İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

UNLARDA KATKI MADDESİ BROMATIN KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hilal Müjde AYDIN

Anabilim Dalı : KİMYA

Programı : KİMYAGERLİK

EKİM 2007

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

UNLARDA KATKI MADDESİ BROMATIN KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hilal Müjde AYDIN
(509041213)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 12 Eylül 2007
Tezin Savunulduğu Tarih : 4 Ekim 2007

Tez Danışmanı : **Prof.Dr. F. Bedia ERİM BERKER**

Diğer Jüri Üyeleri **Prof.Dr. Artemis KARAALİ**

Prof.Dr. Güleren DÖNER

EKİM 2007

ÖNSÖZ

Çalışmalarım boyunca akademik anlamda her türlü desteklerini benden esirgemeyen çok değerli hocalarım Prof. Dr. Bedia Erim Berker' e ve Doç. Dr. Nevin Öztekin' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yaşantım boyunca maddi ve manevi anlamda her zaman desteklerini ve sevgilerini gördüğüm, beni ben yapan; değerli aileme, halama, Evrim ablama, Beyhan yengeme ve özellikle dünya güzeli babaanneme çok teşekkür ederim.

Hayat arkadaşım, destekleriyle her anlamda yanımda olan bir tanecik eşim Mehmet Ali Ecer' e çok teşekkür ederim.

Eylül, 2007 Hilal Müjde AYDIN

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR v
TABLO LİSTESİ vi
ŞEKİL LİSTESİ vii
SEMBOL LİSTESİ viii
ÖZET ix
SUMMARY x

1. GİRİŞ 1

2. KAPİLER ELEKTROFOREZ 3
2.1. Elektroforetik Mobilite 4
2.2. Joule Isısı 5
2.3. Elektroosmotik Akış (EOA) 6
2.3.1. İnorganik Anyonların Analizi için EOA' ın Kontrolü 8
2.4. Ayırım Etkinliği ve Resolüsyon 10
2.5. Kapiler Elektroforez Cihazının Temel Bölümleri 12
2.5.1. Kapiler 12
2.5.2. Voltaj Kaynağı 13
2.5.3. Elektrotlar 13
2.5.4. Enjeksiyon 13
2.5.4.1. Hidrodinamik İnjeksiyon 13
2.5.4.2. Elektrokinetik İnjeksiyon 14
2.5.5. Dedektör 14
2.6. Kapiler Elektroforez Türleri 15
2.7. CZE' de Örnek Derişikleştirme Yöntemi 15

3. BROMAT 17
3.1. İçme Sularında Bromat Oluşumu 17
3.2. Un İşleme Ajanı Olarak Bromat 19

4. DENEYSEL BÖLÜM 21
4.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler 21
4.2. Kimyasal Maddeler 21
4.3. Elektroforetik Koşullar 21
4.4. Un Örneklerinin Hazırlanması 22

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 23
5.1. Çalışmaya Ait Ön Denemeler 23
5.2. Kalibrasyon Grafikleri 25
5.3. Pik Alanı ve Pik Geliş Süresi Tekrarlanabilirlik Değerleri 27
5.4. Geri Kazanım Değerleri 27
5.5. Tayin Sınırı (LOD) 28
5.6. Örnek Sıkıştırma Yöntemiyle Bromat Tayin Sınırının Düşürülmesi 28

5.6.1. Kalibrasyon Grafikleri 30
5.6.2. Pik Alanı ve Pik Geliş Süresi Tekrarlanabilirlik Değerleri 31
5.6.3. Geri Kazanım Değerleri 32
5.6.4. Tayin Sınırı (LOD) 32

6. SONUÇ 33

KAYNAKLAR **34**

ÖZGEÇMİŞ **38**

KISALTMALAR

CE : Kapiler Elektroforez
UV : Ultraviolet
ABD : Amerika Birleşik Devletleri
FDA : Food and Drug Administration
IARC : International Agency for Research on Cancer
IC : Ion Chromatography
FIA : Flow Injection Analysis
EOA : Elektroosmotik Akış
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
CZE : Kapiler Zone Elektroforez
PEI : Polyethylene Imine
CMC : Critical Micelle Concentration
YAM : Yüzey Aktif Madde
CGE : Capillary Gel Electrophoresis
MEKC : Micellar Electrokinetic Chromatography
CITF : Capillary Isotachophoresis
ITP : Capillary Izoelectric Focusing
LIF : Laser-Induced Fluorescence
WHO : World Health Organization
ACN : Asetonitril
CTAB : Cetyl Trimethylammonium Bromide
RSD : Relative Standart Deviation
LOD : Limit of Detection

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1 **:** Analitlerin göç sırası ……. 11
Tablo 2.2 **:** Kapiler elektroforez dedektör türleri ve tayin sınırları ……. 14
Tablo 2.3 **:** Kapiler elektroforez türleri …… 15
Tablo 3.1 **:** İçme sularında bromat konsantrasyonuna karşı hayvan yaşam süresi riskleri ……. 18
Tablo 5.1 **:** Pik alanı ve pik geliş süresi tekrarlanabilirlik değerleri ……..... 27
Tablo 5.2 **:** Gün aşırı tekrarlanabilirlik değerleri ……. 27
Tablo 5.3 **:** Bromat geri kazanım değerleri ……..... 28
Tablo 5.4 **:** Örnek sıkıştırma tekniğinde tekrarlanırlık değerleri ……. 31
Tablo 5.5 **:** Örnek sıkıştırma tekniğinde geri kazanım değerleri ……. 32

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1 : CE'nin şematik gösterimi ……... 4
Şekil 2.2 : Kapiler duvarında silanol gruplarının ayrışması ……. 6
Şekil 2.3 : Kapiler içinde oluşan elektroosmotik akış …….. 7
Şekil 2.4 : CE ve HPLC de akış ve pik profilleri ……. 7
a) Elektroosmotik akış ……... 7
b) Basınçla olan laminer akış ……. 7
Şekil 2.5 : Elektroosmotik akış varlığında partiküllerin hızları ……... 8
Şekil 2.6 : A) Kapiler duvarında katyonik YAM adsorpsiyonu …….. 10
B) YAM çift tabakası …….. 10
Şekil 5.1 : 0.2 mM BrO3 içeren %75 ACN' lik un örneği elektroferogramı 24
Şekil 5.2 : 0.2 mM BrO3 içeren % 75 ACN'lik un örneği elektroferogramı 24
Şekil 5.3 : a) 0.2 mM BrO3 + 0.05 mM KSCN + %75 ACN içeren un örneği elektroferogramı ……. 25
b) 0.2 mM BrO3 + 0.05 mM KSCN + %75 ACN içeren standart bromat çözeltisi elektroferogramı …… 25
Şekil 5.4 : Sulu çözeltiler için bromat kalibrasyon eğrisi …… 26
Şekil 5.5 : %75 ACN içeren sulu çözeltiler için bromat kalibrasyon eğrisi …… 26
Şekil 5.6 : %75 ACN ve 0.05 mM SCN iyonu içeren sulu çözeltiler için bromat kalibrasyon eğrisi ……... 26
Şekil 5.7 : İki farklı örnek sıkıştırma yönteminin karşılaştırılması …….. 29
Şekil 5.8 : Bromat elektroferogramları …… 30
Şekil 5.9 : Standart ekleme yöntemi ile elde edilen kalibrasyon grafiği ….. 31

SEMBOL LİSTESİ

$\mathbf{v}$	**:** İyon göç hızı
μ_e	**:** Elektroforetik mobilite
$\mathbf{E}$	**:** Uygulanan elektriksel alan
$\mathbf{q}$	**:** İyon yükü
η	**:** Çözelti viskozitesi
$\mathbf{r}$	**:** İyon çapı
μ_i	**:** İyonik mobilite
μ_g	**:** Görünen mobilite
v_{EOA}	**:** Elektoroosmotik akış hızı
μ_{EOA}	**:** Elektroosmotik mobilite
$\mathbf{V}$	**:** Uygulanan voltaj
$\mathbf{L}$	**:** Kapilerin toplam uzunluğu
$\mathbf{l}$	**:** Kapilerin etkin uzunluğu
$\mathbf{D}$	**:** Analitin difüzyon katsayısı
$\mathbf{t}$	**:** Analitin göç zamanı
$\mathbf{N}$	**:** Teorik plaka sayısı
$\Delta \mu_e$	**:** İki tür arasındaki mobilite farkı
R_s	**:** Elektroforetik resolüsyon
ΔP	**:** Kapiler boyunca basınç farkı
ρ	**:** Tamponun yoğunluğu
$\mathbf{g}$	**:** Yerçekimi ivme katsayısı
Δh	**:** Örnek ve tampon kabı arasındaki yükseklik farkı
R^2	**:** Regrasyon katsayısı

UNLARDA KATKI MADDESİ BROMATIN KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

ÖZET

Taze değirmen ununun ekmek yapma kalitesi iki ay içinde bozulmaya uğramaktadır. Un ilave maddeleri ile unların raf ömrü önemli ölçüde arttırılabilir. Bromat bu amaçla en çok kullanılan ilave maddesidir. ABD gibi bazı ülkelerde potasyum bromatın, un öğütülürken, ekmek hamuru yapılırken veya her iki durumda una, bromat miktarının sıkı bir şekilde kontrolü ile katılmasına izin verilir. Bazı ülkelerde bromatın kullanımı tümüyle yasaklanmıştır. Her iki halde de bromat varlığını saptamak veya miktarını belirlemek amacıyla hızlı, basit ve güvenilir izleme yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Son yıllarda kapiler elektroforezin (CE) inorganik iyonların analizlerine uygulandığı görülmektedir. Etkin bir analitik yöntem olan kapiler elektroforez son yıllarda hızla gelişmektedir. CE'nin avantajları; yüksek ayırma etkinliği, yüksek ayırımcılık, kısa analiz süreleri, az miktardaki örnek ve çözücü tüketimidir. Silika kapilerler kromatografik kolonlara göre çok ucuzdur, çalışma arasında kolayca yıkanır ve dolgu kolonlarda görünen matris kirlenmesi problemi yoktur.

Bu çalışmada, un örneklerinde bromat tayini için basit, hızlı ve güvenilir bir kapiler elektroforez analiz yöntemi geliştirilmiştir. CE yöntemiyle un örnekleri içinde ayrımı gerçekleştirilen bromat iyonu, 200 nm de doğrudan UV dedeksiyon ile kantitatif olarak tayin edilmiştir. Sinyal/Gürültü oranı 3 olarak alınarak, bromat iyonunun tayin sınırı 1.79 μg/ml olarak bulunmuştur. Çalışmada kullanılan un ekstraksiyon yöntemi ardından geliştirilen analiz yöntemi uygulandığında 21.4 mg bromat/kg un içinde tayin edilebilir. Böylece geliştirilen analiz yöntemiyle un içine ilavesi kabul gören miktar olan 70 ppm lik sınırın aşılması tespit edilebilir.

Yöntemin tayin sınırının düşürülmesi amacıyla uygulanan örnek sıkıştırma tekniği ile, tayin sınırı 164 kat arttırılarak 10.9 ng/mL ye indirilmiştir. Örnek sıkıştırması tekniği ile 1 kg un içinde 2.18 mg (2.18 ppm) bromatın tayin edilmesi mümkün olabilir. Normal CE yöntemiyle, bromat iyonu için, zaman ve pik alanı tekrarlanırlılığı iç standart yöntemiyle unlu örnekler için sırasıyla %0.732 ile %4.28 iken, örnek sıkıştırması yöntemiyle geliş süresi ve pik alanı olarak tekrarlanırlık unlu örnekler için sırasıyla %0.814 ile %7.43 olarak tespit edilmiştir. Analiz yöntemi ticari unlara eklenen bromat tayininde uygulanmıştır.

DETERMINATION OF BROMATE AS ADDITIVE IN FLOURS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

SUMMARY

The bread making quality of freshly milled flour tends to deteriorate only after 2 months. The use of flour additives increases the shelf life of flour considerably. Bromate is relied upon as one of the most used flour improvers. In some countries, including USA, addition of bromate is allowed to the flour at the mill or to the dough at bakery or both provided that the total bromate content in these foods is tightly controlled. In some countries, its use is prohibited. In both case, there is urgent need for a fast, robust, and simple monitoring system to detect bromate or to determine bromate content in flour samples.

More recently, capillary eletrophoresis (CE) has been employed for the analysis of inorganic ions. Capillary electrophoresis (CE) as a highly effective analytical technique that has developed rapidly over the recent decade. It posseses the advantages of high separation efficiency, excellent resolution, and short analysis time. It consumes low solvent and sample. Fused silica capillaries are less expensive than chromatographic columns, easily washed between runs, and free of irreversible contamination of the matrix, unlike the packed column.

In the present study, we developed a simple, fast, and reliable capillary electrophoretic anaytical method for the determination of bromate in flour samples. The determination of the bromate ion in flour samples with CE was performed by direct UV detection at 200 nm as a quantitative method. The detection limit (signal/noise:3) was 1.79 μg/ml for bromate. Bromate was determinated as 21.4 mg/kg in flour after the flour extraction procedure of the study, demonstrating the development of the analytical method. Thus, it was confirmed to obey the acceptance limit of 70 ppm as an additive in flour.

The detection limit was decreased to 10.9 ng/mL with a 164-fold improvement due to the method of sample stacking. It was possible to have a determination of bromate of 2.18 mg/kg (2.18 ppm) with the sample stacking method. While the migration time and peak area repeatability are respectively % 0.732 and % 4.28 for bromate ion in flour samples with the normal injection of the CE method, the migration time and peak area repeatability are respectively % 0.814 and % 7.43 with the sample stacking method. This analysis method was applied to the determination of bromate that is added to commercial flours.

1. GİRİŞ

Kapiler Elektroforez (CE), ayrımın; elektrolit çözeltisiyle doldurulmuş dar bir kapiler kolonda ve elektrotlara uygulanan yüksek voltajla gerçekleştiği bir ayırma tekniği olarak 1980' lerin sonlarına doğru geliştirilerek, analitik bir yöntem olarak sıkça kullanılmaya başlanmıştır.

Çok az miktarda madde tüketimi, elektroosmotik akışın düz profilli olması sebebiyle yüksek ayırım etkinliği, değişik türlerinin değişik ayırım mekanizmaları ve seçiciliği, dedeksiyonun ayırım esnasında gerçekleşmesi ve nicel analiz potansiyeli ile bu analitik yöntem inorganik anyon ve katyon, vitaminler, karbohidratlar, aminoasitler, ilaçlar, polinükleotidler gibi pek çok analitik ayırma yöntemi için kullanılmaktadır.

CE, iyon kromotografisine bir alternatif olarak son yıllarda inorganik iyonların ayırımı için hızla gelişen bir analitik ayırım yöntemi haline gelmiştir. CE ile inorganik anyonların analizinde modifiye edici maddeler sayesinde benzer mobiliteye sahip türlerin ayrım seçimliliği kolaylıkla farklılaştırılabilmekte, UV aktif olmayan inorganik anyonlar için indirekt analiz yöntemleri kullanılmakta ve EOA'ın hızı ve yöntemi kontrol edilebilmektedir.

İçme sularının dezenfeksiyonu için kullanılan ozonlama tekniği neticesinde yan ürün olarak bromat oluşmaktadır. Ekmek yapımında hamur geliştirme ajanı olarak kullanılan potasyum bromatın ABD Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) tarafından belirlenen kullanılabilecek maksimum miktarının 75 ppm olması gerekmektedir. Bromat Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu (IARC) tarafından insanlarda muhtemelen kansere neden olan madde olarak sınıflandırılmıştır. Bu nedenle içme sularında ve unlarda bromat analizi için hızlı, ekonomik ve güvenilir analitik yöntemlerin geliştirilmesi önemlidir.

Bromat analizi için iyon kromatografisi (IC), spektrofotometrik, spektrofluometrik, akışa injeksiyon analizi (FIA) metotları gibi pek çok analitik metot geliştirilmiştir [1-18]. Bromat , direkt ve indirekt dedeksiyon yöntemiyle CE metoduyla da tayin

edilmiştir [19,20]. Kapiler elektroforez esnasında örnek sıkıştırma yöntemleri ile tayin sınırını düşürme çalışmaları yapılmıştır [21,22].

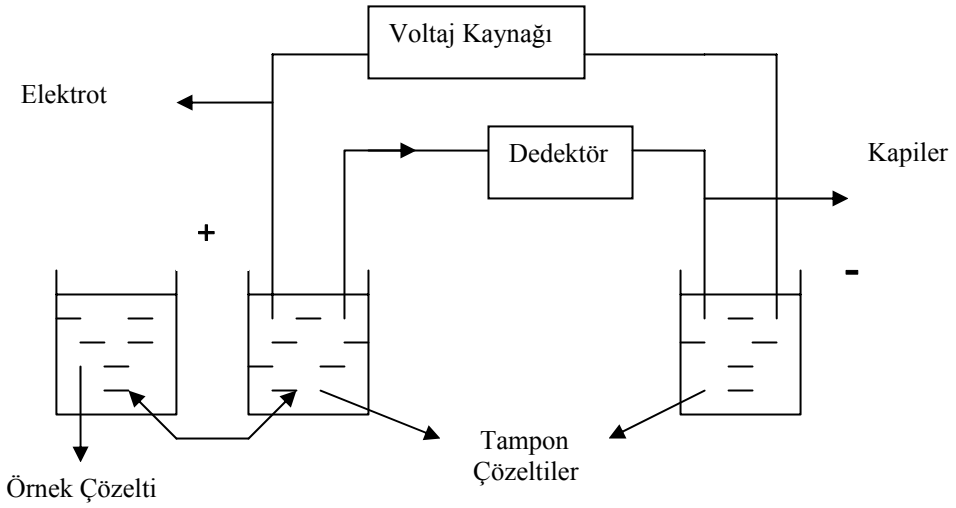
Bugüne kadar literatürde rastlanan CE yöntemiyle bromat tayini, içme sularında bromat analizlerini hedeflemiştir. Literatürde CE yöntemiyle unlarda bromat tayinine rastlanmamıştır. Bu çalışmada, un örneklerinde bromat tayini için kapiler elektroforez yöntemi geliştirilmiş ve un örneklerinin hazırlanma koşulları, ayırma voltajı, ayırma tampon elektrolitinin derişimi, pH'ı, kapiler yükü gibi parametreler optimize edilerek, un solüsyonu içinde bromat iyonu için en uygun ayırma ve tayin şartı tespit edilmiştir. Daha sonra saptanan ayırma şartlarında, tayin sınırını düşürmek amacıyla örnek zenginleştirme deneyleri yapılmış ve optimal zenginleştirme şartları tespit edilmiştir.

2. KAPİLER ELEKTROFEZ

Elektrofez, bir elektrik alan altındaki tampon çözeltide yüklü partiküllerin belirli bir pH' da diferansiyel göç hızlarına dayanan ayırma yöntemidir. İsveçli kimyacı Arne Tiselius tarafından serum proteinleri üzerinde çalışırken ilk olarak bulunmuş olup proteinler, nükleik asitler, amino asitler ve karbohidratlar gibi birçok zor analitik ayırma problemlerine uygulanmaktadır [23,24].

Günümüzde elektroforez ya jel tabakasında ya da dar bir kolon şeklinde olan kapilerde gerçekleşmektedir. Tabaka (slab) elektroforez biyokimya laboratuarlarında günümüzde ve geçmişte çok kullanılmış olmasına karşın; işçiliği fazla, otomasyonu zor, ayrımı yavaş ve çok kesin kantitatif bilgi vermemektedir. Kapiler elektroforez ise 1980' lerden itibaren akademik alanda ve endüstride hızla gelişen bir teknik olarak oldukça hızlı, 0.1 ile 10 nL gibi çok küçük hacimlerdeki numunelerle sağlanan yüksek ayırma gücüne sahip bir yöntemdir. Farklı tiplerinin farklı ayırım mekanizmaları ile seçicilik göstermeleri, kantitatif analizde aynı anda dedeksiyon potansiyeli, hızla önemli bir ayırım tekniği haline gelmesine neden olmaktadır [23-25].

Kapiler elektrofezde ayırımı sağlayan bölge elektrolit çözeltisiyle doldurulmuş dar bir kapiler kolondur. Kapilerlerin yüksek elektrik direnci, düşük ısı üretimi ile çok yüksek elektrik alanların (100'den 500 V/cm' ye kadar) uygulanmalarına olanak sağlar. Aynı zamanda, kapilerin geniş yüzey alanı hacim oranı, üretilen ısıyı yeterince dağıtır. Yüksek elektrik alan uygulanabilmesi; kısa analiz süreleri, yüksek etkinlik (10^5 tabaka sayısına ulaşan) ve ayrımcılık sağlar. Kapilerin iki ucu iki farklı çözelti kabına batırılır ve bu iki kapta bulunan elektrotlara uygulanan yüksek voltajın etkisi ile kapilerin bir ucundan injekte edilen örnek diğer ucuna doğru göç eder ve dedeksiyon bu uçta gerçekleşir. Sistemin basit bir şeması Şekil 2.1' de verilmektedir [25,26].



Şekil 2.1: CE'nin şematik gösterimi [26]

2.1. Elektroforetik Mobilite

Elektroforez yönteminde ayırım, bir elektrik alanda analitlerin farklı hızlardaki göçüne dayanmaktadır. Yüklü bir parçacığın elektriksel alandaki hızı aşağıdaki formül ile ifade edilir.

$$v = \mu_e . E \tag{2.1}$$

Burada; v iyon göç hızı, μ_e elektroforetik mobilite, E ise uygulanan elektriksel alandır.

Taneciğin mobilitesi ortamdaki elektrik kuvvetinden ve sürtünme kuvvetinden etkilenir.

$$\mu_e \, \alpha \, \frac{\text{Elektrik Kuvveti } (F_E)}{\text{Sürtünme Kuvveti } (F_F)} \tag{2.2}$$

Yüklü partikül üzerine etkili olan elektrik kuvvet partikülün yükü ve uygulanan elektrik alan ile doğru orantılıdır. Bu elektrik kuvvet eşitlik (2.3)' deki gibi ifade edilir.

$$F_E = q . E \tag{2.3}$$

Küresel bir partikül için sürtünme kuvveti Stokes eşitliği ile verilir.

$$F_F = -6.\pi.\eta.r.v \tag{2.4}$$

Burada, q iyon yükü, ŋ çözelti viskozitesi, r iyon çapı, v iyon hızını ifade eder.

Sabit elektrik alan uygulandığında sürtünme ve elektrik kuvveti eşitlik (2.5)' deki gibi dengeye ulaşır. Böylece iyonik partiküller sabit hızla hareket ederler.

$$F_E = F_F \tag{2.5}$$

$$v = \frac{q.E}{6.\pi.\eta.r} \tag{2.6}$$

(2.1) ve (2.6) eşitliklerinden hareketle μ_e eşitlik (2.7)' deki gibi ifade edilir.

$$\mu_e = \frac{v}{E} = \frac{q}{6.\pi.\eta.r} \tag{2.7}$$

Ayırmada viskozite sabit olduğundan elektroforetik mobilite (μ_e), taneciğin yük ve büyüklük oranına (q/r) bağlı olacaktır. Analitler bu orana bağlı olarak elektrik alanda farklı hıza sahip olurlar. Küçük ve çok yüklü türler yüksek mobiliteye sahipken, büyük ve az yüklü türler düşük mobiliteye sahiptir. Tamponun pH' sının değişmesi analitlerin yükünü değiştirir ve böylece analitlerin elektroforetik mobiliteleri de değişir [24,27].

2.2. Joule Isısı

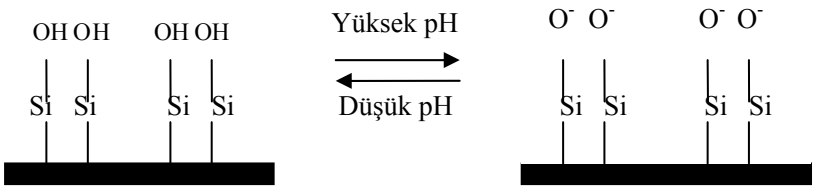
Ayırım için uygulanan voltajla birlikte elektrik akımı, elektrolitik tamponlara aktarılır. Bu ohmic bir ısıya başka bir deyişle joule ısısına neden olur. Bu ısı daha sonra duvarlara ve kapilerin yüzeyine dağılır. Oluşan bu joule ısısını normalize etmek gerekir. Bu amaçla iki yaklaşım uygulanabilir: (1) Daha düşük elektrik alan uygulanması ayırma tamponlarının iletkenliğini azalttığı için joule ısısı da azalacaktır. Bununla birlikte düşük ayırma voltajı ayırma zamanını arttırdığı gibi daha zayıf ayırma etkinliğine de neden olur. (2) Daha genel bir yaklaşım olarak ise yüzey/hacim oranı yüksek olan kapilerler kullanmakla ısısının yayılımı geliştirilebilir. Elektriksel direnç dar kapilerde daha yüksek olduğundan ohm yasası

gereği kapilere ulaşan voltaj da daha düşük olacak ve bu da joule ısısının daha az olmasına neden olacaktır [24].

2.3. Elektroosmotik Akış (EOA)

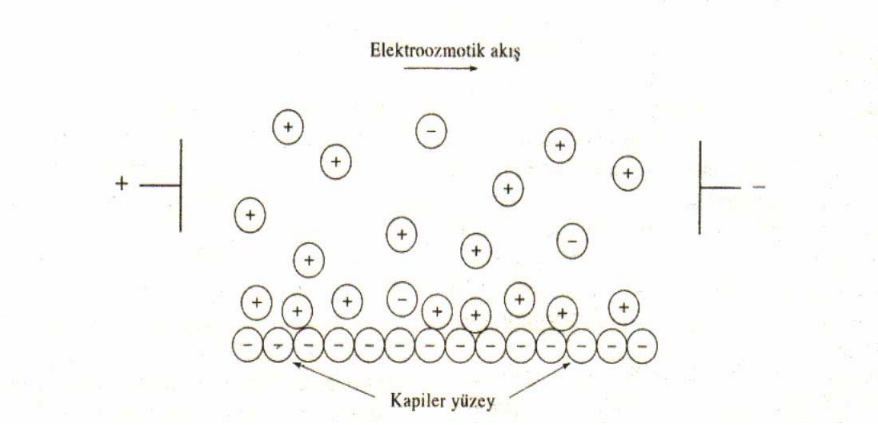
Tampon çözelti içeren bir kapiler kolona yüksek bir potansiyel uygulandığında genellikle bir elektoroosmotik akış oluşur. Elektoroosmotik akış hızına elektroosmoz veya elektroendoosmoz adı verilir. Bu akış sonucunda çözücü anoda veya katoda doğru göç eder. Bu göç hızı önemli boyutlardadır. Elektrolitlerin sulu çözeltileri kapiler kolonun duvarlarıyla etkileşim içindedir. Bu duvar ile çözelti arasında bir yük farkı bulunur. Bu yük farkının nedeni çözeltiden duvara yönelik olan bazı iyonların seçici adsorbsiyonu veya duvar materyalinin iyonlaşmasıdır [23,25].

Elektroosmotik akışın nedeni; silika çözelti ara yüzeyinde oluşan elektrik çift tabakasıdır. Şekil 2.2' de görüldüğü gibi silika kapilerin iç yüzeyi pH 3' ün üzerinde, yüzeydeki silanol grubunun (Si-OH) iyonlaşması sonucunda negatif yüklü hale gelir.

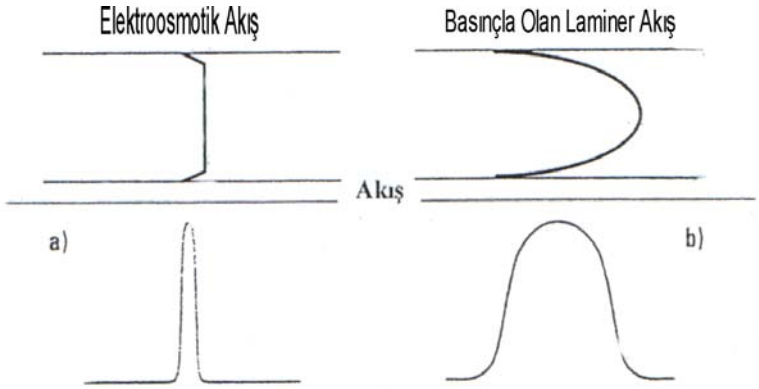


Şekil 2.2: Kapiler duvarında silanol gruplarının ayrışması [28]

Silika kapilerinin negatif yüzeyine yakın bölgede tampon katyonları birikir. Çift tabakanın difüze dış bölümündeki katyonlar katot tarafından çekilirler. Bu katyonlar solvatize oldukları için çözücüye de beraberinde sürüklerler. Böylece katoda doğru yüklü bir göç oluşur. Silika kapiler ara yüzeyinde yük dağılımı ve oluşan elektroosmotik akış Şekil 2.3' de verilmektedir. Elektroosmoz, kapiler içinde parabolik olmayan düz kesitli bir yığın çözelti akışına neden olur. Oysa, sıvı kromatografide basıncın etkisi altında oluşan akış parabolik kesitlidir (Şekil 2.4). Akış profilinin düz olmasından ötürü elektroosmotik akış, sıvı kromatografide olduğu gibi bant genişlemesine önemli bir derecede etki etmemektedir ve CE de bu nedenle dik ve dar pikler elde edilmektedir [23].



Şekil 2.3: Kapiler içinde oluşan elektroosmotik akış



Şekil 2.4: CE ve HPLC de akış ve pik profilleri
a) Elektroosmotik akış **b)** Basınçla olan laminer akış

Eşitlik (2.7) göz önüne alındığında elektroosmotik mobilite, μ_{EOA} eşitlik (2.8)' deki gibi tanımlanır.

$$\mu_{EOA} = \frac{v_{EOA}}{E} \tag{2.8}$$

Burada, v_{EOA} elektroosmotik akış hızını, μ_{EOA} elektroosmotik mobiliteyi, E ise elektriksel alan kuvvetini ifade etmektedir.

Çözeltinin elektroosmotik mobilitesi iyonik mobilitesinden genellikle daha büyüktür. Bu nedenle çözeltideki tüm tanecikler yüküne bakılmaksızın bu güçlü akış hızı eşliğinde katoda doğru göç ederler. Çözeltideki taneciklerin hareket hızları eşitlik (2.9), (2.10) ve (2.11)' deki gibidir.

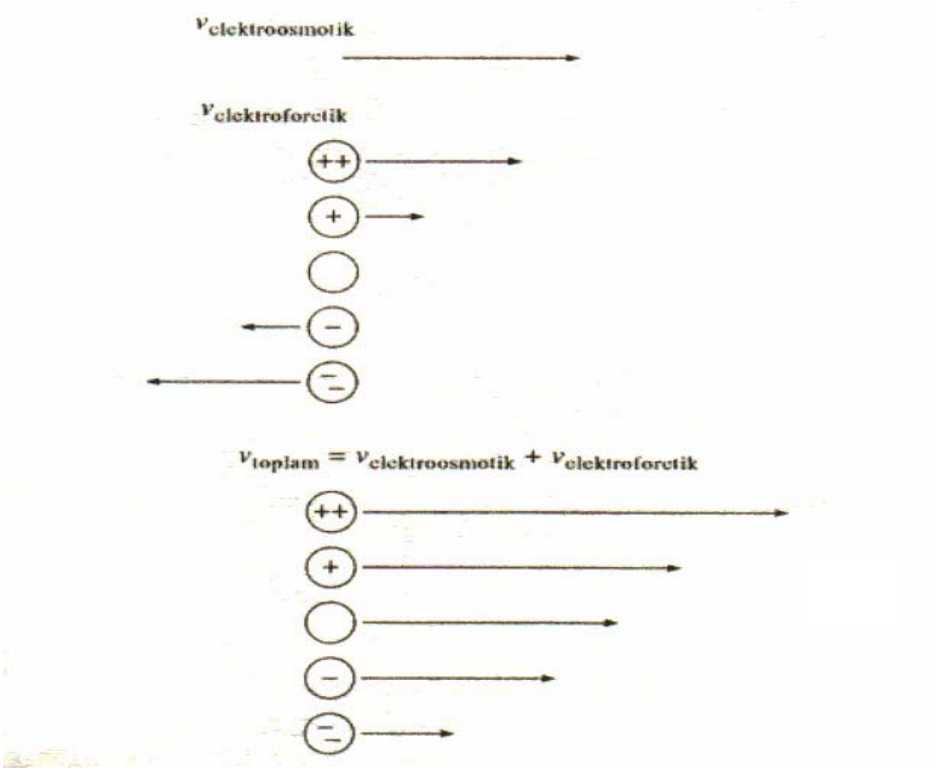
$v_i = (\mu_o + \mu_i).E$ (Pozitif iyonlar için) (2.9)

$v_i = (\mu_o - \mu_i).E$ (Negatif iyonlar için) (2.10)

$v_i = (\mu_o).E$ (Nötral partiküller için) (2.11)

Burada μ_i, iyonik mobiliteyi ifade etmektedir.

Elektroforetik ayırmada elektroosmoz nedeniyle kolondan ilk olarak hızlı katyonlar bunun ardından yavaş katyonlar, daha sonra nötral partiküller, ardından yavaş anyonlar ve son olarak hızlı anyonlar çıkarlar (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Elektroosmotik akış varlığında partiküllerin hızları [23]

Ancak inorganik anyonların ve küçük organik asitlerin mobiliteleri çok büyük olduğu için elektroosmotik akış bu türleri katoda yani detektör yönüne sürüklemeye yetmeyebilir. Bu durum ya çok uzun analiz süresine yada bu analitlerin detektöre ulaşamaması ile sonuçlanabilir.

2.3.1. İnorganik Anyonların Analizi için EOA' nın Kontrolü

CE'nin genel uygulamasında analitler pozitif elektrot yönünden injekte edilirler ve nötral, pozitif ve negatif yüklü tüm analitler kendi elektroforetik mobiliteleri ve

kapiler kolon içinde negatif elektrot yönünde oluşan güçlü elektroosmotik akışın mobilitesinin bir bileşkesi olan bir görünen mobilite ile negatif elektrot yani detektör yönüne hareket ederler. Bu genel duruma inorganik iyonlar bir istisnadır. Yüksek elektroforetik mobiliteleri nedeniyle negatif iyonlar, pozitif kutuptan injekte edildiklerinde negatif kutba yani dedektöre sürüklenemez ya da çok geç olarak ulaşırlar. O halde inorganik iyonların CZE ile göçü için kapiler içinde elektroosmotik mobilitenin bu iyonların göçüne imkan sağlayacak şekilde kontrolü gerekir. Bu, 4 farklı yolla gerçekleştirilebilir. 1) Ayırmanın düşük pH lı tampon ortamında gerçekleştirilmesi (pH≤ 3) 2) Kapiler duvarını nötral bir polimerle kaplamak 3) Kapiler duvarını pozitif yüklü bir polimerle kaplamak 4) Ayırma tamponuna kritik misel konsantrasyonunun altında bir derişimde yüzey aktif madde ilave ederek kapiler duvarını dinamik olarak kaplamak.

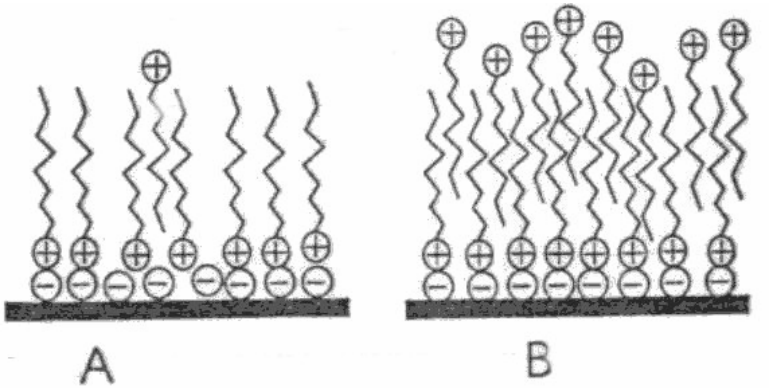
Birinci halde, yani ayırma düşük pH lı bir ortam içinde yapılırsa, silanol gruplarının ayrışması azalacağından duvar negatif yük yoğunluğu dolayısı ile kapiler içinde elektroosmotik mobilitenin değeri azalacaktır. Bu durumda, elektrot polaritesi değiştirilerek (negatif işaretli voltaj gösterimi ile verilen durum) injeksiyon negatif elektrot yönünden yapılırsa negatif yüklü inorganik anyon pozitif kutba yani detektöre (polarite değiştiği için detektör şimdi pozitif kutup yönünde) doğru kendi güçlü elektroforetik mobilitesi ile hareket edecektir. Bu arada kapiler içindeki pozitif kutuptan negatife doğru olan elektroosmotik akışın hızı çok azaldığından iyonun hareketine engel olamayacaktır.

İkinci halde, kapiler nötral bir polimerle kaplanırsa kapiler içindeki elektroosmotik akış sıfırlanacağından yine injeksiyon negatif uçtan yapılırsa, inorganik iyonlar kendi elektroforetik mobiliteleri ile detektöre ulaşacaklardır. Yüksüz polimer olarak en yaygın kullanılan polimer poliakrilamiddir. Akril amid ve başlatıcı kapiler içine doldurularak kapiler içinde polimerizasyon ve duvar kaplaması gerçekleştirilir.

Üçüncü yöntem kapileri bir pozitif yüklü polielektrolitle kaplamaktır. Bu durumda kapiler duvarı pozitif yükleneceğinden kapiler içindeki elektroosmotik akışın yönü negatif kutuptan pozitife doğru olacaktır. Bu durumda yine polarite değişimi ile injeksiyon negatif kutuptan yapılırsa inorganik anyon kendi mobilitesi ile pozitif kutba hareket ederken aynı zamanda elektroosmotik akışla sürüklenecektir. Bu yolla anyonların çok hızlı ayırımı gerçekleşir. Bu amaçla kullanılan en etkili polielektrolit

polietilen imindir. PEI, kapiler duvarında adsorbe olarak çok geniş bir pH alanında kullanılabilen duvar kaplaması sağlar [29].

Dördüncü yöntem kapiler duvarını dinamik olarak pozitif yüklü bir yüzey aktif madde ile kaplayarak, kapiler duvarında pozitif yüklü bir çift tabaka oluşturmak ve pozitif yüklü polimerle kaplamaya benzer şekilde inorganik anyonların ayrımını gerçekleştirmektir. Burada tek fark kaplamanın dinamik olması yani tamponun boşaltılması ve yıkama ile kapiler duvarının tekrar orjinal haline dönmesidir. Oluşan bu çift tabaka Şekil (2.6)' da görülmektedir. Böylece EOA' nın yönü tersine çevrilir. Ancak misel oluşumunun önlenmesi için yüzey aktifler düşük konsantrasyonlarda (kritik misel konsantrasyonun (CMC) altında) kullanılmalıdır.



Şekil 2.6: A) Kapiler duvarında katyonik YAM adsorpsiyonu
B) YAM çift tabakası

2.4. Ayırım Etkinliği ve Resolüsyon

Bir analitin yüküne bağlı olarak görünen mobilitesi, μ_g, analitin elektroforetik mobilitesi, μ_e ve elektroosmotik mobiliteye bağlı olacaktır.

$$\mu_g = \mu_e \pm \mu_{EOA} \qquad (2.12)$$

Eğer EOA ın büyüklüğü, tüm analitlerin elektroforetik mobilitelerinden fazla olursa, tüm analitler katoda doğru göç ederler ve görünen mobilitelerinin farkı sayesinde birbirlerinden ayrılırlar. Katyonlar en yüksek görünen mobiliteye sahiptirler. Çünkü katyonların elektroforetik mobiliteleri, elektroosmotik mobiliteleri ile aynı yöndedir. Nötral türler μ_e' ye sahip değildirler. Bu nedenle nötral türler elektroosmotik akış

hızında sürüklenirler. Anyonlar ise katoda en son ulaşırlar. Çünkü μ_e' leri μ_{EOA}' nın tersi yönündedir. Analitlerin dedektöre ulaşma sıraları Tablo 2.1' de görülmektedir.

Tablo 2.1: Analitlerin göç sırası [24]

Yük	μ_e ve μ_{EOA}	μ_g	Göç Sırası
Katyon	aynı yönde	$\mu_e + \mu_{EOA}$	birinci
Nötral	$\mu_e = 0$	μ_{EOA}	ikinci
Anyon	ters yönde	$-\mu_e + \mu_{EOA}$	sonuncu

Bir analitin göç hızı olan, v, onun görünen mobilitesi, μ_g ve uygulanan elektrik alan şiddeti, E' nin bir ürünü olarak eşitlik 2.13' deki gibi hesaplanır.

$$v = \mu_g \,.\, E = (\mu_e \pm \mu_{EOA}) \,.\, \frac{V}{L} \qquad (2.13)$$

Burada; V uygulanan voltaj, L ise toplam uzunluğudur. Bir analitin göç zamanı eşitlik (2.13) yardımıyla eşitlik 2.14' deki gibi hesaplanır.

$$t = \frac{L.l}{\mu_g.V} \qquad (2.14)$$

Burada l kapilerin etkin uzunluğu yani injeksiyon noktasından dedeksiyon noktasına olan uzaklıktır. Yukarıdaki eşitliklerden görüldüğü gibi uygulanan voltaj arttıkça göç zamanı daha da azalır. Elektroforezde bant genişlemesinin ana sebebi difüzyondur. Pik dispersiyonu, σ^2, (2.14) eşitliğinin yardımı ile hesaplanır.

$$\sigma^2 = 2.D.t = \frac{2.D.L.l}{\mu_g.V} \qquad (2.15)$$

Burada, D, analitin difüzyon katsayısı, t ise analitin göç zamanıdır.

Teorik plaka sayısı, N, eşitlik (2.15) yardımıyla hesaplanır.

$$N = \frac{L.l}{\sigma^2} = \frac{\mu_g.V}{2.D} \qquad (2.16)$$

Plaka sayısı kapilerin boyundan ve göç zamanından bağımsızdır. Uygulanan voltaj arttığında plaka sayısı da artar. Büyük moleküller düşük difüzyon katsayılarına sahip oldukları için yüksek teorik plaka sayısı vermektedirler.

Resolüsyon ise eşitlik (2.17) gibi hesaplanır.

$$R_s = \Delta \mu_e \,.\, \sqrt{V} \,.\, \sqrt{\frac{1}{\mu_g}} \,.\, \frac{1}{4.\sqrt{2.D}} \qquad (2.17)$$

Burada, $\Delta \mu_e$, iki tür arasındaki mobilite farkını,V ise uygulanan voltajı gösterir.

Elektroforetik resolüsyon R_s' yi optimize etmenin en iyi yolu $\Delta \mu_e$' yi arttırmaktır. Bu, çalışma tamponunun pH' sını değiştirmekle veya elektroforezin modunu değiştirmekle sağlanır. Uygulanan voltaj arttığında da resolüsyon artar. Ancak yüksek voltaj joule ısısının artmasına neden olur. Görünen mobilite azalırsa analiz zamanı artar. Çalışma tamponu içerisinde difüzyon katsayısı sabittir. Büyük moleküllerin küçük difüzyon katsayısı olduğu için resolüsyonu da fazladır [24].

2.5. Kapiler Elektroforez Cihazının Temel Bölümleri

2.5.1. Kapiler

Kapiler elektroforez cihazında kullanılan kapilerler genellikle silika kapilerlerdir. Silika kapilerler kırılmayı önlemek ve elastikiyeti sağlamak amacıyla koruyucu bir polimer tabaka ile kaplanmıştır. Bu polimer tabakanın çok küçük bir kısmı yakılarak dedeksiyon için gereken optik pencere elde edilir. Bu kapilerlerin iç çapları 10-200 μm, dış çapları 350-400 μm arasında değişmektedir. Genellikle iç çapı 25-75 μm olanlar kullanılmaktadır. Kapiler elektroforezde kapiler boyu, 50 cm – 1 m arasında değişmektedir. Kapilerin boyu uzadıkça ayrım kolaylaşmasına karşın ayırma süresi artar [26].

Tekrarlanabilir sonuçlar alınması açısından kapilerin kullanıma hazırlanması (şartlandırma işlemi) çok önemlidir. Yeni kapiler genellikle 1M NaOH ile en az yarım saat yıkanarak aktif hale getirilir ve çalışmaya başlarken kapilerin tamponla belli bir süre dengeye gelmesine müsaade edilir.

CE' de silika kapiler kadar kullanışlı olmasa da nadir olarak teflon kapilerler de kullanılır. Teflon geçirgen olduğu için özel bir optik pencere açmaya gerek

duyulmamaktadır. İç çaplarında homojenliği sağlamak zor olduğu gibi düşük ısı transfer özelliği de dezavantajlarındandır [25].

2.5.2. Voltaj Kaynağı

Kapiler elektroforezde yüksek voltaj kaynağı kullanılmaktadır. Ticari aletlerin sağladığı maksimum voltaj genellikle 30 kV veya 35 kV' dir. Voltajın sabit olması göç süresinin tekrarlanabilirliği açısından önemlidir [30].

2.5.3. Elektrotlar

Kapiler elektroforezde pozitif (anot) ve negatif (katot) elektrot olarak platin elektrotlar kullanılmaktadır. Elektrotlardaki reaksiyonlar suyun dekompozisyonu ile meydana gelir. Anot ve katotta meydana gelen reaksiyonlar sırası ile (2.18) ve (2.19) eşitliklerindeki gibidir [31].

$$2H_2O \rightarrow O_2\,(g) + 4H^+ + 4e^- \qquad (2.18)$$

$$2H_2O + 2e^- \rightarrow H_2\,(g) + 2OH^- \qquad (2.19)$$

Kapilerin içinden geçen akım mikroamper mertebesinde olduğundan elektrotlarda oluşan hidrojen ve hidroksil iyonlarının konsantrasyonları çok küçüktür. Ancak CE de ayırma elektroliti hacimleri de çok küçük olduğundan ayırma esnasında ortam pH'ının değişmemesi için ayırma tampon çözeltiler içinde yapılır.

2.5.4. Enjeksiyon

Kapiler elektroforezde ayırımı yapılacak olan numuneyi kapilere almak için hidrodinamik ve elektrokinetik injeksiyon olmak üzere iki tip enjeksiyon uygulanır.

2.5.4.1. Hidrodinamik İnjeksiyon

Bu injeksiyon çeşidinde örnek, uygulanan basınç vasıtasıyla kapiler içerisine alınır. Cihazın tipine göre hidrodinamik injeksiyon üç farklı yöntemle yapılmaktadır. İlk yöntemde örnek kısmına kontrollü bir basınç uygulanırken diğer yöntemde kapilerin diğer ucuna uygulanan kontrollü bir vakumla örnek kapiler içine alınır. En son yöntemde ise basınç farkı, örnekle tampon arasında bir seviye farkı meydana getirilerek sağlanır. Hidrodinamik injeksiyon için injeksiyon hacmi eşitlik (2.20)' deki gibi hesaplanır.

$$V = \frac{\Delta P.r^4.\pi.t}{128.\eta.L} \quad (2.20)$$

Burada ΔP kapiler boyunca basınç farkını, r kapilerin iç çapını , t injeksiyon süresini, η tamponun viskozitesini, L kapilerin toplam boyunu göstermektedir.

Sifonik enjeksiyon için ΔP eşitlik (2.21)' deki gibi hesaplanır.

$$\Delta P = \rho.g.\Delta h \quad (2.21)$$

Burada ρ tamponun yoğunluğunu, g yerçekimi ivme katsayısını, Δh ise örnek ve tampon kabı arasındaki yükseklik farkını göstermektedir [27].

2.5.4.2. Elektrokinetik İnjeksiyon

Bu injeksiyon çeşidinde, kapiler örnek kabının içindeyken, kısa bir süre voltaj uygulanarak örnek kapiler içerisine alınır. Elektrokinetik enjeksiyonun tekrarlanırlığı hidrodinamik enjeksiyona göre daha azdır. İnjekte edilen madde miktarı analitlerin elektroforetik mobilitelerine bağlıdır [32].

2.5.5. Dedektör

CE' de en sık kullanılan dedektör tipi UV-görünür spektrofotometrelerdir. Diğer dedeksiyon türleri ve minimum tayin sınırları Tablo 2.2' de verilmiştir.

Tablo 2.2: Kapiler elektroforez dedektör türleri ve tayin sınırları [23]

Tayin Metodu	Tayin Sınırı (mol)
Spektrometri	
Absorpsiyon	10^{-15} - 10^{-13}
Floresans	10^{-20} - 10^{-16}
Dolaylı Floresans	5×10^{-17}
Termal Mercekler	4×10^{-17}
Raman	2×10^{-15}
Radyometri	1×10^{-19}
Elektrokimyasal	
İletkenlik	1×10^{-16}
Amperometri	7×10^{-19}
Kütle Spektrometri	1×10^{-17}

2.6. Kapiler Elektroforez Türleri

Kapiler elektroforezin genel prensiplerini kullanan ayırma türleri Tablo 2.3.' de verilmiştir.

Tablo 2.3: Kapiler elektroforez türleri [26]

Model	Ayırım Esası
Kapiler Zon Elektroforez (CZE)	Analitlerin Serbest Mobilitelerinin Farklılığı
Kapiler Jel Elektroforez (CGE)	Analitlerin Büyüklüğü
Misel Elektrokinetik Kromatografi (MEKC)	Moleküllerin Misel ile Hidrofobik ve Hidrofilik Etkileşimleri Neticesinde Mobilitelerinin Farklılığı
İzotakoforez (CITF)	Analitler ile Ön-Geri Elektrolitlerin Mobilitelerinin Farklılığı
İzoelektrik Fokus (ITP)	Analitlerin İzoelektrik Noktalarının Farklılığı

2.7. CZE' de Örnek Derişikleştirme Yöntemi

CZE metodunda, kapilerlerdeki kısa optik pencere ve küçük enjeksiyon hacimleri, çok seyreltik örneklerin direkt fotometrik analizlerini önlemektedir. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisiyle (HPLC) karşılaştırıldığında bu sebepten dolayı özellikle güçlü kromofor içermeyen analitlerin tayin sınırları daha yüksek olabilmektedir. CZE' de duyarlılığı arttırmak amacıyla Laser-Induced floresans (LIF) gibi dedeksiyon sistemleri kullanıldığı gibi duyarlılığı arttırmak için kullanılan başka bir yöntemde "örnek sıkıştırma" olarak adlandırılan yöntemlerdir. CE' de bu amaçla kullanılan ve farklı isimlerle anılan örnek sıkıştırma yöntemleri mevcuttur ve literatürde bu çalışmaları toplayan derleme makaleler bulunmaktadır [33, 34]. Farklı örnek sıkıştırma yöntemlerinin temeli, injekte edilen analit örnek bölgesi ile ayırma tamponu arasında konduktivite farkı yaratmaktır. CE'de düşük konduktivitedeki çözelti bölgesinde elektrik alan büyüktür ve bunun aksine yüksek konduktivitedeki çözelti bölgesinde elektrik alan düşüktür. Dolayısı ile düşük konduktivitedeki yani yüksek elektrik alandaki çözelti bölgesinde analitler hızlı hareket edecek, yüksek konduktivitedeki yani düşük elektrik alandaki bölgede analitlerin hızı düşecektir. Örnek düşük konduktivitedeki bir çözeltide, suda yada düşük iyonik şiddetli seyreltik bir çözeltide, kapiler içine büyük hacimde doldurulur ve ayırma tamponu

derişik olursa, yüksek elektrik alanlı örnek bölgesinde hızla hareket eden analitler tampon bölgesine ulaştığında elektrik alan düşeceğinden aniden yavaşlayacaklar ve tampon sınırında sıkışarak konsantre olacaklardır. Bu şekilde normal injeksiyon hacminde elde edilen tayin sınırını çok önemli miktarda düşürmek mümkün olabilir.

3. BROMAT

Bromat iyonu (BrO_3^-) en fazla potasyum bromat ($KBrO_3$) ve sodyum bromat ($NaBrO_3$) bileşikleri halinde bulunmaktadır. Potasyum bromatın sudaki çözünürlüğü 25 ^oC' de 7.5 g/ 100 mL ve suda oda sıcaklığında oldukça kararlıdır. Güçlü bir oksitleyici madde olan potasyum bromat ekmek yapımında kullanıldığı gibi peynir ve bira yapımında da kullanılmaktadır [35].

3.1. İçme Sularında Bromat Oluşumu

İçme sularının dezenfeksiyonu için 1900' lü yıllardan bu yana sıklıkla kullanılan klorlama yönteminde bazı durumlarda sağlığa zararlı olan trihalometanların ve haloasetik asitlerin (monokloroasetik asit, dikloroasetik asit, trikloroasetik asit, monobromoasetik asit ve dibromoasetik asit) oluşumu gözlemlenmektedir. Bu nedenle içme sularının dezenfeksiyonu için klorlama yöntemine en iyi alternatif yöntem olarak ozonlama tekniği kullanılmaya başlanmıştır. Ozonlamanın avantajları ayrıca; virüsit etkisinin yüksek olması, dezenfeksiyon ve oksidasyon için gereken sürenin kısa olması, uygun şartlar sağlandığında suyun bulanıklığının, kokusunun ve tadının giderilmesinde etkili olması olarak sıralanabilir. Ancak ozonlama neticesinde de içinde bromatın da bulunduğu çeşitli dezenfeksiyon yan ürünleri (aldehitler, ketonlar, karboksilik asitler, bromoform gibi bromatlı trihalometanlar, brominantlı asetik asit, kuinolonlar, peroksitler) oluşmaktadır. İçme sularının doğal yapısında önemli miktarlarda bromür iyonu serbest halde bulunmaktadır. Ozonlama yönteminde, ozon molekülünün suda doğal olarak bulunan bromür iyonunu ile reaksiyonu neticesinde bromat anyonu meydana gelmektedir. Reaksiyon adımları şu şekilde gerçekleşmektedir.

Ozon molekülünün bromür iyonu ile direkt reaksiyonu ile hipobromit ve oksijen meydana gelmektedir.

$$O_3 + Br^- \rightarrow O_2 + OBr^- \qquad (3.1)$$

İki ozon molekülünün hipobromit anyonu ile reaksiyonu neticesinde bromat ve oksijen meydana gelmektedir.

$$2O_3 + OBr^- \rightarrow 2O_2 + BrO_3^- \quad (3.2)$$

İçme sularının klorlama yöntemi ile dezenfeksiyonunda ise standart açıdan bromat oluşumu beklenmez iken ticari olarak kullanılan bazı hipoklorit çözeltilerinde bulaşmış olarak bromata rastlanmıştır. Fareler üzerinde yapılan araştırmalar neticesinde, bromatın toksik bir madde olarak fareler üzerinde uygulanan çok yüksek miktarlarında, kalıcı olarak böbrek yetmezliğine, böbrek tümörlerine, sağırlığa ve ölümlere neden olduğu görülmüştür. Tüm bu nedenlerle Amerikalı , Avrupalı ve Kanadalı Çevre Koruma Kurumları içme sularında maksimum kabul edilebilir bromat miktarını 10 μg/L olarak belirlemişlerdir [11,36,37]. Değişik hayvan türleriyle içme sularında bulunan farklı bromat konsantrasyonlarının böbrek kanseri oluşturma riski çalışmaları Kurokawa ve meslektaşları tarafından yayımlanmıştır [38,39]. Bu çalışmaların bir parçası olarak Tablo 3.1 de içme sularında bromat konsantrasyonuna karşı hayvan yaşam süresi riskleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Tablo 3.1: İçme sularında bromat konsantrasyonuna karşı hayvan yaşam süresi riskleri [39]

Yaşam süresi riski	İçme suyundaki bromat konsantrasyonu (μg/L)
10^{-4}	46 – 65
10^{-5}	4.6 – 6.5
10^{-6}	0.46 – 0.65

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) "dezenfeksiyon yan ürünleri kaynaklı olabileceği ileri sürülen sağlık risklerinin, yetersiz dezenfeksiyon sonucu ortaya çıkabilecek sağlık risklerine göre son derece az olduğu"nu açıklamış ve "dezenfeksiyon yan ürünleri oluşumunu azaltmak için, suların dezenfeksiyonunu engelleyecek veya azaltacak hiçbir uygulamanı onaylanamayacağını" belirtmiştir. Yine bir araştırmada dezenfekte edilmemiş bir içme suyunda bulunabilecek patojen mikroorganizmaların,

dezenfekte edilmiş sulardaki dezenfeksiyon yan ürünlerine göre en az 100-1000 kat fazla tehdit oluşturacağı belirtilmiştir [40-42].

3.2. Un İşleme Ajanı Olarak Bromat

Temel bir gıda maddesi olan unun, işleme metotlarının iyileştirilmesi, içeriğinin ve kalitesinin geliştirilmesi, besleyici değerinin korunması ve son ürün kalitesinin artırılması için una ilave edilen katkılara un işleme ajanları denmektedir. Bu maddeler sırasıyla yükseltgen, indirgen maddeler, hamur kuvvetlendiriciler ile emülgatörler ve enzimlerdir. Bu ajanlar kullanıldıkları gıdaların türüne göre ve fonksiyonel nitelikleri düşünülerek gruplandırılırlar. Un işleme ajanlarından olan yükseltgen maddelerin un ve unlu maddeler üzerine üç türlü tesiri vardır: Bunlar ; un olgunlaştırıcılık, un ağartıcılık ve hamur geliştiriciliktir. En eski hamur geliştirici bakır sülfattır. Günümüzde ise bakır sülfat yasaklanmış olup kalsiyum peroksit, askorbik asit, kalsiyum iyodat, potasyum iyodat ve potasyum bromat hamur geliştirici ajan olarak kullanılmaktadır [43].

Taze öğütülmüş unlar kötü kalitede ekmek ürünlerine sebep olduklarından değirmenciler ilk zamanlarda unu, öğütmeden sonra en az dört ila sekiz hafta depolayarak dinlendirmek zorundaydılar. Sonraki yıllarda bilinçli ve kontrollü olarak una yada hamura yapılan kimyasal okside edici maddelerin ilavesi ile bu depolama maliyetinden fırıncılar kurtulmuştur. Doğru biçimde okside olmuş hamurlar uygun esnekliğe ve uzayabilirliğe sahiptir. Bu tür hamurlar makine ile iyi işlenmektedirler ve zamanında fermente olarak fırına girerken yeterli kuvvete sahip olmaktadırlar. Ekmeğin hacmi standartlara uygun ve iyi doku- gözenek yapısının kalitesi ile çok iyi olmaktadır. Ekmek yapımında fazla oksidasyon sorunlara sebep olduğundan yükseltgen maddeler doğru miktarlarda kullanılmalı ve yasal limitlerin dışına çıkılmamalıdır. Potasyum bromat ($KBrO_3$), genel bir hamur geliştirici olarak uzun bir kullanım geçmişi olan bir yükseltgen maddedir [44]. $KBrO_3$ yüksek sıcaklıkta ve düşük pH' da aktif hale gelen ve yavaş tesir eden bir yükseltgen madde olduğu için etkisini son fermantasyonun ilerleyen aşamalarında ve pişirme işleminin başında göstermektedir. Bromatın bitişik protein molekülleri arasında bağ oluşturması ve bağımsız protein konformasyonlarını stabilize etmesi; sisteinin sülfidril gruplarını moleküller arası ve içi disülfit bağlarına çevirmesiyle sağlanır ve bu değişimle de hamur daha fazla stabil halde kalmaktadır. Bromat serbest sülfidril

konsantrasyonunu düşürmekte, glutene lipid bağlanmasını azaltmaktadır ve gluteni okside ederek ekmeğin hacminin artmasına sebep olmaktadır. Bu etki yüksek proteinli ve taze öğütülmüş unlarda daha fazla olduğu gibi pişirme işlemine de bağlıdır [43,44].

$KBrO_3$, 1980' li yılların ortasına kadar yaygın bir şekilde kullanılan en etkili yükseltgen maddedir. Bu yıllara kadar toksik bir madde olan bromatın pişirme sırasında zararsız bir madde olan bromit formuna dönüştüğü kabul edilmekteydi. Fakat yeni duyarlı yöntemlerin geliştirilmesi neticesinde ekmekte iz miktarda da olsa bromatın kaldığının belirlenmesi ile bu reaktif kademeli olarak pek çok ülkede yasaklanmaya başlanmıştır. Düşük dozlarda kullanımı ve düşük maliyeti sebebiyle bromat kullanımının izinsiz bir şekilde yapıldığı belirtilmektedir. Potasyum bromat, ABD'nin bazı eyaletlerinin dışında, un katkı maddesi olarak kullanımı dünyada en fazla ülkede yasaklanan bir yükseltgen maddedir [45]. Ekmek yapımında kullanılabilecek maksimum bromat miktarı ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından 1991 yılında 75 ppm olarak belirlenmiştir ve günümüzde bu oranın 50 ppm' e düşürülmesiyle ilgili tartışmalar sürmektedir [44]. ABD' de unun kuvvetine ve ekmek türüne göre bromatın kullanılabilecek maksimum oranı 10-75 ppm arasında farklılık göstermektedir [43]. Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğine göre ülkemizde ekmek üretiminde askorbik asit dışında hiçbir okside edici katkı maddesi kullanımına izin verilmemektedir [44].

4. DENEYSEL BÖLÜM

4.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Çalışmalarımızda ayırma ve tayinler için diyod-array UV dedektörle kombine edilmiş Agilent marka kapiler elektroforez cihazı, pH ölçümleri için Metrohm (654 pH meter) marka pH-metre ve un örneklerinin hazırlanması için SED marka santrifüj cihazı kullanıldı. Çalışma sonundaki veri analizleri Agilent Chemstation software ile gerçekleştirildi. Tüm çözeltiler Elgacan C114 filtrasyon sisteminden sağlanan deiyonize su ile hazırlandı.

4.2. Kimyasal Maddeler

PEI (polietilen imin), TRIS, $KBrO_3$, NaOH, HCl, KSCN, NaCl, Na_2SO_4, CTAB (setil trimetil amonyum bromür), ACN (aseto nitril) Flukadan, H_3PO_4, $ClCH_2COOH$ (kloroasetik asit) Merck'den temin edilmiştir.

4.3. Elektroforetik Koşullar

Çalışmada Polymicro Technologies' den alınan 75 μm çapındaki silika kapiler kullanıldı. Bu kapiler kolonun toplam uzunluğu 45 cm iken etkin uzunluğu 37 cm olarak seçildi. Kapiler kolon ilk kullanımda yarım saat 1 M NaOH ile her günün başında ve sonunda ise 10 dk 0.1 M HCl ile ardından 5 dk deiyonize su ve son olarak 10 dk çalışma tamponu ile yıkandı. Çalışma tamponu normal enjeksiyon yapılan çalışmanın bir kısmında pH 3'e ayarlanmış 20 mM $ClCH_2COOH$ ve diğer bir kısmında yine pH'ı 3'e ayarlanmış 20 mM $ClCH_2COOH$ içinde 20 mM NaCl olarak seçilirken, tayin sınırını düşürmek için kullanılan örnek sıkıştırma işlemlerinde ise çalışma tamponu pH'ı 3'e ayarlanmış 10 mM H_3PO_4 , 10 mM Na_2SO_4' olarak seçildi.

Tüm çalışmalarda kapiler sıcaklığı 25^oC'de sabitlendi ve dedeksiyon diode-array dedektör kullanılarak direkt UV dedeksiyonla 200 nm dalga boyunda gerçekleştirildi.

4.4. Un Örneklerinin Hazırlanması

Normal injeksiyon ile yapılan çalışmalarda un örnekleri aşağıdaki şekilde hazırlandı: 5 gr un tartıldı. İçine stok bromat çözeltisinden 15 ml'lik hacme tamamlanınca sırasıyla 0.04-0.12-0.2-0.8-2 mM bromat konsantrasyonu verecek şekilde eklendi ve su ile 15 ml ye tamamlandı. Bu çözeltiler manyetik karıştırıcıda 15 dakika boyunca homojen olacak şekilde karıştırıldı. Elde edilen bu çözeltiler yarım saat santrifüjlendi. Santrifüj sonucu elde edilen süzüntü önce adi süzgeçten sonra da 20 μm' luk mikro filtreden geçirilerek süzüldü. Süzüntüden alınan bir hacim üzerine üç hacim asetonitril ilave edildi. Böylece çözeltilerdeki bromat derişimi 1/4 oranında seyreldi ve çözeltiler %75 oranında asetonitril içeriğine sahip oldu. Asetonitril ilavesi ile undaki nişasta ve proteinler çöktürüldü. Elde edilen çözeltli 5 dk daha santrifüjlendikten sonra süzüntü 20 μm' luk mikro filtreden geçirildi. Böylece 0.01-0.03-0.05-0.2 ve 0.5 mM BrO_3 içeren % 75 ACN' lik un örnekleri hazırlanmış oldu.

Tiyosiyanat iç standart kullanılan deneylerde yukarıda yapılan işlemlerin aynısı gerçekleştirildi. Ancak başlangıçta una belli konsantrasyonda stok KSCN' den ilave edildi. Böylece 0.01-0.03-0.05 ve 0.2 mM BrO_3 ve her biri 0.05 mM KSCN içeren % 75 ACN' lik un örnekleri hazırlanmış oldu.

Örnek sıkıştırılması yapılan çalışmalarda ise 5 gr un alındı kg da 50 mg olacak şekilde potasyum bromat eklendi ve 25 ml' ye tamamlandı. Bu çözelti manyetik karıştırıcıda 15 dakika karıştırıldı ve yarım saat santrifüjlendi. Santrifüj sonucu elde edilen süzüntü adi süzgeç kağıdından süzüldü. Bu süzüntüden 1 ml alındı ve 3 ml ACN ile seyreltildi. Elde edilen çözetli 5 dk daha santrifüjlendikten sonra süzüntü 20 μm' lik mikro filtreden geçirildi. Bu örnekler su ile 10 kat seyreltilerek injekte edildi. Böylece injeksiyon çözeltisinin ACN içeriği % 7.5 oldu.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

5.1. Çalışmaya Ait Ön Denemeler

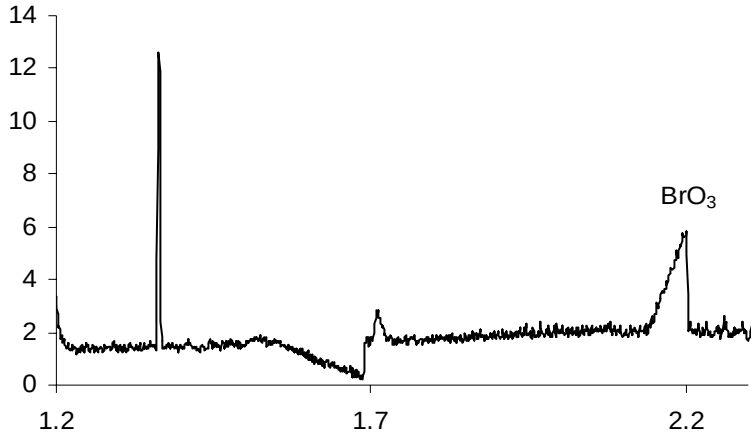
Bölüm 2.3.1 de açıklandığı gibi kapiler içinde elektroosmotik akışı bromat iyonunun göçüne imkan verecek şekilde ayarlamak için farklı yöntemler denendi.

Bu amaçla ilk önce EOA' yı ters çevirmek için katyonik bir polielektrolit olan PEI kullanıldı. Bu çalışmada 75 μm' luk kapiler kolon %10 luk PEI ile kaplandı. Polarite tersine çevrilerek çalışma tamponu olarak sırasıyla pH 8.2 de; 20, 25, 30, 35, 40 mM TRIS, 30 mM TRIS, 5 mM NaCl, 30 mM TRIS, 10 mM NaCl ve 20 mM TRIS, 10 mM NaCl denendi. Bu tamponlara bromat iyonu eklenmiş un örnekleri veya bromat ve iç standart olarak tiyosiyanat içeren un örnekleri injekte edildi. 20, 25 ve 28 kV olmak üzere farklı voltajlarda çalışıldı. Ancak bu denemelerde unlu örneklerin kolonu tıkama sorunu ortadan kaldırılamadığı gibi iç standart yönteminde KSCN ve bromat pikinin resolusyonu sağlanamadı.

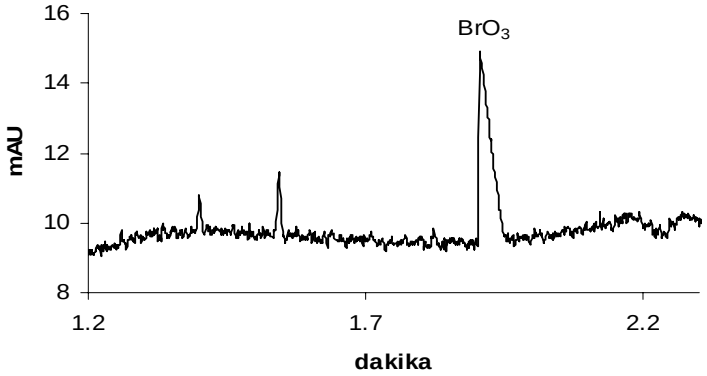
Daha sonra EOA' yı ters çevirmek için katyonik yüzey aktif madde CTAB'nin tampona ilavesi denendi. 50 μm ve 75 μm çapındaki kapiler kolonlar içinde 5 mM TRIS ile 0.125 mM CTAB karışımı, 10 mM TRIS ile 0.25 mM CTAB karışımı, 15 mM TRIS ile 0.25 mM CTAB karışımı, 20 mM TRIS ile 0.5 mM CTAB karışımı ve 30 mM TRIS ile 0.5 mM CTAB karışımlarını içeren pH 8.2' deki çalışma tamponlarına injeksiyonlar yapıldı. Yine 20, 25 ve 28 kV olmak üzere farklı voltajlarda çalışıldı. Ancak tıkanma problemi ve uygun pik eldesi bu çalışmada da sağlanamadı.

Son olarak 50 ve 75 μm çaplı kapiler kolonlarda çalışma tamponu olarak pH 3' de 25 mM H_3PO_4 denendi. Standart bromat çözeltileri ve un örnekleri % 50 ve % 75 ACN içerecek şekilde hazırlandı. Pik uygunluğu açısından % 75 ACN en uygun şart olarak kabul edildi. Her injeksiyon öncesinde ön şartlandırma olarak 3 dk 1M HCl, 4 dk çalışma tamponuyla yıkama yapıldı. Ancak kapiler kolonun tıkanma problemi giderilemedi ve uygun pik eldesi gerçekleştirilemedi.

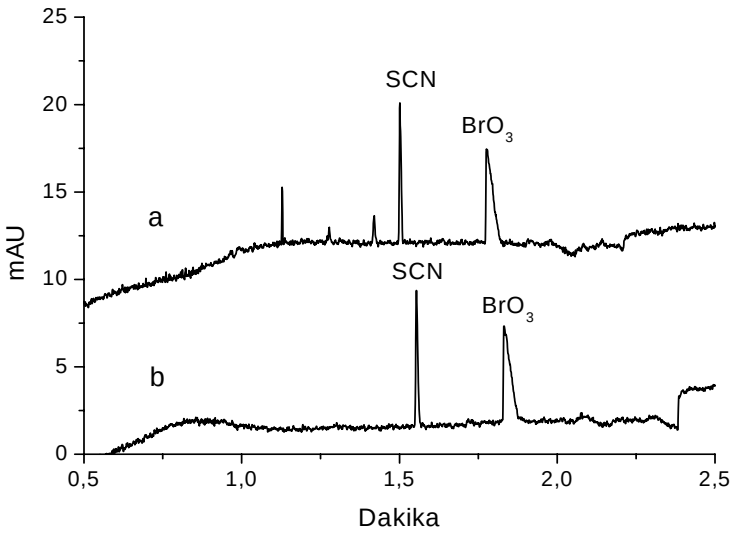
Daha sonra tampon olarak kloroasetik asit kullanımına geçildi. 20 mM $ClCH_2COOH$ ve 20 mM $ClCH_2COOH$, 20 mM NaCl içeren iki farklı tampona injeksiyonlar yapıldı. 20 mM $ClCH_2COOH$ + 20 mM NaCl tamponunda pik yüksekliği daha büyük ve pik şekilleri daha düzgündü (Şekil 5.1 ve 5.2). Bu nedenle çalışmanın devamında tampon olarak pH 3 de 20 mM $ClCH_2COOH$ + 20 mM NaCl kullanılmasına karar verildi. Şekil 5.3 de bu tampona bromat ve iç standart olarak tiyosiyanat eklenmiş un örneklerinin elektroferogramı verilmiştir. Unlarda bromat tayini için metot validasyonu bu tamponla yapıldı.



Şekil 5.1: 0.2 mM BrO_3 içeren %75 ACN' lik un örneği elektroferogramı Tampon: 20 mM $ClCH_2COOH$, pH: 3, Voltaj: 25 kV, injeksiyon 50 mBar, 5 saniye, dedeksiyon: 200 nm, kapiler boyu 48 cm, etkin boyu 40 cm, kapiler iç çapı 75µm



Şekil 5.2: 0.2 mM BrO_3 içeren % 75 ACN'lik un örneği elektroferogramı Tampon: 20 mM $ClCH_2COOH$ + 20 mM NaCl , pH: 3, voltaj: 25 kV, injeksiyon 50 mBar, 5 saniye, kapiler boyu 48 cm, etkin boyu 40 cm, kapiler iç çapı 75µm

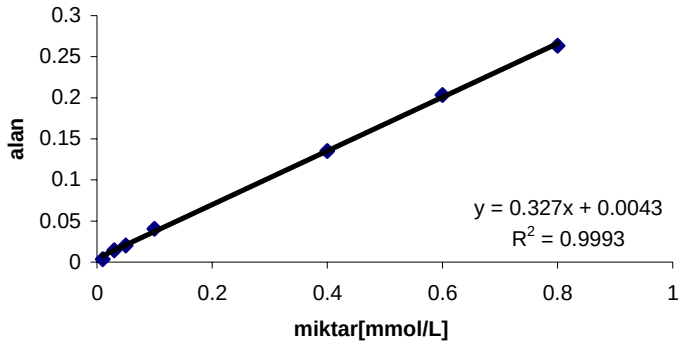


Şekil 5.3: a) 0.2 mM BrO_3 + 0.05 mM KSCN + %75 ACN içeren un örneği elektroferogramı
b) 0.2 mM BrO_3 + 0.05 mM KSCN + %75 ACN içeren standart bromat çözeltisi elektroferogramı
Tampon: 20 mM $ClCH_2COOH$ + 20 mM NaCl , pH: 3, voltaj: 25kV, injeksiyon 50 mBar, 5 saniye, kapiler boyu 45 cm, etkin boyu: 37 cm, kapiler iç çapı 75µm

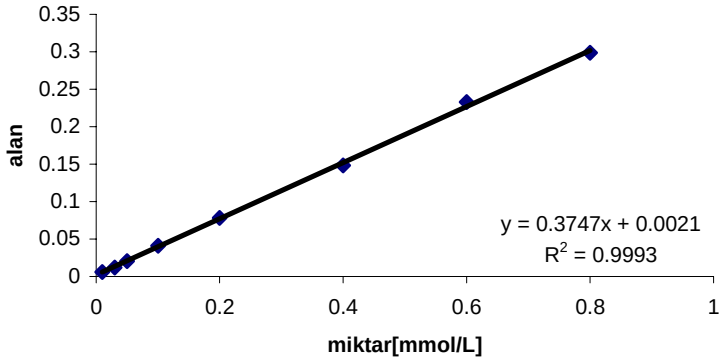
5.2. Kalibrasyon Grafikleri

Undaki bromat miktarını tayin edebilmek için standart çözeltilerle üç farklı kalibrasyon eğrisi çizildi. Birinci kalibrasyon setinde, BrO_3 iyonu sulu çözeltide çözüldü. İkinci kalibrasyon setinde BrO_3 iyonu %75 ACN içeren çözeltide çözüldü. Bu iki kalibrasyon grafiği bromat konsantrasyonu ile pik alanının değişimine göre çizildi. Üçüncü kalibrasyon setinde çözeltilere iç standart olarak 0.05 mM SCN iyonu eklendi ve kalibrasyon grafiği bromat konsantrasyonuna karşı bromat/tiyosiyanat pik alan oranının değişimine göre çizildi. Her üç sette BrO_3 konsantrasyonları 0.01-0.03-0.05-0.1-0.2-0.4-0.6-0.8 mM olarak seçildi ve konsantrasyon aralığında kalibrasyon grafikleri doğrusal alanda kaldı.

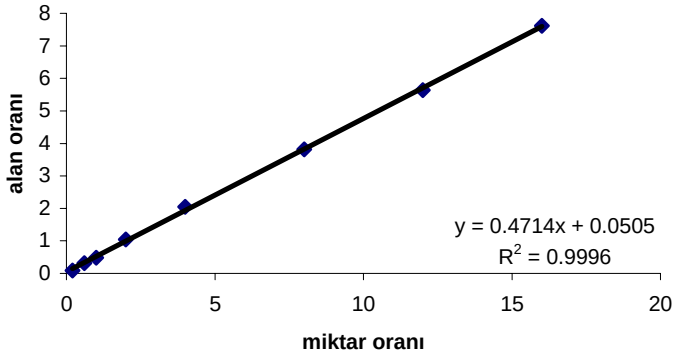
Elde edilen kalibrasyon eğrileri sırasıyla Şekil 5.4, 5.5 ve 5.6' da görülmektedir.



Şekil 5.4: Sulu çözeltiler için bromat kalibrasyon eğrisi



Şekil 5.5: %75 ACN içeren sulu çözeltiler için bromat kalibrasyon eğrisi



Şekil 5.6: %75 ACN ve 0.05 mM SCN iyonu içeren sulu çözeltiler için bromat kalibrasyon eğrisi

Kalibrasyon denklemleri Şekil 5.4 için y = 0.327x + 0.0043 ; Şekil 5.5 için y = 0.3747x + 0.0021 ve Şekil 5.6 için y = 0.4714x + 0.0505 olarak bulunurken, kalibrasyon grafiklerinin regrasyon katsayıları (R^2) sırasıyla 0.9993, 0.9993 ve 0.9996 dır.

5.3. Pik Alanı ve Pik Geliş Süresi Tekrarlanabilirlik Değerleri

Pik alanı ve pik geliş süresi tekrarlanabilirlik değerleri için yapılan çalışmada ise 0.2 mM BrO_3'lı % 75 ACN'li un çözeltisi art arda 7 kez injekte edildi. 0.2 mM BrO_3'lı 0.05 mM KSCN'li %75 ACN'li standart çözeltisi de art arda 7 kez injekte edildi. Geliş süresi ve alanların % RSD olarak tekrarlanabilirlik değerleri Tablo 5.1'de görülmektedir.

Tablo 5.1: Pik alanı ve pik geliş süresi tekrarlanabilirlik değerleri

	%RSD (geliş zamanı için)	**%RSD**
BrO_3	0.511	2.87 (pik alanı)
BrO_3 / SCN	0.732	4.28 (pik alanları oranı)

Günler arası tekrarlanabilirlik için ise 0.2 mM BrO_3' lı 0.05 mM KSCN' li % 75 ACN'li un çözeltisi 4 gün üst üste injekte edildi. 4 gün sonunda elde edilen geliş süreleri ve alan oranlarının % RSD olarak tekrarlanabilirlik değerleri Tablo 5.2' de görülmektedir.

Tablo 5.2: Gün aşırı tekrarlanabilirlik değerleri

	%RSD (geliş zamanı için)	**%RSD (pik alanı için)**
BrO_3/SCN	7.84	3.61

5.4. Geri Kazanım Değerleri

Normal injeksiyon yönteminde 0.03-0.05-0.2-0.5 mM bromat içeren un çözelti örnekleriyle geri kazanıma bakıldı. Ayrıca 0.03-0.05-0.2-0.5 mM bromat ve her biri 0.05 mM KSCN içeren un çözelti örneklerinde de geri kazanıma bakıldı. Tablo 5.3' de bromatın geri kazanım değerleri görülmektedir.

Tablo 5.3: Bromat geri kazanım değerleri

Bromat Konsantrasyonu (mM)	Sulu BrO_3'lı % 75 ACN'li un çözeltileri için	0.05 mM iç standartlı % 75 ACN'li un çözeltileri için
0.03	% 97.6	% 103
0.05	% 101	% 92.2
0.2	% 99.0	% 90.5
0.5	%103	% 92.3

5.5. Tayin Sınırı (LOD)

Un çözeltilerinde bromat ayrımında geliştirilen analiz yönteminin tayin sınırı (LOD) gürültünün üç katı sinyal olarak kabul edilerek hesaplanmış ve bu değer 1.79 μg/ml olarak bulunmuştur. Kullanılan çözme yöntemiyle un örneklerinde bu değer 21.4 mg/kg una denk gelmektedir.

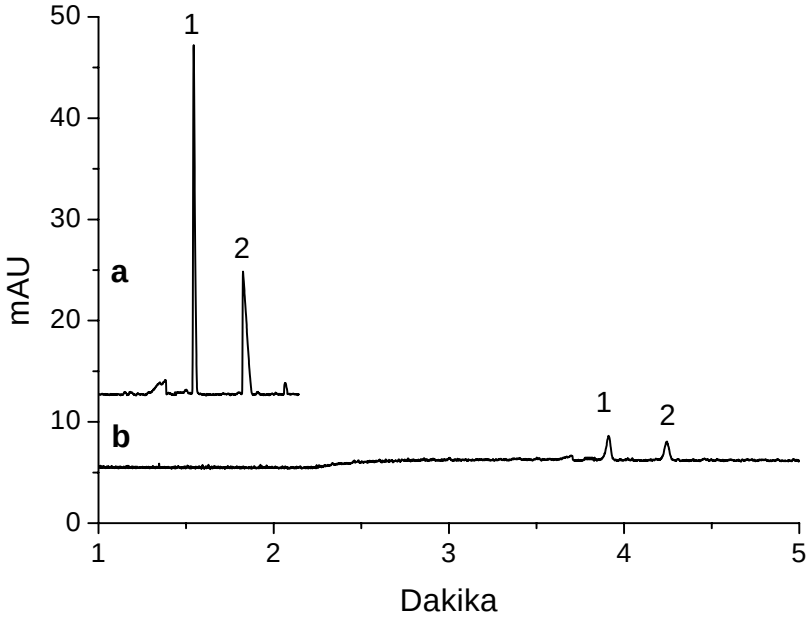
5.6. Örnek Sıkıştırma Yöntemiyle Bromat Tayin Sınırının Düşürülmesi

Unda bromat tayini için geliştirilen yöntemin tayin sınırı (21.4 ppm) unlarda bromat ilavesi için kabul edilebilen sınırın (70 ppm) altındadır. Bu yöntemde unlarda yasal sınırların aşılıp aşılmadığı kontrol edilebilir. Ancak daha düşük konsantrasyonlara inme imkanı olup olmayacağı geliştirilen yönteme örnek sıkıştırma tekniklerini uygulayarak da denendi. Bu amaçla geliştirilen yöntemde 50 mBar, 5 s de yapılan injeksiyon hacmi örnek sıkıştırma denemelerinde arttırılarak, örnek bölgesi ile tampon arasındaki konduktivite farkı yaratılarak BrO_3 iyonu kapiler içinde sıkıştırılarak konsantre edildi.

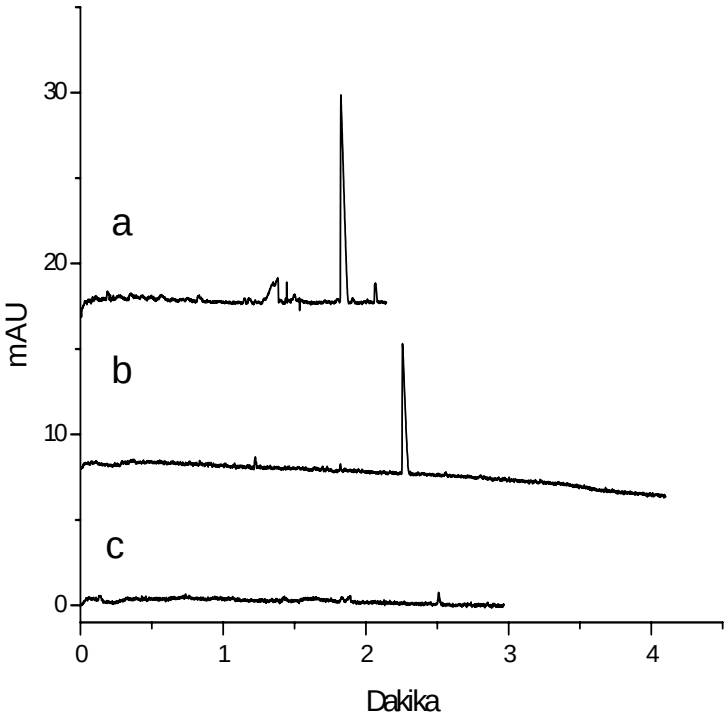
Örnek sıkıştırma denemelerinde en uygun tampon olarak pH' ı 3 olan 10 mM H_3PO_4 ve 10 mM Na_2SO_4 içeren tampon çözelti seçildi. Bu amaçla iki injeksiyon şekli, hidrodinamik ve elektrokinetik injeksiyon yöntemleri denendi. Her iki injeksiyon yöntemi için en uygun şartlar tespit edildi. 2.5 μM bromat, 2 μM SCN ve % 7.5 ACN içeren çözeltiler tamponla doldurulan kolona injekte edildi. Hidrodinamik injeksiyon için 50 mBar da 200 saniye injeksiyon yapıldı. Elektrokinetik için -10kV da 20 s injeksiyon gerçekleştirildi.

Hidrodinamik injeksiyonla örnek sıkıştırma ve elektrokinetik injeksiyonla örnek sıkıştırma yöntemlerinin uygulandığı elektroferogramlar sırasıyla Şekil 5.7 de

verilmiştir. Görüldüğü gibi örneğin elektrokinetik olarak verilmesi sonucunda daha yüksek pik boylarına erişilmiştir. Bu nedenle metot validasyon çalışmalarına bu yöntemle devam edilmiştir. Şekil 5.8 de 0.1 mM ve $2.5x10^{-3}$ mM bromat iyonu içeren bir çözeltinin elektroferogramının, $2.5x10^{-3}$ mM bromat içeren çözeltiye örnek sıkıştırması uygulandığındaki elektroferogramı ile karşılaştırılması verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi $2.5x10^{-3}$ mM lık çözelti 0.1 mM lıktan 40 kez daha seyreltik olduğu halde örnek sıkıştırma yöntemiyle $2.5x10^{-3}$ mM lık BrO_3 çözeltisi piki 0.1 mM lık BrO_3 çözeltisi pikinden daha yüksektir.



Şekil 5.7: İki farklı örnek sıkıştırma yönteminin karşılaştırılması
a) Elektrokinetik injeksiyon -10 kV, 20 s
b) Hidrodinamik injeksiyon 50 mBar 200 s
Örnek: 2.5 µM bromat, 2 µM SCN ve % 7.5 ACN
Pikler: 1: SCN; 2: bromat
Tampon: 10 mM H_3PO_4 , 10 mM Na_2SO_4, pH: 3, voltaj: 25 kV, kapiler boyu 49 cm, etkin boyu 40,5 cm, kapiler iç çapı 75 µm, dedeksiyon 200 nm



Şekil 5.8: Bromat elektroferogramları

a) $2.5x10^{-3}$ mM bromat injeksiyonu örnek sıkıştırılması yöntemiyle, -10 kV, 20 s

b) 0,1 mM bromat, 50 mbar 10 s injeksiyon ile

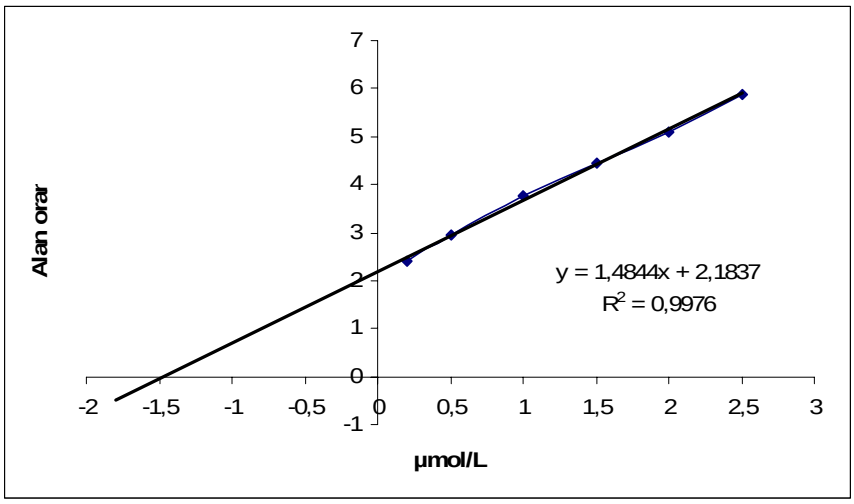
c) $2.5x10^{-3}$ mM bromat, 50 mbar 20 s injeksiyon ile, Tampon: 10 mM H_3PO_4, 10 mM Na_2SO_4, pH: 3, Voltaj: 25 kV, kapiler boyu 49 cm, etkin boyu 40,5 cm, kapiler iç çapı 75 µm, dedeksiyon 200 nm

5.6.1 . Kalibrasyon Grafikleri

Örnek sıkıştırma tekniğinde kalibrasyon , standart ekleme yöntemi ve normal yöntem ile gerçekleştirildi. Her iki yöntemde iç standart olarak KSCN kullanıldı. Kullanılan tüm standart çözeltiler % 7.5 ACN içerecek şekilde hazırlandı.

Standart ekleme yönteminde un örneklerine kg da 50 mg (50ppm) olacak şekilde bromat katıldı. Standartlar bu un çözeltisine katılarak hazırlandı. Kalibrasyon çözeltileri içinde una başlangıçta katılan miktar 1.5 µM konsantrasyona denk gelmekteydi.

Standart ekleme yöntemi ile bromat konsantrasyonuna karşı A_{Bro3}/A_{SCN} alan oranlarına göre çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 5.9' da verilmiştir.



Şekil 5.9: Standart ekleme yöntemi ile elde edilen kalibrasyon grafiği

Unda bulunan miktar 1,5 µM (0,250 mg / 5 g un) olarak bulundu. Bu sonuça göre bromat % 100 geri kazanılmıştır.

Bromat standartları kullanılarak gerçekleştirilen kalibrasyon yönteminde: standartlar % 7.5 ACN içerecek şekilde suda hazırlandı. Kalibrasyon eğrisi bromat konsantrasyonuna karşı BrO_3/SCN alan oranına göre çizildi. Bu doğrunun denklemi y= 0,26925221x - 0,0435744 ve regrasyonu r = 0,99975 olarak bulundu. Bu kalibrasyona göre una eklenmiş miktar 1.48 µM (0,246 mg / 5g un) olarak tayin edildi.

5.6.2. Pik Alanı ve Pik Geliş Süresi Tekrarlanabilirlik Değerleri

Tekrarlanırlık için çözeltiler art arda 7 kez injekte edildi. Geliş süresi ve BrO_3/SCN alan oranları için %RSD olarak tekrarlanırlık değerleri Tablo 5.4' de verilmiştir.

Tablo 5.4: Örnek sıkıştırma tekniğinde tekrarlanırlık değerleri

	%RSD (geliş zamanı için)	**%RSD (pik alanı için)**
Sulu standartlarda	0.622	5.25
Unlu örneklerde	0.814	7.43

5.6.3. Geri Kazanım Değerleri

0.5-1.0-2.0 μM bromat ve her biri 0.2 μM KSCN içeren un çözelti örnekleriyle geri kazanım değerleri saptandı. Tablo 5.5' de bromatın geri kazanım değerleri görülmektedir.

Tablo 5.5: Örnek sıkıştırma tekniğinde geri kazanım değerleri

Madde Konsantrasyonu (μM)	**Geri Kazanım**
0.50	% 84.5
1.0	% 99.5
2.0	% 95.2

5.6.4. Tayin Sınırı (LOD)

Un çözeltilerinde bromat ayrımında geliştirilen analiz yönteminin tayin sınırı (LOD) gürültünün üç katı sinyal olarak kabul edilerek hesaplanmış ve bu değer örnek sıkıştırma tekniğinde 10.9 μg/L olarak tespit edilmiştir. Bu da kullanılan örnek hazırlama yönteminde 2.18 mg/kg una tekabül etmektedir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada bromatın un örneklerinde tayini için bir kapiler elektroforetik analiz yöntemi geliştirilmiştir. Un örneklerinde bromat, 2 dk dan daha kısa sürede analiz edilebilmiştir. Analiz yönteminin tekrarlanırlığı ve geri kazanım değerleri tatmin edicidir. Analiz yönteminin tayin sınırı, FDA'nın una katılması onaylanan maksimum bromat miktarını tespit edebilecek ölçüdedir.

Bromat içeren un örneklerinin analizi için geliştirilen kapiler elektroforez yöntemi, hem kullanılan kimyasalların miktarı bakımından hem de harcanan zaman bakımından hızlı, güvenilir ve ekonomik bir yöntemdir. Yöntemin iyon kromatografiye göre avantajı, kapiler kolonların dolgu kolonlara göre çok daha ucuz olması ve dolgu kolonlar için gereken ön saflaştırma işlemi gerektirmeden doğrudan kapiler kolona injeksiyonun gerçekleştirilerek zaman ve para açısından ekonomik olmasıdır.

Örnek sıkıştırma yöntemi uygulanarak yöntemin tayin sınırı 164 kat arttırılmıştır. Böylece un örneklerinde 2.18 ppm bromatın tayini mümkün olmuştur. Örnek sıkıştırma yöntemiyle sadece unda değil, işlem görmüş unlu mamullerde de bromat tayini mümkün olabilir.

KAYNAKLAR

[1] **Cox, D., Harrison, G., Jandik, P., Jones, W.,** 1985. Application of ion chromatography in the food and beverage industry, *Food Technology*, **7**, 41-44**.**

[2] **Heitkemper, D. T., Kaine, L. A., Jackson, D. S., Wolnik, K. A.,** 1994. Practical applications of element-specific detection by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy and inductively coupled plasma mass spectrometry to ion chromatography of foods, *Journal of Chromatography A*, **671**, 101-108.

[3] **Lu, H., Mou, S., Tong, S., Riviello, J. M.,** 1998. Simultaneous determination of trace oxoanions using ion chromatography with ultraviolet absorbance detection, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **21(15)**, 2313-2326.

[4] **Qi, Z., Qu, F., Liu, K., Mou, S.,** 1998. Determination of bromate in drinking water and bread by chromatography, *Huanjing Huaxue*, **17**, 601-605.

[5] **Hautman, D. P., Munch, D., Pfaff, J. D.,** 1997. Determination of inorganic anions in drinking water by ion chromatography, *US EPA Method300.1*, EPA/600/R-98/118, NTIS PB98-169196INZ.

[6] **Wagner, H. P., Pepich, B. V., Hautman, D. P., Munch, D.J.,** 1999. Analysis of 500-ng/l levels of bromate in drinking water by direct-injection suppressed ion chromatography coupled with a single, pneumatically delivered post-column reagent, *Journal of Chromatography A*, **850**, 119-129.

[7] **Wagner, H. P., Pepich, B. V., Hautman, D. P., Munch, D.J.,** 2000. Eliminating the chlorite interference in US Environmental Protection Agency Method 317.0 permits analysis of trace bromate levels in all drinking water matrices, *Journal of Chromatography A*, **882**, 309-319.

[8] **Wagner, H. P., Pepich, B. V., Hautman, D. P., Munch, D.J.,** 2000. Performance evaluation of a method for the determination of bromate in drinking water by ion chromatography (EPA Method 317.0) and validation of EPA Method 324.0, *Journal of Chromatography A*, **884**, 201-210.

[9] **Wagner, H. P., Pepich, B. V., Hautman, D. P., Munch, D.J.,** 2002. A new method for monitoring inorganic oxyhalides and optimization of the postcolumn derivatization for the selective determination of trace levels of bromate, *Journal of Chromatography A*, **956**, 93-101.

[10] **Wagner, H. P., Pepich, B. V., Hautman, D. P., Munch, D.J.,** 2003. Improving the performance of US Environmental Protection Agency Method 300.1 for monitoring drinking water compliance, *Journal of Chromatography A*, **1011**, 89-97.

[11] **Staden, J. F., Mulaudzi, L. V., Stefan, R. I.,** 2004. Spectrophotometric determination of bromate by sequential injection analysis, *Talanta*, **64**, 1196-1202.

[12] **Boschserrat, F.,** 1997. Colorimetric determination of bromates in flours with previous extraction in N,N-dimethylformaide, *Quimica.Analitca*, **16**, 47-50.

[13] **Roman Ceba, M., Jimenez Sanchez, J. C., Galeano Diaz, T.,** 1983. Cyclopentane-1,3-dionedis(4-methylthiosemicarbazone) monohydrochloride as a spectrophotometric reagent for the determination of bromate in perchloric acid medium, *Anaytical Letters*, **16**, 593-599.

[14] **Gahr, A., Huber, N., Niessner, R.,** 1998. Fluorimetric determination of bromate by ion exchange separation and post-column derivatization, *Mikrochimica Acta*, **129**, 281-290.

[15] **Gong, G., Jia, L., Qu, Y., Wang, H.,** 1993. A fluorescence quenching method for determination of bromate ion with 4,5-dibromophenylfluorone and cetyltrimethylammonium bromide, *Anaytical Letters*, **26**, 2277-2282.

[16] **Osborne, B. G.,** 1987. Determination of potassium bromate in flour by flow injection analysis, *Analyst*, **112**, 137-139.

[17] **Xingguo, C., Xingwei, Z., Zhide, H., Zongyan, K.,** 1990. Determination of BrO_3^- by flow injection analysis with 5-Br-PADAP and SCN^-, *Analytical Letters*, **23**, 119-124.

[18] **Ketai, W., Huitao, L., Jian, H., Xingguo, C., Zhide, H.,** 2000. Determination of bromate in bread additives and flours by flow injection analysis, *Food Chemistry*, **70**, 509-514.

[19] **Takayanagi, T., Ishida, M., Mbuna, J., Driouich, R., Motomizu, S.,** 2006. Determination of bromate ion in drinking water by capillary zone electrophoresis with direct photometric detection, *Journal of Chromatography A*, **1128**, 298–302.

[20] **Johns, C., Macka, M., Haddad, P. R.,** 2000. Indirect photometric detection is widely used for the determination of large amount of ionic species, *Electrophoresis*, **21**, 1312.

[21] **Quirino, J. P., Terabe S.,** 1999. Sample stacking of fast-moving anions in capillary zone electrophoresis with pH-suppressed electroosmotic flow, *Journal of Chromatography A*, **850**, 339-344.

[22] **Albert, M., Debusschere, L., Demesmay C., Rocca J. L.,** 1997. Large-volume stacking for quantitative analysis of anions in capillary electrophoresis I. Large-volume stacking with polarity switching, *Journal of Chromatography A*, **757**, 281-289.

[23] **Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A.,** 1998. Principles of Instrumental Analysis, Saunders College Publishing, USA.

[24] **Manz, A., Pamme, N., Iossifidis, D.,** 2004. Bioanalytical Chemistry, Imperial College Press, London.

[25] **Nutku, M. S.,** 1998. İnorganik anyonların, organik asitlerin ve DNA parçalarının kapiler elektroforez ile ayrımında polielektrolit kullanımı, *Doktora Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[26] **Alemdar, İ.,** 1997. Fenollerin sulu çözeltilerden organo kil üzerinde adsorpsiyon ile zenginleştirilmesi ve kapiler elektroforez yöntemi ile tayini, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[27] **Heigher, D. N.**, 1992. High Performance Capillary Electrophoresis, Hewlett Packard Company, France.

[28] **Altria, K. D.,** 1998. Analysis of Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis, Vieweg Press, London.

[29] **Erim, F. B., Cifuentes, A., Poppe, H., Kraak, J. C.,** 1995. Performance of a physically adsorbed high-molecular-mass polyethyleneimine layer as coating for the separation of basic proteins and peptides by capillary electrophoresis , *Journal of Chromatography A,* **708**, 356-361.

[30] **Kocatürk, N.,** 2002. İnorganik anyonların kapiler elektroforez yöntemi ile tayininde yüksek tuz etkisinin incelenmesi ve deniz suyunda bromür tayini, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[31] **Kok, W., T.,** 1994. Principles of CE, CE Amsterdam Summercourse, University of Amsterdam Press, Amsterdam.

[32] **Bjergegaard, C., Michaelsen, S.,** 1999. Chromatography and Capillary Electrophoresis in Food Analysis, Paston Prepress, Denmark.

[33] **Osbourn, D. M., Weiss, D. J., Lunte, C. E.,** 2000. On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **21**, 2768-2779.

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

[35] http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/ doc_supappui /bromate / index _e.html, 05.08.2007

[36] **Oğur, R., Güler, Ç.,** 2004. 21.nci yüzyılda niçin klorlama?, *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, **3**, Ankara.

[37] http://www.stevenspublishing.com/Stevens/WWPPub.nsf/frame?open&redirect=http://www.stevenspublishing.com/stevens/wwppub.nsf/d3d5b4f938b22b6e8625670c006dbc58/ff4dd1449006111d86256d6b007c2939?OpenDocument, 08.08.2007

[38] **Kurokawa, Y., Takahashi, M., Kokubo, T., Ohno, Y., Hayashi, Y.,**1983. Enhancement by potassium bromate of renal tumorigenesis initiated by N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine in F344 rats, *Gann*, **74**, 607–610.

[39] **Kurokawa, Y., Auki, S., Imazawa, T., Hayashi, Y., Matsushima, Y., Takamura, N.,** 1985. Dose-related enhancing effect of potassium bromate on renal tumorigenesis in rats initiated with N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **76**, 583–589.

[40] World Health Organization, 1993. Guidelines for drinking-water quality. 2nd Ed. Vol. 1 - Recommendations.

[41] **Ford T. E., Colwell, R. R.,** 1996. A global decline in microbiological safety of water: a call for action, *American Academy of Microbiology*.

[42] **Regli, S., Berger, P., Macler, B., Haas, C.,** 1993. Proposed decision three management of risks in drinking water: consideration for health and socio-economic factors. In Safety of Drinking Water: Balancing Chemical and Microbial Risks, 39-80.

[43] **Altuğ, T.,** 2001. Gıda Katkı Maddeleri, Meta Basım, İzmir.

[44] **Boyacıoğlu, M. H.**, 1998. Ekmek katkı maddeleri; tanımları, işlevleri ve bazı son çalışmaları, *Gıda*, 44-52.

[45] **Boyacıoğlu, M. H.**, 2002. Bazı un katkı maddeleri ve bunlara ilişkin ülkemizdeki son gelişmeler, *Gıda*, 65-68.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Ardahan' da doğmuş aynı yıl İzmit'e yerleşmiştir. İlköğretimini İzmit' te Fevzi Çakmak ve 28 Haziran İlköğretim Okullarında, lise öğrenimini ise burslu olarak kazandığı Özel Seymen Lisesi' nde okul birincisi olarak tamamlamıştır. 1999 senesinde İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde yüksek öğrenimine başlamıştır. 2004 senesinde öğrenimini tamamlayarak Kimyager ünvanını almıştır. Aynı yıl İ.T.Ü Kimya bölümü, Analitik Kimya Anabilim Dalı' nda Kimyagerlik Yüksek Lisans programına başlamıştır. 2006 senesinde İstanbul' da bir ilaç firmasının Analitik-Geliştirme Bölümünde analist olarak çalışmaya başlamış ve halen bu görevini devam ettirmektedir.