynı hızla göçer. Bu tekniğin kullanıldığı bir uygulamada her ikisi aynıı anda olmamak şartıyla sadece anyonlar ve katyonların ayrımı yapılabilir. İzotakoforez yöntemi ile analiz yaparken numune iki tampon arasına enjekte edilir. Öndeki tampon, numune içindeki en hızlı iyondan daha hızlı ve arkadaki tampon ise numune iyonlarından daha yavaş olan iyonlar içermelidir. Anyon ayrımı yaparken öndeki elektrolit çözeltisi anoda bağlı arkadaki ise katoda bağlanır. İzotakoferik yöntemde elektrik alan uygulandığında iyonlar zon elektroforezdeki gibi göç ederler. Göç hızlarındaki fark numune bileşenlerini birbirine yakın bantlara ayırır. Numunedeki en hızlı iyon öndeki tamponun hemen ardında yürürken, yavaş iyon da sondaki tamponun hemen önünde yürümektedir. Bantların oluşmasıyla beraber iyonların hepsi aynı hızda hareket eder. İyonların aynı hızda ilerlemesinin sebebi potansiyelin bantların göre ters orantılı olarak değişmesidir. Yani daha hızlı bantlar için potansiyel azalırken daha yavaş bantlar için potansiyel artmaktadır. Böylece tamponlardan aynı akım geçmesi sağlanır. Şekil 3.2'de izotakoforezde temel ayrılma prensibi, bant bölgelerinin ayrımı ve iyonların göç yönü, iyonların harflendirilmesiyle gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere negatif iyonlar anottan katota doğru ilerlemektedir.



Şekil 3.2: İzotakoforezde ayrılma prensibi.

Kapiler izoelektrik fokus yönteminde ise tampon boyunca değişen bir pH ortamında amfiprotik türlerin izoelektrik olarak ayrılması sağlanır. Bir kaç farklı amfolit karışmının sulu çözeltisinden pH gradienti hazırlanır. Karboksilik ve amino gruplarını içeren amfoter bileşikler amfolit olarak adlandırılır. Kapiler kolon içinde izoelektrik fokus deneyini yapmak için analizi gerçekleştirilecek numune karışımı seyreltik amfolit çözeltisi içinde çözülür ve kapiler kolon içine yerleştirilir. Kapilerin bir ucu içinde katodun bulunduğu kuvvetli baz çözeltisi içine alınır. Kapilerin diğer ucu anodun içinde bulunduğu kuvvetli bir asit çözeltisi içine konulur. Elektrik alan yani potansiyel uygulanmasıyla pozitif iyonlar anottan katoda doğru hareket etmeye başlar. Negatif iyonlar ise anoda doğru hareket ederler. Bu göç sırasında giderek azalan pH bölgelerinden geçerken anyonlar gittikçe artan protonlanmaya maruz kalır. Bunun sonucunda negatif yükü azalmış olur. En sonunda sahip olunan pH değeri sayesinde madde üzerindeki net yük sıfır olur. Bu, maddenin izoelektrik noktası olarak ifade edilir. Net yükün sıfır olmasıyla birlikte maddelerin göçü durur. Bu işlem her bir amfolit tür için tekrarlanarak kapiler boyunca bir pH gradienti oluşturulur. Bu işlemler sonucunda bütün analitler kendi izoelektrik noktalarındaki pH'larda bir bant haline gelerek ayrılırlar. Numunedeki tüm iyonlar yüksüz oldukları alana gelinceye kadar farklı hızlarda göç ederler. Daha sonra bantların yerleri sabitlenir. Şekil 3.3'de izoelektrik fokus yönteminin ayrılma prensibi şematik olarak gösterilmiştir.



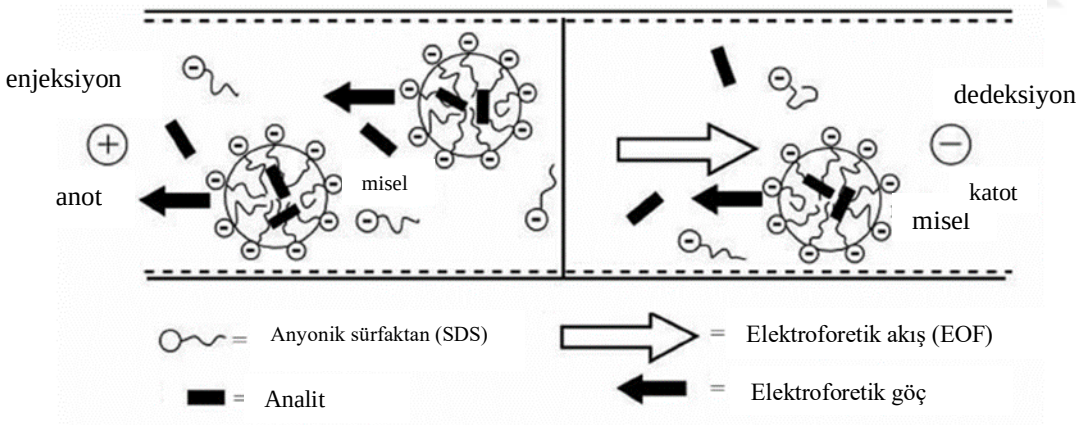
Şekil 3.3: İzoelektrik fokus ayrılma prensibi [52].

Kapiler jel elektroforez (CGE), ayırımın genellikle gözenekli polimer matriksi içinde yapıldığı bir kapiler elektroforez çeşididir. Gözeneklerin içinde bir tampon karışımı bulunur. Ayırım bu tampon karışımı içinde gerçekleşir. Elektroforezde genellikle jel tipi olarak poli akrilamid (CH_2=CH-CO-NH_2) kullanılmaktadır. Jelin gözenek boyutu monomer ile çapraz bağlayıcı reaktifi arasındaki orana göre değişmektedir. Çapraz bağlayıcı reaktifin miktarı ile jel gözeneklerinin boyutu ters orantılıdır. Kapiler elektroforezde çoğunlukla kullanılan diğer jel türleri; agaroz, metil sellüloz ve polietilen glikoldür. Polietilen glikol jel elektroforez yönteminde bir protein karışımı ayrılabilir.

Kapiler zon elektroforez çeşidinde tampon çözelti ayırma bölgesi olan kolonun her yerinde aynı hareketlilik ve etkiye sahiptir. Uygulanan elektrik alan ile yüklü iyonlar kendi iyonik hareketliliklerine göre zonlara ayrılır. Tamamen ayrılmış zonlar arasında tampon çözelti yer almaktadır. Yöntemin en önemli özelliği küçük iyonları elektroosmotik akış yönünde hareket ettirmek için gerekli zamanın küçük olmasıdır. Elektroosmotik akış (EOF) ve katyonların hareket yönü katoda doğrudur. Bundan dolayı katyon ayırmalarında elektroosmatik akış yönünü değiştirmek için kapilerin iç kısmına her hangi bir işlem yapılmaz. Küçük anyonların analizinde ise anyon ile EOF yönünün aynı olması için kapilerin iç yüzeyinin CTAB gibi alkil amonyum tuzları ile muamele edilir. Böylece EOF yönü tersine çevrilmiş olur ve küçük anyonların analizi gerçekleştirilebilir. Çeşitli küçük moleküllü iyonlaşabilen moleküler türler kapiler zon elektroforez (CZE) ile ayrılarak analiz edilebilir. Proteinler, aminoasitler ve karbonhidratların CZE ile kısa analiz sürelerinde ayrımı yapılabilir. Borat tamponu ayırma ortamı olarak kullanılırsa nötral karbonhidratlar da kolayca ayrılabilir.

Misel elektrokinetik kromatografi (MEKC), elektroforez ile kromatografinin birleşimi olduğu bir analiz yöntemidir. En çok kullanılan CE yöntemlerinden biri olan bu yöntem, 1984 yılında Terabe tarafından geliştirilmiştir. Mekc'nin en önemli avantajı ise yüklü taneciklerin yanı sıra nötral taneciklerin de analizine olanak sağlamasıdır. Çalışma tamponuna yüzey aktif madde eklenmesiyle nötral taneciklerin ayırımı gerçekleştirilir. Kritik misel konsantrasyonunun (CMC) üstünde yüzey aktif madde molekülleri biraraya gelerek kümeleşir ve misel denilen oluşumlar meydana gelir. Şekil 3.4'de görüldüğü üzere miseller genellikle küresel yapıdaki oluşumlardır. Sulu ortamda, yüzey aktif madde moleküllerinin hidrofobik kuyrukları kürenin merkezine doğru yönelmiş, hidrofilik (yüklü uç) kısımları tampona doğru yönelmiştir. Nötral taneciklerin yapılarındaki hidrofilik ve hidrofobik grupların miseller ile olan etkileşimleri sayesinde ayırım gerçekleşir. Miseller yüklerine bağlı olarak, EOF yönünde veya EOF‟ye zıt yönde hareket ederler.

MEKC için kullanılan temel kurulum ve tespit yöntemleri CE'de kullanılanlarla aynıdır. Fark, çözeltinin kritik misel konsantrasyonundan (CMC) daha yüksek bir konsantrasyonda bir yüzey aktif madde içermesidir. Bu konsantrasyonun üzerinde sürfaktan monomerleri misellerle dengededir.



Şekil 3.4: Misel elektrokinetik kromatografi (MEKC) ayrılma prensibi [45].

Çoğu uygulamada, MEKC, güçlü bir elektroosmotik akış üretmek için alkalin koşullar altında açık kılcal damarlarda gerçekleştirilir. Sodyum dodesil sülfat (SDS), MEKC uygulamalarında en yaygın kullanılan yüzey aktif maddedir. SDS sülfat gruplarının anyonik karakteri, sürfaktan ve misellerin, güçlü elektroosmotik akış yönüne ters olan elektroforetik mobiliteye sahip olmalarına neden olmaktadır. Sonuç olarak, yüzey aktif madde monomerleri ve miseller yavaş hareket ederler, ancak net hareketleri hala

katoda doğrudur [3]. Bir MEKC ayrımı sırasında, analitler kendilerini miselin hidrofobik iç kısmı ile Şekil 1'de gösterildiği gibi hidrofilik tampon çözeltisi arasında dağıtırlar.

3.3 Kapiler Elektroforez Avantajları ve Kullanım Alanları

Kapiler elektroforezi diğer analiz yöntemlerinden farklı yapan birçok üstün yönü ve avantajları vardır. Bu avantajları sıralayacak olursak ilk olarak ayırma hızının yüksekliğinden söz edebiliriz. Yüksek elektrik alan altında gerçekleştiği için ayırım oldukça hızlıdır. Bu sebeple analiz süresi de oldukça kısadır. Başka bir avantajı ise oldukça küçük miktarlarda örnek ve tampon çözelti kullanıldığı için pahalı maddeler kullanılırken oldukça ekonomik olmasıdır. Elektroforez yöntemleri için gerekli olan numune hacmi nanaolitre mertebesinde iken küçük iyonların tayininde kullanılan diğer yöntemler için gerekli olan numune hacmi mikrolitre veya daha üstü mertebededir. Bu sayede elektroforetik yöntemler diğer yöntemlere göre daha duyarlıdır.

Bunların yanı sıra pozitif, nötr ve negatif iyonlar bir elektrottan diğer elektrota göç ederken elektroozmatik akış sayesinde verimli bir ayırım gerçekleşir. Kapiler elektroforezin en önemli avantajlarından biri ise silika kapiler kolonun diğer kromatografik yöntemlerde kullanılan kolonlara göre çok daha dayanıklı bir malzeme olmasıdır. Kapiler kolon kolaylıkla temizlenebilir ve aynı kolon farklı analizler için defalarca kullanılabilir. Li+ iyonu gibi çok küçük iyonlardan en büyük ve karmaşık DNA molekülüne kadar birçok madde aynı kolonda ayrılabilir.

Kapiler elektroforez, gıda katkıları, organik asitler, DNA molekülü, ilaç, protein ve hidrokarbon analizinde kullanılmaktadır. Son yıllarda biyokimya, genetik, mikrobiyoloji, klinik ve adli tıp gibi çeşitli alanlarda ilaç, protein, nükleik asit gibi moleküllerin analizinde etkili ve ekonomik bir yöntem olarak geniş bir yelpazeye sahip kullanım alanı bulmuştur [8].

Adli bilimlerde CE'nin ana uygulamalarından biri, adli DNA analizinde hızlı ve dramatik ilerlemelere yol açan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak DNA fragmanlarının amplifikasyonu ve tespiti için yöntemlerin geliştirilmesidir. Tespit, kılcal damarlara kazınmış bir pencereden floresan yoluyla gerçekleşir. Kılcal dizi cihazları, aynı anda 16 veya daha fazla örneği çalıştırabilen dizi sistemlerine sahiptir [9]. Kılcal elektroforez (CE), yüksek verim ve yüksek doğrulukta sekanslama bilgisi

sağlayan DNA sekanslaması yapmak için önemli, uygun maliyetli bir yaklaşım haline gelmiştir. 4 renkli etiketleme ve algılama formatı ile A, T, C ve G'nin her bir kısmının konsantrasyonlarını görüntülemek için floresan kullanılır. Görüntüleme sonucunda elde edilen konsantrasyon pikleri, DNA dizilimi belirlemek için kullanılır.

CE için ortaya çıkan diğer kullanımlar arasında, bir adli örneğin biyolojik sıvısını veya doku kökenini tanımlamaya yardımcı olmak için spesifik mRNA fragmanlarının saptanması yer alır [10].

Adli tıpta CE'nin bir başka uygulaması, mürekkep püskürtmeli yazıcılar tarafından basılan belgelerde sahteciliğin artması nedeniyle gerekli hale geldiği mürekkep analizidir. Mürekkeplerin kimyasal bileşimi, sahte belgeler ve sahte banknotlar durumunda çok önemli bilgiler sağlar. Misel elektroforetik kapiler kromatografi (MECC) geliştirilerek kağıttan ekstrakte edilen mürekkeplerin analizi için uygulanmaktadır. Yüksek çözme gücü nedeniyle, kimyasal olarak benzer birkaç madde içeren mürekkeplerin ya da aynı üreticinin mürekkeplerinin arasındaki farklar da ayırt edilebilir. Bu, mürekkeplerin kimyasal bileşimine dayanan belgelerin kökenini değerlendirmek için uygun hale getirir. Aynı kartuşun farklı yazıcı modelleri ile olası uyumluluğu vardır. Bu sebeple mürekkeplerin MECC elektroforetik profillerine göre farklılaştırılması, mürekkep kartuşunun üreticisi ve kartuş numarasının belirlenmesi için daha güvenilir bir yöntemdir [11].

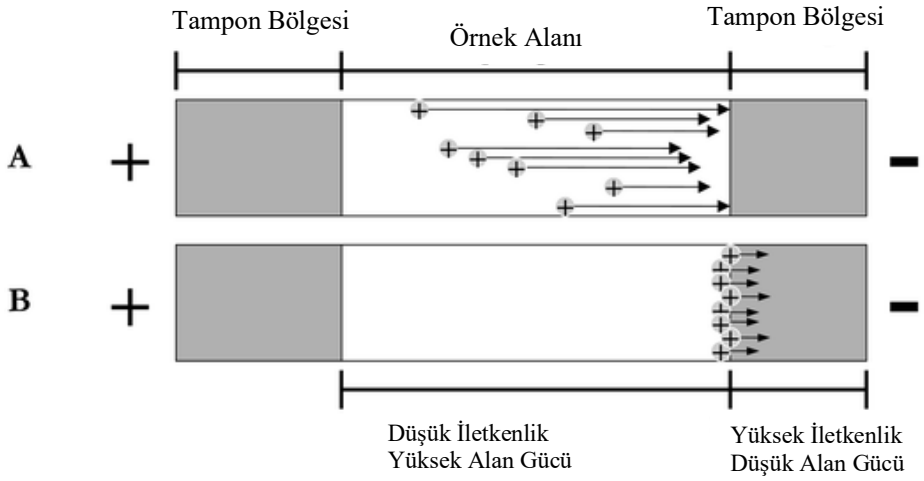
Özel bir CE türü olan afinite kapiler elektroforezi (ACE), protein-ligand etkileşimlerini anlamak için moleküller arası bağlanma etkileşimlerini kullanır. İlaç şirketleri ACE'yi birçok nedenden ötürü kullanmaktadır. En önemli sebeplerinden biri ilaçlar ve ligandlar veya ilaçlar ve miseller gibi bazı araç sistemleri için birleşme / bağlanma sabitleridir. Basitliği, hızlı sonuçları ve düşük analit kullanımı nedeniyle yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. ACE kullanımı, analitlerin bağlanması, ayrılması ve saptanmasında spesifik ayrıntılar sağlayabilir ve yaşam bilimleri çalışmaları için oldukça pratik olduğu kanıtlanmıştır [12].

Kapiler izoelektrik fokus ise bir zayıf asit-karboksilik asit grubu ve bir zayıf baz-amino grubu içeren, pozitif ve negatif yüklü grupları birlikte bulunduran protein ve amino asitler gibi amfiprotik türlerin ayrılmasında kullanılan bir yöntemdir.

Kapiler izotakoforez tekniğinde ise ya anyonlar yada katyonlar tek başına ayrılabilir. Her iki türün aynı anda analizi yapılamaz.

3.4 Örnek Sıkıştırma Yöntemi

Kapiler zon elektroforez sisteminde hassasiyeti arttırmak için lazer indüklenmiş floresans (LIF) ve iletkenlik gibi dedeksiyon sistemleri kullanılmasının yanı sıra bir başka yöntem ise "örnek sıkıştırma" olarak adlandırılan yöntemdir. Kapiler elektroforezde bu amaçla kullanılan ve farklı isimlerle tanıtılan örnek sıkıştırma yöntemleri mevcuttur. Her ne kadar farklı örnek sıkıştırma yöntemleri bulunsa da hepsinin temeli, enjekte edilen analit örnek bölgesi ve ayırma tamponu arasında iletkenlik farkı yaratmaktır [13]. CE'de yüksek iletkenlikteki çözelti bölgesinde elektrik alan düşük iken bunun aksine düşük iletkenlikteki çözelti bölgesinde elektrik alan büyüktür. Bu sebeple düşük iletkenlikteki yani yüksek elektrik alan altındaki çözelti bölgesinde analitlerin mobilitesi yüksek olup hızlı hareket edecek, yüksek iletkenlikteki yani düşük elektrik alandaki bölgede analitlerin mobilitesi düşerek daha yavaş hareket edecektir. Örnek, düşük iletkenlikteki bir çözeltide, düşük iyonik şiddetli seyreltik bir çözeltide yada suda kapiler içine büyük hacimde enjekte edildiğinde ve sistem tamponu derişik olarak hazırlandığında, yüksek elektrik alanına sahip örnek bölgesinde hızla hareket eden iyonlar tampon bölgesine ulaştığında elektrik alan azalacağı için aniden yavaşlayacaklar ve tampon sınırında sıkışarak konsantre bir hale geleceklerdir. Normal enjeksiyon hacminde analiz yapıldığında elde edilen tayin sınırını örnek sıkıştırma metodunu kullanarak çok önemli miktarda düşürmek mümkün olabilir. Şekil 3.5'de örnek sıkıştırma yöntemi şematik olarak verilmiştir.



Şekil 3.5: Örnek sıkıştırma yönteminin şematik olarak gösterimi [46].

4. KAPİLER ELEKTROFOREZDE AYRILMA PRENSİBİ

4.1 Elektroozmatik Akış (EOF)

Elektroosmotik Akış (EOF), uygulanan bir potansiyelin kontrolü altında iyonların bir tampon çözelti içerisinde kapiler kolon boyunca hareketini tanımlar. Elektoroosmotik akış hızına elektroosmoz adı verilir. Bu akışla birlikte tampon çözelti içerisindeki iyonlar anoda veya katoda göç eder. CE'de kılcal kolonlar, iç yüzeye maruz kalan silanol gruplarına sahip silikadan oluşur. Maruz kalan silanol grupları, pH 3'ün üzerinde iyonize edilir, bu nedenle negatif yüklü bir iç kılcal yüzey oluşturur. İyonik çözeltilerde bulunan katyonlar, elektrikli bir çift tabaka oluşturarak negatif yüklü duvara doğru hareket edecektir. Sütun boyunca bir elektrik potansiyelinin üretilmesi artık iyonların katoda doğru göç etmesine neden olmaktadır. Elektroosmotik akış, kılcal duvarlarda kümelenen katyonların, tampon çözeltiyi katoda doğru sürüklediği için ortaya çıkar. Tipik deney koşulları için, elektrolit çözeltisinin elektroosmotik hızı genellikle numune iyonlarının elektroforetik hızından daha büyüktür. Silika kolon için, elektroosmotik akışın yönü katoda (negatif elektrot) doğrudur. Elektroosmotik hareketlilik numune iyonlarının elektroforetik hareketliliğinden daha büyükse, kolonun anot ucuna enjeksiyon yapıldığında ve dedektör katodun yukarısına yerleştirildiğinde hem katyonlar hem de anyonlar tek bir dedektör tarafından belirlenebilir. Bu, genel çalışma için olağan kurulumdur [14].

Elektroozmatik akış hızı;

$$\nu_{eof} = \mu_{eof} . E \tag{4.1}$$

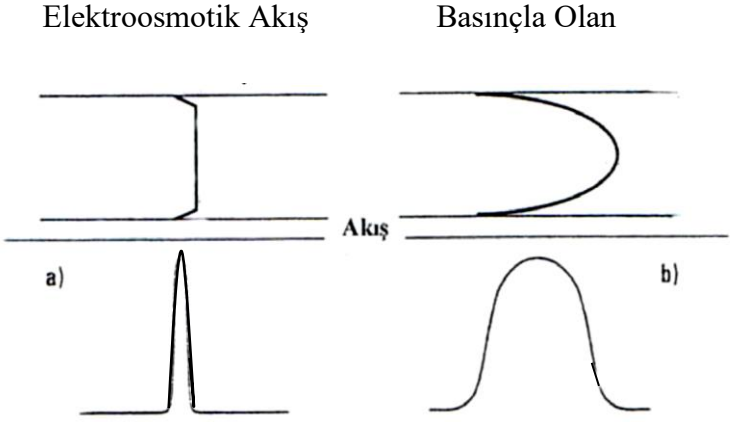
ν_{eof} : Elektroosmotik akıs hızı ($cm.sn^{1}$)

E: Elektriksel alan ($V.cm^{-1}$),

μ_{eof} : Elektroosmotik hareketlilik ($cm^2.V^{-1}.sn^{-1}$)

Şekil 4.1'de gösterildiği gibi basınç altında oluşan laminer akışla elde edilen pikler yeterince dar ve dik değildir. Elektroosmotik akış prensibi ile gerçekleştirilen

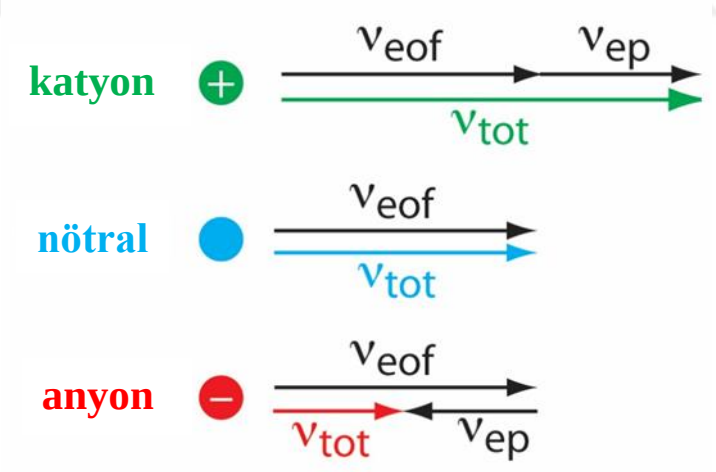
analizlerde elde edilen pikler daha dar ve dik olduğu için bant genişlemesine sebep olmaz.



Şekil 4.1: CE ve HPLC'de akış ve pik profilleri.

a)Elektroosmotik akış b) Basınçla olan laminer akış [47].

Farklı yük ve büyüklüklere sahip parçacıkların elektriksel alanın etkisiyle her biri elektroforetik mobilite denilen farklı hızlara sahiptir. Şekil 4.2'de iyonların elektroforetik mobilitelerinin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 4.2: İyonların elektroforetik mobilite gösterimi.

Her bir iyon için elektroforetik mobilite;

Pozitif iyonlar için total hız: $\nu_{tot} = \nu_{eof} + \nu_{ep}$

Negatif İyonlar için total hız: $\nu_{tot} = \nu_{eof} - \nu_{ep}$

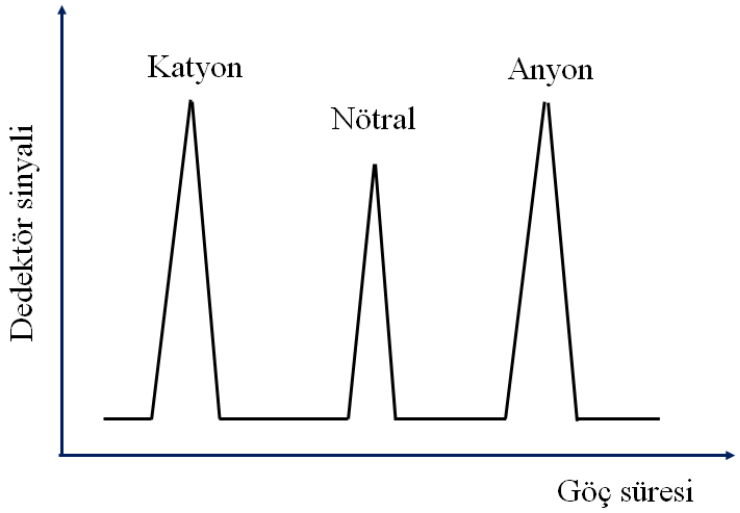
Nötr Partiküller için total hız: $\nu_{tot} = \nu_{eof}$ şeklinde hesaplanır.

Ayrıca aynı tür yüklü iyonların da kendi aralarında bir kolonu terketme sıralaması vardır. Örneğin +2 yüklü pozitif bir iyon, +1 yüklü pozitif iyondan kolonu daha hızlı terkeder. İyonların büyüklüğü de göç hızlarına etki etmektedir. +1 yüklü iki farklı iyondan daha küçük olan kolonu daha hızlı terketmektedir. Bu durum Şekil 4.3'te açıkça gösterilmiştir.



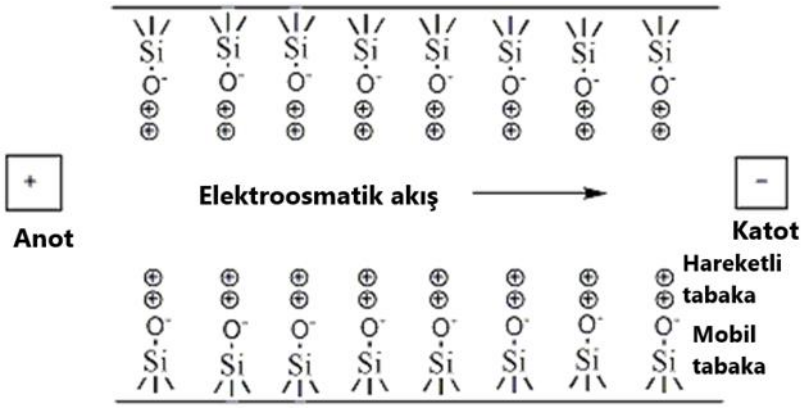
Şekil 4.3: İyonların büyüklük ve yüklerine göre kapiler kolonda göç sıraları.

Elektroforetik ayırmada elektroosmoz nedeniyle iyonlar kolondan büyüklük ve yüklerine göre belli bir sırayla ayrılırlar. Kolondan ilk ayrılan iyonun dedektör sinyalinin geliş sırası da en erkendir. Hız farklarına göre iyonların dedektör sinyallerinin geliş sırası da Şekil 4.4'te gösterildiği gibi ilk olarak katyonlar, ardından nötral partiküller ve son olarak hızlı anyonlar şeklindedir.



Şekil 4.4: İyonların bir elektroferogramdaki geliş sırası.

Şekil 4.5'te olduğu gibi silika kaplı kapiler kolon duvarı negatif (-) yükle yüklenir ve EOF anottan katoda doğru ilerlemektedir. Buna bağlı olarak pozitif yükler negatif yüklerden daha hızlı bir şekilde katoda doğru hareket ederler.



Şekil 4.5: Kapiler elektroforez ayırma sisteminde elektroozmotik akış [53].

Elektroosmotik akış hızı yüksek olan küçük inorganik anyonlar ya da küçük organik asitleri sürüklemede zorlanır. Çünkü bu maddelerin elektroforetik mobiliteleri EOF'tan daha yüksektir. Bu yüzden EOF yönünü tersine çevirerek bu tarz anyonların akış yönüyle aynı olması sağlanır. Bunu sağlamak için ayırma düşük pH'lı (≤3) tampon ortamında yapılabilir, kapiler kolon pozitif polimerle kaplanabilir ya da tampon çözeltiye kritik misel konsantrasyonunun (CMC) altında bir yüzey aktif madde (YAM) eklenerek kolon geçici olarak pozitif yükle kaplanabilir. Böylece EOF yönü katottan anota doğru çevrilerek mobilitesi yüksek küçük anyonlar kolaylıkla kolonda göç edebilir [15].

4.1.1 Zeta potansiyeli

Kapiler kolonun merkezine yakın olan hareketli tabaka ile duvarına yakın olan hareketsiz tabakanın oluşturduğu yapıya çift tabaka adı verilir. Zeta potansiyeli (ζ), bu iki tabakanın arasında oluşan potansiyele olarak tanımlanır. Başka bir deyişle, zeta potansiyeli, dispersiyon ortamı ile dağılmış partiküle tutturulmuş sabit sıvı tabakası arasındaki potansiyel farktır. Zeta potansiyeli, kayma düzlemi ile sınırlanan bölgede bulunan net elektrik yükünden kaynaklanır ve ayrıca o düzlemin yerine bağlıdır. Kapiler duvar yüzeyinde iyon yükü ile zeta potansiyeli doğru orantılıdır. İyon yükü arttıkça zeta potansiyeli de artar. Dolayısıyla zeta potansiyelinin artışına bağlı olarak elektroosmatik akış hızı da artacaktır.

$$\zeta = 4.\pi.\delta.e/\varepsilon \qquad (4.2)$$

δ : Difüzyon tabakası kalınlığı; e : Yüzey alana düşen yük; ε : Tamponun dielektrik sabiti

4.1.2 Ayırma etkinliği ve rezolüsyon

Ayırma etkinliği, diğer bir adıyla teorik plaka sayısı (N) göç zamanı ve pik genişliğine bağlıdır.

$$N = 16 \left(\frac{t_g}{W}\right)^2 \quad (4.3)$$

N: Teorik tabaka sayısı; t_g: Göç zamanı (saniye); w: Pik genişliği

Elektroforezde bant genişlemesinin asıl nedeni ise difüzyondur. Difüzyon katsayısı arttıkça teorik plaka sayısı azalır [16]. Kapilerin boyu ve göç zamanı plaka sayısını etkilememektedir. Uygulanan voltaj ne kadar yüksekse plaka sayısı da o kadar fazladır. Düşük difüzyon katsayılarına sahip olduklarından dolayı büyük moleküller yüksek teorik plaka sayısı (N) vermektedirler.

Teorik plaka sayısı, N, ile difüzyon arasındaki bağıntı aşağıdaki gibidir;

$$N = \frac{L_d^2}{\sigma^2} = \frac{\mu.L.V}{2.D.L} \quad (4.4)$$

D: Analitin difüzyon katsayısı; σ^2 : Pik dispersiyonu; V: Voltaj (V);

L_d: Kapilerin dedektöre olan uzunluğu (cm); L: Kapilerin toplam uzunluğu (cm);

μ : Elektroozmatik mobilite (cm/s)

Ayırma verimliliği sadece difüzyonla sınırlıdır ve elektrik alanının gücü ile orantılıdır. Çok yüksek potansiyellerin (> 20-30 kV) uygulanması kılcal damarların kavislenmesine veya bozulmasına neden olabilir. Ayrıca, güçlü elektrik alanlarının uygulanması tamponun kılcal kısımda ısınmaya (Joule ısısı) yol açar. İyonların elektroforetik hareketliliği genellikle sıcaklığa bağlı olduğundan, homojen olmayan bir sıcaklık profili, kılcal damarlar boyunca elektroforetik hareketliliğin değişmesine ve çözünürlük kaybına neden olur.

Bir karışımın içerdiği bileşenlerin analiz sonucunda verdiği piklerin ne kadar iyi ayrıldığının bir derecesi olan rezolüsyon (R) en önemli ayırım parametrelerinden biridir. Rezolüsyon ardı ardına gelen iki pikin birbirine olan uzaklığı ile ilgilidir.

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_2 + w_1} \quad (4.5)$$

R: rezolüsyon; w_1: ilk pikin genişliği; w_2 : ikinci pikin genişliği

t_1: ilk maddenin geliş zamanı (s); t_2 : ikinci maddenin geliş zamanı (s) [17].

4.2 Elektroozmatik Akışı Etkileyen Faktörler

Analizlerin en güvenilir vermesi için elektroosmotik akış koşulları çeşitli denemeler yapılarak optimize edilmelidir. Elektroosmotik akış kontrolü, kapiler kolon yüzeyinin yükünü ve tampon viskozitesini optimize etmekle sağlanmaktadır. Gerekli optimizasyonları yapmak için sıcaklık, pH, konsantrasyon gibi çeşitli değişkenler üzerinde ayarlama yapılabilir. Bu değişkenler ve elektroosmatik akış üzerindeki etkileri aşağıdaki Çizelge 4.1 çizelgesinde verilmiştir.

Çizelge 4.1: EOF'a etki eden faktörler [18].

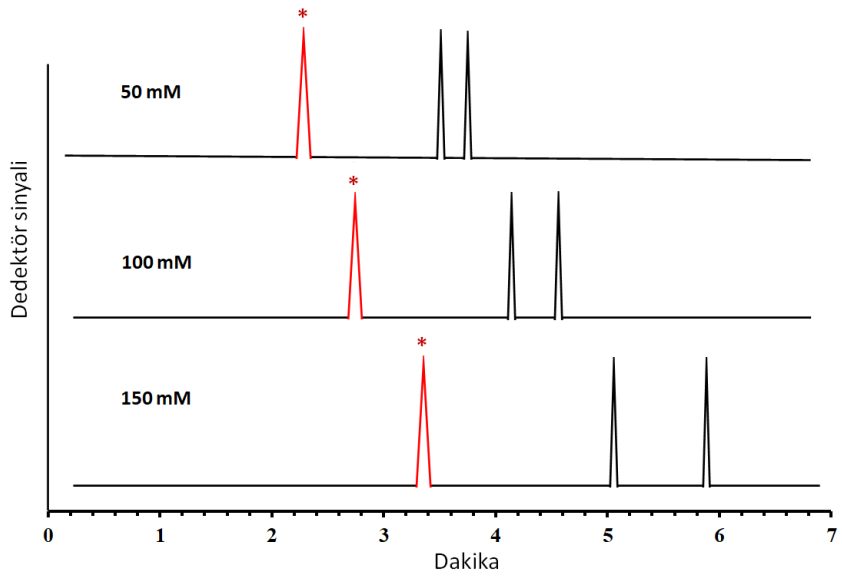
Değişken		EOF'a etkisi
Sıcaklık		EOF ↑
Tampon Konsantrasyonu		EOF ↓
Tamponun pH		EOF ↑
Organik Çözücü İlavesi		EOF ↓
Uygulanan Potansiyel		EOF ↑
Yüklü Yüzey Aktif İlavesi	Pozitif yüklü YAM	EOF yönü değişir
	Negatif yüklü YAM	EOF ↑

4.2.1 Sıcaklık

Sıcaklık artışı tamponun viskozitesini düşüreceğinden elektroosmatik akışta da hızlanmaya sebep olur. Aynı zamanda sıcaklığın yükseltilmesi zon genişlemesine, örnek bozulmasına veya tamponda bozulmaya neden olacağı için sıcaklık kontrolü yapılması gerekir.

4.2.2 Tampon konsantrasyonu

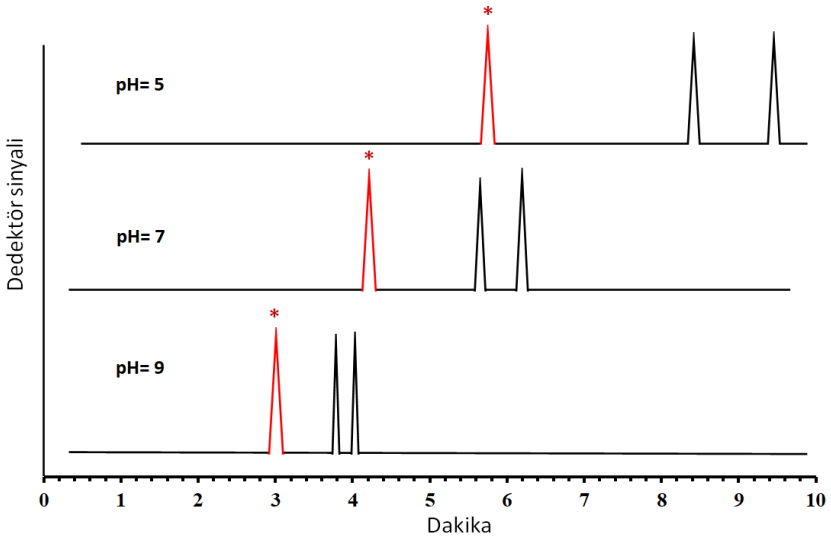
Elektroozmatik akış hızı ile tampon konsantrasyonu arasında ters orantı söz konusudur. Tampon konsantrasyonu arttırıldığına zeta potansiyelinde düşüş meydana gelir. Bu da elektroozmatik akış hızının azalmasına sebep olur. Bu yüzden CZE analizlerinde düşük konsantrasyonlu tampon çözeltiler tercih edilmelidir [19]. Şekil 4.6'da tampon konsantrasyonunun EOF üzerindeki etkisine bir örnek verilmiştir.



Şekil 4.6: Tampon konsantrasyonunun EOF(*)'a etkisi.

4.2.3 Tampon pH'sı

Ortamın pH'sı arttığında iç kapiler duvarındaki Si-OH ve Si – O- daha fazla ayrıldığı için elektroosmotik akış da artmaktadır. Kapiler duvar yüzeyinde iyon yükü ne kadar artarsa zeta potansiyeli de orantılı olarak artar. Büyük bir zeta potansiyeli ise elektroozmatik akış hızının artmasına sebep olacaktır. Eğer pH yaklaşık olarak 2'nin altında olduğunda, silanol gruplarının pek çoğu pozitif yüklendiği için silika kapileri üzerinde elektroosmotik akış meydana gelmez [48]. Şekil 4.7'da tampon pH'sının EOF üzerindeki etkisine bir örnek verilmiştir.



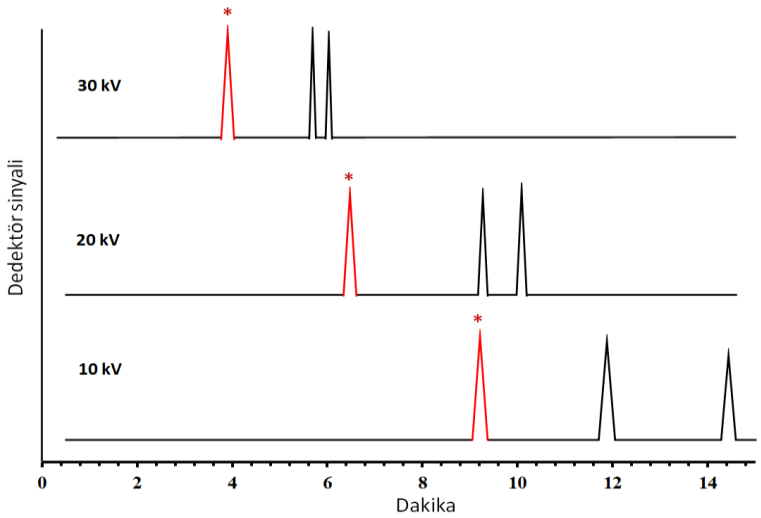
Şekil 4.7: Tampon pH'ının EOF(*)'a etkisi.

4.2.4 Organik çözücü ilavesi

Tampona organik çözücünün eklenmesiyle EOF üzerinde meydana gelecek etkiler çözücünün ne olduğuna ve miktarına bağlıdır. Organik çözücülerin eklenmesi tamponun viskozitesini artırıp buna bağlı olarak göç süresini uzatmaktadır.

4.2.5 Uygulanan potansiyel

Uygulanan potansiyeli ayarlamak elektroozmatik akışı modifiye etmek için iyi bir yoldur. Potansiyel arttıkça EOF ve alıkonma zamanı artar. Bu da kısa analiz süreleri demektir ve bu durumu Şekil 4.8 ile açıklayabiliriz [20].



Şekil 4.8: Uygulanan potansiyelin göç zamanına etkisi.(*)

Fakat belli bir voltajın üzeri daha yüksek akım demektir ve Joule ısısının artmasına sebep olur. Bu sebeple genel olarak 5-30 kV arası voltaj uygulanır. Daha fazlası kıvılcım ile elektrik boşalmasına neden olur ve hatta kapilerin kırılmasına yol açabilir [21].

Eğer ısı artarsa tamponun viskozitesi azalacaktır ve daha fazla akış olacaktır.

Isının artması geniş piklere, değişen alıkonma sürelerine ve tamponun kaynamasına yol açacaktır. Bu yüzden sistemin sıcaklığı sabit tutulmalıdır. Tüm bu olumlu ve olumsuz yönleri dengelemek için potansiyel optimum seviyede ayarlanmalıdır.

4.2.6 Tampona ilave edilen çeşitli maddeler

Tampon çözelti içerisine ayırma verimine etki edebilecek suda çözünen çeşitli maddeler ilave edilebilir. Bu maddeler genellikle yüzey aktifler, viskozite düzenleyiciler, organik çözücüler ya da bunların kombinasyonu şeklinde olur. Yüzey aktif madde eklenmesi analitin çözünmesine ve analit -kolon duvarı etkileşiminin azalmasına yardımcı olur. Aynı zamanda kolon duvarıyla etkileşime girerek EOF üzerinde değişim meydana getirebilir.

Viskozite düzenleyici maddeler ise molekülün hareketinde fiziksel bir rötar sağlayarak EOF'a etki eder.

Organik çözücü olarak ise asetonitril, metanol, formamid ve dimetilformamid kullanılır. Bu çözücüler sulu çözeltilerde çözünürlüğü az olan organik moleküllerin çözünürlüğünü arttırır.

4.2.6.1 Yüzey aktif madde ilavesi

Kapiler yüzeyinde adsorplanan yüzey aktif maddeler EOF üzerinde değişime sebep olurlar. Anyonik yüzey aktif maddeler EOF'ı arttırırken, katyonik yüzey aktif maddeler EOF'yi azaltır veya EOF'ın yönünü tamamen değiştirebilir. Ayrıca yüzey aktif maddeler seçimliliği büyük ölçüde etkilerler [22].

5. KAPİLER ELEKTROFOREZ CİHAZININ BÖLÜMLERİ

5.1 Yüksek Voltajlı Güç Kaynağı

Kapiler elektroforez yönteminin en belirgin özelliklerinden biri yüksek voltaj kaynağı kullanılmasıdır. Ticari cihazların uyguladığı maksimum voltaj genellikle 30 kV veya 35 kV' dir. Bir çalışmada voltajın sabit olması göç süresinin tekrarlanabilirliği açısından oldukça önemlidir [15].

Tekrarlanabilirliğin daha iyi olması için cihazların birçoğunda sabit akım yerine sabit voltaj uygulanmaktadır. Bu, sıcaklık kontrolünün yapılmadığı durumlar için önemli bir avantaj sağlamaktadır [4].

5.2 Kapiler Boru

Kapiler borular, iyonların anot - katot arasında göç ettiği ve birbirinden ayrıldığı yol olarak tanımlanabilir. Bu borular genellikle silika kapilerlerdir. Elastikiyet kazanması ve kırılmayı önlemek amacıyla polimer tabakayla kaplanmıştır. İç çapları 10-200 μm, dış çapları 350-400 μm arasında, boyu ise 50 cm – 100 cm arasında değişmektedir. Kapilerin boyu ne kadar uzunsa ayrımın o kadar kolaylaşmasına rağmen ayırma süresi artar [15].

Kapilerin kullanıma hazırlanması için öncelikle 1M NaOH ile en az yarım saat kadar yıkanarak aktif hale getirilmesi ve daha sonra hazırlanan tamponla belli bir süre yıkanarak dengeye getirilmesi gerekir.

5.3 Enjeksiyon

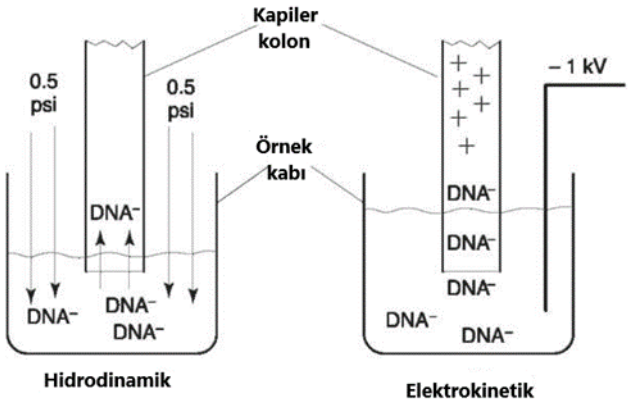
Kapiler elektroforezde ayırımı yapılacak olan numunenin kapilere taşınması enjeksiyon sayesinde gerçekleşir. Hidrodinamik ve elektrokinetik injeksiyon olmak üzere iki tip enjeksiyon uygulanabilir [4].

5.3.1 Hidrodinamik enjeksiyon

Hidrodinamik injeksiyon elektrokinetiğe göre daha yaygın olarak kullanlmaktadır. Hidrodinamik injeksiyonda örnek, uygulanan basınçla kapiler kolon içerisine alınır. Cihaz tipine göre üç farklı yöntemle hidrodinamik injeksiyon yapılır. Bunlardan ilki örnek tüpüne kontrollü basınç uygulanarak yapılması, ikincisi ise kapilerin diğer ucuna uygulanan kontrollü bir vakumla örneğin kapiler içine alınmasıdır. En son yöntemde ise basınç farkı, yani örnekle tampon arasında bir seviye farkı meydana getirilerek sağlanır [15].

5.3.2 Elektrokinetik enjeksiyon

Elektrokinetik enjeksiyonda ise numune tüpü ve çıkış tamponu arasına belli bir süre düşük voltaj uygulanarak numune kapiler boru içine taşınır. Bu enjeksiyon yönteminde tekrarlanabilirlik, hidrodinamiğe göre daha azdır [16]. Şekil 5.1'de elektrokinetik ve hidrodinamik enjeksiyonun farkları şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 5.1: Elektrokinetik ve hidrodinamik enjeksiyon karşılaştırması.

5.4 Dedektör

Dedektörler, kimyasal sinyalleri elektrik sinyallerine dönüştüren cihazlardır. Floresans, Elektrokimyasal, Kütle Spektrometrik, UV-Görünür Alan Absorbsiyon ve İletkenlik dedektörü gibi birçok dedektör çeşidi vardır. Bunlardan en çok kullanılanı UV-GB detektördür. Çizelge 5.1'de her bir dedektörün tayin sınırları molar cinsinden verilmiştir.

Çizelge 5.1: Kapiler elektroforez dedektör türleri ve tayin sınırları [23].

Tayin Metodu	Tayin Sınırı (Molar)
Spektrometri	
UV-GB Absorpsiyon	$10^{-5} – 10^{-8}$
Floresans	$10^{-7} – 10^{-9}$
Lazer İndüklenmiş Floresans	$10^{-14} – 10^{-16}$
Elektrokimyasal	
İletkenlik	$10^{-7} – 10^{-8}$
Amperometri	$10^{-10} – 10^{-11}$
Kütle spektrometri	$10^{-8} – 10^{-9}$

5.4.1 İletkenlik (kondüktivite) dedektörü

İletkenlik dedektörleri çözeltiyle temas halinde olan iki elektrot arasındaki iletkenliğin ölçümüne dayanır. Bu iletkenlik değeri hareketli faza aittir. İletkenlik dedektörü bir bulk dedektör tipidir olduğundan çözelti ve solventteki tüm iyonları algılar. Bu sebeple özellikle küçük iyonların dedeksiyonu için UV detektörlerden daha hassastır [24].

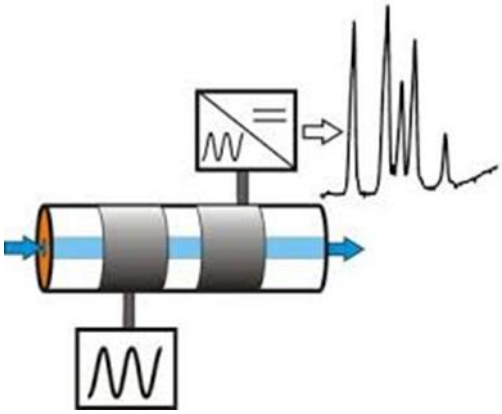
Bu dedeksiyon türünde yüksek frekanslı alternatif akım uygulanmasıyla dedeksiyon gerçekleşmektedir. Bu alternatif akım elektrotlarda meydana gelebilecek elektroliz reaksiyonlarının önüne geçmek amacıyla uygulanır. Dedeksiyon sırasında tampon çözelti ile analitler arasındaki iletkenlik farkını yansıtan sinyaller elde edilir. Analitler ile tampon çözelti arasında iletkenlik farkı ne kadar artarsa dedektör sinyali de aynı oranda artar [25].

5.4.1.1 Temassız İletkenlik Dedektörü

İletkenlik dedektörü temaslı ve temassız olmak üzere ikiye ayrılır. Temassız iletkenlik dedektörü (C^4D) temas moduna göre daha stabil ve daha güçlü bir dedeksiyon yöntemidir.

Kapiler elektroforezde kullanılmak üzere ilk olarak Zemann ve grubu 1998 yılında kapiler kolona tamamen uyulu bir dedektör tasarlamada başarılı olmuşlardı. Bu tasarımdan sonra birçok sayıda araştırma yayınlanmıştır. Bu dedektörün birçok cihaza bağlanarak pek çok alanda kullanılmış ve yüksek hassasiyete sahip analizler gerçekleştirilmiştir [26]. C^4D tasarımı oldukça basit bir yapıya sahiptir. Dedektör hücresi temel olarak kalınlıkları 2 – 30 mM arasında değişen, aralarında 1 – 5 mM boşluk olan metal boru şeklinde iki tane elektrottan oluşmaktadır [27]. Bu elektrotlardan biri uyarma elektrodu diğeri ise dedeksiyon elektrotu olarak adlandırılır.

Uyarma elektrotuna uygulanan akım kolona, oradan da dedeksiyon elektrotuna iletilir ve sinyal elde edilir. Şekil 5.2'de temassız iletkenlik dedektörünün hücresi gösterilmektedir.



Şekil 5.2: Temassız iletkenlik dedektör hücresi [49].

C^4D'nin avantaj ve dezavantajlarını karşılaştıracak olursak Çizelge 5.2'yi inceleyebiliriz.

Çizelge 5.2: C^4D dedeksiyonun avantaj ve dezavantajları [28].

Avantajlar	Dezavantajlar
Basit hücre yapısına sahiptir ve yedek parçaya ihtiyaç duymaz.	Çok yüklü maddeler tampon çözeltide kullanılamaz.
Bakımı ve kullanımı kolaydır.	Isı hassasiyetine sahiptir, buna bağlı olarak zemin gürültüsünde kaymalar olabilir.
Bütün iyonların analizi için uygun ve evrenseldir.	Yüksek pH değerlerinde havadan CO_2 absorplaması nedeniyle zemin gürültüsünü etkileyebilir.
Düşük maliyetle üretilir.	Tampon çözelti yapısındaki değişime (elektrotta oluşan elektrolizden kaynaklanan) karşı hassastır.
Elektrotların kirlenme sorunu yoktur.	
Taşınabilir boyutlara sahiptir.	
Yüksek hassasiyetle gerçekleştirilir.	
CE cihazlarıyla uyumludur.	
Farklı boyutlardaki kapiler kolonlar ile uyumludur.	
Dedeksiyon penceresine ihtiyaç yoktur.	

C^4D, bazı biyomoleküller, inorganik ve organik iyonlar gibi birçok farklı türden analitin dedeksiyonunda kullanılabilir. Bu dedeksiyon türü ile klinik analizler ve gıda analizlerinde çoğunlukla kullanılır. Ayrıca enantiyomerlerin ve amin türevlerinin türevlerlendirilmeye ihtiyaç duymadan ayrılmasını sağlar. Organik bileşikler ise uygun pH seçilerek yüklü hale getirilip, uygun tampon çözelti ortamında dedekte edilebilir.

Kullanım alanı çok geniştir, yani kullanım kısıtlaması nerdeyse yok denecek kadar azdır.

5.5 Elektrotlar

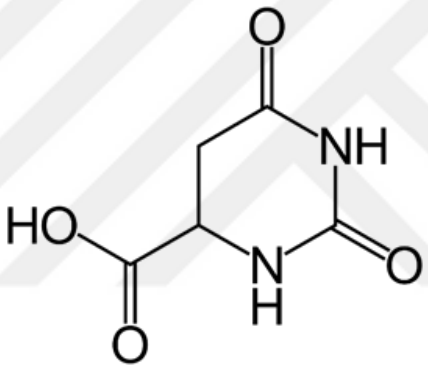
CE'de platin elektrotlar kullanılır ve bu elektrotlardaki reaksiyonlar genellikle suyun ayrışması ile meydana gelir. Anotta ve katotta oluşan ayrışma reaksiyonları sırası ile aşağıda verilmiştir.

$$2H_2O \leftrightarrows 4H^+ + 4e^- \quad (5.1)$$

$$2H_2O + 2e^- \leftrightarrows H_2\,(g) + 2(OH)^- \quad (5.2)$$

6. OROTİK ASİT

Orotik asit bir pirimidindiyon ve küçük bir karboksilik asittir. Daha önceleri B13 vitamini olarak bilinmekteydi, fakat insanlar tarafından sentezlenebileceği anlaşılınca orotik asitin bir vitamin olmadığı ortaya çıkmıştır. Çok sayıda literatürde vitamin olmadığı konusunda görüşler bulunmasına rağmen hala bazı kaynaklarda B13 vitamini olarak tanımlanmaktadır. Çoğu idrar orotik asidi vücutta sentezlenerek pirimidin nükleotitlerinin sentez aşamasında bir ara ürün olarak görev almaktadır. Şekil 6.1'de orotik asidin molekül yapısı verilmiştir.



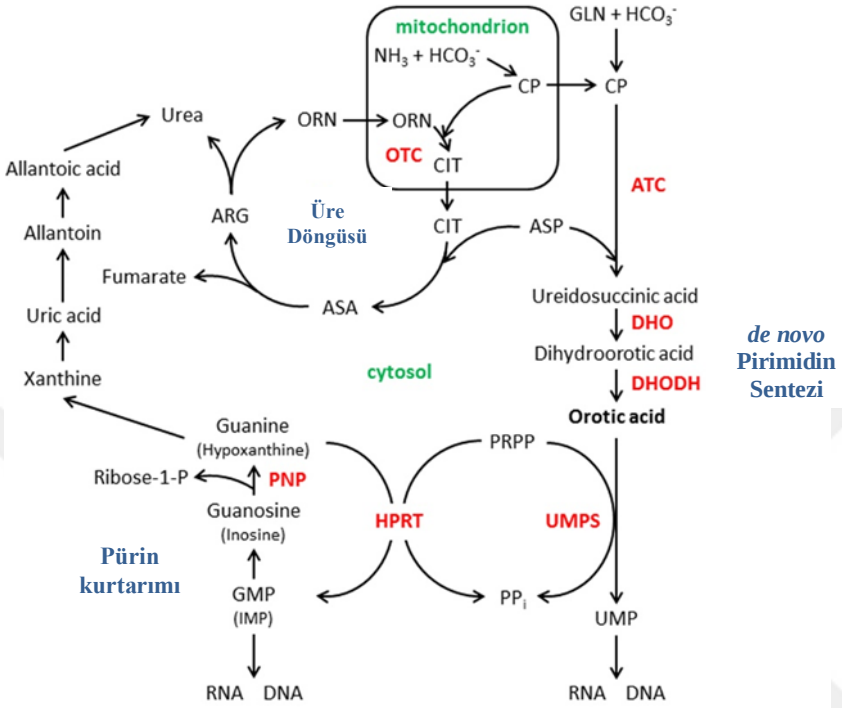
Şekil 6.1 : Orotik asidin molekül yapısı.

Anne sütünde bulunmamasına rağmen inek sütü ve süt ürünlerinde orotik asit bulunmaktadır. Havuç, pancar gibi kök sebzeler ise orotik asitin en zengin bitkisel besin kaynaklarındandır. Yapılan çalışmalar, orotik asitin fermente süt ürünü olan kefirde de mevcut olduğunu ve kefir tüketiminin kandaki orotik asit seviyesini arttırdığını göstermektedir.

Beslenme yoluyla alınan orotik asit karaciğer sağlığını korumada rol almaktadır. Buna bağlı olarak yenidoğan sarılığı, hiperlipoproteinemi, dejeneratif retinal ve gut hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır [29].

İdrar ve kan gibi vücut sıvılarında bulunan yüksek miktarlarda spesifik metabolitler, altta yatan bir sendrom tanısı veya metabolizma hatası için önemli ipuçları verebilmektedir. Orotik asit böyle bir metabolittir.

De novo pirimidin sentezinde ara ürün olarak görev alır ve çeşitli metabolik yollarla bağlantısı Şekil 6.2'de gösterilmiştir.



Şekil 6.2 : Çeşitli metabolik yollarla ilişkili olarak orotik asit: üre döngüsü, de novopirimidin sentez yolu. [30].

Navder ve ark. tarafından yapılan çalışmada, fermente süt ürünleri baz alınarak orotik asidin kolesterol düşürücü etkisi incelenerek beslenme yoluyla alınan orotik asidin kolestrol seviyesini düşürdüğü saptanmıştır [31]. Motyl ve ark.(1991) ise gerçekleştirdikleri çalışmada fermente süt ürünlerinde önemli miktarlarda orotik asit düzeyleri tespit ederek çalışmalarını orotik asit ve kolesterol arasındaki ilişki üzerine yoğunlaştırmışlardır. Orotik asit ve kolesterol arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmaların birinde; besin yoluyla orotik asit verilen farelerin karaciğerlerindeki yağ asitleri sentezinin azaldığı, tiriaçilgliserol, fosfolipid ve kolesterol ester miktarında azalma tespit edilmiştir.

Literatürde kolesterol ve orotik asit ilişkisi üzerinde yapılan çalışmaların sınırlı sayıda olduğu görülmektedir. Yapılan sınırlı sayıda çalışmalar orotik asidin kan kolesterol seviyesini düşürücü etkiye sahip olduğunu, karaciğer sorunlarını ve erken yaşlanmayı önlediğini, ayrıca multiply skleroz tedavisine yardımcı olduğunu göstermektedir. Bilim insanları orotik asidin sağlık üzerindeki olumlu etkileri konusunda

gerçekleştirilen çalışmaların yeterli olmadığını ve bu konuda daha çok ve çeşitli bilimsel çalışmaların yürütülmesi gerektiğini savunmaktadırlar.

Tuma ve arkadaşları, kapiler elektroforez yöntemiyle temassız iletkenlik ve UV dedektör kullanarak idrarda çeşitli organik asitlerin – içlerinde orotik asidin de bulunduğu- analizini geliştirdikleri metot ile gerçekleştirmişlerdir. Sonuç olarak, önerilen kapiler elektroforez metodu ile hızlı bir ayırım, kısa analiz süresi, yüksek geri kazanım, keskin ve az gürültülü elektroferogramların elde edilebildiği gözlemlenmiştir [49].

7. METABOLİK HASTALIKLAR

Metabolik bozukluk kavramı ilk kez 1901 yılında Sir Archibald Garrod tarafından tanımlanarak literatüre geçmiştir. 1901'den bugüne kadar teknoloji ve laboratuar imkanlarının artmasıyla yaklaşık 200'den fazla metabolik hastalık tanımlanmıştır. Bu hastalıklar tek başına düşünüldüğünde ender olarak görülse de, hepsi birlikte değerlendirildiğinde çocuk sağlığı açısından önemli bir hastalık grubudur [32].

Vücuttaki anormal kimyasal reaksiyonlar normal metabolik süreci değiştirdiğinde metabolik bir bozukluk meydana gelebilir. Bu bozukluklar genelde bir metabolik döngüde biriken maddeler veya son ürünün elde edilememesi sebebiyle ortaya çıkmaktadır. Döngülerde biriken maddeler diğer dokulara da ulaşabildiklerinden farklı organları da etkileyebilmektedir. Metabolik bozukluklarla ortaya çıkabilecek semptomlardan bazıları uyuşukluk, kilo kaybı, sarılık ve nöbetlerdir. İfade edilen semptomlar metabolik bozukluğun türüne göre değişiklik gösterebilir. Ayrıca metabolik hastalıklar beslenme yoluyla tedavi edilebilirler.

Metabolik hastalıkların nedeni olan kalıtsal metabolik bozukluklar, kusurlu bir gen ve bir enzim varlığında ortaya çıkmaktadır. Kalıtsal metabolik hastalıklar yaşamın herhangi bir döneminde ortaya çıkarak herhangi bir dokuyu yada organı olumsuz etkileyebilir.

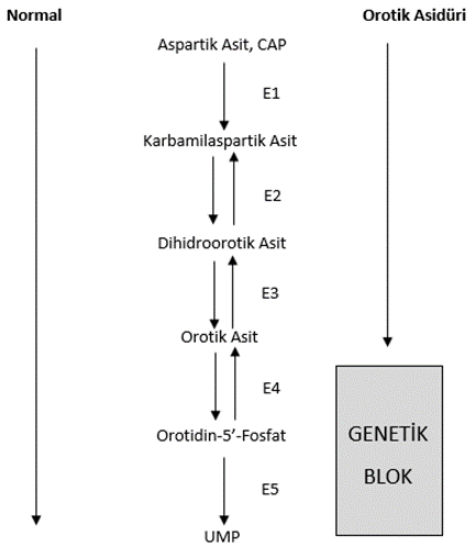
7.1 Organik Asidüriler

Organik asitler, canlı vücudunda çeşitli metabolik döngülerle açığa çıkan fizyolojik ara ürünlerdir. Bu metabolik döngülerden biri veya birkaçında enzimlerin çalışmaması, elde edilmesi gereken metabolik ürünlerin azalmasına ve enzimlerin dönüştürdüğü ara ürünlerin (organik asitler) birikmesine sebep olur. Ara ürün olarak adlandırılan organik asitlerin fazlası idrarla vücuttan atılır. Bu sebeple idrarda organik asit analizi, metabolik hastalık olan organik asidürilerin saptanmasında en güvenilir metoddur. Bu yöntem ile bir çok metabolik hastalık spesifik olarak tanımlanabilir [33].

Organik asidüriler karbonhidrat, aminoasit ve lipit metabolizmalarındaki doğumsal bozukluklar sonucu ortaya çıkan bir grup hastalık olarak tanımlanabilir. Organik asidüriler; psikososyal motor gerilik, kusma, sık enfeksiyon geçirme, hipotoni, hipoglisemi, konvülsiyon, metabolik eos et accusam et justo duo dolores et ea rebum. asidoz, ketozis, hiperamonyemi, en-sefalopati, erken ve açıklanamayan ölüm gibi çeşitli klinik ve laboratuvar bulgularla ortaya çıkmaktadırlar [34].

7.1.1 Orotik asidüri

Orotik asit, hem orotat fosforibozil transferaz hem de orotidilat dekarboksilaz aktivitesine sahip çok fonksiyonlu bir protein olan UMP sentaz ile UMP'ye dönüştürülür. Pirimidin nükleotid sentezinde en sık görülen doğuştan gelen hata, çok fonksiyonlu protein UMP sentazının (UMP sentaz eksikliği veya orotik asidüri) bir mutasyonudur. Bu bozukluk, orotik asidin UMP'ye ve dolayısıyla diğer pirimidinlere dönüştürülmesini önler. Sonuç olarak, plazma orotik asit yüksek konsantrasyonlarda birikir ve idrarda artan miktarlar ortaya çıkar. UMP sentazında bir mutasyon barındıran kişilerde idrarda orotik asit o kadar belirgin bir şekilde artmaktadır ki, idrarda orotik asit kristalleri oluşabilir. Yeterince yüksek seviyelerde bulunduğunda, birçok organ sistemi üzerinde çoklu olumsuz etkiler ortaya çıkabilir. Orotik asit organik bir asittir. Şekil 7.1'de sağlıklı ve orotik asidürili bireylerdeki UMP sentez aşamalarının karşılaştırmalı gösterimi verilmiştir.



Şekil 7.1: Sağlıklı ve orotik asidürili bireylerdeki UMP sentez aşamalarının gösterimi. E1: aspartat karbomil transferaz, E2: dihidrooratazz, E3:dihidrooroticdehidrogenaz, E4: OPRT (UMP synthase), E5: OPD (UMP synthase), CAP:Carbamylphosphate UMP:Uridine monophosphate [50].

Kandaki (organik asidemi), idrardaki (organik asidüri), beyindeki ve diğer dokulardaki anormal derecede yüksek organik asit seviyeleri genel metabolik asidozise yol açar. Asidoz tipik olarak pH 7,35'in altına düştüğünde ortaya çıkar. Asidozlu bebeklerde, ilk belirtiler zayıf beslenme, kusma, iştahsızlık, zayıf kas tonusu ve enerji eksikliğini (uyuşukluk) içerir. Bunlar kalp anormallikleri, nöbetler, koma ve muhtemelen ölüme ilerleyebilir. Organik asidemisi olan çocukların birçoğu zihinsel engellilik veya gecikmiş gelişim yaşar. Yetişkinlerde asidoz veya asidemi baş ağrısı, karışıklık, yorgun hissetme, titreme, uykululuk ve nöbetler ile ortaya çıkabilir [35].

7.1.1.1 Orotik asidüri tip I ve tip II

Orotik asidüri, tip I ve tip II olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Pirimidin sentezinde görev alan orotat fosforibozil transferaz ve orotat monofosfat dekarboksilaz enzimlerinin her ikisinin de eksikliğinde görülen orotik asidüri tip I olarak adlandırılır. Bulguları ise gelişim eksikliği, megaloblastik anemi ve idrarda orotik asit kristalürisi şeklinde görülür. Tedavi olarak ağızdan üridin verilir [36].

Sadece orotat monofosfat dekarboksilaz eksikliğinde ise orotik asidüri tip II ortaya çıkmaktadır. Orotidinüri ve megaloblastik anemi bulguları görülmektedir. Tedavi olarak, orotik asidüri tip I ’de olduğu gibi ağızdan üridin verilir [36].

8. İDRAR

İdrar, böbreklerde kandan süzülerek idrar yolları ile vücuttan atılan sıvı olarak tanımlanır. İdrarın ortalama % 96'sını su; geri kalan kısmını ise çeşitli organik ve inorganik artıklar oluşturur. Bu artıklar vücudumuzda meydana gelen metabolizma olayları sonucunda açığa çıkar. İdrar analizi vücudumuzdaki işleyiş ve bozukluklar hakkında önemli bilgiler verir. Hem bu sebeple hem de ucuz, hızlı ve kolay olması sebebiyle rutinde idrar analizi sıkça istenmektedir.

8.1 İdrarın Kimyasal Özellikleri

İnsan idrarının yaklaşık %91-96'sı su ihtiva etmektedir. Geri kalanını ise üre, ürik asit, kreatinin, hormon, mineral, pigment ve eser miktarda enzim oluşturmaktadır.
İdrar pH'ı içeriğindeki bileşenlerin oranlarına bağlı olarak 5,5-7 arasında değişim göstermektedir [37]. İdrarda pH'ın ölçümü, böbrek enfeksiyonları, böbrek taşları ve kullanılan ilaçların etkilerinin izlenmesi için önemlidir.

8.2 İdrarın Fiziksel Özellikleri

Sağlıklı idrar rengi içeriğindeki su oranına göre açık sarı ve turuncumsu arasında değişmektedir. Hastalık durumunda ve beslenme şekline göre geçici olarak farklı renkler gösterebilir. İdrarın kokusu ise normalde keskin olmamasına rağmen beslenme şekline göre değişiklik gösterebilir. Yoğunluğu ise 1003-1032 g/mL'dir [37]. Yüksek oranda su içerdiği için yoğunluğu suyun yoğunluğuna yakındır.

8.3 İdrarın Toplanması ve Saklanması

Analiz için idrar, temiz, kuru, tek kullanımlık ve kapaklı bir kaba konmalıdır. Rutin idrar kapları koruyucu madde içermemeli ve plastik olmalıdır. Fakat özel testler için koruyucu madde gerekli ise kabın etiketinde hangi koruyucu madde ilave edildiği belirtilmelidir. Daha sonra orta akış idrar toplanır. Bu, idrarın üretra veya vajina içeriği

ile kontaminasyonunu önler ve bu nedenle bileşenlerinin böbrek kökenini yansıtması daha olasıdır. [38]

Hastaya ait bilgiler idrar kabının kapağında değil idrar kabı üzerinde mutlaka belirtilmelidir. İdeal olan analiz sıcaklığı oda sıcaklığıdır. Mümkünse 30 dakika içinde analiz yapılmalıdır. Fakat 2 saati aşmadan mutlaka analiz gerçekleştirilmelidir. 2 saat içinde çalışılamıyorsa +4 ˚C'de saklanabilir ve oda sıcaklığına getirilerek analiz edilir [39].

9. LİTERATÜR İNCELEMESİ

Yapılan literatür araştırmalarına göre kapiler elektroforez genel olarak gıda ve tıbbi analizlerde kullanılmaktadır. Buna örnek olarak Buiarelli ve grubu 2002 yılında UV-DAD dedektör bağlı CE ile aralarında orotik asitin de bulunduğu dört farklı organik asidin (sitrik, orotik, ürik ve hippürik asit) süt peyniraltı suyunda tayinini kantitatif olarak yapmışlardır. Bu çalışmada orotik asidin LOD değeri 2 mg/L olarak verilmiştir [40].

Ayrıca 1996'de Ševčík ve arkadaşları, sağlıklı ve orotik asidürili kişilerin idrar örneklerinde orotik asit miktarını CZE kullanarak bir analiz metodu gerçekleştirmişler ve LOD değerini 0,468 mg/L olarak tespit etmişlerdir [41].

Friedecký ve arkadaşları ise 2002 yılında pürin ve pirimidinlerin sentezinde yer alan önemli metabolitlerin (adenin, adenosin, guanozin, hipoksantin, orotidin, orotik asit vs.) UV dedektör kullanrak kapiler elektroforez yöntemiyle gerçekleştirmiş olduğu analizlerde orotik asidin LOD değerinin 0,808 mg/L olduğunu belirtmişlerdir [42].

Aşağıda Çizelge 9.1'de çeşitli makalelerdeki ve bu çalışmadaki LOD değerleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Çizelge 9.1: Literatürdeki bazı çalışmaların yöntemleri, tamponları ve LOD değerleri.

Makale	LOD	Tampon	Yöntem
[41]	0,468 mg/L	Fosfat (100 mmol/1, pH = 2,25)	ITP ve CZE-UV
[43]	0,265 mg/L	0,03 M Glutamik asit, 10,007 M spermin, pH 5,2	ITP-CZE
[44]	0,390 mg/L	20 mM Na-Borat, pH 9,2	CE-UV
[42]	0,808 mg/L	200 mmol/L Sodyum fosfat, pH 1,8	CE-UV
[40]	2 mg/L	120 mM Borat, CTAB 0,5 mM, pH = 7,0	CZE-UV-DAD

10. DENEYSEL KISIM

10.1 Kimyasallar ve Çözeltilerin Hazırlanması

10.1.1 Kimyasallar

Tampon çözelti için kullanılan MES Fluka (Steinheim/Almanya), L-Histidin SHS (Liverpool/UK), CTAB Merck (Darmstatd/Almanya), asetonitril ise Merck (Darmstatd/Almanya)'den, standart olarak kullanılan orotik asit ise Sigma - Aldrich'den temin edildi. İdrar örnekleri ise 10 kişiden temin edilerek analizleri gerçekleştirilmiştir.

10.1.2 Standart çözeltilerin hazırlanması

Orotik asit için 575 mg/L stok çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra bu stok çözeltisinden aynı yöntemle seyreltilerek 50 ve 10 mg/L olmak üzere iki ara stok hazırlanmıştır. Aynı şekilde 10 mg/L'lik ara stoktan seyreltme yöntemiyle standart çözeltiler hazırlanmıştır. Lineer kalibrasyon eğrileri en az 6 noktadan geçecek şekilde hazırlanan standart çözeltiler yardımıyla sulu çözelti ortamında ve numune ortamında oluşturulmuştur. Her çalışma günü standart çözeltiler ara stoktan taze hazırlanarak kullanılmıştır. Ayrıca tüm stoklar 4˚C' de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

10.1.3 Örnek çözeltilerin hazırlanması

Bu çalışmada analizi yapılmak üzere 10 farklı kişiden idrar örnekleri toplanmıştır. Toplanan bu idrar örneklerinin her biri 100 mL'lik plastik numune saklama kaplarında taşınmıştır. Numune saklama kapları kuru, steril ve tek kullanımlıktır. Numune kaplarında saklanan idrar örnekleri 2 saat geçmeden laboratuvar ortamında, 0,45 µm'lik mikrofiltreden geçirilmiştir. Bu işlem kolonun tıkanmaması için uygulanmaktadır. Mikrofiltreden geçirilip elde edilen süzüntüler 1,5 mL'lik yarı saydam plastik Eppendorf tüplere konularak dondurucuda saklanmıştır.

İdrar analizi için donmuş örnekler oda sıcaklığında sıvı hale getirildikten sonra seyreltme işlemine geçilmiştir. Örneklerin kolonu tıkamaması için bir çözücüyle

seyreltilmesi gerekmektedir. Örneklerin su ile 1:50 oranında seyreltilmesine karar verilip cam analiz kaplarında hazırlanmak üzere ACN eklenen örnekler saf su ile 4 mL'ye seyreltilmiştir. Böylece örnek çözeltiler analize hazır hale getirilmiştir.

10.1.4 Ön denemeler ve tampon çözeltilerin hazırlanması

Elektroforez yönteminde tampon, partiküllerin yüklerinin saptanması, kolonda göç oluşmasını ve iyonizasyonunun devam etmesini sağlayan bir çözeltidir. Tampon çözeltinin iyonik gücü, yüklü parçacıkların etrafında oluşan iyonik bulutun kalınlığını, bu yüklü parçacığın hızını, elektrofretik zonların keskinliğini belirler. İyon konsantrasyonu yükseltilerek iyonik bulut kalınlığı arttırılırsa, molekülün mobilitesini etkileyerek hareketini zorlaştırır.

Tampon çözelti analiz verimliliğini etkileyen; konsantrasyon, pH, sıcaklık, yüzey aktif madde içeriği, organik faz ilavesi gibi birçok değişkene sahiptir. Bu değişkenler rezolüsyonu, iyonların göç süresini, elektroferogramda elde edilen pik şekli, pik yüksekliği ve gürültü miktarını önemli ölçüde ve doğrudan etkilemektedir. Bu sebeple metotta kullanılacak olan tamponun kompozisyonuna yani bileşenleri ve bunların oranlarına, pH ve sıcaklığa karar vermek için çeşitli ön denemelerin yapılması gerekmektedir. Denemeler sonucunda en verimli sonuçları veren tampon şartları belirlenir.

Tampon olarak; borik asit, asetik asit, arjinin, CAPSO, HIS, ve MES kimyasallarının farklı pH'larda ve konsantrasyonlarda çeşitli kombinasyonları denendi. Yüzey aktif madde olarak ise CTAB farklı konsantrasyonlarda tampona eklenerek denendi. Birçoğundan elde edilen elektroferogramda zemin gürültüsü yüksek, pik sinyalleri ve rezolüsyon düşük çıkarken 20 mM MES, 10 mM HIS ve 0,1 mM CTAB (pH = 6,5) denemesinde gürültüsü düşük bir elektroferogram, hızlı ayırım ve daha dik pikler elde edildi.

10.2 Cihazlar ve Çalışma Koşulları

Bu çalışmada analiz cihazı olarak PrinCE Technologies B.V.250 marka kapiler elektroforez kullanılmıştır. İyon göçünün gerçekleştiği Polymicro Technologies (Phoenix, AZ/America) marka kolonun toplam uzunluğu 65 cm, etkin uzunluğu 50 cm ve 50 μm iç çapındadır. Dedeksiyon için TraceDec Contactless Conductivity iletkenlik

dedektörü kullanılmıştır. Dedektörün uyguladığı çalışma voltajı -12 Db ve sinyal dönüştürücü kazanımı %100 dür.

Veri analizi DAx 8.0 Data Acquisition and Analysis programında yapılmıştır. Örnek, standart ve tampon kabı olarak 4 mL hacminde cam vialler ile çalışılmıştır. Çözelti hazırlamada kullanılan deiyonize su Elga Purelab Option-Q saf su cihazından temin edilmiştir. Kapiler kolona verilmeden önce örnekler 0,45 μm'lik mikrofiltre kullanılarak filtrelenmiştir. Tampon çözeltinin pH'sını ölçmek için ise Thermo Scientific Orion Dual Star marka pH metre kullanılmıştır.

Kapiler kolon ilk kullanımda 100 mbar 30 dakika 1M NaOH çözeltisi, 10 dakika saf su ve 10 dakika tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Günlük kullanımda cihaz açıldığında sırasıyla 10 dakika 0,1 M NaOH, 10 dakika saf su ve 10 dakika tampon çözeltisiyle yıkanır. Kapatılmadan önce ise 10'er dakika NaOH ve saf su ile yıkanır kolon uçları saf suda bırakılır. Her örnek analizleri arasında ise 2'şer dakikalık NaOH ve su ve tampon ile ara yıkama yapılır.

Örnek sıkıştırma yöntemini uygulamak için plug çözelti olarak H_2O:ACN (9:1) kullanıldı. Plug enjeksiyonu 60 mbar basınçta 10 saniye süreyle, örnek enjeksiyonu elektrokinetik olarak -8 kV gerilim 20 saniye süreyle uygulanarak, 25˚C'de -28 kV elektrik alan varlığında tüm analizler gerçekleştirildi.

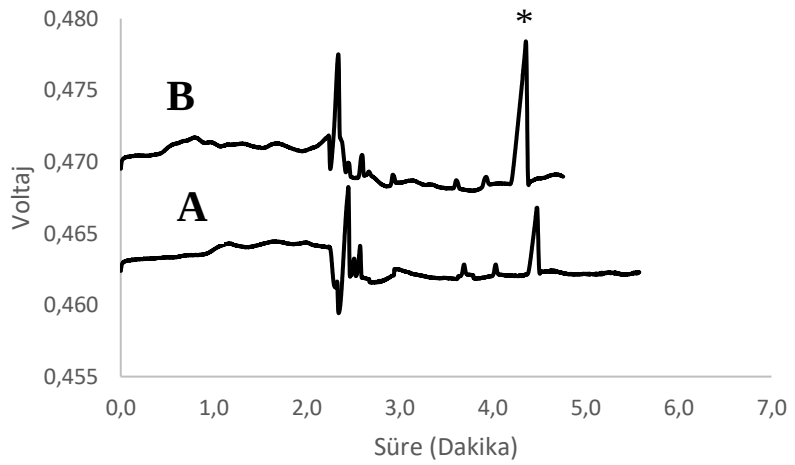
10.3 Metot Geliştirme ve Optimizasyon

Metot optimizasyonu, en verimli ve ideal analiz sonuçları elde etmek için metot parametrelerinin belirlenip incelendiği bir ön çalışmadır.

Bu çalışmada ilk denemeler hidrodinamik enjeksiyon ile yapılmıştır. Daha sonra elektrokinetik enjeksiyon ile yapılan ön denmelerde daha keskin ve yüksek pikler elde edilmiş bu nedenle daha düşük LOD değerlerini sağlayabilmek amacıyla elektrokinetik enjeksiyon ile çalışmaya devam edilmiştir.

Enjeksiyon türüne karar verildikten sonra örnek sıkıştırma metodu ile analizler gerçekleştirilerek piklerin dedeksiyon limitleri düşürülerek daha verimli sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca örnek sıkıştırma için kullanılan "plug" adı verilen çözelti H_2O ve H_2O:ACN olarak ayrı ayrı hazırlanmıştır. H_2O ve ACN karışımının sadece H_2O'ya göre daha etkili olduğu görülmüştür. H_2O:ACN karışım olarak 90:10 ve 80:20 oranlarında denenmiştir. Aralarında bir fark görülmemesi sebebiyle 90:10 oranı seçilmiştir.

Şekil 10.1’de, optimum koşullar ve tampon ortamında örnek sıkıştırma yöntemiyle ve örnek sıkıştırma yapılmadan analizi yapılan standart çözeltilerin karşılaştırmalı olarak elektroferogramı gösterilmektedir.



Şekil 10.1: 5 mg/L orotik asit standardı, *:OA. 20 mM MES, 10 mM HIS, 0,1 mM CTAB pH : 6,5. **A.** Plug kullanılmadan örnek enjeksiyonu: -8kV/20 sn, -28 kV, **B.** Plug: 90:10(H_2O:ACN), plug enjeksiyonu:60 mbar/10 sn. Örnek enjeksiyonu: -8kV/ 20 sn, -28 kV

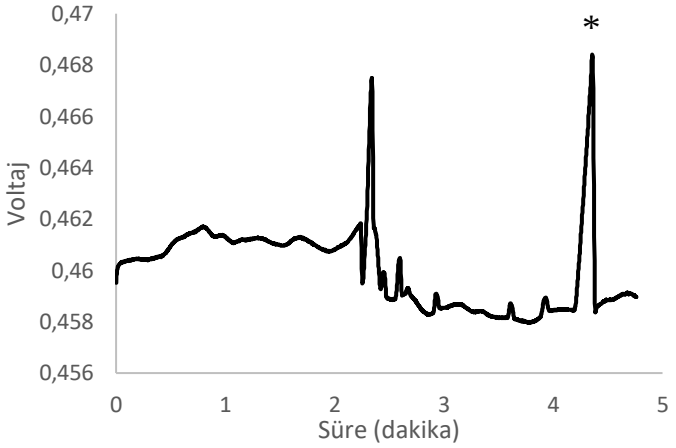
Şekil 10.1’de görüldüğü üzere plug kullanılan örnek sıkıştırma yöntemiyle yapılan analizde piklerin yüksekliğinden, daha düşük dedeksiyon limiti sağlayacağı anlaşılmaktadır. Bu sebeple örnek sıkıştırma yöntemi sayesinde daha verimli sonuçlar elde edileceğine karar verilmiştir.

Örnek enjeksiyonunda 5, 8 ve 12 kV denenerek en iyi pikleri veren voltaj seviyesine karar verilmiştir. 12 kV seviyesinde rezolüsyonun 8 kV’a göre daha düşük olduğu görülmüştür. 5 kV ise pikler daha geç gelmektedir. Bu nedenle optimum injeksiyon voltajı 8 kV olarak seçilmiştir.

Enjeksiyon türüne ve voltaj seviyesi kararlaştırıldıktan sonra enjeksiyon süresine karar vermek için 6, 10, 20 ve 30 saniye olmak üzere farklı süreler denendi. Uygulanan farklı enjeksiyon sürelerine göre, 6 saniyede orotik asit piki gözükmemekte, 30 saniyede ise pikler yayvanlaşmaktadır. 20 saniye enjeksiyon süresinin 10 saniyeye göre daha yüksek pikler ve düşük dedeksiyon limiti sağladığı belirlenmiştir.

Ayrıca resolüsyonu arttırmak amacıyla analizi yapılan standart ve örnek çözeltilerine %5, %10, %20 olmak üzere farklı yüzdelerde organik faz olarak asetonitril ilaveleri denenmiştir.

Sonuç olarak yapılan denemeler neticesinde, örnek sıkıştırma yöntemiyle 90:10 (H_2O:ACN) oranında plug çözelti kullanılmasına, plug enjeksiyonun 60 mbar basınçla 10 saniye sürede yapılmasına, örnek enjeksiyonunun ise elektrokinetik olarak -8 kV/20 sn ve çalışma voltajının -28 kV olmasına karar verilmiştir. Şekil 10.2'de kararlaştırılan metoda göre 5 mg/L orotik asit standardının elektroferogramı verilmiştir.



Şekil 10.2: 5 mg/L orotik asit standardının elektroferogramı. *: orotik asit pikini göstermektedir. Tampon çözelti 20 mM MES, 10 mM HIS ve 0,1 mM CTAB, pH=6,5. Metot: Plug 90:10 (H_2O:ACN), plug enjeksiyonu: 60 mbar/ 10 sn. Örnek enjeksiyonu: -8kV/ 20 sn, -28 kV

10.4 Kalibrasyon Grafiğinin Oluşturulası

Kalibrasyon çözeltileri 1:50 oranında seyreltilmiş idrar örneklerinden hazırlanmış olup, standart ekleme yöntemine dayanarak her birine 0,05; 0,1; 0,5; 1, 2, 5 mg/L olmak üzere farklı konsantrasyonlarda orotik asit standardı eklenmiştir. Altı farklı orotik asit konsantrasyonuna sahip idrar örnekleri analiz edilerek bir kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. İçine orotik asit ilavesi yapılmadan analiz edilen idrar örneğinin kendi içeriğindeki orotik asit miktarı oluşturulan kalibrasyon denkleminden hesaplanarak tespit edilmiştir. Hesaplanan orotik asit miktarına göre kalibrasyon çözeltilerinin orotik asit konsantrasyonu güncellenerek yeni bir kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.

Karşılaştırma yapmak amacıyla sulu ortamda, 0,05; 0,1; 0,5; 1, 2, 5 mg/L konsantrasyonlara sahip orotik asit standartları hazırlanarak yine bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. İki eğrinin karşılaştırmalı olarak denklemleri ve regresyon değerleri Çizelge 10.1'de verilmiştir.

Çizelge 10.1:Sulu ortam ve örnek ortamındaki kalibrasyon eğrilerinin karşılaştırılması.

	Örnek Ortamı (Std Ekleme Metodu)	Sulu Ortam
R^2	0,9967	0,9982
Eğri Denklemi	$y = 3*10^{-6} x + 3*10^{-7}$	$y = 2*10^{-5} x + 7*10^{-6}$

10.5 LOD ve LOQ Değerleri

Dedeksiyon limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ) yöntem validasyonunda iki önemli performans özelliğidir. LOD ve LOQ, analitik bir prosedürle güvenilir bir şekilde ölçülebilen bir analitin en küçük konsantrasyonunu tanımlamak için kullanılan terimlerdir.

Yöntemin LOD değeri, ortalama gürültü miktarının üç katı sinyale eşdeğer konsantrasyon değerleri olarak, LOQ değeri ise 10 katı olarak hesaplanmıştır. Hem sulu ortamdaki hem de örnek ortamındaki kalibrasyon standartlarının LOD ve LOQ değerlerinin ortalaması Çizelge 10.2.'de verilmiştir.

Çizelge 10.2.: Orotik asidin LOD ve LOQ değerleri.

	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Örnek Ortamında	0,103	0,344
Sulu Ortamda	0,014	0,047

10.6 Tekrarlanabilirlik Ölçümleri

1 mg/L'lik orotik asit çözeltisi metodun güvenilirliğini test etmek amacıyla her seferinde beş kere olmak üzere üç gün arka arkaya cihaza verilerek % bağıl standart sapmaları hesaplanmıştır. Gün içi ölçümlerin zamana ve düzeltilmiş pik alanına (alan/zaman) bağlı ortalama %RSD değerleri sırasıyla 0,63 ve 2,39 'tir. Günler arası zaman ve düzeltilmiş pik alanına bağlı %RSD değerleri ise sırasıyla 5,67 ve 2,92'dir. Çizelge 10.3'de ayrıntılında olarak ortalamalar, standart sapmalar ve %RSD'ler verilmiştir.

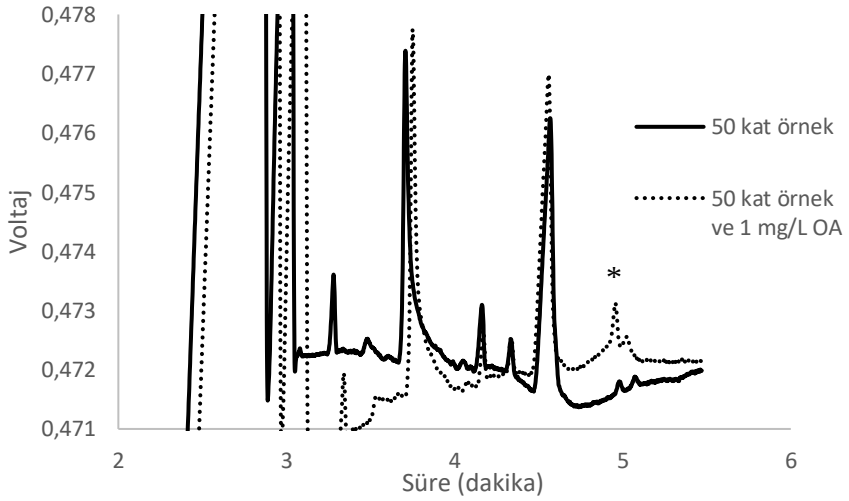
Çizelge 10.3: 1 mg/L Orotik asidin gün içi ve günler arası zaman ve düzeltilmiş pik alanına bağlı %RSD değerleri.

	Gün İçi		Günler Arası	
	Zaman	Düzeltilmiş Pik Alanına Bağlı	Zaman	Düzeltilmiş Pik Alanına Bağlı
%RSD (suda)	0,63	2,39	5,67	2,92
%RSD (örnek)	0,98	3,42	2,58	5,14

10.7 Metodun Örneğe Uygulanması

10 kişiden alınan idrar örneklerinin çözeltileri hazırlanıp orotik asit tayini için analiz edilmiştir. 10 numaralı idrar örneği analizine ait elektroferogramlar Şekil 10.5'de gösterilmiştir.

1:50 seyreltme oranının optimize edilen metot için uygunluğu Şekil 10.3'de görülmektedir. Orotik asit pikinin yerini belirlemek amacıyla aynı idrar örneğine OA standardı ilave edilerek Şekil 10.3'daki elektroferogram elde edildi.



Şekil 10.3: 1:50 oranında seyreltilmiş idrar örneği ve orotik asit standardı eklendikten sonra örneğin elektroferogramları. *: OA. Metot: Plug 9:1 (H_2O:ACN), plug enjeksiyonu: 60 mbar/10 sn. Örnek enjeksiyonu: -8kV/20 sn, -28 kV

10.8 Geri Kazanım Değerleri

Kimyasal ölçümlerde gerçek değerin hatasıza yakın olarak belirlenmesi uygulanan analiz metoduna bağlı olarak değişim gösterir. Deneysel işlemler ve analiz esnasında

çeşitli hatalar meydana gelebilir. Aletsel yada manuel olarak çeşitli nedenlerle oluşan hatalar bir kayıp oluşturur. Bu kayıp miktarının oranını ve belirsizliğini geri kazanım analizleri sayesinde hesaplanmaktadır. Metodun valide edilmesi amacıyla, geri kazanım çalışması yapılmıştır. Geri kazanım hesaplamaları için 10 numaralı idrar örneği kullanılmıştır. Bu çalışmalarda örnek üzerine 3 farklı konsantrasyonda standart ilave edilmiş ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Çizelge 10.4'te orotik asidin geri kazanım değerleri verilmiştir.

Çizelge 10.4. % Geri kazanım değerleri.

Ekleme Oranı	Eklenen Miktar(mg/L)	Örnekteki Miktar(mg/L)	Hesaplanan Miktar(mg/L)	%Geri Kazanım
%50	0,175	0,35	0,50	95,24 (±0,01)
%100	0,35	0,35	0,73	103,72 (±0,01)
%200	0,7	0,35	1,03	97,98 (±0,02)

*Standart sapma değerleri parantez içerisinde (±SS) verilmiştir. n=2

Konsantrasyon olarak %50, 100 ve 200 oranında standartlar eklenerek geri kazanım çalışması gerçekleştirilmiştir. %Geri kazanım değerleri uygun olarak elde edilmiştir.

11. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bazı kalıtımsal hastalıkların teşhisi için, insan idrarında yapılan analizlerde orotik asit tayini büyük bir önem taşımaktadır. Kalıtsal hastalıkların yanı sıra kanserojen yapıların başta karaciğer olmak üzere çeşitli organlarda ilerlemesi ile idrardaki orotik asit miktarının bağlantısı bulunmaktadır. Bu sebeple birçok hastalığın erken teşhisi için idrarda orotik asit analizinin doğru ve güvenilir olması önemlidir.

Bu çalışmada, idrarda orotik asit miktarının tayini için kapiler elektroforez tekniği ile hızlı, basit ve güvenilir bir yöntem geliştirilmiştir. Literatürdeki benzer kromatografik yöntemlerle karşılaştırıldığında geliştirilen bu yöntem ile orotik asit başarılı bir şekilde tayin edilmiştir.

Metodun şartları rezolüsyonu yüksek ve en kısa sürede cevap veren analiz gerçekleştirilene kadar geliştirilmiştir. Uygulanan örnek sıkıştırma tekniği ile literatürde bulunan en düşük LOD değerine (0,265 mg/L ITP-CZE) göre yöntemin LOD değeri yaklaşık 20 kat azaltılmıştır. Geliştirilen yöntem ile idrarda orotik asidin kantitatif analizleri yapılmıştır. Yöntem sonucunda analizi gerçekleştirilen idrar örneklerinden elde edilen sonuçlar Çizelge 11.1'de verilmiştir.

Çizelge 11.1: İdrar örneklerinde orotik asit miktarları.

Örnek	Orotik Asit Miktarı (mg/L)
1	0,13 ±0,03
2	0,59 ±0,05
3	0,30 ±0,02
4	0,11 ±0,02
5	0,38 ±0,03
6	0,48 ±0,04
7	0,41 ±0,04
8	0,89 ±0,01
9	0,12 ±0,03
10	0,35 ±0,01

Yöntemin optimizasyonu ve validasyonu sonucu çeşitli idrar örneklerinde orotik asidin kantitatif ve kalitatif olarak belirlenebileceği kanıtlanmıştır. Doğrusal kalibrasyon grafiği, belirlenen LOD, LOQ ve tekrarlanabilirlik değerlerine dayanarak yöntemin, idrarda orotik asit miktarının analizlerini gerçekleştirecek düzeyde olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak, kapiler elektroforez, idrar numunelerinde orotik asit tayini için hızlı, kolay, ucuz, basit ve gıda analizleri için uygun bir teknik olarak önerilir.

KAYNAKLAR

[1] **Aşicioğlu F., Koluaçik S., Çetinkaya Ü., Akyüz F. (2002).** Elektroforez Teknolojisinin Klinik ve Adli Amaçlı DNA Analizlerinde Kullanımı: Geleneksel jel elektroforez yöntemi ile karşılaştırma. *Adli Tıp Dergisi, **16** (2-4),* 88-93

[2] **Marca, G., Casetta, B., ve Zammarchi, E.** (2003). Rapid determination of orotic acid in urine by fast liquid chromatography/tandem mass spectrometric method. *Rapid Commun. Mass Spectrom., **17**,* 788-793.

[3] **Tokat Ç** (2011). *Kapiler Elektroforezin İlaç Analizlerine Uygulanması*. Bitirme Tezi. Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Kayseri, Türkiye.

[4] **Uzaşçı, S.,** (2011). *Misel Elektrokinetik Kromatografi – Lıf Yöntemiyle Şarap ve Nar Ekşisi Örneklerinde Biyojenik Amin Tayini*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

[5] **Acıbadem Mehmet Aydınlar Üniversitesi Medikal Biyoteknoloji Bölümü.** (2019). *Elektroforezin Temelleri ve Türevleri*. [PowerPoint slides]. Retrieved from https://www.researchgate.net/

[6] **Baker DR** (2007). *Capillary Electrophoresis. New York: John Wiley & Sons, Inc.Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR*. Principles of Instrumental Analysis (6th ed.). Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole Publishing.

[7] **Harris, Daniel C.** *Quantitative Chemical Analysis,* Sixth Edition. W. H. Freeman and Co., New York, 2002.

[8] **Gong X.** (2008). *Applications of Capillary Electrophoresis with Contactless Conductivity Detector.* Doktora Tezi, Basel Üniversitesi Beşeri Bilimler Fakültesi, Basel, İsviçre.

[9] **McCord BR, Buel E** (2013). *"Capillary Electrophoresis in Forensic Genetics". Encyclopedia of Forensic Sciences*. Waltham: Academic Press. pp. 394–401.

[10] **van Oorschot RA, Ballantyne KN.** (2013). "*Capillary electrophoresis in forensic biology*". Encyclopedia of Forensic Sciences. Waltham: Academic Press. pp. 560–566.

[11] **Shallan A, Guijt R, Breadmore M** (2013). "*Capillary Electrophoresis Basic Principles*". In Siegel JA, Saukko PJ, Houck MM (eds.). Encyclopedia of Forensic Sciences. Waltham: Academic Press. pp. 549–559

[12] **Chu YH, Avila LZ, Gao J, Whitesides GM** (November 1995). "*Affinity Capillary Electrophoresis*". Accounts of Chemical Research. ***28 (11)***: 461–468.

[13] **Urbanek, M., Krivankova, L., Bocek, P.,** 2003. *Stacking phenomena in electromigration: from basic principles to practical procedures, Electrophoresis, **24**,* 466–485.

[14] **Colin F. Poole,** Capillary-Electromigration Separation Techniques, The Essence of Chromatography, 2003.

[15] **Aydın, H.,** (2007). *Unlarda Katkı Maddesi Bromatın Kapiler Elektroforez Yöntemi İle Tayini*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

[16] **Cansever, M. Şerif**, (2011). *Metabolik Hastalıkların Teşhisinde Kapiler Elektroforez*. Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

[17] **Alkan, M., Karadaş, M., Doğan, M., Demirbaş, Ö.** (2005). Zeta Potantials of Perlite Samples In Various Electrolyte and Surfactant Media. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, **259***, 155–166.

[18] **Uzaşçı, S.,** (2011). *Misel Elektrokinetik Kromatografi – Lıf Yöntemiyle Şarap ve Nar Ekşisi Örneklerinde Biyojenik Amin Tayini.* Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

[19] **Camilleri, P.,** (2009). Capillary Electrophoresis: Theory and Practice; CRC Press: Boca Raton.

[20] **Gürsoy E.** (2007). Kapiler Elektroforez ve Potansiyometrik Belirleme, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.

[21] **Poppe H.,** (1997). Some reflection on speed and efficiency of modern chromatographic methods. *J Chromatogr A; **778***: 3-21

[22] **Kızıkgonca, E.** (2013). Kapiler elektroforez-örnek sıkıştırma yöntemi ile melatoninin (uyku hormonu) takviye tabletlerinde ve gıda örneklerinde tayini. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

[23] **Heiger, D., (**2000). High Performance Capillary Electrophoresis- An Introduction, Agilent Technologis, Germany.

[24] **Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A.**, (1998). Principles of Instrumental Analysis, Saunders College Publis.

[25] **Lichtenberg, J., de Rooij, N., & Verpoorte, E.** (2002). A Microchip Electrophoresis System with Integrated In-Plane Electrodes for Contactless Conductivity Detection. *Electrophoresis, **23,*** 3769-3780.

[26] **Zemann, A.,** (1998). Contactless Conductivity Detection for Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry, **70***, 563-567.

[27] **Adımcılar, V.,** (2016). *Biyojenik Aminlerin Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Temassız İletkenlik Dedektör Kullanılarak Ayrılması ve Fermente Gıdalarda Tayini.* Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

[28] **Zemann, A.,** (2003). Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection in Capillary Electrophoresis. *Electrophoresis, **24***, 2125–2137.

[29] **Knitzel, H. W., Hinkel, G. K., Schwarze, R.** (1971). The Decrease In The Bilirubin Level In Premature Infants By Orotic Acid. *Acta Pediat Scand* ***60,*** 1-5.

[30] **Aroon, T., Anderson, I., Shein, S., Bedoyan, J.** (2014). A Novel Description of Increased Urinary Orotic Acid Excretion in Pediatric Trauma, *Journal of Endocrinology & Metabolism*, ***4*** *(1-2),* 32-35.

[31] **Navder, Khursheed P., Eryer, E. Beth, Fryer, Holly C.** (1990). J. Nutr. Biochem, 1.

[32] **Kara, A.** (2012). *Pediatrik Metabolizma Hastalıkları ve Beslenme Polikliniğinde Tanı Alan veya Takibe Giren Kalıtsal Metabolik Hastalığı Olan Hastaların Tanılarının, Klinik Ve Laboratuar Bulgularının Analizi İle Takip Sonuçlarının Değerlendirilmesi.* Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana, Türkiye.

[33] **Leroux, G.** (2008). Inhereted Metabolic Disases. Georg F. Hoffmann, Johannes Zschocke, William L. Nyhan(Eds). Retrieved from https://books.google.com.tr/books (Original work published 2010)

[34] **Baykal, T., Hüner, G., Şarbat, G., Demirkol, M.** (1998). Doğumsal Metabolik Hastalıkların Tanısında İdrarda Organik Asit Analizi. *İstanbul Tıp Fakültesi Mecmuası*, ***61 (4),*** 438-442.

[35] **Brosnan, M. E., Brosnan, J. T.,** (2007). Orotik Asit Excretion and Arginine Metabolism. *The Journal of Nutrition*, ***137***, 1656-1661.

[36] **Bak, M., Ural, R., Ağın, H.** (2004). Pediatrik Ürolitiazisde Metabolik Nedenler. *T. Klin. Pediatri*, ***13***, 104-113.

[37] **Putnam, D. F.,** (1971). Composition and Concentrative Properties of Human Urine. (Rapor No. NASA CR-1902). Washington D.C.: NASA Conractor Report.

[38] **Abirami, K., Tiwari, S. C.,** (2001). Urinalysis in Clinical Practice. *Indian Academy of Clinical Medicine, **2***, 39-50.

[39] **Lifshitz, E., Kramer, L.** (2000). Outpatient Urine Culture. *Arch Intern Med, **160***, 2537-2540.

[40] **Bularelli, F., Cartoni, G., Cocciolli, F., Jasionowska, R.** (2003). Capillary Zone Electrophoresis of Some Organic Acids In Milk Whey. *Journal Of Seperation Science*, ***26***, 425-428.

[41] **Ševčík, J., Adam, T., Sàzel, V.** (1997). A Rapid and Simple Screening Method for Detection of Orotik Aciduria By Capillary Zone Electrophoresis. *Clinica Chimica Acta*, ***259***, 73-81.

[42] **Friedecký, D., Adam, T., Bartàk, P.** (2002). Capillary Electrophoresis for Detection of Inherited Disorders of Purine and Pyrimidine Metabolism: A Selective Approach. *Electrophoresis*, ***23***, 505-571.

[43] **Prochàzkovà, A., Křivànkovà, L., Boček, P.** (1999). Analysis of Orotic Acid In Human Urine By On-line Combination of Capillary Isotachophoresis and Zone Electrophoresis. *Journal of Chromatography*, ***838***, 213-221.

[44] **Salerno, C., D'Eufemia, P., Celli, M., Finocchiaro, R., Crifò, C., Giardini, O.** (1999). Determination of Urinary Orotic Acid and Uracil By Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Chromatography, **734***, 175-178.

[45] **Hancu, G., Rusu, A., Simon, B., Boia, G., Gyéresi, A.** (2012). Simultaneous Separation of Ciprofloxacin, Norfloxacin and Ofloxacin By Micellar Electrokinetic Chromatography. *Journal of Brazillian Chemical Society, **23 (10)***, 1889-1894.

[46] **Quirino, J., Terabe, S.** (2000). Sample stacking of cationic and anionic analytes in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A, **902 (1)***, 119-135.

[47] **Heigher, D.N.,** (1992). High Performance Capillary Electrophoresis, *Hewlet Packard GmbH,* Germany.

[48] **Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi.** (n.d.). *Kapiler Elektroforez* [PowerPoint slides]. Retrieved from http://yunus.hacettepe.edu.tr/~enemutlu/belgeler/CE_seminer

[49] **Opekar, F., Tuma, P., Stulik, K.** (2013). Contactless Impedance Sensors and Their Application to Flow Measurements, *Sensors, **13(3),*** 2786-2801.

[50] **Zeydanlı, D.** (2013). *İyon Kromatografi Kondüktivite Dedektörü ile Orotik Asidürili Hasta İdrarında Orotik Asit Tayini.* Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

[51] **Url**-.. <*https://commons.wikimedia.org*>, erişim tarihi 13.06.2020.

[52] **Url**-.. <*https://senthilarivan.wordpress.com*>, erişim tarihi 13.06.2020.

[53] **Url**-.. < *https://en.wikipedia.org* >, erişim tarihi 13.06.2020.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad **: Merve Taşer**

Doğum Tarihi ve Yeri **: 29.03.1994 Kilis**

E-posta **:** merve.taser1@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** **:** 2018, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- Betek Boya ve Kimya Sanayi, İstanbul / Ar-Ge Stajı
- Arçelik A.Ş., İstanbul / Proje Stajı
- Şişecam Anadolu Cam Sanayi, Mersin / Gönüllü Üretim Stajı
- Birgi Mefar Grup, İstanbul / Kalite Güvence Uzman Yardımcısı