

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA BİLİM DALI

POLİSİKLİK AROMATİK HİDROKARBONLARIN (PAH)
EKSTRAKSİYONU VE HPLC İLE TAYİNLERİ

Nergiz GÜLER

Danışman

Prof. Dr. Kenan DOST



Manisa;2020

TEZ ONAYI

Nergiz GÜLER tarafından hazırlanan "Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların (PAH) Ekstraksiyonu ve HPLC ile Tayinleri" adlı tez çalışması 20/01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Prof.Dr. Kenan DOST

Manisa Celal Bayar Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof.Dr. Ali ÇELİK

Manisa Celal Bayar Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç.Dr. Nur AKSUNER

Ege Üniversitesi



TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Nergiz GÜLER



| | |
|---------------------------------------|-------------|
| İÇİNDEKİLER | III |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | V |
| ŞEKİLLER DİZİMİ | VII |
| TABLO DİZİNİ | VIII |
| ÖZET | X |
| ABSTRACT | XI |

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | POLİSİKLIKAROMATİK HİDROKARBONLAR (PAH)..... | 1 |
| 1.1 | PAH'ların Gıdalarda ve Sularda Bulunuşu..... | 3 |
| 1.2 | Yasal Limitleri..... | 6 |
| 1.3 | PAH'ların İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri | 7 |
| 1.4 | PAH Analizlerinin Temel Prensipleri | 9 |
| 2 | SIVI KROMATOĞRAFİSİ | 12 |
| 2.1 | Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) | 12 |
| 2.1.1 | Hareketli Faz Seçimi | 13 |
| 2.1.2 | Enjektör | 14 |
| 2.1.3 | Kolon..... | 15 |
| 2.1.4 | Detektörler..... | 17 |
| 2.2 | Kromatografinin Uygulamaları | 18 |
| 2.2.1 | Kalitatif Analiz..... | 18 |
| 2.2.2 | Kantitatif Analiz..... | 18 |
| 3 | MATERYAL VE METOT | 21 |
| 3.1 | Cihaz..... | 21 |
| 3.2 | Kullanılan Materyaller | 21 |
| 3.3 | Çözeltilerin Hazırlanması..... | 23 |
| 3.4 | Poliaromatik Hidrokarbonların Ekstraksiyonu ve HPLC-UV Metodu ile Tayinleri | 23 |
| 3.4.1 | Örneklerin Ekstraksiyonu..... | 23 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.4.2 | PAH'ların HPLC-UV ile Tayinleri | 24 |
| 4 | SONUÇLAR VE TARTIŞMA | 25 |
| 4.1 | Standartların HPLC-UV Metoduyla Tayinleri | 25 |
| 4.1.1 | PAH ₄ 'ün HPLC-UV Tayinleri..... | 25 |
| 4.1.2 | PAH ₁₆ 'nın HPLC-UV Tayinleri | 27 |
| 4.2 | Ekstraksiyon Yöntemi | 40 |
| 4.2.1 | PAH ₄ Ekstraksiyonu | 40 |
| 4.2.2 | PAH ₁₆ Ekstraksiyonu | 42 |
| 4.3 | Örneklerin Analizleri..... | 46 |
| 4.3.1 | Su Örneklerinde PAH ₄ Tayinleri..... | 46 |
| 4.3.2 | Su Örneklerinde PAH ₁₆ Tayinleri | 47 |
| 4.3.3 | Yağ Örneklerinde PAH ₄ ve PAH ₁₆ Tayinleri | 49 |
| 4.4 | Örneklerin PAH ₁₆ GC-MS Analizleri..... | 51 |
| 5 | SONUÇ | 57 |
| 6 | KAYNAKÇA | 59 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|------------------|---|
| Ace | Asenaften |
| ACN | Asetonitril |
| Ant | Antrasen |
| Aph | Asenaftalen |
| B[a]A | Benzo[a]antrasen |
| B[a]P | Benzo[a]piren |
| B[b]F | Benzo[b]floranten |
| B[ghi]Per | Benzo[g,h,i]perilen |
| B[k]F | Benzo[k]floranten |
| Chr | Krisen |
| CONTAM Panel | Besin Zincirindeki Kirleticiler Paneli |
| DB[ah]A | Dibenzo[a,h]antrasen |
| DCM | Diklorometan |
| FAO | Gıda ve Tarım Örgütü |
| Flr | Floren |
| Flt | Floranten |
| GC | Gaz Kromatografi |
| HPLC | Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi |
| HPLC / UV | HPLC ve Ultraviyole Spektrometresi |
| IPCS | Uluslararası Kimya Güvenlik Programı |
| Ipyr | Indeno[1,2,3;cd]piren |
| JECFA | FAO-WHO Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi |
| LOD | Limit of detection (Tespit limiti) |
| LOQ | Limit of quantification (tayin limiti) |
| Nph | Naftalin |
| ODS | C18- Okta dekilsilan |
| PAH | Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar |
| Phe | Fenantren |
| Pyr | Piren |
| SCF | Gıda Bilimsel Komitesi |
| TEF | Toksik Ekvivalent Faktör |
| WHO | Dünya Sağlık Örgütü |
| PAH ₂ | Benzo[a]pyrene |
| | Chrysene |

PAH₄

Benzo[a]pyrene

Chrysene

Benzo[a]anthracene

Benzo[b]flouranthene

PAH₈

Benzo[a]anthracene

Benzo[b]flouranthene

Benzo[k]flouranthene

Benzo[ghi]perylene

Benzo[a]pyrene

Chrysene

Dibenzo[ah]pyrene

Indenol[1,2,3;cd]pyrene

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 1.1. B[a]P'inmetabolikoksidasyonunun şematik gösterimi..... | 8 |
| Şekil 1.2. B[a]P'inmetabolik yükseltgenmesi ve DNA ile kimyasal bağ oluşturması . | 8 |
| Şekil 2.1.HPLCcihazının şematik gösterimi [20] | 13 |
| Şekil 2.2.Altı Yollu enjeksiyonvalfi için yükleme ve enjeksiyon konumları | 14 |
| Şekil 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan HPLC-UVsistemi | 21 |
| Şekil 3.2. Tez kapsamında tayin edilen poliaromatik hidrokarbonların kimyasal yapıları..... | 22 |
| Şekil 4.1. Optimum şartlarda PAH ₄ standartlarına ait HPLC-UVkromatogramı. | 25 |
| Şekil 4.2. PAH ₄ için HPLC-UV yönteme ilişkin kalibrasyon grafikleri | 26 |
| Şekil 4.3. Optimum şartlarda PAH ₁₆ standartlarına ait HPLC-UVkromatogramı..... | 28 |
| Şekil 4.4. PAH ₁₆ için HPLC-UV Yönteme İlişkin Kalibrasyon Grafikleri | 34 |
| Şekil 4.5. PAH ₁₆ standart çözeltisine (10µg/L) ait HPLC-UVkromatogramı | 39 |
| Şekil 4.6. PAH ₁₆ standart çözeltisine (700µg/L) ait HPLC-UVkromatogramı | 44 |
| Şekil 4.7. PAH ₁₆ standart çözeltisi (700µg/L) ile spike edilen saf su örneğinin ekstraksiyon sonrasına ait HPLC-UVkromatogramı | 44 |
| Şekil 4.8. PAH ₁₆ standart ve spike edilen saf su örneğinin ekstraksiyonsonrasına ait HPLC-UVkromatogramlarının çakıştırılmış durumları..... | 45 |
| Şekil 4.9. PAH ₁₆ standart çözeltisi (700µg/L) ile spike edilen yağ örneğinin ekstraksiyon sonrasına ait HPLC-UVkromatogramı | 46 |
| Şekil 4.10. Optimum şartlarda PAH ₄ standartlarına ve su örneklerine ait HPLC-UVkromatogramlarının üst üste çakıştırılmış durumları..... | 47 |
| Şekil 4.11. PAH ₁₆ için atık, çeşme ve içme sularına ait HPLC-UVkromatogramları | 49 |
| Şekil 4.12. PAH ₁₆ standart çözeltisine ait HPLC-UVkromatogramı | 49 |
| Şekil 4.13. Standart PAH ₁₆ çözeltisi ile (700µg/L) spike edilmiş yağ örneğinin kromatogramı | 50 |
| Şekil 4.14. Standart PAH ₁₆ çözeltisine ait (700µg/L) ait kromatogram | 50 |
| Şekil 4.15. Yağ örneğine ait kromatogram | 51 |
| Şekil 4.16. PAH ₁₆ standartlarının TICmodundakiGC-MS kromatogramı..... | 52 |
| Şekil 4.17. PAH ₁₆ standartlarının SIMmodundakiGC-MS kromatogramı | 53 |
| Şekil 4.18. PAH ₁₆ standartlarının her birinin kütle spektrumları..... | 55 |

TABLO DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Tablo 1.1. JECFA tarafından kanserojenik ve genotoksik olarak önerilen 16 PAH.... | 4 |
| Tablo 1.2. CONTAM tarafından PAH kirliliğinin indikatörü olarak kullanılabilmesine karar verilen PAH ₂ , PAH ₄ ve PAH ₈ türleri. | 5 |
| Tablo 1.3. Tez kapsamında çalışılan PAH bileşikleri ve bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri..... | 6 |
| Tablo 1.4. Su ve yağlardaki PAH miktarlarının tayininde kullanılan ekstraksiyon, saflaştırma ve tayin metotları | 10 |
| Tablo 2.1. HPLC detektörlerin bazı performans özellikleri..... | 18 |
| Tablo 4.1. PAH ₄ için HPLC/UV metodunun doğruluğuna ait veriler..... | 26 |
| Tablo 4.2. PAH ₁₆ tayinleri için HPLC-UV analizlerinde kullanılan hareketli faz bileşimi ve akış hızları. | 27 |
| Tablo 4.3. Optimum şartlarda PAH ₁₆ türlerinin HPLC-UV tayinlerinde elde edilen kromatogramdaki sıralamaları | 27 |
| Tablo 4.4. PAH ₁₆ Standartlarına ait piklerin ortalama pik alanları | 28 |
| Tablo 4.5. PAH ₁₆ için pik alanları bakımından tekrarlanabilirlik verileri..... | 35 |
| Tablo 4.6. PAH ₁₆ için alıkonma zamanları bakımından tekrarlanabilirlik verileri ... | 36 |
| Tablo 4.7. PAH ₁₆ için HPLC-UV metodunun doğruluğuna ait veriler | 38 |
| Tablo 4.8. Su örneklerinde PAH ₄ için ekstraksiyon verimi verileri..... | 40 |
| Tablo 4.9. Yağlarda PAH ₄ için sıvı-sıvı ekstraksiyon verimi verileri..... | 42 |
| Tablo 4.10. PAH ₁₆ ile spike edilen su örnekleri için hava ve rotary ile yapılan hesaplamalar..... | 42 |
| Tablo 4.11. Su örneklerinin içerisindeki PAH ₄ miktarları | 47 |
| Tablo 4.12. GC-MS ile su örneklerinde PAH ₁₆ tayinleri | 56 |

TEŐEKKÜR

Bu çalışmanın her aőamasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, karşılaőtığım problemlerle ilgilenen, bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Kenan DOST'a, laboratuvar çalıőmalarımnda her türlü desteklerini gördüğüm hocalarım Arő.Gör. Mertcan ÖKSÜZ ve Dr. Mustafa CİTTAN'a teőekkürü borç bilirim. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne 2015-073 nolu Hızlı Projeye desteklerinden dolayı teőekkür ederim.

Tüm öğrenim hayatım boyunca yanımda olan, bugünlere gelmeme vesile olan anne ve babama, özellikle hayatıma girdiğinden beri hiçbir desteği benden esirgemeyen, her daim yanımda olan sevgili eőime ve aileme sonsuz teőekkürler.

Nergiz GÜLER

Manisa, 2020

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların (PAH) Ekstraksiyonu ve HPLC ile Tayinleri

Nergiz GÜLER

Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kenan DOST

Temel olarak PAH'lar doğal veya insan kaynaklı olup prolitik süreçler ile endüstriyel ve diğer insan aktiviteleri sonucu organik bileşiklerin tam yanmaması sonucunda meydana gelmektedirler. Doğada yüzlerce PAH olmasına rağmen, Uluslararası yetkili kuruluşlar bu bileşiklerden özellikle 16 tanesini kanserojenik ve genotoksik madde olarak önermiş olup Benzo[a]pyrene bileşiğini çevre veya gıdaların kirletmiş olduğunu gösteren bir indikatör olarak kabul etmiştir.

Bu çalışmada su ve sıvı yağlarda kanserojenik etkiye sahip PAH'ların ekstraksiyonu ve sonrasında HPLC-UV yöntemi ile tayinleri amaçlanmıştır. Su örneklerinde olası PAH'lar basitçe sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile diklorometan çözücüsü içerisine çekilir. Yağ örnekleri ekstraksiyonları için ise yağörneği ilk önce n;heksan ile çözülür ve sonrasında yine sıvı-sıvı ekstraksiyon ile asetonitril içerisine alınır. PAH'ların tayinleri HPLC-UV yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında seçilen 16 PAH 15 dakika gibi bir alıkonma zamanı içerisinde birbirlerinden ayrılmış ve her bir PAH için keskin ve dar pikler elde edilmiştir. Yöntemin alıkonma zamanları bakımından tekrarlanabilirliği 0.79 dak SD ve %6 RSD den, pik alanları bakımından %2.5 RSD den düşük olup doğruluk %0.47-6.10 bağıl hata aralığında değişmektedir. Yöntemin LOQ değerleri standart çözeltiler ile yapılan çalışmalara göre deneysel olarak 1-25 µg/L arasında olduğu bulunmuştur. Optimizasyon çalışmalarından sonra metot gerçek örneklerle uygulanmıştır. Yöntem su örnekleri için başarılı bir şekilde uygulanmıştır, fakat yağ örneklerinde ekstraksiyon basamağında birlikte ekstrak edilen türlerden dolayı PAH'ların tanımlanmasında problemler ortaya çıkmıştır.

Anahtar Kelimeler: PAH, HPLC-UV, Su, Sıvı yağ, Ekstraksiyon

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Extraction and Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) by HPLC

Nergiz GÜLER

**Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Chemistry**

Supervisor: Prof. Dr. Kenan DOST

Essentially, PAHs occur as a result of incomplete combustion of organic compounds as a result of pyrolytic processes and industrial and other human activities as a result of natural or human activities. Although there are hundreds of PAHs in nature, International authorities have recommended 16 of these compounds as carcinogenic and genotoxic substances, and Benzo[a]Pyrene has been accepted as an indicator of contaminating the environment or food.

In this study, extraction and determination of PAHs in water and oils by HPLC-UV method was aimed. In water samples, possible PAHs are simply drawn into the dichloromethane solvent by liquid-liquid extraction. For oil samples, the oil sample is first dissolved with n-hexane and then taken into acetonitrile by liquid-liquid extraction. The determination of PAHs was performed by HPLC-UV method. The 16 PAHs selected in the study were separated from each other within a retention time of 15 minutes and sharp and narrow peaks were obtained for each PAH. The reproducibility of the method in terms of retention times are less than 0.79 min SD and %6 RSD, in terms of peak areas are less than %2.5 RSD and accuracy varies between %0.47-6.10 relative error range. LOQ values of method were found between 1-2.5 µg/L by studying of the standard solutions experimentally. After the optimization studies, the method was applied to real samples. The method was successfully applied to the water samples, but problems occurred in the identification of PAHs in the oil samples due to the co-extract.

Keywords: PAH, HPLC-UV, water, edible oil, extraction

GİRİŞ

Hızla gelişen teknoloji ve bunun sonucu olarak ortaya çıkan sanayileşme, insan yaşamını önemli ölçüde kolaylaştırırken birçok önemli çevre sorunlarını da beraberinde getirmektedir. Günümüz çevre sorunlarının başında hava, su, toprak ve gıda kirliliği gelmektedir. İnsanlar bu tür kirleticilerle çevresel yollarla veya bir şekilde temas ederek toksik etkilerine maruz kalmakta ve insan sağlığı olumsuz yönde etkilenmektedir. Endüstriyel ve evsel atıklar, orman yangınları, tarım ilaçları, çöpler, fosil yakıtların yanma ürünleri, sanayi baca gazları gibi zararlı maddelerden çevreye yayılan kimyasallar, hava, su ve toprak ortamına girerek çevresel kirliliklere neden olmaktadır. Bu kirlilik, insan yaşamının temel kaynağı olan gıdalara da geçmektedir. Çevresel kirlilikler arasında polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) önemli bir yer tutmaktadır. Bu tür kirleticiler başta insan sağlığı olmak üzere canlı organizma üzerinde toksik ve kanserojen etkiye sahiptirler. Bu maddelerin düşük miktarları dahi insan sağlığı için bir tehdit oluşturmaktadır. Bu nedenle PAH'ların, insanın temasta olduğu çevresel ortamlarda ve gıda ürünlerindeki miktarlarının kontrol edilmesi oldukça önem taşımaktadır. Bu değerlerin kabul edilen maksimum kalıntı limitleri ile karşılaştırılması ve eğer yüksekse limit değerlerin altına indirilmesi için gerekli önemelerin alınması oldukça önemlidir. Bu çalışmada PAH'ların su ve sıvı yağlardan ekstraksiyonu ve sonrasında miktarlarının kromatografik yöntemle tayinleri amaçlanmıştır.

1 POLİSİKLIK AROMATİK HİDROKARBONLAR (PAH)

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) iki veya daha fazla aromatik halka içeren lipofilik yapıları geniş bir gruba sahip organik bileşiklerdir. Temel olarak PAH'lar doğal veya insan kaynaklı olup politik süreçler ile endüstriyel ve diğer insan aktiviteleri sonucu organik bileşiklerin tam yanmaması sonucunda meydana gelmektedirler [1]. Doğal olarak, orman yangınları ya da volkanik patlamalarla ortaya çıkmaktadır. İnsan aktiviteleriyle meydana gelmeleri ise petrol, kömür ve doğal gaz gibi fosil yakıtların yakılmasında, motorlu araçlarda ve sigarada ortaya çıkmaktadır. Sigarayla meydana gelen PAH'lar bağıl olarak az olsa da direkt kullanıcılarla temas ettiğinden insan sağlığına en zararlıları arasındadır [2]. Endüstriyel işlemlerde, atık yakma, çimento fabrikaları, petrol rafinerileri, kok ve asfalt imalatı, alüminyum, demir çelik imalatında ortaya çıkmaktadır[3]. Isınma ve enerji maksatlı tercih edilen odun gibi katı ve fosil yakıtlar da PAH'ların ortaya çıkmasına neden olmaktadır [4].

PAH'ların, lipofilik karakteri nedeniyle suda çözünme oranları düşüktür. Fiziksel ve kimyasal özellikleri moleküldeki halka sayısına veya molekül ağırlıklarına bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Temelde yapıdaki halka sayısına göre PAH'lar hafif ve ağır PAH'lar diye iki sınıfa ayrılır. Bünyesinde dörtten az aromatik halka taşıyan PAH'lar hafif PAH, dört ve daha çok aromatik halka taşıyan PAH'lar ise ağır PAH olarak sınıflandırılmıştır [5]. Ağır PAH'lar genel olarak suda çözünmez, dolayısıyla buhar basınçları düşüktür. Hafif PAH'lar ise suda daha kolay çözünür ve dolayısıyla buhar basınçları da yüksektir. PAH'ların halka sayısına bağlı olarak molekül ağırlıkları artması suda çözünme oranlarını düşürürken toksik ve kanserojenik özelliklerini artırmaktadır [6].

PAH'ların mutajene neden olan, zehirli ve kanserojenik özellikleri yapılan çalışmalar neticesinde saptanmıştır [7]. Bu riskler nedeniyle çevrede ve gıdalarda bulunan oranları insan sağlığı bakımından kritik bir hale dönüşmüştür. PAH'ların yaşadığımız yerlerde bulunmasına neden olabilecek pek çok durum söz konusudur. Tütün ya da odun dumanında, islenmiş ya da salamura edilmiş gıdalarda bulunabilmektedir. Sütün kirlenmesi durumunda da PAH ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca kirliliği ortamda yetiştirilen ürünlerde de PAH görülebilmektedir [8].

Doğada yüzlerce PAH bileşiği bulunmaktadır [8, 1]. Fakat Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Birimi özellikle 16 PAH'ın insan sağlığı ve çevre üzerine olan potansiyel etkilerinden dolayı öncelikli kirleticiler olarak belirlemiştir [9]. Bu 16 PAH şunlardır: Naftalin (Nph), Asenaftalen (Aph), Asenaften (Ace), Floren (Flr), Fenantren (Phe), Antrasen (Ant), Floranten (Flt), Piren (Pyr), Benzo[a]antrasen (B[a]A), Krisen (Chr), Benzo[b]floranten (B[b]F), Benzo[k]floranten (B[k]F), Benzo[a]piren (B[a]P), Benzo[g,h,i]perilen (B[ghi]Per). Dibenzo[a,h]antrasen (DB[ah]A) ve Indeno[1,2,3;cd]piren (Ipyr). Genel olarak yukarıda verilen PAH'ların saf halleri katı, bazıları renksiz, bazıları beyaz, bazıları açık sarı renge sahip kokulu bileşiklerdir.

Bu bileşikler arasında en çok çalışılanı ve bilineni Benzo[a]piren'dir (B[a]P). Bu nedenle B[a]P genel olarak PAH kirlenmesinin bir indikatörü olarak görülmektedir. PAH'ların ve buna bağlı olarak B[a]P'nin meydana gelmesinde doğal ve çevresel kaynaklar etkili olmaktadır. B[a]P'lar tabiatla atmosferin tanecik fazında bulunmaktadırlar. Bu sebeple B[a]P'ların temel kaynağını atmosferde oluşan

fotokimyasal oksidasyonlar meydana getirmektedir. Meydana gelen bu oksidasyonlardan dolayı B[a]P'lar toprak ve suya geçer ve neticesinde çeşme suları, yağmur suları, yer altı suları ve atık sularda B[a]P'lar saptanabilmektedir [6].

1.1 PAH'ların Gıdalarda ve Sularda Bulunuşu

PAH'ların gıdalarla teması iki şekilde gerçekleşmektedir. Bu yollardan ilki gıdaların üretim esnasında çevresel olarak hava, su ve toprak ile teması sonucu gıdaların kirlenmesi, ikincisi ise gıdaların tütüleme ve kurutma gibi işleme prosesleri ve yüksek sıcaklıklarda kızartma, ızgara, kavurma gibi pişirilme işlemleri ile PAH'ların oluşması ve gıdaların kirlenmesidir [6]. Kızartma ve kavurma işlemlerinde yağların yüksek sıcaklıklarda piroliz olmasından, ızgara işlemlerinde ise pişirilen gıdadan kor kömür üzerine düşen yağ damlarının yanarak pirolizi ve yine odun kömürünün tam yanmaması sonucu oluşan PAH'ların dumanla birlikte gıda maddesi yüzeyine yapışmasıyla kirlenme oluşmaktadır [6,10,11].

PAH'lar lipofilik karakterde olmaları ve çevrede geniş bir şekilde yer almalarından dolayı hava, su ve topraktan yağlı tohumlara bulaşmakta ve bu tohumların işlenmesi sonucu da kolayca yağlara geçmektedirler. PAH'lar yağlara doğal kaynaklardan, çevresel kirliliklerden veya rafinasyondan önceki işlem adımlarının birinden bulaşmış olabilmektedir. Yağlar rafine edildiğinde, ağartma ve deodorizasyon işlemlerinden sonra kirlilik miktarlarında azalma olduğu görülmüştür. Bunun nedeni ağartma basamağında kullanılan ağartma toprağının ve deodorizasyon basamağında da yağa istenmeyen koku ve tat veren maddeler uzaklaştırılırken PAH'ların bir kısmının da uzaklaştırılmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ağartma başmağı aktif karbon ve ağartma toprağı karışımıyla yapıldığında PAH'ların uzaklaştırılması daha etkin olmaktadır [12]. Yemeklik sıvı yağlar çok fazla tüketildikleri için bu tip gıdalarda bulunan PAH miktarları çok önemlidir.

PAH'lar bilhassa prina yağlarında yüksek miktarlarda bulunur. Bunun sebebi üretim anındaki birkaç etken olabilmektedir. Bu etkenlerden ilki, prinanın kurutulması basamağında, ikincisi çözücünün uçurulması anında yüksek sıcaklık uygulanması, üçüncüsü prinadan yağın ekstraksiyonu sırasında, önceden kontamine olmuş çözücünün kullanılması olabilmektedir [5].

İçme sularının PAH'larla kirlenmelerinin en büyük nedeni su depolama tankları ve su borularının korozyonu önlemek için kömür katranı ile kaplanmaları sonucu suyun kirlenmelerinden kaynaklanmaktadır [6]. Atmosferdeki asılı partiküllere absorbe olmuş PAH'ların da yağmur sularıyla içme suları kaynaklarına karışması da kirlilik kaynakları arasında sayılabilir. PAH'ların sudaki çözünürlükleri düşük olduklarından sedimentteki miktarları sudaki miktarlarından daha yüksek olacağı düşünülmektedir. Ayrıca göl ve nehirlerin PAH'larla kirlenmesinde, arıtılmış endüstriyel ve belediye sularının deşarjı, yağmur suları, kimyasal rafinasyon, volkanlar ve egzoz gazlarının atmosferik serpinileri rol oynamaktadır. Buradan da içme sularına karışma ihtimali oldukça yüksektir.

Doğada yüzlerce PAH olmasına rağmen, Uluslararası Kimya Güvenlik Programı (IPCS), Gıda Bilimse Komitesi (SCF) ve Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) birlikteliğinden oluşan FAO-WHO Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (JECFA) tarafından 15 PAH bileşiği kanserojenik ve genotoksik madde olarak önermiştir. Daha sonra JECFA tarafından Benzo[c]Florende bu gruba dahil edilerek bu sayı 16 çıkartılmıştır. JECFA tarafından kanserojenik ve genotoksik olarak önerilen 16 PAH bileşiği Tablo 1.1'de verilmiştir [13].

Tablo 1.1. JECFA tarafından kanserojenik ve genotoksik olarak önerilen 16 PAH

| | | |
|----------------------|-----------------------|-------------------------|
| Benzo[a]anthracene | Benzo[a]pyrene | Dibenzo[ah]pyrene |
| Benzo[b]flouranthene | Chrysene | Dibenzo[ai]pyrene |
| Benzo[j]flouranthene | Cyclopenta[cd]pyrene | Dibenzo[al]pyrene |
| Benzo[k]flouranthene | Dibenzo[ah]anthracene | Indenol[1,2,3;cd]pyrene |
| Benzo[ghi]perylene | Dibenzo[ae]pyrene | 5;Methylchryzene |
| | | Benzo[c]fluorene |

EFSA tarafından düzenlenen Besin Zincirindeki Kirleticiler Paneli (CONTAM Panel)'inde bu 16 PAH'ın her biri için tek başlarına oral kanserojenik çalışmaların eksikliği, toksik etki mekanizmalarının farklılığı ve toksik ekivalent faktör (TEF) bakımından PAH karışımlarının kanserojenik potansiyellerinin tahmindeki yetersizliklerden dolayı Tablo 1.1'de verilen PAH'ların tamamını kanserojenik indikatör olarak kabul edilemeyeceğini açıkladı. CONTAM Panel risk karakterizasyonun PAH'ların mevcut oral kanserojenik verilere dayandırılması

gerektiğini sonucuna vardı. Bu nedenle bu konuda oldukça çok sayıda veri bulunan B[a]P ve kanserojenik çalışmada kullanılan iki kömür katranı karışımında bulunan yedi tane PAH toplamda sekiz PAH (PAH₈) (Tablo 1.2) tek başlarına veya bir arada besinlerde bulunmaları onların kanserojenik potansiyeli olan kirleticilerle kirletildiğinin bir indikatörü olarak kullanması gerektiği sonucuna vardı [13]. Tablo 1.2’de verilen sekiz PAH’ın yanı sıra, kimi zamanlar sadece dört PAH’ın (PAH₄) kimi zamanda sadece iki PAH’ın (PAH₂) tayinleri analizi yapılan ortamın PAH’larla kirletici indikatör olarak kullanılıp kullanılmayacağına kararına varmak için gerçekleştirildi. PAH₂, PAH₄ ve PAH₈ arasındaki korelasyon 0.92, PAH₄ ve PAH₈ arasında ise 0.99 olarak bulundu. Sonuç olarak CONTAM panel, besin maddelerinin kirlenmiş olduğunun indikatörü olarak PAH₄ ve PAH₈ kullanımının daha iyi olduğunu önerdi [13].

Tablo 1.2. CONTAM tarafından PAH kirliliğinin indikatörü olarak kullanılabilmesine karar verilen PAH₂, PAH₄ ve PAH₈ türleri.

| PAH ₈ | PAH ₄ | PAH ₂ |
|-------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| Benzo[a]anthracene | <u>Benzo[a]pyrene</u> | <u>Benzo[a]pyrene</u> |
| Benzo[b]flouranthene | Chrysene | Chrysene |
| Benzo[k]flouranthene | <u>Benzo[a]anthracene</u> | |
| Benzo[ghi]perylene | <u>Benzo[b]flouranthene</u> | |
| Benzo[a]pyrene | | |
| Chrysene | | |
| Dibenzo[ah]pyrene | | |
| Indenol[1,2,3;cd]pyrene | | |

Bu açıklamalara rağmen tez kapsamında Tablo 1.3. de verilen 16 PAH ile çalışmalarımızı sürdürdük.

Tablo 1.3. Tez kapsamında çalışılan PAH bileşikleri ve bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri.

| Kimyasal Ad | Simge | Formül | MA (g/mol) | Renk | Sudaki Çöz.(mg/L) |
|------------------------|-----------|---------------------------------|------------|------------|-------------------|
| Naphthalene | Nph | C ₁₀ H ₈ | 128.169 | Beyaz | 31 |
| Acenaphthylene | Aph | C ₁₂ H ₈ | 152.19 | Sarı | 3.93 |
| Acenaphthene | Ace | C ₁₂ H ₁₀ | 154.21 | Beyaz | 1.93 |
| Fluorene | Flr | C ₁₃ H ₁₀ | 166.22 | Beyaz | 1.98 |
| Phenanthren | Phe | C ₁₄ H ₁₀ | 178.23 | Renksiz | 1.20 |
| Anthracene | Ant | C ₁₄ H ₁₀ | 178.23 | Renksiz | 0.076 |
| Fluoranthene | Flt | C ₁₆ H ₁₀ | 202.25 | Soluk sarı | 2.6 |
| Pyrene | Pyr | C ₁₆ H ₁₀ | 202.25 | Soluk sarı | 0.077 |
| Benzo[a]anthracene | B[a]A | C ₁₈ H ₁₂ | 228.30 | Yeşilimsi | 0.1 |
| Chrysene | Chr | C ₁₈ H ₁₂ | 228.30 | Renksiz | 0.0028 |
| Benzo[b]fluoranthene | B[b]F | C ₂₀ H ₁₂ | 252.30 | Renksiz | 0.0012 |
| Benzo[k]fluoranthene | B[k]F | C ₂₀ H ₁₂ | 252.30 | Sarı | 0.00076 |
| Benzo[a]pyrene | B[a]P | C ₂₀ H ₁₂ | 252.30 | Sarı | 0.0023 |
| Benzo[g,h,i]perylene | B[ghi]Per | C ₂₂ H ₁₂ | 276.30 | Soluk sarı | 0.00026 |
| Dibenzo[a,h]anthracene | DB[ah]A | C ₂₂ H ₁₄ | 278.30 | Renksiz | 0.000050 |
| Indeno[1,2,3;cd]pyrene | Ipyr) | C ₂₂ H ₁₂ | 276.30 | Sarı | 0.062 |

1.2 Yasal Limitleri

Gıda maddelerindeki PAH içeriğinin sınır değerleri Avrupa Komisyonu tarafından belirlenmiştir. Komisyon yönetmeliği 835/2011'da, İnsan tüketimi için kullanılan sıvı ve katı yağlarda B[a]P için maksimum seviye 2 µg/kg, benzo[a]piren, benzo[a]anthrasen, benzo[b]floranten ve chrysene'nin toplamı için maksimum seviyeyi 10 µg/kg olarak belirlemiştir [3]. Yenilebilir yağlar da PAH'ların maksimum değerleri için bazı ülkeler (İspanya, İtalya, Portekiz, Yunanistan) kendi limitlerinin koymuştur.

PAH₈ grubundaki her bir PAH için 2 µg/kg, toplamı için 10 µg/kg sınır değerlerini belirlemiş bulunmaktadır [2].

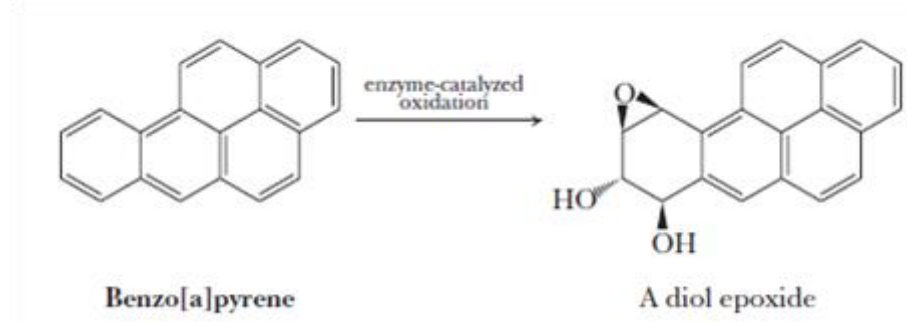
Yüzey ve kıyı sularında genel olarak her bir PAH için limit değer 50 ng/L, kirletilmemiş yeraltı sularında 0-5 ng/L, yüksek kontamine bölgelerde ki yeraltı sularından 10 µg/L, içme sularında 1 ng/L-11 µg/L arası olarak kabul edilmektedir [14].

1.3 PAH'ların İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

İnsanlar havayı ve havada asılı partikül ve tozları soluyarak, su ve yiyecek tüketerek ve toprak ve tozla temasla etmek suretiyle birçok yolla PAH'larla temas etmektedir [1]. Özellikle yüksek derecede etkileşme insanların PAH ile kirletilmiş yiyecekleri tüketmekle (tütsülenmiş ve odun kömüründe pişirilmiş et veya balık) maruz kalınmaktadır. Yiyecek tüketimi PAH'lara maruz kalmanın önemli yoludur (soluk almaya göre), su içimi ve toprakla temas daha düşük etkilere sahiptirler [1].

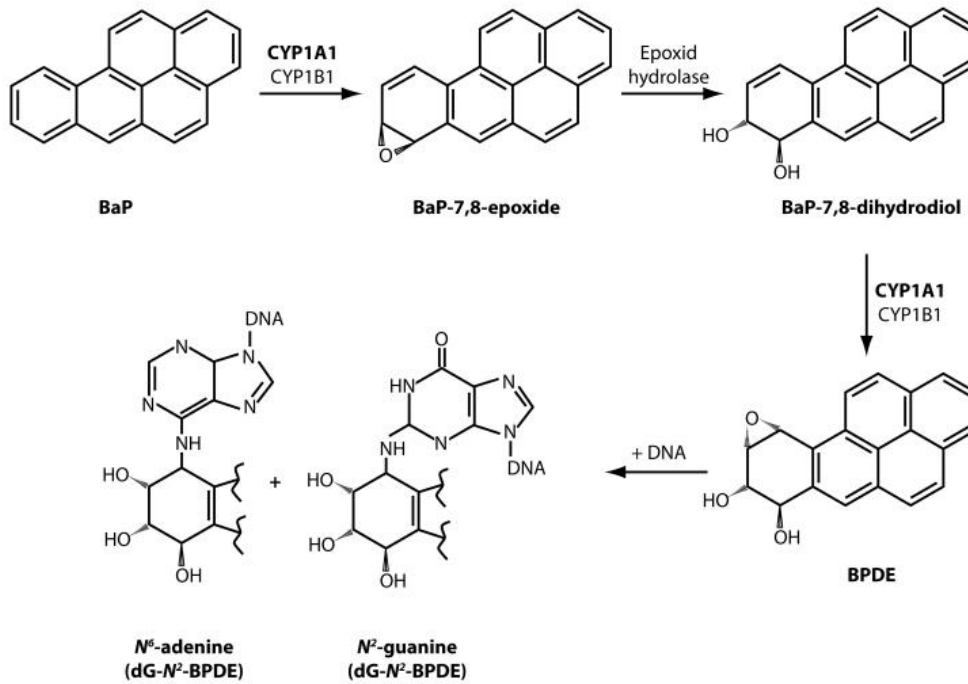
PAH'ların toksik ve kanserojenik etkileri hücre içi kimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan metabolitlerine bağlıdır. Genel olarak PAH'lar canlı organizmada kimyasal reaksiyona girerek üç farklı bilinen metabolitler üretirler. Bunlar diol-epoksit, radikal katyon ve o-kinon metabolitleridir. Bunlardan en önemlisi ve en çok bilineni diol-epoksi metabolit oluşum mekanizmasıdır.

İnsan vücudu PAH'ları (B[a]P ve diğerlerini) elimine etmek amacıyla onları yükseltgeyerek suda çözülebilir duruma getirmektedir. Meydana gelen bu metabolik oksidasyon sonucu yüksek verimde oluşan diol-epoksit türevleri DNA ile kimyasal tepkime vererek PAH'ların DNA ile kimyasal bağ yapmasına neden olmaktadır [5, 15]. Sonuçta PAH-DNA türünde kimyasal bağlı bileşikler oluşmaktadır ki, bu yapılar PAH'lara maruz bırakılan deneysel hayvanların dokularında ve insan akciğer dokularında bulunmuştur [1].



Şekil 1.1. B[a]P'in metabolik oksidasyonunun şematik gösterimi

Daha detaylı olarak, B[a]P'nin metabolik oksidasyonu üç adımda gerçekleşmektedir. Birinci adım olarak B[a]P CYP1A1 veya CYP1B1 enzimleriyle enzimatik yükseltgenme sonucu B[a]P-7,8-epoksi ara ürünü, devamında epoksi hidroliziyle B[a]P-7,8-dihidrodiol oluşmaktadır, tekrardan CYP1A1 veya CYP1B1 enzimleriyle B[a]P-7,8-dihidrodiol-9,10-epoksi (BPDE) metaboliti oluşmaktadır. Bu metabolik yükseltgenme yüksek verimle oluşmaktadır [15]. Sonuçta oluşan metabolit DNA ile kimyasal bağ oluşturarak B[a]P'nin yani PAH'ların canlı bünyesinde kanserojenik ve mutajenik özellik göstermesi neden olmaktadır [7]. B[a]P metabolik oksidasyonu ve DNA ile reaksiyonu Şekil 1.2'de verilmiştir.



Şekil 1.2. B[a]P'in metabolik yükseltgenmesi ve DNA ile kimyasal bağ oluşturması

PAH'lar tümör başlatıcı, geliştirici ve ilerletici özellikleri olan bileşiklerdir. Hayvanlar ile yapılan çalışmalarda kısa veya uzun vadede PAH'lara maruz kaldıklarında bağışıklık sisteminde, vücut sıvılarında sorunlara, akciğer, mesane ve deri kanserlerine sebep olduğu görülmektedir. Yüksek miktarda B[a]P'ne maruz bırakılan hamile farelerde doğum zorlukları görülmüş buna ek olarak bu farelerin yavrularında doğum bozuklukları, düşük kiloda doğum gibi problemler görülmektedir. Benzeri sorunlar insanlar için de bulunma ihtimali vardır ama bunu tasdik eden bir çalışma yapılmamıştır [16]. B[a]P'ne maruz bırakılan hayvanlarda dakikalar ve hata saatler sonrasında hayvanının iç organlarında tayin edilebilir miktarlarda B[a]P tayin edilmiştir. En yüksek miktar karaciğerde görülmüştür. Yağlı dokular PAH'lar için önemli depolanma bölgeleri olmalarına rağmen, hızlı metabolizma olmalarından dolayı depolanma gibi bir özelliklerinin olduğu görülmemiştir [17]. Vücuttan atılım dışı ve idrar yoluyla olmaktadır.

Doğada bulunan yüzden fazla PAH bileşiğinin mutajenik ve kanserojenik etkisi DNA ile yaptıkları bileşiklere bağlıdır [1]. Bu durum, Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), Avrupa Bilimsel Komitesi (SCF) ve EFSA gibi birçok kuruluş tarafından rapor edilmiştir [16,18, 19].

1.4 PAH Analizlerinin Temel Prensipleri

PAH'lar herhangi bir analitik metotla kalitatif veya kantitatif olarak tayin edilmeden önce genel olarak su ve yağ örneklerinde ekstraksiyon edilmez. Bu nedenle kullanılacak analitik metodun yüksek zenginleştirme faktörüne sahip olmalı ve son olarak elde edilen çözelti içerisinde düşük konsantrasyonlardaki analitlerin zenginleştirilerek analitik cihazla tayin edilebilir seviyelere çıkartılmasına izin vermelidir. Bu amaç için birçok ekstraksiyon metodu kullanılmıştır. Tablo 1.4'te su ve yağ örneklerinde PAH'ların ekstraksiyonu ve tayinleri için genel olarak kullanılan yöntemler özet olarak verilmiştir. Bu tekniklerden herhangi birinin kullanılması analizi yapılacak örneğe, PAH'ların türlerine, zamana, eldeki imkânlarla ve istenilen hassasiyete bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir [9].

Tablo 1.4. Su ve yağlardaki PAH miktarlarının tayininde kullanılan ekstraksiyon, saflaştırma ve tayin metotları

| Su Örnekleri | | |
|---|--|---|
| Ekstraksiyon Metodu | Saflaştırma Yöntemi | Tayin Metodu |
| Katı Faz Ekstraksiyonu Sıvı;SıvıEkstraksiyonu | Kolon Kromatografi İnce Tabaka Kromatografi Katı Faz Ekstraksiyonu | HPLC/FLD, HPLC/UV GC/FID, GC/MS LC/MS |
| Yağ Örnekleri | | |
| Sıvı;SıvıEkstraksiyonu Kafein Kompleksi Sabunlaştırma | Kolon Kromatografi İnce Tabaka Kromatografi Katı Faz Ekstraksiyonu | HPLC/FLD, HPLC/UV GC/FID, GC/MS LC/MS |

Yağların analizinde en önemli basamak, yağı çözerek PAH'ları lipitlerden ayırarak çözücü ortamına alınması için gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemidir. Bu amaç için çoğu kez sıvı-sıvı ekstraksiyonu, kafein kompleksi oluşumu ve sabunlaştırma yöntemleri kullanılmaktadır. Her yöntem kendine özgü avantajları içerisinde barındırmaktadır [9].

Sıvı-sıvı ekstraksiyonda yağ örnekleri apolar organik bir çözücüde çözülür ve PAH'lar çözünürlükleri yüksek olan bir organik çözücü ile ekstrakte edilerek çözelti içerisine alınır.

Kafein kompleksi ile ekstraksiyon metodunda, yağ örnekleri apolar organik bir çözücüde çözülür, elde edilen çözeltiye kafein-formik asit çözeltisi eklenerek PAH'lar ekstrakte edilir. Kafein kompleksi sulu sodyum klorür çözeltisi ile, PAH'lar ise çözünürlükleri yüksek olan bir organik çözücü ile ekstrakte edilerek çözelti içerisine alınır.

Sabunlaştırma yönteminde, yağ örnekleri bazik metanol içerisinde 60–70 °C de muamele edilerek yağ asitlerinin sabun yapısına geçmeleri sağlanır. Karışım soğutulduktan sonra sabun fazı ayrılır. Geriye kalan metanolik faz uygun bir organik çözücü ile ekstrakte edilerek çözelti ortamına alınır.

Toksik ve kanserojen etkiye sahip PAH'ların çevre, gıda ve biyolojik örneklerde bulunan miktarları, gaz kromatografisi (GC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve elektrokinetik kromatografi gibi yüksek hassasiyetle donatılmış cihazlar ile tayin edilebilmektedir. PAH'ların gaz kromatografisi ile tayinlerde detektör olarak alev iyonlaşma detektörü (GC;FID) ya da kütle spektrometresi (GC;MS) kullanılmaktadır. HPLC ile tayinlerde ise genelde ultraviyole spektrometresi (HPLC-UV), Floresans spektrometresi (HPLC-F), fotodiyotarray (PDA) ve kütle spektrometresi (HPLC-MS) detektör olarak kullanılmaktadır. PAH'ların HPLC ile tayinlerinde genelde sabit fazın apolar, hareketli fazın polar olduğu ters faz kromatografi (RP-HPLC) yöntemi kullanılmaktadır [16].

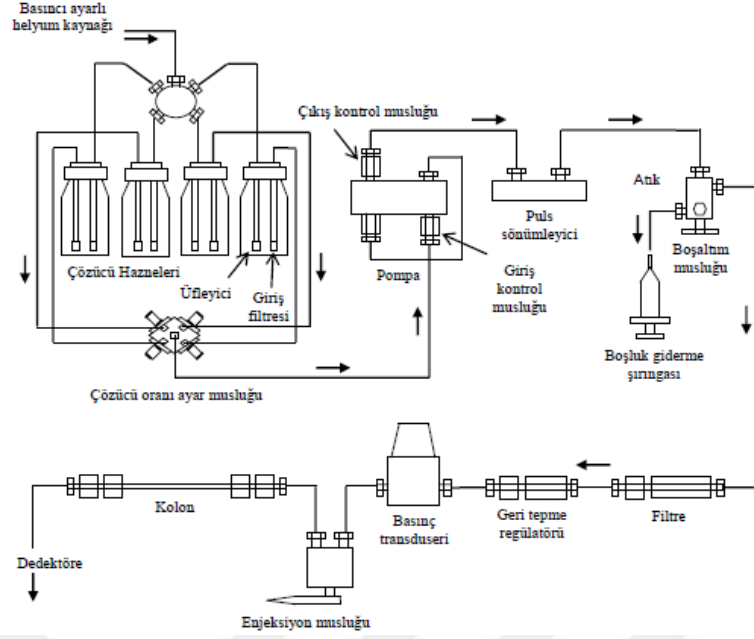


2 SIVI KROMATOGRAFİSİ

Kromatografi, kompleks karışımlar içerisindeki maddelerin birbiriyle karışmayan iki faz arasında farklı dağılım oranları/fazlara olan ilgileri / fazlardaki farklı çözünürlükleri / adsorpsiyonları / iyonik yükleri / büyüklük farklılıkları gibi özelliklerinden yararlanılarak maddelerin ayrılması ve sonrasında tanımlanması üzerine kurulmuş ayırma yöntemine denmektedir. Fazlardan biri sabit diğeri hareketli fazdır. Sabit faz bir kolon içerisine doldurulmuş veya düz bir zemin üzerine yayılmış herhangi bir katı veya katı üzerine emdirilmiş bir sıvı, hareketli faz ise burada sıvı olup bir çözücü veya çözücüler karışımıdır. Hareketli faz bir kolon içinde, ya normal gravitasyon (yer çekimi) kuvvetiyle veya basınçla kolondaki sabit faz içerisinden veya üzerinden belirli bir akış hızıyla geçirilir. Bu geçiş esnasında hareketli faz içerisinde çözünmüş halde bulunan maddelerle sabit faz içerisinden veya üzerinde geçerken aralarında fiziksel ve kimyasal bazı çekim kuvvetlerinden veya çözünürlüklerinden veya maddelerin büyüklüklerinden dolayı her madde için farklı olan etkileşimler meydana gelecektir. Bundan dolayı hareketli faz, sabit faz üzerinden geçerken, hareketli faz içerisinde bulunan maddelerin kolon içindeki hızları farklı olur. Sabit fazla arasındaki çekim kuvveti veya ilgisi en az olan büyük moleküller kolon içinde hızlı hareket ederek kolondan en önce çıkarken, tersi durumlarda yavaş hareket ederek kolondan daha geç çıkarlar [20].

2.1 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC’de hareketli faz bir sıvıdır ve ayırımlarda, maddelerin sabit faz ile hareketli faz arasındaki farklı dağılım oranlarına göre yapılmaktadır. Günümüzde, ticari olarak farklı firmalara tarafından üretilen HPLC cihazı ve kolonları bulmak mümkündür. Hareketli fazın sabit faz üzerinden belli bir akış hızında geçebilmesi için pompa sistemlerine ihtiyaç vardır. Genel olarak pompalar 0.1-10 mL/dak akış hızına sahip olup 1200 atm’lik yüksek basınçlara kadar çıkabilmektedirler. HPLC, tüm ayırma yöntemleri içerisinde en yaygın olarak tercih edilenidir. Bunun başlıca nedenleri; duyarlılığı, doğruluğu, tekrarlanabilirliğin yüksek olması, uçucu olmayan türlerin ya da sıcakta hızlı bir şekilde bozunabilen maddelerin ayrılmasına uygun olması, pek çok bilim alanının ve sanayinin ilgisini çeken maddelerin kantitatif çözümlerine basit ve geniş bir biçimde uygulanabilir olmasıdır [21]. Şekil 2.1. gradiyent ve izokritik ayırmada kullanılacak ticari bir HPLC cihazının şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.1. HPLC cihazının şematik gösterimi [20]

2.1.1 Hareketli Faz Seçimi

HPLC’de hareketli faz seçimi maddelerin ayrımlarının istenilen ayırma gücünde olması için çok önemlidir. Hareketli faz seçiminde, kaynama noktası, viskozite, UV geçirgenlik, kırılma indisi, saflık, örnek çözelti bileşenlerine karşı inertlik, korozyon direnci, toksisite ve fiyat gibi değişik özellikler göz önüne bulundurulmaktadır. Bu özellikler yanında genel olarak hareketli faz seçiminde en önemli nokta hareketli fazın kullanılan detektöre uygun olmasıdır, yani detektöre aktif olmalıdır. Aksi durumda, düşük hassasiyet, düşük duyarlık, yüksek zemin sinyali ve kromatogram üzerinde beklenmeyen pikler görülebilir [19]

HPLC’de hareketli faz olarak kullanılan bir veya birden fazla çözücünün karıştırılmasıyla oluşturulan hareketli fazın bileşimi sabit ve analiz süresince de değiştirilmiyorsa yani analiz süresince hareketli faz polaritesinde herhangi bir değişim olmadan yapılan ayırma işlemine izokritik ayırma veya izokritik elüsyon denir. Hareketli faz bileşimi iki veya daha fazla farklı çözücü kullanılarak analiz süresince belli bir programa bağlı olarak değiştiriliyor yani hareketli faz polaritesi analiz süresince değiştiriliyorsa yapılan ayırma gradiyent ayırma veya gradiyent elüsyon olarak adlandırılır. Her iki elüsyon yönteminin de avantaj ve dezavantajları vardır. Duruma göre izokritik veya gradiyent elüsyon analizci tarafından seçilir. Yalnız HPLC’de

gradyent elüsyon maddelerin ayırma kapasitesi üzerinde daha etkili olduğu akıldan çıkartılmamalıdır. [20].

2.1.2 Enjektör

HPLC metodunda hareketli faz bir pompa yardımıyla pompalandığı ve kolonun dolgu maddesinden dolayı ayırımlar yüksek basınç altında gerçekleştirilmektedir. Dolayısıyla numunenin tekrarlanabilir bir şekilde ve basınçta herhangi bir değişim olmadan hareketli faz içerisine izin verecek enjeksiyon sistemi kullanılmak zorundadır. Bu amaç için ticari olarak üretilen altı yollu enjeksiyon valfi kullanılmaktadır (Şekil 2.2.). Enjeksiyon valfinin örneği her zaman tekrarlanabilir bir hacimde enjeksiyon yapak için yükleme ve sonrasında da örneği kolona göndermek için enjeksiyon olarak iki konumu bulunmaktadır. Yükleme konumunda örnek düşük basınç altında loop diye adlandırılan ve hacmi sabit olan örnek sarmalı içerisine bir enjektör yardımıyla 4-1-6 yolundan doldurulur. Loop hacmi sabit olduğundan enjektörden doldurulan örneğin fazlası 6 yolundan dışarı aktarılır. Bu konumda hareketli faz 2 ve 3 yolunu kullanarak yüksek basınç altında kolona gitmektedir. Enjeksiyon konumunda valf bir adım döndürülerek hareketli faz yükleme adımında sarmal içerisine doldurulan örneğin kolon içerisine sürüklemesi için 2-1-4-3 yolları yardımıyla hareket ettirilir. Bu şekilde enjeksiyon adımında kolon basıncında herhangi bir değişim olmaz. Enjeksiyon manuel veya otomatik olarak gerçekleştirilebilir. Manuel de valfin hareketi analizci tarafında gerçekleştirilmektedir. Otomatik sistemde valf hareketi bilgisayar kontrollü bir sistem tarafından yapılmaktadır. Genel olarak otomatik enjeksiyon sistemlerinin tekrarlanabilirlik bakımından daha üstün olduğu bilinmektedir.



Şekil 2.2. Altı Yollu enjeksiyon valfi için yükleme ve enjeksiyon konumları

2.1.3 Kolon

Kompleks karışımlardaki maddelerin istenilen ayırma gücünde ayrılmasında en büyük pay ve HPLC metodunun en önemli parçası olan kolonlar 30-300 mm uzunlukta, 1-4.6 mm çapında, 1.9-10 µm tanecik boyutuna sahip olabilirler. Günümüze kadar en çok tercih edilen HPLC kolonu 4.6 mm çap, 250 mm boy ve 5 µm tanecik boyutlu kolonlardır. Bu tür kolonlarla 40000;60000 plaka/m ulaşılabilir. Kolonların boylarının artışı, örnek bileşenlerinin ayırımının daha iyi olmasını sağlamasına karşın, analiz süresinin uzamasına, hareketli faz miktarının ve pik genişliklerinin artmasına sebebiyet vermektedir [20].

UHPLC sistemlerinin varlığı daha kısa, dar ve küçük tanecik boyutuna sahip mikro-kolonların kullanımı ön plana çıkmaktadır. Her bir parametre (kolon uzunluğu, çapı ve tanecik boyutu) teorik plaka sayısı üzerinde etkilidir. Kolon ve tanecik boyutları yapılan analize ve eldeki cihaza göre seçilmektedir. Bu mikro-kolonlar ile çok az miktarda çözücü ile hızlı bir şekilde ayırma yapabilmektedir. Çözücüler kullanıldıktan sonra atıldığı için mikro-kolon kullanımı çok önemli bir üstünlüktür. 15 saniye gibi çok kısa bir zamanda sekiz farklı madde birbirinden ayrılabilir [22].

2.1.3.1 Kolon Dolgu Maddeleri

HPLC kolonların ayırım gücü ve performansı yapıldığı materyalden ziyade, kolon dolgu malzemenin kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlıdır. Temel olarak dolgu malzemesi silanol gruplarını ihtiva eden ana kemik yapı üzerine farklı fonksiyonel grupların bağlanmasıyla oluşturulmaktadır. Fonksiyonel grupların farklı olması ve buna bağlı olarak polaritelerinin de farklı olmasından dolayı HPLC’de farklı polariteye sahip çok çeşitli kolon kullanmak mümkündür. Bu fonksiyonel gruplar C₁₈ (ODS), C₈, C₆H₅, CN, NH₂, diol, NO₂ grupları olabilir. Seçilecek analitik kolon, kullanılacak hareketli fazın ve uygulanacak HPLC metodunun özelliklerine ve en önemlisi analizi yapılacak maddelerin özelliklerine göre seçilmelidir. [20].

2.1.3.2 Normal Faz Kromatografisi

Normal faz sıvı kromatografisinde sabit faz yani kolon dolgu malzemesi polar (silika veya polimer yapı üzerine bağlanmış Diol, glikol, CN, NO₂ veya NH₂ fonksiyonel gruplu dolgu maddeleri) yapıya sahip olup, hareketli faz apolar ya da kolon

dolgu malzemesinden düşük polariteye sahip (etileter, kloroform, hekzan vb.) çözücüler ve karışımlarını içermektedir.

Normal faz sıvı koromatografisinde düşük polariteye sahip maddeler kolondan ilk çıkar. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği yüksek olduğu için düşük polariteye sahip maddeler hareketli fazda çok iyi çözünür ve kolon dolgu malzemesi ile etkileşimi düşük olduğunda kolonda kısa süreli tutularak kolondan ilk önce çıkar. Bu durumda, hareketli faz polaritesinin değiştirilmesi ile alıkonma zamanı üzerinde oynanabilir. Alıkonma zamanını kısaltmak için hareketli fazın polaritesi azaltılırken, alıkonma zamanını arttırmak için hareketli fazın polaritesi artırılabilir [20].

2.1.3.3 Ters Faz Kromatografisi

Ters faz sıvı kromatografisinde, sabit faz yani kolon dolgu malzemesi apolar (silika veya polimer yapı üzerine bağlanmış C₃, C₈, C₁₈, C₆H₅, NH₂ gruplu dolgu maddeleri) yapıya sahip olup, hareketli faz polar (metanol, etanol, asetonitril, tetrahidrofuran gibi polar organik çözücüler ve su veya tamponlanmış, pH ayarı yapılmış karışımları) çözücüler içerir.

Ters faz sıvı kromatografisinde yüksek polariteye sahip maddeler kolondan ilk çıkar. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği olduğu için yüksek polariteye sahip maddeler hareketli fazda çok iyi çözünür ve kolon dolgu malzemesi ile etkileşimi düşük olduğunda kolonda kısa süreli tutularak kolondan ilk önce çıkar. Bu durumda, hareketli faz polaritesinin değiştirilmesi ile alıkonma zamanı üzerinde oynanabilir. Alıkonma zamanını kısaltmak için hareketli fazın polaritesi azaltılırken, alıkonma zamanını arttırmak için hareketli fazın polaritesi artırılabilir [20].

2.1.3.4 Kolonların Depolanması

HPLC kolonların ömrünün uzatılması ve performanslarının ilk günkü gibi devam ettirilebilmesi için kullanılmadıkları zamanlarda bazı küçük tedbirlerin alınması önemli olmaktadır. Alınacak bu tedbirler kolonların depolama sürelerine göre değişebilir, bazı tedbirler aşağıda verilmiştir.

- Kısa süreli (bir gün veya gecelik) depolamalarda kolon içerisinden kullanılan hareketli fazın belli bir süre geçirilmesi (kolon temizleninceye kadar) uygun olacaktır.
- Orta süreli (2;7 gün arası) depolamalarda kolonu, bakteri üremesini engellemek için, tamponsuz hareketli faz ile yıkanması uygun olacaktır.
- Uzun süreli (7 günden fazla) depolamalarda, kolon dolgu maddelerini, ligandların olası bir hidrolizini minimum düzeyde tutmak için, % 100 metanol veya asetonitril çözeltisi yıkanması uygun olacaktır.

Tampon tuzları organik çözücüler içinde çökerek kolonları ve kılcal boruları tıkayacaklarında, her üç durumda da kolonları yıkamadan önce, sulu ve organik çözücü içeren tampon çözeltileri kolon içinden temizlenmelidir [20].

2.1.4 Detektörler

HPLC sistemlerinde en önemli bileşenlerden biri detektördür. Kromatografik yöntemle ayrılan herhangi bir maddeye ilişkin anlamlı bir sonuç üretebilmesi için kalitatif ve kantitatif yönden değerlendirilmesi gerekir. Bir detektörün işlevi örneğin derişimi ile orantılı olacak şekilde elektrik sinyali üretmektir. İdeal bir detektör, yaygın olarak kullanılan çözücüler için ya çok az ya da hiç sinyal üretmemelidir. Fakat uygulamalarda böyle bir detektörle karşılaşmak güçtür. Bu nedenle hareketli fazda ve kromatografik sınırlar içinde seçimlilik ve duyarlık açısından en iyi saptanabilen bölge seçilmelidir. Ekstra bant genişlemesini en aza indirmek için detektör hücresinin hacmi mümkün olduğu kadar küçük tutulur.

HPLC’de genel ve özel amaçlı olmak üzere iki tip detektör kullanılır. Genel amaçlı detektörler, hareketli fazın kırma indisini, dielektrik sabitini, yoğunluğunu ölçen detektörlerdir. Bu özellikler çözünenin konsantrasyonuna ve türüne bağlı olarak değişir. Buna karşılık özel amaçlı detektörler, bir maddenin UV absorpsiyonunu, floresansını, difüzyon akımını, kütlesini ölçer. HPLC’de kullanılan detektörler Tablo 2.1’de özellikleriyle beraber verilmiştir [20].

Tablo 2.1. HPLC detektörlerin bazı performans özellikleri

| HPLC Detektörü | Ticari Detektörler | Kütle LOD (tipik) | Doğrusal Aralık (10x) |
|--------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|
| Absorbans | Var | 10 pg | 3-4 |
| Floresans | Var | 10 fg | 5 |
| Elektrokimyasal | Var | 100 pg | 4-5 |
| Kırma indisi | Var | 1 ng | 3 |
| İletkenlik | Var | 100 pg-1ng | 5 |
| Kütle spektrometre | Var | < 1pg | 5 |
| FT;IR | Var | 1 µg | 3 |
| Işık saçma | Var | 1 µg | 5 |

2.2 Kromatografinin Uygulamaları

Kromatografik yöntemler kompleks karışım içerisinde yer alan kimyasal özellik olarak birbirlerine yakın bileşenlerin ayrıştırılmasında, kalitatif ve kantitatif analizlerinde önemli ölçüde kullanılmaktadır.

2.2.1 Kalitatif Analiz

Kromatografik yöntemlerde kalitatif analizler alıkonma zamanları üzerine kurulmuştur. Kalitatif analiz gerçekleştirilirken, iyi bir standart karışım hazırlayıp kromatografik sisteme vererek bu standartların her birine ait alıkonma zamanları bulunup daha sonra örnek için elde edilen kromatogram üzerindeki piklerin alıkonma zamanları ile karşılaştırma yapılır. Standart ve örnek analiz esnasında tüm kromatografik koşulların (kolon, detektör, akış hızı vb.) aynı tutulması önemlidir. Ancak bu durumda kromatografik olarak kalitatif tayin gerçekleştirilmesi mümkün olur. Bu sonuçlar diğer spektroskopik yöntemlerle desteklenebilir. Günümüzde kromatografik yöntemler spektroskopik yöntemlerle birleştirilerek uygulanmakta ve böylece kalitatif analizde daha güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir [20].

2.2.2 Kantitatif Analiz

Kantitatif analiz, yapılan maddenin pik yüksekliğinin veya pik alanının bir veya birkaç standardın yükseklikleri veya pik alanlarıyla kıyaslanmasına dayanır. [20].

2.2.2.1 Pik Yüksekliğine Dayalı Analizler

Bir kromatografi pikinin yüksekliği, pikin her iki tarafındaki taban çizgilerinin düz bir çizgi ile birleştirilmesi ve bu çizgiden pik tepesine dikey mesafesinin ölçülmesi ile elde edilir. Bu ölçüm genellikle yüksek kesinlikle yapılabilir. Bununla birlikte pik yüksekliklerinin pik genişlikleriyle ters orantılı olduğuna dikkat etmek gerekir. Bu nedenle pik yüksekliklerini kullanarak doğru sonuçlar ancak kolon koşullarındaki değişikliklerin numunenin ve standartların kromatogramlarını elde etmek için gerekli olan sürede pik genişliklerini değiştirmede elde edilir. Yakından kontrol edilmesi gereken değişkenler kolon sıcaklığı, eluent akış hızı ve numune enjeksiyon hızıdır. Ayrıca kolonun aşırı yüklenmemesine de dikkat edilmelidir. Numune enjeksiyon hızı özellikle kromatogramın ilk pikleri için önemlidir. Bu sebepten dolayı şırınga ile yapılan enjeksiyonlarda %5-10 bağıl hata normaldir [20].

2.2.2.2 Pik Alanına Dayalı Analizler

Pik alanları, pik yüksekliğine dayalı analizlerde söz konusu olan değişkenlere bağlı olan bant genişlemesi etkilerinden bağımsızdır. Bu bakış açısına göre, alanlar pik yüksekliklerine göre daha iyi bir analitik değişkendir. Diğer yönden pik yükseklikleri daha kolay ölçülür ve dar pikler için daha doğru bir şekilde tayin edilebilir [20].

2.2.2.3 Kalibrasyon ve Standartlar

Kromatografik yöntemlerde, kantitatif analizler için en dolaysız yöntem, bilinmeyen bileşimine benzeyen bir seri standart çözelti hazırlanmasını içerir. Bundan sonra standartların kromatogramları alınır ve pik yüksekleri veya alanları derişimin bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirilir. Kantitatif analiz yapılabilmesi için çalışılan konsantrasyon aralığında elde edilen grafik doğrusal olmalıdır. En yüksek doğruluk için sık sık yeniden kalibrasyon yapılması gereklidir. Bu yöntemde en yüksek hata kaynağı, genellikle numune hacmindeki belirsizlik ve bazen de enjeksiyon hızıdır.

2.2.2.4 İç Standart Yöntemi

En kesin kromatografik kantitatif değerler, iç standart kullanılmak suretiyle elde edilir. Bu metotta kullanılan çözücülerde çokça çözünen ve analitin kimyasal yapısına benzerlik gösteren bir madde iç standart olarak seçilir ve bilinen bir miktarı numune içerisine ilave edilir. Analitin pik alanı veya yüksekliğinin, iç standardın pik

yüksekliğine veya alanına oranı bir analitik parametre olarak kullanılır ve konsantrasyon bu oran üzerinden hesaplanır. Bu metottan iyi sonuç alabilmek için iç standardın pikinin, numunede bulunan diğer maddelerin piklerinden iyi ayrılmış ($R_s > 1,25$) ve analitin pikine çok yakın olması gerekir. Uygun bir iç standart kullanılarak kesinliği %1 den daha düşük bağıl hatayla tayinler yapmak mümkündür [20].



3 MATERYAL VE METOT

3.1 Cihaz

Deneylerde, Perkin Elmer Series 200 marka HPLC cihazı kullanılmıştır. Cihaz; C18 (oktadekilsilan 4,6mm x 250mm) kolon, Perkin Elmer Series 200 marka UV;Vis dedektör, Perkin Elmer Series 200 izokritik akış pompası, 7725i Rheodyne enjektör ve 50 µL'lik loop ile donanımlıdır.

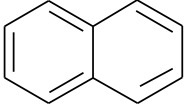
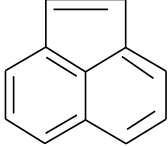
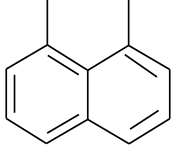
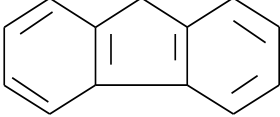
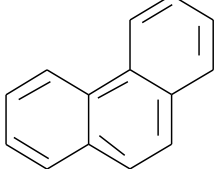
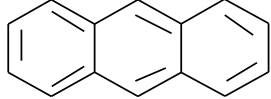
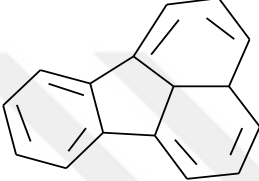
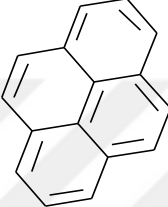
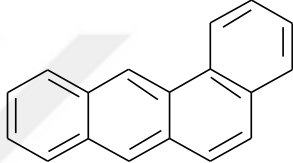
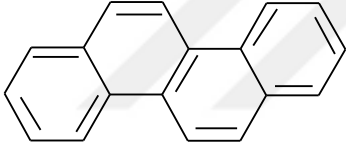
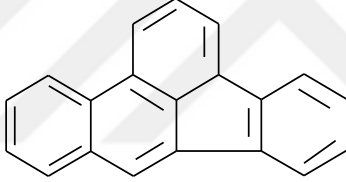
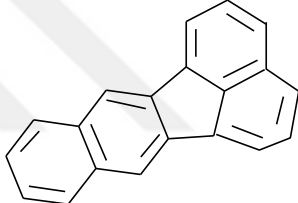
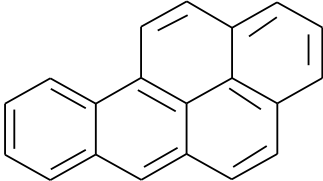
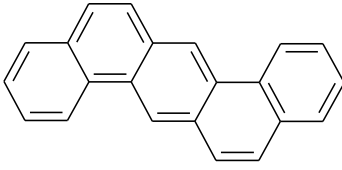
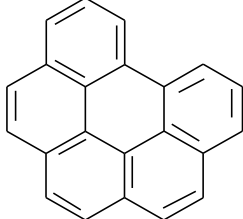
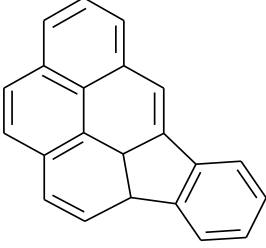


Şekil 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan HPLC-UV sistemi

3.2 Kullanılan Materyaller

Deneylerde kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup; Supelco marka SS TCL Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Mix (Şekil 3.2), phenanthrene, pyrene, benzo[a]anthracene, benzo[a]pyrene sigma aldrich marka, asetonitril, hekzan, diklorometan Merck marka çözücüler kullanılmıştır. Ultra saf kendi laboratuvarımızda Milipor Elix 5 cihazından üretilmiştir.

Su örnekleri piyasada satılan içme suyundan, laboratuvarında bulunan çeşmeden ve çevrede bulunan nehirden temin edilmiştir. Yağ örneği olarak kullanılan sıvı yağ ve zeytinyağı rastgele marketten satın alınmıştır.

| | | |
|---|--|---|
|  |  |  |
| Naphthalene | Acenaphthylene | Acenaphthene |
|  |  |  |
| Flourene | Phenanthrene | Anthracene |
|  |  |  |
| Flouranthene | Pyrene | Benzo[a]Anthracene |
|  |  |  |
| Chrysene | Benzo[b]fluoranthene | Benzo[k]Flouranthene |
|  |  |  |
| Benzo[a]Pyrene | Dibenzo[a,h]anthracene | Benzo[g,h,i]perylene |
| |  | |
| | İndeno[1,2,3;cd]pyrene | |

Şekil 3.2. Tez kapsamında tayin edilen poliaromatik hidrokarbonların kimyasal yapıları

3.3 Çözeltilerin Hazırlanması

İlk optimizasyon çalışmalarında kullanılan PAH₄ (Fenantren, Piren, Benzo[a]antrasen ve Benzo[a]piren) 1000 µg/L'lik ana stok çözeltileri asetonitril içerisinde hazırlanmış olup, çalışma çözeltileri bu ana stok çözeltisinden çıkılarak 12,5-1000 µg/L konsantrasyon aralığında asetonitril içerisinde hazırlandı.

On altı PAH ticari olarak satın alınan ve her bir PAH konsantrasyonu 2000 µg/L olan PAH mix çözeltisinden hazırlanmıştır. Çalışma standartları 10-1000 µg/L konsantrasyon aralığında bu ana stok ve hazırlanan ara stok (200 µg/L) çözeltilerinden çıkılarak asetonitril içerisinde hazırlanmıştır.

3.4 Poliaromatik Hidrokarbonların Ekstraksiyonu ve HPLC-UV Metodu ile Tayinleri

Mevcut çalışmanın amacı, insan sağlığı açısından kanserojen olan ve ayrıca çevresel kirlenici olarak kabul edilen PAH'ların bitkisel yağlardan ve çevresel su örneklerinden (içilebilir ve atık sularda) rutin analizlerde kullanılacak hızlı, basit ve etkili bir şekilde ekstraksiyonları için yeni prosedürü oluşturmak ve bunu takiben HPLC-UV sistemini optimize ederek yağ ve çevresel su örneklerinde kalitatif ve kantitatif tayinlerini gerçekleştirmektir. Çalışmada PAH'lar iki kısımda incelenmiştir. Birinci kısımda PAH₄ model olarak seçilmiş ve optimizasyon işlemleri bu PAH₄ için gerçekleştirilmiştir. Sonrasında PAH₄ için elde edilen şartlarda PAH₁₆ ekstraksiyonu ve tayinleri gerçekleştirilmeye çalışılmıştır.

3.4.1 Örneklerin Ekstraksiyonu

3.4.1.1 Su Örneklerinin Ekstraksiyonu

Su örneklerinde olası PAH'lar sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile direk olarak diklorometan (DCM) çözücüsü içerisine çekilir. Bu amaç için 50 mL'lik su örnekleri 10 mL'lik DCM ile üç kez ekstrakt edilir ve ekstraktlar birleştirilerek DCM'nın tamamı rotary ile kuruluğa kadar uçurulur. Kalıntı 1 mL'lik hareketli fazda çözülerek HPLC sistemine enjekte edilir. DCM'in rotary ile uzaklaştırılması esnasında PAH miktarlarında herhangi kaybın olup olmadığı 30 mL saf DCM içerisine bilinen konsantrasyonda PAH çözeltisinin spike edilmesi ve sonrasında yukarıdaki işlemler

yapılarak elde edilmiştir. Örneklerin aşırı miktarda kirli olması durumunda kalıntı SPE kartuşundan geçirilmesi düşünülmüştür.

Sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminin verim hesaplaması, saf su ortamına bilinen konsantrasyonda PAH'ların spike edilip ekstraksiyon prosedürünün uygulanması ile elde edilmiştir. Prosedüre ilk olarak PAH₄ sonrasında PAH₁₆ için uygulanmıştır.

3.4.1.2 Yağ Örneklerinin Ekstraksiyonu

Yağ örnekleri ekstraksiyonları için 5 mL yağ örneği 10 ml n-hekzan ile çözülür. Daha sonra yağ hekzan karışım 3 x 10 mL ACN ile ekstraksiyon yapılır ve ayrılan ACN fazları birleştirilir. Rotaryde 40°C'de evapore edilir. Evaporasyon işlemi kuruluğa kadar yapılır ve elde edilen kalıntı 1 mL mobil faz ile çözülür ve HPLC sistemine enjekte edilir. Sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminin verim hesaplaması, yağ ortamına bilinen konsantrasyonda PAH'ların spike edilip ekstraksiyon prosedürünün uygulanması ile elde edilmiştir. Prosedüre ilk olarak PAH₄ sonrasında PAH₁₆ için uygulanmıştır.

3.4.2 PAH'ların HPLC-UV ile Tayinleri

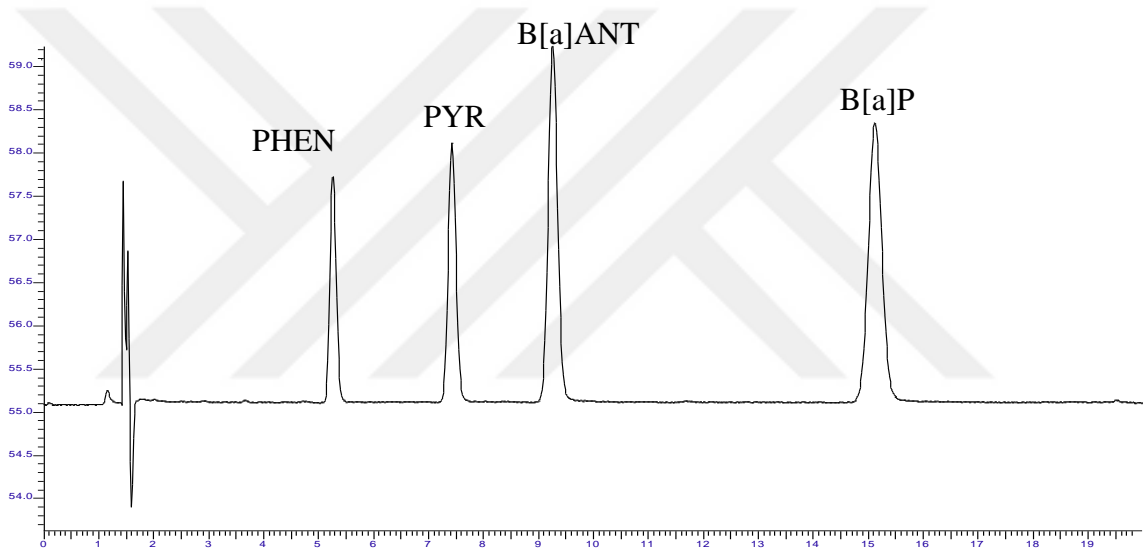
Yağ ve su örneklerinin analizinde kullanılan yöntem ters faz sıvı kromatografisi yöntemi olup, kromatografik ayırımlar asetonitril/su içeren hareketli faz ile C18 kolonda gerçekleştirilmiştir. HPLC-UV analizlerinde optimizasyon parametreleri olarak, hareketli fazın bileşimi, akış hızı ve kolon gibi parametreler optimize edilmiştir. Tayinler PAH₄ ve PAH₁₆ olarak iki gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan optimum şartlarda yöntemin her bir PAH serisi için yöntemin doğrusalılığı, doğruluğu, tekrarlanabilirliği gibi istatistiksel çalışmalar yapılmıştır.

4 SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 Standartların HPLC-UV Metoduyla Tayinleri

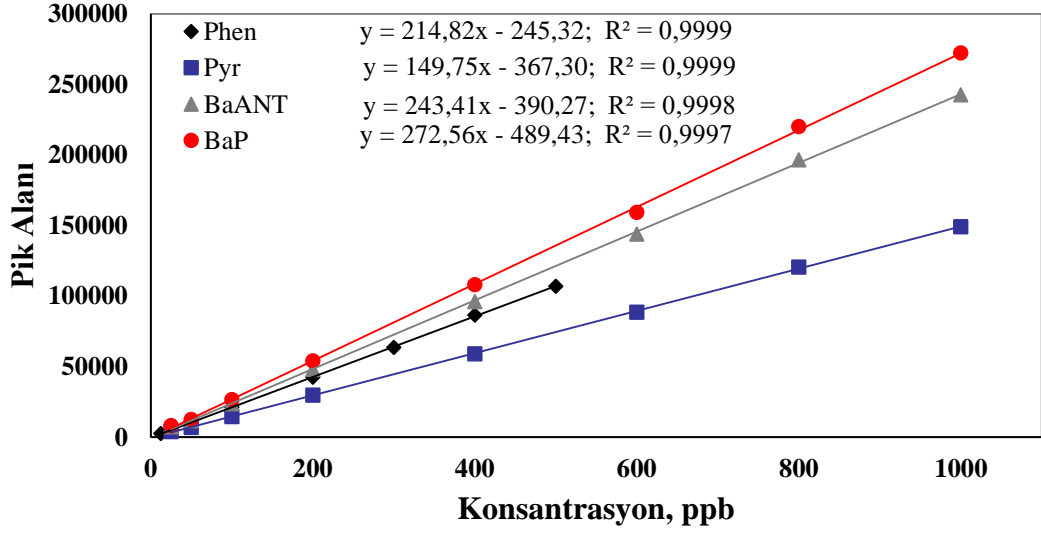
4.1.1 PAH₄'ün HPLC-UV Tayinleri

PAH'ların HPLC-UV tayinlerinde optimizasyon parametreleri olarak, hareketli faz bileşimi, akış hızı ve kolon gibi parametreler optimize edilmiştir. HPLC-UV sistemi ile tayinlerde başlangıçta, model olarak seçilen dört PAH (Phen, Pyr, B[a]Ant, B[a]P) için iyi bir zaman aralığında en iyi ayırım C18 kolon ve 1.5 mL/dak akış hızında ve %80 asetonitril ve %20 su hareketli faz bileşiminde olup pik okumalarının 254 nm dalga boyunda elde edilmiştir. Bu şartlarda seçilen PAH₄ için alıkonma zamanları 5.83–16.09 dakika arasında değişmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Optimum şartlarda PAH₄ standartlarına ait HPLC-UV kromatogramı.

Oluşturulan optimum şartlarda sistemin doğrusallığının tayini için karışımdaki PAH₄ standartlarının konsantrasyon aralığı 12.5-1000 µg/L arasında hazırlanmıştır. Bu konsantrasyon aralığında hazırlanan standartlar HPLC-UV sistemine enjekte edildi ve elde edilen pik alanları konsantrasyonun bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği oluşturuldu (Şekil4.2). Çalışılan konsantrasyon aralığında HPLC-UV sisteminin doğrusallığının oldukça yüksek olduğu grafiklere ait doğrusal korelasyon katsayıları (R^2) değerlerinden anlaşılmaktadır. Optimum şartlarda HPLC-UV sistemi 5000 µg/L'ye kadar doğrusallık göstermektedir.



Şekil 4.2. PAH₄ için HPLC-UV yönteme ilişkin kalibrasyon grafikleri

HPLC-UV yönteminin tekrarlanabilirliği için PAH₄ standartlarını içeren 200 µg/L konsantrasyondaki çözelti 10 kez sisteme enjekte edilmiş ve sistemin tekrarlanabilirliği, maddelerin alıkonma ve her bir madde için elde edilen pik alanlarına göre hesaplanmıştır. Alıkonma zamanı için hesaplanan bağıl standart sapma %0.05'ten, pik alanları için bağıl standart sapma %1'den küçük hesaplanmıştır. Bu sonuçlar her iki özellik için sistemin tekrarlanabilirliğinin iyi olduğunu göstermektedir.

Sistemin doğruluğu, bilinen konsantrasyondaki PAH₄ çözeltilisinin HPLC-UV sistemine 10 kez enjekte edilmesi ve pik alanları kullanılarak daha önce oluşturulan kalibrasyon eğrilerinden elde edilen denklemlerden hesaplanmıştır. Her bir PAH için hesaplanan bağıl hata değerleri Tablo 4.1 de verilmiştir. Model olarak çalışılan PAH'lar için bağıl hata değerleri oldukça küçük çıkmıştır. Bu değerler sistemin doğruluğunun oldukça iyi olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.1. PAH₄ için HPLC/UV metodunun doğruluğuna ait veriler

| Standartlar | Gerçek kons, (µg/L) | Hesaplanan kons, (µg/L) | Bağıl hata, (%) |
|----------------------|------------------------|----------------------------|--------------------|
| 1. Phenanthrene | 100 | 98.09 | 1.91 |
| 2. Pyrene | 200 | 198.29 | 0.85 |
| 3. Benzo[a]antracene | 200 | 197.22 | 1.39 |
| 4. Benzo[a]pyrene | 200 | 197.42 | 1.29 |

4.1.2 PAH₁₆'nın HPLC-UV Tayinleri

PAH₄ için oluşturulan optimum şartlar PAH₁₆ serisi içinde uygulanmıştır. Fakat elde edilen kromatogramdan, bazı piklerde örtüşme ve yeni eklenen PAH'ların alıkonma zamanları genel olarak kabul edilebilir alıkonma zamanlarından biraz uzun olduğu görülmüştür. Bu nedenle parametrelerde bazı değişiklikler yapılmıştır. En önemli değişiklik hareketli faz bileşimi ve hareketli faz akış hızında yapılmıştır. PAH₁₆'ın HPLC'de ayırmak için üç aşamalı gradiyet hareketli faz bileşimi ve 1-1.5 mL/dak akış hızı kullanılmıştır. Detektör dalga boyu aynı şekilde 254 nm olarak ayarlanmıştır. Kullanılan üç aşamalı gradiyent metot bilgileri Tablo 4.2'de verilmiştir.

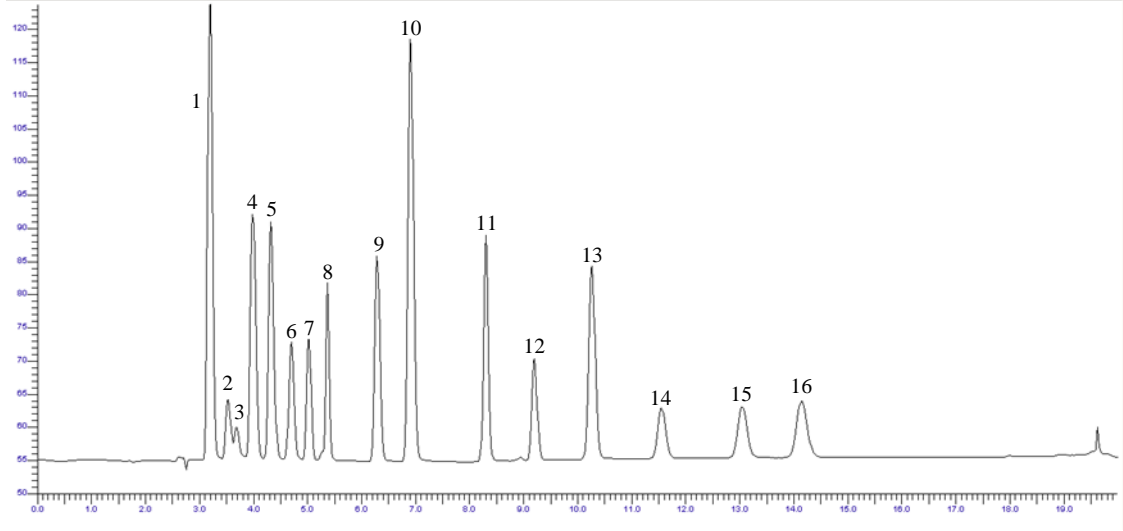
Tablo 4.2. PAH₁₆ tayinleri için HPLC-UV analizlerinde kullanılan hareketli faz bileşimi ve akış hızları.

| Metot Adımları | Zaman (dak) | Hareketli faz akış hızı (mL/dk) | Hareketli faz bileşimi (su/ACN v:v) |
|----------------|-------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| 1 | 0-5 | 1,00 | 10/90 |
| 2 | 5-15 | 1,50 | 0/100 |
| 3 | 15-20 | 1,00 | 10/90 |

Tablodan da anlaşıldığı gibi PAH₁₆'nın ayırımı 5 dak 10/90 su/ACN (v/v), 10 dak 0/100 su/ACN (v/v) ve 5 dak 10/90 su/ACN (v/v) hareketli faz bileşiminde elde edilmiştir. Optimum şartlarda PAH₁₆'ların alıkonma süresi 3-21 dak arasında olup pikler keskin, simetrik ve birbirinden iyi derecede ayrılmış bir şekilde elde edilmiştir (Şekil 4.3). Kromatogram üzerindeki piklerin sıralaması Tablo 4.3 te verilmiştir.

Tablo 4.3. Optimum şartlarda PAH₁₆ türlerinin HPLC-UV tayinlerinde elde edilen kromatogramdaki sıralamaları

| | | |
|-------------|---------------|--------------------|
| 1. Pik, Nph | 6. Pik, Ant | 11. Pik, B[b]F |
| 2. Pik, Aph | 7. Pik, Flt | 12. Pik, B[k]F |
| 3. Pik, Ace | 8. Pik, Pyr | 13. Pik, B[a]P |
| 4. Pik, Flr | 9. Pik, B[a]A | 14. Pik, B[ghi]Per |
| 5. Pik, Phe | 10. Pik, Chr | 15. Pik, DB[ah]A |
| | | 16. Pik, Ipyr |



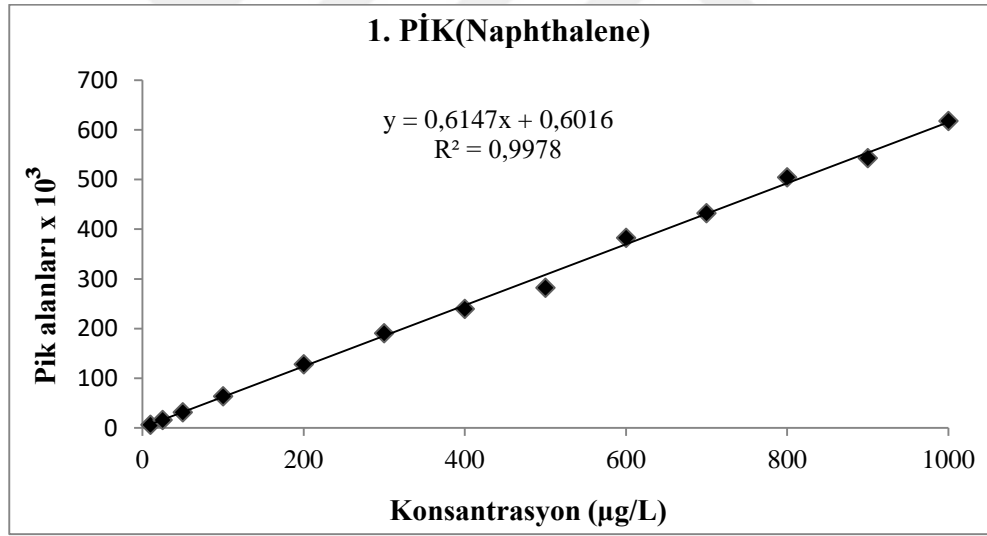
Şekil 4.3. Optimum şartlarda PAH₁₆ standartlarına ait HPLC-UV kromatogramı.

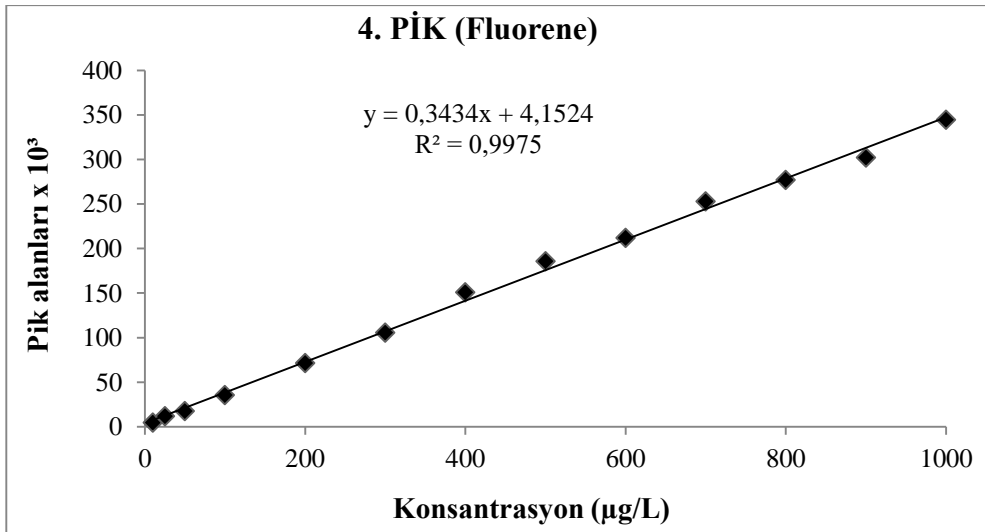
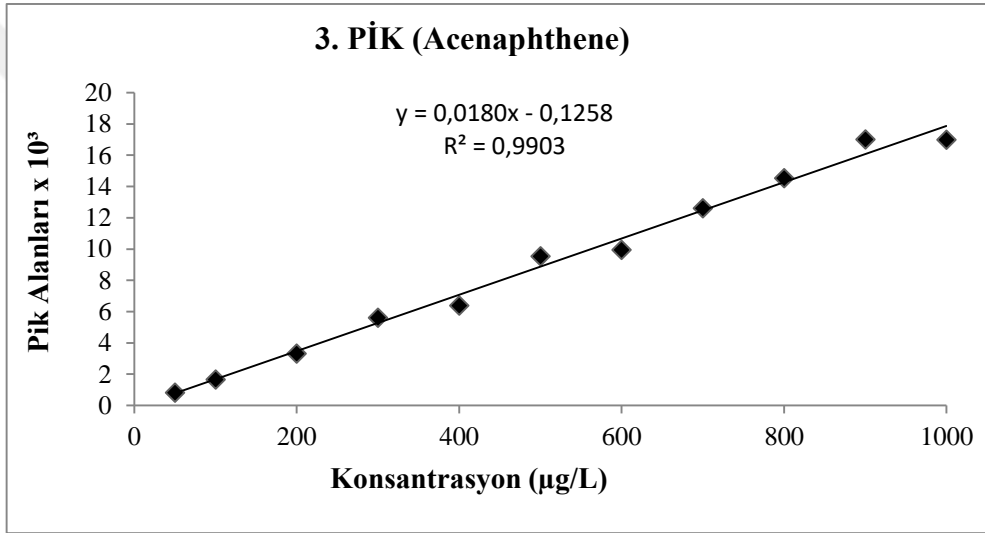
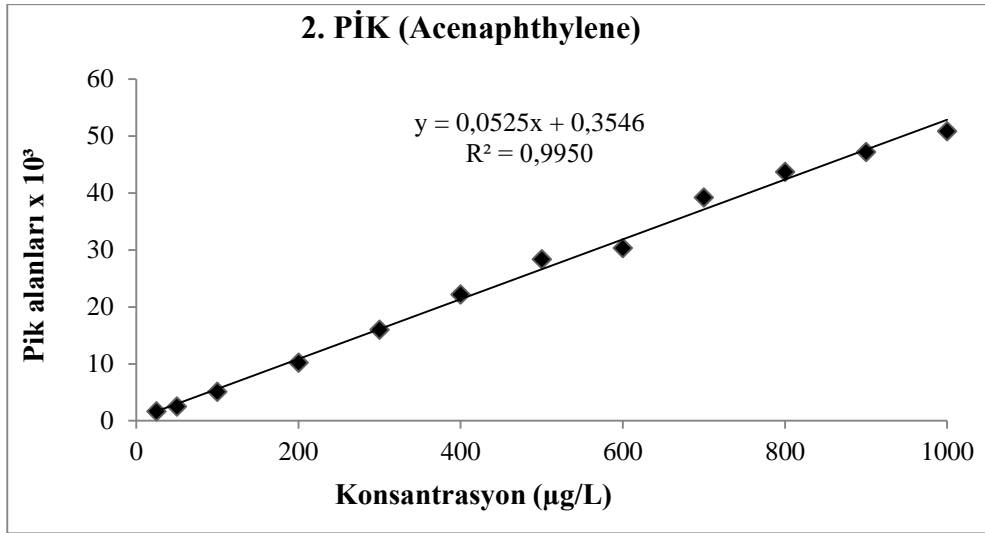
PAH₁₆ için oluşturulan optimum şartlarda HPLC-UV yönteminin doğrusallığının tayini geniş bir konsantrasyon (25-1000µg/L) aralığında on üç farklı konsantrasyon kullanılmış ve her bir PAH için elde edilen pik alanları konsantrasyonun bir fonksiyonu olarak grafiğe geçilerek kalibrasyon grafikleriyle elde edilmiştir. Tablo 4.4 kalibrasyon eğrilerini oluşturulmasında kullanılan her bir PAH için üç enjeksiyon sonunda elde edilen piklerin pik alanlarının ortalama verilerini içermektedir. Şekil 4.4. PAH₁₆'nın her birine ait kalibrasyon eğrilerini göstermektedir.

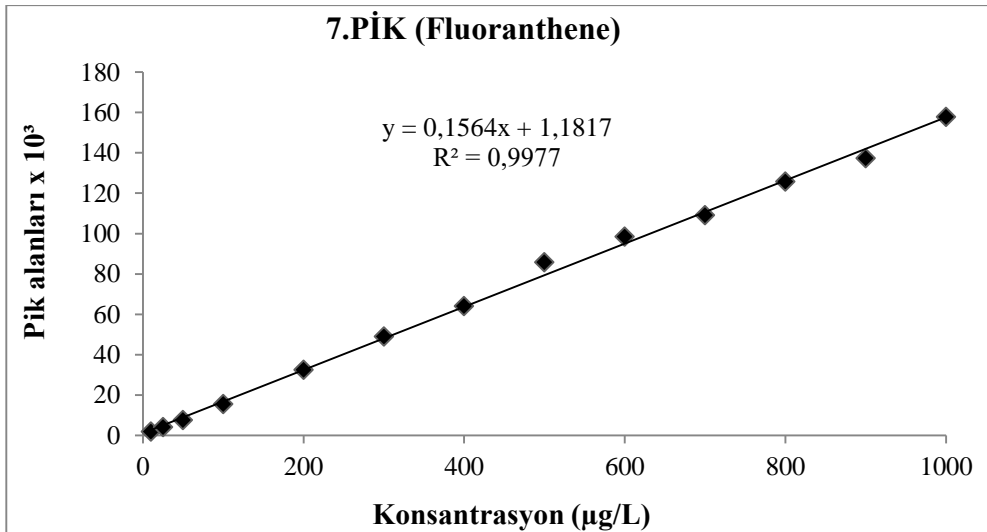
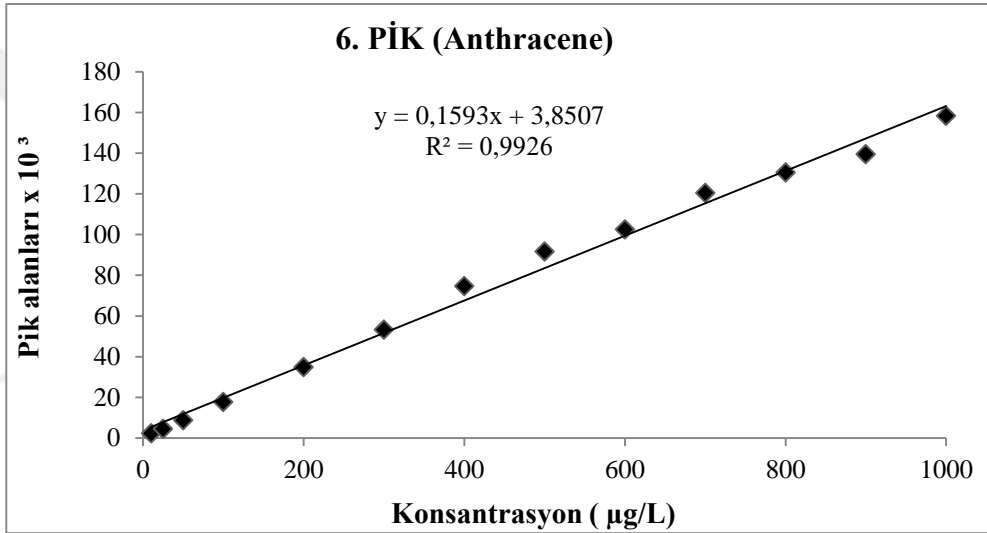
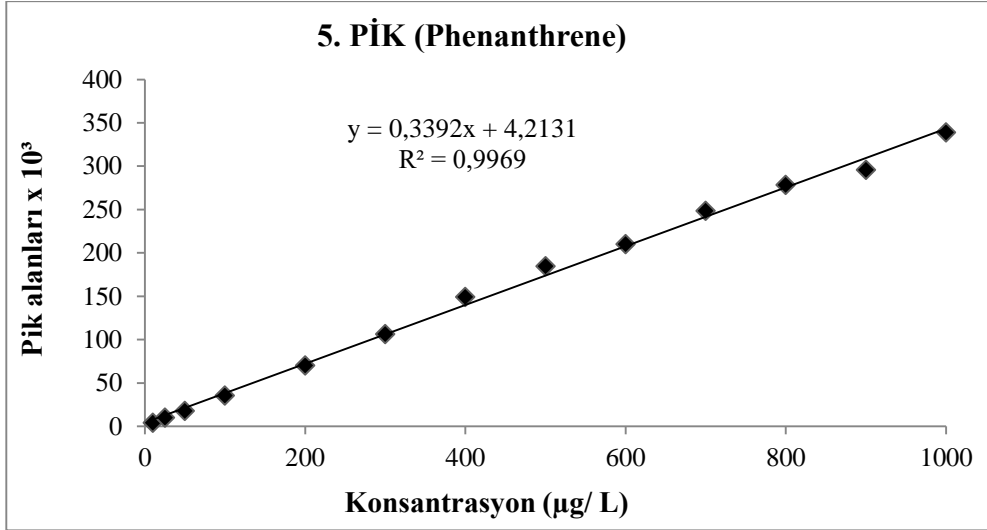
Tablo 4.4. PAH₁₆ Standartlarına ait piklerin ortalama pik alanları

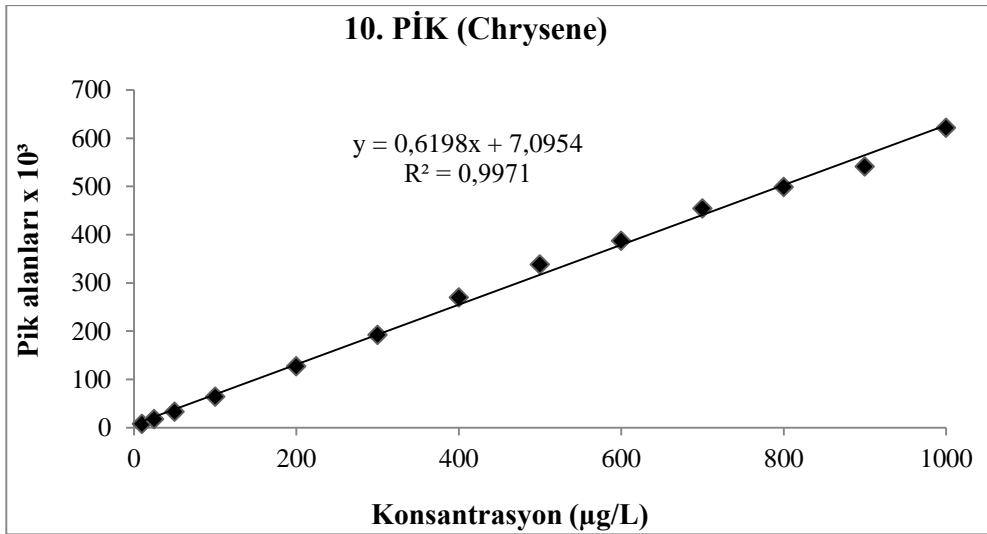
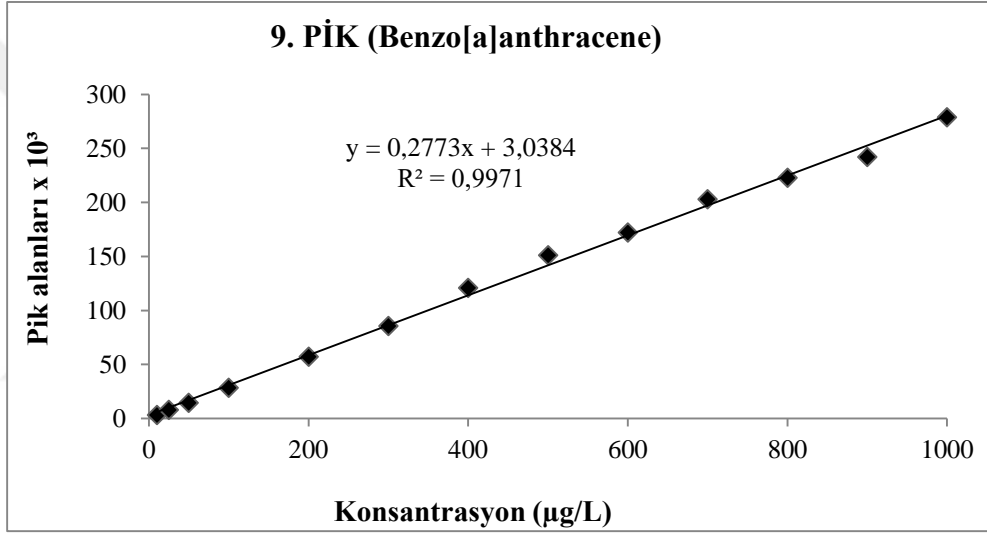
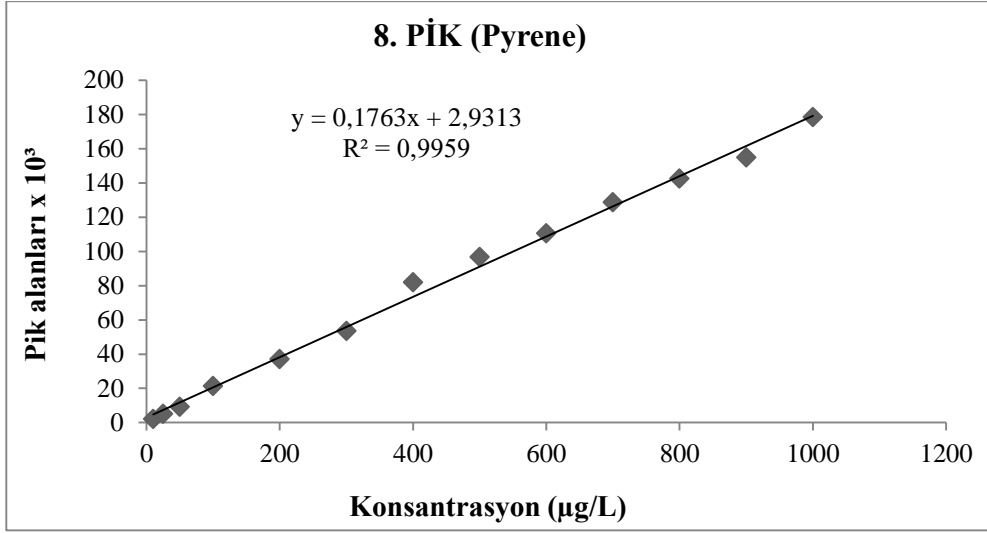
| Çöz. no | Konst. | 1.pik Nph | 2.pik Aph | 3.pik Ace | 4.pik Flr | 5.pik Phe | 6.pik Ant | 7.pik Flt | 8.pik Pyr |
|---------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| çöz.1 | 10 | 6659 | 0 | 0 | 4639 | 4183 | 2421 | 1843 | 2190 |
| çöz.2 | 25 | 16386 | 1681 | 0 | 11671 | 9852 | 4552 | 4140 | 5181 |
| çöz.3 | 50 | 31424 | 2509 | 821 | 17570 | 17541 | 8795 | 7561 | 9339 |
| çöz.4 | 100 | 63887 | 5081 | 1670 | 35465 | 35546 | 17837 | 15479 | 21471 |
| çöz.5 | 200 | 127942 | 10178 | 3326 | 71494 | 70178 | 34850 | 32573 | 37108 |
| çöz.6 | 300 | 190912 | 15977 | 5620 | 105649 | 106397 | 53381 | 48968 | 53579 |
| çöz.7 | 400 | 239495 | 22158 | 6386 | 150918 | 149247 | 74765 | 64043 | 82007 |
| çöz.8 | 500 | 282466 | 28372 | 9542 | 185663 | 184591 | 91707 | 85794 | 96772 |
| çöz.9 | 600 | 382914 | 30309 | 9951 | 211971 | 209950 | 102552 | 98460 | 110527 |
| çöz.10 | 700 | 432333 | 39194 | 12603 | 252815 | 248436 | 120415 | 109113 | 128720 |
| çöz.11 | 800 | 504755 | 43680 | 14532 | 277177 | 278573 | 130515 | 125776 | 142482 |
| çöz.12 | 900 | 543409 | 47185 | 17011 | 302136 | 295753 | 139475 | 137420 | 154896 |
| çöz.13 | 1000 | 618389 | 50821 | 16988 | 344425 | 338985 | 158400 | 157806 | 178351 |

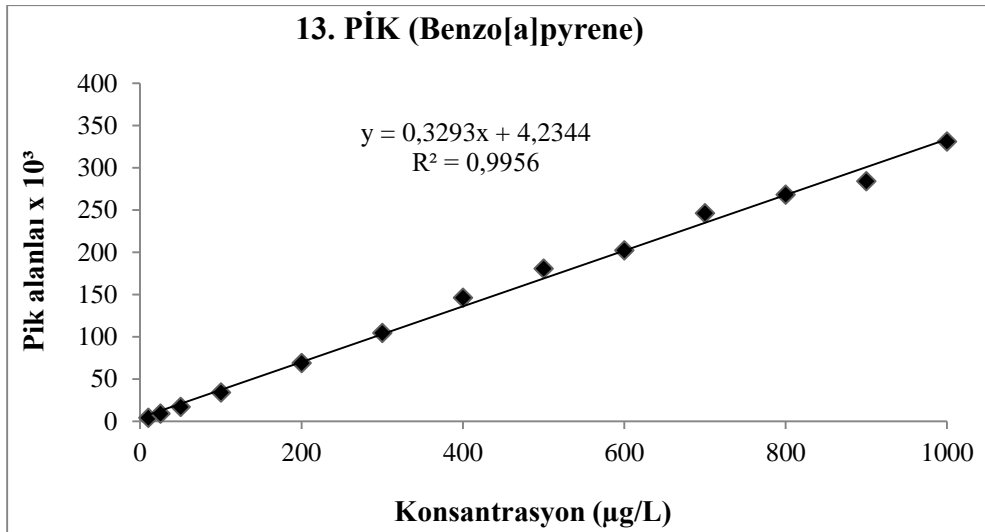
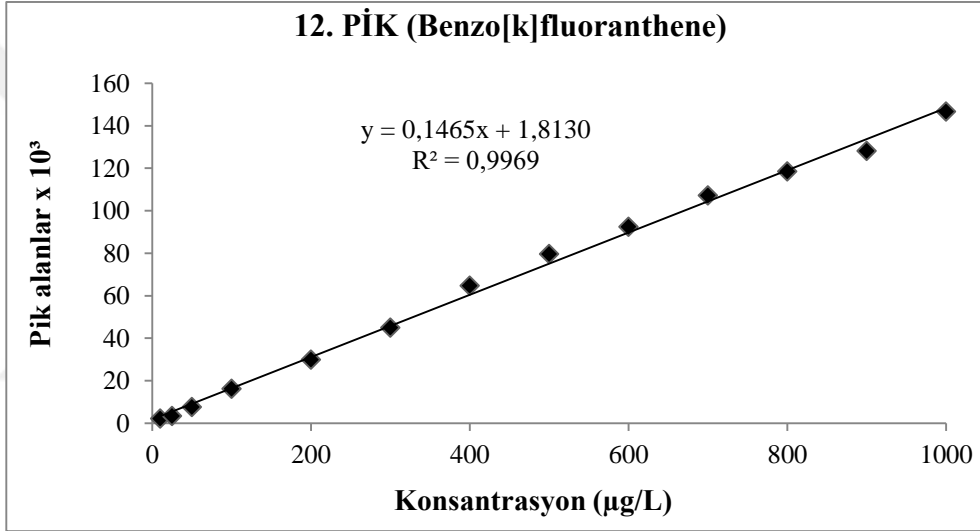
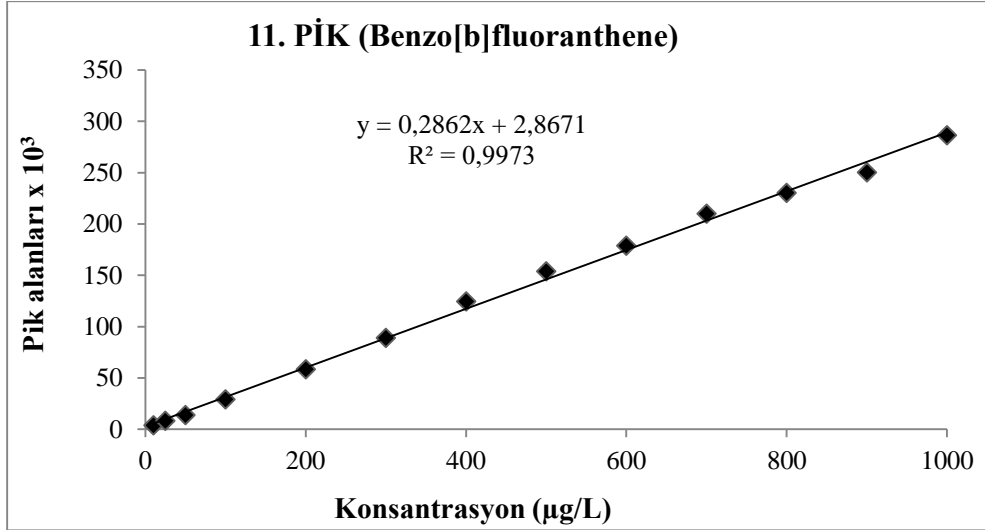
| Çöz.no | Konst. | 9.pik B[a]A | 10.pik Chr | 11.pik B[b]F | 12.pik B[k]F | 13.pik B[a]P | 14.pik B[ghi]Per | 15.pik DB[ah]A | 16.pik Ipyr |
|--------|--------|----------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------|-------------------|----------------|
| çöz.1 | 10 | 3251 | 7817 | 3818 | 2198 | 3895 | 1599 | 1694 | 2228 |
| çöz.2 | 25 | 7899 | 17466 | 8212 | 3359 | 9081 | 3104 | 3462 | 4913 |
| çöz.3 | 50 | 14524 | 32670 | 13697 | 7606 | 16844 | 5365 | 6388 | 8004 |
| çöz.4 | 100 | 28418 | 64144 | 29050 | 16280 | 33924 | 10708 | 12931 | 16450 |
| çöz.5 | 200 | 57264 | 127160 | 58387 | 30022 | 68639 | 22422 | 26709 | 33904 |
| çöz.6 | 300 | 85580 | 192010 | 88907 | 45016 | 104261 | 33388 | 40025 | 49766 |
| çöz.7 | 400 | 120977 | 269801 | 124407 | 64813 | 146192 | 46078 | 55729 | 69633 |
| çöz.8 | 500 | 151137 | 338021 | 153703 | 79639 | 180426 | 57152 | 68824 | 87016 |
| çöz.9 | 600 | 172208 | 387608 | 178641 | 92426 | 202130 | 66125 | 79541 | 99418 |
| çöz.10 | 700 | 203029 | 454560 | 210082 | 107208 | 246021 | 77915 | 93737 | 116868 |
| çöz.11 | 800 | 222906 | 499144 | 230365 | 118491 | 267965 | 86233 | 103042 | 128930 |
| çöz.12 | 900 | 241993 | 541420 | 250086 | 128263 | 284092 | 92750 | 110938 | 139594 |
| çöz.13 | 1000 | 278990 | 621923 | 286514 | 146686 | 330893 | 105448 | 127155 | 159909 |

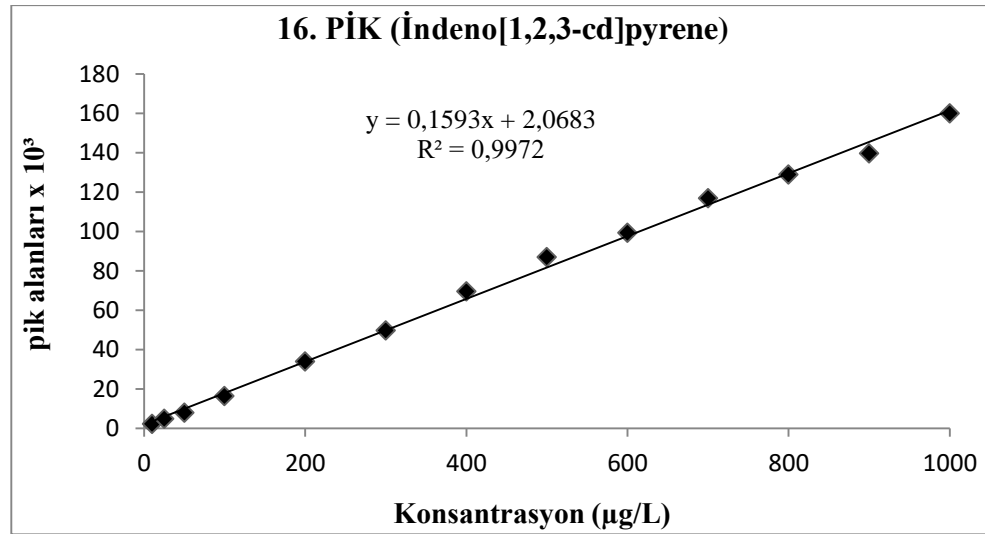
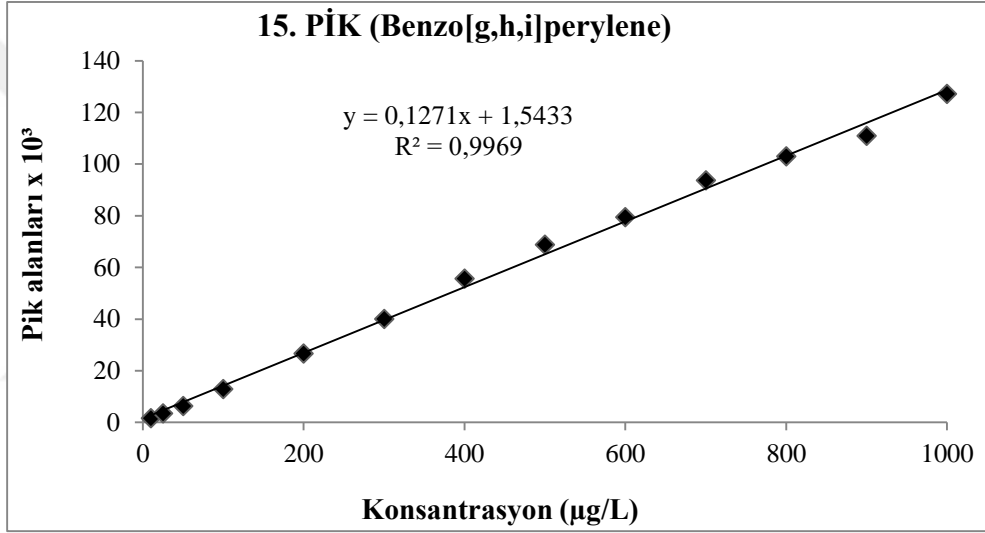
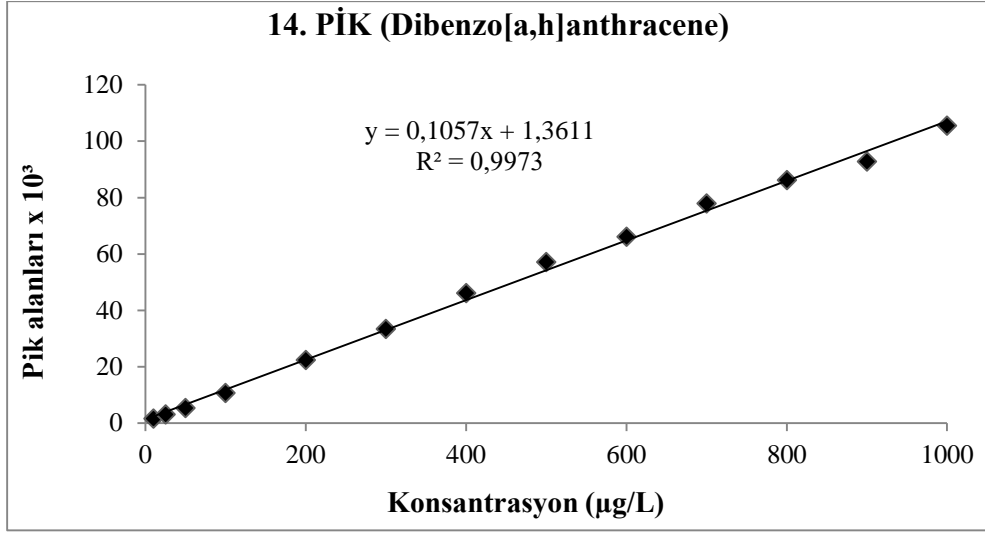












Şekil 4.4. PAH₁₆ için HPLC-UV yönteme ilişkin kalibrasyon grafikleri

Kalibrasyon grafiklerinin R^2 değerlerine bakılarak seçilen çalışma aralığında, HPLC-UV yontemin doğrusallığının geniş bir konsantrasyon aralığında oldukça iyi olduğu görülmektedir.

HPLC-UV yonteminin pik alanları ve alıkonma zamanları bakımından tekrarlanabilirliğinin tayini PAH₁₆ standardının optimum şartlarda 5 kez sisteme enjekte edilmesi ile elde edilen verilerle gerçekleştirilmiştir. Her iki durumda da verilerin değerlendirilmesi tekrarlanabilirliğin ls olan SD ve RSD değenlerine göre yapılmıştır.

Pik alanları bakımından HPLC-UV yonteminin tekrarlanabilirliği genel olarak yüksek olup bağıl standart sapma çoğunlukla %2.5'in üzerine çıkmamış sadece üç tür için bu değerin üzerine çıkmıştır (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. PAH₁₆ için pik alanları bakımından tekrarlanabilirlik verileri

| | Pik Alanı | Ortalama Pik Alanı | Standart Sapma, | Bağıl Standart Sapma (%) |
|------------------|---|-------------------------------|----------------------------|---|
| 1. PİK Nph | 278172; 283814; 286679; 284131; 286136 | 283786 | 3374 | 1,19 |
| 2. PİK Aph | 29757; 27435; 27281 | 28158 | 1387 | 4,93 |
| 3. PİK Ace | 8076; 9514; 9291 | 8960 | 774 | 8,64 |
| 4. PİK Flr | 184117; 192108; 191083; 90800; 18776 | 189174 | 3258 | 1,72 |
| 5. PİK Phe | 183805; 190048; 187371; 187938; 186447 | 187122 | 2277 | 1,22 |
| 6. PİK Ant | 87838; 92197; 89746; 93701; 88276 | 90352 | 2531 | 2,80 |
| 7. PİK Flt | 84184; 87318; 86779; 88270; 87737 | 86858 | 1592 | 1,83 |
| 8. PİK Pyr | 125824; 130749; 115902 | 124158 | 7562 | 6,09 |
| 9. PİK B[a]A | 150585; 154061; 154876; 154754; 154994 | 153854 | 1863 | 1,21 |
| 10. PİK Chr | 331340; 340277; 341893; 345600; 342598 | 340342 | 5389 | 1,58 |
| 11. PİK B[b]F | 154887; 157182; 158623; 157948; 160528 | 157834 | 2062 | 1,31 |

| | | | | |
|----------------------|---|--------|------|------|
| 12. PİK B[k]F | 79735; 80684; 80257; 80742; 81985 | 80681 | 833 | 1,03 |
| 13. PİK B[a]P | 181109; 184037; 183173; 184324; 186717 | 183872 | 2028 | 1,10 |
| 14. PİK B[ghi]Per | 56424; 58395; 58610 59526; 60202 | 58631 | 1431 | 2,44 |
| 15. PİK DB[ah]A | 68839; 69915; 70989; 70793; 70962 | 70300 | 927 | 1,32 |
| 16. PİK Ipyr | 86574; 88244; 88545 88206; 89459 | 88206 | 1043 | 1,18 |

Alıkonma zamanları bakımından HPLC-UV yönteminin optimum şartlarda tekrarlanabilirliğiyle ilgili veriler Tablo 4.5 verilmiştir. SD ve RSD değerlerine bakıldığında bu değerlerin sırasıyla 0.79 dak ve %6'dan küçük oldukları görülmektedir. Bu sayısal değerler HPLC-UV yönteminin alıkonma zamanları bakımından tekrarlanabilirliğin iyi olduğunu göstermektedir. İstenirse piklerin tanımlanması için bağıl alıkonma zamanları da kullanılabilir. Bağıl alıkonma zamanının hesaplanmasında piklerden biri referans pik olarak seçilir ve diğer piklerin alıkonma zamanları referans olarak seçilen pikin alıkonma zamanının bölünerek hesaplanabilir. Naftalen için bağıl alıkonma zamanı aşağıdaki gibi hesaplanmıştır. Diğer 15 PAH için de aynı formül kullanılarak hesaplamalar yapılmış ve Tablo 4.6'daki sonuçlar elde edilmiştir.

$$RRT = \frac{t_{pik}}{t_{referans}} \text{ ise } RRT = \frac{3.13}{5.08} \text{ ise } RRT = 0,62$$

RRT: bağıl alıkonma zamanı, $t_{referans}$: referans olarak kullanılan pikin alıkonma zamanı, t_{pik} : diğer piklerin alıkonma zamanı.

Tablo 4.6. PAH₁₆ için alıkonma zamanları bakımından tekrarlanabilirlik verileri

| | Alıkonma zamanı, (dak.) | Ort. Alıkonma zamanı, t_R (dak) | Standart Sapma, (dak) | Bağıl Standart Sapma (%) | Bağıl Alıkonma Zamanı, RRT |
|---------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------|
| 1. PİK Nph | 3,13; 3,15; 3,12; 3,12; 3,13 | 3,13 | 0,01 | 0,32 | 0,62 |
| 2. PİK Aph | 3,40; 3,45; 3,37; 3,38; 3,47 | 3,40 | 0,03 | 0,88 | 0,67 |
| 3. PİK Ace | 3,53; 3,59; 3,48; 3,50; 3,54 | 3,53 | 0,04 | 1,13 | 0,69 |

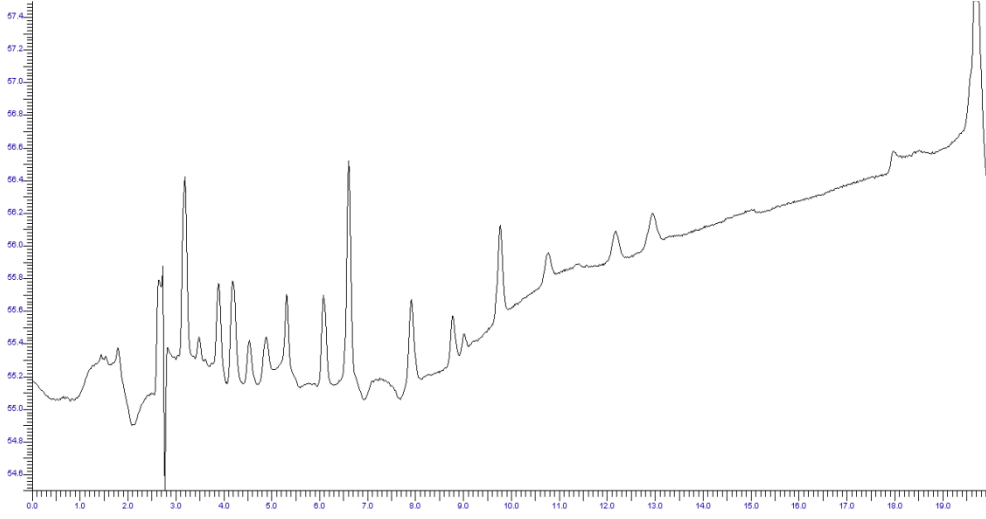
| | | | | | |
|----------------------|---|-------|------|------|------|
| 4. PİK Flr | 3,75; 3,85; 3,69; 3,68; 3,77 | 3,75 | 0,07 | 1,87 | 0,74 |
| 5. PİK Phe | 3,99; 4,16; 3,95; 3,92; 4,01 | 4,01 | 0,09 | 2,24 | 0,79 |
| 6. PİK Ant | 4,24; 4,51; 4,22; 4,22; 4,30 | 4,30 | 0,12 | 2,79 | 0,85 |
| 7. PİK Flt | 4,48; 4,83; 4,48; 4,53; 4,64 | 4,59 | 0,15 | 3,27 | 0,90 |
| 8. PİK Pyr | 4,97; 5,27; 4,97; 5,03; 5,15 | 5,08 | 0,13 | 2,56 | 1,00 |
| 9. PİK B[a]A | 5,91; 6,07; 5,67; 5,69; 5,87 | 5,84 | 0,17 | 2,91 | 1,15 |
| 10. PİK Chr | 6,17; 6,67; 6,17; 6,10; 6,38 | 6,30 | 0,23 | 3,65 | 1,24 |
| 11. PİK B[b]F | 7,37; 8,11; 7,35; 7,25; 7,59 | 7,53 | 0,35 | 4,65 | 1,48 |
| 12. PİK B[k]F | 8,30; 9,11; 8,36; 8,14; 8,54 | 8,40 | 0,37 | 4,40 | 1,65 |
| 13. PİK B[a]P | 9,32; 10,23; 9,45; 9,22; 9,55 | 9,55 | 0,40 | 4,19 | 1,88 |
| 14. PİK B[ghi]Per | 10,26; 11,62; 10,62 ; 10,24; 10,56 | 10,66 | 0,56 | 5,25 | 2,09 |
| 15. PİK DB[ah]A | 11,69; 13,16; 13,12; 11,70; 12,00 | 12,13 | 0,60 | 4,95 | 2,38 |
| 16. PİK Ipyr | 12,42; 14,37; 13,09; 12,53; 12,81 | 13,04 | 0,79 | 6,02 | 2,57 |

Sistemin doğruluğu, bilinen konsantrasyondaki PAH₁₆ çözültisinin HPLC-UV sistemine 5 kez enjekte edilerek elde edilen pik alanlarının, kalibrasyon eğrilerinden elde edilen denklemlerde yerlerine konularak hesaplanmıştır. Her bir PAH için hesaplanan bağıl hata değerleri Tablo 4.7 de verilmiştir. Bu değerler HPLC-UV sisteminin çözelti veya numune içerisindeki PAH'ların tayinleri için doğruluğunun oldukça iyi olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.7. PAH₁₆ için HPLC-UV metodunun doğruluğuna ait veriler

| Standartlar | Gerçek kons, (µg/L) | Hesaplanan kons, (µg/L) | Bağlı hata, (%) |
|------------------------|------------------------|----------------------------|-----------------|
| Naphthalene | 500 | 502.34 | 0.47 |
| Acenaphthylene | 500 | 479.43 | -4.71 |
| Acenaphthene | 500 | 469.52 | -6.10 |
| Fluorene | 500 | 509.45 | 1.89 |
| Phenanthren | 500 | 506.86 | 1.37 |
| Anthracene | 500 | 492.61 | -1.48 |
| Fluoranthene | 500 | 506.20 | 1.24 |
| Pyrene | 500 | 472.92 | -5.42 |
| Benzo[a]anthracene | 500 | 508.99 | 1.80 |
| Chrysene | 500 | 503.43 | 0.69 |
| Benzo[b]fluoranthene | 500 | 516.80 | 3.36 |
| Benzo[k]fluoranthene | 500 | 506.54 | 1.31 |
| Benzo[a]pyrene | 500 | 509.55 | 1.91 |
| Dibenzo[a,h]anthracene | 500 | 512.94 | 2.59 |
| Benzo[g,h,i]perylene | 500 | 510.72 | 2.14 |
| Indeno[1,2,3;cd]pyrene | 500 | 506.84 | 1.37 |

HPLC-UV yönteminin LOD ve LOQ değerleri deneysel olarak belirlenmiştir. Deneysel olarak LOD ve LOQ değerleri Şekil 4.5’de verilen 10 µg/L konsantrasyona sahip PAH₁₆ için elde edilen kromatograma göre değerlendirilmiştir. Kromatogramda görüldüğü gibi Aph ve Ace haricindeki tüm PAH türlerine ait pikler net görülmekte ve piklere ait pik alanları rahatlıkla elde edilebilmektedir. Bu durum LOQ değerlerinin Aph ve Ace için kalibrasyon grafiğinin en düşük konsantrasyonu olan 25µg/L, diğer 14 PAH için ise LOQ değerinin 1 µg/L den küçük olduğu söylenebilir. LOD değerleri ise bu konsantrasyon değerlerin altında olduğu tahmin edilebilir.



Şekil 4.5. PAH₁₆ standart çözeltisine (10µg/L) ait HPLC-UV kromatogramı



4.2 Ekstraksiyon Yöntemi

Uygulanan ekstraksiyon prosedürünün tekrarlanabilirliği ve ekstraksiyon verimi sentetik olarak oluşturulan spike çözeltilerle gerçekleştirilmiştir. İlk çalışmalar yine PAH₄ için gerçekleştirilmiş ve sonrasında elde edilen optimum şartlar PAH₁₆ için uygulanmaya çalışılmıştır.

4.2.1 PAH₄ Ekstraksiyonu

4.2.1.1 Sularda PAH₄ Ekstraksiyonu

Su örneklerinin ekstraksiyonu sonucu elde edilen DCM çözeltilisinin rotary ile uzaklaştırılmasında esnasında PAH₄ miktarında herhangi bir kaybın olup olmadığı, 30 mL'lik saf DCM içerisine bilinen konsantrasyonlarda PAH₄ eklenip ve sonrasında rotaryde kuruluğa kadar evapore edip elde edilen kalıntının 1 mL hareketli faz içerisinde çözülüp HPLC-UV sistemine enjekte edilmesiyle tayin edilmiştir. Sonuçta DCM'nin rotaryde uzaklaştırması esnasında ortalama %1'lik bir kaybın olduğu hesaplanmıştır. Örneklerin aşırı miktarda kirli olması durumunda ekstraktların SPE kartuşundan geçirilmesi söz konusu olacağına yukarıdaki çözelti SPE kartuşundan geçirilmiş ekstraksiyon basamağı aynı şekilde uygulanmıştır. PAH₄'ün SPE kartuşundan geçirilmesi esnasında yaklaşık %2'lik bir kaybın olduğu hesaplanmıştır.

Sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminin verimliliği çalışmada yine bilinen konsantrasyonlardaki PAH₄ 50mL'lik saf su içerisine eklenerek DCM ile ekstrak edilmiş ve DCM rotary evaporasyonu ile kuruluğa kadar buharlaştırılmış ve kalıntı 1 mL hareketli faz içerisinde çözülerek HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.8. Su örneklerinde PAH₄ için ekstraksiyon verimi verileri

| Standart Maddeler | Eklenen kons, (µg/L) | Hesaplanan kons, (µg/L) | Bağlı hata, (%) | Ekstraksiyon Verimi (%) |
|----------------------|----------------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|
| 1. Phenanthrene | 300 | 283.65 | 5.45 | 94.55 |
| 2. Pyrene | 600 | 580.01 | 3.33 | 96.67 |
| 3. Benzo[a]antracene | 600 | 577.34 | 3.78 | 96.22 |
| 4. Benzo[a]pyrene | 600 | 572.73 | 4.57 | 95.43 |

Tablodan da görüldüğü gibi ekstraksiyon verimi %95'ten büyük ve ortalama bağıl hata ise %5 civarlarındadır. Sayısal veriler direk ekstraksiyon yönteminin sularda PAH₄ tayininde kullanılabilceğini göstermektedir.

4.2.1.2 Yağlarda PAH₄ Ekstraksiyonu

Yağ örneklerinde PAH₄ tayini için basit olarak düşünülen sıvı-sıvı ekstraksiyon sonucunda asetonitril fazının kuruluğa kadar uçurulması ile elde edilen kalıntı içerisinde yağ taneciklerinin olması ekstraksiyon verimini önemli derecede etkilemektedir. Bu nedenle sıvı-sıvı ekstraksiyonu sonrasında çözücünün uçurulmasına geçmeden önce asetonitril içerisinde çözülmüş veya miseller oluşturmuş yağın tamamen temizlenmesi için asetonitril ekstraktı SPE kartuştan geçirilmiştir. Yağ örnekleri ekstraktlarının SPE kartuştan geçirilmesi çözücünün kuruluğa kadar uçurulmasından sonra 1 mL hareketli faz içerisinde çözülmesi sonucu oluşan yağ taneciklerinin giderilmesi konusunda herhangi bir yardımcı olmamıştır. Ayrıca SPE kartuşu PAH₄ standardı ile yükleme yapılmış ve standartlar asetonitril ile kolondan alınmıştır. Fakat, sonuçlar beklenmedik bir şekilde eklenen konsantrasyonlardan oldukça yüksek çıkmıştır. Bu nedenle ekstraktların SPE kartuşundan geçirilmesi bundan sonraki çalışmalarda uygulanmamıştır.

Yağ örnekleri içerisindeki PAH₄'ün ekstraksiyon verimi için, farklı konsantrasyonlara sahip PAH₄'le spike yapılan 2 mL zeytinyağı örneği 10 mL n-hekzan ile iyice çözülür. Daha sonra karışım 3 x 10 mL ACN ile ekstraksiyon yapılır ve ayrılan ACN fazları birleştirilir. Rotaryde 40°C'de evaporasyon işlemi kuruluğa kadar yapılır ve elde edilen kalıntı 1 mL mobil faz içerisinde çözülerek HPLC-UV sistemine enjekte edilir. Spike yağlarla yapılan çalışmaların sonuçları Tablo 4.9 da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre PAH₄ için uygulanan ekstraksiyon yönteminin verimi düşük, özellikle spike 2 çözeltisi için elde edilen verim oldukça düşük. Bu durumun yapılmış herhangi bir hatadan kaynaklandığı düşünüldüğünde, bağıl standart sapmanın düşük olması bu ihtimalde ortadan kaldırmaktadır. Her ne kadar verim yüksek olmasa da belli bir yüzdede ekstraksiyon gerçekleştirilmektedir.

Tablo 4.9. Yağlarda PAH₄ için sıvı-sıvı ekstraksiyon verimi verileri

| | Çözümler | Eklenen Kons. µg/L | Hesaplanan Kons. µg/L | Bağlı Std. Sapma (%) | Bağlı Hata (%) | Ekstraks Verimi (%) |
|---------|-----------------|-----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| PHEN | Spiked;1 | 25 | - | | | |
| | Spiked;2 | 200 | 146.52 | 8.18 | -26.74 | 73.26 |
| | Spiked;3 | 400 | 236.90 | 0.49 | -40.78 | 59.22 |
| PYR | Spiked;1 | 50 | 29.37 | 4.46 | -41.26 | 58.47 |
| | Spiked;2 | 400 | 294.23 | 8.43 | -26.44 | 73.56 |
| | Spiked;3 | 800 | 681.81 | 1.23 | -14.77 | 85.23 |
| B[a]ANT | Spiked;1 | 50 | 47.53 | 1.03 | -4.94 | 95.06 |
| | Spiked;2 | 400 | 248.62 | 9.10 | -37.85 | 62.15 |
| | Spiked;3 | 800 | 708.31 | 1.00 | -11.46 | 88.54 |
| B[a]P | Spiked;1 | 50 | 44.42 | 2.98 | -11.16 | 88.84 |
| | Spiked;2 | 400 | 190.74 | 8.47 | -52.31 | 47.69 |
| | Spiked;3 | 800 | 681.15 | 1.06 | -14.86 | 85.14 |

4.2.2 PAH₁₆ Ekstraksiyonu

4.2.2.1 Sularda PAH₁₆ Ekstraksiyonu

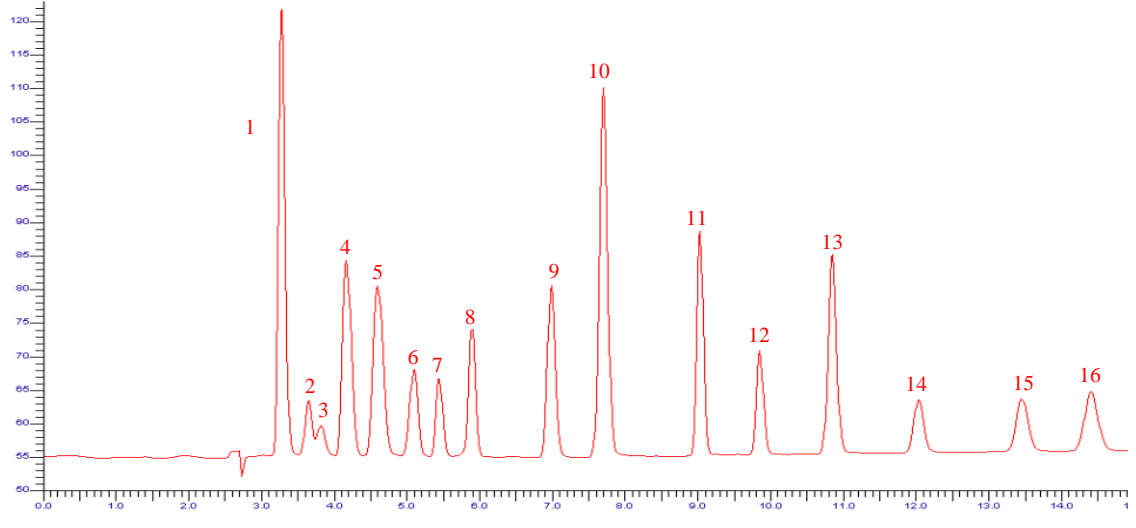
PAH₄ için uygulanan sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi PAH₁₆ içinde uygulanmıştır. Ekstraksiyon verimi çalışması için bilinen konsantrasyonlardaki PAH₁₆ 50 mL'lik saf su üzerine eklenerek spike numune hazırlandı. Elde edilen spike su numunesi 3 kez 5 mL DCM ile ekstrak edildi. Elde edilen ekstraktlar hem rotary hem de hava ile kuruluğa kadar uçuruldu ve kalıntı 1 mL ACN eklenerek HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.10. PAH₁₆ ile spike edilen su örnekleri için hava ve rotary ile yapılan hesaplamalar

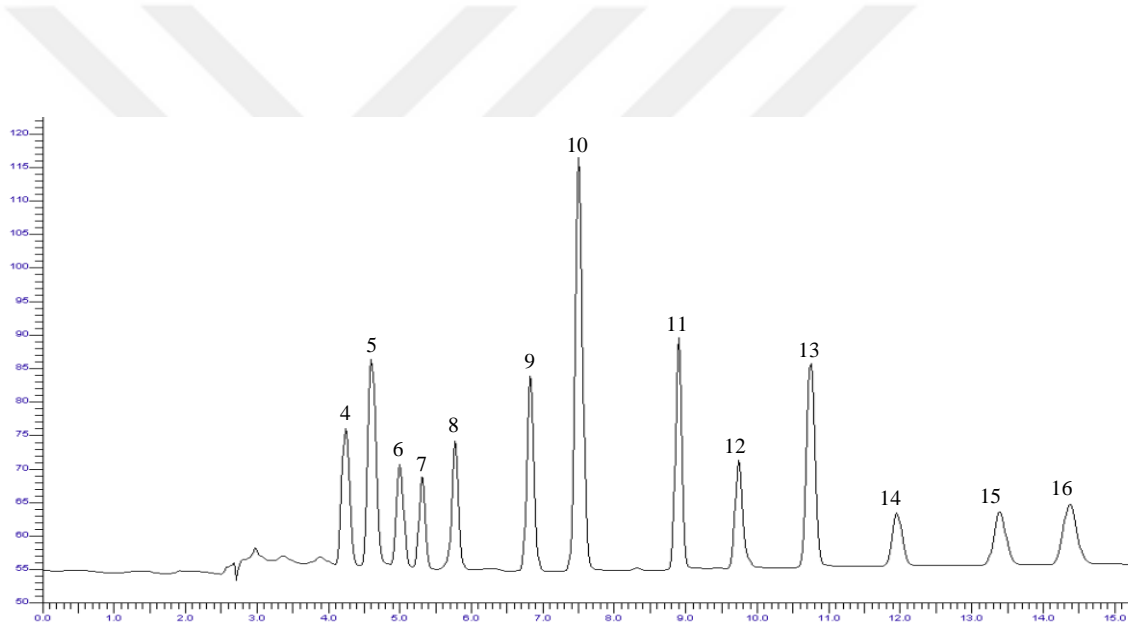
| | | DCM'nın Hava ile Uçurulması Durumundaki Veriler | | | DCM'nın Rotary ile Uçurulması Durumundaki Veriler | | |
|--|-------------------------------------|--|---------------------|---------------------------------|--|---------------------|---------------------------------|
| | Eklenen Kons. (µg/L) | Hesaplanan Kons. (µg/L) | Hata (%) | Ekst. Verimi (%) | Hesaplana n Kons. (µg/L) | Hata (%) | Ekst. Verimi (%) |

| | | | | | | | |
|-----------|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Nph | 700 | - | - | - | - | - | - |
| Aph | 700 | - | - | - | - | - | - |
| Ace | 700 | - | - | - | - | - | - |
| Flr | 700 | 293,49 | -58,07 | 41,93 | 563,57 | -19,49 | 80,51 |
| Phe | 700 | 733,59 | 4,80 | 104,80 | 430,21 | -38,54 | 61,46 |
| Ant | 700 | 395,36 | -43,52 | 56,48 | 522,69 | -25,33 | 74,67 |
| Flt | 700 | 621,92 | -11,15 | 88,85 | 699,48 | -0,07 | 99,93 |
| Pyr | 700 | 726,95 | 3,85 | 103,85 | 819,39 | 17,06 | 117,06 |
| B[a]A | 700 | 822,33 | 17,48 | 117,48 | 828,82 | 18,40 | 118,40 |
| Chr | 700 | 857,31 | 22,47 | 122,47 | 848,80 | 21,26 | 121,26 |
| B[b]F | 700 | 677,24 | -3,25 | 96,75 | 736,97 | 5,28 | 105,28 |
| B[k]F | 700 | 674,59 | -3,63 | 96,37 | 671,93 | -4,01 | 95,99 |
| B[a]P | 700 | 663,42 | -5,23 | 94,77 | 655,50 | -6,36 | 93,64 |
| B[ghi]Per | 700 | 658,98 | -5,86 | 94,14 | 669,67 | -4,33 | 95,67 |
| DB[ah]A | 700 | 648,81 | -7,31 | 92,69 | 441,91 | -36,87 | 63,13 |
| Ipyr | 700 | 692,89 | -1,02 | 98,98 | 660,26 | -5,68 | 94,32 |

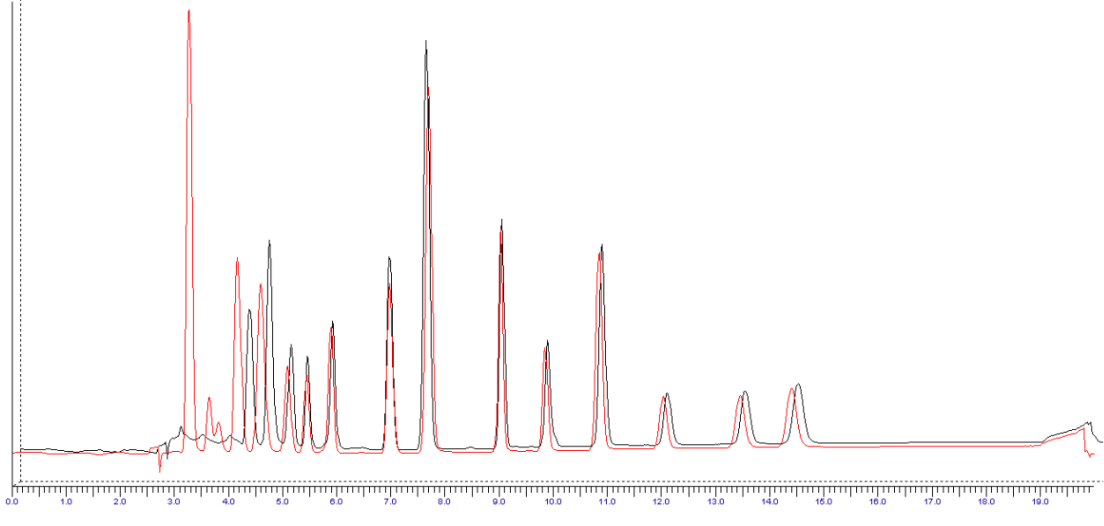
Rotary evaporsyonu PAH₄ için oldukça iyi sonuçlar vermesine rağmen PAH₁₆ için beklenen sonuçları vermemiştir. Diğer bir durum ise ilk üç PAH (Nph, Aph ve Ace) rotary evaporsyonu sonrasında önemli derecede azalma gözlemlenmiştir. Her iki durumu da iyileştirmek için DCM'nin uçurulması alternatif olarak hava ortamında gerçekleştirilmiştir. Fakat bu değişimde ekstraksiyon veriminin artırılmasına ve aynı zamanda Nph, Aph ve Ace türlerinin de kromatogramda gözlemlenmesine önemli derecede etki etmemiştir. Bu durum ilk üç PAH'ın uçuculuklarının yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Basitlik nedeniyle bundan sonraki çalışmalarda ekstraksiyon ortamından DCM'nin uzaklaştırılması hava ortamından gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.6. PAH₁₆ standart çözeltisine (700µg/L) ait HPLC-UV kromatogramı



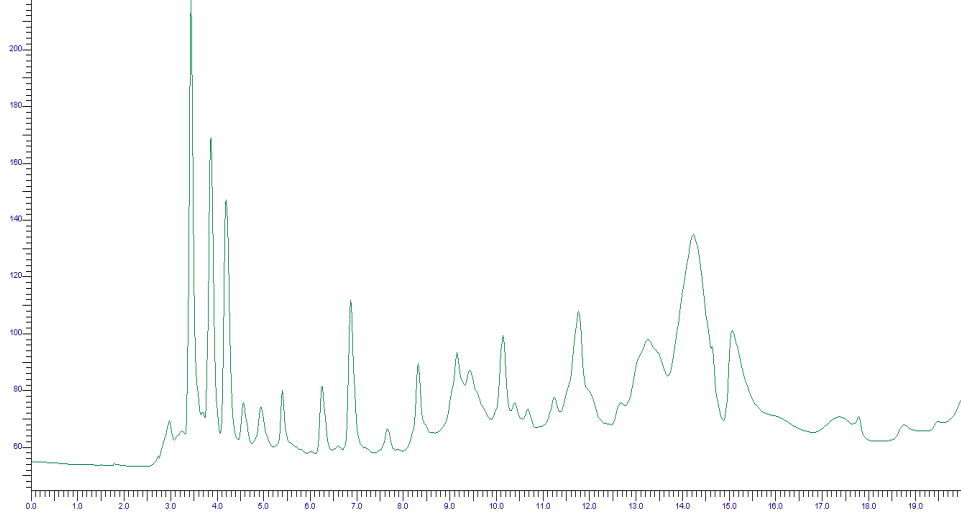
Şekil 4.7. PAH₁₆ standart çözeltisi (700µg/L) ile spike edilen saf su örneğinin ekstraksiyon sonrasında ait HPLC-UV kromatogramı



Şekil 4.8.PAH₁₆ standart ve spike edilen saf su örneğinin ekstraksiyon sonrasında ait HPLC-UV kromatogramlarının karşılaştırılmış durumları

4.2.2.2 Yağlarda PAH₁₆ Ekstraksiyonu

Yağ örnekleri içerisindeki PAH₁₆'ün ekstraksiyon verimi için, bilinen konsantrasyondaki (700 µg/L) PAH₁₆ ile spike yapılan 2 mL zeytinyağı örneği 10 mL n-hekzan ile iyice çözülür. Daha sonra karışım 3 x 10 mL ACN ile ekstraksiyon yapılır ve ayrılan ACN fazları birleştirilir. Rotaryde 40°C'de evaporasyon işlemi kuruluğa kadar yapılır ve elde edilen kalıntı 1 mL mobil faz içerisinde çözülerek HPLC-UV sistemine enjekte edilir. Spike yağ için ekstraksiyon sonucu elde edilen kromatogram Şekil 4.9'da ve PAH₁₆ standartına ait kromatogram ise Şekil 4.6'da verilmiştir. Kromatogramlarda pikler görülmesine rağmen kantitatif hesaplama yapmak mümkün olmamıştır.

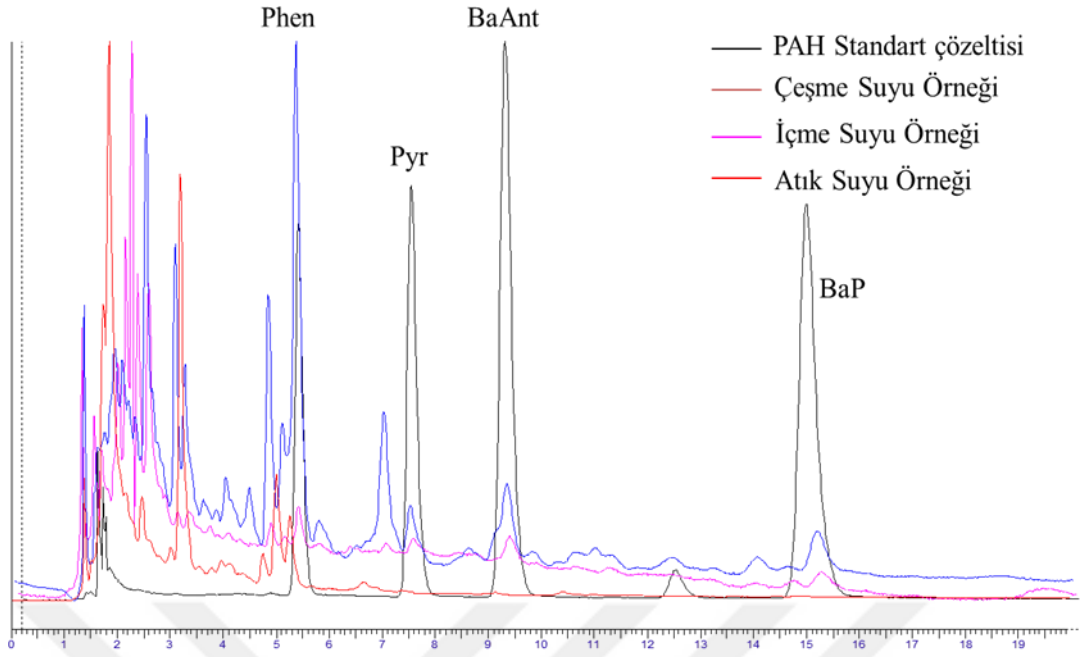


Şekil 4.9. PAH₁₆ standart çözeltisi (700µg/L) ile spike edilen yağ örneğinin ekstraksiyon sonrasına ait HPLC-UV kromatogramı

4.3 Örneklerin Analizleri

4.3.1 Su Örneklerinde PAH₄ Tayinleri

Su örneklerini piyasada satılan içme suyu, laboratuvarda bulunan çeşme suyu ve çevrede bulunan nehirden alınan sular oluşturmaktadır. Burada yapılan ekstraksiyonda toplanan DCM fazı rotary ile evapore edilmiştir. Şekil 4.10 standart ve 50 kat zenginleştirilmiş su örneklerine ait kromatogramların üst üste çakıştırılmış durumlarını göstermektedir. Kromatogramlardan, su örnekleri içerisinde PAH₄ varlığı görülmektedir. Tablo 4.11 su örnekleri içerisindeki tayin edilen PAH₄ miktarlarını göstermektedir.



Şekil 4.10. Optimum şartlarda PAH₄ standartlarına ve su örneklerine ait HPLC-UV kromatogramlarının üst üste çakıştırılmış durumları (n=3)

Tablo 4.11. Su örneklerinin içerisindeki PAH₄ miktarları

| Poliaromatik Hidrokarbonlar | Atık Suyu (µg/L) | İçme Suyu µg/L | Çeşme Suyu µg/L |
|-----------------------------|---------------------|-------------------|--------------------|
| 1. Phenanthrene | 4.69±0.02 | 0.37±0.19 | 4.23±0.95 |
| 2. Pyrene | 0.52±0.21 | 0.11±0.03 | 0.92±0.02 |
| 3. Benzo[a]anthracene | 0.23±0.03 | 0.13±0.01 | 0.95±0.40 |
| 4. Benzo[a]pyrene | bsa | 0.10±0.01 | 0.52±0.02 |

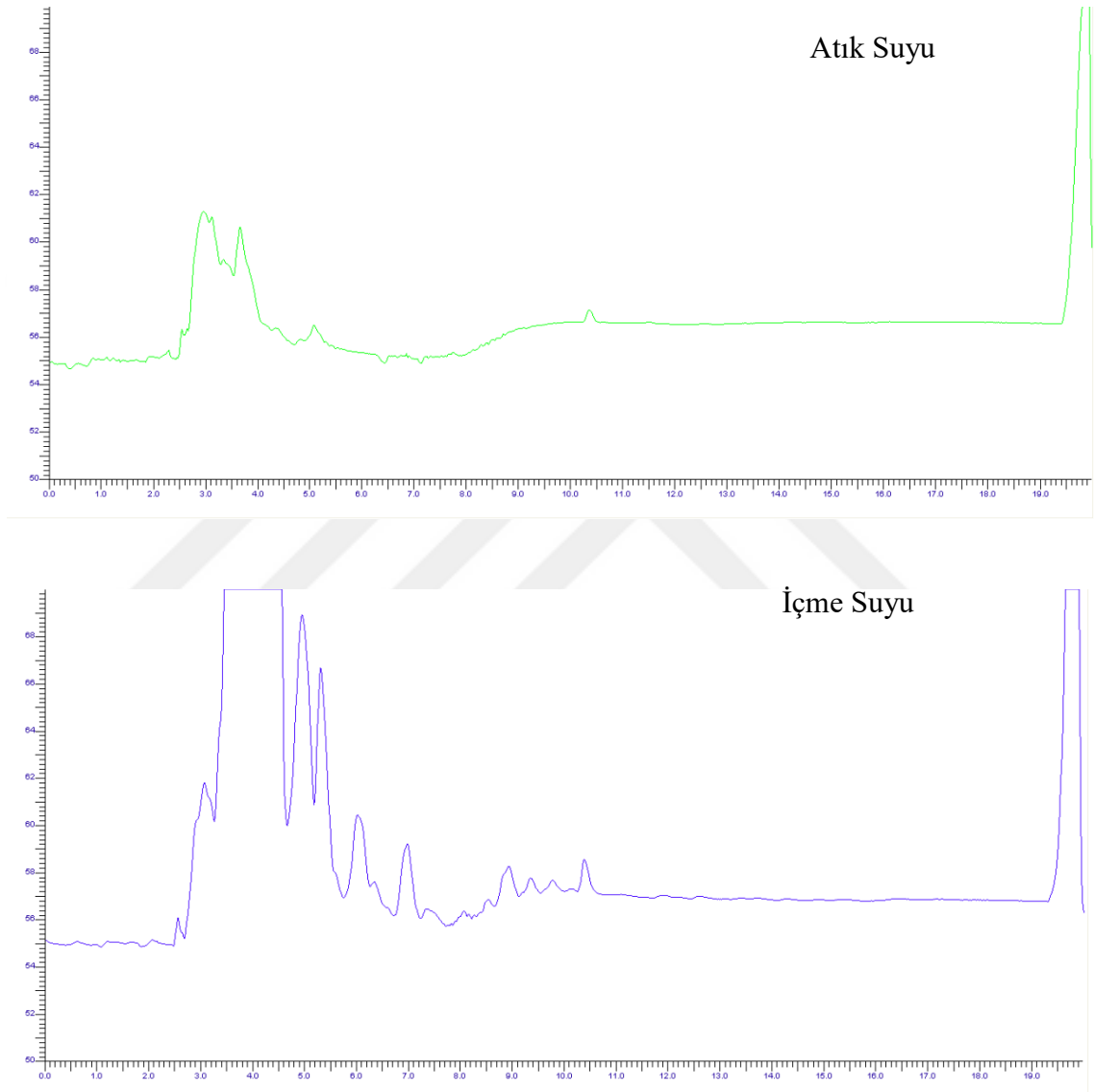
bsa: belirtme sınırının altında

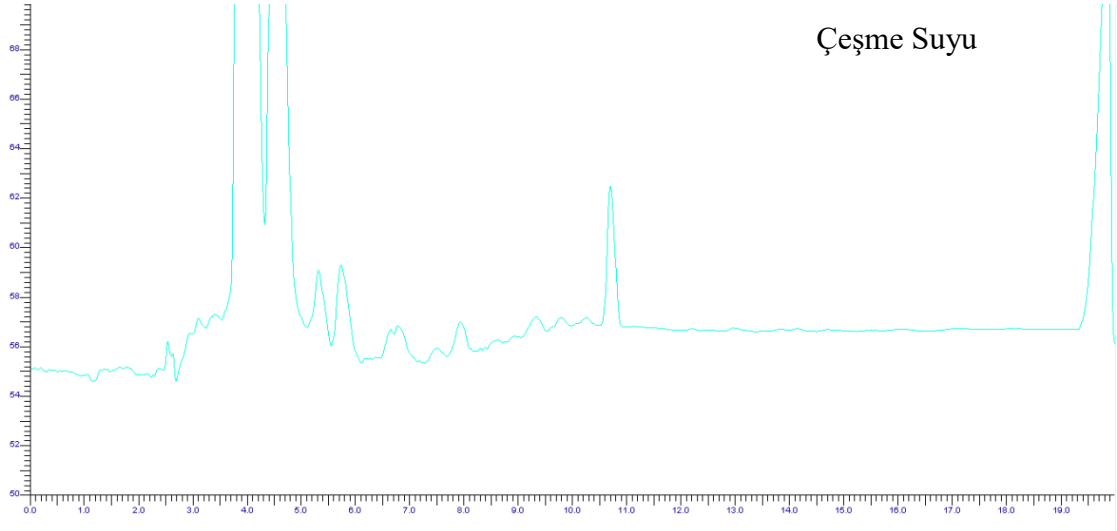
Su örnekleri içerisinde bulunan değerler PAH₄ için belirlenen limit değerler çok altındadır. Özellikle PAH kirliliğinin bir ölçüsü olarak belirlenen Benzo[a]pyren alt limit değer olan 5 µg/L değerinin çok çok altında. Dolayısıyla her ne kadar su örneklerinde PAH₄ bulunmuş olsa da suların PAH'lar bakımından kirletilmiştir demek yanlış olur.

4.3.2 Su Örneklerinde PAH₁₆ Tayinleri

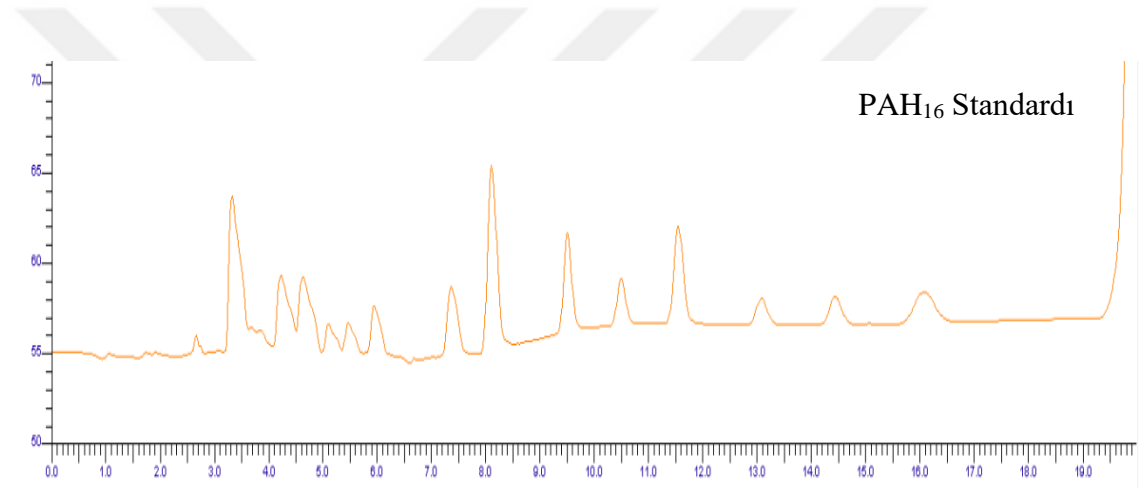
HPLC-UV analizleri PAH₄ için başarılı bir şekilde uygulanmış olmasına rağmen PAH₁₆ için çok da başarılı olmamıştır. PAH'ların sayısının çok olması ve alıkonma zamanlarındaki farklılaşmalar piklerin tanımlanmasında önemli güçlükler

ıkartmaktadır. Şekil 4.11 Atık, eŐme ve içme sularına ait HPLC-UV kromatogramları göstermektedir. Özellikle içme ve eŐme sularında oldukça çok sayıda pik olmasına raŐmen standartların alikonma zamanlarına (Şekil 4.12) bakarak net tanımlama yapmak çok doŐru olmayacaktır.





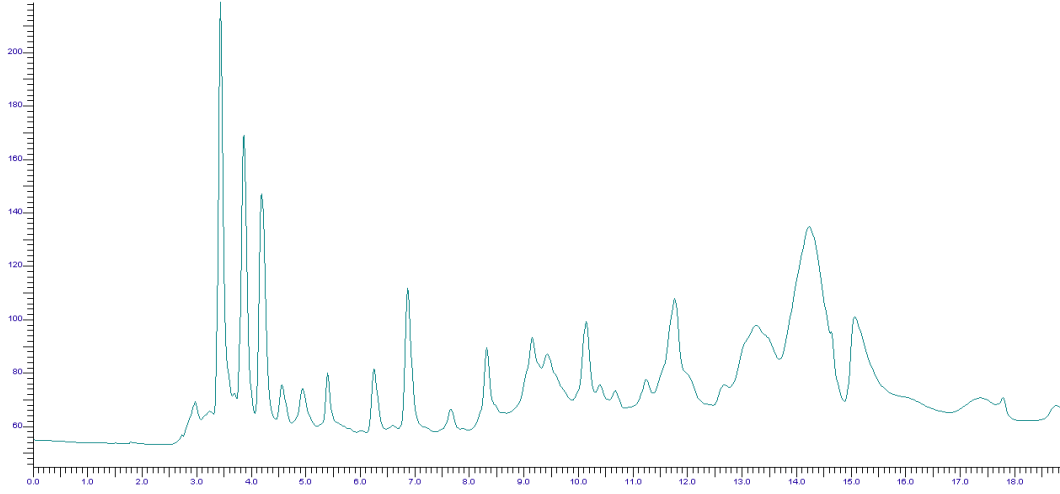
Şekil 4.11. PAH₁₆ için atık, çeşme ve içme sularına ait HPLC-UV kromatogramları



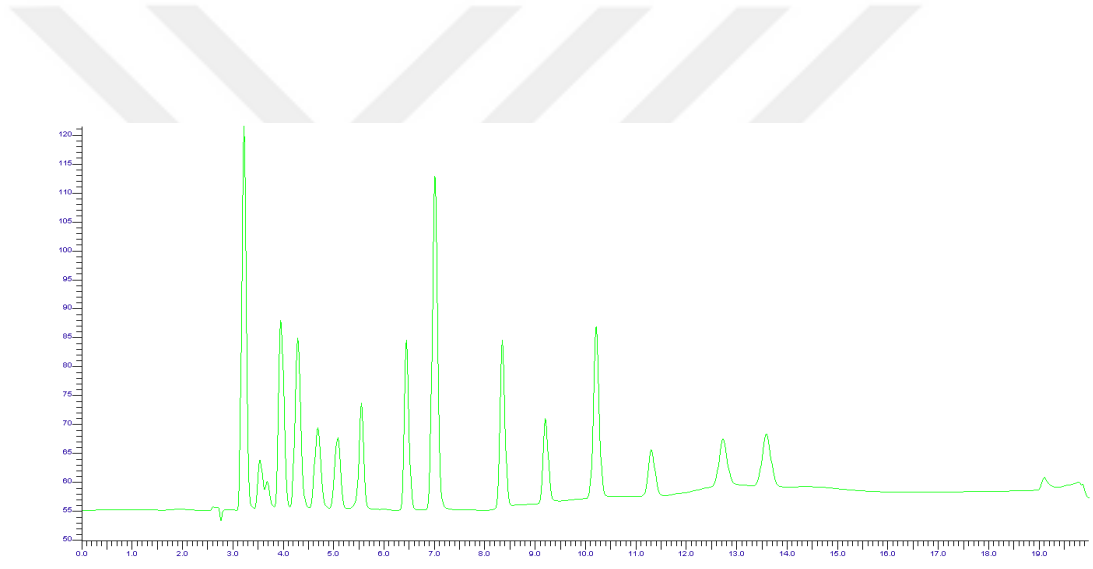
Şekil 4.12. PAH₁₆ standart çözeltisine ait HPLC-UV kromatogramı

4.3.3 Yağ Örneklerinde PAH₄ ve PAH₁₆ Tayinleri

Yağ örneklerinde PAH₄ ve PAH₁₆ tayini için basit olarak sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile olumlu sonuçlar elde edilememiştir. Bu durumun en önemli belirtisi 700 µg/L konsantrasyona sahip PAH₁₆ ile spike edilen yağ örneğine ait kromatogramdır (Şekil 4.13). Kromatogramda her bir PAH'a ait piklerin 700 µg/L standart PAH₁₆ çözeltisi için elde edilen kromatogramdaki (Şekil 4.14) gibi net olarak görülmesi beklenmektedir. Fakat, piklerin bazıları istenmedik bir şekilde geniş ve ayrılmamış şekilde elde edilmiştir.

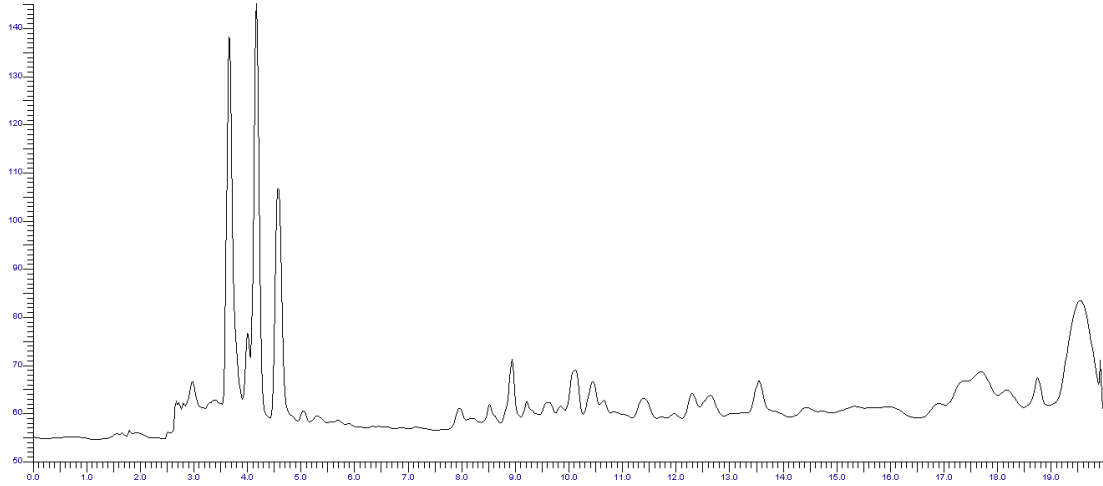


Şekil 4.13. Standart PAH₁₆ çözeltisi ile (700µg/L) spike edilmiş yağ örneğinin kromatogramı



Şekil 4.14. Standart PAH₁₆ çözeltisine ait (700µg/L) ait kromatogram

Şekil 4.15 yağ örneğine ait kromatogramı göstermektedir. Kromatogram üzerinde çok sayıda pik olması PAH₁₆ varlığı olduğunu düşündürmektedir. Fakat hangi pik hangi PAH'a ait olduğunu sadece alıkonma zamanlarına bakarak söylenmesi oldukça zor olduğu görülmektedir. Bu durum yağlarda PAH₄ tayini içinde söylenebilir.

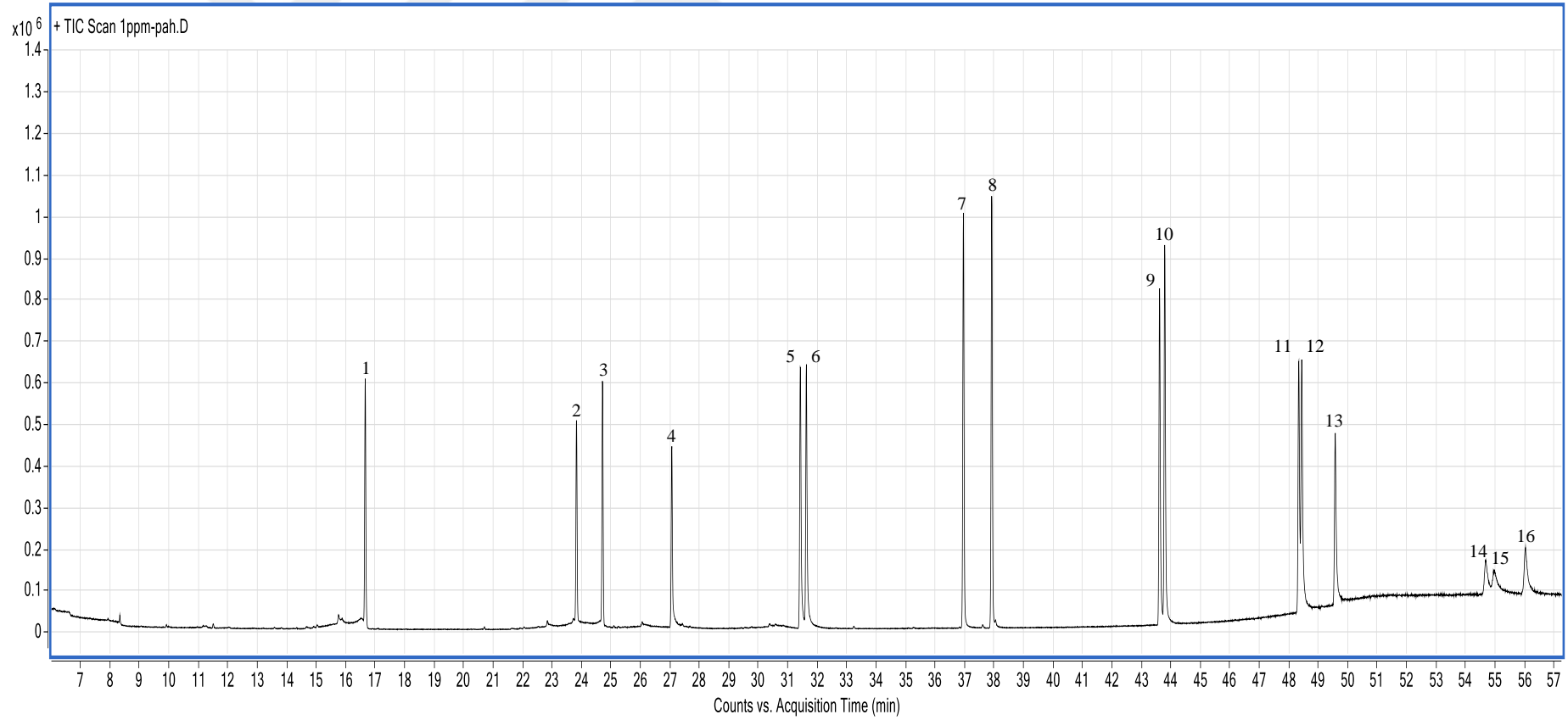


Şekil 4.15. Yağ örneğine ait kromatogram

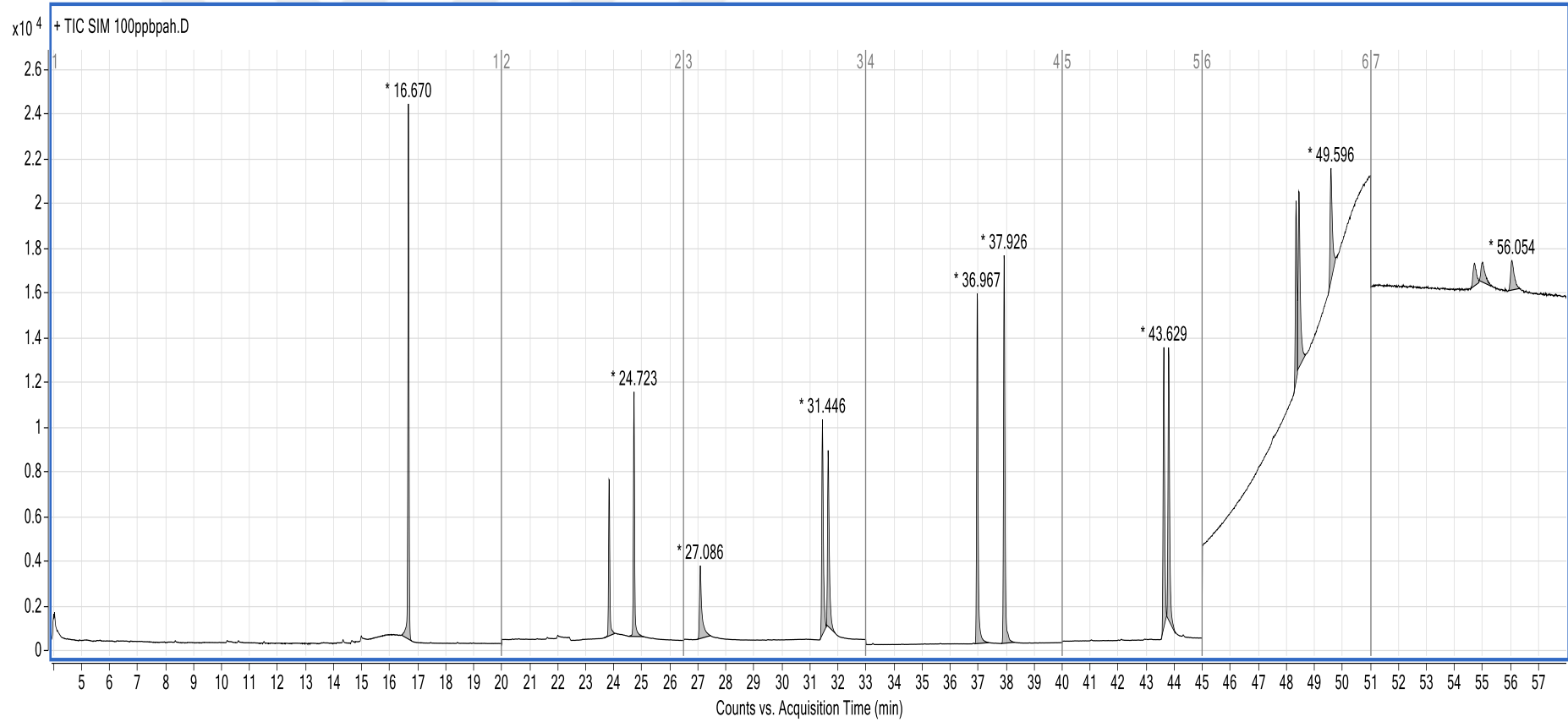
4.4 Örneklerin PAH₁₆ GC-MS Analizleri

Özellikle PAH₁₆ tayinlerinde HPLC-UV kromatogramları yardımı ile türlerin alıkonma zamanları üzerinden tanımlanma yapılmasında yaşanan sorunlardan dolayı su ve yağ örnekleri daha spesifik bir yöntem olan ve m/s oranı parametresi üzerine dayandırılan GC-MS yöntemiyle de analiz edilmiştir. Uygun GC-MS koşullarında 1000 µg/L konsantrasyon sahip PAH₁₆ standardı sisteme enjekte edilmiştir. Şekil 4.16 analiz sonucunda elde edilen TIC modunda ki GC-MS kromatogramını göstermektedir. Kromatogramda görüldüğü gibi PAH₁₆ türünün de görülmesi mümkün olmuştur. Kantitatif analizler için 100 µg/L konsantrasyon sahip PAH₁₆ standardına ait SIM modundaki ait kromatogramda elde edilmiştir (Şekil 4.17). Kantitatif analizler standartlar için elde edilen pik alanlarıyla numune için elde edilen pik alanlarıyla karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

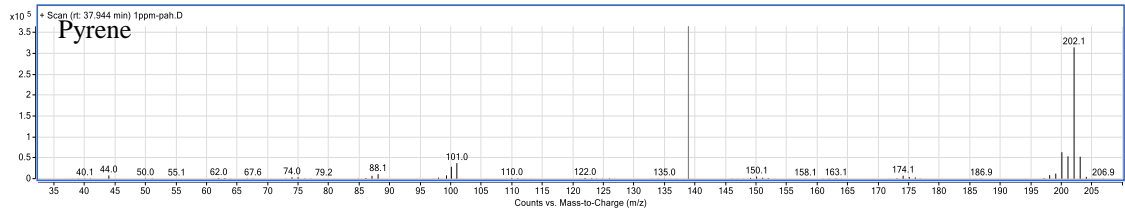
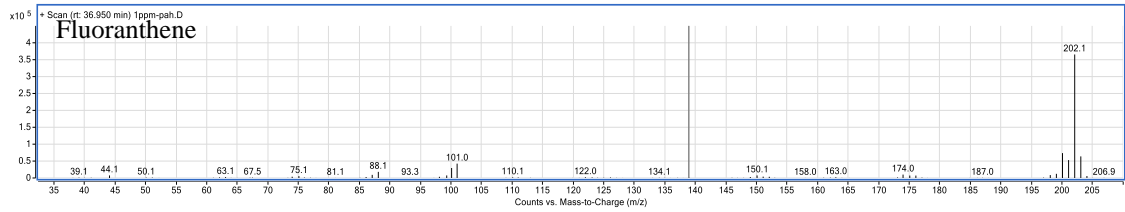
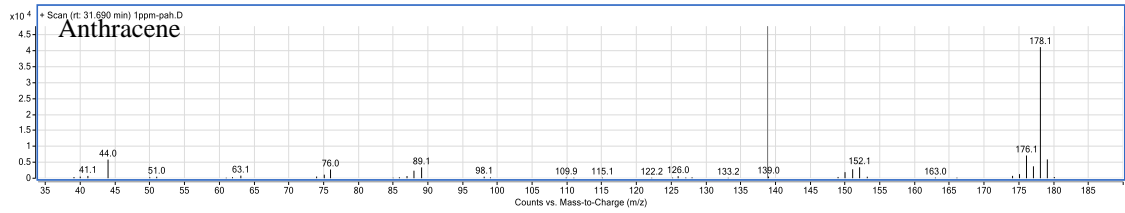
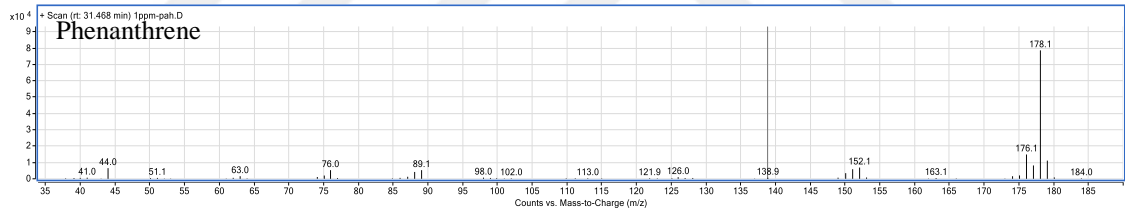
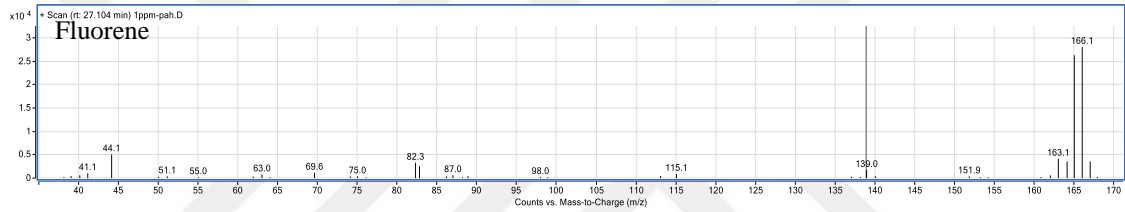
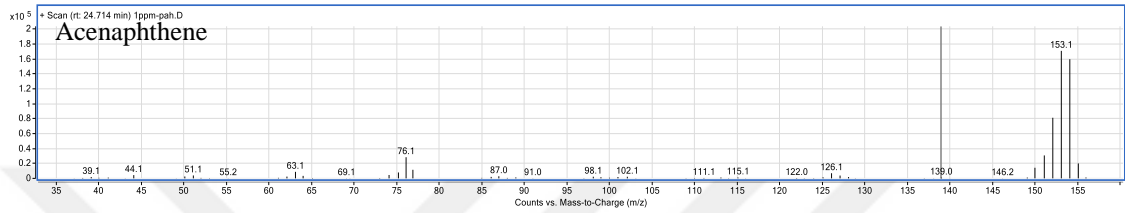
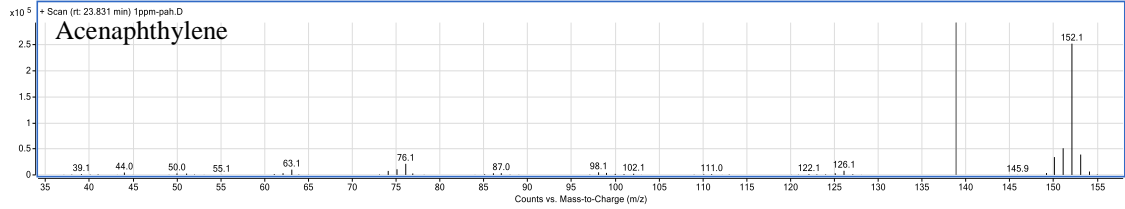
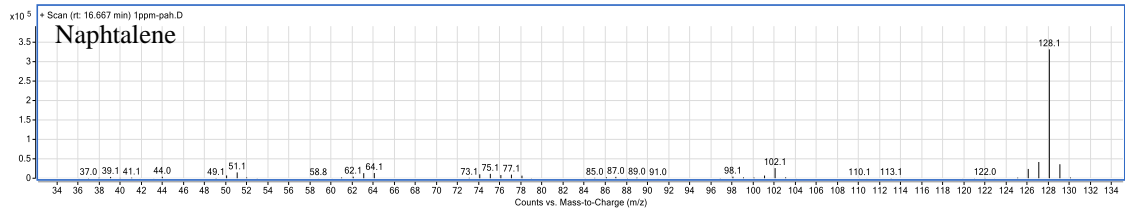
Kromatogramlar üzerindeki her türe ait kütle spektrumları sırasıyla Şekil 4.18’de verilmiştir. MS spektrumlarında her bir PAH türünün moleküler iyon pikleri net bir şekilde görülmektedir. Bu durumda kalitatif tanımlamalar çok daha kolay olmuştur.

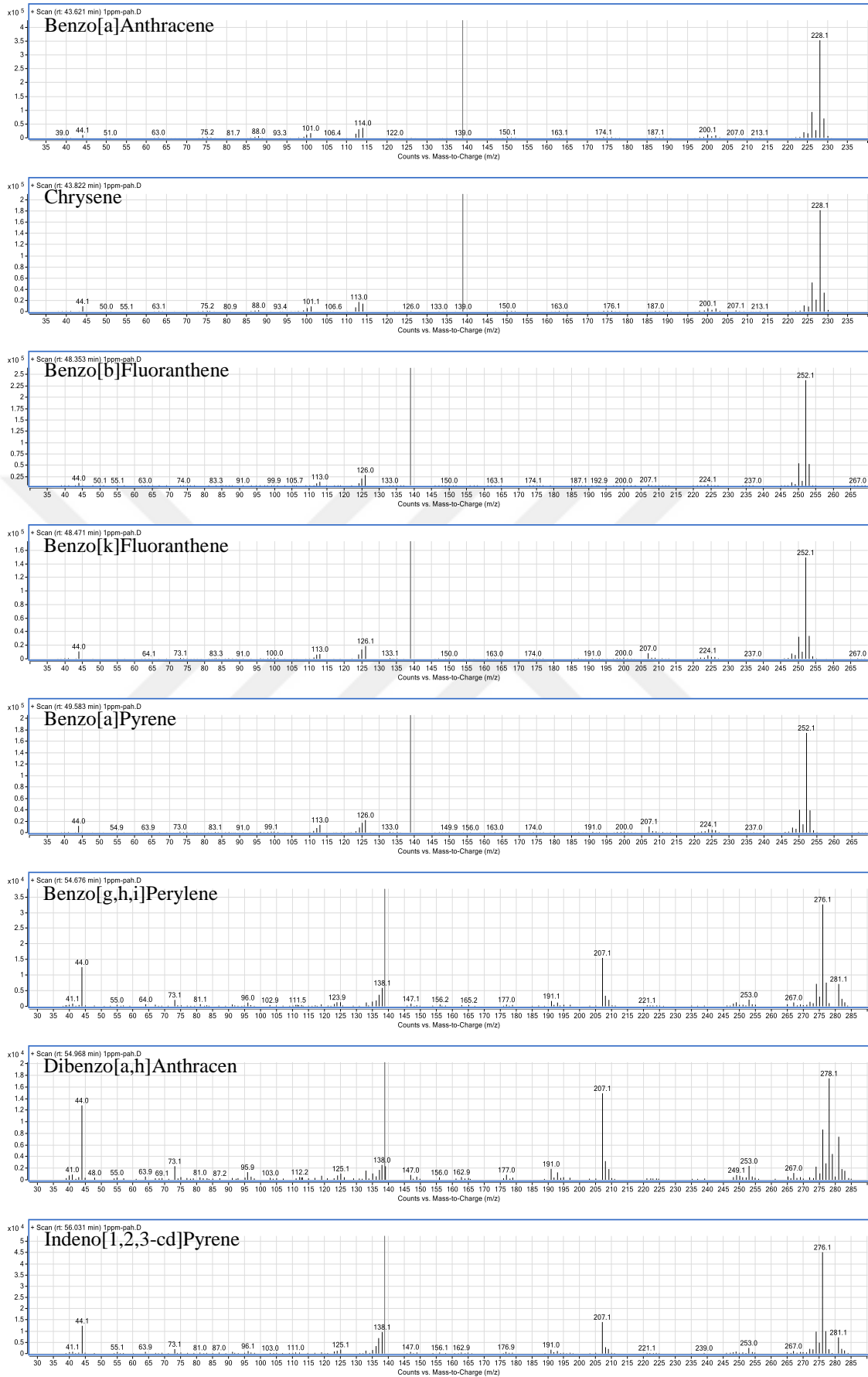


Şekil 4.16. PAH₁₆ standartlarının TIC modundaki GC-MS kromatogramı



Şekil 4.17. PAH₁₆ standartlarının SIM modundaki GC-MS kromatogramı





Şekil 4.18. PAH₁₆ standartlarının her birinin kütle spektrumları

Tablo 4.12. GC-MS ile su örneklerinde PAH₁₆ tayinleri

| Poliaromatik Hidrokarbonlar | Saf Su (µg/L) | Atık Suyu (µg/L) | İçme Suyu µg/L | Çeşme Suyu µg/L |
|------------------------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|
| 1. Nph | bsa | 0.32 | 0.39 | 0.21 |
| 2. Aph | bsa | bsa | bsa | bsa |
| 3. Ace | bsa | 0.38 | 0.32 | bsa |
| 4. Flr | bsa | 0.48 | 1.51 | bsa |
| 5. Phe | 0.28 | 0.45 | 1.23 | 0.48 |
| 6. Ant | bsa | bsa | bsa | bsa |
| 7. Flt | bsa | bsa | bsa | bsa |
| 8. Pyr | bsa | bsa | bsa | bsa |
| 9. B[a]A | 0.18 | 0.14 | bsa | bsa |
| 10. Chr | bsa | bsa | bsa | bsa |
| 11. B[b]F | bsa | bsa | bsa | bsa |
| 12. B[k]F | bsa | bsa | bsa | bsa |
| 13. B[a]P | bsa | bsa | bsa | bsa |
| 14. B[ghi]Per | bsa | bsa | bsa | bsa |
| 15. DB[ah]A | bsa | bsa | bsa | bsa |
| 16. İpyr | bsa | bsa | bsa | bsa |

bsa: belirtme sınırının altında

Su örneklerinde özellikle B[a]P olmaması suların kirletilmediği anlamına gelmektedir. Her bir su örneğinde sadece bir kaç tane PAH varlığı gözlemlenmektedir. Toplam PAH'lar bakımından da bakıldığında suların kirlenmemiş olduğu ve Limit değerlerin altında olduğu görülmüştür.

Yağ örneklerinin sonuçları oldukça yüksek çıkmıştır. Bu kadar yüksek konsantrasyonda PAH olma ihtimalinin mümkün olmadığı düşünülmektedir. Bu nedenle yağ örnekleri için elde edilen sonuçlar burada verilmemiştir. Bunun nedeninin basit olarak uygulanmak istenen ve her hangi bir temizleme prosedürü uygulanmadan elde edilen yağ örneklerinde yüksek miktarlarda birlikte ekstrakt edilen maddenin olmasından kaynaklanmaktadır. Her ne kadar MS spesifik bir detektör olmasına rağmen aynı m/z değerine sahip türlerin ekstrakt içerisinde olduğu düşünülmektedir.

5 SONUÇ

HPLC-UV metodu tez kapsamında analizleri planlanan 16 PAH türü için başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Çalışma kapsamında seçilen 16 PAH 15 dakika gibi bir alıkonma zamanı içerisinde birbirlerinden ayrılmış ve her bir PAH için keskin ve dar pikler elde edilmiştir. Yöntemin alıkonma zamanları bakımından tekrarlanabilirliğin 0.79 dak SD ve %6 RSD den düşük hesaplanmıştır. Yöntem doğruluğu ise bağıl hata türünde %0.47-6.10 hata aralığında değişmektedir. Deneysel olarak değerlendirilen LOQ değerleri standart çözeltiler ile yapılan çalışmalara göre 1-25 µg/L arasında olduğu bulunmuştur.

PAH'ların su ve yağlardan ekstraksiyonu için basit olarak sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygulanmıştır. Burada su örneklerinde PAH'lar diklorometan içerisinde, n-hekzan içerisinde çözülen yağ örnekleri içerisindeki PAH'lar ise asetonitril içerisinde çekilmiştir. Elde edilen ekstrakt çözeltileri rotary ve hava ortamında kuruluğa kadar uçurulmuş ve kalıntı 1 mL asetonitril içerisinde çözülerek HPLC-UV sistemi ile analizlenmiştir.

Sonuçlar sıvı-sıvı ekstraksiyon prosedürünün su örnekleri için uygulanabilir olduğunu göstermiştir. Su örneklerinde PAH varlığına rastlanmış olup konsantrasyonları oldukça düşük çıkmıştır. Bu bağlamda su örneklerinin PAH'lar bakımından kirlenmemiş olduğunu göstermektedir.

Yağların ekstraksiyonu ise beklenildiği gibi iyi sonuçlar vermemiştir. Ekstraksiyon verimini ve birlikte ekstrak edilen maddeleri temizlemek için SPE kartuşu kullanılmıştır. Fakat her iki durum içinde bir iyileştirme sağlanamamıştır. Yağlar için elde edilen kromatogramlar üzerinde oldukça fazla sayıda, geniş ve tam olarak bir birlerinde ayrılmayan piklerin varlığı standartların alıkonma zamanları ile karşılaştırılarak tanımlama yapmaya imkan sağlamamaktadır. Bu durumun en önemli sebeplerinden biri çalışılan konsantrasyonların µg/L gibi çok düşük olması ve UV detektör sisteminin seçici olmamasında kaynaklanmaktadır. Standartlarla çalışma esnasında µg/L düzeyindeki (1-10 µg/L) PAH'ların HPLC-UV sisteminde çok rahatlıkla tayin edilmesine rağmen yağ örnekleri ortamında bu düzeylerde tayinlerde zorluklar karşılaşılmaktadır. Daha yüksek konsantrasyonlar olan mg/L seviyelerinde çalışmak bu durumu düzeltebilir, fakat PAH'lar için verilen limit değerlere uygun olmayacaktır. Diğer bir iyileştirme noktası olarak örnek miktarlarının artırılması

düşünülebilir, fakat bu durumda da birlikte ekstrakte edilen maddelerin de konsantrasyonu bağıl olarak artacaktır. Yağ ekstraktları GC-MS gibi daha spesifik bir analiz yönteminde de beklenen sonuçları vermemiştir. Birlikte ekstrakte edilen türlerin tayinleri üzerine etki ederek PAH konsantrasyonlarının kabul edilemeyecek şekilde çok yüksek çıkmasına neden olmuştur.

Bu sonuçlar doğrultusunda gelecekte yapılacak çalışmalarda ekstraksiyon prosedürünü sadece sıvı-sıvı ekstraksiyonu şeklinde değil daha iyi sonuçlar verecek şekilde geliştirmek çalışma konusu olabilir. Ekstraların temizlenmesi için klasik kolon, SPE vs tayinler için daha spesifik olan GC-MS-MS analiz yöntemleri düşünülmelidir.

Sonuç, HPLC-UV metodu su örneklerinde PAH'ların tayini için kullanılabilir. Yağ örnekleri analizlerinde ise ekstraksiyon işleminden sonra ekstraktların analiz öncesi uygun bir temizleme yöntemine tabi tutulması gerekmektedir.

KAYNAKÇA

1. World Health Organization, WHO Guide lines for Indoor Air Quality: Selected Pollutants, pp: 289;325, 2010, Bonn, ISBN 978 92 890 0213 4.
2. Amanzadeh, H., Yamani, Y., Moradi, M. ve Asl, Y.A. (2016). Determination of phthalate esters in drinking water and edible vegetable oil samples by headspace solid phase micro extraction using graphene/polyvinylchloride nano composite coated fiber coupled to gas chromatography-flame ionization detector. *Journal of Chromatography A*, 38-46.
3. Zhang, Y., Zhou, H., Zhang, Z-H., Wu, X-L., Chen, W-G., Zhu, Y., Fang, C-F. ve Zhao, Y.G. (2017). Three-dimensional ionic liquid functionalized magnetic grapheneoxide nanocomposite for the magnetic dispersive solid phase extraction of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils. *Journal of Chromatography A*, 29-38.
4. Nestola, M. ve Schmind, T.C. (2017). Determination of mineral oil aromatic hydrocarbons in edible oils and fats by online liquid chromatography–gas chromatography–flame ionization detection – Evaluation of automated removal strategies for biogenic olefins. *Journal of Chromatography A*, 69-76.
5. Zheng, H-B., Ding, J., Zheng, S-J., Zhu, G-T., Yuan, B-F. ve Feng, Y-Q. (2016). Facile synthesis of magnetic carbon nitride nanosheets and its application in magnetic solid phase extraction for polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oil samples. *Talanta*, 46-53.
6. Çorman, M.E., Armutçu, C., Lokman, U. ve Denizli, A. (2017). Rapid, efficient and selective pre-concentration of benzo[a]pyrene (BaP) by molecularly imprinted composite cartridge and HPLC. *Materials Science and Engineering C*, 41-53.
7. Jiang, D., Xin, C., Li, W., Chen, J., Li, F., Chu, Z., Xiao, P. ve Shao, L. (2015). Quantitative analysis and health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible vegetable oils marketed in Shandong of China. *Food and Chemical Toxicology*, 61-67.
8. Yousefi, M., Shemshadi, G., Khorshidian, N., Ghasemzadeh-Mohammadi, V., Fakhri, Y., Hosseini, H. ve Khaneghah, A.M. (2018). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) content of edible vegetable oils in Iran: A risk assessment study. *Food and Chemical Toxicology*, 480-489.

9. Payanan, T., Leepipatpiboon, N. ve Varanusupakul, P. (2013). Low-temperature cleanup with solid-phase extraction for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils by reversed phase liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Chemistry*, 2720-2726.
10. Özlem Kiliç Büyükkurt, Elif Aykınve Mustafa Erbaş, Gıdalarda Polisiklik Aromatik Hidrokarbon Bileşiklerinin Bulunuşu Ve Sağlık Üzerine Etkileri, *Gıda* (2017) 42 (2): 127;135, doi: 10.15237/gıda.GD16060
11. İdeli C., (2007). Bazı gıda maddeleri ve bitkisel yağlarda poliaromatik hidrokarbonların (PAH) analizleri. Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı, Manisa.
12. Palamutoğlu, R.; Sarıçoban, C.; Kasnak, C. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH) ve Et Ürünlerinde Oluşumu, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*. 2014; 9 (3) 47;57.
13. EFSA, European Food Safety Authority. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food: Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal*. 2008; 724, 15;114.
14. WHO, Polynuclear aromatic hydrocarbons in Drinking;water, Background document for development of WHO Guidelines for Drinking;water Quality, 2003, Switzerland.
15. Michaela MOSEROVÁ, VěraKOTRBOVÁ, Dagmar AIMOVÁ, Miroslav ŠULC, Eva FREI, Marie STIBOROVÁ, Analysis of benzo[a]pyrene metabolites formed by rat hepatic micro somes using high pressure liquid chromatography: optimization of the method, *Inter disciplinary Toxicology*, 2009; Vol. 2(4): 239–244.doi: 10.2478/v10102;009;0024;0.
16. Błaszczuk, U. (2014). Theapplication of multistep extraction and liquid chromatography with fluorescence detection for analysis of azaarenes in edible oil samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, 175-180.
17. World Health Organization, Air Quality Guidelines for Europe, Chapter 5.9, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), Second Edition, WHO Regional Publications, European Series, No. 91, 2000, Copenhagen, pp
18. Wang, J., Jia, L., Wei, W., Lang, S., Shao, P. ve Fan, X. (2016). Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Edible Oil by Gel Permeation Chromatography and Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled

with Diode Array Detector and Fluorescence Detector. *Acta Chromatographica*, 415-427.

19. Meyer, V. R., (2000). *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. Third Edition, John Wiley&Sons Ltd, England.
20. Holler F.J, SkoogD.A., ve Crouch, Enstrümental Analiz İlkeleri, Kılıç E., Yılmaz, H Çeviri Editörleri, Altıncı Baskı, Bilim Yayıncılık Ankara, 2015.
21. Aydın, İ. (2016). Deksketoprofen Trometamol Ve Diklofenak Sodyum'un İnsan Plazmasında Dad Dedektörlü Hplc İle Eşzamanlı Tayini. (Doktora Tezi), Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı, Kayseri.
22. Şanlı, S. (2009). Makrolid Kalıntılarının Sütte Analizi İçin Sıvı Kromatografik Yöntemin Optimizasyonu. (Doktora Tezi), Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Ad Soyad : Nergiz GÜLER
Uyruğu : T.C
Doğum Yeri : İZMİR
Doğum Tarihi : 07.04.1991
Medeni Durumu : Evli
Mail Adresi : nergizdal@gmail.com



EĞİTİM DURUMU

2005-2009 : Çimentaş Lisesi
2009-2013 : Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü
2014-2020 : Celal Bayar Üniversitesi Kimya Bölümü Analitik Kimya
Yüksek Lisans Öğrencisi