Arsenik ve Selenyumun Eşzamanlı Türlendirilmesi için Analitik Yöntemler Geliştirilmesi ve Bitkilerde Arsenik-Selenyum Etkileşimi için Kullanılması

Program Kodu: 1001

Proje No: 112T790

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Gülay ERTAŞ

Danışman(lar):

Prof. Dr. O. Yavuz ATAMAN

Prof. Dr. Süleyman TABAN

Bursiyer(ler):

Başak DÜGENCİLİ

Pınar MERCAN

Emrah YILDIRIM

MART 2015

ANKARA

ÖNSÖZ

Tübitak 1001 - Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından 112T790 kodu ile desteklenen bu çalışmada beş selenyum, Se(IV), Se(VI), selenometiyonin, selenosistin ve selenometil selenosisteyin; ve iki arsenik, As(III) ve As(V), türünün eşzamanlı tayinini yapabilmek için duyarlı bir HPLC-ICP-MS metodu geliştirilmiş ve arsenik ve selenyum ile beslenen yeşil soğan bitkisinde anılan elementlerin bitkiye alınışları açısından olası sinerjik ve antagonistik etkileri gözlenmiş ve sonuçlar incelenmiştir. Proje sonuçları arsenik ve selenyumun yeşil soğan bitkisi içerisinde etkileşim halinde olduğunu ve birbirlerinin alınımını, taşınımını ve depolanmasını etkilediğini göstermiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ii
İÇİNDEKİLER iii
TABLO LİSTESİ v
ŞEKİL LİSTESİ vi
ÖZET ix
ABSTRACT x
1. GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti 1
2. GEREÇ VE YÖNTEM 5
2.1 Kimyasallar ve Araçlar 5
2.2 Cihazlar 6
2.2.1 Endüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS) 6
2.2.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) 7
2.3 Prosedürler 8
2.3.1 Kontrollü Bitki Yetiştirme 8
2.3.2 Örneklerin Analize Hazırlanması 10
2.3.3 Toplam Selenyum ve Arsenik Tayini 10
2.3.4 Katı-sıvı ve Enzim Yardımlı Özütleme İşlemleri 11
3. BULGULAR VE TARTIŞMA 12
3.1 ICP-MS Cihazının Optimizasyonu 12
3.2 Bitki Büyümesinde Fiziksel Gözlemler 13
3.3 Toplam As ve Se Tayini 16
3.4 Arsenik Dağılımı 18
3.5 Selenyum Dağılımı 22
3.6 Özütleme İşlemi Optimizasyonu 26
3.7 HPLC-ICP-MS Optimizasyonları 29
3.7.1 İyon Eşleştirici HPLC 29
3.7.2 Anyon Değiştirici HPLC 31
3.8 Analitik Performans 38
3.9 Soğan Örneklerinin Türlendirme Çalışmaları 43
3.9.1 Arsenik ile Besleme 43
3.9.2 Selenyum ile Besleme 45
3.9.3 Se(IV) ve As(III) ile Besleme 48
3.9.4 Se(IV) ve As(V) ile Besleme 50
3.9.5 Se(VI) ve As(III) ile Besleme 52
3.9.6 Se(VI) ve As(V) ile Besleme 54

4. SONUÇLAR 56
KAYNAKLAR.....60

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Hoagland besleme çözeltisi içeriği 6
Tablo 2. HPLC çalışma koşulları. 7
Tablo 3. Hoagland çözeltisindeki elementlerin son derişimi*. 8
Tablo 4. Deney kaplarına eklenen selenyum ve/veya arsenik türleri. 9
Tablo 5. Mikrodalga sıcaklık programı. 11
Tablo 6. ICP-MS cihazının optimize edilmiş parametreleri. 12
Tablo 7. 10,0 mg/L As ve/veya Se eklenmiş bitkilerin kök ve yapraklarının kütleleri. 13
Tablo 8. 5,0 mg/L As ve/veya Se eklenmiş bitkilerin kök ve yapraklarının kütleleri. 14
Tablo 9. Bitkilerin kök, gövde ve yapraklarındaki nem miktarı. 16
Tablo 10. ICP-MS analitik performans değerleri. 18
Tablo 11. Metod validasyonu. 18
Tablo 12. Bitkilerin kök, gövde ve yapraklarında depolanan türlerine göre toplam As derişimleri. 19
Tablo 13. Bitki kök, gövde ve yaprak bölümündeki toplam selenyum derişimi. 23
Tablo 14. Farklı çözgenler için As ve Se özütleme verimleri. 26
Tablo 15. Farklı enzimler için Se özütleme verimi. 28
Tablo 16. İyon eşleştirici sıvı kromatografi optimizasyon parametreleri. 30
Tablo 17. Birinci taşıyıcı fazın çalışma şartları, AE-HPLC. 31
Tablo 18. İkinci taşıyıcı fazın çalışma şartları. 33
Tablo 19. AE-HPLC-ICP-MS sistemiyle elde edilmiş arsenik ve selenyum türlerine ait gözlenebilme ve tayin sınırları. 43
Tablo 20. Hasat zamanında besleme çözeltisinin pH değerleri. 45

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. HPLC-ICP-MS EVISA, 2015 referansıdan uyarlanmıştır. 4
Şekil 2. Yetiştirilen bitkilerin kök, gövde ve yaprak bölümleri.....10
Şekil 3 Kontrol bitkisi (a), 10 mg/L As(III) ve 10 mg/L Se(IV) ile beslenen bitki (b) 14
Şekil 4. Bitkilerin kök, gövde ve yapraklarının yaş kütleleri. 15
Şekil 5. ICP-MS ile arsenik tayini için kalibrasyon grafiği ve denklemi. 17
Şekil 6. ICP-MS ile selenyum tayini için kalibrasyon grafiği ve denklemi.....17
Şekil 7. Bitkilerin kök, gövde ve yapraklarında toplam As derişimi. 20
Şekil 8. Arseniğin bitkinin kök, gövde ve yaprak bölümlerindeki yüzdece kütle dağılımı.....20
Şekil 9. Başlangıç değeri 1000 µg/L olan besleme çözeltisinde kalan As derişimleri. 22
Şekil 10. 1,0 mg/L As ve/veya Se ile beslenen bitkilerde kök, gövde ve yapraktaki Se derişimleri.....24
Şekil 11. Kök, gövde ve yapraktaki kütlece yüzde Se dağılımı.....25
Şekil 12. Başlangıç değeri 1000 µg/L olan besleme çözeltisinde kalan Se derişimleri. 25
Şekil 13. Örneklerin fosfat tampon ile proteaz type XIV enzim varlığında ve enzim olmadan alınan kromatogramları.....27
Şekil 14. 10, 30, 50 ve 80 mg enzim kullanılarak özütlenmiş örneklerin AE-HPLC-ICP-MS kromatogramları. 29
Şekil 15. Her tür için 200 ng/mL Se içeren selenyum standart çözeltisi ile pH 7,0'da %5 (h/h) metanol içeren 50 mM amonyum fosfat tampon çözeltisi kullanıldığında elde edilen AE-HPLC-ICP-MS kromatogramı. 32
Şekil 16. Her tür için 200 ng/mL Se içeren selenyum standart özeltisi ile pH 5,0'da %5 (h/h) metanol içeren 50 mM amonyum fosfat tampon çözeltisi kullanıldığında elde edilen AE-HPLC-ICP-MS kromatogramı. 32
Şekil 17. Her tür için 200 ng/mL Se içeren selenyum standart çözeltisi ile pH 6,5'da amonyum sitrat tampon çözeltisi kullanılarak elde edilen Se(IV) ve selenometil selenosistein türlerinin AE-HPLC-ICP-MS kromatogramları. 33
Şekil 18. Her tür için 200 ng/mL Se içeren selenyum standart çözeltisi ile pH 5,5'de, 5 mM amonyum sitrat tampon çözeltisi kullanıldığında elde edilen AE-HPLC-ICP-MS kromatogramı. 34
Şekil 19. Her tür için 200 ng/mL Se içeren selenyum standart çözeltisi ile pH 5,0'da 5 mM amonyum sitrat tampon çözeltisi kullanıldığında elde edilen AE-HPLC-ICP-MS kromatogramı. 34

Şekil 20. Her tür için 200 ng/mL As içeren arsenik standart çözeltisi ile pH 5,0'da 5 mM amonyum sitrat tampon çözeltisi kullanıldığında elde edilen AE-HPLC-ICP-MS kromatogramı. 35
Şekil 21. pH'ın selenyum türlerinin alıkonma süreleri üzerine etkisi. 5 mM amonyum sitrat tampon çözeltisi, Hamilton PRP-X100 kuvvetli anyon değiştirici kolon ile birlikte kullanıldı. ..36
Şekil 22. pH'ın As(III) ve As(V) türlerinin alıkonma süreleri üzerine etkisi. 5 mM amonyum sitrat tampon çözeltisi, Hamilton PRP-X100 kuvvetli anyon değiştirici kolon ile birlikte kullanıldı. 36
Şekil 23. Se türlerinin ve sitrik asitin pH 0-14 aralığında iyon dağılımı. Çalışma aralığı yeşil çizgilerle gösterilmiştir (Stadlober vd., 2001). 37
Şekil 24. 200 µg/L, 100 µg/L, 50 µg/L ve 20 µg/L derişimlerde Se türleri içeren karışım standartların üst üste çakıştırılmış AE-HPLC-ICP-MS kromatogramları. 38
Şekil 25. 200 µg/L, 100 µg/L, 50 µg/L ve 20 µg/L As türleri içeren karışım standartların üst üste çakıştırılmış AE-HPLC-ICP-MS kromatogramları. 39
Şekil 26. Se(IV) türüne ait AE-HPLC-ICP-MS için kalibrasyon doğrusu. 39
Şekil 27. Se(VI) türüne ait AE-HPLC-ICP-MS için kalibrasyon doğrusu. 40
Şekil 28. Selenometiyonin türüne ait AE-HPLC-ICP-MS için kalibrasyon doğrusu. 40
Şekil 29. Selenosistin türüne ait AE-HPLC-ICP-MS için kalibrasyon doğrusu. 41
Şekil 30. Selenometil selenosistein türüne ait AE-HPLC-ICP-MS için kalibrasyon doğrusu. .41
Şekil 31. Optimum AE-HPLC-ICP-MS koşullarında As(III) türüne ait kalibrasyon doğrusu....42
Şekil 32. Optimum AE-HPLC-ICP-MS koşullarında As(V) türüne ait kalibrasyon doğrusu. ...42
Şekil 33. 1,0 mg/L As(III) ile beslenen bitkilerin kök, gövde ve yapraklarındaki As(III) ve As(V) derişimleri. 44
Şekil 34. 1,0 mg/L As(V) ile beslenen bitkilerin kök, gövde ve yapraklarındaki As(III) ve As(V) derişimleri. 44
Şekil 35. 1,0 mg/L Se(IV) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin derişimleri. 46
Şekil 36. 1,0 mg/L Se(IV) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin kütlece yüzde dağılımı. 46
Şekil 37. 1,0 mg/L Se(VI) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin derişimleri. 47
Şekil 38. 1,0 mg/L Se(VI) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin kütlece yüzde dağılımı. 47
Şekil 39. 1,0 mg/L Se(IV) ve As(III) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki arsenik türlerinin derişimleri. 48

Şekil 40. 1,0 mg/L Se(IV) ve As(III) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin derişimleri. 49
Şekil 41. 1,0 mg/L Se(IV) ve As(III) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin kütlece yüzde dağılımı. 49
Şekil 42. 1,0 mg/L Se(IV) ve As(V) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin derişimleri. 50
Şekil 43. 1,0 mg/L Se(IV) ve As(V) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin derişimleri. 51
Şekil 44. 1,0 mg/L Se(IV) ve As(V) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin kütlece yüzde dağılımı. 51
Şekil 45. 1,0 mg/L Se(VI) ve As(III) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki arsenik türlerinin derişimleri. 52
Şekil 46. 1,0 mg/L Se(VI) ve As(III) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin derişimleri. 53
Şekil 47. 1,0 mg/L Se(VI) ve As(III) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki arsenik türlerinin kütlece yüzde dağılımı. 53
Şekil 48. 1,0 mg/L Se(VI) ve As(V) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki arsenik türlerinin derişimleri. 54
Şekil 49. 1,0 mg/L Se(VI) ve As(III) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin derişimleri. 55
Şekil 50. 1,0 mg/L Se(VI) ve As(III) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin kütlece yüzde dağılımı. 55

ÖZET

Arsenik ve selenyum metabolizmadaki rolleri nedeniyle araştırmacıların sürekli ilgisini çeken elementler olmuşlardır. Selenyum derişim düzeyine göre hem gerekli hem de toksik, arsenik ise toksik bir elementtir. Her iki element de türlendirme analizi açısından da ilgi odağıdır. Literatürde, bu iki elementin canlılarda antagonistik veya sinerjik etkileri üzerine çalışmalar bulunmaktadır. Proje kapsamında arsenik ve selenyumun eşzamanlı türlendirmesi için enzimatik özütleme ve HPLC-ICP-MS sistemi kullanarak analitik bir yöntem geliştirilmiş ve arsenik ve/veya selenyum katılmış, Hoagland çözeltisinde yetiştirilmiş yeşil soğan bitkilerinde arsenik-selenyum etkileşimi incelenmiştir.

As(III) veya As(V) ile beslemede, bu elementin çözelti ortamından büyük oranda alındığı ve kök bölümünde çoğunlukla As(III) formunda depolandığı, gövde ve yapraklara geçişinin ise sınırlı olduğu gözlemlenmiştir. Selenyum alınımının ise arseniğe oranla daha az olduğu, bitkinin Se(IV) ile beslenmesi durumunda selenyumun kök ve yaprak bölümlerinde selenometiyonin ve selenometil selenosistin formlarında depolandığı gözlemlenmiştir. Se(VI) ile besleme durumunda ise selenyumun çoğunlukla Se(VI) formunda korunduğu, düşük bir yüzdesinin organik selenyum formlarına dönüştüğü tespit edilmiştir. Besleme çözeltisinde As(III)-As(V) ve Se(IV)-Se(VI) çiftleri için bir türden diğerine geçiş olmadığının gösterilmiş olması, literatürdeki benzer çalışmalara göre bu proje sonuçlarının özgünlüğüne önemli bir katkıdır.

Selenyum ile arseniğin birlikte verildiği durumlar incelendiğinde sinerjik ve antagonist sonuçlar alınmış ve bunlar ayrıntılı biçimde saptanmıştır.

Literatürde farklı bitkiler için farklı etkileşim mekanizmalarının olduğu bilinmektedir. Bu proje kapsamında verilen sonuçlar sadece belli koşullarda yetiştirilmiş yeşil soğan bitkisi için geçerli olup diğer bitkiler için genel bir yargı yapmak için yeterli değildir.

Anahtar kelimeler: Arsenik, selenyum, türlendirme, HPLC, ICP-MS, yeşil soğan, antagonistik ilişki, sinerjik ilişki.

ABSTRACT

Elements of arsenic and selenium have been the centres of attention for researchers regarding their important roles in metabolism. Selenium can be both essential and toxic depending on its concentration level, while arsenic is a toxic element. Both elements are also in focus of interest for their speciation analysis. In literature, there are studies on their antagonistic and/or synergic interactions. In this project, an analytical method based on enzymatic extraction followed by determination using HPLC-ICP-MS was developed for the simultaneous extraction and speciation of arsenic and selenium. Developed methodology was applied to green onion plants that were grown in Hoagland nutrient solution spiked with arsenic and/or selenium in order to investigate possible arsenic-selenium interactions.

In the samples fed by As(III) or As(V) spiked solution, most of the arsenic was absorbed by the plant and deposited in the root as As(III) whereas transport to bulb and leaves was limited. On the other hand, selenium absorption was lower compared to arsenic; when plants were supplemented with Se(IV), most of the selenium was found in root and leaves in the form of selenomethionine and selenomethyl selenocysteine. Selenium was preserved as Se(VI) and only very small percentage was converted to organoselenium compounds in plants supplemented with Se(VI). Analysis of feed solutions revealed that conversion between As(III)-As(V) and Se(IV)-Se(VI) couples in feed solution was insignificant. This result is a significant contribution to the novelty of the present research findings compared to the similar studies in literature.

Synergic and antagonistic relations were observed and determined in a detailed manner in case of simultaneous supplementation of arsenic and selenium.

It is known from the literature that different interaction mechanisms were present for different plants. Results given in this study are valid only for green onion plants grown under specific conditions and should not be generalized for other plants.

Keywords: Arsenic, selenium, speciation, HPLC, ICP-MS, green onion, antagonistic interaction, synergic interaction.

1. GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Selenyum canlılarda dar bir derişim aralığında gerekli bir elementtir. Yetişkinler için günlük 70-400 µg aralığında selenyum alınımı önerilmektedir. Bu aralığın dışında selenyum eksikliği ya da toksisitesi gözlemlenmektedir (Anon, 2015). Selenyum, glutatyon peroksidaz, tiyoredoksin redüktaz gibi enzimlerin yapısında yer alarak hücrenin antioksidasyon mekanizmasında kilit rol oynamaktadır (Birringer vd., 2002). Bu sayede hücre içerisinde yer alan serbest radikallerin miktarının düştüğü ve bunun sonucunda da kanserli hücre oluşumunda azalma olduğu rapor edilmiştir (Clark vd., 1996; Rayman, 2007). Yukarıda verilen aralıktan daha düşük değerlerde alınımının kalp damar rahatsızlıklarına, bağışıklık sistemi bozukluklarına, tiroit düzensizliklerine sebep olduğu bilinmektedir (Beck vd., 2003; Papp vd., 2007; Moosmann ve Behl 2004).

Selenyum çoğunlukla bitkisel gıdalardan vücuda alınır. Fındık, ay çekirdeği, soğan, tahıllar, yumurta gibi gıdalar selenyumca zengindir (Cankur vd., 2006). Özellikle Brezilya Cevizi (Brazil nut, *Bertholletia excelsa*) 8 ila 83 μg/g selenyum içermektedir ve selenyumca en zengin bitki olarak bilinir (Stockler-Pinto vd., 2010; Strunz vd., 2008). Bitkilerin içerdikleri selenyum yetiştirildikleri toprakta bulunan selenyum ile doğru orantılıdır.

Dünya genelinde tarım yapılan alanlarda selenyum dağılımı farklılık gösterdiği için bazı bölgelerde selenyum yetersizliği gözlemlenirken bazı bölgelerde eksikliği rapor edilmiştir (Kabata-Pendias, 1998). Bu sebeple selenyumca fakir bölgelerde yaşayan insanların diyetine selenyum katılması ile sorun aşılmaya çalışılmaktadır. Anorganik selenyum türlerinin biyoyararlılığı düşük olduğu için organoselenyum türlerinin kullanılması daha etkindir.

Selenyum ile zenginleştirilen besinlerin üretimi anorganik selenyumu organoselenyum türlerine çevirebilme yeteneklerinden dolayı literatürde oldukça fazla çalışılmış konular arasında yer almaktadır (Kabata-Pendias, 1998; Kápolna vd., 2009; Kapolna vd., 2007; Kápolna ve Fodor 2006; Xia vd., 2005; Auger vd., 2004; Bulska vd., 2006). Bu kapsamda soğan, dereotu, havuç, sarımsak, brokoli gibi yeşil yapraklı bitkiler sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan türlendirme çalışmalarında bitkilerin genellikle anorganik selenyumu selenometiyonin, selenosistein, selenometil-selenosistein, γ-glutamil-selenometil-selenosistein ve selenoproteinlere dönüştürerek depo ettiği gözlemlenmiştir (Pyrzynska,

2009; Dumont vd., 2006). Bu türler arasında selenometil-selenosistein ve γ-glutamil-selenometil-selenosistein türlerinin diğer selenyum türlerine göre daha etkili bir tümör inhibitörü oldukları bilinmektedir (Kapolna vd., 2007).

Anorganik selenyumu biyoyararlı türlere çevirme yeteneklerinden dolayı selenyumca zengin gıda üretiminde mayalar da sıklıkla kullanılmaktadır (Behne vd., 2009; Stabnikova vd., 2008). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi'nin (European Food Safety Authority, EFSA) yayınladığı bir çalışmada selenite maruz bırakılan mayaların, %60-85 seleniti bir seleno-aminoasit olan selenometiyonin çevirdiği gösterilmiştir (EFSA, 2008; EFSA, 2009). Öte yandan mayalarda bulunan selenosistein ise toplam selenyumun %2-4 ünü oluşturmaktadır. EFSA tarafından, selenyumun maya ile birlikte gıda katkısı olarak kullanılmasının üst limitler göze alınarak uygulandığında herhangi bir sağlık riski bulunmadığı rapor edilmiştir (EFSA, 2008).

Öte yandan arsenik, canlılar için toksik etki yaratabilen bir elementtir. Doğada çoğunlukla arsenit (AsO_3^{3-}) ve arsenat (AsO_4^{3-}) olarak bulunur (Emsley, 2011). İçme sularına doğal yollarla yeraltı kaynaklarından karışan arsenik ciddi sağlık sorunlarına yol açabilmektedir. Dünya Sağlık Örgütünün belirlediği içme suyu standardına göre izin verilen maksimum limit 10 µg/L'dir (WHO, 2015). Özellikle Bangladeş ve komşusu ülkelerdeki sularda bulunan arsenik kirliliği bu eşik değerinin çok üzerindedir ve bölgede önemli sağlık sorunlarına sebep olmaktadır (Radloff vd., 2011). Arsenitin tiyollere aşırı ilgisi olduğu bilinmektedir. Enzim yapısındaki tiyollere bağlanarak aktif grupları inhibe eder ve enzim çalışma mekanizmasına olumsuz etkide bulunur (Langner, 2005). Arsenat bir fosfat analoğudur ve varlığı fosfat mekanizmasına ve dolayısıyla ATP mekanizmasına zarar verir. Bunun bir sonucu olarak vücuttaki enerji dağıtım sistemi dengesi bozulmakta ve ölümle sonuçlanan vakalar görülebilmektedir (Hughes, 2002).

As ve Se, P ve S gibi elementlerle kimyasal benzerlikler gösteren metalloidler olsalar da canlılar üzerindeki etkileri P ve S elementlerinden çok farklıdır. Literatürde As ve Se elementlerinin birbirleri üzerinde antagonistik veya sinerjik etkileri olduğunu gösteren az sayıda çalışmalar mevcuttur (Malik vd., 2012; Feng vd., 2009; Kobaissi vd., 2013). Malik ve arkadaşlarının maş fasulyesi (mung bean) kullanarak yaptıkları bir çalışmaya göre bitkiye yalnız Se (2,5 veya 5,0 µM) uygulamanın bitki gelişimini artırdığı, yalnız As (10 µM) uygulamasının bitki gelişimini inhibe ettiği bununla birlikte Se (5µM) ve As'ın (10 µM) birlikte uygulandığı durumda bitki gelişimini olumlu yönde etkilediği gözlemlenmiştir. Ayrıca, 5,0 µM selenyum varlığında bitkideki arsenik derişiminin gözle görülür derecede azaldığı, arsenik

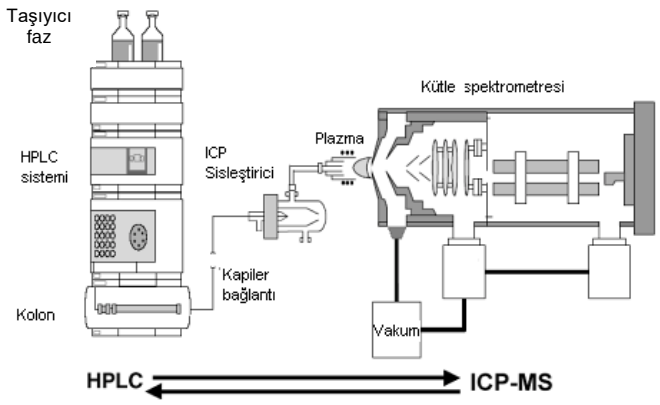
varlığında ise selenyum derişiminin arttığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada Se varlığının As'ın bitki gelişimindeki olumsuz etkiyi ortadan kaldırdığı sonucuna varılmıştır (Malik vd., 2012).

Yapılan başka bir çalışmada Çin kuzgunotu (*Pteris vittata*) bitkisine hidrofonik bir sistemde As ve Se uygulanmış, sonuçlara göre Se seviyesi 2,5 mg/L` den düşük olduğunda As eklemenin Se bitkiye alınımını artırdığı, bu değerden yüksek olduğunda ise As eklemenin Se alınımını azalttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca As uygulamasının Se'un köklerden yapraklara doğru geçişini artırdığı gözlemlenmiştir (Feng vd., 2009).

Tüm bu sonuçlar arsenik ve selenyumun bitki içerisinde birbirleri ile etkileştiğini göstermektedir. Ancak bitki ile yapılan çalışmaların büyük bölümünde toplam element derişimi ölçümlerine göre sonuçlar verilmiş olup, sınırlı sayıda türlendirme çalışması bulunmaktadır (Afton vd., 2009). Bu bağlamda, projede geliştirilmesi önerilen eşzamanlı As ve Se türlendirmesi, anılan sorunların ele alınması için yararlı ve önemli bir analitik yöntem olarak ortaya çıkmaktadır.

İyi bir türlendirme çalışmasının ilk basamağı hedef türlerin örnek matriksinden yüksek verimlilikle alınması ile başlar. Düşük molekül ağırlığına sahip türler genellikle sıcak de-iyonize su, HCl, NaOH, perklorik asit, metanol gibi çözücüler ile özütlenebilirler (Montes-Bayón vd., 2006). Özütleme verimini artırmak için ultrasonik su banyosu, çok yöne hareketli karıştırıcı, mikrodalga destekli özütleme sistemi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Yüksek molekül ağırlığına sahip ve proteinlere bağlı türleri özütleyebilmek için ise bunların öncelikle protein yapısından ayırılması sağlanır ve bu amaçla proteaz XIV, proteaz K ve pronaz E enzimleri kullanılmaktadır (Reyes vd.,2009).

Literatürde selenyum ve arsenik türlendirmesi için genellikle kromatografi ve spektrometri içeren birleşik yöntemler kullanılmaktadır. Öncelikle farklı türler, yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) (Guerin vd., 1999), gaz kromatografi (GC) (Kösters, 2003) veya elektroforez (Matusiewicz ve Ślachciński 2012; Morales vd. 2008) teknikleriyle birbirlerinden ayrılmaları sağlanmakta, daha sonra atomik soğurma spektrometri (AAS) [34], atomik floresans spektrometri (AFS) (Capelo vd., 2006), endüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometri (ICP-OES) (Deng vd., 2007) ya da endüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometri (ICP-MS) (Kápolna ve Fodor 2006; Auger vd., 2004) gibi tekniklerle kalitatif ve/veya kantitatif olarak takip edilmektedirler. Bu sistemler arasında ayırma gücü, uygulama kolaylığı, sistemler arası uyum ve duyarlılığından dolayı HPLC-ICP-MS en çok kullanılan birleşik sistemdir (Şekil 1).



Şekil 1. HPLC-ICP-MS EVISA, 2015 referansıdan uyarlanmıştır.

Sathrugnan ve Hirata (2004) yaptıkları bir çalışmada iyon çifti HPLC kullanarak anorganik As (As(V) ve As(III)) ve Se (Se(VI) ve Se(IV)) türlerini ayırmış ve içme suyu, baca kurumu ve sediman örneklerinde türlendirme çalışmaları yapmışlardır. Başka bir çalışmada Reyes ve arkadaşları (2009) balık dokusundaki farklı selenyum (Se(IV), Se(VI) ve selenometiyonin) ve arsenik türlerini (As(III), As(V), MMA, DMA ve arsenobetayin) mikrodalga destekli enzimatik özütleme yöntemi ile çözeltiye alarak iyon kromatografisi ile eşzamanlı olarak ayırmış ve ICP-MS ile tayinlerini yapmışlardır. Geliştirilen yöntemde pronaz E ve lipaz enzimleri kullanılmış ve türler %80-94 verimle özütlenmiştir. Enzimler büyük protein yapılarını parçalarlar ve yapılarında bulunan aminoasitleri ortaya çıkarırlar. Bu özellikleri protein yapısında bulunan molekülleri incelemek açısından büyük önem taşır ve biyolojik örnekler incelenirken kullanımları yaygındır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Kimyasallar ve Araçlar

Çalışma sırasında kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır. 1000 mg/L'lik Se(IV), Se(VI), seleno-DL-metiyonin, seleno-DL-sistin ve Se-(methyl) selenosistein sırasıyla sodium selenite (Ventron, Karlsruhe, Germany), sodium selenate (Ventron), Seleno-DL-methionine (>99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), seleno-DL-cystine (Sigma-Aldrich) ve Se-(Methyl)selenocysteine hydrochloride (>95, Sigma-Aldrich) katılarının deiyonize suda çözülmesi ile hazırlanmışlardır. 1000 mg/L'lik As(III), As(V), monometil arsenik ve dimetil arsenik sırasıyla sodium arsenite (Fisher Scientific, New Jersey, USA), sodium arsenate (Fisher Scientific), cacodylic acid (Sigma-Aldrich) ve disodium methyl arsenate (Supelco, Bellefonte, Pa, USA) katılarından deiyonize suda çözülmesi ile hazırlanmıştır. Ana ve ara stok çözeltiler -18 °C'de saklanmıştır. Çalışma standartları haftalık olarak ara stoklardan hazırlanmış ve 4 °C'de kullanılacağı ana kadar muhafaza edilmiştir.

Enzim yardımlı özütleme işlemi için Protease type XIV, Trypsin, Proteinase K, Drisilaze ve Pancreatin (Sigma-Aldrich) enzimleri kullanılmıştır.

Çözme prosedürünün doğruluğunu test etmek için NRC DOLT-4 Dogfish Liver ve NIST 1566b Oyster Tissue standart referans maddeleri kullanılmıştır.

Topraksız ortamda bitki yetiştirmek için besleme çözeltisi olarak sıklıkla kullanılan Hoagland and Arnon'un reçetesi bu çalışmada kullanılmıştır (Hoagland ve Arnon, 1950). Bu çözelti bitkilerin ihtiyaç duyabileceği anorganik kimyasalları içermektedir. Çözeltinin hazırlanması için 100 mL'lik KNO_3 (Acros Chemicals, Geel, Belçika), $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ (Riedel-de Haen, Seelze, Almanya), $MgSO_4.7H_2O$ (Kimetsan, Ankara, Türkiye), NH_4NO_3 (Riedel-de Haen), H_3BO_3 (Merck, Darmstadt, Almanya), $MnCl_2.4H_2O$ (Riedel-de Haen), $ZnSO_4.7H_2O$ (Fisher Scientific), $CuSO_4.5H_2O$ (Riedel-de Haen), $Na_2MoO_4.2H_2O$ (Fisher Scientific), KH_2PO_4 (Riedel-de Haen) stok çözeltileri Tablo 1'de verilen derişimlere göre hazırlanmıştır. Son çözeltiyi hazırlamak için yine Tablo 1'de en son kolonda verilen hacimler her bir stok çözeltiden balon jojeye alınarak 1000 mL'ye deiyonize su ile tamamlanmıştır.

Demir-EDTA şelatı Beale (1971) tarafından geliştirilen prosedüre göre sentezlenmiş ve Hoaglan çözeltisini hazırlamak için kullanılmıştır (Beale, 1971). Prosedüre uygun olarak 146 g EDTA ve 53,5 g $Fe(OH)_3$ (Merck) 500 mL su içerisinde karıştırılmış ve 3 saat boyunca 90 °C'de ısıtılmıştır. Elde edilen karışım Whatman No. 1 kodlu filtre kâğıdı ile süzüldükten

sonra soğuk su ile yıkanmış ve bir gece 80 °C etüvde kurutulmuştur. Elde edilen sarı renkli katı havan ile ezilerek homojenize edilmiş ve ışık almayan kapalı bir kapta muhafaza edilmiştir.

Tablo 1. Hoagland besleme çözeltisi içeriği.

Kimyasal	**Stok çözelti, mol/L**	**1,0 L Hoagland çözeltisi için kullanılan stok hacmi, mL**
KNO_3	2,0	2,5
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	1,0	2,5
Demir-EDTA şelatı	0,05	1,5
$MgSO_4.7H_2O$	1,0	1,0
NH_4NO_3	1,0	1,0
H_3BO_3	0,05	1,0
$MnCl_2.4H_2O$	0,01	1,0
$ZnSO_4.7H_2O$	0,001	1,0
$CuSO_4.5H_2O$	$2,0x10^{-4}$	1,0
$Na_2MoO_4.2H_2O$	$2,0x10^{-4}$	1,0
KH_2PO_4	1,0	0,5

Anyon değiştirici kromatografi için taşıyıcı faz olarak 5,0 mmol/L sitrat tamponu 2% (h/h) metanol ortamında hazırlanmıştır. Bu çözeltiyi hazırlamak için yüksek saflıkta sitrik asit (Fluka) deiyonize suda çözüldükten sonra yeterli miktarda HPLC saflıkta metanol (Merck) eklenmiş ve 0,1 mol/L amonyak (Merck) kullanılarak pH sı 5,00'a ayarlanmıştır. Hazırlanan taşıyıcı faz HPLC kolonunu tıkayabilecek parçacıklardan arındırılmak için 0,20 µm naylon net membran filtre (Millipore) kullanılarak süzülmüş ve son olarak da içerisindeki çözünmüş gazları uzaklaştırmak için ultrasonik banyo kullanılarak 30 dakika boyunca karıştırılarak gazdan arıtılmıştır.

2.2 Cihazlar

2.2.1 Endüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS)

Toplam element tayini ve türlendirme deneyleri için konsantrik sisleştirici ve Peltiyer soğutmalı sisleştirme odacığına sahip Thermo Scientific X series ICP-MS cihazı

kullanılmıştır. Cihaz çalışma parametreleri üretici tarafından önerilen ve içerisinde düşük, orta ve yüksek kütleli iyonlar içeren Tune A çözeltisi kullanılarak optimize edilmiştir. Ayrıca ^{75}As, ^{78}Se ve ^{82}Se izotoplarında en iyi duyarlılığı elde etmek için bu iyonları içeren bir çözelti ile daha detaylı optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Cihazdan elde edilen sonuçlar PlasmaLAb, Excel ve Origin yazılımları kullanılarak düzenlenmiştir. Bu rapor içerisinde kullanılan As ve/veya Se derişim değerleri her tür için anyon veya molekül cinsinden değil fakat anılan elementler içindir.

2.2.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Kromatografik ayırma işlemlerinde online degazör sistemli Dionex 3000 pompa ve Hamilton PRP-X100 (4,6 x 250 mm) anyon değiştirici kolon kullanılmıştır. Örnekler sisteme 100 µL hacimli ve basınca dayanıklı Rheodyne 8125 marka 6 yollu vana ile enjekte edilmiştir.

HPLC ile ICP-MS arasındaki bağlantı 40 cm uzunluğunda ve 0,56 mm iç çaplı PTFE boru ile HPLC kolunu ve ICP-MS cihazının sisleştirici girişi arasında yapılmıştır. HPLC parametreleri Tablo 2'de verilmiştir.

Oluşturulmuş birleşik sistemli teknik, anyon değiştirici yüksek basınçlı sıvı kromatografi-endüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometri, metin içinde AE-HPLC-ICP-MS olarak anılacaktır.

Tablo 2. HPLC çalışma koşulları.

AE-HPLC parametreleri	
Kolon	Hamilton PRP-X100 (4,6 X 250 mm)
Taşıyıcı faz	2% (v/v) metanol içerisinde hazırlanmış 5,0 mmol/L sitrat tamponu, pH 5,0, izokratik elüsyon
Örnek hacmi	100 µL
Akış hızı	1,0 mL/min

Katı maddeleri çözmek ve taşıyıcı fazı çözünmüş gazlardan arındırmak için Elma S 40 H (New Jersey, ABD) ultrasonik su banyosu kullanılmıştır. Büyütülen örneklerin içerisindeki

suyu uçurarak liyofilize etmek için Christ LDC-1 (Osterode am Harz, Germany) marka liyofilizatör kullanılmıştır. Örneklerin çözme işlemi için Milestone Ethos Plus marka (Sorisole, Italya) mikrodalga özütleme sistemi kullanılmıştır.

2.3 Prosedürler

2.3.1 Kontrollü Bitki Yetiştirme

Yeşil soğan bitkileri topraksız su kültürü (hidrofonik) ortamında yetiştirilmiştir. Bu amaçla 400 mL'lik polipropilen kaplar kullanılmış ve kapların ağzını kapatmak için strafor köpük plakalar istenilen şekilde ve ölçüde kesilerek hazırlanmış ve kullanılmıştır. Kaplar iki kat seyreltilmiş 400 mL Hoagland çözeltisi ile doldurulmuştur. Her kaba ikişer soğan yumrusu, kökleri çözelti içinde kalırken gövdesi sıvı seviyesinin üzerinde olacak şekilde dikilmiştir. Hoagland çözeltisi Tablo 1'de verilen stok çözeltilerden pipetleme yöntemiyle gerekli miktarlarda alınıp de-iyonize suyla 1000 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Elementlerin son derişimleri Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Hoagland çözeltisindeki elementlerin son derişimi*.

Element	Derişim, mg/L
Azot	210
Potasyum	235
Kalsiyum	200
Fosfor	31
Sülfür	64
Magnezyum	48
Bor	0,5
Demir	1,0
Mangan	0,5
Çinko	0,05
Bakır	0,02
Molibden	0,01

* Soğan bitkilerinin yetiştirildiği ortam için Hoagland çözeltisi 2 kez seyreltilmiştir.

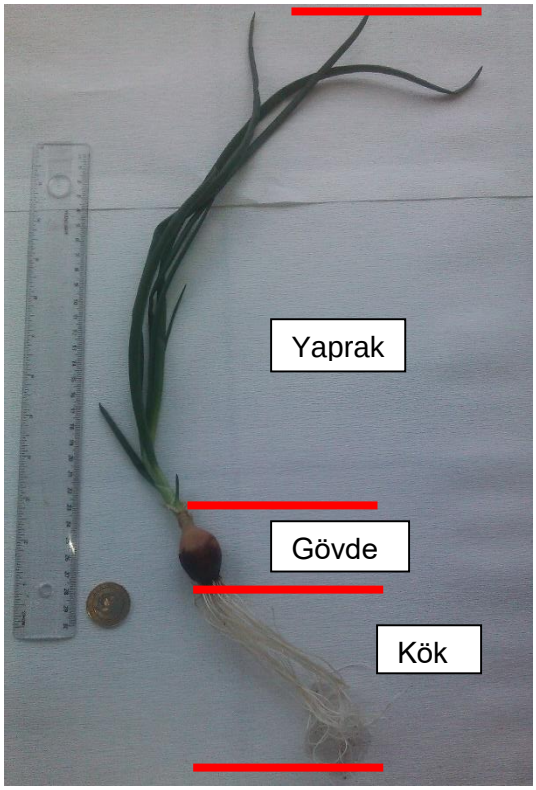
Farklı türlerin birbirine etkisini incelemek amacı ile Tablo 4'de belirtildiği üzere dokuz farklı kap hazırlanmış ve farklı miktarlarda selenyum ve/veya arsenik besleme çözeltisine

eklenmiştir. Çözeltinin eksilmesi durumunda deiyonize su ile hacim 400 mL ye tamamlanıştır. Kaplar kontrollü büyütme odasına yerleştirilmiş ve besleyici çözelti günlük olarak 5 L/min hava debisine sahip harici pompa ile 5 dakika boyunca havalandırılmıştır. Bitkiler 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık periyotlarıyla çalışan, 100 µmol foton.m^{-2}.s^{-1} sabit ışık yoğunluğu sağlayan floresan lambalar ile aydınlatılan, sıcaklığı 20-25 °C aralığında olan büyüme ortamında yetiştirilmiştir. 25 gün sonra tüm bitkiler toplanmış, her bir kaptan çıkarılan bitkiler birleştirilmiş ve Şekil 2'de gösterildiği gibi kök, gövde, yaprak olarak bölümlere ayrılmıştır. Ayrıca kaplarda kalan besleme çözeltileri hacmi deiyonize su ile 400 mL'ye tamamlanmış ve bitkiye alınan ve çözeltide kalan element miktarlarını belirlemek amacı ile analiz edilmiştir.

Tablo 4. Deney kaplarına eklenen selenyum ve/veya arsenik türleri.

Kap numarası	**Katılan tür, herbiri 1,0 mg/L***
1	kontrol
2	As (III)
3	As (V)
4	Se (IV)
5	Se (VI)
6	As (III) + Se (IV)
7	As (III) + Se (VI)
8	As (V) + Se (IV)
9	As (V) + Se (VI)

*Bu değer her türdeki As ve/veya Se içindir.



Şekil 2. Yetiştirilen bitkilerin kök, gövde ve yaprak bölümleri.

2.3.2 Örneklerin Analize Hazırlanması

Toplanan örnekler deiyonize su ile yıkandıktan sonra sıvı azot ortamında hızlı dondurma işlemine tabi tutulmuştur. Donmuş örnekler agat havan yardımı ile toz haline getirilerek homojenize edilmiştir. Hazırlanan örnekler -47 °C sıcaklık ve 1,4 mbar basınç altında 24 saat boyunca kuru dondurma (liyofilizasyon) işlemine tabi tutulmuştur. Örnekler analiz safhasına kadar -18 °C'de saklanmıştır.

2.3.3 Toplam Selenyum ve Arsenik Tayini

Çözme için 0,10 g örnek tartılarak PTFE çözme kaplarına aktarılmış ve üzerlerine 3,0 mL derişik nitrik asit ve 3,0 mL %30 luk (h/h) hidrojen peroksit eklenmiştir. Tablo 5'da belirtilen mikrodalga programı uygulanmıştır. Çözülen örnekler 0,45 µm membran filtre ile süzülerek 25,0 mL ye seyreltilmiş ve polietilen kaplara aktarılarak analize kadar buzdolabında 4 °C sıcaklıkta bekletilmiştir.

Tablo 5. Mikrodalga sıcaklık programı.

Sıcaklık, °C	Artış süresi, min	Bekleme süresi, min
100	5	5
150	5	10

2.3.4 Katı-sıvı ve Enzim Yardımlı Özütleme İşlemleri

Özütleme işlemi için 15 mL hacimli santrifüj tüplerinde, 100 mg liyofilize edilmiş örneğe 7.0 mL çözücü karışımı katılarak önce 15 min boyunca vorteks yardımı ile daha sonra 20 min boyunca ultrasonik banyo ile karıştırıldı. Katı fazı ayırmak için 5000 devir/min kullanarak 15 min santrifüjlendi. Ayrılan sıvı faz 0,20 µm naylon membran filtreden süzülerek analize kadar -18 °C de saklandı.

Enzim yardımlı özütleme işlemi için 100 mg liyofilize edilmiş kuru örnek 15 mL hacimli santrifüj tüpüne alındı. Üzerine 7,0 mL 25 mmol/L, 7,5 pH değerinde fosfat tamponu ve 30 mg enzim katıldı. Bu karışım vorteks yardımı ile 15 min ve sonra ultrasonik banyoda 20 min boyunca karıştırıldı. Daha sonra örnekler mekanik eliptik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 24 saat boyunca çalkalandı. Bu işlem sonunda da 15 min boyunca 5000 devir/min kullanarak santrifüjlendi ve 0,20 µm filtreden süzüldükten sonra analize kadar -18 °C'de saklandı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 ICP-MS Cihazının Optimizasyonu

ICP-MS cihazının duyarlılığı ve kesinliği cihazın optimizasyonu ile yakından ilgilidir. ICP-MS cihazında örnek girişi, plazma ve iyon optiği olmak üzere üç temel grup bulunmaktadır. Bu parametreler cihaz üreticisinin önerdiği 0,5 mol/L nitrik asit içerisinde hazırlanmış her biri 10 µg/L derişiminde Li^{+}, Co^{2+}, In^{3+}, Pb^{2+}, Bi^{5+} ve U^{4+} gibi düşük, orta ve yüksek kütlede iyonlar içeren “Tune A” çözeltisi kullanılarak optimize edilmiştir. Ayrıca bu çözelti ile her analizden önce duyarlılıkta düşme olup olmadığı kontrol edilmiştir. Ayrıca selenyum ve arsenik iyonları için en yüksek duyarlılığı elde etmek için bu iyonları içeren standart bir çözelti ile optimizasyon sonlandırılmıştır. ICP-MS cihazı için optimize edilmiş parametreler Tablo 6’de verilmiştir.

Tablo 6. ICP-MS cihazının optimize edilmiş parametreleri.

Parametre	Optimize edilmiş değer
Ekstraksiyon lens voltajı, V	-158
Lens 1, V	-7,6
Fokus, V	10,9
D1, V	-47,6
Pole bias, V	-7,2
Hexapole bias, V	0,3
Sisleştirici basıncı, psig	0,9
Örnekleme derinliği*, cm	1,4
Lens 2, V	-80
Lens 3, V	-168,9
Güç, W	1400
D2, V	-160
Soğutucu gaz akışı, L/min	13
Yardımcı gaz akışı, L/min	0,8

*Örnekleme derinliği örnekleme konisi ile plazma başlığı arasındaki uzaklıktır.

3.2 Bitki Büyümesinde Fiziksel Gözlemler

Yetiştirme aşamasında yapılan ön deneylerde bitkiler üç farklı derişimde arsenik ve/veya selenyum türlerine maruz bırakılmıştır.

İlk olarak besleme çözeltisine 10,0 mg/L As ve/veya Se katılmıştır. 25. gün bitkiler hasat edilmiş, kök, gövde ve yapraklar olarak 3 parçaya ayrılmış ve her bir bölüm tartılarak yaş kütleleri ölçülmüştür. Kök ve yapraklar için yaş kütleler Tablo 7'de verilmiştir. Kontrol ve 10,0 mg/L As(III) ve 10,0 mg/L Se(IV) ile beslenmiş bitkilerinin fotoğrafları karşılaştırma amacı ile sırası ile Şekil 3a ve 3b' de verilmiştir. Se(VI) eklenen bitkiler hariç diğer bitkilerdeki kök gelişiminin kontrol grubuna oranla çok düşük olduğu gözlenmiştir. Bu derişim seviyesinde verilen arsenik ve selenyumun bitki için toksik etki gösterdiğine karar verilmiştir. Diğer sette As ve Se derişimleri 5,0 mg/L seviyesine düşürülmüştür. Bu derişimde büyütülen bitkiler için kök ve yaprak kütleleri

Tablo 8'da verilmiştir.

Tablo 7. 10,0 mg/L As ve/veya Se eklenmiş bitkilerin kök ve yapraklarının kütleleri.

Ekleme	Yaş kök kütlesi, g	Yaş yaprak kütlesi, g
Kontrol	5,55	13,85
As(III)	1,36	10,82
As(V)	1,69	10,27
Se(IV)	0,92	7,42
Se(VI)	7,15	14,10
As(III) + Se(IV)	0,15	4,85
As(III) + Se(VI)	0,22	1,02
As(V) + Se(IV)	0,31	2,17
As(V) + Se(VI)	0,27	3,14

(a)

(b)

Şekil 3 Kontrol bitkisi (a), 10 mg/L As(III) ve 10 mg/L Se(IV) ile beslenen bitki (b)

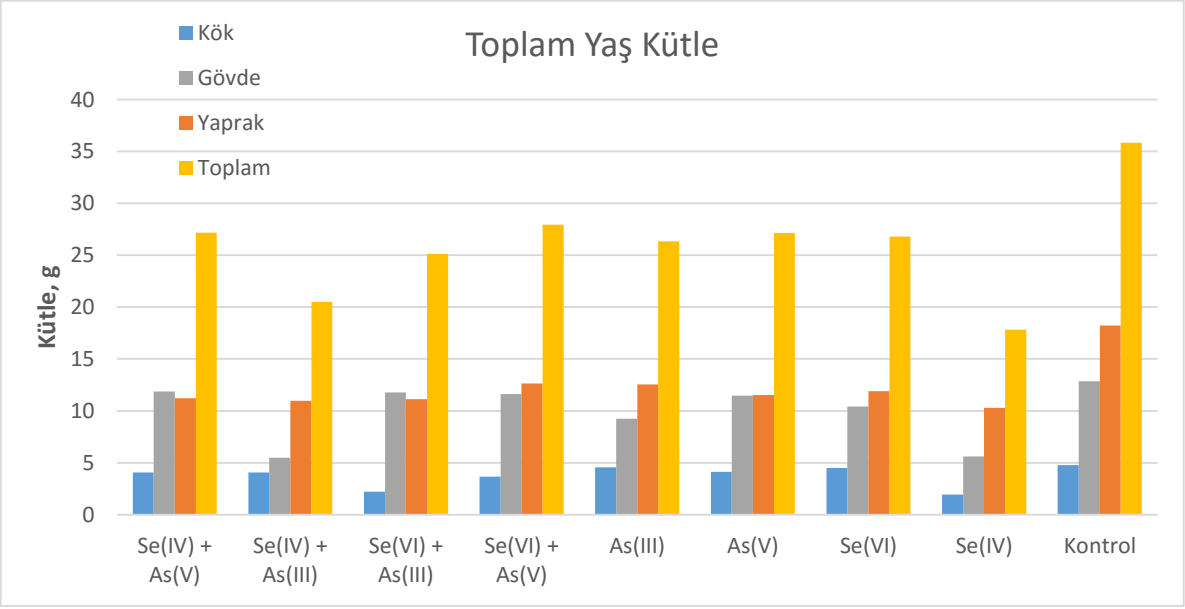
Tablo 8. 5,0 mg/L As ve/veya Se eklenmiş bitkilerin kök ve yapraklarının kütleleri.

Ekleme	**Yaş kök kütlesi, g ***	**Yaş yaprak kütlesi, g ***
Kontrol	6,17	14,15
As(III)	5,14	12,75
As(V)	5,72	11,12
Se(IV)	4,91	10,92
Se(VI)	6,42	13,55
As(III) + Se(IV)	0,97	8,82
As(III) + Se(VI)	1,21	7,63
As(V) + Se(IV)	1,05	8,12
As(V) + Se(VI)	0,88	8,14

*RSD < 3%, N=3

5,0 mg/L derişimin uygulandığı deneylerde ise sadece arsenik ya da selenyum ile beslenen bitkilerde kök gelişiminin kontrol grubuna oranla daha az olduğu, selenyum ve arseniğin birlikte verildiği bitkilerde ise kök gelişiminin neredeyse hiç olmadığı, yeşil yaprakların gelişiminin ise kontrol deneyine göre çok sınırlı olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle derişimler 1,0 mg/L ye kadar düşürülmüştür 1,0 mg/L derişimin uygulandığı deneylerde bitkilerin kök, gövde ve yaprak bölümlerinin ölçülebilir miktarlarda geliştiği gözlemlenmiştir. Bu deney sonuçları baz alınarak bitki yetiştirmek için 1,0 mg/L derişiminin uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bitkiler 25 gün boyunca deneysel kısımda anlatıldığı gibi kontrollü hidrofonik koşullarda yetiştirilmiştir. Bu sürenin sonunda, bitkiler hasat edilmiştir. Bütün bitkilerin yapraklarının yeşil ve canlı olduğu gözlemlenmiştir. Deney sonunda hasat edilen bitkilerin kök, gövde ve yaprak kütleleri Şekil 4'te verilmiştir. En fazla kök, gövde ve yaprak gelişiminin kontrol grubunda olduğu, selenyum ve/veya arsenik ile beslenen bitkilerin kütlelerinin daha az olduğu görülmüştür. Se(IV) ile beslenen bitkilerin kütlelerinin en az olduğu, bununla birlikte As(III) ve As(V) ile birlikte Se(IV) verildiğinde ise bitki kütlesinin yanlız Se(IV) verildiği duruma göre arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4. Bitkilerin kök, gövde ve yapraklarının yaş kütleleri.

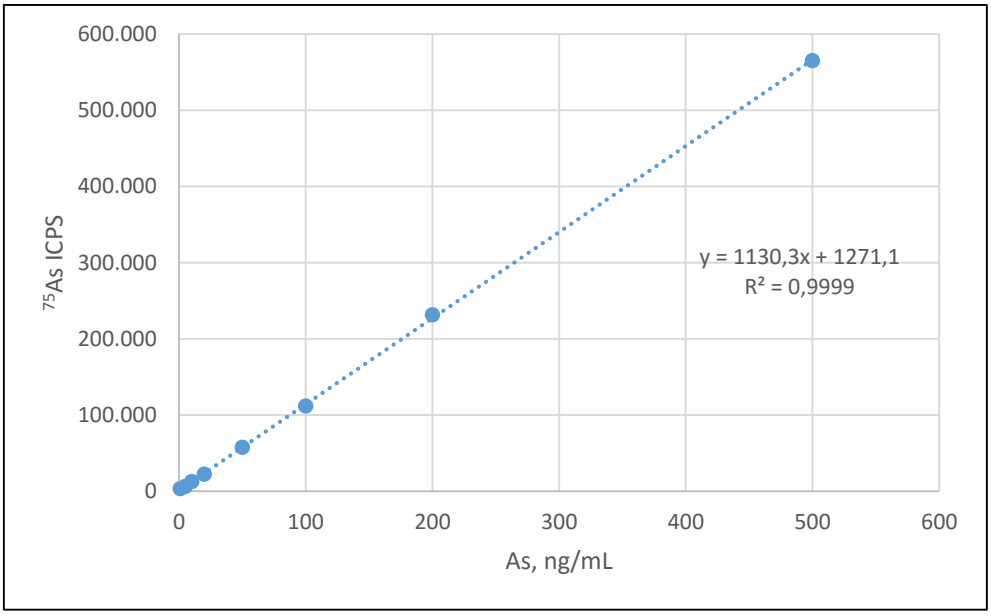
Bitkilerin kök, gövde ve yapraklarındaki ortalama nem miktarı yaş ağırlık değerlerinden kuru ağırlık değerleri çıkarılarak hesaplanmış ve Tablo 9'da verilmiştir. Bulunan ortalama nem miktarı Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı değerlerine oranla daha yüksek olduğu görülmektedir. Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanına göre yeşil soğan bitkisinin ortalama nem oranı %91,42'dir (TürKomp, 2015). Bu sonucun bitkilerin topraksız ortamda Hoagland çözeltisi içerisinde yetiştirilmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Tablo 9. Bitkilerin kök, gövde ve yapraklarındaki nem miktarı.

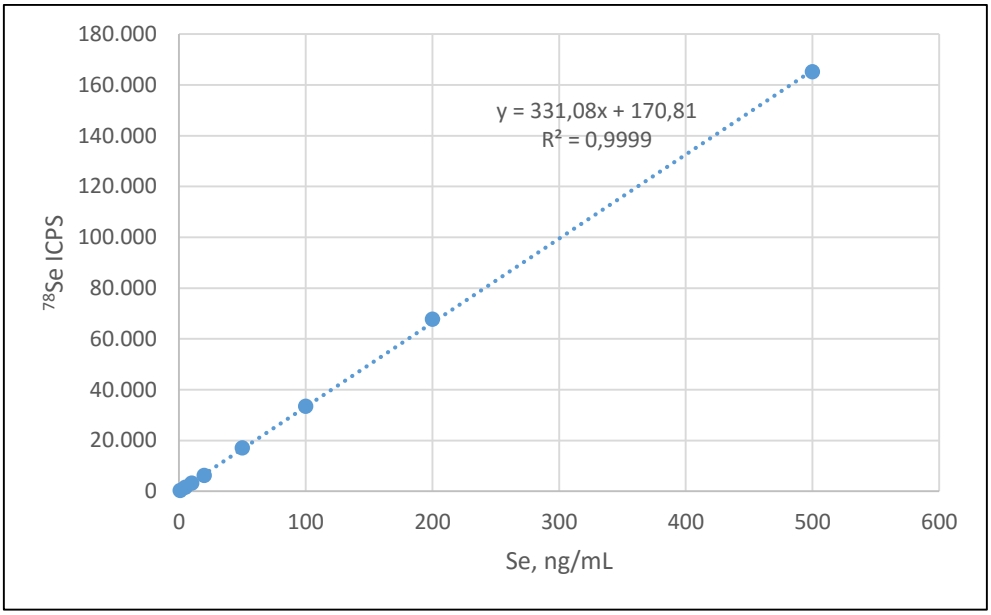
	Nem miktarı, % (k/k) ± s, N=3
Kök	96,0 ± 2,1
Gövde	94,0 ± 1,2
Yaprak	95,1 ± 1,3

3.3 Toplam As ve Se Tayini

Mikrodalga yardımlı özütleme sistemi ile çözülen bitkilerdeki toplam Se ve As miktarları ICP-MS cihazı ile tayin edilmiştir. Özütleme işlemi daha önce çalışma grubumuzda Türk baharatlarında As, Se ve Cd tayini için geliştirilen yöntem kullanılarak yapılmıştır (Şenol, 2010). 0,100 g örnek 3,0 mL derişik HNO_3 ve 3,0 mL 30% (v/v) H_2O_2 karışımı kullanılarak Tablo 5'da verilen mikrodalga sıcaklık-zaman programına göre çözülmüş, 0,45 µm membrane filtrelerden süzülmüş ve 25,0 mL'ye tamamlanmıştır. Matriks etkisini ortadan kaldırmak için aynı miktar asit ve peroksit içeren standartlar hazırlanmış ve As ve Se için Şekil 5 ve Şekil 6'de verilen kalibrasyon grafikleri ^{75}As ve ^{78}Se için elde edilmiştir. Selenyum elementi için 78 ve 82 izotoplarının her ikisi de olası bir girişimi gözlemlemek amacıyla izlenmiş ve hesaplamalarda hassasiyetinin daha yüksek olması nedeniyle 78 izotopu kullanılmıştır.



Şekil 5. ICP-MS ile arsenik tayini için kalibrasyon grafiği ve denklemi.



Şekil 6. ICP-MS ile selenyum tayini için kalibrasyon grafiği ve denklemi.

Yöntemin analitik performansı Tablo 10'de verilmiştir. Sistemin güvenilirliğini test etmek için NRC DOLT-4 Dogfish Liver ve NIST 1566b Oyster Tissue standart referans maddeleri kullanılmıştır. Sonuçlar Tablo 11'de verilmiştir. Yapılan t-test sonuçlarına göre, deneysel sonuçlar ile sertifika değerlerinin %95 güvenilirlik seviyesinde birbirleri ile uyumlu oldukları sonucuna varılmıştır.

Tablo 10. ICP-MS analitik performans değerleri.

	As	Se
Gözlenebilme sınırı, mg/kg	0,2	0,3
Tayin sınırı, mg/kg	0,6	0,9

Tablo 11. Metod validasyonu.

	Sertifika değeri, mg/kg		Analiz sonucu, mg/kg	
	As	Se	As	Se
NRC DOLT-4	9,66 ± 0,62	8,3 ± 1,3	9,01 ± 0,39	8,64 ± 0,52
NIST 1566b	7,65 ± 0,65	2,06 ± 0,15	8,31 ± 1,30	2,33 ± 0,35

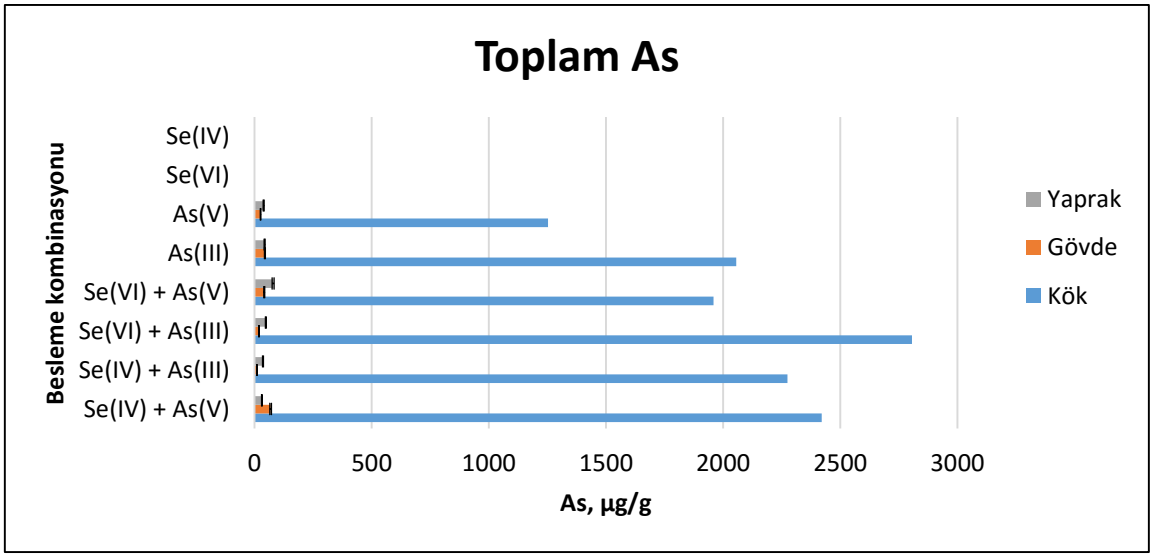
3.4 Arsenik Dağılımı

Kök, gövde ve yapraklarda bulunan toplam arsenik derişimleri Tablo 12 ve Şekil 7'de verilmiştir. Ayrıca bitkilerin farklı bölümlerindeki arseniğin kütlece yüzde dağılımı Şekil 8'de verilmiştir. Tayin sınırı altında kalan örnekler n.d. olarak verilmiştir. Rapor içerisinde verilen tüm sonuçlar liyofilize kuru ağırlık esas alınarak hesaplanmıştır.

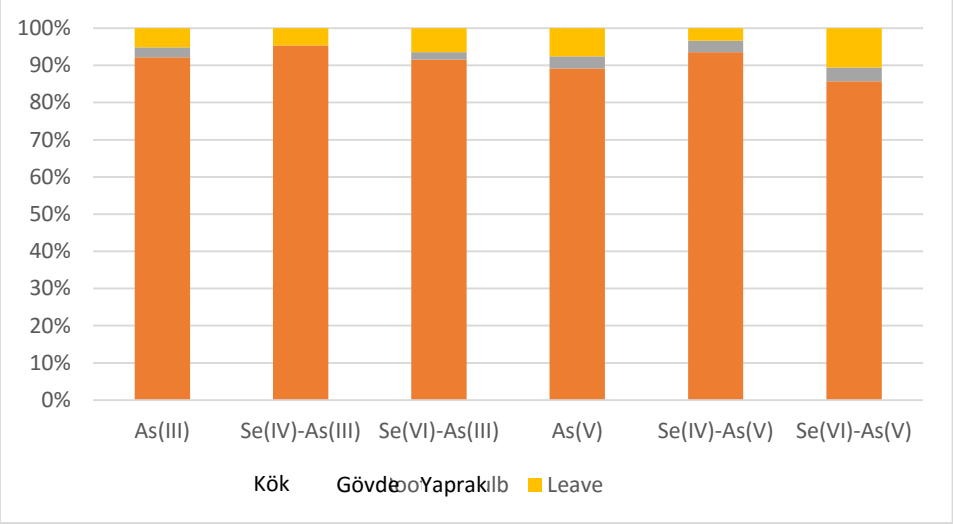
Tablo 12. Bitkilerin kök, gövde ve yapraklarında depolanan türlerine göre toplam As derişimleri.

Ekleme		**C_{As} ± s, mg/kg**
As(III)	Kök	2468 ± 239
	Gövde	34,9 ± 3,4
	Yaprak	50,7 ± 4,9
As(V)	Kök	1504 ± 146
	Gövde	20,2 ± 2,0
	Yaprak	45,6 ± 4,4
Se(IV) + As(III)	Kök	2027 ± 197
	Gövde	n.d.
	Yaprak	36,9 ± 3,6
Se(IV) + As(V)	Kök	2271 ± 220
	Gövde	25,3 ± 2,5
	Yaprak	29,9 ± 2,9
Se(VI) + As(III)	Kök	3362 ± 326
	Gövde	13,9 ± 1,3
	Yaprak	47,0 ± 4,6
Se(VI) + As(V)	Kök	2345 ± 228
	Gövde	31,9 ± 3,1
	Yaprak	83,6 ± 8,1

*n.d. Tayin sınırı altında



Şekil 7. Bitkilerin kök, gövde ve yapraklarında toplam As derişimi.



Şekil 8. Arseniğin bitkinin kök, gövde ve yaprak bölümlerindeki yüzdece kütle dağılımı.

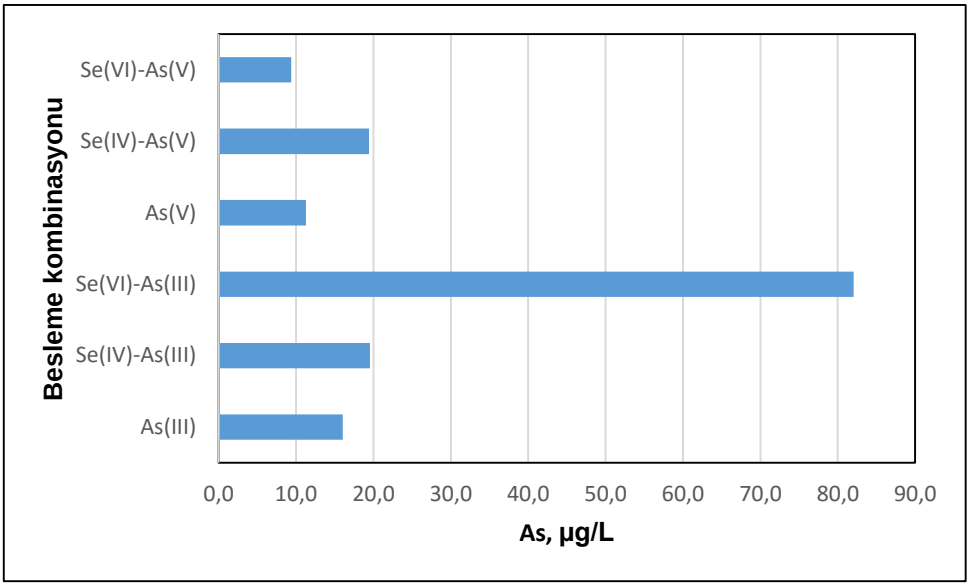
Şekil 7 ve Şekil 8'de verildiği gibi bitkide arsenik büyük ölçüde kök bölümünde, çok az bir kısmı ise gövde ve yapraklarda depolanmaktadır. Bu verilerden, bitkinin arseniği köklerde tutma eğilimi gösterdiği sonucuna varılabilir. Bu davranış arseniğin toksik etkisine karşı bitkinin geliştirdiği bir koruma mekanizması olarak da varsayılabilir. Bitki As türlerini kök bölümünde hapsederek gövde ve yapraklara geçişini sınırlamıştır. Yeşil soğan bitkisi dışında *Camellia sinensis L., Dryopteris filix-mas, Calluna vulgaris (L.) Hull, Alternanthera philoxeroides, Zea mays* ve *Helianthus annuus*, gibi bitkilerin de buna benzer davranışta

bulundukları rapor edilmiştir (Li vd., 2011; Larios vd., 2012; Neidhardt vd., 2012; Aldrich vd., 2007; Karak vd., 2011).

Diğer taraftan *Pteris vittata L.* ve *Agrostis capillaris L.* gibi arsenik hiperakümülatör bitkiler ise arseniği yapraklarında depolamayı tercih etmektedir (Bona vd., 2011; Zhang vd., 2002; Feng vd., 2009; Tripathi vd., 2007; Srivastava vd., 2009; Austruy vd., 2013; McSweeney ve Forbes, 2014). Arseniğin bitkinin hangi bölgesinde ve hangi oranlarda depolanacağının bitkiler arası farklılık gösterdiği bu çalışmalardan anlaşılmakta ve proje sonuçlarında da doğrulanmaktadır.

Şekil 7'de görüldüğü üzere arsenik selenyum ilişkisinde ise As(V)'in bitkilere Se(IV) veya Se(VI) ile birlikte verilmesi durumunda kökte depolanan arsenik derişimin arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum As(V) ve inorganik Se türleri arasında sinerjik bir etkileşim olduğuna dair bir işaret olarak değerlendirilebilir. Benzer bir sinerjik etki As(III) ve Se(VI) arasında da görülmektedir.

Besleme çözeltisinde kalan As miktarını belirlemek için bitkiler hasat edildikten sonra kalan çözeltinin hacmi 400 mL'ye tamamlanmış, süzülmüş ve toplam As derişimi tayin edilmiştir. Sonuçlar Şekil 9'da verilmiştir. Çözeltide kalan As miktarının deney başlangıcında eklenen miktara oranla çok düşük olduğu ve Se(VI)-As(III) ile beslenen bitkileri içeren çözeltideki As miktarının diğerlerine oranla 7 kat daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Arseniğin toksik bir element olmasına karşın büyük oranda bitki tarafından alındığı görülmektedir. Buradan bitkinin arseniği aldığı ancak daha sonra toksik etki gösteren elementleri kök bölümünde tuttuğu sonucuna varılabilir.



Şekil 9. Başlangıç değeri 1000 µg/L olan besleme çözeltisinde kalan As derişimleri.

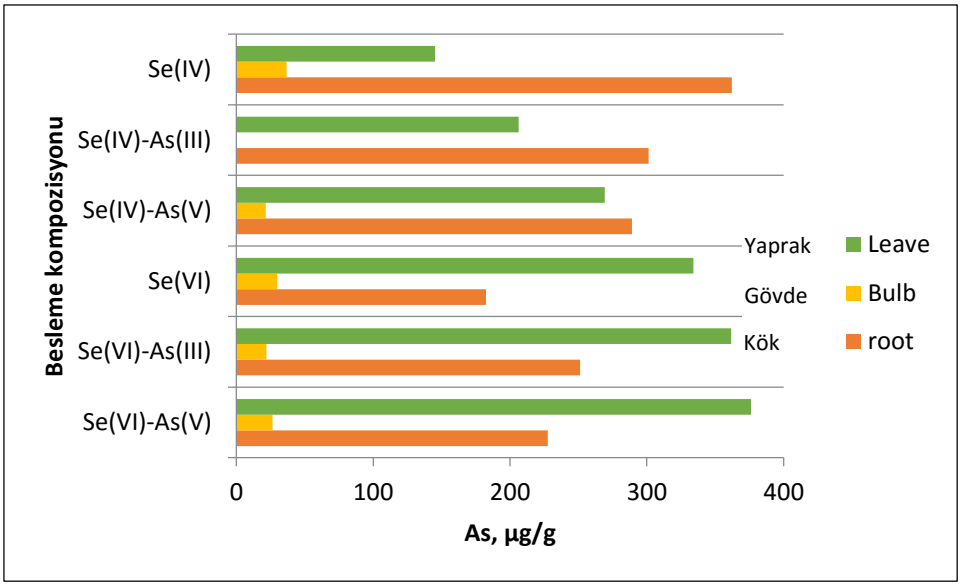
3.5 Selenyum Dağılımı

Bitki kök, gövde ve yaprak bölümündeki toplam selenyum derişimi hesaplanmış Tablo 13 ve Şekil 10'de verilmiştir. Besleme çözeltisinde Se(IV) bulunan durumlarda en yüksek Se derişimi kök bölümünde ölçülürken besleme çözeltisinde Se(VI) verilmesi durumunda en yüksek Se derişimi yaprak bölümünde ölçülmüştür. Bu davranış Se(IV)'ün kök bölümünde alımından sonra biyoyararlı bileşiklerine dönüştürülmesi ancak Se(VI)'nın dönüşüm oranının düşük olması ile açıklanabilir.

Tablo 13. Bitki kök, gövde ve yaprak bölümündeki toplam selenyum derişimi.

Ekleme		**C_{Se} ± s, mg/kg**
Se(IV)	Kök	362 ± 29
	Gövde	36,8 ± 3,0
	Yaprak	145 ± 12
Se(VI)	Kök	182 ± 15
	Gövde	30,0 ± 2,4
	Yaprak	334 ± 27
Se(IV) + As(III)	Kök	301 ± 24
	Gövde	n.d.
	Yaprak	206 ± 17
Se(IV) + As(V)	Kök	289 ± 23
	Gövde	21,5 ± 1,7
	Yaprak	269 ± 22
Se(VI) + As(III)	Kök	251 ± 20
	Gövde	21,9 ± 1,8
	Yaprak	362 ± 29
Se(VI) + As(V)	Kök	228 ± 18
	Gövde	26,3 ± 2,1
	Yaprak	376 ± 31

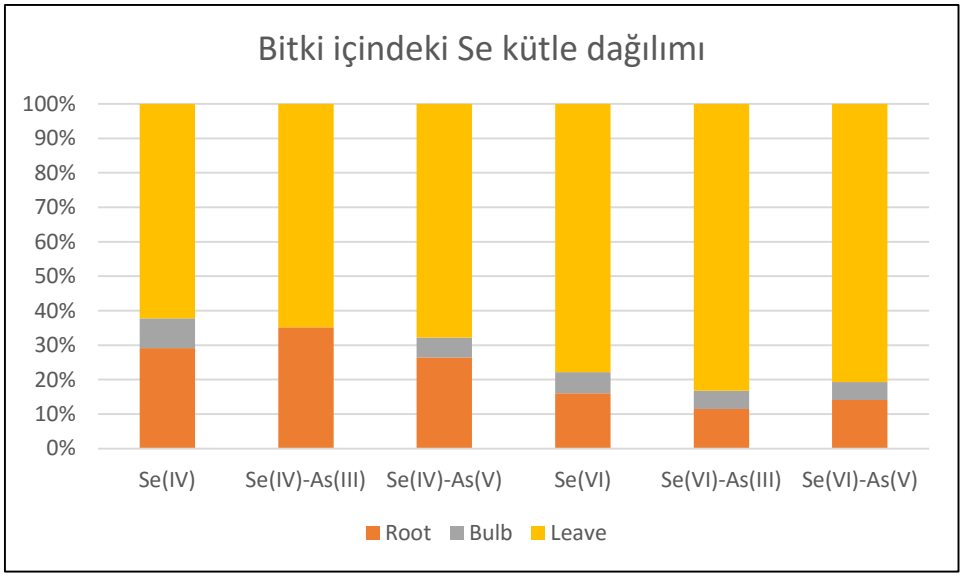
*n.d. Tayin sınırı altında



Şekil 10. 1,0 mg/L As ve/veya Se ile beslenen bitkilerde kök, gövde ve yapraktaki Se derişimleri.

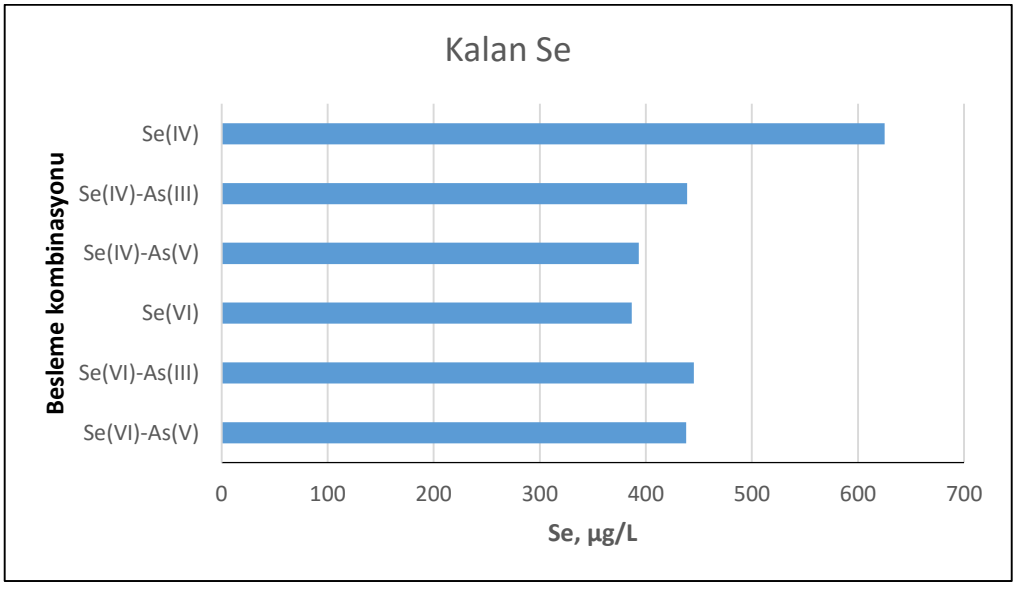
As(III) veya As(V)'in Se(IV) ile birlikte verildiği durumlarda kök bölümündeki Se derişimin azaldığı, yaprak bölümündeki Se derişimimin ise arttığı gözlemlenmektedir. Bu bulgulara dayanarak arseniğin selenyum türlerinin organoselenyuma dönüşmesini azalttığı dolayısıyla daha çok selenyumun arsenik derişimi görece düşük olan yaprak bölümüne geçerek orada organoselenyum türlerine dönüştüğü söylenebilir.

Selenyumun kök, gövde ve yapraktaki yüzdece kütle dağılımı Şekil 11'de verilmiştir. Bu grafikte selenyumun en çok yapraklarda depolandığı, gövde bölümünde depolanan selenyum miktarının ise çok düşük olduğu görülmektedir.



Şekil 11. Kök, gövde ve yapraktaki kütlece yüzde Se dağılımı.

Hasat zamanı besleme çözeltisinde kalan Se derişimi hesaplanmış ve Şekil 12'te verilmiştir. Bu grafikten arsenikten farklı olarak selenyumun yarıya yakın bir bölümünün besleme çözeltisinde kaldığı görülmektedir. Ayrıca, As(III) ve As(V) varlığında Se(IV) alımının daha az olduğu, Se(VI) alımının ise etkilenmediği görülmektedir.



Şekil 12. Başlangıç değeri 1000 µg/L olan besleme çözeltisinde kalan Se derişimleri.

3.6 Özütleme İşlemi Optimizasyonu

Özütleme işlemi türlendirme çalışmalarında önemli bir yer tutmaktadır. Türlendirme çalışmasındaki başarı, yüksek verime sahip ve örnekteki tür bozulmamış şekilde çözeltiye aktaran bir özütleme işlemiyle mümkün olabilir. Bu amaçla bu projede farklı çözgenler denenmiştir. Örnek miktarlarının az olması nedeni ile özütleme prosedürünün optimizasyonu için referans olarak kullanılmak üzere yetiştirilen örneklerin yaprak bölümlerinden yaklaşık 100-150 mg örnek alınarak homojenleştirilmiş ve tüm özütleme işleminin optimizasyonunda bu örnek kullanılmıştır. Verim hesabı yapabilmek için homojen örnekteki toplam As ve Se derişimi öncelikle mikrodalga etüv ile türlerin korunması düşünülmeden tayin edilmiştir. Daha sonra NaOH, metanol-su karışımı, fosfat tamponu, tris-HCl tamponu ve enzim içeren fosfat tamponları ile özütleme işlemi gerçekleştirilmiş ve Tablo 14'de belirtilen özütleme verimleri hesaplanmıştır aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Özütleme Verimi} = \frac{\text{Özütleme derişimi}}{\text{Toplam derişim}} \text{x} 100\%$$

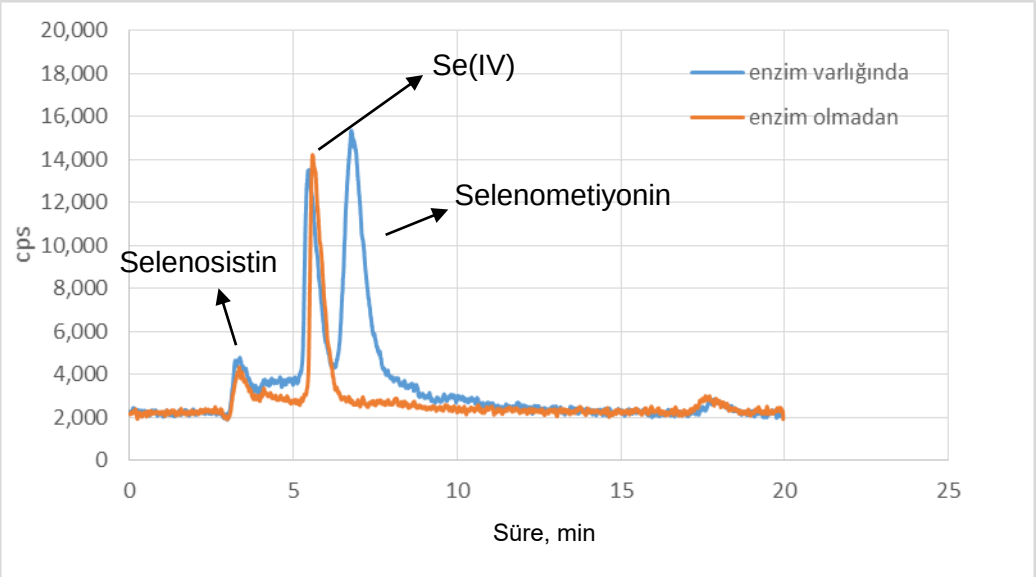
Tablo 14. Farklı çözgenler için As ve Se özütleme verimleri.

Çözgen	As özütleme verimi, %*	Se özütleme verimi, %*
0,10 mol/L NaOH	86	46
metanol-su karışımı (1+3, h+h)	94	59
25 mmol/L fosfat tamponu, pH 7,5	86	30
50 mmol/L tris-HCL tamponu, pH 7,5	88	34
25 mmol/L fosfat tamponu + Proteaz type XIV enzimi, pH 7,5	99	83

* N=2, RSD < %3,5

Sonuçlar arseniğin denenen tüm çözücülerle yüksek bir verimle çözelti ortamına alınabildiğini göstermektedir. En yüksek verim enzim içeren özütleme işlemi ile elde edilmiştir. Bu sonuç arseniğin büyük oranda bitkide serbest halde bulunduğunu, kalan kısmının da proteinlere bağlı olduğuna işaret etmektedir. Diğer taraftan selenyum özütlemesinde en düşük verim fosfat tamponu ile elde edilirken, fosfat tamponuna enzim eklendiği zaman ise en yüksek verim elde edilmiştir. Enzimin Se özütleme verimliliğini arttırması, selenyumun önemli bir kısmının suda çözünmeyen proteinlere bağlı olarak bulunduğunun bir göstergesidir.

Özütlenen örnekler, proteinlere bağlanmış As ve Se türlerini belirlemek amacıyla HPLC-ICP-MS sistemi ile analiz edilmiştir. Şekil 13'te verilen kromatogramlar incelendiğinde, Se(IV) ve selenosistin sinyalleri hem enzim içeren hem de içermeyen fosfat tamponu ile görülebilirken, selenometiyonin sinyali ise yalnızca enzim içeren fosfat tamponu taşıyıcı faz olarak kullanıldığında gözlemlenmiştir.



Şekil 13. Örneklerin fosfat tampon ile proteaz type XIV enzim varlığında ve enzim olmadan alınan kromatogramları.

Bu sonuç selenometiyoninin proteinlerin yapısında bulunduğunu göstermektedir. Montes-Bayon ve arkadaşları selenyum türlerinin selenyum ile zenginleştirilmiş bitkilerden özütlenmesi ile ilgili yaptıkları çalışmada selenometiyoninin proteaz enzimi varlığında yüksek verimle özütlendiğini göstermiştir (Montes-Bayón vd., 2006).

HPLC-ICP-MS analiz sonuçları etkin bir özütleme işlemi için enzim kullanılmasının gerekli olduğunu göstermektedir. En yüksek verimi sağlayan enzimin bulunması amacı ile özütleme işlemi pH 7,5 fosfat tamponu ortamında proteaz type XIV, tripsin, proteinaz K, pankreatin ve drisilaz enzimleri ile denemiş ve

Tablo 15’da verilen özütleme verimleri elde edilmiştir.

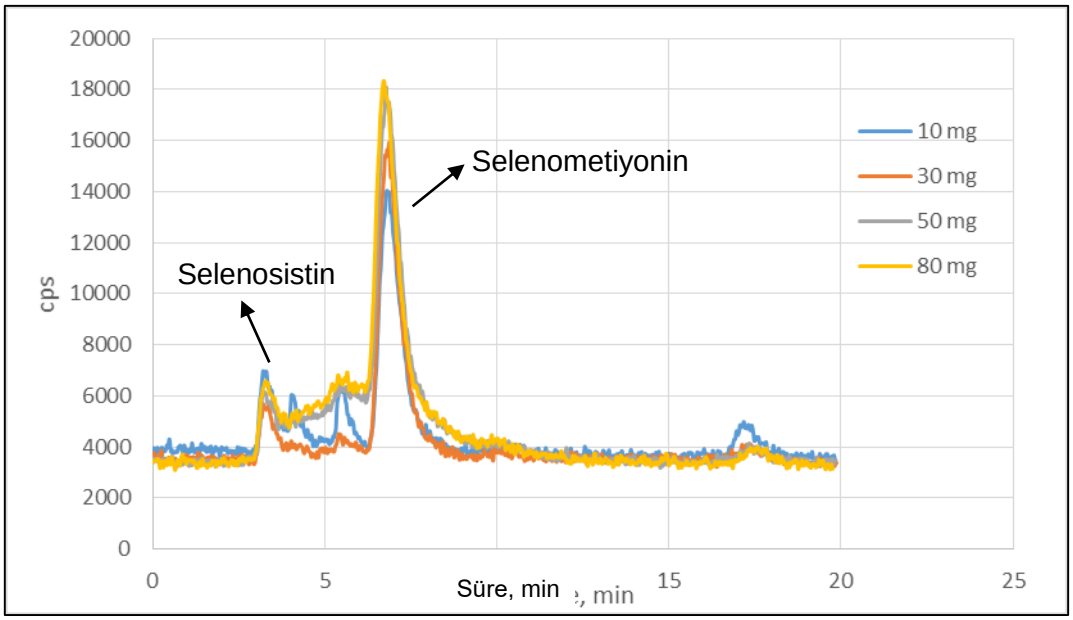
Tablo 15. Farklı enzimler için Se özütleme verimi.

Enzim	Se için özütleme verimi, % *
Proteaz type XIV	82
Tripsin	28
Proteinaz K	55
Drisilaz	26
Pankreatin	85

* N=2, RSD < %4,5

En yüksek özütleme verimi Proteaz type XIV ve pankreatin kullanıldığında elde edilmiştir. Ancak, pankreatin sadece tripsin türevi enzimleri içerirken proteaz type XIV Streptomyces griseus Proteaz A, Streptomyces griseus Proteaz B ve Streptomyces griseus Trypsin gibi enzimleri de içermektedir. Farklı proteinlere bağlı olan Se türlerini özütleyebildiğinden dolayı ve literatürde kullanımının daha yaygın olması sebebi ile Proteaz type XIV bundan sonraki deneylerde özütleme basamağında enzim olarak kullanılmıştır (Gergely vd., 2006; Hsieh ve Jiang 2013; Kápolna vd., 2009; Kapolna vd., 2007).

Yüksek verimli bir özütleme prosedürü için bir diğer önemli nokta da kullanılan enzimin miktarıdır. Enzim miktarı 10 mg ile 80 mg arasında 4 farklı miktarda denenmiş ancak özütleme veriminde %99 aralığında Grubbs test uygulandığında sonuçlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ancak, örneklerin HPLC-ICP-MS ile analizinde 50 mg ve daha fazla enzim kullanıldığında zemin sinyalinin arttığı Şekil 14'te görülmektedir. 30 mg enzim kullanıldığında zemin sinyali 10 mg enzim içeren ortamın sinyali ile aynı değerde kalmaktadır; ancak, sinyal yüksekliği 30 mg için daha fazladır. Bu nedenle daha sonraki deneylerde 30 mg enzim kullanılmıştır.



Şekil 14. 10, 30, 50 ve 80 mg enzim kullanılarak özütlenmiş örneklerin AE-HPLC-ICP-MS kromatogramları.

3.7 HPLC-ICP-MS Optimizasyonları

Bu proje kapsamında 5 selenyum türü, Se(IV), Se(VI), selenometiyonin, selenosistin, selenometil selenosistin, ve 2 arsenik türü, As(III) ve As(V), hedef As ve Se türleri olarak seçilmiştir. Bu yedi türün aynı kromatogramda gözlenebilir olduğu ve en iyi S/N değerini elde etmek için HPLC-ICP-MS sisteminin optimizasyonu yapılmıştır.

3.7.1 İyon Eşleştirici HPLC

İyon eşleştirici kromatografide ayırım işlemi için genellikle C18 veya C8 gibi ters faz kolonlar kullanılır. Bu tür kolonlar moleküller yanında iyon eşleştirici ajanlar yardımı ile iyonik türlerin de ayırılmasını sağlar. Bu çalışmada farklı kolonlar farklı taşıyıcı fazlarla birlikte denenmiştir. Denenen kolonlar ve deney parametreleri

Tablo 16’de verilmiştir.

Tablo 16. İyon eşleştirici sıvı kromatografi optimizasyon parametreleri.

Kolon	Akış hızı, mL/min	Taşıyıcı faz
Altima C8	1,0	%0,5 (h/h) Heptaflorobutrik asit, %5 (h/h) metanol, pH 3,6
Altima C8	1,0	%0,2 (h/h) Heptaflorobutrik asit, %2 (h/h) metanol, pH 2,5
Dionex C18	1,0	%0,2 (h/h) Heptaflorobutrik asit, %2 (h/h) metanol, pH 2,5
Dionex C18	1,0	%0,1 (h/h) Trifloro asetik asit, %2 (h/h) metanol
Dionex C18	1,0	%0,1 (h/h) Trifloro asetik asit, 50 mM fitalat tampon çözeltisi, pH 5,8, %2 (h/h) metanol
Dionex C18	1,5	4 mM Tributilamonyum fosfat, 4 mM diamonyum hidrojen fosfat fosfat tampon çözeltisi, pH 5,8, %2 (h/h) metanol
Dionex C18	1,0	10 mM Tributilamonyum fosfat, 5 mM diamonyum hidrojen fosfat fosfat tampon çözeltisi, pH 6,1, %1,5 (h/h) metanol

Tablo 16'deki parametreler hedef As ve Se türlerinin tümünü aynı anda tamamen ayıramamıştır. Tributilamonyum fosfat gibi büyük molekül ağırlıklı iyon eşleştirici bir ajanın kullanımı ile inorganik türlerin, Se(IV), Se(VI), As(III) ve As(V), ayırılması sağlanırken organik türlerin, selenometiyonin, selenosistin, selenometil selenosistein, ayırımında başarılı olunamamıştır. Bunun aksine, küçük molekül ağırlığa sahip trifloro asetik asit taşıyıcı faz olarak kullanıldığında organik türlerin, selenometiyonin, selenometil selenosistein ayırımı sağlanmış ancak inorganik türlerin, Se(IV), Se(VI), As(III) ve As(V), ayırımında başarılı olunamamıştır.

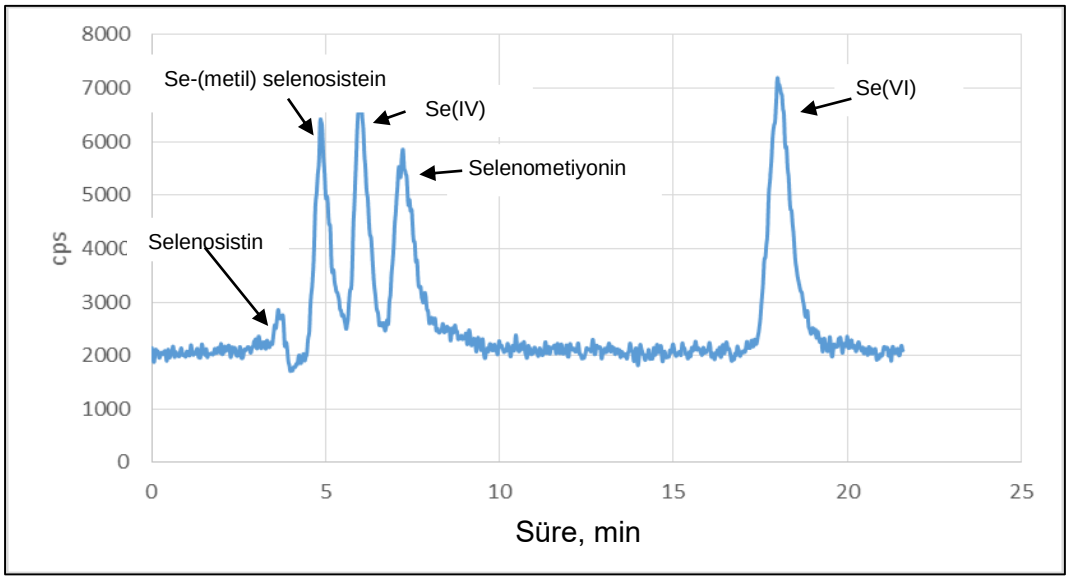
3.7.2 Anyon Değiştirici HPLC

Beş selenyum ve iki arsenik türü ayırımı için farklı taşıyıcı faz birleşimleri denenmiş ve kullanılan parametreler Tablo 17'de verilmiştir.

Amonyum Fosfat Taşıyıcı Fazı:
İlk olarak %5 (h/h) metanol içeren ve farklı pH değerlerine sahip amonyum fosfat tampon çözeltisi denenmiştir. Şekil 16'daki kromatogramda da görüleceği gibi As(III) ve As(V) türleri pH 9,0'da 8 dakika içinde birbirlerinden ayırılabilirken, selenosistin ve selenometiyonin türleri 40 dakikada kolondan elüe olmamışlardır. pH değeri 7,0'a düşürüldüğünde ise ayırılmanın daha iyi olduğu, As(III) ve As(V)'in ayırıldığı ancak Se türlerinin sinyallerinin tamamen ayırılamadığı gözlemlenmiştir.

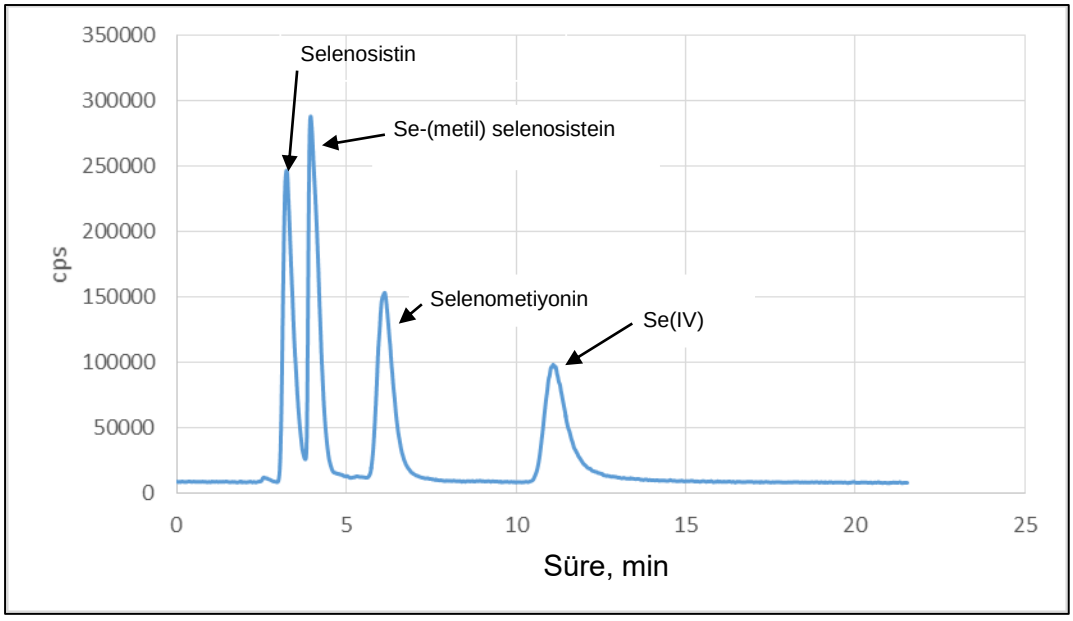
Tablo 17. Birinci taşıyıcı fazın çalışma şartları, AE-HPLC.

Taşıyıcı faz	50 mM amonyum fosfat tampon çözeltisi, %5 (h/h) metanol
Akış hızı	1,0 mL/min
pH değerleri	5,0, 7,0, 9,0
Kolon	Hamilton PRP-X100 kuvvetli anyon değiştirici



Şekil 15. Her tür için 200 ng/mL Se içeren selenyum standart çözeltisi ile pH 7,0'da %5 (h/h) metanol içeren 50 mM amonyum fosfat tampon çözeltisi kullanıldığında elde edilen AE-HPLC-ICP-MS kromatogramı.

En düşük pH değeri olan pH 5,0'da ise As türlerinin sorunsuz olarak ayrıldığı, Se türlerinin birbirinden ayrıldığı ancak Se(VI)'nın 30 dakikada kolondan elüe olmadığı görülmüştür (Şekil 16).



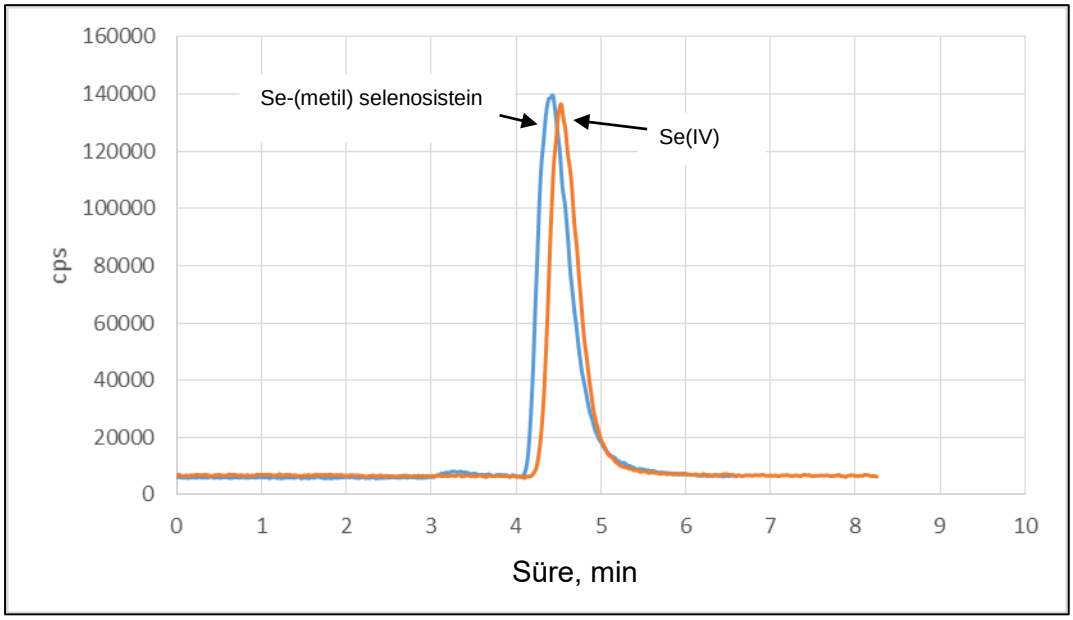
Şekil 16. Her tür için 200 ng/mL Se içeren selenyum standart özeltisi ile pH 5,0'da %5 (h/h) metanol içeren 50 mM amonyum fosfat tampon çözeltisi kullanıldığında elde edilen AE-HPLC-ICP-MS kromatogramı.

Amonyum Sitrat Taşıyıcı Fazı:

İkinci taşıyıcı faz sistemi pH değerleri 5,0, 5,5 ve 6,5 olan amonyum sitrat tampon çözeltisidir (Tablo 18). pH 6,5'ta, Se(IV) ve selenometil selenosistin dışında bütün türler ayırılmıştır. Bu iki türün kolonda alıkonma süreleri birbirine çok yakın olduğu için zemin sinyalleri ayırılamamıştır (Şekil 17).

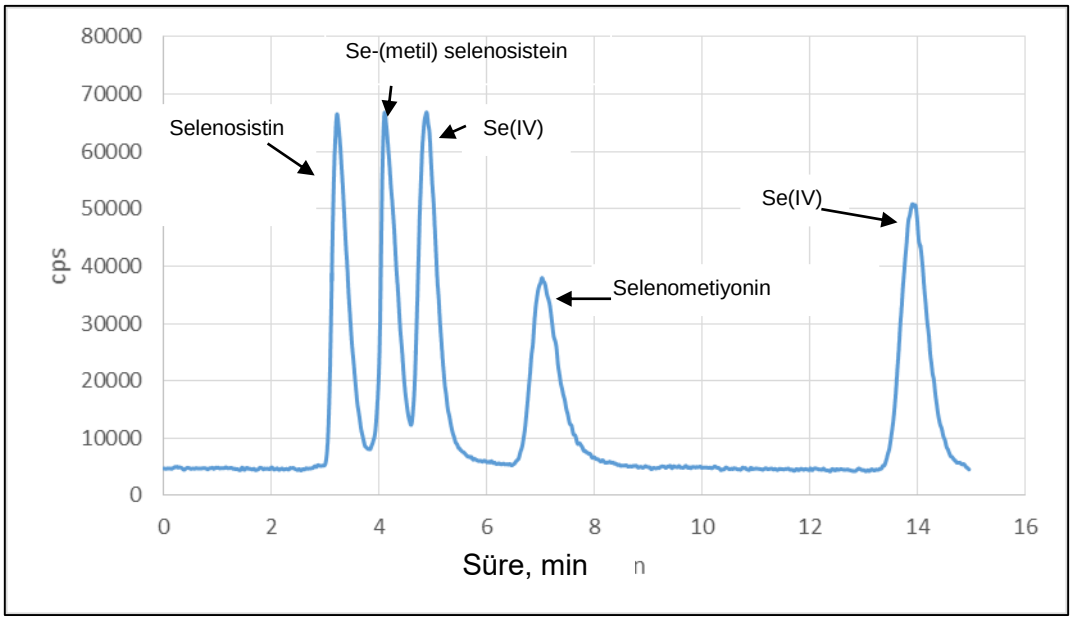
Tablo 18. İkinci taşıyıcı fazın çalışma şartları.

Taşıyıcı faz	5 mM amonyum sitrat tampon çözeltisi, %2 (h/h) metanol
Taşıyıcı faz akış hızı	1,0 mL/min
pH değerleri	5,0, 5,5, 6,5
Kolon	Hamilton PRP-X100 kuvvetli anyon değiştirici

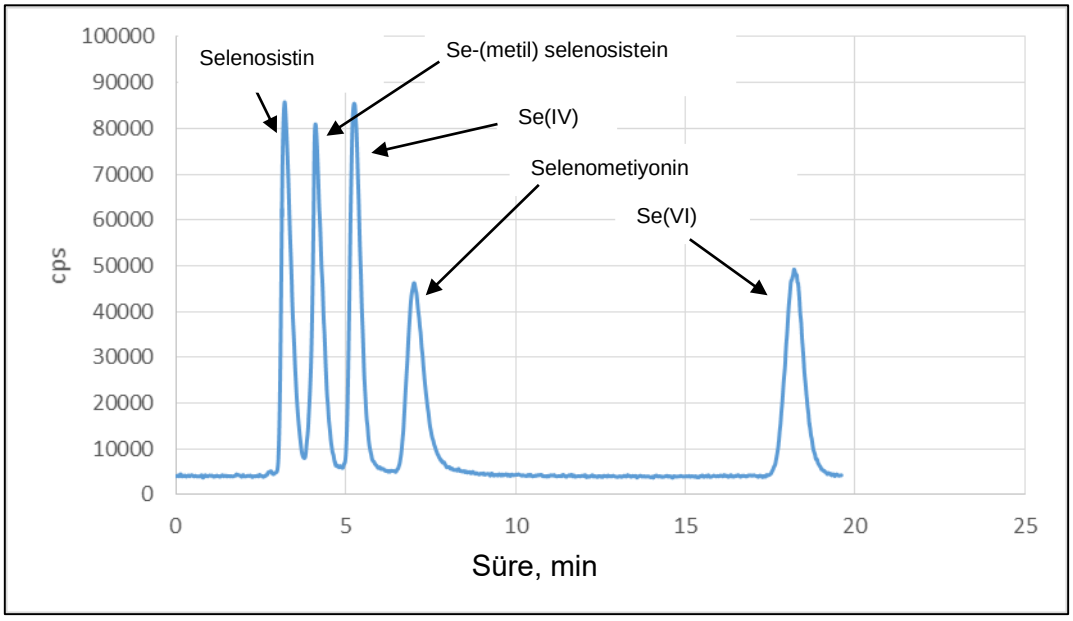


Şekil 17. Her tür için 200 ng/mL Se içeren selenyum standart çözeltisi ile pH 6,5'da amonyum sitrat tampon çözeltisi kullanılarak elde edilen Se(IV) ve selenometil selenosistein türlerinin AE-HPLC-ICP-MS kromatogramları.

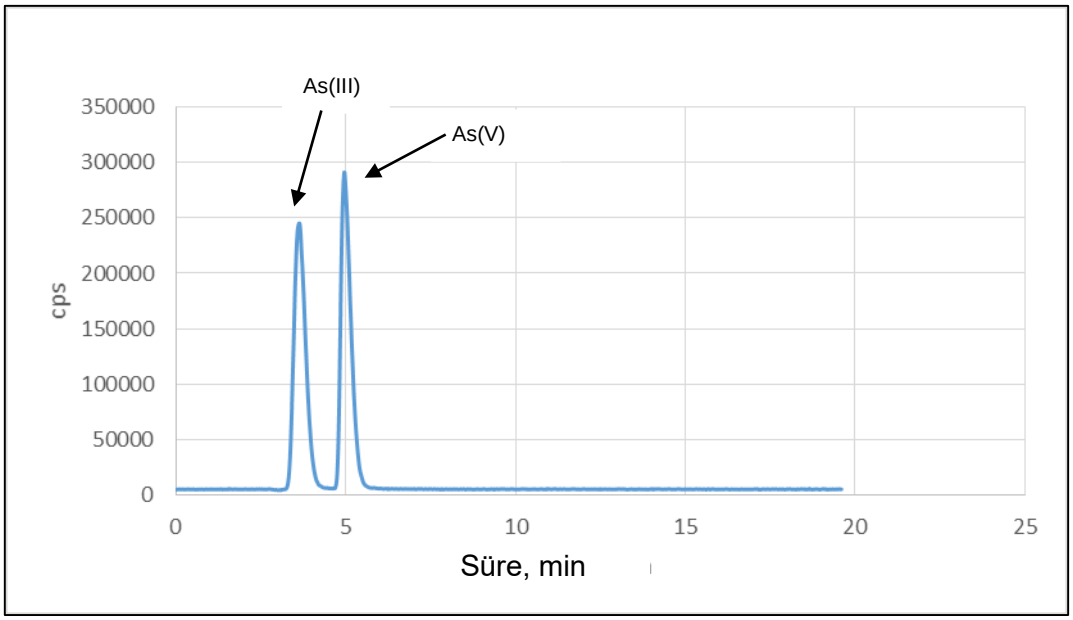
pH 5,5'de ayırma pH 6,5 değerine göre daha iyi olmakla birlikle (Şekil 18), pH 5,0 selenyum ve arsenik türlerinin ayırımı için tüm pH değerleri arasında en yüksek başarıyı sağlamıştır (Şekil 19 ve Şekil 20).



Şekil 18. Her tür için 200 ng/mL Se içeren selenyum standart çözeltisi ile pH 5,5'de, 5 mM amonyum sitrat tampon çözeltisi kullanıldığında elde edilen AE-HPLC-ICP-MS kromatogramı.

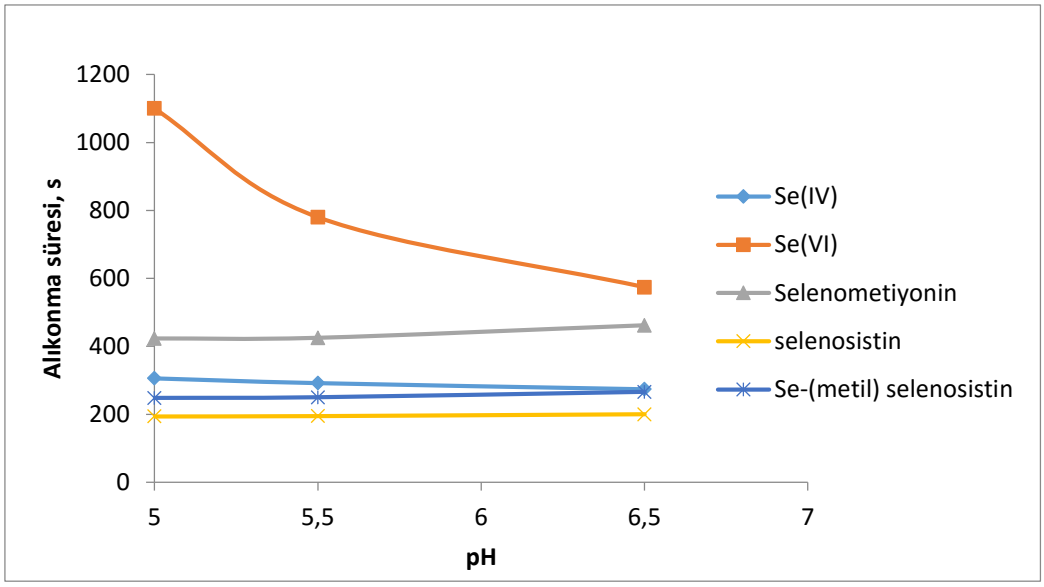


Şekil 19. Her tür için 200 ng/mL Se içeren selenyum standart çözeltisi ile pH 5,0'da 5 mM amonyum sitrat tampon çözeltisi kullanıldığında elde edilen AE-HPLC-ICP-MS kromatogramı.

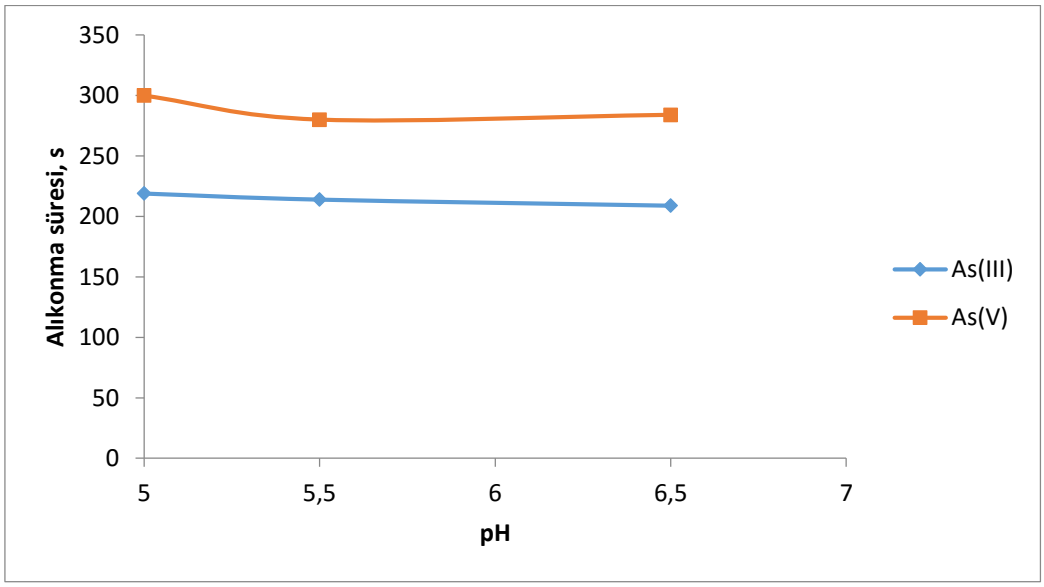


Şekil 20. Her tür için 200 ng/mL As içeren arsenik standart çözeltisi ile pH 5,0'da 5 mM amonyum sitrat tampon çözeltisi kullanıldığında elde edilen AE-HPLC-ICP-MS kromatogramı.

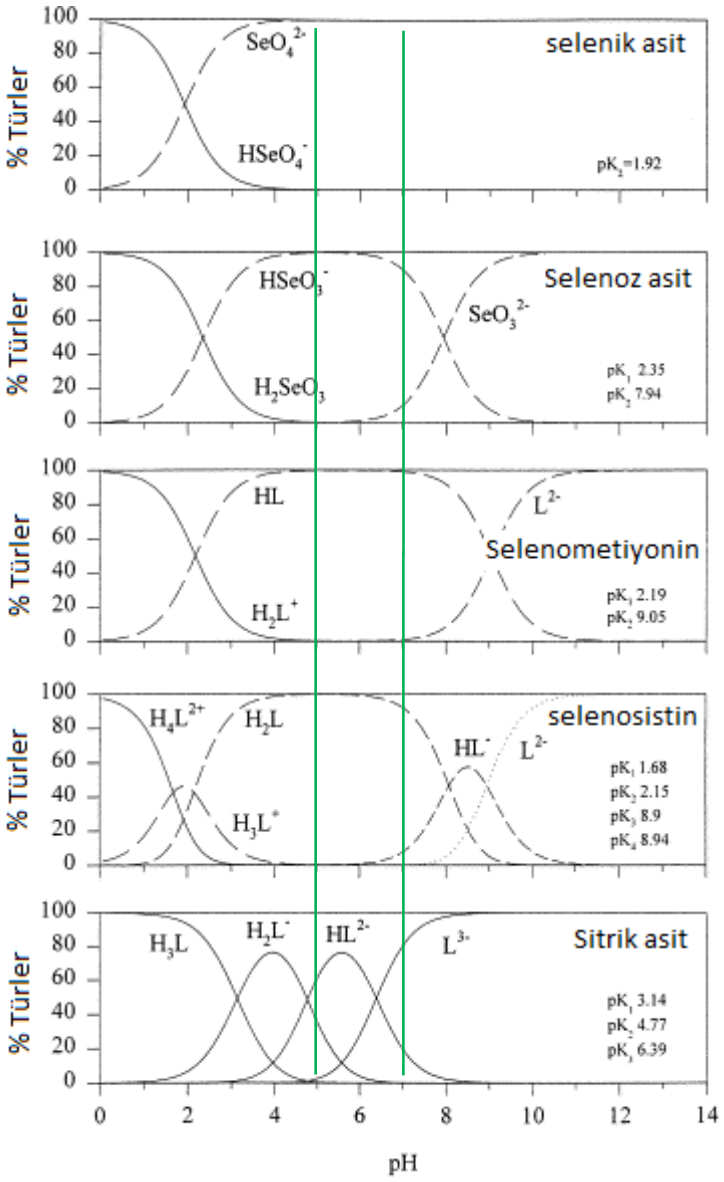
Selenyum ve arsenik türlerinin alıkonma sürelerinin pH ile değişimi Şekil 21 ve Şekil 22'te verilmiştir. Baskın selenyum tür derişimlerinin pH değeriyle değişimleri Şekil 23'de verilmektedir. pH değerindeki artış ile Se(VI) türünün alıkonma süresi belirgin bir biçimde azalmıştır. Se(VI), pH 5,0-6,5 aralığında baskın olarak SeO_4^{2-} iyonu olarak bulunmaktadır ve eksi yükü arttığı için pH değeri arttıkça alıkonma süresinin artması beklenmektedir. Ancak, pH artarken taşıyıcı fazdaki sitrat anyonu da baskın tür haline gelmektedir (Şekil 23). Selenit ve selenat iyonlarının alıkonma sürelerindeki azalma, sabit fazın fonksiyonel gruplarının selenit, selanat ve sitrat iyonları tarafından doldurulma rekabetine dayandırılabilir.



Şekil 21. pH'ın selenyum türlerinin alıkonma süreleri üzerine etkisi. 5 mM amonyum sitrat tampon çözeltisi, Hamilton PRP-X100 kuvvetli anyon değiştirici kolon ile birlikte kullanıldı.



Şekil 22. pH'ın As(III) ve As(V) türlerinin alıkonma süreleri üzerine etkisi. 5 mM amonyum sitrat tampon çözeltisi, Hamilton PRP-X100 kuvvetli anyon değiştirici kolon ile birlikte kullanıldı.

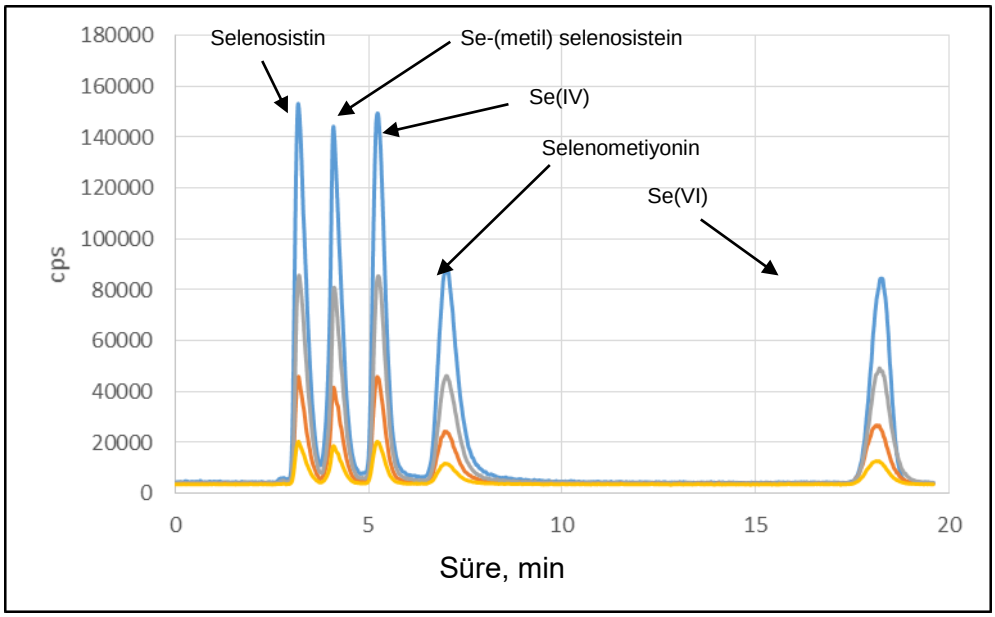


Şekil 23. Se türlerinin ve sitrik asitin pH 0-14 aralığında iyon dağılımı. Çalışma aralığı yeşil çizgilerle gösterilmiştir (Stadlober vd., 2001).

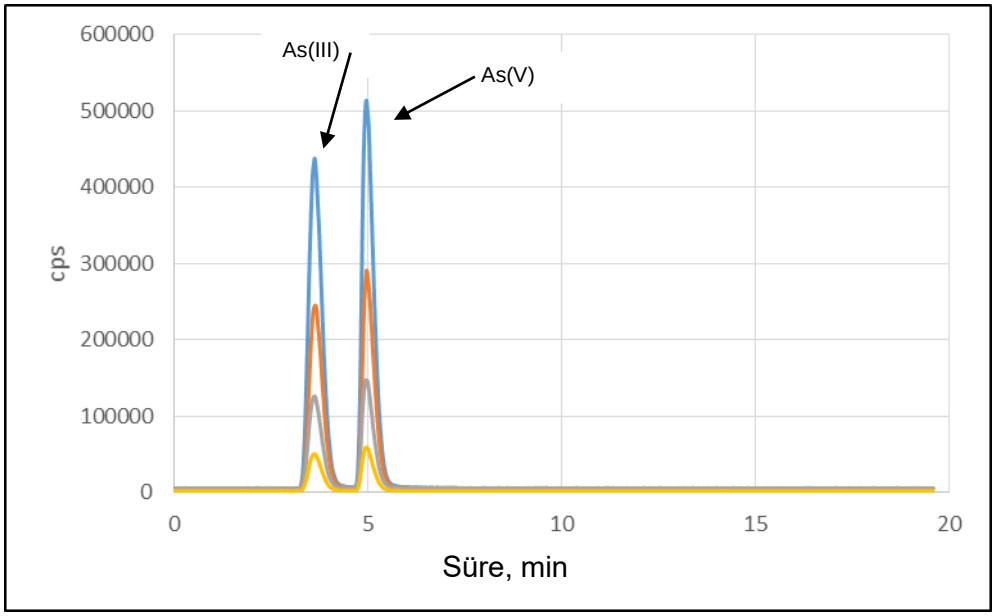
Sonuç olarak kuvvetli anyon değiştirici kolon ile birlikte %2 (h/h) metanol içerisinde hazırlanmış ve pH değeri 5,0 olan 5,0 mM amonyum sitrat tampon çözeltisinden oluşan taşıyıcı faz kullanılarak hedef türler birbirlerinden ayırılmışlardır.

3.8 Analitik Performans

Geliştirilen AE-HPLC-ICP-MS metodunun analitik performansını değerlendirmek için As ve Se standartları enjekte edilmiş ve her bir türe ait pik alanları hesaplanarak kalibrasyon doğruları oluşturulmuştur. Farklı derişimlerde Se ve As içeren karışım standartlarının üst üste çakıştırılmış kromatogramları Şekil 24 ve Şekil 25'da verilmiştir.

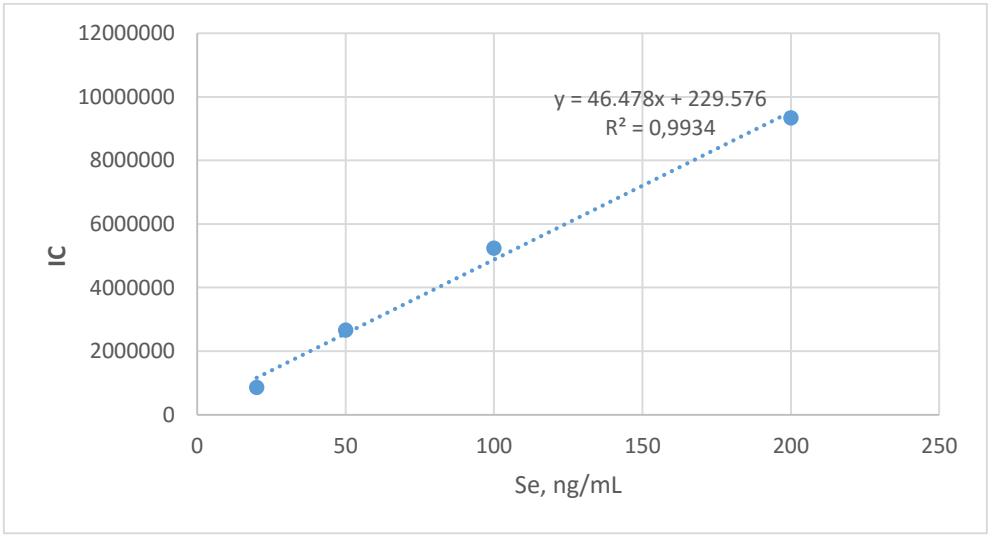


Şekil 24. 200 µg/L, 100 µg/L, 50 µg/L ve 20 µg/L derişimlerde Se türleri içeren karışım standartların üst üste çakıştırılmış AE-HPLC-ICP-MS kromatogramları.

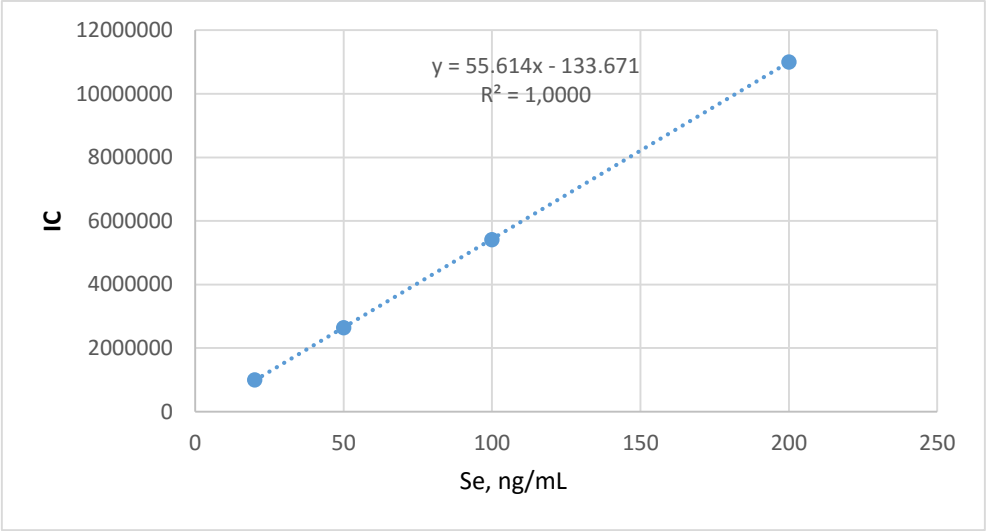


Şekil 25. 200 µg/L, 100 µg/L, 50 µg/L ve 20 µg/L As türleri içeren karışım standartların üst üste çakıştırılmış AE-HPLC-ICP-MS kromatogramları.

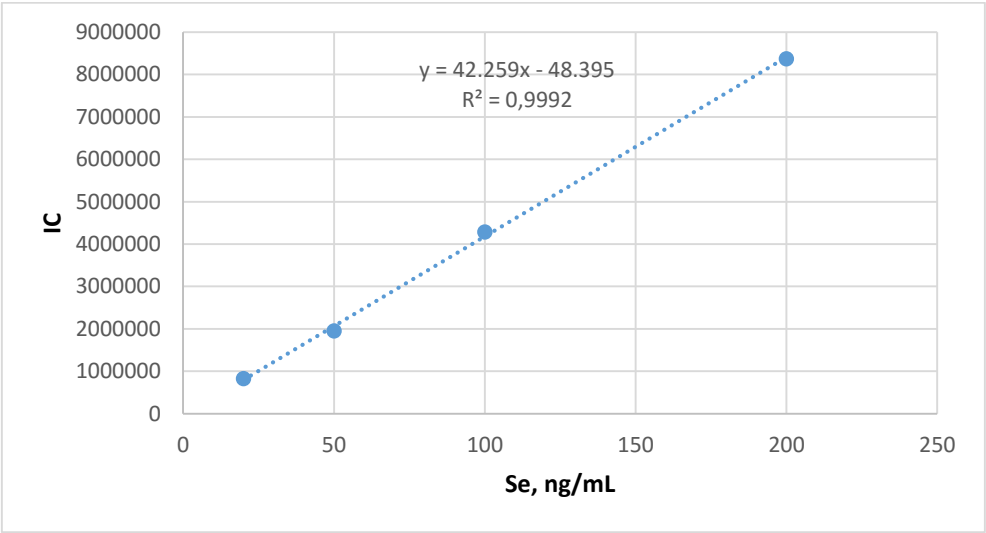
Se(IV), Se(VI), selenometiyonin, selenosistin, selenometil selenosistein türlerine ait kalibrasyon doğruları, doğru denklemleri ve R^2 değerleri sırası ile Şekil 26, Şekil 27, Şekil 28, Şekil 29 ve Şekil 30'de verilmiştir.



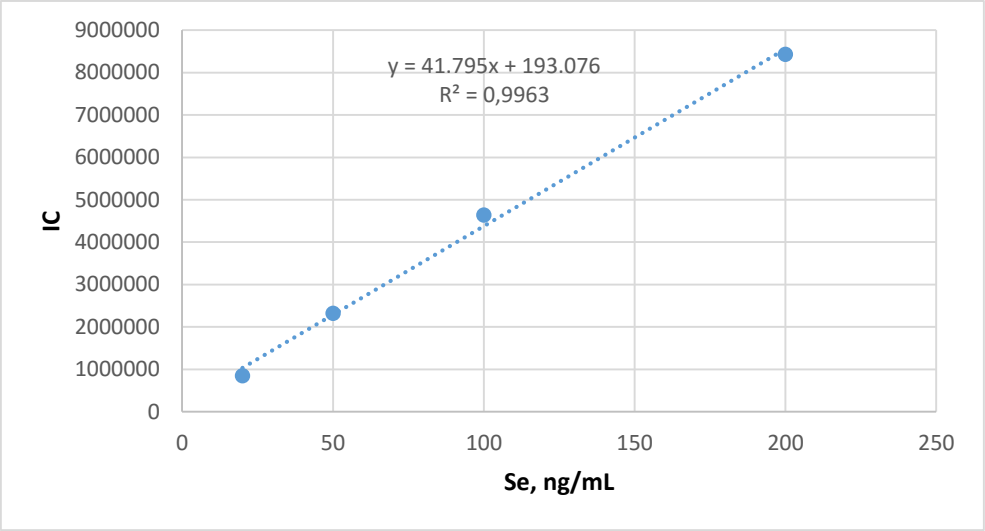
Şekil 26. Se(IV) türüne ait AE-HPLC-ICP-MS için kalibrasyon doğrusu.



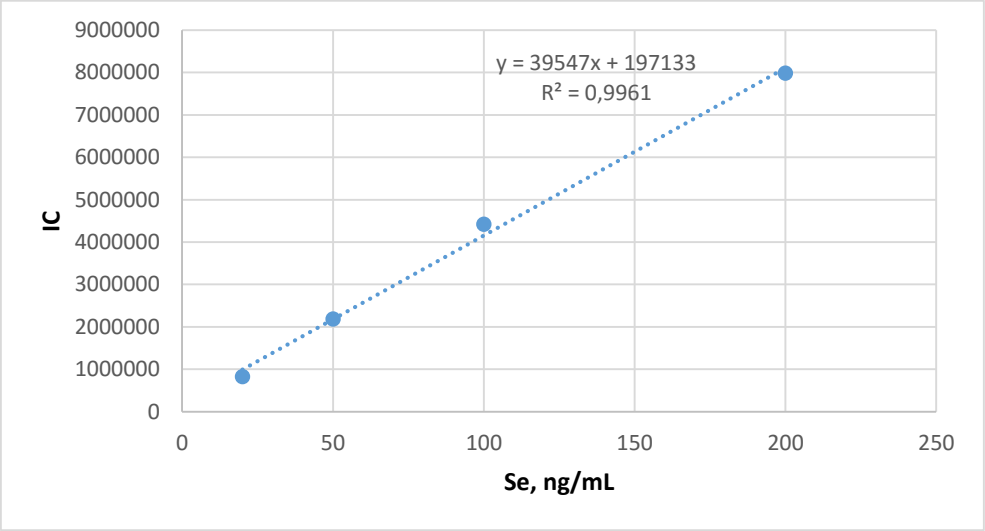
Şekil 27. Se(VI) türüne ait AE-HPLC-ICP-MS için kalibrasyon doğrusu.



Şekil 28. Selenometiyonin türüne ait AE-HPLC-ICP-MS için kalibrasyon doğrusu.



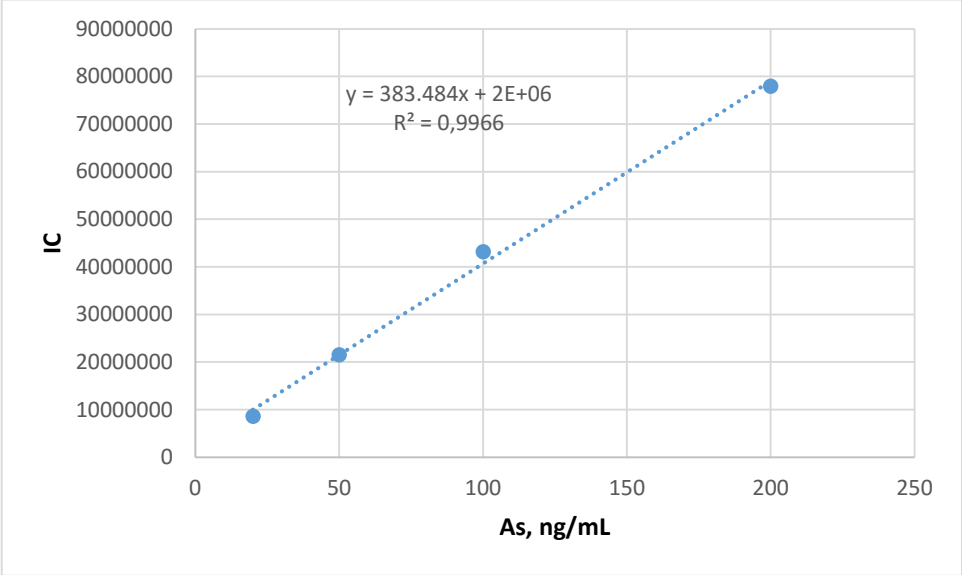
Şekil 29. Selenosistin türüne ait AE-HPLC-ICP-MS için kalibrasyon doğrusu.



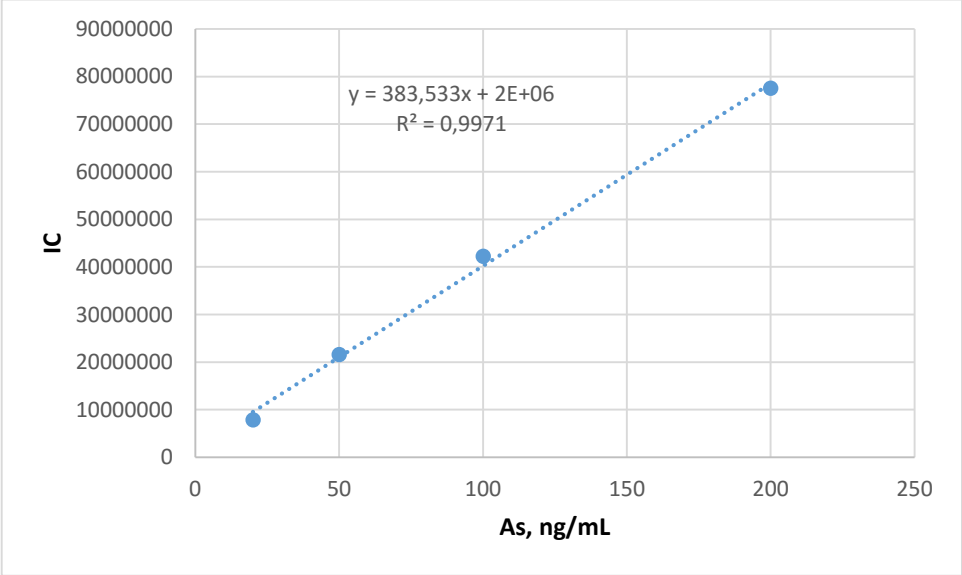
Şekil 30. Selenometil selenosistein türüne ait AE-HPLC-ICP-MS için kalibrasyon doğrusu.

Doğru denklemlerinden, metodun inorganik selenyum türleri için organik selenyum türlerinden daha hassas olduğu söylenebilir. Hassasiyetteki farklılıklar türlerin sisleşme verimindeki farklardan ve kolon içerisindeki alıkonma mekanizmalarından kaynaklanabilir.

Benzer şekilde As(III) ve As(V) türleri için kalibrasyon doğruları çizilip doğru denklemleri bulunmuş ve Şekil 31 ve Şekil 32'te verilmiştir. İki türün de geliştirilen metotta benzer hassasiyette olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 31. Optimum AE-HPLC-ICP-MS koşullarında As(III) türüne ait kalibrasyon doğrusu.



Şekil 32. Optimum AE-HPLC-ICP-MS koşullarında As(V) türüne ait kalibrasyon doğrusu.

Her bir türe ait gözlenebilme sınırı ve tayin sınırı hesaplanması için 5,0 ng/mL derişimindeki karışık standart çözelti ile 5 defa kromatogram alınmıştır. Sonuçlar

Tablo 19’ de verilmiştir.

Tablo 19. AE-HPLC-ICP-MS sistemiyle elde edilmiş arsenik ve selenyum türlerine ait gözlenebilme ve tayin sınırları.

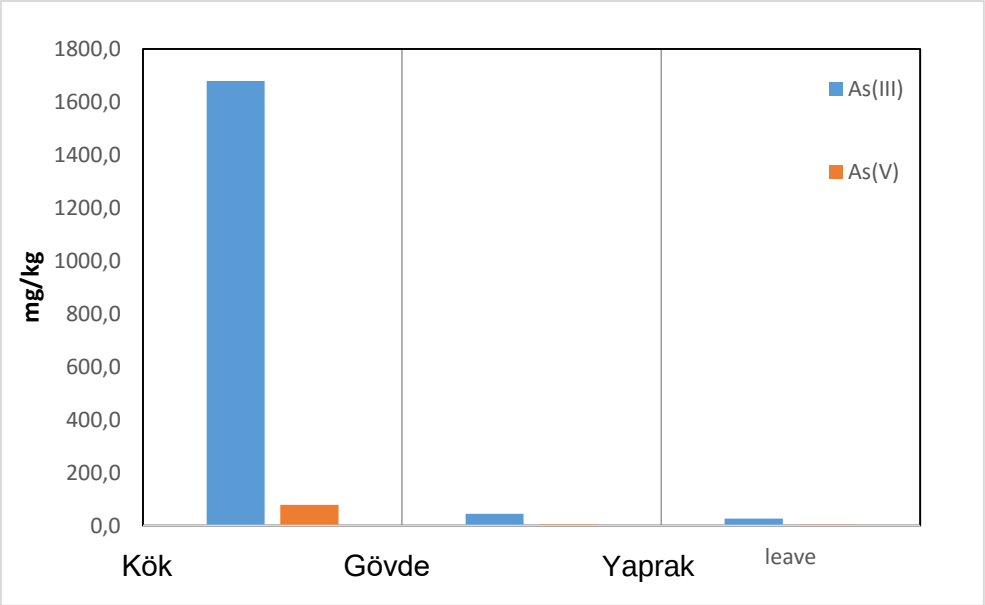
Tür	LOD, 3s/m, µg/L	LOQ, 10s/m, µg/L	LOD, 3s/m, µg/g	LOQ, 10s/m, µg/g
As(III)	0,52	1,73	0,04	0,12
As(V)	0,61	2,03	0,04	0,14
Se(IV)	0,92	3,07	0,06	0,21
Se(VI)	0,88	2,93	0,06	0,21
Selenometiyonin	1,00	3,34	0,07	0,23
Selenosistin	0,91	3,03	0,06	0,21
Selenometil selenosistein	1,49	4,98	0,10	0,35

LOD: Gözlenebilme sınırı, LOQ: Tayin sınırı

3.9 Soğan Örneklerinin Türlendirme Çalışmaları

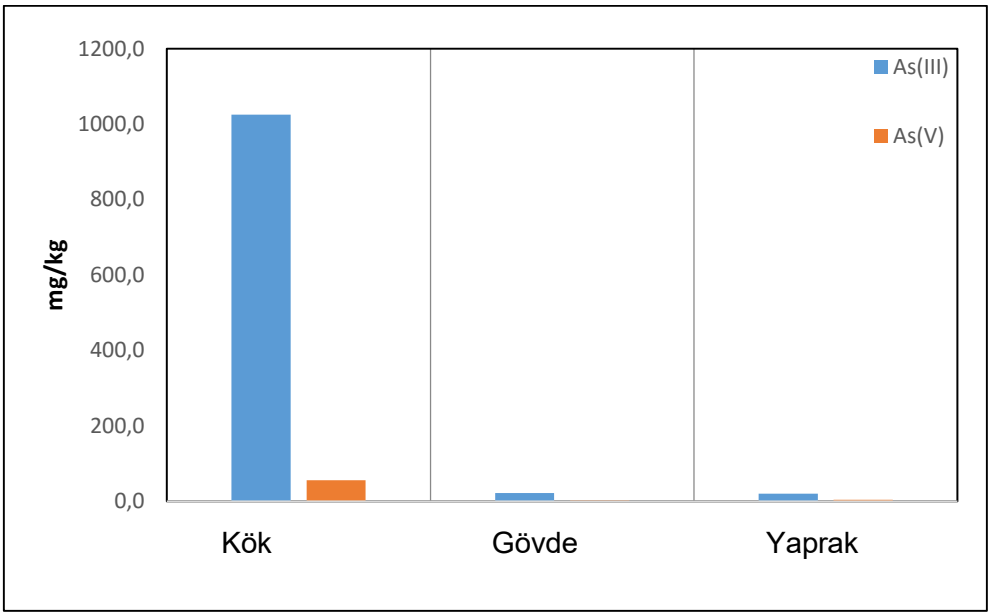
3.9.1 Arsenik ile Besleme

1,0 mg/L As(III) ile beslenen bitkilerin kök, gövde ve yaprak ekstraktları AE-HPLC-ICP-MS ile analiz edilmiş ve arsenik türlerinin bulunan derişimleri Şekil 33'te verilmiştir. Sonuçlar arseniğin çok büyük oranda As(III) formunda olduğunu, %10'dan az olmak üzere çok düşük bir kısmının da As(V) formuna dönüştüğünü göstermektedir. En yüksek arsenik derişimi önceki deney sonuçlarına benzer şekilde kök bölümünde görülmektedir. Bu sonuç bitkilerin As(III) formunu tercih ettiklerini, muhtemel bir As(III)-As(V) dönüşümünün tercih edilmediğini göstermektedir.



Şekil 33. 1,0 mg/L As(III) ile beslenen bitkilerin kök, gövde ve yapraklarındaki As(III) ve As(V) derişimleri.

1,0 mg/L As(V) çözeltisi ile beslenen bitkilerin türlendirme sonuçları Şekil 34'te verilmiştir. As(V) ile besleme durumda da baskın türün As(III) olduğu görülmektedir. Bu durumda As(V) besleme çözeltisinde ya da bitki içerisinde As(III)'e dönüşmektedir. Besleme çözeltisinin pH değerleri ölçülmüş ve Tablo 20'de verilmiştir.



Şekil 34. 1,0 mg/L As(V) ile beslenen bitkilerin kök, gövde ve yapraklarındaki As(III) ve As(V) derişimleri.

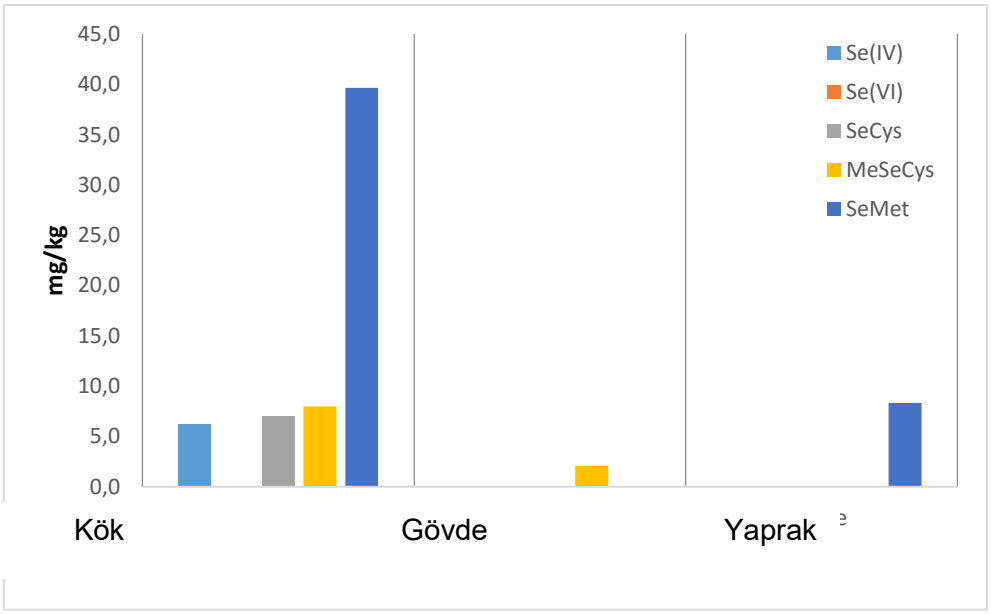
Bu pH aralığında termodinamik olarak arseniğin As(V) olarak bulunması beklenir. Bu sonuç ışığında As(V)'in bitkiye alımından sonra As(III)'e dönüştüğü sonucuna varılabilir.

Tablo 20. Hasat zamanında besleme çözeltisinin pH değerleri.

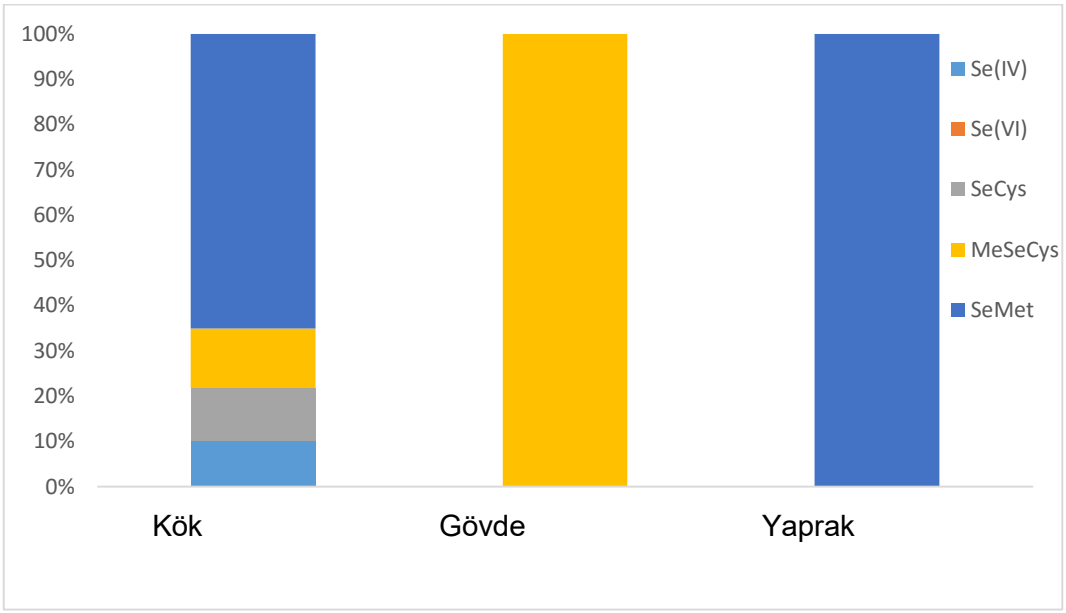
Besleme Çözeltisi	pH
Kontrol	7,77
As (III)	8,07
As (V)	8,01
Se (IV)	8,13
Se (VI)	7,38
As (III) + Se (IV)	8,76
As (III) + Se (VI)	7,75
As (V) + Se (IV)	7,15
As (V) + Se (VI)	7,72

3.9.2 Selenyum ile Besleme

1,0 mg/L Se(IV) ile beslenmiş bitkilerde türlendirme çalışması yapılmış ve sonuçlar Şekil 35 ve Şekil 36'de verilmiştir. Selenyumun baskın olarak selenometiyonin formunda ve kök bölümünde depolandığı gözlemlenmiştir. Daha sonra selenometil selenosistein gelmektedir. Ayrıca Se(IV) sadece kök bölümünde çok düşük bir derişimde bulunmuş, gövde ve yapraklarda ise Se(IV) türüne rastlanmamıştır. Bu sonuç Se(IV)'ün temel olarak kök bölümünde organik selenyum türlerine çevrildiğini göstermektedir. Derişiminin çok düşük olması Se(IV) türünün biyokullanılabilirliğinin yüksek olduğunu ve hızla organik selenyum türlerine çevrildiğini göstermektedir.



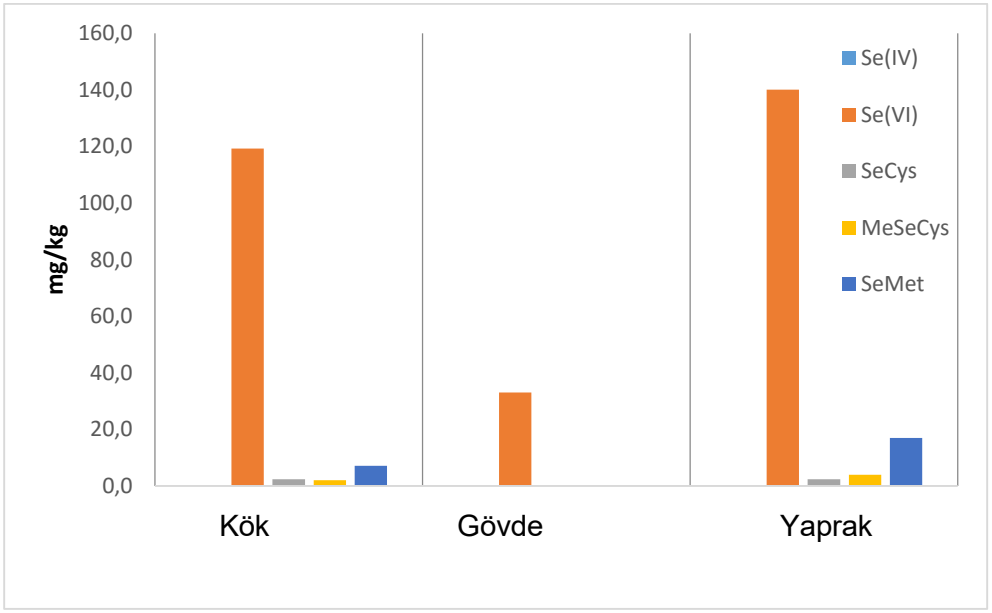
Şekil 35. 1,0 mg/L Se(IV) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin derişimleri.



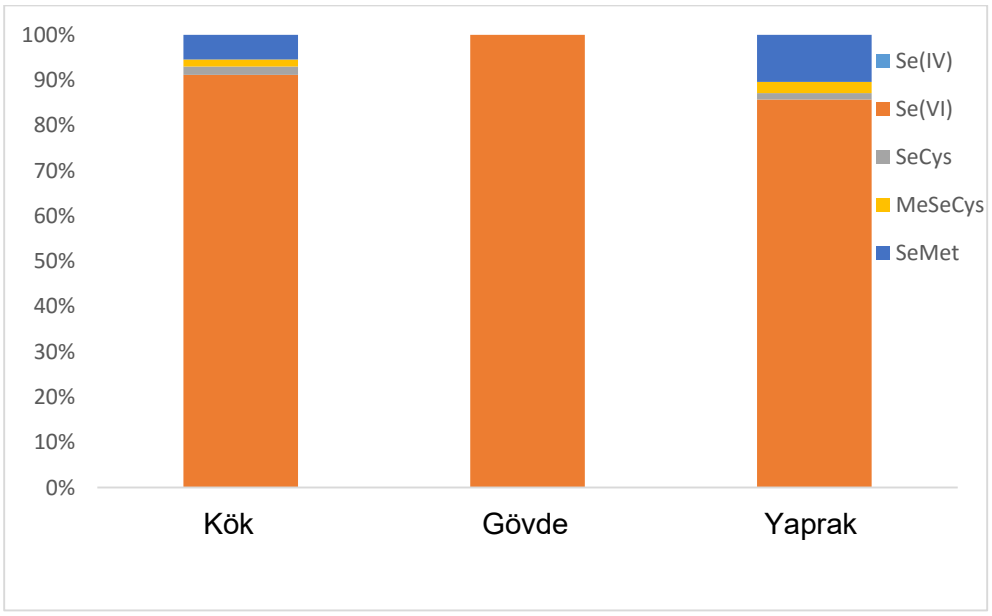
Şekil 36. 1,0 mg/L Se(IV) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin kütlece yüzde dağılımı.

1,0 mg/L Se(VI) ile beslenen bitkiler incelendiğinde ise Şekil 37 ve Şekil 38'da verilen derişimler bulunmuştur. Bu durumda selenyumun temel olarak Se(VI) şeklinde bulunduğu, organik türlere dönüşümün Se(IV)'e oranla çok sınırlı olduğu görülmüştür. En yüksek Se(VI) derişimi yaprak bölümünde bulunmuştur. Sonuçlar inorganik Se(VI) türünün biyoyararlılığının

(bioavailability) daha düşük olduğunu ve bitki içerisinde farklı Se türlerine dönüşmediğini göstermektedir. Ayrıca derişimi en yüksek olan organoselenyum türünün selenometiyonin olduğu ve yaprak bölümünde en fazla bulunduğu görülmüştür. Bu sonuç Se(VI) iyonunun yaprak bölümünde organoselenyum türlerine dönüşme veriminin daha fazla olduğunu göstermektedir.



Şekil 37. 1,0 mg/L Se(VI) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin derişimleri.

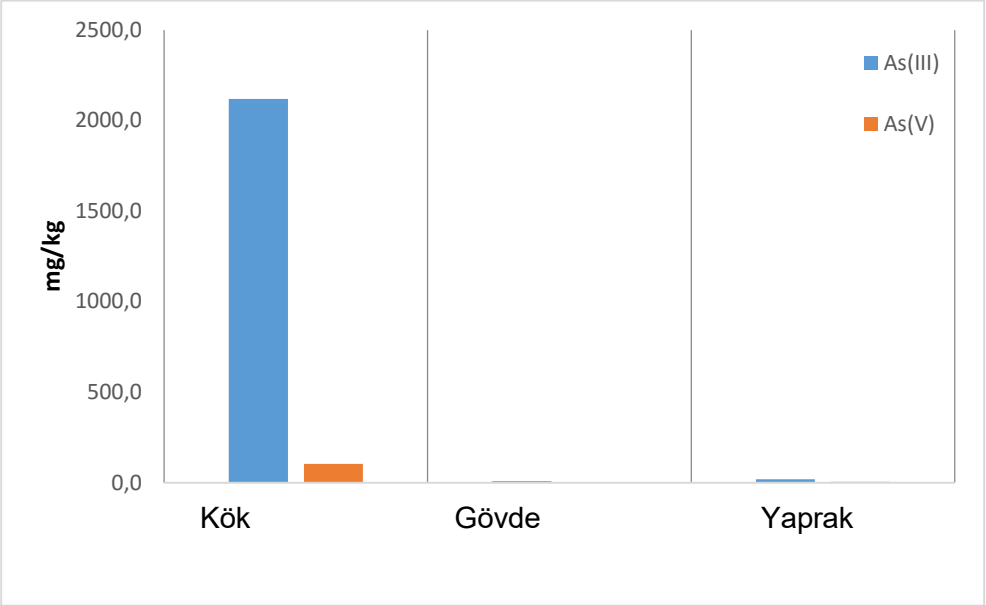


Şekil 38. 1,0 mg/L Se(VI) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin kütlece yüzde dağılımı.

3.9.3 Se(IV) ve As(III) ile Besleme

1,0 mg/L Se(IV) ve As(III) ile beslenen bitkilerin türlendirme işlemi yapıldığında türlerine göre bulunan arsenik dağılımı

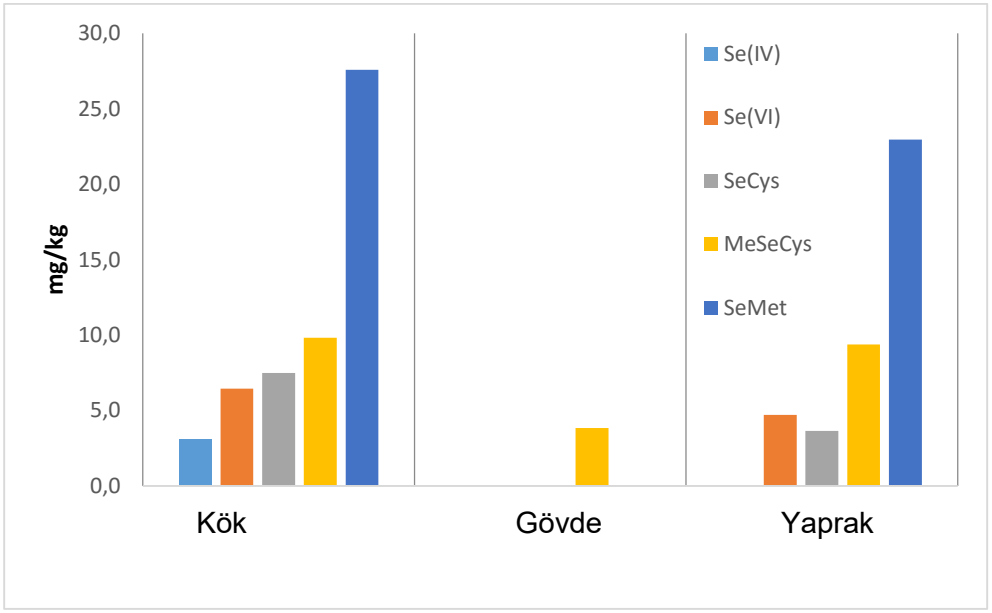
Şekil 39'ta, selenyum dağılımı ise Şekil 40'de verilmiştir. Arsenik dağılımı sadece As(III) ile besleme durumu ile karşılaştırıldığında kök bölümündeki As(III) derişiminin %25 arttığı ve As(III)-As(V) derişim oranının sabit kaldığı gözlemlenmiştir. Bu gözlemlere dayanarak Se(IV) varlığında As(III) derişiminin arttığı ve sonuç olarak da Se(IV)'ün As alınımını arttırdığı sonucuna varılabilir.



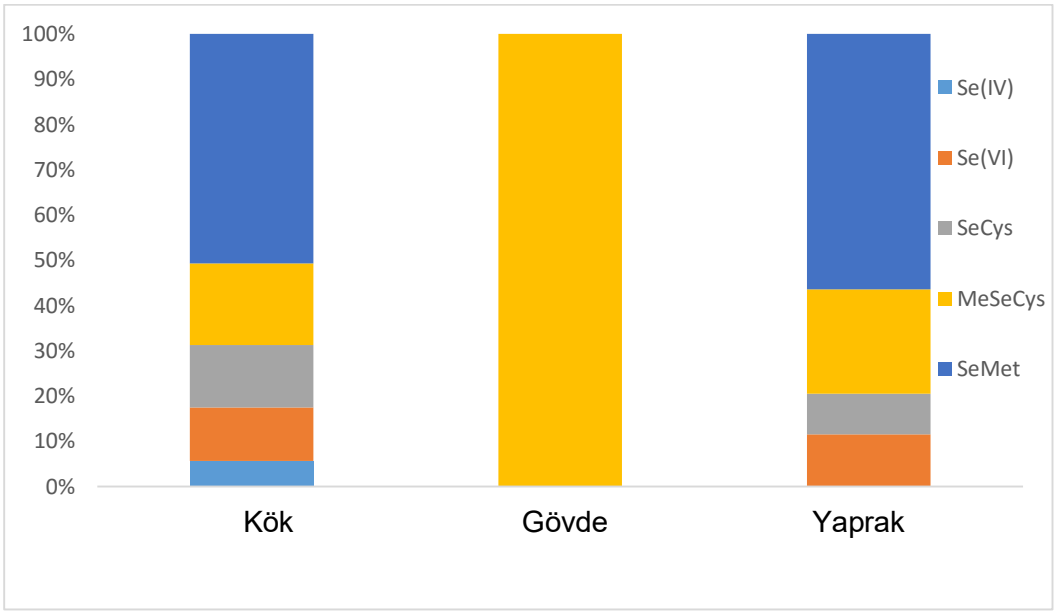
Şekil 39. 1,0 mg/L Se(IV) ve As(III) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki arsenik türlerinin derişimleri.

Şekil 40 ve Şekil 41'den görüleceği üzere As(III) varlığında da baskın selenyum türü selenometiyonindir ve en fazla kök bölümünde bulunmaktadır. Selenometiyoninin derişimi As(III) olduğu ve olmadığı durumlarla karşılaştırılırsa As(III) varlığında kök derişiminin %31 oranında azaldığı, yaprak bölümündeki derişiminin 3 kat arttığı görülmektedir. Ayrıca diğer organoselenyum türlerinin de yaprak bölümündeki derişimlerinin As(III) olmadığı duruma göre arttığı gözlemlenmiştir. Sadece Se(IV) ile beslenen bitkilerde Se(VI) varlığına rastlanmazken As(III) ile birlikte beslenen bitkilerin kök ve yaprak bölümlerinde Se(VI) varlığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında As(III) varlığında selenyum türlerinin kök bölümünden

yaprak bölümüne geçiş yaptığı söylenebilir. As(III) derişiminin en yüksek oranda kök bölümünde olduğu düşünülürse As(III)'ün selenyumun organoselenyum türlerine çevrilmesini inhibe ettiği, selenyumun mobilitesi fazla olan inorganik formda kaldığı ve selenyumun yaprak bölümüne geçişini kolaylaştırdığı söylenebilir.



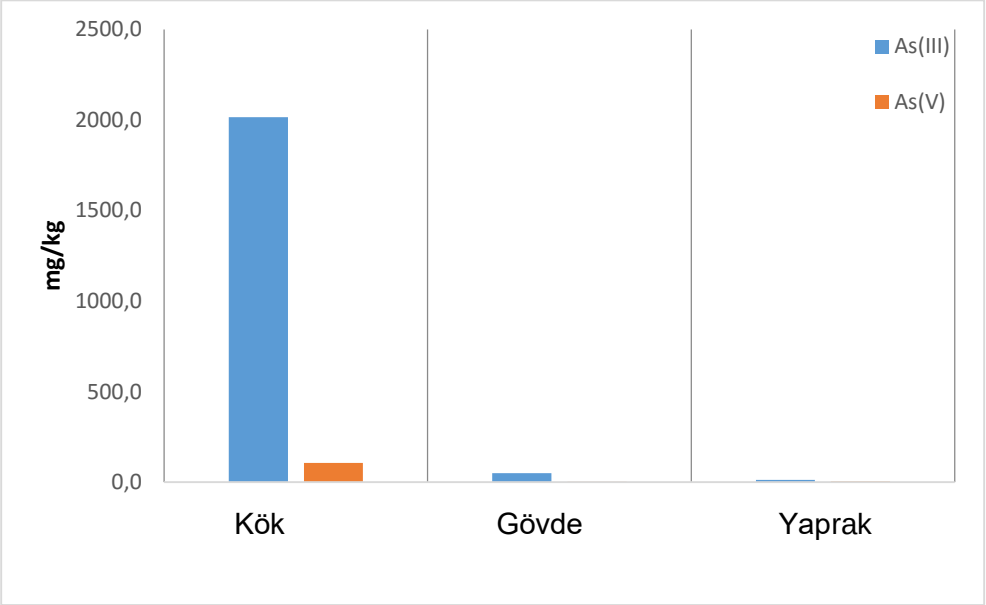
Şekil 40. 1,0 mg/L Se(IV) ve As(III) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin derişimleri.



Şekil 41. 1,0 mg/L Se(IV) ve As(III) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin kütlece yüzde dağılımı.

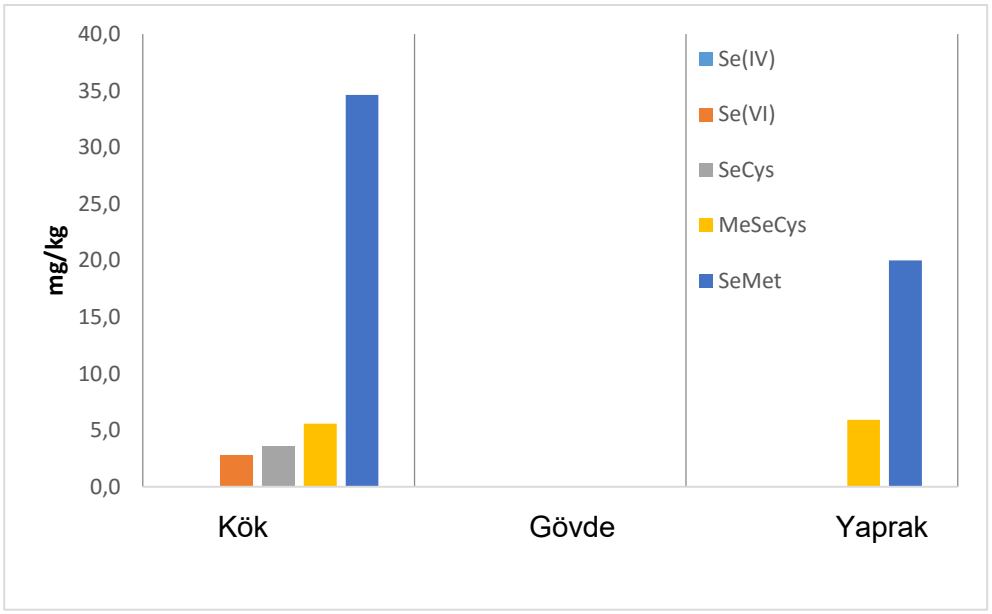
3.9.4 Se(IV) ve As(V) ile Besleme

Şekil 42'ten de görülebileceği üzere Se(IV) ve As(V)'in birlikte verildiği kombinasyonda da As(V)'in yalnız verildiği duruma benzer olarak arseniğin As(III) formunda bulunduğu ve kök bölümünde depolandığı görülmektedir. Kök, gövde ve yapraklardaki As(III) derişiminin Se(IV) varlığında yaklaşık iki katına çıktığı görülmüştür.

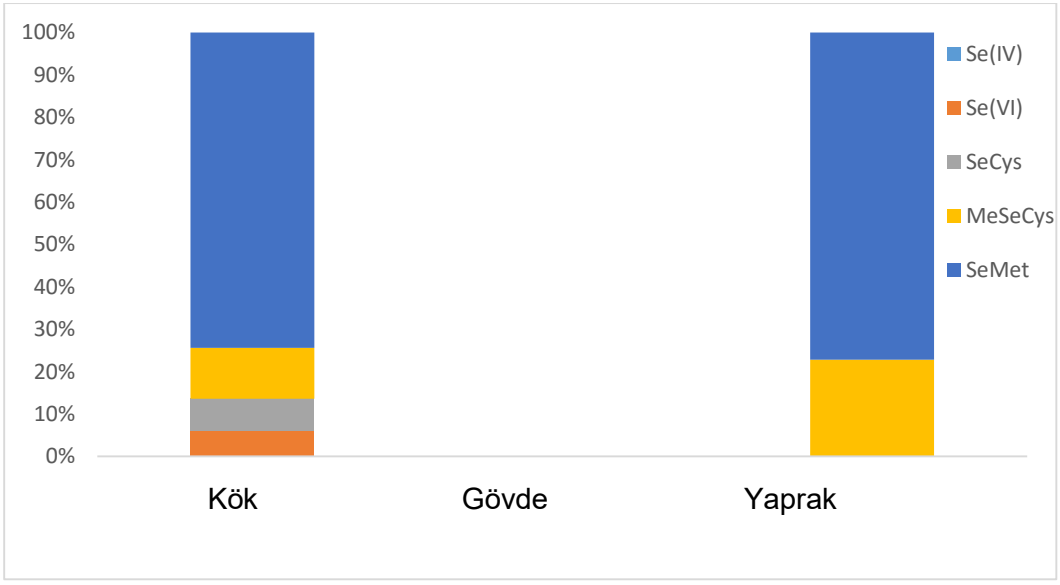


Şekil 42. 1,0 mg/L Se(IV) ve As(V) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin derişimleri.

Selenyum türlerinin dağılımı Şekil 43 ve Şekil 44'te verilmiştir. As(V) varlığında kök bölümünde selenometiyonin derişimi %10 azalırken yaprak bölümünde selenometiyonin derişimi iki kat artmıştır. Selenometil selenosistein ve selenosistin moleküllerinin derişiminde çok büyük bir değişim olmamıştır. Bu sonuçlar As(III) ile Se(IV) arasında sinerjik bir ilişki varlığını işaret etmektedir.



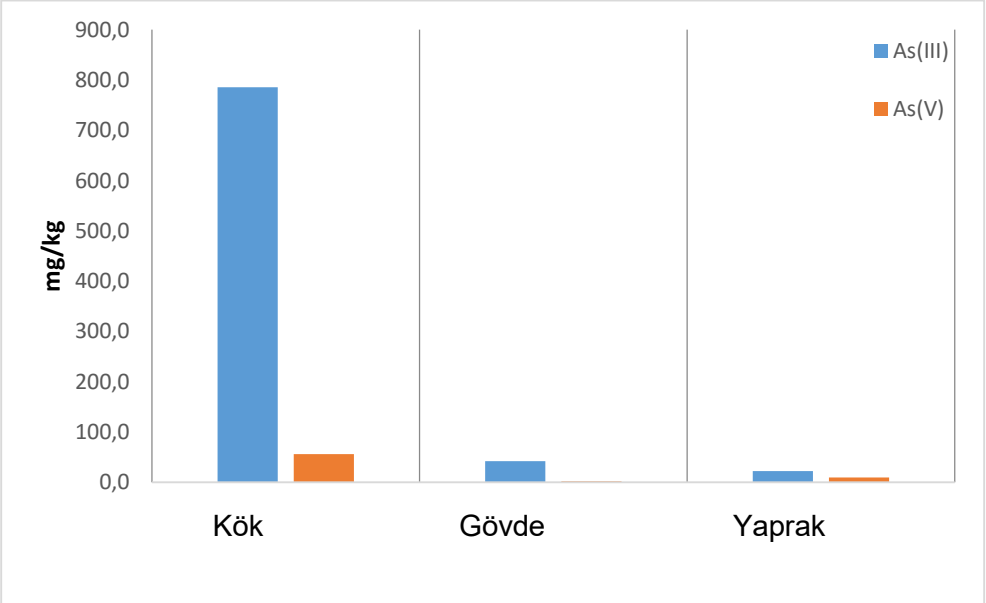
Şekil 43. 1,0 mg/L Se(IV) ve As(V) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin derişimleri.



Şekil 44. 1,0 mg/L Se(IV) ve As(V) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin kütlece yüzde dağılımı.

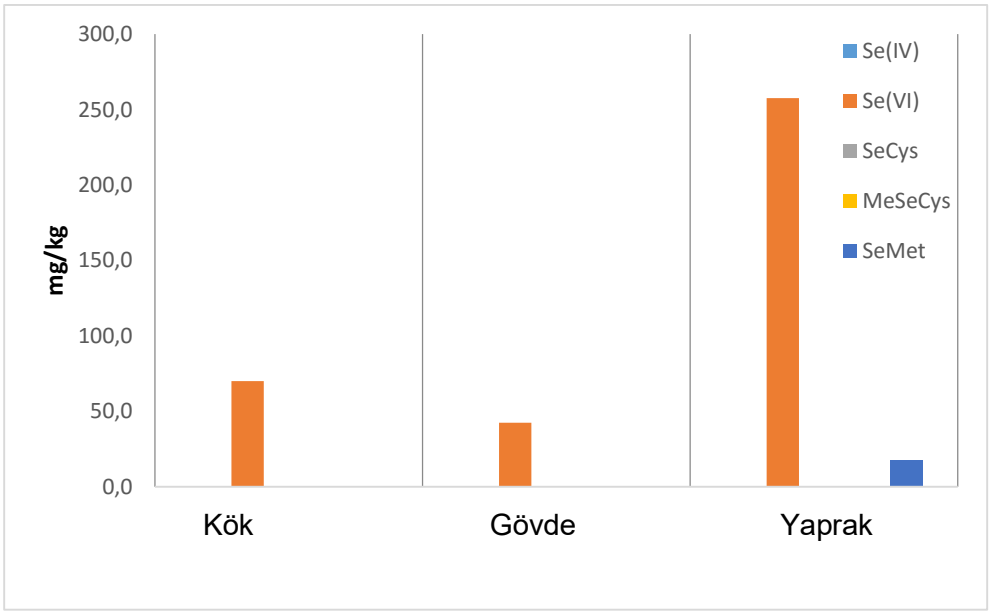
3.9.5 Se(VI) ve As(III) ile Besleme

As(III) iyonları Se(VI) ile birlikte bitkiye verildiğinde kök bölümündeki As(III) derişiminin yarı yarıya azaldığı ve gövde ve yaprak bölümlerindeki As(III) derişiminde önemli bir fark olmadığı görülmektedir (Şekil 45). Diğer taraftan kök bölümündeki As(V) derişiminin yarı yarıya azaldığı görülebilir. Bu durumda Se(VI) varlığında arseniğin bitkiye alınımının azaldığı sonucuna varılabilir. Şekil 9'da verilen çözelti ortamında kalan As derişimleri bu bulguyu destekler niteliktedir.

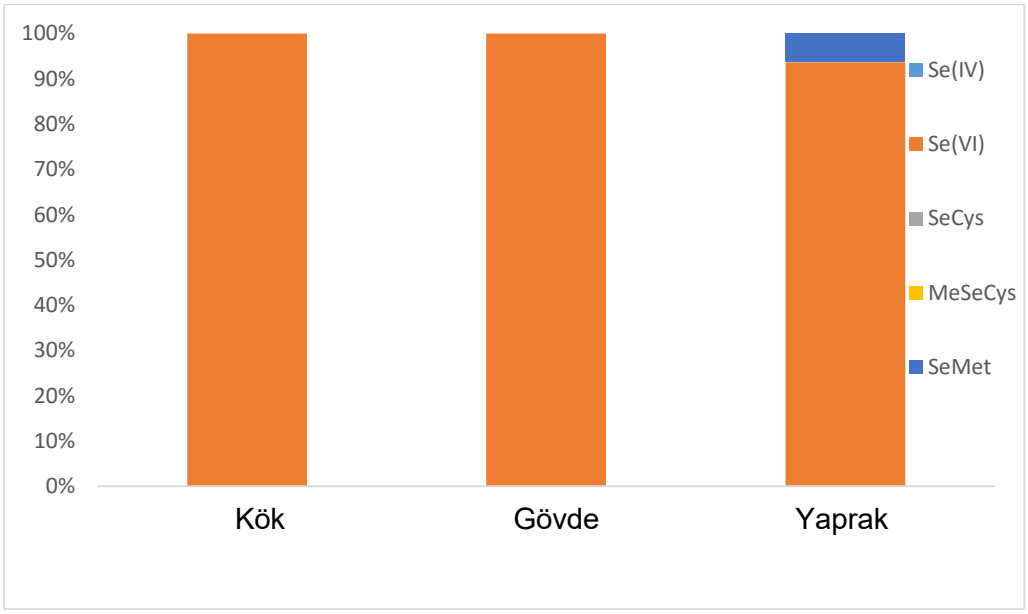


Şekil 45. 1,0 mg/L Se(VI) ve As(III) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki arsenik türlerinin derişimleri.

Selenyum türlerinin dağılımı incelendiğinde ise Şekil 46 ve Şekil 47'den görüleceği üzere baskın tür yine Se(VI)'dır. Ancak kök bölümündeki Se(VI) derişimi yarı yarıya azalırken yaprak bölümündeki Se(VI) derişiminin neredeyse iki katına çıktığı gözlenmiştir. Bu durum tartışma bölümünde toplam selenyum dağılımı altında verilen, (Bkz. Bölüm 3.5), As(III) varlığında selenyumun yapraklara taşındığı görüşü desteklemektedir. Organoselenyum türlerinden sadece selenometiyonin gözlemlenebilirken yapraktaki derişimi sabit kalmıştır. Bu sonuçlar, kök bölümünde As(III) ile Se(VI) arasında antagonistik bir ilişki olduğunu gösterir niteliktedir.



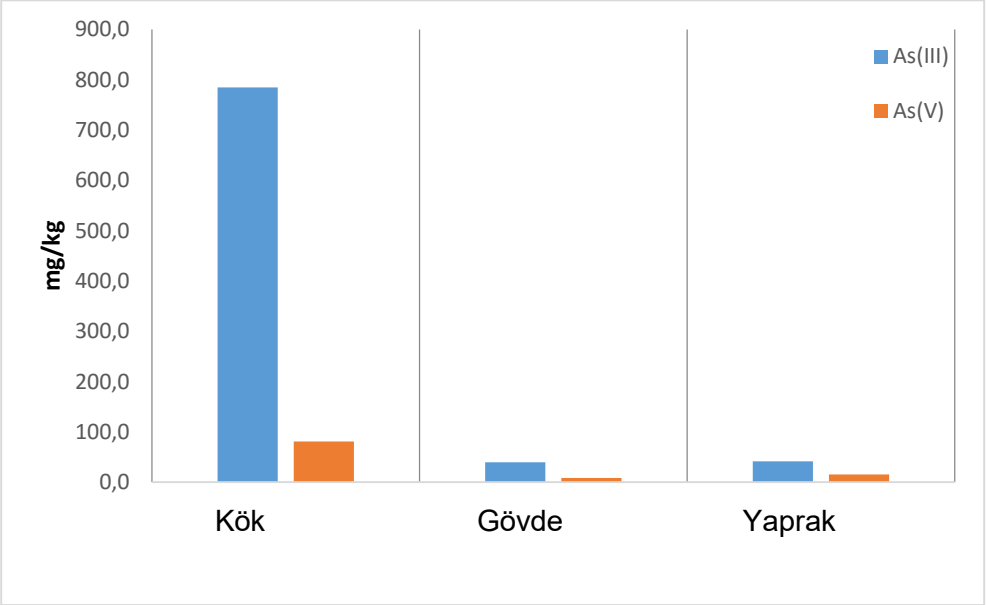
Şekil 46. 1,0 mg/L Se(VI) ve As(III) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin derişimleri.



Şekil 47. 1,0 mg/L Se(VI) ve As(III) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki arsenik türlerinin kütlece yüzde dağılımı.

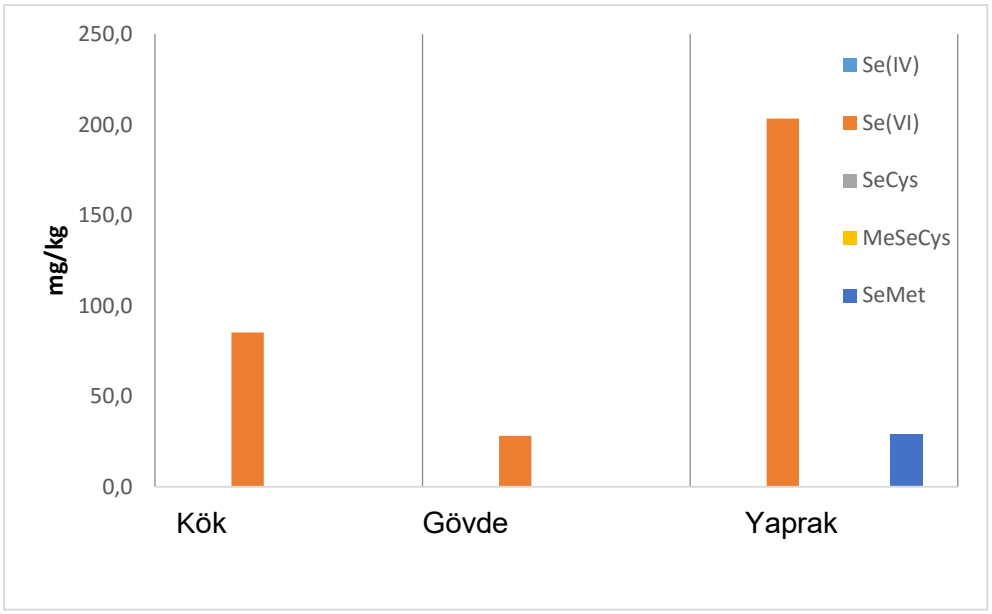
3.9.6 Se(VI) ve As(V) ile Besleme

Se(VI) ve As(V) iyonlarının eş zamanlı verildiği durumda kök bölümünde As(III) derişiminin yalnız As(III) verildiği duruma göre %23 azaldığı As(V) derişiminin ise yalnız As(III) verildiği duruma göre %40 oranında arttığı görülmüştür (Şekil 48). Bu sonuçlar ışığında Se(VI) varlığında As(III) iyonlarının As(V) iyonlarına dönüşme veriminin arttığı söylenebilir.

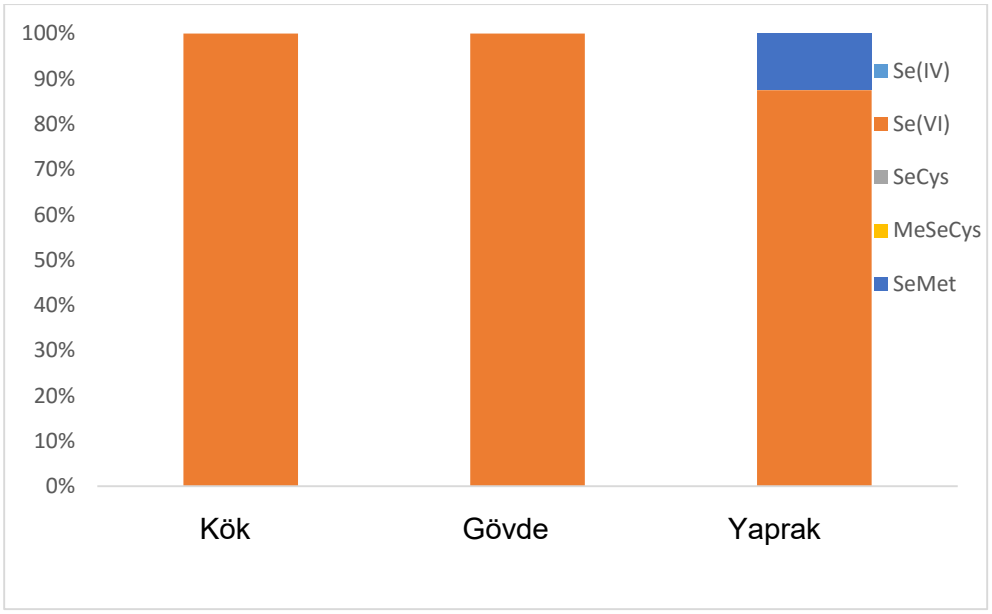


Şekil 48. 1,0 mg/L Se(VI) ve As(V) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki arsenik türlerinin derişimleri.

Selenyum türlerinin derişimleri incelendiğinde Şekil 49 ve Şekil 50'de görülebileceği gibi baskın türün Se(VI) olduğu gözlemlenmiştir. Kök ve gövdedeki Se(VI) derişimleri yalnız Se(VI) ile besleme durumuna göre çok değişmezken, yapraktaki Se(VI) derişiminin As(V) varlığında %30 oranında arttığı gözlemlenmiştir. Benzer şekilde yapraklardaki selenometiyonin derişimi %50 oranında artmıştır.



Şekil 49. 1,0 mg/L Se(VI) ve As(III) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin derişimleri.



Şekil 50. 1,0 mg/L Se(VI) ve As(III) ile beslenmiş bitkilerde kök, gövde ve yapraklardaki selenyum türlerinin kütlece yüzde dağılımı.

4. SONUÇLAR

Bu çalışmada beş selenyum, Se(IV), Se(VI), selenometiyonin, selenosistin ve selenometil selenosistein; ve iki arsenik, As(III) ve As(V), türünün eşzamanlı türlendirmesini yapabilmek için duyarlı bir HPLC-ICP-MS metodu geliştirilmiş ve arsenik ve selenyum ile beslenen yeşil soğan bitkisinde anılan elementlerin bitkiye alınışları açısından olası sinerjik ve antagonistik etkileri gözlenmiş ve sonuçlar incelenmiştir.

Öncelikli olarak seçilen türlerin hepsini olabildiğince kısa sürede ayırabilecek bir kromatografik metot aranmıştır. Bu amaçla ilk olarak iyon eşleştirici (ion pairing) ajanlar eşliğinde C18 ve C8 ters faz kolonlar kullanılmış, ancak büyük moleküllü ajanlar kullanıldığı durumda iyonik türler ayırılırken organik türler ayırılamamış, küçük moleküllü ajanlar kullanıldığında ise organik türler ayırılırken inorganik türler ayırılamamıştır. Bunun üzerine iyon değiştirici kolon kullanılmıştır. Farklı denemeler sonucunda güçlü bir anyon değiştirici kolon olan PRP-X100 seçilmiş, hedeflenen ayırılma, %2 (h/h) metanol içerisinde pH değeri 5,0 olan 5,0 mM amonyum sitrat taşıyıcı faz ile gerçekleştirilmiştir.

Farklı bileşimlerde inorganik As ve/veya Se içeren besleme çözeltileri kullanılarak hidrofonik ortamda yeşil soğan bitkileri yetiştirilmiştir. 5,0 mg/L ve 10,0 mg/L As ve/veya Se içeren çözeltiler kullanıldığında bitkilerdeki kök ve yaprak gelişiminin kontrol bitkisine oranla çok düşük olduğu gözlemlenmiş ve bu derişim seviyelerinde arsenik ve selenyumun toksik etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. Örneğin, 5,0 mg/L düzeyinde besleme için özellikle As ve Se'un birlikte olduğu durumlarda bitki kök kütlesinin kontrol örneğe göre %15, yaprak kütlesinin ise %50 oranlarında olduğu gözlenmiştir. As ve Se elementlerin besleme çözeltisinde yalnız bulunduğu durumlarda ise aynı oran yaklaşık %80 düzeyindedir. 1,0 mg/L derişimin uygulandığı deneylerde ise bitkilerin kök, gövde ve yaprak kütlelerinin kontrol örneğine göre en az %50 olduğu saptanmıştır. Bu deney sonuçları temel alınarak bitki yetiştirmek için 1,0 mg/L derişiminin uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bitkilerdeki toplam As ve Se tayini için kök, gövde ve yaprak bölümlerinden örnekler mikrodalga yardımlı özütleme sistemi ile hazırlanmış ve ICP-MS ile analiz edilmiştir. Ayrıca besleme çözeltisinde kalan As ve Se derişimleri tayin edilmiştir.

Arsenik dağılımı incelendiğinde büyük oranda bitki tarafından alındığı ve %90 üzerinde kök bölümünde depolandığı görülmektedir. As(III) ve As(V) için ortak olan bu davranış arseniğin toksik etkisine karşı bitkinin geliştirdiği bir koruma mekanizması olarak da yorumlanabilir.

Selenyum dağılımı incelendiğinde besleme çözeltisinde Se(IV) bulunan durumlarda en yüksek Se derişimi kök bölümünde ölçülürken, Se(VI) verilmesi durumunda en yüksek Se derişimi yaprak bölümünde ölçülmüştür. Bu davranış Se(IV)'ün kök bölümünde alımından sonra biyoyararlı bileşiklerine dönüştürülmesi ancak Se(VI)'nın dönüşüm oranının düşük olması ile açıklanabilir.

Yalnız Se(IV) içeren beslemeye göre, As(III) veya As(V)'in de verildiği durumlarda kök bölümündeki Se derişimin azaldığı, yaprak bölümündeki Se derişimimin ise arttığı gözlemlenmiştir. Bu bulgulara dayanarak arseniğin selenyum türlerinin organoselenyuma dönüşmesini azalttığı dolayısıyla daha çok selenyumun arsenik derişimi görece düşük olan yaprak bölümüne geçerek orada organoselenyum türlerine dönüştüğü söylenebilir.

Türlendirme çalışmalarına geçilmeden önce selenyum ve arsenik türlerinin örneklerden özütlenmesi işlemi optimize edilmiştir. Bu noktada enzim yardımlı özütlemenin en yüksek verime sahip olduğu ve enzim olmadan selenometiyonin gibi proteinlere bağlı türlerin çözelti ortamına alınamadığı gözlemlenmiştir. Fosfat tamponu eşliğinde en etkin sonuçları sağlayan proteaz type XIV enzimi kullanıldı.

Türlendirme çalışmaları sonucunda As(III) veya As(V) ile beslenen bitkilerde kök, gövde ve yaprak bölümlerinde baskın tür olarak As(III) bulunmuş, As(V) derişiminin ise düşük olduğu saptanmıştır. Besleme çözeltisinde de As(III) ve As(V) türlendirme analizi yapılmış, bu ortamdaki türlerin derişiminde değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Bu verilerden yola çıkarak As(V)'in bitkiye alındıktan sonra As(III) formuna dönüştüğü anlaşılmıştır.

Yalnız Se(IV) ile beslenen bitkiler incelendiğinde selenyumun baskın olarak selenometiyonin ve selenometil selenosistin formlarında ve kök bölümünde depolandığı gözlemlenmiştir. Dönüşüm, kök için %90, gövdede ve yaprakta ise %100 düzeyindedir. Bu sonuçlar Se(IV) türünün biyokullanılabilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Se(VI) ile beslenen bitkilerde ise selenyumun baskın şekilde Se(VI) şeklinde kaldığı, organik türlere dönüşümün çok sınırlı olduğu görülmüştür. Dönüşüm, kök için %8, gövdede %0 yaprakta ise %14 düzeyindedir. Sonuçlar inorganik Se(VI) türünün biyoyararlılığının Se(IV)'e göre daha düşük olduğunu ve bitki içerisinde farklı Se türlerine önemli ölçüde dönüşmediğini göstermektedir.

Bu aşamalardan sonra, Selenyum ve arseniğin birlikte verildiği durumlar incelenmiştir. As(III) ve Se(IV) ile beslenen bitkilerde, kökteki As(III) derişiminin yalnız As(III) ile beslenen bitkilere göre %25 arttığı görülmüştür. Gövde ve yaprakta ise anılan iki besleme rejiminin sonuçları arasında önemli fark görülmemiştir. Bu durum As(III) ile Se(IV) arasında sinerjik bir ilişki olduğunu göstermektedir.

As(III) ve Se(IV) ile beslenen bitkilerde, kök bölümünde selenometiyonin derişiminin yalnızca Se(IV) ile beslenen bitkiye göre yaklaşık %30 azaldığı, yaprak bölümünde ise 2,5 kat arttığı görülmüştür.

As(V) ve Se(IV) türlerini birlikte içeren besleme çözeltisiyle alınan sonuçlar da incelendi. Bu durumda, kök bölümündeki As(III) derişimi, yalnız As(V) içeren rejime göre yaklaşık 2 kat artmıştır. Öte yandan Se(IV) türünün dönüşüm ürünleri için derişim, başta selenometiyonin olmak üzere, yalnız Se(IV) içeren rejime göre kök bölümünde önemli bir değişiklik göstermezken, yaprak bölümünde yaklaşık 2,5 kat artmıştır. Bu sonuçlar, sinerjik etkinin As(V) ile Se(IV) arasında da bulunduğuna işaret etmektedir.

As(III) ve Se(VI) türlerinin birlikte besleme çözeltisinde bulunduğu deneylerin sonuçları da incelenmiştir. Yalnız As(III) içeren besleme rejimine göre, As(III) derişimi karışık beslemede kök bölümünde 2 kat azalırken diğer bitki bölümlerinde iki besleme türünün sonuçları arasında önemli farklar gözlenmemiştir. Sonuçlar, kök bölümü için besleme çözeltisinde Se(VI) varlığının arsenik alımını azalttığı, yani antagonistik bir etkinin bulunduğu gözlenmiştir.

As(III) ve Se(VI) türlerinin birlikte besleme çözeltisinde bulunduğu deneylerin sonuçları ise hem sinerjik, hem de antagonistik sonuçlar vermiştir. Yalnız Se(VI) içeren besleme rejimine kıyasla karışım içeren durumda, Se(VI) derişimi yaprakta yaklaşık 1,8 kat artarken, kök bölümünde ise 1,7 kat azalma gözlenmiştir.

As(V) ve Se(VI) türlerinin birlikte besleme çözeltisinde kullanıldığı durumda ise etkileşimin önemli ölçüde olmadığı gözlenmiştir. Bu tartışmada, daha önce de belirtildiği gibi, bitki As(V) ile beslendiğinde büyük ölçüde As(III) türüne dönüşüm olmaktadır. Bu dönüşümün çözeltide değil, bitki içinde olduğunun hatırlanması da yararlı olacaktır. Yalnız As(V) içeren besleme rejimine göre, karışık beslemede As(III) derişimi kök bölümünde sadece %20 düzeyinde azalmıştır.

As(V) ve Se(VI) türlerinin birlikte bulunduğu durumda da, bitkideki Se(VI) derişimi için, hem sinerjik hem de antagonistik etkileşimlerin varlığına işaret eden sonuçlar alınmıştır. Yalnız Se(VI) içeren besleme rejimine kıyasla, karışım içeren durumda, Se(VI) derişimi kök bölümünde 1,4 kat azalırken, yaprakta ise 1,5 kat artış gözlenmiştir. Se(VI) içeren besleme çözeltilerinde, organoselenyum türlerine dönüşüm bitkinin tüm bölümlerinde önemsiz düzeyde bulunmaktadır; analizler baskın türün bitkinin tüm bölümlerinde Se(VI) olduğunu göstermiştir.

Yukarıda sunulan gözlem ve sonuçların tüm bitkilere genellenmesinin doğru olmayacağını, literatür verilerinden anlaşılmaktadır.

Literatürde bitkilerde eşzamanlı türlendirme çalışmaları nadirdir. Ulaşılabilen çalışmalarda bitkiler seralarda kontrolsüz olarak doğal toprak (Afton vd., 2009) ya da çeşme suyu gibi çözelti ortamında (Pacheco vd., 2014) yetiştirilmiştir. Bu durumun bir sonucu olarak eklenen elementlerin besleme ortamında geçirebilecekleri olası değişimler, bitki ve yetiştirme ortamı arasındaki dağılım gibi durumları incelemek mümkün olamamıştır. Buna karşın mevcut çalışmada bitkinin kök, gövde ve yaprak bölümlerinin yanı sıra besleme çözeltisi de incelenmiş, türlerin besleme çözeltisi içerisinde bir değişime uğramadığı, değişimin bitkiye alımdan sonra olduğu gösterilmiş; bitki ve besleme ortamındaki As(III)-As(V) derişimleri bu sonuca varılmasını sağlamıştır. Bu projede, As ve Se elementlerinin toplam derişimi ve ayrıca türleri bazında bitkinin kök, gövde ve yaprak bölümlerinde ayrıntılı bir dağılım çıkarılabilmek mümkün olmuştur. Bu bulgular çalışmanın özgün değerine katkı sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

Afton, S.E., Catron, B., Caruso, J. 2009. “Elucidating the selenium and arsenic metabolic pathways following exposure to the non-hyperaccumulating Chlorophytum comosum, spider plant”, Journal of experimental botany, 60(4), pp.1289–97.

Aldrich, M. V., Peralta-Videa, J. R.,Parsons, J. G., Gardea-Torresdey, J., 2007. “Examination of arsenic(III) and (V) uptake by the desert plant species mesquite (Prosopis spp.) using X-ray absorption spectroscopy”, The Science of the total environment, 379(2-3), pp.249–55.

Auger, J.,Yang, W.,Arnault, I.,Pannier, F., Potin-Gautier, M. 2004. “High-performance liquid chromatographic-inductively coupled plasma mass spectrometric evidence for Se-“alliins” in garlic and onion grown in Se-rich soil”, Journal of chromatography. A, 1032(1-2), pp.103–7.

Austruy, A., Wanat, N.,Moussard, C.,Vernay, P.,Joussein, E.,Ledoigt, G.,Hitmi, A. 2013. “Physiological impacts of soil pollution and arsenic uptake in three plant species: Agrostis capillaris, Solanum nigrum and Vicia faba” Ecotoxicology and environmental safety, 90, 28–34.

Beale, S.1971. “A Simple Method for Synthesis of Ferric Ethylenediaminetetraacetate in a Pure and Stable Form”, Plant physiology, (48), 228.

Beck, M.A., Levander, O.A., Handy, J. 2003. “Selenium Deficiency and Viral Infection”, Journal of Nutrition, 133(5), 1463–1467.

Behne, D., Alber, D., Kyriakopoulos, A. 2009. “Effects of long-term selenium yeast supplementation on selenium status studied in the rat” Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS), 23(4), 258–64.

Birringer, M., Pilawa, S., Floh, L. 2002. “Trends in selenium biochemistry” Natural Product Reports, 19(6), 693–718.

Bona, E., Marsano, F.,Massa, N.,Cattaneo, C.,Cesaro, P.,Argese, E.,Sanità di Toppi, L., Cavaletto, M.,Berta, G. 2011. “Proteomic analysis as a tool for investigating arsenic stress in Pteris vittata roots colonized or not by arbuscular mycorrhizal symbiosis” Journal of proteomics, 74(8), 1338–50.

Bulska, E.,Wysocka, I. A.,Wierzbicka, M. G. H.,Proost, K.,Janssens, K.,Falkenberg, G. 2006. “In vivo investigation of the distribution and the local speciation of selenium in Allium cepa L. by means of microscopic X-ray absorption near-edge structure spectroscopy and confocal microscopic X-ray fluorescence analysis” Analytical chemistry, 78(22), 7616–24.

Cankur, O., Yathavakilla, S. K. V., Caruso, J. A. 2006. “Selenium speciation in dill (Anethum graveolens L.) by ion pairing reversed phase and cation exchange HPLC with ICP-MS detection” Talanta, 70(4), 784–90.

Capelo, J. L.,Fernandez, C.,Pedras, B.,Santos, P.,Gonzalez, P.,Vaz, C. 2006. “Trends in selenium determination/speciation by hyphenated techniques based on AAS or AFS” Talanta, 68(5), 1442–7.

Clark, L. C.,Combs, G. F.,Turnbull, B. W.,Slate, E. H.,Chalker, D. K.,Chow, J.,Davis, L. S.,Glover, R. A.,Graham, G. F.,Gross, E. G.,Krongrad, A.,Lesher, J. L.,Park, H. K.,Sanders, B. B.,Smith, C. L.,Taylor, J. R. 1996. “Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group” JAMA, 276(24),1957–63.

Deng, B., Feng, J., Meng, J. 2007. “Speciation of inorganic selenium using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry with on-line hydride generation”, Analytica chimica acta, 583(1), 92–7.

Dumont, E., Vanhaecke, F., Cornelis, R. 2006. “Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review”, Analytical and bioanalytical chemistry, 385(7), 1304–1323.

EFSA. “Selenium-enriched yeast as source for selenium added for nutritional purposes in foods for particular nutritional uses and foods (including food supplements) for the general population”. http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/766.htm
Son erişim tarihi: 3 Mart 2015.

EFSA “L-selenomethionine as a source of selenium added for nutritional purposes Scientific Opinion of the Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food Supplements”. www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1082.pdf
Son erişim tarihi: 3 Mart 2015.

Emsley, J. 2011. Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements. Oxford, England, UK: Oxford University Press.

EVISA. "LC-ICP-MS: The most often used hyphenated system for speciation analysis". http://www.speciation.net/Public/Document/2007/06/21/2914.html
Son erişim tarihi: 3 Mart 2015.

Feng, R.,Wei, C.,Tu, S.,Sun, X. 2009. "Interactive effects of selenium and arsenic on their uptake by Pteris vittata L. under hydroponic conditions", Environmental and Experimental Botany, 65(2-3), 363–368.

Food and Nutrition Board. "DRI Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids". http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=9810,
Son erişim tarihi: 11 Kasım 2014

Gergely, V.,Kubachka, K. M.,Mounicou, S.,Fodor, P.,Caruso, J. A. 2006. "Selenium speciation in Agaricus bisporus and Lentinula edodes mushroom proteins using multi-dimensional chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry", Journal of chromatography. A, 1101(1-2), 94–102.

Guerin, T., Astruc, A., Astruc, M. 1999. "Speciation of arsenic and selenium compounds by HPLC hyphenated to specific detectors: a review of the main separation techniques", Talanta, 50(1), 1–24.

Hoagland, D., Arnon, D. 1950. "The water-culture method for growing plants without soil", California: California Agricultural Experiment Station Publications.

Hsieh, Y.J. Jiang, S.J. 2013. "Determination of selenium compounds in food supplements using reversed-phase liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry", Microchemical Journal, 110, 1–7.

Hughes, M.F. 2002. "Arsenic toxicity and potential mechanisms of action" Toxicology Letters, 133(1), 1–16.

Kabata-Pendias, A. 1998. "Geochemistry of selenium" Journal of environmental pathology, toxicology and oncology, 17(3-4), 173–7.

Kapolna, E.,Shah, M.,Caruso, J.,Fodor, P. 2007. “Selenium speciation studies in Se-enriched chives (Allium schoenoprasum) by HPLC-ICP–MS”, Food Chemistry, 101(4), 1398–1406.

Kápolna, E.,Hillestrøm, P. R.,Laursen, K. H.,Husted, S.,Larsen, E. H. 2009. “Effect of foliar application of selenium on its uptake and speciation in carrot” Food Chemistry, 115(4), 1357–1363.

Kápolna, E., Fodor, P. 2006. “Speciation analysis of selenium enriched green onions (Allium fistulosum) by HPLC-ICP-MS”, Microchemical Journal, 84(1-2), 56–62.

Karak, T.,Abollino, O.,Bhattacharyya, P.,Das, K. K.,Paul, R. K. 2011. “Fractionation and speciation of arsenic in three tea gardens soil profiles and distribution of As in different parts of tea plant (Camellia sinensis L.)”, Chemosphere, 85(6), 948–60.

Kobaissi, A. N.,Kanso, A. A.,Kanbar, H. J.,Kazpard, V. A. 2013. “Morpho-physiological changes caused by soil compaction and irrigation on Zea mays” Eurasian journal of soil science, 2(2), 114 – 121.

Kösters, J. J. 2003. “Identification of organic arsenic, tin, antimony and tellurium compounds in environmental samples by GC-MS” Journal of Molecular Structure, 661-662, 347 – 356.

Langner, B. E., 2005. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim: Wiley-VCH.

Larios, R.,Fernández-Martínez, R.,Lehecho, I.,Rucandio, I. 2012. “A methodological approach to evaluate arsenic speciation and bioaccumulation in different plant species from two highly polluted mining areas”, The Science of the total environment, 414, 600–7.

Li, H.,Ye, Z. H.,Wei, Z. J.,Wong, M. H. 2011. “Root porosity and radial oxygen loss related to arsenic tolerance and uptake in wetland plants”, Environmental pollution, 159(1), 30–7.

Malik, J.,Goel, S.,Kaur, N.,Sharma, S.,Singh, I.,Nayyar, H. 2012. “Selenium antagonises the toxic effects of arsenic on mungbean (Phaseolus aureus Roxb.) plants by restricting its uptake and enhancing the antioxidative and detoxification mechanisms” Environmental and Experimental Botany, 77, 242–248.

Matusiewicz, H., Ślachciński, M. 2012. “Development of a new hybrid technique for inorganic arsenic speciation analysis by microchip capillary electrophoresis coupled with hydride generation microwave induced plasma spectrometry”, Microchemical Journal, 102, 61–67.

McSweeney, N.J., Forbes, L. 2014. “Arsenic-interacting plant proteins as templates for arsenic specific flotation collectors? A review”, Minerals Engineering, 64, 67–77.

Montes-Bayón, M.,Molet, M. J. D.,González, E. B.,Sanz-Medel, A. 2006. “Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium-enriched plants (Alliumsativum and Brassicajuncea) and Se speciation by HPLC-ICP-MS”, Talanta, 68(4), 1287–93.

Moosmann, B., Behl, C. 2004. “Selenoprotein synthesis and side-effects of statins”, Lancet, 363(9412), 892–4.

Morales, R., López-Sánchez, J.F., Rubio, R. 2008. “Selenium speciation by capillary electrophoresis”, Trends in Analytical Chemistry, 27(2), 183–189.

Neidhardt, H.,Norra, S.,Tang, X.,Guo, H.,Stüben, D. 2012. “Impact of irrigation with high arsenic burdened groundwater on the soil-plant system: Results from a case study in the Inner Mongolia, China”, Environmental pollution, 163, 8–13.

Pacheco, P., Hanley, T., Figueroa, J. 2014. “Identification of proteins involved in Hg-Se antagonism in water hyacinth (Eichhornia crassipes)”, Metallomics, 6, 560–571.

Papp, L. V.,Lu, J.,Holmgren, A.,Khanna, K. K. 2007. “From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health” Antioxidants & redox signaling, 9(7), 775–806.

Pyrzynska, K. 2009. “Selenium speciation in enriched vegetables”, Food Chemistry, 114(4), 1183–1191.

Radloff, K. A.,Zheng, Y., Michael, H. A., Stute, M., Bostick, B. C., Mihajlov, I.,Bounds, M.,Huq, M. R.,Choudhury, I.,Rahman, M. W.,Schlosser, P.,Ahmed, K. M.,van Geen, A. 2011. “Arsenic migration to deep groundwater in Bangladesh influenced by adsorption and water demand” Nature geoscience, 4(11), 793–798.

Rayman, M.P. 2007. “Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action”, Proceedings of the Nutrition Society, 64(04), 527–542.

Reyes, L. H., Mar, J. L. G., Rahman, G. M. M., Seybert, B., Fahrenholz, T., Kingston, H. M. S. 2009. “Simultaneous determination of arsenic and selenium species in fish tissues using microwave-assisted enzymatic extraction and ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry” Talanta, 78(3), 983–90.

Sathrugnan, K., Hirata, S. 2004. “Determination of inorganic oxyanions of As and Se by HPLC-ICPMS” Talanta, 64(1), 237–43.

Srivastava, M., Ma, L. Q., Rathinasabapathi, B., Srivastava, P. 2009. “Effects of selenium on arsenic uptake in arsenic hyperaccumulator Pteris vittata L.” Bioresource technology, 100(3), 1115–21.

Stabnikova, O., Ivanov, V., Larionova, I., Stabnikov, V., Bryszewska, M. A., Lewis, J. 2008. “Ukrainian dietary bakery product with selenium-enriched yeast” Food Science and Technology, 41(5), 890–895.

Stadlober, M., Sager, M., Irgolic, K.J. 2001. “Effects of selenate supplemented fertilisation on the selenium level of cereals — identification and quantification of selenium compounds by HPLC–ICP–MS”, Food Chemistry, 73(3), 357–366.

Stockler-Pinto, M. B.,Mafra, D.,Farage, N. E.,Boaventura, G. T.,Cozzolino, S. M. F. 2010. “Effect of Brazil nut supplementation on the blood levels of selenium and glutathione peroxidase in hemodialysis patients” Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 26(11-12), 1065–9.

Strunz, C. C.,Oliveira, T. V., Vinagre, J. C.M., Lima, A., Cozzolino, S., Maranhão, R. C., 2008. “Brazil nut ingestion increased plasma selenium but had minimal effects on lipids, apolipoproteins, and high-density lipoprotein function in human subjects”, Nutrition Research, 28(3), 151–155.

Şenol, F. 2010. “Determination of arsenic, selenium and cadmium in some Turkish spices by inductively coupled plasma mass spectrometry”. MS Thesis Middle East Technical University.

Tripathi, R. D., Srivastava, S., Mishra, S., Singh, N., Tuli, R., Gupta, D. K., Maathuis, F. J. M. 2007. “Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants”, Trends in biotechnology, 25(4), 158–65.

TürKomp. “Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı - TürKomp : Soğan, taze, kök, sap.”. http://www.turkomp.gov.tr/food/229,
Son erişim tarihi: 20Ekim 2014.

WHO. “Guidelines for Drinking-Water Quality, 2nd edition”.
http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq2v1/en/index1.html,
Son erişim tarihi: 5 Mart 2015.

Xia, Y., Hill, K. E., Byrne, D. W.,Xu, J., Burk, R. F. 2005. “Effectiveness of selenium supplements in a low-selenium area of China”, The American journal of clinical nutrition, 81(4), 829–34.

Zhang, W., Cai, Y., Tu, C., Ma, L. Q. 2002. Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant. Science of The Total Environment, 300(1-3), 167–177.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. GÜLAY ERTAŞ
Proje No:	112T790
Proje Başlığı:	Arsenik ve Selenyumun Eşzamanlı Türlendirilmesi için Analitik Yöntemler Geliştirilmesi ve Bitkilerde Arsenik-Selenyum Etkileşimi için Kullanılması
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	SÜLEYMAN TABAN, OSMAN YAVUZ ATAMAN
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ KİMYA B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/03/2013 - 15/03/2015
Onaylanan Bütçe:	196910.0
Harcanan Bütçe:	169104.14
Öz:	Tübitak 1001 - Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından 112T790 kodu ile desteklenen bu çalışmada beş selenyum, Se(IV), Se(VI), selenometiyonin, selenosistin ve selenometil selenosisteyin; ve iki arsenik, As(III) ve As(V), türünün eşzamanlı tayinini yapabilmek için duyarlı bir HPLC-ICP-MS metodu geliştirilmiş ve arsenik ve selenyum ile beslenen yeşil soğan bitkisinde anılan elementlerin bitkiye alınışları açısından olası sinerjik ve antagonistik etkileri gözlenmiş ve sonuçlar incelenmiştir. Proje sonuçları arsenik ve selenyumun yeşil soğan bitkisi içerisinde etkileşim halinde olduğunu ve birbirlerinin alınımını, taşınımını ve depolanmasını etkilediğini göstermiştir.
Anahtar Kelimeler:	Arsenik, selenyum, türlendirme, HPLC, ICP-MS, yeşil soğan, antagonistik ilişki, sinerjik ilişki
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır

TÜBİTAK