

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI GIDA MADDELERİ VE BİTKİSEL YAĞLARDA
POLİAROMATİK HİDROKARBONLARIN (PAH) ANALİZLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Cevat İDELİ

Anabilim dalı: Kimya

Programı: Analitik Kimya

Manisa- 2007

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI GIDA MADDELERİ VE BİTKİSEL YAĞLARDA
POLİAROMATİK HİDROKARBONLARIN (PAH) ANALİZLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Cevat İDELİ

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 18.01.2007

Tezin Savunulduğu Tarih : 05.02.2007

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Kenan DOST (C.B.Ü)

Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Ali ÇELİK (C.B.Ü)

Doç. Dr. Kadriye ERTEKİN (D.E.Ü)

Manisa–2007

İÇİNDEKİLER	I
SEMBOL LİSTESİ	III
ŞEKİL LİSTESİ	IV
TABLO LİSTESİ	VI
KISALTMALAR	VII
TEŞEKKÜR	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
GİRİŞ	1
1. POLİ (ÇOK HALKALI) AROMATİK HİDROKARBONLAR (PAH)	1
1.1. Bulunduğu yerler	2
1.2. Kaynaklar ve ortaya çıkışları	3
1.3. Yasal limitleri	5
2. AROMATİK HİDROKARBONLAR VE KANSER	6
2.1. Poliaromatik Hidrokarbonların analiz teknikleri	7
3.YÜKSEK-PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ	8
3.1. HPLC'nin kapsamı	8
3.2.Sıvı kromatografide kolon verimliliği	9
3.2.1. Dolgu maddesi tanecik boyutunun etkileri	9
3.2.2. Sıvı kromatografide kolon-dışı bant genişlemesi	10
3.3. Sıvı kromatografi cihazları	10
3.3.1. Hareketli faz hazneleri ve çözücü muamele sistemleri	10
3.3.2. Pompalama sistemleri	12
3.3.2.1.Pistonlu pompalar	12
3.3.2.2. Sürgülü pompalar	12
3.3.2.3. Pnömatik pompalar	13
3.3.3. Numune enjeksiyon sistemleri	13
3.3.4. Sıvı kromatografi kolonları	14
3.3.4.1. Analitik kolonlar	14
3.3.5. Kolon dolgu maddelerinin tipleri	14
3.3.5.1. Bağlı – faz dolgu maddeleri	15
3.3.5.2. Normal – faz ve ters – faz dolgu maddeleri	15
3.3.5.2.1.Normal-Faz Dağılma Kromatografisi	16
3.3.5.2.2. Ters-faz dağılma kromatografisi	16

3.3.6. Dedektörler	16
3.3.6.1. Dedektör tipleri	17
3.4. Kromatografinin uygulamaları	17
3.4.1. Kalitatif analiz	17
3.4.2. Kantitatif analiz	18
3.4.2.1. Pik yüksekliğine dayalı analizler	18
3.4.2.2. Pik alanına dayalı analizler	18
3.4.2.3. Kalibrasyon ve standartlar	19
3.4.2.4. İç standart yöntemi	19
4. MATERYAL VE METOT	20
4.1. Cihaz	20
4.2. Kullanılan kimyasallar	20
4.3. Çözeltilerin hazırlanması	20
4.4. Materyal	21
4.5. Deney uygulamaları	21
4.5.1. Poliaromatik Hidrokarbonların HPLC metodu ile tayini	21
4.6. Örneklerin ekstraksiyonu	22
4.6.1. Yağ örneklerinin ekstraksonu	22
4.6.1.1. Aromatik fraksiyonun kolon ile temizlenmesi (f2)	22
4.6.2. Et, balık ve kömür örneklerinin ekstraksiyonu	23
4.6.2.1. Örneklerin kolon ile temizlenmesi	23
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	24
5.1. Standartların analizleri	24
5.1.1. Doğruluk ve tekrarlanabilirlik	26
5.1.2. Geri kazanım çalışması	30
5.1.2.1. Sıvı yağ örnekleri ile yapılan geri kazanım çalışması	30
5.1.2.1.1. İki ortalamanın istatistiksel değerlendirmesi	31
5.1.2.2. Et, balık ve kömür örnekleri ile yapılan geri kazanım çalışması	34
5.2. Örneklerin analizleri	37
5.2.1. Yağ örneklerinin analizleri	37
5.2.2. Et, balık ve kömür örneklerinin analizleri	40
6. SONUÇ	50
KAYNAKLAR	52

SEMBOL LİSTESİ

ACN	: Asetonitril
C18	: Oktildesilsilan
C_M	: Hareketli fazdaki analit derişimi
D_M	: Hareketli fazda difüzyon katsayısı
d_p	: Dolgu parçacık çapı
F1	: Birinci Fraksiyon
F2	: İkinci Fraksiyon
F3	: Üçüncü Fraksiyon
t_r	: Alıkonulma süresi
UV	: Ultraviyole
X_i	: Birinci Ölçüm
\bar{X}	: Ortalama ölçüm (Konsantrasyon)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil	Sayfa
3.1. Sıvı Kromatografinin Uygulamaları	9
3.2. Tabaka yüksekliğine dolgu maddesinin tanecik boyutunun ve akış hızının etkisi	9
3.3. Bir HPLC cihazının şeması	11
3.4. Sıvı kromatografide enjektör sisteminin çalışma prensibi	13
3.5. Kolon Dolgu Maddesinin Yapısı	15
4.1. HPLC Cihazı	20
4.2. Tayin edilen poliaromatik hidrokarbonların kimyasal yapıları	21
5.1 Standart PAH'lara ait HPLC-UV-Vis Kromatogramı	24
5.2. Standart PAH 'ların kalibrasyon eğrileri	25
5.3. Optimum koşullarda PAH standartlarının (A) ve mısır yağı (B) örneğine ait HPLC kromatogramlarının üst üste karşılaştırılması	37
5.4. Optimum Koşullarda PAH standartları (A) ve Ayçiçeği yağı (B)Örneğine Ait HPLC Kromatogramlarının üst üste Çakıştırılması	38
5.5. Optimum Koşullarda PAH Standartlarının (A) ve Zeytin Yağı (B) Örneğine Ait HPLC kromatogramlarının üst üste karşılaştırılması	39
5.6. Optimum Koşullarda Standart PAH'ların (A) ve Pişirilmemiş Alabalık Eti (B) Örneğine Ait HPLC Kromatogramlarının Üst Üste Çakıştırılması	41
5.7. Optimum Koşullarda Standart PAH'ların (A) ve Izgara Alabalık (B) Örneğine Ait HPLC kromatogramlarının üst üste karşılaştırılması	42
5.8. Optimum koşullarda ızgara alabalık (A) ve pişmemiş alabalık örneğine Ait(B) HPLC kromatogramlarının üst üste karşılaştırılması	42
5.9. Optimum Koşullarda Standart PAH (A) ve Pişmemiş Levrek (B) Örneğine Ait HPLC kromatogramlarının üst üste karşılaştırılması	43
5.10. Optimum Koşullarda Standart PAH (A) ve Izgara Levrek (B)Örneğine Ait HPLC kromatogramlarının üst üste karşılaştırılması.	44
5.11. Optimum koşullarda ızgara levrek (A) ve pişmemiş levrek örneğine ait HPLC kromatogramlarının üst üste karşılaştırılması	45
5.12. Optimum Koşullarda Standart PAH (A) ve Pişmemiş Et (B) Örneğine Ait HPLC kromatogramlarının üst üste karşılaştırılması	45
5.13. Optimum Koşullarda Standart PAH (A) ve Izgara Et (B) Örneğine Ait HPLC kromatogramlarının üst üste karşılaştırılması	46

5.14. Optimum koşullarda ızgara et (A) ve (B) pişirilmemiş et örneklerine Ait HPLC kromatogramlarının st üste akıştırılması	47
5.15. Optimum Koşullarda Standart PAH (A) ve Odun Kömürü (B) rneğine ait HPLC kromatogramlarının st üste akıştırılması	47

TABLO LİSTESİ

Tablo	Sayfa
1.1. İnsanlar için genotoksik ve kanserojenik ihtimali olan poliaromatik hidrokarbonlar	2
5.1. Standart PAH'ların ortalama pik alanları	25
5.2. Standart PAH'lara ait gerçek alıkonma zamanı, standart sapma ve bağıl alıkonma zamanları	26
5.3. Yöntemin doğruluğuna ilişkin veriler	27
5.4. Yöntemin tekrarlanabilirliğine ilişkin veriler	29
5.5. PAH'ların tanımlama sınırları	29
5.6. Sıvı yağ örneğine ait geri kazanım çalışması	30
5.7. Sıvı yağ örneklerinde standart PAH'lara ait bazı istatistik bilgileri	32
5.8. Sıvı yağ örneklerinde standart PAH'lara ait yüzde (%) geri kazanım değerleri	33
5.9. Sıvı yağlarda geri kazanım çalışmasında F1 ve F3 fraksiyonuna geçen ortalama madde miktarları	33
5.10. Alabalık örneğine ait geri kazanım çalışması	34
5.11. Alabalık örneğinde standart PAH'lara ait bazı istatistik bilgileri	35
5.12. Alabalık örneğinde standart PAH'a ait yüzde (%) geri kazanım değerleri	36
5.13. Yağ örneklerinde bulunan madde miktarları	39
5.14. Mısır yağına ait F1 ve F3 fraksiyonuna geçen ortalama madde miktarları	40
5.15. Balık, et ve kömür örneklerindeki madde miktarları	49

KISALTMALAR

atm	: Atmosfer
B.H	: Bağıl Hata
cm	: Santimetre
Dak	: Dakika
DD	: Deneysel Değer
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EPA	: Amerika Çevre Koruma Merkezi
GC	: Gaz Kromatografisi
GD	: Gerçek Değer
g	: Gram
HPLC	: Yüksek Performanslı sıvı kromatografisi
IARC	: Uluslar Arası Kanser Araştırma Merkezi
Kg	: Kilogram
Kons	: konsantrasyon
L	: litre
mL	: Mililitre
NaOH	: Sodyum hidroksit
Ort	: Ortalama
PAH	: Poliaromatik Hidrokarbon
ppb	: Milyarda bir kısım
ppm	: Milyonda bir kısım
RRT	: Bağıl Alıkonma Zamanı
RSD	: Bağıl Standart Sapma
$S_{\text{Birleşik}}$: Birleşik Standart Sapma
SD	: Standart Sapma
UV-VIS	: Ultraviyole Görünür Bölge Spektrofotometresi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
μm	: Mikrometre
μL	: Mikrolitre
μg	: Mikrogram

TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca benden manevi desteğini esirgemeyen, karşılaştığım bütün problemlerle tek tek ilgilenen, değerli bilgi ve yorumları ile bana yol gösteren, bilgilerini her durumda benimle paylaşan, saygıdeğer danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Kenan DOST'a, bilgi ve tecrübeleriyle bizlere her zaman destek olan hocam sayın Prof. Dr. Ali ÇELİK'e ayrıca çalışmam süresince bana bilgileri ile destek veren ve malzeme temininde her zaman yardımcı olan değerli hocalarım sayın Dr. Mustafa ESKİCİ ve Yrd. Doç.Dr. M.Sabih ÖZER'e, malzeme konusunda destek ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Araş. Gör. Emriye AY'a ve destek olan bütün arkadaşlarıma teőekkürlerimi bir borç bilirim.

Tüm eğitim - öğretim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, beni bu günlere getiren, maddi ve manevi her türlü desteğini eksik etmeyen aileme sonsuz teőekkürler.

Cevat İDELİ

5 Őubat 2007

ÖZET

Gıda maddelerinde ve sıvı yağlardaki poliaromatik hidrokarbonlar insan sağlığı bakımından oldukça önemlidir. Bu çalışmada, bazı gıda maddelerinde ve bitkisel yağlar ile odun kömürü örneklerinde dokuz farklı poliaromatik hidrokarbonun (PAH) yan yana tayini için yeni bir HPLC – UV-Vis yöntemi araştırılmış ve PAH'ların bu tür örneklerde miktarları belirlenmiştir. Bu yöntemde öncelikle tayinleri hedeflenen PAH için optimum koşullar araştırılmıştır. Bitkisel yağların analizleri ekstraksiyon ve kolon ile temizleme işlemlerinden sonra doğrudan sisteme enjekte edilerek gerçekleştirilmiştir. Et ve balık örneklerinde ise örnekler iki farklı şekilde analiz elde edilmiştir. İlk olarak örnekler odun kömürü ile ızgara yapıldıktan sonra ekstrakt edilmiş ve kolon ile temizlendikten sonra HPLC – UV-Vis yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu sayede odun kömürü dumanından gıda maddelerine geçebilecek PAH miktarlarının tayini amaçlanmıştır. Ayrıca odun kömürü örnekleri et ve balık örneklerinde olduğu gibi ekstrakt edilmiştir. Yöntemin tekrarlanabilirliği dokuz farklı PAH için % 0,16 ile % 1,60 (RSD) arasında ve doğruluğun % 0,19 ile % 7.40 (bağıl hata) arasında olduğu hesaplanmıştır. Tanımlama sınırı ise dokuz farklı PAH için 1 ppb – 10 ppb, olarak hesaplanmıştır. Optimizasyon çalışmalarından sonra metot gerçek örneklere uygulanmıştır. Örneklerin analizleri için çeşitli marka bitkisel sıvı yağlar, et ve balık gibi gıda maddeleri ile odun kömürü örnekleri marketlerden alınmış ve PAH'ların tayinleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar analiz edilen örneklerde ki poliaromatik hidrokarbonların kabul edilen limit değerlerin üzerinde olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: HPLC, PAH, yağlar, balık

ABSTRACT

Polyaromatic hydrocarbons in food stuff and vegetables oils are very important for human health since they are classified as carcinogenic organic compounds. The theses, describes the investigate and determination of nine different polyaromatic hydrocarbons in some food stuff, vegetable oils and charcoal by HPLC – UV-Vis method. Initially, the optimum conditions for the determination of polyaromatic hydrocarbons are studied. Analyses of vegetable oils were directly injected to the chromatographic system after extraction and column chromatography. Meat and fish samples were analysed in two different ways. First the raw meat and fish samples were extracted then analysed following column chromatography. Second the raw samples were barbequed with charcoal then extracted and then analysed by the HPLC – UV-Vis method following column chromatography. Here, the aim was to determine the amount of polyaromatic hydrocarbons which pass from the charcoal smoke to meat or fish during the barbeque. Charcoal was also extracted and analysis of the nine polyaromatic hydrocarbons were calculated as between % 0.16–1.60 in relative standart deviation and % 0.19–7.40 in relative error respectively. Detection limits were calculated in the range of 1–10 ppb for nine polyaromatic hydrocarbons. Subsequent to optimisation study, real samples purchased from supermarkets were analysed. The results showed that all samples have polyaromatic hydrocarbons higher than the accepted limit values.

Key Words: HPLC, PAH, vegetable oil, fish

GİRİŞ

1. POLİ (ÇOK HALKALI) AROMATİK HİDROKARBONLAR (PAH)

İki ya da daha fazla benzen halkasının birleşmesiyle meydana gelen bileşikler poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) olarak adlandırılırlar. Bunlardan iki halkalı olanı naftalin, üç halkalı olanları antrasen, fenantren ve halka sayısı daha fazla olan poliaromatik hidrokarbonlar da kendilerine özgü adlarla ifade edilirler [1,2]. PAH'ların, hidrokarbonların yüksek sıcaklıkta pirolizi sonucunda oluştuğu uzun süreden beri bilinmektedir [1,3,4,5,6]. Ayrıca yakın zamanlarda ortaya konan bulgular PAH'ların bakteri ve bitkilerce de oluşturulabildiğini göstermektedir [4].

Poliaromatik hidrokarbonlar, bilinen bütün çevresel olaylardaki başlıca organik kirleticilerdendir ve geniş bir çevreye dağılmış olmalarından dolayı oldukça önemlidirler [4,6,8]. Bu bileşiklerin fazlalığı çevresel kaygılara neden olmaktadır [9]. Poliaromatik hidrokarbonların esas kaynakları yanmanın tam olmaması, eksoz gazları, organik maddelerin diagenetik prosesleri, orman yangınları ve mikrobiyolojik sentezler ya da dönüşümlerdir [6,8]. Yani bu bileşikler hem bazı doğal olaylar sonucunda hemde antropojenik prosesler sonucunda oluşmaktadır [6,10].

Doğada yüzden fazla PAH olmasına rağmen, Gıda Bilimleri Komitesi, Amerika Araştırma Merkezi ve Avrupa Birliği'nin yaptığı araştırmalarda bunların on beş tanesinin mutogenetik/genotoksik ve kanserojenik özellikte olduğunu kanıtlamıştır (Tablo 1.1). Bu nedenle Uluslar arası Kanser Araştırma Merkezi ve Amerikan Çevre Araştırma Merkezleri tarafından bu maddeler kanserojen ve çevre kirleticisi olarak kabul edilmiştir [6,8,10,11,12].

Poliaromatik hidrokarbonların molekül ağırlıkları geniş bir aralıkta bulunur ve kanserojenik etkileri buna bağlı olarak değişir. Kesin olmamakla birlikte, molekül ağırlıkları 216 Da dan daha düşük olan PAH'lar kanserojenik özelliğe sahip değilken daha büyük molekül ağırlığına sahip olanlar kanserojenik özelliğe sahiptir. Molekül ağırlığı 252 Da olan benzo[a]pyrene mutajenik ve kanserojenik özellikte olduğu bilinmektedir. Bu yüzden doğal ürünlerde, tütsülenmiş gıdalarda ve odun dumanında bulunan poliaromatik hidrokarbonlardan benzo[a]pyrene'nin kansere yol açabileceği düşünülmektedir. Ayrıca benzo[a]pyrene'nin, benzo[e]pyrene adında ve benzo[a]pyrene' den daha az kanserojen olan bir izomeri de bulunmaktadır. Bu iki izomerin analitik olarak ayrılması zordur ve bu iki izomer ayrıştırılmadığından yapılan deneysel çalışmalarda sonuçlar sadece benzo[a]pyrene olarak hesaplanmaktadır [11].

Tablo 1.1

İnsanlar için Genotoksik ve Kanserojenik İhtimali Olan Poliaromatik Hidrokarbonlar (2002) [4]

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	Indeno[1,2,3-cd]pyrene
Benzo[ghi]perylene	Dibenzo[ae]pyrene	5-Methylchryzene

1.1. Bulunduğu Yerler

Poliaromatik hidrokarbonlar, hemen hemen bütün toprak çeşitlerinde bulunabilen kirleticilerdendir. Kömürün prolizinde, örneğin “gaz kok'u” fabrikasyonundaki gibi ya da kok üretim fabrikalarında oluşurlar ve buralardan çevreye atılan PAH içerikli atık maddeler, toprağa ve sedimentlere karışmakta ve buraların kirlenmesine neden olmaktadır. Ayrıca bu kirleticilerin uzun süreli desorpsiyonu sonucu kaynak suyuna da geçmektedir. Bu nedenle, bu kirleticilerin yerleşim yerlerinden mümkün olduğu kadar temizlenmesi gerekmektedir [5].

Poliaromatik hidrokarbonlar hem gıdalarda birikirler hemde çevresel kirleticiler olarak atmosferde doğrudan bulunurlar [2,3]. Bu yüzden hava, toprak ya da sular da bu maddeler tarafından etkilenmektedir ki bu çok önemlidir [13]. Poliaromatik hidrokarbonlar ile ilgili yapılan çalışmalar, birçok örnekte bu kirleticilerin bulunduğunu ortaya koymuştur. Bu örneklerden bazıları aşağıda verilmiştir.

- Toprakta (kuru ağırlıkta 40–1300 µg/kg)
- Bitkisel sıvı yağlar, margarinler ve tereyağında
- Tütsülenmiş et ve balık gibi gıda maddelerinde
- Açıkta satılan balıklarda, tereyağı gibi hayvansal kaynaklı yağlarda, sıvı yağlarda ve çeşitli gıdalarda
- Buğday, çavdar, mercimek gibi tahıllarda
- Tahıllardan üretilen gıdalarda, örneğin puding gibi tatlılarda, bisküvilerde, keklerde ve çocuk mamalarında
- Sebzelerde (kuru ağırlıkta 10–20 µg/kg)
- Kuyu (kaynak) suyu gibi içme sularında
- Deniz ve nehir suyunda
- Sigara dumanı ile odun ve kömür dumanında

- Atmosferdeki toz ve partiküllerde
- Petrol ve türevlerinde
- Polietilen kaplarda
- Taş kömürü katranında

Endüstriyel organik maddelerin, boya, ilaç, patlayıcı maddeler, sentetik polimerler v.b. maddelerin % 90'nını aromatik bileşikler oluşturur [1,4,8,10,15].

Poliaromatik hidrokarbonların çeşitli gıda maddelerinden, içme sularından ve solunum sırasında alınan havadan insanlara geçtikleri tahmin edilmektedir. Ancak yemeklik sıvı yağlar çok fazla tüketildikleri için bu tip gıdalarda bulunan PAH miktarları çok önemlidir. Çünkü yemeklik yağlardaki PAH'lar doğal kaynaklıdır ve doğrudan yağın yapısına geçmektedir. Isısal işlemlere tabii tutulmamış ve rafine edilmemiş yağlarda yapılan araştırmalarda PAH'ların var olduğu belirlenmiştir. Aynı yağlar rafine edildiğinde, ağartma ve deodorizasyon işlemlerinden sonra bu oranın azaldığı görülmüştür. Bunun nedeni ağartma basamağında kullanılan "ağartma toprağı" poliaromatik hidrokarbonların bir kısmını adsorblayarak uzaklaştırması ve deodorizasyon (koku giderme) basamağında (yüksek sıcaklık ve düşük basınç altında, su buharının da sürükleyici etkisiyle koku veren maddeleri uzaklaştırma işlemi) da yağa istenmeyen koku ve tat veren maddeler uzaklaştırılırken PAH ların bir kısmının uzaklaşmasıdır [4].

Dünya sağlık örgütünün (WHO) içme suyundaki maksimum PAH miktarlarını belirlemesi ile bu bileşiklerin izlenmesinde kullanılan analiz tekniklerine özel bir ilgi ortaya çıkmaktadır. Bundan dolayı içilebilir ve atık su arıtma işlemlerinin PAH düzeylerine olan etkileri duyarlı bir şekilde incelenmekte ve bu bileşiklerin sulu ortamlardaki muhtemel kaynaklarına da önem verilmektedir [6,7,13].

Poliaromatik hidrokarbonlar çevrede düşük konsantrasyonda bulunmalarına rağmen, organik dokulardaki birikimi dokunun lipofilik karakterine ve bozunabilme mukavemetine bağlıdır. Deniz ürünlerinde bulunan PAH lar bunun iyi bir örneğidir. Birçok su canlısında bu bileşikler fazla miktarlarda bulunmaktadır [6,8,10,].

1.2. Kaynaklar ve Ortaya Çıkışları

Son yirmi yılda bu maddelerin mutajenik ve kanserojenik olmalarının anlaşılmasından sonra gıdalardaki varlıkları dikkatle araştırılmaktadır. Organik materyallerin tam olarak yanmaması, orman yangınları, volkanik püskürtmeler ve fosil yakıtlar (kömür ve petrol) başlıca

PAH kaynaklarıdır. Ayrıca bazı gıdaların ızgara ve tütsülenmesi sonucu bu bileşiklerin oluştukları belirlenmiştir [1,13]

Poliaromatik hidrokarbonlar, organik maddelerin poliz ürünleri olarak çevremizde bol bulunan maddelerdir. PAH'ların tespit edildiği gıdalar arasında; sebzeler, bitkisel yağlar, meyveler, taneliler, deniz ürünleri, ızgaralanmış etler, tütsü et ve balık sayılabilir. PAH'lar gıda maddelerine iki yolla bulaşmaktadır.

- Bitkilerin yüzeyine çevreden adsorplanarak,
- Gıda maddelerinin ısısıl işlemleri sonucunda [13,16].

Gıda maddelerinin ısısıl işlemler sonucu yüzeylerinde farklı yollardan poliaromatik hidrokarbonlar birikebilir, genel bir sınıflama ile bunları üç grupta toplayabiliriz:

- Uygulanan yüksek sıcaklığın gıda yüzeyinde PAH oluşturması,
- Özellikle ızgara ve mangalda pişirme işlemlerinde, eriyen yağ damlacıklarının ısınan yüzeye düşmesi ve poliz sonucu PAH oluşması ve gıda maddelerinde birikmesi,
- Tütsüleme işleminde kullanılan yakıtın yanması sonucu açığa çıkan ve tütsü bileşiminde bulunan PAH ların ttslenecek üründe birikmesi.

Gıda maddelerinin tütsüleme işleminde kullanılan odunun, kısmi yanmasından meydana gelen dumanın bileşiminin aydınlatılması gerekir. Dumanın kantitatif bileşimi kullanılan odunun cinsine, sıcaklığa ve ortamın oksijen miktarına bağlıdır. 20 yıl öncesine kadar dumanda 380 civarında organik bileşik tanımlanabilmiştir. Bu bileşikler fenoller, aldehitler, ketonlar, organik asitler, alkoller, eterler, hidrokarbonlar ve çeşitli heterosiklik bileşiklerin karışımıdır [11].

Gıda maddelerinde ve bitkisel yağlarda bulunan poliaromatik hidrokarbonların kaynakları ve bunların nasıl ortaya çıktığı çok önemlidir. Çünkü PAH'ların bu tür gıda maddelerinde olması sağlık açısından zararlıdır [4]. Çeşitli gıda maddelerinde bulunan PAH lar, gıda maddelerinin retim Őekillerine göre gıdalara bulaştıkları belirlenmiştir (tütsüleme, doğrudan kurutma, pişirme, doğal kaynaklar) [13]. Tütsülenmiş ürünlerde benzo[a]anthracene, dibenzo[ah]anthracene, benzo[a]pyrene, benzo[ghi]pyrene gibi oldukça kanserojen olan bileşiklerin varlığı yapılan çalışmalar sonucunda tespit edilmiştir. Bu yüzden PAH ların tütsü bileşimi içindeki miktarının azaltılması yönünde çalışmalar önem kazanmıştır [11,13].

Evlerde ya da endüstriyel tesislerde odun-kömürü kullanımının arttığı durumlarda atmosfere çok miktarda toz, duman, partikül v.s karışmakta ve atmosferin yoğun olarak

kirlenmesine neden olmaktadır. Bu partiküller piroliz olduklarında pek çok yan ürün ile birlikte poliaromatik hidrokarbonları da oluşturmaktadır. Bu maddeler yağmur ve karın yağması gibi doğa olayları sırasında yeryüzüne inmekte ve denizlerin, göllerin, nehirlerin ve kuyu (kaynak) sularının kirlenmesine neden olmaktadır. Bu sırada yeryüzünde yaşayan bütün canlılar bu maddelerle doğrudan ya da dolaylı olarak temas etmektedirler. Ayrıca solunum sırasında insanlarda bu maddelerden etkilenmektedir [4,11].

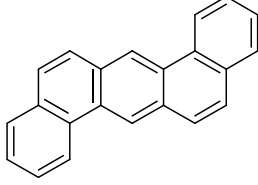
Sigara dumanında da çok miktarda kanserojenik poliaromatik hidrokarbon bulunmaktadır. Poliaromatik hidrokarbonlardan en kanserojen olanı ve sigara dumanında en çok bulunanı benzo[a]pyrene'dir. Sigara içen insanlarda dudak ve akciğer kanserinin fazla görülmesinin sebebi diğer kanserojenlerle birlikte benzo[a]pyrene'dir. Ayrıca petrol ürünlerinin kullanıldığı plastik ve boya maddesi yapımı içeren sanayiler ile yüksek sıcaklıktaki fırınların kullanıldığı tesislerde de PAH'ların meydana geldiği belirlenmiştir [1]

1.3. Yasal Limitleri

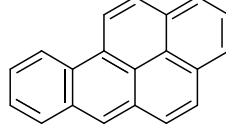
Avrupa Birliğinde, yemek yağlarında ve yemeklik yağlarında bu tip bileşikler için kabul edilebilir ortak bir yasal limit yoktur. Örneğin Almanya, Avusturya ve İsviçre de tükülenmiş gıda maddelerinde bu bileşikler için kabul edilen yasal limit 1 µg/L benzo[a]pyrene iken, İspanya da bu bileşiklerin bazıları için zeytin yağında 2 µg/L dir. Bütün bunlara rağmen "German Society for Fat Science" tarafından kabul edilen limit değer toplam PAH için 25 µg/L'dir [4].

2. AROMATİK HİDROKARBONLAR VE KANSER

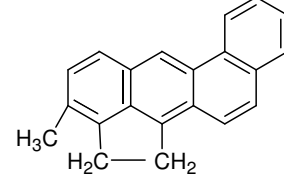
Antracene halkasına bir ya da daha çok benzen halkası bitiştirği zaman güçlü kanser yapan (kanserojen) bileşikler meydana gelir. Bunlardan bazıları aşağıda gösterilmiştir:



Dibenzo[a,h]anthracene



Benzo[a]pyrene

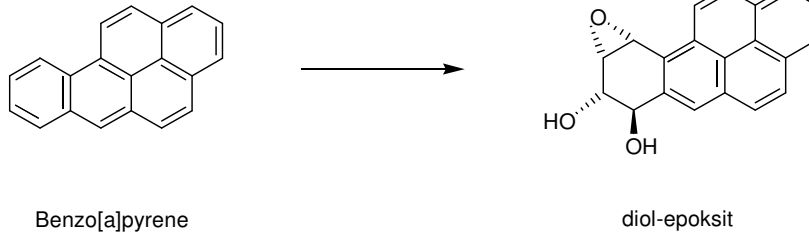


Metilkolantren

Farelerin derileri üzerine çok az miktarda bile sürülürse tümör oluşturabilirler. Bu kanserojen hidrokarbonlar sadece kömür katranında değil aynı zamanda sigara dumanında da mevcut olup, hatta mangalda et pişirirken bile oluşabilirler. Bu bileşiklerin biyolojik etkinlikleri, 1775 yılında baca temizleyicilerinde yüksek oranda görülen deri kanserinden sonra fark edilmiştir. Benzer olay sigara tiryakilerinde dudak ve akciğer kanserlerinde de görülmüştür. Taş kömürü destilasyonu ile çalışan işçilerde kanser yüzdesinin fazlalığı dikkati çekmiş ve yapılan araştırmalar sonucu taş kömüründe bulunan çok halkalı aromatik hidrokarbonların kanserojen etkili bileşikler oldukları saptanmıştır. Kanserojen etkisi olduğu anlaşılan ilk bileşikler 1,2,5,6-dibenzantrasendir (dibenzo[a,h]anthracene). 3,4-benzpiren (benzo[a]pyrene) çok güçlü kanserojendir. Kolik asit, dezoksiolik asit ve kolesterol gibi steroidlerin invitro reaksiyonlar sonucu değişimleriyle oluşan metilkolantren de çok kuvvetli bir kanserojendir [1].

Bu nedenle kanser nedeni olarak, vücuttaki steroidlerin normal metabolik değişimleriyle oluşabileceği düşünülen, metilkolantren üzerinde durulmuş, fakat yapılan bütün gayretlere rağmen ne bu steroidler invivo reaksiyonlarda metilkolantrene dönüştürülebilmiş; ne de kanserli dokulardan metilkolantren elde edilebilmiştir. Sözü geçen bu kanserojen bileşiklerin hepsinde de phenanthrene halka sisteminin bulunuşu oldukça ilginçtir. Yukarıda yapıları gösterilmiş olan bu kanserojen bileşiklerin, halkalarında azot veya kükürt içeren türevleri de kanserojendir.

Kanserojenlerin, kansere nasıl yol açtığı bugün dahi iyi anlaşılamamıştır. Vücut, hidrokarbonları elemine etmek için, onları yükseltgen ve suda çözünebilir hale getirir ve onları bu şekilde vücuttan atar. Burada oluşan metabolik yükseltgenme ürünlerinin kansere neden olduğu belirlenmiştir. Örnek olarak bu tip en önemli kanserojenlerden birisi benzo[a]pyrene'dir. Enzimlerle yükseltgenme, aşağıda gösterildiği gibi benzo[a]pyrene'i diol-epoksite dönüştürür [1].



Diol-epoksit hücresel DNA ile tepkimeye girerek, hücrelerin normal olarak yeniden üremesini önleyen mutasyonlara sebep olur.

2.1. Poliaromatik Hidrokarbonların Analiz Teknikleri

Poliaromatik hidrokarbonlar, günümüzde hemen hemen her yerde karşımıza çıkmaktadır. Bu yüzden bu kirleticilerin uygun analiz yöntemleri ile tayin edilmesi ve çevremizden mümkün olduğunca uzaklaştırılması için önlemler alınması gerekir.

Bu bileşiklerin analiz edilmeleri için ilk olarak solvent ekstraksiyonu yapılması, elde edilen ekstraktın temizlenmesi ve konsantre edilmesi gerekir [6]. Örneklerin saflaştırılması ve özellikle ekstraksiyonları bu organik kirleticilerin analizlerinde en kritik basamaktır. Çünkü bu basamaklardaki kayıplar kantitatif hatalara neden olmaktadır [12]. Örneklerin saflaştırılması ve tanımlanmasındaki duyarlılık geliştirilen metoda bağlıdır. Ayrıca bu metodun yüksek doğruluğu ya da eser analiz sonuçlarının güvenilirliği için birkaç teknik tarafından da doğrulanabilir olması gerekir [13].

PAH'ların tayinleri için çeşitli metotlar geliştirilmiştir. Bu metotlar;

- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) – Fotometrik Dedektör (UV - Vis),
- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) – Flourimetrik Dedektör (FL),
- Gaz Kromatografi (GC) – Alev İyonlaşma Detektörü (FID),
- Miseller Elektro kinetik Kapiler Kromatografi – Ultraviyole Detektörü (UV)'dir [14].

Biyolojik örneklerdeki PAH'ların analizinde GC-MS de kullanılmaktadır. Ayrıca hem GC ve hemde HPLC tek başlarına bu tür maddelerin tayinlerinde kullanılabilir [13].

PAH'ların tanımlama sınırının genellikle kilogram başına mikrogram olduğu saptanmıştır. Bu metotların tanımlama yöntemleri spesifik ve kompleks karışımların analizlerinde pozitif ya da negatif hata verebilirler [14].

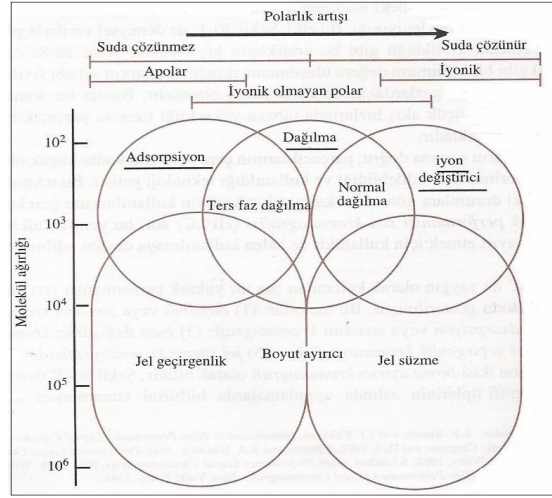
3. YÜKSEK-PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ

Sıvı kromatografisinin geliştiği ilk yıllarda, kolon veriminin, dolguda kullanılan taneciklerin boyutunun küçültülmesi ile önemli ölçüde artacağı fark edildi. Ancak, tanecik çapı 3-10 µm kadar küçük olan dolgu maddelerinin üretim teknolojisinin gelişmesi ve kullanılması 1960'lı yılların son dönemlerine kadar başarısız oldu. Bu teknoloji, klasik yer çekimi-akışlı sıvı kromatografisinin basit cam kolonlardaki durumunun aksine, yüksek basınçta çalışan, gelişmiş cihazlara ihtiyaç göstermektedir. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) ismi, preparatif amaçla halen kullanılan temel yöntemlerden, daha yeni işlemleri ayırt etmek için kullanılmaktadır [17,18,19].

3.1. HPLC'NİN KAPSAMI

Yüksek performanslı sıvı kromatografi analitik teknikler arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri, duyarlılığı, doğruluğu, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozulabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve hepsinden de önemlisi sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu gibi maddelere örnek olarak; amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal-organik türler ve çeşitli inorganik bileşikler sayılabilir [17,18,21].

Şekil 3.1., sıvı kromatografisi işlemlerinin, uygulama alanları bakımından birbirini tamamlama eğiliminde olduğunu göstermektedir. Örneğin, mol kütlesi 10000'den daha büyük maddeler için, her ne kadar şimdilerde bu gibi maddeleri ters-faz dağılma kromatografisi ile de incelemek mümkün ise de, eleme kromatografisi daha çok kullanılır. Daha küçük mol kütleli iyonik türler için, iyon değiştirme kromatografisi yaygın bir şekilde kullanılır. Küçük, polar, ancak iyonik olmayan türler, en iyi dağılma yöntemleri ile incelenebilir. Ayrıca, bu işlem, homolog serilerin ayrılması için çoğu zaman kullanışlıdır. Adsorbsiyon kromatografisi çoğu zaman, polar olmayan türlerin, yapısal izomerlerin ayrılması ve alifatik hidrokarbonlar gibi bileşik sınıflarının alifatik alkollerden ayrılması için seçilir [17,18].

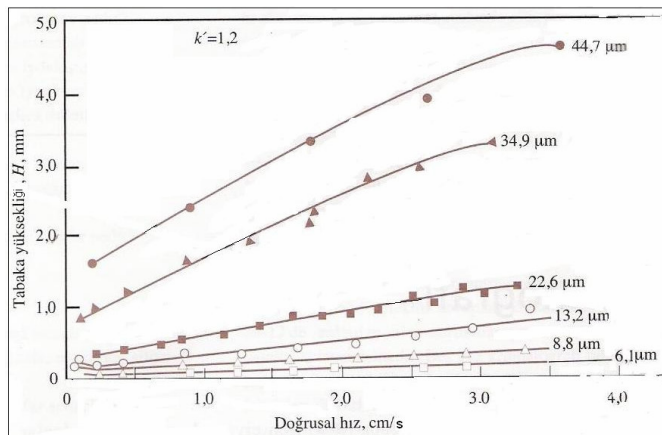


Şekil 3.1. Sıvı Kromatografinin Uygulamaları

3.2. SIVI KROMATOGRAFİDE KOLON VERİMLİLİĞİ

3.2.1. Dolgu Maddesi Tanecik Boyutunun Etkileri

Hareketli faz kütle-kütle aktarım katsayılarının incelenmesi, Van Deemter eşitliğindeki C_M 'nin dolguda kullanılan taneciklerin çapının (d_p) karesi ile doğru orantılı olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, HPLC kolonunun verimliliği, tanecik boyutu azaldığında çarpıcı bir biçimde artmalıdır. Şekil 3.2., tanecik boyutunun $45 \mu\text{m}$ 'den $6 \mu\text{m}$ 'ye düşmesiyle tabaka yüksekliğinin on kat veya daha fazla azaldığını gösteriyor ki, bu, söylenenin deneysel bir kanıtıdır. Bu şekildeki eğrilerin hiç birinde Van Deemter eşitliğinde beklenen minimumlar yoktur. Aslında bu gibi minimumlar, sıvı kromatografide genellikle, bir çok pratik uygulamalar için ancak çok düşük akış hızlarında gözlemlenebilir [17,18,22].



Şekil 3.2. Tabaka yüksekliğine dolgu maddesinin tanecik boyutunun ve akış hızının etkisi

3.2.2. Sıvı Kromatografide Kolon-Dışı Bant Genişlemesi

Sıvı kromatografide, kolon dolgusunun dış kısmında bazen önemli bant genişlemesi meydana gelmektedir. Kolon dışı bant genişlemesi olarak adlandırılan bu olay, çözülmüş maddenin, enjeksiyon sisteminde bulunan açık borularda, dedektör bölgesinde ve sistemin farklı parçalarını birbirine bağlayan boru bağlantılarında akışı sırasında meydana gelir. Buralarda, borunun merkezindeki ve çeperine yakın bölgedeki sıvı tabakalarının akış hızları arasında farktan dolayı genişleme olur. Sonuç olarak, çözünen maddenin oluşturduğu bandın merkezi, dış kısmından daha hızlı hareket eder. Gaz kromatografide, kolon dışı genişleme difüzyonla büyük ölçüde dengelenir. Ancak, sıvılardaki difüzyon önemli ölçüde yavaştır ve bu tip bant genişlemesi çoğu zaman önemsenecek duruma gelir.

Toplam tabaka yüksekliğine kolon dışı etkilerin katkısı ($H_{dış}$) aşağıda verilen eşitlikle gösterilmiştir:

$$H_{dış} = \frac{\pi r^2 \cdot \mu}{24 \cdot D_M} \quad (3.1)$$

Burada μ ; doğrusal akış hızı, cm/s; r ; borunun yarıçapı, cm ve D_M ; çözünen maddenin hareketli fazdaki difüzyon katsayısı, cm^2/s 'dir.

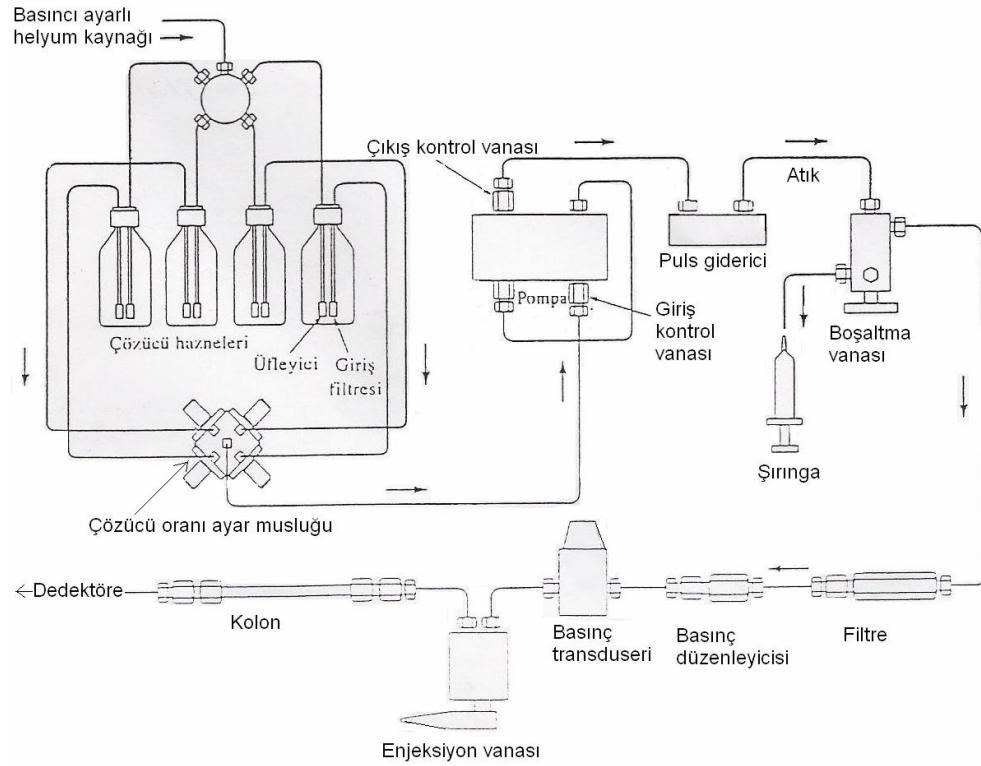
Küçük çaplı kolonlar kullanıldığında kolon dışı genişleme oldukça ciddi boyutlara ulaşabilir. Burada, kolon bağlantılarının yarıçapını 0,25 mm'nin altına düşürmek için her türlü gayret gösterilmelidir [17,18,22].

3.3. SIVI KROMATOGRAFİ CİHAZLARI

Modern sıvı kromatografi sistemlerinde genel olarak kullanılan ve tanecik boyutu 2 ile 10 μm arasında olan dolgu maddeleri ile uygun sıvı akış hızları elde edebilmek için, yüzlerce atm'lik pompa basınçlarına gerek vardır. Bu yüksek basınçların bir sonucu olarak HPLC için gerekli donanım, diğer tip kromatografi sistemleri dikkate alındığında, daha ince işçilik gerektirir ve sonuçta daha pahalıdır. Şekil 3.3., tipik bir yüksek performanslı sıvı kromatografinin önemli parçalarını şematik olarak göstermektedir [17,18].

3.3.1. Hareketli Faz Kapları ve Çözücü Muamele Sistemleri

Modern bir HPLC cihazı, bir veya daha fazla, her biri 200-1000 mL çözücü içeren camdan veya çelikten yapılmış hazne içermektedir. Bu hazneler çoğu zaman, kolonda ve



Şekil 3.3. Bir HPLC cihazının şeması

dedektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözülmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır. Bu gaz kabarcıkları bant genişlemesine, ayrıca, çoğu zaman detektörün performansında bozucu etkilere sebep olurlar. Gaz giderme düzeneği, vakum pompası sistemi, damıtma sistemi ve çözücüü ısıtıp karıştıran bir parçadan oluşacağı gibi, Şekil 3.3'teki gibi düşük çözünürlükteki inert bir gazın küçük kabarcıkları yardımıyla, çözülmüş gazları sürükleyen basit bir üfleyici de olabilir. Çoğunlukla bu sistemler, çözücü içinde bulunabilecek toz ve partikül halindeki maddelerin pompaya veya enjeksiyon sistemine zarar vermemesi veya kolonu tıkamaması için, toz ve partikül maddeleri süzmeye yarayan bir süzme düzeneği de içerirler. Gaz gidericilerin ve süzme düzeneğinin, Şekil 3.3'de görüldüğü gibi, HPLC sisteminin ana parçası olması gerekli değildir.

Sabit bileşimdeki tek bir çözücü kullanılarak yapılan bir ayırma izokratik elüsyon olarak adlandırılır. Sıklıkla, ayırma etkinliği gradient elüsyonu ile büyük ölçüde artırılır. Burada polariteleri önemli derecede birbirinden farklı, iki veya üç çözücü sistemi kullanılır. Elüsyon başladıktan sonra, belli bir programa göre, bazen sürekli olarak ve bazen de bir seri basamaklar halinde, çözücülerin oranı değiştirilir. Modern HPLC ekipmanları çoğu zaman, çözücülerin

hacimsel oranı zamanla doğrusal olarak veya üstel olarak değiştirilebilecek şekilde, iki veya daha fazla hazneden aldığı çözümleri bir karıştırma odasında sürekli olarak değişen hızlarda bir araya getiren sistemlerle donatılmıştır [17,18,22].

3.3.2. Pompalama Sistemleri

Bir HPLC pompalama sistemi için gerekli şartlar oldukça sıkıdır ve şunları içermektedir: (1) 6000 psi kadar basınç üretimi, (2) puls içermeyen basınç çıkışı, (3) 0,1–10 ml/dakika aralığında akış hızları, (4) %0,5 veya daha iyi bir bağıl tekrarlanabilirlikle akış kontrolü, (5) korozyona dayanıklı parçalar (paslanmaz çelik veya teflondan yapılmış sızdırmazlık). Sıvılar çok fazla sıkıştırılmadığından dolayı HPLC pompaları tarafından üretilen basıncın bir patlama tehlikesi oluşturmamasına da dikkat edilmelidir. Böylece, sistemin parçalarından herhangi birisinde meydana gelebilecek bir çatlak, sadece çözümlerin dışarı sızması ile sonuçlanacaktır. Tabii ki bu gibi kaçaklar bir yangın tehlikesi oluşturabilir.

Her birinin kendine göre üstünlük ve sakıncaları bulunan üç tip pompa vardır. Bunlar; pistonlu pompalar, şırınga veya sürgülü pompalar ve pnömomatik veya sabit basınç pompalarıdır.

3.3.2.1.Pistonlu Pompalar

Ticari olarak satılan HPLC sistemlerinin yaklaşık %90'ında kullanılan pistonlu pompalar, genellikle motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözümlerin pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmiştir. Sırasıyla açılıp kapanan iki tane küresel kontrol musluğu, çözümlerin silindir içine giriş ve çıkış akışını kontrol eder. Çözüm piston ile doğrudan temas etmektedir. Bir alternatif olarak, basınç, gidip-gelen pistonla hidrolik olarak kumanda edilen esnek bir diyafram yardımıyla çözümlere iletilebilir. Pulsu akış, kromatogramın zemin çizgisinde gürültü sinyali olarak kendini açıkça belli ettiği için, puls giderici bir sistemle puls giderilir. Pistonlu pompaların üstünlüğü; küçük iç hacimleri (35–400 µl) , yüksek çıkış basıncı (10000 psi'ye kadar) , gradiyent elüsyona uyarlanmaya hazır oluşları ve kolon geri basıncından ve çözümlerin viskozitesinden büyük ölçüde bağımsız olan sabit akış hızlarıdır [17,18,22].

3.3.2.2.Sürgülü Pompalar

Sürgülü pompalar, bir kademeli motordan güç alan vidalı güdüm mekanizması ile kumanda edilen sızdırmaz bir sürgüsü olan, şırınga benzeri silindirik bir kaptan ibarettir. Sürgülü pompalar da viskoziteden ve geri basınçtan bağımsız bir akış üretirler ve çıkış akışı pulssuzdur.

Sakıncaları; sınırlı çözücü kapasitesi (≈ 250 ml) ve çözücü değiştirilmesi gerektiğinde karşılaşılan güçlüklerdir.

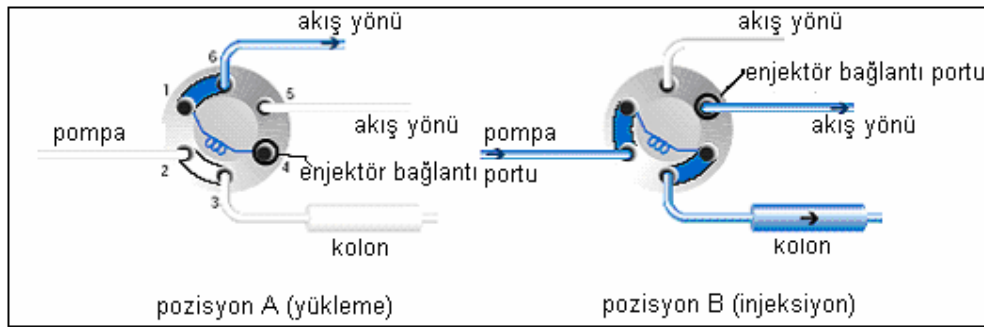
3.3.2.3. Pnömatik Pompalar

En basit pnömatik pompalarda, sıvı hareketli, sıkıştırılmış bir gaz ile basınçlandırılabilen bir kap içine yerleştirilmiş, portatif bir kap içine konur. Bu tip pompalar, pahalı değildir ve pulssuzdur, ancak kapasitesi sınırlı olup çıkış basıncı düşüktür ve çıkış hızı çözücü viskozitesine ve kolon geri basıncına bağlıdır. Ayrıca bunlar, gradiyent elüsyona uygun değildir ve basınçları genelde 135 atm'den daha düşüktür.

3.3.3. Numune Enjeksiyon Sistemleri

Sıvı kromatografik ölçmelerin kesinliğini belirleyici faktörlerde biri, numunenin kolon dolgu maddesine aktarımının tekrarlanabilirliğidir. Aşırı numune yüklenmiş kolonlarda görülen bant genişlemesi de kesinliği etkiler. Bu yüzden, kullanılan hacim, mikrolitrenin birkaç ondalığından belki 20 μ l'ye kadar oldukça küçük olmalı ve sistemin basıncını düşürmeksizin numunenin sisteme girişinin sağlanması gerekmektedir.

Sıvı kromatografide numune vermek için en yaygın kullanılan yöntem, Şekil 3.4 de görüldüğü gibi, numune giriş sarımlarının kullanılması esasına dayanmaktadır. Birçok sıvı kromatografi cihazının ayrılmaz bir parçası olan bu sarımlar, değiştirilebilir nitelikte olup 5 μ l'den 500 μ l'ye kadar değişen hacimlerde numune hacmi seçimine olanak tanımaktadır. Bu tipteki numune alma halkaları, numunenin 7000 psi basınca kadar, binde birkaç bağıl hata verecek kesinlikle numunenin kolona uygulanabilmesini sağlamaktadır. Hacmi 0,5–5 μ l arasında olan luplar bulunan mikro numune enjeksiyon muslukları da mevcuttur [17,18,22].



Şekil 3.4. Sıvı kromatografide enjektör sisteminin çalışma prensibi

3.3.4. Sıvı Kromatografi Kolonları

Sıvı kromatografi kolonları normal olarak düzgün iç çaplı paslanmaz çelik borulardan yapılır. Çeşitli üreticilerden, boyutları ve dolgu maddesi farklı, yüzlerce dolgu kolon temin etmek mümkündür.

3.3.4.1. Analitik Kolonlar

Sıvı kromatografi kolonlarının büyük bir çoğunluğu 10–30 cm arasındadır. Normalde kolonlar düzdür ve gerektiği yerlerde iki veya daha fazla kolonun birbirine eklenmesiyle kolonun boyu arttırılabilir. Bazen sarmal kolonlar da kullanılır, ancak bu konfigürasyonda kolon etkinliğinde bir miktar kayıp söz konusudur. Sıvı kromatografi kolonlarının iç çapı çoğu zaman 4–10 mm; yaygın olarak kullanılan birçok kolon dolgu maddesinin tanecik büyüklüğü 5–10 µm arasındadır. Günümüzde belki de en çok kullanılan kolon, 250 mm uzunluğunda, 4,6 mm iç çapında ve 5 µm tanecik büyüklüğüne sahip dolgu maddesi doldurulmuş kolondur. Bu tip kolonlar 40000–60000 tabaka/metre içerirler.

Son yıllarda, üreticiler tarif edilen kolonun boyutlarından daha küçük boyutlarda, yüksek hızlı ve yüksek performanslı kolonlar üretmektedirler. Bu gibi kolonların iç çapı 1–4,6 mm ve 3,5 µm tanecik büyüklüğündeki dolgu maddesi ile doldurulmuş olabilir. Çoğu zaman bunların boyu 3–7,5 cm kadar kısadır. Bu gibi kolonlar 100000 tabaka/m içerirler ve hız, minimum çözücü sarfiyatı avantajları vardır. Son özellik oldukça önemlidir, çünkü sıvı kromatografi için gerekli olan yüksek saflıktaki çözücüler, temin edilmesi ve daha sonra atılması oldukça pahalıya mal olan çözücülerdir [18,22].

3.3.5. Kolon Dolgu Maddelerinin Tipleri

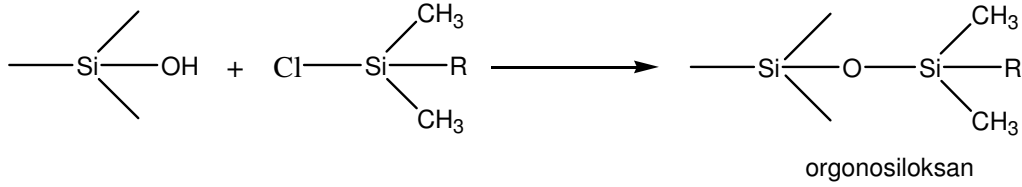
Sıvı kromatografide temel olarak iki tip kolon dolgu maddesi kullanılmaktadır. Bunlar, Film Dolgular ve Gözenekli Dolgulardır. Bunlardan birincisi, küresel, gözeneksiz, çapları 30–40 µm olan cam veya polimer tanelerinden oluşur. Bu tanelerin yüzeyine, silis, alumina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden oluşan ince gözenekli bir film kaplanır. Bazı uygulamalar için, bu yüzeye, absorpsiyon ile yüzeye tutunan uygun bir sıvı, durgun faz olarak ilave bir katman halinde kaplanır. Alternatif olarak, organik bir yüzey katman oluşturmak üzere kimyasal işleme tabi tutulabilir.

Sıvı kromatografide kullanılan gözenekli partiküller, çapları 3–10 µm arasında olan gözenekli partiküllerdir. Belli boyuttaki bir partikül için, partikül boyutu aralığını en aza indirmek

için, her türlü gayret sarfedebilmektedir. Partiküller, silis, alumina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden meydana gelmiştir. Silis, sıvı kromatografide en yaygın kullanılan bir dolgu maddesidir. Silis partikülleri, mikron altı silis partiküllerini oldukça uniform yarıçapta daha büyük partiküller oluşturacak koşullarda bir araya toplanmasıyla hazırlanır. Elde edilen partiküller çoğu zaman, yüzeye kimyasal olarak veya fiziksel olarak bağlanan, ince bir organik film ile kaplanır.

3.3.5.1. Bağlı-Faz Dolgu Maddeleri

Bağlı faz dolgu maddelerinin çoğu bir organoklorosilanın, sıcak seyreltik hidroklorik asit çözeltisinde hidrolizlenerek yüzeyine OH grubu bağlanmış silisyum dioksit ile reaksiyona sokulmasıyla hazırlanır. Bu reaksiyon sonucunda oluşan ürün bir organosiloksandır. Katı parçacık yüzeyinde bulunan böyle bir SiOH ile meydana gelen reaksiyon aşağıdaki gibi yazılabilir:



Şekil 3.5. Kolon dolgu maddesinin temel yapısı [17]

Burada R, genellikle düz zincirli oktil- veya oktildesil- grubudur. Silis yüzeylerine bağlanan diğer organik fonksiyonlu gruplar alifatik aminler, eterler, nitriller, aromatik hidrokarbonlar ve siyano gruplarıdır. Böylelikle çok farklı polaritede durgun faz elde etmek mümkündür.

Bağlı faz dolgu maddeleri, fiziksel olarak yüzeye tutturulmuş dolgulara göre daha kararlı olma gibi bir üstünlüğe sahiptir. Yüzeye fiziksel olarak tutturulmuş dolgular, zamanla hareketli fazda çözünerek sürüklendikleri için sık sık yeniden kaplanmaları gerekir. Ayrıca bu dolgularda, hareketli fazdaki çözünme problemi nedeniyle, gradiend elüsyon tekniği uygulamak pratik değildir. Bağlı faz dolgularının başlıca sakıncası, biraz sınırlı numune kapasitesine sahip olmalarıdır.

3.3.5.2. Normal-Faz ve Ters-Faz Dolgu Maddeleri:

Durgun faz ile hareketli fazın bağlı polaritelerine göre iki tip dağılım kromatografisinden söz edilir. Bunlar:

3.3.5.2.1. Normal-Faz Dağılıma Kromatografisi :

Sıvı kromatografi ile yapılan ilk çalışmalarda durgun faz olarak daha çok trietilen glikol ve su gibi polaritesi yüksek maddeler kullanılırdı. Hareketli faz olarakta hekzan gibi nispeten apolar olan çözücüler kullanılırdı. Tarihsel nedenlerden dolayı bu tip kromatografiye şimdi "normal-faz kromatografi" adı verilmektedir.

3.3.5.2.2. Ters-Faz Dağılıma kromatografisi :

Bu kromatografide ise durgun faz apolar bir hidrokarbon; hareketli faz ise nispeten polar olan bir çözücüdür.

Normal-Faz kromatografi'de polarlığı en az olan bileşen kolondan ilk önce çıkar; hareketli fazın polarlığı arttıkça elüsyon zamanı azalır. *Ters-Faz tekniğinde ise*, aksine, polarlığı en çok olan bileşen kolondan ilk önce çıkar ve hareketli fazın polarlığı arttıkça elüsyon zamanı artar.

HPLC ile yapılan bütün ayırma işlemlerinin dörtte üçünden daha fazlasının oktil- veya oktildesil siloksan bağlı dolgu maddesi bulunduran ters-faz kromatografi ile yapıldığı söylenebilir. Bu tür dolgu maddelerinde uzun zincirli hidrokarbon bir yüzey elde edilmiş olur. Bu dolgu maddeleri ile kullanılan hareketli faz ise, genellikle çeşitli konsantrasyonlarda metanol, asetonitril veya tetrahidrofuran gibi çözücülerini içeren sulu çözeltilerdir [18].

3.3.6. Dedektörler

Sıvı kromatografide, gaz kromatografinin tersine, alev iyonlaşma ve termal iletkenlik gibi güvenilir ve evrensel uygulanabilen dedektörler yoktur. Sıvı kromatografinin gelişmesindeki ana güçlük, dedektörlerin gelişmesinde yaşanmıştır.

İdeal Bir Dedektörün Özellikleri

Sıvı kromatografi için ideal bir dedektör; yeterli duyarlık, iyi bir kararlılık ve tekrarlanabilirlik, geniş bir doğrusal çalışma aralığı, akış hızından bağımsız küçük cevap zamanı, yüksek güvenilirlik ve kullanım kolaylığı, her türden analite benzer cevap alınmalı veya belirli sınıf maddelere karşı tahmini kolay ve seçici cevap verme özelliği olmalı, numuneyi parçalamamalı, bant genişlemesini azaltmak amacıyla, minimum iç hacimde olmalıdır.

3.3.6.1. Dedektör Tipleri

Sıvı kromatografi dedektörleri temel olarak iki tiptir. Yığın Özelliği Dedektörleri, hareketli fazın kırma indisi, dielektrik sabiti veya yoğunluğu gibi, analit tarafından değiştirilen yığın özelliklerine cevap veren dedektörlerdir. Bunun tersine, Analit Özelliği Dedektörleri, analitin UV absorpsiyonu, floresans şiddeti veya difüzyon akımı gibi hareketli fazın sahip olmadığı, bazı özelliklerine cevap veren dedektörlerdir.

1982 yılında ve sıvı kromatografinin önemli rol oynadığı 365 tane basılmış makalede yapılan incelemede, çalışmaların % 71 'nin UV absorpsiyonunun belirlenmesiyle, % 15 'inin floresansla, % 5,4 'nün kırma indisiyle, % 4,3 'nün elektrokimyasal ölçmelerle ve geri kalan % 4,3 'nün diğer yöntemlerle yapıldığını ortaya koymaktadır. UV absorpsiyon dedektörleri ile yapılan çalışmaların % 39 'unda ışın kaynağı olarak cıvanın bir emisyon çizgisi, % 13 'ünde döteryum lambasından çıkan ışınların süzülmesi ile elde edilen ışın ve % 48 'inde optik ağ monokromatörden yayılan ışın kullanılmıştır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan dedektörler; absorpsiyon, filtreli ultraviyole, monokromatörlü ultraviyole, infrared absorpsiyon, floresans, kırma indisi ve kütle spektrometrik dedektörlerdir [17,18,22].

3.4. KROMATOĞRAFİNİN UYGULAMALARI

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılan cihazdır. Kullanılma sebepleri; duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğudur. En önemlisi ise sanayinin birçok bilim dalının ve toplumun birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir [17,20].

3.4.1. Kalitatif Analiz

Bir kromatogram, bir numunedeki her bir tür hakkında sadece biraz kalitatif bilgi sağlar. Bu bilgi söz konusu maddenin alıkonma süresi ya da belli bir elüsyon süresinden sonra sabit fazda bulunduğu yerdir. Bundan sonraki bilgiler, değişik hareketli fazda ve değişik sıcaklıklarda alınan kromatogramlardan elde edilir. Bunlarla bile elde edilen bilgiler, sadece IR ile veya NMR ile veya kütle spektroskopisiyle elde edilen bilgilerden daha azdır. Bütün bunlardan başka spektroskopik olarak elde edilen değerler, kromatografik olarak elde edilenlerden (t_R gibi) çok daha güvenilir ve kesin değerlerdir. Ancak bunlar kromatografinin yeterli olmadığı anlamına gelmemelidir. Gerçekte kromatografi ne oldukları bilinen sınırlı sayıdaki olası maddeleri içeren

karışımların bileşenlerinin var olup olmadığını belirtmede sıklıkla kullanılan bir araçtır. Örneğin; bir protein hidrolizatındaki 30 yada daha fazla amino asit, kromatogram sayesinde bağıl olarak daha yüksek bir kesinlikle tayin edilebilir. Ancak ayrılan amino asitlerin spektral veya kimyasal yolla desteklenmesi gerekir [17,18].

Kromatogramlar bir maddenin varlığını kesin olarak göstermeseler bile, bunların yokluğunu kesin olarak gösterirler. Buna göre aranan bir madde aynı şartlarda standardın gösterdiği alıkonma zamanında pik vermiyorsa, bu madde numunede yok veya konsantrasyonu kromatografik tayin sınırının altında demektir [17,18].

3.4.2. Kantitatif Analiz

Kromatografide kantitatif analiz, analiz yapılan maddenin pik yüksekliğinin veya pik alanının bir veya birkaç standardın yükseklikleri veya pik alanlarıyla kıyaslanmasına dayanır. Düzlem kromatografisindeyse, kantitatif analiz ayrılmış olan türün kapladığı alana bağlıdır. Şartlar iyi ayarlanabilirse, bu şekilde bulunan alanlar konsantrasyonla doğru orantılıdır [17,18].

3.4.2.1. 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 yapılabilmektedir. 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 [17,18].

3.4.2.2. 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 yandan pik yükseklikleri daha kolay ölçülür ve dar pikler için daha doğru bir şekilde tayin edilebilir.

Modern kromatografi cihazlarının çoğu pik alanlarının kesin olarak bulunmasına olanak sağlayan dijital elektronik integral hesabı yapan cihazlarla donatılmıştır. Böyle bir donanım yoksa elle hesap yapılabilir. Uygun genişlikleri olan simetrik pikler için iyi sonuç veren basit bir yöntem pik yksekliliğini, pik yarı yksekliliindeki pik genişliği ile çarpma dır. Genellikle elle yapılan integral hesabı teknikleri % 2 ile % 5 düzeyinde tekrarlanabilen alanlar sağlar, dijital integral hesaplayıcılar en az bir ondalık mertebesinde daha kesindir [17,18,19].

3.4.2.3. Kalibrasyon ve Standartlar

Kantitatif analizler için en dolaysız yöntem, bilinmeyen bileşimine benzeyen bir seri standart çözelti hazırlanmasını içerir. Bundan sonra standartların kromatogramları alınır ve pik ysekleri veya alanları derişimin bir fonksiyonu olarak grafiğe geerilir. Verilerin grafiği, orjinden geçen düz bir doğru vermelidir. Analizler bu grafiğe dayandırılır. 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 [17,18].

3.4.2.4. İç Standart Yöntemi

En kesin kromatografik kantitatif değerler, iç standart kullanılmak suretiyle elde edilir. Bu metotta iyi çözülmüş aynı miktarda iç standart hem numuneye hem de standartlara ilave edilir. Analit pikinin i standardın pik yksekliliğine veya alanına oranı bir analitik parametre olarak kullanılır. Bu metottan iyi sonuç alabilmek için i 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 [17,18].

4. MATERYAL VE METOT

4.1. Cihaz

Deneylerde, Perkin Elmer Series 200 Marka HPLC cihazı kullanılmıştır. Cihaz; C18 (oktadekil silan 4.6 mm x 250 mm) kolon, Perkin Elmer Series 200 UV-VIS dedektör, Perkin Elmer Series 200 izo-kritik akış pompası, 7725i Rheodyne enjektör ve 50 µL'lik loop ile donanımlıdır. Ayrıca Jasco V-530 UV-VIS Spectrophotometer ve 1 cm'lik kuartz küvetler kullanılmıştır.



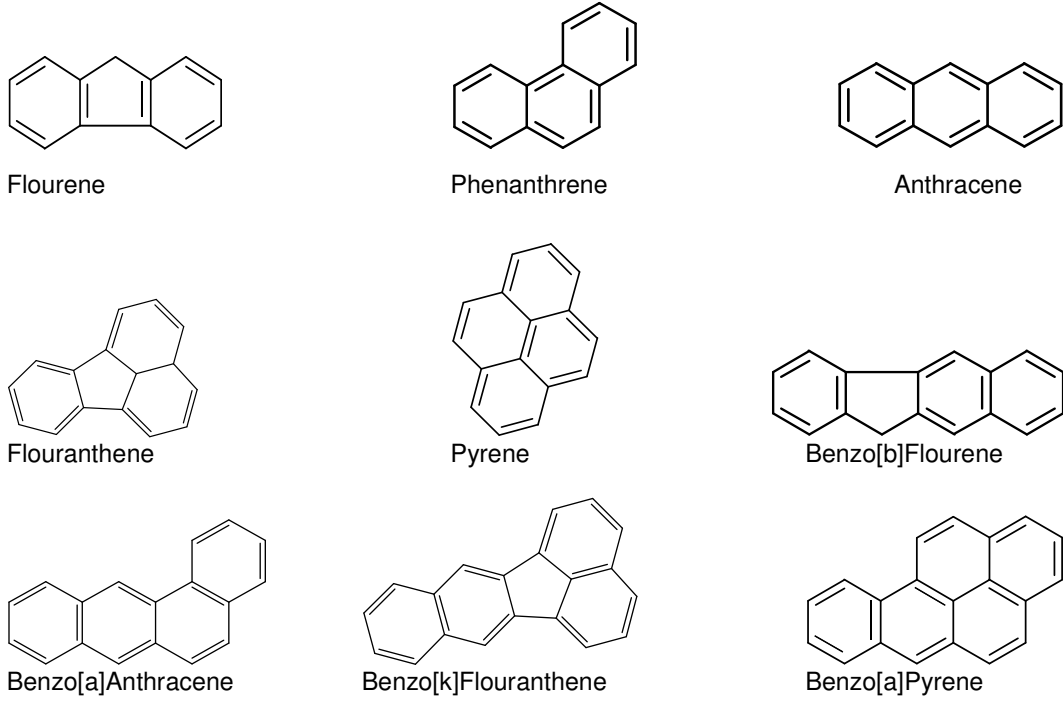
Şekil 4.1. HPLC Cihazı

4.2. Kullanılan Materyaller

Deneylerde kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup; flourene, phenanthrene, anthracene, flouranthene, pyrene, benzo[b]flourene, benzo[a]anthracene, benzo[k]flouranthene, benzo[a]pyrene, NaOH, asetonitril, metanol, hekzan, dichlorometan, toluen, SiO₂ ve Al₂O₃ Merck ve Hekzan Carlo Erba kalitedir. Şekil 4.1 tayin edilen PAH'ların formüllerini içermektedir.

4.3. Çözeltilerin Hazırlanması

Her bir PAH için 1000 ppm'lik ana stok çözeltisi 0,050 gr standart maddeden hassas olarak tartılarak asetonitrilde 50 mL'lik çözeltileri hazırlanır. Ara stok çözeltiler ana stok çözeltilerden uygun hacimlerde alınarak hazırlanmıştır. Çalışma standartları ise 1 ppm'lik stok çözeltilerden çıkılarak hazırlanmıştır.



Şekil 4.2. Tayin edilen poliaromatik hidrokarbonların kimyasal yapıları [1,4,14]

4.4. Materyal

Piyasada bulunan çeşitli marka sıvı yağlar ile balık, et ve odun kömürü örnekleri, Manisa ilindeki marketlerden temin edildi ve analizler gerçekleştirildi.

4.5. Deney Uygulamaları

4.5.1. Poliaromatik Hidrokarbonların HPLC Metodu ile Tayini

Seçilen PAH'ların molar absorpsiyon katsayıları birbirinden farklı olduğundan ve kaydedilen absorpsiyon şiddetlerinin uygun olması için farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmıştır. Standart çözeltilerin konsantrasyonları, flourene, phenanthrene, anthracene, benzo[k]flouranthene ve benzo[a]pyrene için 25 µg/L, 100 µg/L, 200 µg/L, 400 µg/L ve 500 µg/L; flouranthene, pyrene ve benzo[a]anthracene için 50 µg/L, 200 µg/L, µg/L 400 µg/L, 800 µg/L ve 1000 µg/L ve benzo[b]flourene için 12,5 µg/L, 50 µg/L, 100 µg/L, 200 ve 250 µg/L olacak şekilde karışım halinde hazırlanmıştır.

PAH standartlarının her birinin UV-Vis spektrofotometresinde dalga boyu taraması yapılarak maksimum absorpsiyon dalga boyları belirlendi. Daha sonra bu dalga boyu değerlerinin aritmetik ortalaması etrafında farklı dalga boylarında PAH standart karışımları HPLC-UV-Vis sistemine enjekte edilerek en iyi doğrusallığın olduğu 254 nm ortak dalga boyu olarak tespit edildi ve deneysel çalışmalar bu dalga boyunda gerçekleştirildi.

Ölçümlerin tamamı oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş olup mobil faz olarak asetonyril/su (80/20) karışımı kullanılmış olup akış hızı 1.5 mL/dak'ya ayarlanmıştır. Ölçümler 254 nm de yapılmış ve her bir PAH standardının ayrı ayrı kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur.

4.6. ÖRNEKLERİN EKSTRAKSİYONU

4.6.1. Yağ Örneklerinin Ekstraksiyonu

Poliaromatik hidrokarbonların sıvı yağlardaki ekstraksiyon işlemlerinde farklı yöntemler kullanılmış ve amaçlanan örnekler için en uygun ekstraksiyon yönteminin sabunlaştırma yöntemi olduğuna karar verilmiştir. Bunun için 50 mL yağ örnekleri, 40 g NaOH içeren %95'lik metanol: toluen (2:1, v/v) ortamında 60–70 °C de 3 saat karıştırılır. Karışım soğutulduktan sonra sabun fazı ayrılır. Geriye kalan metanolik faz 3 x 50 mL toluen ile ekstraksiyon yapılır ve toluen fazları birleştirilir, saf su ile yıkanır ve susuz Na₂SO₄ ile kurutulduktan sonra 70–80 °C de evapore edilir. Evaporasyon işlemi kuruluğa kadar yapılır ve elde edilen ürün 3 ml saf asetonyril ile çözülür, santrifüjlenir ve üstte kalan asetonyril fazı alınır. Asetonyril fazı PAH'lar yanında yağ içerisinde bulunan ve birlikte ekstrakte edilen a-polar ve polar maddeleride içermektedir. Bundan dolayı PAH'lar kolon kromatografisi ile saflaştırılır [12].

4.6.1.1. Aromatik Fraksiyonun Kolon ile Temizlenmesi (F2 fraksiyonu)

8 g silika (SiO₂) ile 8 g alümina (Al₂O₃) 250 mL'lik beherde 50 mL saf hekzan içinde karıştırılır ve bu karışım cam kolona doldurulur. Sonra kolondan 50 mL hekzan geçirilerek şartlandırılır. Aromatik fraksiyonun saflaştırılması için asetonyril fazı, hazırlanmış olan silika-alümina kolonundan geçirilir. İlk olarak 30 mL saf hekzan ile örnek içerisindeki alifatik hidrokarbonlar (F1 fraksiyonu), sonra 40 mL hekzan: DCM (80:20, v/v) ile saflaştırılmak istenen PAH'lar (F2 fraksiyonu), son olarakta 40 mL DCM: metanol (95:5, v/v) karışımı ile polar bileşikler kolondan alınır (F3 fraksiyonu). İkinci elüsyondan elde edilen ve PAH'lar içeren fraksiyon 40–50 °C de kuruluğa kadar evapore edilir ve 2 mL saf ACN ile çözülerek HPLC-UV-Vis sistemine enjekte edilir [12].

Yapılan deneysel çalışmalar, ekstraksiyon yöntemlerinden sabunlaştırma ve bunu takiben yapılan kolon kromatografisi yöntemlerinin en uygun olduğunu göstermiştir. Sıvı yağlarda sabunlaştırma işlemi sırasında kullanılan yağın miktarı arttıkça oluşan ve uzaklaştırılan sabunumsu fazın miktarı da artmaktadır. Ancak sabunumsu faz uzaklaştırılırken metanolik faz içine de geçmekte ve toluen ile ekstaksiyon işlemleri sırasında bu faz, toluen fazına geçmektedir. Dolayısıyla toluen fazındaki sabunumsu faz miktarı arttığı için bu fazın saf su ile uzaklaştırılması zorlaşmakta ve madde kayıpları da artmaktadır.

Sıvı yağlarda PAH'ların tayinleri için 50 mL yağ örnekleri sabunlaştırılmış ve toluen ile ekstrakte edilmiştir. Ancak bu maddelerin geri kazanım işlemlerinde (% verim), yağ miktarı azaltılmış ve 10 mL yağ kullanılmıştır. Sıvı yağlarda poliaromatik hidrokarbonların geri kazanım çalışmalarında iki paralel örnek ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. 10 mL yağ örneklerine standart PAH çözeltileri eklenerek yukarıda verilen ekstraksiyon yöntemi uygulanarak geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

4.6.2. Et, Balık ve Kömür Örneklerinin Ekstraksiyonu

Et ve balık örneklerinin ekstraksiyonlarında, pişmemiş balık, ızgara yapılmış balık, pişmemiş et ve ızgara yapılmış et ürünleri olmak üzere değişik şekillerde ekstraksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işlemleri için 10 ± 0.020 g et ya da balık örneği 250 mL behere alınır ve 50 mL saf toluen ile 45 dak. ultrasonik banyoda ekstrakt edilir, süzgeç kâğıdından süzülür ve 70 – 80 °C de kuruluğa kadar evapore edilir. Sonra 2 mL saf asetone ile çözülür, santrifüjlenir ve üstteki faz alınarak kolondan geçirilir [16].

Kömür örneklerinin ekstraksiyon işlemlerinde aynı yöntem kullanılmış, ancak toluen miktarı 75 mL olarak kullanılmıştır.

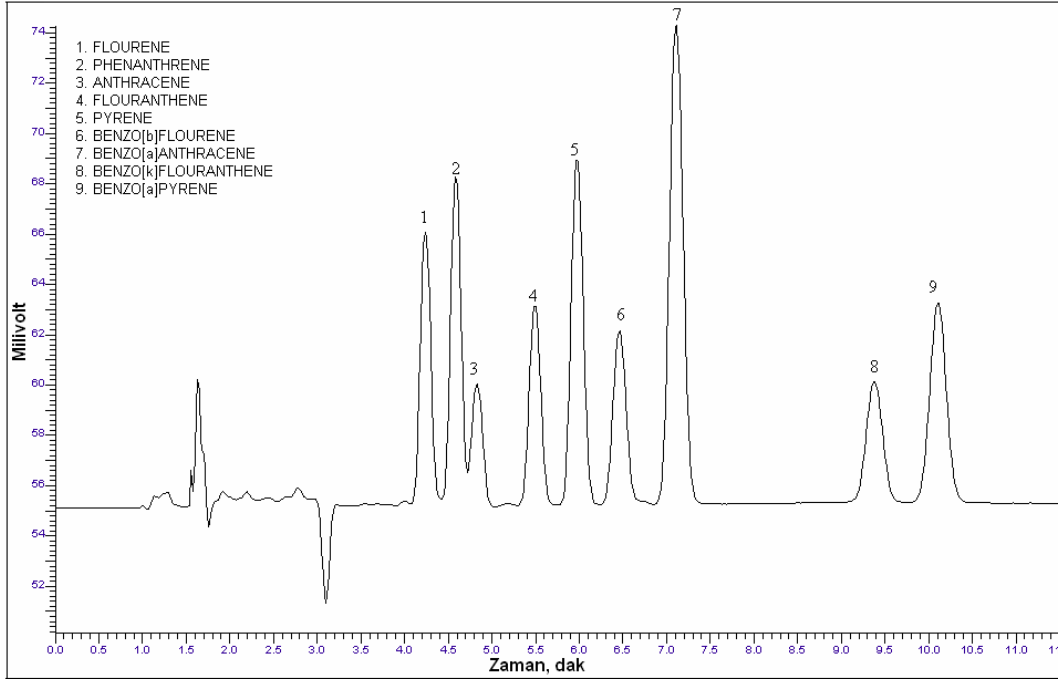
4.6.2.1. Örneklerin Kolon ile Temizlenmesi

Kolon ile saflaştırma işleminde, 10 g SiO₂, 250 mL beherde 50 mL saf hekzan ile karıştırıldıktan sonra kolona dolduruldu ve 50 mL hekzan kolondan geçirilerek şartlandırıldı. Sonra yukarıda elde edilen 2 mL örnek bu kolondan geçirilerek saflaştırıldı. Hareketli faz olarak 50 mL hekzan/DCM 80:20 (v/v) karışımı kullanıldı [16]. Kolon ile saflaştırma işleminde örnekler dört kez kolondan geçirildikten sonra ölçümler alınmıştır. Burada yapılan bütün işlemlerde iki paralel numune ile çalışılmıştır. Et, balık ve kömür örnekleri ile yapılan geri kazanım çalışmasında, iki paralel örneğe standart PAH'lar katılmış ve yukarıda ifade edilen yöntem kullanılmıştır

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

5.1. STANDARTLARIN ANALİZLERİ

Kullanılan yöntem C18 kolonunun kullanıldığı ters faz sıvı kromatografisi yöntemidir. PAH standartlarının konsantrasyonları $\mu\text{g/L}$ düzeylerinde olup, hazırlanan standartların konsantrasyonları bir birinden farklıdır. Optimum şartlar, mobil faz 80:20 (v/v; asetonitril:su) karışımı, akış hızı 1.5 mL/dak., basınç 1000-1030 Psi ve UV-Vis dedektörünün dalga boyu 254 nm olarak belirlenmiştir. Optimum şartlarda standart PAH'ların alıkonma süresi 4.07–9.31 dakika arasında olup pikler keskin, simetrik yani Gaussian şeklinde ve bir birlerinden iyi derece ayrılmış şekilde elde edilmiştir. Sadece ikinci ve üçüncü pikler arasındaki rezolasyon düşük olmasına rağmen kantitatif çalışmalar için yeteri miktarda bir birlerinde ayrılmışlardır (Şekil 5.1).

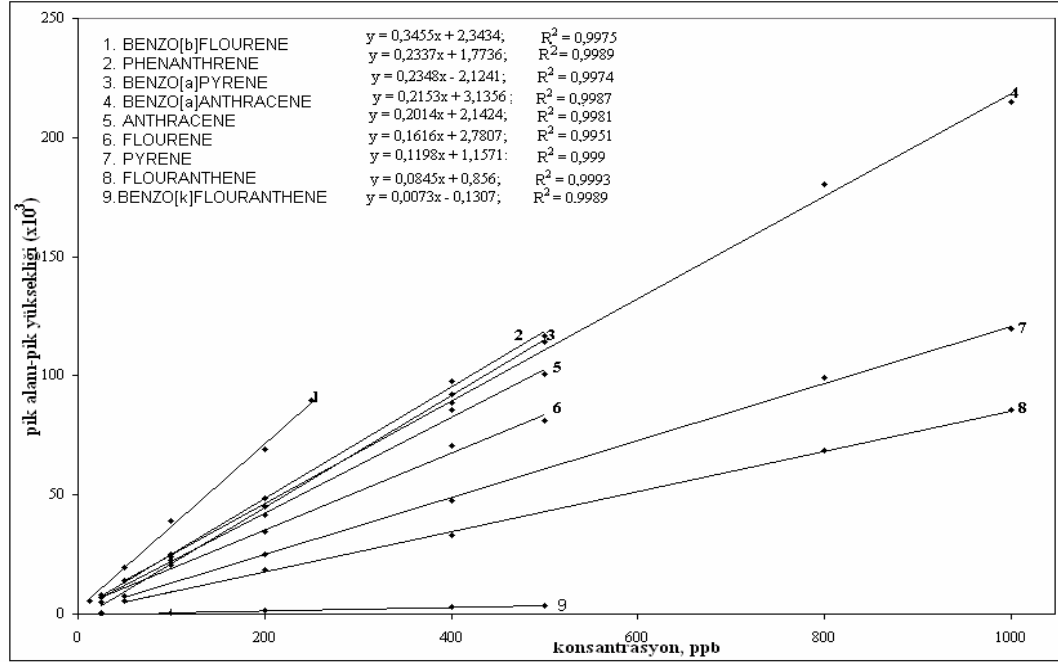


Şekil 5.1. Optimum şartlarda standart PAH'lara ait HPLC-UV-Vis kromatogramı

Kalibrasyon grafikleri, her bir PAH için geniş bir konsantrasyon aralığında beş farklı konsantrasyon kullanılarak oluşturulmuştur. Şekil 5.2 HPLC-UV-Vis yöntemi ile tayin edilen dokuz farklı PAH'a ait kalibrasyon eğrilerini göstermektedir. Kalibrasyon grafikleri aynı zamanda yöntemin doğrusallığını ifade etmek içinde kullanılmıştır. Tablo 5.1 kalibrasyon eğrilerinin oluşturulmasında kullanılan verileri içermektedir.

Tablo 5.1. Standart PAH'ların Ortalama Pik Alanları

Standart	Konsantrasyon, ($\mu\text{g/L}$)	Ortalama Pik Alanları
1.Flourene	25, 100, 200, 400, 500	5229, 20467, 34564, 70512, 81112
2.Phenanthrene	25, 100, 200, 400, 500	7879, 24251, 48489, 97582, 116896
3.Anthracene	25, 100, 200, 400, 500	6855, 22474, 41761, 85504, 100878
4.Flouranthene	50, 200, 400, 800, 1000	5497, 18365, 33040, 68810, 85526
5.Pyrene	50, 200, 400, 800, 1000	7732, 24843, 47750, 99518, 119678
6.Benzo[b]flourene	12.5, 50, 100, 200, 250	5682, 19576, 39216, 69274, 89567
7.Benzo[a]anthracene	50, 200, 400, 800, 1000	13926, 45196, 88906, 180366, 214821
8.Benzo[k]flouranthene	25, 100, 200, 400, 500	171, 682, 1314, 2820, 3529
9.Benzo[a]Pyrene	50, 200, 400, 800, 1000	7109, 24862, 45108, 91975, 114436



Şekil 5.2. Standart PAH'ların kalibrasyon eğrileri

Kalibrasyon grafiği ve R^2 değerleri, yöntemin doğrusallığının geniş bir konsantrasyon aralığında oldukça iyi olduğunu gösterir.

Tablo 5.2 de optimum şartlarda standart PAH'lara ait ortalama gerçek alıkonma zamanları, gerçek alıkonma zamanlarına ait standart sapma değerleri ve bağıl alıkonma

zamanları görülmektedir. Bağıl alıkonma zamanı hesaplamasında pyrene referans madde olarak seçilmiş ve diğer maddelerin alıkonma zamanları pyrene'nin alıkonma zamanına oranlanarak bağıl alıkonma zamanları hesaplanmıştır.

Flourene için bağıl alıkonma zamanı aşağıdaki gibi hesaplanmıştır. Diğer maddeler için de aynı formül kullanılarak hesaplamalar yapıldığında Tablo 5.2 de ki sonuçlar elde edilmiştir.

$$RRT = \frac{t_{\text{standart}}}{t_{\text{referans}}}$$

$$RRT = \frac{4.07}{5.65}$$

$$RRT = 0,72$$

RRT: bağıl alıkonma zamanı, t_{standart} : standartlara ait gerçek alıkonma zamanı, t_{referans} : referans olarak kullanılan standarda ait gerçek alıkonma zamanı.

Tablo 5.2. Standart PAH'lara ait gerçek alıkonma zamanı, standart sapma ve bağıl alıkonma zamanları

Standartın adı	Ort. alıkonma zamanı, t_R (dak)	Standart sapma, SD (dak)	Bağıl alıkonma zamanı, RRT
1.Flourene	4,07	0,02	0,72
2.Phenanthrene	4,37	0,01	0,77
3.Anthracene	4,61	0,02	0,81
4.Flouranthene	5,20	0,03	0,92
5.Pyrene	5,65	0,02	1,00
6.Benzo[b]flourene	6,02	0,01	1,06
7.Benzo[a]anthracene	6,62	0,04	1,17
8.Benzo[k]flouranthene	8,61	0,05	1,52
9.Benzo[a]Pyrene	9,31	0,05	1,65

Tablodanda görüldüğü gibi gerçek alıkonma zamanları için hesaplanan SD değerleri 0.05'den küçük. Bu sonuç yöntemin kalitatif olarak PAH'ların tayininde güvenilir bir şekilde kullanılabilceğini göstermektedir.

5.1.1. Doğruluk ve Tekrarlanabilirlik

Doğruluk çalışmalarında tayin edilen dokuz PAH'ın bilinen konsantrasyonlarını içeren standart çözelti sisteme enjekte edilmiş ve elde edilen pik alanları kullanılarak oluşturulan

kalibrasyon eğrileri yardımı ile konsantrasyonları hesaplanarak doğruluğun ifadesi olan bağıl hata değerleri günlük ve beş aylık süre için hesaplanmıştır. Tablo 5.3, enjekte edilen ve kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplanan konsantrasyon ve bağıl hata değerlerini göstermektedir. Günlük ve beş aylık bağıl hata hesaplamasında, farklı kalibrasyon grafiği ve üç enjeksiyon sonucunda elde edilen ortalama konsantrasyon değerleri kullanılmıştır. Örnek olması açısından, flourene için bağıl hata aşağıdaki gibi hesaplanmıştır. Diğer maddeler için de aynı formül kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır.

$$\text{Bağıl Hata} = \frac{\text{GD} - \text{DD}}{\text{GD}} \times 100$$

$$\text{Bağıl Hata} = \frac{200 - 197,70}{200} \times 100$$

$$\text{Bağıl Hata} = \% 1,15$$

Burada GD: gerçek değer; DD: deneysel değeri ifade etmektedir.

Tablo 5.3'te görüldüğü gibi her iki durumda da (günlük ve beş aylık) standartlar için hesaplanan bağıl hata değerleri % 8'ten daha küçük çıkmıştır. Bu durum tayin edilen dokuz PAH için yöntemin doğruluğunun çok iyi olduğunu göstermektedir. Bağıl hata değerleri önündeki eksi işaretleri hatanın hangi yönde olduğunu ve hatanın rastgele hatalardan kaynaklandığını ifade etmektedir.

Tablo 5.3. Yöntemin doğruluğuna ilişkin veriler

Standardın adı	Günlük deneysel veriler			5 aylık deneysel veriler		
	Gerçek kons., (µg/L)	Deneysel kons., (µg/L)	Günlük bağıl hata, (%)	Gerçek kons., (µg/L)	Deneysel kons., (µg/L)	Beş aylık bağıl hata, (%)
Flourene	150	144.53	3,65	200	197.70	1.15
Phenanthrene	150	143.50	4,33	200	200.38	-0.19
Anthracene	150	158.50	-5,67	200	197.58	1.21
Flouranthene	300	300.51	-0.17	400	382.13	4.47
Pyrene	300	297.14	0,95	400	392.05	1.99
Benzo[b]flourene	75	69.45	7.40	100	107.29	-7.29
Benzo[a]anthracene	300	297.27	0,91	400	402.37	-0.59
Benzo[k]flouranthene	150	153.72	-2,28	200	200.49	-0.24
Benzo[a]pyrene	300	292.76	2,41	200	204.87	-2.43

Yöntemin tekrarlanabilirliği, günlük ve beş aylık deneysel veriler hesaplanırken her bir PAH için farklı konsantrasyonlara sahip çözelti sisteme üç kez enjekte edilmiş ve pik alanları hesaplanmıştır. Tekrarlanabilirlik pik alanlarına göre yapılmış olup SD ve RSD cinsinden ifade edilmiştir. Beş aylık SD ve RSD hesaplanmasında, günlük SD ve RSD hesaplamasında kullanılan PAH çözeltileri beşinci ayın sonunda fakat farklı konsantrasyonda sisteme enjekte edilmiş ve aynı işlemler bu ölçümlerde de yapılarak beş aylık sonuçlar hesaplanmıştır. Tablo 5.4 tekrarlanabilirlik ile ilgili verileri içermektedir.

Flourene için SD ve RSD hesaplaması aşağıdaki gibi yapılmıştır. Diğer maddeler için de aynı formül kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır.

$$\text{Standart sapma} = \sqrt{\frac{\sum (X_{\text{ort}} - X_i)^2}{N - 1}}$$

$$\text{Standart Sapma} = \sqrt{\frac{6324}{3 - 1}}$$

$$\text{Standart Sapma} = 56$$

$$\text{RSD} = \frac{\text{SD}}{X_{\text{ort}}} \times 100$$

$$\text{RSD} = \frac{56}{34564} \times 100$$

$$\text{RSD} = 0,16$$

N: Ölçüm sayısı, RSD: bağıl standart sapma SD: standart sapma, , Xort: ortalama pik alanı.

Tekrarlanabilirliğin bir ifadesi olan RSD %2'nin altında oluşu yöntemin tekrarlanabilirliğinin gün içinde ve hatta aylar arasında mükemmel olduğu görülmektedir.

Tablo 5.5'te standart PAH'ların deneysel olarak bulunan yaklaşık tanımlama sınırları görülmektedir. Tanımlama sınırları belirlenirken her bir PAH standardı farklı konsantrasyonlarda sisteme enjekte edildi ve sinyal/zemin (3/1) oranı göz önünde bulundurularak yan yana tayin edilebilen minimum standart PAH'ların konsantrasyonları bulunmuştur. Deneysel olarak tanımlama sınır değerleri birbirinden farklı olarak çıkmıştır. Kullanılan HPLC–UV–Vis yöntemi ile tanımlama sınır değerlerinin düşük oluşu yöntemin uygulanabilirliğinin bir ifadesidir.

Tablo 5.4 Yöntemin tekrarlanabilirliğine ilişkin veriler

Standardın adı	Günlük deneysel veriler				Beş aylık deneysel veriler			
	Kons. (µg/L)	Ort. pik alanı	SD	RSD (%)	Kons., (µg/L)	Ort., pik alanı	SD	RSD (%)
Flourene	150	25889	140	0,54	200	34564	56	0,16
Phenanthrene	150	36320	257	0,71	200	6672	39	0,59
Anthracene	150	22229	356	1,60	200	48490	129	0,27
Flouranthene	300	23565	144	0,61	400	41761	269	0,65
Pyrene	300	40062	141	0,35	400	33040	77	0,23
Benzo[b]flourene	75	23841	213	0,89	100	47750	105	0,22
Benzo[a]anthracene	300	68113	285	0,42	400	39216	88	0,22
Benzo[k]flouranthene	150	21325	323	1,51	200	88906	846	0,95
Benzo[a]pyrene	300	39634	372	0,94	200	1406	7	0,52

Tablo 5.5. PAH'ların tanımlama sınırları

Standart	Tanımlama sınırı, (µg/L)
Flourene	5
Phenanthrene	5
Anthracene	5
Flouranthene	5
Pyrene	10
Benzo[b]flourene	1
Benzo[a]anthracene	5
Benzo[k]flouranthene	5
Benzo[a]pyrene	5

5.1.2. Geri Kazanım Çalışması

5.1.2.1. Sıvı Yağ Örnekleri ile Yapılan Geri Kazanım Çalışması

Sıvı yağlarda yapılan geri kazanım çalışmasında elde edilen sonuçlar Tablo 5.6'da verilmiştir. Geri kazanım çalışmasında iki paralel örnek kullanılmış ve yağ örneği olarak mısır yağı seçilmiştir.

Tablo 5.6. Sıvı yağ örneğine ait geri kazanım çalışması (F2 fraksiyonu)

1.Örnek

Madde	1.ölçüm, µg/L	2.ölçüm, µg/L	3.ölçüm, µg/L	Ortalama ölçüm, µg/L
Flourene	4508	4430	4735	4558
Phenanthrene	4361	4312	4446	4373
Anthracene	4030	4030	4047	4036
Flouranthene	4649	4666	6653	5323
Pyrene	3699	3679	3538	3639
Benzo[b]flourene	4131	4112	3902	4048
Benzo[a]anthracene	4098	4047	3900	4015
Benzo[k]flouranthene	6234	6120	5991	6115
Benzo[a]pyrene	8390	8318	7917	8208

2.Örnek

Madde	1.ölçüm, µg/L	2.ölçüm, µg/L	3.ölçüm, µg/L	Ortalama ölçüm, µg/L
Flourene	4584	4549	4507	4547
Phenanthrene	4597	4380	4490	4489
Anthracene	4217	3909	4041	4056
Flouranthene	7314	7411	7486	7403
Pyrene	3868	3943	3836	3883
Benzo[b]flourene	4212	4256	4272	4247
Benzo[a]anthracene	4149	4313	4182	4215
Benzo[k]flouranthene	4303	4446	4344	4364
Benzo[a]pyrene	8588	8743	8678	8669

Gerri kazanım için hazırlanan iki ayrı örnek içerisindeki PAH'lar için elde edilen sonuçlar arasında herhangi bir fark olup olmadığı % 95 güven aralığında istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 5.7'de verilmiştir.

Örnek olması nedeniyle flourene için yapılan istatistiksel değerlendirme aşağıdaki şekilde yapılmış olup, diğer PAH'lar için değerlendirmeler aynı şekilde yapılmıştır.

5.1.2.1.1. İki ortalamanın istatistiksel değerlendirilmesi;

$$S_{\text{birleşik}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 + \sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})^2}{N_1 + N_2 - 2}}$$

$$S_{\text{birleşik}} = \sqrt{\frac{(-49,44)^2 + (-128,03)^2 + (177,47)^2 + (37,06)^2 + (2,41)^2 + (-39,51)^2}{3 + 3 - 2}}$$

$$S_{\text{birleşik}} = 115,40$$

$s_{\text{birleşik}}$: birleşik standart sapma; x_i : birinci ölçüme ait madde miktarı; \bar{x} : ortalama madde miktarı; N_1 ve N_2 : ölçüm sayısı

%95 güven aralığında $t=2,78$;

$|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| < t \cdot s_{\text{birleşik}} \cdot \sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 \cdot N_2}}$ ise iki ortalama arasında bir fark yoktur denir.

Buna göre;

$$|4558 - 4547| < 2,78 \times 115,40 \times \sqrt{\frac{3 + 3}{3 \times 3}}$$

11 < 261,95 sonucu, yüz ölçümden 5'inin % 95 güven seviyesinde iki ortalama arasındaki farkın 261.95'ten büyük olmasının nedeni rastgele hatalardır. Sonuç olarak iki ortalama arasında fark yoktur denir.

Tablo 5.7. Sıvı yağ örneklerinde standart PAH'lara ait bazı istatistik bilgileri

Madde	I. Ortalama, $\mu\text{g/L}, \bar{x}_1$	II. Ortalama, $\mu\text{g/L}, \bar{x}_2$	$S_{\text{birleşik}}$	$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$	$\pm t.S \text{ birleşik} \times \sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 \cdot N_2}}$	istatistiksel sonuçlar
Flourene	4558	4547	115,40	11	261,95	fark yok
Phenanthrene	4373	4489	90,57	116	205,59	fark yok
Anthracene	4036	4056	109,65	20	248,90	fark yok
Flouranthene	5323	7403	816,75	2081	1853,90	fark var
Pyrene	3639	3883	73,13	244	165,99	fark var
Benzo[b]flourene	4048	4247	92,66	198	210,32	fark yok
Benzo[a]anthracene	4015	4215	95,13	200	215,93	fark yok
Benzo[k]flouranthene	6115	4364	100,50	1750	228,13	fark var
Benzo[a]pyrene	8208	8669	188,78	461	428,51	fark var

İstatiksel olarak iki ortalama değer arasında fark oluşu sistemde belirli hatanın olma ihtimalini gösterir. Tablodanda görüldüğü gibi bazı PAH'lar için % 95 güven aralığında iki ortalama değer arasında fark olduğu görülmektedir. Bu durumun belirli hatadan ziyade ekstraksiyon esnasında oluşan kayıplardan kaynaklanmaktadır. Çünkü yağlar sabunlaştırıldıktan ve toluen ile ekstrakte edildikten sonra, toluen fazına geçen sabun fazı tekrar saf su ile yıkama yapılarak toluen fazından uzaklaştırılır. Bu işlem sırasında ve kolon kromatografisi ile saflaştırma işleminde F_1 ve F_3 fraksiyonlarına da madde geçişleri olmakta ve bu yüzden madde kayıpları olduğu düşünülmektedir. Tablo 5.7'den de bu kayıpların bazı PAH'lar için her iki örnekte de aynı olduğu bazıları için ise farklılıklar gösterdiği görülmektedir. Fakat her iki örnek için hesaplanan % geri kazanım değerlerinin bir birine yakın olması bu farkların önemli olmadığını ve sonuç olarak ekstraksiyon işlemlerinin tekrarlanabilirliğinin tatmin edici düzeyde olduğunu göstermektedir. İki ortalama değer arasında fark olmayan PAH'lar için ekstraksiyon işleminin tekrarlanabilir olduğu açıktır.

Tablo 5.8 de PAH standartlarının geri kazanım çalışmalarından (% verim) elde edilen sonuçlar görülmektedir. Tabloda hesaplanan ortalama madde miktarı; iki ayrı paralel numuneden elde edilen ortalama madde miktarlarının aritmetik ortalamasını ifade etmektedir. Dolayısı ile hesaplanan geri kazanım değerleri de ortalama % geri kazanımları ifade etmektedir.

Tablo 5.8. Sıvı yağ örneklerinde standart PAH'lara ait yüzde (%) geri kazanım değerleri

Madde	Hesaplanan ort. madde miktarı, (x ₁) (µg/L ± SD)	Eklene madde miktarı,(x ₂) (µg/L)	%Geri kazanım, (x ₁ /x ₂)x100
Flourene	4552 ± 163	5000	91,04
Phenanthrene	4431 ± 128	5000	88,62
Anthracene	4046 ± 155	5000	80,91
Flouranthene	6363 ± 1155	5000	127,26
Pyrene	3761 ± 103	5000	75,21
Benzo[b]flourene	4147 ± 131	5000	82,95
Benzo[a]anthracene	4115 ± 134	5000	82,30
Benzo[k]flouranthene	5240 ± 142	5000	104,79
Benzo[a]pyrene	8439 ± 267	10000	84,39

Geri kazanım çalışmalarında eklene madde miktarları kalibrasyon eğrilerinin çizildiği aralığın oldukça üzerinde olduğu görülmektedir. Buradaki temel amaç kolon kromatografisinde elde edilen F1 ve F3 fraksiyonlarındaki madde miktarlarının analiz edilebilir düzeyde tutmak içindir. F2 deki madde miktarı gerekli oranda seyreltme yapılarak hesaplanmıştır. Tablo 5.9 sıvı yağlarda ki geri kazanım çalışmasında, F1 ve F3 fraksiyonlarına geçen madde miktarlarını göstermektedir.

Tablo 5.9. Sıvı yağlarda geri kazanım çalışmasında F1 ve F3 fraksiyonuna geçen ortalama madde miktarları

Madde	F1-Fraksiyonu madde miktarı, (µg/L ± SD)	F3-Fraksiyonu madde miktarı, (µg/L ± SD)	Toplam (F1+F3)	%Hata
Flourene	93 ± 36	40 ± 2	133 ± 39	2,67
Phenanthrene	185 ± 7	17 ± 1	202 ± 7	4,04
Anthracene	573 ± 15	42 ± 1	615 ± 15	12,3
Flouranthene	168 ± 32	36 ± 37	205 ± 48	4,1
Pyrene	269 ± 40	16 ± 12	285 ± 42	5,7
Benzo[b]flourene	40 ± 4	1.53 ± 0,21	42 ± 4	0,83
Benzo[a]anthracene	45 ± 20	5.21 ± 2,94	50 ± 20	1,00
Benzo[k]flouranthene	364 ± 36	5.18 ± 2,82	369 ± 36	7,39
Benzo[a]pyrene	141 ± 23	ND	141 ± 23	2,82

ND: tanımlanamadı

F1 fraksiyonuna geçen PAH miktarları F3 fraksiyonuna göre daha fazla olduğu görülmektedir. Bunun nedeni örneğin hazırlanmasında kullanılan PAH standartlarının konsantrasyonlarının yüksek olması ve dolayısıyla dolgu maddesinin aşırı yüklenmiş olması olabilir. Standartların konsantrasyonlarının düşük tutulması F1 fraksiyonuna geçen madde miktarlarının tablodaki değerlerden daha düşük olmasını sağlayacaktır. F3 fraksiyonunda ki madde miktarlarının düşük olması maddelerin dolgu maddesinden alınması tam anlamı ile yapıldığını göstermektedir. Buradaki toplam kayıpların % hataları Tablo 5.9'da verilmiştir. Sonuçlara göre kaynaklanan hatanın çok büyük olmadığı ve ihmal edilebilir düzeyde olduğu görülmektedir. Hataların ihmal edilebilir olmasına rağmen, fraksiyonların toplanmasının uygun olacağı söylenebilir, fakat özellikle F1 fraksiyonuna geçen alifatik hidrokarbonlardan dolayı karşılaşılan güçlükler de (düşük alıkonma zamalarında çoklu piklerin görülmesi ve rezolasyonun bozulması açısından) dolayı fraksiyonlar birleştirilmemiştir.

5.1.2.2. Et, Balık ve Kömür örnekleri ile Yapılan Geri Kazanım Çalışması

Tablo 5.10'da et, balık ve kömür örneklerine ait geri kazanım çalışması görülmektedir. Sonuçların birbirine yakın olması sonuçların tekrarlanabilir olduğunu gösterir.

Tablo 5.10. Alabalık örneğine ait geri kazanım çalışması

1. Örnek

Madde	1.ölçüm, µg/L	2.ölçüm, µg/l	3.ölçüm, µg/L	Ortalama ölçüm, µg/L
Flourene	166	163	162	163
Phenanthrene	124	120	119	121
Anthracene	263	247	247	252
Flouranthene	142	126	124	131
Pyrene	110	104	101	105
Benzo[b]flourene	151	148	145	148
Benzo[a]anthracene	108	108	107	108
Benzo[k]flouranthene	84	81	79	81
Benzo[a]pyrene	172	161	169	167

2. Örnek

Madde	1.ölçüm, µg/L	2.ölçüm, µg/L	3.ölçüm, µg/L	Ortalama ölçüm, µg/L
Flourene	129	136	130	132
Phenanthrene	122	128	124	125
Anthracene	246	255	248	249
Flouranthene	120	119	120	120
Pyrene	111	108	111	110
Benzo[b]flourene	213	209	214	212
Benzo[a]anthracene	106	105	107	106
Benzo[k]flouranthene	86	74	81	80
Benzo[a]pyrene	230	205	205	213

Geri kazanım için hazırlanan iki ayrı örnek içerisindeki PAH'lar için elde edilen sonuçlar arasında her hangi bir fark olup olmadığı % 95 güven aralığında istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 5.11'de verilmiştir. Tablodan da görüldüğü gibi, elde edilen sonuçlara göre hemen hemen bütün PAH'lar için iki ortalama değer arasında bir fark olmadığı görülmektedir. Bu durum ekstraksiyon yönteminde meydana gelebilecek kayıplar tekrarlanabilir ve et, balık ve kömür örneklerindeki PAH'ların ekstraksiyonu için kullanılabilmesi anlaşılmaktadır.

Tablo 5.11. Alabalık örneğinde standart PAH'a ait bazı istatistik bilgileri

Madde	I. Ort., x_1 , µg/L	II. Ort., x_2 , µg/L	$S_{\text{birleşik}}$	$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$	$\pm t.S \text{ birleşik } \times$ $\sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1.N_2}}$	istatistiksel Sonuçlar
Flourene	163	131,92	3,04	31	6,90	fark var
Phenanthrene	121	124,68	2,80	4	6,37	fark yok
Anthracene	252	249,51	7,42	3	16,85	fark yok
Flouranthene	131	119,72	7,18	11	16,29	fark yok
Pyrene	105	109,88	3,31	5	7,50	fark yok
Benzo[b]flourene	148	211,87	3,05	64	6,92	fark var
Benzo[a]anthracene	108	106,08	0,91	1	2,07	fark yok
Benzo[k]flouranthene	81	80,54	4,65	1	10,55	fark yok
Benzo[a]pyrene	167	213,47	10,73	46	24,35	fark var

Tablo 5.12'de et, balık ve kömür örneklerine ait geri kazanım çalışmasından elde edilen sonuçlar görülmektedir. Geri kazanım değerleri anthracene, benzo[b]flourene ve benzo[a]pyrene dışında oldukça düşük düzeylerde çıkmıştır. Bunun nedeni kolon kromatografisinin dört kez tekrarlanması kaynaklandığı düşünülmektedir.

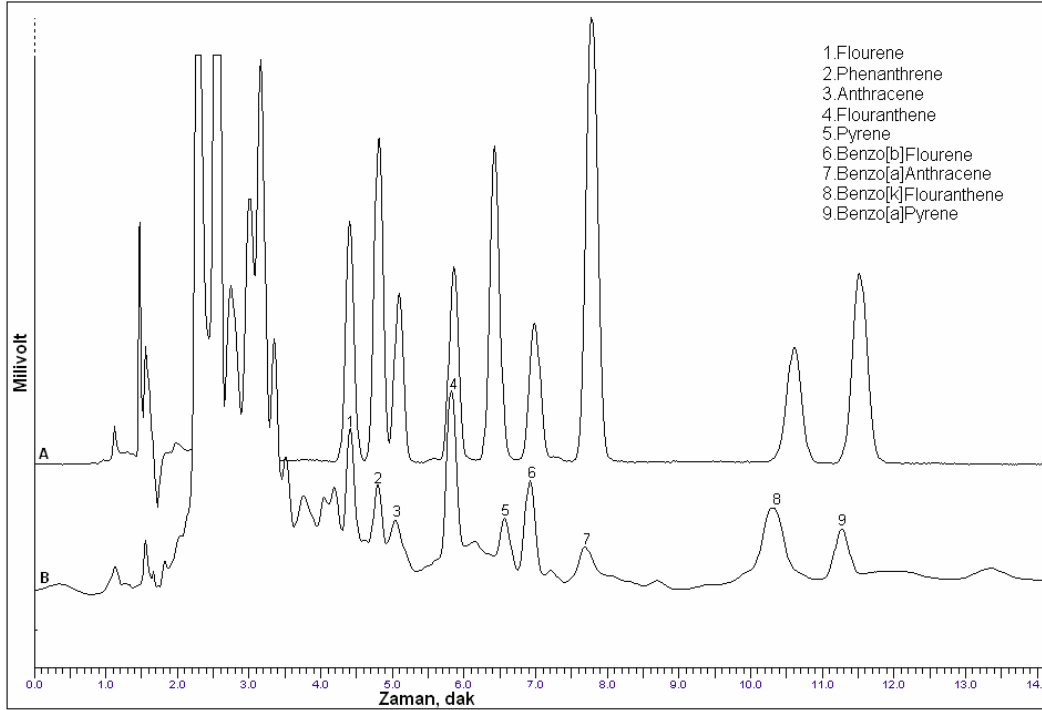
Tablo 5.12. Alabalık örneklerinde standart PAH'a ait yüzde (%) geri kazanım değerleri

Madde	Hesaplanan madde miktarı, ($\mu\text{g}/\text{kg} \pm \text{SD}$) ($x_1$)	Eklene madde miktarı, ($\mu\text{g}/\text{kg}$) (x_2)	%geri kazanım, (x_1/x_2)x100
Flourene	128 \pm 4	200	63,97
Phenanthrene	110 \pm 4	200	55,08
Anthracene	239 \pm 10	200	119,36
Flouranthene	125 \pm 10	200	62,66
Pyrene	107 \pm 5	200	53,71
Benzo[b]flourene	180 \pm 4	200	90,01
Benzo[a]anthracene	107 \pm 1	200	53,39
Benzo[k]flouranthene	81 \pm 7	200	40,49
Benzo[a]pyrene	190 \pm 15	200	95,23

5.2. ÖRNEKLERİN ANALİZLERİ

5.2.1. Yağ Örneklerinin Analizleri

Analizler sırasında örnek olarak mısır yağı, ayçiçeği yağı ve zeytinyağı kullanılmıştır. Şekil 5.3 mısır yağına ait HPLC–UV–Vis kromatogramları görülmektedir.



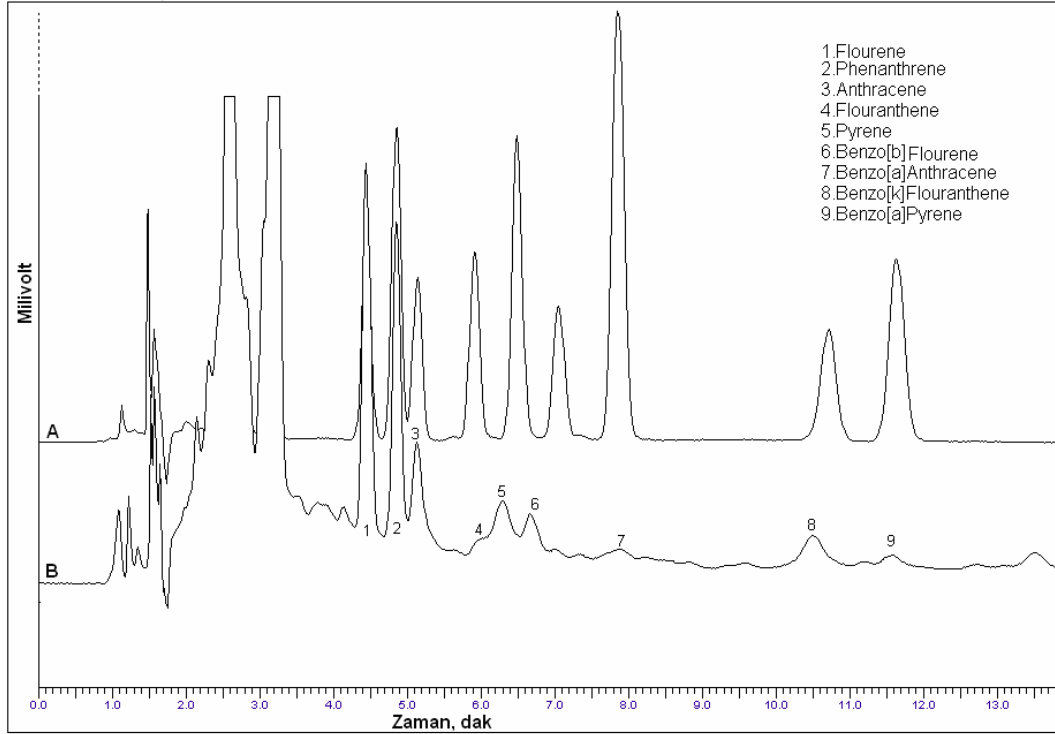
Şekil 5.3. Optimum koşullarda PAH standartlarının (A) ve mısır yağı (B) örneğine ait HPLC kromatogramlarının üst üste çakıştırılması

Kromatogramdan da görüldüğü gibi mısır yağı örneği tayin edilen bütün PAH'ları içermektedir. Her bir madde için elde edilen kromatogramlar belirgin ve net bir şekilde görülmektedir. Birinci pik olarak numaralandırılan flourene piki öncesindeki pikler yağ içerisinde birlikte ekstrakt edilen alifatik hidrokarbonlara ve alıkonma zamanı 2–2,5 dak arasında görülen şiddetli pikler ekstraksiyonda kullanılan toluenden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kolon kromatografisi, ekstraksiyonda kullanılan toluenin F2 fazına geçmesini önemli ölçüde engellemesine rağmen, tam olarak absorblayamamaktadır. Belki de enjeksiyon öncesi

örneklerin tekrar kolondan geçirilmesi bu maddelere ait piklerin temizlenmesine imkan sağlayabilir. Fakat pikler bizim ilgilendiğimiz alıkonma zamanı dışında olduğundan ve hesaplamalara negatif etki etmediğinden dolayı ekstra temizlemeye gerek duyulmamıştır.

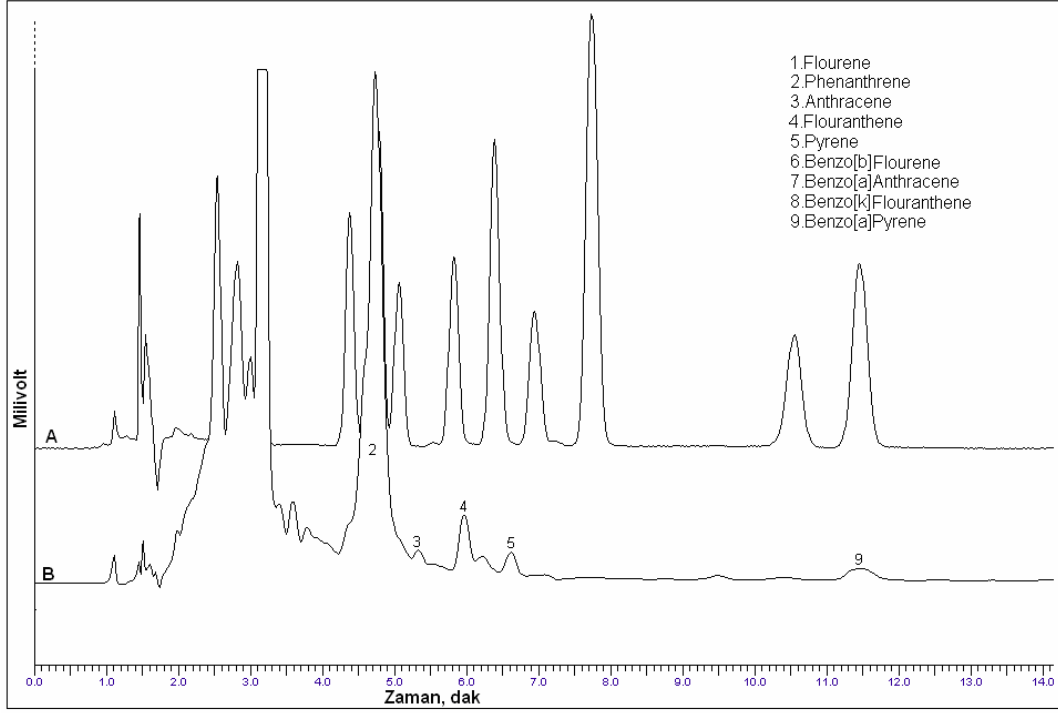
Şekil 5.4'te ayçiçeği yağı örneğine ait kromatogram görülmektedir. Ayçiçeği yağında tayin edilen PAH'ların tümü var olmasına rağmen, 4, 7 ve 9 numaralı piklere ait olan flourenthene, benzo[a]anthracene ve benzo[a]pyrene kalitatif olarak tanımlanabilmekte, fakat sinyal/zemin oranı 3/1'in altında olduğu için kantitatif olarak hesaplanamamıştır.



Şekil 5.4. Optimum koşullarda PAH standartları (A) ve ayçiçeği yağı (B) örneğine ait HPLC kromatogramlarının üst üste çakıştırılması

Şekil 5.5'te zeytin yağı örneğine ait pik görülmektedir. Zeytin yağında analiz edilen PAH'dan sadece beşine ait pikler belirlenmiş ve bunlardan üç tanesi kantitatif olarak tayin edilmiştir. Alıkonma zamanı 4,5–5 dak arasındaki şiddetli pik analiz edilen zeytin yağı örneğinin phenanthrene bakımından oldukça zengin olduğunu göstermektedir.

Mısır yağı, ayçiçeği yağı ve zeytinyağı örneklerinde bulunan PAH miktarları Tablo 5.13 te görülmektedir.



Şekil 5.5. Optimum koşullarda PAH standartlarının (A) ve zeytin yağı (B) örneğine ait HPLC kromatogramlarının üst üste çakıştırılması

Tablo 5.13. Yağ örneklerinde bulunan madde miktarları (F2 fraksiyonu)

Madde	Mısır yağındaki madde miktarları, (µg/L ± SD)	Ayçiçeği yağındaki madde miktarları, (µg/L ± SD)	Zeytinyağındaki madde miktarları, (µg/L ± SD)
Flourene	421 ± 15	186 ± 10	ND
Phenanthrene	185 ± 33	124 ± 9	2473 ± 77
Anthracene	271 ± 48	84 ± 34	ND
Flouranthene	1902 ± 76	ND	459 ± 26
Pyrene	301 ± 12	36 ± 5	88 ± 7
Benzo[b]flourene	252 ± 14	11 ± 1	ND
Benzo[a]anthracene	160 ± 8	ND	ND
Benzo[k]flouranthene	929 ± 50	24 ± 4	ND
Benzo[a]pyrene	480 ± 38	ND	ND

ND: tanımlanamadı

Mısır yağının PAH bakımından zengin olduğu ve PAH'ların miktarlarının tamamının kabul edilen (25 ppb) limit değerinden oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Ayçiçeği yağı flouranthene, benzo[a]anthracene ve benzo[a]pyrene harici diğer altı PAH'ı içermekte ve bunların üçü limit değerinden yüksek çıkmıştır. Zeytin yağı en az sayıda PAH içermesine rağmen phenanthrene miktarı diğer iki yağ örneğinden çok daha yüksek çıkmıştır.

Tablo 5.14 de mısır yağına ait F1 ve F3 fraksiyonlarına geçen madde miktarları görülmektedir. F1 ve F3 fraksiyonlarının analizi sadece mısır yağı için gerçekleştirilmiştir. Diğer yağ örneklerine ait F1 ile F3 fraksiyonlarına da madde geçişleri olduğu düşünülmektedir.

Tablo 5.14. Mısır yağına ait F1 ve F3 fraksiyonuna geçen ortalama madde miktarları

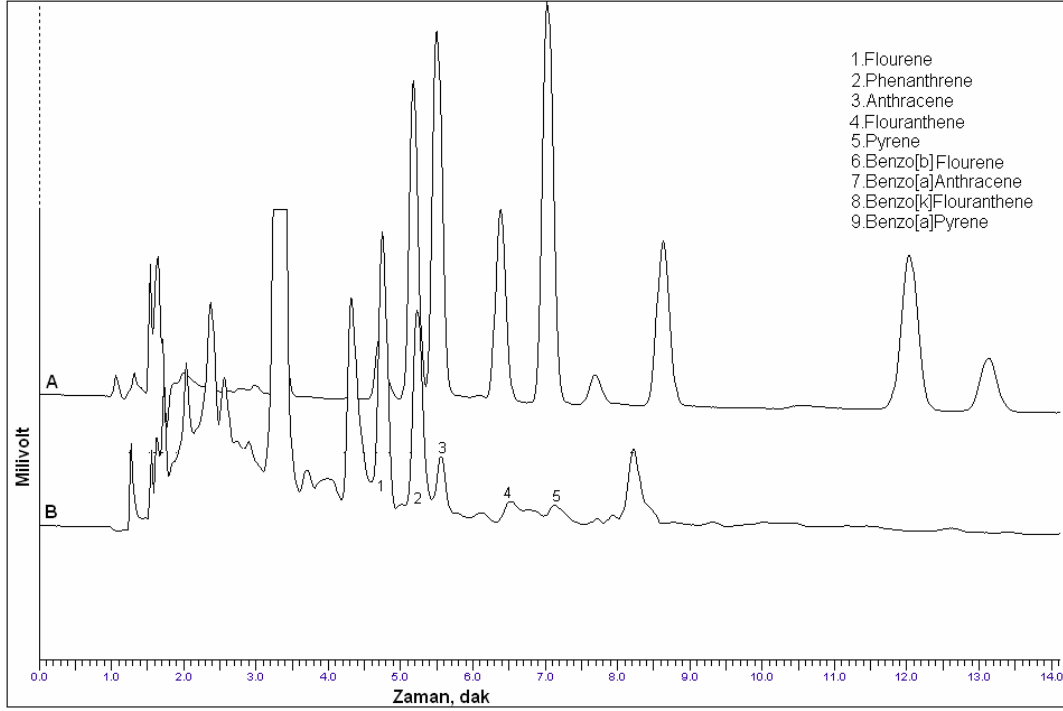
Madde	F1-Fraksiyonunda hesaplanan ortalama madde miktarı, ($\mu\text{g/L} \pm \text{SD}$)	F3-Fraksiyonunda hesaplanan ortalama madde miktarı, ($\mu\text{g/L} \pm \text{SD}$)
Flourene	ND	ND
Phenanthrene	4.79 \pm 0,32	ND
Anthracene	ND	ND
Flouranthene	17.55 \pm 4,42	5.95 \pm 0,56
Pyrene	28.71 \pm 0,88	21.49 \pm 2,31
Benzo[b]flourene	1.06 \pm 0,09	11.86 \pm 1,34
Benzo[a]anthracene	ND	5.36 \pm 1,50
Benzo[k]flouranthene	ND	6.64 \pm 4,34
Benzo[a]pyrene	ND	ND

F1 ve F3 fraksiyonundaki değerler F2 fraksiyonundan oldukça düşük olduğu görülmektedir. Standartlarla yapılan istatistiksel çalışmalarda buradan kaynaklanacak hataların düşük ve ihmal edilebilecek düzeyde olduğunu göstermiştir.

5.2.2. Et, Balık ve Kömür Örneklerinin Analizleri

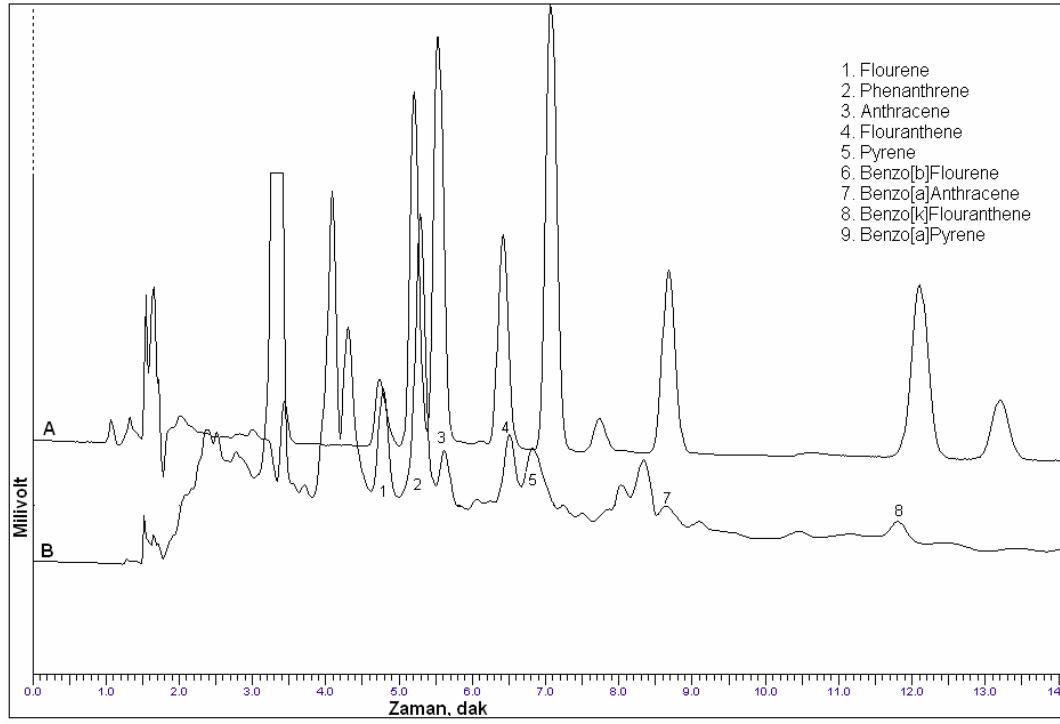
Aşağıdaki şekillerde sırasıyla, pişmemiş alabalık eti, ızgara alabalık, pişmemiş levrek, ızgara levrek, pişmemiş et, ızgara et ve odun kömürü örneklerine ait HPLC kromatogramları görülmektedir. Her bir örneğin kromatogramından da görüldüğü gibi örnek içerisinde farklı miktarlarda PAH bulunmaktadır.

Şekil 5.6'da pişirilmemiş alabalığa ait kromatogram görülmektedir. Analiz edilen pişirilmemiş alabalık örneğinde PAH'ın sadece beş tanesi kalitatif olarak tayin edilmesine rağmen sadece üç tanesi kantitatif olarak tayin edilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi pikler oldukça belirgin çıkmıştır. Alıkonma zamanı 4.5 ve 8–8,5 dak arasında olan pikler için alıkonma zamanları gözönünde bulundurulduğunda bizim tayin ettiğimiz PAH'ların dışında başka bir PAH'a ait olabileceği düşünülmektedir. Bu pikin aydınlatılması için herhangi bir ek çalışma yapılmamıştır.

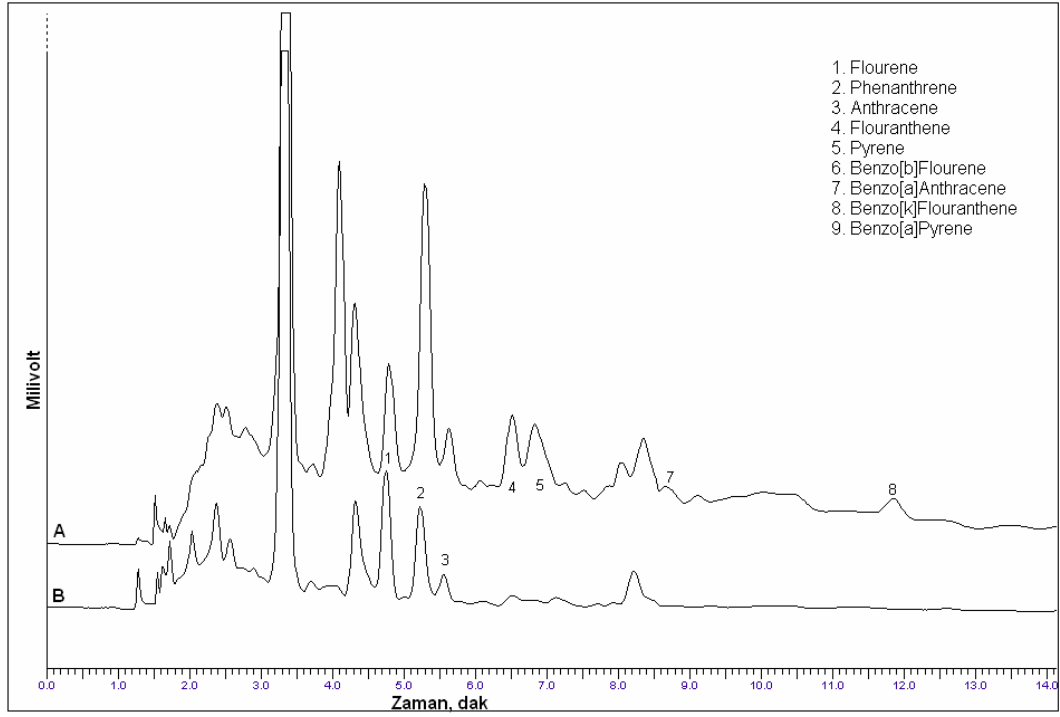


Şekil 5.6. Optimum koşullarda standart PAH'ların (A) ve pişirilmemiş alabalık eti (B) örneğine ait HPLC kromatogramlarının üst üste çakıştırılması.

Şekil 5.7'de odun kömürü örneği kullanılarak ızgara yapılmış alabalık örneğine ait pik görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi pişirilmemiş örnekten farklı olarak benzo[a]anthracene ve benzo[k]flouranthene pikleri de belirlenmiştir. Ancak benzo[a]anthracene ile benzo[k]flouranthene sadece kalitatif olarak belirlenmiş, kantitatif olarak tayin edilememiştir. Ayrıca flourene, phenanthrene, anthracene, flouranthene ve pyrene ait piklerin de pik şiddetlerinin arttığı gözlenmiştir. Bu sonuç ızgara işlemi esnasında balığın PAH'lar bakımından kirlendiğini göstermektedir. Izgara yapılmış alabalık örneklerinde analizde kullanılan PAH'dan beş tanesinin kantitatif olarak olduğu belirlenmiştir.



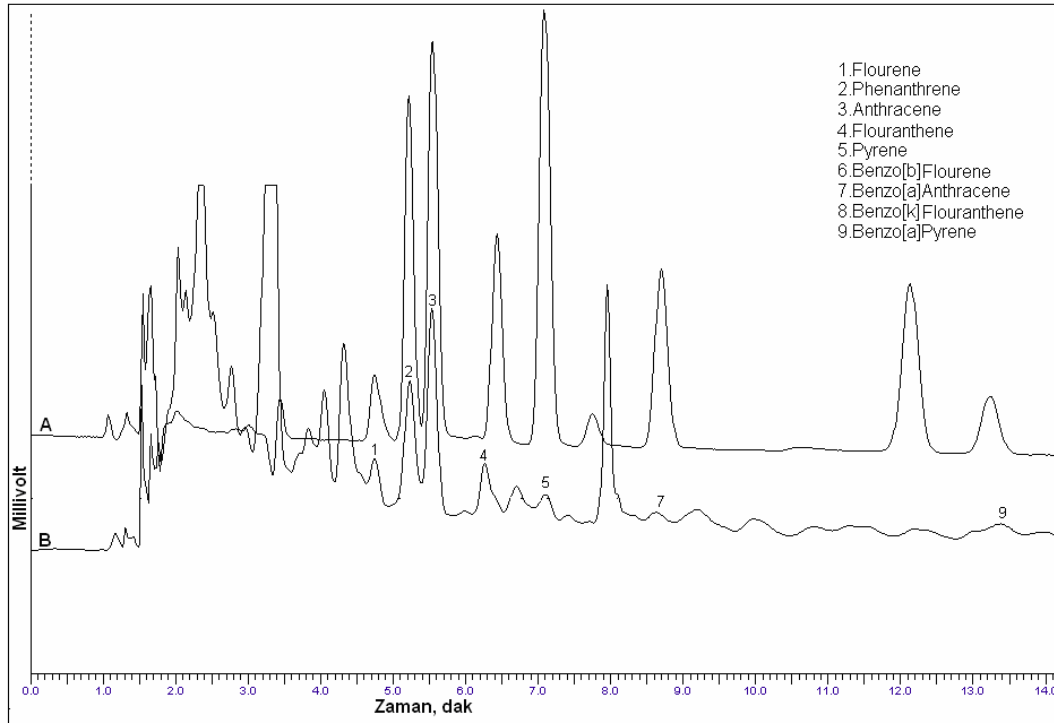
Şekil 5.7. Optimum koşullarda standart PAH'ların (A) ve ızgara alabalık (B) örneğine ait HPLC kromatogramlarının üst üste çakıştırılması



Şekil 5.8. Optimum koşullarda ızgara alabalık (A) ve pişmemiş alabalık örneğine (B) ait HPLC kromatogramlarının üst üste çakıştırılması

Şekil 5.8 pişmemiş alabalık ile ızgaralanmış alabalık örneklerinin üst üste çakışmasını göstermektedir. Şekilden de görüldüğü gibi pişirilmemiş örnekte beş farklı PAH varken, ızgaralanmış örnekte yedi farklı PAH bulunmaktadır. Dolayısıyla 1,2,3,4 ve 5 numaralı piklere ait PAH'ların şiddetleri artarken 7 ve 8 numaralı piklere ait PAH'lar ızgara ile pişirme sırasında dumandan örnek üzerinde birikmiştir. Bunun nedeni proliz olayı olduğu düşünülmektedir. Yani ızgaralama sırasında balıkta bulunan yağın eriyerek ısınan yüzeye düşmesi ve burada oluşan yüksek sıcaklığın etkisiyle yağların prolizinden PAH'ın oluşarak duman ile birlikte balığın yüzeyine yapışmasıdır.

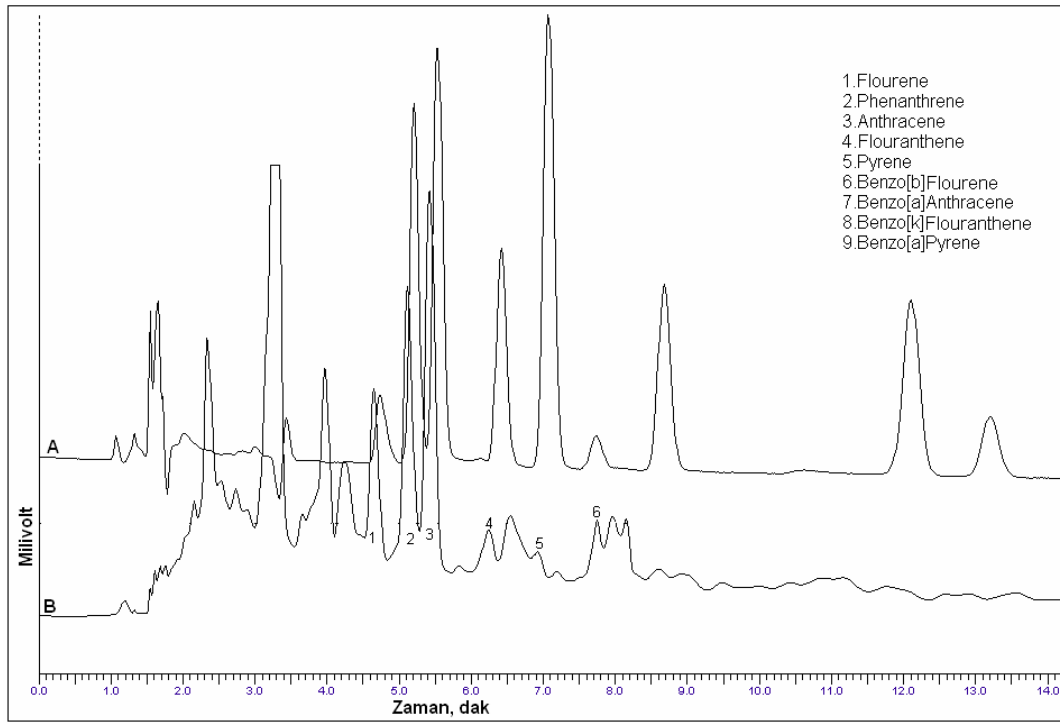
Şekil 5.9'da pişmemiş levrek örneğine ait pik görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi bu örnekte, tayin edilen PAH'dan beş tanesinin olduğu saptanmış ve kantitatif tayinleri yapılmıştır. Ayrıca tayin edilen diğer PAH'ın da (7. ve 9. piklere ait PAH'lar) kalitatif olarak var olduğu, ancak tayin sınırları altında olduğundan kantitatif olarak saptanamadığı söylenebilir. Yine alıkonma zamanı 7.5 – 8 dak. arasındaki pik alabalıkta olduğu gibi farklı bir maddeye ait olduğu düşünülmektedir.



Şekil 5.9. Optimum koşullarda standart PAH (A) ve pişmemiş levrek (B) örneğine ait HPLC kromatogramlarının üst üste çakıştırılması

Piştirilmemiş alabalık örneği ile piştirilmemiş levrek örneklerine dikkat edildiğinde, levrek örneğinde farklı olarak flouranthene ve pyrene'nin kantitatif olarak tanımlanabildiği ve benzo[a]anthracene ile benzo[k]flouranthene'nin de kalitatif olarak bulunduğu tespit edilmiştir.

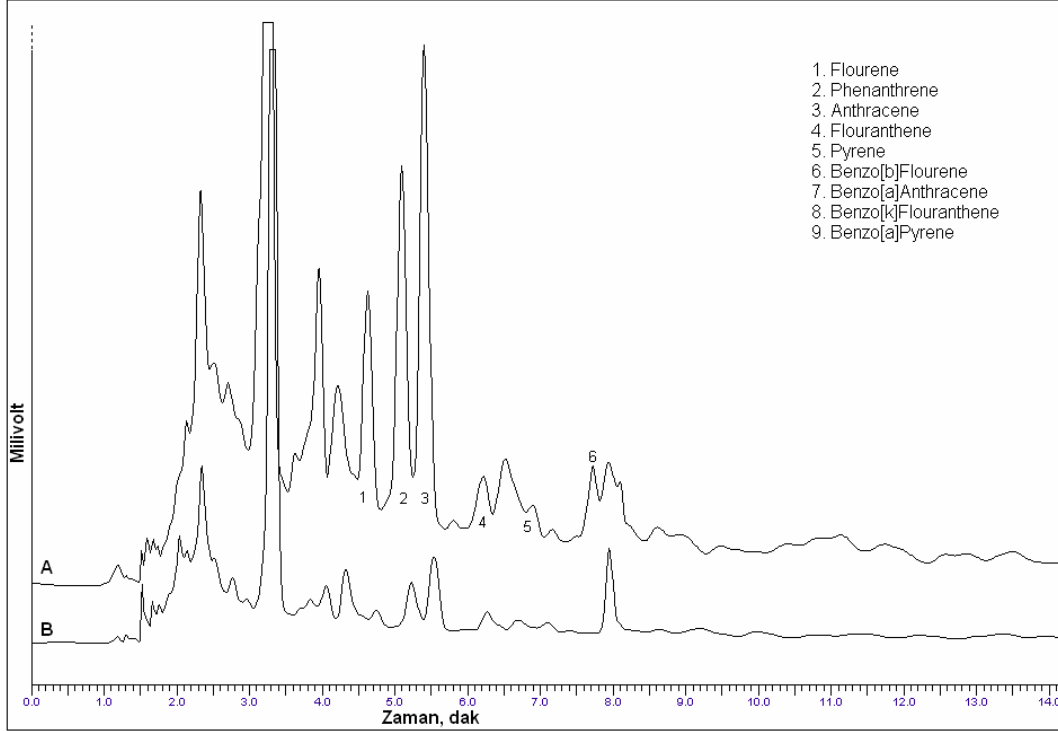
Şekil 5.10'da ızgara yapılmış levrek örneği görülmektedir. Bu örnekte tayinleri yapılan PAH'lardan altı tanesinin var olduğu tespit edilmiştir. Benzo[b]flourene pişmemiş örnekte görülmesine rağmen ızgara sonucunda oluştuğu net olarak görülmektedir. Alıkonma zamanı 8 – 8,5 dak arasındaki iki pike ait madde ızgaralama sırasında dumandan gelen ve tayin edilen PAH'dan farklı maddelere ait olabilir.



Şekil 5.10. Optimum koşullarda Standart PAH (A), ve ızgara levrek (B) örneğine ait HPLC kromatogramlarının üst üste çakıştırılması

Şekil 5.11'de piştirilmemiş ve ızgaralanmış levrek örneklerinin kromatogramlarının üst üste çakıştırılmasını göstermektedir. Şekilden de görüldüğü gibi her iki örnekte de aynı tür PAH bulunmakta, fakat pik şiddetlerinin, dolayısıyla her iki örnekteki madde miktarların farklı olduğu sonucu çıkmaktadır. Buda ızgara sırasında oluşan PAH'ların balıkta biriktiğini göstermektedir.

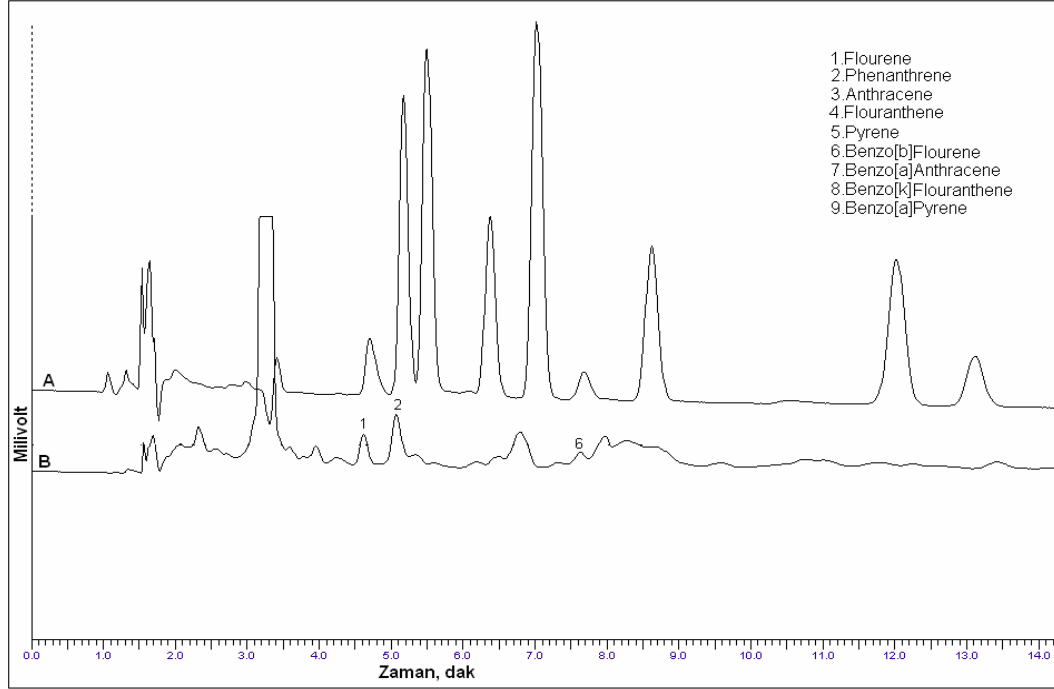
Şekil 5.12 pişmemiş et örneğine ait kromatogramı göstermektedir. Pişmemiş et örneğinde tayin edilen PAH'dan üç tanesinin bulunduğu belirlenmiş ve bunların kantitatif tayinleri yapılmıştır.



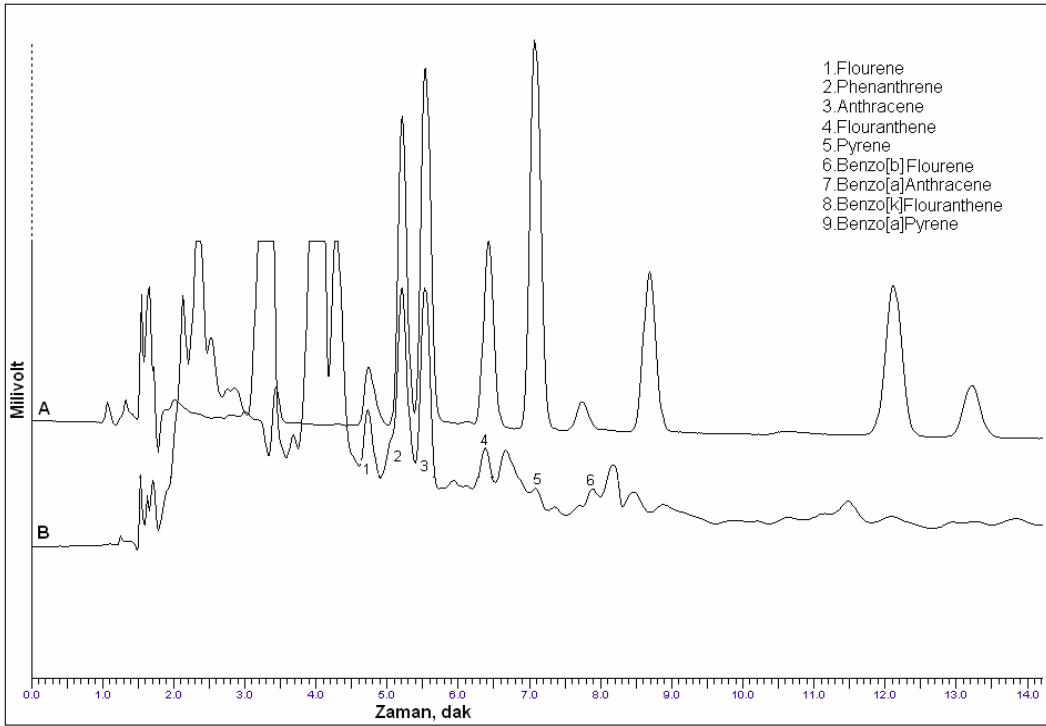
Şekil 5.11. Optimum koşullarda ızgara levrek (A) ve pişmemiş levrek örneğine ait HPLC kromatogramlarının üst üste çakıştırılması

Şekil 5.13 ızgara yapılmış et örneğinin kromatogramını göstermektedir. Izgara yapılmış et örneklerinde pişmemiş et örneklerinden farklı olarak üç tane pikin olduğu kromatogramdan görülmektedir. Izgara yapılmış etteki piklerin şiddetinin pişmemiş örneklerden daha fazla olması ızgaralama sırasında dumandan ete madde geçişleri olduğunu gösterir ve bu yüzden ızgaralanmış etlerdeki madde miktarları pişirilmemiş etlerden daha fazla olarak hesaplanmıştır.

Izgaralanmış ette ayrıca tayin edilen diğer PAH'ların da olduğu görülmektedir. Ancak tanımlama sınırının altında olduklarından dolayı kantitatif olarak tayin edilememiştir.



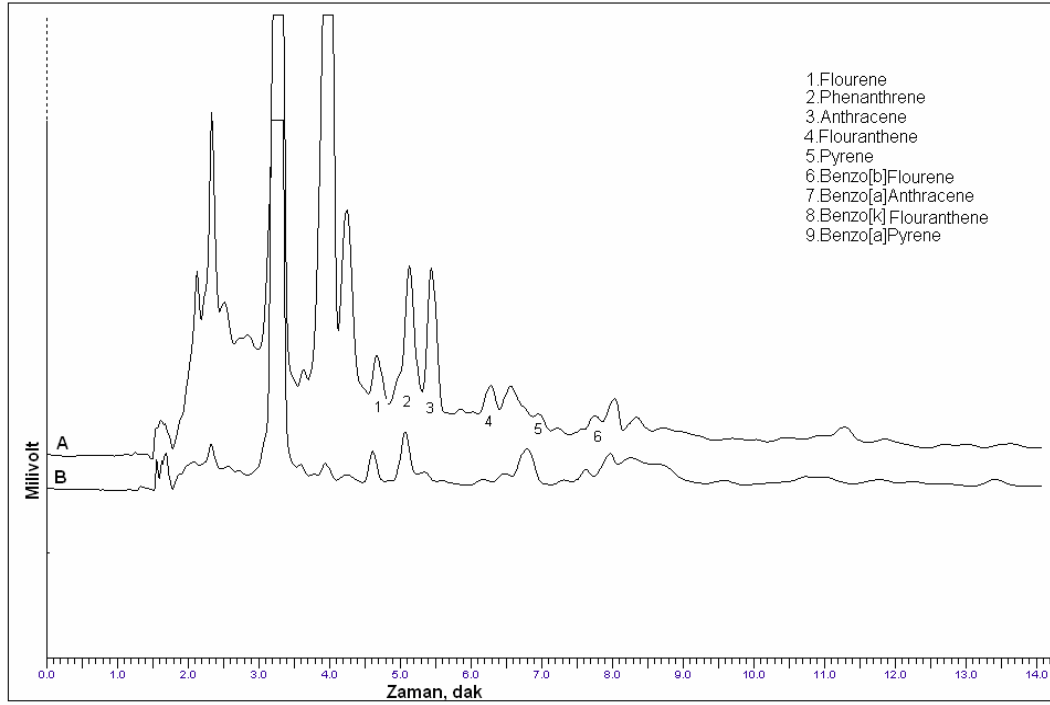
Şekil 5.12. Optimum koşullarda standart PAH (A) ve pişmemiş et (B) örneğine ait HPLC kromatogramlarının üst üste çakıştırılması.



Şekil 5.13. Optimum koşullarda standart PAH (A) ve ızgara et (B) örneğine ait HPLC kromatogramlarının üst üste çakıştırılması.

Şekil 5.14'te ise ızgara yapılmış et örneği ile pişirilmemiş et örneğine ait kromatogramların karşılaştırılması görülmektedir. Izgara yapılmış örnekte farklı olarak flouranthene, pyrene ve benzo[b]flourene bulunmaktadır. Her iki örnekte farklı miktarlarda maddenin olduğu piklerin şiddetlerinden anlaşılmaktadır.

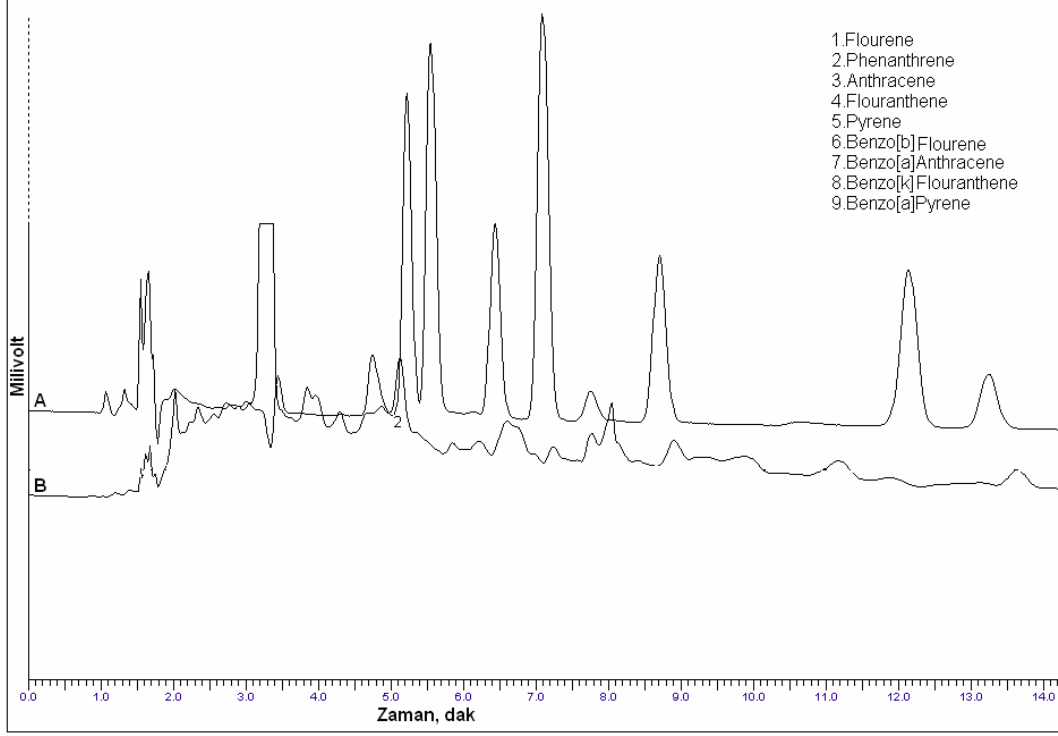
Şekil 5.15'te odun kömürü örneğine ait pik görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi odun kömürü örneğinde sadece phenanthrene ait pik kantitatif olarak tayin edilebilmektedir.



Şekil 5.14. Optimum koşullarda ızgara et (A) ve (B) pişirilmemiş et örneklerinin üst üste karşılaştırılması

Tablo 5.15 de et, balık ve odun kömürü örneklerindeki madde miktarları görülmektedir. Tablo 5.15'te görüldüğü gibi farklı örneklerdeki PAH'ların miktarlarının farklı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu gıdaların ızgara ile odun kömürü ateşinde pişirilmesi sonucunda yüzeylerine farklı miktarlarda PAH biriktiği gözlenmiştir. Odun kömürü örneğinde kantitatif olarak sadece phenanthrene olduğu görülmektedir. Ancak bu gıdalar ızgara yapıldığında yüzeylerine phenanthrene den başka maddelerinde biriktiği saptanmıştır. Bunun nedeninin, bu gıdaların pişirilmesi sırasında yüzeylerindeki yağların eriyerek ateşin içine düşmesi ve buradaki sıcaklığın yüksek olması nedeniyle çok miktarda PAH'ın oluşması ve oluşan bu PAH'ın tekrar dumanla

birlikte gıdaların yüzeyine yapışarak birikmesi olduğu düşünülmektedir. Tablo 5.15 te ki verilere bakıldığında pişmemiş ve ızgara yapılmış ürünlerdeki madde miktarlarının birbirinden farklı olması bu düşünceyi doğrulamaktadır



Şekil 5.15. Optimum koşullarda standart PAH (A) ve odun kömürü (B) örneğine ait HPLC kromatogramlarının üst üste çakıştırılması.

Tablo 5.15. Balık, et ve kömür örneklerindeki madde miktarları

Madde	Pişmemiş alabalık (µg/kg ± SD)	Izgara abalık (µg/kg ± SD)	Pişmemiş levrek (µg/kg ± SD)	Izgara levrek (µg/kg ± SD)	Pişmemiş et (µg/kg ± SD)	Izgara et (µg/kg ± SD)	Odun kömürü (µg/kg ± SD)
Flourene	493 ± 5	756 ± 23	40 ± 1	618 ± 15	199 ± 58	132 ± 9	ND
Phenanthrene	318 ± 4	960 ± 13	111 ± 2	855 ± 18	234 ± 7	464 ± 14	186 ± 13
Anthracene	306 ± 12	533 ± 9	621 ± 24	4970 ± 57	ND	1682 ± 75	ND
Flouranthene	ND	467 ± 15	169 ± 4	383 ± 13	ND	397 ± 35	ND
Pyrene	ND	250 ± 18	31 ± 1	136 ± 3	ND	82 ± 5	ND
Benzo[b]flourene	ND	ND	ND	ND	34 ± 1	33 ± 1	ND
Benzo[a]anthracene	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Benzo[k]flouranthene	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Benzo[a]pyrene	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: tanımlanamadı

6. SONUÇ

Dokuz farklı PAH standardını içeren çözeltilerle yapılan çalışmalarda PAH analizleri için amaçlanan HPLC–UV–Vis yönteminin tekrarlanabilirliği % 0.12 ile % 1.4 (RSD) arasında, doğruluğunun % 8 bağıl hatanın altında, analiz süresinin 10 dakikadan daha kısa ve tanımlama sınırlarının 1–10 µg/L olduğu hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar geliştirilen HPLC–UV–Vis yönteminin yağ ve gıda maddelerindeki PAH'ların analizleri için uygulanabilir olduğunu göstermiştir.

Poliaromatik hidrokarbonların sıvı yağlardan ekstraksiyonu için sabunlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Yağların sabunlaştırılmasından sonra PAH'lar toluen fazına çekilir ve toluen evapore edildikten sonra ekstrakt asetronitril içerisinde çözülerek kolon kromatografisine verilir. PAH'lar hekzan: DMC ile kolondan alınarak tekrardan evapore edilir ve 2 ml asetronitril içerisine alınır. Ekstraksiyon işlemlerindeki zorluk sabunumsu maddenin toluen fazından uzaklaştırılması olmuştur. Et, balık ve kömür örneklerinin ekstraksiyonları toluen ile ultrasonik banyoda yapılmıştır. Ekstrakt evapore edildikten sonra PAH'lar 2 ml asetronitril içerisine alınmıştır ve yağ örneklerinde olduğu gibi kolon kromatografisi ile saflandırılmıştır.

Yağlarla yapılan geri kazanım çalışmalarında verim % 80, et ve balık için ise % 60'lar civarında bulunmuştur. Özellikle et ve balık için geri kazanımın düşük düzeylerde olması ekstraktın kolondan dört kez geçirilmesinden kaynaklanmaktadır. Dolayısı ile ekstraksiyon prosedürü daha iyi sonuçlar alınabilmesi için geliştirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Sıvı yağlarla yapılan çalışmalarda mısır yağı, ayçiçeği yağı ve zeytinyağı olmak üzere üç farklı örnek ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu yağlarda tayini yapılan PAH'ların farklı miktarlarda oldukları tespit edilmiştir. Özellikle mısır yağı örneklerde çalışmada kullanılan PAH'ların tamamının olduğu kalitatif ve kantitatif olarak, ayçiçeği yağında kalitatif olarak dokuz kantitatif olarak altı ve zeytin yağında ise kalitatif olarak beş kantitatif olarak üçünün bulunduğu tespit edilmiştir. Genel olarak her iki tür örnekte kantitatif olarak tayin edilen PAH'lar limit değer olarak kabul edilen 25 µg/L değerinden daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar piyasada satılan bütün yağ ürünlerinde aynı düzeyde PAH olduğu anlamına gelmez. PAH'lar yağların üretim ve yağın elde edildiği bitkinin yetişme şartlarına ve türüne bağlı olarak farklı miktarlarda bulunmaktadır. Dolayısıyla diğer farklı marka yağlarda farklı miktarlarda PAH bulunabilir.

Et ve balık örneklerinin analizlerinde ise et, alabalık ve levrek örnekleri kullanılmıştır. Buradaki temel amaç et, tatlı su ve tuzlu suda yaşayan balıklardaki PAH'ların düzeylerini ve izgaralama işleminden sonra gıdalara geçen PAH'ların olup olmadığı ve ayrıca bunların

miktarlarını saptamaktır. Örnekler ilk olarak pişirilmeden ve sonrada odun kömürü ile ızgarada pişirildikten sonra analizler gerçekleştirilmiştir. Analizi yapılan balık ve et örneklerinde PAH'ların bulunduğu ve birbirilerinden farklı miktarlarda olduğu tespit edilmiştir. Özellikle ızgaralama sonucunda örneklerdeki PAH miktarının arttığı ve farklı PAH'ların da gıdalara bulaştığı görülmüştür. Bunun nedeni gıdaların yüzeyindeki yağın eriyerek ısınan yüzeye düşerek proliz olayı sonucunda PAH'ların oluşması ve bu PAH'ların duman ile birlikte gıdalarda birikmesi olduğu düşünülmektedir.

Kömür örneklerinde ise tayin edilen PAH'lardan sadece phenanthrene bulunduğu belirlenmiştir. Ancak kömür yandıktan sonra oluşan yüksek sıcaklık nedeniyle proliz olayı sonucunda farklı PAH'ların oluştuğu ve dumanla birlikte atmosfere karıştığı düşünülmektedir.

HPLC–UV–Vis yöntemi sıvı yağlarda, et ve balık gibi gıda maddelerinde ve odun kömüründeki poliaromatik hidrokarbonların tayinlerinde kullanılabilecek bir yöntem olduğu sonuçlardan anlaşılmaktadır. PAH'ların tanımlama sınırının kilogram başına mikro gram olarak tespit edildiği düşünüldüğünde geliştirilmiş olan bu metodun oldukça duyarlı ölçümlerde kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Harold, H., Hart, D. J. And Craine, L. E., Organik chemistry, Ninth Ed, Palmer Publishing, New Jersey, 1998. Çeviri Ed. Tahsin Uyar, Ankara, 1998.
2. Kim, I.S., Ritchie, L., Setford, S., Taylor, J., Allen, M., Wilson, G., Heywood, R., Pahlavanpour, B., Saini, S., 2001, quantitative immunoassay for determining polyaromatic hydrocarbons in electrical insulating oils, *Analytica Chimica Acta*, 450, 13-25, 2001.
3. Järvenpää, E., Huopalahti, R., Tapanainen, P, 1996. use of supercritical fluid extraction-high performance liquid chromatography in the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons from smoked and broiled fish, *J. Liq. Chrom. & rel. Technol.*, 19(9), 1473-1482, 1996.
4. Moret, S., Conte S, Lanfranco., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical method, *A*, 882, 245-253, 2000.
5. Gong Z., Wilke B.-M., Alef, K, Li, P., 2005, influence of soil moisture on sunflower oil extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from a manufactured gas plant soil, *Science of the Total Environment*, 343, 51-59, 2005.
6. Barranco, A., Alonso-Salces, R.M., Bakkali, A., Berrueta, L. A., Gallo, B., Vicente, F., Sarobe, M., 2003, Solid-phase clean-up in the liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils, *Journal of chromatography A*, 988, 33-40, 2003.
7. Gong, Z., Alef, K, Wilke, B.-M., Li, P., 2005, Dissolution and removal of PAHs from a contaminated soil using sunflower oil, *Chemosphere*, 58, 291-298, 2005.
8. Pensado, L., Casais, M. C., Mejuto, M. C., Cela, R., 2005. Application of matrix solid-phase in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples, *Journal of chromatography A*, 1077, 103-109, 2005.
9. Domeño, C., Nerin C., 2003, Fate of polyaromatic hydrocarbons in the pyrolysis of industrial waste oils, 2003, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 67, 237-246, 2003.
10. Quiroz, R., Popp, P., Urrutia, R., Bauer, C., Araneda, A., Treutler, H.C., Bara, R., 2005, PAH fluxes in the Laja Lake of South central Chile Andes over the last 50 years: Evidence from a dated sediment core, *science of the Total Environment*, 349, 150-160, 2005.
11. Stolyhwo, A., Sikorski E, Z., Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish – a critical review, 2000, *Food chemistry*, 91, 303-311, 2005.
12. Boco, S., Moragues, M., Doumenq, P., Noor, A., Mille, G., 2003. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil by Curie point pyrolysis coupled to gas chromatography-mass spectrometry, an alternative to conventional methods, *Journal of chromatography A*, 1026, 223-229, 2003.

13. Lawrence F., James., and Weber F, Dorcas., 1984, Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Some Canadian Commercial Fish, Shelfish, and Meat Products by Liquid Chromatography with Confirmation by Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry, vol. 32, No. 4, 1984.
14. Anyakora, C., Ogbeche, A., Palmer, P., Coker, H., Ukpo, G., Ogah, C., 2005, GC/MS analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons in sediment samples from the Niger Delta region, Chemosphere, 60, 990-997, 2005.
15. Saitoh, T., Matsushima S., Hiraide M., 2005, Concentration of poyaromatic hydrocarbons in water to sodium dodecyl sulfate- γ -alumina admicelle, Journal of chromatography A, 1069, 271-274, 2005.
16. Moret, S., Conte, L., and Dean, D., 1999, Assesment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Content of Smoked Fish by Means of a Fast HPLC/HPLC Method, 1999, Journal of agriculture and Food Chemistry, 47, 1367-1371, 1999.
17. Gördü, Y. E., Sulu Ortamdaki İnorganik Arsenik Bileşiklerinin Trlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Manisa, 2005.
18. Skoog, A.D., Holler, J., Nieman, T.A., Çeviri Editörleri, Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., Enstrümental Analiz İlkeleri, Bilim yayınları, 1997.
19. DİKMAN, E., Enstrümental Analiz, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1988.
20. <http://www.atal.tubitak.gov.tr/teknik/hplct.htm>, 2005
21. <http://ebiltem.ege.edu.tr/Cihaz/lac-5.html>, 2005
22. Skoog, A.D., West, M.D., Holler, J., Çeviri Editörleri, Kılıç, E., Köseoğlu, F., Analitik Kimya Temelleri, 1.Cilt, Bilim Yayınları, 1996.