

1997-953



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

İNSAN KEMİĞİNDE MİNÖR VE TANI ESER ELEMENTLERİN
TAYİNİ

1997-953

PROJE NO: SBAG-1533

Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu
Health Sciences Research Committee

**İNSAN KEMİĞİNDE MİNÖR VE TANI ESER ELEMENTLERİN
TAYİNİ**

1997-953

PROJE NO: SBAG-1533

**PROF. DR. NAMIK KEMAL ARAS
ARAŞ. GÖR. SELMİYE ALKAN
ARAŞ. GÖR. GÜLAY YILMAZ
DOÇ. DR. FEZA KORKUSUZ
DOÇ. DR. UĞUR GÜNEL
PROF. DR. BEHÇET SEPİCİ
DOÇ. DR. FATİH EKŞİOĞLU**

ODTÜ Kinyalı Bl. ve
Sağlık Merk.

Say. 75

Ref. 53

**ŞUBAT 1998
ANKARA**

TEŞEKKÜR

Türkiye için önemli olduğuna inandığımız bu projeyi desteklediği için TUBİTAK SBAG grubu üyelerine teşekkür ederiz.



Namık K. ARAS

1. 12.1997

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	1
ÖNSÖZ	9
ÖZET	10
ABSTRACT	11
1.1.Kemiğin Yapısı	12
1.2. Kemikte Eser Element Tayininin Önemi.....	13
1.3. Kemik Yapısında Yer Alan Minor ve Eser Elementlerin Kemik Metabolizmasındaki Rollerini	14
1.3.1.Kalsiyum	14
1.3.2.Bakır	14
1.3.3.Çinko	15
1.3.4. Magnezyum	15
1.3.5. Sodyum.....	16
1.3.6.Potasyum	16
1.3.7. Florür	16
1.4. Osteoporoz.....	17
BÖLÜM II	19
DENEYLER	19
2.1. Kemik Numunelerinin Alınması	19
2.2. Kemik Numunelerinin Analiz İçin Hazırlanması	19

2.3. Numunelerin Çözülmesi	21
2.4. Kemik Numunelerinde Minor ve Eser Element Tayinleri	22
2.5. Bakırın Grafit Fırın Atomik Absorpsiyon (GFAAS) ile tayini	22
2.5.1. Bakır İçin Deneysel Şartların Optimum Hale Getirilmesi	23
2.6. Ca, Mg, Zn, Na ve K ' nın FAAS ile Tayinleri	26
2.7. Aletli Nötron Aktivasyon Yöntemi	28
2.7.1. MIT'de Yapılan Deneyler	30
2.7.2. Türkiye'de yapılan deneyler	31
2.7.3. İstanbul Teknik Üniversitesinde TRIGA MARK-II Reaktöründe Işınlama	32
2.7.4. Numunelerin Analizi	34
2.8. Florürün İyon Seçici Elektrot (ISE) ile Tayini	39
2.8.1. Deneysel Parametrelerin Belirlenmesi	39
2.8.2. İyon Seçici Elektrot ile Kemik Numunelerinde Florür Tayini için Kullanılan İşlem	40
BÖLÜM III	41
BULGULAR VE TARTIŞMA	41
3.1. Atomik Absorpsiyon Spektrometrisi	41
3.1.1. Cu, Ca, Na, K, Mg, Zn elementlerin kemikteki miktarları ve bunların diğer parametrelerle bağlantıları	41
3.1.1.1. Hayvan Kemikleri	41
3.1.1.2. NIST SRM 1486-Bone Meal	42
3.1.1.3. İnsan Kemikleri	44
3.2. INAA	49
3.3. Kemikte İyon Seçici Elektrot Kullanılarak Florür Tayini	56
3.3.1 Flor İyon Seçici Elektrotu Ölçümlerindeki Bazı Önemli Parametrelerin Optimizasyonu	56

3.3.2 Ölçümlerin Güvenirliliği	63
3.3.3 Femur Başı'ndan Alınan Kemik Numunesinde Florür Tayini	65
3.3.4 Kemik Numunelerinde Florür Konsantrasyonu Sonuçları	66
3.3.5 Florür Konsantrasyonu ile Yaş Arasındaki İlişki	68
SONUÇ	69
REFERANSLAR	70

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 1.1. Kalsiyum hidroksiapatit ve kemiğin anorganik yapısını oluşturan diğer iyonlar	12
Şekil 2.1 Bakır standard çözeltisi ve NIST SRM 1486-Bone meal için kütleme eğrisi	24
Şekil 2.2.NIST SRM-1486 için kütleme ve atomlaşma eğrileri	25
Şekil 2.3. CsCl 'nin potasyum sinyaline etkisi	27
Şekil 2.4. CsCl 'nin sodyum sinyaline etkisi	28
Şekil 2.5. (n, γ) reaksiyonu ve onu izleyen β^- parçalanma şeması	29
Şekil 2.7.Kemik numunelerinin ışınlama ve sayım çizelgesi	33
Şekil.2.8 2.5 saat ışınlama dan 19 gün sonra 8 saat sayım sonucu elde edilen NBS 1486 Bone Meal Standart gama ışını spektrumu (100-700 keV)	35
Şekil 2.9 2.5 saat ışınlama dan 19 gün sonra 8 saat sayım sonucu elde edilen NBS 1486 Bone Meal Standart gama ışını spektrumu (700-1600 keV)	35
Şekil 2.10. 2.5 saat ışınlama dan 19 gün sonra 8 saat sayım sonucu elde edilen SeD-C kemik numunesi gama ışını spektrumu (100-700 keV)	36
Şekil 2.11. 2.5 saat ışınlama dan 19 gün sonra 8 saat sayım sonucu elde edilen SeD-C kemik numunesi gama ışını spektrumu (100-700 keV)	36
Şekil 2.12. 6 saat ışınlama dan 8 gün sonra 8 saat sayım sonucu elde edilen HB-C kemik numunesi gama ışını spektrumu (100-1900 keV)	37
Şekil 2.13. 6 saat ışınlama dan 82 gün sonra 17 saat sayım sonucu elde edilen HB-C kemik numunesi gama ışını spektrumu (100-1900 keV)	38
Şekil 3.1. Beş farklı tampon için 10^{-3} - $5 \cdot 10^{-7}$ M arasındaki kalibrasyon grafiği (pH=5.5, 1:1 seyreltme)	56
Şekil 3.2.Kemik matriksinde iki tampon çözeltisinde çizilen kalibrasyon eğrileri (pH=5.5, 1:1 seyreltme)	57
Şekil 3.3. IUPAC tarafından tavsiye edilen görünebilirlik sınırı	58
Şekil 3.4.TISAB-II seyreltme oranının sinyal üzerindeki etkisi	59
Şekil 3.5.TISAB-II tampon çözeltisi ortamında farklı flor konsantrasyonlarında pH'nın sinyal üzerindeki etkisi	60
Şekil 3.6.Farklı flor konsantrasyonlarında zamana bağımlı olarak potansiyeldeki değişim grafiği	61

Şekil 3.7. Al, Fe(III) ve Mg'un TISAB-II ortamında $4.44 \cdot 10^{-4}$ M F konsantrasyonu içeren çözeltilerdeki % flor kazanımı grafiği.....	62
Şekil 3.8 Flor Konsantrasyonu vs. yaş grafiği	68

TABLULARIN LİSTESİ

Tablo 2.1. Kemik numunesi alınan kişiler hakkındaki bilgiler	20
Tablo 2.2. Bakırın GFAAS ile tayininde kullanılan deneysel koşullar	23
Tablo 2.4. Ca, Mg, Zn, Na, K nin FAAS ile tayininde kullanılan deney koşulları.....	26
Tablo 2.5. SRM 1486 Bone Meal Element Konsantrasyonları (IAEA,1995)	31
Tablo 2.6. Yedi gün sonraki sayımda gözlenen izotoplar.....	33
Tablo 3.1. Hayvan kemiklerindeki minor ve eser element derişimleri.....	41
Tablo 3.2. Elementlerin NIST SRM 1486-Bone meal'daki miktarları.....	43
Tablo 3.3. Elementlerin NIST SRM 1486-Bone Meal'deki derişimleri ile sertifikalanmış ve diğer bir çalışmadaki derişimlerinin kıyaslanması	43
Tablo 3.4. Elementlerin insan kemikleri içindeki derişimleri-Kortikal kısım.....	45
Tablo 3.5. Elementlerin insan kemikleri içindeki derişimleri-Trabeküler kısım.....	46
Tablo 3.6. Kemikte minor ve eser elementlerin tayinine ilişkin literatürdeki çalışmalar (Iyengar et al.,1997)	47
Tablo 3.7. Kemikte minor ve eser elementlerin trabecular/kortikal oranlarının 12 insan kemiği için Robertson (1992) çalışması ile kıyaslanması. Bu çalışmada ilyak kanat, Robertson'un çalışmasında ise kaburga kemikleri kullanılmıştır.	48
Tablo 3.8. AAS ile tayin edilen Ca, Na, K ,Zn 'nin, INAA ile kıyaslanması-kortikal kısım.....	48
Tablo 3.9. AAS ile tayin edilen Ca, Na, K, Zn 'nin, INAA ile kıyaslanması-trabekular kısım.....	49
Tablo 3.10. Dört dış kemik numunesinde birinci ve ikinci sayımlara göre elde edilen sonuçlar	50
Tablo 3.11. Dört iç kemik numunesinde birinci ve ikinci sayımlara göre elde edilen sonuçlar	50
Tablo 3.12. Trabeküler sonuçlarının Kortikal sonuçlarına olan oranları.....	51
Tablo 3.13. Beş tane kortikal kemik numunesindeki sonuçlar	52
Tablo 3.14. Beş tane trabeküler kemik numunesindeki sonuçlar	54
Tablo 3.15. Al, Fe ve Mg varlığında TISAB-II ve TISAB-II tamponunun bulunmadığı 63 çözeltilerde yüzde flor kazanım sonuçları	63

Tablo 3.16. Al, Fe ve Mg konsantrasyonları, (100 mg kemik 25 mL hacimde).....	63
Tablo 3.17 Flor elektrodu ile analiz edilen SRM 1486 Bone Meal sonuçları	64
Tablo 3.18. SRM 1486 Bone Meal' da flor konsantrasyon sonuçları (mg/kg). (n analiz edilen numune sayısı).....	64
Tablo 3.19. Orion standardında ISE kullanılarak elde edilen flor konsantrasyonu sonuçları (mg/L).....	64
Tablo 3.20. Femur Başından alınan numunede flor konsantrasyonu sonuçları (mg/kg).....	65
Tablo 3.21 Kortikal kemik numunelerinde flor konsantrasyonları sonuçları (mg/kg) ...	66
Tablo3.22 Trabeküler kemik numunelerinde flor konsantrasyonları sonuçları (mg/kg) .	67
Tablo 3.23 Trabeküler ve Kortikal kemik numunelerindeki sonuçlar (mg/kg). (n analiz edilen numune sayısı).....	67
Tablo 3.24 Trabeküler flor konsantrasyonunun kortikale olan oranları	68

ÖNSÖZ

TUBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubunun SBAG-1533 nolu proje ile desteklenen "Kemikte Eser Elementler ve Bunun Osteoporoz ile İlişkisi" adlı proje 1.1.1996 tarihinde başlamış ve çalışmaların bu kısmı 1.8.1997 de tamamlanmıştır. Bu süre içinde kemikte Cu, Mg, Na, K, Ca, Zn elementleri için AAS, F için iyon seçici elektrodu, 20'ye yakın element için ise Nötron Aktivasyon Analizi, tayin metodları geliştirilmiş ve 8 hayvan, 12 insan kemiğinin trabeküler ve kortikal kısımlarında bu tayinler gerçekleştirilmiştir.

ÖZET

Kemik kalsiyum, fosfor, sodyum, potasyum, flor ve diğer vücut için gerekli olan elementler için önemli bir depodur. Kemik hastalıklarının anlaşılmasında bu elementlerin rolü ve konsantrasyonlarındaki değişiklikleri takip etmek son yıllarda oldukça ilgi toplamaktadır. Bu elementlerin azlığı ya da çokluğu osteoporoz gibi kemik hastalıklarının gelişiminde önemli rol oynadığı sanılmakta, böylelikle kemikte eser elementlerin tayini oldukça önem kazanmaktadır.

Kemikte pek çok eser element Aletli Nötron Aktivasyon (INAA) ve Atomik Absorbsiyon (AAS) yöntemleri ile, flor ise iyon seçici elektrod ile tayin edilmiştir. Kemik numuneleri osteoporoz hastalığı dışında travma nedeniyle kemiğe yönelik cerrahi girişimde bulunan kişilerin ilyak kanat kısımlarından alınmıştır. Kemiğin iç ve dış kısımları birbirinden ayrılmış ve ayrı ayrı analiz edilmişlerdir. Yüzey kirlenmelerini temizlemek için %5'lik sitrik asit çözeltisi; kan için %5'lik glikoz çözeltisi; yağ ve kas için de dietileter kullanılmıştır. Kemik numuneleri sıvı azot içerisinde dondurulmuş ve daha sonra dövülerek küçük parçalara ayrılmıştır. Homojen hale getirilmiş toz halindeki kemik numunelerinin bir kısmı, İstanbul Teknik Üniversitesi Nükleer Enerji Enstitüsü'nde bulunan Triga Mark-II ve MIT reaktörlerinde ışınlanmışlardır. Ca, Na, Br, Fe, Zn, Ba, Cr, Sr, K, ve Se konsantrasyonları hesaplanmıştır. Diğer yandan, toz haline getirilmiş kemik numunelerinin herbirinden yaklaşık 100 mg olarak alınan örnekler, sabit ağırlığa ulaşıncaya kadar kurutulmuş ve 1+1(v/v) nitrik asit çözeltisiyle mikrodalga fırında çözülmüş ve uygun hacme seyreltilmiştir. Herbir örnek için en az iki tane paralel numune hazırlanmış ve standard ekleme yöntemi kullanılmıştır. Kalsiyum, magnezyum ve çinko Alevli Atomik Absorbsiyon Spektrometri (FAS), sodyum ve potasyum Alevli Emisyon Spektrometri (FES), bakır ise Grafit Fırın Atomik Absorbsiyon Spektrometri ile (GFAAS) tayin edilmiştir. Kemikte florür konsantrasyonu ise iyon seçici iyon elektrodu kullanılarak tayin edilmiştir. Çözeltinin iyon gücü en uygun şekilde ayarlanarak 12 trabeküler ve 12 kortikal kemikte florür tayini yapılmıştır. Bu metodlar kullanılarak 25'e yakın elementin konsantrasyonunu tayin edilmiş ve aralarındaki ilişkiler incelenmiştir.

ABSTRACT

The determination of minor and trace elements in bone is of considerable interest because bone serves as important storage areas for calcium, phosphorous, sodium, potassium, fluorine and other essential elements for the body. Excess or deficiency of these elements has a role in the development of bone diseases such as osteoporosis, therefore, research on trace elements in bone is very important.

Most of the trace elements in bone were determined by Instrumental Neutron Activation Analysis (INAA) and Atomic Absorption Spectrometry (AAS) and fluorine was determined by using ion selective electrode (ISE). Bone samples were obtained from twelve persons undergoing orthopedic surgery due to any reason other than osteoporosis. The cortical and trabecular parts were separated and analyzed separately. For the removal of possible surface contamination 5% citric acid solution; for blood 5% glucose solution; for fat and muscle diethyl ether were used. The bone samples were frozen with liquid nitrogen and then grounded. Some of the ground samples were irradiated at Triga Mark-II in ITU Nuclear Energy Institute and MIT reactors. The Ca, Na, Br, Fe, Zn, Ba, Cr, Sr, K, and Se concentrations were determined.

In addition to that, some of the ground bones (100 mg) were dried until the constancy in weight was achieved and dissolved in 1+1(v/v) nitric acid solution in a microwave oven. Bone digests were diluted to volume. Two or three replicates were prepared for each samples. Calcium, magnesium and zinc were determined by Flame Absorption Spectrometry (FAS), sodium and potassium were determined by Flame Emission Spectrometry (FES) and copper was determined by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GFAAS). Methods of standard addition was used for the determination of each element. Fluoride concentrations in 12 trabecular and 12 cortical bones were determined by ion selective electrode method. Using all these method, the concentration of more than 25 elements in cortical and trabecular bones were determined and their relations were investigated.

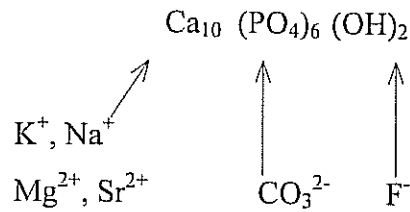
BÖLÜM I

GİRİŞ

1.1.Kemiğin Yapısı

Kemik, vücuda mekanik destek sağlayan ve kalp, beyin gibi pek çok önemli organı koruyan bir yapıdır. Vücuttaki kalsiyum ve fosfatın önemli bir kısmını içermesinin yanında pekçok eser elementi de yapısında bulundurur. Kemiğin önemli bir kısmı kollajen proteinlerinden; inorganik kısmı ise kalsiyum fosfattan oluşmuştur (Boskey et al.,1990).

-Inorganik faz: Kemiğin bu kısmı kalsiyum hidroksiapatit'den $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ oluşmaktadır. Saf kalsiyum hidroksiapatitte % 40.3 Ca, % 18.4 P bulunmaktadır. Bu da ağırlık oranı Ca:P=2.16 ve mol oranı Ca:P= 1.67 sonucunu vermektedir (Hancock et al., 1987). Şekil 1.1'de görüldüğü gibi kalsiyum hidroksiapatitte bulunan karbonat gibi iyonlar fosfat ile, florür veya klorür gibi iyonlar hidroksit ile, potasyum, sodyum, magnezyum ve bazı diğer iyonlar ise kalsiyum ile yer değiştirerek çözünürlük, kristalleşme gibi fiziksel özelliklerin değişmesine yol açmaktadırlar.



Şekil 1.1. Kalsiyum hidroksiapatit ve kemiğin anorganik yapısını oluşturan diğer iyonlar

-*Organik faz:* Organik yapı, kemiğin biyokimyasal yapısını oluşturan kısımdır. Organik yapının yaklaşık olarak % 90' ı kollojen, % 5 kadarı da kollojen olmayan proteinlerden oluşmuştur.

Kemiğin yapısı ve bileşimi, yaş, beslenme durumu ve diğer pekçok faktöre bağlı olarak kişiden kişiye farklılıklar gösterebilir. Yetişkin bir insan vücudundaki kemikler, yapısal özellikler (sertlik, gözeneklilik, yumuşak dokuların azlığı ya da fazlalığı) açısından farklılıklar gösteren iki kısımdan oluşur; kortikal ve trabeküler kısımlar. Kortikal kısım, kemiğin dışını saran, yoğun ve sert kısımdır. Trabeküler kısım ise içte yer alan, gözenekli kısımdır. Kemiğin, yaklaşık olarak % 75-85'lik bir kısmını kortikal kısım, kalanını ise trabeküler kısım oluşturur. Fakat, bu oran, iskeletin farklı kısımlarında değişiklik gösterebilir.

1.2. Kemikte Eser Element Tayininin Önemi

Kalsiyum, fosfor, sodyum, potasyum, flor ve daha pek çok element için kemik önemli bir depodur. Bu nedenle de kemikte yer alan elementlerin miktarlarının bulunması oldukça önemlidir. Son yıllarda bu elementlerin çeşitli kemik hastalıklarının oluşmasındaki rolleri, bu hastalıkların oluşumundan sonraki dönemde miktarlarındaki değişiklikler merak konusu haline gelmiştir. Bu elementlerin eksiklikleri veya fazlalıkları osteoporoz gibi pek çok kemik hastalığının oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Bu nedenlerle, kemikteki eser elementlerin tayini diet veya biyolojik maddelerde yapılan çalışmalar kadar önem taşımaktadır. Kemik, dış etkilerin vücut metabolizmasındaki etkilerini gözlemlemek ve pek çok hastalığın erken teşhisinde anlamlı bir araç olabilir. Eser elementler ile eser elementlerin konsantrasyonlarındaki değişikliklerin yaratacağı sağlık problemleri arasında bağıntı kurabilmek için normal insandaki eser element konsantrasyonlarının bulunması gerekir.

1.3. Kemik Yapısında Yer Alan Minor ve Eser Elementlerin Kemik Metabolizmasındaki Rollerini

Kemik yapısında yer alan pekçok element, kemik oluşumu ve metabolizmasında önemli roller üstlenmiştir. Bu elementlerden yalnız birkaçının önemi aşağıda verilmiştir.

1.3.1.Kalsiyum

Kemik, vücuttaki kalsiyumun yaklaşık olarak % 98-99'unu içerir. Kemikteki kalsiyumun fosfora kütlece oranı yaklaşık olarak sabit olup, 2:1 olarak gösterilebilir (Helfrich et al., 1991). Kalsiyum ve fosforun yerdeğıştirmeleri, kan aktarımı ve vücudun diğer kısımlarına iletilmeleri sayesinde, kemik sürekli olarak yapılır. Fakat, bu yapılanma esnasında bir dengesizlik olduğunda, kemik zayıf ve kırılğan bir hal alıp dayanıksızlaşır (Klepinger et al, 1984).

Vücuda yeterince kalsiyum alınması, kemik yoğunluğunu uygun bir seviyede tutmak bakımından önemlidir. Yaş ilerledikçe, özellikle, 50'li yaşlardan sonra, kemik yoğunluğu azalmaya başlamakta, buna bağılı olarak kemiğin sağlamlığı azalmakta ve kırık riski artmaktadır (Horwood et al.,1989).

1.3.2.Bakır

Bakır, insan vücudunda demir ve çinkodan sonra en yaygın olarak bulunan üçüncü eser elementtir. Bakır, biyolojik dokularda enzim rolü üstlenen organik kompleksler formunda bulunur. Bakır enzimleri, hücre solunumu için gerekli oksijeni ve enerjyi sağlayan metabolik reaksiyonlarda yer alır. Aynı zamanda iskelet dokusunu ve kan damarlarını oluşturan proteinlerin sentezinde rol alırlarlar.

Yetişkin bir insan vücudunda, yaklaşık 50-120 mg bakır bulunduğu sanılmaktadır. Bu miktarın önemli bir kısmı karaciğer, beyin, böbrek ve kalp gibi organlarda toplanmıştır. Doku seviyesinde ise, kas ve kemik dokularının en çok bakır içerdikleri saptanmıştır.

Vücuttaki bakırın yaklaşık olarak %'50'lik kısmı kemik dokusunda toplandığı ve kemik oluşumunda, özellikle de kemiğin önemli bir kısmını oluşturan kalsiyum, magnezyum ve çinko gibi diğer elementlerle birlikte önemli rol üstlendiği bilinmektedir. Bunlara ilaveten, bakırın kan damarı duvarlarında koruyucu olarak yer aldığı da sanılmaktadır.

Bakır eksikliği durumunda anemi, saç ve deri bozuklukları, iskelet oluşumunda düzensizlikler ve bunun sonucunda da osteopenia ve osteoporoz gibi kemik hastalıkları gözlenmektedir. Hayvanlarda ise temel belirtiler bacak yapısında bozukluklar, kemik kalsifasyonunda gözlenebilen birtakım bozukluklardır (Saltzman et al, 1990). Vücutta, bakır gerekenden fazla alınır ise damar sertliği, tansiyon düşüklüğü, karaciğer bozuklukları gözlenebilir (Norval et al.,1978).

1.3.3.Çinko

Çinko, vücuttaki pekçok metabolik olayda yer alan enzimlerin yapısında bulunur. Normal bir insan vücudunda yaklaşık 2.2 g çinko vardır. Çinko epidermal dokularda, deride, saçta fazla miktarda bulunur. Kemikte bulunan çinkonun önemli bir kısmı vücutta ve dokularda kullanıma elverişsizdir. Özellikle, kemik ve beyin hücrelerindeki çinkonun vücuda yayılımı yavaş olmakta ve depolama işlemi oldukça uzun yıllar sürmektedir (Saltzman et al., 1990).

Çinko eksikliği durumunda, çeşitli kemik bozuklukları gözlenmektedir. İskelet yapısında ve gelişiminde birtakım bozukluklar, uzun kemiklerin kısalması, kemiklerde incelme gibi belirtilere de rastlanabilir (Hedrich et al, 1989).

1.3.4. Magnezyum

Vücuttaki magnezyumun yaklaşık olarak %60-65'i iskelette yer almaktadır. Magnezyumun hücre oluşumunda yer aldığı, kemik yapısında bulunduğu gözlenmiştir. Magnezyumun, %70'inin vücuttaki kalsiyum ile yer değiştirdiği bilinmektedir. Magnezyum, kemikteki hem mineral kısmın hem de kemik matriksinin metabolizmasını

etkiler. Kemikteki magnezyum miktarı pek çok faktöre bağılı olarak değişmektedir. Kemiğin gelişimi, yapısal bütünlüğü ve kemik oluşumunda magnezyumun rol aldığı bilinmektedir (Szefer et al., 1986).

1.3.5. Sodyum

Kemikte sodyum fazla miktarda vardır. Kemikten kemiğe değişmekle birlikte, kortikal kemiğin trabeküler kemikten daha çok sodyum içerdiği, kemik gelişimi ve yapılanmasında rol aldığı bilinmektedir (Gil et al.,1993). Kemikte, Na/Ca oranının yaklaşık olarak sabit olduğu sanılmaktadır.

1.3.6.Potasyum

Potasyum, insan vücudunda, özellikle kas ve deri hücrelerinde fazla miktarlarda bulunmaktadır. Ayrıca, kan ve sinir hücrelerinde de önemli miktarlarda bulunduğu bilinmektedir. Kemik yoğunluğunda azalma, ayakların kullanımında zorluklar, özellikle tavuklarda ayakta durabilme zorluğu, reflekslerde azalma, kasların yumuşaması potasyum azlığı durumunda gözlenebilen rahatsızlıklardan bazılarıdır (Lambert et al.,1989).

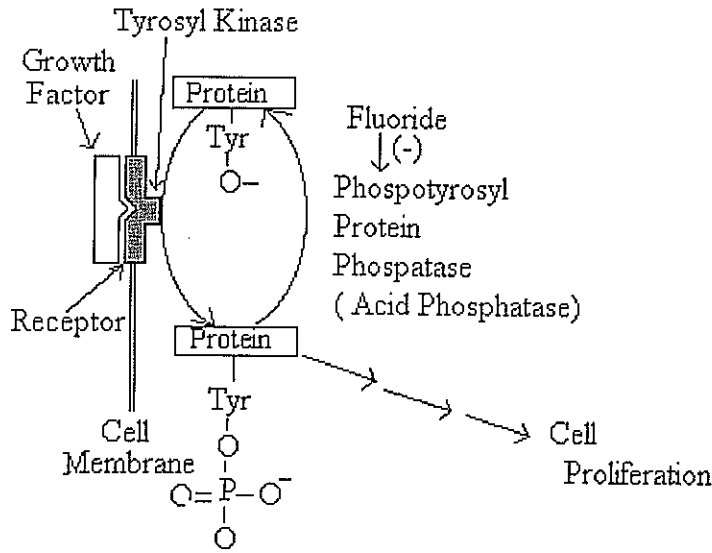
1.3.7. Florür

Flor osteoporoz tedavisinde kemik formasyonunu artıran, pratik kullanımı olan bir elementtir. Florun kemik üzerine olan etkileri şu şekilde özetlenebilir:

- F⁻ un antirezorptif etkisi vardır. Çünkü F kemiğin kristal yapısındaki hidroksiapatitdeki OH iyonları yerine geçerek fluoroapatit oluşturur ve kristalleşmeyi artırır. Böylece kemik minerallerinin eriyebilirliklerini azaltarak onları rezorpsiyona dayanıklı hale getirir (Abdulla et al, 1989).

- F kuvvetli osteojenik bir etkiye sahiptir. Çünkü fluoroapatit kristalleri normal hidroksiapatite göre daha kuvvetli piezoelektrik akımlar yaratır ve mekanik güç bölgelerinde, osteoplastların osteojenik aktivitesini ve aktivasyonunu artırır.

- F osteoplastta özel asit fosfatazları inhibe eder. Bu da osteoplasttaki fosfotid protein düzeylerini artırır. Bu yolla osteoplastların kemik yapıcı ve mitojenik aktivitelerini artırır (Şekil 1.2) (Gruber and Baylink, 1991).



Şekil 1.2 .Florürün osteoplastlar üzerindeki mitojenik etkisi

1.4. Osteoporoz

Osteoporoz, kemiklerin mineral içeriklerinin azalması sonucu oluşan ve genellikle kırıklarla seyreden bir hastalıktır. Yaşlanma ile kemiklerin mineral içerikleri doğal olarak azalmaktadır. Ancak özellikle bayanlarda, menopoz sonrası dönemde bu azalma çok daha belirgin olmaktadır (Sheldon, 1994).

Osteoporoz, kemik kitlesinin azalması ile giden bir hastalık olduğuna göre tanı için kitledeki azalmayı göstermek gerekir. Bu amaçla ilk önce foton absorpsiyometre kullanılmıştır. Radyoizotoplar, dokulardan geçerken önceden hesaplanabilen şiddette

monokromatik radyasyon yayarlar. Bu tip bir radyasyon ışını bir ekstremiteyi geçerken radyasyonun Őiddet kaybı kemik mineral kapsamına bağlıdır.

Bu çalışmada kemik mineral yoğunluklarının ölçümünde ift X-Ray Kaynaklı Absorbsiyometre, DEXA kullanılmıştır. Metodun esası, farklı enerji radyasyonlarının dokular tarafından farklı emilmesidir (Mazess and Barden, 1989; Nordin, 1994).

BÖLÜM II

DENEYLER

2.1. Kemik Numunelerinin Alınması

Bu çalışmada, 12 tane insan kemiği (kortikal ve trabeküler kısımları ayrı olarak) ve 8 tane hayvan kemiği analiz edilmiştir.

İnsan kemikleri, travma nedeniyle ameliyata alınan yaşları 15-50 arasında değişen 8 erkek ve 4 kadın hastadan, özel osteotomlar kullanılarak ortopedistler tarafından yaklaşık olarak 3-5 gram olarak alınmıştır. Kemiklerin alındığı bölge, kalça kemiğinin ilyak kanat kısmıdır. İlyak kanat, element analizi açısından en uygun kemik olma özelliği taşır. Bunun belli başlı sebepleri şu şekilde sıralanabilir. Element içeriği açısından hemen hemen homojen bir bileşim göstermesi, kortikal ve trabeküler kısımlarının birbirinden kolaylıkla ayrılabilmesi ve graft alınan hastalarda herhangi bir problem teşkil etmemesidir. (Gawlik et al., 1982).

2.2. Kemik Numunelerinin Analiz İçin Hazırlanması

Kemik numuneleri, hastalardan alındıktan hemen sonra daha önceden seyreltik nitrik asit ve deionize su ile iki defa temizlenmiş polietilen torbalar içerisine yerleştirilmiş ve diğer işlemler yapıncaya kadar -20 ° C deki derin dondurucuda bekletilmiştir.

Kemikteki eser elementlerin tayininden önce kas, yağ ve kandan arındırılması çok önemlidir. Çünkü bazı elementler kemikten çok bu kısımlarda bulunabilir, örneğin demirin kanda bol miktarda bulunuşu gibi. Kemiğin iç ve dış kısımları, osteotom yardımıyla birbirinden ayrılmış ve üzerinde bulunan yumuşak dokular, kas ve yağ mekanik olarak mümkün olduğunca temizlenmiş, bu işlemin bitiminde numuneler, daha küçük parçalara ayrılmış ve tartılmıştır.

Tablo. 2.1.1. Kemik numunesi alınan kişiler hakkındaki bilgiler

İsim	Cinsiyet	Yaş	Kilo (kg)	Boy (cm)	BMD (g/cm ²)				Ameliyat Tarihi	Ameliyat Nedeni
					(L1-L4)	Hip (Neck)	Hip (Ward)	Hip (Troek)		
SeD	E	15							6.12.1995	Mal-union of the right femur
MD	E	25	80	170	1.301	1.119	1.268	0.972	22.5.1995	Tibial Fracture
CS	E	29							26.3.1996	Mal-union of the left femur
AA	E	31	85	170	1.364					Giant cell tumor of the wrist
YG	E	36	57	173	0.921	0.788	0.646	0.629	4.9.1995	Pseudoarthrosis of the humerus
FD	E	40	65	160	0.910	0.924	0.771	0.915	12.10.1995	Radius-Ulna fracture
NO	E	41	64	175	1.347	1.017	0.825	0.814	2.5.1995	Radius-Ulna fracture
AD	E	43							10.6.1996	Fracture of the left ulna
SD	K	47	93	168	1.180	0.954	0.891	0.881	14.10.1995	Pseudoarthrosis of the left Ulna
HB	K	17	58	160	1.094				6.10.1995	Solitary bone cyst of the calcaneus
ZK	K	50	75	150	0.891	0.756	0.593	0.635	20.3.1995	Pseudoarthrosis of the radius and ulna
UT	K	30							10.7.1996	Fracture of the left femur

Kemikte bulunan kan, kas, yağ, et ve yumuşak dokuların kemikten temizlenmesi için aseton, metanol, etanol, hidrojen peroksit, dietileter, acetone-etanol ve deiyonize su gibi çözücüler veya çözücü karışımları denenmiştir. Kemik numuneleri, bu çözücü ve çözücü karışımlarında, ultrasonik karıştırıcı kullanılarak karıştırılmış ve en iyi sonuçlar kanın temizlenmesi için deiyonize su ile ve yağın, kasın, yumuşak dokuların temizlenmesi için ise dietileter ile elde edilmiştir. Ardından, yüzeyde meydana gelebilecek herhangi bir kirlenmeyi ortadan kaldırmak için, hem iç hem de dış kısmı, %5'lik sitrik asit çözeltisinde 30 saniye boyunca ultrasonik bir karıştırıcıda bekletilmiştir. Daha sonra kemik numunelerinden kanın temizlenmesi için, %5'lik glikoz çözeltisi kullanılmıştır. Bu işlem, 1 saatlik periyotlar halinde ultrasonik karıştırıcı kullanılarak 6 kez tekrarlanmış ve her seferinde çözelti değiştirilmiştir. Kanın temizlenmesi için %5'lik glikoz çözeltisi kullanılmıştır. Bunun nedeni, hücrelerin deiyonize su ile dolup, ardından osmotik basınç sebebiyle şişip, patlamasına engel olmaktır.

Kemik numunelerinden, kas ve yağın temizlenmesi için dietileter kullanılmıştır. Bu işlem 15 dakikalık periyotlar halinde ultrasonik karıştırıcı kullanılarak 2 kez tekrarlanmış ve her seferinde çözelti değiştirilmiştir. Bu işlemlerden sonra, kemik numuneleri, 3 saat süreyle 60°C de bir fırın içinde kurutulmuştur.

Daha sonra, kemik numuneleri, önce dewar bir kap içindeki sıvı azotta yaklaşık 30 dakika soğutulmuş ve ardından teflon bir dövücü kullanılarak toz haline getirilmiştir. Kemik numuneleri, analiz anına kadar -20°C 'de, iç ve dış kısımları ayrı ayrı polietilen torbalar içinde bekletilmiştir.

2.3. Numunelerin Çözülmesi

Eser elementlerin nötron aktivasyon analizi ile tayininde katı numuneler, AAS ve ISE ile Florür tayininde ise çözülmüş numuneler kullanılmıştır. Temizlenip, toz haline getirilen insan kemikleri, (1+1,v/v) nitrik asit içerisinde mikrodalga fırın kullanılarak (Westinghouse, mutfak tipi), 8 dakika, % 80 güç altında PTFE bombalarda çözülmüştür.

Ardından, 10 mL' lik balon jöjelerde, deiyonize su ile seyreltilmiş ve polietilen şişelere boşaltılmış ve analiz zamanına kadar, buzdolabında saklanmıştır. Bu yolla, aynı şartlarda, herbir insan kemiğinden en az 2 tane paralel örnek hazırlanmıştır. Bu işlem kemiğin, hem kortikal hem de trabeküler kısımları için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

Hayvan kemiklerinin, analiz için hazırlanmasında insan kemikleriyle tamamen aynı yol izlemiştir. Analiz esnasındaki tek farklılık, hayvan kemikleri kortikal ve trabeküler kısımları birbirinden ayrılmadan, bütün olarak analiz edilmiştir. Bu amaç için, kasaptan temin edilen hayvan kemiği, aynı yolla temizlenmiş, kurutulmuş ve toz haline getirilmiş ve toz halindeki bu kemikten 8 tane paralel örnek (yaklaşık olarak aynı miktarda tartılıp, nitrik asit içinde çözülerek) hazırlanmıştır.

2.4. Kemik Numunelerinde Minor ve Eser Element Tayinleri

Yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan ve toz haline getirilen numunelerde eser element analizi için AAS, INAA ve ISE metodları kullanılmıştır. Tek bir metodla istenilen bütün elementlerin tayini mümkün olmadığı ve kalite kontrolü bakımından değişik metodlarla aynı elementin analiz edilerek sonuçların karşılaştırılması için AAS ve NAA metodları seçilmiştir.

2.5. Bakırın Grafit Fırın Atomik Absorpsiyon (GFAAS) ile tayini

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, kemikte bakır tayini için FAAS, ICP-AES veya PIXE metodlarının kullanıldığı görülmüştür. Bu yöntemlerden yalnızca GFAAS ve FAAS laboratuvarlarımızda var olduğu için öncelikle hangisinin uygun olduğu saptanmıştır. Kemikte bakır miktarı az olduğu ve bu çalışmada kullanabilecek insan kemiği miktarı sınırlı olduğu için FAAS yöntemi ile bakır görülememiştir. Bu sebeple GFAAS yöntemi kullanılmıştır.

Bakır tayinleri, GFAAS yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Philips PU 9200 AA spektrometre, PU 9390 atomlaştırıcı ve PU 9380 otomatiksampler kullanılmış ve Epson X-850 yazıcı ile de absorpsiyon sinyalleri ve diğer deneysel veriler yazılmıştır. Bakır tayini esnasında kullanılan deneysel koşullar Tablo 2.2'de verilmiştir.

2.5.1. Bakır İçin Deneysel Şartların Optimum Hale Getirilmesi

GFAAS ile bakır tayininde ilk ve en önemli aşama en uygun fırın programının saptanması olmuştur. Bu amaçla sırasıyla kurutma, kütleme, atomlaştırma basamakları optimum hale getirilmiştir.

Kurutma basamağının optimum hale getirilmesi

Kurutma basamağında, çözücünün örnek çözeltisinden buharlaştırılarak uzaklaştırılması hedeflenmektedir. Bu basamağın, hem çözücünün tümünü uzaklaştıracak kadar yavaş olması gerekirken, diğer yandan örnek parçacıklarının kaybedilmesine yol açacak kadar yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmemesi gerekmektedir. En uygun kurutma sıcaklığını belirlemek amacıyla, örnek çözeltisinin grafit tüp içindeki yayılımı bir dışı aynası yardımıyla izlenmiştir. Sırasıyla, blank, standart bakır çözeltisi ve NIST SRM 1486-Bone meal enjekte edilmiş ve 110 °C ve 30 saniye'nin uygunluğu tespit edilmiştir.

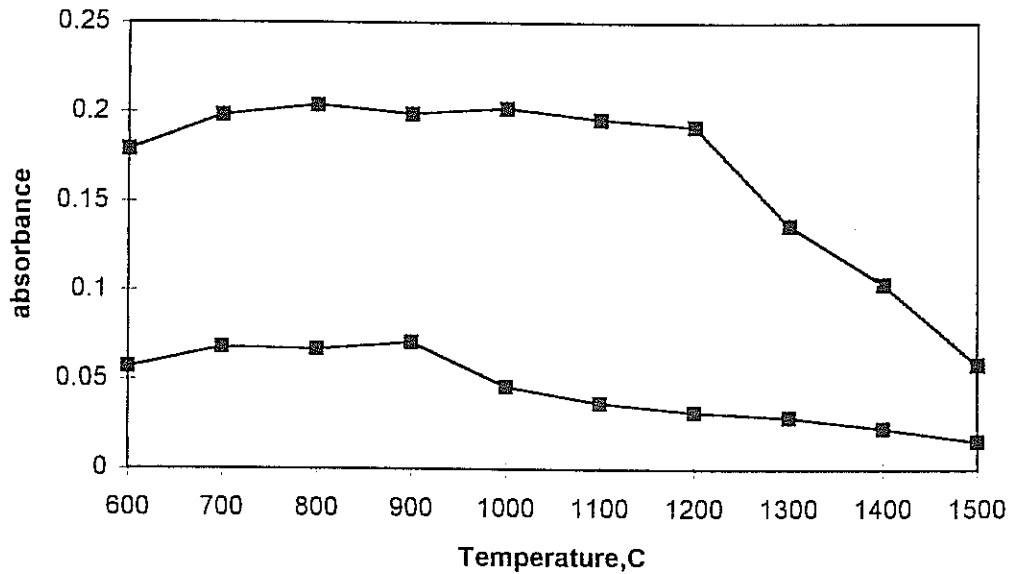
Tablo 2.2. Bakırın GFAAS ile tayininde kullanılan deneysel koşullar

Tüp	Dalga boyu (nm)	Yarık genişliği (nm)	Örnek miktarı (µL)	HCL akımı (mA)	Mod
Kaplanmamış küvet	324.8	0.5	25	16	Sinyal yüksekliği

Külleme basamağının optimum hale getirilmesi

Külleme basamağında amaçlanan, örnek matrisi içinde varolan istenmeyen maddelerin ortamdaki uzaklaştırılmasıdır. Kemik matrisi için bu aşama tüm fırın programı içinde en önemli olan aşamadır. Yeterince uzun külleme zamanı ve yeterince yüksek külleme sıcaklığı seçilmelidir. Fakat, çok yüksek külleme sıcaklığı ve çok uzun külleme zamanı seçildiğinde atomlaştırma aşamasına gelmeden, arandığı elementin önemli bir miktarının kaybedilme tehlikesi olabilir.

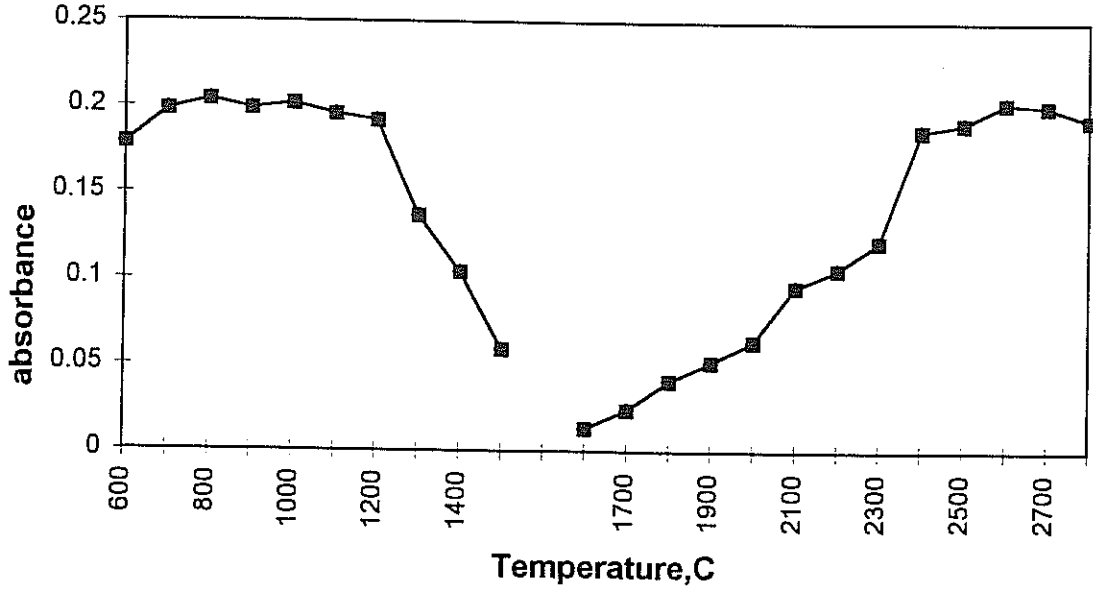
En uygun külleme sıcaklığının belirlenmesine yönelik çalışmalar, 10 µg/L bakır standart çözeltisi ve NIST SRM 1486-Bone meal için gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, atomlaştırma basamağı 2600°C ve 3 saniye olarak sabit tutulmuş ve 600 °C den başlanarak, 1400 °C ' ye kadar çıkarılmıştır. Bakır standart çözeltisi ve NIST SRM 1486-Bone meal için külleme eğrileri Şekil 2.1 de gösterilmiştir. Bu eğrilerden görüldüğü üzere, bakır standart çözeltisi için 900 °C külleme sıcaklığı yeterli ve optimum olurken, NIST SRM 1486-Bone meal için 1200 °C uygun külleme sıcaklığı olarak belirlenmiştir



Şekil 2.1 Bakır standart çözeltisi ve NIST SRM 1486-Bone meal için külleme eğrisi

Atomlaştırma basamağının optimum hale getirilmesi

Bu aşamada hedeflenen, kemik matriksi içinde, aranılan elementin atomlaştırılmasıdır. Bu amaçla, NIST SRM 1486-Bone meal için, kurutma, ön külleme ve külleme sıcaklıkları sırasıyla 110 °C, 190 °C, 1200 °C 'de sabit tutulduktan sonra, 1500 °C den başlayarak 2800 °C 'ye kadar artırılmıştır. 2400 °C'ye kadar absorbans değerlerinin sıcaklıkla arttığı, 2400 °C' de ise hemen hemen sabitleştiği gözlenmiştir. Bu yüzden 2400°C ve 3 saniye bu basamak için optimum fırın sıcaklığı ve zamanı olarak gösterilmiştir. Şekil 2.2' de külleme ve atomlaşma eğrileri birarada gösterilmiştir. Bu basamaktan sonra grafit tüp, 2600 °C ve 3 saniyede temizlenmiştir.



Şekil 2.2.NIST SRM-1486 için külleme ve atomlaşma eğrileri

Sonuç olarak, kurutma, külleme ve atomlaşma basamakları optimum düzeye getirilmiş ve Tablo 2.3' de gösterilen sıcaklık programına ulaşılmıştır:

Tablo.2.3. GFAAS ile bakır tayininde kullanılan fırın programı

Faz	Sıcaklık (°C) (Standart)	Sıcaklık (°C) (Bone Meal)	Zaman (s)	Ramp (°C/s)	
Kurutma	110	110	30.0		
Ön Külleme	190	190	5.0	50	TC RD
Külleme	900	1200	20.0		TC
Atomlaştırma	2100	2400	3.0		
Temizleme	2600	2600	2.0		

2.6. Ca, Mg, Zn, Na ve K ' nın FAAS ile Tayinleri

Kemikteki diğer elementlerden, Ca, Mg, Zn, Na ve K tayinleri için FAAS kullanılmıştır. Bunlardan Na, K ve Zn için PTFE aksesuar kullanılarak mikroenjeksiyon yapılmıştır.

Ca, Zn, Na, K tayinleri Philips PU 929/1011 AAS spektrometresi ile yapılmıştır. Magnezyum tayininde ise Perkin Elmer model 305-B AAS spektrometresi kullanılmıştır. Bu elementlerin tayininde kullanılan deneysel şartlar Tablo 2.4'de verilmiştir.

Tablo 2.4. Ca, Mg, Zn, Na, K nin FAAS ile tayininde kullanılan deney koşulları

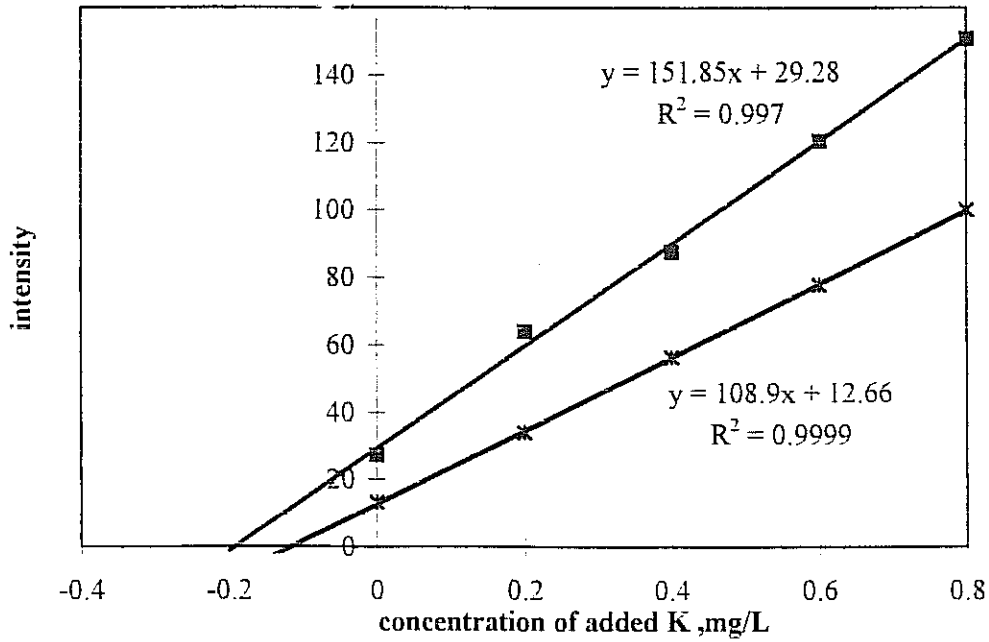
	Ca	Mg	Zn	Na *	K*
Dalga boyu, nm	422.7	285.2	213.9	589.0	766.5
Yarı genişliği, nm	0.5	0.7	0.2	0.5	0.5
Lamba akımı, mA	18	14	8	-	-
Alev tipi	N ₂ O -C ₂ H ₂	hava-C ₂ H ₂	hava-C ₂ H ₂	hava-C ₂ H ₂	hava-C ₂ H ₂
Deuterium lambası	-	-	kullanılmış	-	-

*Na ve K Alevli Emisyon Spectrometre ile tayin edilmistir.

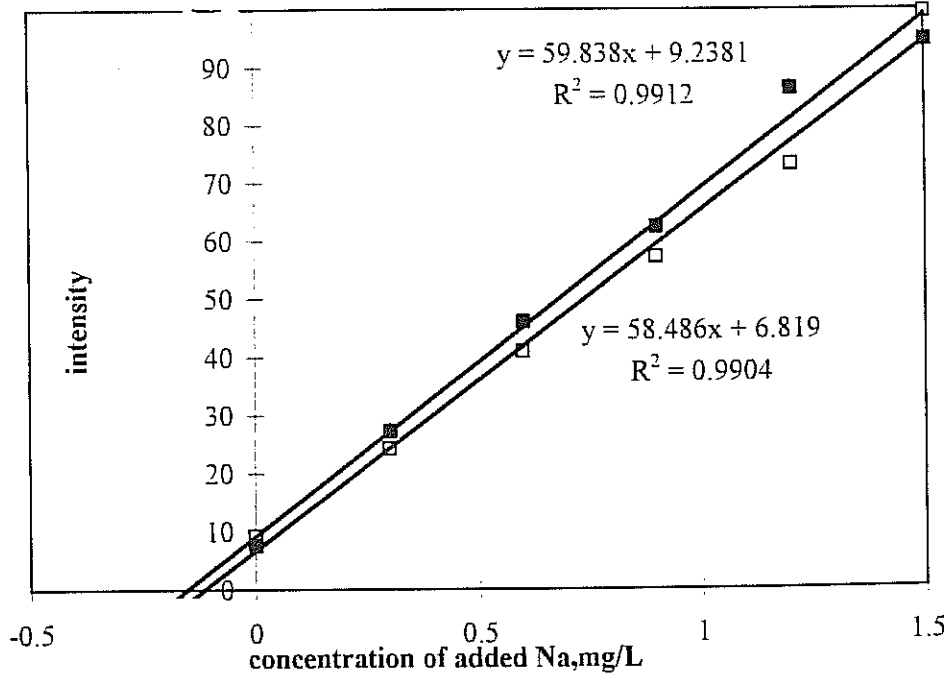
Bu elementlerin kemikteki miktarları FAAS ile tayin edilebilecek kadar fazla oldukları için bu metod uygulanmıştır. Kalsiyum ve magnezyum için, blank, standard çözeltiler ve kemik örnek çözeltileri direkt olarak, alevli atomik absorpsiyon yöntemiyle tayin edilmiştir. Kemik örnek çözeltilerinde bu elementlerin miktarları çok fazla olduğu için, örnek çözeltileri kalsiyum için 500 kat, magnezyum için ise 200 kat seyreltilmiştir.

Kemikte fazla miktarda bulunan fosforun kararlı tuzlarının oluşması ve bu yüzden de, kalsiyum sinyalinde gözlenilmesi olası azalmaları önlemek amacıyla, kalsiyum tayinlerinde $N_2O-C_2H_2$ alevi kullanılmıştır.

Sodyum, potasyum ve çinko tayinleri için, PTFE den yapılmış akseuar kullanılmıştır. Buradaki amaç, örnek miktarı sınırlı olduğu için, mililitrelerce örnek tüketmek yerine, en az miktarda örnek kullanarak bu tayinleri gerçekleştirmektir. Mikropipet yardımıyla, optimum enjeksiyon hacmi belirlendikten sonra (150 μ L), blank, standard çözeltiler ve örnek çözeltileri enjekte edilmiştir. Bu elementler için seyreltme faktörleri sırasıyla, 50, 3 ve 1.5 olarak belirlenmiştir. Sodyum ve potasyum için, iyonlaşma etkilerden dolayı olabilecek sinyal kayıplarını önlemek için, %1'lik CsCl çözeltisi hem standart çözeltilere hem örnek çözeltilisine eklenmiştir. CsCl eklenmesinin, potasyum ve sodyum sinyallerine etkileri sırasıyla Şekil 3.3 ve Şekil 3.4 de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. CsCl 'nin potasyum sinyaline etkisi



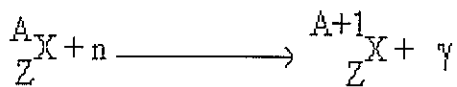
Şekil 2.4. CsCl 'nin sodyum sinyaline etkisi

2.7. Aletli Nötron Aktivasyon Yöntemi

Katı numunelerin analizi için aktivasyon yöntemi en iyisidir. Katı numuneleri nötron aktivasyon yönteminde çözmek gerekmemektedir. Bu da çözümü zor olan numunelerdeki problemleri ortadan kaldırmaktadır.

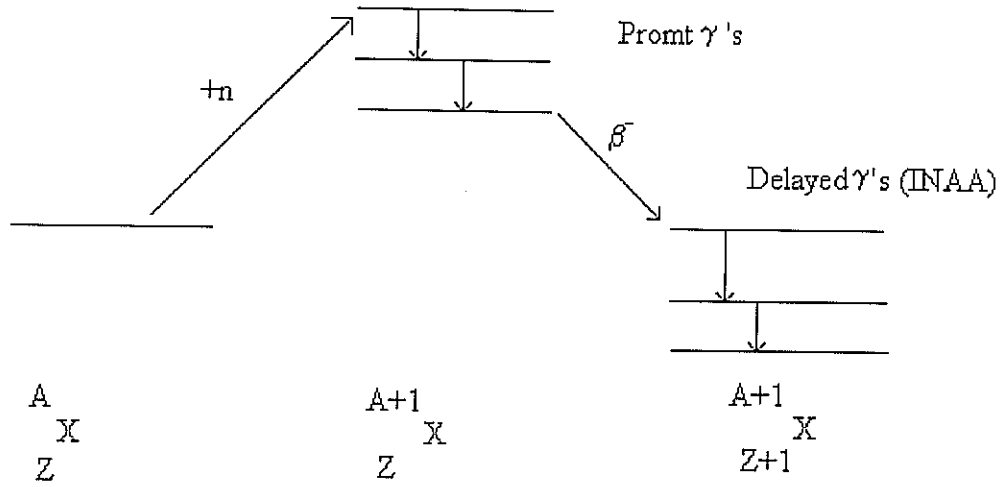
Bir numune nükleer bir reaktörde ışımlandığı zaman, nötronlar ve numunede bulunan elementler arasında nükleer bir reaksiyon gerçekleşmektedir. Bir numune thermal nötronlar ile ışımlandığı zaman (n,γ) reaksiyonu diğerlerinden baskın çıkmaktadır.

Thermal nötronlar ile olan nükleer reaksiyonda, aşağıdaki reaksiyon gerçekleşmektedir:



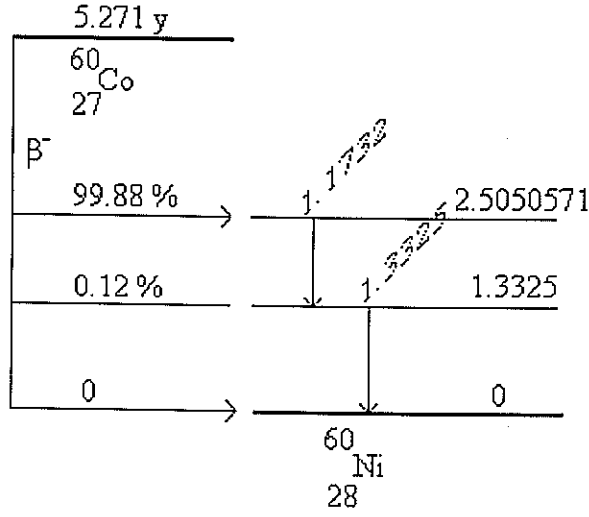
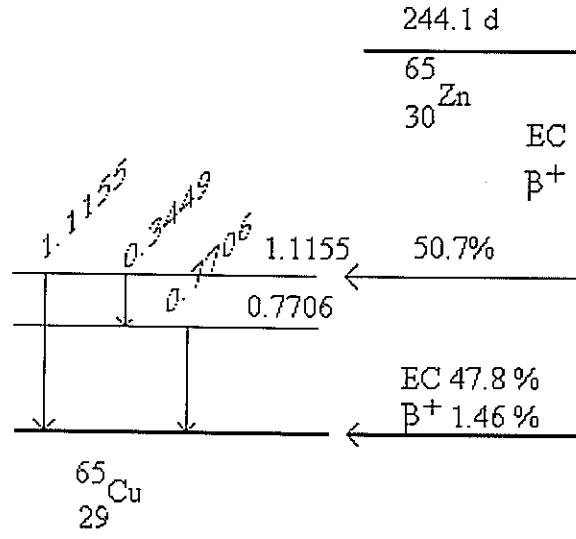
veya kısaca ${}^AX (n,\gamma) {}^{A+1}X$. Oluşan ${}^{A+1}_ZX$, beta ve γ ışınları yayar ve ${}^{A+1}_{Z+1}X$ seviyesine ulaşır. Sonuçta nötron aktivasyon yönteminin prensibi bu gama ışınlarının

ölçümü temeline dayanır ve daha sonra ${}_Z X$ 'in numune içerisindeki miktarının hesaplanmasıdır. (n,γ) reaksiyonu ve onu izleyen β^- parçalanması Şekil 2.5'de gösterilmiştir:



Şekil 2.5. (n, γ) reaksiyonu ve onu izleyen β^- parçalanma şeması

Parçalanma şemaları izotopların parçalanma modlarını ve yayılan gama ışınları hakkında bilgi vermektedir. ${}^{65}\text{Zn}$ ve ${}^{60}\text{Co}$ parçalanma şemaları Şekil 2.6'da örnek olarak gösterilmiştir. Ne yazıkki kemikte eser element tayini için ve özellikle INAA ile literatürde çok az çalışma vardır. Son yıllarda aktivasyon analizi fosil kemiklerinde element tayininde çok kullanılmıştır. Çinko ve stronsiyum elementleri kullanılarak fosilin et yiyerek mi yoksa sebze yiyerekmi beslendiği bulunabilmektedir (Lambert et al., 1985; Rheingold et al., 1983; Nelson and Sauer, 1984).



Şekil 2.6. ^{65}Zn ve ^{60}Co için parçalanma şemaları, gama enerjileri MeV olarak verilmiştir

2.7.1. MIT'de Yapılan Deneyler

Kemik numunelerinden 10 tanesi, 5'i dış 5'i iç, Massacusette Institue of Technogy (MIT), USA' de bulunan nükleer reaktörde ışınlamış ve MIT nükleer labratuvarlarında analizleri yapılmıştır. Aynı numuneler laboratuvarımızda da analiz edilmişlerdir.

Kemik numuneleri 6 saat ışınlamışlardır. İlk sayımlar ışınlamadan 8 gün sonra ikinci sayımlar ise ışınlamadan 82 gün sonra yapılmıştır.

2.7.2. Türkiye’de yapılan deneyler

Standartlar:

İki tane Standard Referans Maddesi (SRM) kullanılmıştır:

- NBS Bone Meal 1486
- NBS Orchard Leaves 1571

Bu standartların bilinen ağırlıkları hazırlanmıştır. SRM Bone Meal’in sertifikalı ve diğer elementleri Almanya da bulunan Mainz Üniversitesinde de Dr. Mauerhofer tarafından da Aletli Nötron Aktivasyon Yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Kısa ve uzun ışınlamalar TRIGA Mainz reaktöründe yapılmıştır. Bulunan element konsantrasyonları Tablo 2.5’ de verilmiştir.

Tablo 2.5. SRM 1486 Bone Meal Element Konsantrasyonları (IAEA,1995)

Kısa Işınlamalar	Mauerhofer, 1996	Sertifika lanmış Değerler :
F(mg/kg)	820 ± 47	[800]
Na(g/kg)	5.71 ± 0.04	[5]
Mg(g/kg)	4.62 ± 0.23	4.66 ± 17
K(g/kg)	0.394 ± 0.052	0.412 ± 0.004
Cl(g/kg)	0.261 ± 0.005	-
Ca(g/kg)	268.6 ± 1.1	265.8 ± 2.4
Sr(mg/kg)	246 ± 10	264 ± 7
Ba(mg/kg)	264 ± 6	-
Br(mg/kg)	2.16 ± 0.29	-
Mn(mg/kg)	0.75 ± 0.03	[1]
Al(mg/kg)	7.6 (LOD)	[< 1]
Cu(mg/kg)	7.6 (LOD)	[0.8]
P(g/kg)	120.9 ± 1.1 thermal	123.0 ± 1.9
	125.8 ± 0.8 epithermal	
	127.1 ± 5.2 bremstrahlung	

Uzun İşnlamalar	Mauerhofer, 1996	Sertifika lanmış Değerler :
Na(g/kg)	5.55 ± 0.04	[5]
K(g/kg)	0.421± 0.029	0.412 ± 0.04
Ba(mg/kg)	274 ± 8	-
Br(mg/kg)	1.93 ± 0.07	-
Zn(mg/kg)	149 ± 3	147 ± 16
Fe(mg/kg)	119 ± 31	99 ± 8
Se(mg/kg)	3.2 (LOD)	[0.13]
As(mg/kg)	0.29 (LOD)	[0.006]
Cd(mg/kg)	3.6 (LOD)	[0.003]

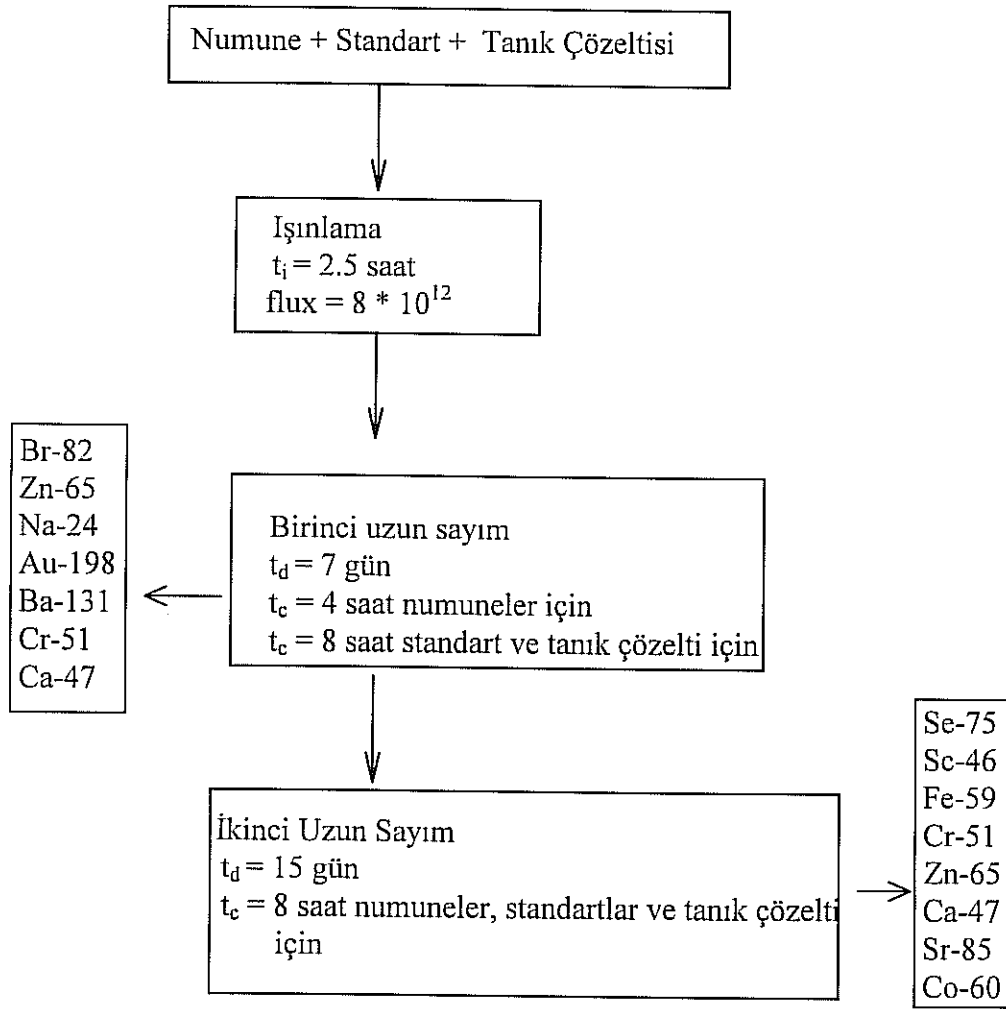
LOD: Görünebilirlik Sınırı

2.7.3. İstanbul Teknik Üniversitesinde TRIGA MARK-II Reaktöründe İşnlama

8 tane kemik numunesi, 4'ü dış 4'ü iç, tanık ve SRM'ler quartz tüpler içerisinde işnlama tüplerinin içinde işnlanmışlardır. Alüminyum işnlama tüpü kullanılmıştır. İşnlamada iki tane SRM kullanılmış olup bunlardan birisi işnlama tüpünün ortasına, diğeri de kenara yerleştirilmiştir.

Numuneler İstanbul Teknik Üniversitesi'nin kampüsünde bulunan TRIGA-MARK-II nükleer reaktöründe 2.5 saat $8 \cdot 10^{12}$ n/cm²sec 'lık nötron flux ile işnlanmıştır. İşnlama ve sayım detayları Şekil 2.7' de verilmiştir.

Sayımlar Orta Doğu Teknik Üniversitesi'nin (ODTÜ) Nükleer Kimya laboratuvarında yapılmıştır. Dedektör olarak HPGe, sayımlar içinde Canberra 35 Series MCA kullanılmıştır. Quartz tüplerin dış yüzeyleri sayımdan önce % 30 HNO₃ ve % 10 HF ile yıkanmıştır. Herbir quartz tüp ise polyethylene tüpler içerisine yerleştirilerek gama ışınlarının sayımı gerçekleştirilmiştir. 7 gün ve 15 gün soğuma periyodundan sonra gözlenen izotoplar Tablo 2.6 ve Tablo 2.7'de verilmiştir.



Şekil 2.7.Kemik numunelerinin ışınlama ve sayım çizelgesi

Tablo 2.6. Yedi gün sonraki sayımda gözlenen izotoplar

Element	İzotop	$t_{1/2}$	Kullanılan keV
Ba	Ba-131	11.8 d	496
			216
Ca	Ca-47	4.536 d	1297
			807
Br	Br-82	36.3 h	776
			554
Zn	Zn-65	244.4 d	1115
Na	Na-24	15 h	1368
Au	Au-198	2.698 d	411.8

Tablo 2.7. Onbeş gün sonraki sayımda gözlenen izotoplar

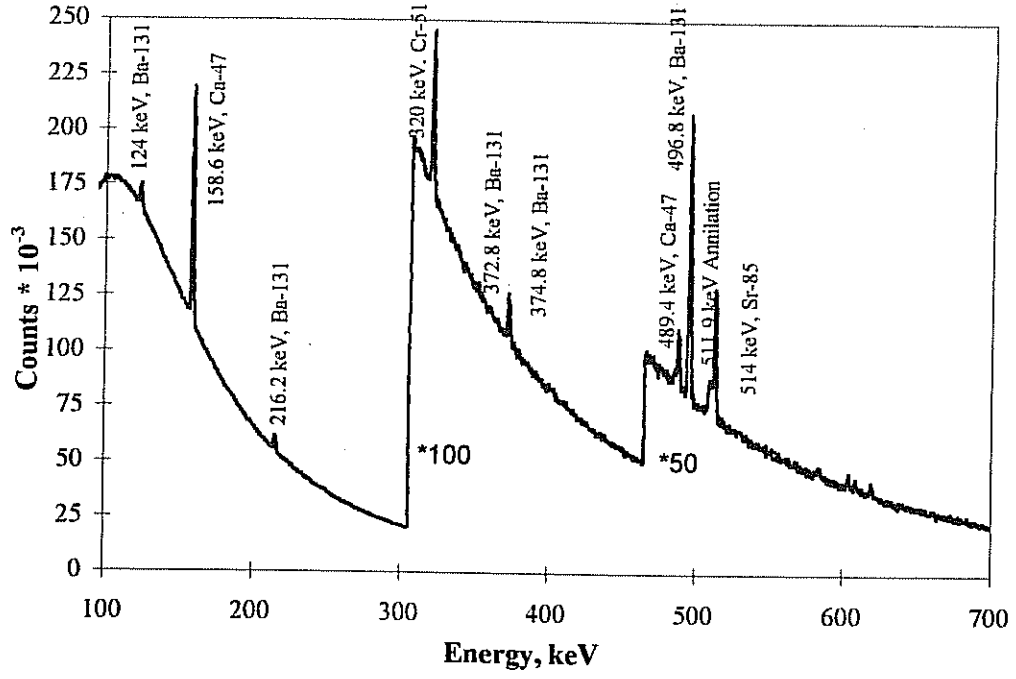
Element	İzotop	$t_{1/2}$	Kullanılan keV
Ba	Ba-131	11.8 d	496 216
Cr	Cr-51	27.7 d	320
Ca	Ca-47	4.536 d	1297
Sr	Sr-85	64.8 d	514
Fe	Fe-59	44.6 d	1099
Zn	Zn-65	244.4 d	1115
Co	Co-65	5.271 y	1332.5 1173.2
Se	Se-75	119.8 d	265

2.7.4. Numunelerin Analizi

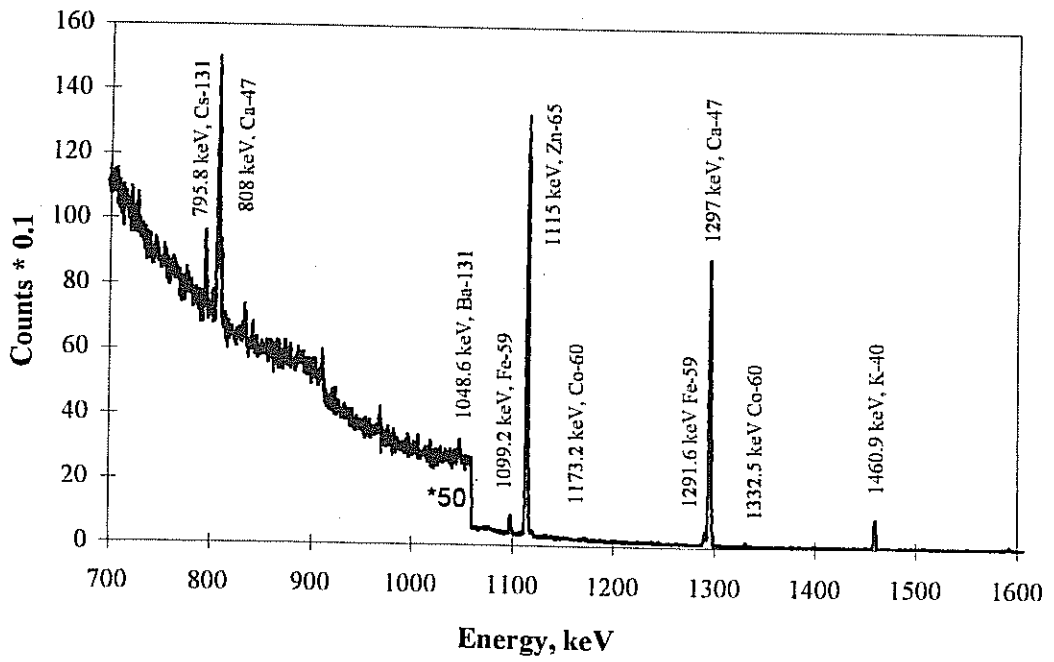
Analizler sırasında Full Width at Half Maximum (FWHM), iki gama ışının ayırabilme yeteneği, Co-60 izotopunun 1332.5 keV enerjisi için 2.19 keV olarak kullanılmıştır.

Kemik numuneleri çok fazla miktarda fosfor içerdikleri için P-32 den gelen beta parçacıklarını (enerjisi 0.7-0.8 Mev a kadardır) durdurmak gerekmiştir. Bu amaçla da 0.8 cm kalınlığında plexiglas dedektör ile numuneler arasına yerleştirilmiştir (Bratter et al., 1977). Beta parçacıkları enerjilerini inelastik çarpışma ile plexiglas da kaybetmişlerdir. İlk sayımlarda dedektör ile numuneler arasındaki uzaklık 4 cm, ikinci sayımlarda ise bu uzaklık 3 cm'dir.

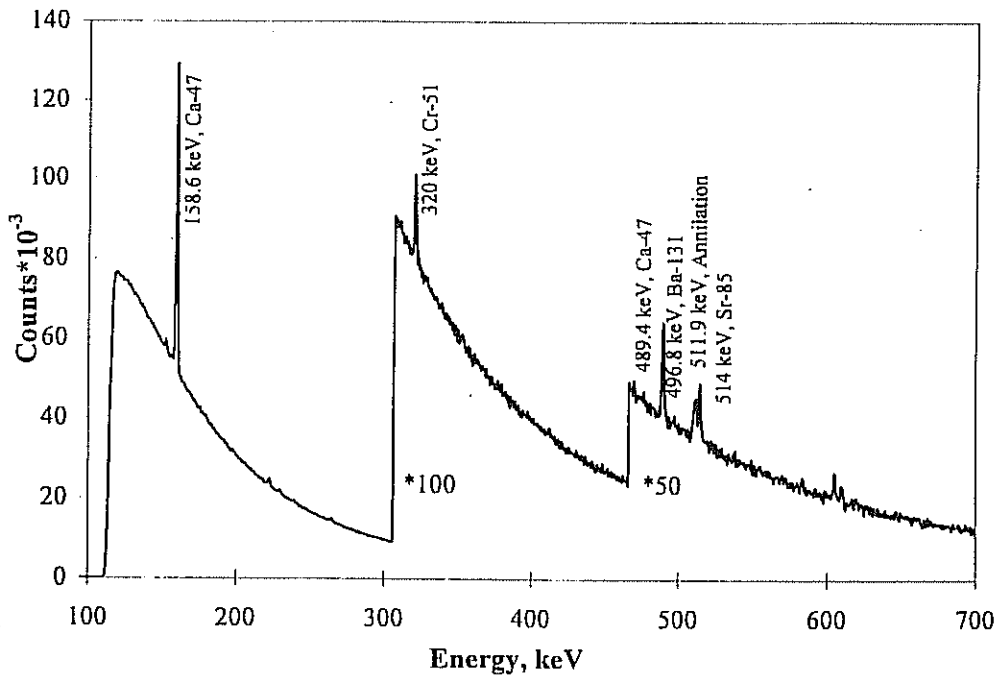
ODTÜ de analiz edilen bir kemik numunesi ile bir SRM Bone Meal standardının spektrumları Şekil 2.8 ve Şekil 2.9 de verilmiştir. MIT de analiz edilen bir kemik numunesinin 8 gün ve 82 gün sonraki sayımlarında elde edilen spektrumlar da Şekil 2.10 ve Şekil 2.11'da verilmiştir. Şekil 2.12 ve 2.13 te ise MIT de ışınlanan HB-C numunesinin spektrumları verilmektedir.



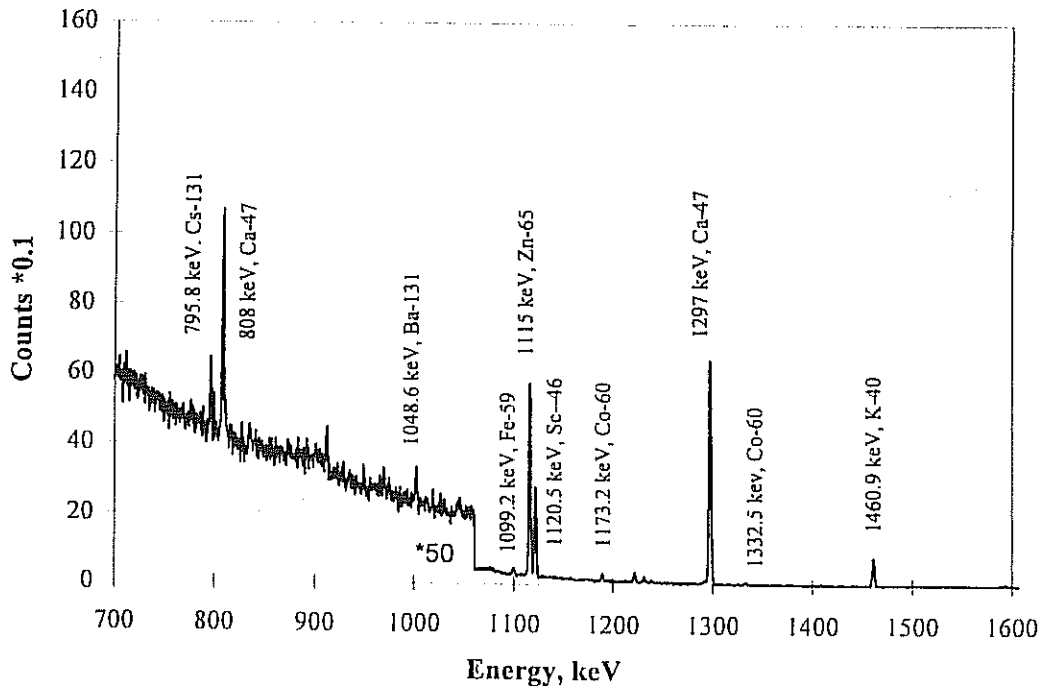
Şekil.2.8 2.5 saat ışınlama dan 19 gün sonra 8 saat sayım sonucu elde edilen NBS 1486 Bone Meal Standart gama ışını spektrumu (100-700 keV)



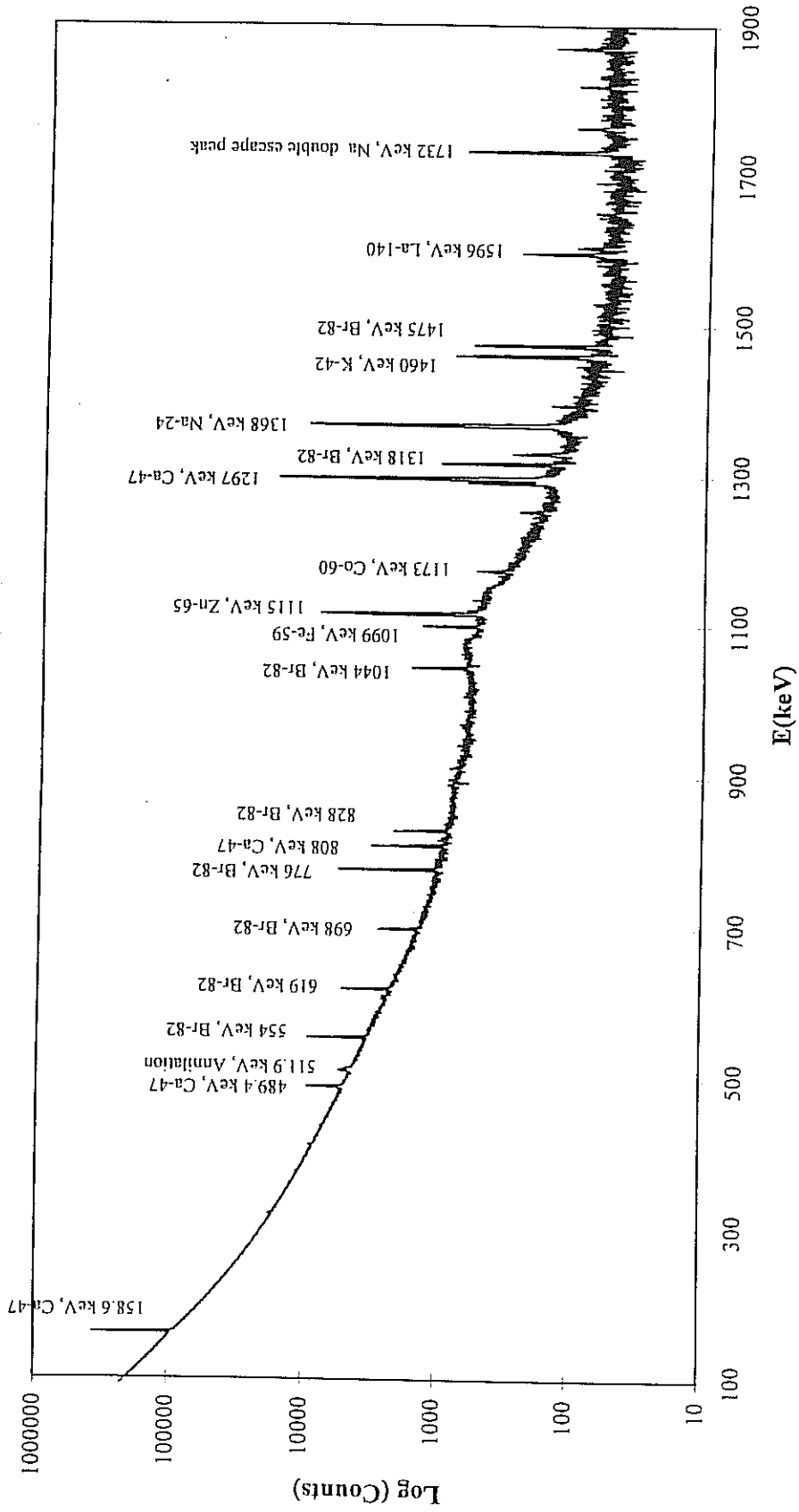
Şekil 2.9 2.5 saat ışınlama dan 19 gün sonra 8 saat sayım sonucu elde edilen NBS 1486 Bone Meal Standart gama ışını spektrumu (700-1600 keV)



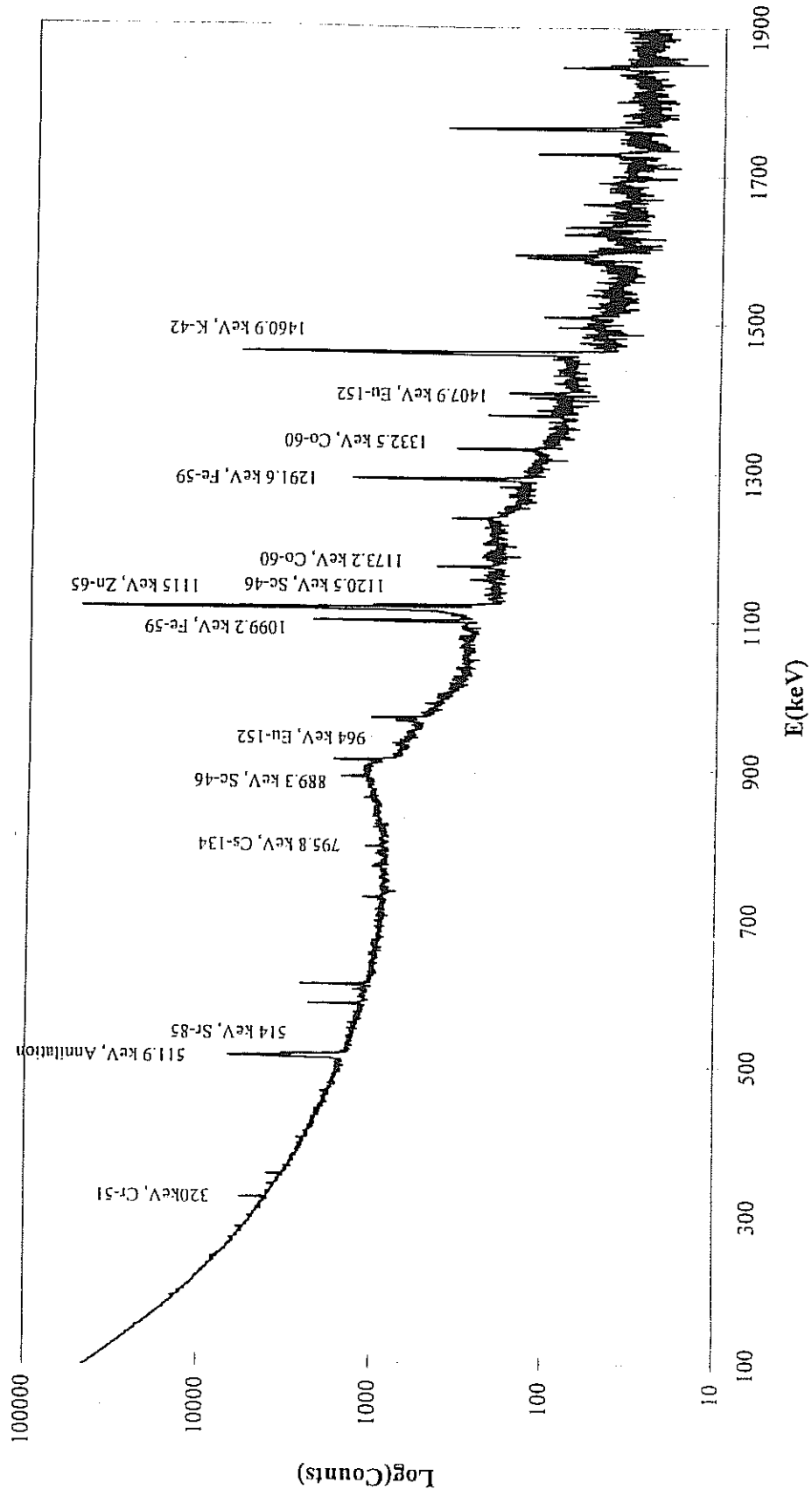
Şekil 2.10. 2.5 saat ışınlama dan 19 gün sonra 8 saat sayım sonucu elde edilen SeD-C kemik numunesi gama ışını spektrumu (100-700 keV)



Şekil 2.11. 2.5 saat ışınlama dan 19 gün sonra 8 saat sayım sonucu elde edilen SeD-C kemik numunesi gama ışını spektrumu (100-700 keV)



Şekil 2.12. 6 saat ışınlama dan 8 gün sonra 8 saat sayım sonucu elde edilen HB-C kemik numunesi gama ışını spektrumu (100-1900 keV)



Şekil 2.13. 6 saat ışınlama dan 82 gün sonra 17 saat sayım sonucu elde edilen HB-C kemik numunesi gama ışını spektrumu (100-1900 keV)

MicroSAMPO software programı ile pik alanları bulunmuş, konsantrasyon hesapları ise Excel bilgisayar programı ile hesaplanmıştır.

2.8. Florürün İyon Seçici Elektrot (ISE) ile Tayini

Kemikte flor tayini için iyon seçici elektrot kullanılmıştır. Bu amaçla Jenway 3040 pH metresi, Entek flor iyon seçici elektrodu ve Entek doymuş kalomel referans elektrotu (SCE) kullanılmıştır.

2.8.1. Deneysel Parametrelerin Belirlenmesi

1) İyonik Güç Ayarlaması: Dört farklı toplam iyonik güç ayarlayıcı tampon (TISAB), kemik numunelerinde florür tayini için en uygun TISAB 'ı bulmak için denenmiştir. Bu 4 TISAB'ın içerikleri şöyledir:

TISAB-I.....58 g sodyum klorür, 0.3 g sodyum sitrat, 57 mL asetik asit (Frant and Ross, 1968)

TISAB.....102.1 g sodyum asetat, 58.4 g sodyum klorür, 0.3 g sodyum sitrat, 14.3 mL asetik asit

5M Asetat/0.5M Sitrat.....246.1 g sodyum asetat, 149 g sodyum sitrat, 114 mL asetik asit (Kauranen, 1977)

TISAB-II.....85 g sodyum nitrat, 68 g sodyum asetat , 92.4 g sodyum sitrat (Covington, 1980)

Sitrat.....294 g sodyum sitrat (Edmond, 1969)

Bu beş TISAB çözeltilisinin pH sı 5.5'e ayarlanmış ve 1 L 'ye tamamlanmıştır.

2) pH Ayarlaması: pH ayarlamaları 5 M NaOH ve, asetik asit ve hidroklorik asit ile yapılmıştır.

pH'nun etkisini görmek için farklı pH'lara sahip TISAB-II çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan bütün TISAB-II çözeltilerinde 21.3 g sodyum nitrat, 17 g sodyum asetat ve 23.1 g sodyum sitrat bulunmaktadır. Bu karışım 100 mL su içinde çözülmüştür ve bu çözeltinin pH'sı yaklaşık olarak 8 ölçülmüştür. pH'yı ayarlamak için 5 M NaOH ve konsantre asetik asit kullanılmıştır. Yedi tane tampon çözeltisi hazırlanmıştır. Bu tamponların pH'ları sırası ile 3.5, 5.0, 5.5, 6.5, 8.0, 10.0 ve 12 olarak ayarlanmış ve 250 mL' ye deionize su ile tamamlanmıştır.

3) Sıcaklık: Sıcaklık ayarı yapılmamıştır. Ölçümler oda koşullarında 22°C civarında yapılmıştır.

4) Elektrotun saklanması: Elektrot plastik bir kap içinde kuru havada saklanmıştır.

2.8.2. İyon Seçici Elektrot ile Kemik Numunelerinde Florür Tayini için Kullanılan İşlem

Üç tane paralel kemik numunesi 100-110 mg civarında mikrodalga fırın kullanılarak çözülmüştür. Çözme işleminden sonra kalanlar 50 mL 'lik bir polyethylene kap içine transfer edilmiştir. İçine 5 mL su ve 12.5 mL TISAB-II eklendikten sonra PH 'sı 3.1-3.3 olarak ölçülmüştür. Bu çözeltinin pH 'sı 5 M NaOH ile 5.4-5.5 arasında ayarlandıktan sonra çözeltinin hacmi 25 mL'ye tamamlanmıştır. Üç saat bekletildikten sonra standart katma yöntemi kullanılarak kemik numunelerinde florür konsantrasyonu bulunmuştur.

İki elektrot bu çözeltilere daldırılmış ve çözeltide sabit bir potansiyel okunana kadar bekletilmiştir. Bu arada çözelti aynı zamanda karıştırılmıştır. Bu süre yaklaşık olarak 5-8 dakika kadardır. 25 µL 0.188 M standart florür çözeltisi eklenmiş ve sonuçtaki potansiyel kullanılarak ΔE değeri hesaplanmıştır. Bu ekleme işlemi 4 kez tekrarlanmıştır ve sonuçta elde edilen 4 konsantrasyonun ortalaması alınmıştır.

BÖLÜM III

BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Atomik Absorbsiyon Spektrometrisi

3.1.1. Cu,Ca, Na, K, Mg, Zn elementlerin kemikteki miktarları ve bunların diğer parametrelerle bağlantıları

3.1.1.1. Hayvan Kemikleri

Bu çalışmada, öncelikle 8 tane hayvan kemiği analiz edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları Tablo 3.1' de verilmiştir.

Tablo 3.1.Hayvan kemiklerindeki minor ve eser element derişimleri

paralel	Ca (g/kg)	Na (g/kg)	Mg (g/kg)	K (g/kg)	Zn (mg/kg)	Cu (mg/kg)
1	164	5.31	4.90	3.17	72.7	4.50
2	173	5.65	5.86	3.12	85.9	5.25
3	161	5.61	6.01	2.96	89.4	4.61
4	179	5.51	5.78	3.26	73.7	4.62
5	168	5.83	5.45	3.23	98.9	4.39
6	156	5.73	5.07	3.51	82.7	4.16
7	149	5.80	5.38	3.34	92.4	5.04
8	139	5.57	5.79	2.85	82.6	5.02
ortalama	161	5.63	5.53	3.18	84.8	4.80
medyan	163	5.63	5.61	3.20	84.3	4.60
geometrik ortalama	161	5.62	5.52	3.17	84.4	4.60
Standard sapma	13	0.17	0.40	0.21	8.9	0.15
%RSD	8	3.00	7.23	6.56	10.5	3.16

Bu sonuçlar incelendiğinde, elementler için ortalama değer, medyan ve geometrik ortalamalarının aynı veya birbirlerine çok yakın oldukları görülmüştür. Bu ise genelde

element miktarlarının, normal dağılım eğilimi gösterdiğini kanıtlamaktadır. Ayrıca, % RSD değerleri incelendiğinde, Zn hariç diğer elementler için bu değerleri, oldukça küçük olduğu gözlenmiştir. Bu ise sonuçların tekrarlanabilirliklerinin iyi olduğunu göstermektedir. Ayrıca, bu sonuçlara istatistiksel testlerden, Q-test uygulandığında, sonuçların birbirleriyle uyumlu olduğu ve herhangi bir değerin atılıp, iptal edilecek kadar farklı olmadığı görülmüştür.

3.1.1.2. NIST SRM 1486-Bone Meal

Kemikte yapılan çalışmanın temizleme, çözmeden başlayarak analize kadar ne kadar güvenilir olduğunu anlamak ve test etmek amacıyla bir standard referans madde kullanılmıştır. Gerçekte, kemik analizi için kullanılacak referans madde sayısı oldukça sınırlıdır. Bunlardan bir tanesi olan animal bone SRM (IAEA H-5) artık stoklarının tükendiği bir maddedir. Bunun dışında, NIST tarafından hazırlanıp onaylanan iki standard madde, bone ash (NIST SRM 1400) ve bone meal (NIST SRM 1486) dir. Bu çalışmada, (NIST SRM 1486)-Bone meal kullanılmıştır.

NIST SRM 1486-Bone meal, hayvan kemikleri ve insan kemikleri ile mümkün olduğunca aynı şartlarda ve aynı şekilde hazırlanmıştır. Yalnız tek sorun çözme basamağında gözlenmiştir. Çözme işlemi, için yaklaşık 100 mg toz haline getirilmiş, NIST SRM 1486-Bone meal için 2 mL HNO₃ ve 2 mL deionize su kullanılmış ve yine aynı mikrodalga fırın içerisinde, 8 dakika süreyle çözme işlemi gerçekleştirilmiştir. 3 tane paralel örnek hazırlanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları Tablo 3.2' de verilmiştir.

Tablo 3.2. Elementlerin NIST SRM 1486-Bone meal'daki miktarları

paralel	Ca (g/kg)	Na (g/kg)	Mg (g/kg)	K (g/kg)	Zn (mg/kg)	Cu (mg/kg)
1	287	5.17	4.56	0.41	151	1.09
2	275	5.10	4.40	0.38	166	1.07
3	280	5.41	4.26	0.32	162	1.16
ortalama	281	5.22	4.41	0.37	160	1.10
medyan	280	5.17	4.40	0.38	162	1.12
geometrik ortalama	281	5.22	4.41	0.37	160	1.12
standard sapma	6	0.16	0.15	0.05	7.80	0.05
%RSD	2	3.09	3.40	13.51	4.88	4.80

Sonuçlar incelendiğinde, öncelikle gözlenen, tıpkı hayvan kemikleri sonuçlarında olduğu gibi, ortalama değer, medyan ve geometrik değerlerin yakınlıkları ve sonuç olarak da normal dağılım eğilimleri gösterdikleridir. Potasyum hariç diğer elementler için, %RSD değerleri %5'in altında olup, tekrarlanabilir sonuçlar elde edildiği göstermektedir. Değerlerin bu derece uyumlu olmaları, bu standard maddenin çok iyi homojene edilmiş olmasıyla da ilişkilendirilebilir.

Tablo 3.3. Elementlerin NIST SRM 1486-Bone Meal'deki derişimleri ile sertifikalanmış ve diğer bir çalışmadaki derişimlerinin kıyaslanması

Element	Bu çalışma (AAS)	Mauerhofer ve Porte,1997 (INAA)	NIST Sertifikalanmış değer
Ca(g/kg)	281 ± 6	268.6± 1.1	266
Na(g/kg)	5.22 ± 0.16	5.7± 0.4	5*
K(g/kg)	0.37 ± 0.05	0.394 ± 0.052	0.41
Mg(g/kg)	4.41 ± 0.15	4.62 ± 0.23	4.66
Zn(mg/kg)	160± 8	149 ± 3	147
Cu(mg/kg)	1.10 ± 0.05	7.6	0.8 *

* Bu değerler sertifikalanmamış olup, sadece bilgi için verilmiştir.

AAS ile yapılan NIST SRM-1486 - Bone Meal'deki element tayinleri Mauerhofer ve Porte tarafından. INAA ile gerçekleştirilen sonuçlarla kıyaslandığında, sonuçların uyumlu oldukları gözlenmiştir. Ayrıca bulunan sonuçların sertifikalanmış sonuçlara olan yakınlıkları da t-test uygulanarak bir kez daha görülmüştür.

3.1.1.3. İnsan Kemikleri

12 tane insan kemiğinin kortikal ve trabeküler kısımları ayrı ayrı analiz edilmiş ve element miktarları saptanmıştır. Herbir numuneden en az ikişer tane paralel örnek hazırlanmıştır. Bulunan sonuçlar Tablo 3.4 ve 3.5 de gösterilmiştir.

Tablo 3.4 ve 3.5 görüldüğü gibi Ca dışında erkek ve kadın kemikleri eser elementleri arasında bir farklılık görülmemiştir. Yalnız Ca, trabeküler kemikte erkeklerde kadınlara nazaran %90 konfidans seviyesinde farklılık göstermektedir. Numune sayısı çok az olduğundan istatistik olarak bunun çok önemli olacağı şüphelidir.

Tablo 3.4. Elementlerin insan kemikleri içindeki derişimleri-Kortikal kısım

kortikal kısım	Ca (g/kg)	Na (g/kg)	K (g/kg)	Mg (g/kg)	Zn (mg/kg)	Cu (mg/kg)
AA(n=3)	211±18	4.57 ± 0.10	3.94 ± 0.39	2.24 ± 0.12	118 ± 9	2.58±0.09
NO(n=2)	185 ± 14	8.07±0.20	1.23 ± 0.08	0.39 ± 0.13	113 ± 6	5.75±0.17
MD(n=3)	175 ± 7	3.41±0.17	2.04 ± 0.10	0.97 ± 0.10	69 ± 4	7.00±0.19
SeD(n=2)	255 ± 17	4.80 ± 0.13	1.99 ± 0.08	2.35±0.11	76 ± 5	3.83±0.05
YG(n=3)	206 ± 16	8.35±0.33	2.73 ± 0.10	2.37±0.22	109 ± 4	4.22±0.05
CS(n=2)	202 ± 12	5.35±0.12	2.83 ± 0.07	2.54 ± 0.19	88 ± 3	2.27±0.03
AD(n=3)	214 ± 10	8.51±0.21	2.84 ± 0.09	1.79 ± 0.19	75 ± 4	5.05±0.01
FD(n=2)	174 ± 18	5.83 ± 0.15	3.91 ± 0.05	2.37±0.13	180 ± 6	8.91±0.02
ortalama(erkekler)	203 ±26	6.11 ±1.77	2.69 ±2.81	1.88 ±0.55	104 ±33	4.95±2.35
SD(n=3)	200 ± 20	5.74±0.22	3.26 ± 0.07	1.63 ± 0.23	90 ± 5	5.08±0.17
HB(n=3)	156± 20	4.20 ± 0.22	3.29±0.16	1.92±0.17	61 ± 5	4.08±0.18
UT(n=2)	188 ± 6	6.67 ± 0.35	2.86 ± 0.13	2.14 ± 0.21	112 ± 4	3.58±0.20
ZK(n=2)	186 ± 10	6.53±0.53	5.71 ± 0.13	1.70 ± 0.16	82 ± 6	9.11±0.03
ortalama(kadınlar)	183±20	5.79±1.59	3.78± 1.60	1.85±0.89	86±23	5.46±2.23

Tablo 3.5. Elementlerin insan kemikleri içindeki derişimleri-Trabeküler kısım

trabeküler kısım	Ca (g/kg)	Na (g/kg)	K (g/kg)	Mg (g/kg)	Zn (mg/kg)	Cu (mg/kg)
AA(n=3)	192 ± 23	4.94 ± 0.16	1.51 ± 0.21	1.79 ± 0.14	101 ± 5	4.57 ± 0.04
NO(n=2)	213 ± 8	5.47 ± 0.19	1.26 ± 0.08	1.90 ± 0.19	113 ± 6	5.50 ± 0.07
MD(n=2)	181 ± 10	3.04 ± 0.16	1.14 ± 0.66	2.14 ± 0.22	81 ± 6	10.3 ± 0.1
SeD(n=3)	271 ± 83	8.42 ± 0.39	1.11 ± 0.37	1.82 ± 0.14	99 ± 5	5.46 ± 0.09
YG(n=3)	225 ± 9	3.89 ± 0.11	0.87 ± 0.11	1.95 ± 0.19	62 ± 4	4.12 ± 0.16
CS(n=2)	209 ± 6	5.31 ± 0.13	1.53 ± 0.09	2.50 ± 0.15	104 ± 4	2.53 ± 0.03
AD(n=2)	189 ± 9	7.08 ± 0.23	2.99 ± 0.14	1.54 ± 0.19	74 ± 3	3.18 ± 0.01
FD(n=2)	182 ± 17	5.29 ± 0.21	4.21 ± 0.09	2.14 ± 0.18	141 ± 6	6.86 ± 0.07
ortalama(erkekler)	184 ± 43	5.43 ± 1.98	1.83 ± 1.15	1.97 ± 0.37	97 ± 43	5.31 ± 2.35
SD(n=3)	178 ± 20	2.91 ± 0.09	1.37 ± 0.05	1.31 ± 0.15	88 ± 6	4.80 ± 0.03
HB(n=3)	184 ± 6	3.82 ± 0.30	1.91 ± 0.08	2.55 ± 0.15	57 ± 4	4.18 ± 0.09
ZK(n=2)	185 ± 11	6.16 ± 0.43	1.99 ± 0.13	1.73 ± 0.17	58 ± 5	7.68 ± 0.07
UT(n=2)	184 ± 11	6.92 ± 0.45	1.68 ± 0.10	1.90 ± 0.28	118 ± 5	3.04 ± 0.02
ortalama(kadımlar)	183 ± 15	4.95 ± 1.32	1.74 ± 0.30	1.87 ± 0.43	80 ± 30	4.92 ± 1.32

Tablo 3.6. Kemikte minor ve eser elementlerin tayinine ilişkin literatürdeki çalışmalar (Iyengar et al., 1997)

Referanslar	Ca (g/kg)	Mg (g/kg)	Na (g/kg)	Zn (mg/kg)	K (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Method	Numune Alman Bölge
Bush et al,1995	224±44	2.2±0.7	-	114±18.1	-	1.0±1.3	ICPAES	Rib
Yoshinga et al, 1995	246±6	2.8±0.2	5.18±0.46	149±19	80.7±58.2	0.19±0.20	AAS	Rib
Robertson et al,1992	200±41(c) 190±24(t)	2.6±0.5(c) 2.7±0.4(t)	5.20±0.80(c) 5.20±0.60(t)	182±47(c) 144±18(t)	-	5.1±9.2 (c) 4.81±1.3 (t)	PIGE/PIXE	Rib kortikal trabeküller
Hisanaga et al,1989	168±13	-	-	-	-	3.41±0.71	AAS	Rib
Kosugi et al, 1988	167±0.1	1.8±0.1	3.88±0.01	120±1.2	429±1.9	22.6±1.1	ICPAES	Rib
Grynypas et al,1987	225±14(c) 186±28(t)	2.2±0.2	6.0±0.3	-	-	-	NAA	İlyak Kanat kortikal trabeküller
Jaworowski et al,1985	185±34	2.5±0.4	-	126±21	-	-	NAA	-
Gawlik et al,1982	213±1	-	4.90±0.90	-	-	-	NAA	İlyak Kanat

Tablo 3.7. Kemikte minor ve eser elementlerin trabecular/kortikal oranlarının 12 insan kemiği için Robertson (1992) çalışması ile kıyaslanması. Bu çalışmada ilyak kanat, Robertson'un çalışmasında ise kaburga kemikleri kullanılmıştır.

Element	Bu çalışma		Robertson et al,1992		Bu çalışma	Robertson et al,1992
	Kortikal	Trabeküler	Kortikal	Trabecüler	Oran(T/C)	Oran(T/C)
Ca(g/kg)	196	201	200	190	1.02	0.95
Na(g/kg)	5.96	5.19	5.20	5.20	0.87	1.00
K(g/kg)	2.84	1.50	-	-	0.53	-
Mg(g/kg)	1.87	1.85	2.6	2.7	0.99	1.04
Zn(mg/kg)	96	90	182	144	0.94	0.79
Cu(mg/kg)	5.03	5.09	5.10	4.81	1.01	0.94

Tablo 3.7 incelendiğinde, bu çalışma sonucunda bulunan trabecüler/kortikal oranlarının (T/C) Robertson tarafından bulunan sonuçlara yakınlığı gözlenmiştir. T/C oranları genelde, 1'e yakın olup, sadece potasyum için 1'den çok farklı bulunmuştur.

Tablo 3.8. AAS ile tayin edilen Ca, Na, K ,Zn 'nin, INAA ile kıyaslanması-kortikal kısım

Element	Metod	HB-C	SeD-C	YG-C	CS-C	Ortalama±sts
Ca(g/kg)	AAS	156±20	255±17	206±16	202±12	205±40
	INAA(METU)	198±4	247±7	218±4	237±5	225±22
Na(g/kg)	AAS	4.2±0.2	4.8±0.1	8.4±0.3	5.4±0.1	5.7±1.9
	INAA(METU)	4.5±0.1	4.5±0.2	4.6±0.1	5.3±0.1	4.7±0.4
	INAA(MIT)	2.7±0.2	3.5±0.2	7.2±0.5	4.6±0.3	4.5±2.0
K(g/kg)	AAS	3.3±0.2	2.0±0.1	2.7±0.1	2.8±0.1	2.7±0.5
	INAA(METU)	3.3	1.6	2.1±0.1	5.2	3.0±1.6
Zn(mg/kg)	AAS	61±5	76±5	109±4	88±3	84±20
	INAA(METU)	113±12	114±12	119±13	115±13	115±3
	INAA(MIT)	62±8	55±7	120±20	76±10	81±34

Tablo 3.9.AAS ile tayin edilen Ca, Na, K, Zn 'nin, INAA ile kıyaslanması-trabekular kısım

Element	Metod	HB-T	SeD-T	YG-T	CS-T	Ortalama±sts
Ca(g/kg)	AAS	184±6	271±83	225±9	209±6	188±28
	INAA(METU)	183±6	186±5	157±5	224±4	194±27
Na(g/kg)	AAS	3.8±0.3	8.4±0.4	3.9±0.1	5.3±0.1	5.4±2.1
	INAA(METU)	3.7±0.2	4.0±0.1	3.5±0.1	4.7±0.1	4.0±0.5
	INAA(MIT)	2.9±0.2	3.5±0.2	3.7±0.2	5.0±0.3	3.8±0.9
K(g/kg)	AAS	1.9±0.1	1.1±0.4	0.87±0.1	1.5±0.1	1.3±0.5
	INAA(METU)	1.2	1.2	0.76	1.1	1.1±0.2
Zn(mg/kg)	AAS	57±4	99±5	62±4	104±4	81±24
	INAA(METU)	106±12	114±12	116±12	119±13	114±6
	INAA(MIT)	53±7	88±12	53±7	97±13	73±23

3.2. INAA

Sekiz numunede, 4'ü dış 4'ü iç, sekiz elementin konsantrasyonları hesaplanmıştır. Sonuçları Tablo 3.10 ve Tablo 3.11' de verilmiştir. Ortalama konsantrasyonlar(Ort) ve ortalama sapmalar(sts) birinci ve ikinci sayım sonuçlarına göre S1 ve S2 (SRM Bone Meal Standartları, biri Al canin ortasında diğeri ise kenarda) standartları kullanılarak hesaplanmıştır sadece Cr Orchard Leaves standardı kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.10. Dört diş kemik numunesinde birinci ve ikinci sayımlara göre elde edilen sonuçlar

Elementler	SeD-T	CS-T	YG-T*	HB-T	Ort ± Sts	Medyan	Geomean
Ca (g/kg)	186 ± 5	224 ± 4	157 ± 5	183 ± 6	188 ± 28	185	186
Na (g/kg)	4.04 ± 0.07	4.71 ± 0.03	3.53 ± 0.11	3.68 ± 0.16	3.99 ± 0.53	3.86	3.97
Zn (mg/kg)	114 ± 12	119 ± 13	116 ± 12	106 ± 12	114 ± 6	115	114
Br (mg/kg)	1.2 ± 0.1	0.24 ± 0.01	7.8 ± 0.4	1.1 ± 0.1	2.6 ± 3.5	1.2	1.3
Cr (mg/kg)	0.18 ± 0.04	2.5 ± 0.4	0.95 ± 0.17	0.93 ± 0.10	1.1 ± 1.0	0.9	0.8
Fe (mg/kg)	134 ± 13	26.5 ± 3.8	154 ± 16	73.5 ± 8.7	97 ± 58	104	80
Sr (mg/kg)	134 ± 2	85.0 ± 2.8	41.8 ± 1.8	57.0 ± 2.3	76 ± 41	67	69
Ba (mg/kg)	1.4 ± 0.2	3.2 ± 0.2	-	3.4 ± 0.4	2.7 ± 1.1	3.2	2.5

*YG-T: T kemiğin dış kısmının olduğunu gösteriyor

Tablo 3.11. Dört iç kemik numunesinde birinci ve ikinci sayımlara göre elde edilen sonuçlar

Elementler	SeD-C	YG-C*	CS-C	HB-C	Ort ± Sts	Medyan	Geomean
Ca (g/kg)	247 ± 7	218 ± 4	237 ± 5	198 ± 3	225 ± 22	228	224
Na (g/kg)	4.50 ± 0.16	4.60 ± 0.05	5.30 ± 0.07	4.46 ± 0.02	4.72 ± 0.39	4.55	4.70
Zn (mg/kg)	114 ± 12	119 ± 13	115 ± 13	113 ± 12	115 ± 3	115	115
Br (mg/kg)	0.81 ± 0.04	1.5 ± 0.1	0.54 ± 0.02	0.69 ± 0.02	0.9 ± 0.4	0.8	0.8
Cr (mg/kg)	6.1 ± 1.1	3.4 ± 0.5	0.84 ± 0.20	0.14 ± 0.03	2.6 ± 2.7	2.1	1.2
Fe (mg/kg)	58.0 ± 7.3	35.6 ± 3.1	24.7 ± 4	166 ± 16	71 ± 65	47	54
Sr (mg/kg)	82.6 ± 3.0	62.0 ± 3.4	101 ± 6	74.3 ± 2.5	75 ± 15	74	74
Ba (mg/kg)	4.6 ± 0.4	-	6.8 ± 0.4	4.5 ± 0.2	5.3 ± 1.3	4.6	5.2

*YG-C: C kemiğin iç kısmının olduğunu gösteriyor

Bu sonuçlara göre kemiğin iç ve dış kısımları her bir element için oranlandırıldığı zaman Tablo 3.12 de verilen sonuçlar elde edilmiştir. Görüldüğü üzere T/C oranı Br, Cr, ve Fe için birden büyük Ba için ise birden küçük bulunmuştur.

Tablo 3.12. Trabeküler sonuçlarının Kortikal sonuçlarına olan oranları

Elementler	SeD	CS	YG	HB	Ort ± Sts
Ca	0.75	0.95	0.72	0.92	0.84 ± 0.12
Na	0.90	0.89	0.77	0.83	0.84 ± 0.06
Zn	1.0	1.0	0.97	0.94	0.99 ± 0.04
Br	1.5	0.44	5.2	1.6	2.2 ± 2.1
Cr	0.03	3.0	0.28	6.6	3.5 ± 4.4
Fe	2.3	1.1	4.3	0.44	2.0 ± 1.7
Sr	1.7	0.84	0.67	0.77	1.0 ± 0.5
Ba	0.30	0.47		0.76	0.51 ± 0.23

Tablo 3.13 ve Tablo 3.14 'de 5 kortikal ve 5 trabeküler kemik numunesi sonuçları verilmektedir.

Tablo 3.13. Beş tane kortikal kemik numunesindeki sonuçlar

Elementler	SeD-C	CS-C	YG-C	HB-C	ZK-C	Ort ± Sts
Na(g/kg)	3.5 ± 0.2	4.6 ± 0.3	7.2 ± 0.5	2.7 ± 0.2	6.7 ± 0.4	4.9 ± 1.8
K(g/kg)	1.6	5.2	2.1 ± 0.1	3.3	-	3.0 ± 1.4
Fe(mg/kg)	56 ± 8	81 ± 26	62 ± 14	180 ± 10	210 ± 20	118 ± 64
Zn(mg/kg)	55 ± 7	76 ± 10	120 ± 20	62 ± 8	110 ± 20	85 ± 26
As(mg/kg)	0.23 ± 0.02	0.52	0.27	0.37 ± 0.04	1.20	0.52 ± 0.36
Se(mg/kg)	0.32 ± 0.26	0.77	0.77 ± 0.67	-	0.83 ± 0.51	0.68 ± 0.18
Rb(mg/kg)	1.1 ± 0.1	0.84 ± 0.51	1.0 ± 0.6	1.2	2.4	1.3 ± 0.6
Zr(mg/kg)	13	35	34 ± 28	16	18 ± 18	23 ± 9.4
Mo(mg/kg)	0.9	1.4	0.35 ± 0.29	1.2	3.3	1.4 ± 1.0
Cd(mg/kg)	0.27	2.0	1.7 ± 0.6	0.36 ± 0.06	0.89 ± 0.52	1.04 ± 0.70
Ba(mg/kg)	13	8 ± 5	21	16	36	19 ± 10
Ce(mg/kg)	0.31 ± 0.09	0.65 ± 0.03	0.64	0.45 ± 0.02	0.29	0.47 ± 0.15
Nd(mg/kg)	1.3	2.8 ± 0.3	2.1	1.5 ± 0.5	3.8	2.3 ± 0.91
Cr(mg/kg)	0.40	0.48 ± 0.23	1.2 ± 0.3	0.9 ± 0.17	1.3	0.86 ± 0.37
Hg (mg/kg)	2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.1	3.2 ± 0.1	1.9 ± 0.1	4.5 ± 0.2	2.8 ± 0.95

Tablo 3.13 devam ediyor

Elementler	SeD-C	CS-C	YG-C	HB-C	ZK-C	Ort ± Sts
Br (mg/kg)	0.77 ± 0.22	0.5 ± 0.24	2.9 ± 0.8	8.1 ± 2.1	11 ± 3	4.6 ± 4.2
Sm (µg/kg)	12	-	18	16	35 ± 18	34 ± 28
Eu (µg/kg)	5.4	9.8 ± 5.5	8.8 ± 7.3	12	25	12 ± 6.7
Tb (µg/kg)	14	19	51 ± 26	16	84	37 ± 27
Yb (µg/kg)	7 ± 5.7	28	26 ± 16	22	63	29 ± 18
Lu (µg/kg)	2.8 ± 1.7	9.7	5.8 ± 4.1	7.5	23.0	9.8 ± 7.0
Ta (µg/kg)	330 ± 160	48 ± 40	380 ± 220	65	72	179 ± 145
Th (µg/kg)	47	37 ± 21	81	55	140	72 ± 37
U (µg/kg)	200	110 ± 80	27	260	710	261 ± 238
Sc (µg/kg)	3.0 ± 0.8	2.6 ± 0.9	6.6 ± 1.5	5.3 ± 1.3	8.1 ± 2.3	5.1 ± 2.1
Co (µg/kg)	46 ± 12	83 ± 16	65 ± 31	26 ± 10	130 ± 30	70 ± 36
Sb (µg/kg)	16	7 ± 6	25	22 ± 2	60	26 ± 18
La (µg/kg)	25	30 ± 9	140 ± 10	120 ± 10	54 ± 14	74 ± 47
Cs (µg/kg)	38 ± 19	76 ± 10	130	65 ± 7	130 ± 50	88 ± 37

Tablo 3.14. Beş tane trabeküler kemik numunesindeki sonuçlar

Elementler	SeD-T	CS-T	YG-T	HB-T	ZK-T	Ort ± Sts
Na(g/kg)	3.5 ± 0.2	5.0 ± 0.3	3.7 ± 0.2	2.9 ± 0.2	4.9 ± 0.3	4.0 ± 0.9
K(g/kg)	1.2	1.1	0.76	1.2	2.6 ± 0.2	1.4 ± 0.71
Fe(mg/kg)	280 ± 20	37	34 ± 10	110 ± 10	1100 ± 100	312 ± 452
Zn(mg/kg)	88 ± 12	97 ± 13	53 ± 7	53 ± 7	110 ± 20	80 ± 26
As(mg/kg)	0.14 ± 0.07	0.20	0.15 ± 0.2	0.23	0.27 ± 0.09	0.20 ± 0.05
Se(mg/kg)	0.66	0.60 ± 0.43	0.76	0.40 ± 0.32	0.25	0.53 ± 0.21
Rb(mg/kg)	1.6	2.8	1.6	0.38	1.3	1.5 ± 0.9
Zr(mg/kg)	34	-	18	18	24 ± 20	24 ± 7.5
Mo(mg/kg)	0.8	1.0	0.82 ± 0.18	1.0	1.1	1.0 ± 0.1
Cd(mg/kg)	0.54	0.28	0.013	0.082 ± 0.077	0.13	0.21 ± 0.21
Ba(mg/kg)	14	20	16	19	16	17 ± 2
Ce(mg/kg)	0.54	0.74	0.23 ± 0.1	0.51	0.47	0.50 ± 0.18
Nd(mg/kg)	2.1	2.9	1.5	1.7	0.2	1.7 ± 1.0
Cr(mg/kg)	0.58 ± 0.16	2.3 ± 0.3	0.84 ± 0.17	0.76 ± 0.2	6.8 ± 0.3	2.3 ± 2.7
Hg(mg/kg)	1.3 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.1 ± 0.5

Tablo 3.14 devam ediyor

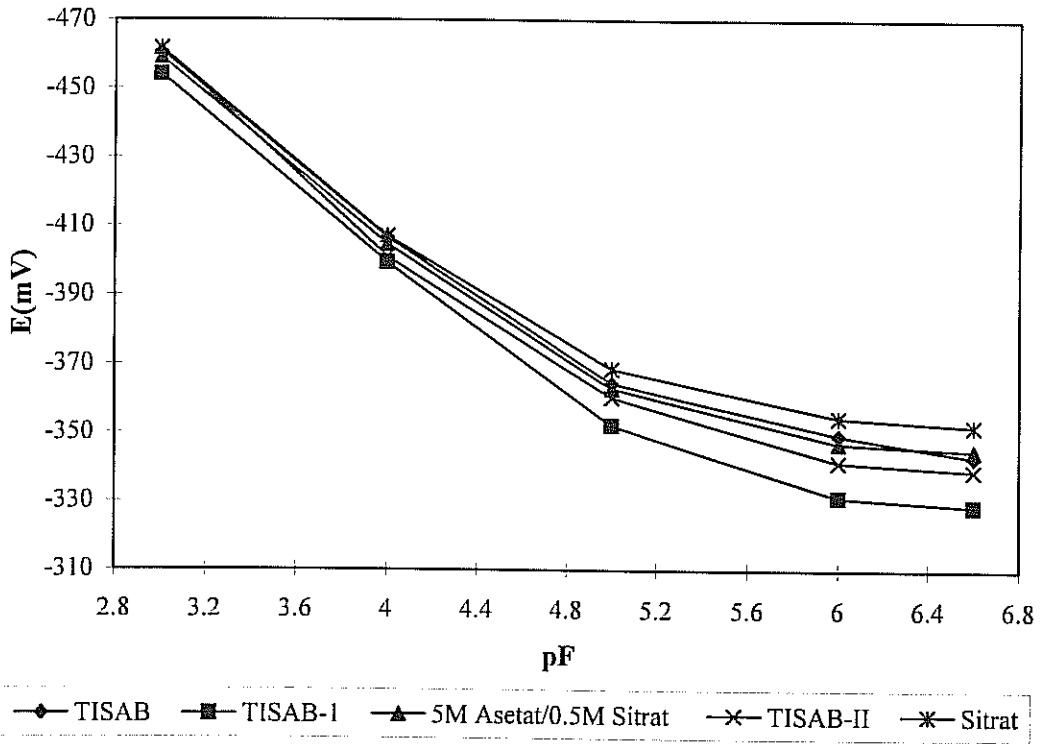
Br (mg/kg)	1.6 ± 0.4	0.51 ± 0.18	0.61 ± 0.18	0.96 ± 0.27	17 ± 5	4.2 ± 7.2
Sm (µg/kg)	13	15	10	13	3.3	11 ± 5
Eu (µg/kg)	10 ± 7	15 ± 10	22	17	18	16 ± 4
Tb (µg/kg)	16	18 ± 8	17	19	37	21 ± 9
Yb (µg/kg)	20	25	19	23	24	22 ± 3
Lu (µg/kg)	7.0	9.4	6.7 ± 1.4	8.0	9.1	8.0 ± 1.2
Ta (µg/kg)	220 ± 160	-	33 ± 31	91	120 ± 60	116 ± 78
Th (µg/kg)	27 ± 19	77	56	63	60	57 ± 18
U (µg/kg)	180	220	170	220	220	202 ± 25
Sc (µg/kg)	3.0 ± 0.9	4.4 ± 1.7	5.5 ± 1.8	4.1 ± 1.2	6.1 ± 1	4.6 ± 1.2
Co (µg/kg)	62 ± 20	64 ± 23	55 ± 21	47 ± 17	97 ± 16	65 ± 19
Sb (µg/kg)	12	3	16	20	54 ± 8	21 ± 19
La (µg/kg)	19 ± 5	43 ± 8	17	12 ± 6	85 ± 8	35 ± 30
Cs (µg/kg)	34 ± 24	120	78	77	93	80 ± 31

3.3. Kemikte İyon Seçici Elektrot Kullanılarak Florür Tayini

3.3.1 Flor İyon Seçici Elektrotu Ölçümlerindeki Bazı Önemli Parametrelerin Optimizasyonu

1) TISAB Seçimi:

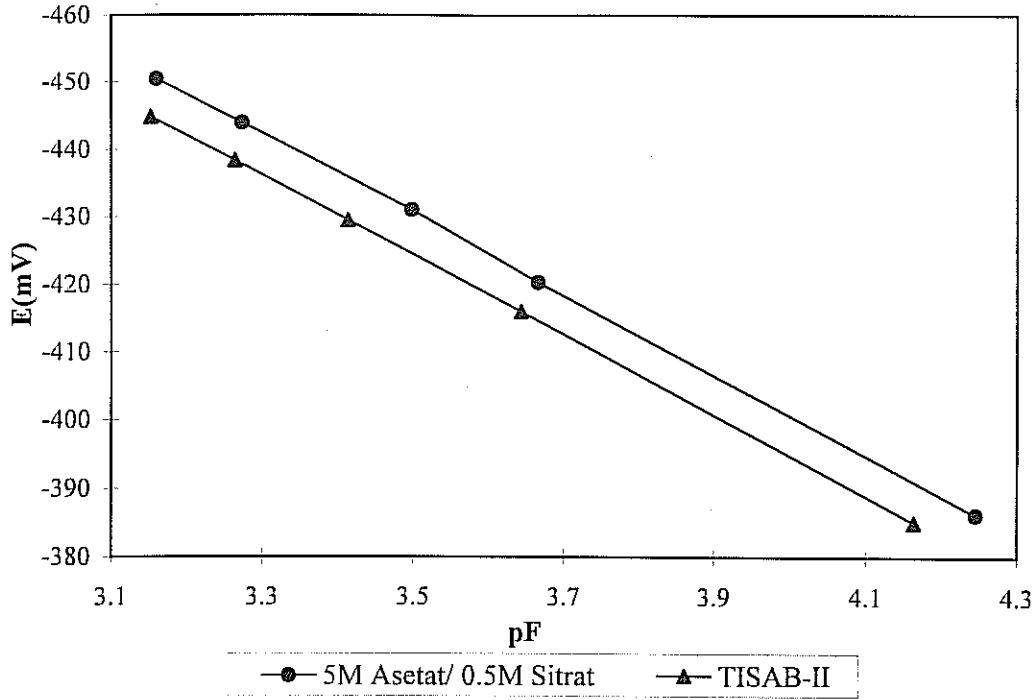
Beş TISAB çözeltisi için Şeil 3.1.5 'deki kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Bu beş tampon için çizilen kalibrasyon eğrilerine bakıldığı zaman aralarında duyarlılık açısından fark olmadığı görülmektedir. Görünebilirlik sınırlarında ise çok az farklılıklar vardır.



Şekil 3.1. Beş farklı tampon için 10^{-3} - $5 \cdot 10^{-7}$ M arasındaki kalibrasyon grafiği (pH=5.5, 1:1 seyreltme)

Bu tamponların kemik matriksindeki eğilimlerini görmek için TISAB-II ve 5 M asetat/0.5M sitrat tamponları için Şekil 3.2 'deki kalibrasyon eğrileri çizilmiştir.

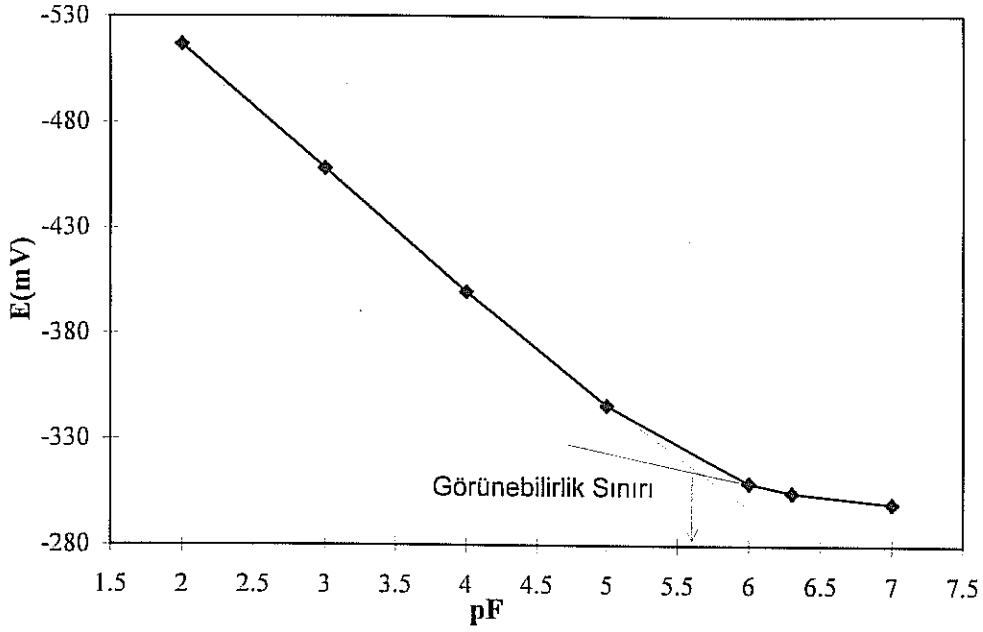
TISAB-II için duyarlılık 59.1 ve 5 M asetat/0.5M sitrat için ise 59.3 bulunmuştur. Bu da aralarında bir fark olmadığını göstermiştir.



Şekil 3.2. Kemik matriksinde iki tampon çözeltisinde çizilen kalibrasyon eğrileri (pH=5.5, 1:1 seyreltme)

Sonuç olarak bu tamponların arasında büyük farklar olmadığına karar verilmiştir. TISAB-II bu 5 tampon arasından yüksek sitrat konsantrasyonu ve diğerlerine göre daha düşük olan görünebilirlik sınırı göz önüne alınarak seçilmiştir.

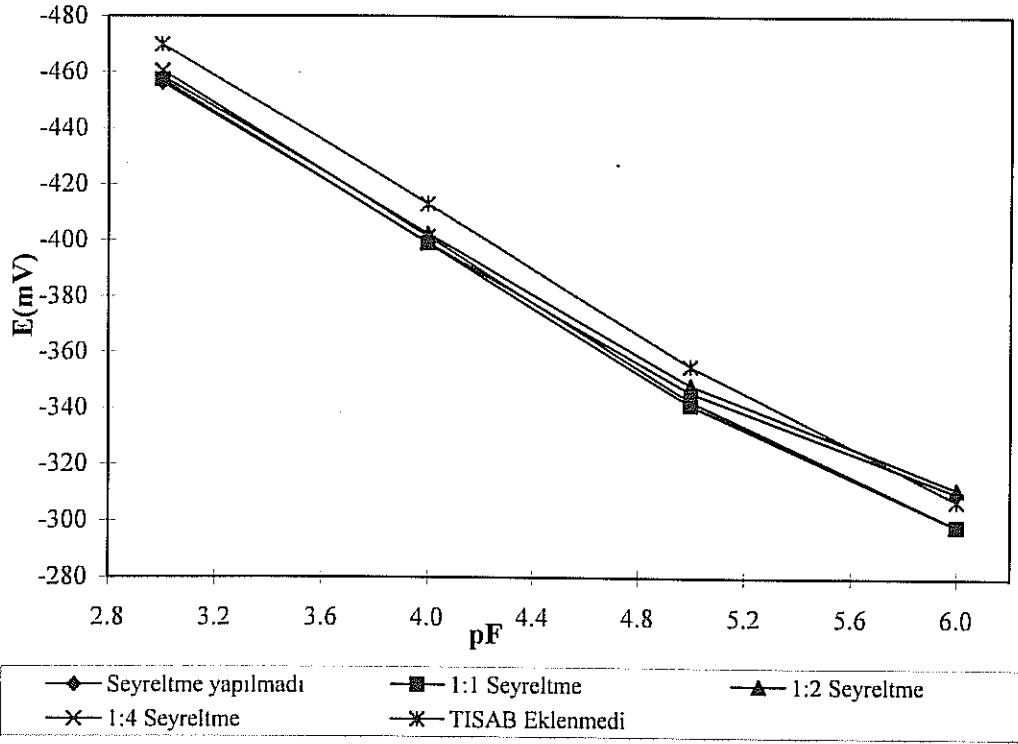
Görünebilirlik Sınırı iki lineer bölgenin ekstrapole edilmesi sonucu oluşan kesişim noktasıdır (Şekil 3.3). Bu çalışmada TISAB-II kullanılarak görünebilirlik sınırı $3 \cdot 10^{-6} M$ bulunmuştur. Lineer bölge ise 10^{-2} ile $10^{-5} M$ F konsantrasyonu arasındadır. Görünebilirlik sınırının bu şekilde hesaplanması IUPAC tarafından tavsiye edilmiştir (Bailey, 1980).



Şekil 3.3. IUPAC tarafından tavsiye edilen görünebilirlik sınırı

2) Tampon Seyreltme Oranı:

Beş tampon-çözelti oranı, tampon seyreltme oranının etkisini görmek için çalışılmıştır. Kalibrasyon eğrileri 10^{-3} ile 10^{-6} M F konsantrasyonu aralığında çizilmiştir. Şekil 3.4 de de görüleceği üzere bu eğriler arasında duyarlılık, ve lineerlik açısından bir fark gözlemlenmemiştir. Böylelikle sonuç olarak oran ne olursa olsun önemli olanın ortamın iyonik gücünü sabit tutmak olduğuna karar verilmiştir. Bununla birlikte 1:1 oranı tampon-çözelti bu çalışmada, sitrat konsantrasyonu düşünülerek seçilmiştir.

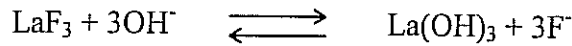


Şekil 3.4. TISAB-II seyreltme oranının sinyal üzerindeki etkisi

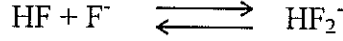
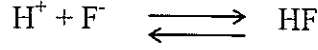
3) pH

pH'nin etkisini gözlemlemek için bir seri farklı pH'larda TISAB-II tamponu deney kısmında anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Elektrot potansiyelleri bu tamponlarda farklı florür konsantrasyonlarında Şekil 3.5 'de görüldüğü gibi ölçülmüştür.

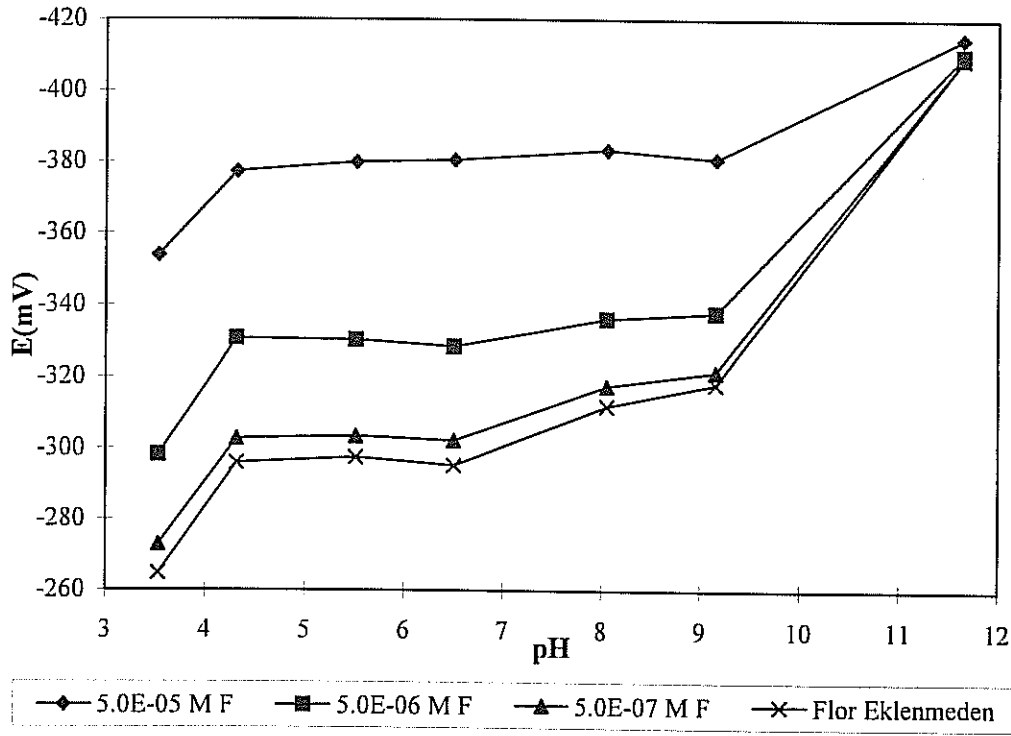
Kuvvetli bazik çözeltilerde ($\text{pH} > 9.5$) elektrot tamamiyle hidroksit iyon konsantrasyonu değişikliklerine cevap vermektedir. Bu interferansın sebebi OH^- 'in LaF_3 lattice'ine girmesi sonucu olabilir çünkü OH^- ve F^- aynı yüklüdürler ve büyüklükleri de aşağı yukarı aynıdır veya aşağıda verilen yüzey reaksiyonu buna sebep olabilir (Cammann and Rechnitz, 1976; Hawkins et al., 1978):



Düşük pH'larda ise ($\text{pH} < 4$), aşağıdaki mekanizmadaki gibi florür ve hidrojen iyonları hidrojen florür oluşturabilirler:



Şekil 3.5' de de görüleceği üzere pH 6.5 'un üzerinde çok düşük florür konsantrasyonlarında çalışılmaz çünkü bu pH'dan sonra OH⁻ interferansı ortaya çıkmaktadır. Böylelikle çalışma pH aralığı 5-6 arası olarak belirlenmiştir.

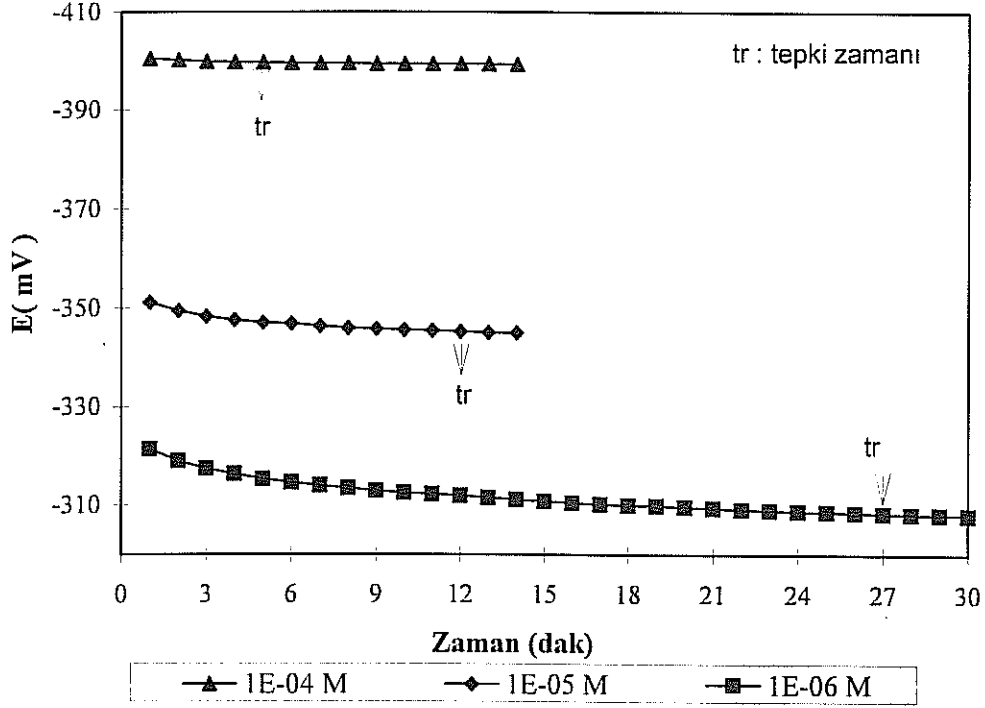


Şekil 3.5. TISAB-II tampon çözeltisi ortamında farklı florür konsantrasyonlarında pH'nın sinyal üzerindeki etkisi

4) Tepki Zamanı:

Tepki zamanı sabit bir potansiyel değerine ulaşınca kadar geçen zamandır. Sabit potansiyelde son okunan denge potansiyelinden sonraki 0.1 mV'luk değişimin

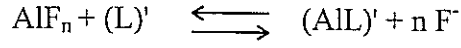
gözlemlendiği değerdir. Şekil 3.6 'da farklı konsantrasyonlardaki zaman karşılık potansiyeldeki değişimi göstermektedir. Tepki zamanı yüksek konsantrasyonlarda azalmaktadır. Bizim deneylerimizde yüksek konsantrasyonlar için 3-4 dakika dengeye ulaşmak için yeterli olmaktadır. Bununla birlikte düşük konsantrasyonlar için bu süre artmaktadır mesela 10^{-7} M için bu süre 25-30 dakikaya kadar çıkmaktadır. Tepki zamanı ayrıca potansiyelin hangi çözültiden sonra ölçüldüğüne de bağlı olmaktadır.



Şekil 3.6.Farklı florür konsantrasyonlarında zamana bağımlı olarak potansiyeldeki değişim grafiği

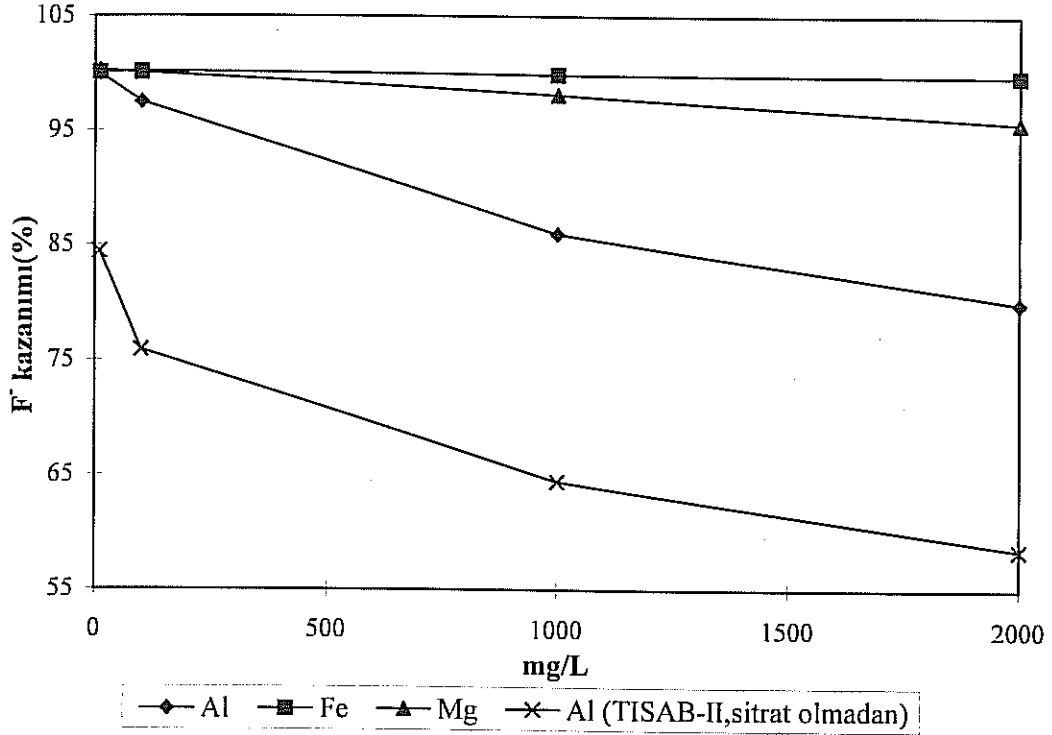
5) Alüminyum ve Diğer Florür ile Kompleks Yapan İyonların Etkilerinin Ortadan Kaldırılması

Al, Fe, and Mg iyonlarının varlığı toplam florür konsantrasyonu ölçümlerini etkilemektedir. Çünkü bu iyonlar florür iyonları ile kompleks oluşturmaktadırlar. Bu etkiyi ortadan kaldırmak için çeşitli Masking Reagent'lar karşılaştırılmıştır. Florür iyonlarını Al dan ayırma reaksiyonu ise şu şekildedir:



Masking Reagent olarak DCTA (1,2 diaminocyclohexanetetracetic acid), EDTA ve sitrat denenmiş ve sitratın diğerlerinden daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Yuchi et al., 1986).

Sitrat bu çalışmada da decomplexing agent olarak seçilmiştir. TISAB-II 'nin ne kadar loru kazandırabildiğini görmek için farklı Al, Fe ve Mg konsantrasyonlarında $4.44 \cdot 10^{-4}$ M florür varlığında çalışılmıştır. Bu florür konsantrasyonu kemikteki maksimum florür konsantrasyonu düşünülerek seçilmiştir. Sonuçlar Şekil 3.7 ve Tablo 3.15'de verilmiştir.



Şekil 3.7. Al, Fe(III) ve Mg'un TISAB-II ortamında $4.44 \cdot 10^{-4}$ M F konsantrasyonu içeren çözeltilerdeki % florür kazanımı grafiği

Tablo 3.15. Al, Fe ve Mg varlığında TISAB-II ve TISAB-II tamponunun bulunmadığı çözeltilerde yüzde florür kazanım sonuçları

Eklenen Al, Fe veya Mg mg/L	% kazanım, sitratlı ortamda			% kazanım, sitratsız ortamda
	Al	Fe	Mg	Al
10	100	100	100	84
100	98	100	100	76
1000	86	99.9	98	64
2000	80	99.8	96	58

Kemik numunelerinde florür tayini için bu tampon yeterli miktarda sitrat içermektedir. Eğer 100 mg kadar kemik numunesi 25 ml de çözülürse, bu çözeltilerdeki Al, Fe ve Mg konsantrasyonları Tablo 3.16' da verilmiştir. Bu değerler literatürden alınmış değerler olup kemikteki en yüksek değerlerdir (Iyengar, 1997).

Tablo 3.16. Al, Fe ve Mg konsantrasyonları, (100 mg kemik 25 mL hacimde)

	mg/kg	mg/L
Al	67	$9.9 * 10^{-6}$
Fe	530	$3.8 * 10^{-5}$
Mg	3900	$6.4 * 10^{-4}$

Görüldüğü üzere Al, Fe ve Mg bu konsantrasyonlarda TISAB-II tamponu kullanıldığı zaman florür tayinini etkilememektedirler.

3.3.2 Ölçümlerin Güvenirliliği

SRM 1486 Bone Meal analizler sonucu elde edilen sonuçların güvenirliliğini belirlemek için, bu SRM kemik numunelerinin analiz edildiği gibi aynı işlemler uygulanarak analiz edilmiştir.

Tablo 3.17 Flor elektrodu ile analiz edilen SRM 1486 Bone Meal sonuçları

Bone Meal (mg/kg)	1	2	3	4	Ort ± Sts	RSD(%)
Mikrodalga Sindirimi	904	898	859	987	912 ± 54	5.93
Asit Bombası Sindirimi	972	912	942		942 ± 30	3.22

t-test % 95 CL da uygulanmış, mikrodalga ve asit bombası sonuçlarının aynı olduğu görülmüştür.

Tablo 3.18. SRM 1486 Bone Meal' da florür konsantrasyon sonuçları (mg/kg). (n analiz edilen numune sayısı)

Sertifikalanmamış Değer	800
INAA, Almanya da kısa ışınlama	820 ± 47 (n=6)
Iyon Seçici Elektrod	912 ± 54 (n=4)

t-test %95 CL da uygulanlığı zaman INNA ve ISE sonuçları birbirinden farklı bulunmuştur.

Orion sıvı florür standardı da 3 değişik metodla analiz edilmiştir:

- Sindirme işlemine tabi tutmadan,
- Mikrodalga sindirimi sanki katı imiş gibi
- Asit bombası sindirimi

Tablo 3.19. Orion standardında ISE kullanılarak elde edilen florür konsantrasyonu sonuçları (mg/L)

	1	2	3	4	Ort ± Sts
Orion serifikalanmış					100 ± 1
Sindirme işlemi olmadan	97.7	106	107	106	104 ± 4
Mikrodalga	101	105	104	107	104 ± 2
Asit Bombası	113	109	108		110 ± 2

Bu sonuçlar göstermektedir ki sindirme işlemi sonucu florür kaybı olmamaktadır. Çünkü florür asitli ortamda, HF oluşturmaktadır ve HF'in kaynama noktası 120 °C' dir. Her iki sindirme sisteminde asidik ortamda florür kaybı olmamıştır. Mikrodalga sindirim yöntemi bu çalışmada Orion standardı sonucu ile uyumu nedeni ile seçilmiştir.

3.3.3 Femur Başından Alınan Kemik Numunesinde Florür Tayini

Numune Hastanesinden, 20 g femur başı kemik numunesi alınmıştır. Bu kemik numunesinde diğer ilyak kanat kemik numunelerine uygulanan işlemler uygulanmıştır. Yağdan, kandan arındırılmış ve florür tayini için çözülmüştür. 100-110 mg kadar kemik her bir deney için kullanılmıştır. Bu kemikte mikrodalga ve asit bombası kullanılarak çözülmüştür. Sonuçlar Tablo 3.20 da verilmiştir.

Tablo 3.20. Femur Başından alınan numunede florür konsantrasyonu sonuçları (mg/kg)

Paralleler	Asit Bombası (3.6.1997)	Mikrodalg a (3.6.1997)	Mikrodalga (4.7.1997)
1	696	698	781
2	767	679	756
3	734	709	741
4	741	707	711
5		728	716
6		709	741
Ort ± Sts	735 ± 29	705 ± 16	741 ± 26
Medyan	738	708	741
Geometrik Ortalama	734	705	741
% RSD	4.0	2.3	3.5

Tablo 3.20'de görüleceği üzere farklı deneyler aynı numune için benzer sonuçlar vermiştir. t-test 95% CL da uygulandığında bu ispatlanmıştır.

Bütün bu üç testte göstermişirki bu işlemlerle ve bu iyon seçeci elektrod ile güvenilir ve birbirine uyumlu sonuçlar elde edilebilir.

3.3.4 Kemik Numunelerinde Florür Konsantrasyonu Sonuçları

Yirmidört tane kemik numunesinde, 12'si iç 12'si dış, elde edilen florür konsantrasyonları Tablo3.21 ve Tablo 3.22'de verilmiştir.

Tablo 3.21 Kortikal kemik numunelerinde florür konsantrasyonları sonuçları (mg/kg)

Numuneler	1	2	3	Ort ± Sts	RSD
SeD-C	307	301	319	309 ± 9	3.0
MD-C	532	453		493 ± 56	11
CS-C	723	708	687	706 ± 18	2.6
AA-C	728	713	752	731 ± 20	2.7
YG-C		1218	1069	1144 ± 105	9.2
FD-C	919	1029		974 ± 78	8.0
NO-C	760	614		687 ± 103	15
AD-C	631	556	579	589 ± 38	6.5
Erkekler				704 ± 262	
SD-C	725	749	701	725 ± 24	3.3
HB-C	202	207	200	203 ± 4	1.8
ZK-C	668	607	460	578 ± 107	18
UT-C	784	827	836	816 ± 28	3.4
Bayanlar				581 ± 270	

Tablo3.22 Trabeküler kemik numunelerinde florür konsantrasyonları sonuçları (mg/kg)

Numuneler	1	2	3	Ort ± Sts	RSD
SeD-T	375	386	403	388 ± 14	3.6
MD-T	481	508	459	483 ± 25	5.1
CS-T	1082	983	1019	1028 ± 50	4.9
AA-T	1003		897	950 ± 75	7.9
YG-T	1505	1576	1569	1550 ± 39	2.5
FD-T	766	707	719	731 ± 31	4.3
NO-T	735	666	694	698 ± 35	5.0
AD-T	637	655	631	641 ± 12	1.9
Erkekler				809 ± 368	
SD-T	729	783	803	772 ± 38	5.0
HB-T	961	901		931 ± 42	4.6
ZK-T	650	660		655 ± 7	1.1
UT-T	242	214	219	225 ± 156	6.6
Bayanlar				646 ± 302	

Ortalama, medyan, geometrik ortalama and standart sapma sonuçları bütün numuneler için Tablo 3.23 de verilmiştir.

Tablo 3.23 Trabeküler ve Kortikal kemik numunelerindeki sonuçlar (mg/kg). (n analiz edilen numune sayısı).

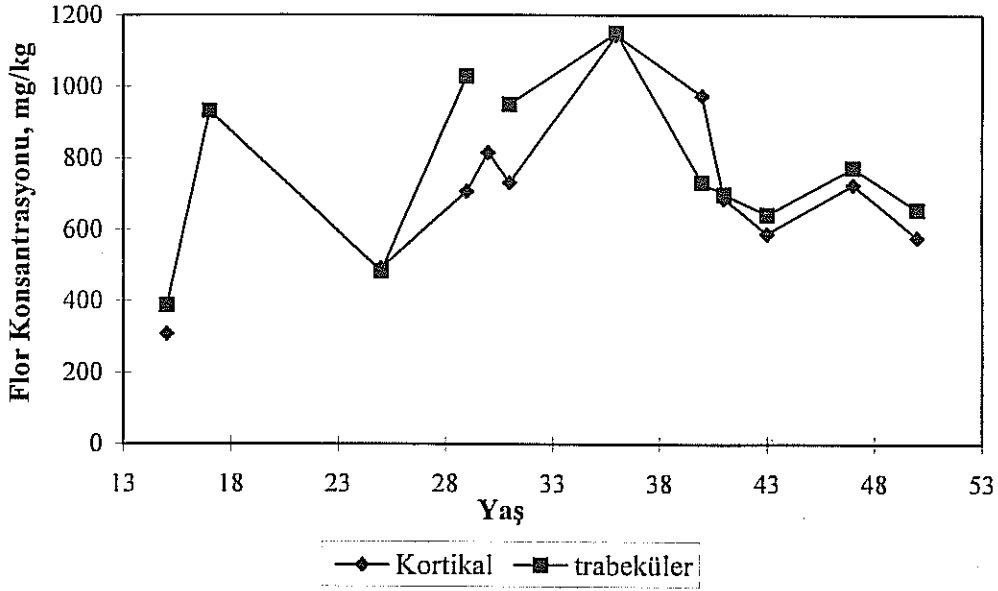
	trabeküler (n=12)	kortikal (n=12)
Ort ± Sts	754 ± 343	663 ± 260
Medyan	715	697
Geometrik Ortalama	680	606

Tablo3.24'de trabeküler florür konsantrasyonunun kortikale olan oranları verilmiştir. Sonuçlar göstermiştir ki trabeküler ve kortikal kısımlardaki florür konsantrasyonları birbirinden çok farklı değildir.

Tablo 3.24 Trabeküler florür konsantrasyonunun kortikale olan oranları

Samples	T/C
SeD	1.3
MD	1.0
CS	1.5
AA	1.3
YG	1.0
FD	0.8
NO	1.0
AD	1.1
SD	1.1
ZK	1.1
Ort ± Sts	1.1 ± 0.20

3.3.5 Florür Konsantrasyonu ile Yaş Arasındaki İlişki



Şekil 3.8 Florür Konsantrasyonu vs. yaş grafiği

Şekil 3.8 de florür konsantrasyonu ile yaş arasındaki ilişkiyi göstermektedir. 35 yaş civarında kemikte florür konsantrasyonu maksimum değerine ulaşmaktadır. Aynı zamanda 35 yaş civarında kemik mineral yoğunluğuda maksimum değerine ulaştığı bilinmektedir.

SONUÇ

Eser elementler kemik metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Hem fazlalığı hemde eksikliği kemik normal işleyiş mekanizmasını etkilemektedir. Bu çalışmada normal bir insan kemiğinde bulunan element konsantrasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada kemikte pekçok elementin aletli nötron aktivasyon ve atomik absorpsiyon yöntemleri ile ve de florürün iyon seçici elektrod ile tayini yapılmıştır.

Numunelerin analizine kadar olan stepler açık bir biçimde tanımlanmıştır. Numunelerin alındığı kısım ve kemiğin kan, yağ ve kasdan arındırılması oldukça önemlidir. Bu durum literatürde belirgin bir biçimde verilmemiştir. Bu oldukça önemlidir çünkü literatür de kemikte bulunan element konsantrasyonları oldukça farklılık göstermektedir. Dolayısı ilede sonuçları karşılaştırmak oldukça güç olmaktadır.

Biz sadece 12 tane kemik numunesi analiz ettiğimiz için, kemikte eser element konsantrasyonu ile pekçok parametre arasında, yaş, ağırlık, boy, BMD gibi, çok kesin bağıntılar bulunamamıştır.

Çalışmanın gerçekleştirildiği örnek sayısının az olması ve cins ve yaşa bağlı BMI ve BMD rasında belirgin fark bulunmaması bu parametreler ile ölçülen minor ve eser elementler arasında bağlantı kurulamamasının en önemli etkenidir.

REFERANSLAR

- Abdulla M., Dashti H., Sarkar B., Al-sayer H., Al-Naqeeb N., Edited by, *Proceedings of the International Symposium, Metabolism of Minerals and Trace Elements in Human Disease*, Smith-Gordan Ltd., London, (1989). pp:191-196.
- Alfrey AC., *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, Vol:2, (1986) Academic Press, Newyork.
- Bailey PL., *Analysis with Ion Selective Electrodes*, Heyden & Son Ltd, Spectrum House, Hillview Gardens, London, NW4 2JQ, 2nd ed, (1980). pp:201-215,46-51.
- Black AE., Wiles SJ., Paul A., *The Nutrient Intakes of Pregnant and Lactating Mothers of Good Socio-Economic Status In Cambridge, UK. Some Implications for Recommended Daily Allowances of Minor Nutrients*, British Journal of Nutrition, (1986); 56: 59-72.
- Boskey AL., *Bone Mineral and Matrix*, The Orthopedic Clinics of North America, 1990; 21:1: 19-29.
- Britton JM., Davie WJ., *Mechanical Properties of Bone from Iliac Crest and Relationship to L5 Vertabral Bone*, Bone, 1990;11: 21-28.
- Bratter P., Gawlik D., Lausch J., Rösick U., *On the Distribution of Trace Elements in Human Skeletons*, J.Radioanalytical Chemistry, 1977; 37: 393-403.
- Burguera M., Burguera JL., Alarcon OM., *Determination of Zinc and Cadmium in Small Amounts of Biological Tissues by Microwave Assisted Digestion and Flow Injection Atomic Absorption Spectrometry*, Anal. Chim. Acta, 1988; 214: 421-427.

Bush VJ., Moyer TP., Batts KP., Parisi JE., *Essential and Toxic Element Concentrations in Fresh and Formalin-Fixed Human Autopsy Tissues*, *Clinical Chemistry*, 1995; 41:2: 284-294.

Calhoun WO., Hurley RB., *Determination of Low Levels of Copper by Atomic Absorption Spectrometry with A Simplified Extraction Technique*, *Analytical Chemistry*, 1980; 52: 1551-1552.

Cammann K., Rechnitz GA., *Exchange Kinetics at Ion-Selective Membrane Electrodes*, *Anal. Chem.*, 1976;48: 856-862.

Chapman S., *Child Abuse or Copper Deficiency. A Radiological View*. *British Medical Journal*, 1987; 294: 1370-1382.

Covington AK., *Ion-Selective Electrode Methodology*, CRC Press Inc., Florida, 2nd Ed., V.II, (1980), pp: 79-80.

Edmond CR., *Direct Determination of Fluoride in Phosphate Rock Samples Using the Specified Ion Electrode*, *Anal. Chem.*, 1969; 41:10: 1327-1328.

Edward JB., Benfer RA., Morris JS., *The Effects of Dry Ashing on the Composition of Human and Animal Bone*, *Biological Trace Element Research*, 1990; 25:10: 219-231.

Evans RA., *Calcium and Osteoporosis*, *The Medical Journal of Australia*, 1990; 152: 431-433.

Frant MS., Ross JW., *Use of a Total Ionic Strength Adjustment Buffer for Electrode Determination of Fluoride in Water Supplies*, *Anal. Chem.*, 1968; 40:7: 1169-1171.

Frausto JR., Williams JP., *The Biological Chemistry of the Elements*, *The Inorganic Chemistry of Life* (1991) Oxford University Press, Newyork.

Gawlik D., Behne D., Brätter P., Gatschke W., Gessner H., *The Suitability of the Iliac Crest Biopsy in the Element Analysis of Bone and Marrow*, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1982; 20: 499-507.

Gil F., Perez M., Facio A., Villanueva E., Tojo R., *Microwave Oven Digestion Procedure for Atomic Absorption Spectrometry Analysis of Bone and Teeth*, Clinica Chimica Acta, 1993; 221: 23-31.

Gruber HE., Baylink DJ., *The Effects of Fluoride on Bone*, Clin. Ortho. Rel. Res., 1991; 267: 264-277.

Hancock RGV., *The Abuse of Bone Analysis for Archaeological Dietary Studies*, Archaeometry, 1989; 31:2: 169-179.

Hancock RGV., Grynopas MD., Alpert B., *Are Archeological Bones Similar to Modern Bones? An INAA Assessment*, J. Radioanal. Nucl. Chem., Articles, 1987; 110:1: 283-291.

Hawkings RC., Corriveau LPV., Kushneriuk SA., Wong PY., *Dynamic Response of the Fluoride Ion-Selective Electrode*, Anal. Chim. Acta, 1978; 102: 61-83.

Hedrich M., Bergmann RL., Rsieck U., Bratter P., Bergmann KE., *Pb, Cd and Mn In Fetal, Infant and Adult Rib Bones from Urban and Industrial Areas of Germany*, Trace Elements In Medicine and Biology, 1989: 237-242.

Hisanaga A., Hirata M., Tanaka A., Ishinishi N., Eguchi Y., *Variation of Trace Metals in Ancient and Contemporary Japanese Bones*, Biological Trace Element Research, 1989;22: 221-231.

Horwood M., *Trace Element Analysis of Human Bone from The Prehistoric Moriori of the Chatham Islands, with Special Reference to Diet*, J. Royal Society of New Zealand, 1989; 19:1: 59-71.

IAEA, *Elemental Analysis of Biological Materials; Current Problems and Techniques with Special Reference to Trace Elements* (1980) Technical Reports Series No.197 IAEA, Vienna.

IAEA-Tec. Doc-854, *Survey of Reference Materials, Biological and Environmental Reference Materials for Trace Elements, Nuclides and Microcontaminants*, IAEA, 1995, December 1995.

Iyengar GV., Tandon L., *The Elemental Composition of Human Tissues and Body Fluids* (1997) Biomineral Sciences International Inc. Newyork.

Kauranen P., *The Use of Buffers in the Determination of Fluoride by an Ion Selective Electrode at Low Concentrations and In the Presence of Aluminum*, Anal. Lett., 1977; 10:6: 451-465.

Kidd PM., Nicolaqu G., Spyrou NM., *Elemental Composition and Distribution of a Human Tibia Using Non-Destructive and Destructive Techniques of Analysis*, J. Radioanalytical Chemistry, 1982; 71: 489-507.

Klepinger LL., *Nutritional Assesment from Bone*, Annual Review Anthropology, 1984; 13: 75-96.

Knapp G., *New Developments in the Decomposition of Biological Material*, Analysentechnik Postfact, 1991; 171: 1-8.

Lambert JB., Simpson VS., Szpunar CB., Buikstra JE., *Bone Diagenesis and Dietary Analysis*, J. Human Evolution, 1985: 14: 477- 482.

Mazess RB., *Fracture Risk: A role for Compact Bone*, Calcified Tissue International, 1990; 47: 191-193.

Melton LJ., Wahner HW., Richelson LS., O'Fallon W.M., Riggs BL., *Osteoporosis and The Risk of Hip Fracture*, American J. Epidemiology, 1986; 124:2: 254-261.

Miller NJ., *Simultaneous Multielement Atomic Absorption Analysis of Biological Materials*, Talanta, 1990; 37:1: 119-125.

Mundy G.R., Poser JW., *Chemomimetic Activity of the Gamma Carboxyglutamic Acid Containing Protein in Bone*, Calcified Tissue International, 1983; 35: 164-168.

Nelson DA., Sauer NJ., *An Evaluation of Postdepositional Changes in the Trace Element Content of Human Bone*, American Antiquity, 1984; 49:1: 141-147.

Nordin BEC., *Guidelines for Bone Densitometry*, The medical Journal of Australia, 1994; 160: 517-520.

Nordin BEC., Need AG., Horowitz M., Morris HA., Durbridge TC., Cleghorn DB, *Osteoporosis and Calcium*, Australian NZ J. Medicine, 1991; 21: 275-279.

Norval EA., *Tungsten Carbide-Coated Crucible for Electrothermal Atomization. Determination of Copper In Some Biological Standards*, Analytica Chimica Acta, 1978; 97: 399-403.

Ostlere SJ., Gold RH., *Osteoporosis and Bone Density Measurement Methods*, Clinical Orthopedics and Related Research, 1991; 271: 149-163.

Rheingold AL., Hues S., Cohen MN., *Strontium and Zinc Content in Bones as an Indication of Diet*, J. of Chem. Educ., 1983, 60:3: 233-234.

Riggs BL., Wahner HW., Melton LJ., *Rates of bone loss in the axial and appendicular skeletons of women: evidence of substantial vertebral bone loss prior to menopause*, J. Clinical Investigations, 1986; 77: 1487-1491.

Robertson JD., Samudralwar DL., Markesbery WR., *Ion Beam Analysis of the Bone Tissue of Alzheimer's Disease Patients*, Nuclear Instrumental. Methods Physical Research, 1992; B64: 553-557.

Robey PG., *The Biochemistry of Bone, Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 1989; 18:1: 859-902.

Runia LT., *Analysis of Bone from The Bronze Age Site Bovenkarspel-Het Valkje, The Netherlands: A Preliminary Report Archaometry*, 1987; 29:2: 221-232.

Sheldon RS., *Orthopaedic Basic Science*, American Academy of Orthopaedic Surgeons, (1994), pp:129-184.

Trace Elements in Human Nutrition and Health (1996) World Health Organization, Geneva.

Yilmaz, G., *Determination of Minor and Trace Elements in Bone Samples by INAA*, (1997) MS Thesis.

Yuchi A., Ueda K., Wada H., Nakagawa G., *Equilibrium Study on the Masking of Aluminum Ion in the Determination of Fluoride with Ion-Selective Electrodes*, Anal. Chim. Acta, 1986; 186: 313-318.

Zwanziger H., *The Multielement Analysis of Bone*, Biological Trace Element Research, 1989; 19: 195-232.

BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU

1- Proje No: SBAG-1533

2- Rapor Tarihi: 10.12.1997

3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1.1.1996-1.8.1997

4- Projenin Adı: Kemikte Eser Elementler ve Bunun Osteoporoz ile İlişkisi

5- Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar:

Proje Yürütücüsü : Prof.Dr.Namık K.Aras

Yardımcı Araştırmacılar : Gülay Yılmaz, Selmiye Alkan, Feza Korkusuz, Uğur Günel, Behçet Sepici, Fatih Eksioğlu

6- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:

ODTÜ Kimya Bölümü ve Sağlık Merkezi, Ankara

7- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:

International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.

8- Öz (Abstract):

Kemik kalsiyum, fosfor, sodyum, potasyum, florür ve diğer vücut için gerekli olan elementler için önemli bir depodur. Bu elementlerin azlığı ya da çokluğu osteoporoz gibi kemik hastalıklarının gelişiminde önemli rol oynadığı sanılmaktadır. Bu nedenle normal kemikte eser element tayini oldukça önem kazanmaktadır.

Kemikte pek çok eser element Aletli Nötron Aktivasyon ve Atomik Absorbsiyon yöntemleri ile, flor ise iyon seçici elektrod ile tayin edilmiştir. Kemik numuneleri osteoporoz hastalığı dışında travma nedeniyle kemiğe yönelik cerrahi girişimde bulunan kişilerin ilyak kanat kısımlarından alınmıştır. Kemik yüzeyi su, sitrik asid ve ether kullanılarak kan, yağ'dan temizlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Osteoporoz, kemik, nötron aktivasyon analizi, iyon seçici elektrod.

9- Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler

Bu sonuçlar yurt dışında Japonya'da yurt içinde Van ve İstanbul'da yapılan kongrelerde sunulmuşlardır. J.Radio Anal.Chem.mecmuasında bir makale gönderilmiştir.

10- Bilim Dalı:

Doçentlik B. Dalı Kodu:

ISIC Kodu:

Uzmanlık Alanı Kodu:

11- Dağıtım (*): Sınırlı

Sınırsız

12- Raporun Gizlilik Durumu :

Gizli

Gizli Değil

(*) Projenizin Sonuç Raporunun ulaştırılmasını istediğiniz kurum ve kuruluşları ayrıca belirtiniz.