

**KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**SİGARA İZMARİT ZİFİRİNDE PAH'LARIN HPLC/UV SİSTEMDE
TAYİNİ: ZENGİNLEŞTİRME VE ÖN TEMİZLEMEDE OYUK (HOLLOW)
FİBER SIVI FAZ MİKROEKSTRAKSİYON'UN (HF-LPME) KULLANILMASI**

Erol ALVER

NİSAN 2011

Kimya Anabilim Dalında Erol ALVER tarafından hazırlanan SİGARA İZMARİT ZİFİRİNDE PAH'LARIN HPLC/UV SİSTEMDE TAYİNİ: ZENGİNLEŞTİRME VE ÖN TEMİZLEMEDE OYUK (HOLLOW) FİBER SIVI FAZ MİKROEKSTRAKSİYON'UN (HF-LPME) KULLANILMASI adlı Doktora Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Zeki ÖKTEM
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumuzu ve tezin **Doktora Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Yrd. Doç. Dr. Ayla DEMİRCİ
Ortak Danışman

Prof. Dr. Mustafa ÖZCİMDER
Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan: Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK _____
Üye (Danışman): Prof. Dr. Mustafa ÖZCİMDER _____
Üye: Prof. Dr. Zeki ÖKTEM _____
Üye: Doç. Dr. Ş. Fatma AYGÜN _____
Üye: Doç. Dr. Adem ASAN _____

.../.../.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Doktora derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. İhsan ULUER
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

SİGARA İZMARİT ZİFİRİNDE PAH'LARIN HPLC/UV SİSTEMDE
TAYİNİ: ZENGİNLEŞTİRME VE ÖN TEMİZLEMEDE OYUK (HOLLOW)
FİBER SIVI FAZ MİKROEKSTRAKSİYON'UN (HF-LPME) KULLANILMASI

ALVER, Erol

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Doktora tezi

Danışman: Prof. Dr. Mustafa ÖZCİMDER

Ortak Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ayla DEMİRCİ

Nisan 2011, 126 sayfa

Bu çalışmada, sigara izmarit zifirindeki polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) tayini için yüksek basınç sıvı kromatografik (HPLC) yöntem geliştirilmiştir. Yöntem, zenginleştirme ve ön temizleme için oyuk (hollow) fiber sıvı faz mikroekstraksiyonun (HF-LPME) uygulanmasına dayanmaktadır. Sigara filtresi ve filtre zifiri asetonitrilde çözüldü. HF-LPME'de verici faz asetonitril/su karışımı kullanıldığı için gerçek sigara örnekleri ile çalışmadan önce model PAH çözeltileri ile verici fazdaki asetonitril/su oranı, pH, alıcı faz türü, karıştırma hızı, karıştırma zamanı gibi parametreler optimize edilmiştir. Alıcı fazın kromatografik analizi C18 ters faz kolon ve UV detektör sistemi ile yapılmıştır. Belirlenen optimum koşullarda model örnekler ile ekstraksiyon sonrasında geri alınabilirlik yüzdeleri 63 ile 97 arasında, zenginleştirme faktörleri ise 208 (BaP) ile 319 (An) arasında bulunmuştur. Gerçek örneklerden geri alınabilirlikler % 8 ile % 71 arasında, zenginleştirme faktörleri 27 (BbF) ile 234 (An) arasında bulunmuştur. Çalışmada farklı marka sigara izmaritlerindeki altı polisiklik aromatik

hidrokarbon tayin edilmiştir. Altı PAH'ın en küçük tayin sınırları (LOD) 1.65 ng/sigara ile 14.15 ng/sigara arasında bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Sigara, PAH, HPLC, Mikroekstraksiyon

ABSTRACT

DETERMINATION OF PAHs IN CIGARETTE FILTER TAR BY MEANS OF HPLC/UV SYSTEM: USE OF HOLLOW FIBER LIQUID PHASE MICROEXTRACTION (HF-LPME) FOR ENRICHMENT AND CLEAN-UP PROCESSES

ALVER, Erol

Kirikkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry, Ph. D. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa ÖZCİMDER

Co-Supervisor: Assist. Dr. Ayla DEMİRCİ

April 2011, 126 pages

In this work, a high pressure liquid chromatographic (HPLC) method has been developed to determine polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in cigarette filter tar. The method is based on the application of hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) as clean-up and enrichment steps. Cigarette filter and filter tar were dissolved in acetonitrile. The donor phase for HF-LPME is a mixture of acetonitrile and water. Therefore, before working with real cigarette samples, some preliminary experiments were to be carried out to find the optimum starting HF-LPME conditions such as, donor phase composition (acetonitrile/water), pH, type acceptor phase, mixing rate and extraction time. These experiments were carried out with model PAHs solutions. The chromatographic analysis of acceptor solution was performed using C18 reversed phase column, and UV detector system. Under optimum conditions, percent recoveries and enrichment factors ranged from 63 to 97 and from 208 (BaP) to 319 (An) respectively for model PAHs

solutions. The recoveries from real samples were between 8 and 71%, whilst the enrichment factors ranged from 27 (BbF) to 234 (An). The concentrations of the six polycyclic aromatic hydrocarbons in real samples (various types of cigarettes) were determined. The LODs of the six PAHs were found between 1.65 and 14.15 ng/cigarette filter.

Key Words: Cigarette, PAH, HPLC, Microextraction

TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarımnda bana destek olan ve her konuda yardımlarını gördüğüm danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa ÖZCİMDER'e ve ortak danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayla DEMİRÇİ'ye sonsuz teŐekkürlerimi sunarım. Tez İzleme Komitesinde bulunan ve görüşleri ile çalıŐmalarıma katkıda bulunan Sayın Doç. Dr. Ő. Fatma AYGÜN hocama teşekkür ederim.

Çalışmada kullandığım polipropilen hollow fiberi gönderen "Membrana" (Wurperral, Almanya) firmasına ve çalıŐmamı "Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi"den proje ile destekleyen Kırıkkale Üniversitesine teşekkür ederim.

Ayrıca eğitim öğretim hayatım boyunca fedakârca destek olan anneme ve babama, çalıŐmalarım süresince sabır gösterip fedakârca destek olan sevgili eşime ve bu süreçte çok az zaman ayırdığım oğluma, teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tütün	1
1.1.1. Tütünün Tarihçesi	1
1.1.2. Tütünün Kullanıldığı Yerler	2
1.1.3. Tütünün Kimyasal Bileşimi	2
1.1.4. Sigara ve Zararları	3
1.2. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH)	8
1.2.1. PAH'ların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	10
1.2.2. PAH'ların İnsan ve Hayvan Sağlığı Üzerine Etkileri	14
1.2.3. PAH'ların Tayin Edilme Yöntemleri	16
1.3. Yüksek Basınç Sıvı Kromatografi (HPLC)	16
1.4. Kromatografik Analiz İçin Örnek Hazırlama	21
1.5. Mikroekstraksiyon	22
1.5.1. Katı Faz Mikroekstraksiyon (SPME)	23
1.5.2. Manyetik Karıştırma Çubuğu İle Ekstraksiyon (SBSE)	29
1.5.3. Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (LPME)	30
1.5.3.1. Asılı Damla Mikroekstraksiyon (SDME)	31
1.5.3.2. Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon (DLLME)	36

1.5.3.3. Yüzen Katı Organik Damla Mikroekstraksiyon (SFODME)	38
1.4.3.4. Oyuk (Hollow) Fiber Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (HF-LPME)	40
1.6. İzmarit Zifiri Analizi	46
1.7. Çalışmanın Amacı	50
2. MATERYAL VE YÖNTEM	51
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	51
2.1.1. Kimyasallar	51
2.1.2. Cihazlar	52
2.2. PAH Çözeltileri	52
2.3. PAH Standart Çalışma Çözeltileri	52
2.4. Fiberin Temizlenmesi ve Hazırlanması	53
2.5. Fiberin Boşluk ve Gözenek Hacminin Bulunması	53
2.6. Kromatografik Koşullar	54
2.7. Yöntem	55
2.8. Fiber İle Mikroekstraksiyon ve Etkili Parametreler (Model Örnekler)	56
2.8.1. Verici Fazda ACN Değişimi	57
2.8.2. Karıştırma Hızı	57
2.8.3. Karıştırma Zamanı	58
2.8.4. Tuz Değişimi	58
2.8.5. pH	58
2.8.6. Alıcı Faz Türü	58
2.8.7. Verici Faz Hacmi	59
2.8.8. PAH Değişimi	59
2.9. PAH Eklenmiş Zifir Örneklerinden Fiber İle Mikroekstraksiyon	59
2.10. Gerçek Örneklerden Ekstraksiyon (HF-LPME)	62

2.11. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon	62
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	63
3.1. Fiberin Boşluk ve Gözenek Hacmi	63
3.2. Ekstraksiyon Verimine Etki Eden Parametreler	64
3.2.1. Verici Fazdaki Asetonitril–Su Değişimi	65
3.2.2. Karıştırma Hızı	68
3.2.3. Karıştırma Zamanı	71
3.2.4. Ekstraksiyon Ortamındaki Tuz Miktarı	74
3.2.5. Verici Faz pH'sı	76
3.2.6. Alıcı Fazın Türü	79
3.2.7. Verici Faz Hacmi	79
3.2.8. Ortamdaki PAH Miktarı	81
3.3. Gerçek Örnekler	87
3.3.1. İzmaritlerde PAH'ların Tayini	100
3.4. Yöntemin Değerlendirilmesi	102
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	105
KAYNAKLAR	112
ÖZGEÇMİŞ	126

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Bazı PAH'ların Molekül Yapısı	11
1.2. Düzlemsel PAH'ların L/B Gösterimi	13
1.3. Düzlemsel Olmayan Moleküller İçin L/B'nin Algoritmik Gösterimi ...	13
1.4. Kromatogram	18
1.5. Yüksek Basınç Sıvı Kromatograf Şeması	20
1.6. Katı Faz Mikroekstraksiyon (SPME) Enjektörü	24
1.7. SPME Sistemi (A: Doğrudan Ekstraksiyon, B: Tepe Boşluklu (Headspace) Ekstraksiyon	25
1.8. Manyetik Karıştırma Çubuğu ile Ekstraksiyon (SBSE) Sistemi	30
1.9. Asılı Damla Mikroekstraksiyon Sistemi (A: Doğrudan Daldırma, DI-SDME; B: Tepe Boşluklu, HS-SDME)	33
1.10. Asılı Damla Mikroekstraksiyon (Üçlü Faz-SDME) Sistemi	34
1.11. Sürekli Akış Mikroekstraksiyon (CFME) Sistemi	35
1.12. Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon (DLLME)	37
1.13. Yüzen Katı Organik Damla Mikroekstraksiyon (SFODME) Sistemi	39
1.14. Polipropilen Hollow Fiberin Duvar Kesiti	41
1.15. Oyuk (Hollow) Fiber Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (HF-LPME) Sistemi	41
1.16. "U" Şeklinde HF-LPME Sistemi	42
1.17. İkili ve Üçlü Faz HF-LPME Gösterimi	45
2.1. Polipropilen Fiberin Özellikleri	54
3.1. Pik Alanlarının Verici Fazdaki Asetonitril Derişimi ile Değişimi	66
3.2. Zenginleştirme Faktörlerinin Verici Fazdaki Asetonitril Derişimi ile Değişimi	67
3.3. Yüzde Geri Alınabilirliklerin Verici Fazdaki Asetonitril Derişimi ile Değişimi	67

3.4. Pik Alanlarının Karıştırma Hızı İle Değişim	69
3.5. Zenginleştirme Faktörlerinin Karıştırma Hızı İle Değişimi	70
3.6. Yüzde Geri Alınabilirliklerin Karıştırma Hızı İle Değişimi	70
3.7. Pik Alanlarının Karıştırma Zamanı İle Değişim	72
3.8. Zenginleştirme Faktörlerinin Karıştırma Zamanı İle Değişimi	73
3.9. Yüzde Geri Alınabilirliklerin Karıştırma Zamanı İle Değişimi	73
3.10. Pik Alanlarının Tuz Derişimi İle Değişimi	75
3.11. Zenginleştirme Faktörlerinin Tuz Derişimi İle Değişimi	75
3.12. Yüzde Geri Alınabilirliklerin Tuz Derişimi İle Değişimi	76
3.13. Pik Alanlarının pH'a Göre Değişimi	77
3.14. Zenginleştirme Faktörlerinin pH'a Göre Değişimi	78
3.15. Yüzde Geri Alınabilirliklerin pH'a Göre Değişimi	78
3.16. Model Örnekte Antrasen İçin Kalibrasyon Doğrusu	82
3.17. Model Örnekte Floranten İçin Kalibrasyon Doğrusu	83
3.18. Model Örnekte Piren İçin Kalibrasyon Doğrusu	83
3.19. Model Örnekte Benza[a]antrasen İçin Kalibrasyon Doğrusu	84
3.20. Model Örnekte Benzo[b]floranten İçin Kalibrasyon Doğrusu	84
3.21. Model Örnekte Benzo[a]piren İçin Kalibrasyon Doğrusu	85
3.22. Standart PAH Karışımının Kromatogramı	86
3.23. Hollow Fiber Mikroekstraksiyon Sonrası Kromatogram	86
3.24. Gerçek Örnekte Antrasen İçin Kalibrasyon Doğrusu	95
3.25. Gerçek Örnekte Floranten İçin Kalibrasyon Doğrusu	95
3.26. Gerçek Örnekte Piren İçin Kalibrasyon Doğrusu	96
3.27. Gerçek Örnekte Benza[a]antrasen İçin Kalibrasyon Doğrusu	96
3.28. Gerçek Örnekte Benzo[b]floranten İçin Kalibrasyon Doğrusu	97
3.29. Gerçek Örnekte Benzo[a]piren İçin Kalibrasyon Doğrusu	97
3.30. Standart Eklenmiş Gerçek Örneklerde HF-LPME Sonrası Kromatogram	99

3.31. Standart Eklenmemiş İzmarit Örneklerinden Sıvı–Sıvı Ekstraksiyon Sonrası Kromatogram	99
3.32. Gerçek Örnekten HF-LPME Sonrası Kromatogram	102
4.1. PAH'ların M_A 'larına Göre Zenginleştirme Faktörleri	108
4.2. PAH'ların L/B Oranına Göre Zenginleştirme Faktörleri	109
4.3. Çizelge 4.1'deki Parametrelerin Draftsman Grafiği	110
4.4. Çizelge 4.1'deki Parametrelerin İlk Esas Bileşen Değerleri	111

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Sigaradaki Filtre Durumuna Göre Ana Dumandaki Bazı Kimyasal Bileşenler	5
1.2. Filtresiz Sigarada Ana Dumanındaki Bazı Önemli Toksik Kimyasalar	7
1.3. Bazı PAH'ların Sigara Ana Dumanındaki Miktarları ve Kansorejenlik Sınıflandırılmaları	8
1.4.a. Bazı PAH'ların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	12
1.4.b. Bazı PAH'ların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri (Devam)	12
3.1. Verici Fazdaki Asetonitril Derişimine Göre Z.F. ve % R Değerleri ...	66
3.2. Karıştırma Hızına Göre Z.F. ve % R Değerleri	69
3.3. Karıştırma Zamanına Göre Z.F. ve % R Değerleri	72
3.4. Tuz Derişimine Göre Z.F. ve % R Değerleri	74
3.5. Ekstraksiyon Ortamının pH'sına Göre Z.F. ve % R Değerleri	77
3.6. Alıcı Fazın Türüne Göre Z.F. ve % R Değerleri	79
3.7. Verici Faz Hacmine Göre Z.F. ve % R Değerleri	80
3.8. Ortamdaki PAH Derişimine Göre Z.F. ve % R Değerleri	82
3.9. Model Örneklerde PAH'ların Kalibrasyon Doğru Denklemleri ve Tayin Sınırları	85
3.10. Optimum Koşullardaki Z.F. ve % R Değerleri	87
3.11. Deiyonize Su ile Çöktürme Sonrası Z.F. ve % R Değerleri	89
3.12. Santrifüj, Alumina ve Silika ile Ön Temizleme Sonrası Z.F. ve % R Değerleri	90
3.13. pH = 3 Olan Su ile Çöktürme Sonrası Z.F. ve % R Değerleri	91
3.14. Nylon Filtre ve Alümina ile Ön Temizleme Sonrası Z.F. ve % R Değerleri	93

3.15. Standart Eklenmiş Gerçek Örneklerde PAH Derişimine Göre Z.F. ve % R Değerleri	94
3.16. Standart Eklenmiş Gerçek Örneklerde Kalibrasyon Doğru Denklemleri ve Tayin Sınırları	98
3.17. İzmarit Zifirindeki PAH'ların Tayini İçin Analiz Basamakları	100
3.18. Farklı Markalara Ait Sigara İzmaritlerindeki PAH Miktarları	101
4.1. PAH'ların Zenginleştirme Faktörleri ve Bazı Özellikleri	108
4.2. Çizelge 4.1'deki Parametrelerin Korelasyon Matrisi	110

KISALTMALAR DİZİNİ

PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
IARC	International Agency for Research on Cancer
HPLC	Yüksek Basınç Sıvı Kromatografi
LC	Sıvı Kromatograf
LC-UV	Sıvı Kromatograf-UV Detektör
CE	Kapiler Elektroforez
GC	Gaz Kromatograf
GC-MS	Gaz Kromatograf-Kütle Spektrometresi
GC-ECD	Gaz Kromatograf-Elektron Yakalama Detektörü
GC-FID	Gaz Kromatograf-Alevde İyonlaşma Detektörü
US-EPA	United States Environmental Protection Agency
DahA	Dibenzo[a,h]antrasen
Np	Naftalin
Anp	Asenaftelen
Ane	Asenaften
Flr	Floren
Phe	Fenantren
An	Antrasen
Flu	Floranten
Py	Piren
BaA	Benzo[a]antrasen
Chr	Krisen
BbF	Benzo[b]floranten
BkF	Benzo[k]floranten
BjF	Benzo[j]floranten
BaF	Benzo[a]floranten
BbC	Benzo[b]krisen
IdcP	İndeno[1,2,3-cd]piren
BghiPy	Benzo[g,h,i]perilen
BaP	Benzo[a]piren

BeP	Benzo[e]piren
DajA	Dibenzo[a,j]antrasen
DacA	Dibenzo[a,c]antrasen
Pcn	Pisen
NPL	National Priorities List
DHHS	The Department of Health and Human Services
SPME	Katı Faz Mikroekstraksiyon
PDMS	Polidimetilsiloksan
DB	Divinilbenzen
SBSE	Stir Bar Sorbtive Ekstraksiyon
LPME	Sıvı Faz Mikroekstraksiyon
SDME	Tek Damla Mikroekstraksiyon
DLLME	Dağıtıcı Sıvı Sıvı Mikroekstraksiyon
SFODME	Yüzen Katı Organik Damla Mikroekstraksiyon
HF-LPME	Oyuk (Hollow) Fiber Sıvı Faz Mikroekstraksiyon
DI-SDME	Doğrudan Daldırma-Tek Damla Mikroekstraksiyon
HS-SDME	Tepe Boşluklu-Tek Damla Mikroekstraksiyon
CFME	Sürekli Akış Mikroekstraksiyon
LOD	Limit of Detection (En Küçük Tayin Sınırı)
DSDME	Doğrudan Askıda Damla Mikroekstraksiyon
GC-ECD	Gaz Kromatograf-Elektron Yakalama Detektörü
GC-FID	Gaz Kromatograf-Alevde İyonlaşma Detektörü
SLM	Sıvı Destekli Membran
HS-DHF-LPME	Dinamik Headspace Hollow Fiber Mikroekstraksiyon
ACN	Asetonitril
DCM	Diklorometan

1. GİRİŞ

Endüstriyel atıklar, tarım ilaçları, çöpler, sigara dumanı ve sanayi baca gazları gibi zararlı maddelerden çevreye gelen kimyasallar, hava, su, toprak ve gıdalara karıştıklarından dolayı insan sağlığını tehdit eden önemli çevresel kirleticilerdendir. Bu maddelerin içerisinde bulunan kükürt dioksit, azot oksitler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), pestisitler, insektisitler, metaller gibi birçok kirleticisi, insan sağlığı için toksik ve kanserojen etkiye sahiptir.

1.1. Tütün

Tütün (*Nicotiana*), patlıcangiller (*solanaceae*) familyasından *Nicotiana* cinsinden, yıllık, otsu bitki türlerine verilen addır. Haziran–Ağustos ayları arasında pembemsi renkli çiçekler açan, 0,75–1,5 m boylarında, bir yıllık kültür bitkisidir. Gövdeleri dik, silindir şeklinde, tüylü ve yapışkanlıdır. Yaprakları sapsız veya kısa saplı, büyük oval, tüylü, yapışkan, özel kokulu ve acı lezzetlidir. Çiçekler tepede salkım durumunda bulunurlar. Tüp şeklinde, pembemsi–kırmızı renkli, tüylü ve beş sivri dişli çiçeklere sahiptir [1].

1.1.1. Tütünün Tarihçesi

M.Ö. 1000 yıllarına ait Orta Amerika'daki antik tapınakların duvarlarında Maya rahiplerinin çubukla tütün içtiğini tasvir eden figürlerin bulunduğu oymalar görülmüştür. Kristof Kolomb'un Amerika'yı keşfine kadar, Avrupa'nın tütünden haberi olmamıştır. Kolomb ve arkadaşları, Amerikan yerlilerinin (kızıl derili) kuru bir otu mısır koçanına sararak içtiklerini, ağız ve burunlarından duman çıkardıklarını ve yerlilerin buna "tabaco" veya "tombac" adını verdiklerini görmüşlerdir. Tütün 1500'lü yıllarda İspanyol gemicileri vasıtasıyla İspanya'ya ve oradan Avrupa'ya yayılmıştır. Anadolu'ya ise Osmanlı İmparatorluğu zamanında (1605) Venedikli tüccarlar tarafından sokulmuş ve kısa bir zamanda yayılmıştır [1,2].

Avrupa, tütünü önce süs bitkisi olarak kullanmış kısa bir süre sonra da şifa bitkisi olarak kullanmaya başlamıştır. Tütün, öksürük, astım, baş ağrısı, bağırsak solucanları, açık yara tedavisi, kötü huylu (malign) tümör tedavisinde kullanılmıştır. Kullanımı toz olarak burna çekme, çiğneme veya lokal olarak bölgeye sürmek şeklinde olmuştur [3].

Tütün içerisinde en fazla bulunan bileşenden biri nikotindir. Nikotin adı, Fransa'nın Lizbon büyükelçisi Jan Nicot'un adından gelmiştir. Jan Nicot, bu bitkinin çıban ve yaraların tedavisinde kullanıldığını bir mektupla bildirmiş ve bitkinin fide ve tohumlarını kraliçeye göndermiştir [1].

1.1.2. Tütünün Kullanıldığı Yerler

Tütün yapraklarında tanen, zambak, nişasta, reçine ve alkaloidler bulunur. Bu alkaloidler içinde miktarı en fazla olan Nikotin alkaloididir ve kötü kokuludur. Tütün yaprağından hazırlanan infüzyonlar (% 1'lik) vücut parazitlerine karşı, sürülmek suretiyle kullanılabilir. Nikotinin sülfat tuzları zirai mücadelede böcek öldürücü, tütünün yaprakları ise keyif verici olarak sigara imalinde kullanılır. Ayrıca tütün yaprağı özel bir şekilde fermente edilerek kokulandırılıp, toz haline getirilerek enfiye adı verilen keyif verici ürün elde edilir. Tütün tohumları yağ bakımından zengindir. Tütün yağı, boya ve sabun sanayisinde kullanılır.

Tütün bitkisi, kurutulmuş yaprakların yakılması ile ortaya çıkan dumanın içe çekilmesi, tozlarının enfiye halinde buruna çekilmesi veya özel işlem görmüş yapraklarının çiğnenmesi suretiyle kullanılır [1].

1.1.3. Tütünün Kimyasal Bileşimi

Tütün yapraklarında birçoğu zararlı birçok kimyasal mevcuttur. Kurutma işlemi ile tütün yapraklarındaki nişasta önemli ölçüde azalırken indirgen şeker

miktarı % 100'e kadar artar. Protein ve nikotin içeriğinde ise bir miktar azalma olur. Fermantasyondan önce işlenmiş tütün yaprağının büyük bölümü karbonhidrat (yaklaşık % 50) ve proteinlerden oluşur. Kurutulmuş yaprağın fermantasyonu yapraklardaki karbonhidrat ve polifenol seviyesinin azalmasına neden olur. Tütün yaprağında bulunan diğer önemli bileşenler;

Alkaloidler % 0.5–5 , (% 85–95'i nikotin)
terpenler (% 0.1–3.0),
polifenoller (% 0.5–4.5),
fitosteroller (% 0.1–2.5%),
karboksilik asitler (% 0.1–0.7),
alkanlar (% 0.1–0.4),
aromatik hidrokarbonlar,
aldehitler,
ketonlar,
aminler,
nitrillerin,
N-ve O-heterosiklik hidrokarbonlar,
pestisitler,
alkali nitratlar (% 0,01–5) ve
en az 30 farklı anorganik bileşik sayılabilir [4,5].

1.1.4. Sigara ve Zararları

Sigara, kâğıda sarılı tütün içeren 85–100 mm uzunluğunda 4–8 mm çapında keyif verici bir maddedir. Sigara yakılmasından sonra ortaya çıkan dumanın ağızdan vücuda çekilmesi ile içilir [1].

Sigara dört ana kısımdan oluşur:

- Tütün çubuğu,
- Tütün çubuğunun etrafını saran sigara kâğıdı,

- Filtre bölgesi,
- Filtre ve filtre bölgesinin etrafındaki filtre kâğıdı.

Tütün: Çubuk bölgesinde bulunur ve yaprak ayası (tütün yaprağının düz bölümü), yaprak gövdesi (yaprağın orta damarı) ve genişleştirilmiş tütün tabakasından oluşur.

Tütün kâğıdı ve filtre kâğıdı: Kâğıt ve yapıştırıcıdan oluşur. Tütün çubuğu ve filtre kâğıdının özellikleri ayarlanabilir. Kâğıdın gözenek yapısı ayarlanarak sigaradan çekilen duman miktarı değiştirilip sigaranın tadı ve sertliği ayarlanabilir. Gözenek yapısının artırılması ile çekilen hava miktarı artırılarak duman miktarı azaltılabilir. Dolayısı ile vücuda giren duman bileşenlerinin miktarı azaltılabilir. Kâğıt sigaradaki yanmayı etkileyen faktörlerdendir. Katkı maddesi olarak kâğıda % 20–30 arasında kalsiyum karbonat eklenir. Ayrıca yanmayı kolaylaştırmak için % 2 civarında sodyum veya potasyum sitrat tuzu eklenir [1,6].

Sigara filtresi: Sigara filtreleri 1930'larda ortaya çıkmasına rağmen 1950'li yılların başlarında sigara dumanındaki zifirin (katran) sigaraya bağlı hastalıklarda sebep olarak görülmeye başlanmasından sonra önemi artmaya başlamıştır. Filtre olarak kâğıt, asbest, karbon ve selüloz asetat gibi maddeler kullanılmıştır. Haag vd. (1959) tarafından karbon filtre yardımı ile sigara dumanındaki uçucu bileşenlerin azaltılabileceği bildirilmiştir. Karbon filtreler hidrojen siyanür, formaldehit, akrolein, asetaldehit gibi toksik maddeleri, sigaradaki ana dumanda (mainstream) % 66'ya kadar azaltabilmelerine rağmen sigara ana dumanındaki zifirin azaltılmasında selüloz asetat filtreler kadar etkin değildir [7,8].

Günümüzde sigarada selüloz asetat filtreler yaygın şekilde kullanılmaktadır. Selüloz asetat, kâğıt hamuru veya ketenden elde edilir. Lifler, bir sertleştirici etken olan ve filtrenin şeklini korumasını sağlayan "triasetin plastik yapıcı" ile birbirine bağlanır. Filtre kâğıda sarılır ve bir yapıştırıcı ile bu kâğıt tutturulur. Filtrenin etkinliğini artırmak için bazı filtrelerde selüloz asetat içerisine

karbon parçaları katılarak da kullanılmaktadır [2]. Sigara filtreleri, sigara dumanında bulunan kimyasal bileşenlerin azaltılmasında önemli rol oynamaktadırlar. Çizelge 1.1’de filtreli ve filtresiz sigara ana dumanındaki bazı kimyasal bileşenler ve bulunan miktarları görülmektedir [8,9].

Çizelge 1.1. Sigaradaki Filtre Durumuna Göre Ana Dumandaki Bazı Kimyasal Bileşenler

Bileşik	A	B	C	D
Karbon monoksit (mL)	16.2	19.2	8.62	6.66
Hidrojen siyanür (µg)	368	296	201	109
Azot oksit (NOx) (µg)	406	438	364	224
Formaldehit (µg)	36.0	20.9	31.7	21.4
Asetaldehit (µg)	1040	1290	608	550
Akrolein (µg)	105	104	58.6	48.6
Zifir (mg)	27.0	14.7	19.2	19.5
Nikotin (mg)	1.8	0.94	1.31	1.5
Fenol (µg)	161	61.7	122	129
Benzo[a]antrasen (ng)	40.6	35.3	38.5	40.1
Benzo[a]piren (ng)	29.9	19.6	29.2	23.9

A: Filtresiz sigara ana dumanı

B: Selüloz Asetat Filtreden geçen sigara ana dumanı

C: Delikli selüloz asetat filtreden geçen sigara ana dumanı

D: Delikli selüloz asetat filtreden ve gözenekli kâğıttan geçen sigara ana dumanı

Tütün dumanı karmaşık bir kimyasal yapıya sahiptir. Dumanda 4800’ün üzerinde kimyasal tanımlanmıştır [10,11]. Bunların yaklaşık 400–500 tanesi gaz fazında olup yaklaşık 300 tanesi yarı uçucu bileşiklerdir [12-14]. Sigara dumanındaki kimyasalların birçoğu insanlar için kanserojen ve toksik etkiye sahiptir. Sigara dumanında bulunan maddeler tütünün tipi, yanma sıcaklığı, sigaranın uzunluğu, sigara kâğıdının ve filtre kâğıdının gözenekliliği, filtre ve tütüne ilave edilen katkı maddeleri gibi faktörlerden etkilenmektedir.

Sigara dumanı partikül ve gaz faz olarak ikiye ayrılır. Gaz fazında karbon monoksit (% 5), karbondioksit, azot oksit, amonyak, formaldehit, benzen ve hidrojen siyanür gibi kimyasallar bulunur. Partikül fazında ise nikotin, fenol

naftalin, kadmiyum gibi bileşikler bulunur. Partikül fazındaki bileşikler nikotin hariç zifir olarak adlandırılır.

Sigara dumanı ayrıca ana duman (mainstream) ve yan duman (sidestream) olarak da sınıflandırılır. Sigaranın ağız kısmından içeriye çekilen duman “Ana Duman”, yanan sigaranın ucundan kendiliğinden çıkan duman ise “Yan Duman” olarak tanımlanmaktadır. Yan dumanda, bir filtreden geçmediği için ana dumana göre bazı kimyasallar yüz kat daha fazla bulunur [15].

Sigara dumanında insan sağlığını etkileyen en önemli bileşenler zifir, nikotin ve karbon monoksittir. Dünyadaki pek çok ülke tarafından bu bileşenlerin sigarada bulunan miktarlarına sınırlama getirilmiştir.

Zifir, sigara dumanında partikül fazında bulunan su ve nikotin çıkarıldıktan sonra geriye kalan ve oldukça karmaşık yapıya sahip çeşitli kimyasal bileşenlerden oluşur. Birçok toksik ve kanserojen bileşik içerir.

Nikotin, tütün bitkisinde doğal olarak bulunur ve dumanın temel bileşenleri arasında yer alır. Nikotin merkezi sinir sistemini uyarır ve bağımlılık yapmasının yanı sıra insan vücuduna birçok zararlı etkisi vardır.

Karbon monoksit, organik maddelerin yanmasıyla oluşan bir gazdır. Kandaki hemoglobinle birleşerek kanın oksijen taşıma kapasitesini azaltır. Tütün dumanındaki karbon monoksitin sigaraya bağlı kalp hastalığı riskini artırdığı düşünülmektedir [2].

Sigara içimi yaygınlaşınca kadar çok küçük zararları olabileceği tespiti yapılmıştır. İlk zararlı etki Sömmering (1975) tarafından dudak kanserine sebep olduğunu açıklaması ile bildirilmiştir. 19. yüzyıl boyunca Fransa (Bouisson, 1859), Almanya (Virchow, 1863–67) ve İngiltere (Anon, 1890) klinik çalışmalarda sigara dumanının dilde ve ağızın diğer bölgelerinde kansere sebep olduğunu bildirmişlerdir. Sigara dumanının insan vücudunda kansere neden olma sebepleri artık bugün kolaylıkla açıklanabilmektedir [3].

Sigara zifirinin kanser ile ilişkisini ilk olarak Wynder vd. (1953) laboratuvarda fare derilerine zifir uygulayarak göstermiştir. Çizelge 1.2'de sigara ana dumanındaki yüksek derecede toksik bazı kimyasallar görülmektedir [8].

Çizelge 1.2. Filtresiz Sigaranın Ana Dumanındaki Bazı Önemli Toksik Kimyasallar

Bileşik	Miktar, µg	Toksik Etkisi
Karbon monoksit	(10–23)x10 ³	Solunumu kısıtlar, Hemoglobine bağlanır
Amonyak	10–130	Solunum yolu tahrişi
Azot oksit (NOx)	100–600	Akciğer iltihabı
Hidrojen siyanür	400–500	Yüksek oranda silia için toksik ve akciğerin temizlenmesini yavaşlatır.
Hidrojen sülfid	10–90	Solunum yolu tahrişi
Akrolein	60–140	Silialar için toksik ve akciğerin temizlenmesini yavaşlatır.
Metanol	100–250	Solunduğunda ve yutulduğunda toksik
Piridin	16–40	Solunum yolu rahatsızlıkları
Nikotin	1.0–3.0	Bağımlılığa sebep olur, kalp damar ve endokrin sistemi etkiler
Fenol	80–160	Laboratuvar hayvanlarında tümör başlatıcı
Katekol	200–400	Laboratuvar hayvanlarında kanser oluşumuna yardımcı
Anilin	360–655	Methemoglobin oluşturur ve solunumu etkiler
Maleik hidrazid	1.16	Mutajenik ajan

Gelişmiş ülkelerde kanser ölümlerinin % 30'u tütün ürünlerinin kullanımından kaynaklanmaktadır. Tütün ürünleri gırtlak, ağız, yemek borusu, pankreas, böbrek, karaciğer, mesane, mide ve kolon kanserlerinden ölüme sebep olurlar [16].

Sigara dumanında, yüksek duyarlıklı analitik cihazlar ile 69 kanserojen bileşik tespit edilmiştir. Uluslararası Kanser Araştırma Birimi (International Agency for Research on Cancer, IARC) bunların 11 tanesini kanserojen (Grup 1), 7 tanesini insanlar için yüksek olasılıkla kanserojen (2A), 49 tanesini de hayvanlar için kanserojen insanlar için ise muhtemel kanserojen ola-

rak sınıflandırmıştır. İki bileşik ise şüpheli görülmelerine rağmen henüz bir sınıflandırmaya tabi tutulmamıştır. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar da IARC tarafından bu sınıflandırmalara tabi tutulan bileşikler arasındadır. Çizelge 1.3'de Bazı PAH'ların sigara ana dumanındaki miktarları ve IARC tarafından belirlenen kanserojen dereceleri verilmiştir [8].

Çizelge 1.3. Bazı PAH'ların Fitresiz Sigara Ana Dumanındaki Miktarları ve Kanserojenlik Sınıflandırılmaları

PAH	Miktar (ng)	Kanserojenlik*
Benzo[a]antrasen	20–70	2A
Benzo[b]floranten	4–22	2B
Benzo[j]floranten	6–21	2B
Benzo[k]floranten	6–12	2B
Benzo[a]piren	20–40	2A
Dibenzo[a,h]antrasen	4	2A
Dibenzo[a,l]piren	1.7–3.2	2B
Dibenzo[a,e]piren	Var	2B
İndeno[1,2,3-cd]piren	4–20	2B
Metilkrisen	0.6	2B

*2A yüksek olasılıkla kanserojen, 2B insanlarda kansere sebep olabilir.

1.2. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH)

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar iki ya da daha fazla benzen halkasına sahip hidrofobik karakterli organik bileşiklerdir [17-19]. PAH'lar doğal ya da insan kaynaklı olarak organik bileşiklerin eksik yanması sonucu oluşurlar. Doğal şekilde, orman yangınları veya volkanik patlamalarla oluşur. İnsan kaynaklı oluşumları ise endüstriyel kaynaklar, motorlu taşıtlar ve sigara ile olmaktadır. Sigara ile ortaya çıkan PAH miktarı diğerlerine göre az olmasına rağmen insan sağlığı açısından en fazla tehdit oluşturan kaynaklar arasındadır [20]. Endüstriyel kaynaklar, çöp yakma, çimento fabrikaları, petrol rafinerileri, kok ve asfalt üretimi, alüminyum, demir çelik üretiminden kaynaklanmaktadır [21,22]. Isınma ve enerji amaçlı kullanılan kömür, odun gibi katı yakıtlar ve fosil yakıtlar da PAH oluşumuna neden olmaktadır [23-26].

PAH'ların, hidrofobik yapılarından dolayı sudaki çözünürlükleri oldukça azdır. Ancak yüksek oranda lipofilik özelliğe sahiptirler. Yapısında dörtten az benzen halkası bulunduran PAH'lar hafif PAH, dört ve daha fazla benzen halkası bulunduran PAH'lar ise ağır PAH olarak tanımlanır [27]. Hafif PAH'ların sudaki çözünürlükleri daha fazla ve buhar basınçları daha yüksektir. PAH'ların molekül ağırlıkları arttıkça sudaki çözünürlükleri azalmaktadır. Ancak toksik ve kanserojenik özellikleri artmaktadır [28,29].

PAH'lar toprakta, suda, havada ve gıda örneklerinde bulunmaktadır [27,30-32]. PAH'ların mutajenik, toksik ve kanserojenik oldukları bilinmektedir [19,33-35]. Bu tehlikelerinden dolayı çevrede, yiyecek ve içeceklerde bulunan miktarları insan sağlığı açısından önemli hale gelmiştir.

Evde PAH'lar tütün dumanı, yanan odun dumanı, tahıl, ekmek, sebze, meyve, et, işlenmiş veya salamura ürünler, kirlenmiş inek sütü veya anne sütünde mevcuttur. Kirlenmiş toprak, hava ve suda yetişen ürünler de PAH içerir. Et veya diğer yiyecekleri ızgarada veya yanacak şekilde yüksek sıcaklıklarda pişirme yiyeceklerdeki PAH miktarının artmasına neden olur [36].

Doğada 100'ün üzerinde PAH bileşiği mevcuttur [36-38]. Ancak Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Birimi (United States Environmental Protection Agency, US-EPA) tarafından bunların 16 tanesi öncelikli kirleticiler arasında sayılmıştır [39]. Bu 16 PAH;

Naftalin (Np)	Asenaftelen (Anp)
Asenaften (Ane)	Floren (Flr)
Fenantren (Phe)	Antrasen (An)
Floranten (Flu)	Piren (Py)
Benzo[a]antrasen (BaA)	Krisen (Chr)
Benzo[b]floranten (BbF)	Benzo[k]floranten (BkF)
Benzo[a]piren (BaP)	Dibenzo[a,h]antrasen (DahA)
İndeno[1,2,3-cd]piren(lcdP)	Benzo[g,h,i]perilen (BghiPy)'dir.

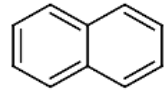
Bu bileşiklerin öncelikli kirleticiler arasında sayılmasının nedenleri olarak ise;

- I. Bu bileşikler hakkında diğerlerine göre daha fazla bilgiye sahip olunması,
- II. Bu PAH'ların daha fazla zararlı olduklarından şüphelenilmesi ve bunların zararlı etkilerinin gösterilmesi,
- III. Diğerlerinden daha çok bu PAH'lara maruz kalma riskinin fazla olması,
- IV. Amerika'daki Ulusal Öncelikler Listesi'inde (National Priorities List, NPL) bulunan atık alanlarında yapılan analizlerde en yüksek oranlarda bu PAH'ların belirlenmesi sayılabilir [36].

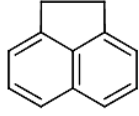
1.2.1. PAH'ların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Yanmanın tam olarak gerçekleşmemesi sonucunda oluşan PAH'lar genellikle tek bir bileşik olarak değil yanma ürününün kompleks bir karışımı olarak ortaya çıkarlar [36,40]. Ancak araştırma amaçlı saf bir bileşik olarak da üretilebilirler. Saf bileşik halinde PAH'lar renksiz, beyaz, açık sarı yeşil renkli, katı halde ve hafif hoş bir kokuya sahiptirler [36]. Şekil 1.1'de bazı PAH'ların molekül yapıları verilmiştir. PAH'lar azot oksit ve nitrik asit ile tepkimeye girerek nitro türevlerini, kükürt dioksitler ve sülfürik asitle reaksiyona girerek sülfürik ve sülfonik asit formlarını oluştururlar [22,41]. Ayrıca ozon ve hidroksil radikalleri ile de tepkime verirler [40].

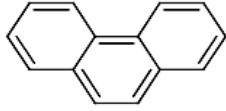
PAH'ların çevrede yayılmalarını sudaki çözünürlükleri, buhar basınçları, $\log K_{ow}$, gibi faktörler belirler. Çizelge 1.4.a ve b'de EPA tarafından öncelikli kirletici kabul edilen PAH'ların fiziksel ve kimyasal özellikleri verilmiştir. Çizelgede; CAS numarası, Amerikan Kimya Derneği'nin (American Chemical Society) bir alt bölümü olan "Chemical Abstracts Service" (CAS), tarafından bilinen tüm kimyasal bileşikler tanımlamak için verilen numaradır. K_{ow} bileşiğin sudan lipide geçiş potansiyelini gösterir. K_{oc} , bileşiğin toprakta bulunan organik karbon üzerine adsorblanma potansiyelini gösterir. Henry sabiti, denge durumunda bir bileşiğin sudaki ve havadaki derişimlerini açıklayan ve bu kimyasalın uçuculuk potansiyeliyle ilgili bilgi veren bir değerdir. L/B ise bileşiğin boy/en oranını vermektedir.



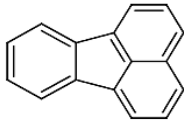
Naftalin (Np)



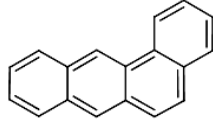
Asenaften (Ane)



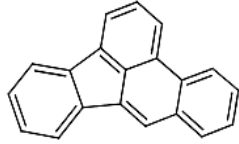
Fenantren (Phe)



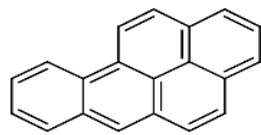
Floranten (Flu)



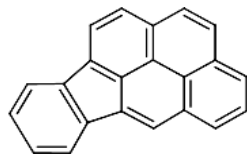
Benzo[a]antrasen (BaA)



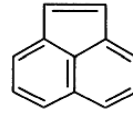
Benzo[b]floranten (BbF)



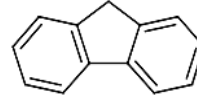
Benzo[a]piren (BaA)



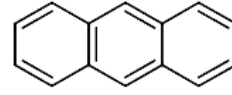
İndeno[1,2,3-cd]piren (IcdP)



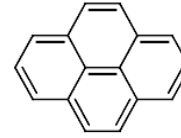
Asenaftelen (Anp)



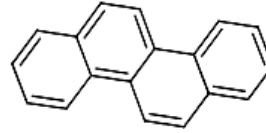
Floren (Flr)



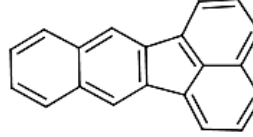
Antrasen (An)



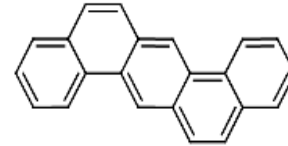
Piren (Py)



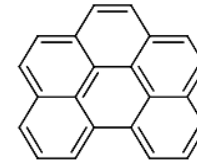
Krisen (Chr)



Benzo[k]floranten (BkF)



Dibenzo[a,h]antrasen (DahA)



Benzo[g,h,i]perilen (BghiPy)

Şekil 1.1. Bazı PAH'ların Molekül Yapısı

Çizelge 1.4.a. Bazı PAH'ların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri [22,36,42-46]

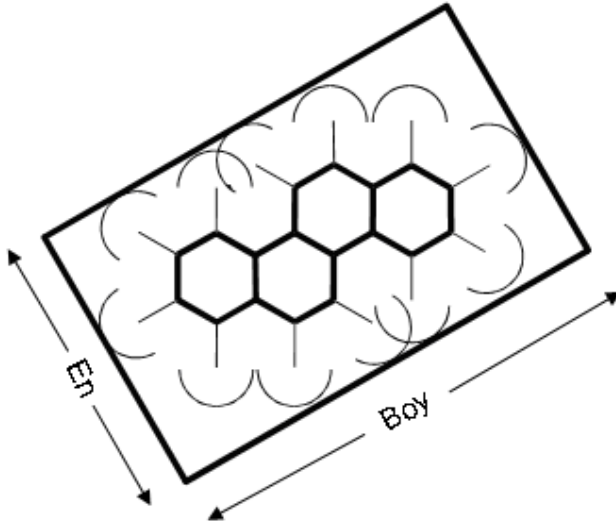
PAH	Np	Anp	Ane	Flr	Phe	An	Flu	Py	BaF	BjF	BbC
CAS Numarası	91-20-3	208-96-8	83-32-9	86-73-7	85-01-8	120-12-7	86-74-8	206-44-0	20333-8	20582-3	214-17-5
Molekül Formülü	C ₁₀ H ₈	C ₁₂ H ₈	C ₁₂ H ₁₀	C ₁₃ H ₁₀	C ₁₄ H ₁₀	C ₁₄ H ₁₀	C ₁₆ H ₁₀	C ₁₆ H ₁₀	C ₂₀ H ₁₂	C ₂₀ H ₁₂	C ₂₂ H ₁₄
Molekül Ağırlığı (g/mol)	128.17	152.20	154.21	166.22	178.23	178.23	202.25	202.25	252.3	252.3	278.35
Renk	-	-	Beyaz	Beyaz	Renksiz	Renksiz	Mat sarı	Renksiz	-	Sarı	-
Erime Noktası (°C)	80.2	92-93	95	116-117	100	218	109	156	-	166	-
Kaynama Noktası (°C)	217.9	265-275	96.2	295	340	342	375	393-404	-	-	-
Yoğunluk (g/cm ³)	-	-	1.225	1.203	0.98	1.283	1.252	1.271	-	-	-
Sudaki Çözünürlük (mg/L)	31	3.93	1.93	1.98	1.20	0.076	2.0-2.6	0.077	-	6.76x10 ⁻³	-
Buhar Basıncı (mm-Hg)	0.085	0.029	4.47x10 ⁻³	3.2x10 ⁻⁴	6.8x10 ⁻⁴	1.7x10 ⁻⁵	5x10 ⁻⁶	2.5x10 ⁻⁶	-	1.5x10 ⁻⁸	-
Log K _{ow}	3.3	4.07	3.98	4.18	4.45	4.45	4.90	4.88	-	6.12	-
Log K _{oc}	-	1.40	3.66	3.86	4.15	4.15	4.58	4.58	-	4.7	-
Henry Sabiti (atm.m ³ /mol)	0.44	1.45x10 ⁻³	7.91x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁴	2.56x10 ⁻⁵	1.77x10 ⁻⁵	6.5x10 ⁻⁶	1.14x10 ⁻⁵	-	1x10 ⁻⁶	-
L/B oranı	1.238	-	-	-	1.463	1.566	1.22	1.257	1.16	1.39	1.84

12

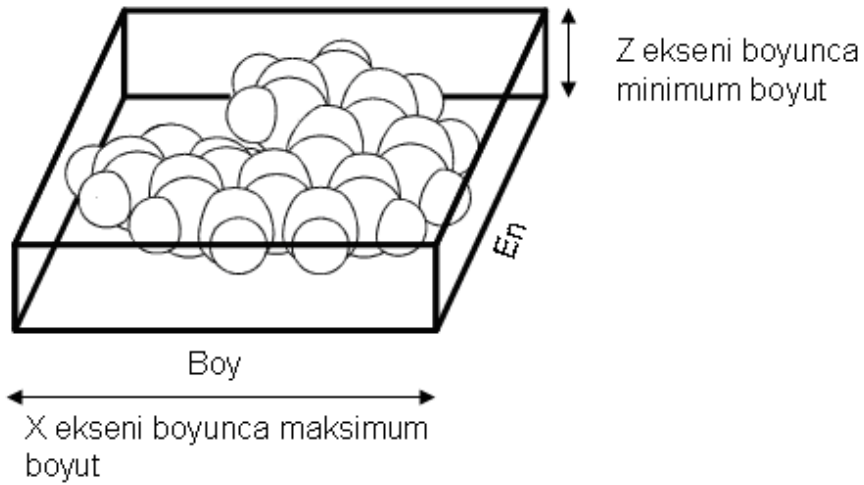
Çizelge 1.4.b. Bazı PAH'ların Fiziksel ve Kimyasal Özellikler

PAH	BaA	Chr	BbF	BkF	BaP	DahA	IcdP	BghiPy	DacA	DajA	Pcn
CAS Numarası	56-55-3	218-01-9	205-99-2	207-08-9	50-32-8	53-70-3	193-39-5	191-24-2	215-58-7	224-41-9	213-46-7
Molekül Formülü	C ₁₈ H ₁₂	C ₁₈ H ₁₂	C ₂₀ H ₁₂	C ₂₀ H ₁₂	C ₂₀ H ₁₂	C ₂₂ H ₁₄	C ₂₂ H ₁₂	C ₂₂ H ₁₂	C ₂₂ H ₁₄	C ₂₂ H ₁₄	C ₂₂ H ₁₄
Molekül Ağırlığı (g/mol)	228.29	228.3	252.3	252.3	252.3	278.35	276.3	276.34	278.35	278.35	278.35
Renk	Renksiz	Renksiz	Renksiz	Mat Sarı	Mat Sarı	Renksiz	Sarı	Matsarı	-	-	-
Erime Noktası (°C)	159-162	255-256	168.3	215.7	179	262	163.6	273	205	-	-
Kaynama Noktası (°C)	400	448	481	480	495	-	530	550	518	-	-
Yoğunluk (g/cm ³)	1.274	1.274	-	-	1.351	1.282	-	1.329	-	-	-
Sudaki Çözünürlük (mg/L)	0.010	2.8x10 ⁻³	1.2x10 ⁻³	7.6x10 ⁻⁴	2.3x10 ⁻³	5x10 ⁻⁴	0.062	2.6x10 ⁻⁴	-	-	-
Buhar Basıncı (mm-Hg)	2.2x10 ⁻⁸	6.3x10 ⁻⁷	5x10 ⁻⁷	9.59x10 ⁻¹¹	5.6x10 ⁻⁹	1.x10 ⁻¹⁰	1.x10 ⁻¹¹	1.03x10 ⁻¹⁰	-	-	-
Log K _{ow}	5.61	5.16	6.04	6.06	6.06	6.84	6.58	6.50	-	-	-
Log K _{oc}	5.30	5.30	5.74	5.74	6.74	6.52	6.22	6.20	-	-	-
Henry Sabiti (atm.m ³ /mol)	1x10 ⁻⁶	1.05x10 ⁻⁶	1.22x10 ⁻⁵	3.87x10 ⁻⁵	4.9x10 ⁻⁷	7.3x10 ⁻⁸	6.95x10 ⁻⁸	1.44x10 ⁻⁷	-	-	-
L/B oranı	1.58	1.78	1.40	1.48	1.50	1.79	1.40	1.12	1.24	1.47	1.99

Wise, Sander vd. (1981) PAH'ların L/B oranlarını bilgisayar ve molekül modelleme programı yardımı ile belirlemişlerdir. Düzlemsel PAH'ların L/B oranı molekülün iki boyutlu gösteriminden belirlenebilmektedir (Şekil 1.2). Düzlemsel olmayan moleküller de maksimum L/B oranını belirlemek için molekül denemeler yapılarak döndürülür. Maksimum x değeri ve minimum z değeri olacak şekilde ayarlanır (Şekil 1.3) Sadece aromatik karbon içeren bileşikler için yaklaşık 3.9 Å'dan büyük z değeri bileşiğin düzlemsel olmamasının göstergesidir [46,47].



Şekil 1.2. Düzlemsel PAH'ların L/B Gösterimi



Şekil 1.3. Düzlemsel Olmayan Moleküller İçin L/B'nin Algoritmik Gösterimi

1.2.2. PAH'ların İnsan ve Hayvan Sağlığı Üzerine Etkileri

Genel olarak PAH'ların çevrede dolaşımı, onların suda kolay çözünebilme ve havada kolay buharlaşabilme gibi özelliklerine bağlıdır. Havada partiküllere tutunmuş veya buhar fazda bulunan bu bileşikler rüzgâr ile çok uzun mesafelere taşınabilirler. İnsanlar, kirlenmiş havayı ciğerlerine soludukları zaman genelde havada toz ya da partiküllere tutunmuş olan PAH'lar insan vücuduna girebilir. İçme suyu, yiyecekler ve PAH içeren ürünlerin deri ile temas etmesi, bu kimyasalların insan vücuduna girmesinin diğer yollarıdır. Bu bileşikler oluşumları sırasında kompleks karışım halinde oluştukları için insanlar birçok PAH bileşiğine birlikte maruz kalırlar. PAH'ların insan vücuduna girme oranı PAH'ların yeme, içme ile ya da deri ile teması sırasında başka kimyasal maddelerin varlığından etkilenebilir. PAH'lar yağ içeren bütün vücut dokularımıza girebilir, çoğunlukla karaciğer, yağ ve böbrekte depolanma eğilimindedir. Küçük miktarları adrenal bezlerinde, yumurtalıklarda ve dalakta depolanır [36].

İnsan vücudu PAH'ları elimine etmek için onları yükseltger ve suda çözünebilir hale getirir. Meydana gelen bu oksidatif metabolizma ile yüksek verimli diol-epoksit türevleri oluşur [48]. Oluşan bu diol-epoksit türevleri DNA ile kimyasal tepkime verir ve PAH'ların DNA ile kimyasal bağ yapması kansere sebep olur [49]. Benzo[a]piren bilinen en önemli kanserojen PAH olduğu için kanser araştırmalarında model bileşik olarak kabul edilmiştir [50,51]. Sigara içen insanlarda da bu bileşiklerin DNA mutasyonuna neden olduğu görülmüştür [52].

PAH'lar tümör başlatıcı, geliştirici ve ilerletici özellikleri olan bileşiklerdir. Hayvanlar ile yapılan çalışmalarda kısa ya da uzun vadede PAH'lara maruz kaldıklarında bağışıklık sisteminde, vücut sıvılarında sorunlara, akciğer, mesane ve deri kanserlerine neden olduğu görülmüştür.

Yüksek miktarda BaP'ne maruz bırakılan hamile farelerde doğum zorlukları görülmüş ayrıca bu farelerin yavrularında doğum bozuklukları, düşük kiloda

doğum gibi sorunlar görülmüştür. Benzer sorunlar insanlar için de gerçekleşebilir, ancak bunu doğrulayan bir çalışma yapılmamıştır [36]. Yeni doğan farelerin yaşamlarının ilk 15 gününde karın zarlarına ve deri altlarına BaP ve diğer PAH'lar enjekte edildiğinde altı ay içerisinde akciğer ve karaciğer tümörleri görülmüştür [53,54]. Ayrıca, nitro-PAH'ların lösemi, süt bezleri ve kolon tümörlerine neden olduğu görülmüştür [55]. Hayvanlar üzerinde yapılan başka çalışmalarda fetal ve bebeklik döneminden yetişkinliğe kadar olan süreçte PAH'lara maruz kalındığı zaman çok yüksek oranda kanser oluşumu ile PAH'ların ilişkili olduğu görülmüştür. Plasenta ile yapılan biyolojik deneylerde ise bazı PAH'ların çocuklarda karaciğer, akciğer, lenfatik doku ve sinir sistemi tümörlerine neden olabileceği görülmüştür [56-58].

Amerika Birleşik Devletleri Sağlık ve İnsan Hizmetleri Bölümü (The Department of Health and Human Services, DHHS) hayvanlar için BaA, BaP, BbF, B_jF, B_kF, DahA ve IcdP'ni kanserojen olarak nitelemiştir. IARC, insanlar için BaA ve BaP'ni muhtemel kanserojenler, BbF, B_jF, B_kF ve IcdP'ni düşük olasılıkla kansere neden olma ihtimali olan bileşikler olarak sınıflandırmıştır. An, BghiPy, BeP, Chr, Flu, Flr, Py'ni ise insanlar için kanserojen olarak nitelememiştir. EPA ise BaA, BaP, BbF, B_kF, DahA, Chr ve IcdP'ni insanlar için muhtemel kanser yapma ihtimali olan bileşikler arasında göstermiştir. Anp, An, BghiPy, Flu, Flr, Phe ve Py'ni ise kanserojen bileşikler sınıfına sokmamıştır. Asenaften ise DHHS, IARC ve EPA tarafından kanserojen etki konusunda bir sınıflandırmaya tabi tutulmamıştır [36].

İnsanların PAH'lara kompleks karışım olarak ve bunun yanı sıra tümörlere, kansere sebep olan diğer kimyasallara (nitrozamin, katran ruhu gibi) bir arada maruz kalma ihtimallerinden dolayı PAH'ların tek başına insanlar üzerindeki kanserojen etkilerini değerlendirmek oldukça zordur. Tüm bu sınırlamalara rağmen BaP, Chr, BaA, BbF ve DahA gibi PAH karışımlarının insanlar da kansere sebep olduğu rapor edilmiştir [36].

1.2.3. PAH'ların Tayin Edilme Yöntemleri

Toksik ve kanserojen etkiye sahip PAH'ların çevre, gıda ve biyolojik örneklerde bulunan miktarları, gaz kromatograf (GC) ve yüksek basınç sıvı kromatograf (HPLC) gibi yüksek duyarlılığa sahip cihazlarla tayin edilebilirler. PAH'ların gaz kromatograf ile tayinlerde detektör olarak alevde iyonlaşma detektörü (GC-FID) ya da kütle spektrometresi (GC-MS) kullanılır. HPLC ile tayinlerde ise genelde UV-görünür bölge spektrometresi, (HPLC-UV), Floresans spektrometresi (HPLC-F) ve kütle spektrometresi (HPLC-MS) detektör olarak kullanılır. Ayrıca PAH'ların HPLC ile tayinlerinde genelde sabit fazın apolar, hareketli fazın polar olduğu ters faz kromatografi (RP-HPLC) tekniği kullanılmaktadır. Ancak PAH'ların HPLC ile tayinleri sabit fazın polar, hareketli fazın apolar olduğu normal faz kromatografi (NP-HPLC) tekniği ile de başarılı bir şekilde yapılabilmektedir [59].

1.3. Yüksek Basınç Sıvı Kromatografi (HPLC)

Kromatografik yöntem; bir örnek içindeki maddelerin, biri hareketli ve diğeri sabit iki faz arasında dağılımlarına bağlı olarak, ayırma ortamını farklı zamanlarda terk etmelerini esas alarak kalitatif ve kantitatif analiz yapılmasına olanak sağlayan yöntemdir.

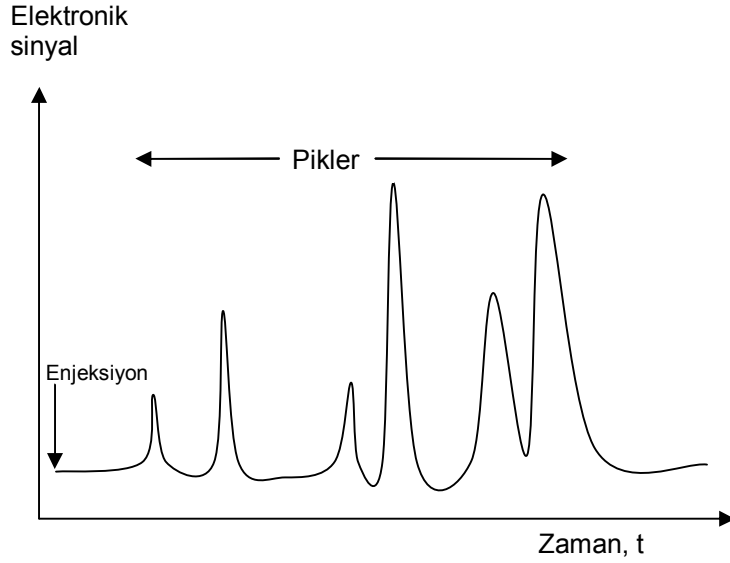
Rus botanikçi Tswett 1903'de bitki pigmentleri üzerine yaptığı çalışmada kromatografi tekniğini ilk kez uygulamış ve kromatografi yönteminin bulucusu olarak tarihe geçmiştir. Tswett bitki yapraklarından ekstrakte ettiği klorofilleri ve ksantofilleri, içine toz kalsiyum karbonat doldurduğu cam kolondan petrol eteri ile geçirerek ayırmayı başarmıştır. Böylece ilk kromatogram elde edilmiştir. Tswett bu renk olayından esinlenerek Yunanca renk anlamına gelen "*chroma*" kelimesinden esinlenerek yöntem kromatografi adını vermiştir. Yapılan bu ilk uygulama daha sonraları klasik kolon kromatografi olarak tanınmıştır [60].

Zamanımızda uygulanmakta olan kromatografi yönteminde renk fazla bir anlam ifade etmemekle beraber bu ad benimsenmiştir. Kromatografi olayı sonrasında, maddelerin birbirinden ayrılmış olarak elde edilen görüntüleri, kromatogram olarak adlandırılırken, ayırım ve daha sonra kalitatif ve kantitatif analizin gerçekleştirildiği sistemin tümü kromatografi olarak isimlendirilmiştir. Yöntemi rutin analizler veya araştırma amacıyla kullananlara da, pek doğru bir yaklaşım olmamakla beraber, kromatografçı adı verilir.

Tswett tarafından yapılan ilk çalışmalar kolon kromatografi olarak adlandırılmıştır. Bu yöntemler sonraları adsorpsiyon kromatografi olarak tanımlanmıştır. Tswett'in uyguladığı yöntemde, cam kolona katı adsorban doldurulmuş, üzerine klorofil karışımlarının konulmasından sonra petrol eteri sürekli olarak kolondan geçirilmiştir. Yani ayırma ortamı adını vereceğimiz bir kolonda, katı madde (1. faz, adsorban) ve sıvı madde (2. faz) birlikte bulunmaktadır. Katı veya sıvı olabilen birinci faza zamanla adsorban, sabit faz, hareketsiz faz veya durgun faz, iyon değiştirici, moleküler elek gibi isimler verilmiştir. Maddelerin birbirinden ayrılarak sürüklenip cam kolonu terk edebilmeleri için verilen petrol eteri ise hareketli faz olarak adlandırılmıştır. Daha sonra geliştirilen kromatografik yöntemlerde gaz veya süperkritik sıvılar da kullanılmaktadır. Bunlara da çözücü, hareketli faz, mobil faz, yürütücü sıvı gibi adlar verilir.

Hareketli faz ile birlikte çıkan ayırma ortamını terk eden maddeler ya fraksiyonlar halinde toplanıp ayrı ayrı kalitatif ve kantitatif tayin yapılır, ya da hareketli faz detektör adı verilen bir elektronik cihazdan geçirilir. Detektör sürekli olarak izlenirken hareketli faz özelliğine bağlı olarak sabit elektronik sinyal verir (temel çizgi, baseline). Hareketli faz içinde karışım içindeki maddelerden birisinin gelmesi halinde detektör sinyali değişir. Her madde için ayrı oluşan bu değişik sinyal topluca kromatogram olarak adlandırılan şekli oluşturur (Şekil 1.4). Kromatogramda oluşan her bir sinyale ise pik adı verilir. Pikler, kromatografinin türüne göre farklı biçimlerde olabilir. Örneğin ince tabaka kromatografide renkli lekeler, klasik kolon kromatografide renkli bantlar, gaz veya sıvı kromatografilerde Şekil 1.4'de görüldüğü gibi bir grafik

şeklinde olabilir. Pikler kalitatif ve kantitatif analizde kullanılır.



Şekil 1.4. Kromatogram

Bugün onlarca temel kromatografik yöntemlerden başka hemen her gün yeni katılımlarla kromatografik yöntem sayısı artmaktadır. Bu nedenle tek bir sınıflandırma ile kromatografik yöntemleri sıralamak gerçekçi olmayacaktır. Kromatografik yöntemler çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırmalar:

- a) Kromatografik ortamın fiziksel şekline göre,
 - b) Örneğin kromatografik ortama verilmiş biçimine göre,
 - c) Kromatografik ayırma mekanizmasına göre,
 - d) İki fazın polarlık durumlarına göre,
 - e) İki fazın fiziksel haline göre,
- yapılabilir.

Yukarıdaki sınıflandırmaların ötesinde pratikte kromatografik yöntemler denilince akla klasik olarak şu yöntemler ve sınıflandırma gelir:

1. Kâğıt kromatografisi,
2. İnce tabaka kromatografisi,
3. Kolon kromatografisi,

4. Gaz-sıvı kromatografi,
5. Yüksek basınç sıvı kromatografi
6. Süperkritik akışkan kromatografi [60-62].

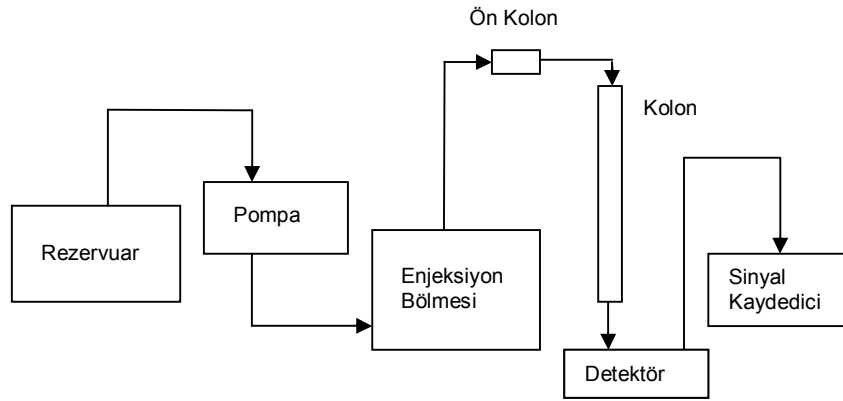
Sıvı kromatografi sabit fazın, sıvı veya katı oluşuna göre sıvı-sıvı, sıvı-katı şeklinde ikiye ayrılabilir. Ancak, pratikte, sıvı kromatografik yöntemlerden konu edilirken şöyle bir sınıflandırma ile daha çok karşılaşılır.

- Adsorpsiyon kromatografi, (Normal ve Ters Faz Kromatografi),
- Sıvı-sıvı partisyon kromatografi,
- İyon kromatografi,
- Jel kromatografi,

Hareketli fazın sıvı, sabit fazın sıvı veya katı olduğu tüm kromatografik yöntemler sıvı kromatografi başlığı altında toplanabilir. Bu başlık altında klasik kolon kromatografi, kâğıt kromatografi, ince tabaka kromatografi yöntemleri de bulunmaktadır. Ancak, bu yöntemleri ayrı başlıklar veya bölümler altında toplamak ve günümüzde sıvı kromatografi denince yüksek basınç sıvı kromatografisiyi anımsamak normal olmuştur. Klasik kolon kromatografisi şeklinde uygulanan yüksek basınç sıvı kromatografi (HPLC), günümüzde modern enstrümantal analitik tekniklerin en önemlilerinden birini oluşturur. Çeşitli örneklerle uygulanabilmesi ve hareketli faz yönünden çok alternatifli oluşu bu teknikte büyük ilerlemeler sağlanmasına yol açmıştır.

HPLC, sabit fazın polar, hareketli fazın apolar olması halinde normal faz-yüksek basınç sıvı kromatografi (NP-HPLC), sabit fazın apolar, hareketli fazın polar olması durumunda ise ters faz-yüksek basınç sıvı kromatografi (RP-HPLC) olarak isimlendirilir. Normal fazda alümina, silika, Si-CN, Si-NH₂ gibi polar katılar kullanılır. Ters fazda ise, apolar karakter gösteren alkil grupların bağlandığı silika, alumina kullanılır. Ancak normal faz ile ters faz arasında belki de en büyük fark, ters faz kromatografide hareketli faz içinde su kullanılmasıdır. Bol ve ucuz olan suyun kullanılabilmesi ters faz kromatografiye büyük avantajlar sağlamaktadır.

Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri, duyarlılığı, kalitatif ve kantitatif tayinlere kolaylıkla uygulanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkta kolayca bozunabilen 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 aminoasitler, proteinler, nükleikasitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, pestisitler, antibiyotikler ve çeşitli inorganik bileşikler sayılabilir. Bir HPLC sistemi, ana bölümler olarak, bir veya birkaç çözücü rezervuarı, pompa, akış sistemleri, puls gidericiler, enjeksiyon vanası, ön kolon, analitik kolon, detektör ve sinyal kaydediciden meydana gelir. Şekil 1.5’de bir HPLC sisteminin blok şeması görülmektedir.



Şekil 1.5. Yüksek Basınç Sıvı Kromatograf Şeması

Çözücü rezervuarından alınan hareketli faz, sürekli akış sağlayan puls gidericilerden geçtikten sonra enjeksiyon bölgesine gelir ve burada enjekte edilen örneği kolona sürükler. Kolondaki tutulma eğilimine bağlı olarak birbirlerinden ayrılan maddeler, kolonu farklı zamanlarda terk eder ve detektöre ulaşır. Detektörde maddelerin oluşturduğu sinyaller bir yazıcıda veya integratörde kaydedilir ve buradan kalitatif ve kantitatif analiz yapılabilir.

1.4. Kromatografik Analiz İçin Örnek Hazırlama

Son yıllarda matriks örneklerden kalitatif ve kantitatif tayinlerde hassas, doğru ve hızlı yöntemlerin geliştirilmesi önemli bir konu haline gelmiştir. Ancak biyolojik, çevresel, gıda ve eczacılık ürünlerinin tayinlerinde yüksek hassasiyetli analitik cihazların gelişmesine rağmen, analitik cihaz çoğunlukla matriks ortamında tayinde başarısız olmaktadır. Bundan dolayı matriks ortamdan örneği alma, deriştirme (zenginleştirme) için genellikle ön işlem (clean-up) uygulanması gerekmektedir [63].

Karmaşık bir örnekteki madde veya maddeler, HPLC veya GC gibi kromatografik yöntemlerle analiz edilmek istenildiğinde, bu maddelerin miktarlarının cihazın tayin sınırlarının üzerlerine getirilmeleri (zenginleştirme) ve/veya karmaşık ortamdan mümkün olduğu kadar arındırılmaları (saflaştırma) gerekmektedir. Bu saflaştırma ve zenginleştirme işlemleri genelde distilasyon (damıtma), bir katı yüzeyine adsorbsiyon ve ekstraksiyon gibi işlemler yapılarak gerçekleştirir [62].

Damıtma işleminde iki ya da daha fazla bileşen içeren örnek ısıtılıp sıvı ve buhar faz oluşturulur. Buhar fazda uçucu bileşikler zenginleştirilirken sıvı fazda kaynama noktası daha yüksek bileşikler kalır. Bir katı yüzeyine adsorbsiyon ise katı faz ekstraksiyon olarak adlandırılır. Katı faz ekstraksiyon işleminde genellikle bir cam veya plastik tüpe doldurulan adsorban üzerinden madde içeren örnek sıvı geçirilir. Adsorban üzerinde biriken madde daha sonra uygun bir çözücü yardımıyla geri alınır. Ekstraksiyon işlemi ise genellikle katı-sıvı ve sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemleridir. Katı-sıvı ekstraksiyon işleminde katı örnekteki maddeler uygun bir çözücü yardımıyla ekstrakte edilir. Bu işlem için genelde sokslet ekstraksiyon cihazı kullanılır. Sıvı-sıvı ekstraksiyon işleminde sulu örnek içerisindeki organik maddeler uygun bir organik çözücü yardımıyla ekstrakte edilir. Bunların dışında ultrason destekli ekstraksiyon (Ultrasound-Assisted Extraction, USE), mikrodalga destekli ekstraksiyon (Microwave-Assisted Extraction, MAE), hızlandırılmış solvent ekstraksiyon (Accelerated Solvent Extraction,

ASE), altkritik su ekstraksiyon (Subcritical Water Extraction, SWE) ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu (Supercritical Fluid Extraction, SFE) gibi ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir. Ancak son yıllarda daha hızlı, duyarlı, pahalı ve toksik çözücü kullanımını mikrolitre seviyelerine azaltan, ekonomik mikroekstraksiyon yöntemlerinin kullanımı hızlı bir şekilde artmaktadır [64].

1.5. Mikroekstraksiyon

Karmaşık örneklere uygulanan saflaştırma ve zenginleştirme işlemleri ile örnek analiz için istenilen özelliklere getirilir. Klasik örnek hazırlama teknikleri sıvı-sıvı ekstraksiyon, katı-sıvı ekstraksiyon, katı faz ekstraksiyon yöntemlerinin otomasyon zorluğu, örnek ve organik sıvının büyük miktarda kullanılması, karmaşık ve zaman alıcı olması gibi dezavantajları vardır. Zararlı kimyasalların ve organik çözücülerin büyük miktarlarda kullanılması çevre kirliliğine, laboratuvar personeline sağlık risklerine, atık arıtma ve ilave işletme maliyetlerine sebep olur. İdeal örnek hazırlama teknikleri hızlı, kullanımı kolay, ucuz ve birçok analitik cihaza uygulanabilir olmalıdır. Yeni eğilim organik çözücü tüketimini en aza indirmek, örnek hazırlama basamağını basitleştirme ve küçültme şeklindedir [63,65]. Bu nedenle mikroekstraksiyon yöntemlerine ilgi önemli ölçüde artmıştır. Mikroekstraksiyon yöntemleri;

- Klasik sıvı-sıvı ekstraksiyon ve sıvı-katı ekstraksiyonlarda kullanılan toksik ve pahalı ekstraksiyon sıvılarının kullanımını mikrolitre seviyelerine indirmeleri,
- Buharlaştırma, saflaştırma gibi işlemlere gerek duyulmaması,
- Yüksek zenginleştirme oranı,
- Ekstraksiyon ve zenginleştirmenin yanısıra saflaştırma işleminin de yapılabilmesi,
- Ekstraksiyon sonrasında alınan örneğin doğrudan GC veya HPLC'ye enjekte edilebilmesine olanak sağlaması ve
- Otomasyonun yapılabilmesi gibi

avantajlarından dolayı son zamanlarda klasik sıvı-sıvı ve sıvı-katı ekstraksiyon yöntemlerinin yerlerini almaya başlamışlardır.

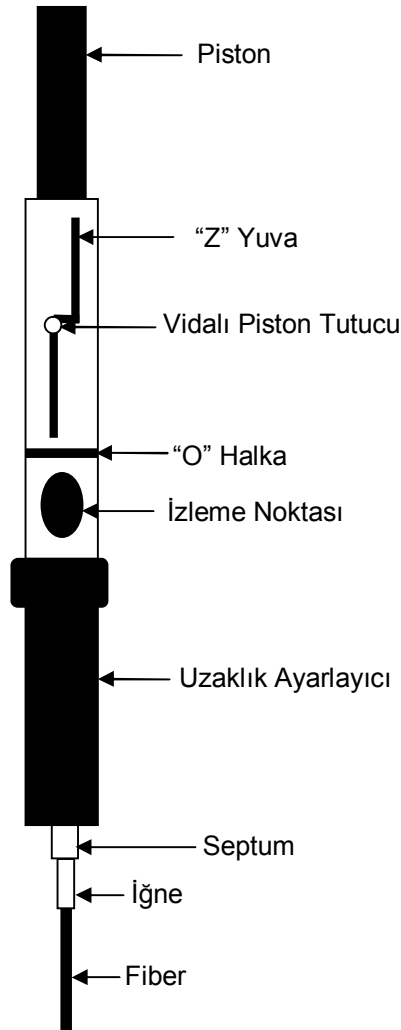
1.5.1. Katı Faz Mikroekstraksiyon (SPME)

Katı faz mikroekstraksiyon yöntemi, hava ya da su matrisindeki maddeleri “fused” silika üzerine polimer kaplı fibere ekstre eden basit, hızlı, duyarlı ve organik çözücüden bağımsız bir örnek hazırlama yöntemidir [66]. İlk olarak Arthur ve Pawliszyn tarafından 1990 yılında geliştirilmiştir [67]. 1993 yılında ise ticari olarak üretilmeye başlanmıştır. Polidimetilsiloksan (PDMS), divinilbenzen (DVB), poliakrilat (PA), carboxen (CAR) ve carbowax (CW; polietilen glikol) fiber üretiminde kullanılırlar [64,68,69]. Ayrıca polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) carboxen/polidimetilsiloksan (CAR/PDMS), carbowax/divinilbenzen (CW/DVB) gibi farklı birleşimlerde de fiberler hazırlanabilir [69].

Şekil 1.6’da katı faz mikroekstraksiyon (SPME) enjektörü görülmektedir. Polimerik adsorban ile kaplanmış “fused” silika SPME enjektörünün içine yerleştirilir. Enjektörün ucundaki iğne ekstraksiyon ve desorpsiyon işlemlerinde septum delici olarak ve fiberi korumak için kullanılır. SPME enjektörü analiz edilecek örnek çözeltisine yerleştirildikten sonra piston aşağı doğru ittilerek fiberin iğne ucundan çıkması sağlanır. Ekstraksiyon işlemi tamamlandıktan sonra fiber tekrar geri çekilir. SPME enjektör desorpsiyon işlemi için GC’nin enjeksiyon bölgesine veya HPLC’de ara faza yerleştirildikten sonra fiber, iğneden tekrar çıkarılarak desorpsiyon işlemi yapılır.

SPME fiberden maddelerin desorpsiyonu, bir çözücü ile (MeOH, ACN gibi) veya GC enjeksiyon bölgesinde yapılan termal desorpsiyon işlemi ile yapılmaktadır [70-73]. Sıvı kullanarak desorpsiyon LC ve kapiler elektroforez (CE) ile kullanılır. Sıvı kromatografide çözücü ile desorpsiyon için geliştirilmiş “ara-faz” sistemleri HPLC vanası ve sıvı haznesinden ibarettir. Ekstraksiyon sonrası enjektör ucundaki fiber HPLC vanasının bulunduğu

sıvı haznesine yerleştirilir. Burada desorpsiyon iki şekilde sağlanabilir [74]. Eğer maddeler fibere zayıf bir şekilde bağlı ise doğrudan hazneye pompadan gelen hareketli faz ile desorbe edilirler. Buna dinamik desorpsiyon denir. Ancak maddeler daha güçlü bir şekilde adsorbe olmuşlar ise fiber hazneye konulmuş hareketli faza veya başka bir çözücüye daldırılır ve belirli bir süre bekletilir. Daha sonra hareketli faz ile kolona taşınır. Bu statik desorpsiyon olarak isimlendirilir [75].

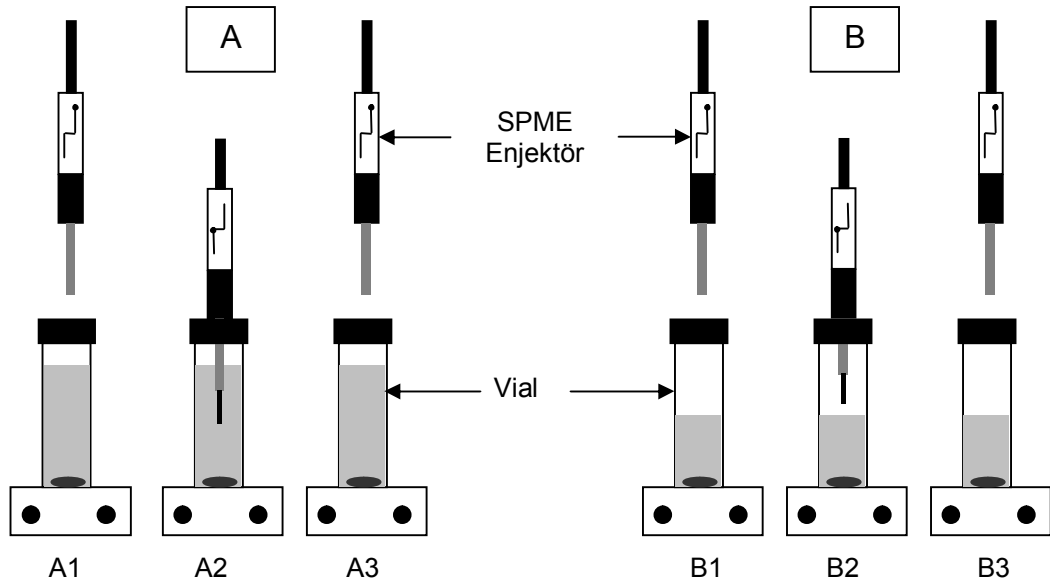


Şekil 1.6. Katı Faz Mikroekstraksiyon (SPME) Enjektörü

SPME iki şekilde uygulanır;

- Tepe Boşluklu (Headspace) Ekstraksiyon,
- Doğrudan Daldırma Ekstraksiyon;

Tepe boşluklu ekstraksiyon katı, sıvı veya gaz örneğin buhar fazının fiber ile etkileşimine dayanır. Tepe boşluklu analizde fiber örnek ile temas halinde değildir. Buhar fazındaki maddeler difüzyon veya doğal hava akımı yolu ile fibere ulaşır. Doğrudan ekstraksiyonda ise fiber, madde içeren sıvı örneğin içersine doğrudan daldırılarak ekstraksiyon sağlanır. Şekil 1.7’de katı faz mikroekstraksiyon (SPME) sistemi görülmektedir. Uçucu bileşiklerin analizinde fiberin kullanım ömrünü artırdığı için, headspace ekstraksiyon daha çok tercih edilir [69,76,77]. Sıvı örnek içersine doğrudan daldırma yapıldığında yüksek molekül ağırlıklı türler, diğer uçucu olmayan kirlilikler, fiberin kaplamasına zarar verebilir veya geri dönülmez şekilde fibere bağlanabilirler. Ayrıca headspace ekstraksiyon doğrudan ekstraksiyona göre daha seçici bir yöntemdir [64,78,79].



Şekil 1.7. SPME Sistemi (A: Doğrudan Ekstraksiyon, B: Tepe Boşluklu (Headspace) Ekstraksiyon)

SPME yöntemi, örnekte ekstrakte edilecek analit ile “fused” silika üzerine kaplanmış sıvı, katı ya da her ikisinin karışımı polimer ile kaplanmış [30-150 µm) sabit faz arasındaki dengeye dayanmaktadır [68,80]. Ekstraksiyon sonrasında maddeler fiber kaplaması, gaz faz (tepe boşluğunda) ve hava veya su gibi homojen matriks ortamın olduğu örnek fazı olmak üzere üç faz

arasında dağılırlar. Maddelerin üç fazda dengedeki kütle dağılımları aşağıdaki gibi gösterilebilir.

$$C_o \cdot V_s = C_c^\infty \cdot V_c + C_h^\infty \cdot V_h + C_s^\infty \cdot V_s \quad (1.1)$$

Burada C_o , örnek içerisindeki aranan maddenin başlangıç derişimi, C_c^∞ , C_h^∞ , C_s^∞ ise sırası ile ekstraksiyon sonrası denge anında fiberdeki, tepe boşluğundaki ve örnek içerisindeki derişimleri, V_c , V_h , V_s ise sırası ile kaplamanın, tepe boşluğunun ve örneğin hacmini göstermektedir.

Fiberdeki kaplama ile tepe boşluğu arasındaki dağılıma katsayısı, K_{ch} :

$$K_{ch} = C_c^\infty / C_h^\infty \quad (1.2)$$

Tepe boşluğu ile örnek arasındaki dağılıma katsayısı ise, K_{hs} :

$$K_{hs} = C_h^\infty / C_s^\infty \quad (1.3)$$

şeklinde yazılabilir.

Fiberde absorblanan maddenin miktarı, n :

$$n = C_c^\infty \cdot V_c \quad (1.4)$$

Eşitlik 1.2 ve 1.4 düzenlenerek;

$$n = K_{ch} \cdot C_h^\infty \cdot V_c \quad (1.5)$$

yazılabilir.

Eşitlik 1.3 ve 1.5'i kullanarak "n" yeniden aşağıdaki şekilde düzenlenebilir;

$$n = K_{ch} \cdot K_{hs} \cdot C_s^\infty \cdot V_c \quad (1.6)$$

Eşitlik 1.1' den C_s^∞ çekilip eşitlik 1.6'da yerine yazılırsa "n" aşağıdaki şekilde yazılabilir.

$$n = \frac{K_{ch} \cdot K_{hs} \cdot V_c \cdot C_o \cdot V_s}{K_{ch} \cdot K_{hs} \cdot V_c + K_{hs} \cdot V_h + V_s} \quad (1.7)$$

Fiberdeki kaplama ile örnek arasındaki dağılım katsayısı (K_{cs}) aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$K_{cs} = K_{ch} \cdot K_{hs} = \frac{C_c^\infty \cdot C_h^\infty}{C_h^\infty \cdot C_s^\infty} \quad (1.8)$$

Eşitlik 1.8 kullanılarak eşitlik 1.7 aşağıdaki gibi sadeleştirilebilir.

$$n = \frac{K_{cs} \cdot V_c \cdot C_o \cdot V_s}{K_{cs} \cdot V_c + K_{hs} \cdot V_h + V_s} \quad (1.9)$$

Ekstraksiyon işleminde tepe boşluklu (headspace) analiz yapılmıyor ise " $K_{hs} \cdot V_h$ " terimi eşitlikten çıkarılır.

Ayrıca fiber üzerindeki kaplama hacmi, örnek hacmi yanında çok küçük olduğu için;

$$K_{cs} \cdot V_c \ll V_s \text{ olur.} \quad (1.10)$$

Eşitlik 1.9 tekrar sadeleştirildiğinde fiber üzerine absorblanan madde miktarı (n) aşağıdaki şekilde ifade edilir.

$$n = K_{cs} \cdot C_o \cdot V_c \quad (1.11)$$

Bu sonuç örnekten fibere ekstrakte edilen maddenin miktarının örnek hacminden bağımsız olduğunu göstermektedir [79].

SPME'de maddenin ekstraksiyon miktarı, ekstraksiyon fazının hacmi (fiber adsorbanı) ile orantılıdır. Dolayısı ile ekstraksiyon fazının hacmi artırılarak metodun duyarlılığı artırılabilir. Bu da, ya film kalınlığını artırarak ya da daha kalın destekler üzerine kaplama yapılarak veya çoklu fiber yöntemi kullanılarak sağlanır [68].

SPME tek adımda örnekten maddeyi zenginleştirme, matriksden ayırma ve de tayin etme işlemidir. Geliştirildiğinden beri bu yöntem çevresel analizlerde geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Örneğin, sularda uçucu organik bileşiklerin, biyolojik olarak aktif maddelerin, fenollerin, pestisitlerin, poliaromatik hidrokarbonların ve poliklorlu bifenillerin tayininde kullanılmıştır. Termal bozunmaya sebep olmaksızın uçucu bileşiklerin kimyasal analizi için sıcaklık programlı desorpsiyon ile GC uygulamaları yapılabilmektedir. SPME fiberler ayrıca çevre ve işyeri havalarındaki uçucu organik bileşiklerin analizinde de kullanılır [64].

Klasik örnek hazırlama yöntemleri ile karşılaştırıldığında SPME'nin önemli avantajları vardır. Maddelerin ekstraksiyonu için hızlı, basit ve çözücü kullanılmayan hassas yöntemlerdir. Örnek, matriks ortamdan ekstrakte edilirken aynı zamanda zenginleştirilir. Adsorpsiyon ve desorpsiyon tekniği etkili ve basittir. Analitleri ayırma ve tayin etmede, yüksek basınç sıvı kromatografi (HPLC) ile kullanıma uygundur. Ancak kullanılan organik çözücülerin fiber ile uyumlu olmasına dikkat edilmelidir. Çünkü fiber güçlü organik çözücülere karşı dayanıklı ve kararlı olamamaktadır. Geniş bir alanda madde derişimi için doğrusal sonuçlar verir. SPME enjektörleri örneklerin bulunduğu alanlarda kullanıma uygun küçük boyutlara sahiptir [68,69,81].

SPME fiberler giderek artan oranda kullanılmalarına rağmen bazı önemli dezavantajlara da sahiptirler. Termal desorpsiyonda (GC) nispeten düşük sıcaklık aralığında çalışılması (genellikle 240–280°C) gerekir. Fiberlerin organik çözücü ile temasta kararsızlıkları ve şişmeleri (büyük ölçüde HPLC ile kullanımına sınırlama), kırılması, kaplamasının sıyrılması, iğnesinin eğilmesi, pahalı oluşu [81], kullanım sayısındaki sınırlama [82], polarite derecesi

düşük ticari sabit faz türünün sınırlı olması, düşük tekrarlanabilirlik (repeatability) ve seçiciliğinin az olması [68] gibi dezavantajlar sayılabilir. Ayrıca her bir üretimde fiber boyu ve kaplama özellikleri farklılık gösterebileceğinden zenginleştirme faktörleri fiberden fibere farklılık gösterebilir [82]. Kullanım sonrası fiberlere etkili temizleme işlemi uygulanmaz ise sonraki çalışmalarda iyi sonuçlar elde etmek zordur [83]. Analitin fiberden buharlaşması veya vialin çeperlerine adsorbsiyon ile analit kaybı kontrol edilemediğinden dolayı zenginleştirme faktörleri düşük olabilmektedir. Ancak bu dezavantajlara rağmen SPME teknolojisi biyoanalitik, çevre ve gıda gibi birçok alanda kullanılmaktadır [64].

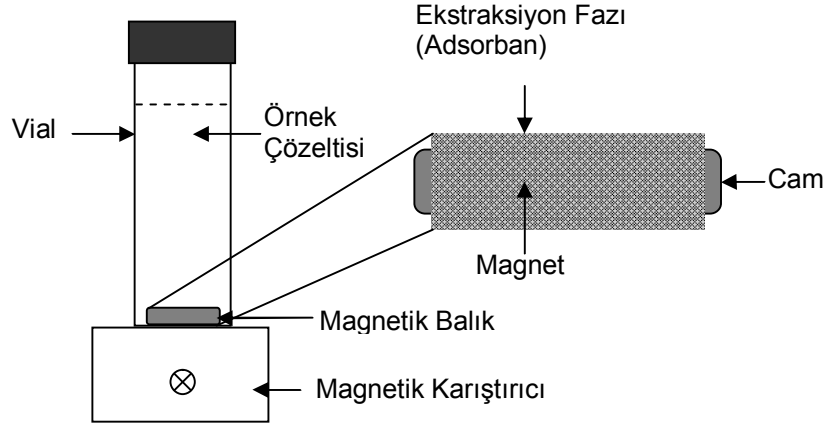
1.5.2. Magnetik Karıştırma Çubuğu İle Ekstraksiyon (Stir Bar Sorptive Ekstraksiyon, SBSE)

1999 yılında Baltusen vd. tarafından yeni bir ekstraksiyon tekniği olarak tanımlanmıştır [84]. Magnetik karıştırma çubuğu ile ekstraksiyon (SBSE) olarak isimlendirilen bu ekstraksiyon tekniği, cam üzerine 50–300 µL (0.5–1.0 mm kalınlık) PDMS kaplanmış magnetik karıştırıcının ekstraksiyon ortamına konulması ile kullanılır [84,85]. Magnetik çubuk yaklaşık 1.5 cm uzunluğunda, 0.5 cm çapındadır. SBSE’de maddeler Şekil 1.8’de görüldüğü gibi örneği karıştırmak için kullanılan magnetik çubuk üzerindeki PDMS tarafından adsorbe edilir.

Magnetik çubuktan maddelerin alınması iki şekilde olabilir. Ya magnetik çubuktaki maddeler termal desorpsiyon cihazında buharlaştırılarak GC ile tayin edilir, ya da magnetik çubuk metanol, ACN gibi çözücülere daldırılıp karıştırma veya sonikasyon ile maddeler geri alınarak HPLC, CE veya GC ile analiz edilir [86-89].

SBSE’nin ekstraksiyon mekanizması ve avantajları SPME’ye benzerdir. Ancak zenginleştirme faktörü ekstraksiyon fazının miktarı ile doğru orantılı olduğundan, SPME’ye göre çok daha fazladır. Genel olarak zorlu matrislerde

eser miktarda madde tayinlerinde kesinlik ve duyarlık açısından SBSE'nin SPME'ye göre daha iyi olduğu düşünülür [68]. SPME'de olduğu gibi SBSE'de çevresel, gıda ve biyolojik örneklerdeki uçucu ve yarı uçucu örneklerde kullanılır. SBSE sıvılarda ve yarı katı matris ortamlarda kullanılabilir. Kahve analizlerinde, sulu örneklerde PAH analizlerinde ve ballarda pestisit kalıntılarının belirlenmesinde kullanılabilir [64].



Şekil 1.8. Magnetik Karıştırma Çubuğu İle Ekstraksiyon (SBSE) Sistemi

SBSE, PDMS kaplı olduğu için çoğunlukla sulu ortamlarda apolar ve yarı polar bileşiklerin analizi için uygundur. Uygun derivatizasyon işlemleri ile polar bileşiklerin analizinde de kullanılabilir [90]. Yöntemde magnetik çubuğun doğrudan GC enjeksiyon bölgesinde desorbe edilemeyip özel olarak dizayn edilmiş termal desorpsiyon cihazı gerektirmesi, tam otomasyona uygun olmaması dezavantaj olarak sayılabilir [68].

1.5.3. Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (LPME)

Sıvı faz mikroekstraksiyonun (LPME) klasik sıvı-sıvı ekstraksiyondan en önemli farkı ekstraksiyon sıvısının mikrolitre düzeylere indirilmesidir. Böylece hem zenginleştirme yapılır, hem çözücü kaybı önlenir hem de buharlaştırma işlemine gerek kalmaz. LPME ile ekstraksiyonda maddeler genellikle sulu bir örnek (verici faz, donor faz) içerisinde. Su ile karışmayan organik

çözücü alıcı faz (acceptor faz) olarak kullanılır. Sıvı faz mikroekstraksiyon yöntemi aşağıdaki şekillerde uygulanır;

- I) Asılı Damla Mikroekstraksiyon
(Single Drop Microextraction, SDME)
- II) Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon
(Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, DLLME)
- III) Yüzen Katı Organik Damla Mikroekstraksiyon
(Solidified Floating Organic Drop Microextraction, SFODME)
- IV) Oyuk (Hollow) Fiber Sıvı Faz Mikroekstraksiyon
(Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction, HF-LPME)

1.5.3.1. Asılı Damla Mikroekstraksiyon (Single Drop Microextraction, SDME)

Asılı damla mikroekstraksiyon (SDME) yönteminde, gaz veya sıvı örnek içerisinde karışmayan ekstraksiyon çözücü damlası (1–10 µL), enjektör ucunda asılı durur. Belirli bir zaman yapılan ekstraksiyon işlemi sonrasında maddeler sulu örnekten pasif difüzyon ile asılı damla içersine alınır ve GC, HPLC, CE ile analiz edilir [91].

Bu tekniğin popüler olmasının nedeni, herhangi bir karmaşık donanıma ihtiyaç duyulmaması, ucuz ve uygulamasının kolay olması, neredeyse çözücü kullanılmaması ve derivatizasyonun mümkün olması sayılabilir. Yöntemin dezavantajları arasında damla yüzeyinin sınırlı olması, damlanın enjektör ucunda kararsız olması ve ekstraksiyon kinetiğinin yavaş olması sayılabilir [65].

SDME yöntemi değişik biçimlerde uygulanabilir;

- Doğrudan Daldırma-Asılı Damla Mikroekstraksiyon
(Direct Immersion-Single Drop Microextraction, DI-SDME),

- Tepede-Asılı Damla Mikroekstraksiyon
(Headspace Single Drop Microextraction HS–SDME),
- Üçlü Faz-Asılı Damla Mikroekstraksiyon
(Three Phase-Single Drop Microextraction, Three Phase–SDME)
- Sürekli-Akış Mikroekstraksiyon
(Continuous-Flow Microextraction, CFME)

Şekil 1.9.a'da görülen doğrudan daldırma-asılı damla mikroekstraksiyon (DI–SDME) yönteminde karıştırılan sulu örnek içerisinde, ekstraksiyon çözücü damlası mikro enjektör iğnesi ucunda askıda bırakılır. Örnekten maddeler damlaya geçer. Çözücü damlası enjektöre geri çekilerek analiz için GC veya HPLC'ye enjekte edilir. Bu statik SDME olarak tanımlanır [63,65,92].

Dinamik SDME'de ise ekstraksiyon çözücüsü çekilmiş enjektöre örnek çözeltisi çekilir. Enjektörün iğne ve duvar çeperlerinde ince bir film tabakası oluşturan ekstraksiyon çözücüsünün örnekten maddeleri ekstrakte etmesi için birkaç saniye bekletilir ve örnek dışarı atılır. Bu işlem birkaç dakika içinde çoğu kez tekrarlanır. Zenginleşen ekstraksiyon fazı GC veya HPLC'ye enjekte edilir. Sistem damla formu içermese de SDME yöntemi olarak isimlendirilmiştir. [65,93].

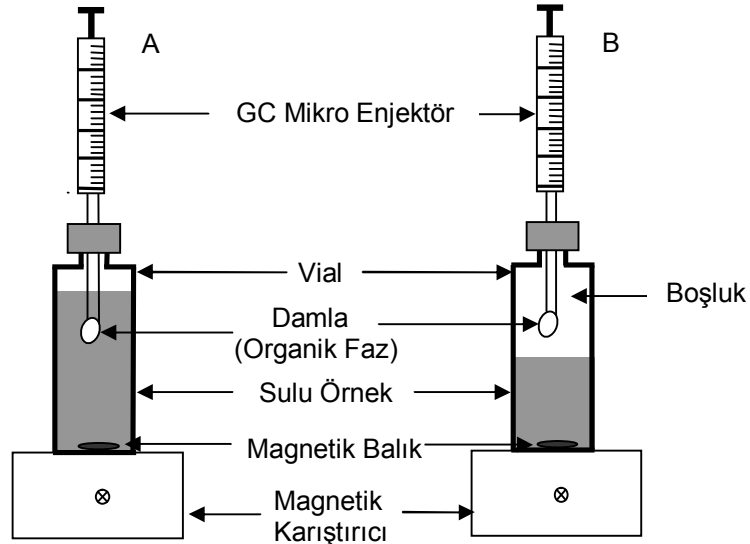
Statik ve dinamik SDME karşılaştırıldığında; statik SDME çok iyi yinelenebilirlik (reproducibility) sağlamasına rağmen zaman alıcı ve zenginleştirme faktörü düşüktür. Dinamik SDME ise kısa zaman içinde yüksek zenginleştirme faktörleri sağlamasına rağmen elle kullanımdan dolayı yinelenebilirlik ve tekrarlanabilirlik düşüktür. Ancak bu dezavantaj otomatik enjektör pistonu kullanılarak azaltılmıştır [94,95].

Şekil 1.9.b'de görülen tepede-asılı damla mikroekstraksiyon (HS–SDME) yönteminde, mikro enjektörün ucunda asılı damla, örnek çözeltisinden bağımsız tepe boşluğuna yerleştirilir. Örnek ısıtılarak analiz edilecek maddelerin buharlaşıp damlaya geçmesi sağlanır. Ekstraksiyon sonrasında damla

enjektöre geri çekilerek, GC veya HPLC'ye enjekte edilir. Yöntemde maddeler sulu faz, tepe boşluğu (headspace) ve organik damla olmak üzere üç faza dağılır [65,96].

DI-SDME ile çevresel biyolojik ve gıda örneklerindeki apolar ve yarı polar bileşiklerin analizi yapılırken HS-SDME ile uçucu ve yarı uçucu bileşiklerin ve derivatizasyona uygun uçucu bileşiklerin tayini yapılabilir [63,65].

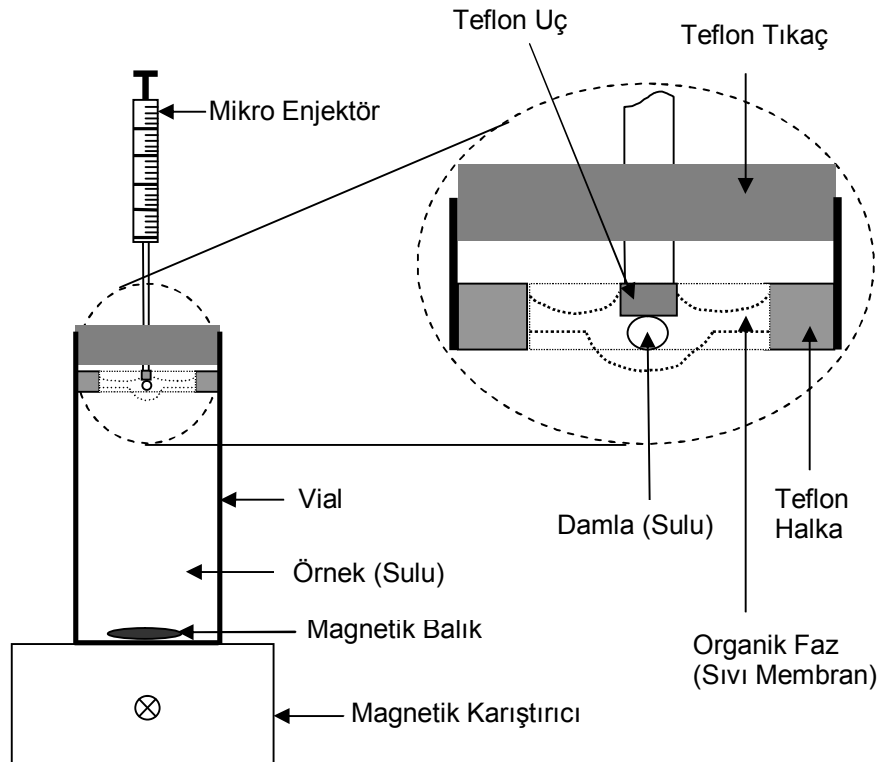
DI-SDME ile karşılaştırıldığında, HS-SDME organik çözücü seçimi açısından hayli esnek ve çözücünün örnek çözeltisi içindeki çözünürlüğünü dikkate almaya gerek yoktur. Ancak çözücü seçiminde ana sınırlayıcı, kendi buhar basıncıdır. Ekstraksiyon sırasında buharlaşmayı önlemek için buhar basıncı düşük olmalı ancak aynı zamanda GC'ye enjeksiyon için uygun olmalıdır [63,97]. HS-SDME çok fazla matriks içeren örneklerde (uçucu olmayan bileşikler, yüksek molekül ağırlıklı) çok iyi bir ön temizleme sağlar [63,65]. DI-SDME' de damla yüksek karıştırma hızlarında kararsızdır. HS-SDME ise damla örnek ile temas etmediği için karıştırma hızından etkilenmez.



Şekil 1.9. Asılı Damla Mikroekstraksiyon Sistemi (A: Doğrudan Daldırma, DI-SDME; B: Tepe Boşluklu, HS-SDME)

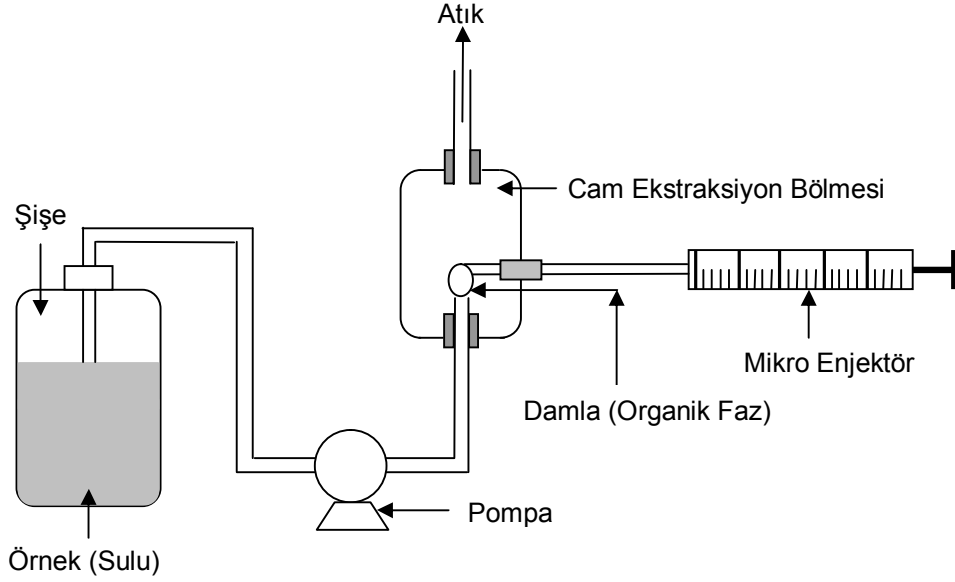
Ayrıca DI-SDME'nin aksine HS-SDME'de suda çözünen analitlerin ve uçucu ekstraktların analizinde su, mikro çözücü olarak kullanılabilir [63]. Metaloid (metalimsi), organometal ve ametallerin ekstraksiyonunda yüksek kaynama noktalı sıvılar ile çalışılabilir [65]. Ancak sulu örnekler ile analiz yapıldığı zaman eğer çözücü su ile karışırsa çapı büyür ve iğnenin ucundan kopmasına sebep olabilir. SDME ile ekstraksiyon sonrasında HPLC analiz için fazla tercih edilmemektedir. Çünkü SDME'de damlanın kararlı olması için damla hacmi, mümkün olduğunca küçük seçilir. Ancak HPLC çalışmalarında enjeksiyon hacminin 2 µL'den daha büyük olması tercih edilir. Aynı zamanda seçilen çözücü hareketli faz ile de uyumlu olmalıdır [63,97].

Şekil 1.10'da görülen üçlü faz-asılı damla mikroekstraksiyon (Üçlü Faz-SDME) yöntemi 1999 yılında Ma ve Cantwell tarafından uygulanmıştır. Sistemde pH'ın ayarlanabildiği verici faz, organik çözücü faz ve pH'ın ayarlanabildiği alıcı faz olmak üzere üç faz vardır [98].



Şekil 1.10. Asılı Damla Mikroekstraksiyon (Üçlü Faz-SDME) Sistemi

Üçlü Faz–SDME yönteminde sulu örnek çözeltisi üzerinde teflon halka içeri- sine organik sıvı membran hapsedilir. Mikro enjektör yardımı ile alıcı sulu fazın mikro damlası organik sıvı membranın içerisinde askıda bırakılır. Sulu damla ve organik membran konfigürasyonu çok yüksek hızlarda karıştırma yapılmasına uygundur. Sulu örnek fazında pH'ın ayarlanması ya da bir kompleksleştirici reaktifin eklenmesi ile maddeler organik faza ekstrakte edi- lir. Buradan da koşulları ayarlanmış alıcı faza geri ekstrakte edilir. Sulu faza alınan ekstrakt HPLC, CE ve atomik spektroskopi (AS) gibi cihazlarla analiz yapmaya uygundur. Yöntem her ekstraksiyon sonrası vialin yıkanmasını gerektirmesi ve vial içerisinde teflon halkanın konumunun ayarlanma zorlu- ğu gibi dezavantajlara sahiptir. Ayrıca halkanın her zaman belli konumda sabit durması gerekir [65].



Şekil 1.11. Sürekli Akış Mikroekstraksiyon (CFME) Sistemi

Şekil 1.11’de sistemi görülen sürekli akış mikroekstraksiyon (CFME) yön- temi 2000 yılında Liu ve Lee tarafından uygulanmıştır [99]. Bu yöntemde or- ganik damla bir enjektör ile sisteme örnek taşıyan polietereeterketon (PEEK) veya politetrafloroetilen (Teflon, PTFE) bağlantı borusunun ucuna bırakılır. Örnek, pompa ile sürekli olarak damla üzerine gönderilir ve sistemden dışarı atılır. Atılan örnek tekrar sisteme geri verilerek örnek hacmi çok daha fazla

azaltılabilir [100,101]. Hem difüzyon hem de moleküler momentum, ekstraksiyon etkinliğine katkıda bulunur.

Bu yöntem organik çözücünün tam bir damla olması ve sürekli olarak yeni örnek çözeltisi ile temas halinde olması nedeniyle statik SDME'ye göre daha fazla zenginleştirme faktörü elde edilmesini sağlar. Ayrıca yüksek zenginleştirme faktörleri sağlanabildiğinden dolayı küçük hacimli örnekler ile çalışılabilir [63,65].

SDME yöntemleri ile ekstrakte edilen maddelerin tayininde GC ve HPLC'nin yanı sıra mikro düzeyde örneklerle ölçüme izin veren elektro termal atomik absorpsiyon spektrometresi (ETAAS) ve elektro termal buharlaşma-indüktif optik plazma emisyon spektrometre/kütle spektrometresi (ETV-ICPOES/MS) gibi cihazlar kullanılabilir [102]. Son yıllarda, kapiler elektroforez (CE), SDME sonrası hem iyonik hem de nötr bileşikler için son derece cazip bir ayırma tekniği haline gelmiştir [63].

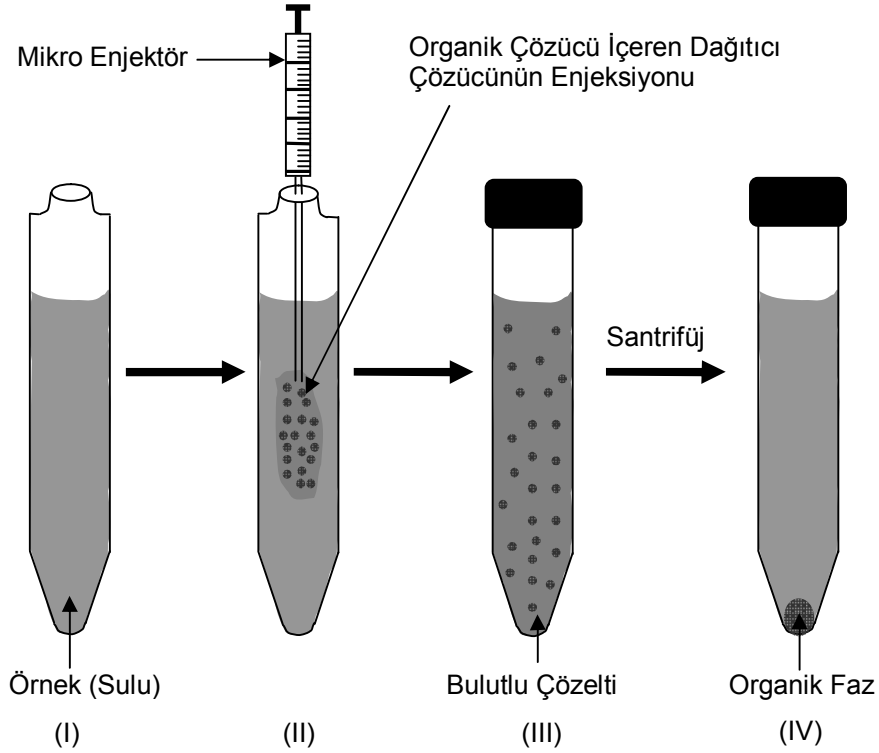
1.5.3.2. Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon

(Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, DLLME)

Rezaee vd. (2006) birkaç mililitre dağıtıcı (dispersive) çözücü ile birlikte mikro hacimde ekstraksiyon çözücüsünün kullanıldığı yeni bir mikroekstraksiyon yöntemi geliştirmişlerdir [103]. Dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DLLME) yöntemi, homojen sıvı-sıvı ekstraksiyonu (HLLLE) ve bulutlanma noktası ekstraksiyonu (CPE) yöntemlerine benzer bir üçlü çözücü sistemine dayanmaktadır [104].

Şekil 1.12'de dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DLLME) sistemi görülmektedir. Yöntem hedef maddeleri içeren sulu örnek (I) içersine dağıtıcı (dispersive) ve ekstraksiyon çözelti karışımının hızlı bir şekilde enjeksiyonuna (II) dayanır. Ekstraksiyon çözücüsü toplam çözelti hacminin % 1–3'ünü oluşturur. Örnek çözeltisine bu şekilde enjeksiyon örnek içerisinde

ekstraksiyon çözücüsünün küçük damla formlarının oluşmasına neden olur (III). Bu adımda çözeltide bulut oluşur. DLLME'de ekstraksiyon karışımının % 99–97'sini oluşturan sulu çözelti içinde ekstraksiyon çözücüsünün iyi damlacıklar oluşturmasında dağıtıcı (dispersive) çözücü anahtar rol oynar. Ekstraksiyon çözücüsü ile sulu örnek arasında büyük yüzey alanı olduğundan dengeye çok hızlı ulaşır. Böylece ekstraksiyon zamandan bağımsız olur. Hidrofobik maddeler toplam sulu çözelti içerisinde dağılan ekstraksiyon çözeltisinde zenginleştirilir. Karışım santrifüjlendiğinde küçük damlacıklar konik tüpün dibinde toplanır (IV). Dibe toplanan alt fazdaki ekstraksiyon çözücüsü, mikro enjektörle alınarak uygun enstrumantal yöntemler ile tayin edilir [63,65].



Şekil 1.12. Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon (DLLME) Sistemi

Ekstraksiyon çözücüsü olarak yoğunluğu sudan ağır ve su ile karışmayan klorobenzen, karbon tetraklorür ve tetrakloroetilen gibi çözücüler kullanılırken dispersive çözücü olarak aseton, etanol, metanol ve asetonitril gibi su ile karışan polar çözücüler kullanılır [63,65].

Yöntem başlangıçta PAH'lar, organik fosforlu pestisitler ve klorobenzenler gibi organik bileşiklerin tayinlerinde kullanılmıştır. Ancak son zamanlarda yöntemin uygulaması inorganik bileşiklerin tayinine doğru genişlemiştir [105].

DLLME'nin başlıca avantajları; basitliği, düşük maliyeti, hızlılığı, düşük örnek hacmi, yüksek geri alınabilirlik ve zenginleştirme faktörleri elde edilebilmesidir [63,65].

Yöntemin seçiciliği kötü olduğu için karmaşık örneklerden ekstraksiyonlarda tercih edilmezler. Üç farklı çözücünün gerekli olması, ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan bileşiklerin yoğunluğunun sudan ağır olması gerektiğinden çözücü seçiminin sınırlı olması ve santrifüj gerektirmesi yöntemin dezavantajları olarak sayılabilir [63,65].

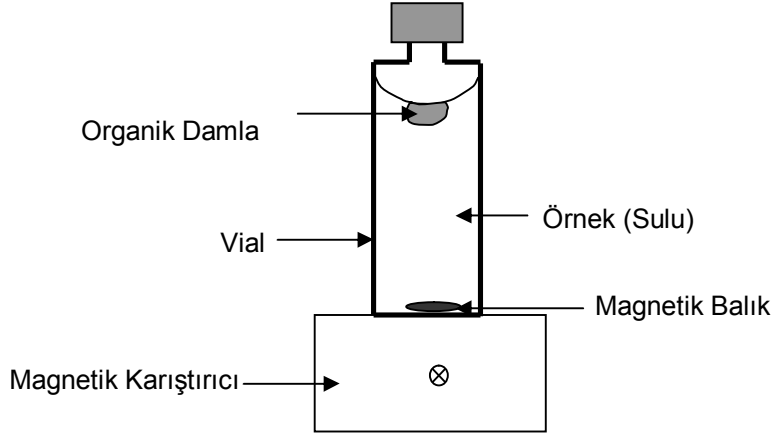
1.5.3.3. Yüzen Katı Organik Damla Mikroekstraksiyon

(Solidified Floating Organic Drop Microextraction, SFODME)

Statik mikro damla temelli sıvı faz mikroekstraksiyon yönteminde bazı dezavantajlar vardır. İlk olarak yerçekimi, kayma kuvveti ve girdap (vorteks) yüzünden mikro damla kopabilir. Ayrıca karıştırma hızı sınırlı olduğu için ekstraksiyon etkinliği ve zenginleştirme faktörleri azalır. Mikro damla hacmi sınırlı olduğu için büyük enjeksiyon hacmi gerektiren enstrumantal cihazlar ile kullanılamazlar [63].

Lu vd. (2006) doğrudan askıda damla mikroekstraksiyon (directly-suspended droplet microextraction, DSDME) olarak isimlendirdikleri yeni bir mikroekstraksiyon yöntemi geliştirmiştir [106]. Bu yöntemde, bir magnetik karıştırıcı sulu örnek içeren vialin dibine yerleştirilerek düşük vorteksli bir karıştırma sağlanır. Eğer suyla karışmayan organik damla, sulu örneğin yüzeyine yerleştirilse damla vortekse yakın veya merkezine yerleştirilmiş olur. Kütle transferi olurken damla da sulu fazın yüzeyinde kendi etrafında döner.

Bu yöntem diğer LPME sistemleri ile karşılaştırıldığında, işlemsel parametrelerin seçiminde, özellikle organik çözücü miktarında ve karıştırma hızı parametrelerinde daha esneklik sağlar. Yöntem organik çözücünün büyük hacimlerinin de kullanımına izin verdiği için GC'nin yanı sıra HPLC sistemleri ile de kullanıma uygundur.



Şekil 1.13. Yüzen Katı Organik Damla Mikroekstraksiyon (SFODME) Sistemi

Yöntem, çok basittir ve hızlı bir şekilde dengeye ulaşılır. Ayrıca destek materyali gerektirmez. Ancak metodun en büyük dezavantajı örnek içerisinde askıda duran mikro damlanın çıkarılmasıdır. Mikro enjektör kullanarak organik damlayı örnek içerisinde tam olarak almak imkânsızdır. Organik damla alınırken enjektör içersine bir miktar su alınması da kaçınılmazdır ve bu da GC-ECD gibi enstrümantal sistemlerde problem oluşturmaktadır [63]. Bu problemin üstesinden gelmek, için Khalili Zanjani vd. (2007) yüzen katı organik damla mikroekstraksiyon (SFODME) isimli yeni bir yöntem geliştirmişlerdir [107]. Bu yöntemde oda sıcaklığına yakın bir sıcaklıkta erime noktasına sahip organik çözücünün (10–30°C) küçük miktarı örnek çözeltisi yüzeyinde yüzdürülür. Çözelti belirli bir süre karıştırıldıktan sonra buz banyosuna yerleştirilir. Donan organik çözücü, küçük konik bir vialle alınır. Organik çözücü eridikten sonra maddelerin tayini için kullanılır [63,65]. Bu yöntemle ilk çalışma, su örneklerinden GC-FID ile PAH'ların ekstraksiyonunun yapılması ile olmuştur [107]. Ayrıca, yöntem sulardan metal iyon komplekslerinin

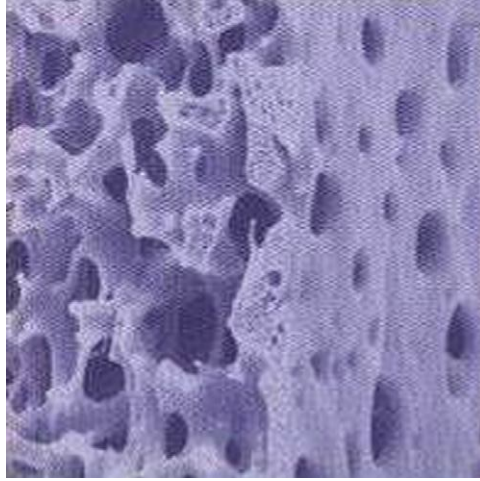
ekstraksiyonu için de uygulanmıştır [108]. Şekil 1.13'de Yüzen Katı Organik Damla Mikroekstraksiyon (SFODME) sistemi görülmektedir.

Leong ve Huang (2008) SFODME'da yeni bir uygulama geliştirmişlerdir. Örnek içerisinde bir damla yerine dağıtıcı (dispersive) ve ekstraksiyon çözücü karışımının enjeksiyonu ile örnek içerisinde küçük damlacıklar oluşturmuşlardır. Bu uygulama, örnek ve ekstraksiyon çözücüsü arasında daha fazla etkileşim sağlar. Böylece daha iyi ekstraksiyon zamanı ve hızlı kütle transferine neden olur [109].

Bu yöntem çok cazip görünmesine rağmen diğer birçok LPME yöntemi gibi biyolojik örneklerden veya çok karmaşık örneklerden maddeyi ekstrakte etmek için ayrıca ön temizleme (clean-up) işlemlerine gerek duyulmaktadır. Bu yöntemin avantajları düşük maliyet, basitlik, yüksek bir doğruluk ve kesinlik, düşük ekstraksiyon zamanı, organik çözücü tüketiminin minimum düzeyde olması ve basit parçalara gerek duyulmasıdır. Ancak uygun çözücü seçimindeki sınırlamalar ve ekstraksiyon çözücüsünün dondurulmasının gerekliliği, dezavantajlar olarak sayılabilir [65].

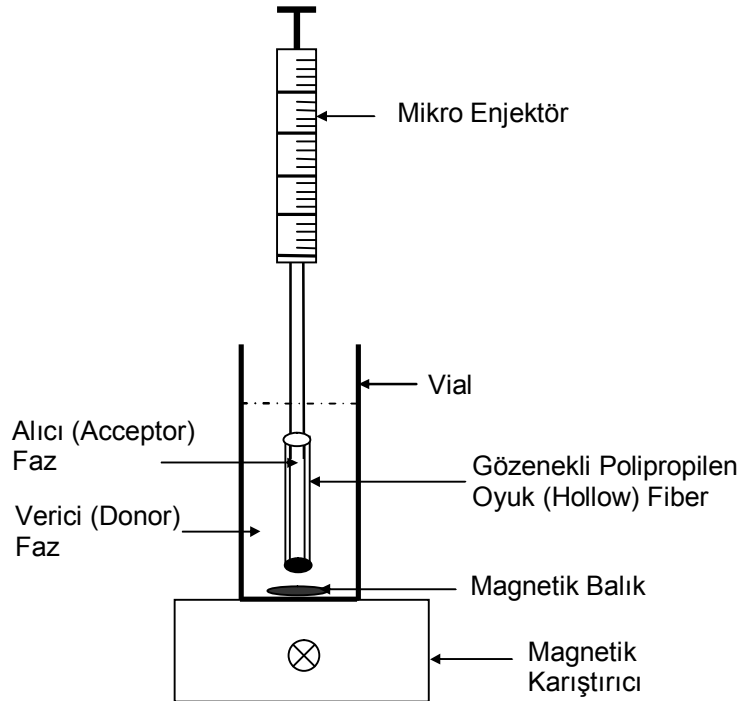
1.5.3.4. Oyuk (Hollow) Fiber Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction, HF-LPME)

HF-LPME yöntemi 1999 yılında Pedersen-Bjergaard and Rasmussen tarafından geliştirilmiştir [110]. Yöntemde sulu çözelti içerisindeki hedef maddeler gözenekli polipropilen oyuk (hollow) fiberin duvarlarına emdirilmiş organik çözücü yardımıyla fiberin içerisindeki alıcı faza ekstrakte edilir. Şekil 1.14'de polipropilen fiberin duvar kesiti görülmektedir.



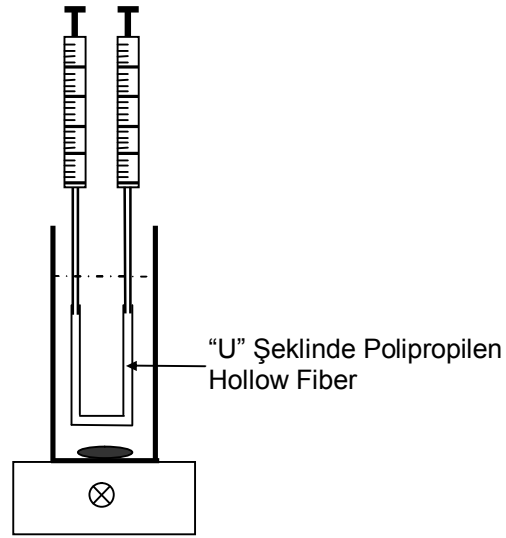
Şekil 1.14. Polipropilen Hollow Fiberin Duvar Kesiti [111].

Deney düzeneğinde oyuk fiber, ya çubuk şeklinde (Şekil 1.15) bir ucu kapalı diğer ucu mikro enjektöre takılı ya da her iki ucu mikro enjektör ile bağlantılı “U” şeklinde (Şekil 1.16) hazırlanarak kullanılır [110,112].



Şekil 1.15. Oyuk (Hollow) Fiber Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (HF-LPME) Sistemi

İlk olarak fiberin gözenekleri düşük polariteli (toluen, oktanol, diheksileter vb.) organik çözücünün içerisinde birkaç saniye daldırılıp kapiler etki ile doldurulur. Gözeneklerdeki organik çözücü fiber duvarlarında ince bir film tabakası oluşturarak, fiber içerisindeki alıcı fazın verici faz ile karışmasını engeller. Fiber, alıcı faz çekilmiş mikro enjektörün ucuna takılır. Ardından alıcı faz, mikro enjektörden fiberin içersine doldurulur ve hedef maddelerin analizi için sulu örnek çözeltisine daldırılır. Hedef maddeler fiberin içerisinde hapsolan alıcı faza ekstrakte edilir. Ardından alıcı fazdaki maddeler doğrudan HPLC, GC, CE gibi analitik cihazlarla tayin edilir. Alıcı faz organik çözücünün kendisi ile doldurulduğunda ikili faz sistem, asidik veya bazik sulu çözelti ile doldurulduğunda üçlü faz sistem olarak isimlendirilir. Üçlü faz sistem, genelde HPLC ve CE ile uyumludur. Alıcı faz hacmi 2–30 µL arasında değişirken, verici faz hacmi 50 µL ile 1 L arasında değişir [63,111,113].



Şekil 1.16. “U” Şeklinde HF–LPME Sistemi

İkili faz sistemde, maddeler fiberin hem gözeneklerinde hem de içerisinde bulunan organik çözücüye ekstrakte edilir. Maddeler verici fazdan alıcı faza transfer olur. Fazlar arasında dağılıma uğrayan, örneğin bir “A” maddesi aşağıdaki dengeyi oluşturur. [63,114].

$$A_{\text{verici(örnek)}} \rightleftharpoons A_{\text{alıcı}} \quad (1.12)$$

A'nın dengede alıcı faz ve verici faz arasındaki dağılım katsayısı, $K_{d(a/v)}$;

$$K_{d(a/v)} = (C_d)_a / (C_d)_v \text{ şeklindedir.} \quad (1.13)$$

$(C_d)_a$: A'nın dengede alıcı fazdaki (organik faz) derişimi

$(C_d)_v$: A'nın dengede verici fazdaki derişimidir.

İkili faz sistemde geri alınabilirlik (R) aşağıdaki şekilde hesaplanabilir [115].

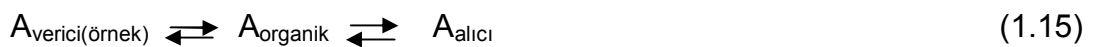
$$\% R = \frac{K_{d(a/v)} \times V_{\text{org}}}{K_{d(a/v)} \times V_{\text{org}} + V_v} \times 100 \quad (1.14)$$

V_{org} , fiberin içerisinde ve gözeneklerindeki toplam alıcı faz hacmi, V_v ise verici faz hacmini göstermektedir.

Eşitlik 1.14'den de görüldüğü gibi geri alınabilirlik dağılım katsayısı (K), verici faz hacmi ve alıcı faz hacmine bağlıdır. Yüksek dağılım katsayısı ile yüksek geri alınabilirlik elde edilebilir.

İkili faz sistemlerde, sudaki çözünürlükleri çok az, organik çözücüde (ekstraksiyon çözücüsü) çözünen bileşikler tayin edilebilir. Organik fazın fiber ile uyumlu olmasına dikkat edilmelidir. Ayrıca hedef maddelere karşı duyarlı olmalı, su ile karışmamalı ve uçuculuğu düşük olmalıdır [63].

Üçlü faz sistemde ise, örneğin "A" maddesinin transferi, sulu örnekten fiberin gözeneklerindeki organik sıvıya, oradan da fiberin içerisindeki sulu alıcı faza olur. Denge eşitlik 1.15'de gösterildiği gibi olur.



Geri alınabilirlikler hesaplanırken, denge kurulduktan sonra verici faz ile or-

ganik faz arasında ($K_{d(org/v)}$) ve alıcı faz ile organik faz arasındaki ($K_{d(a/org)}$) dağılıma katsayıları dikkate alınır.

$$K_{d(org/v)} = (C_d)_{org} / (C_d)_v \quad (1.16)$$

$$K_{d(a/org)} = (C_d)_a / (C_d)_{org} \quad (1.17)$$

$(C_d)_{org}$: A'nın dengede organik fazdaki derişimini gösterir.

Üçlü faz sistemde toplam kütle dengesi dikkate alınarak geri alınabilirlik aşağıdaki gibi hesaplanır [115].

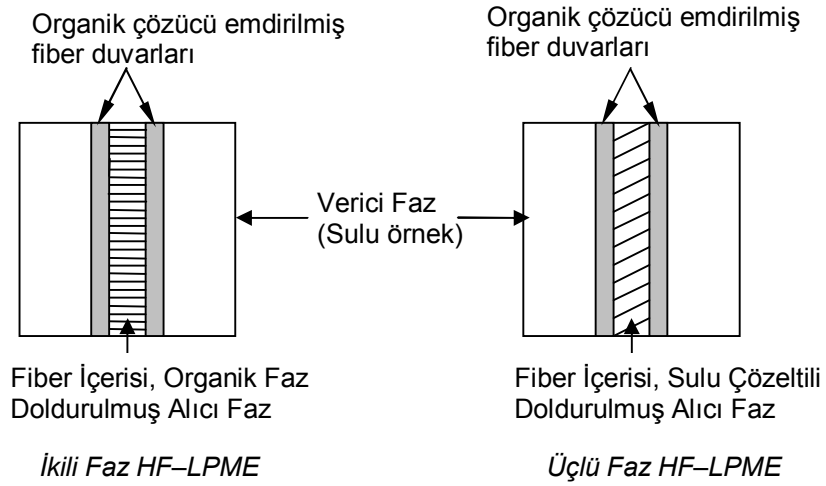
$$\% R = \frac{K_{d(org/v)} \times K_{d(a/org)} \times V_a}{(K_{d(org/v)} \times K_{d(a/org)} \times V_a) + (K_{d(org/v)} \times V_{org}) + V_v} \times 100 \quad (1.18)$$

V_a , fiber içerisindeki sulu alıcı faz miktarını, V_{org} ise fiberin gözeneklerindeki organik çözücü miktarını gösterir.

Üçlü faz sistemi, iyonlaşabilir asidik ve bazik bileşikler ile sınırlıdır. Bazik bileşiklerin ekstraksiyonunda analitlerin çözünürlüğünü artırmak için alıcı fazın pH'ı düşük tutulurken, sulu örnek çözeltisinde çözünürlüğü baskılamak için pH alkali olarak ayarlanır. Bu şekilde organik fazdan geri ekstrakte olmadan bileşikler organik faza oradan da alıcı faza ekstrakte edilir. Asidik bileşik analizlerinde ise alıcı faz alkali yapılırken örnek çözeltisi asidik olarak ayarlanır. Ekstraksiyon sonrası alıcı faz HPLC, CE gibi cihazlar ile doğrudan kullanılabilir [63,114]. Şekil 1.17'de ikili ve üçlü faz HF–LPME sistemleri gösterilmektedir.

HF–LPME statik ve dinamik metot olmak üzere iki şekilde uygulanabilir. Statik metotta örnek karıştırılarak maddelerin mikro enjektörün ucunda takılı fiber içerisindeki alıcı faza difüzyonu sağlanır. Dinamik metotta ise mikro

şırınganın pistonu da maddelerin ekstraksiyonunda etkilidir. Ekstraksiyon boyunca mikro enjektörün pistonu hareket ettirilerek fiber içerisindeki alıcı faz enjektöre geri çekilip tekrar fibere aktarılır. Statik yöntem ile karşılaştırıldığında dinamik yöntem, daha iyi ekstraksiyon etkinliği ve yinelenbilirlik sağlar [114,116].



Şekil 1.17. İkili ve Üçlü Faz HF-LPME Gösterimi

HF-LPME basit, hızlı, ucuz ve yüksek oranda seçici ve yüksek zenginleştirme faktörüne sahip bir yöntemdir. Oyuk fiber mikroekstraksiyon yöntemi çevresel, biyolojik, gıda örneklerinde ve asidik ve bazik ilaç analizlerinde zenginleştirmenin yanı sıra ön temizleme işlemini de aynı anda yaparak kullanılabilir. Fiber, alıcı fazın örnek çözelti ile direkt irtibatını kestiğinden dolayı şiddetli karıştırma hızlarında ekstraksiyon çözücüsü kaybını en az düzeylere indirir. Polipropilen fiber çok ucuz bir maliyete sahiptir. Bu nedenden dolayı her analizde bir kez kullanılır. Fiberin her analizde bir kez kullanılması önceki analizlerden kirlilik gelmesini engeller. Polipropilen hollow fiber küçük gözeneklere sahip olduğu için matriks ortamdaki büyük molekül ağırlıklı kirliliklerin alıcı faza girmesini engelleyerek iyi bir ön temizleme işlemi yapar [63,83,111,113,114,117].

Yöntem alıcı faz ile verici faz arasındaki membran bariyerin ekstraksiyon etkinliğini azaltması ve ekstraksiyon süresini uzatması, fiberin yüzeyinde

hava kabarcıklarının oluşması ile ekstraksiyon etkinliği ve yinelenebilirliğin azaltması, gerçek örnek analizlerinde matriksin (kan, plazma, atık su) fiber üzerindeki gözenekleri tıkkayabilmesi gibi dezavantajlara sahiptir [63,118].

1.6. İzmarit Zifiri Analizi

PAH'ların buldukları matriks ortamından saflaştırılmalarında ve zenginleştirilmelerinde birçok ekstraksiyon yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden oyuk fiber sıvı faz mikroekstraksiyon yöntemi (HF-LPME), basit, hızlı, zararlı organik çözücü kullanımını mikro düzeylere düşürmesi, zenginleştirme ve ön temizleme işleminin aynı anda yapılabilmesi, ekstraksiyon sonrası örneğin doğrudan GC, HPLC, gibi sistemlere verilebilmesi gibi birçok avantaja sahiptir.

N. Ratola vd. (2008) HF-LPME yöntemini kullanarak GC-MS ile çam iğnelerindeki 13 PAH bileşimini tayin etmişlerdir. İlk olarak çam iğnelerini 20 mL % 20 (v/v) aseton içeren çözelti içinde çözmüşlerdir. HF-LPME için bu örnekten 5 mL kullanmışlardır. HF-LPME'de alıcı faz türü, yardımcı çözücü etkisi, tuz etkisi, karıştırma hızı, karıştırma zamanı gibi parametreleri optimize ettikten sonra, çam iğnelerindeki PAH'ları analiz etmişlerdir. PAH'ların kompleks ortamdan alınmasında HF-LPME başarılı olurken aynı zamanda zenginleştirme de sağlayarak GC-MS ile tayin edilebilir hale getirmişlerdir. Sinyal/gürültü oranı 3 kabul edilerek PAH'ların en küçük tayin limitleri 0.01-0.95 ng/g (kuru kütle) olarak bulunmuştur [119].

C. Basheer vd. (2008) örnek hazırlama yöntemi olarak ikili faz HF-LPME, iyonik sıvılı üçlü faz HF-LPME ve SPME yöntemlerini kullanarak sulu örnekten GC-MS ile alifatik ve aromatik hidrokarbonların tayinini yapmışlar ve üç yöntemin performansını değerlendirmişlerdir. Her iki HF-LPME yönteminde de 10 mL verici faz kullanmışlardır. İkili fazda fiberin gözenek ve içerisi toluen ile doldurulmuştur. Üçlü faz HF-LPME'de ise fiberin gözenekleri hem su ile hem de organik faz ile karışmayan iyonik bir sıvı ile doldurulurken fibe-

rin içerişi toluen ile doldurulmuştur. Çalışmalarda 1 cm uzunluğunda polipropilen fiber kullanmışlardır. İyonik sıvı destekli üçlü faz HF–LPME ile yapılan çalışmalarda diğer iki yöntemle göre daha iyi sonuçlar elde etmişlerdir. Çalışmada fiberin gözeneklerini 1-bütül 3-metillimidazolium hekzaflorofosfat, içerişini ise toluen ile doldurduklarında yüksek geri kazanım elde etmişlerdir. Alifatik ve aromatik hidrokarbonların analizinde 210 kata kadar zenginleştirme faktörleri elde etmişlerdir. Analiz süresi 40 dakika, yinelenebilirlik % 11'den az ve en küçük tayin limitleri 1–7 ng/L olarak belirlenmiştir [120].

X. Jiang vd. (2005) toprak örneklerinden altı PAH bileşimini dinamik tepe boşluklu (headspace) oyuk fiber mikroekstraksiyon yöntemini kullanarak GC–MS ile tayin etmişlerdir. Çalışmada programlanabilir enjektör pistonu kullanarak ekstraksiyon etkinliğini artırmayı amaçlamışlardır. Ekstraksiyon süresince piston ile fiber içerişindeki alıcı fazı enjektör içerişine geri çekip tekrar fiber içersine aktarmışlardır. Organik faz türü, sıcaklık, tuz etkisi ve alıcı fazın enjektöre her çekilişinde, enjektörde bekleme süresi gibi parametrelerin zenginleştirme faktörlerine etkisini incelemişlerdir. Çalışılan PAH bileşiklerinin en küçük tayin sınırları 5.9–76 ng/g arasında değişmektedir, tekrarlanabilirlikler ise yüzde 5.40 ile 14.60 arasında değişmektedir. HS–DHF–LPME yönteminin yarı uçucu bileşiklerin tayininde hızlı, etkili, basit ve ucuz bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir [121].

M. Charalabaki vd. (2005) atık sularından HF–LPME–GC–MS ile düşük molekül ağırlıklı PAH bileşiklerini tayin etmişlerdir. Optimum ekstraksiyon şartlarını, verici faz 5 mL sulu örnek, % 2.5 NaCl, karıştırma hızını 1000 rpm olarak belirlemişlerdir. Alıcı faz olarak toluen kullanmışlar ve ekstraksiyon süresini 15 dakika olarak seçmişlerdir. Tayini yapılan PAH bileşiklerinin en küçük tayin sınırı 5–11 ng/L olarak belirlemişlerdir. PAH bileşiklerinin tekrarlanabilirliği % 2.7 ile % 11.3 arasında değişmektedir. Yinelenebilirlikleri ise % 7.9 ile % 14.4 arasında değişmektedir [122].

C. Basheer vd. (2003) yağmur sularında 16 PAH ve 12 organoklorlu pestisit

(OCP) bileşimini HF–LPME–GC–MS ile tayin etmişlerdir. Karıştırma hızı, ekstraksiyon süresi, tuz, alıcı faz türü, pH gibi parametreleri, gerçek örnek analizlerinden önce optimumlaştırmışlardır. Bileşikler için 35 dakika ekstraksiyon süresinde, 100 katdan daha fazla zenginleştirme faktörleri elde etmişlerdir. Tekrarlanabilirlikler, PAH'lar için % 1.3 ile % 13.6, OCP'ler için ise % 1.7 ile % 13.8 arasında bulunmuştur. En küçük tayin sınırları ise PAH'lar için 2–47 ng/L OCP'ler için ise 13–59 ng/L olarak belirlemişlerdir [123].

M.B. Melwanki vd. (2006) nehir sularındaki altı hidroksiaromatik bileşiği üçlü faz HF–LPME yöntemini kullanarak, LC–UV ile 254 nm dalga boyunda tayin etmişlerdir. Yöntemde ayrıca ekstraksiyon etkinliğini artırmak amacı ile ekstraksiyon süresince fiberdeki alıcı fazı belirli bir hızda enjektör içerisine geri çekip tekrar fiber içersine aktarmışlardır. Çalışmada verici faz olarak 10 mL 1 M'lık HCl, alıcı faz olarak 5 µL 1M'lık NaOH çözeltisi kullanmışlardır. Fiberin gözeneklerini doldurmada organik çözücü olarak ise nanonal kullanmışlardır. Hidroksiaromatik bileşiklerin geri alınabilirlikleri % 33.9–63.0 arasında bulunmuştur. Tekrarlanabilirlikler, % 3.9 ile % 5.6 arasında değişmektedir. En küçük tayin sınırları ise 2.0–51.2 ng/mL arasında bulunmuştur [124].

Sigara içimi sonrası oluşan kimyasalların tayinlerini iki grupta toplamak mümkündür:

- I) Duman analizleri (ana duman ve yan duman)
- II) Zifir analizleri

Literatürde görülen çalışmaların çoğunluğu duman üzerinedir. Dumanın doğrudan ağızdan ciğerlere hava ile giderek sağlık için büyük bir potansiyel tehlike oluşturması araştırmaların yoğunluğunun nedenidir. Ancak izmaritin elle ve ağız ile olan teması, içinde bulunan kimyasalların potansiyel tehlikesinin ihmal edilmemesini ve izmarit içindeki zifirde analiz için yöntem geliştirilmesini önemli hale getirmektedir. Zifirin, sıvı ve içindekilerin yüksek kay-

nama noktalı organik maddeler oluşu analizlerde HPLC'yi ön plana çıkar-
maktadır.

Nitekim Aygün vd. (1996) Türkiye'deki sigaralarda izmarit zifirinde BaP tayi-
ni için HPLC–UV dedektör sisteminin kullanıldığı bir yöntem geliştirmişlerdir.
Sigara izmaritinde BaP'yi ekstrakte etmek için farklı işlemler denemişler ve
en iyi sonucu n-heksan ile yapılan ekstraksiyon işleminde elde etmişlerdir.
Sigara izmaritini asetonitrilde (ACN) çözdükten sonra 10 mL n-heksan ile 10
dakika süre ile dört kez karıştırarak sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi yapmışlar-
dır. Ekstraksiyon sonrasında sigara izmarit zifirinden BaP'ni % 50 oranında
geri kazanmayı başarmışlardır. % 10.5 bağıl standart sapma (% RSD) ile
izmaritteki BaP miktarını, ortalama 78 ng/sigara olarak bulmuşlardır [125].

Aygün (2005) Yüksek Basınç Sıvı Kromatografide (HPLC) Floresan detektör
ile Türkiye'deki sigaralardaki izmarit zifirinde Benzo[a]piren ve
Dibenzo[a,h]antrasen (DahA) tayini için metot geliştirmiştir. 20 adet sigara
filtresini 50 mL asetonitrilde çözdükten sonra 20 mL n-hekzan ile üç kez
ekstraksiyon yapmıştır. Ekstraksiyon sonrası n-hekzanı 5 mL'ye konsantre
etmiştir. Elde edilen ekstraktı 100 mL n-hekzan/diklorometan (DCM) (9:1
v/v) karışımı yardımı ile XAD–2 kolondan geçirdikten sonra kuruluğa kadar
buharlaştırmıştır. Buharlaştırılan karışıma 1 mL DCM eklendikten sonra 8
µL'si HPLC sisteme enjekte edilmiştir. Ortalama BaP ve DahA miktarlarını
sırası ile 74.28 ng/filtre, 5.24 ng/filtre olarak bulmuştur[126].

Demirci (2005) sigara izmarit zifirinden PAH'ların geri kazanılmasında karşı-
laşılan problemler üzerine doktora çalışması yapmıştır. Çalışmada izmarite
eklenen PAH'ların geri alınabilirliklerinde en yüksek değer % 117 ile
Floranten'de sağlandığını ve benzo[a]piren dışında diğer PAH'ların geri alı-
nabilirliğinin % 33–63 arasında değiştiğini bildirmiştir. Ayrıca selüloz asetat
filtrelerden PAH'ların geri kazanılmasının zor olduğunu ve sigara izmariti
gibi kompleks bir ortamda PAH'ların cam yüzeyine tutunmalarının önemli bir
hata kaynağı olduğunu bildirmişlerdir [127].

1.7. Çalışmanın Amacı

Literatürde verilen örneklerde olduğu gibi PAH'ların sigara ve dumandaki tayinleri üç basamaktan oluşmaktadır.

- I) Örneğin hazırlanması
- II) Zenginleştirme, saflaştırma
- III) Bir enstrüman ile kalitatif-kantitatif tayin

Bu çalışmada izmarit zifirinde bulunan PAH'ların tayini için bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Yöntem, üç basamaktan oluşmaktadır.

- I) İzmaritin çözünmesi,
- II) HF–LPME ile izmarit çözeltilisinden PAH'ların alınması,
- III) Ekstraksiyon sonrasında zenginleştirme ile HPLC–UV ile tayin

Yukarıdaki basamakların gerçek örneklerle uygulanmasından önce, optimum deney koşullarının (alıcı faz türü; verici faz koşulları; ACN derişimi, pH, tuz, karıştırma hızı, karıştırma zamanı, fiber boyu seçimi vb.) belirlenmesi için model PAH çözeltileri ile çalışmalar yapılmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

2.1.1 . Kimyasallar Maddeler

1. Polipropilen oyuk (hollow) fiber (fiber iç çapı: 600 μm , fiber et kalınlığı: 200 μm , gözenek çapı 0.2 μm) Membrana (Wuppertal, Germany)
2. Toluen (HPLC saflıkta, Supelco),
3. Asetonitril (HPLC saflıkta, Merck),
4. İzo-oktan (HPLC saflıkta, Riedel),
5. Aseton (HPLC saflıkta, Merck),
6. n-oktan (HPLC saflıkta, Merck),
7. Oktanol (HPLC saflıkta, Merck)
8. Deiyonize Su,
9. Antrasen, (Supelco)
10. Floranten, (Supelco)
11. Piren, (Supelco)
12. Benzo[a]antrasen, (Supelco)
13. Benzo[b]floranten, (Supelco)
14. Benzo[a]piren (Supelco)
15. NaCl (analitik saflıkta, Meck)
16. NaOH (analitik saflıkta, Merck)
17. HCl (% 37 w/v saflıkta, d: 1.18 g/cm³, Merck)
18. n-Hekzan (HPLC saflık Merck)
19. Metanol (HPLC saflık, Merck)
20. Bazik alümina (kolon kromatografi, partikül boyutu: 0.063–0.200 mm, Merck)
21. Silika (kolon kromatografi, partikül boyutu: 0.063–0.200 mm, Merck)
22. Sigara (Yerel marketten rastgele satın alındı., Parliament, Samsun, Winston marka)

2.1.2. Cihazlar

1. Yüksek Basınç Sıvı Kromatograf (HPLC), THERMO SEPARATION PRODUCTS, SPECTRA SYSTEM, P1500
2. Detektör, THERMO SEPARATION PRODUCTS, SPECTRA SYSTEM, UV 1000
3. Enjektör, SGE LC 10 µL (23 guage)
4. Ultrasonik Banyo, BANDELIN SONAREX, SUPER, RK 510H
5. pH Metre, pH METER, METTLER TOLEDO, MP 220
6. pH Elektrot, METTLER TOLEDO
7. Magnetik Karıştırıcı, BIBBY STUART
8. Magnetik Balık (uzunluk: 10 mm, çap: 3 mm)
9. Deiyonize Su Cihazı, MILLIPORE, ELIX3
10. C18 Kolon, PHENOMEX (150 mm; 4.6 mm, partikül çap = 5 µm)

2.2. PAH Çözeltileri

Antrasen (An): 0.2 mg/mL metanol çözeltisinde

Floranten (Flu): 0.2 mg/mL diklorometan çözeltisinde

Piren (Py): 0.2 mg/mL diklorometan çözeltisinde

Benzo[a]antrasen (BaA): 0.2 mg/mL diklorometan çözeltisinde

Benzo[b]floranten (BbF): 0.2 mg/mL metanol çözeltisinde

Benzo[a]piren (BaP): 0.2 mg/mL diklorometan çözeltisinde

2.3. PAH Standart Çalışma Çözeltileri

Stok PAH karışımlarını hazırlamak için; 2.2'deki çözeltilerinden antrasen için 100 µL ve floranten, piren, benzo[a]antrasen, benzo[b]floranten, benzo[a]piren'nin her birinden 200 µL alınarak vialde konuldu. Vialdeki karışım buharlaştırılıp, 2 mL metanol konularak; antrasen: 10 µg/mL, floranten, piren, benzo[a]antrasen, benzo[b]floranten, benzo[a]piren: 20 µg/mL olacak

şekilde stok PAH karışımı hazırlandı.

Stok PAH karışım çözeltisinden 200 µL alınıp vialde konuldu. Üzerine 1.8 mL metanol konularak; antrasen: 1 µg/mL, floranten, piren, benzo[a]antrasen, benzo[b]floranten ve benzo[a]piren: 2 µg/mL derişimlerde çalışma çözeltisi hazırlandı.

Çalışma çözeltisinden 100 µL alınıp, üzerine 0.9 mL metanol konularak derişimleri, 100 ng/mL antrasen, 200 ng/mL floranten, piren, benzo[a]antrasen, benzo[b]floranten ve benzo[a]piren olan standart çalışma çözeltisi hazırlandı.

2.4. Fiberin Temizlenmesi ve Hazırlanması

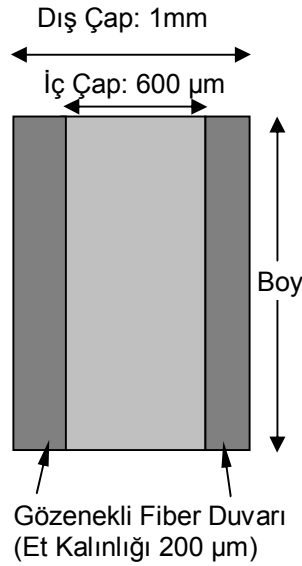
Polipropilen oyuk fiber membran aseton içinde, ultrasonik banyoda 5 dakika süre ile bekletildi. Fiber, aseton içerisinde çıkarılarak kurutuldu. Çalışmalarda kullanılmak üzere 22 mm uzunluğunda kesildi. Her ekstraksiyon için yeni bir parça fiber kullanıldı.

2.5. Fiberin Boşluk ve Gözenek Hacminin Bulunması

Fiberin gözenek hacmini belirlemek için, aseton içinde yıkanıp kurutulan fiberden belirli uzunluklarda (4–7 cm) kesildi ve tartıldı. Enjektör ucuna takılan fiber, toluen içerisinde bir iki dakika bekletilerek gözeneklerin dolması sağlandı. Fiber boşluğunda olabilecek toluen, enjektördeki hava yardımı ile uzaklaştırılarak, fiber tekrar tartıldı. Aradaki kütle farkından, fiber gözeneğine yerleşmiş toluenin kütlesi belirlendi. Toluenin yoğunluğu (0.867 g/mL) yardımıyla fiberin gözenek hacmi, 1 cm uzunluktaki gözenek hacmi olarak verildi. Çalışma yedi kez tekrarlandı.

Fiberin boşluk hacminin belirlenebilmesi amacıyla, iki farklı yöntem kullanıldı. Birinci yöntemde, belli uzunluktaki fiberin gözenekleri mikro enjektör yardımı ile doldurularak tartıldı. Ardından gözenekleri ve iç hacmi doldurularak tekrar tartıldı. Aradaki kütle farkından fiberin iç hacmindaki toluen miktarı belirlendi. Daha sonra toluen yoğunluğu (0.867 g/mL) yardımıyla fiberin boşluk hacmi 1 cm uzunluktaki boşluk hacmi olarak verildi. Çalışma yedi kez tekrarlandı.

İkinci yöntemde ise, belli uzunlukta kesilen fiber, 50 µL toluen çekilmiş mikroenjektöre takılarak, toluen içine daldırıldı. Fiberin gözeneklerinin dolması için 1–2 dakika süre ile beklendikten sonra, toluen içerisinde opak görünüme sahip olan fiberin içerisine toluen dikkatli bir şekilde enjekte edildi. Fiberin tamamı doldurularak boşluk hacmi belirlendi. Şekil 2.1’de polipropilen fiberin özellikleri verilmiştir.



Şekil 2.1. Polipropilen Fiberin Özellikleri

2.6. Kromatografik Koşullar

Hareketli Faz: % 80 ACN – % 20 su

Akış Hızı: 1 mL/dakika

Kolon: C18 (150 mm, 4.6 mm, 5 µm, Phenomenex)

Detektör: UV Spektrometresi

İzo-oktan, n-oktan, oktanol ile yapılan çalışmalarda dalga boyu 254 nm olarak seçildi. Toluene ile yapılan deneylerde farklı dalga boylarında çalışıldı.

0–8.5	dakika	289 nm
8.5–10.5	dakika	254 nm
10.5–13.5	dakika	289 nm
13.5–30	dakika	254 nm

PAH'ların toluene göre alıkonma (kapasite) faktörleri (k'); An: 0.70, Flu: 0.96, Py: 1.15, BaA: 1.59, BbF: 2.37, BaP: 2.74'dür. Kalitatif tayin için alıkonma zamanları, kantitatif tayin için pik alanları kullanıldı.

Alıkonma (Kapasite) Faktörü (k') : Kolonda çözünen bir maddenin göç hızını açıklamada kullanılan bir terimdir. Bir A maddesi için alıkonma faktörü:

$$k'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad 2.1$$

şeklinde tanımlanır. Burada t_R , "A" maddesinin kolondaki alıkonma zamanını t_M ise inert maddenin alıkonma zamanını göstermektedir.

2.7. Yöntem

Çalışmada ilk olarak altı, PAH bileşiğinin HF–LPME–HPLC–UV yöntemi ile model örneklerden ekstraksiyonu için optimum şartlar belirlendi. Bunun için ACN derişimi, karıştırma hızı, karıştırma zamanı, tuz derişimi, pH, PAH derişimi, alıcı faz türü, verici faz hacmi gibi parametrelerin etkileri araştırıldı. Model örnekler ile belirlenen optimum koşullar, sigara izmarit zifirinden

PAH'ların ekstraksiyonuna uygulandı. İzmarit zifirine standart PAH çözeltileri eklendikten sonra fiber kullanılarak mikroekstraksiyon yapıldı. Son olarak farklı markalara ait sigara izmarit zifiri örneklerindeki PAH miktarları tayin edildi.

2.8. Fiber ile Mikroekstraksiyon ve Etkili Parametreler (Model Örnekler)

Çalışmalarda kullanılmak üzere 22 mm uzunluğunda fiber kesildi. Ekstraksiyon ortamında verici faz olarak 5 mL veya 10 mL asetonyitril-su karışımı, organik (alıcı) faz olarak toluen, izo-oktan, n-oktan veya oktanol kullanıldı. Ekstraksiyon ortamına, farklı olarak belirtilmedikçe, 5 µL çalışma çözeltilisi eklenerek ekstraksiyon çözeltilisindeki PAH'ların derişimleri; An: 1 ng/mL; Flu, Py, BaA, BbF, BaP: 2 ng/mL olacak şekilde ayarlandı.

Şekil 1.15'de görülen HF–LPME sisteminde ekstraksiyon için mikro enjektöre hava kabarcığı kalmayacak şekilde organik faz çekildi. Polipropilen hollow fiber, enjektör ucuna takılarak, gözeneklerinin organik faz ile dolması için alıcı faz içerisinde bir iki dakika bekletildi. Daha sonra mikro enjektöre çekilen organik faz, fiberin içine aktarıldı. Fiberin açık olan ucu, uçları alev ile ısıtılmış pens yardımıyla kapatıldı. Ardından fiberin yüzeyinde biriken organik fazı uzaklaştırmak için fiber, su içerisine daldırılarak birkaç saniye bekletildi. Fiber buradan çıkarılarak ekstraksiyon için örneğin bulunduğu vial (5 cm) daldırıldı. Ekstraksiyon işlemi belirli bir zaman ve karıştırma hızında tamamlandıktan sonra fiber içerisindeki organik sıvıdan 3 µL enjektöre çekilerek, doğrudan HPLC sistemine enjekte edildi.

Ekstraksiyon işlemi sonrasında zenginleştirme faktörleri (Z.F.) ve yüzde geri alınabilirlik (% R) değerleri aşağıdaki formüllerle hesaplandı [128-130].

$$Z.F. = (C_A)_a / (C_A)_v \quad (2.2)$$

Z.F. : Zenginleştirme Faktörü

$(C_A)_v$: A'nın ekstraksiyon öncesi verici fazdaki derişimi

$(C_A)_a$: A'nın ekstraksiyon sonrası alıcı fazdaki derişimi

$$\% R = (Z.F.) \times (V_a/V_v) \times 100 \quad (2.3)$$

% R : Yüzde geri alınabilirlik

V_v : Verici faz hacmi

V_a : Alıcı faz hacmi

Sigara izmarit zifirindeki bazı PAH'ların HF–LPME yöntemi kullanılarak zenginleştirilme çalışmalarında ekstraksiyon verimine etki eden parametrelerden, verici fazdaki asetonitril yüzdesi, karıştırma hızı, karıştırma zamanı, verici faz ortamındaki tuz derişimi, verici fazın pH'sı, ekstraksiyon ortamındaki organik fazın türü, verici faz hacmi ve ekstraksiyon ortamına eklenen PAH miktarının etkisi incelendi. Çalışmada parametrelerdeki her bir değer beş defa tekrarlandı. Aynı günde yapılan deney sonuçları ile ilgili yüzde bağıl standart sapma (% RSD) tekrarlanabilirliği (repeatability, intra-day) vermektedir. Farklı günde yapılan deney sonuçlarının yüzde bağıl standart sapması (% RSD) ise yinelenebilirliği (reproducibility, inter-day) vermektedir.

2.8.1. Verici Fazda ACN Derişimi:

Verici fazdaki asetonitril-su derişimi yüzde 70–30, 50–50, 30–70, 10–90 ve 5–95 olarak değiştirilirken, verici faz hacmi 5 mL, alıcı faz ise toluen olarak belirlendi. Ekstraksiyon süresi 15 dakika, karıştırma hızı 1000 rpm olarak seçildi.

2.8.2. Karıştırma Hızı

Karıştırma hızı 800, 1000, 1200 rpm seçilerek ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon ortamının diğer koşulları; verici faz; 5 mL, % 10 ACN – % 90

su karışımı, alıcı faz olarak toluen kullanıldı. Ekstraksiyon süresi 15 dakika seçildi.

2.8.3. Karıştırma Zamanı

15, 20, 25, 35 ve 45 dakikalık süreler boyunca ekstraksiyon yapılırken, verici faz; 5 mL, % 10 ACN – % 90 su karışımı, alıcı faz; toluen ve hız 1000 rpm olarak seçildi.

2.8.4. Tuz Değişimi

Verici fazdaki NaCl değişimi yüzde 0, 1, 5, 15 (w/v) oranlarında iken ekstraksiyonlar yapıldı. Ekstraksiyon ortamının diğer şartları; verici faz; 5 mL % 10 ACN – % 90 su karışımı, alıcı faz toluen, karıştırma hızı 1000 rpm ve ekstraksiyon süresi 35 dakika olarak seçildi.

2.8.5. pH

Verici fazın pH'sı 4, 5, 6 (ortam pH'sı), 7 ve 8'e ayarlanarak (HCl veya NaOH ile) ekstraksiyon yapıldı. Verici faz; 5 mL, % 10 ACN – % 90 su karışımı, alıcı faz olarak toluen kullanıldı. Ekstraksiyon 1000 rpm karıştırma hızında, 35 dakika süre ile yapıldı.

2.8.6. Alıcı Faz Türü

35 dakika sürede, 1000 rpm karıştırma hızında alıcı faz olarak toluen, oktanol, izo-oktan ve n-oktan kullanılarak ekstraksiyonlar yapıldı. Kullanılan (5 mL, % 10 ACN – % 90 su) verici faz karışımının pH'sı 6 olarak belirlendi.

2.8.7. Verici Faz Hacmi

% 10 ACN – % 90 su olacak şekilde hazırlanan verici fazın 5 ve 10 mL'lik hacimleri ile çalışmalar yapıldı. Alıcı faz olarak toluen kullanıldı. Ekstraksiyon işlemi pH 6'da, 1000 rpm karıştırma hızında, 35 dakika süre ile yapıldı.

2.8.8. PAH Derişimi

Ekstraksiyon ortamına;

- 1) An: 0.2 ng/mL; Flu, Py, BaA, BbF, BaP: 0.4 ng/mL,
- 2) An: 1.0 ng/mL; Flu, Py, BaA, BbF, BaP: 2.0 ng/mL,
- 3) An: 5.0 ng/mL; Flu, Py, BaA, BbF, BaP: 10.0 ng/mL ,

olacak şekilde üç farklı derişimde PAH standartları eklendi ve kalibrasyon doğruları çizildi.

Ekstraksiyon ortamının diğer koşulları; verici faz; 5 mL, % 10 ACN – % 90 su karışımı, alıcı faz; toluen, karıştırma hızı; 1000 rpm ve ekstraksiyon süresi 35 dakika seçildi. Verici faz pH'sı 6 olarak belirlendi.

2.9. PAH Eklenmiş Zifir Örneklerinden Fiber ile Mikroekstraksiyon

Optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra sigara izmaritleri ile çalışmalar yapıldı. İzmaritler, tarafımdan altı ay boyunca günde 10 adet içilerek elde edildi. İzmarit asetonitrilde çözüldükten sonra filtrenin (selüloz asetat), ekstraksiyonu etkilememesi için ortamdan alınmasında iki yol denendi.

- 1) Deiyonize su (pH = 5.5) ile çöktürme
- 2) pH = 3'e ayarlanan su ile çöktürme

Deiyonize Su (pH = 5.5) ile Selüloz Asetat Çöktürülmesi

Bir adet içilmiş sigara izmaritinden yanmamış kısmı ayrıldıktan sonra, filtre kâğıdı çıkarıldı. İzmarit kesilerek küçük parçalara ayrıldıktan sonra 5 mL ACN ile magnetik karıştırıcıda çözününceye kadar karıştırıldı. Daha sonra çözeltiyeye standart PAH karışımı eklenip toplam hacim deiyonize su (pH = 5.5) ile 50 mL'ye tamamlandı. Bu arada derişimler, An: 5 ng/mL; Flu, Py, BaA, BbF, BaP: 10 ng/mL oldu. Su eklenmesi ile çöken selüloz asetatlardan kurtulmak için örnek mavi bant süzgeç kâğıdından süzülerek verici faz hazırlandı. Örneğin pH'sı NaOH ile 6'ya ayarlandı. Ekstraksiyon işlemlerinde % 10 ACN – % 90 su oranında olan bu çözeltiden 5 mL kullanıldı.

Filtrenin ortamdan alınmasının yanı sıra ortamın matriks etkisini en aza indirebilmek için iki farklı işlem denendi.

- 1) Verici faz, mavi bant süzgeç kâğıdından süzüldükten sonra 4000 devirde 20 dakika süre ile santrifüjlenerek hazırlandı.
- 2) İzmarit, 5 mL asetonitrilde çözüldükten sonra 0.5 g bazik alümina veya silika doldurulmuş kolondan geçirilerek verici faz hazırlandı. Sonraki işlemler yukarıda anlatılan basamaklara göre yapıldı.

Selüloz asetatların geri alınabilirliğe etkisini görmek için, filtre ortamdan alındıktan sonra PAH standartları eklenerek ekstraksiyon yapıldı.

Ortam koşulları, model örneklerde belirlenen optimum koşullara göre ayarlandı. pH'sı 6'ya ayarlanan verici fazdan 5 mL (% 10 ACN – % 90 su) kullanıldı. Alıcı faz toluen, karıştırma hızı 1000 rpm, ekstraksiyon süresi 35 dakika olarak seçildi. 22 mm uzunluğunda fiber kullanıldı. Ekstraksiyon sonrasında alıcı fazın 3 µL'si HPLC sisteme enjekte edildi.

pH = 3'e Ayarlanan Su ile Selüloz Asetat Çöktürülmesi

Bir adet içilmiş sigara filtresi, filtre kâğıdından ayrılıp kesildikten sonra vialere alındı. Üzerine 5 mL asetonitril konularak filtre çözününceye kadar karıştırıldı. Örnek üzerine farklı miktarlarda PAH standardı eklendi. 1000 rpm hızında karıştırılan örnek üzerine 10 mL pH = 3'e ayarlanan su, yavaş yavaş eklenerek selüloz asetatların kontrollü bir şekilde çökmesi sağlandı [131]. Su ekleme işlemi tamamlandıktan sonra örnek 15 dakika daha karıştırılmaya devam edildi. Su eklenmesi ile çöken selüloz asetat mavi bant süzgeç kâğıdından süzüldü. Örneğin pH'sı NaOH ile 6'ya ayarlandı. Hazırlanan bu örnekten vialere 1.5 mL alınıp üzerine 3.5 mL saf su eklenerek % 10 ACN – % 90 su oranında 5 mL'lik verici faz hazırlandı.

Yine matriks etkisini azaltmak için selüloz asetat ortamdan alındıktan sonra bazı işlemler yapıldı.

- 1) Verici faz, mavi bant süzgeç kâğıdından süzüldükten sonra 0.22 µL'lik naylon filtre sisteminden de süzülerek hazırlandı.
- 2) Örnek, mavi bant süzgeç kâğıdından süzüldükten sonra, 0.5 g bazik alümina doldurulmuş kolondan geçirildi.

Ayrıca selüloz asetat, verici faz ortamından uzaklaştırıldıktan sonra, PAH standardı eklenerek ekstraksiyon yapıldı.

Verici faz içersine;

- 1) An: 1 ng/mL, Flu, Py, BaA, BbF, BaP: 2 ng/mL,
- 2) An: 2 ng/mL, Flu, Py, BaA, BbF, BaP: 4 ng/mL,
- 3) An: 4 ng/mL, Flu, Py, BaA, BbF, BaP: 8 ng/mL
- 4) An: 6 ng/mL, Flu, Py, BaA, BbF, BaP: 12 ng/mL,

olacak şekilde PAH standartları eklenip kalibrasyon doğruları çizildi.

pH = 3'e ayarlanan su ile yapılan çalışmalarda ortamın koşulları model örneklerdeki optimum şartlara göre ayarlandı. Ekstraksiyon sonrasında alıcı fazın 3 µL'si HPLC sisteme enjekte edildi.

2.10. Gerçek Örneklerden Ekstraksiyon (HF–LPME)

İki adet içilmiş sigara filtresi, tütün artıklarından ve filtre kâğıdından ayrılıp kesildikten sonra vialere alındı. Üzerine 5 mL asetonitril konularak filtre çözününceye kadar karıştırıldı. Model örnekler ve PAH eklenmiş zifir örnekleriyle (pH = 3'e ayarlanan su) belirlenen optimum koşullarda yapılan HF–LPME ile üç farklı marka sigarada PAH'lar tayin edildi.

Ekstraksiyon ortamın koşulları;

pH'sı 6'ya ayarlanan verici fazdan 5 mL (% 10 ACN – % 90 su) kullanıldı. Alıcı faz toluen, karıştırma hızı 1000 rpm, süre 35 dakika ve fiber boyu 22 mm olarak seçildi. Alıcı fazın 3 µL'si HPLC sisteme enjekte edildi.

2.11. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon

Bir adet içilmiş sigara filtresi, filtre kâğıdından ayrılıp kesildikten sonra vialere alındı. Üzerine 5 mL asetonitril konularak filtre çözününceye kadar karıştırıldı. İki defa 5 mL n-hekzan konulup 10 dakika magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak hekzan fazları toplandı. Toplanan hekzan yaklaşık 0.5 mL kalıncaya kadar buharlaştırıldı. Kalan kısım ön temizleme için 0.5 g bazik alümina doldurulmuş kolondan geçirildi. Daha sonra kolondan 15 mL hekzan geçirildi. Toplanan hekzan fazı kuruluğa kadar buharlaştırıldıktan sonra 100 µL ACN ile seyreltildi ve HPLC sisteme 3 µL enjeksiyon yapıldı.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

3.1. Polipropilen Oyuk (Hollow) Fiberin Boşluk ve Gözenek Hacmi

Polipropilen fiberin gözenek ve boşluk hacmi aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

Gözenek Hacmi

Kullanılan sıvı: Toluen

Toluenin yoğunluğu: T_d (g/mL)

Fiberin uzunluğu: F_L (cm)

Fiberin boş kütlesi: F_{bw} (g)

Fiberin gözenekleri dolu iken kütlesi: F_{gw}

Fiberin gözeneklerindeki toluenin kütlesi: T_{gw}

Fiberin gözeneklerindeki toluenin hacmi: T_{gv}

$$T_{gw} = F_{gw} - F_{bw} \quad (3.1)$$

$$T_{gv} = T_{gw} / T_d \quad (3.2)$$

$$1 \text{ cm fiberin gözeneklerindeki toluen hacmi: } T_{gv} / F_L \quad (3.3)$$

Fiberin gözenek hacmi, $4.32 \pm 0.14 \mu\text{L/cm}$ olarak hesaplandı.

Boşluk Hacmi

Fiberin gözenek ve içi dolu iken kütlesi: F_{tw}

Fiberin iç boşluğundaki toluenin kütlesi: T_{iw}

Fiberin iç boşluğundaki toluenin hacmi: T_{iv}

$$T_{iw} = F_{tw} - F_{gw} \quad (3.4)$$

$$T_{iv} = T_{iw} / T_d \quad (3.5)$$

$$1 \text{ cm fiberin iç boşluğundaki toluen hacmi: } T_{iv} / F_L \quad (3.6)$$

Bölüm 2.5'de anlatılan ikinci yöntemde ise, gözenekleri doldurulan fiberin içerisi mikro enjektör yardımı ile dolduruldu ve harcanan toluen miktarı enjektörden okundu. Toluenin bulunan hacmi fiberin uzunluğuna bölünerek, 1 cm fiberin içindeki hacim hesaplandı.

Polipropilen hollow fiberin boşluk hacmi, birinci yöntem ile 3.33 ± 0.28 $\mu\text{L/cm}$ olarak, ikinci yöntemde ise 3.18 ± 0.16 $\mu\text{L/cm}$ olarak hesaplandı.

Ticari olarak temin edilen 600 μm iç çap, 200 μm et kalınlığı ve % 70 gözenekli yapıya sahip polipropilen fiberin gözenek ve boşluk hacmi teorik olarak hesaplandığında, sırası ile 3.57 $\mu\text{L/cm}$ ve 2.80 $\mu\text{L/cm}$ bulunmuştur. Deneysel olarak belirlenen sonuçlar ile karşılaştırıldığında teorik değerlerin daha düşük olduğu görülmektedir. Fiberin gözenek hacmi için teorik değer ile deneysel değer arasında % 20, boşluk hacmi için ise % 13 dolaylarında fark görülmektedir. Bu farklılık deneysel hataların yanı sıra üretilen fiberlerin homojen olmamasından kaynaklanabilir.

3.2. Ekstraksiyon Verimine Etki Eden Parametreler

Sigara izmarit zifirindeki bazı PAH'ların, HF-LPME yöntemi kullanılarak zenginleştirilme çalışmalarında ekstraksiyon verimliliğine etki eden parametrelerden; verici fazdaki asetonyitril derişimi, karıştırma hızı, karıştırma zamanı, verici faz ortamındaki tuz derişimi, verici fazın pH'sı, ekstraksiyon ortamındaki organik fazın (alıcı) türü, eklenen PAH miktarı ve verici faz hacminin etkisi incelenerek zenginleştirme ve geri alınabilirlik için optimum şartlar belirlenmeye çalışıldı.

Fiberin boyunun seçiminde;

- Ekstraksiyonda 5 cm'lik vial kullanılması,
- Verici faz hacmi arttıkça ekstraksiyonun daha uzun zamanda dengeye gelmesi nedeniyle verici faz hacminin maksimum 10 mL kullanılması,
- Fiber boyu uzadıkça karıştırma anında fiberin vorteksten daha fazla etkilenip alıcı faz kaybının artması,
- Fiber boyu uzadıkça alıcı faz hacminin artması ile zenginleştirme faktörünün azalması,

gibi etkenler fiber boyunu sınırlandırmaktadır. 22 mm boy, çalışmada en uygun fiber boyu olarak belirlendi. Fiberin 2 milimetresi, fiberi enjektörün ucuna takma ve açık olan ucunu kapatmak için kullanıldı.

Literatürde asetonitrilin izmarit ve zifir için iyi bir çözücü olduğu bildirilmiştir [119]. Bu nedenle asetonitril verici faz ortamında bulunacaktır. Su eklenmesi ile PAH'ların hidrofobik özellikleri ekstraksiyonda etkili olacağı için ilk olarak ACN–su yüzdesinin bulunması gerekmektedir.

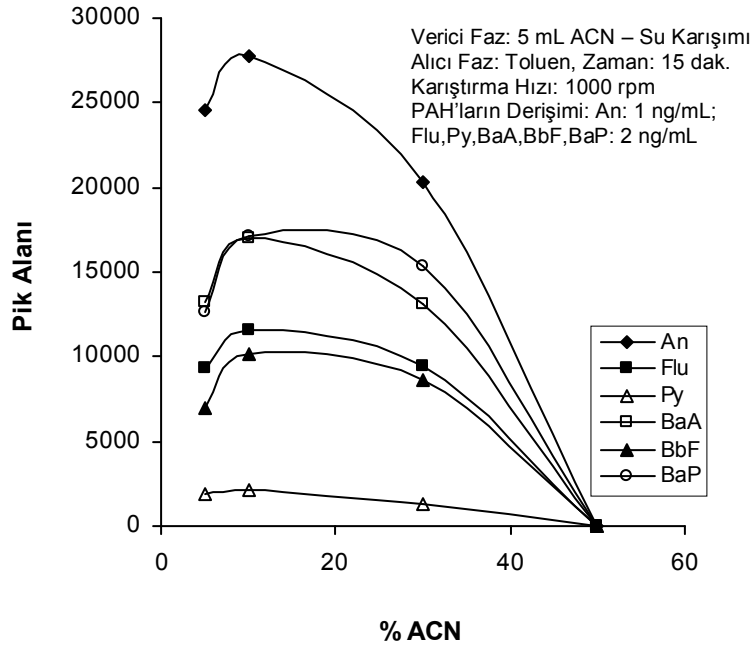
3.2.1. Verici Fazdaki Asetonitril – Su Değişimi

Çizelge 3.1'de zenginleştirme faktörlerinin ve yüzde geri alınabilirliklerin ACN değişimi ile değişimi yüzde bağıl standart sapma değerleri (tekrarlanabilirlik, % RSD) ile birlikte verilmiştir. Çalışılan PAH bileşikleri için en yüksek geri kazanım % 10 ACN – % 90 su ortamında sağlanmıştır. Antrasen için zenginleştirme faktörü ve geri alınabilirlik sırası ile 234 ve 71 iken BaP için bu değerler 123 ve 37'dir. Bağıl standart sapma % 0.91 ile en düşük antrasende, % 4.73 ile en yüksek BaP'de bulunmuştur.

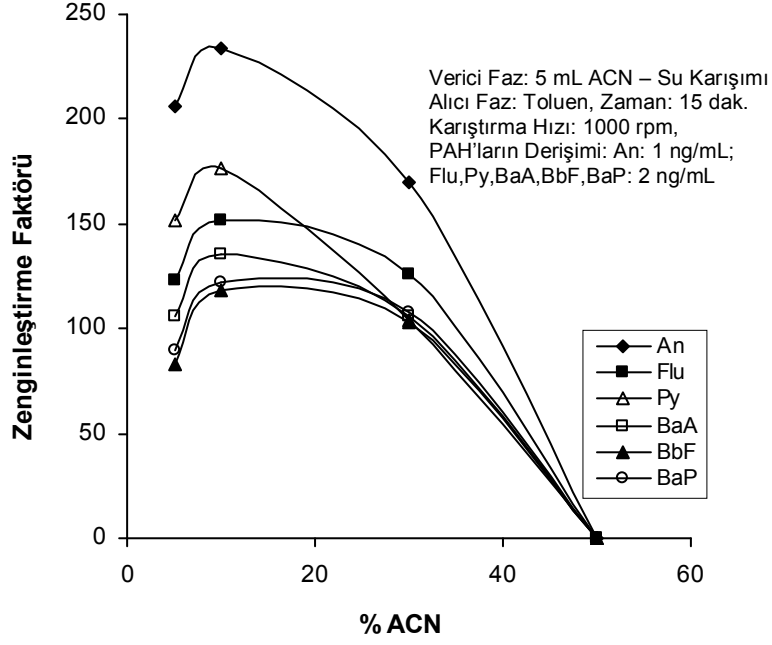
Çizelge 3.1. Verici Fazdaki Asetonitril Derişimine Göre Z.F. ve % R Değerleri (n= 5)

	% 5 ACN			% 10 ACN			% 30 ACN			% 50 ACN*		
	Z.F.	% R	% RSD	Z.F.	% R	% RSD	Z.F.	% R	% RSD	Z.F.	% R	% RSD
An	206	63	4.84	234	71	0.91	170	52	8.76	–	–	–
Flu	123	37	0.87	152	46	3.98	126	38	7.05	–	–	–
Py	151	46	5.68	176	54	3.64	104	32	0.79	–	–	–
BaA	106	32	4.56	136	41	4.02	106	32	6.68	–	–	–
BbF	83	25	4.20	118	36	2.37	103	31	8.31	–	–	–
BaP	90	27	0.51	123	37	4.73	108	33	6.51	–	–	–

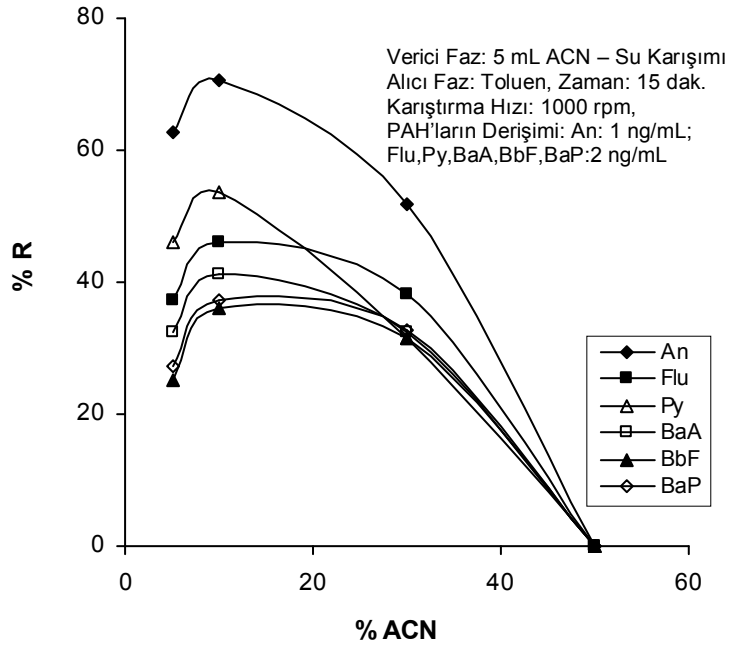
*Tayin edilemedi.



Şekil 3.1. Pik Alanlarının Verici Fazdaki Asetonitril Derişimi ile Değişimi



Şekil 3.2. Zenginleştirme Faktörlerinin Verici Fazdaki Asetonitril Derişimi ile Değişimi



Şekil 3.3. Yüzde Geri Alınabilirliklerin Verici Fazdaki Asetonitril Derişimi ile Değişimi

Şekil 3.1,3.2 ve 3.3'de sırası ile pik alanlarının, zenginleştirme faktörlerinin ve yüzde geri alınabilirlik değerlerinin asetonitril derişimi ile değişimi görülmektedir. ACN yüzdesi artıkça PAH'ların geri kazanılmasında azalma görülmektedir. Verici faz ortamındaki organik çözücü (ACN) miktarının artışı ile PAH'ların ekstraksiyon ortamındaki çözünürlüğü artacağından geri kazanmadaki bu azalma beklenen bir durumdur. Ancak grafiklerden de görüldüğü gibi maksimum geri kazanma % 10 ACN – % 90 su ortamında sağlanmış, % 5 ACN'li ortamda geri alınabilirliklerde azalma görülmüştür. Örneğin, zenginleştirme faktörleri piren için 176'dan 151'e azalırken, BaA için 136'dan 106'ya düşmüştür. Bu azalma fiberin etrafındaki su moleküllerinin PAH'ların fiberin içerisine difüzyonunu zorlaştırması ile açıklanabilir.

Ayrıca asetonitril derişimi % 30'a çıkarıldığında piren dışında yüzde bağıl standart sapma değerlerinin arttığı görülmektedir. Örneğin BbF için % 10 ACN derişiminde % RSD 2.37 iken ACN derişimi % 30 yapıldığında % RSD 8.31'e çıkmıştır. Floranten için ise 3.98'den 7.05'e çıkmıştır. % RSD'lerdeki bu artış, verici faz ortamındaki ACN derişiminin artması ile alıcı fazın, verici faz içerisindeki çözünürlüğünü artırması nedeni ile alıcı fazın fiber içerisinden kaçma eğiliminin artması ile açıklanabilir.

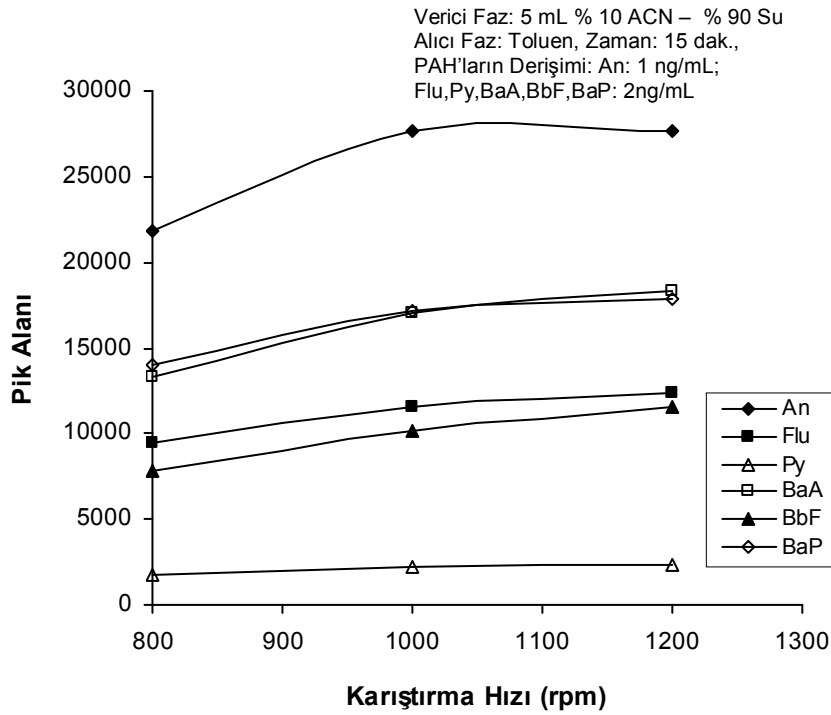
3.2.2. Karıştırma Hızı

Karıştırma hızının etkisini, Çizelge 3.2, Şekil 3.4, 3.5 ve 3.6'da görmek mümkündür. Karıştırma hızı arttıkça PAH'ların ekstraksiyon ortamından geri kazanılmasında da artış gözlenmiştir. Örneğin, 800 rpm'de antrasenin zenginleştirme faktörü 184 iken, karıştırma hızı 1000 rpm'ye çıkarıldığında 234'e yükselmiştir. BaP için ise zenginleştirme faktörü 99'dan 137'ye yükselmiştir. Karıştırma hızı 1200 rpm'ye çıkarıldığında antrasenin geri kazanımında bir artış sağlanmazken, diğer PAH'larda bir miktar artış olmuştur. Pirenin geri alınabilirliği 1000 rpm'de 54 iken karıştırma hızı 1200 rpm yapıldığında geri alınabilirlik 59'a yükselmiştir. BbF'de ise geri alınabilirlik 36'dan 41'e yükselmiştir. Karıştırma hızı 1200 rpm yapıldığında PAH'ların geri ka-

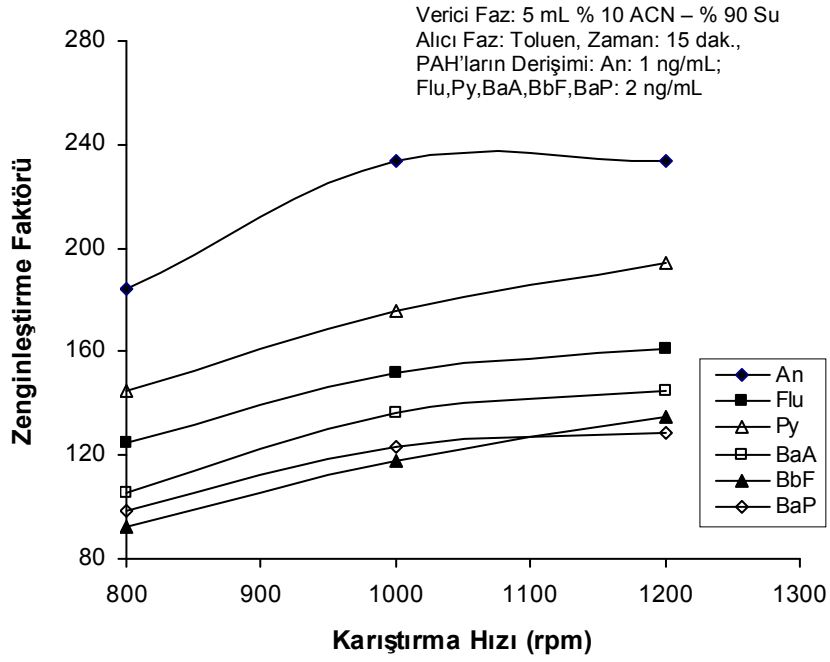
zanılmasında artış görülmesine rağmen, yüksek vorteks nedeniyle fiber içersindeki organik fazda önemli kayıplar olabilmektedir. Sonuçta 1000 rpm optimum hız olarak belirlenmiştir. Karıştırma hızının artması alıcı faz kaybına neden olmasına rağmen yüzde bağıl standart sapmalarda (% RSD) önemli artışlara sebep olmamıştır. 1000 rpm’de floranten için yüzde standart sapma 3.98 iken karıştırma hızı 1200 rpm yapıldığında 5.75’ yükselmiştir. BaA için ise 4.02’den 4.58’e yükselmiştir.

Çizelge 3.2. Karıştırma Hızına Göre Z.F. ve % R Değerleri (n= 5)

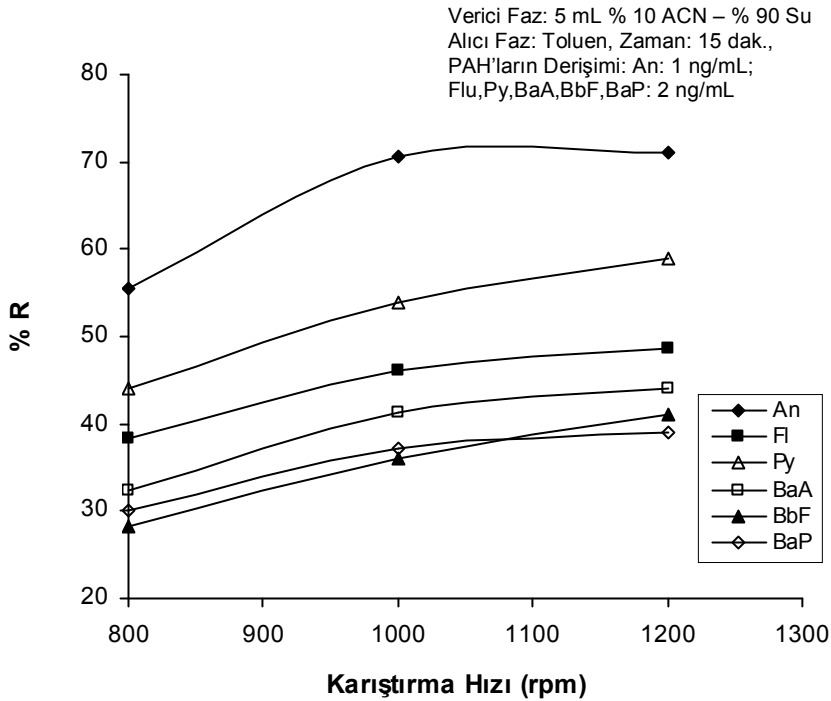
	800 rpm			1000 rpm			1200 rpm		
	Z.F.	% R	% RSD	Z.F.	% R	% RSD	Z.F.	% R	% RSD
An	184	56	1.33	234	71	0.91	234	71	1.96
Flu	125	38	2.38	152	46	3.98	161	49	5.75
Py	145	44	3.50	176	54	3.64	194	59	5.24
BaA	105	32	1.70	136	41	4.02	145	44	4.58
BbF	92	28	2.64	118	36	2.37	135	41	4.04
BaP	99	30	2.42	123	37	4.73	128	39	5.12



Şekil 3.4. Pik Alanlarının Karıştırma Hızı ile Değişimi



Şekil 3.5. Zenginleştirme Faktörlerinin Karıştırma Hızı İle Değişimi



Şekil 3.6. Yüzde Geri Alınabilirliklerin Karıştırma Hızı İle Değişimi

Oyuk (hollow) fiber sıvı faz mikroekstraksiyon yönteminde ortamın karıştırma hızı, maddelerin ekstraksiyon ortamından geri kazanılmasında önemli etkiye sahiptir. Karıştırma hızı arttıkça maddelerin fiber içine difüzyon hızı artacağı için ekstraksiyon süresi kısalır. Ancak yüksek karıştırma hızlarına çıkıldığında oluşan vorteks ile PAH'ların fiber içersine difüzyonu zorlaşabilmektedir, ayrıca fiber içerisindeki organik sıvı, yüksek karıştırma hızında fiberin gözeneklerinden kaçma eğilimi gösterebilmektedir. Karıştırma hızı çalışmaları yapılırken bu sorunlar da dikkate alınarak optimum şartlar belirlenmiştir.

3.2.3. Karıştırma Zamanı

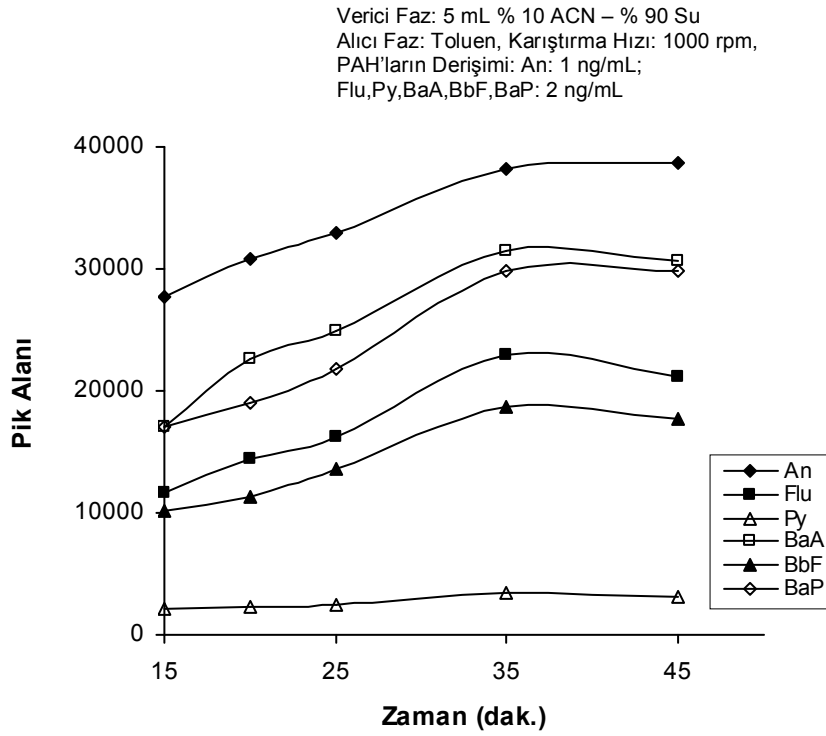
Karıştırma zamanı ekstraksiyonda dengeye ulaşılması açısından önemli bir faktördür. Karıştırma zamanının zenginleştirme faktörleri ve yüzde geri alınabilirliklere etkisi Çizelge 3.3, Şekil 3.7, 3.8 ve 3.9'da görülmektedir. Kısa süreli ekstraksiyonda, ekstraksiyon işlemi dengeye ulaşamadığından PAH'ların geri alınabilirliği beklendiği gibi düşüktür. Ekstraksiyon süresi artırdıkça, zenginleştirme faktörleri ve geri alınabilirlikler artmaktadır. Antrasen için, 15 dakika karıştırma zamanında zenginleştirme faktörü 234 iken, 25 dakikada 280'e, 45 dakikada 327 yükselmiştir. Bu artış diğer PAH'lar için de söz konusudur. BaP için zenginleştirme faktörü 15 dakikada 123 iken, 45 dakikada 210 değerine ulaşmaktadır. Bu artışlar antrasen ve BaA için 1.4 katı, diğerlerinde 1.8 dolaylarındadır. Ortalama 1.66'luk bir artış söz konusudur. Bunlara çok yakın değerler 35 dakika karıştırma zamanı ve sonrasında olmaktadır. Örneğin antrasen için 1.39 iken BaP için 1.70'dir. Bu değerler 35 dakika sonrasında dengeye ulaşıldığını göstermektedir.

35 dakika ekstraksiyon işlemi ile antrasen'in hemen hemen tamamının geri alınabildiği (% 98), en düşük geri kazanım ile BaP'nin ise % 64 oranında geri alınabildiği görülmektedir. Çalışılan tüm ekstraksiyon sürelerinde yüzde standart sapma değerleri PAH'lar için % 7'nin altında bulunmuştur. Örneğin

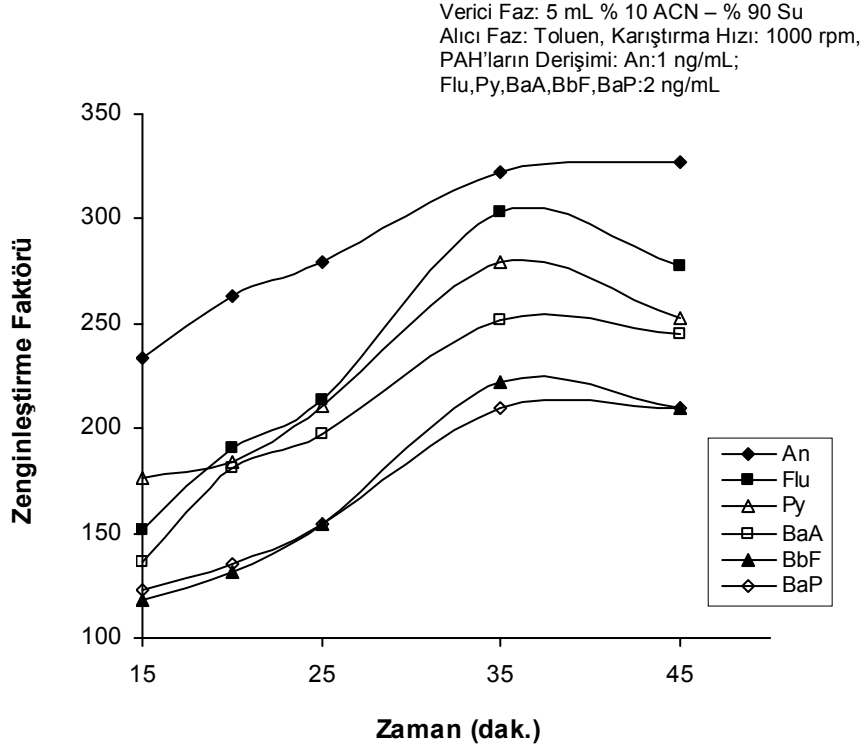
optimum süre olarak seçilen 35 dakika karıştırma zamanında antrasen için % 2.34 iken BaA için bu değer % 5.33 bulunmuştur.

Çizelge 3.3. Karıştırma Zamanına Göre Z.F. ve % R Değerleri (n= 5)

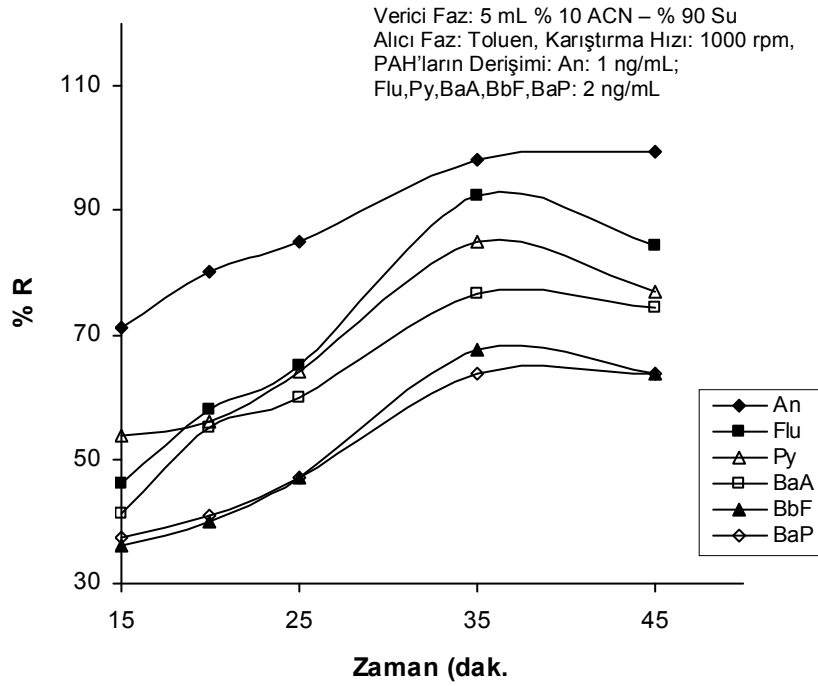
	15 dakika			20 dakika			25 dakika			35 dakika			45 dakika		
	Z.F.	% R	%RSD	Z.F.	% R	%RSD	Z.F.	% R	%RSD	Z.F.	% R	%RSD	Z.F.	% R	%RSD
An	234	71	0.91	263	80	3.17	280	85	0.85	322	98	2.34	327	99	1.22
Flu	152	46	3.98	191	58	5.22	214	65	2.99	303	92	2.96	278	84	4.00
Py	176	54	3.64	184	56	6.65	211	64	6.26	279	85	4.44	253	77	4.61
BaA	136	41	4.02	181	55	0.43	197	60	3.10	252	76	5.33	245	74	3.45
BbF	118	36	2.37	132	40	4.71	155	47	4.73	222	67	2.63	210	64	2.45
BaP	123	37	4.73	135	41	9.38	155	47	3.63	210	64	4.63	210	64	3.42



Şekil 3.7. Pik Alanlarının Karıştırma Zamanı İle Değişimi



Şekil 3.8. Zenginleştirme Faktörlerinin Karıştırma Zamanı İle Değişimi



Şekil 3.9. Yüzde Geri Alınabilirliklerin Karıştırma Zamanı İle Değişimi

3.2.4. Ekstraksiyon Ortamındaki Tuz Miktarı

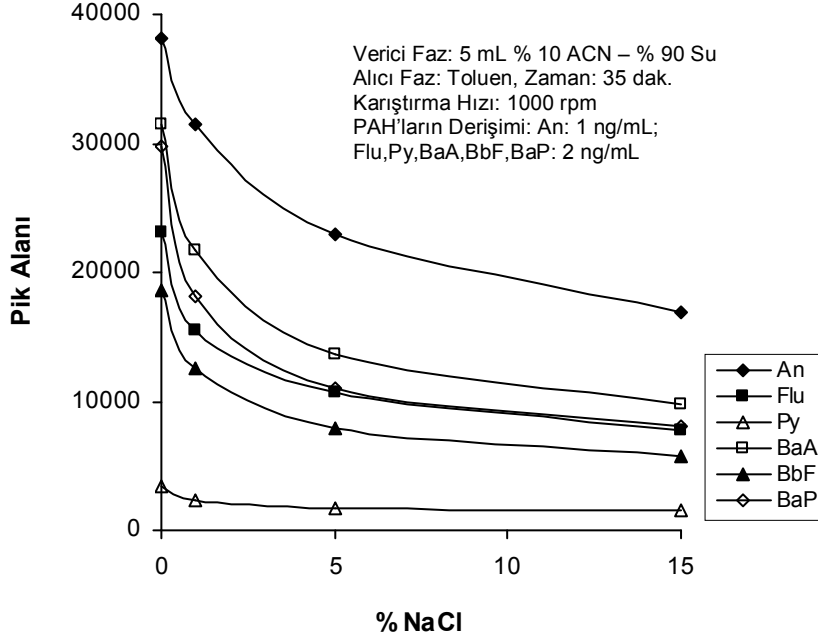
Ortamın tuz miktarının, zenginleştirme faktörleri ve yüzde geri alınabilirliklere etkisini Çizelge 3.4, Şekil 3.10, 3.11 ve 3.12'de görmek mümkündür.

Çizelge 3.4. Tuz Derişimine Göre Z.F. ve % R Değerleri (n= 5)

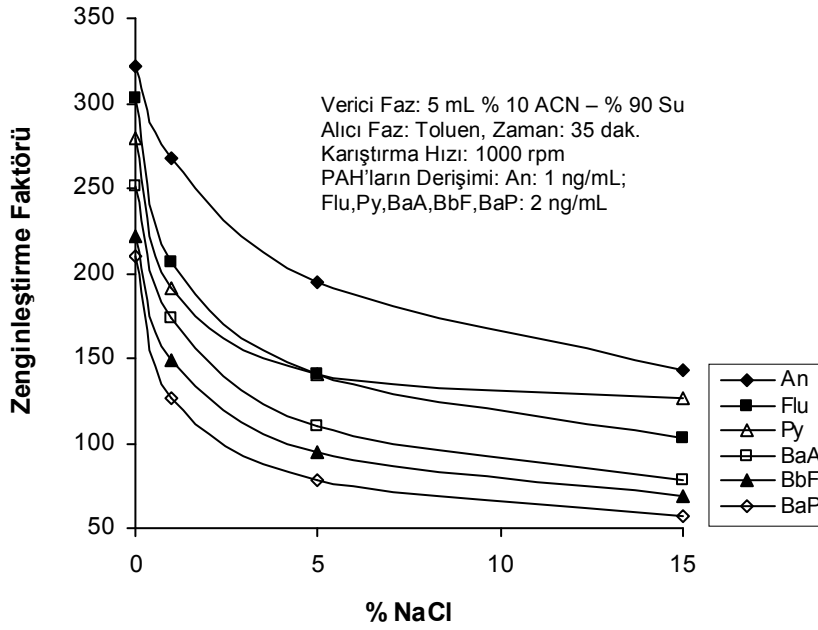
	% 0 NaCl			% 1 NaCl			% 5 NaCl			% 15 NaCl		
	Z.F.	% R	% RSD	Z.F.	% R	% RSD	Z.F.	% R	% RSD	Z.F.	% R	% RSD
An	322	98	2.34	268	81	2.72	195	59	4.65	143	44	2.16
Flu	303	92	2.96	206	63	4.28	140	43	3.00	103	31	2.46
Py	279	85	4.44	192	58	2.68	140	43	5.10	126	38	5.26
BaA	252	76	5.33	174	53	3.96	110	33	4.19	78	24	5.65
BbF	222	67	2.63	149	45	4.58	94	29	3.01	69	21	1.88
BaP	210	64	4.63	127	38	3.93	78	24	3.70	57	17	2.29

Grafiklerden de görüldüğü gibi, ortamdaki iyonik şiddetin artışı PAH'ların ekstraksiyon ortamından geri kazanılmasını önemli miktarda azaltmaktadır. % 0 tuzdan % 5'e kadar olan tuz derişiminde zenginleştirme faktörleri ve yüzde geri alınabilirliklerde logaritmik bir azalma görülmüştür. Örneğin antrasen için % 98'den % 59'a, BaP için % 64'den % 24'e inmektedir. Tuz derişimi % 15 yapıldığında antrasen için % 44, BaP için % 17'lere kadar azaldığı görülmüştür.

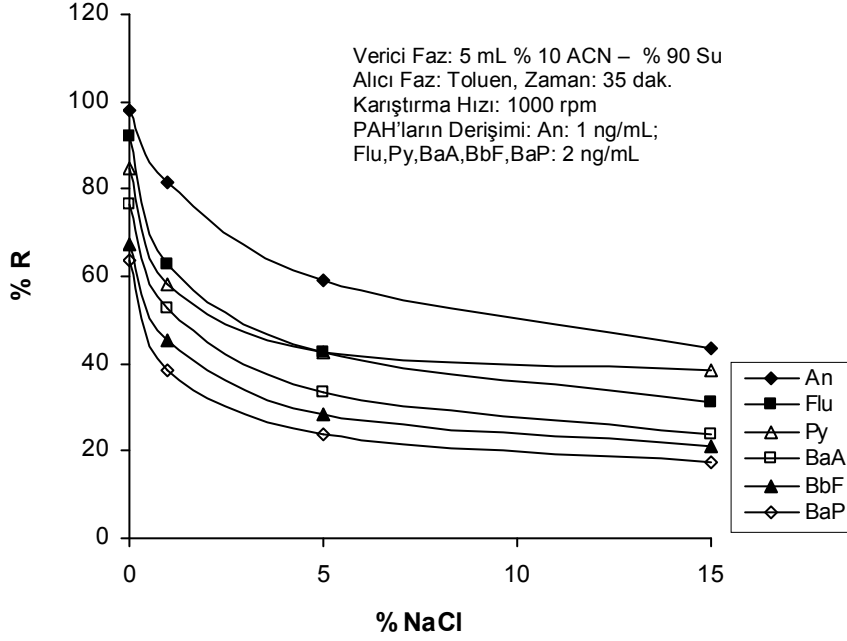
Bu azalmanın nedenleri arasında, tuz derişimi arttıkça PAH'ların verici fazdaki çözünürlüklerinin artması ile alıcı faza difüze olan miktarlarının azalması ve ortamdaki tuz moleküllerinin PAH'ların alıcı faza difüzyonunu zorlaştırması gösterilebilir.



Şekil 3.10. Pik Alanlarının Tuz Derişimi İle Değişimi



Şekil 3.11. Zenginleştirme Faktörlerinin Tuz Derişimi İle Değişimi



Şekil 3.12. Yüzde Geri Alınabilirliklerin Tuz Derişimi İle Değişimi

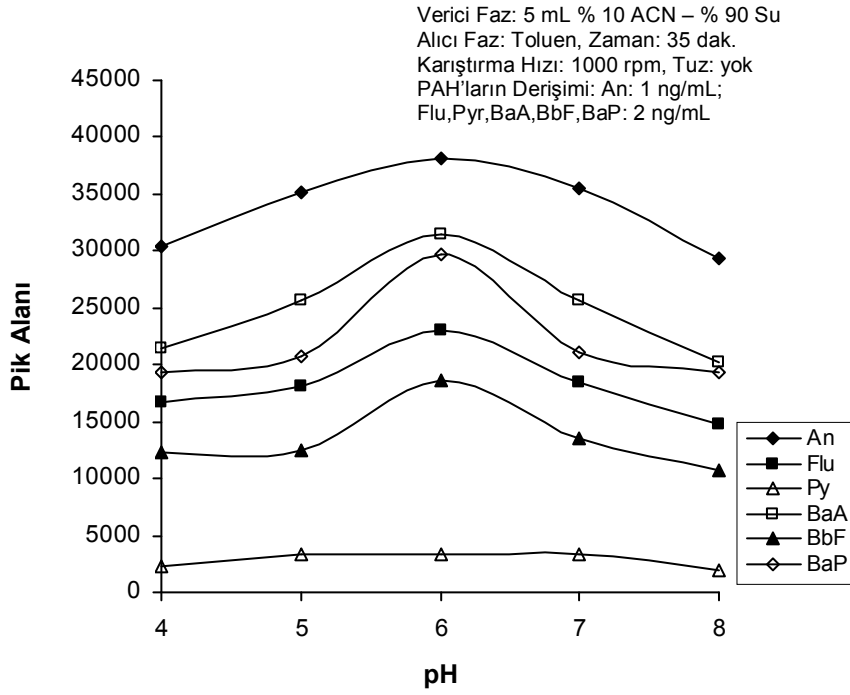
3.2.5. Verici Faz pH'sı

Çizelge 3.5, Şekil 3.13, 3.14 ve 3.15'de verici fazın orjinal pH değeri olan 6'nın üzerinde ve altındaki değerlerde, zenginleştirme faktörleri ve yüzde geri alınabilirliklerde azalma olduğu görülmektedir. Antrasen için pH = 4'de zenginleştirme faktörü 255 iken, pH = 5'de 296'ya, pH = 6'da 322 kadar yükselmektedir. pH = 7'de zenginleştirme faktörü 299'a pH = 8'de ise 246 kadar azalmaktadır. BaP için ise pH = 5'de zenginleştirme faktörü 146 iken pH = 6'da 210'a yükselmiştir. pH = 7'de ise 148'e kadar azalmıştır. Bu durum piren hariç diğer PAH'lar için de geçerlidir. Piren için pH = 5–7 arasında zenginleştirme faktörleri sabit kalırken, pH = 4 ve 8'de azalma görülmüştür.

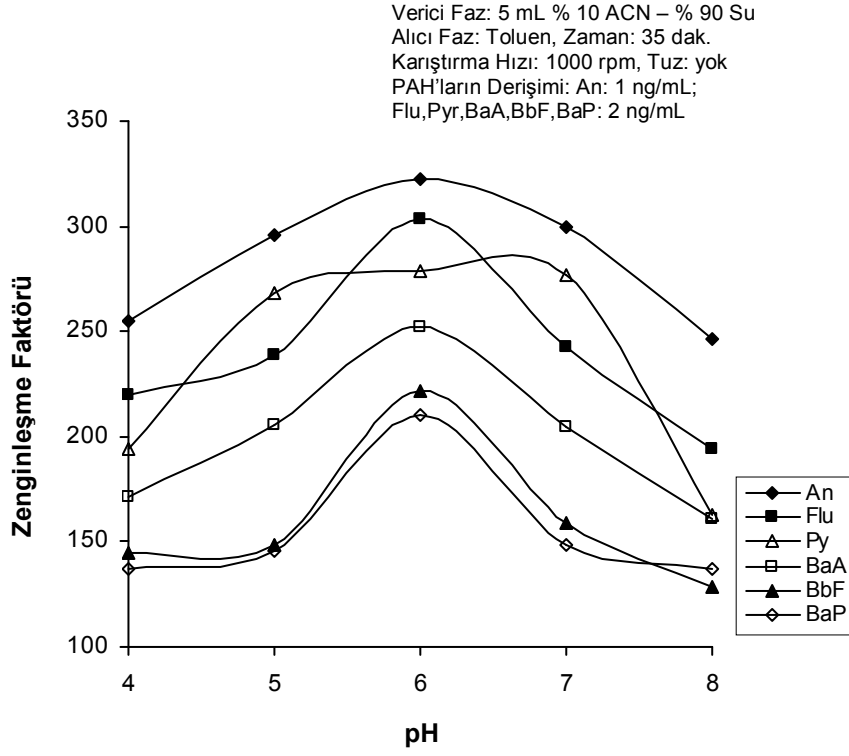
PAH'lar sulu ortamda, yüksek pH değerlerinde proton kaybedip anyonik hale gelebilir. Düşük pH değerlerinde ise PAH'lar protonlanıp katyonik hale gelebilir [132]. Her iki durumda PAH'ların sudaki çözünürlüklerinin artmasına neden olur. pH = 6'nın üzerinde ve altında değerlerde görülen geri kazanımlardaki azalma bu etki ile açıklanabilir.

Çizelge 3.5. Ekstraksiyon Ortamının pH'sına Göre Z.F. ve % R Değerleri (n=5)

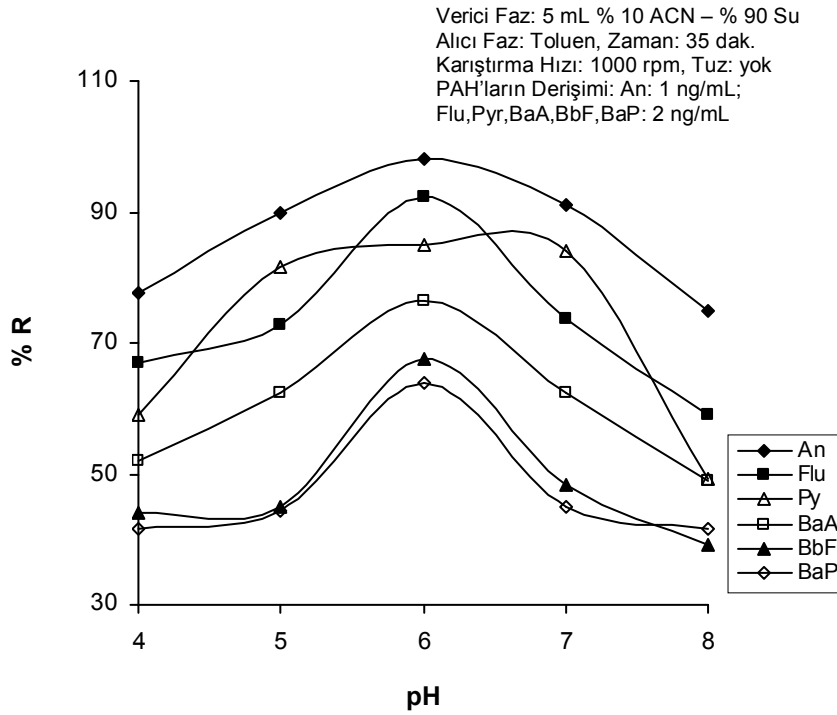
	pH: 4.0			pH: 5.0			pH: 6.0			pH: 7.0			pH: 8.0		
	Z.F.	% R	%RSD	Z.F.	% R	%RSD	Z.F.	% R	%RSD	Z.F.	% R	%RSD	Z.F.	% R	%RSD
An	255	77	3.78	296	90	3.28	322	98	2.34	299	91	4.22	246	75	2.40
Flu	220	67	3.75	239	73	3.06	303	92	2.96	243	74	3.31	195	59	4.23
Py	194	59	5.75	269	82	2.45	279	85	4.44	277	84	0.86	162	49	4.70
BaA	171	52	1.73	205	62	5.39	252	76	5.33	205	62	4.00	161	49	4.81
BbF	145	44	1.66	148	45	5.88	222	67	2.63	159	48	0.97	129	39	5.44
BaP	137	42	4.08	146	44	5.39	210	64	4.63	148	45	2.93	137	42	2.47



Şekil 3.13. Pik Alanlarının pH'a Göre Değişimi



Şekil 3.14. Zenginleşme Faktörlerinin pH'a Göre Değişimi



Şekil 3.15. Yüzde Geri Alınabilirliklerin pH'a Göre Değişimi

3.2.6. Alıcı Fazın Türü

Alıcı fazın zenginleştirme faktörleri ve yüzde geri alınabilirliklere etkisini incelemek için farklı organik fazlar ile ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon sonrasında sonuçlar Çizelge 3.6'da görülmektedir. Çalışılan organik fazlar ile yapılan ekstraksiyon sonrasında antrasenin tamamı geri kazanılmaktadır. Floranten, toluen ile % 92, izo-oktan ile % 76, oktanol ile % 42 geri alınırken, n-oktan ile % 50 geri alınabilirlik sağlanmıştır. BaP için toluen ile % 92, izo-oktan ile % 76, oktanol ile % 42 ve n-oktan ile % 50 geri alınabilirlik bulunmuştur. Benzer sonuçlar diğer PAH'lar için de görülmektedir. Sonuçlardan da görüldüğü gibi toluen ile yapılan ekstraksiyonlarda en yüksek verim elde edilmiştir. Yüzde bağıl standart sapmalar tüm organik fazlar için % 6'dan düşük bulunmuştur. Örneğin pirenin bağıl standart sapması toluende % 4.44, izo-oktanda % 3.99, oktanolde % 3.32 ve n-oktanda % 4.36 bulunmuştur. BaA için ise toluende % 5.33, izo-oktanda % 5.79, oktanolde % 3.90 ve n-oktanda % 2.39 bulunmuştur.

Çizelge 3.6. Alıcı Fazın Türüne Göre Z.F. ve % R Değerleri (n= 5)

	Toluen			İzo-oktan			Oktanol			n-Oktan		
	Z.F	% R	% RSD	Z.F	% R	% RSD	Z.F	% R	% RSD	Z.F	% R	% RSD
An	322	98	2.34	335	102	3.27	319	97	3.30	338	103	3.69
Flu	303	92	2.96	249	76	4.55	139	42	4.06	164	50	2.53
Py	279	85	4.44	211	64	3.99	153	47	3.32	140	42	4.36
BaA	252	76	5.33	231	70	5.79	129	39	3.90	136	41	2.39
BbF	222	67	2.63	182	55	2.50	102	31	3.61	90	27	2.76
BaP	210	64	4.63	208	63	3.59	106	32	2.18	86	26	1.83

3.2.7. Verici Faz Hacmi

Verici fazın 5 ve 10 mL'deki hacimleri ile çalışmalar yapıldı. Ekstraksiyon ortamındaki diğer şartlar; verici fazda % 10 ACN – % 90 su karışımı, alıcı faz olarak toluen kullanıldı. Ekstraksiyon işlemi 1000 rpm karıştırma hızında, 35 dakika süre ile yapıldı ve ekstraksiyon çözeltisinin pH'sı 6 olarak belir-

lendi. Ekstraksiyon ortamına 5 mL verici faz için, An: 5 ng / 5 mL, Flu, Py, BaA, BbF, BaP: 10 ng / 5 mL, 10 mL verici faz için ise An: 5 ng / 10 mL, Flu, Py, BaA, BbF, BaP: 10 ng / 10 mL olacak şekilde PAH eklendi. Zenginleştirme faktörleri ve yüzde geri alınabilirlik değerleri Çizelge 3.7'de görülmektedir. Verici faz hacmi 10 mL olduğunda zenginleştirme faktörü 5 mL'ye göre ortalama 1.8 kat artarken geri alınabilirlik değerlerinde biraz azalma görülmektedir. Örneğin antrasen için verici faz hacmi 5 mL alındığında zenginleştirme faktörü 322 iken, hacim 10 mL alındığında zenginleştirme faktörü 592'ye yükselmiştir. Ancak gerinalınabilirlik % 98'den % 90'a azalmıştır. BaP için ise zenginleştirme faktörü 210'dan 395'e yükselirken, geri alınabilirlik % 64'den % 60'a azalmıştır. Benzer sonuçlar diğer PAH'lar için de görülmektedir. Bağlı standart sapmalar % 5.5'in altında bulunmuştur.

Çizelge 3.7. Verici Faz Hacmine Göre Z.F. ve % R Değerleri (n= 5)

	5 mL			10 mL		
	Z.F	% R	% RSD	Z.F	% R	% RSD
An	322	98	2.34	592	90	4.15
Flu	303	92	2.96	572	87	2.49
Py	279	85	4.44	421	64	4.84
BaA	252	76	5.33	447	68	3.96
BbF	222	67	2.63	421	64	5.21
BaP	210	64	4.63	395	60	4.36

Ekstraksiyon ortamdaki PAH'ların mol sayıları sabit kalmak koşulu ile verici faz hacmi 2 kat arttığında zenginleştirme faktörlerindeki artış, beklenen bir sonuçtur. Ancak verici faz hacmi artırıldığında PAH'ların alıcı faza difüzyonu daha uzun süreceğinden geri alınabilirliklerde azalma görülmüştür. Ayrıca verici faz artırıldığında kimyasal madde tüketimi artacağından sonraki çalışmalarda 5 mL verici deneylerde kullanılmıştır.

3.2.8. Ortamdaki PAH Derişimi

Ekstraksiyon ortamına aşağıda belirtilen şekilde üç farklı derişimde PAH eklenerek ekstraksiyon yapıldı.

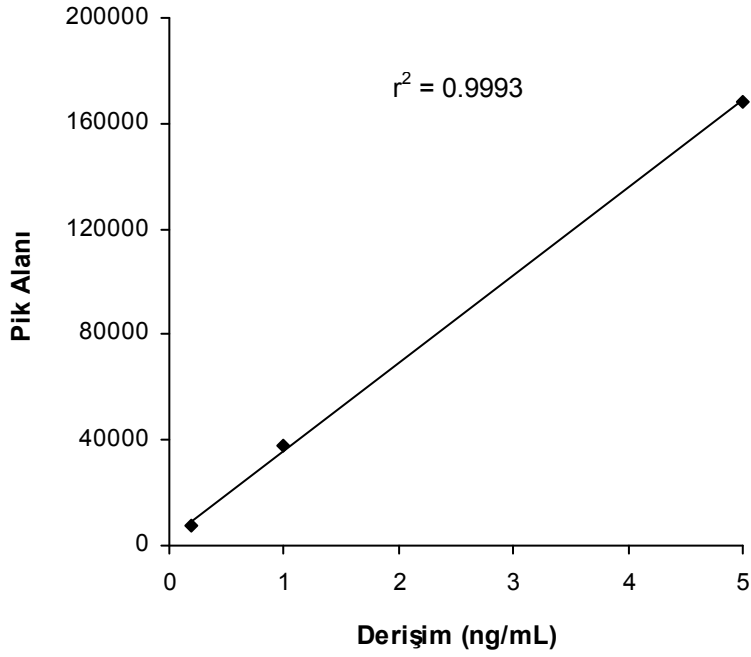
- 1) An: 0.2 ng/mL, Flu, Py, BaA, BbF, BaP: 0.4 ng/mL,
- 2) An: 1.0 ng/mL, Flu, Py, BaA, BbF, BaP: 2.0 ng/mL,
- 3) An: 5.0 ng/mL, Flu, Py, BaA, BbF, BaP: 10.0 ng/mL

Ekstraksiyonlar, pH = 6'da 5 mL % 10 ACN – % 90 su karışımı, toluen alıcı faz olarak kullanılarak, 1000 rpm karıştırma hızında 35 dakika süre ile yapıldı. Ekstraksiyon sonrası zenginleştirme faktörleri ve geri alınabilirlik yüzdeleri Çizelge 3.8'de görülmektedir. Ortama 0.2 ng/mL antrasen eklendiğinde zenginleştirme faktörü 328, 1 ng/mL eklendiğinde 322 ve 5 ng/mL eklendiğinde ise 306 bulunmuştur. BaP için ise zenginleştirme faktörleri 0.4 ng/mL eklendiğinde 222 iken 2 ng/mL eklendiğinde 210'a azalmıştır. 10 ng/mL eklendiğinde ise zenginleştirme faktörü 185'e azalmıştır.

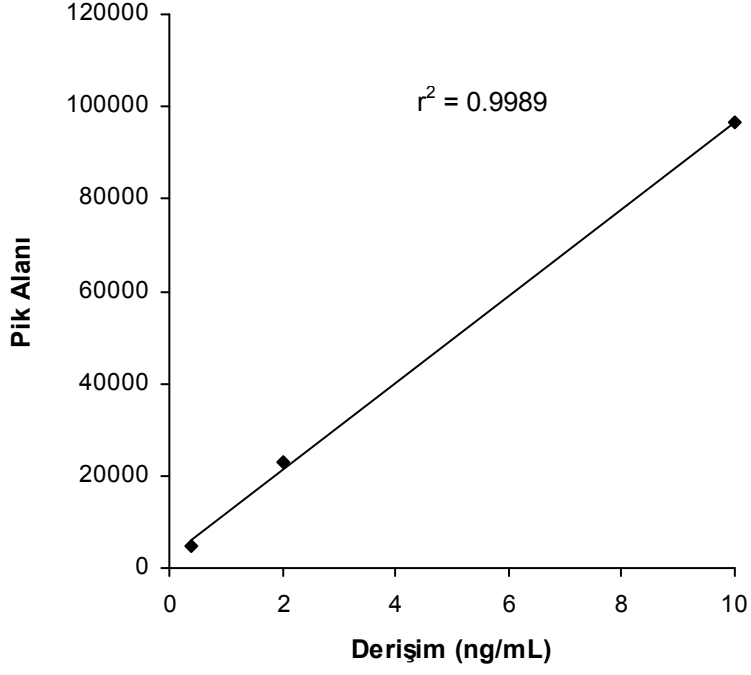
Şekil 3.16, 3.17, 3.18, 3.19, 3.20 ve 3.21'de optimum koşullarda model örnekler ile ekstraksiyon sonrası kalibrasyon grafikleri verilmiştir. Çizelge 3.9'da kalibrasyon doğruları, r^2 ve LOD değerleri verilmiştir. Çalışılan derişim aralıklarında (An: 0.2 ng/mL – 5.0 ng/mL, Diğer PAH'lar: 0.4 ng/mL – 10.0 ng/mL) doğruların r^2 değerleri 0.9984 ile 0.9996 arasında değişmektedir. PAH'ların en küçük tayin sınırları ise 0.040 (An) ng/mL ile 0.136 (Py) ng/mL arasında değişmektedir. LOD'ler sinyal/gürültü (S/N) oranı 3 kabul edilerek belirlenmiştir. Çalışılan derişim aralıklarında doğrusallık görülmektedir. Bu aralık gerçek örneklerdeki PAH derişimleri ile uyum gösterdiği için tercih edilmiştir.

Çizelge 3.8. Ortamdaki PAH Derişimine Göre Z.F. ve % R Değerleri (n= 5)

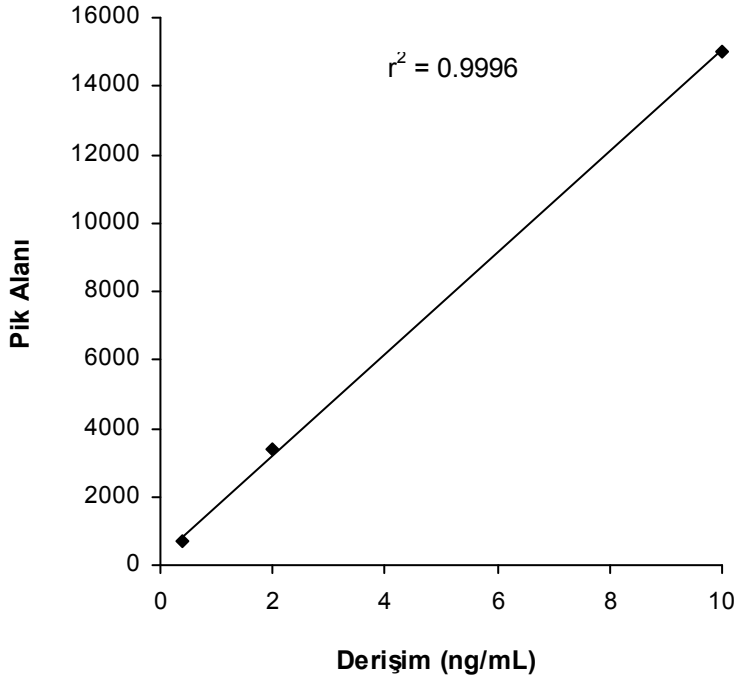
	0.2 ng/mL An 0.4 ng/mL Diğer PAH'lar			1 ng/mL An. 2 ng/mL Diğer PAH'lar			5 ng/mL An 10 ng/mL Diğer PAH'lar		
	Z.F.	% R	% RSD	Z.F.	% R	% RSD	Z.F.	% R	% RSD
An	328	100	3.44	322	98	2.07	306	93	3.95
Flu	320	97	1.00	303	92	2.96	281	86	3.04
Py	301	92	5.21	279	85	4.44	266	81	1.43
BaA	261	79	6.13	252	76	5.33	204	62	3.61
BbF	226	69	1.80	222	67	2.63	190	58	1.17
BaP	222	67	1.25	210	64	4.63	185	57	1.54



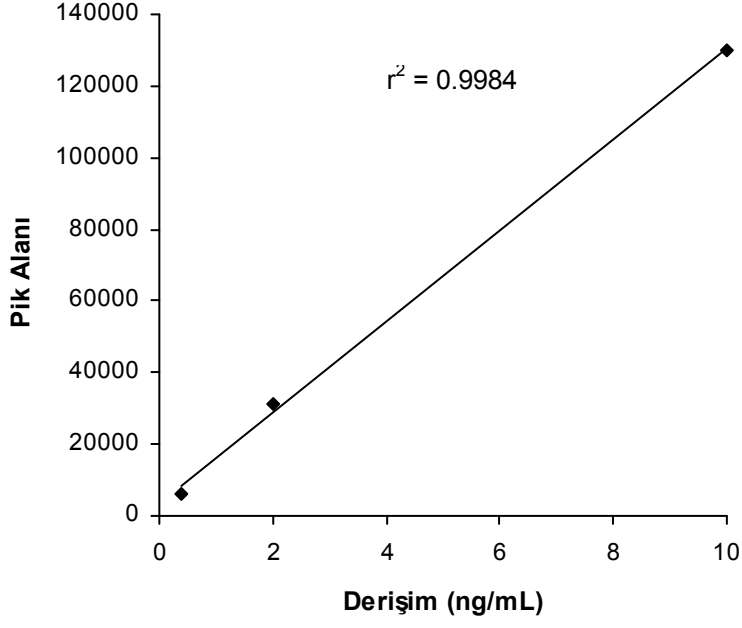
Şekil 3.16. Model Örnekte Antrasen İçin Kalibrasyon Doğrusu



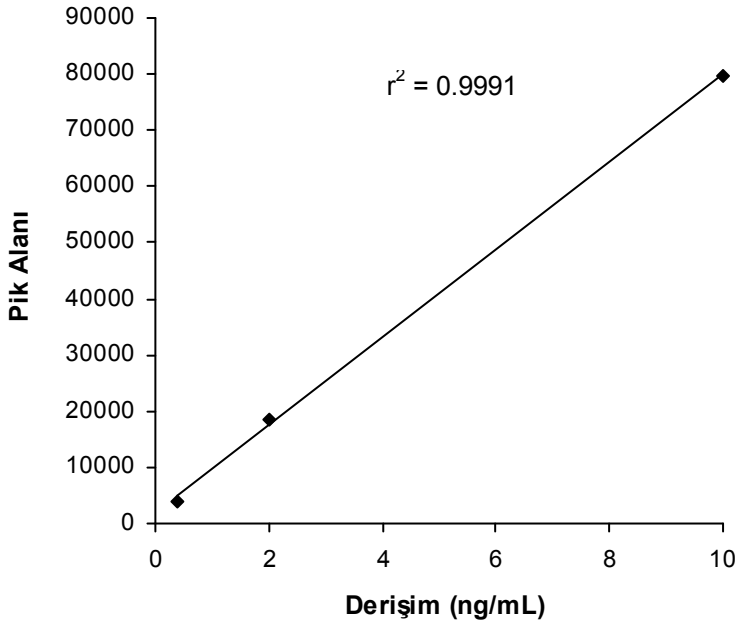
Şekil 3.17. Model Örnekte Floranten İçin Kalibrasyon Doğrusu



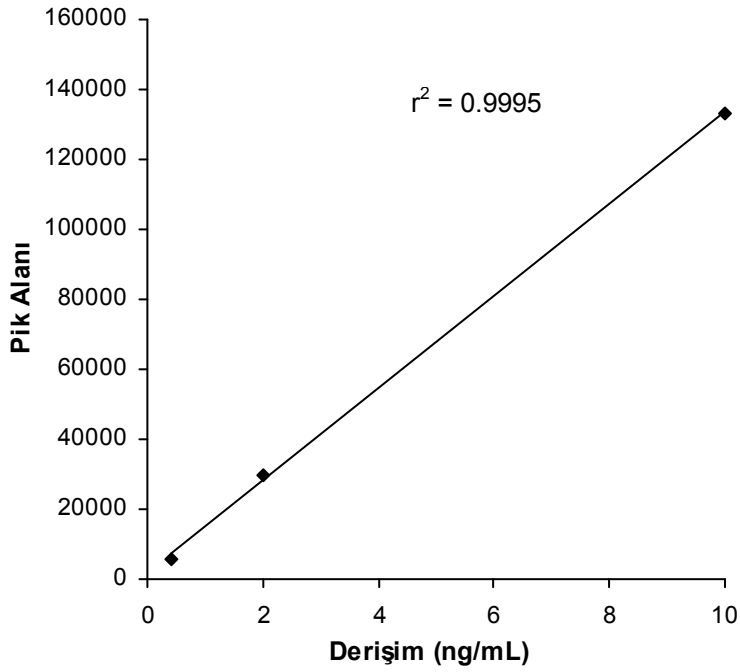
Şekil 3.18. Model Örnekte Piren İçin Kalibrasyon Doğrusu



Şekil 3.19. Model Örnekte Benzo[a]antrasen İçin Kalibrasyon Doğrusu



Şekil 3.20. Model Örnekte Benzo[b]floranten İçin Kalibrasyon Doğrusu



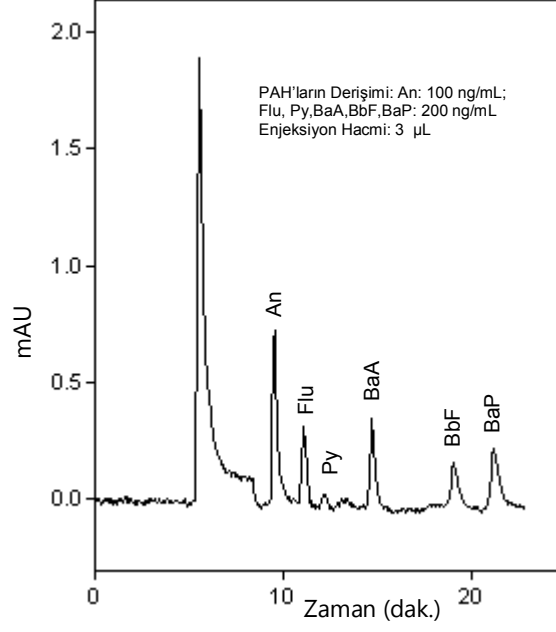
Şekil 3.21. Model Örnekte Benzo[a]piren İçin Kalibrasyon Doğrusu

Çizelge 3.9. Model Örneklerde PAH'ların Kalibrasyon Doğru Denklemleri ve Tayin Sınırları

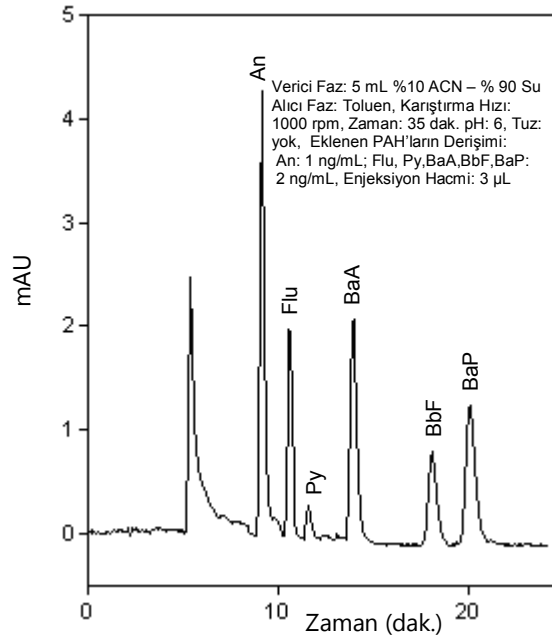
	r^2	Doğru Denklemi	*LOD (ng/mL)
Antrasen	0.9993	$y=33254.0x + 2586.1$	0.040
Floranten	0.9989	$y=9439.9x + 2414.2$	0.050
Piren	0.9996	$y=1479.5x + 248.0$	0.136
Benzo[a]antrasen	0.9984	$y=12715.0x + 3238.1$	0.052
Benzo[b]floranten	0.9991	$y=7828.6x + 1715.6$	0.057
Benzo[a]piren	0.9995	$y=13156.0x + 1897.6$	0.044

*LOD: En küçük tayin sınırı

Şekil 3.22'de metanol içinde hazırlanmış standart PAH karışımının HPLC/UV detektör sisteminde elde edilen kromatogramı görülmektedir. Şekil 3.23'de ise HF-LPME sonrası elde edilen kromatogram görülmektedir. Standart PAH karışımının derişimleri, ekstraksiyon ortamının şartları ve enjeksiyon hacimleri şekil üzerinde verilmiştir.



Şekil 3.22. Standart PAH Karışımının Kromatogramı



Şekil 3.23. Hollow Fiber Mikroekstraksiyon Sonrası Kromatogram

Buraya kadar yapılan çalışmalarda model örnekler ile PAH'ların ekstraksiyonu için optimum koşullar belirlenmiştir.

Model örnekler için optimum koşullar;

- Verici faz: 5 mL % 10 ACN – % 90 su karışımı,
- Alıcı faz: Toluen,
- Karıştırma hızı: 1000 rpm
- Ekstraksiyon süresi: 35 dakika
- Verici faz pH'sı: 6.0
- Tuz Derişimi: 0

Çizelge 3.10'da optimum koşullardaki zenginleştirme faktörleri ve yüzde geri alınabilirlik değerleri, yinelenebilirlik sonuçları ile birlikte verildi. Antrasenin geri alınabilirliği % 97 iken BaP % 63 olarak bulunmuştur. Yinelenebilirlikler (% RSD) % 2.62 (An) ile % 13.97 (BbF) arasında değişmektedir.

Çizelge 3.10. Optimum Koşullardaki Z.F. ve % R Değerleri

PAH	Z.F.	% R	% RSD*
Antrasen	319	97	2.62
Floranten	303	92	3.34
Piren	283	86	4.58
Benzo[a]antrasen	238	72	9.03
Benzo[b]floranten	215	65	13.97
Benzo[a]piren	208	63	13.74

*Yinelenebilirlik (reproducibility)

3.3. Gerçek Örnekler

PAH'ların oyuk (hollow) fiber mikroekstraksiyon yöntemi ile optimum geri kazanım şartları belirlendikten sonra, çalışmanın asıl amacını oluşturan si-gara izmaritlerindeki PAH'ları tayin etmek için ekstraksiyon işlemleri yapıldı.

İlk olarak standart eklenmiş izmarit örneklerinden ekstraksiyonlar yapılarak gerçek örneklerde PAH'ların geri alınabilirlikleri belirlendi. Sonrasında üç farklı markaya ait sigara izmaritindeki PAH'lar belirlendi. Standart eklenmiş izmarit örneklerinin ekstraksiyonunda verici faz, iki farklı şekilde hazırlandı. İzmaritler asetonitrilde çözüldükten sonra çözünen selüloz asetatın çöktürülmesinde deiyonize su ve pH = 3'e ayarlanmış su kullanıldı. Ekstraksiyon sonrasında alıcı faz HPLC sisteme enjekte edilerek zenginleştirme faktörleri ve yüzde geri alınabilirlikler hesaplandı.

Deiyonize Su ile Selüloz Asetat Çöktürülmesi

PAH standartları eklenmiş sigara izmariti, asetonitrilde çözüldüğü zaman, çözelti ortamı bulanık bir haldedir. Bu bulanıklık zifirde çok fazla kimyasal olmasının yanı sıra çözünen selüloz asetatın da kaynaklanmaktadır. Selüloz asetat ortama su eklendiğinde çökmektedir. Model örnek çalışmalarında verici faz ortamı % 10 ACN – % 90 su olarak optimumlaştırılmıştır. Hem selüloz asetatları çöktürmek hem de verici faz ortamını optimum şartlara getirmek için ortama su eklenmiştir.

Çöktürme işleminden sonra selüloz asetatı ortamdaki uzaklaştırmak için örnek mavi bant süzgeç kâğıdı ile süzme işlemi gerçekleştirildi. Verici fazın hazırlanışı Bölüm 2.9.'da daha ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Verici faz hazırlandıktan sonra model örneklerde belirlenen koşullarda ekstraksiyon işlemi tamamlandı. Bulunan zenginleştirme faktörleri ve yüzde geri alınabilirlikler Çizelge 3.11'de "I" sütununda görülmektedir. Antrasen hariç, diğer PAH'ların geri alınabilirlikleri oldukça düşüktür. Örneğin, ekstraksiyon sonrasında floranten % 15 oranında geri kazanılırken BbF için bu değer % 3'tür. Tekrarlanabilirlikler (% RSD) % 7.5'in altındadır.

Çizelge 3.11. Deiyonize Su ile Çöktürme Sonrası
Z.F. ve % R Değerleri (n= 5)

	I			II		
	Z.F.	% R	% RSD	Z.F.	% R	% RSD
An	223	68	2.69	266	81	2.52
Flu	49	15	1.37	92	28	7.24
Py	69	21	6.43	69	21	5.15
BaA	21	6	7.12	56	17	1.19
BbF	11	3	6.73	17	5	6.32
BaP	13	4	5.66	20	6	3.54

I: PAH standartları selüloz asetat çöktürülmeden önce eklendi.
II: PAH standartları selüloz asetat ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra eklendi.

Sigara izmariti yapısında çok sayıda organik ve inorganik maddeler bulunması, ortamın iyonik şiddetinin yüksek olması, geri alınabilirliklerin düşük olmasının nedenleri (matriks etkisi) olabilir. Diğer taraftan izmaritte bulunan selüloz asetatın da geri alınabilirliklere etkisi olabilir. Selüloz asetat ortamdan süzgeç kâğıdı ile süzülerek ayrıldıktan sonra verici faz ortamının bulanık olduğu ve kolloidal partiküllerin bulunduğu görülmektedir.

PAH'ların katı partiküllere tutunma eğiliminde olmaları, ortamdaki bu partiküllerin fiberin gözeneklerini tıkaması ve PAH'ların alıcı faza difüzyonunu zorlaştırması geri alınabilirliklerde etkili olabilir.

Verici faz mavi bant süzgeç kâğıdından süzüldükten sonra askıda kalan partiküllerin 4000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenerek çökmesi sağlandı. Damlalık yardımıyla verici faz dikkatli bir şekilde alınarak çöken partiküller uzaklaştırıldı. Ekstraksiyon sonrasında bulunan sonuçlar Çizelge 3.12'de verilmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.11'in "I" sütunu ile karşılaştırıldığında florantenin geri alınabilirliği % 15'den % 25'e yükselmiştir. Ancak diğer PAH'ların geri alınabilirliklerinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Tekrarlanabilirlikler (% RSD) % 0.81 (Flu) ile % 7.25 (BbF) arasında değişmektedir.

Yine ekstraksiyon verimini artırmak amacı ile standart eklenmiş izmarit, asetonitrilde çözüldükten sonra alümina veya silika doldurulmuş kolondan

geçirildi. Bölüm 2.9’da anlatıldığı gibi deionize su eklenerek selüloz asetatlar çöktürüldü. Mavi bant süzgeç kâğıdından süzülerek verici faz hazırlandı. Ekstraksiyon sonrası sonuçlar Çizelge 3.12’de verilmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.11’in “I” sütunu ile karşılaştırıldığında alümina ve silika ile yapılan ön temizleme çalışmalarının PAH’ların geri kazanılmasında etkili olmadığı görülmektedir. Her iki ekstraksiyon sonrasında da tekrarlanabilirlikler % 7.5’ in altındadır. Alümina ile yapılan işlemde antresinin tekrarlanabilirliği % 3.12 bulunurken silika ile yapılan işlemlerde % 2.11 olarak bulunmuştur. BaP için ise sırası ile % 5.66 ve % 7.48 olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.12. Santrifüj, Alümina ve Silika ile Ön Temizleme Sonrası Z.F. ve % R Değerleri (n= 3)

	SANTRIFÜJ			ALUMİNA			SİLİKA		
	Z.F.	% R	% RSD	Z.F.	% R	% RSD	Z.F.	% R	% RSD
An	236	72	2.26	226	69	3.12	220	67	2.11
Flu	82	25	0.81	56	17	2.17	49	15	4.56
Py	72	22	5.22	72	22	5.14	65	20	6.15
BaA	23	7	6.78	23	7	4.72	21	6	5.12
BbF	11	3	7.25	13	4	3.86	13	4	5.45
BaP	7	2	4.56	13	4	5.66	11	3	7.48

Matriks ortamındaki selüloz asetatın PAH’ların geri kazanılmasına etkisini belirlemek amacı ile izmarit, PAH standartı eklenmeden asetonitrilde çözüldü. Deiyonize su eklenip selüloz asetat çöktürüldükten sonra mavi bant süzgeç kâğıdından süzülerek verici faz hazırlandı. Selüloz asetatın süzme işlemi ile uzaklaştırılmasından sonra PAH standartları eklendi. Ekstraksiyon sonrası sonuçlar Çizelge 3.11’in “II” sütununda verildi. Çizelge 3.11’deki, PAH standartlarının, selüloz asetatın uzaklaştırılmasından önce (I) ve sonra (II) eklenmesi ile yapılan ekstraksiyon sonuçları karşılaştırıldığında PAH standartları, selüloz asetat uzaklaştırıldıktan sonra eklenince, pirenin dışındaki PAH’ların geri alınabilirliklerinde bir miktar artış gözlenmiştir. Antrasen’in geri alınabilirliği % 68’den % 81’e yükselirken, florantenin geri alınabilirliği % 15’den % 28’e yükselmiştir. Özellikle BaA’de üç kata yakın bir

artış gözlenerek, % 6'dan % 17'ye yükselmiştir. PAH standartlarının önce ya da sonra eklenmesinin pirenin geri alınabilirliğine bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Selüloz asetatın deionize su çöktürülmesi ile yapılan çalışmalarda % R değerleri düşük bulunmuştur. Mavi bant süzgeç kâğıdı ile süzme sonrasında ortamda hala çok küçük partiküllerin kaldığı gözlenmektedir. Ekstraksiyon öncesi yapılan ön temizleme işlemlerinin de geri kazanımda etkili olmadığı görülmektedir.

pH = 3'e Ayarlanan Su ile Selüloz Asetat Çöktürülmesi

Standart eklenmiş sigara izmariti asetonitrilde çözüldükten sonra, karıştırılan örnek üzerine pH = 3 olan 10 mL su yavaş bir şekilde eklendi [131]. Bu sayede selüloz asetatın bir anda çökmesi ve koloidal tanecikler oluşturması engellendi. Çöken selüloz asetat mavi bant süzgeç kâğıdından süzildükten sonra, verici fazın deiyonize su ile yapılan çöktürme işlemine göre çok daha berrak olduğu gözlemlendi. % 10 ACN – % 90 su olacak şekilde saf su ilavesi yapıp, pH = 6'ya ayarlandı. Verici fazın hazırlanışı 2.9'da ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır. Optimum koşullarda yapılan ekstraksiyon sonrasında sonuçlar Çizelge 3.13'de "I" sütununda verilmiştir.

Çizelge 3.13. pH = 3 Olan Su ile Çöktürme Sonrası
Z.F. ve % R Değerleri (n= 5)

	I			II		
	Z.F.	% R	% RSD	Z.F.	% R	% RSD
An	234	71	3.22	337	102	3.32
Flu	89	27	3.60	161	49	1.94
Py	105	32	5.59	214	65	1.83
BaA	40	12	4.89	109	33	2.02
BbF	27	8	4.57	50	15	4.44
BaP	30	9	5.06	60	18	3.50

I: PAH standartları selüloz asetat çöktürülmeden önce eklendi.
II: PAH standartları selüloz asetat ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra eklendi.

Çizelge 3.13'ün "I" sütunundaki sonuçlar Çizelge 3.11'in "I" sütunundaki sonuçlar ile karşılaştırıldığında zenginleştirme faktörleri ve % R değerlerinin daha iyi olduğu görülmektedir. Örneğin florantenin geri alınabilirliği % 15'den % 27'ye yükselirken, BaP'nin geri alınabilirliği % 4'den % 9'a yükselmiştir. Bu artışlar diğer PAH'lar için de söylenebilir. Ancak geri kazanım değerlerinin hala düşük olduğu görülmektedir. Tekrarlanabilirlikler % 3.22 (An) ile % 5.59 (Py) arasında değişmektedir. Geri alınabilirliklerin düşük olmasının önemli nedenlerinden biri, izmarit zifirinde bulunan birçok kimyasal bileşik nedeniyle ortamdaki iyonik şiddetin oldukça yüksek olması ile açıklanabilir. Geri kazanımları artırmak için verici faz ortamının matriks etkisini azaltmak için aşağıdaki çalışmalar yapıldı.

- I. Verici faz, mavi bant süzgeç kâğıdından süzöldükten sonra 0.22 µm naylon filtreden geçirilerek ekstraksiyon işlemi yapıldı. Sonuçlar Çizelge 3.14'de verildi. Sonuçlar Çizelge 3.13'ün "I" sütunu ile karşılaştırıldığında antrasen hariç diğer PAH'ların geri alınabilirliklerinde azalma görülmektedir. Örneğin florantenin geri alınabilirliği % 27'den % 14'e azalırken, BbF % 8'den % 4'e azalmıştır. Bu azalmalar diğer PAH'lar için de söylenebilir. Özellikle BaA'nin geri alınabilirliğinde önemli bir azalma olmuştur. Tekrarlanabilirlikler (% RSD) % 7'nin altında bulunmuştur.
- II. Selüloz asetat pH = 3 olan su ile çöktürölüp mavi bant süzgeç kâğıdından süzöldükten sonra örnek alümina kolondan geçirilerek ön temizleme işlemine tabi tutuldu. % 10 ACN – % 90 su olacak şekilde saf su ilavesi yapıp, pH = 6'ya ayarlandı. Ekstraksiyon sonrası sonuçlar Çizelge 3.14'de verildi. Sonuçlar Çizelge 3.13'ün "I" sütunu ile karşılaştırıldığında verici fazın alümina kolondan geçirilmesinin geri kazanımlara bir etkisinin olmadığını göstermektedir.
- III. İzmarit, PAH standardı eklenmeden, asetonitrilde çözüldü. pH = 3 olan su ile çöktüröldükten sonra mavi bant süzgeç kâğıdı ile süzölerek verici

faz hazırlandı. PAH standartları, çöken selüloz asetat uzaklaştırıldıktan sonra eklendi. Sonuçlar Çizelge 3.13'ün "II" sütununda verildi.

Çizelge 3.14. Naylon Filtre ve Alümina ile Ön Temizleme Sonrası Z.F. ve % R Değerleri (n= 3)

	NAYLON FİLTRE			ALÜMİNA		
	Z.F.	% R	% RSD	Z.F.	% R	% RSD
An	256	78	2.95	240	73	4.05
Flu	45	14	4.61	98	30	5.56
Py	72	22	6.97	99	30	6.17
BaA	3	1	4.52	46	14	5.06
BbF	14	4	5.47	25	8	4.11
BaP	8	3	3.87	33	10	5.53

Çizelge 3.13'deki, PAH standartlarının selüloz asetatın uzaklaştırılmasından önce (I) ve sonra (II) eklenmesi ile yapılan ekstraksiyon sonuçları karşılaştırıldığında PAH standartları, selüloz asetat uzaklaştırıldıktan sonra eklenince PAH'ların geri alınabilirliklerinde bir miktar artış gözlenmiştir. Standartlar önce eklendiğinde, antrasenin geri alınabilirliği % 71 iken, standartlar sonra eklendiğinde % 102'e yükselmiştir. BaP'nin geri alınabilirliği % 9'dan % 18'e yükselmiştir. BaA'de üç kata yakın bir artış gözlenirken diğer PAH'ların geri alınabilirlikleri hemen hemen iki kat artmıştır.

Bu sonuçlar ortamdaki selüloz asetatın PAH'ların geri alınabilirliğine önemli etkisi olduğunu göstermektedir. Selüloz asetatın bu etkisinin, daha önce de değinildiği gibi PAH'ların katı partiküllere tutunma eğiliminde olmaları, ortamdaki bu partiküllerinin PAH'ların alıcı faza difüzyonunu zorlaştırması ve selüloz asetat partiküllerinin fiberin gözeneklerini tıkaması gibi nedenlerle açıklanabilir.

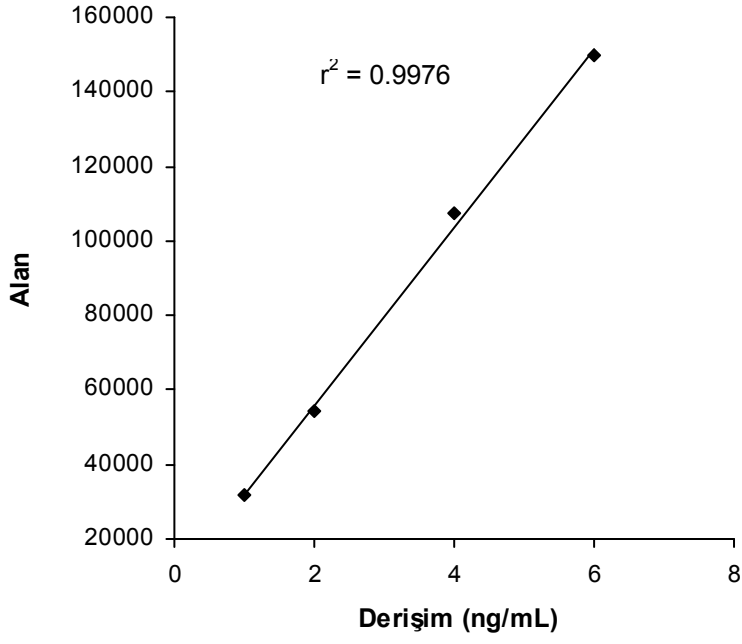
İzmarit örneklerine aşağıdaki derişimlerde PAH karışımı eklendi.

- 1) An: 1 ng/mL, Flu, Py, BaA, BbF, BaP: 2 ng/mL,
- 2) An: 2 ng/mL, Flu, Py, BaA, BbF, BaP: 4 ng/mL,
- 3) An: 4 ng/mL, Flu, Py, BaA, BbF, BaP: 8 ng/mL,
- 4) An: 6 ng/mL, Flu, Py, BaA, BbF, BaP: 12 ng/mL

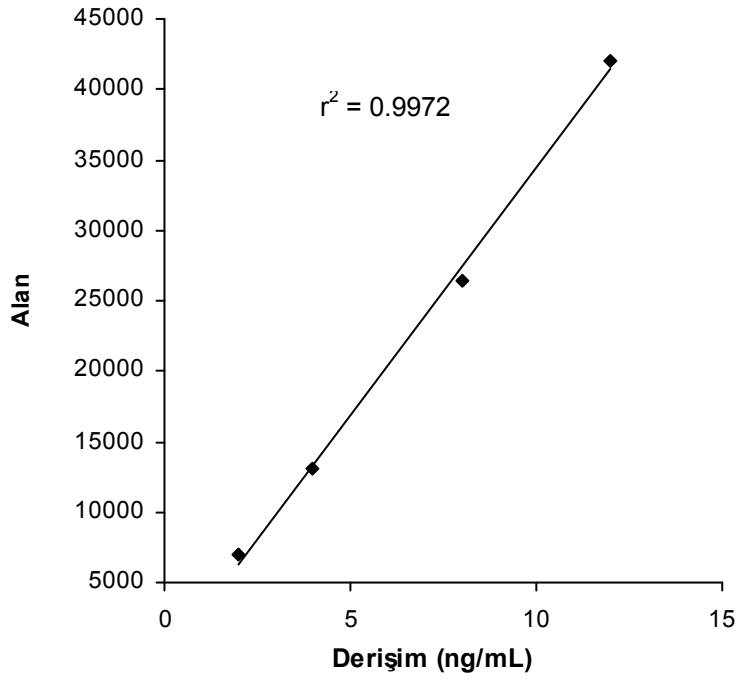
Model örneklerde belirlenen optimum koşullarda 3 kez ekstraksiyon yapıldı ve kalibrasyon doğruları çizildi. Ekstraksiyon sonrasında sonuçlar Çizelge 3.15'de verildi. İzmarit örneğine 2 ng/mL floranten eklendiğinde, geri alınabilirlik % 28, 4 ng/mL eklendiğinde % 26, 8 ng/mL eklendiğinde % 26 ve 12 ng/mL eklendiğinde ise % 28 olarak bulunmuştur. BaP için ise sırası ile geri alınabilirlikler % 10, % 9, % 8 ve % 8 olarak bulunmuştur. Çalışılan derişim aralığında tekrarlanabilirlikler (% RSD) % 7.5'in altında bulunmuştur.

Çizelge 3.15. Standart Eklenmiş Gerçek Örneklerde PAH Derişimine Göre Z.F. ve % R Değerleri (n= 5)

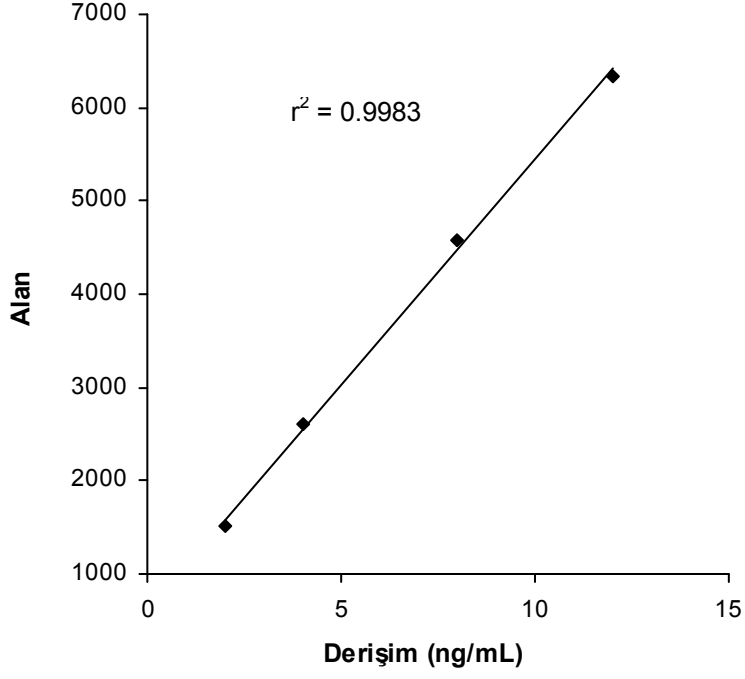
	1 ng/mL An 2 ng/mL Diğer PAH'lar			2 ng/mL An 4 ng/mL Diğer PAH'lar			4 ng/mL An 8 ng/mL Diğer PAH'lar			6 ng/mL An 12 ng/mL Diğer PAH'lar		
	Z.F.	% R	% RSD	Z.F.	% R	% RSD	Z.F.	% R	% RSD	Z.F.	% R	% RSD
An	269	81	2.94	230	70	3.18	226	69	2.65	211	64	4.12
Flu	93	28	3.89	86	26	3.12	85	26	5.25	91	28	2.11
Py	123	37	7.17	109	33	4.86	94	29	6.25	87	27	4.09
BaA	39	12	4.35	40	12	5.14	40	12	2.87	38	12	7.22
BbF	27	8	5.63	26	8	4.36	23	7	4.81	24	7	3.95
BaP	32	10	4.68	29	9	6.02	28	9	5.34	26	8	4.20



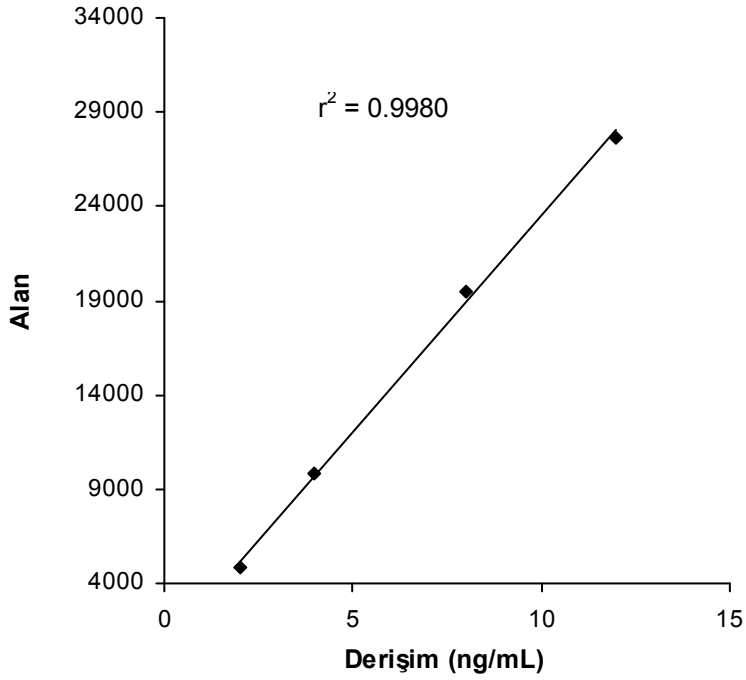
Şekil 3.24. Gerçek Örnekte Antrasen İçin Kalibrasyon Doğrusu



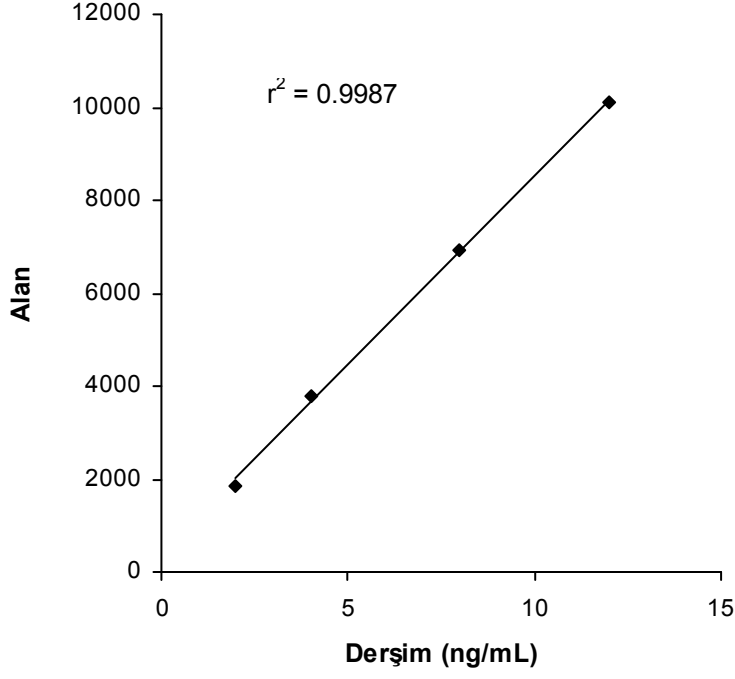
Şekil 3.25. Gerçek Örnekte Floranten İçin Kalibrasyon Doğrusu



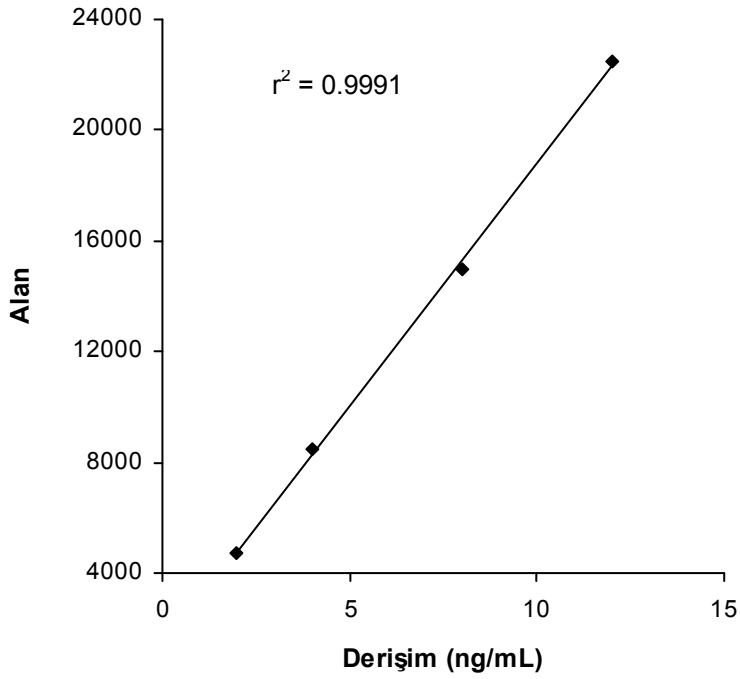
Şekil 3.26. Gerçek Örnekte Piren İçin Kalibrasyon Doğrusu



Şekil 3.27. Gerçek Örnekte Benza[a]antrasen İçin Kalibrasyon Doğrusu



Şekil 3.28. Gerçek Örnekte Benzo[b]floranten İçin Kalibrasyon Doğrusu



Şekil 3.29. Gerçek Örnekte Benzo[a]piren İçin Kalibrasyon Doğrusu

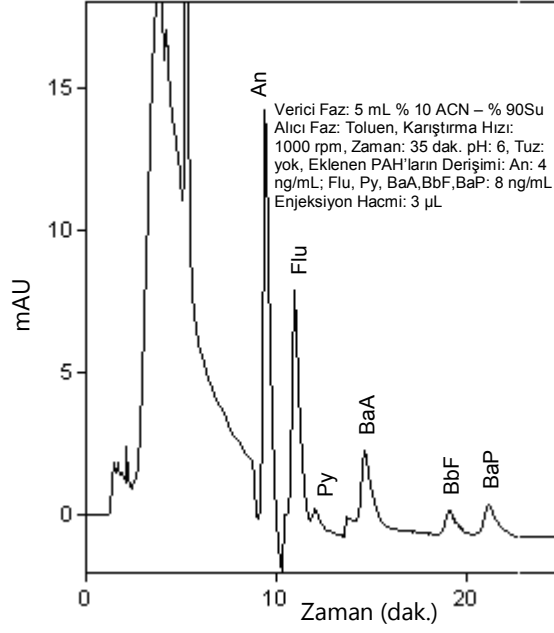
Şekil 3.24, 3.25, 3.26, 3.27, 3.28 ve 3.29'da optimum koşullarda standart eklenmiş gerçek örnekler ile ekstraksiyon sonrası kalibrasyon grafikleri verilmiştir. Çizelge 3.16'da kalibrasyon doğruları, r^2 ve LOD değerleri verilmiştir. Çalışılan derişim aralıklarında PAH'ların r^2 değerleri 0.9972 ile 0.9991 arasında değişmektedir. r^2 değerleri, çalışılan aralıkta yüksek doğrusallıkla bulunmuştur. Zenginleştirme faktörleri ve r^2 değerlerine bakıldığında çalışılan derişim aralığında PAH'ların geri kazanımlarının önemli oranda değişmediği görülmüştür. PAH'ların en küçük tayin sınırları 1.65 ng/sigara ile 14.15 ng/sigara arasında değişmektedir. LOD değerleri sinyal/gürültü (S/N) oranı 3 kabul edilerek belirlenmiştir. LOD'lerin daha aşağı değerlere düşürülmesini, detektörün en küçük tayin sınırı, ekstraksiyon sonrası geri alınabilirlikler, verici fazın hacmi ve verici faz içerisindeki ACN yüzdesi gibi faktörler etkilemektedir. Yinelenebilirlikler (% RSD) % 2.30 (BbF) ile % 15.54 (Py) arasında değişmektedir.

Çizelge 3.16. Standart Eklenmiş Gerçek Örneklerde Kalibrasyon Doğru Denklemleri ve Tayin Sınırları

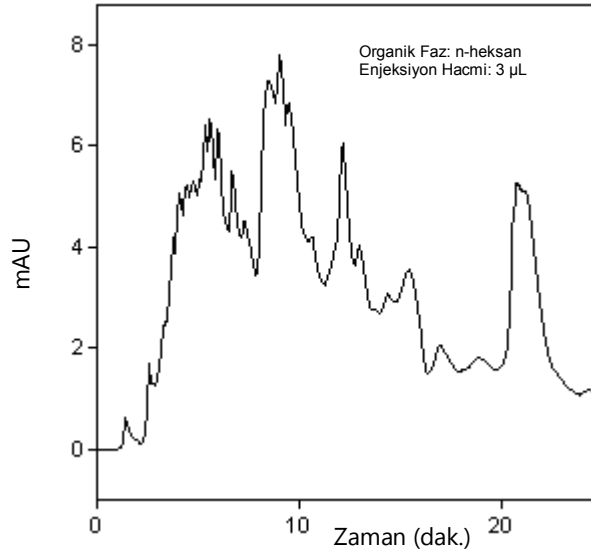
	r^2	Doğru Denklemi	LOD (ng/sig.)	% RSD*
An	0.9976	$y=23932.0x + 8057.8$	1.65	10.57
Flu	0.9972	$y=3504.5x - 669.3$	4.60	4.35
Py	0.9983	$y=482.5x + 622.5$	9.79	15.54
BaA	0.9980	$y=2286.4x + 586.4$	8.70	2.44
BbF	0.9987	$y=816.6x + 369.5$	14.15	2.30
BaP	0.9991	$y=1763.2x + 1203.7$	8.65	10.17

*Yinelenebilirlik

Şekil 3.30'da PAH standardı eklenmiş gerçek örnek ile yapılan HF-LPME sonrası elde edilen kromatogram görülmektedir. Şekil 3.31'de ise standart eklenmemiş izmarit örneğinden klasik sıvı-sıvı ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogram görülmektedir.



Şekil 3.30. Standart Eklenmiş Gerçek Örneklerde HF–LPME Sonrası Kromatogram



Şekil 3.31. Standart Eklenmemiş İzmarit Örneklerinden Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon Sonrası Kromatogram

Kromatogramlar karşılaştırıldığında sıvı-sıvı ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogramın, mikroekstraksiyon sonrası elde edilen kromatograma göre oldukça karmaşık olduğu görülmektedir. Sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemin-

de bu karmaşıklık, PAH'ların tayini için birkaç ön temizleme işlemi gerektirmekte ve geri kazanımlarda kayıplara neden olmaktadır. Ayrıca zaman ve maliyet artışlarına neden olmaktadır. Mikroekstraksiyonda daha temiz bir kromatogram alınması, sıvı-sıvı ekstraksiyona göre daha az izmarit kullanılması, fiberin zenginleştirmenin yanı sıra ön temizleme işlemi de yapması ile açıklanabilir.

3.3.1. İzmaritlerde PAH'ların Tayini

Önce model örnekler için belirlenen optimum deney koşulları yukarıda açıklandığı gibi PAH eklenmiş izmarit zifirlerine uygulanarak gerçek örnekler uygulanacak hale getirildi. Gerçek sigara izmarit örneklerinin analizi Çizelge 3.17'deki basamaklar halinde uygulandı. Uygulanan bu analiz basamaklarından sonra 3 farklı marka sigara izmarit zifirinde belirlenen PAH derişimleri Çizelge 3.18'de verildi. Şekil 3.32'de sigara izmaritlerindeki PAH'ların tayini için yapılan HF–LPME sonrası elde edilen kromatogram görülmektedir.

Çizelge 3.17. İzmarit Zifirindeki PAH'ların Tayini İçin Analiz Basamakları

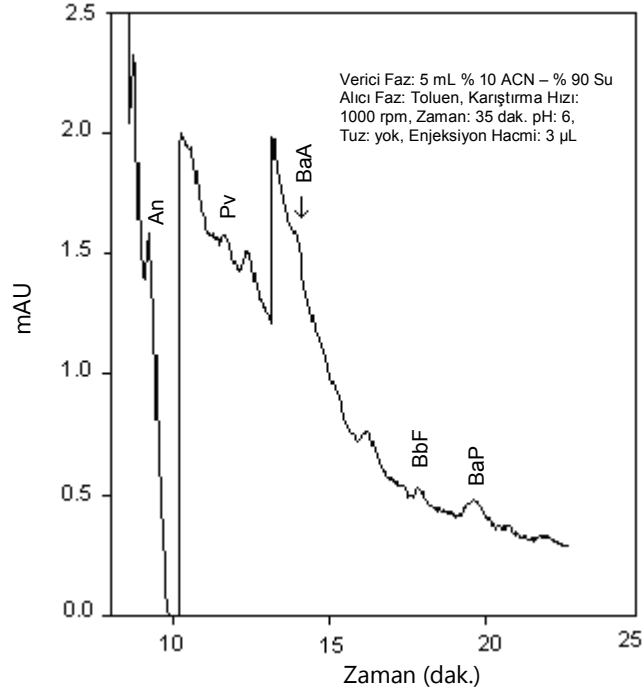
-
1. Bir içici tarafından sigaranın içilmesi
 2. Filtreden kâğıt ve kalıntıların ayrılması
 3. Filtrenin 5 mL asetonitrilde çözülmesi
 4. pH = 3 olan sudan 10 mL eklenerek filtrenin (selüloz asetat) çöktürülmesi
 5. Çöken filtrenin mavi bant süzgeç kâğıdından süzülerek örnekten ayrılması
 6. 35 mL deiyonize su eklenerek asetonitril derişiminin % 10 yapılması
 7. NaOH ile pH'ın 6'ya ayarlanması (toplam hacim 50 mL)
 8. 15 mL'lik vialde 5 mL örnek (verici faz) alınması
 9. Toluene (alıcı faz) ile doldurulmuş 22 mm'lik fiberin vialde yerleştirilmesi
 10. 1000 rpm karıştırma hızında 35 dakika süre ile ekstraksiyon
 11. Ekstraksiyon sonunda fiberden alınan alıcı fazın 3 µL'sinin HPLC'ye enjeksiyonu
 12. Tayin
-

Çizelge 3.18. Farklı Markalara Ait Sigara İzmaritlerindeki PAH Miktarları (n= 3)

	C ₁	C ₂	C ₃
Zifir; Nikotin; CO (mg/sigara)	10;0.8;10	10;0.8;10	10;0.6;10
	ng/sigara	ng/ sigara	ng/ sigara
An	29.92	7.96	3.75
Flu	<LOD	<LOD	<LOD
Py	69.49	14.47	23.22
BaA	17.05	11.76	<LOD
BbF	30.62	<LOD	<LOD
BaP	18.41	16.30	24.07
Σ_{PAH}	165.49	50.49	51.04

C₁: Parliament, C₂: Samsun, C₃: Winston

Antrasen, Parliament marka sigara filtresinde 29.92 ng/sigara, Samsun marka sigara filtresinde 7.96 ng/sigara, Winston marka sigara filtresinde ise 3.75 ng/sigara olarak bulunmuştur. Floranten üç marka sigarada da tayin sınırının altında olduğundan tespit edilememiştir. Parliament marka sigara filtresinde BbF, 30.62 ng/sigara olarak bulunurken diğer iki markada tayin sınırının altındadır. Kansorejen etkisi kesin olarak bilinen BaP, Parliament, Samsun ve Winston'da sırası ile 18.41 ng/sigara, 16.30 ng/sigara ve 24.07 ng/sigara olarak bulunmuştur. Toplam PAH miktarları, Parliament, Samsun ve Winston marka sigara filtrelerinde sırası ile 165.49 ng/sigara, 50.49 ng/sigara ve 51.04 ng/sigara olarak bulunmuştur. Toplam PAH miktarlarındaki sonuçlar Parliament marka sigara filtresinin PAH'ları tutmakta daha etkin olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.32. Gerçek Örnekten HF–LPME Sonrası Kromatogram

3.4. Yöntemin Değerlendirilmesi

HF–LPME yöntemi ile genellikle sulu örneklerden maddelerin ekstraksiyonu yapılmaktadır. Literatürde, PAH'ların matriks ortamdan ekstraksiyonunda su örnekleri dışında çok az çalışma vardır. Ancak bazı matriks ortamlarda, verici faz ortamının sadece su olması yeterli olmamaktadır. Örneğin S. King vd. (2002) toprakta PAH'ların analizinde [133], N. Ratola vd. (2008) ise çam iğnelerinde PAH'ların analizinde [122] verici faz olarak, aseton/su karışımını kullanmışlardır. Bu çalışmada PAH tayini, sigara izmarit matriksi ortamında yapılması nedeni ile model örnek çalışmalarında verici faz olarak ACN/su karışımının kaçınılmaz biçimde kullanılması gerekmektedir. Model örneklerde optimum şartlarda (22 mm fiber, verici faz; 5 mL % 10 ACN – % 90 su, alıcı faz; toluen, 1000 rpm, 35 dakika, pH: 6, tuz: yok) yapılan ekstraksiyonda PAH'ların geri kazanımı yüksek oranda sağlandı. Geri alınabilirlikler % 98 (An) ile % 63 (BaP) arasında tekrarlanabilirlik ve yinelenebilirlikler ise yüzde bağıl standart sapma (% RSD) olarak sırası ile % 2.07–5.33, % 2.62–13.97 arasında değişmektedir. Çalışılan derişim aralıklarında r^2 de-

ğerleri 0.9984 ile 0.9996 arasında yüksek doğrusallıkta bulunmuştur. PAH'ların en küçük tayin sınırları ise bir 0.040 (An) ng/mL ile 0.136 (Py) ng/mL arasında değişmektedir.

PAH standartı eklenmiş izmarit örneklerinden ekstraksiyon çalışmalarında, deiyonize su ile hazırlanan örneklerden ekstraksiyonlarda geri alınabilirlikler % 3 (BbF) ile % 68 (An) arasında değişmektedir. Model örneklere göre geri alınabilirlikler oldukça düşük bulunmuştur. Geri alınabilirliklerin azalmasında, ortamdaki matriks etkisinin yanı sıra, çöktürülen selüloz asetatın ortamdaki çok iyi uzaklaştırılmamasının da etkisi vardır. pH = 3 olan su ile hazırlanan örneklerden ekstraksiyonlarda, geri alınabilirlikler % 8 (BbF) ile % 71 (An) arasında değişmektedir. Geri alınabilirlikler model örneklere göre düşüktür. Ekstraksiyon ortamında matriks etkisi olmasına rağmen yüzde bağıl standart sapmalar (% RSD) % 3.22 (An) ile 5.59 (Py) arasındadır. Matriks etkisini azaltmak için, örneklerin silika veya alumina kolondan geçirilmelerinin, geri kazanımlara etkisinin olmadığı görülmüştür.

Her iki örnek hazırlama işleminde de (deiyonize su, pH = 3'e ayarlı su) standart ekleme, selüloz asetat ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra yapıldığında geri alınabilirliklerde bir miktar artış gözlenmiştir. Deiyonize su ile hazırlanan örneklerden ekstraksiyonda piren dışındaki PAH'ların geri kazanımlarında artış sağlanmıştır. pH = 3 ayarlı su ile hazırlanan örneklerden ekstraksiyonda ise PAH'ların geri kazanımının hemen hemen iki kat arttığı görülmektedir. Örneğin, pirenin geri alınabilirliği % 32'den % 65'e yükselirken, BbF'nin geri alınabilirliği % 8'den % 15'e yükselmiştir. BaA'de bu artış üç kat olmuştur. Bu sonuçlar PAH'ların geri kazanılmasına filtrenin önemli etkisinin olduğunu göstermektedir.

Standart eklenmiş izmarit örneklerinde, çalışılan derişim aralıklarında r^2 değerleri 0.9972 ile 0.9991 arasında bulunmuştur. PAH'ların en küçük tayin sınırları, 1.65 ng/sigara (An) ile 14.15 ng/sigara (BbF) arasında bulunmuştur. Yinelenebilirlikler (% RSD) ise % 2.30 (BbF) ile 15.54 (Py) arasında bulunmuştur.

Standart eklenmiş gerçek örneklerde HF–LPME sonrası elde edilen kromatogramın (Şekil 3.30) klasik sıvı-sıvı ekstraksiyon sonrası kromatograma (Şekil 3.31) göre daha iyi bir ayırım göstermesi mikroekstraksiyonun başarısını göstermektedir. Ayrıca HF–LPME yönteminde daha az örnek ve çözücü kullanılması avantajlarıdır.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

- ✓ Polipropilen oyuk (hollow) fiberin boşluk ve gözenek hacmi için yapılan deneysel çalışmalarda, fiberin gözenek hacmi, $4.32 \pm 0.14 \mu\text{L}/\text{cm}$ olarak hesaplandı. Fiberin boşluk hacmi, birinci yöntem ile $3.33 \pm 0.28 \mu\text{L}/\text{cm}$ olarak, ikinci yöntemde ise $3.18 \pm 0.16 \mu\text{L}/\text{cm}$ olarak hesaplandı. Çalışmalarda yapılan hesaplamalarda fiberin boşluk hacmi ortalama $3.26 \mu\text{L}/\text{cm}$ olarak alındı. Ticari olarak temin edilen fiberin gözenek ve boşluk hacmi teorik olarak hesaplandığında sırası ile $3.57 \mu\text{L}/\text{cm}$ ve $2.80 \mu\text{L}/\text{cm}$ 'dir. Fiberin gözenek hacmi için teorik değer ile deneysel değer arasında % 20, boşluk hacmi için ise % 13 dolaylarında hata görülmektedir. Bu farklılık deneysel hataların yanı sıra üretilen fiberlerin homojen olmamasından kaynaklanabilir.
- ✓ Fiber boyu bazı parametreler dikkate alınarak seçildi.
 - Ekstraksiyonda 5 cm'lik vial kullanılması,
 - Verici faz hacmi arttıkça ekstraksiyonun daha uzun zamanda dengeye gelmesi nedeniyle verici faz hacminin maksimum 10 mL kullanılması,
 - Fiber boyu uzadıkça, karıştırma anında fiberin vorteksten daha fazla etkilenip alıcı faz kaybının artması,
 - Fiber boyu uzadıkça, alıcı faz hacminin artması ile zenginleştirme faktörünün azalması gibi etkenler fiber boyunu sınırlandırmaktadır.

Bu etkenler dikkate alındığında 22 mm en uygun fiber boyu olarak alındı. Fiberin 2 milimetresi, fiberi enjektörün ucuna takma ve açık olan ucunu kapatmak için kullanıldı.

- ✓ Ekstraksiyon için optimum koşullar;
 - Verici faz: 5mL % 10 ACN – % 90 Su karışımı,
 - Alıcı faz: Toluen,

- Karıştırma hızı: 1000 rpm
- Ekstraksiyon süresi: 35 dakika
- Verici faz pH'sı: 6
- Tuz Derişimi: 0

olarak bulunmuştur.

- ✓ Optimum koşullarda PAH'ların zenginleştirme faktörleri, 319 (An) ile 208 (BaP) arasında değişirken, geri alınabilirlik yüzdeleri % 97 ile % 63 arasında değişmektedir. Tekrarlanabilirlik (repeatability) ve yinelenebilirlik (reproducibility) ise yüzde bağıl standart sapma (% RSD) olarak sırası ile % 2.07–5.33 ve % 2.62–13.97 arasında bulunmuştur.
- ✓ Model örnekler ile çalışılan derişim aralıklarında (An: 0.2 ng/mL – 5 ng/mL, Diğer: 0.4 ng/mL – 10 ng/mL) doğruların r^2 değerleri 0.9984 ile 0.9996 arasında değişmektedir. PAH'ların en küçük tayin sınırları (LOD) ise sinyal/gürültü (S/N) oranı 3 kabul edilerek 0.040 ng/mL (An) ile 0.136 ng/mL (Py) arasında bulunmuştur.
- ✓ Standart eklenmiş örnekler ile çalışılan derişim aralıklarında (An: 1 ng/mL – 6 ng/mL, Diğer: 2 ng/mL – 12 ng/mL) doğruların r^2 değerleri 0,9989 ile 0.9995 arasında değişmektedir. Gerçek örneklerde en küçük tayin sınırları 1.65 ng/sigara (An) ile 14.15 ng/sigara (BbF) arasında bulunurken, yinelenebilirlikler (% RSD) % 2.30 (BbF) ile % 15.54 (Py) arasında değişmektedir.
- ✓ Çalışmada Parliament, Winston ve Samsun marka içilmiş sigara izmaritlerinde An, Flu, Py, BaA, BbF ve BaP miktarları tayin edilmiştir. Çizelge 3.17'de görüldüğü gibi Flu her üç marka sigara filtresinde de gözlemlenmemiştir. BaA ise Parliament hariç diğer markalarda tayin sınırının altında kalmıştır. Piren, Parliament marka sigara filtresinde 65.49 ng/sigara, Samsun marka sigara filtresinde 14.47 ng/sigara, Winston marka sigara filtresinde ise 23.22 ng/sigara olarak tayin edilirken BaP sırası ile 18.41 ng/sigara, 16.30 ng/sigara ve 24.07 ng/sigara olarak

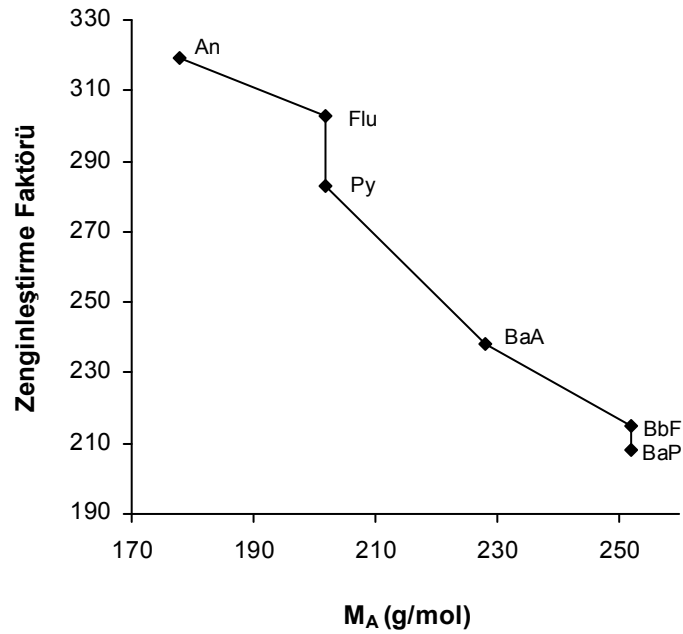
bulunmuştur. Toplam PAH miktarları, Parliament, Samsun ve Winston marka sigara filtrelerinde sırası ile 165.49 ng/sigara, 50.49 ng/sigara ve 51.04 ng/sigara olarak tayin edilmiştir. Üç sonuç karşılaştırıldığında Parliament marka sigara filtresinin PAH'ları tutmakta daha etkili olduğu görülmektedir.

- ✓ Standart eklenmiş izmarit örnekleri ile yapılan çalışmalarda zenginleştirme faktörleri antrasen için 234 iken diğer PAH'lar için 105 (Py) ile 27 (BbF) arasında kalmıştır. Ancak yine de tayin sınırları zenginleştirme ile nanogram düzeylerine düşürülmüştür. Tayin sınırlarının daha aşağı düşürülmesinde, kullanılan detektör sistemi etkili olduğu gibi, yöntemde 5 mL asetonitril içerisinde çözünen sigara izmarit sayısı da etkilidir. Çalışmada verici faz miktarı artırılarak LOD değerleri daha da aşağılara çekilebilir. Ancak bu durum hem ekstraksiyon süresi hem de kullanılan kimyasal madde miktarlarının artması gibi dezavantajları beraberinde getirir.
- ✓ Çalışmada zenginleştirme faktörleri istenildiği düzeyde olmamasına rağmen klasik sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile yapılan izmarit çalışmaları ile kıyaslandığında;
 - Zararlı organik kimyasalların kullanımını mikro düzeylere indirmesi,
 - Ön temizleme işlemlerine gerek duyulmaması,
 - Zaman ve maliyet açısından uygunluğu,
 - Elde edilen kromatogramın daha temiz olması,
 - Ekstraksiyon sonrası alınan organik fazın buharlaştırılması ve deriştirilmesi gibi işlemlere gerek duyulmadan ekstraksiyon fazının doğrudan HPLC sisteme enjekte edilebilmesigibi birçok avantajlara sahiptir.
- ✓ Sigara filtrelerinde 6 PAH'ın tayin edilmesinde başarılı olan yöntem 16 PAH bileşiğinin izmaritlerde tayin edilmesi için de kullanılabilir.

- ✓ PAH'ların zenginleştirme faktörlerine deneysel parametrelerin yanısıra, molekül ağırlıkları, L/B oranları, suda çözünürlükleri ve $\log K_{ow}$ değerleri etkili olmaktadır. Genel olarak bu parametrelere bakıldığında (Çizelge 4.1), beklenildiği gibi molekül ağırlıkları arttıkça zenginleştirme faktörlerinin azaldığı görülmektedir (Şekil 4.1). M_A arttıkça, molekülün fiberin gözeneklerinden geçmesi zorlaşacağı için Z.F. ve geri alınabilirlik yüzdelerinin azalması beklenir.

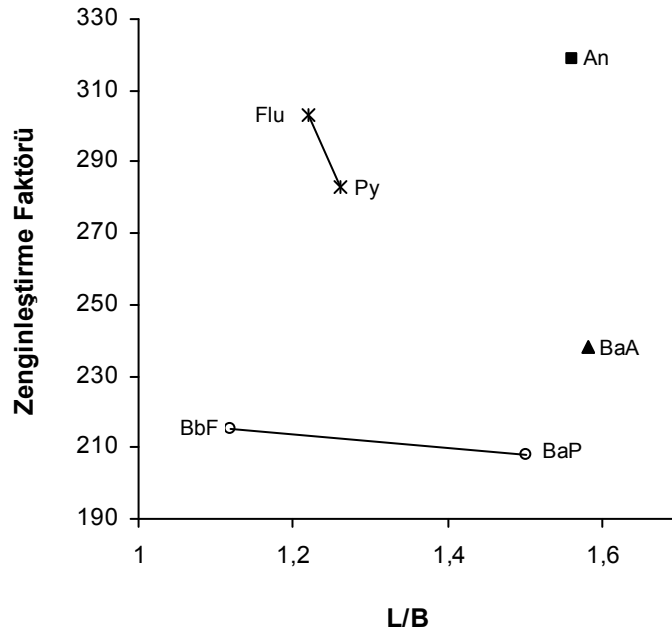
Çizelge 4.1. PAH'ların Zenginleştirme Faktörleri ve Bazı Özellikleri

	Z.F.	M_A (g/mol)	Çöz. (mg/L)	L/B	$\log K_{ow}$
An	319	178	0.076	1.56	4.45
Flu	303	202	0.2	1.22	4.90
Py	283	202	0.077	1.26	4.88
Ort.	302				
BaA	238	228	0.01	1.58	5.61
BbF	215	252	0.0012	1.12	6.04
BaP	208	252	0.0023	1.50	6.06
Ort.	220				



Şekil 4.1. PAH'ların M_A 'larına Göre Zenginleştirme Faktörleri

Z.F. ile L/B oranları arasında ise, doğrusal bir ilişki olduğunu söylemek mümkün değildir. Şekil 4.2’de görüldüğü gibi L/B oranları büyüdükçe, PAH’ların, fiberin gözeneklerinden geçmesi zorlaşacaktır. Aynı molekül ağırlıklı PAH’ların zenginleştirme faktörlerinde, L/B oranlarının etkili bir parametre olduğu söylenebilir. Bu etki BbF–BaP ve floranten-piren çiftlerinin zenginleştirme faktörlerinde görülmektedir (Çizelge 4.1).

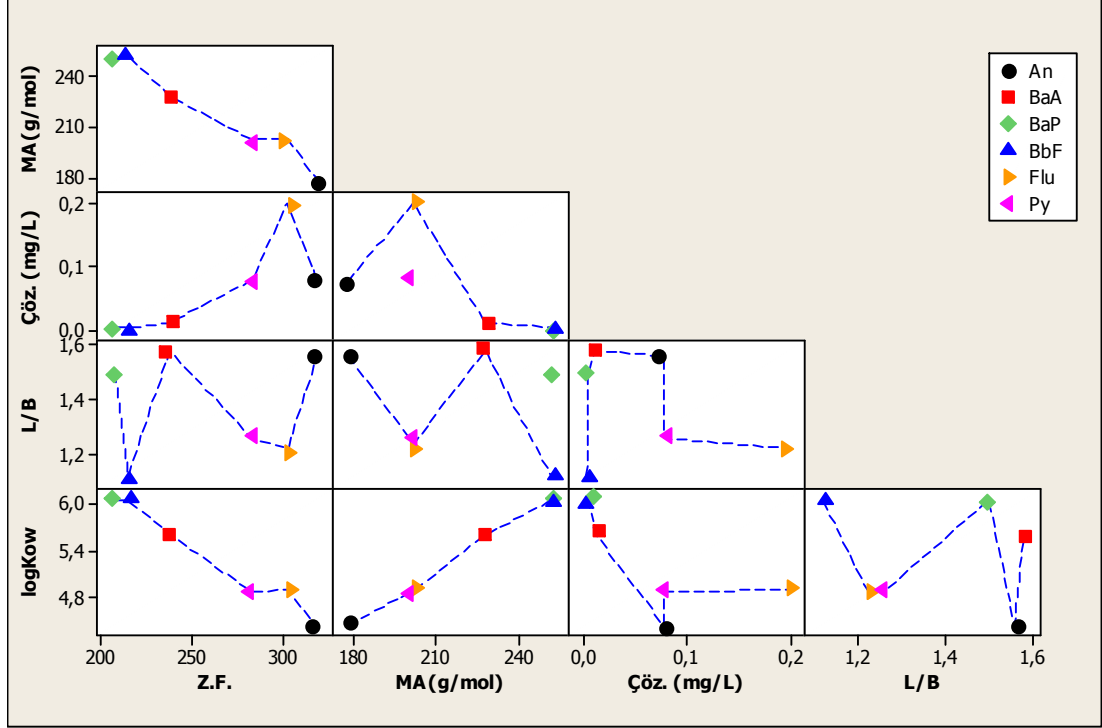


Şekil 4.2. PAH’ların L/B Oranına Göre Zenginleştirme Faktörleri

PAH’ların bu dört farklı özelliğinin, Z.F. ve geri alınabilirlik yüzdelerine etkisini tek tek yorumlamak yerine her farklı özelliği birer parametre kabul ederek, birbirleri ve Z.F. ile ilişkilerini dağılma diyagramında gösterebiliriz. Minitab paket programı ile çizilen diyagramda ve Pearson korelasyon matrisinde bazı parametre çiftleri arasında korelasyon olduğu görülmektedir. Diyagram ve korelasyon matrisi, Şekil 4.3 ve Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Çizelge 4.2’de, zenginleştirme faktörleri ile, molekül ağırlığı ve log K_{ow} değerleri arasında, negatif yönde, yüksek bir korelasyon olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.2. Çizelge 4.1'deki Parametrelerin Korelasyon Matrisi

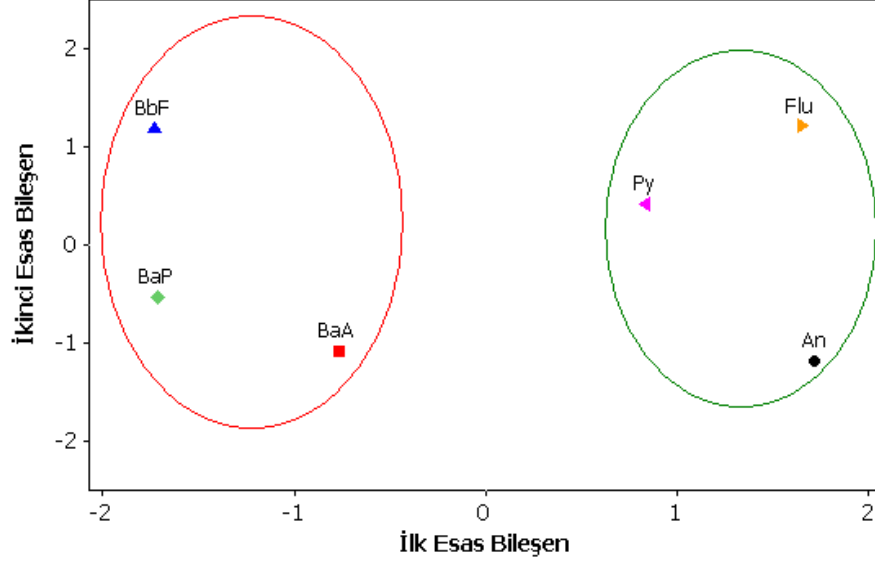
	Z.F.	MA (g/mol)	Çöz. (mg/L)	L/B
MA (g/mol)	-0.982			
Çöz. (mg/L)	0.781	-0.661		
L/B	0.045	-0.184	-0.306	
logKow	-0.988	0.997	-0.694	-0.116



Şekil 4.3. Çizelge 4.1'deki Parametrelerin Draftsman Grafiği

Çoğunlukla, parametreler arasında bir miktar korelasyon olduğu durumlarda, Esas Bileşen Analizi (PCA) uygulanıp parametrelerin sayısı azaltılarak, deney sonuçları daha kolay değerlendirilebilir bir forma getirilir [134,135]. PCA analizi, orjinal değişkenin (parametre) varyans yapısını daha az sayıda ve bu değişkenlerin doğrusal bileşenleri olan yeni değişkenlerle ifade etme yöntemidir. PAH'ların dört farklı özelliği (M_A , çözünürlük, L/B, $\log K_{ow}$) dikkate alınarak, PCA analizi uygulanmış ve ilk iki esas bileşen değerleri Şekil 4.4'deki grafikte gösterilmiştir. Şekil 4.4'te görüldüğü gibi An, Flu, Py ve BaA, BbF, BaP iki ayrı grup oluşturmaktadır. Çizelge 4.1'de

grupların ortalama zenginleştirme faktörlerinin sırası ile 220 ve 302 olduğu görülmekte ve bu değerler gruplandırmayı doğrulamaktadır.



Şekil 4.4. Çizelge 4.1.'deki Parametrelerin İlk Esas Bileşen Değerleri

KAYNAKLAR

- [1] Anonim, Tütün Hakkında, Wikipedia Özgür Ansiklopedi, <http://www.tr.wikipedia.org/> (Erişim tarihi: 15.07.2010)
- [2] Anonim, Tütün Hakkında, British American Tobacco, Türkiye, <http://www.bat.com.tr/> (Erişim tarihi: 15.07.2010)
- [3] Doll, R., Evolution of knowledge of the smoking epidemic. Tobacco History. Tobacco and Public Health: Science and Policy. 3-16. Ed: P. Boyle. Oxford University Pres. New York, 2004.
- [4] Brunnemann, K.D., Cox, J.E., Hoffmann, D. Analysis of tobacco specific N-nitrosamines in indoor air. *Carcinogenesis*, 13: 2415–2418, 1992.
- [5] World Health Organization (WHO), International Agency For Research On Cancer (IARC), Smokeless Tobacco and Some Tobacco-specific N-Nitrosamines. 55-57. Volume: 89 Lyon, 2007.
- [6] Anonim, Tobacco Research, British American Tobacco, <http://www.bat.com/> (Erişim tarihi: 15.07.2010)
- [7] Kozlowski, L.T., O'Connor, R.J., Dealing with health fears: Cigarette advertising in the United States in the twentieth century. Tobacco History. Tobacco and Public Health: Science and Policy. 37-50. Ed: P. Boyle. Oxford University Pres. New York, 2004.
- [8] Hoffmann, I., Hoffmann, D., The changing cigarette: Chemical studies and bioassays. Tobacco Composition. Tobacco and Public Health: Science and Policy. 53-92. Ed: P. Boyle. Oxford University Pres. New York, 2004.
- [9] National Cancer Institute, Smoking and Health Program. Toward less hazardous cigarettes. Third set of experimental cigarettes. DHEW Publ. No. (NIH) 77–1280, 1977.
- [10] Hoffmann, D., Hoffmann, I., El-Bayoumy, K., The less harmful cigarette: A controversial issue. A tribute to Ernst L Wynder. *Chemical Research in Toxicology* 14: 767–790, 2001.
- [11] Shihadeh, A., Saleh, R., Polycyclic aromatic hydrocarbons, carbon monoxide, “tar”, and nicotine in the mainstream smoke aerosol of the

- narghile water pipe. *Food and Chemical Toxic.* 43: 655–661, 2005.
- [12] Gaworski, C.L., Dozier, M.M., Eldridge, S.R., Morrissey, R., Rajendran, N., Gerhart, J.M., Cigarette smoke vapor-phase effects on the rat upper respiratory tract. *Inhal. Toxicol.* 10: 857–873, 1998.
- [13] Norman, V., An overview of the vapor phase, semivolatile and nonvolatile components of cigarette smoke. *Rec. Adv. Tob. Sci.* 3: 28–58, 1977.
- [14] Adam, T., McAughey, J., Mocker, C., McGrath, C., Zimmermann, R., Influence of filter ventilation on the chemical composition of cigarette mainstream smoke. *Anal. Chim. Acta* 657: 36–44, 2010.
- [15] Goodman J., *Tobacco In History. The cultures of dependence.* 2-16. Routledge Pres. London, 1993.
- [16] Hecht, S.S., Tobacco smoke carcinogens: Human uptake and DNA interactions. *Tobacco Composition. Tobacco and Public Health: Science and Policy.* 93-125. Ed: P. Boyle. Oxford University Pres. New York, 2004.
- [17] Zhang, J.L.G., Li, X.D., Qi, S.H., Liu, G.Q., Peng, X.Z., Source seasonality of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in subtropical city, Guangzhou, South China. *Science of the Total Environment* 355: 145-155, 2006.
- [18] Wcisło, E., Soil Contamination with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Poland - a Review. *Polish Journal of Environmental Studies* 7 (5): 267-272, 1998.
- [19] Wang, X.Y., Li, Q.B., Luo, Y.M., Ding, Q., Xi, L.M., Ma, J.M., Li, Y., Liu, Y.P., Cheng, C.L., Characteristics and sources of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Shanghai, China. *Environ. Monit. Assess* 165: 295–305, 2010.
- [20] Vardar, N., Tasdemir, Y., Odabası, M., Noll, K. Characterization of Atmospheric Concentrations and Partitioning of PAHs in the Chicago Atmosphere. *Science of the Total Environment* 327: 163-174, 2004.
- [21] Perry, R., Baek, S.O., Field, R.A., Goldstone, M.E., Kirk, P.W., Lester, J.N., A Review of Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Fate and Behavior. *Water, Air and Soil*

- Pollution 60: 279-300, 1991.
- [22] WHO, World Health Organisation, Environmental Health Criteria 202, Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. IPCS, International Programme on Chemical Safety. World Health Organisation, Geneva. 1998.
- [23] Re N-Poppi, N., Santiago-Silva, M., Polycyclic aromatic hydrocarbons and other selected organic compounds in ambient air of Campo Grande City, Brazil. *Atmospheric Environment* 39: 2839-2850, 2005.
- [24] Lee, S.C., Ho, K.F., Chan, L.Y., Zielinska, B., Chow, J.C., Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Carbonyl Compounds in Urban Atmosphere of Hong Kong. *Atmospheric Environment*, 35: 5949-5960, 2001.
- [25] Garban, B., Blanchoud, H., Motelay-Massei, A., Chevreuil, M., Ollivon, D., Atmospheric Bulk Deposition of PAH's Onto France: Trends From Urban to Remote Sites. *Atmospheric Environment*, 36: 5395-5403, 2002.
- [26] Dabestani, R., Ivanov, I.N., A complication of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Photochemistry and Photobiology* 70, (1), 10-34, 1999.
- [27] Danyi, S., Bose, F., Brasseur, C., Schneider, Y.J., Larondelle, Y., Pussemier, L., Diğerleri., Analysis of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons in food supplements using high performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet, diode array or fluorescence detector. *Anal. Chim. Acta* 633: 293-699, 2009.
- [28] Wenzl, T., Simon, R., Anklam, E., Kleiner, J., Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. *Trends Anal. Chem.* 25 (7): 716-725, 2006.
- [29] Ferrarese, E., Andreottola, G., Oprea, I.A., Remediation of PAH contaminated sediments by chemical oxidation. *J. Hazard. Mater.* 152: 128-39, 2008.
- [30] Phillips, D.H., Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat.*

Res. 443: 139–147, 1999.

- [31] Bartos, T., Cupr, P., Klánová, J., Holoubek, I., Which compounds contributed most to elevated airborne exposure and corresponding health risks in the Western Balkans. *Environ. Int.* 35: 1066–1071, 2009.
- [32] Zhang, P., Song, J., Yuan, H., Persistent organic pollutant residues in the sediments and mollusks from the Bohai Sea coastal areas, North China: an overview. *Environ. Int.* 35: 632–646, 2009.
- [33] Nieva-Cano, M.J., Rubio-Barosso, S., Santos-Delgado, M.J., Determination of PAH in food samples by HPLC with fluorimetric detection following sonication extraction without sample clean-up. *Analyst* 126: 1326–1331, 2001.
- [34] Tsai, P.J., Shieh, H.Y., Lee, W.J., Lai, S.O., Characterization of PAHs in the atmosphere of carbon black manufacturing workplaces. *J. Hazard. Mater.* (26) 91: 25–42, 2002.
- [35] Liang, H-D., Han, D-M., Yan, X-P., Cigarette filter as sorbent for on-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *J. Chromatogr. A* 1103: 9–14, 2006.
- [36] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Atlanta (GA): U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 1995.
- [37] Moret, S., Purcaro, G., Conte, S.L., Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) levels in propolis and propolis-based dietary supplements from the Italian market. *Food Chemistry* 122: 333–338, 2010.
- [38] Martorell, I., Perelló, G., Martí-Cid, R., Castell, V., Juan M. Llobet, J.M., Domingo, J.L., Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in foods and estimated PAH intake by the population of Catalonia, Spain: Temporal trend. *Environ. Int.* 36: 424–432, 2010.
- [39] US Environmental Protection Agency (EPA), Compendium Method TO-13A, Cincinnati, OH, USA, 1999.

- [40] Douben, P.E.T., PAHs: An Ecotoxicological Perspective. Introduction. 1–6. Ed: P.E.T Douben Wiley, 2003.
- [41] Marcè R.M., Borrull, F., Solid Phase extraction of polycyclic aromatic compounds, *J. Chromatogr. A* 885: 273–290, 2000.
- [42] Martinez, E., Gros, M., Lacorte, S., Barcelo, D., Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediments and mussels. *J. Chromatogr. A* 1047:181–188, 2004.
- [43] Bjorseth, A., Ramdahl, T., Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Volume 2: Emission Sources and Recent Progress in Analytical Chemistry Science, 1985.
- [44] Radecki, A., Lamparczyk, H., Kaliszan, R., A Relationship Between the Retention Indices on Nematic and Isotropic Phases and the Shape of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Chromatographia*. 12: 595–599, 1979.
- [45] Varnamkhasti, A.K, Eghtesadi-Araghi, P., Negarestan, H., Ranaci-Siadat, O., Maghsoudlou, A., The Role of Three Dimensional Geometric Descriptors of Selected PAHs on Inducing Mortality in Juvenile Angel Fish (*Pterophyllum scalare*). *Journal of Biological Sciences* 8: 314–320, 2008.
- [46] Wise, S.A., Bonnett, W.J., Guenther, F.R., May, W.E., A Relationship Between Reversed Phase C18 Liquid Chromatographic Retention and the Shape of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *J. Chromatogr. Sci.*, 19: 457–465, 1981.
- [47] Sander, L.C., Wise, S.A., Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Structure Index. United States Department of Commerce Technology Administration National Institute of Standards and Technology (NIST) Special Publication 922, 1997.
- [48] Naegeli, H. Geacintov, N.E., Carcinogenic Effects Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Mechanisms of Repair of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced DNA Damage. 211–258. Ed: A. Luch. Imperial College Pres. USA, 2005.
- [49] Harold, H., Hart, D.J., Craine, L.E., Organic chemistry, Ninth Ed,

- Palmer, New Jersey, 1998. Çeviri Ed. Tahsin Uyar, Ankara, 1998.
- [50] Luch, A., Baird, W.M., Carcinogenic Effects Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Metabolic Activation and Detoxification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. 19–96. Ed: A. Luch. Imperial College Pres. USA, 2005.
- [51] Akcha, F., Burgeot, T., Narbonne, J.F., Garrigues, P., PAHs: An Ecotoxicological Perspective. Metabolic Activation of PAHs: Role of DNA Adduct Formation in Induced Carcinogenesis. 65–79 Ed: P.E.T Douben Wiley, 2003.
- [52] Chen, S., C., Liao, C., M., Health risk assesment on human exposed to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons pollution sources. Science of the Total Environment 366: 112–123, 2006.
- [53] Platt, K.L., Pfeiffer, E., Petrovic, P., Friesel, H., Beermann, D., Hecker, E., Oesch, F., Comparative tumorigenicity of picene and dibenz[a,h]anthracene in the mouse. Carcinog. 11: 1721–1726 1990.
- [54] Busby, W.F., Stevens, E.K., Martin C.N., Chow, F.L., Garner, R.C., Comparative lung tumorigenicity of parent and mononitro-polynuclear aromatic hydrocarbons in the BLU:Ha newborn mouse assay. Toxicology and Applied Pharmacology 99: 555–563 1989.
- [55] Imaida, K., Uneyama, C., Ogasawara, H., Hayashi, S., Fukuhara, K., Miyata, N., Takahashi, M., Induction of colon adenocarcinomas in CD rats and lung adenomas in ICR mice by 6-nitrochrysene: comparison of carcinogenicity and aryl hydrocarbon hydroxylase induction in the target organs of each species. Cancer research 52: 1542-1545 1992.
- [56] Rice, J.M., Ward, J.M., Age dependence of susceptibility to carcinogenesis in the nervous system. Ann. N. Y. Acad. Sci. 381: 274–289, 1982.
- [57] Vesselinovitch, S.C., Kandala D.R., Mihailovich N., Neoplastic response of mouse tissues during perinatal age periods and its significance in chemical carcinogenesis. J. Natl. Cancer Inst Monogr. 51: 230–250, 1975.
- [58] Soyka, L.F., Hepatic drug metabolizing enzyme activity and tumorigenesis in mice following perinatal exposure to

- benzo[a]pyrene. *Pediatr. Pharmacol.* 1: 85–96, 1980.
- [59] Aygün, S.F., Özcimder, M., A comparison of normal (-CN) and reversed (C-18) phase chromatographic behaviour of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Turkish J. Of Chem.* 20: 269–275, 1996.
- [60] Demirci, A., Özcimder, M., *Gaz ve Sıvı Kromatografileri*. Bilim Yayıncılık, Ankara, 2004.
- [61] Demirci, A., Özcimder, M., *Kromatografik Yöntemler*. Kuban Matbaacılık Yayıncılık, Ankara, 2009.
- [62] Demirci, A., Özcimder, M., *Kimyada Ayırma Yöntemleri*. Kuban Matbaacılık Yayıncılık, Ankara, 2008.
- [63] Sarafraz-Yazdi, A., Amiri, A., Liquid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*. 29 (1): 1–14, 2010.
- [64] Olariu, R-I., Vione, D., Grinberg, N., Arsene, C., Sample preparation for trace analysis by chromatographic methods. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 33: 1174–1207, 2010.
- [65] Dadfarnia, S., Shabani, A.M.H., Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals—A review. *Anal. Chim. Acta*. 658: 107–119, 2010.
- [66] Frazey, P.A., Barkley, R.M., Sievers, R.E., Solid-phase microextraction with temperature programmed desorption for the analysis of iodination disinfection byproducts. *Analytical Chemistry* 70: 638–644, 1998.
- [67] Arthur, C.L., Pawliszyn, J., Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry* 62: 2145–2148, 1990.
- [68] Dietz, C., Sanz, J., C´amara C., Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques. *J. Chromatogr. A* 1103: 183–192, 2006.
- [69] Malik, A. K., Kaur, V., Verma, N., A review on solid phase microextraction—High performance liquid chromatography as a novel tool for the analysis of toxic metal ions. *Talanta* 68: 842–849, 2006.
- [70] Fuster S., Beltran J., Lopez F.J., Hernandez F.. Application of solid phase microextraction for the determination of soil fumigants in water

- and soil samples. *J. Sep. Sci.* 28: 98–103, 2005.
- [71] Aulakh, J.S., Malik, A.K., Mahajan, R.K., Solid phase microextraction high pressure liquid chromatographic determination of Nabam, Thiram and Azamethiphos in water samples with UV detection: preliminary data. *Talanta* 66: 266–270, 2005.
- [72] Dong, C.Z., Zeng, Z.R., Yang, M., Determination of organochlorine pesticides and their derivations in water after HS-SPME using polymethylphenylvinylsiloxane coated fiber by GG-ECD. *Water Res.* 39: 4204–4210, 2005.
- [73] Rodriguez, R., Manes, J., Pico, Y., Off-line solid phase microextraction and capillary electrophoresis mass spectrometry to determine acidic pesticides in fruits. *Analytical Chemistry* 75: 452–459, 2003.
- [74] Sanchez-Ortega, A., Sampedro, M.C., Unceta, N., Goicolea, M.A., Barrio, R.J., Solid-phase micro-extraction coupled with high performance liquid chromatography using on-line diode-array and electrochemical detection for the determination of fenitrothion and its main metabolites in environmental water samples. *J. Chromatogr A* 1094: 70–76, 2005.
- [75] Picó, Y., Fernández, M., Ruiz, M.J., Font, G., Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70: 117–131, 2007.
- [76] Zygmunt, B., Jastrzebska, A., Namiesnik, J., Solid phase microextraction - A convenient tool for the determination of organic pollutants in environmental matrices *J. Crit. Rev. Anal. Chem.* (1) 31: 1–18, 2001.
- [77] Kataoka, H., Lord, H. L., Pawliszyn, J., Applications of solid phase microextraction in food analysis *J. Chromatogr. A* 880: 35–62, 2000.
- [78] Pawliszyn, J., New directions in sample preparation for analysis of organic-compounds *Trends Anal. Chem.* 14: 113–122, 1995.
- [79] Mester, Z., Sturgeon, R., Trace element speciation using solid phase microextraction. *Spectrochimica Acta Part B.* 60: 1243 – 1269, 2005.

- [80] Hyötyläinen, T., Riekkola, M-R., Sorbent- and liquid-phase microextraction techniques and membrane-assisted extraction in combination with gas chromatographic analysis: A review. *Anal. Chim. Acta* 614: 27–37, 2008.
- [81] Kumar, A., Gaurav, Malik, A.K., Tewary, D.K., Singh, . B., A review on development of solid phase microextraction fibers by sol-gel methods and their applications. *Anal. Chim. Acta* 610: 1–14 2008.
- [82] Psillakis, E., Kalogerakis, N., Solid-phase microextraction versus single-drop microextraction for the analysis of nitroaromatic explosives in water samples. *J. Chromatogr. A* 938: 113–120, 2001.
- [83] Psillakis, E., Kalogerakis, N., Hollow-fibre liquid-phase microextraction of phthalate esters from water. *J. Chromatogr. A* 999: 145-153, 2003.
- [84] Baltussen, E., Sandra, P., David, F., Cramers, C., Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. *J. Microcolumn Sep.* 11: 737–747, 1999.
- [85] MacNamaraa, K., Leardi, R., McGuigana, F., Comprehensive investigation and optimisation of the main experimental variables in stir-bar sorptive extraction (SBSE)-thermal desorption-capillary gas chromatography (TD-CGC). *Anal. Chim. Acta.* 636: 190–197, 2009.
- [86] Baltussen, E., Cramers, C.A., Sandra, P.J.F., Sorptive sample preparation — a review. *Anal. Bioana. Chem.* 373: 3–22, 2002.
- [87] David, F., Sandra, P., Stir bar sorptive extraction for trace analysis. *J. Chromatogr. A*1152: 54–69, 2007.
- [88] Prietoa, A., Basauria, O., Rodilb, R., Usobiagaa, A., Fernández, L.A., Etxebarriaa, N., Zuloaga, O., Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. *J. Chromatogr. A* 1217: 2642–2666, 2010.
- [89] Kawaguchi, M., Ito, R., Saito, K., Nakazawa, H., Novel stir bar sorptive extraction methods for environmental and biomedical analysis. *J. Pharm. and Biomedical Analysis* 40: 500–508, 2006.
- [90] Dieza, J., Dominguez, C., Guillen Rafael Veasa, D.A., Barroso, C.G.,

- Optimization of stir bar sorptive extraction for the analysis of volatile phenols in wines. *J. Chromatogr. A* 1025: 263–267, 2004.
- [91] Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E., Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. *J. Chromatogr. A* 1184: 132–142, 2008.
- [92] Jeannot, M.A., Cantwell, F.F., Mass transfer characteristics of solvent extraction into a single drop at the tip of a syringe needle. *Analytical Chemistry* 69: 235–239, 1997.
- [93] He, Y., Lee, H.K., Liquid phase microextraction in a single drop of organic solvent by using a conventional microsyringe. *Analytical Chemistry* 69: 4634–4640, 1997.
- [94] Hou, L., Lee, H.K., Application of static and dynamic liquid-phase microextraction in the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Chromatogr. A* 976: 377–385, 2002.
- [95] Myung, S.W., Yoon, S.H., Kim, M., Analysis of benzene ethylamine derivatives in urine using the programmable dynamic liquid-phase microextraction (LPME) device. *Analyst* 28: 1443–1446, 2003.
- [96] Theis, A.L., Waldack, A.J., Hansen, S.M., Jeannot, M.A., Headspace solvent microextraction. *Analytical Chemistry* 73: 5651–5654, 2001.
- [97] Xu, L., Basheer, C., Lee, H.K., Developments in single-drop microextraction. *J. Chromatogr. A* 1152: 184–192, 2007.
- [98] Ma, M.H., Cantwell, F.F., Solvent microextraction with simultaneous back-extraction for sample cleanup and preconcentration: Preconcentration into a single microdrop. *Analytical Chemistry* 71: 388–393, 1999.
- [99] Liu, W.P., Lee, H.K., Continuous-flow microextraction exceeding 1000-fold concentration of dilute analytes. *Analytical Chemistry*. 72: 4462–4467, 2000.
- [100] Xia, L., Hu, B., Jiang, Z., Wu, Y., Li, L., Chen, R., 8-Hydroxyquinoline-chloroform single drop microextraction and electrothermal vaporization ICP-MS for the fractionation of aluminium in natural waters and drinks. *J. Anal. At. Spect.* 20: 441–446, 2005.

- [101] Xia, L., Hu, B., Jiang, Z., Wu, Y., Liang, Y., Single-drop microextraction combined with low-temperature electrothermal vaporization ICPMS for the determination of trace Be, Co, Pd, and Cd in biological samples. *Analytical Chemistry* 76: 2910–2915, 2004.
- [102] Chamsaz, M., Arbad-Zavar, M.H., Nazari, S., Determination of arsenic by electrothermal atomic absorption spectrometry using headspace liquid phase microextraction after in situ hydride generation. *J. Anal. At. Spectrom.* 18: 1279–1282, 2003.
- [103] Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseini, M.R.M., Aghaee, E., Ahmadi, F., Berijani, S., Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J. Chromatogr. A* 1116: 1–9, 2006.
- [104] Pena-Pereira, F., Lavilla, I., Bendicho, C., Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review. *Spectrochim. Acta, Part B* 64: 1–15, 2009.
- [105] Kozani, R.R., Assadi, Y., Shemirani, F., Hosseini, M.R.M., Jamali, M.R., Part-per-trillion determination of chlorobenzenes in water using dispersive liquid-liquid microextraction combined gas chromatography-electron capture detection. *Talanta* 72: 387–393, 2007.
- [106] Lu, Y., Lin, Q., Luo, G., Dai, Y., Directly suspended droplet microextraction. *Anal. Chim. Acta* 566: 259–264, 2006.
- [107] Khalili Zanjani, M.R., Yamini, Y., Shariati, S., Jonsson, J.A., A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop. *Anal. Chim. Acta* 585: 286–293, 2007.
- [108] Dadfarnia, S., Salmanzadeh, A.M., Haji Shabani, A.M., A novel separation/preconcentration system based on solidification of floating organic drop microextraction for determination of lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 633: 163–167, 2008.
- [109] Leong, M.I., Huang, S.D., Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with

- gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. A* 1211: 8–12, 2008.
- [110] Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E., Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* 71: 2650–2656, 1999.
- [111] Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E., Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid–liquid extraction. *J. Chromatogr. A* 1184: 132–142, 2008.
- [112] De Jager, L.S., Andrews, A.R.J., Preliminary studies of a fast screening method for cocaine and cocaine metabolites in urine using hollow fibre membrane solvent microextraction (HFMSME). *Analyst* 126: 1298–1303, 2001.
- [113] Psillakis, E., Kalogerakis, N., Developments in liquid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.* (22) 10: 565–574, 2003.
- [114] Rasmussen, K.E., Pedersen-Bjergaard, S., Developments in hollow fibre based, liquid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.* (23) 1: 1–10, 2004.
- [115] Ho, T.S., Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E., Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction - Comparison with conventional liquid-liquid extraction. *J. Chromatogr. A* 963: 3-17, 2002.
- [116] Hou, L., Shen, G., Lee, H.K., Automated hollow fiber-protected dynamic liquid-phase microextraction of pesticides for gas chromatography - Mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr. A* 985: 107–116, 2003.
- [117] Shen, G., Lee, H.K., Hollow fiber-protected liquid-phase microextraction of triazine herbicides. *Analytical Chemistry* 74: 648–654, 2002.
- [118] Zanjani, M.R.K., Yamini, Y., Shariati, S., Joˆnsson, J.A., A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop. *Anal. Chim. Acta* 585: 286–293, 2007.
- [119] Ratola, N., Alvesa, A., Kalogerakisb, N., Psillakis, E., Hollow-fibre

- liquid-phase microextraction: A simple and fast cleanup step used for PAHs determination in pine needles. *Anal. Chim. Acta.* 618: 70–78, 2008.
- [120] Basheera, C., Alnedharyb, A.A., Raob, B.S.M., Balasubramanianc, R., Leea, H.K., Ionic liquid supported three-phase liquid–liquid–liquid microextraction as a sample preparation technique for aliphatic and aromatic hydrocarbons prior to gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1210: 19–24, 2008.
- [121] Jiang, X., Basheer, C., Zhang, J., Lee, H.K., Dynamic hollow fiber-supported headspace liquid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A* 1087: 289–294, 2005.
- [122] Charalabaki, M., Psillakis, E., Mantzavinos, D., Kalogerakis, N., Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater treatment plant effluents using hollow fibre liquid-phase microextraction. *Chemosphere* 60: 690–698, 2005.
- [123] Basheer, C., Rajasekhar Balasubramanian, R., Lee, H.K., Determination of organic micropollutants in rainwater using hollow fiber membrane/liquid-phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1016: 11–20, 2003.
- [124] Melwanki, M.B., Huang, S-D., Extraction of hydroxyaromatic compounds in river water by liquid–liquid–liquid microextraction with automated movement of the acceptor and the donor phase. *J. Sep. Sci.* 29: 2078 – 2084, 2006.
- [125] Aygün, F., Demirci, A., Özcimder, M., Liquid chromatographic method for the determination of benzo[a]pyrene in filter tar of Turkish cigarettes. *J. Agric. Food Chem.* 44:1488-1490, 1996.
- [126] Aygün, Ş.F., Determination of some polycyclic aromatic hydrocarbons in filter tar of Turkish cigarettes. *J. Sep. Sci.* 28: 2370–2373, 2005.
- [127] Demirci, A., Yüksek Basınç Sıvı Kromatografi (HPLC) İle Sigara İzmaritinde Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların (PAH) Tayininde Karşılaşılan Problemler Üzerine Bir Çalışma. Doktora Tezi. Ondokuz

Mayıs Üniversitesi, Samsun, 2002.

- [128] Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E., Liquid-phase microextraction utilising plant oils as intermediate extraction medium – Towards elimination of synthetic organic solvents in sample preparation. *J. Sep. Sci.* 27: 1511–1516, 2004.
- [129] Halvorsen, T.G., Pedersen-Bjergaard, S., Reubsaet, J.L.E., Rasmussen, K.E., Liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry. Extraction from small volumes of biological samples. *J. Sep. Sci.* 26: 1520–1526, 2003.
- [130] Halvorsen, T.G., Pedersen-Bjergaard, S., Reubsaet, J.L.E., Rasmussen, K.E., Liquid-phase microextraction combined with flow injection tandem mass spectrometry Rapid screening of amphetamines from biological matrices. *J. Sep. Sci.* 24: 615–622, 2001.
- [131] Gren, C.R., Conrad, F.W., Bridle, K.A., Borgerding, M.F., A Liquid Chromatography Procedure for Analysis of Nicotine on Cellulose Acetate Filters. *Beitrage zur Tabakforschung International* (1) 13: 11–16, 1985.
- [132] Moldoveanu, S.C., Solutions and challenges in sample preparation for chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 42: 1–14, 2004.
- [133] King, S., Meyer, S.J., Andrews, A.R.J., Screening method for polycyclic aromatic hydrocarbons in soil using hollow fiber membrane solvent microextraction. *J. Chromatogr. A* 982: 201–208. 2002.
- [134] Brereton, R.G., *Applied Chemometrics for Scientists*, John Wiley & Sons, Ltd. 2007.
- [135] Mathews, P. G., *Design of Experiments with Minitab*, ASQ Quality Press, Milwaukee, Wisconsin, 2004.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Erol ALVER

Doğum Tarihi :15.02.1977

Yabancı Dil :İngilizce

Eğitim Durumu :

Lisans :Niğde Üniversitesi Fen–Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü (1995 – 1999)

Yüksek Lisans :Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı (2002 – 2005)

Çalıştığı Kurum ve Yıl :Kırıkkale Üniversitesi Fen–Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü (1999 – ……)