

2007-613

TÜBİTAK

TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU
THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

Temel Bilimler Araştırma Grubu
Basic Sciences Research Grant Group

4000 777
95966

Proje No: TBAG-2369(103T157)

**Selenyumun Tavuk Etinde Toplam Derişim ve Türlerinin
Belirlenmesi**

Prof.Dr. Mürvet VOLKAN
Prof. Dr. O. Yavuz ATAMAN
Doç Dr. Nusret ERTAŞ
Doç. Dr. Mustafa EREN

Temmuz 2007
ANKARA

Önsöz

TÜBİTAK tarafından desteklenen bu proje kapsamında, Türkiye’de ilk defa HPLC-ICP-MS sistemi kullanılarak selenyum türlendirmesi yapılmıştır. Bu çalışmanın hem araştırma grubumuzda, hem de ülkedeki diğer gruplarda benzer çalışmaları başlatacağını umuyoruz. Her selenyum türünün insan vücudunda farklı aktiviteler gösterdiği göz önüne alındığında, bu projenin önemi birkez daha anlaşılabilir. Türlendirme çalışmaları hem selenyum, hem de diğer elementler üzerinde genişletilerek sürdürülmelidir.

İÇİNDEKİLER		Sayfa
1. Giriş		16
1.1. Selenyumun Önemi ve Tayin Yöntemleri		16
1.2. Selenyum Türlelendirmesi İçin Ekstraksiyon Teknikleri		17
1.2.1. Literatürde Kullanılan Ekstraksiyon Teknikleri		17
2. ICP-MS cihaz parametrelerinin optimizasyonu		19
3. ICP-MS sisteminde kullanılacak çözeltinin hacim optimizasyonu		21
4. Yumurta örneklerinin dondurarak kurutulması (Freeze-Drying)		22
5. Yumurtada toplam Se tayini		22
6. Farklı yöntemlerle yumurtada bulunan selenyumun ekstraksiyonu		26
7. Ekstraksiyon Süresinin Optimizasyonu		31
8. Ekstraksiyon İşleminde Kullanılacak Enzim Miktarının Optimizasyonu		34
9. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Çalışmaları		37
9.1 Anyon Değiştirici Kolon ve HPLC Çalışmaları		37
9.2 C8-C18 Kolonları Kullanarak Lyon Çifti Temelli (IP-RP-HPLC-ICP-MS) Çalışmalar		43
9.2.1. Farklı hareketli Fazlar		43
9.2.1.1. Hareketli Faz 1		43
9.2.1.2. Hareketli faz 2		45
9.2.1.3. Hareketli Faz 3		47
9.2.1.4. Hareketli Faz 4		49
9.2.1.5. Hareketli Faz 5		51
9.2.2. Hareketli Faz Programı		53
9.2.2.1. Program 1		53
9.2.2.2. Program 2		54

9. 3. Katyon Değiştirmeli-HPLC-ICP-MS	56
9. 3. 1. Hareketli Faz 1	56
9. 3. 2. Hareketli Faz 2	58
9. 3. 2. 1. Çözücü Programı 1	59
9. 3. 2. 2. Çözücü Programı 2	61
9. 3. 3. Hareketli Faz 3	62
9. 3. 4. Hareketli Faz 4	63
9. 3. 5. Katyon Değiştirici-HPLC-ICP-MS Sisteminin Analitik Performansı	65
9. 3. 5. 1. Se (VI) Türü için Analitik Performans	66
9. 3. 5. 2. Se (IV) Türü için Analitik Performans	67
9. 3. 5. 3. Selenomethionine Türü için Analitik Performans	68
9. 3. 5. 4. Selenocystine Türü için Analitik Performans	70
10. Yumurta ve SRM numunelerinde Selenyum Türlendirmesi	72
11. Kaynaklar	75
12. % 1 Çözümler	
13. % 0,1 Çözümler	
14. % 0,01 Çözümler	
15. % 0,001 Çözümler	
16. % 0,0001 Çözümler	
17. % 0,00001 Çözümler	
18. % 0,000001 Çözümler	
19. % 0,0000001 Çözümler	
20. % 0,00000001 Çözümler	
21. % 0,000000001 Çözümler	

TABLolar

	Sayfa
Tablo 1. ICP-MS optimizasyon şartları.	20
Tablo 2. Yumurta su yüzdesi.	22
Tablo 3. Yumurta örneğini çözme işleminde kullanılan asit ve asit karışımları.	23
Tablo 4. Mikrodalga etüv çözünürleştirme programı.	23
Tablo 5. Yumurtada farklı asit karışımları kullanılarak elde edilen toplam Se verimleri.	24
Tablo 6. Mikrodalga etüv çözünürleştirme programı.	25
Tablo 7. Toplam çözme sonucu elde edilen SRM ve yumurta analiz sonuçları.	26
Tablo 8. Ekstraksiyon işleminde kullanılan reaktifler ve ekstraksiyon verimleri.	27
Tablo 9. Ekstraksiyon süresinin optimizasyon değerleri.	33
Tablo 10. Enzim miktarının ekstraksiyon verimi üzerine etkisi.	35
Tablo 11. SRM Çalışmasında Selenyum Ekstraksiyon Değerleri.	36
Tablo 12. % 5 CH ₃ OH kullanılarak yapılan kromatografik ayırım şartları.	43
Tablo 13. % 0.1 TFA ve % 5 CH ₃ OH (pH 1.71) kullanılarak yapılan kromatografik ayırım şartları.	46
Tablo 14. % 0.05 HFBA ve % 5 CH ₃ OH (pH 3.14) kullanılarak yapılan kromatografik ayırım şartları.	47
Tablo 15. % 0.2 HFBA ve % 2.5 CH ₃ OH (pH 1.64) kullanılarak yapılan kromatografik ayırım şartları.	49
Tablo 16. % 0.2 HFBA ve % 2.5 CH ₃ OH (pH 1.64) kullanılarak yapılan kromatografik ayırım şartları.	51
Tablo 17. 10 mM Piridin (pH 1.50) kullanılarak yapılan kromatografik ayırım şartları.	56
Tablo 18. 10 mM Piridin (pH 1.50) kullanılarak yapılan kromatografik ayırım şartları.	58

Tablo 19. Hareketli fazın farklı pH değerlerinde selenyum türlerinin ICPS değerleri.	59
Tablo 20. 10 mM Piridin (pH 1.30) kullanılarak yapılan kromatografik ayırım şartları.	62
Tablo 21. 10 mM Piridin (pH 1.25) kullanılarak yapılan kromatografik ayırım şartları. 20 mg Protease UV-M	64
Tablo 22. Se (IV), Se (VI), Se (Methionine) ve Se (Cystine) türlerinin LOD ve LOQ değerleri.	71
Tablo 23. Se (Methionine) ve Se (Cystine) türlerinin yumurta ve 1566b Oyster Tissue SRM numunelerinde bulunan derişimleri.	74

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1. 1.00 mg/L Se (IV) den devamlı akış modunda elde edilen ICP-MS sinyali.	21
Şekil 2. Se (IV) kalibrasyon grafiği	24
Şekil 3. 20 mg Protease XIV (4.5 units/mg) içeren 30 mM Tris HCl (pH 7.2) kullanılarak yapılan ekstraksiyondan elde edilen ICP-MS sinyali	28
Şekil 4. Proteinase K (7.5 units/mg) içeren 30 mM Tris HCl (pH 7.2) kullanılarak yapılan ekstraksiyondan elde edilen ICP-MS sinyali	28
Şekil 5. 10.0 ng/mL Se IV ün sulu çözeltisinin verdiği ICP-MS sinyali	29
Şekil 6. 10.0 ng/mL Se IV ün % 10 CH ₃ OH içeren 0.20 M HCl de hazırlanmış çözeltisinin verdiği ICP-MS sinyali	29
Şekil 7. 10.0 ng/mL Se IV ün % 90 CH ₃ OH - % 10 H ₂ O da hazırlanmış çözeltisinin verdiği ICP-MS sinyali	30
Şekil 8. Yeşil:10.0 ng/mL Se IV ün 0.80 g TMAH - 30 mM Tris HCl (pH 7.2) kullanılarak hazırlanmış çözeltisinin, Kahverengi: 10.0 ng/mL Se IV ün sulu çözeltisinin verdiği ICP-MS sinyalleri	30
Şekil 9. 10.0 ng/mL Se IV ün 30 mM Tris HCl (pH 7.2) de hazırlanmış çözeltisinin verdiği ICP-MS sinyali	31
Şekil 10. 4 (Yeşil), 8. (Kahverengi), 12. (Turuncu), 24. (Mavi), 28. (Pembe) saat sonunda elde edilen ekstraktlerin ve 10.0 ng/mL Se IV (Eflatun) ün verdiği ICP-MS sinyali	32
Şekil 11. Ekstraksiyon süresinin optimizasyon değerleri	33
Şekil 12. 5.0 mg Protease XIV kullanılarak (Yeşil) ve 10.0 ng/mL Se IV (Kahverengi) kullanılarak elde edilen ICP-MS sinyalleri	34
Şekil 13. Yumurta/Enzim oranının ekstraksiyon verimi üzerine etkisi	35
Şekil 14. 100 ng/mL Se(IV) çözeltisinin 1.0 mL/dak. akış hızında anyon değiştirici kolona gönderilmesiyle elde edilen ICP-MS kromatogramı	37
Şekil 15. 100 ng/mL Se(IV) çözeltisinden elde edilen ICP-MS sinyali	38

Şekil 16. 100 ng/mL Se IV (Pembe), Se VI (Yeşil), Selenocystine (Kahverengi), Selenomethionine (Turuncu) çözeltilerinden elde edilen ICP-MS sinyalleri	38
Şekil 17. 100 ng/mL Se(IV) çözeltisinin 1.0 mL/dak. akış hızında anyon değiştirici kolona % 10 Metanol içeren hareketli faz yardımıyla gönderilmesiyle elde edilen ICP-MS kromatogramı	39
Şekil 18. 100 ng/mL Se(IV), Se(VI) ve Se (Selenocystine den hazırlanan) türlerinin anyon değiştirici kolonda ayrıştırılmasıyla elde edilen ICP-MS sinyalleri	40
Şekil 19. 100 ng/mL Se(IV), Se(VI) ve Se (Selenomethionine den hazırlanan) türlerinin anyon değiştirici kolonda ayrıştırılmasıyla elde edilen ICP-MS sinyalleri	40
Şekil 20. 100 ng/mL Se (VI), Se (VI) ve Se (Selenomethionine) standartlarını içeren çözeltinin 182 µL hacimde anyon değiştirici kolona pH 5.5 e ayarlanmış, % 15 CH ₃ OH içeren 5 mM Sitrat tamponun hareketli faz olduğu sisteme enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri	41
Şekil 21. 100 ng/mL Se (VI), Se (VI) ve Se (Selenocystine) standartlarını içeren çözeltinin 182 µL hacimde anyon değiştirici kolona pH 5.5 e ayarlanmış, % 15 CH ₃ OH içeren 5 mM Sitrat tamponun hareketli faz olduğu sisteme enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri	42
Şekil 22. 100 ng/mL Se (VI) (Yeşil), Se (IV) (Kahverengi), Se (Selenocystine) (Mavi) ve Se (Methionine) (Turuncu) standartlarının ayrı ayrı 91 µL hacimde reverse phase kolona % 5 CH ₃ OH içeren hareketli faz yardımıyla enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri	44
Şekil 23. 100 ng/mL Se (VI), Se (VI), Se (Selenocystine) ve Se (Methionine) standartlarını içeren çözeltinin 91 µL hacimde reverse phase kolona % 5 CH ₃ OH içeren hareketli faz yardımıyla enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri	45

Şekil 24. 100 ng/mL Se VI (Kahverengi), Se IV (Yeşil), Se (Methionine) (Pembe), Se (Cystine) (Mavi) standartlarının ayri ayri 91 µL hacimde reverse phase kolona % 0.10 TFA ve % 5.0 CH ₃ OH (pH 1.71) içeren hareketli faz yardımıyla enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri	46
Şekil 25. 100 ng/mL Se (Cystine), Se (Methionine), Se IV, Se VI standartlarını içeren çözeltinin 91 µL hacimde reverse phase kolona enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri	47
Şekil 26. 100 ng/mL Se VI (Mavi), Se IV (Kahverengi), Se (Methionine) (Turuncu), Se (Cystine) (Yeşil) standartlarının ayri ayri 91 µL hacimde reverse phase kolona % 0.05 HFBA ve % 5 CH ₃ OH (pH 3.14) içeren hareketli faz yardımıyla enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri	48
Şekil 27. 100 ng/mL Se (Cystine), Se (Methionine), Se IV, Se VI standartlarını içeren çözeltinin 91 µL hacimde reverse phase kolona % 0.05 HFBA ve % 5 CH ₃ OH (pH 3.14) içeren hareketli faz yardımıyla enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyali	49
Şekil 28. 100 ng/mL Se VI (Turuncu), Se IV (Kahverengi), Se (Methionine) (Yeşil), Se (Cystine) (Mavi) standartlarının ayri ayri 91 µL hacimde reverse phase kolona % 0.2 HFBA ve % 2.5 CH ₃ OH (pH 1.64) içeren hareketli faz yardımıyla enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri	50
Şekil 29. 100 ng/mL Se (Cystine), Se (Methionine), Se IV ve Se VI standartlarını içeren çözeltinin 91 µL hacimde reverse phase kolona % 0.2 HFBA ve % 2.5 CH ₃ OH (pH 1.64) içeren hareketli faz yardımıyla enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri	50
Şekil 30. 100 ng/mL Se VI (Kahverengi), Se IV (Turuncu), Se (Methionine) (Mavi), Se (Cystine) (Yeşil) standartlarının ayri ayri 91 µL hacimde reverse phase kolona % 0.10 HFBA ve % 5.0 CH ₃ OH (pH 1.82) içeren hareketli faz yardımıyla enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri	52

- Şekil 31. 100 ng/mL Se (Cystine), Se (Methionine), Se IV, Se VI standartlarını içeren çözeltinin 91 µL hacimde reverse phase kolona % 0.1 HFBA ve % 5 CH₃OH (pH 1.82) içeren hareketli faz yardımıyla enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri 52
- Şekil 32. RP-HPLC de selenyum türlerini ayırmada kullanılan çözücü programı (1) 53
- Şekil 33. 100 ng/mL Se (Cystine), Se (Methionine), Se IV, Se VI standartlarını içeren çözeltinin 91 µL hacimde reverse phase kolona Şekil 32' de belirtilen solvent programı kullanılarak enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri 54
- Şekil 34. RP-HPLC de selenyum türlerini ayırmada kullanılan çözücü programı (2) 55
- Şekil 35. 100 ng/mL Se (Cystine), Se (Methionine), Se IV, Se VI standartlarını içeren çözeltinin 91 µL hacimde reverse phase kolona Şekil 102' de belirtilen solvent programı kullanılarak enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri 55
- Şekil 36. 100 ng/mL Se (VI) (Pembe), Se (IV) (Mavi), Se (Selenomethionine) (Sarı) ve Se (Selenocystine) (kahverengi) içeren standartların ayrı ayrı, 91 µL hacimde, pH 1.50' e tamponlanmış 10 mM piridin hareketli fazı yardımıyla katyon değiştirici kolona enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri 57
- Şekil 37. 100 ng/mL Se (IV), Se (VI), Se (Selenomethionine) ve Se (Selenocystine) içeren standard çözeltinin 91 µL hacimde, pH 1.50' e tamponlanmış 10 mM piridin hareketli fazı yardımıyla katyon değiştirici kolona enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri 57
- Şekil 38. 100 ng/mL Se (IV), Se (VI), Se (Selenomethionine) ve Se (Selenocystine) içeren standard çözeltinin 91 µL hacimde, pH 1.50' e tamponlanmış % 5.0 CH₃OH içeren 10 mM piridin hareketli fazı yardımıyla katyon değiştirici kolona enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri 58

Şekil 39. Katyon Değiştirici-HPLC-ICP-MS de selenyum türlerini ayırmada kullanılan çözücü programı	60
Şekil 40. 100 ng/mL Se (IV), Se (VI), Se (Selenomethionine) ve Se (Selenocystine) içeren standard çözeltinin 91 µL hacimde, katyon değiştirici kolona Şekil 39' da görülen çözücü programı kullanılarak enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri	60
Şekil 41. CE-HPLC-ICP-MS' de selenyum türlerini ayırmada kullanılan çözücü programı	61
Şekil 42. 100 ng/mL Se (IV), Se (VI), Se (Selenomethionine) ve Se (Selenocystine) içeren standard çözeltinin 91 µL hacimde, katyon değiştirici kolona Şekil 41' de görülen çözücü programı kullanılarak enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri	62
Şekil 43. 100 ng/mL Se (IV), Se (VI), Se (Selenomethionine) ve Se (Selenocystine) içeren standard çözeltinin 91 µL hacimde, pH 1.30' a tamponlanmış % 5.0 CH ₃ OH içeren 10 mM piridin hareketli fazı yardımıyla katyon değiştirici kolona enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri	63
Şekil 44. 100 ng/mL Se (VI) (Yeşil), Se (IV) (Kahverengi), Se (Selenomethionine) (Mavi) ve Se (Selenocystine) (Sarı) içeren standartların ayrı ayrı, 91 µL hacimde, pH 1.50' e tamponlanmış 10 mM piridin hareketli fazı yardımıyla katyon değiştirici kolona enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri	64
Şekil 45. 100 ng/mL Se (IV), Se (VI), Se (Selenomethionine) ve Se (Selenocystine) içeren standard çözeltinin 91 µL hacimde, pH 1.25' e tamponlanmış % 5.0 CH ₃ OH içeren 10 mM piridin hareketli fazı yardımıyla katyon değiştirici kolona enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri	65
Şekil 46. 2.0 (Yeşil), 5.0 (Kahverengi), 10.0 (turuncu), 20.0 (Mavi), 50.0 (Pembe), 100.0 ng/mL (Eflatun) Se (VI) standardının Katyon Değiştirici-HPLC-ICP-MS sistemine Tablo 21' de belirtilen şartlar altında enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri	66

Şekil 47. Se (VI) için Katyon Değişirici-HPLC-ICP-MS sisteminde elde edilen kalibrasyon grafiği	66
Şekil 48. 5.0 ng/mL derişimde Se (VI) için Katyon Değişirici-HPLC-ICP-MS sisteminde elde edilen sinyaller	67
Şekil 49. 2.0 (Yeşil), 5.0 (Kahverengi), 10.0 (Turuncu), 20.0 (Mavi), 50.0 (Pembe), 100.0 ng/mL (Eflatun) derişimlerinde Se (IV) standardının Katyon Değişirici-HPLC-ICP-MS sistemine Tablo 21' de belirtilen şartlar altında enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri	67
Şekil 50. Se (IV) için Katyon Değişirici-HPLC-ICP-MS sisteminde elde edilen kalibrasyon grafiği	68
Şekil 51. 5.0 ng/mL derişimde Se (IV) için Katyon Değişirici-HPLC-ICP-MS sisteminde elde edilen sinyaller	68
Şekil 52. 2.0 (Yeşil), 5.0 (Kahverengi), 10.0 (turuncu), 20.0 (Mavi), 50.0 (Pembe), 100.0 ng/mL (Eflatun) derişimlerinde Se (Methionine) standardının Katyon Değişirici-HPLC-ICP-MS sistemine Tablo 21' de belirtilen şartlar altında enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri	69
Şekil 53. Se (Methionine) için Katyon Değişirici-HPLC-ICP-MS sisteminde elde edilen kalibrasyon grafiği	69
Şekil 54. 5.0 ng/mL derişimde Se (Methionine) için Katyon Değişirici-HPLC-ICP-MS sisteminde elde edilen sinyaller	70
Şekil 55. 2.0 (Yeşil), 5.0 (Kahverengi), 10.0 (turuncu), 20.0 (Mavi), 50.0 (Pembe), 100.0 ng/mL (Eflatun) derişimlerinde Se (Cystine) standardının Katyon Değişirici-HPLC-ICP-MS sistemine Tablo 21' de belirtilen şartlar altında enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri	70
Şekil 56. Se (Cystine) için Katyon Değişirici-HPLC-ICP-MS sisteminde elde edilen kalibrasyon grafiği	71

Şekil 57. 5.0 ng/mL (Kahverengi) derişimlerinde Se (IV), Se (VI), Se (Methionine) ve Se (Cystine) içeren standart çözeltinin ve yumurta ekstraktından elde edilen çözeltinin (Turuncu) Katyon Değiştirici-HPLC-ICP-MS sistemine Tablo 21' de belirtilen şartlar altında enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri 73

Şekil 58. 5.0 ng/mL (Kahverengi) derişimlerinde Se (IV), Se (VI), Se (Methionine) ve Se (Cystine) içeren standart çözeltinin ve 1566b Oyster Tissue ekstraktından elde edilen çözeltinin (Yeşil) Katyon Değiştirici-HPLC-ICP-MS sistemine Tablo 21' de belirtilen şartlar altında enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri 73

Şekil 59. 5.0 ng/mL (Kahverengi) derişimlerinde Se (IV), Se (VI), Se (Methionine) ve Se (Cystine) içeren standart çözeltinin ve 1566b Oyster Tissue ekstraktından elde edilen çözeltinin (Yeşil) Katyon Değiştirici-HPLC-ICP-MS sistemine Tablo 21' de belirtilen şartlar altında enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri 73

Şekil 60. 5.0 ng/mL (Kahverengi) derişimlerinde Se (IV), Se (VI), Se (Methionine) ve Se (Cystine) içeren standart çözeltinin ve 1566b Oyster Tissue ekstraktından elde edilen çözeltinin (Yeşil) Katyon Değiştirici-HPLC-ICP-MS sistemine Tablo 21' de belirtilen şartlar altında enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri 73

ÖZET

Selenyum eser elementinin insan beslenmesindeki önemi uzun süredir bilinmektedir. Düşük derişimlerde selenyum içeren besinlerle vücut için gerekli selenyum düzeyinin (200 µg/gün) sağlanması mümkün değildir. Bu yüzden günümüzde insan ve hayvan beslenmesinde selenyumca zenginleştirilmiş ürünlerin hazırlanması ve kullanılması kaçınılmaz olmuştur. İnsanların tükettiği besinler içinde selenyum açısından en zengin olanları et, yumurta, balık ve tahıllardır. Selenyumca zenginleştirilmiş besinlerdeki selenyum derişimlerinin tayini hem beslenme açısından hem de insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Bilindiği gibi selenyumun yararlı ve zararlı düzeyleri arasındaki fark çok azdır ve yüksek dozlarda (800 µg/gün) alındığı zaman zehirleyici etki göstermektedir. Bu nedenle amaca uygun analitik yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada Türkiye'de ve diğer ülkelerde bolca tüketilen yumurta örneğinde selenyum türlendirmesi yapmak için bir analitik yöntem geliştirilmiştir. Enzimatik ekstraksiyon yardımıyla selenyum türleri numuneden yapısı bozulmadan ekstrakte edildikten sonra, HPLC yardımıyla türler birbirinden ayrılıp ICP-MS kullanılarak tayin edilmişlerdir. Geliştirilen yöntemle, en sık görülen Se(IV), Se(VI), selenomethionine ve seleno cystine türlerini ayırıp tayin etmek mümkündür.

Keywords: Selenyum

Anahtar Kelimeler: Selenyum, türlendirme, enzim, HPLC-ICP-MS.

ABSTRACT

The importance of selenium as a trace element in the human diet has long been established. Increase in selenium intake to a recommended level (~200µg/day) is not feasible by consuming a diet only with natural selenium concentrations owing to the low abundance of selenium in common foods. Today, selenium supplements are very popular in the diet of man and animals. Therefore, determination of selenium in food enriched with selenium is very important for not only nutrition but also human health. It is well-known that the difference between necessary and toxic levels of Se is rather small; at high doses (~800µg/day) this element acts as a poison. Consequently, adequate analytical methods should be developed for the control of Se levels. In this study, an analytical method was developed for the speciation of selenium in egg which is highly consumed in Turkey and other countries. Selenium species were extracted from egg using enzymes without uniformation, and then analyzed using ICP-MS after separation from each other via HPLC. Using the developed method, it is possible to separate and quantitate the most abundant species of selenium, Se(IV), Se(VI), selenomethionine and selenocystine.

Keywords: Selenium, speciation, enzyme, HPLC-ICP-MS.

1. Giriş

1.1. Selenyumun Önemi ve Tayin Yöntemleri

İnsan vücudu bakımından çok önemli bir eser element olan selenyum, tiroid metabolizmasında, bağışıklık sisteminde, üreme sisteminde hayati rol oynamaktadır. Yeterli miktarda selenyum desteğinin sağlıklı yaşam için gerekliliği kesinleşmiştir. Buna bağlı olarak, insan ve hayvan diyetlerindeki selenyum derişimleri büyük önem taşımaktadır¹. Doğal besinlerde selenyum düzeyinin çok düşük olması nedeni ile selenyumca zenginleştirilmiş besinlerin kullanılması gündeme gelmiştir. Ancak önerilen selenyum düzeyi (200 µg Se/ gün) ile toksik doz (800 µg Se/gün) arasındaki fark çok az olduğundan selenyum destekli gıdalardaki selenyum düzeyinin kontrol altında tutulması çok önemlidir.

Selenyumun insan ve çevre üzerinde etkisi büyük ölçüde türüne bağlıdır². Selenyum (IV) en toksik olanıdır; sırasıyla selenyum (VI) ve organik selenyum formları bunu izlemektedir. Selenyumun biyo-yararlılığı da türlerine bağlı olarak değişmektedir. Organik selenyumun emiliminin daha fazla olduğu saptanmıştır³. Selenyumca zengin gıda ürünlerinin hazırlanmasında bu tür yaklaşımlar önem kazanmaktadır.

Selenyum türlendirmesinde farklı Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (HPLC) modları kullanılmaktadır. Bunlar arasında iyon değiştirme, ters-faz ve iyon çifti-ters faz kromatografileri en yaygın olanlarıdır³. Türlendirme analizlerinde başarı, temelde seçicilik ve duyarlılık olmak üzere iki faktöre bağlı gözükmektedir. Bu şartların sağlanabilmesi için, HPLC dedektörü olarak, element analizlerinde vazgeçilmez olan atomik tekniklerin (AAS, ICP-AES, ICP-MS) kullanımı kaçınılmazdır.

ICP-AES tayin sınırının yeterince düşük olmaması nedeni ile gerçek numunelerde türlendirme çalışmalarında gerekli performansı gösterememektedir. Düşük düzeyde selenyum tayinine uygun AAS metodları *hidrür oluşturmali* AAS (HG-AAS) veya *elektrotermal atomlaştırmali*-AAS (ETA-AAS) dir⁴. Daha duyarlı olan ve on-line çalışmalara uygunluğu nedeniyle *endüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometri* (ICP-MS) ise giderek tüm laboratuvarlarda HPLC veya diğer bir ayırma aşamasından sonra en sık kullanılan sistemdir^{5,6}.

1. 2. Selenyum Türlendirmesi İçin Ekstraksiyon Teknikleri

Se türlendirme çalışmalarında ortamda serbest halde bulunan selenoamino asit türleri suda çözülebilmekte, ancak proteinlere bağlı olan bazı organik Se türlerini çözeltiye almak için ise hidroliz işlemi gerekmektedir. pH ya ve sıcaklığa bağlı olan hidroliz işlemi sırasında bazı türlerin yapılarının bozulduğu gözlenmiştir. Bu nedenle türlerin yapısını ve derişim dağılımını bozmadan çözeltiye alabilmek için asidik özütleme yerine enzimatik özütleme kullanılmalıdır.

1. 2. 1. Literatürde Kullanılan Ekstraksiyon Teknikleri

Fındık örneklerinde toplam selenyum analizleri için mikrodalga etüv kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi için yaklaşık 0.5 g fındık örneği 10 mL 50:50 oranda nitrik asit kullanılarak mikrodalga yardımıyla çözünürleştirilmiştir. Mikrodalga etüvde güç, 5 dakika aralıklarla 250 watt (120 °C), 450 watt (140 °C), 550 watt (150 °C), 650 watt (165 °C) uygulanacak şekilde artırılmıştır. Selenyum türlendirme analizleri için, 0.25 g ince öğütülmüş fındık örneği üzerine yaklaşık 5.0 mL Tris-HCl (pH 7.5) ve 0.025 g Proteinase K enzimi katılıp 20 saat boyunca 37 °C ye ayarlanmış bir su banyosunda karanlık bir ortamda tutulmuştur.⁷

Değişik bitki numunelerinde (*Brassica juncea*, *Astragalus praleongus*), soğan, sarmısak ve maya örneklerinde bulunan farklı selenyum türlerini ekstrakte etmek için enzimatik ve sıcak su ekstraksiyon işlemleri uygulanmıştır. Sıcak su ekstraksiyonu için 0.2 g örnek 5 mL deiyonize su kullanılarak kaynar su içeren su banyosunda 1 saat süreyle muamele edilmiştir. Enzimatik ekstraksiyon için, 0.2 g örnek üzerine 5 mL deiyonize su ve 0.02 g Protease XIV enzimi ilave edilerek 24 saat boyunca çalkalayıcıda karıştırılmışlardır. Ekstraksiyon işleminden sonra örnek filtre kağıdı kullanılarak süzümüştür.⁸

Sediment örneklerinde bulunan toplam selenyum türlerinin tayini için, 1 g örnek 10 mL kral suyu ile 12 saat boyunca ekstrakte edilmiştir. Selenyum türlendirme çalışmaları için, 2 g numune 20 mL metil alkolle 24 saat etkileştirilmiştir. Bu işlem esnasında sıcaklık 20 °C de tutulmuştur. Aynı yöntem kullanılarak numune HCl ile ekstrakte edilmiştir.⁹

Değişik biyolojik matrikslerde bulunan selenyumun etkin bir şekilde ekstraksiyonu için farklı enzimler önerilmiştir. Canlı organizmasında bulunan selenyum, bünyesinde sülfür bulunan aminoasitlerin yapısına kolaylıkla girebildiğinden bu aminoasitlerin uygun bir şekilde ekstraksiyonuyla selenyum türlerinin tayininin kolaylıkla yapılabileceği önerilmektedir. Pronase enzimi bu amaçla kullanılan bir enzimdir. Fakat enzimatik ekstraksiyonla yapıda bulunan selenyumun tamamı ekstrakte edilememektedir. Çünkü, yapıda bulunan selenyumun tümü aminoasitlerin yapısında bulunmamaktadır. Bu çalışmada, mantarın yapısında bulunan selenyum türlerinin ekstraksiyonu için farklı ekstraksiyon prosedürleri denenmiştir.

a-Tris-HCl (pH 2.1) ve fosfat (pH 5.7) tamponları ince öğütülmüş mantar numunesiyle 3 saat boyunca etkileştirilmiştir.

b- 16 mg pronase enzimi içeren fosfat tamponu 20 saat boyunca mantar numunesiyle 37 °C de muamele edilmiştir.

c- Numune başlangıç olarak Tris-HCl ile ekstrakte edilip daha sonra ortamdaki alınamayan selenyum türleri 45 mg pepsin içeren Tris-HCl tamponuyla 20 saat boyunca ekstrakte edilmiştir.

d- Numune başlangıç olarak fosfat tamponu ile ekstrakte edilip daha sonra ortamdaki alınamayan selenyum türleri 45 mg tripsin içeren fosfat tamponuyla 20 saat boyunca ekstrakte edilmiştir.

e- Ortamda bulunan selenyum ardışık ekstraksiyon kullanılarak çözelti ortamına alınmaya çalışılmıştır. Bu amaçla örnek ilk önce deiyonize su ile ekstrakte edilmiştir. Kalıntı daha sonra 45 mg pepsin içeren Tris-HCl tamponuyla 20 saat boyunca 37 °C de ekstrakte edilmiştir. Son basamak olarakta, ikinci basamaktan kalan kalıntı 45 mg pepsin içeren Tris-HCl tamponuyla 20 saat boyunca ekstrakte edilmiştir.

Yapılana analizler sonunda çoklu basamak içeren ekstraksiyon prosedürü kullanılarak elde edilen verimin diğer prosedürlere nazaran daha iyi olduğu tesbit edilmiştir.¹⁰

Deniz canlılarından olan istiridyenin yapısında bulunan selenyumu ekstrakte etmek için ardışık ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Ekstraksiyon için, 200 mg numune üzerine 3 mL deiyonize su ilave edilerek 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi

tamamlandıktan sonra, numune süzgeç kağıdı kullanılarak süzülmüştür. Süzgeç kağıdında kalan numune bir santrifüj tüpüne alınarak üzerine 20 mg subtilisin enzimi ve 5 mL 0.1 M Tris-HCl tamponu (pH 7.5) ilave edilerek 24 saat boyunca sıcaklığı 37 °C ye ayarlanmış su banyosunda bekletilmiştir. Numune daha sonra süzülerek analize hazırlanmıştır.¹¹

2. ICP-MS cihaz parametrelerinin optimizasyonu:

Selenyum türlendirmesinde gerekli duyarlılığın sağlanması için kullanılacak olan ICP-MS cihazında en yüksek verimi almak, plazmada oluşan analit iyonların kütle analizörü tarafından en yüksek oranda algılanmasını sağlamak amacıyla cihazda selenyum tayini için ön çalışmalar yapılmıştır.

ICP-MS cihazında var olan parametrelerden hepsinin sabit tutulup 1 parametrenin değiştirilmesiyle optimizasyon işlemi yapılmıştır. Optimizasyon işlemlerinde 100 ng/mL Se (IV) standardı kullanılmıştır. Bolluk yüzdesi bakımından selenyum elementinin en yüksek izotopu ⁸⁰Se olmasına rağmen, kullanılan sistemde giderilemeyen ⁸⁰ArAr girişi nedeniyle yapılan tüm çalışmalarda ⁷⁸Se izotopu kullanılmıştır.

Optimizasyon çalışmaları, ilk aşamalarda sabit tutulan parametreler için tahmini değerlerin alınmasıyla yapılmış, daha sonra bulunan optimum değerler kullanılarak çalışma tekrarlanmış ve bulunan değerler değişmeyene kadar denemelere devam edilmiştir. Genellikle en duyarlı sinyali veren parametre değeri seçilmiş, bu noktada sistemin kararsız olması durumunda duyarlılığı daha az olan fakat plato konumunda değerler seçilmiştir. Böylece, optimizasyon çalışmalarını gösteren şekillerde, sabit tutulan parametrelerin tümü, Tablo 1'de verilen değerlerdir.

ICP-MS parametrelerinin optimizasyonu sonucu elde edilen optimum şartlar Tablo1' de gösterilmektedir.

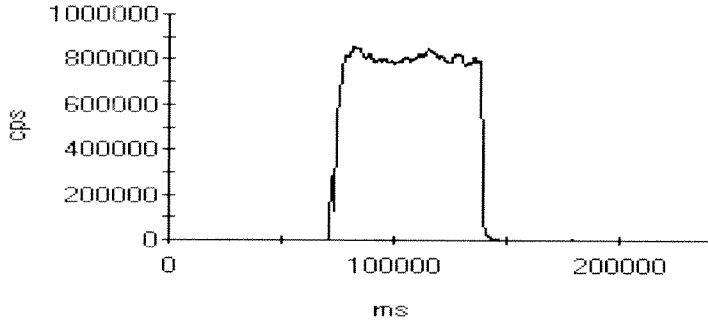
Tablo 1. ICP-MS optimizasyon sonuçları.

Parametre	Optimum Değer
Ekstraksiyon Lensi Voltajı, V	3.0
Mercek 1 Voltajı, V	-220.0
Mercek 2 Voltajı, V	-21.2
Odaklama Merceği Voltajı, V	17.0
1. Kırınım Apertürü Voltajı, V	-41.6
2. Kırınım Apertürü Voltajı, V	-151.0
Kuadropol Voltajı Voltajı, V	-3.5
Hekzapol Voltajı , V	5.1
Sisleştirici Argon Hızı, Litre/Dakika	0.85
Mercek 3 Voltajı, V	-197.6
Plazma Başlığı Yatay Pozisyonu	63.0
Plazma Başlığı Dikey Pozisyonu	619.0
Plazma Oluşum Gücü, Watt	1400
3. Kırınım Apertürü Voltajı, V	-30.6
Plazma Başlığı Soğutucu Ar Akış Hızı, Litre/Dakika	13.0
Plazma Oluşumunda Kullanılan Ar Akış Hızı, Litre/Dakika	0.9
Plazma Başlığı ile Örnekleme Konisi Arasındaki Mesafe, Bağıl Birimler	100

en 0.25 ml olarak seçilmiştir.

3. ICP-MS sisteminde kullanılacak çözeltinin hacim optimizasyonu.

ICP-MS parametrelerinin optimizasyonundan sonra sisteme gönderilecek çözeltinin hacim optimizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla 0.10, 0.25, 0.50 ve 1.00 mL hacimde sarmaller hazırlanmıştır. Herbir sarmal, sisteme ayrı ayrı takılıp 1.00 mg/L Se(IV) çözeltisi için performansları saptanmıştır. Şekil 1'de görüldüğü gibi devamlı akış yöntemiyle de bir sinyal elde edilerek hangi sarmalin en uygun olduğuna karar verilmeye çalışılmıştır.



Şekil 1. 1.00 mg/L Se (IV) den devamlı akış modunda elde edilen ICP-MS sinyali.

0.25 mL hacimde sarmal kullanılarak elde edilen sinyal devamlı akış modunda elde edilen sinyale oranla duyarlılıkta yaklaşık olarak % 15 düşük olmasına rağmen, elde edilen pik şeklinin güzel oluşu ve hacim olarak küçük bir değer oluşu nedeniyle ilerideki çalışmalarda 0.25 mL hacimle çalışılmasına karar verilmiştir. 0.50 ve 1.00 ml sarmal hacimlerinde sinyal yüksekliği önemli ölçüde artmamış ve şekil bozuklukları gözlenmiştir. Sisteme gönderilecek ekstraksiyon çözeltilerinde organik madde miktarlarının fazla oluşundan ötürü, gönderilecek numune hacmi en iyi duyarlılığa ulaşan minimum hacim olan 0.25 mL olarak saptanmıştır.

4. Yumurta örneklerinin dondurarak kurutulması (Freeze-Drying)

Türkiye de tavuk ve tavuk ürünleri üretiminde verimi artırmak maksadıyla organik ve inorganik selenyumu katkı maddesi olarak kullanan bir firmanın üretimi olan yumurtalar süpermarketten temin edilmiştir. Yumurta örnekleri kırılarak kabuğundan ayrılıp sarı ve beyaz kısımları homojen olacak şekilde baget kullanılarak karıştırılmıştır. Ekstraksiyon verimini artırmak maksadıyla yumurta örnekleri dondurarak kurutma (Freeze-Drying) işlemine tabi tutulmuşlardır. Bu amaçla, 50.89 gram yumurta örneği -85°C de 24 saat tutulduktan sonra sıcaklığı -55°C ye ayarlanmış dondurarak kurutma ünitesine yerleştirilerek 48 saat boyunca kurutma işlemi sürdürülmüştür. Kurutma işlemi sonunda yumurta numunesi toz halinde elde edilip desikatörde muhafaza edilerek tekrar su kapması engellenmeye çalışılmıştır. Tablo 2' de yumurta örneğinin kurutmada önce ve sonraki ağırlıkları ile su yüzdesi verilmektedir.

Tablo 2. Yumurta su yüzdesi.

Örnek	Ağırlık
Toplam yumurta	58.548 g
Kabuk	7.654 g
Ak+Sarı	50.894 g
Kurutmadan sonra	11.516 g
Su yüzdesi	% 77.37

5. Yumurtada toplam Se tayini

Yumurta numuneleri için ekstraksiyon veriminin bulunması amacıyla yumurtada bulunan toplam Se tayin edilmiştir. Bu amaçla Tablo 3' de görüldüğü gibi farklı asit ve asit karışımları belirtilen miktarda, kurutulmuş ve toz haline getirilmiş yumurta örnekleri kullanılarak en uygun çözme yöntemi bulunmuştur.

Tablo 3. Yumurta örneğini çözme işleminde kullanılan asit ve asit karışımları.

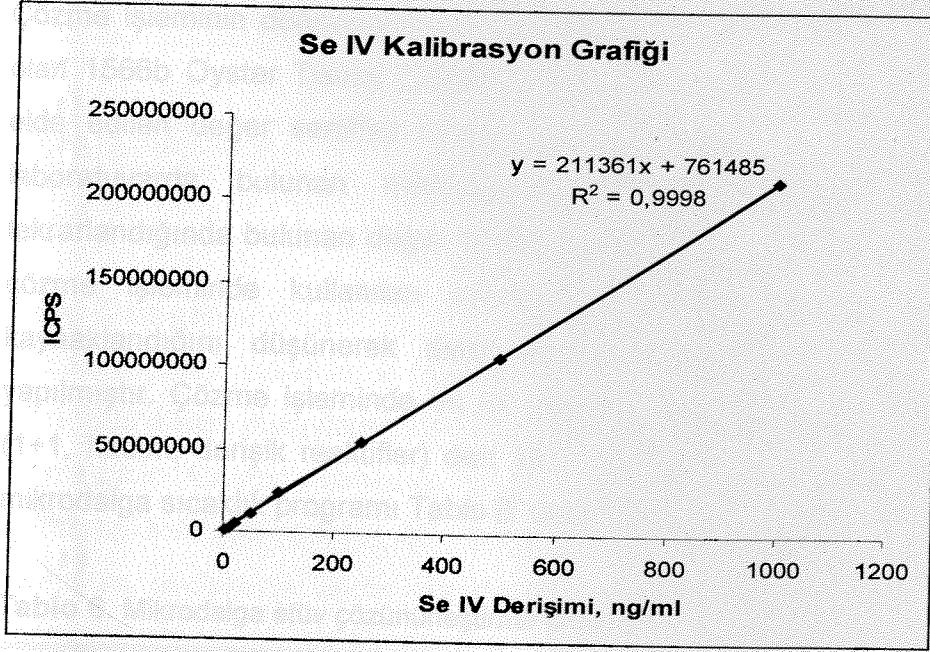
Örnek Ağırlığı	Kullanılan Reaktif
0.306 g	8 mL HNO ₃ (derişik)
0.302 g	8 mL (HNO ₃ +H ₂ O ₂) (1+1, hacim, derişik reaktifler)
0.306 g	8 mL (HNO ₃ +H ₂ O ₂) (2+1, hacim, derişik reaktifler)

Tablo 3' de belirtilen miktarda alınan yumurta örneği Tablo 4' de gösterilen sıcaklık programı kullanılarak mikrodalga etüvde çözünürleştirilmiştir. Çözünürleştirilen yumurta örneği 10.0 mL'ye seyreltilerek PTFE kaplarda saklanmıştır. Herbir çözme prosedürü için 3 paralel örnekle çalışılmıştır.

Tablo 4. Mikrodalga etüv çözünürleştirme programı.

İşlem Süresi, Dakika	Sıcaklık, °C
5	↑100
5	→100
5	↑150
5	→150
5	↑180
10	→180
5	Soğutma

ICP-MS parametreleri ile kullanılacak çözeltilerin hacim optimizasyonu yapıldıktan sonra farklı derişimlerde hazırlanmış Se(IV) çözeltileri kullanılarak Şekil 2'de görülen kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Kalibrasyon grafiği elde edilirken selenyumun verdiği sinyalin alanı (ICPS) kullanılmıştır.



şekil 2. Se (IV) kalibrasyon grafiği.

şekil 2' de görülen kalibrasyon grafiği kullanılarak mikrodalga etüvde Çözünürleştirilen yumurta örnekleri analiz edilmiş ve farklı çözme metodları kullanılarak elde edilen değerler Tablo 5' de gösterilmiştir.

Tablo 5. Yumurtada farklı asit karışımları kullanılarak elde edilen toplam Se miktarları, N=3.

Kullanılan Asit	Se, ng/g (Kuru)
8 mL HNO ₃ (derişik)	676.7 ± 20.3
8 mL (HNO ₃ +H ₂ O ₂) (1+1, hacim, derişik reaktifler)	815.6 ± 24.5
8 mL (HNO ₃ +H ₂ O ₂) (2+1, hacim, derişik reaktifler)	752.0 ± 22.6

Tablo 5' de görüldüğü gibi 1+1 derişik reaktif hacim oranında HNO₃-H₂O₂ zeltisi kullanılarak yapılan çözünürleştirme işlemleri daha iyi sonuç verdiğinden daha sonraki çalışmalarda bu karışımın kullanılmasına karar verilmiştir.

Çözme işleminin doğruluğunu kanıtlamak amacıyla selenyum derişimi bilinen bir SRM olan 1566b Oyster Tissue yukarıda belirtilen yöntem kullanılarak çözünürleştirilmiş ve elde edilen değer sertifika değerinden düşük bulunmuştur. Aynı deneyler farklı bir laboratuvarında bulunan mikrodalgalı etüvde benzer bir sıcaklık programında tekrarlandığında bulunan değer sertifika değerinden yine düşük bulunmuştur. Problemin çözme işleminde kullanılan sıcaklık ve basınç değerlerinin yüksek oluşundan kaynaklandığını düşünerek daha düşük bir sıcaklık programında çözme işlemi yapılmıştır. Çözme işleminde en iyi çözme karışımı olarak kabul ettiğimiz HNO₃-H₂O₂ (1+1, hacim, derişik reaktifler) den 10.0 mL kullanılmıştır. Çözme işleminde kullanılan mikrodalga sıcaklık programı Tablo 6' da görölmektedir.

Tablo 6. Mikrodalga etüv çözünürleştirme programı.

İşlem Süresi, Dakika	Sıcaklık, °C
5	↑100
10	→100
5	↑150
10	→150
5	Soğutma

Tablo 6' da belirtilen sıcaklık programı kullanılarak 1566b Oyster Tissue SRM i ve dondurarak kurutulmuş yumurta örneği çözünürleştirilmiştir. Çözme işlemi sonunda örnekler tümüyle çözeltiye alınmış, 25.0 mL ye seyreltilerek ICP-MS de analiz edilmiştir. SRM ve yumurta örneği için bulunan değerler Tablo 7' de görölmektedir.

Tablo 7. Toplam çözme sonucu elde edilen SRM ve yumurta analiz sonuçları.

Örnek	Kullanılan Asit	Sertifika Değeri mg/kg	Bulunan Değer, N=3, mg/kg
1566b Oyster Tissue	10 mL HNO ₃ -H ₂ O ₂ (1/1)	2.06 ± 0.15	1.93 ± 0.08
Yumurta	10 mL HNO ₃ -H ₂ O ₂ (1/1)	-	1.19 ± 0.05

Tablo 7' de görüldüğü gibi referans madde için sertifika edilen değerle, yukarıda belirtilen çözme yöntemi kullanılarak bulunan değer birbirlerine çok yakındır. Student-t testine göre %95 güven düzeyinde anlamlı bir fark yoktur. Değerlerin yakınlığı, çözme işleminde herhangi bir kaybın olmadığı veya varsa bile çok az bir düzeyde olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, bu çözme işlemi sonucunda elde edilen yumurtadaki toplam selenyum derişiminin ilerde yapılacak olan ekstraksiyon çalışmalarında ekstraksiyon verimini hesaplamak için bir referans olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

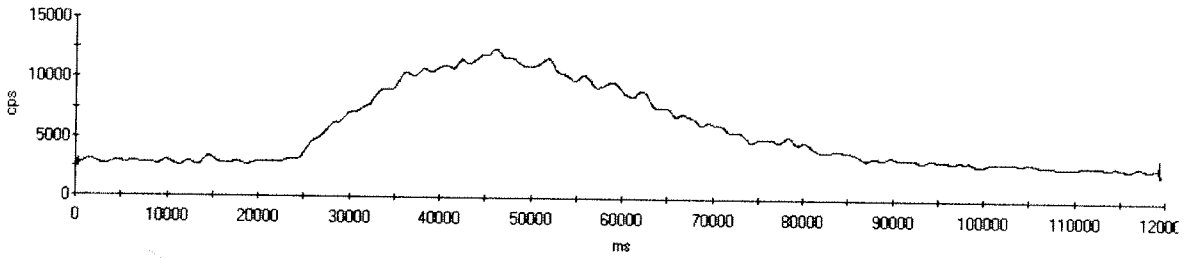
6. Farklı yöntemlerle yumurtada bulunan selenyumun ekstraksiyonu

Yumurta örneklerinde Se türleştirmesi yapmak için en önemli koşul, ortamda bulunan tüm selenyum türlerinin yapısını bozmadan çözelti ortamına almaktır. Ortamda serbest halde bulunan selenoamino asit türleri suda çözülebilmekte, ancak proteinlere bağlı olan bazı organik Se türlerini çözeltiye almak için hidroliz işlemi gerekmektedir. pH değerine ve sıcaklığa bağlı olan hidroliz işlemi sırasında bazı türlerin yapılarının bozulduğu gözlenmiştir. Bu nedenle türlerin yapısını ve derişim dağılımını bozmadan çözeltiye alabilmek için asidik özütleme yerine enzimatik özütleme kullanılmalıdır. Tablo 8'da gösterilen ekstraksiyon çözeltileri belirtilen miktarda yumurta örneği üzerine ilave edilip kör analizleri yapılmış 10 mL lik ağzı vidalı numune kaplarında 24 saat boyunca çalkalanmıştır. Bu işlem sonunda elde edilen çözeltiler 13500 RPM'de 60 dakika süre ile santrifüj edilip berrak çözelti aktararak analize hazır hale getirilmiştir. İşlemler sonucunda elde edilen çözeltiler ICP-MS ile analiz edilip Tablo 8' da görülen ekstraksiyon verimleri elde edilmiştir. Ekstraksiyon verimleri bulunurken HNO₃+H₂O₂ (1+1, hacim, derişik reaktifler) kullanılarak elde edilen toplam Se derişimi referans olarak kabul edilmiştir.

Tablo 8. Ekstraksiyon işleminde kullanılan reaktifler ve ekstraksiyon verimleri, N= 3.

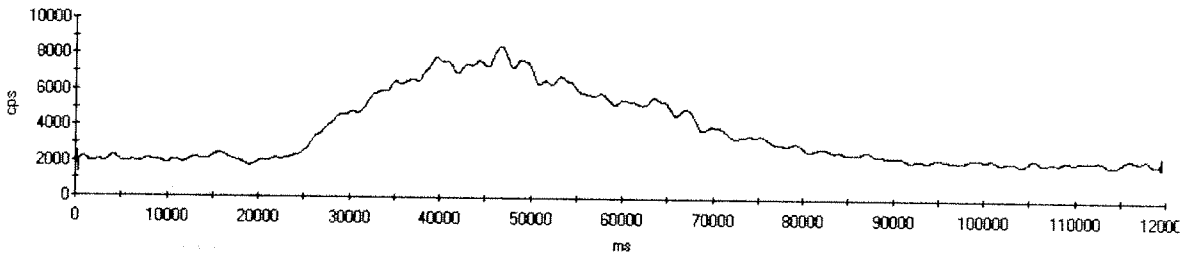
Prosedür	Reaktifler	Ekstraksiyon verimi, %
1	H ₂ O	11.2 ± 0.3
2	% 10 CH ₃ OH içeren 0.20 M HCl	30.8 ± 0.7
3	0.10 M HCl	< 4.2
4	0.10 M NaOH	23.3 ± 0.7
5	% 4 SDS içeren Tris HCl (pH 7.2)	< 6.1
6	% 90 CH ₃ OH - % 10 H ₂ O	15.1 ± 0.4
7	0.020 M Tris HCl – 0.15 M NH ₄ CH ₃ COO (pH 7.0)	< 4.2
8	20.0 mg Pepsin (4230 units/mg) içeren 30 mM Tris HCl (pH 7.2)	12.1 ± 0.4
9	20.0 mg Tripsin (1670 units/mg) içeren 30 mM Tris HCl (pH 7.2)	18.1 ± 0.5
10	0.80 g TMAH - 30 mM Tris HCl (pH 7.2)	34.8 ± 0.9
11	20.0 mg Protease XIV (4.5 units/mg) içeren 30 mM Tris HCl (pH 7.2)	70.5 ± 2.1
12	20.0 mg Proteinase K (7.5 units/mg) içeren 30 mM Tris HCl (pH 7.2)	37.7 ± 1.1
13	20.0 mg Driselase içeren 30 mM Tris HCl (pH 7.2)	4.3 ± 0.1
14	20.0 mg Bacillus Subtilis içeren 30 mM Tris HCl (pH 7.2)	9.2 ± 0.3
15	20.0 mg Pancreatin içeren 30 mM Tris HCl (pH 7.2)	11.6 ± 0.4
16	20.0 mg PMSF içeren 30 mM Tris HCl (pH 7.2)	< 4.2
17	30 mM Tris HCl (pH 7.2)	10.9 ± 0.4

Tablo 8' de görüldüğü gibi en iyi ekstraksiyon verimi Protease XIV (4.5 units/mg) enzimi kullanılarak elde edilmiştir. Proteinase K kullanılarak elde edilen ekstraksiyon verimi ise % 37.7 olarak bulunmuştur. PMSF, Tris HCl-NH₄CH₃COO tamponu, SDS ve 0.10 M HCl kullanılarak elde edilen ekstraksiyon verimleri de % 4.2' nin altında bulunmuştur. 20.0 mg Protease XIV içeren çözeltiyle elde edilen ICP-MS sinyali Şekil 3' te görülmektedir.



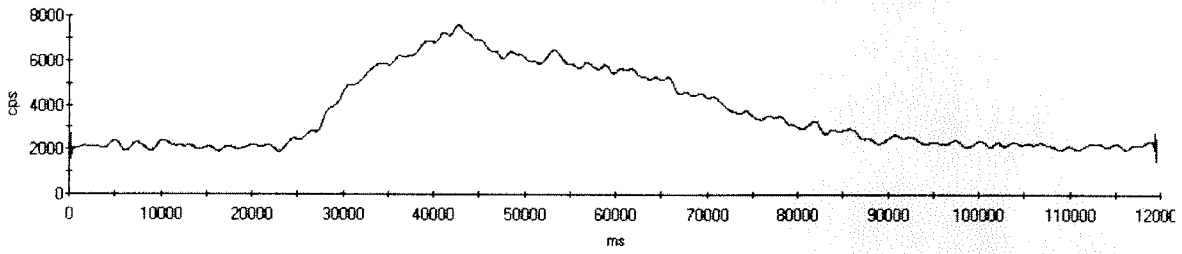
Şekil 3. 20 mg Protease XIV (4.5 units/mg) içeren 30 mM Tris HCl (pH 7.2) kullanılarak yapılan ekstraksiyondan elde edilen ICP-MS sinyali.

Elde edilen bu sinyalin ICPS değeri 5,050,100 dür. 20 mg Proteinase K (7.5 units/mg) içeren 30 mM Tris HCl (pH 7.2) içeren çözeltiyle elde edilen ICP-MS sinyali de Şekil 4' te görülmektedir.

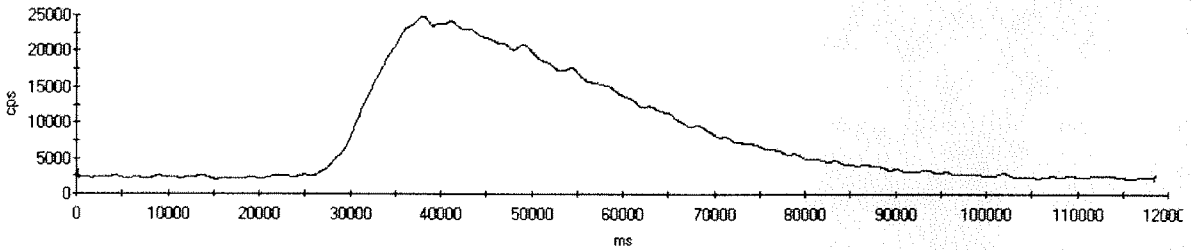


Şekil 4. Proteinase K (7.5 units/mg) içeren 30 mM Tris HCl (pH 7.2) kullanılarak yapılan ekstraksiyondan elde edilen ICP-MS sinyali.

% 10 CH₃OH in 0.2 M HCl de hazırlanmış çözeltisi kullanılarak yapılan 2 nolu ekstraksiyonda ekstraksiyon verimi, metil alkolün ICP-MS de örnek sisleştirme verimini artırma etkisi göz önünde bulundurularak hesaplanmıştır. Bu amaçla 10.0 ng/mL Se IV ün suda ve % 10 CH₃OH içeren 0.20 M HCl de hazırlanmış çözeltilerin ICP-MS sinyalleri karşılaştırılmıştır. 10.0 ng/mL Se IV ün sulu çözeltisinin verdiği sinyal Şekil 5' te, % 10 CH₃OH içeren 0.20 M HCl de hazırlanmış çözeltisinin verdiği sinyalde Şekil 6' da görülmektedir.



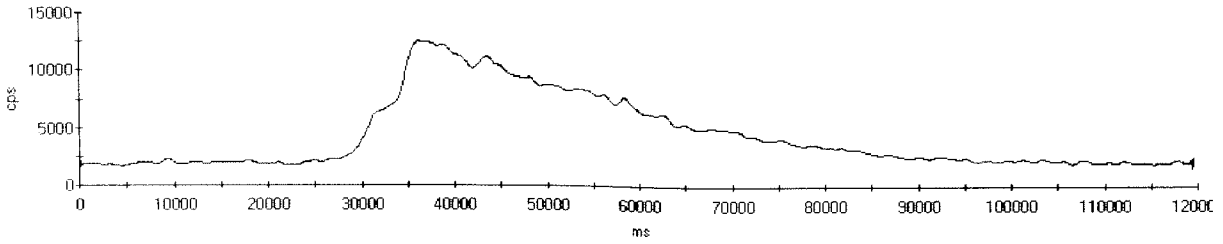
Şekil 5. 10.0 ng/mL Se IV ün sulu çözeltisinin verdiği ICP-MS sinyali.



Şekil 6. 10.0 ng/mL Se IV ün % 10 CH₃OH içeren 0.20 M HCl de hazırlanmış çözeltisinin verdiği ICP-MS sinyali.

Şekil 5' te görülen sinyalin ICPS değeri 2,854,203 olmasına rağmen Şekil 6' da bulunan sinyalin ICPS değeri 9,365,631 dir. Görüldüğü gibi % 10 CH₃OH içeren 0.20 M HCl de hazırlanmış Se IV standardından elde edilen sinyal sulu ortamda hazırlanan Se IV sinyalinden 3.28 kat daha büyüktür. Bundan ötürü, metil alkol içeren çözeltilerin ekstraksiyon verimlerini hesaplamak için gereken kalibrasyon grafiğinin elde edilmesinde

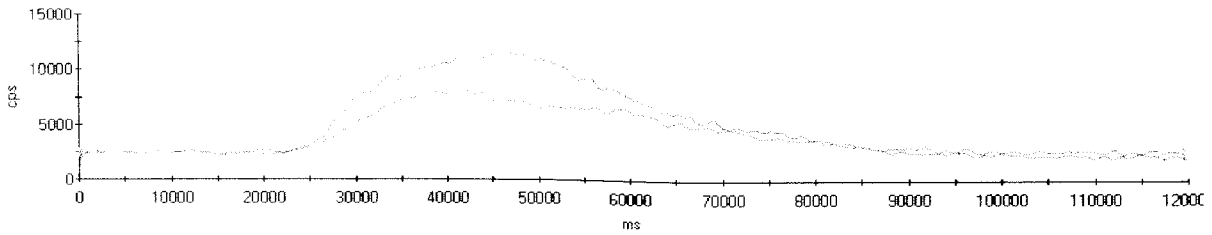
aynı oranda CH₃OH ile hazırlanmış standart çözeltiler kullanılmıştır. Benzeri bir durum % 90 CH₃OH - % 10 H₂O kullanılarak yapılan ekstraksiyon çalışmasında da görülmüştür. Bu çözelti kullanılarak elde edilen 10.0 ng/mL Se IV sinyali Şekil 7'de görülmektedir.



Şekil 7. 10.0 ng/mL Se IV ün % 90 CH₃OH - % 10 H₂O da hazırlanmış çözeltisinin verdiği ICP-MS sinyali.

% 90 CH₃OH - % 10 H₂O kullanılarak elde edilen ICP-MS sinyalinin ICPS değeri 4,038,674 olarak bulunmuştur. Elde edilen bu sinyal, sulu ortamda hazırlanan Se IV sinyalinden 1.41 kat daha büyüktür.

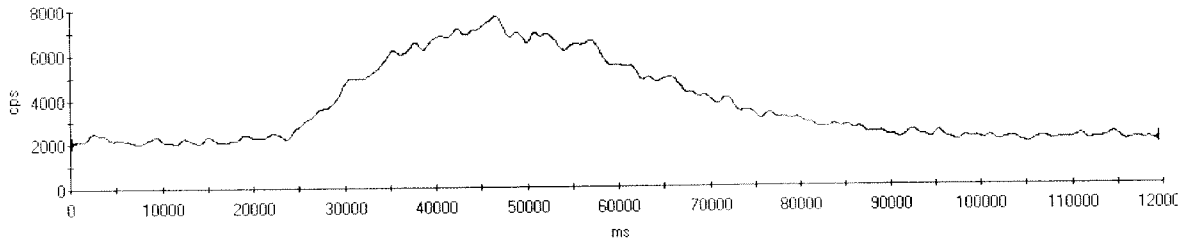
Tablo 8' de görüldüğü gibi 0.80 g TMAH - 30 mM Tris HCl (pH 7.2) kullanılarak elde edilen ekstraksiyon verimi % 34.8 ± 0.9 olarak bulunmuştur. TMAH' in yapısında bulunan hidroksil gruplarının metil alkollü ortamdaki gibi ekstraksiyon çözeltisinin sisleştirme verimini artırdığı tespit edilmiştir.



Şekil 8. Yeşil: 10.0 ng/mL Se IV ün 0.80 g TMAH - 30 mM Tris HCl (pH 7.2) kullanılarak hazırlanmış çözeltisinin, Kahverengi: 10.0 ng/mL Se IV ün sulu çözeltisinin verdiği ICP-MS sinyalleri.

Şekil 8'de de görüldüğü gibi TMAH içeren çözelti kullanılarak yapılan ekstraksiyonda elde edilen ICP-MS sinyali Se IV ün sulu çözeltisi kullanılarak elde edilen sinyalden yaklaşık 2 kat daha büyüktür. ICPS olarak TMAH içeren 10.0 ng/mL SE IV çözeltisinden elde edilen sinyal 4,590,886 olduğu halde sulu çözeltiden elde edilen değer 2,678,579 dur. Sisleşme veriminden kaynaklanan bu sinyal farkından ötürü, TMAH içeren çözeltinin ekstraksiyon verimini hesaplamada kullanılan kalibrasyon grafiğini elde ederken TMAH içeren standartlar kullanılmıştır.

Ekstraksiyon çalışmalarının çoğunda kullanılan 30 mM Tris HCl (pH 7.2) in sinyal üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığıda araştırılmıştır. Bu amaçla 30 mM Tris HCl (pH 7.2) de hazırlanmış 10.0 ng/mL Se IV sinyali Şekil 9' de görüldüğü gibi elde edilmiştir.



Şekil 9. 10.0 ng/mL Se IV ün 30 mM Tris HCl (pH 7.2) de hazırlanmış çözeltisinin verdiği ICP-MS sinyali.

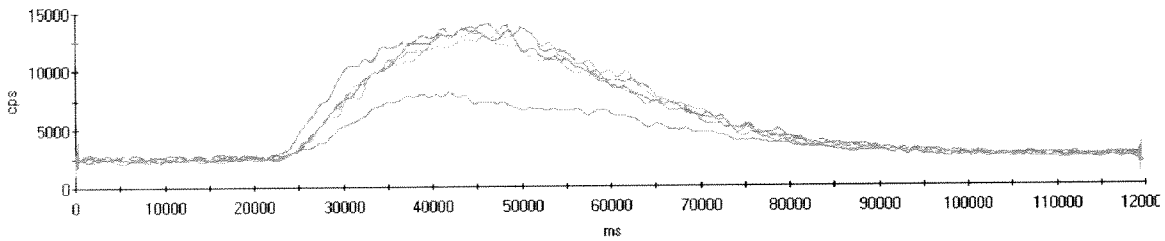
Elde edilen bu sinyalin ICPS değeri 2,829,230 olarak bulunmuştur. Bu değer H₂O kullanılarak hazırlanan 10.0 ng/mL Se IV den elde edilen ICPS değerine çok yakın olduğundan, bu çözeltinin ICP-MS sinyallerine bir etkide bulunmadığı sonucuna varılmıştır.

Tüm ekstraksiyon çözeltilerinin kör analizleri yapılmış ve çözeltilerin Se içermedikleri tespit edilmiştir.

7. Ekstraksiyon Süresinin Optimizasyonu

Ekstraksiyon işleminde ekstraksiyona tabii tutulacak yumurta örneği ile ekstraksiyon çözeltisinin optimum etkileşme süresini bulmak için bu optimizasyon yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemleri genellikle zaman alıcı olup, türlendirme çalışmalarında en fazla zamanın harcandığı işlem basamağı olarak bilinir. En az zaman kullanarak en iyi veya en iyiye yakın ekstraksiyon işlemini bulmak amacıyla yapılan bu deneyde; yaklaşık 0.20 g alınan dondurarak kurutulmuş yumurta örnekleri üzerine 20 mg Protease XIV enzimi ve 10.0 mL Tris-HCl (pH 7.2) çözeltisi katılmıştır. Çalkalayıcı üzerine yerleştirilen örnekler aynı anda karıştırılmaya başlanmış ve belirli zaman aralıklarında ikişer paralel örnek halinde çalkalayıcı üzerinden indirilip 15 dakika boyunca 4500 RPM de santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminden sonra örnekler Millipore Stirred Ultrafiltrasyon Cell düzeneğinde 10 KDa ultrafiltrasyon membranı (Filter Code: YM10 Dia: 63.5 mm) kullanılarak süzümüştür. Berrak olarak elde edilen çözeltiler ICP-MS ile analiz edilmiştir.

4, 8, 12, 24 ve 28 saat boyunca ekstrakte edilen yumurta örneklerinden elde edilen ICP-MS sinyalleri ve referans olarak kullanılmak üzere 10.0 ng/mL Se IV çözeltisinden elde edilen sinyaller Şekil 10' da verilmektedir.

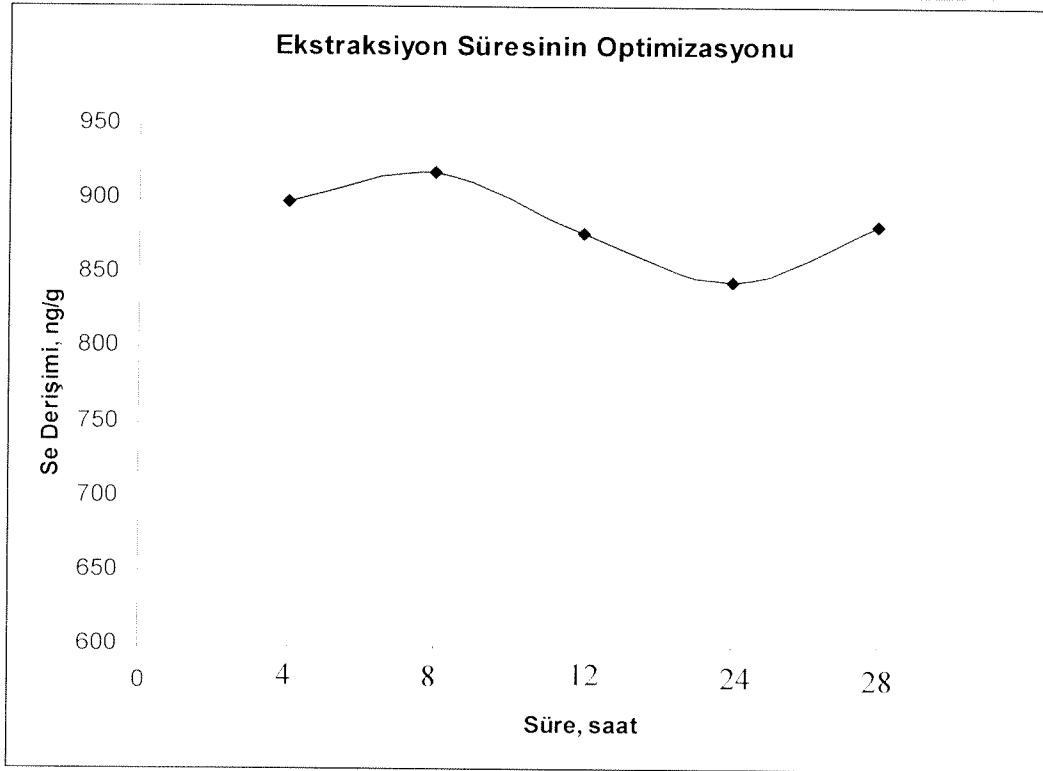


Şekil 10. 4 (Yeşil), 8. (Kahverengi), 12. (Turuncu), 24. (Mavi), 28. (Pembe) saat sonunda elde edilen ekstraktlerin ve 10.0 ng/mL Se IV (Eflatun) ün verdiği ICP-MS sinyali.

Şekil 10' da tüm ekstraktlerden elde edilen sinyallerden görüldüğü gibi, ekstraksiyon süresi arttıkça sinyalde belirgin bir artış görülmemiştir. Elde edilen bu sinyaller derişime dönüştürüldüğünde elde edilen değerler Tablo 9 ve Şekil 11' de verilmektedir.

Tablo 9. Ekstraksiyon süresinin optimizasyon değerleri, N=2.

Yumurta örneği, g	Enzim, mg	Ekstraksiyon süresi, Saat	Se Derişimi, ng/g	Ekstraksiyon verimi, %
0.2019	20.2	4	899.5 ± 28.1	75.0 ± 2.3
0.2014	20.1	8	918.0 ± 31.2	76.6 ± 2.6
0.2063	20.6	12	878.2 ± 17.6	73.3 ± 1.5
0.2059	21.9	24	845.0 ± 25.4	70.5 ± 2.1
0.2093	21.5	28	883.1 ± 17.7	73.7 ± 1.5

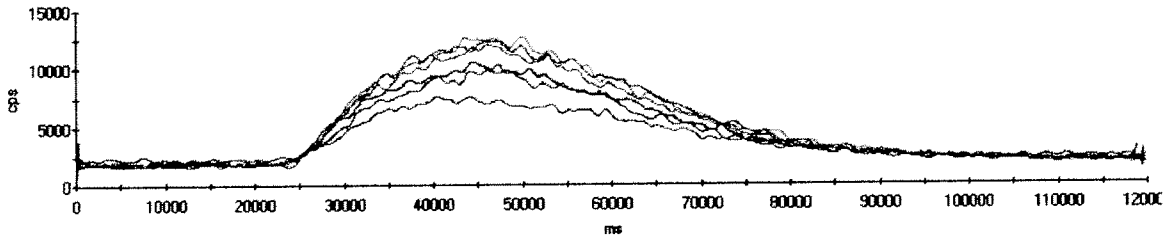


Şekil 11. Ekstraksiyon süresinin optimizasyon değerleri.

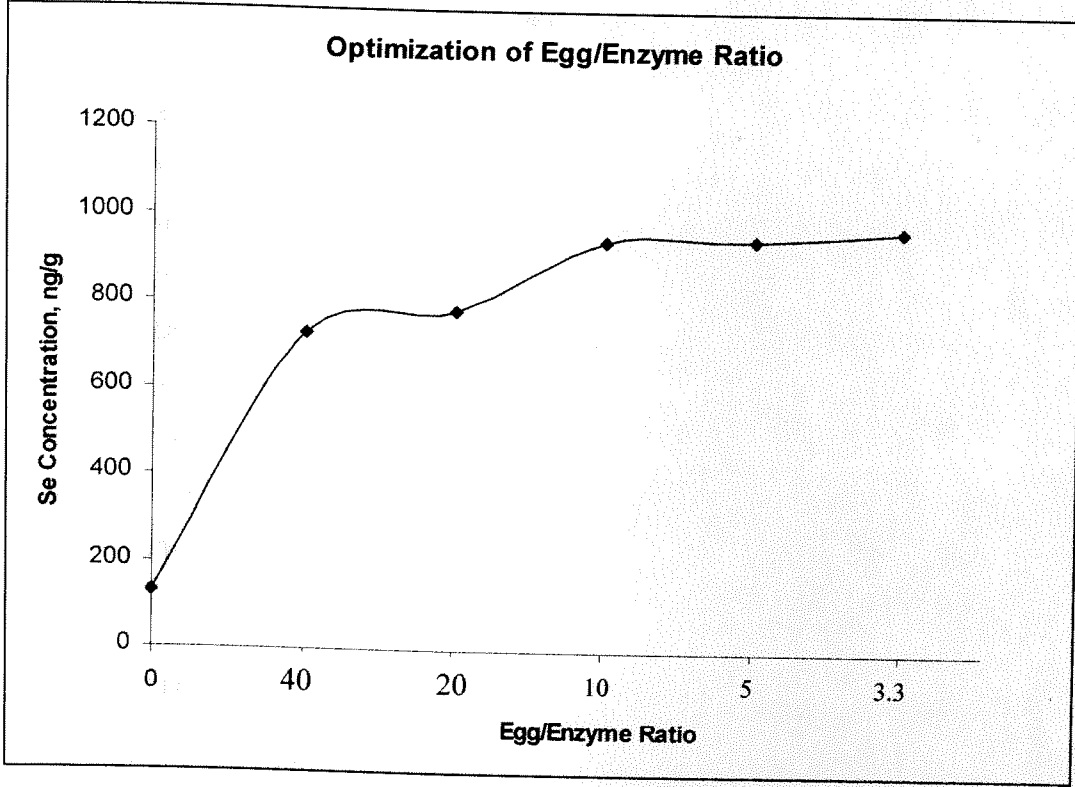
Tablo 9 ve Şekil 11' de görüldüğü gibi artan ekstraksiyon süresiyle, ekstraksiyon sonucu elde edilen Se derişiminde belirgin bir artış elde edilememiştir. Bu nedenle, ilerleyen çalışmalarda ekstraksiyon süresi olarak 4 saat optimum değer olarak seçilmiştir.

8. Ekstraksiyon İşleminde Kullanılacak Enzim Miktarının Optimizasyonu

Yumurta örneğinde, ortamda bulunan farklı selenyum türlerinin yapısını bozmadan çözelti ortamına almak amacıyla farklı enzimler kullanılmaktadır. Önceki çalışmalarımızda kullanılan farklı enzimler arasında en iyi ekstraksiyon verimi protease XIV enziminden elde edildiği için optimizasyon işlemi de bu enzim kullanıldı. . Kullanılan protease XIV enziminin hangi oranda en iyi ekstraksiyon verimini verdiğini saptamak için bu optimizasyon yapılmıştır. Bu amaçla yumurta/enzim ağırlık oranı 40, 20, 10, 5 ve 3.3 değerlerinde sabit tutulup daha önce optimizasyonu yapılan 4 saatlik zaman diliminde 10.0 mL 30 mM Tris-HCl (pH 7.2) ortamında çalkalayıcı üzerinde enzim ve yumurta örneği işleme sokulmuştur. 4 saat sonunda ekstrakte edilen örnekler, 4500 RPM de 15 dakika boyunca santrifüj edilip Millipore Stirred Ultrafiltration Cell düzeneğinde 10 KDa ultrafiltrasyon membranı (Filter Code: YM10 Dia: 63.5 mm) kullanılarak süzölmüştür. Berrak olarak elde edilen çözeltiler ICP-MS ile analiz edilmiştir. Farklı enzim miktarları kullanılarak elde edilen ICP-MS sinyalleri Şekil 12 ve Tablo 10' da gösterilmektedir.



Şekil 12. 5.0 mg Protease XIV kullanılarak (Yeşil) ve 10.0 ng/mL Se IV (Kahverengi) kullanılarak elde edilen ICP-MS sinyalleri.



Şekil 13. Yumurta/Enzim oranının ekstraksiyon verimi üzerine etkisi.

Şekil 13' te, aynı yumurta miktarının farklı enzim miktarları kullanılarak ekstrakte edilmesi sonucu elde edilen selenyum derişimleri gösterilmektedir. Hiç enzim kullanılmadan sadece Tris HCl tamponu kullanılarak ekstrakte edilen selenyum miktarı x ekseninde 0 olarak verilmektedir. Görüldüğü gibi Yumurta/Enzim oranı olarak 10 ve yukarısında kullanıldığında yaklaşık olarak aynı miktarda selenyum ekstrakte edilebilmiştir.

Tablo 10. Enzim miktarının ekstraksiyon verimi üzerine etkisi, 4 saat süre için, N=2.

Yumurta Miktarı, g	Protease XIV Miktarı, mg	Se, ng/g (Kuru Örnekte)	Ekstraksiyon verimi, %
0.2008	5.0	726.6 ± 25.4	60.65 ± 2.12
0.2018	11.3	781.5 ± 23.4	65.23 ± 1.95
0.2039	20.7	945.1 ± 28.4	78.89 ± 2.37
0.2027	41.1	947.7 ± 28.4	79.11 ± 2.37
0.2023	61.0	971.3 ± 29.1	81.08 ± 2.43

Şekil 13 ve Tablo 10' da görüldüğü gibi Protease XIV miktarı 5.0 ve 11.3 mg alındığında elde edilen sinyaller kullanılan diğer miktarlara oranla düşük bulunmuştur. 20.7 mg ve yüksek miktarda enzim kullanıldığında elde edilen sinyaller de birbirlerine çok yakındır. Ekstraksiyon verimlerini hesaplamada SRM ile test edilen en uygun çözme işlemi sonunda elde edilen toplam selenyum derişimi esas alınmıştır. 20.7 mg Protease XIV kullanılmasıyla ekstrakte edilen selenyum değeri daha yüksek enzim miktarları kullanıldığında değışmediğı için ileriki çalışmalarda platonun ortasına düşen değeri olan 25.0 mg enzim miktarı optimum değeri olarak kabul edilmiştir. Bu değeri, yumurta/enzim ağırlık oranı olarak 8 değerine karşı gelmektedir. Süre ve kullanılacak enzim miktarının optimizasyonundan sonra bulunan ekstraksiyon verimlerinin doğruluğunu kanıtlamak için, optimum şartlarda 1566b Oyster tissue SRM inin ekstraksiyonu yapılmıştır.

Tablo 11. SRM Çalışmasında Selenyum Ekstraksiyon Değerleri.

Örnek	Kullanılan Tampon	Sertifika Değeri mg/kg	Bulunan mg/kg	Ekstraksiyon verimi, %
1566b Oyster Tissue	10 mL Tris HCl (pH 7.2)	2.06 ± 0.15	1.38 ± 0.05	66.99 ± 2.50

Yaklaşık 0.2 g alınan dondurarak kurutulmuş yumurta örneğı üzerine 20.75 mg Protease XIV ve 10.0 mL Tris HCl (pH 7.2) ilave edilerek 4 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde karıştırılmıştır. Karıştırılan numune 4500 RPM de 15 dakika boyunca santrifüj edilip Millipore Stirred Ultrafiltration Cell düzeneğinde 10 KDa ultrafiltrasyon membranı (Filter Code: YM10 Dia: 63.5 mm) kullanılarak süzölmüştür. Berrak olarak elde edilen çözeltiler ICP-MS ile analiz edilmiştir. Yumurta örneğı için optimum şartlarda % 78.89 ± 2.37 ekstraksiyon verimi olarak elde edilmişken, Oyster Tissue için bu değeri % 66.99 ± 2.50 olarak bulunmuştur. Ekstraksiyon değeri arasında bir fark görünse de SRM için bile elde edilen verim gayet iyi bulunmuştur. Verimler arasındaki bu fark, kullanılan matrikslerin farklı oluşundan kaynaklanabilir. Ekstraksiyon çalışmaları yapılan optimizasyon çalışmaları hep yumurta örneğı için yapıldığından, yumurtadan farklı bir matrikse sahip olan Oyster Tissue örneğine göre yüksek verim elde edilmesi beklenebilir.

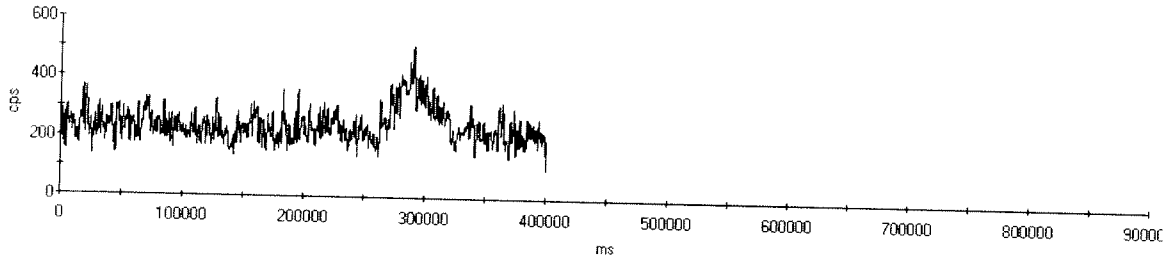
9. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Çalışmaları

Ekstraksiyon çözeltilerinde bulunan farklı selenyum türleri (selenomethionine, selenocystine, Se(IV) ve Se(VI)) HPLC kullanarak ayrılmıştır. Bu çalışmada anyon değiştirici, katyon değiştirici, C18 ve C8 kolonları olmak üzere 4 farklı kolon ve çeşitli hareketli fazlar kullanılmıştır.

9.1 Anyon Değiştirici Kolon ve HPLC Çalışmaları.

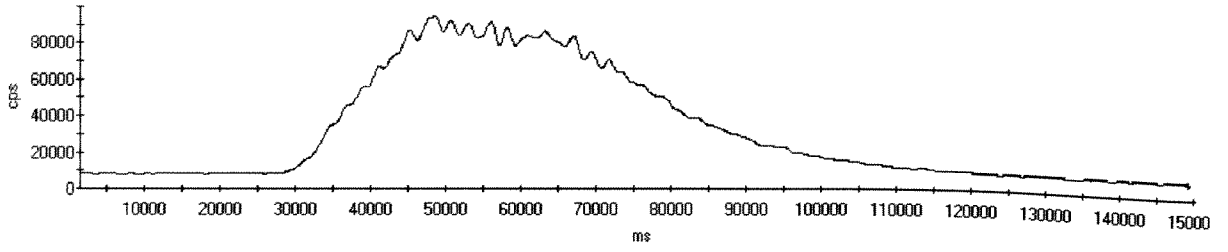
HPLC ile ayırma çalışmalarımızın ilk kısmında anyon değiştirici kolon kullanarak türlerin ayrılması amaçlanmıştır. Hareketli faz olarak pH 5.0 değerinde Sitrata tamponu kullanılmıştır. Örnek hacmi 20 µL dir.

Şekil 14' te görülen sinyal, anyon dönüştürücü kolona mobil faz olarak pH 5.0 değerinde Sitrata tampon çözeltilisinin hareketli faz olarak kullanıldığı HPLC sistemine 100 ng/mL Se IV gönderilmesiyle elde edilmiştir.



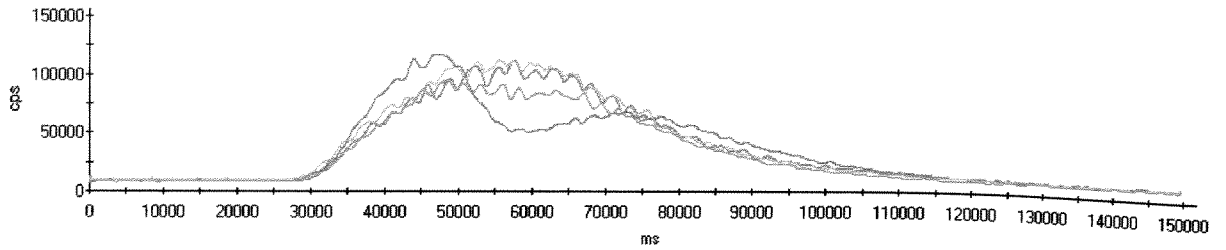
Şekil 14. 100 ng/mL Se(IV) çözeltilisinin 1.0 mL/dak. akış hızında anyon değiştirici kolona gönderilmesiyle elde edilen ICP-MS kromatogramı.

HPLC kullanılmadan devamlı akış modunda 100 ng/mL Se(IV) çözeltilisinin ICP-MS'e gönderilmesiyle elde edilen sinyal Şekil 15' te gösterilmektedir.



Şekil 15. 100 ng/mL Se(IV) çözeltisinden elde edilen ICP-MS sinyali.

Şekil 15' te görüldüğü gibi 100 ng/mL Se (IV) ün 250 µL hacminde kolon olmadan ICP-MS sistemine gönderilmesiyle elde edilen ICP-MS sinyali yaklaşık 80,000 CPS dir. 4 farklı selenyum türünün 100 ng/mL lik çözeltilerinin 250 µL hacimde ICP-MS' e gönderilmesiyle elde edilen ICP-MS sinyalleri Şekil 16' da görülmektedir.

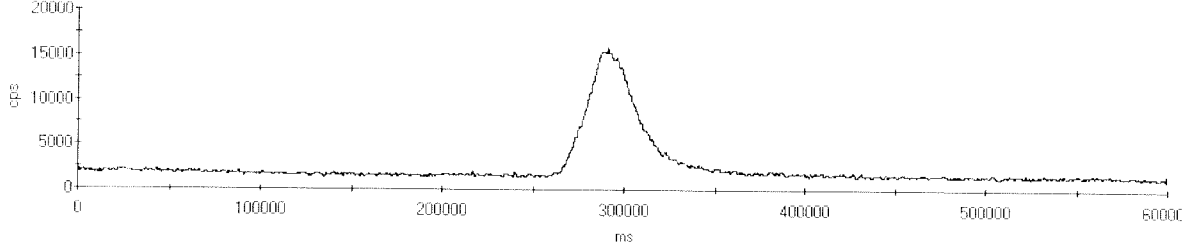


Şekil 16. 100 ng/mL Se IV (Pembe), Se VI (Yeşil), Selenocystine (Kahverengi), Selenomethionine (Turuncu) çözeltilerinden elde edilen ICP-MS sinyalleri.

HPLC nin kullanıldığı sistemde 1.00 mg/L Se(IV) için elde edilen sinyal yaklaşık 2,000 CPS dir. Yani HPLC kullanılmasıyla elde edilen sinyalde büyük oranda bir azalma görülmektedir.

Hareketli faz olarak % 10 CH₃OH içeren pH 5' e ayarlanmış 10 mM Sitrat tamponu kullanılarak yukarıda belirtilen olumsuzluğun giderilmesi amaçlandı. Bu hareketli faz

kullanılarak ve polarlık farkından faydalanarak sinyalde artış beklenmiştir. Şekil 17' de, yukarıda belirtilen hareketli faz kullanılarak 100 ng/mL Se IV çözeltisinin 1.0 mL/dak. akış hızında anyon değiştirici kolona gönderilmesiyle elde edilen ICP-MS sinyali gösterilmiştir.



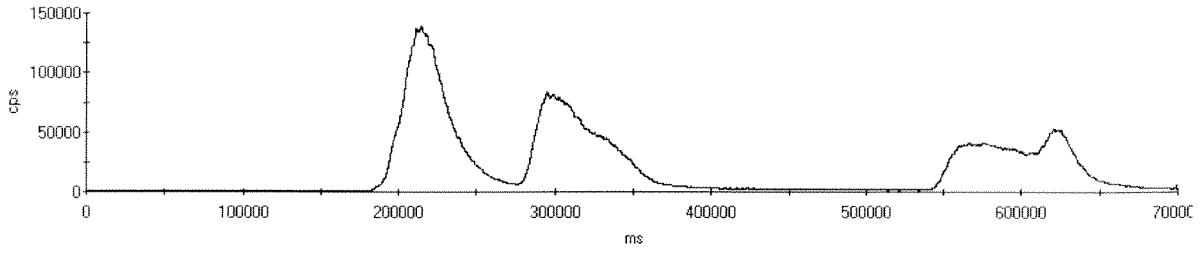
Şekil 17. 100 ng/mL Se(IV) çözeltisinin 1.0 mL/dak. akış hızında anyon değiştirici kolona % 10 Metanol içeren hareketli faz yardımıyla gönderilmesiyle elde edilen ICP-MS kromatogramı.

Yalnızca sulu sistemde sitrat tamponuna göre duyarlılığı artırmak için % 10.0 CH₃OH kullanıldı; örnek hacmi 182 µL olarak optimize edildi. Sonuç 17' de verilmektedir. Şekil 17' de görüldüğü gibi % 10 metanol içeren hareketli fazla elde edilen sinyal metanol içermeyen mobil fazla elde edilene göre yaklaşık olarak 75 kat daha büyüktür.

Yukarıda belirlenen şartlarda 100 ng/mL selenyum türlerini içeren standart çözeltiler 182 µL hacimde % 10 metanol içeren pH 5.0 a ayarlanmış 5 mM sitrat tamponunun hareketli faz olarak kullanıldığı sisteme enjekte edilmiş ve Şekil 18-19' da gösterilen ICP-MS sinyalleri elde edilmiştir.

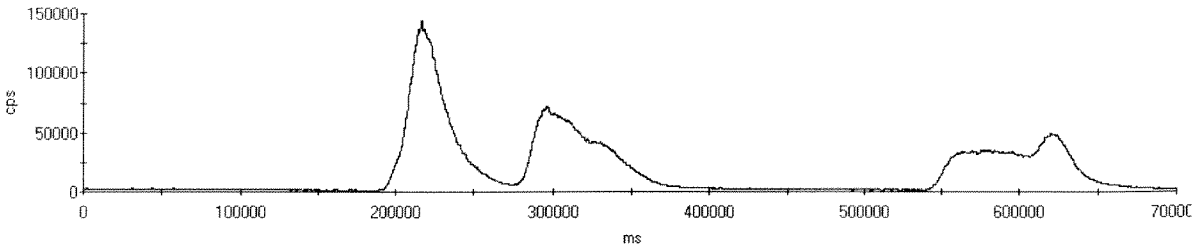
Bu bölümdeki analizlerde S5 SAX 25 cm Analytical 4.6 mm kolonu kullanılmıştır. Kolonun çıkışı, doğrudan PTFE boru ile plazmanın örnek verme bölümüne bağlanmıştır. ICP-MS analizlerinde ⁷⁸Se izotopu kullanılmış, zaman zaman duyarlılık ve doğruluğun denetimi için de diğer izotoplar, ⁷⁶Se, ⁷⁷Se ve ⁸²Se kullanılmıştır. Bu izotopların bolluk oranları yüzde olarak ⁸²Se (8.73), ⁷⁷Se(7.63) ve ⁷⁶Se(9.36) dır.

Selenomethionine ve selenocystine anyon değiştirici kolonda ayrılamamaktadır. Se IV ün anyon değiştirici kolonda alıkonma süresi 300, Se VI nın 550, selenomethionine ve de selenocystine in ise 220 saniye olarak tespit edilmiştir.



şekil 18. 100 ng/mL Se(IV), Se(VI) ve Se (Selenocystine den hazırlanan) türlerinin anyon değiştirici kolonda ayrıştırılmasıyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

şekil 18' de görüldüğü gibi Se(IV), Se(VI) ve selenocystine anyon değiştirici kolonda yukarıda belirtilen şartlarda selenyum türlerinin alıkonma sürelerinin farkından yararlanarak birbirinden ayrılmıştır. Se IV ve Se VI türlerinin alıkonma sürelerinin fazla oluşundan ötürü, bu türlere ait pikler yayvanlaşmıştır. Pik alanlarında, saf standartlarına kıyasla herhangi bir değişiklik meydana gelmemiştir.



şekil 19. 100 ng/mL Se(IV), Se(VI) ve Se (Selenomethionine den hazırlanan) türlerinin anyon değiştirici kolonda ayrıştırılmasıyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

şekil 19' de görüldüğü gibi Se IV, Se VI ve Selenomethionine türleri, anyon değiştirici kolonda

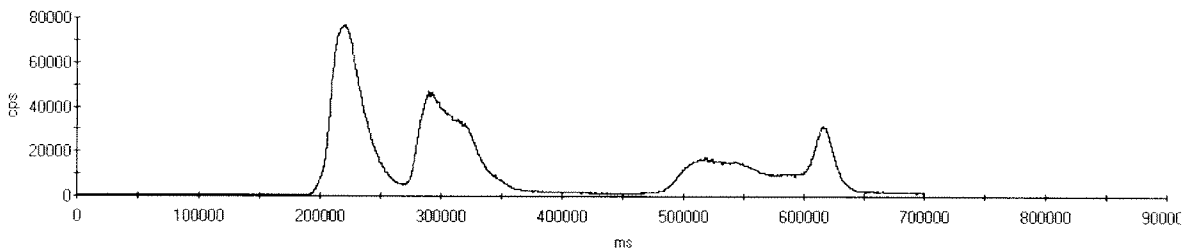
yukarıda belirtilen şartlarda selenyum türlerinin alıkonma sürelerinin farkından yararlanarak birbirinden ayrılmıştır.

Yukarıda belirtildiği gibi anyon değiştirici kolon için geliştirilen bu yöntem kullanılarak 4 selenyum türünden Se IV ve Se VI belirgin bir şekilde birbirinden ayrılabilir.

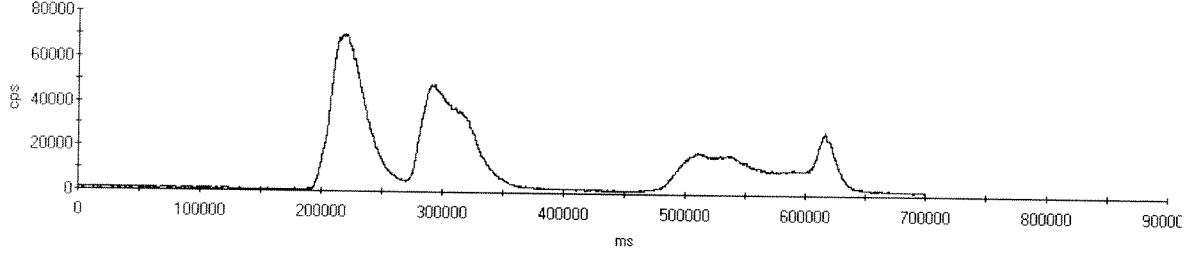
Selenomethionine ve selenocystine anyon değiştirici kolonda aynı alıkonma süresine sahip olduğundan bu iki tür anyon değiştirici kolonda birbirinden ayrılamamıştır.

Selenomethionine ve selenocystine türlerinin % 10 metanol içeren pH 5.0 a ayarlanmış sitrat tamponunun hareketli faz olarak kullanıldığı sistemde ayrılmadığından ötürü, yine anyon dönüştürücü kolonda farklı bir pH ya ayarlanmış farklı miktarda CH₃OH içeren sitrat tamponu hareketli faz olarak denenmiştir. Bu amaçla pH 5.5 e ayarlanmış, % 15 CH₃OH içeren 5 mM Sitrat tamponu hareketli faz olarak kullanılmıştır. Deneylerde 182 µL örnek hacmi kullanılmıştır. S5 SAX 25 cm Analytical 4.6 mm kolonu anyon değiştirici kolon olarak kullanılmıştır.

Se (VI) için elde edilen sinyal, pH 5.0 e ayarlanmış tamponun kullanıldığı sisteme göre daha düşük niteliktedir. Yaklaşık 500 saniyede elde edilen Se (VI) sinyalinin yanısıra 230 saniye alıkonma süresine sahip küçük bir pik de elde edilmiştir. Üçlü karışım halinde hazırlanan standart 100.0 ng/mL Se çözeltilerinin HPLC ye gönderilmesiyle elde edilen sinyaller Şekil 20-21' de görülmektedir.



Şekil 20. 100 ng/mL Se (VI), Se (VI) ve Se (Selenomethionine) standartlarını içeren çözeltinin 182 µL hacimde anyon değiştirici kolona pH 5.5 e ayarlanmış, % 15 CH₃OH içeren 5 mM Sitrat tamponun hareketli faz olduğu sisteme enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.



Şekil 21. 100 ng/mL Se (VI), Se (VI) ve Se (Selenocystine) standardlarını içeren çözeltinin 182 µL hacimde anyon değiştirici kolona pH 5.5 e ayarlanmış, % 15 CH₃OH içeren 5 mM Sitrat tamponun hareketli faz olduğu sisteme enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

Şekil 20-21' de görüldüğü gibi Selenomethionine ve selenocystine anyon değiştirici kolonda aynı alıkonma süresine sahiptirler. Dolayısıyla pH 5.5 ta da bu iki tür birbirinden ayrılamamıştır. % 15 CH₃OH içeren mobil fazı kullanıldığında püsürtme odacığı (spray chamber) sisteminin sıcaklığı beklenenin (3⁰C) çok altına düşmüştür (-2⁰C). Bu sıcaklıkta sisleştirme veriminde düzensizlikler tespit edilmiştir. Bu da Se (IV) ve Se (VI) standartlarının sisteme gönderilmesinde beklenmeyen küçük pikler halinde kendini göstermiştir. İlerde yapılacak anyon değiştirici kolonla ilgili çalışmalarda % 15 CH₃OH içeren mobil fazı yerine, pH 5.0 e ayarlanmış %15 CH₃OH içeren 5 mM Sitrat tamponu kullanılmasına karar verilmiştir.

9. 2. C8-C18 Kolonları Kullanarak İyon Çifti Temelli (IP-RP-HPLC-ICP-MS) Çalışmalar

Selenyum türlerinin birbirinden ayrılması için ters faz kolon denenmiştir. Ters faz kolon, durgun faz olarak apolar yapıların kullanıldığı kolonlardır. Bu tür kolonlar maddelerin polaritesinden hareketle ayırım yaparlar. Literatürde selenyum türlerinin birbirlerinden ayrılması için sıklıkla kullanılırlar. İyon çifti oluşturan maddeler de hareketli faz olarak kullanılarak ortamda bulunan analitleri yüksüz hale getirip ayırımda tek etkenin maddenin polarite olmasını sağlarlar. Bu amaçla en çok kullanılan ion-pairing maddeler heptafluorobutiricacid (HFBA) ve trifluoroaceticacid (TFA), pentafluoropropanoicacid (PFPA) dir^{12,5}. Perfluorinated karboksilik asit yapılarında olan bu bileşikler, farklı kimyasal yapıda olan selenyum türlerini farklı pH değerlerinde başarıyla ayırabilmektedirler. HFBA ile elde edilen kromatogramlarda pikler arası ayırım en iyi olarak gözlemlenmiştir.

Se (IV), Se (VI), Selenomethionine ve selenocystine türlerini ayırmak için aşağıdaki tablolarda verilen şartlar denenmiştir.

9. 2. 1. Farklı hareketli Fazlar

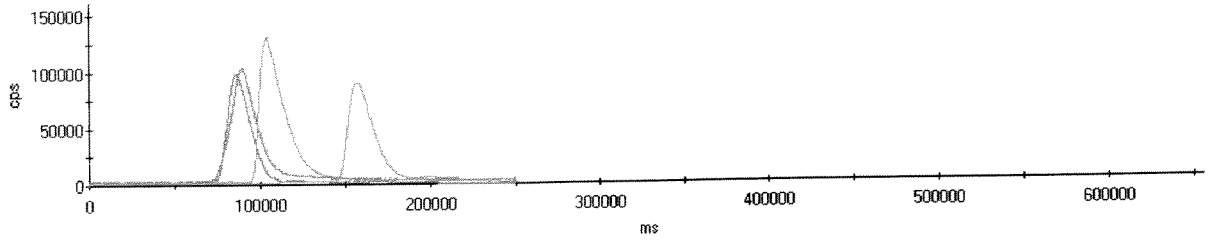
9. 2. 1. 1. Hareketli Faz 1

Alltima C₈ reverse phase kolonu % 5 CH₃OH hareketli fazı eşliğinde kullanılmıştır. Bu şartlar altında selenyum türlerinin herbiri 100.0 ng/mL derişiminde kolona ayrı ayrı gönderilmiş ve bu şartlar altında herbir türün alıkonma süresi tespit edilmiştir.

Tablo 12. % 5 CH₃OH kullanılarak yapılan kromatografik ayırım şartları.

Parametre	
Kolon	Alltima C8
Çözelti	% 5 CH ₃ OH
Akış hızı	1.0 mL/minute
Örnek sarmalı	91.0 µL
Se tür derişimi	100.0 ng/mL

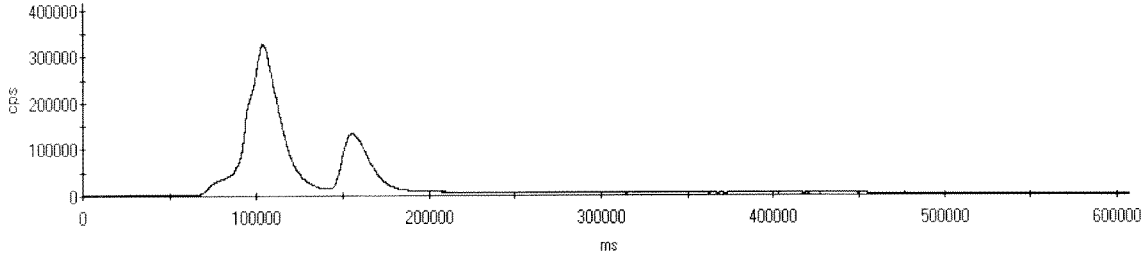
Şekil 22, 4 farklı türlerin tek kromatogram üzerinde gösterimini içermektedir. Görüldüğü gibi Se (IV) ve Se (VI) türlerinin sinyalleri ayırlanamamıştır. Elde edilen Se (IV) ve Se (VI) sinyalleri ile selenocystine sinyalleri arasındaki çözünürlük ise alıkonma sürelerinin yakınlığından dolayı iyi değildir.



Şekil 22. 100 ng/mL Se (VI) (Yeşil), Se (IV) (Kahverengi), Se (Selenocystine) (Mavi) ve Se (Methionine) (Turuncu) standartlarının ayrı ayrı 91 µL hacimde reverse phase kolona % 5 CH₃OH içeren hareketli faz yardımıyla enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

Se (IV) ve Se (VI) nin alıkonma süreleri birbirine çok yakın olarak bulunmuştur; bu değer yaklaşık olarak 90 saniyedir. Selenocystine için alıkonma süresi 110, selenomethionine için ise 160 saniye olarak gözlemlenmiştir.

4 farklı selenyum türünün herbirinden 100.0 ng/mL içeren standardın % 5.0 CH₃OH içeren hareketli faz yardımıyla C₈ kolonuna gönderilmesiyle elde edilen HPLC-ICP-MS sinyali Şekil 23' de görülmektedir.



Şekil 23. 100 ng/mL Se (VI), Se (VI), Se (Selenocystine) ve Se (Methionine) standartlarını içeren çözeltinin 91 µL hacimde reverse phase kolona % 5 CH₃OH içeren hareketli faz yardımıyla enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

Şekil 23' te görüldüğü gibi % 5.0 CH₃OH içeren hareketli faz yardımıyla 4 selenyum türü birbirinden etkili bir biçimde ayıramamıştır. Se (VI), Se (VI) ve Se (Selenocystine) türlerinin alıkonma süreleri birbirine çok yakın olduğundan Şekil 23' te görülen yayvan bir pik ve selenomethionine ait yaklaşık 160 saniyede ikinci bir pik elde edilmiştir. Bu şartlar altında % 5.0 CH₃OH içeren hareketli fazın selenyum türlerini ayırmada kullanılamayacağına karar verilmiştir.

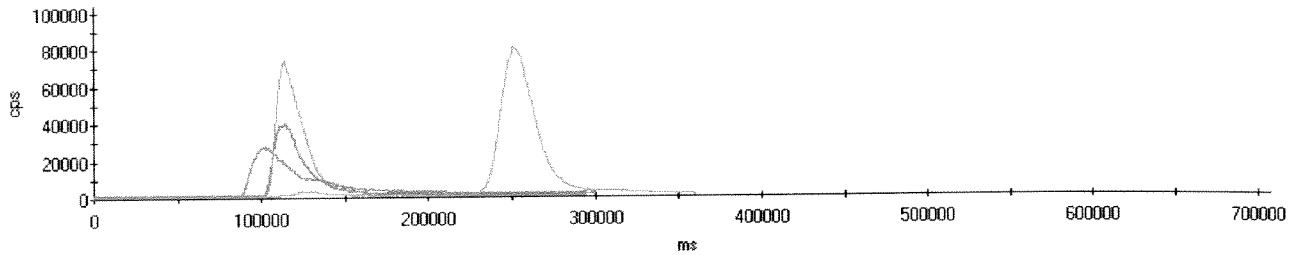
9. 2. 1. 2. Hareketli faz 2

Trifluoroacetic acid (TFA) in mobil faz olarak kullanılmasıyla selenyum türleri birbirlerinden ayrılmaya çalışılmıştır. TFA'nın C₈ kolonunda kullanılmasıyla, ortamda bulunan selenyum türlerini yüksüz duruma getirip sadece polarite farklarından hareketle bu türler birbirlerinden ayrılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla % 0.1 TFA ve % 5 CH₃OH (pH 1.71) çözeltisi hazırlanmıştır. Bu şartlarda kullanılan parametreler Tablo 13' de özetlenmiştir.

Tablo 13. % 0.1 TFA ve % 5 CH₃OH (pH 1.71) kullanılarak yapılan kromatografik ayırım şartları.

Parametre	
Kolon	Alltima C ₈
Tampon çözelti	% 0.1 TFA % 5 CH ₃ OH (pH 1.71)
Akış hızı	1.0 mL/dakika
Örnek sarmalı	91.0 µL
Se tür derişimi	100.0 ng/mL

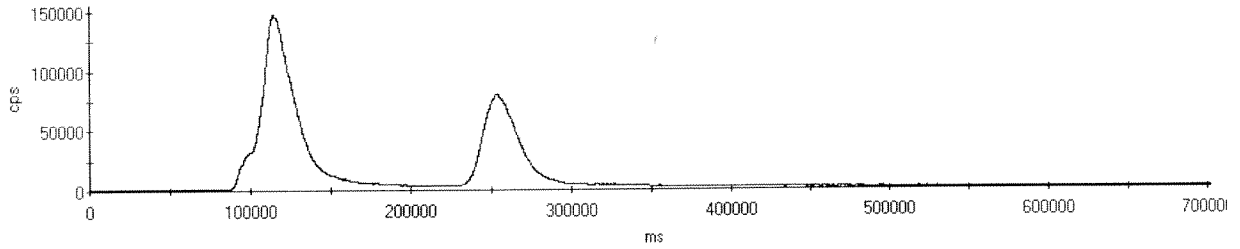
Belirtilen hareketli faz kullanılarak Se (IV), Se (VI), selenomethionine ve selenocystine türlerinin 100.0 ng/mL lik saf çözeltileri için C₈ kolondaki alıkonma süreleri bulunmuştur. Selenyum türlerinin ayrı ayrı elde edilen sinyalleri tek kromatogram üzerinde Şekil 24' te gösterilmektedir.



Şekil 24. 100 ng/mL Se VI (Kahverengi), Se IV (Yeşil), Se (Methionine) (Pembe), Se (Cystine) (Mavi) standartlarının ayrı ayrı 91 µL hacimde reverse phase kolona % 0.10 TFA ve % 5.0 CH₃OH (pH 1.71) içeren hareketli faz yardımıyla enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

Se (VI) için alıkonma süresi yaklaşık 95, Se (IV) ve selenocystine için 120 ve selenomethionine için 255 saniye olarak tespit edilmiştir. İnorganik selenyum türleri ile selenocystine türünün kolondaki alıkonma sürelerinin çok yakın oluşundan ötürü bu şartlarda etkili bir ayırım sağlanamamıştır.

Herbir tür için 100.0 ng/mL lik derişim içeren standart çözeltinin sisteme gönderilmesiyle elde edilen kromatogram Şekil 25' de görülmektedir.



Şekil 25. 100 ng/mL Se (Cystine), Se (Methionine), Se IV, Se VI standartlarını içeren çözeltinin 91 µL hacimde reverse phase kolona enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

Elde edilen kromatogramdan anlaşıldığı gibi, % 0.1 TFA içeren % 5.0 CH₃OH hareketli fazı kullanılarak 4 selenyum türü birbirinden ayrılamamıştır. Bu sistemde selenomethionine haricinde 3 selenyum türünün alıkonma süreleri birbirine çok yakın olarak tespit edilmiştir.

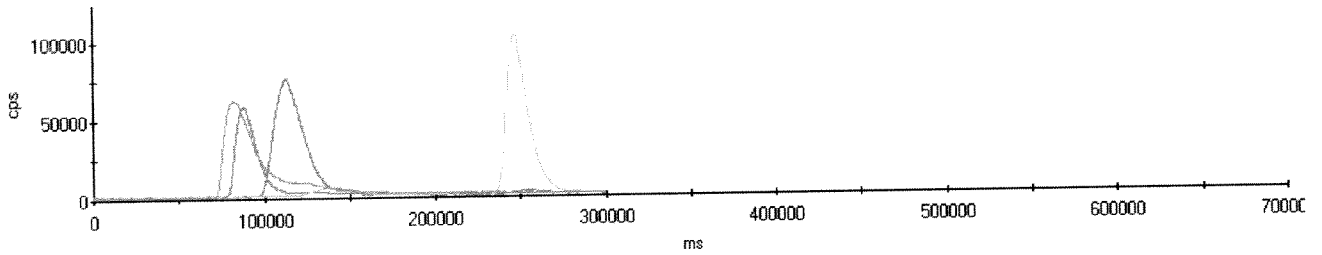
9. 2. 1. 3. Hareketli Faz 3

Hidrofilik yapıda olan selenoaminoasitlerin birbirlerinden ayrılmaları için Alltima C₈ reverse phase kolonu % 0.05 HFBA ve % 5 CH₃OH (pH 3.14) hareketli fazı eşliğinde kullanılmıştır. Hazırlanan hareketli fazın pH sında herhangi bir değişiklik yapılmamış % 0.05 HFBA in oluşturduğu pH olan 3.14 kullanılmıştır. Bu şartlar altında selenyum türlerinin herbiri 100.0 ng/mL derişiminde kolona ayrı ayrı gönderilmiş ve herbir türün kolondaki alıkonma süresi tespit edilmiştir. Bu mobil faz eşliğinde kullanılan parametreler Tablo 14' da özetlenmiştir.

Tablo 14. % 0.05 HFBA ve % 5 CH₃OH (pH 3.14) kullanılarak yapılan kromatografik ayırım şartları.

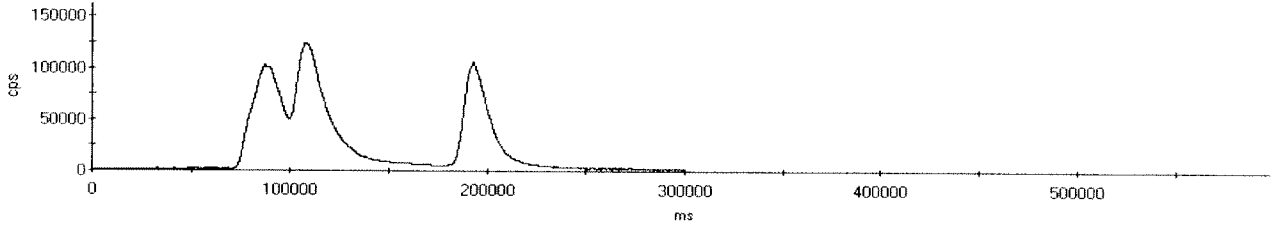
Parameter	Value
Kolon	Alltima C8
Tampon çözelti	% 0.05 HFBA % 5 CH ₃ OH (pH 3.14)
Akış hızı	1.0 mL/dakika
Örnek sarmalı	91.0 µL
Se tür derişimi	100.0 ng/mL

Se (IV) ve Se (VI) nin alıkonma süresi 90 saniye olarak bulunmuştur. Alıkonma süreleri, selenocystine için 115, selenomethionine için ise 250 saniye olarak gözlemlenmiştir. Mobil faz 1'den farklı olarak selenocystine türünün alıkonmasında az da olsa bir artış görülmüş selenomethionine yapısının alıkonma süresi ise büyük oranda artmıştır. Şekil 26, 4 farklı türün tek kromatogram üzerinde gösterimini içermektedir. Görüldüğü gibi Se (IV) ve Se (VI) türleri çok küçük zaman aralıklarıyla detektöre varmaktadırlar. Elde edilen Se (IV) ve Se (VI) sinyalleri ile selenocystine sinyalleri arasındaki çözünürlük alıkonma sürelerinin yakınlığından dolayı çok iyi değildir.



Şekil 26. 100 ng/mL Se VI (Mavi), Se IV (Kahverengi), Se (Methionine) (Turuncu), Se (Cystine) (Yeşil) standartlarının ayrı ayrı 91 µL hacimde reverse phase kolona % 0.05 HFBA ve % 5 CH₃OH (pH 3.14) içeren hareketli faz yardımıyla enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

4 farklı selenyum türünün herbirinden 100.0 ng/mL içeren standardın % 0.05 HFBA ve % 5 CH₃OH (pH 3.14) içeren hareketli faz yardımıyla C₈ kolona enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyali Şekil 27' de görülmektedir.



Şekil 27. 100 ng/mL Se (Cystine), Se (Methionine), Se IV, Se VI standartlarını içeren çözeltinin 91 µL hacimde reverse phase kolona % 0.05 HFBA ve % 5 CH₃OH (pH 3.14) içeren hareketli faz yardımıyla enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyali.

Şekil 27' de görüldüğü gibi bu şartlar altında sadece selenomethionine türü ayrı bir alıkonma süresinde elde edilmiştir. Se (Cystine) Se IV ve Se VI türleri bu şartlarda uygun bir ayırma tabii tutulamamışlardır.

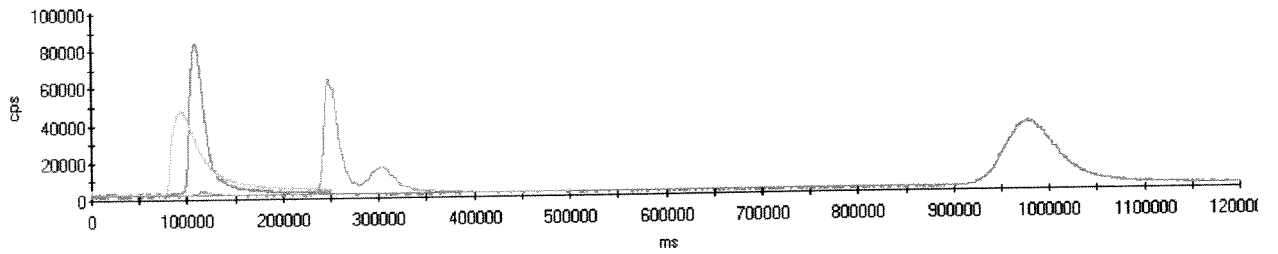
9. 2. 1. 4. Hareketli Faz 4

% 0.05 HFBA kullanılarak selenomethionine ve selenocystine türlerinin alıkonma sürelerinde, mobil faz'1 e göre bir artış meydana geldiği için hareketli faz 4 olarak da hareketli faz 2'ye oranla daha fazla HFBA içeren bir bileşim kullanılmıştır. Bu amaçla % 0.2 HFBA ve % 2.5 CH₃OH (pH 1.64) hazırlanmıştır. Hareketli faz 3 kromatografik ayırım şartları Tablo 15' te verilmiştir.

Tablo 15. % 0.2 HFBA ve % 2.5 CH₃OH (pH 1.64) kullanılarak yapılan kromatografik ayırım şartları.

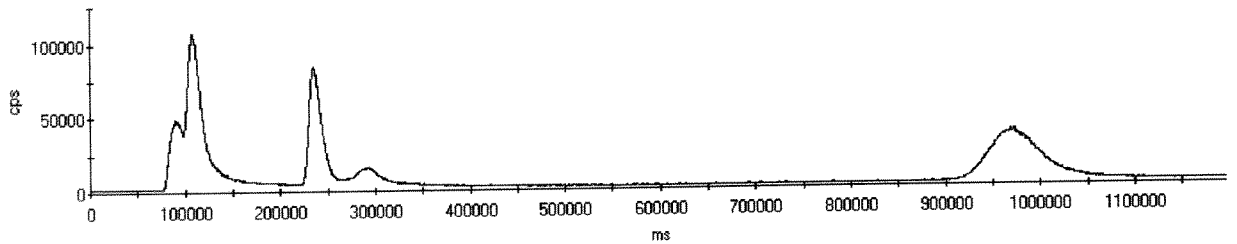
Parameter	Value
Kolon	Alltima C8
Tampon çözelti	% 0.2 HFBA % 2.5 CH ₃ OH (pH 1.64)
Akış hızı	1.0 mL/dakika
Örnek sarmalı	91.0 µL
Se tür derişimi	100.0 ng/mL

Se (IV) için elde edilen alıkonma süresi yaklaşık olarak 100 saniye olarak tespit edilmişken bu değer Se (VI) için yaklaşık 110 saniye olarak bulunmuştur. Bu iki tür arasında ilk 2 hareketli faza oranla bu hareketli faz eşliğinde az da olsa bir ayırım elde edilmiştir. Selenocystine için alıkonma süresi 200, selenomethionine için ise 980 saniye olarak gözlemlenmiştir. Şekil 28' de herbir selenyum türünün ayrı ayrı sisteme enjeksiyonuyla elde edilen pikler tek kromatogram üzerinden görülebilmektedir. Herbir bileşenin derişimi 100.0 ng/mL dir.



Şekil 28. 100 ng/mL Se VI (Turuncu), Se IV (Kahverengi), Se (Methionine) (Yeşil), Se (Cystine) (Mavi) standartlarının ayrı ayrı 91 µL hacimde reverse phase kolona % 0.2 HFBA ve % 2.5 CH₃OH (pH 1.64) içeren hareketli faz yardımıyla enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

4 farklı selenyum türünün herbirinden 100.0 ng/mL içeren standardın % 0.2 HFBA ve % 2.5 CH₃OH (pH 1.64) içeren hareketli faz yardımıyla C₈ kolona enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyali Şekil 29' da görülmektedir.



Şekil 29. 100 ng/mL Se (Cystine), Se (Methionine), Se IV ve Se VI standartlarını içeren çözeltinin 9 µL hacimde reverse phase kolona % 0.2 HFBA ve % 2.5 CH₃OH (pH 1.64) içeren hareketli faz yardımıyla enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

Şekilde görüldüğü gibi selenomethionine ve selenocystine türleri inorganik selenyum türlerinden başarılı bir şekilde ayrılmışlardır. Selenomethionine türünün alıkonma süresi de çok büyük bir değerde elde edildiğinden bu tür için elde edilen pikte yayvanlaşma gözlemlenmiştir. Bu da ilerideki yumurta çalışmalarında bir engel oluşturabilir. Selenocystine türü inorganik selenyum türlerinden ayrılmasına rağmen elde edilen selenocystine sinyalinin yanında küçük de olsa bir omuz tespit edilmiştir. Kullanılan hareketli fazın pH değerinin küçük olmasından kaynaklanabilecek bu pik ile selenocystine sinyalinin genişliği yaklaşık olarak 110 saniye olarak tespit edilmiştir. İlerideki çalışmalarda bu pik genişliğinin bir engel teşkil edebileceğinden hareketli faz 4' ün uygun bir hareketli faz olmadığına karar verilmiştir.

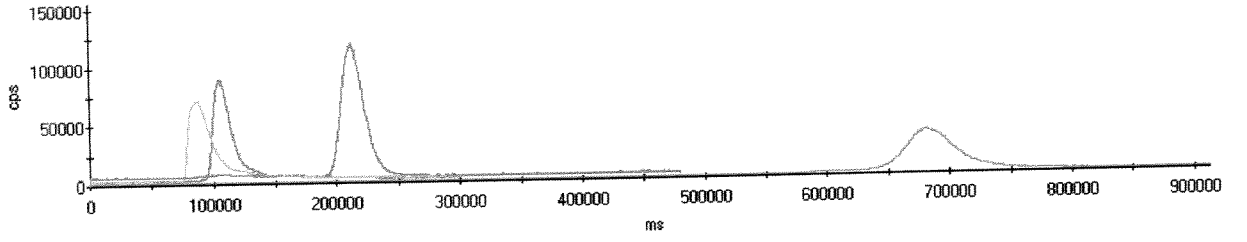
9. 2. 1. 5. Hareketli Faz 5

% 0.2 HFBA in hareketli faz olarak kullanıldığı sistemde elde edilen selenocystine pikinin yanında asitlikten kaynaklandığı düşünülen omuz şeklindeki küçük pikten ötürü daha düşük oranda HFBA içeren hareketli faz denenmiştir. Bu amaçla % 0.1 HFBA ve % 5 CH₃OH (pH 1.82) içeren çözelti hareketli faz olarak kullanılmıştır. Bu şartlar altında kullanılan parametreler Tablo 16' de özetlenmiştir.

Tablo 16. % 0.2 HFBA ve % 2.5 CH₃OH (pH 1.64) kullanılarak yapılan kromatografik ayırım şartları.

Parameter	Value
Kolon	Alltima C8
Tampon çözelti	% 0.1 HFBA % 5 CH ₃ OH (pH 1.82)
Akış hızı	1.0 mL/dakika
Örnek sarmalı	91.0 µL
Se tür derişimi	100.0 ng/mL

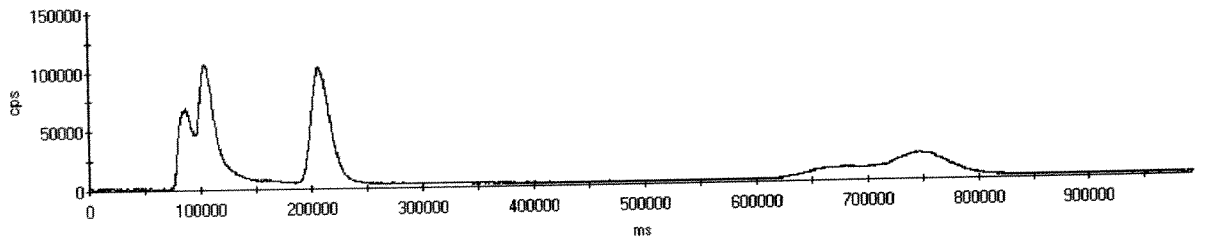
Şekil 30' da, 4 farklı selenyum türünün, 100 ng/mL lik derişimlerde ayrı ayrı sisteme enjeksiyonuyla elde edilen pikler tek kromatogram üzerinden görülebilmektedir.



Şekil 30. 100 ng/mL Se VI (Kahverengi), Se IV (Turuncu), Se (Methionine) (Mavi), Se (Cystine) (Yeşil) standartlarının ayrı ayrı 91 µL hacimde reverse phase kolona % 0.10 HFBA ve % 5.0 CH₃OH (pH 1.82) içeren hareketli faz yardımıyla enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

İnorganik selenyum türleri olan Se (IV) ve Se (VI) arasında meydana gelen kromatografi ayırım şimdiye kadar elde edilen kromatogramlar arasında en iyisi olarak bulunmuştur. Se (IV) için elde edilen pikin alıkonma süresi yaklaşık 85 saniye olarak gözlenirken Se (VI) için bu değer 110 saniye olarak bulunmuştur. C₈ kolonunda selenocystine türünün alıkonma süresi 225 saniye, selenomethionine türünün ise yaklaşık 680 saniye olarak bulunmuştur.

Selenyum türlerinin herbirinden 100.0 ng/mL içeren standardın % 0.1 HFBA ve % 5 CH₃OH (pH 1.82) içeren hareketli faz yardımıyla C₈ kolona enjeksiyonuyla elde edilen HPLC-ICP-MS kromatogramı Şekil 31' de görülmektedir.



Şekil 31. 100 ng/mL Se (Cystine), Se (Methionine), Se IV, Se VI standartlarını içeren çözeltinin 91 µL hacimde reverse phase kolona % 0.1 HFBA ve % 5 CH₃OH (pH 1.82) içeren hareketli faz yardımıyla enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

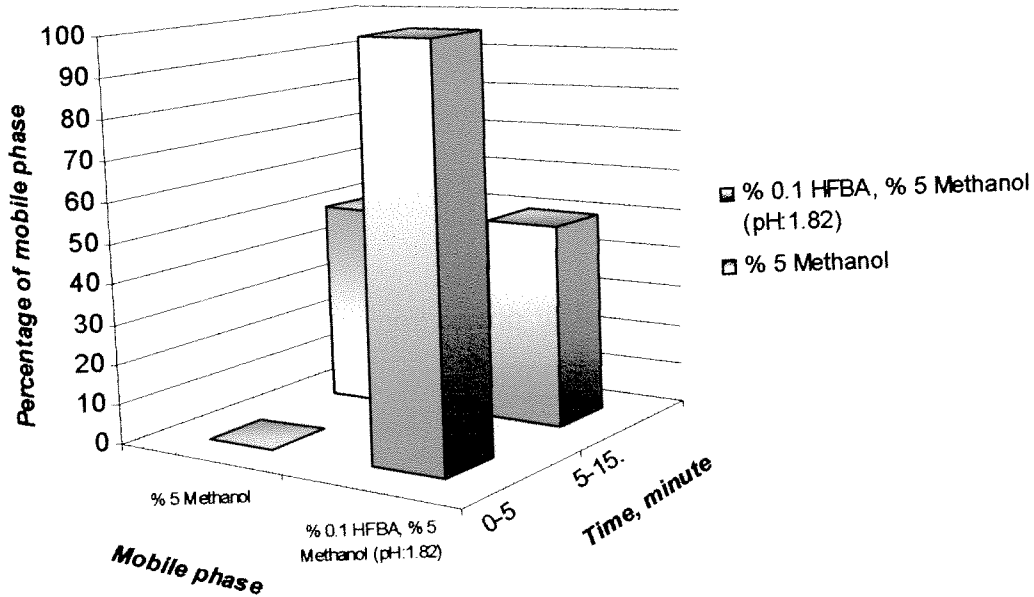
Şekil 31' de görüldüğü gibi Se (IV) ve Se (VI) türleri arasında az da olsa bir ayrım

gerçekleşmiştir. Düşük pH' da meydana gelen selenocystine pikindeki omuz bu HFBA derişiminde ortadan kaybolmuştur. Selenocystine türünün kolondaki alıkonma süresinin inorganik selenyum türlerine nazaran büyük oluşundan ötürü bu hareketli faz kullanımında selenocystine, inorganik selenyumlardan ayrılabilmiştir. Selenomethionine türünün kolondaki alıkonma süresinin büyük oluşundan ötürü elde edilen pikte yayvanlaşma tespit edilmiştir. Yayvanlaşma olmasına karşın, elde edilen sinyalin alanı (ICPS) aynı miktarda sisteme gönderilen diğer selenyum türlerinin alanlarına yakın bir değerde bulunmuştur.

9. 2. 2. Hareketli Faz Programı

9. 2. 2. 1. Program 1

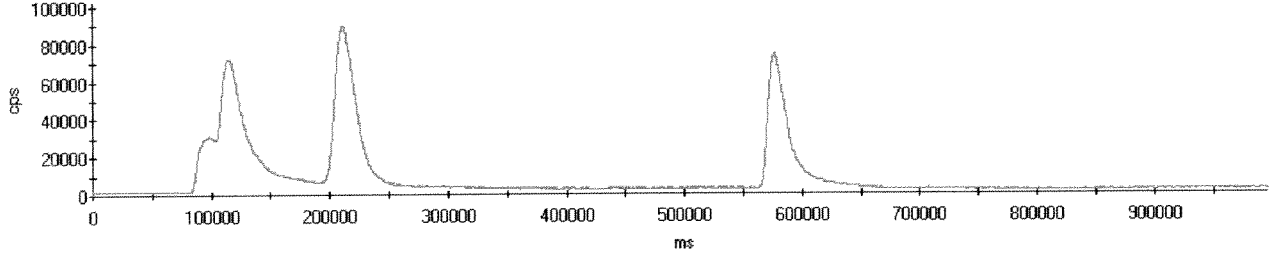
Hareketli faz olarak % 0.1 HFBA ve % 5.0 CH₃OH (pH 1.82) kullanıldığında elde edilen HPLC-ICP-MS kromatogramında görülen selenomethionine pikindeki yayvanlaşmayı ortadan kaldırmak için çözücü programı (Solvent Programing) uygulanmıştır. Uygulanan program Şekil 32' de görülmektedir.



Şekil 32. RP-HPLC de selenyum türlerini ayırmada kullanılan çözücü programı (1).

Bu sistemde, selenyum türlerinden 100.0 ng/mL içeren standart çözelti sisteme enjekte edildi ve ilk 5.0 dakika boyunca hareketli faz olarak % 0.1 HFBA ve % 5.0 CH₃OH (pH 1.82) sistemi

gönderilmiştir. 5.0 dakika dolduğunda, hareketli fazın bileşeni % 50 oranda % 0.1 HFBA ve % 5.0 CH₃OH (pH 1.82) ve % 50 oranda % 5.0 CH₃OH olacak şekilde değiştirilmiştir.

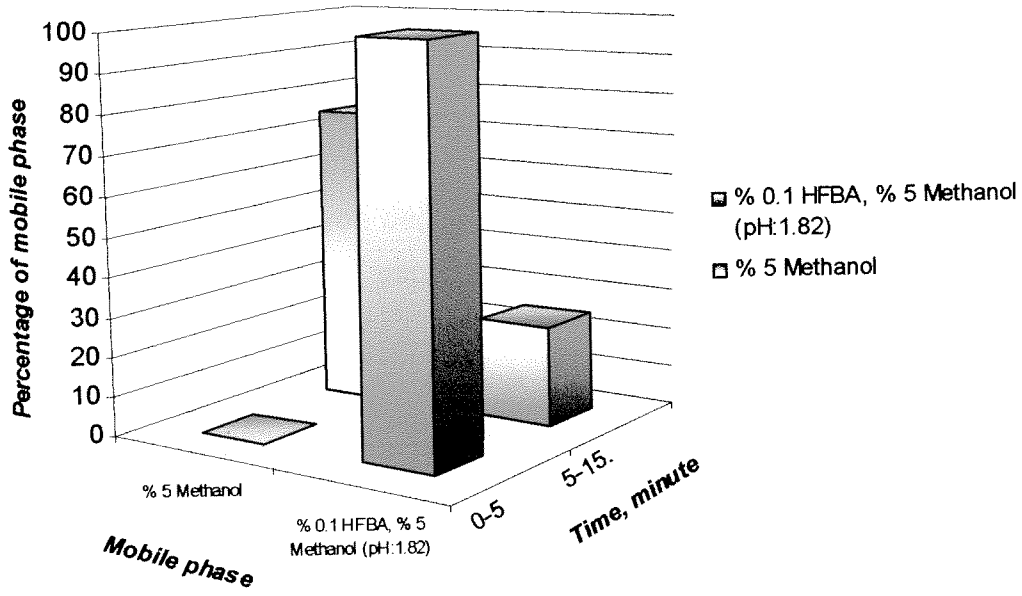


Şekil 33. 100 ng/mL Se (Cystine), Se (Methionine), Se IV, Se VI standartlarını içeren çözeltinin 91 µL hacimde reverse phase kolona Şekil 32' de belirtilen solvent programı kullanılarak enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

5.0 dakika sonunda sisteme gönderilen hareketli faz içerisinde HFBA derişinin düşük oluşundan ötürü selenomethionin türünün kolondaki alıkonma süresi azalmış ve pikte meydana gelen yayvanlaşmanın önüne önemli oranda geçilmiştir.

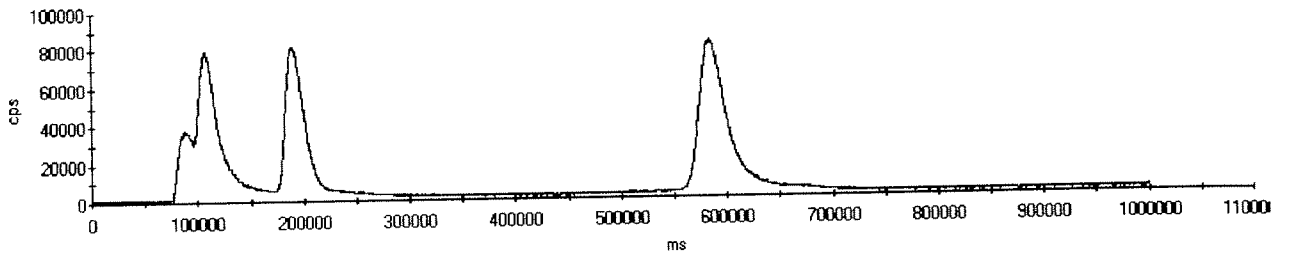
9. 2. 2. 2. Program 2

Program 1 kullanılarak selenomethionine türünün C₈ kolonunda alıkonma süresi yaklaşık 580 saniyeye indirilmiştir. Çözücü programında meydana gelen değişikliğin selenomethionine türünün kolondaki alıkonmasını ne derecede değiştirdiğini tespit etmek için ikinci bir çözücü programı uygulanmıştır. Bu amaçla selenyum türlerinden 100.0 ng/mL içeren standart çözelti sisteme enjekte edilmiş ve ilk 5.0 dakika boyunca hareketli faz olarak % 0.1 HFBA ve % 5.0 CH₃OH (pH 1.82) sisteme gönderilmiştir. 5.0 dakika sonunda, hareketli fazın bileşeni % 25 oranda % 0.1 HFBA ve % 5.0 CH₃OH (pH 1.82) ve % 75 oranda % 5.0 CH₃OH olacak şekilde değiştirilmiştir. Kullanılan programı özetleyen grafik Şekil 34' te gösterilmektedir.



Şekil 34. RP-HPLC de selenyum türlerini ayırmada kullanılan çözücü programı (2).

Program 2' nin uygulanmasıyla elde edilen HPLC-ICP-MS kromatogramı Şekil 35' te gösterilmektedir.



Şekil 35. 100 ng/mL Se (Cystine), Se (Methionine), Se IV, Se VI standartlarını içeren çözeltinin 91 µL hacimde reverse phase kolona Şekil 102' de belirtilen solvent programı kullanılarak enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

Şekil 35' te görüldüğü gibi program 1 ve program 2 kullanılarak elde edilen alıkonma sürelerinde belirgin bir değişiklik görülmemiştir.

9. 3. Katyon Değiştirmeli-HPLC-ICP-MS

Düşük molekül ağırlığına sahip selenyum türlerini birbirinden ayırmak için kullanılan yöntemlerden bir diğeri de katyon değiştirici kolon kullanmaktır. Literatürde sıklıkla kullanılan bu teknikte, selenyum türlerinin yapısında bulunan katyonik gruplar baz alınarak ayırım gerçekleştirilmeye çalışılmaktadır.¹³ Normal olarak katyon değiştirici kolon kullanılarak inorganik selenyum türleri, yapıların anyonik karakterinden ötürü birbirlerinden ayrılamazlar. Selenit ve selenat yapıları katyon değiştirici kolonda tutunmayıp hareketli fazın ICP-MS e varmasıyla ayna anda pik verirler. Bunun yanısıra, pH 3.0' da selenit (SeO_3^{2-}) yapısı protonlanır ve az da olsa katyon değiştirici kolonda alıkonulur. pH değeri 3 ün altına indikçe ortamdaki proton miktarından ötürü Se (IV)'ün katyon değiştirici kolondaki alıkonma süresi artar.¹⁴

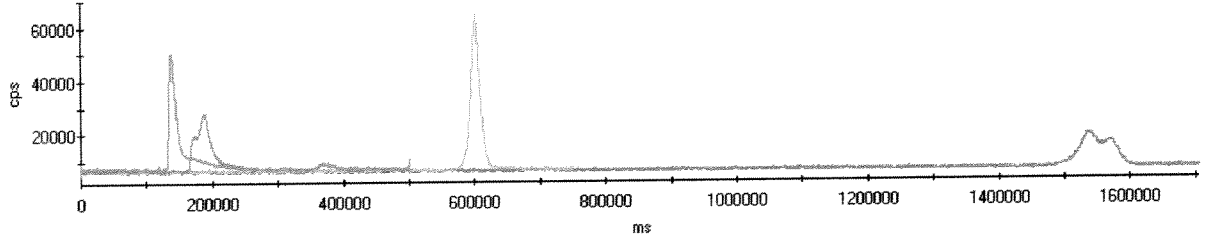
9. 3. 1. Hareketli Faz 1

Selenyum türlerini birbirinden ayırmak için katyon değiştirici kolonda hareketli faz olarak 10 mM piridin in pH 1.5 e ayarlanmış tamponu kullanılmıştır. Tablo 17' de katyon değiştirici kolon kullanarak selenyum türlerini ayırım parametreleri görölmektedir.

Tablo 17. 10 mM Piridin (pH 1.50) kullanılarak yapılan kromatografik ayırım şartları.

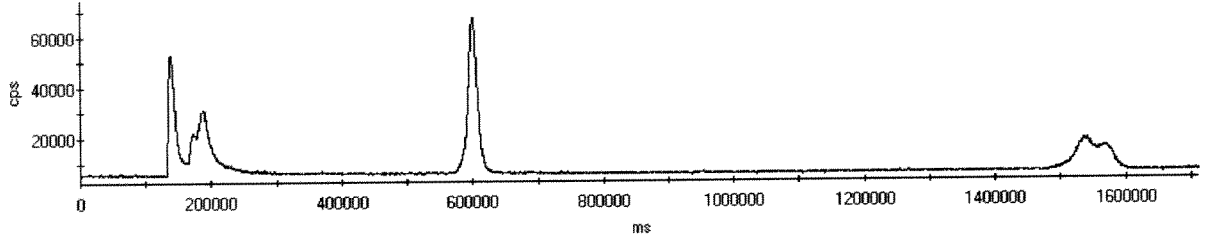
Parametre	Değer
Kolon	Spheris S5SCX katyon Değiştirici kolon
Hareketli Faz	10 mM Piridin (pH 1.50)
Akış Hızı	1.0 mL/dakika
Örnek Sarmalı	91.0 μL
Se Tür Derişimleri	100.0 ng/mL

4 farklı selenyum türü için elde edilen sinyallerin tek kromatogram üzerinde gösterimi Şekil 36' da görölmektedir.



Şekil 36. 100 ng/mL Se (VI) (Pembe), Se (IV) (Mavi), Se (Selenomethionine) (Sarı) ve Se (Selenocystine) (kahverengi) içeren standartların ayrı ayrı, 91 µL hacimde, pH 1.50' e tamponlanmış 10 mM piridin hareketli fazı yardımıyla katyon değiştirici kolona enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

Karışım içerisinde herbir selenyum standardından 100.0 ng/mL içeren çözeltinin katyon değiştirici kolona enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri Şekil 37' de görülmektedir.



Şekil 37. 100 ng/mL Se (IV), Se (VI), Se (Selenomethionine) ve Se (Selenocystine) içeren standart çözeltinin 91 µL hacimde, pH 1.50' e tamponlanmış 10 mM piridin hareketli fazı yardımıyla katyon değiştirici kolona enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

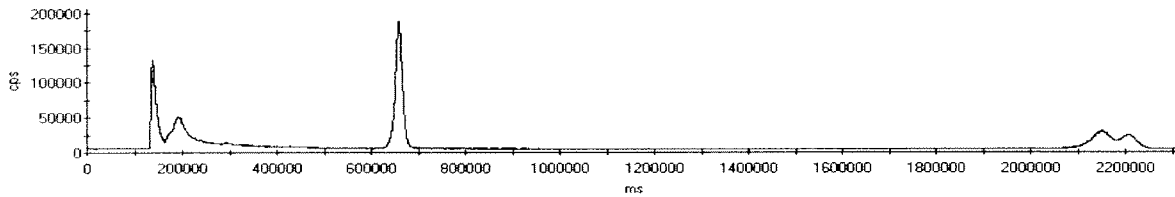
Şekil 37' de görüldüğü gibi 4 farklı selenyum türü katyon değiştirici kolonda birbirinden ayrılmaktadırlar. İnorganik selenyum türleri arasındaki ayırım çok iyi olmasa da Se (VI) türünün verdiği sinyal üzerine, Se (IV) türünün etkisi fazla değildir. Selenomethionine ve selenocystine türleri de hem birbirlerinden hem de inorganik türlerden iyi bir şekilde ayrılmışlardır.

9. 3. 2. Hareketli Faz 2

10 mM piridin (pH 1.50) kullanılarak elde edilen selenyum piklerinin ICPS değerleri düşük olduğundan hareketli faz içeriği değiştirilmiştir. Bu amaçla Tablo 18' de gösterilen parametreler kullanılmıştır.

Tablo 18. 10 mM Piridin (pH 1.50) kullanılarak yapılan kromatografik ayırım şartları.

Parametre	Değer
Kolon	Spheris S5SCX katyon Değiştirici kolon
Hareketli Faz	10 mM Piridin % 5 CH ₃ OH (pH 1.50)
Akış Hızı	1.0 mL/dakika
Örnek Sarmalı	91.0 µL
Se Tür Derişimleri	100.0 ng/mL



Şekil 38. 100 ng/mL Se (IV), Se (VI), Se (Selenomethionine) ve Se (Selenocystine) içeren standard çözeltinin 91 µL hacimde, pH 1.50' e tamponlanmış % 5.0 CH₃OH içeren 10 mM piridin hareketli fazı yardımıyla katyon değiştirici kolona enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

Şekil 38' de görüldüğü gibi katyon değiştirici kolonda kullanılan hareketli faza % 5.0 CH₃OH ilavesiyle piklerin şiddetinde yaklaşık 3 katlık bir artış gözlenmiştir. 10 mM piridin (pH 1.50) ve de 10 mM piridin + % 5.0 CH₃OH (pH 1.50) tamponlarının hareketli faz olarak kullanılmasıyla elde edilen piklerin ICPS değerlerinin karşılaştırılması Tablo 19' da gösterilmiştir. Sinyaldeki artışlar, hareketli faz içeriğine % 5.0 oranında metil alkol ilavesinin sisleştirme etkisini artırması sonucu olabilir.

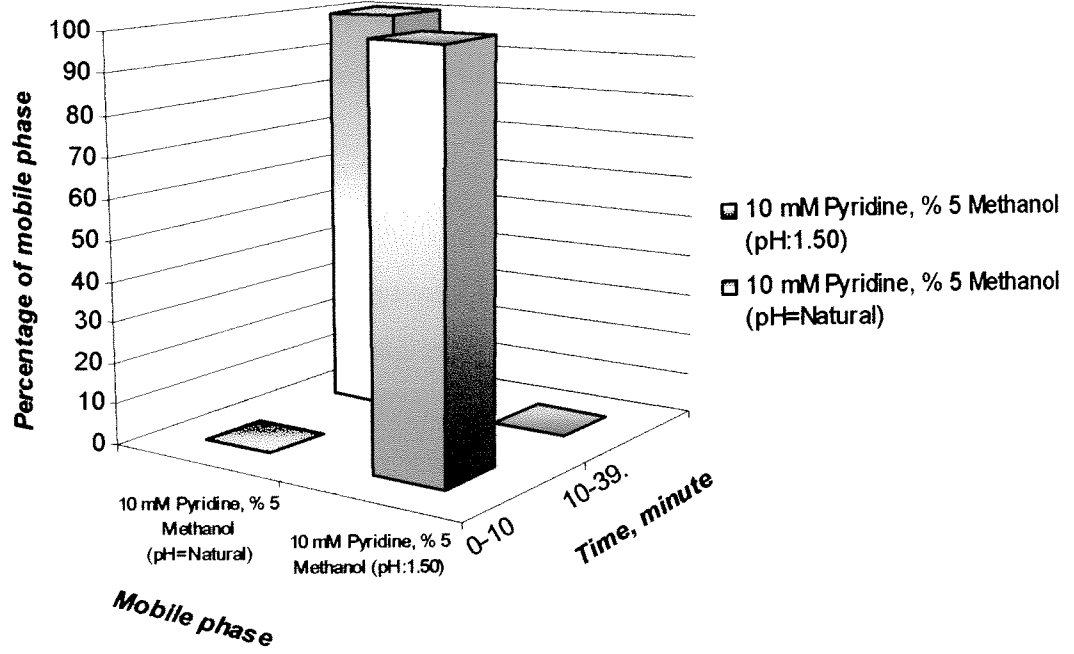
Tablo 19. Hareketli fazın farklı pH değerlerinde selenyum türlerinin ICPS değerleri.

	ICPS Sonuçları	
	10 mM Piridin (pH 1.50)	10 mM Piridin + % 5.0 CH ₃ OH (pH 1.50)
Se (IV)	7,640,112	21,195,693
Se (VI)	8,705,793	23,972,768
Selenomethionine	14,830,294	46,020,930
Selenocystine	10,093,399	30,697,433

Şekil 38' de görüldüğü gibi, inorganik selenyum türlerinin alıkonma sürelerinde belirgin bir değişiklik meydana gelmezken selenomethionine için alıkonma süresi, metil alkol kullanımıyla yaklaşık 6000 saniyeden 6600 saniyeye kaymıştır. Selenocystine için de alıkonma süresi 1550 saniyeden 2180 saniyeye kaymıştır.

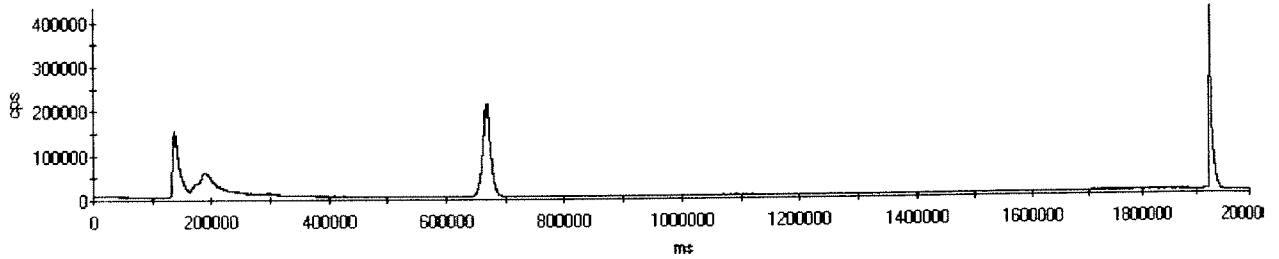
9. 3. 2. 1. Çözücü Programı 1

Şekil 99' da görüldüğü gibi selenocystine'nin katyon değiştirici kolondaki alıkonma süresinin çok yüksek oluşundan ötürü pikte bir yayvanlaşma gözlenmiştir. Yaklaşık 2180 saniyede elde edilen bu yayvan pikin genişliği ortalama 150 saniye'dir. Selenocystine türünün alıkonma süresinin azaltılması ile pikte meydana gelen genişlemeyi minimuma indirmek amaçlanmıştır. Bu amaçla Şekil 39' da görülen çözücü programı uygulanmıştır.



Şekil 39. Katyon Değiştirici-HPLC-ICP-MS de selenyum türlerini ayırmada kullanılan çözücü programı.

Şekil 39' da görülen çözücü programı uygulanarak elde edilen HPLC-ICP-MS kromatogramı Şekil 40' ta görülmektedir.



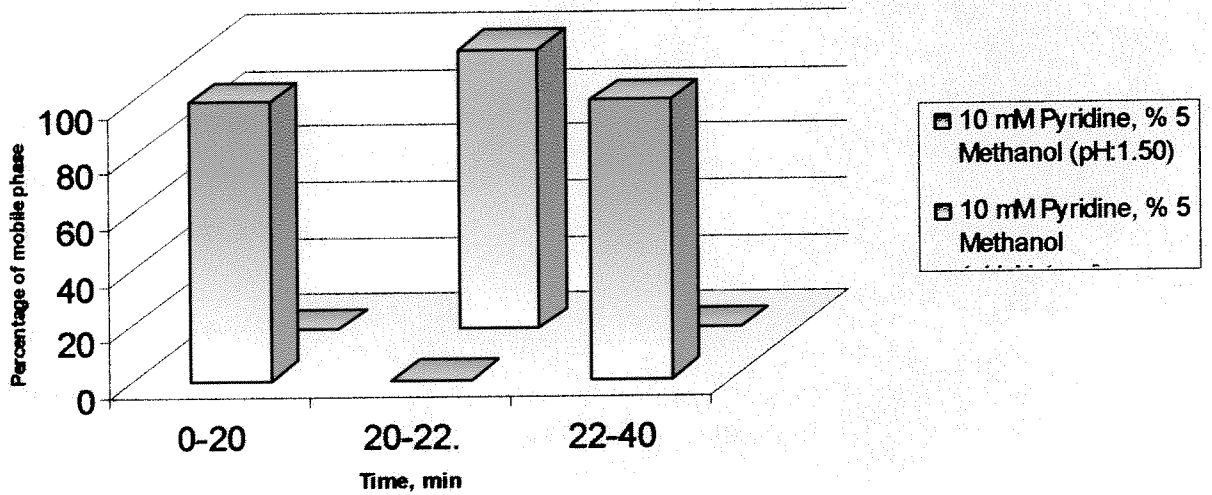
Şekil 40. 100 ng/mL Se (IV), Se (VI), Se (Selenomethionine) ve Se (Selenocystine) içeren standard çözeltinin 91 µL hacimde, katyon değiştirici kolona Şekil 39' da görülen çözücü programı kullanılarak enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

Şekil 40' ta görüldüğü gibi çözücü programı kullanılmasıyla selenocystine türünün alıkonma süresi 2180 saniyeden yaklaşık 1920 saniyeye kaymıştır. Alıkonma süresindeki bu azalmaya

ilave olarak selenocystine türünün verdiği ICP-MS sinyalinin yayvanlığında büyük ölçüde azalma pik şiddetinde artış gözlemlenmiştir. Bu türün verdiği ICPS değerinde herhangi bir değişiklik meydana gelmemiştir.

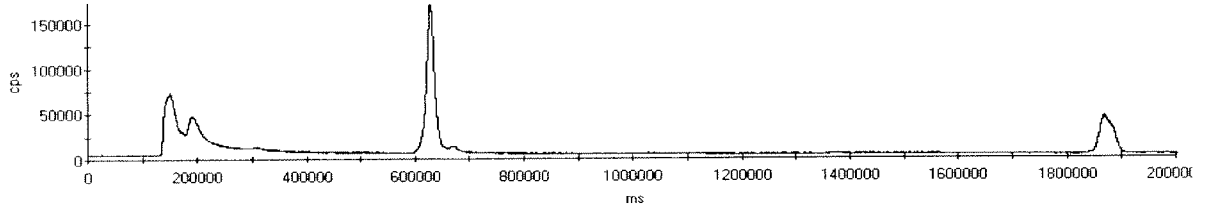
9. 3. 2. 2. Çözücü Programı 2

Çözücü programının kullanımıyla kolona farklı pH değerlerinde çözeltiler gönderilmiştir. İnorganik selenyum türlerinin birbirlerinden ayrılması için gerekli olan pH 1.50'ye tamponlanmış 10 mM piridin çözeltisiyle kolonun koşullandırılması gerekirken, çözücü programı ile farklı bir hareketli fazın kolondan geçirilmesiyle bu işlem kesintiye uğramaktadır. Kolonun bir sonraki ayırım gücü bir öncekine göre düşmektedir. Bunun yanısıra selenocystine türünün verdiği ICP-MS sinyalinin şeklindeki iyileştirme yapmak da gerekmektedir. % 5 CH₃OH içeren 10 mM piridin çözeltisi kullanılarak selenocystine pikindeki yayvanlaşma ve yarılanmanın giderilebileceği görülmektedir. Hem kolonun pH 1.50'ye tamponlanmış çözeltiyle doygunluğunu sağlamak hem de selenocystine pikindeki yayvanlaşma ve yarılanmayı minimize etmek amacıyla Şekil 41'de görülen çözücü programı uygulanmıştır.



Şekil 41. CE-HPLC-ICP-MS' de selenyum türlerini ayırmada kullanılan çözücü programı.

Şekil 41' de gösterilen çözücü programının kullanılmasıyla elde edilen HPLC-ICP-MS kromatogramı Şekil 42' de görülmektedir.



Şekil 42. 100 ng/mL Se (IV), Se (VI), Se (Selenomethionine) ve Se (Selenocystine) içeren standard çözeltinin 91 µL hacimde, katyon değiştirici kolona Şekil 41' de görülen çözücü programı kullanılarak enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

Şekil 42' de görüldüğü gibi, Şekil 41' de gösterilen çözücü programının kullanımıyla selenocystine türünün verdiği sinyalde bir iyileşme elde edilmiştir. Pikte daha önce gözlemlenen yarımla bertaraf edilmiştir.

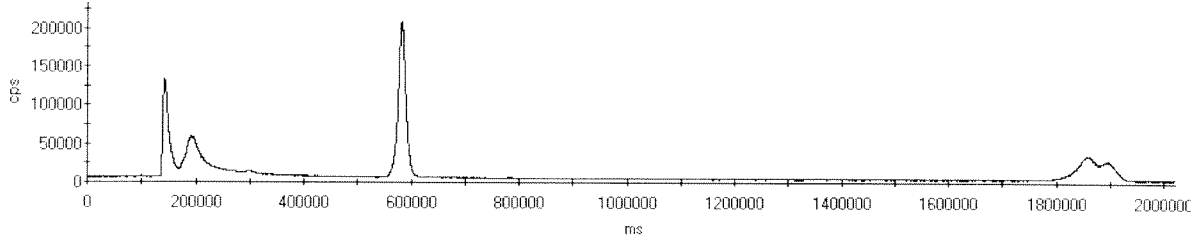
9. 3. 3. Hareketli Faz 3

Hareketli fazın pH değerini daha düşük asitlik seviyelerine ayarlayarak inorganik selenyum türleri birbirlerinden etkili bir biçimde ayrılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla Tablo 20' de görüldüğü gibi pH 1.30' a ayarlanmış 10 mM piridin hareketli faz olarak kullanılmıştır.

Tablo 20. 10 mM Piridin (pH 1.30) kullanılarak yapılan kromatografik ayırım şartları.

Parametre	Değer
Kolon	Spheris S5SCX katyon Değiştirici kolon
Hareketli Faz	10 mM Piridin % 5 CH ₃ OH (pH 1.30)
Akış Hızı	1.0 mL/dakika
Örnek Sarmalı	91.0 µL
Se Tür Değişimleri	100.0 ng/mL

Hareketli fazın asitlik değeriyle elde edilen ICP-MS kromatogramı Şekil 43' de görülmektedir.



Şekil 43. 100 ng/mL Se (IV), Se (VI), Se (Selenomethionine) ve Se (Selenocystine) içeren standard çözeltinin 91 µL hacimde, pH 1.30' a tamponlanmış % 5.0 CH₃OH içeren 10 mM piridin hareketli fazı yardımıyla katyon değıştirci kolona enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

Hareketli fazda düşük pH kullanımıyla inorganik selenyum türlerinde belirgin bir ayırım gözlenmemiştir. Se (IV) ve Se (VI) için her iki hareketli faz kullanılarak elde edilen alıkonma süreleri birbirine çok yakın olarak bulunmuştur. Selenomethionine için pH 1.50 de alıkonma süresi 660 saniye iken, hareketli fazın pH değeri 1.30 olarak ayarlandığında alıkonma süresi yaklaşık 590 saniyeye kaymıştır. Aynı durum selenocystine türünde de gözlenmiştir. Hareketli fazın pH değeriyle 1.50' den 1.30' a indirilmesiyle selenocystine in alıkonma süresi yaklaşık 2180 saniyeden 1850 saniyeye kaymıştır. Tüm türler için ICPS değerlerinde her iki pH ya ayarlanmış hareketli fazlarda belirgin bir değışiklik gözlenmemiştir.

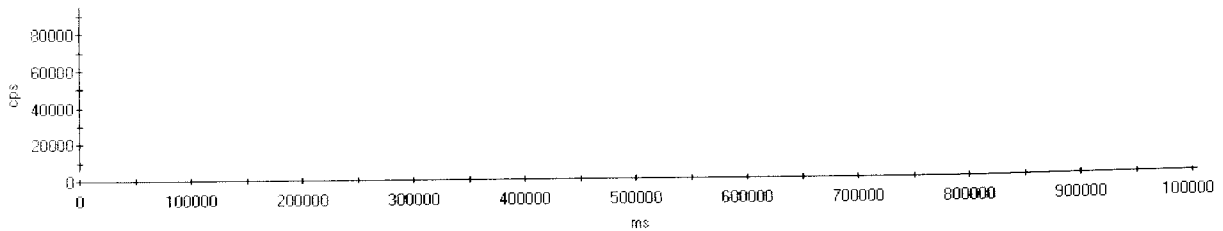
9. 3. 4. Hareketli Faz 4

Katyon değıştirci kolonda şimdiye kadar yapılan hareketli faz çalışmalarında selenocystine türünün alıkonma süresi 1750 saniyeden büyük bulunmuştur. Alıkonma süresinin bu denli büyük oluşundan ötürü ardışık ICP-MS sinyallerinde az da olsa değışiklikler meydana geldiği gözlenmiştir. Bu amaçla dördüncü hareketli faz olarak Tablo 21' de gösterilen hareketli faz kullanılmıştır.

Tablo 21. 10 mM Piridin (pH 1.25) kullanılarak yapılan kromatografik ayırım şartları.

Parametre	Değer
Kolon	Spheris S5SCX katyon Değiştirici kolon
Hareketli Faz	10 mM Piridin % 5 CH ₃ OH (pH 1.25)
Akış Hızı	1.0 mL/dakika
Örnek Sarmalı	91.0 µL
Se Tür Derişimleri	100.0 ng/mL

Se (VI) için katyon değiştirici kolonda alıkonma süresi yaklaşık 165 saniye, Se (IV) için 200 saniye, Selenomethionine için 460 saniye ve selenocystine için 815 saniye olarak bulunmuştur. Herbir selenyum türünün ayrı ayrı katyon değiştirici kolona gönderilmesiyle elde edilen ICP-MS sinyallerinin tek kromatogram üzerinden gösterimi Şekil 44' te görülebilmektedir.

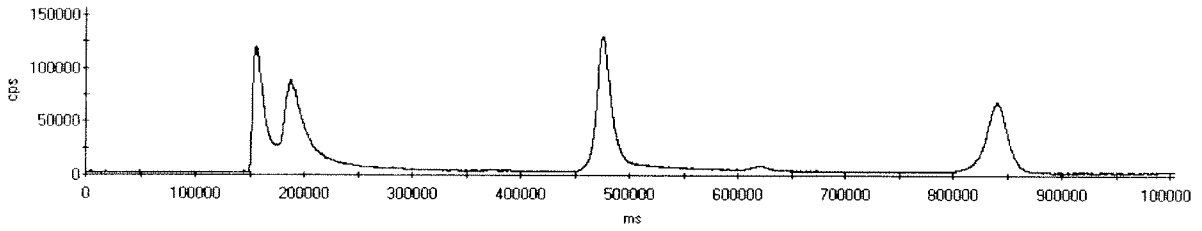


Şekil 44. 100 ng/mL Se (VI) (Yeşil), Se (IV) (Kahverengi), Se (Selenomethionine) (Mavi) ve Se (Selenocystine) (Sarı) içeren standartların ayrı ayrı, 91 µL hacimde, pH 1.50' e tamponlanmış 10 mM piridin hareketli fazı yardımıyla katyon değiştirici kolona enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

Şekil 44' te görüldüğü gibi, dört selenyum türünde Tablo 21' de belirtilen şartlar altında alıkonma süreleri arasındaki farktan ötürü birbirlerinden ayrılmıştır. Her ne kadar inorganik selenyum türleri arasındaki ayırım iyi görünmese de Se (IV) türünün verdiği sinyalin Se (VI) türünün verdiği sinyalin yaklaşık % 75 lik bir kısmını etkilemediği için bu şartlar altında pik alanlarından hareketle hesaplama yapılabileceğine karar verilmiştir. Hareketli fazın asitliğinin artmasıyla

inorganik türler arasındaki ayırım artmış olmasına rağmen katyon değiştirici kolonun dolgu maddesinin daha düşük pH değerlerinde deforme olma ihtimaline karşı hareketli fazın asitliği daha fazla artırılmamıştır.

Karışım içerisinde herbir selenyum standardından 100.0 ng/mL içeren çözeltinin katyon değiştirici kolona Tablo 21'de belirtilen şartlar altında enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri Şekil 45' te görülmektedir.



Şekil 45. 100 ng/mL Se (IV), Se (VI), Se (Selenomethionine) ve Se (Selenocystine) içeren standard çözeltinin 91 µL hacimde, pH 1.25' e tamponlanmış % 5.0 CH₃OH içeren 10 mM piridin hareketli fazı yardımıyla katyon değiştirici kolona enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

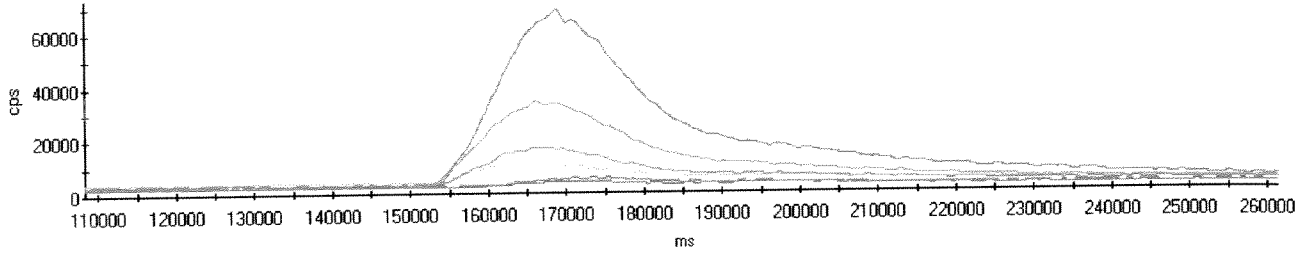
Şekil 45' te görüldüğü gibi 900 saniyelik bir zaman zarfında Se (VI), Se (IV), selenomethionine ve selenocystine türleri etkili bir biçimde birbirinden ayrılabilirler. Şimdiye kadar farklı kolonlar ve de herbir kolon için denenen farklı hareketli fazlar göz önüne alındığında, hem zaman hem de türlerin ayırımı bakımından en uygun şartların Tablo 21' de belirtilenler olduğuna karar verilmiştir.

9. 3. 5. Katyon Değiştirici-HPLC-ICP-MS Sisteminin Analitik Performansı

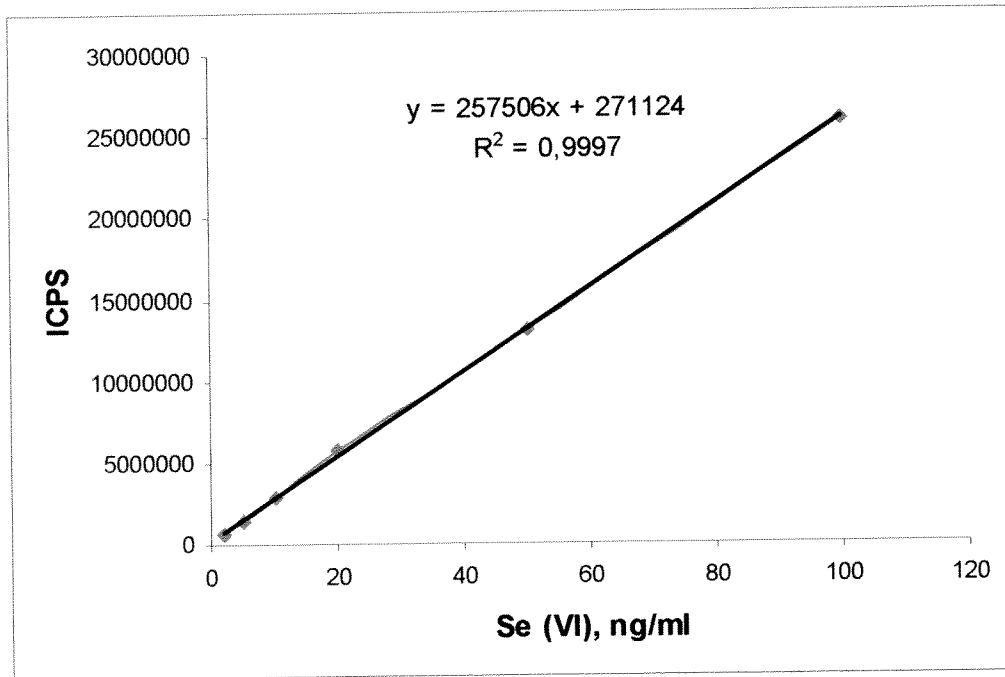
Katyon değiştirici kolon kullanılarak türlerin birbirlerinden ayrılması sağlandıktan sonra her bir selenyum türünün gözlenebilme sınırı (Limit of Detection, LOD) ve tayin sınırı (Limit of Quantitation, LOQ) değerleri araştırıldı. Bu amaçla herbir selenyum türünden 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0 ve 100.0 ng/mL lik standart çözeltiler hazırlanmış ve ayrı ayrı Katyon Değiştirici-HPLC-ICP-MS sistemine gönderilmiştir.

9. 3. 5. 1. Se (VI) Türü için Analitik Performans

Yukarıda belirtilen derişimlerde Se (VI) türünün sisteme gönderilmesiyle elde edilen sinyaller Şekil 46' da elde edilen kalibrasyon grafiği de Şekil 47' de görölmektedir.



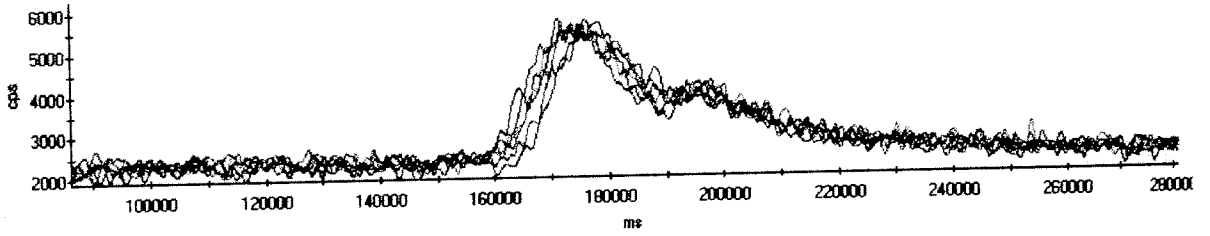
Şekil 46. 2.0 (Yeşil), 5.0 (Kahverengi), 10.0 (turuncu), 20.0 (Mavi), 50.0 (Pembe), 100.0 ng/mL (Eflatun) Se (VI) standardının Katyon Değiştirici-HPLC-ICP-MS sistemine Tablo 21' de belirtilen şartlar altında enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.



Şekil 47. Se (VI) için Katyon Değiştirici-HPLC-ICP-MS sisteminde elde edilen kalibrasyon grafiği.

Şekil 47' te göröldüğü gibi 2.0-100.0 ng/mL derişim aralığında doğrusal bir kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Se (VI) için LOD ve LOQ hesaplamalarında, 5.0 ng/mL Se (VI) derişiminin

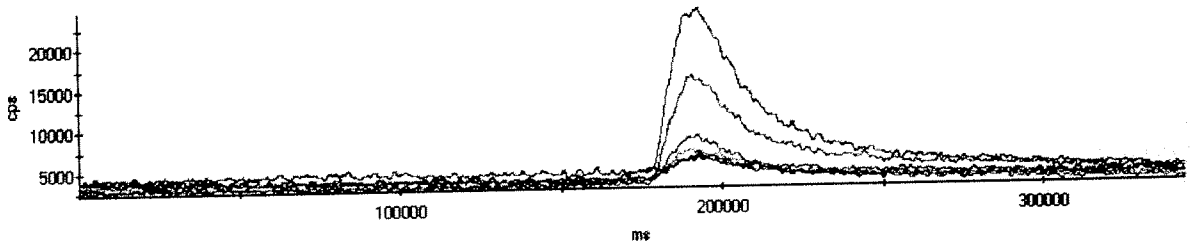
ardışık olarak sisteme gönderilmesiyle elde edilen piklerin ICPS değerlerinin standart sapması kullanılmıştır. Standart sapma hesaplamalarında kullanılan ICPS değerlerinin bulunmasında zaman ekseninde piklerin başladığı ve bittiği yerler esas alınmıştır. Standart sapma hesaplamalarında kullanılan sinyaller Şekil 48’ de görülmektedir.



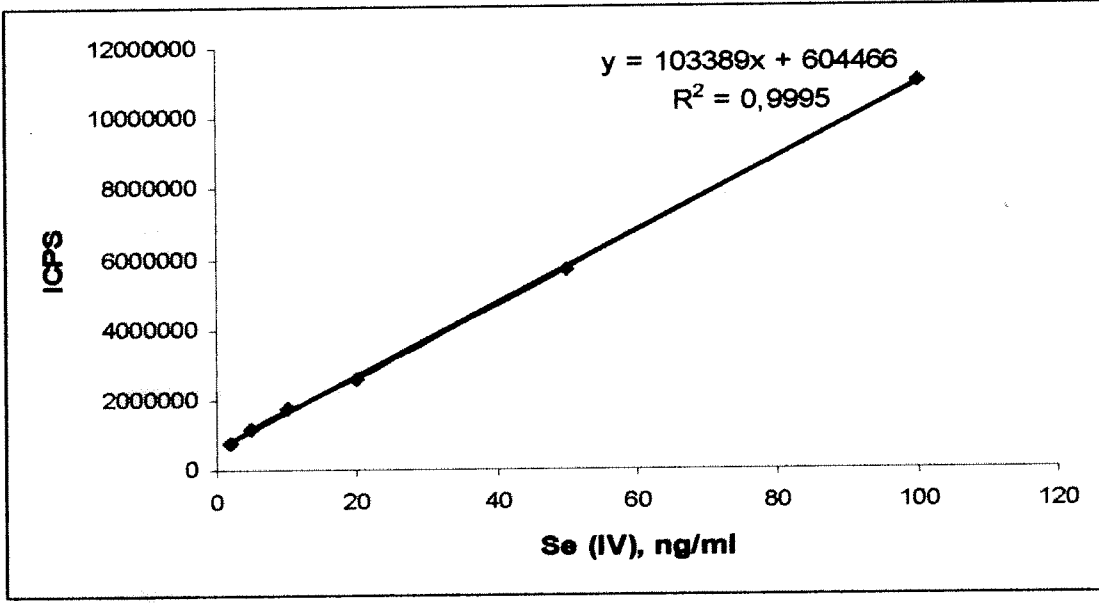
Şekil 48. 5.0 ng/mL derişimde Se (VI) için Katyon Değiştirici-HPLC-ICP-MS sisteminde elde edilen sinyaller.

9. 3. 5. 2. Se (IV) Türü için Analitik Performansı

Tablo 21’ de belirtilen şartlar kullanılarak Se (IV) standartlarından elde edilen sinyaller Şekil 49’ da, kalibrasyon grafiği de Şekil 50’ de görülmektedir.

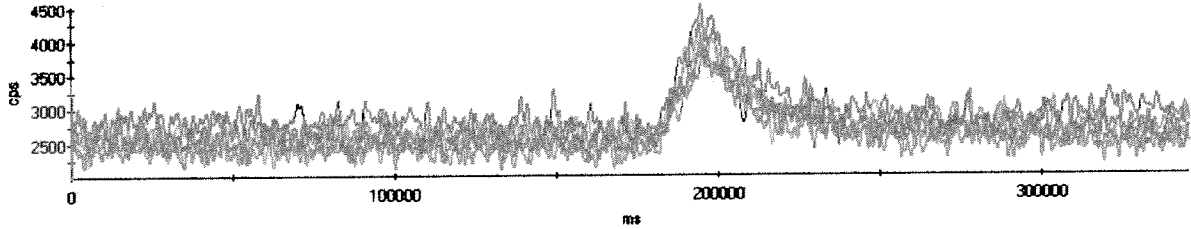


Şekil 49. 2.0 (Yeşil), 5.0 (Kahverengi), 10.0 (Turuncu), 20.0 (Mavi), 50.0 (Pembe), 100.0 ng/ml (Eflatun) derişimlerinde Se (IV) standardınının Katyon Değiştirici-HPLC-ICP-MS sistemine Tablo 21’ de belirtilen şartlar altında enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.



Şekil 50. Se (IV) için Katyon Değiştirici-HPLC-ICP-MS sisteminde elde edilen kalibrasyon grafiği.

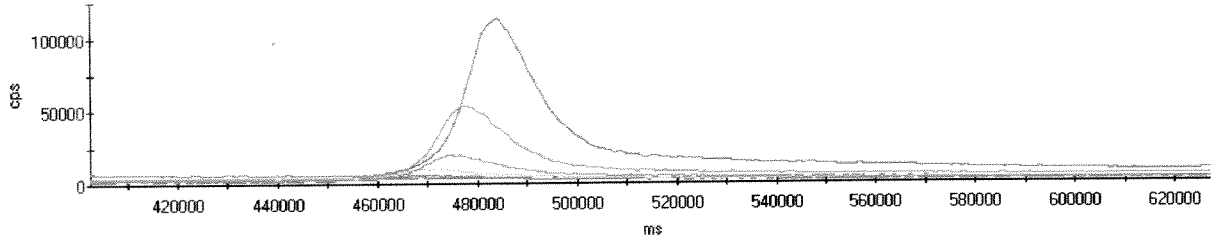
Se (VI) türünden elde edilen kalibrasyon grafiğine benzer olarak Se (IV) türü için de doğrusal bir kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. 5.0 ng/mL derişiminde Se (IV) türünün sisteme enjeksiyonuyla elde sinyaller Şekil 51' de görülmektedir.



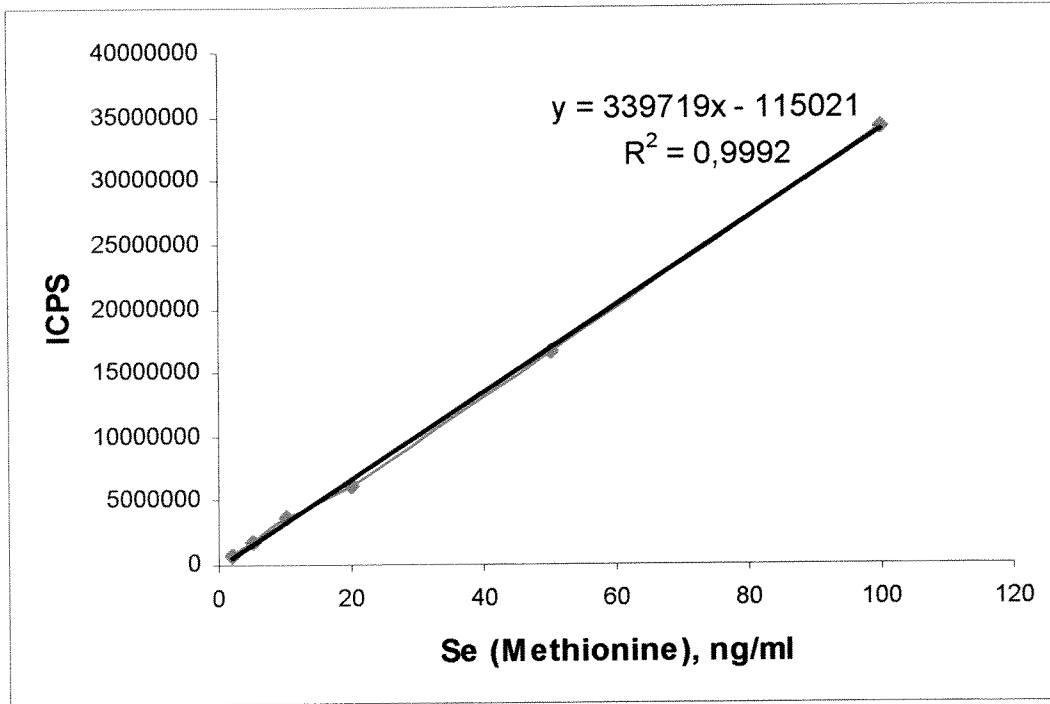
Şekil 51. 5.0 ng/mL derişimde Se (IV) için Katyon Değiştirici-HPLC-ICP-MS sisteminde elde edilen sinyaller.

9. 3. 5. 3. Selenomethionine Türü için Analitik Performans

Tablo 21' de belirtilen şartlar kullanılarak 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0 ve 100.0 Se (Methionine) standartlarından elde edilen sinyaller Şekil 52' de, kalibrasyon grafiği de Şekil 53' te görülmektedir.

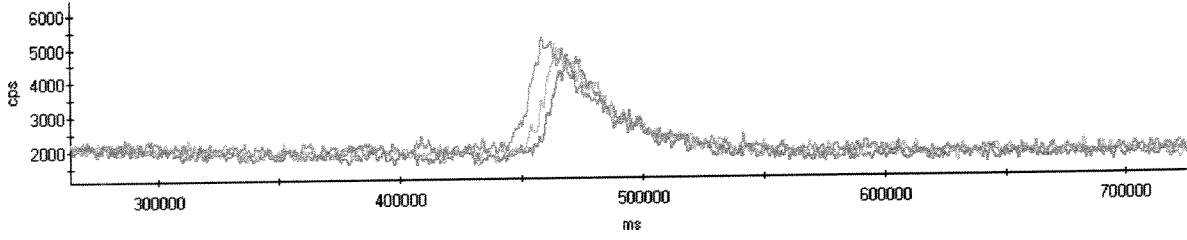


Şekil 52. 2.0 (Yeşil), 5.0 (Kahverengi), 10.0 (turuncu), 20.0 (Mavi), 50.0 (Pembe), 100.0 ng/mL (Eflatun) derişimlerinde Se (Methionine) standardının Katyon Değiştirici-HPLC-ICP-MS sistemine Tablo 21' de belirtilen şartlar altında enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.



Şekil 53. Se (Methionine) için Katyon Değiştirici-HPLC-ICP-MS sisteminde elde edilen kalibrasyon grafiği.

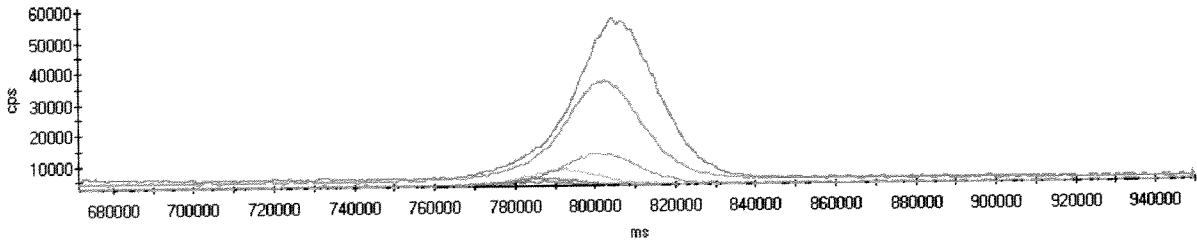
5.0 ng/mL derişimde Se (methionine) standardının sisteme gönderilmesiyle elde edilen sinyaller Şekil 54' te görölmektedir.



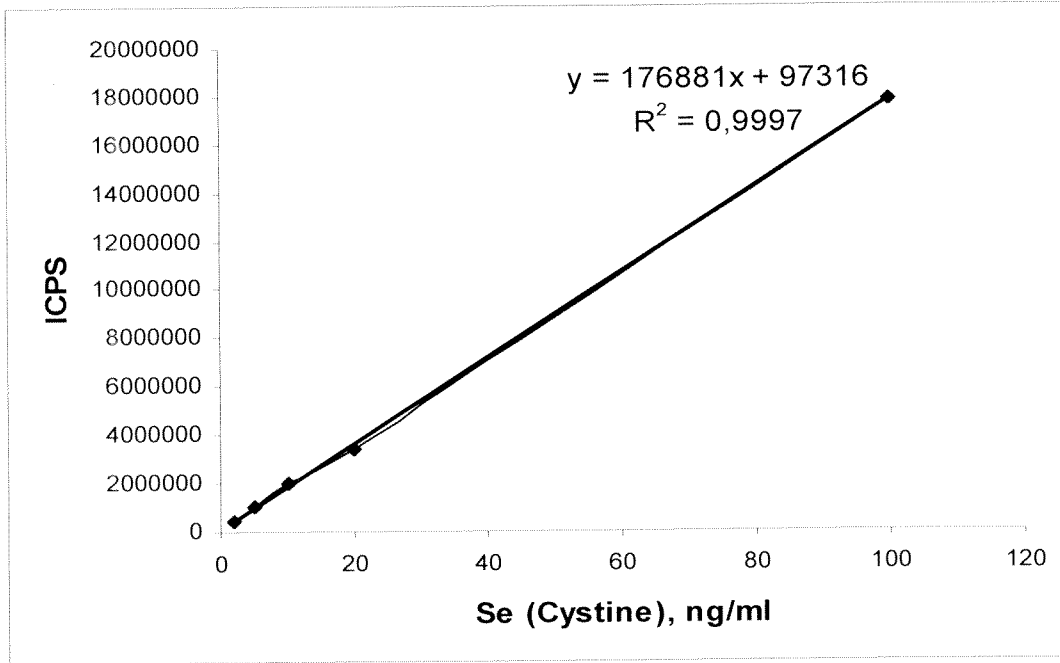
Şekil 54. 5.0 ng/mL derişimde Se (Methionine) için Katyon Değiştirici-HPLC-ICP-MS sisteminde elde edilen sinyaller.

9. 3. 5. 4. Selenocystine Türünün Analitik Performansı

Tablo 21' de belirtilen şartlar altında selenocystine kimyasalında hazırlanan farklı derişimlerde selenyum standartlarının CE-HPLC-ICP-MS sistemine enjeksiyonuyla elde edilen sinyaller Şekil 55' te, elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 56' da grlmektedir.



Şekil 55. 2.0 (Yeşil), 5.0 (Kahverengi), 10.0 (turuncu), 20.0 (Mavi), 50.0 (Pembe), 100.0 ng/mL (Eflatun) derişimlerinde Se (Cystine) standardının Katyon Değiştirici-HPLC-ICP-MS sistemine Tablo 21' de belirtilen şartlar altında enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.



Şekil 56. Se (Cystine) için Katyon Değiştirici-HPLC-ICP-MS sisteminde elde edilen kalibrasyon grafiği.

Şekil 48, 51 ve 54' te yer alan sinyallerin standart sapma değerleri hesaplanarak aşağıda belirtilen formül yardımıyla, herbir selenyum türü için LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır.

$$\text{LOD} = 3 \times \text{Standard sapma (5.0 ngml}^{-1} \text{ Se için)} / \text{eğim}$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{Standard sapma (5.0 ngml}^{-1} \text{ Se için)} / \text{eğim}$$

4 selenyum türü için hesaplanan LOD ve LOQ değerleri Tablo 22' de görülmektedir.

Tablo 22. Se (IV), Se (VI), Se (Methionine) ve Se (Cystine) türlerinin LOD ve LOQ değerleri.

	Se (IV)	Se (VI)	Se (Methionine)	Se (Cystine)
Gözlenebilme sınırı (LOD), ng/mL	0.35	0.38	0.41	0.44
Tayin sınırı (LOQ), ng/mL	1.16	1.28	1.36	1.47

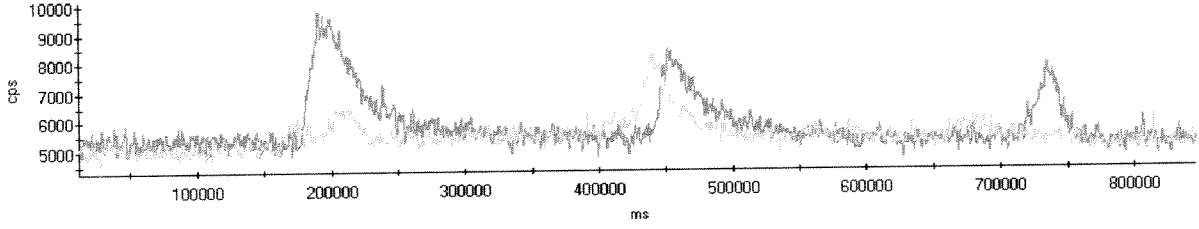
Tablo 22' de görüldüğü gibi, 4 selenyum türü için bulunan LOD ve LOQ değerleri birbirlerine çok yakındır.

10. Yumurta ve SRM numunelerinde Selenyum Türleendirmesi

Daha önceki ara raporlarda belirtilmiş olduğu gibi, teminindeki güçlük nedeniyle selenyum içeren yemlerle beslenen tavuk örneğinde çalışmak mümkün olmamıştır. Buna ek olarak kısıtlı bütçenin önemli bir bölümü proje dışı kaynaklarla temin edilen ICP-MS cihazının sarf giderleri için harcanmıştır; bu yüzden gereken tavuk üretme birimi için kaynak bulunamamıştır. Bununla birlikte, projenin asıl hedefi olan HPLC-ICP-MS analitik sistemiyle doğal örneklerde selenyum türlerinin ayrılması ve tayini başarıyla sonuçlandırılmıştır. Tavuk eti örnekleri yerine piyasada rahatlıkla bulunan ve bütçeye yük getirmeden temin edilebilen selenyum içerikli yumurta örneklerinde yukarıda adı geçen analizleri başarıyla uygulamak mümkün olmuştur. Bu bakımdan proje hedeflerine ulaşılmıştır.

Yukarıda belirtilen şartlar altında birbirinden ayrılan selenyum türlerinin derişimlerini bulmak amacıyla, selenyumca zengin olduğu düşünölen yumurta örneği marketten alınmıştır. Yumurta örneği Bölüm 3'de belirtildiği şekilde soğukta kurutularak toz haline getirilmiştir. Daha önce optimize edilen şartlar altında yaklaşık 200.0 mg toz haline getirilmiş yumurta örneği 4 saatlik zaman diliminde 10.0 mL Tris-HCl (pH 7.2) ortamında çalkalayıcı üzerinde yaklaşık 25.0 mg Protease XIV enzimi ile muamele ettirilmiştir. 4 saat sonunda ekstrakte edilen numuneler 4500 RPM de 15 dakika boyunca santrifüj edilip Millipore Stirred Ultrafiltration Cell düzeneğinde 10 KDa ultrafiltrasyon membranı (Filter Code: YM10 Dia: 63.5 mm) kullanılarak filtre edilmiştir.

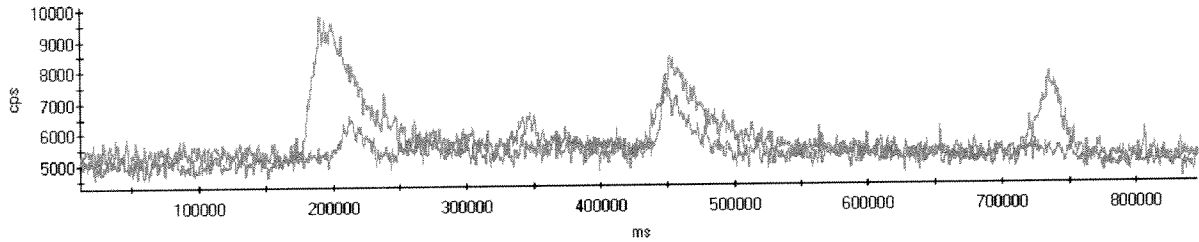
CE-HPLC-ICP-MS sisteminde standart çözeltiler kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafiği yardımıyla, yumurtada bulunan selenyum türlerinin miktarları hesaplanmıştır. Şekil 57' de herbir selenyum türünden 5.0 ng/mL içeren standart çözeltilerin (Kahverengi) ve yumurta ekstraktından elde edilen çözeltilerin kromatogramları görölmektedir.



Şekil 57. 5.0 ng/mL (Kahverengi) derişimlerinde Se (IV), Se (VI), Se (Methionine) ve Se (Cystine) içeren standart çözeltinin ve yumurta ekstraktından elde edilen çözeltinin (Turuncu) Katyon Değişirici-HPLC-ICP-MS sistemine Tablo 21' de belirtilen şartlar altında enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

Şekil 57' de görüldüğü gibi yumurtadan elde edilen ekstraksiyon çözeltisinde selenomethionine derişimi diğer türlere göre daha yüksektir.

Yumurta numunesine uygulanan ekstraksiyon işlemi, elimizde bulunan 1566b Oyster Tissue SRM örneğine de uygulanmış ve Şekil 58' de gösterilen kromatogram elde edilmiştir.



Şekil 58. 5.0 ng/mL (Kahverengi) derişimlerinde Se (IV), Se (VI), Se (Methionine) ve Se (Cystine) içeren standart çözeltinin ve 1566b Oyster Tissue ekstraktından elde edilen çözeltinin (Yeşil) Katyon Değişirici-HPLC-ICP-MS sistemine Tablo 21' de belirtilen şartlar altında enjeksiyonuyla elde edilen ICP-MS sinyalleri.

Şekil 58' de görüldüğü gibi 1566b Oyster Tissue numunesinde de selenomethionine derişimi belirgin bir şekilde diğer türlere göre yüksek bulunmuştur. Yaklaşık 350 saniye alıkonma süresine sahip olan ve elimizde standardı mevcut olmayan bir selenyum sinyali de

gözlenmiştir. Katyon değiştirici kolonun uzun süreli kullanımıyla beraber inorganik selenyum türleri arasındaki ayırımın gittikçe azaldığı ve bu kolon yardımıyla bu türlerin etkili bir biçimde ayırlamayacağına ve kantitatif tayin yapılamayacağına karar verilmiştir. Şekil 57 ve 58' deki kromatogramlardada görüldüğü gibi inorganik selenyum türlerinin pik şiddetleri düşüktür. Se (Methionine) ve Se (Cystine) türlerinin yumurta ve 1566b Oyster Tissue SRM numunelerinde bulunan miktarları Tablo 23' de görülmektedir.

Tablo 23. Se (Methionine) ve Se (Cystine) türlerinin yumurta ve 1566b Oyster Tissue SRM numunelerinde tespit edilen miktarları..

Örnek	Se (Methionine), ng/g (Kuru örnekte)	Se (Cystine) ng/g (Kuru örnekte)
Yumurta	271.3	< 21.6
1566b Oyster Tissue	166.2	< 20.2

11. Kaynaklar

1. Patterson E. L., Milstrey R. and Stokstad E.L.R., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, **95**, 1957, 617.
2. Kot A. and Namiesnik J., *Trends in Anal. Chem.*, **19**, 2000, 69.
3. Zheng J., Ohata M., Furuta N. and Kosmus W., *J.Chromatogr. A*, **874**, 2000, 55.
4. Merchante-Gayon J. M., Gonzales J. M., Fernandez M. L., Blanc E. and Sanz-Medel A., *Fresen. J. Anal. Chem.*, **355**, 1996, 615.
5. Kotrebai M., Tyson J. F., Block E. and Uden P. C., *J. Chromatogr. A*, **866**, 2000, 51.
6. Claudia A., Leon P. d., Montes-Bayon M. and Caruso J. A., *J. Chromatogr. A*, **974**, 2002, 1.
7. Vonderheide A. P., Wrobel K., Kannamkumarath S. S., B'Hymer C., Montes-Bayón M, Leon P. d. and Caruso J. A., *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2002, 5722.
8. Kotrebai M., Birringer M., Tyson J. F., Block E. and Uden PC, *Analyst*, **125**, 2000, 71.
9. Ochsenkuhn-Petropoulou M., Michalke B., Kavouras D. and Schramel P., *Anal. Chim. Acta*, **478**, 2003, 219.
10. Stefanka Z., Ipolyi I., Dernovics M. and Fodor P., *Talanta*, **55**, 2001, 437–447.
11. Moreno P., Quijano M. A., Gutierrez A. M., Perez-Conde M. C. and Camara C., *J. Anal. At. Spectrom.*, **16**, 2001, 1044.
12. Cankur O., Yathavakilla S. K. V. and Caruso J. A., *Talanta*, **70**, 2006, 784.

13. Larsen E. H., Hansen M., Fan T. and Vahl M., *J. Anal. At. Spectrom.*, **16**, 2001, 1403.
14. Goessler W., Kuehnel D. T., Schlagenhafen C., Kalcher K., Abegaz M. and Irgolic K. J., *J. Chromatogr. A*, **789**, 1997, 233.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: TBAG-2369(103T157)
Proje Başlığı: Selenyumun Tavuk Etinde Toplam Derişim ve Türlerinin Belirlenmesi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof.Dr. Mürvet VOLKAN, Prof. Dr. O. Yavuz ATAMAN, Doç. Dr. Nusret ERTAŞ, Doç. Dr. Mustafa EREN,
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi Adres: ODTÜ, Kimya Bölümü 06531/Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.04.2004-01.04.2007
Öz (en çok 70 kelime) Selenyum eser elementinin insan beslenmesindeki önemi uzun süredir bilinmektedir. Düşük derişimlerde selenyum içeren besinlerle vücut için gerekli selenyum düzeyinin (200 µg/gün) sağlanması mümkün değildir. İnsanların tükettiği besinler içinde selenyum açısından en zengin olanları et, yumurta, balık ve tahıllardır. Selenyumca zenginleştirilmiş besinlerdeki selenyum derişimlerinin tayini hem beslenme açısından hem de insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada Türkiye'de ve diğer ülkelerde bolca tüketilen selenyumca zenginleştirilmiş yumurta örneğinde selenyum türlendirmesi yapmak için bir analitik yöntem geliştirilmiştir. Enzimatik ekstraksiyon yardımıyla selenyum türleri numuneden yapısı bozulmadan ekstrakte edildikten sonra, HPLC yardımıyla birbirinden ayrılıp ICP-MS kullanılarak tayin edilmişlerdir. Geliştirilen yöntemle, en sık görülen Se(IV), Se(VI), selenomethionine ve selenocystine türlerini ayırıp tayin etmek mümkün olmuştur.
Anahtar Kelimeler: Selenyum, yumurta, türlendirme, enzimatik ekstraksiyon, HPLC-ICP-MS.
Projeden Yapılan Yayınlar: