

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK SICAKLIKTA HAZIRLANMIŞ GIDALARDA ORGANİK
KANSEROJEN MADDELERİN HPLC-MS İLE TAYİNİ**

Muharrem İNCE

**Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Mehmet YAMAN**

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

ELAZIĞ - 2008

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK SICAKLIKTA HAZIRLANMIŞ GIDALARDA ORGANİK
KANSEROJEN MADDELERİN HPLC-MS İLE TAYİNİ

Hazırlayan
Muharrem İNCE

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Mehmet YAMAN

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI

SON RAPOR

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (FÜBAP) tarafından desteklenmiştir. (FÜBAP Proje No:1533)

ELAZIĞ – 2008

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK SICAKLIKTAKİ HAZIRLANMIŞ GIDALARDA ORGANİK
KANSEROJEN MADDELERİN HPLC-MS İLE TAYİNİ

Muharrem İNCE

Doktora Tezi
Kimya Ana Bilim Dalı

Bu tez, Tarihinde, Aşağıda Belirtilen Jüri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Başarılı/Başarısız Olarak Değerlendirilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Mehmet YAMAN

Üye:

Üye:

Üye:

Üye:

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

TEŐEKKÖR

Bu çalışmada beni yönlendiren, çalışmalarım süresince büyük ilgi ve anlayışını esirgemeyen ve her konuda yardımcı olan Sayın Hocam Prof. Dr. Mehmet YAMAN' a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarımın her aşamasında bana katkıda bulunan, benimle özverili şekilde çalışan ve sonuçların analizinde yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Olcay KAPLAN' a, çalışmalarımın yazılması ve baskısında büyük emekleri geçen Cemile ÖZCAN, Nagihan Mehpare KARAASLAN, İrfan TİM R ve Tuğrul ÇALIK' a teőekkürü bir borç bilirim.

Araştırmalarım sırasında bana her türlü desteği veren, çalışmalarım süresince göstermiş oldukları sabır ve bana verdikleri moral için ailemin bütün bireylerine bütün içtenliğimle teőekk r ederim.

MUHARREM İNCE

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	V
TABLOLAR LİSTESİ.....	VII
KISALTMALAR.....	VIII
ÖZET.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar	3
2.1.1. Polisiklik aromatik hidrokarbonların kaynakları ve elde edilişi	3
2.1.2. PAH' ların canlılar üzerindeki etkileri	4
2.1.3. PAH' ların kanserojen etkilerinin değerlendirilmesi.....	9
2.1.4. PAH bileşiklerinden Antrasen ve özellikleri	18
2.1.4.1. Antrasenin Reaksiyonları.....	18
2.1.4.2. Antrasenin Toksisitesi	19
2.1.5. Benzo[a]antrasen ve özellikleri	20
2.1.6. Benzo[a]piren ve özellikleri	21
2.1.6.1. Benzo[a]piren Kaynakları	21
2.1.6.2. Benzo[a]pirenin Toksisitesi	21
2.1.6.3. Benzo[a]pirenin DNA ile Etkileşimi	22
2.1.7. Piren ve özellikleri	24
2.2. Literatürde PAH' lar ile İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar	26
3. ÖRNEKLERİN EKSTRAKSİYONU VE ANALİZ METODLARI	34
3.1. Örneklerin Ekstraksiyonu	34
3.1.1. Katı Faz Ekstraksiyonu Metodu ve Genel Özellikleri	35
3.1.2. SPE Metodunda Maddelerin Ayrılma Prensipleri	36
3.1.3. SPE Metodunun Avantajları	37
3.2. Kromatografi ile Ayırma	38
3.2.1. Kromatografide Sınıflandırma	39
3.2.1.5. İki Fazın Fiziksel Şekline Göre Sınıflandırma	39
3.2.2. Sıvı Kromatografi	39
3.2.2.1. Sıvı Kromatografinin Sınıflandırılması	39

3.2.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	43
3.2.3.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı	43
3.2.3.2.1. Pompa Sistemleri	45
3.2.3.2.2. Numune Enjeksiyon Sistemleri	46
3.2.3.2.3. Yüksek performanslı Sıvı Kromatografisi Kolonları	46
3.2.3.2.3.1. Kolon Dolgu Maddelerinin Tipleri	47
3.2.3.2.4. Dedektörler	47
3.3. Kütle Spektrometrisi	48
3.3.1. Moleküler kütle spektrometride iyon kaynakları	48
3.3.1.1. Gaz Fazı İyonlaştırma Kaynakları	49
3.3.1.1.1. Elektron İmpakt Kaynağı	49
3.3.1.1.2. Kimyasal İyonlaştırma Kaynakları	51
3.3.1.1.3. Alan İyonlaştırma Kaynakları	51
3.3.1.2. Desorpsiyon Kaynakları	52
3.3.1.2.1. Alan Desorpsiyon Kaynakları	52
3.3.1.2.2. Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyonu/İyonlaştırma	53
3.3.1.2.3. Elektrosprey İyonlaştırma	53
3.3.1.2.4. Hızlı Atom Bombardıman Kaynakları	53
3.3.2. Kütle Ayırıcıları	53
3.3.3. Kütle Spektrumlarının Karşılaştırılması ile Bileşiğin Tespit Edilmesi	56
3.3.4. Moleküler Kütle Spektrometrisinin Uygulamaları	60
4.MATERYAL ve METOT	62
4.1.Kullanılan Cihazlar ve Cam Malzemeler	62
4.2. Kullanılan Standart Çözeltiler ve Reaktiflerin Hazırlanması	62
4.3. PAH' ların Tayininde HPLC-MS' in Koşullarının Optimizasyon Çalışmaları	63
4.3.1. Antrasen için Optimum Koşullarının Tayini	63
4.3.2. Benzo[a]antrasen için Optimum Koşullarının Tayini	69
4.3.3. Piren için Optimum Koşulların Tayini	78
4.3.4. Benzo[a]piren Optimum Koşullarının Tayini	84
4.4. Ölçümlerle ilgili elde edilen optimum şartlar	91
4.5. Örneklerin Analize Hazırlanması	92
4.6.Örneklerin Temini ve Ekstraksiyonu	94
4.7. Bulgular	95
4.7.1. Akış Hızı ile İlgili Bulunan Sonuçlar	95
4.7.2. Fragmenter ile İlgili Bulunan Sonuçlar	95

4.7.3. Enjeksiyon Hacmi ile İlgili Bulunan Sonuçlar	95
4.7.4. Kolon Sıcaklığı ile İlgili Bulunan Sonuçlar	95
4.8. Çalışılan Örneklerde bulunan PAH Konsantrasyonları	96
5.SONUÇ VE TARTIŞMA	100
KAYNAKLAR	102
ÖZGEÇMİŞ	108

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Polisiklik aromatik hidrokarbonların tipik bir gösterimi.....	13
Şekil 2.2. Hegza-peri-hegzabenzob[bc,ef,hi,kl,no,qr]coronen' den türetilen hegza-t-bütilin kristal yapısı.....	14
Şekil 2.3. Antrasenin molekül geometrisi.....	18
Şekil 2.4. Karsinojen benzo[a]pirenin diol-epoksit kimyasal yapısı.....	22
Şekil 2.5. Mutajen olan benzo[a]pirenin DNA ile etkileşimi	23
Şekil 2.6. Enzimatik reaksiyonlar sonucu dokularda piren diol-epoksit formu	24
Şekil 2.7. Labaratuar ortamında piren ile RNA etkileşmesi basamakları.....	25
Şekil 3.1. SPE kolonunun yapısı	35
Şekil 3.2. Analiz edilecek örneğin özelliğine göre seçilmesi gereken SPE ayırım tekniği	38
Şekil 3.3. Bir HPLC cihazı şeması	43
Şekil 3.4. Gradient elüsyon uyumlu bir HPLC cihazının şeması	44
Şekil 3.5. HPLC için bir pistonlu pompa	45
Şekil 3.6. Yüksek hızlı izokratik ayırma	39
Şekil 3.7. Elektron-impakt kaynağının yapısı	49
Şekil 3.8. Dekanol'ün (a) sert bir kaynakla ve (b) yumuşak bir kaynakla alınmış kütle spektrumları	50
Şekil 3.9. Glutamik asidin, a. Elektron impakt, b. Alan iyonlaştırma, c. Alan desorpsiyon yöntemi ile elde edilen spektrumları	52
Şekil 3.10. Dört kutuplu (Kuadropol) bir kütle ayırıcısı	56
Şekil 3.11. n-Heptanal'in elektron impakt spektrumu. Pikler C ₆ , C ₅ , .. C ₁ 'e kadar, CH ₂ eksilmeleriyle meydana gelen iyonların pikleridir	57
Şekil 4.1. Antrasenin optimum akış hızı tayini	63
Şekil 4.2. Antrasenin optimum fragmenter tayini	64
Şekil 4.3. Antrasenin optimum enjeksiyon hacmi tayini	65
Şekil 4.4. Antrasenin optimum kolon sıcaklığı tayini	66
Şekil 4.5. 5–10–25–50–100–250 ve 500 ppb antrasenin kromatogramları	67
Şekil 4.6. Antrasenin kalibrasyon eğrisi	68
Şekil 4.7. Benzo[a]antrasenin optimum akış hızı kromatogramları	69
Şekil 4.8. Benzo[a]antrasenin 50–70–90–110 fragmenterdeki kromatogramları	70
Şekil 4.9. Benzo[a]antrasenin 130-150-180-200 fragmenterdeki kromatogramları	71
Şekil 4.10. Benzo[a]antrasenin optimum enjeksiyon hacmi tayini	71
Şekil 4.11. Benzo[a]antrasenin kolon sıcaklığı tayini	72

Şekil 4.12. 5-10-25-50-100-250 ve 500 ppb benzo[a]antrasenin kromatogramları	73
Şekil 4.13. 5-10-25-50-100-250 ve 500 ppb benzo[a]antrasenin kromatogramlarının sinyal olarak gösterimi	74
Şekil 4.14. Benzo[a]antrasenin kalibrasyon eğrisi	75
Şekil 4.15. 500 ppb benzo[a]antrasenin MS spektrumu	76
Şekil 4.16. 250 ppb benzo[a]antrasenin MS spektrumu	76
Şekil 4.17. 100 ppb benzo[a]antrasenin MS spektrumu	77
Şekil 4.18. Piren için optimum akış hızı kromatogramları	78
Şekil 4.19. Piren için en iyi fragmenterin sinyal olarak gösterimi	79
Şekil 4.20. Piren için optimum enjeksiyon hacmi	79
Şekil 4.21. Piren için optimum kolon sıcaklığı tayini	80
Şekil 4.22. 5-10-25-50-100-250-500 ve 1000 ppb piren standartlarının optimum koşullarda kromatogramlarının görünümü	81
Şekil 4.23. Pirenin kalibrasyon eğrisi	82
Şekil 4.24. 1 ppm piren standartının MS spektrumu	83
Şekil 4.25. Benzo[a]piren için optimum fragmenter tayini	84
Şekil 4.26. Benzo[a]piren için optimum akış hızı tayini	85
Şekil 4.27. Benzo[a]piren için optimum enjeksiyon hacmi tayini	86
Şekil 4.28. Benzo[a]piren için optimum kolon sıcaklığı tayini	87
Şekil 4.29. Benzo[a]pirenin farklı konsantrasyonlardaki kromatogramları	88
Şekil 4.30. Benzo[a]pirenin kalibrasyon eğrisi	89
Şekil 4.31. 500 ppb benzo[a]piren nin MS spekturumu	90
Şekil 4.32. 250 ppb benzo[a]pirenin MS spekturumu	90
Şekil 4.33. 100 ppb benzo[a]pirenin MS spekturumu	91
Şekil 4.34. Örneklerin analize hazırlanması basamakları: A) Perklorik asit ile B) Asetik asit ile	92
Şekil 4.35. Örneklerin katı faz ekstraksiyonu yöntemiyle hazırlanması basamakları	93
Şekil 4.36. Örneklerin soğuk santrifüj yöntemi ile analize hazırlanma basamakları	94
Şekil 4.37. Kırmızı et ızgarasında benzo[a]antrasen tayini için; örnek, standart ve standart ilave edilmiş örneğin kromatogramları	97
Şekil 4.38. Kırmızı et ızgarasında benzo[a]antrasen tayini için; örneğin MS spektrumu	97
Şekil 4.40. Kırmızı et ızgarasında benzo[a]antrasen tayini için; standart ilave edilmiş örneğin MS spektrumu	98

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1. PAH' ların sağlık yönünden sınır değerleri	7
Tablo 2.2. Yaz aylarında doğada meydana gelen yangınlardan dolayı maruz kalınan PAH miktarı	7
Tablo 2.3. PAH' ların USEPA ve IARC tarafından öngörülen karsinojenik etkileri	8
Tablo 2.4. Bazı PAH' lar için gerçek etki değerleri	9
Tablo 2.5. Bazı PAH bileşikleri	15
Tablo 2.6. Antrasenin genel özellikleri	18
Tablo 2.7. Benzo[a]antrasenin genel özellikleri	20
Tablo 2.8. Benzo[a]pirenin genel özellikleri	21
Tablo 2.9. Pirenin genel özellikleri	24
Tablo 3.1. Moleküler kütle spektroskopide kullanılan iyon kaynakları	48
Tablo 3.2. Bir elektron impakt kaynağındaki bazı tipik reaksiyonlar	51
Tablo 3.3. Bazı LC/MS Ara Faz Sistemlerinin Karakteristikleri	59
Tablo 3.4. Moleküler Kütle Spektrometrinin Uygulamaları	60
Tablo 3.5. Gaz ve Sıvı Kromatografilerinin Karşılaştırılması	61
Tablo 4.1. PAH' ların optimum tayin koşulları	91
Tablo 4.2. MS parametreleri	92
Tablo 4.3. Normal pişirilen gıdalardaki PAH miktarları	99
Tablo 4.4. Yenilemeyecek kadar ızgarada pişirilen (kömürleşmiş) gıdalardaki PAH miktarları	99

KISALTMALAR

PAH: Polisiklik Aromatik Hidrokarbon

USEPA: Birleşmiş Milletler Çevre Koruma Derneği

HAA: Heterosiklik Aromatik Aminler

NOB: Nitroze Bileşikler

IARC: Uluslar arası Kanser Araştırma Merkezi

B[a]P: Benzo[a]piren

NIOSH: Ulusal Mesleki Koruma ve Sağlık Enstitüsü

NMR: Nükleer Magnetik Rezonans

AHR: Aril Hidrokarbon Reseptör

ARNT: Aril Hidrokarbon Çekirdeksel Yer Değiştirici Reseptör

HPLC-MS: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi

GC-MS: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi

FAB: Sürekli Akışlı Hızlı Atom Bombardmanı Sistemi

APCI: Atmosferik Basınçta Kimyasal İyonlaştırma Sistemi

HPLC-FD: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Floresans Dedektör

MAE: Ultrasonik Mikrodalga Yardımlı Ekstraksiyon

LOD: En Küçük Tayin Sınırı

LOQ: Belirleyebildiğimiz Minimum Madde Miktarı Değeri

SPE: Katı Faz Ekstraksiyonu

SCX: Kuvvetli Katyon Değiştirici

SAX: Kuvvetli Anyon Değiştirici

ÖZET

Doktora Tezi

YÜKSEK SICAKLIKTAKI HAZIRLANMIŞ GIDALARDA ORGANİK KANSEROJEN MADDELERİN HPLC-MS İLE TAYİNİ

Muharrem İnce

Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Ana Bilim Dalı
2008, Sayfa: X + 108

Polisiklik aromatik hidrokarbon bileşikleri (PAH); iki veya daha fazla benzen halkasının yüksek sıcaklıkta bağlanmasıyla oluşan bileşiklerdir.

Bu çalışmada, antrasen, benzo[*a*]antrasen, benzo[*a*]piren ve piren gibi PAH bileşiklerinin HPLC-MS ile nicel analizleri için, mobil faz akış hızı, enjeksiyon hacmi, kolon sıcaklığı ve parçalama gerilimi gibi faktörler optimize edildi. Optimize edilen şartlarda yukarıda adı geçen bileşiklerin yüksek sıcaklıkta hazırlanmış ızgara türü örneklerde tayinine uygulandı. Çeşitli ızgara ve benzeri örnekler, dört farklı ekstraksiyon yöntemi uygulanarak analize hazırlandı. Elde edilen sonuçlardan çalışılan PAH bileşiklerinin restoranlarda tüketime sunulan ızgaralarda ve çalışılan diğer örneklerdeki derişimlerinin pişirme kaynaklarına bağlı olup 10 ppb' yi geçmediği gözlemlendi. Yenilemeyecek kadar aşırı pişirilen ızgara örneklerinde bulunan PAH derişimlerinin ise, hem et cinsi hem de pişirme kaynağına bağlı olarak antrasen için 156 ppb, benzoantrasen için 115 ppb, piren için 166 ppb ve benzopiren için 140 ppb' ye kadar büyük olduğu gözlemlendi. Bu verilere göre, çalışılan gıda örneklerinde antrasen, benzo[*a*]antrasen, benzo[*a*]piren ve piren bileşikleri yönünden bir risk söz konusu olmadığı sonucuna varıldı.

*Anahtar kelimeler: Polisiklik Aromatik Hidrokarbon, Antrasen, Benzo[*a*]antrasen, Benzo[*a*]piren, Piren, Katı Faz Ekstraksiyon, HPLC-MS.*

ABSTRACT

Doctorate Thesis

DETERMINATION OF ORGANIC CANCEROGEN COMPOUNDS IN FOODSTUFFS COOKED AT HIGH TEMPERATURES BY HPLC-MS

Muharrem Ince

Firat University

Graduate School of Natural and Applied Sciences,

Department of Chemistry

2008, Page: X + 108

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are compounds formed by binding of two or more benzen rings at high temperatures.

In this study, the factors including flowing rate of mobile phase, injection volume, column temperature and fragmenter potential were optimised to quantitative analyse of anthracene, benzo[*a*]anthracene, benzo[*a*]pyrene and pyrene by HPLC-MS. The optimised conditions were applied to determination of the compounds mentioned above in foodstuff such as grills cooked at high temperatures. Various grills and similar samples were prepared by applying four different extraction methods. From the obtained results, concentrations of the studied PAH compounds in grills prepared in restaurants for consumption and other studied samples are dependent on the cooked materials, and their concentrations were observed to be under 10 ppb. The obtained PAH concentrations (as ppb) in grill samples which extremely cooked were found to be 156 for anthracene, 115 for benzo[*a*]anthracene, 140 for benzo[*a*]pyrene and 166 for pyrene, depending on both meat species and cooking source. According to these data, there isn't any risk in point of the compounds anthracene, benzo[*a*]anthracene, benzo[*a*]pyrene and pyrene in the studied foodstuff.

*Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons, Anthracene, Benzo[*a*]anthracene, Benzo[*a*]pyrene, Pyrene, Solid-Phase Extraction (SPE), HPLC-MS.*

1. GİRİŞ

İnsan sağlığına zararlı olan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), her yerde bulunabilen çevresel toksik bileşiklerdir. PAH' lar memelilerin hücrelerinde metabolik aktivasyona uğrayarak, hücresel makromoleküllere kovalent olarak bağlanan "diol epoxides" lere dönüşerek kanserojenik prosesleri başlattıklarından ve DNA' da mutasyon ve replikasyon hatalarına sebep olabildiklerinden bir kısmı kanserojen olarak sınıflandırılmışlardır. Her ne kadar PAH' lar toprak, su ve hava gibi çevresel örneklerden bitki, içecek, sebze, tahıl, et ve deniz gıdalarına geçerek alınabilmekte veya bu gıdaların taşınma ve depolanmaları sırasında toplanmakta iseler de, temel olarak hayvansal kaynaklı ve proteince zengin gıdaların ısıtılma işlem görmeleri sonucunda oluşurlar. Gıdalar, özellikle et, et ürünleri ve balık ızgarada pişirildiğinde, kızartıldığında ve benzeri ısıtılma işlem gördüğünde, organik materyallerin termal bozulması veya tam yanmanın olmamasının sonucunda PAH' lar oluştuğu belirtilmiştir. Eğer et direkt alev ile temas ettirilirse, etlerdeki yağların pirolizi sonucu PAH' lar oluşur. Etler kömür üzerinde direkt pişiriliyorsa, PAH' lar hem gıdalardaki yağlardan hem de kömürün yanma ürünlerinin gıdaya karışmasından oluşur.

Gıdaların pişirilmesi sonucu ortaya çıkan mutajenik/karsinojenik heterosiklik yapılar 20' den fazladır. Bu bileşiklerin çoğu karsinojenik bileşikler olarak sınıflandırılabilir. Karsinojenik/mutajenik bileşikler genellikle iki ana sınıfa ayrılır;

1. Pirolitik aminler
2. Amino-imidazo-azaarenler

İlk grup 300 °C' nin üstündeki yüksek sıcaklıkta oluşurlar ve bu grupta şu aminler bulunur; Trp-P-1, Trp-P-2, AaC, MeAaC, Glu-P-1 ve Glu-P-2.

Aminoimidazo-azaarenler ise 100–225 °C arasındaki sıcaklıklardaki gıdaların pişirilmesi sonucu meydana gelirler. Genellikle gıda pişirmelerinde meydana gelen aminoimidazo-azaarenler şunlardır; IQ, IQ_x, MeIQ, MeIQ_x, 4,8-DiMeIQ_x, 7,8- DiMeIQ_x ve PhIP. Bu bileşiklerin kimyasal davranışlarına göre; polar (aminoimidazo-azaarenlerle birlikte Glu-P-1 ve Glu-P-2) ve apolar (bütün diğer) aminler olarak gruplandırılırlar.

Bu çalışmada, antrasen, benzo[*a*]antrasen, piren ve benzo[*a*]piren gibi PAH bileşiklerinin HPLC-MS ile nicel analizleri amaçlandı. Yapılan ön çalışmalarda, mobil faz akış hızı, enjeksiyon hacmi, kolon sıcaklığı ve parçalanma gerilimi gibi faktörler optimize edildi. Optimize edilen şartlar yüksek sıcaklıkta hazırlanmış ızgara türü örneklerdeki yukarıda adı geçen bileşiklerin tayinine uygulandı. Çeşitli ızgara ve benzeri örnekler dört farklı ekstraksiyon yöntemi uygulanarak analize hazırlandı. Elde edilen sonuçlardan, çalışılan PAH bileşiklerinin restoranlarda tüketime sunulan normal pişirilmiş ızgaralardaki derişimlerinin et kaynağına bağlı

olup 10 ppb' yi geçmediği gözlemlendi. Örneğin, tavuk etinden hazırlanmış ızgarada 2.3 ve 4.8 ppb piren ve benzopiren bulunurken, kırmızı etten hazırlanmış ızgarada sırasıyla 4.2 ve 6.3 ppb piren ve benzopiren bulundu. Bu verilere göre, ülkemizde önemli bir yeri olan ızgaralarda antrasen, benzo[*a*]antrasen, piren ve benzo[*a*]piren bileşikleri yönünden bir risk sözkonusu olmadığı sonucuna varıldı. Et dışındaki örneklerle yapılan çalışmada ise çifte kavrulmuş bisküvi örneğindeki değerler tayin sınırının altında bulundu. Türk kahvesinde antrasen tayin sınırının altında olup çalışılan diğer PAH' lar 2.1-3.4 µg/kg, nescafe de ise 2.0-3.2 µg/kg olduğu tespit edildi. Tüp alevinde ve kömürde ayrı ayrı yenilemeyecek kadar özel olarak aşırı pişirilmiş ızgara örneklerinde ise normal örneklere göre daha fazla PAH konsantrasyonları bulundu. Ancak bu şekilde hazırlanmış ızgaraların yenilmesi sözkonusu olmadığından sağlık yönünden bir riskten bahsedilemeyeceği sonucuna varıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH)' lar genel olarak fosil yakıtlarının tam yanmaması sonucu yan ürün olarak açığa çıkarlar. Çevrede 100' ün üzerinde PAH bileşiği bulunmaktadır, bunların 16 tanesi United States Environmental Protection Agency (USEPA)' nın belirlediği 129 öncelikli kirleticiler arasında yer almaktadır. Atmosfere salınan PAH' lar yağmur şeklinde veya havadaki partiküllere tutunmuş bir şekilde kuru olarak çökelirler. PAH' ların gerçekleştirdikleri çökelmeler yüzey sularının, toprağın, yer altı sularının başlıca kirletici kaynağıdır.

Polisiklik sistemler ya bir halkanın 2 karbonunu diğer bir halkayla paylaşmasıyla ya da halkaların birbirine C-C bağı ile bağlanmasıyla meydana gelirler. Polisiklik karbonlar benzen gibi kömür katranında bulunurlar.

En çok rastlanılanları şunlardır: Naftalen, antrasen, fenantren, difenil, difenilmetan.

PAH' lar aşağıdaki özellikleri taşırlar;

- 1- Molekül formülleri bakımından doymamışlık gösteren fakat genellikle doymamış bileşikler için karakteristik olan katılma reaksiyonlarını vermeyen bileşikleridir.
- 2- Halkalı (siklik) yapıda olan düzlemsel (veya hemen hemen düzlemsel) moleküllerdir. Aromatik halkalar genelde 5, 6, 7 üyeden oluşmuşlardır.
- 3- Oksidasyona dayanıklı bileşiklerdir.

2.1.1. Polisiklik aromatik hidrokarbonların kaynakları ve elde edilişi

Benzen ve genellikle aromatik bileşikler için en önemli endüstriyel kaynak taş kömür katranıdır. Taş kömürü havasız ortamda kuru kuruya ısıtıldığı zaman uçucu bileşiklerin ayrılmasıyla geriye “**kok**” kalır. Uçucu bileşikler ise kömür gazları ile taş kömürü katranıdır. Taş kömürü katranının destilasyonundan benzen, toluen, ksilen, naftalen, antrasen gibi aromatik hidrokarbonlar, arenler ile piridin ve türevleri, anilin ve benzeri gibi diğer aromatik bileşikler ele geçer, ki bunlardan naftalen katranda en bol bulunan hidrokarbondur.

Petrolde ele geçen alifatik hidrokarbonların katalizör ile ısıtılmasından ve dehidrogenasyon (hidrojen ayrılması) veya siklilizasyon (halka kapanması) ile aromatik hidrokarbonlar oluşur.

2.1.2. PAH' ların canlılar üzerindeki etkileri

Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlara (PAH) çevrede geniş olarak rastlamak mümkündür. Dolayısıyla PAH' lara hem çevresel hem de mesleki olarak maruz kalınmaktadır. Başlıca PAH kaynakları arasında, dizel ve benzinli motor egzozları, petrolün yanması ile oluşan egzozlar, çeşitli şekilde içilen tütün dumanları, grafit ve elektrot üretimi esnasında meydana gelen ürünler, gıdaların pişirilmesi sonucu oluşan duman, kömürün piroliziyle meydana gelen kömür katranı sayılabilir.

PAH maddesi insanlara sigaradan insana kan dolaşımı ile geçiyor. Kömür, asfalt, katran, alininin bu maddenin en çok yer aldığı kimyasal bileşimlerdir.

PAH yumurtalık hücrelerindeki bir genetik reseptör olan Ahr, Bax gibi bazı yumurta hücrelerinde bulunan genleri harekete geçiriyor. Bu eşleşme gerçekleşince, hücreler ölüyor. Aslında normal işleyişte tüm kadınlarda bu hücre ölümleri gerçekleşir. Buna menopoz denir. Ancak yukarıdaki maddeler vücuda alındığında bu işlem çok daha erken gerçekleşiyor.

Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda PAH maddelerine maruz bırakılan hayvanlarda erken menopoz belirtilerini ortaya koymuştur. Araştırmacılar test farelerinin deri altına PAH maddesini enjekte ettiklerinde hücreler tıpkı bir kadın rahmi şeklinde reaksiyon vermiştir. Bu denemede de farelerin deri altı hücreleri yok olduğu gözlenmiştir. Bütün bunlara rağmen sigara kullanan bir kadın kesinlikle erken menopoz olur sonucunu çıkaramayız. Diğer tüm etkenler göz önünde tutulmalıdır. Bunların dışında insan vücudunun harikalarından biri olan kendi kendimizi yenileyebilmemiz PAH maddesinin olumsuz sonuçlarını azaltabiliyor.

Diyetle kanser arasında bir ilişki olabileceği görüşü 1960' lı yılların sonlarında kanser etiyojisinde toplumlararası belirgin varyasyonların rapor edilmesiyle ilgi çekmeye başlamıştır. Bu farklılıklar yalnızca sanayileşmenin ve genetik yapının bir sonucu olarak açıklanamamaktadır. Örneğin kanser Yeni Zelanda gibi sanayileşmemiş bazı ülkelerde, Amerika Birleşik Devletleri' nde olduğundan daha yaygındır. Bir ülkeden diğerine göç eden insanlarda görülen kanser türleri ve oranı, yeni ülkelerdeki profile uymaktadır. Amerika Birleşik Devletleri' nde, sigara ve alkol tüketmeyen Mormonlarla yapılan çok sayıda incelemelerde, vejeteryanlarda gastrointestinal kanserlerin oranı, benzer yaşam koşullarında ve yaş grubundaki etoburlarinkine göre önemli düzeyde düşük bulunmuştur. Kolon kanserinin, Avrupa ve kuzey Amerika Ülkelerinde, Asya ve Afrika ülkelerinden daha çok yaygın olduğu belirtilmiştir. Bu nedenlerle, insanların yaşam biçimlerinin, özellikle beslenme alışkanlıklarının, kanser üzerinde önemli düzeyde etkili oldukları görüşü ileri sürülmüştür. Ancak, beslenmenin kanser üzerindeki etkilerini belirleyebilmek oldukça zordur. Günümüzün değişen koşullarında, kanserli hastaların 20-30 yıl önce ne yediklerini takip edebilmek, laboratuvar hayvanlarının diyetlerini kontrol

altına alabilmek ve bu hayvanlarda değişik kanser türlerini oluşturabilmek, konu üzerinde çalışan araştırmacıları zorlamaktadır.

Bütün kanserlerin % 10-70' inin, kanserden ölenlerin ise % 35' inin diyetle ilişkisinin olduğu ileri sürülmektedir. Toplumda genel olarak gıdadaki karsinojenler olarak gıda katkıları, yapay tatlandırıcılar, renklendiriciler, koruyucular ile sentetik pestisidler ve çeşitli çevresel kimyasal kirleticiler sayılmaktadır. Oysa bu tür karsinojenler gıdalardaki karsinojen maddelerin % 1' inden daha azını oluşturur. Diyetteki karsinojenler esas olarak bitkiler tarafından mantar, böcek ve hayvanlara karşı savunma için üretilen doğal pestisidler ile küf tarafından gıdalarda yapılan mikotoksinlerden ve gıda hazırlanırken ortaya çıkan çeşitli maddelerden oluşur. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda beslenmenin en çok gastrointestinal sistem, endokrin ve akciğer tümörleri ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Gıdalar hazırlanırken oluşan karsinojenler; polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), heterosiklik aromatik aminler (HAA) ve nitroze bileşikleridir (NOB). HAA gıdaların kızartma, ızgara ve közlemesi sırasında oluşur. PAH, ızgara ve tütüleme esnasında meydana gelir. NOB ise tuzlu, turşu, nitrat ve nitrit ile muamele edildiğinde oluşur. Bu bileşikler genotoksiktirler.

Meme ve kolorektal kanserlerde pişirilme yöntemine bağlı olarak oluşan bileşiklerin kanser riskini artırabileceği öne sürülmektedir. HAA, güçlü mutajen ve hayvanlarda kanserojendir. Karaciğer kolon, meme ve deri kanseri gelişiminde rol oynadığı bildirilmektedir. Haşlama, buğulama, kaynatma ve mikrodalga çok az HAA oluşumuna neden olur veya hiç olmazlar. Hızlı asetitleyiciler ve iyi pişmiş et tercih edenler 6.5 kat daha fazla kolon kanser riskine sahiptir. Diyetteki yağ oranı fazla oluşu HAA' nın karsinojen özelliğini artırmaktadır. HAA oluşumunu önleme bakımından düşük ısıda ve az pişirme tavsiye edilmektedir.

PAH birincil olarak hayvansal yağın eksik yanması sonucu oluşur. Gıdalarda birçok PAH oluşmaktadır. Alevde pişirilen et ve balıkta PAH oluşur. Kömüre damlayan yağın yanmasıyla oluşan PAH dumanla birlikte pişen ete bulaşır. Benzo[a]piren en karsinojen PAH' dır. Tencerde pişirme, etin üzerine ısı kaynağının yerleştirilmesi, mikrodalga kullanımı ve pişirme sırasında et ile dumanın ayrıştırılması gıdaların polisiklik aromatik hidrokarbonlar ile kirlenmesini azaltması için önemlidir.

Diyette bulunan nitrit ve aminlerden endojen olarak ağız boşluğu ve midede nitrozo bileşikleri oluşabilir. Ağızdan alınan NOB' lar kanserojendir. Mide, ösefagus, nazofarenks, mesane ve karaciğer kanseri ile eksojen ve endojen NOB alımı arasında kuvvetli bir ilişki bulunmuştur. Yüksek karbonhidratlı diyetle beslenen kişilerde riskin obezite ile ilgili olabileceği de savunulmaktadır.

EPA, PAH' ın insanı etkileyen kanserojenler arasında yedinci sınıfta olduğunu belirtmiştir, fakat düzenli olan Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların avantajları da vardır:

Halka şekilli benzer PAH' lar DNA'da bulunurlar ve onların aslında 4,5 milyon yıl önce dünyadaki yaşamın başladığı zaman gelişebildiklerini biyologlar kendi aralarında anlaşılarak bilim dünyasına duyurmuşlardır. Öyle ki yaşamın büyük moleküllerin yapısında bulunmaktalar, PAH' ların kimyasal süreçlerin başlangıcında etkin rol oynadığı belirtilmiştir.

Yarı uçucu organik bileşiklerden olan çok halkalı aromatik hidrokarbonlar (PAH' lar) atmosfere girdiklerinde gaz ve partikül fazda bulunabilirler ve uzak bölgelere taşınarak ıslak veya kuru çökeltme yoluyla herhangi bir yüzeye (su, kara vs.) çökeltmek atmosferden uzaklaşırlar. Atmosfer, PAH gibi antropojenik yarı uçucu organik bileşiklerin taşınımı, çökeltmesi ve çevriminde önemli bir rol oynamaktadır. Atmosferik çökeltme bu kirleticilerin temiz göllere, körfezlere ve okyanuslara taşınması sonucu önemli bir girdi oluşturmaktadır. Bu bileşiklerin atmosferik taşınmaları onların karakteristiklerine ve meteorolojik faktörlere bağlıdır. Çevrede birçok PAH bileşiği vardır ancak bunlardan sadece 16 tanesi EPA' nın öncelikli kirleticiler listesinde yer almaktadır [1]. PAH' ların ana kaynakları sabit ve hareketli olmak üzere 2 kategoriye ayrılır. Sabit kaynakları; evsel ısınma, çöplerin yakılması, kok üretimi, alüminyum üretimi, demir ve çelik, petrol prosesi, asfalt üretimi ve kullanımı, güç ve ısı üretimi, orman ve tarımsal yangınlar oluşturmaktadır. Hareketli kaynakları ise motorlu taşıtların egzoz gazları oluşturmaktadır. Bu kirletici kaynakların her birinden atmosfere verilen PAH' ların türleri ve miktarları farklıdır.

İlk çağlardan beri et insanoğlunun tükettiği ana gıdalardan biri olma özelliğini taşımakta, şöyle ki; insan ve hayvan organizmasının işlevselliğinin sağlanması için gerekli proteinler en kolay et yoluyla alınabilir. Ancak her şeyde olduğu gibi ette de fazla tüketimden kaçınmak gerekiyor. Yapılan çalışmalar özellikle işlenmiş kırmızı et (sucuk, salam, sosis vs.) tüketiminin, kolon kanseri riskini arttırdığını kesin olarak kanıtlamıştır. 2005 yılında 149.000 kişi üzerinde yapılan bir araştırmaya göre, yüksek oranda işlenmiş ya da işlenmemiş kırmızı et tüketen bireylerin, bu ürünleri minimal düzeyde tüketenlere göre % 30-40 oranında kalın bağırsak kanserine daha çok meyilli olduğu saptanmıştır. 149.000 kişi arasında işlenmiş et ürünlerini en çok tüketen bireylerde kolon kanserine yakalanma riski % 50, rektum kanserine yakalanma riski ise % 20 oranında daha fazla bulunmuştur.

Tablo 2.1. PAH' ların sağlık y6n6nden sınır değerleri [2].

Kimyasal	EPA Kanser Sınıflandırması ^A	Kronik Soluma Referans Doz (mg/kg/g6n)	Solunum Eğilim Fakt6r6 (mg/kg/g6n)
Akrolein	-	5.7×10^{-6}	-
Antrasen	-	3.0×10^{-1B}	-
Benzen	A	-	2.9×10^{-2}
Benzo[a]antrasen	B2	-	3.1×10^{-1C}
Benzo[a]piren	B2	-	3.1×10^{-10C}
Benzo[b]floranten	B2	-	3.1×10^{-1C}
Benzo[k]floranten	B2	-	3.1×10^{-2C}
Karbon monoksit	-	8.3×10^{-10D}	-
Krisen	B2	-	3.1×10^{-3C}
Florenten	-	4.0×10^{-2B}	-
Formaldehit	B1	-	4.6×10^{-2}
İndeno[1,2,3-cd]piren	B2	-	3.1×10^{-1C}
Solunabilen partik6l madde (PM 3.5)	-	1.4×10^{-2E}	-
Fenantren	-	3.0×10^{-2F}	-
Piren	-	3.0×10^{-2B}	-

RfD = Referans doz

^AU.S.EPA karsinojen sınıflandırması: A= İnsan karsinojeni; B1= Muhtemel insan karsinojeni (insanlarda sınır değer); B2 = Muhtemel insan karsinojeni (hayvanlarda yeterli kanıt var, insanlarda yeterli kanıt yok veya az miktarda kanıt var).

(^BOral yolla maruz kalmadan ekstrapole edilen toksik değerler).

(^CU.S.EPA Superfund Teknik Destekleme Merkezi).

(^DACGIH^RTLV^R 'den t6retilen değerler).

(^ELiterat6rden geliştirilen toksik değerler).

(^FTemsili değer olarak piren toksik değerleri kullanıldı).

Tablo 2.2. Yaz aylarında doğada meydana gelen yangınlardan dolayı maruz kalınan PAH miktarı [3].

PAH	PAH' a Maruz Kalmanın Geometrik Ortalama Değerleri ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	95% G6ven Aralığı ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
Antrasen	0.061 (0.005-0.152)	0.136
Benz[a]antrasen	0.015 (ND-0.034)	0.025
Benzo[a]piren	0.012 (ND-0.034)	0.025
Benzo[b] fluoranten	0.018 (ND-0.120)	0.053
Benzo[k]fluoranten	0.004 (ND-0.014)	0.013
Benzo[ghi]peryilen	0.022 (ND-0.032)	0.027
Krisen	0.025 (ND-0.080)	0.048
Fluoranten	0.048 (ND-0.101)	0.256
Indeno-1,2,3-[cd]piren	0.016 (ND-0.042)	0.051
Fenantren	0.257 (0.013-0.869)	1.013
Piren	0.075 (ND-0.110)	0.162

ND = Tayin edilemedi

Tablo 2.3. PAH' ların USEPA ve IARC tarafından öngörülen karsinojenik etkileri [4].

Polisiklik Aromatik Hidrokarbon	USEPA (1)	IARC (2)
Asenaften	N/A	N/A
Asenaftalen	D	N/A
Antrasen	D	3
Benz[<i>a</i>]antrasen	B2	2A
Benz[<i>a</i>]piren	B2	2A
Benzo[<i>e</i>]piren	N/A	3
Benzo[<i>b</i>]fluoranten	B2	2B
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen	N/A	3
Benzo[<i>j</i>]fluoranten	N/A	2B
Benzo[<i>k</i>]fluoranten	B2	2B
Krisen	B2	3
Dibenz[<i>a,h</i>]antrasen	B2	N/A
Fluoranten	D	3
Fluoren	N/A	3
İndeno[<i>1,2,3-cd</i>]piren	B2	2B
2-Metilnaftalen	N/A	N/A
Naftalen	D	3
Fenantren	D	3
Piren	D	3

1. USEPA: Birleşmiş Milletler Çevre Koruma Derneği

B2: Muhtemel insan karsinojeni

2. IARC: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı

2A: Muhtemel insan karsinojeni

2B: Mümkün insan karsinojen.

3: Sınıflandırılmamış

N/A-Elde edilemedi

Tablo 2.4. Bazı PAH’ lar için gerçek etki değerleri [4].

Bileşik	Etki faktörü
Asenaften	NA
Asenaftalen	NA
Antrasen	NA
Benzo[<i>a</i>]antrasen	0.1
Benz[<i>a</i>]piren	1
Benzo[<i>b</i>]floranten	0.1
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen	NA
Benzo[<i>k</i>]floranten	0.01
Krisen	0.01
Dibenz[<i>a,h</i>]antrasen	1
Floranten	NA
Floren	NA
Indeno[<i>1,2,3-cd</i>]piren	0.1
2-Metilnaftalen	NA
Naftalen	NA
Fenantren	NA
Piren	NA
NA – USEPA tarafından gerçek etki değerleri tam olarak tespit edilemediğinden dikkate değer karsinojen olarak sınıflandırılmamıştır.	

2.1.3. PAH’ ların Kanserojen Etkilerinin Değerlendirilmesi

USEPA tarafından PAH’ lar için geliştirilmeyen kanser eğilim faktörü, USEPA tarafından tavsiye edilen gerçek etki değerleri kullanılarak değerlendirilebilir (Tablo 2.4). Bu değerler

matematiksel eşitlik olarak iki yolla değerlendirilebilir. Örneğin, indeno[1,2,3-cd]piren için 2 mg/kg olarak rapor edildiğini kabul edelim.

İlk yaklaşım, indeno[1,2,3-cd]piren için gerçek etki değeri (Tablo 2.4' te 0.1), benzo[a]piren (7.3 mg/kg/gün) için eğilim faktörü ayarlanarak bu bileşik için bir kanser eğilim faktörünün tahmini için kullanılır.

$CSFi[1,2,3-cd]p = 0.1 \times 7.3 \text{ (1/mg/kg/gün)} = 0.73 \text{ (1/mg/kg/gün)}$ İkinci yaklaşım, gerçek etki değeri (Tablo 4' te 0.1) ile indeno[1,2,3-cd]piren konsantrasyonunun (2 mg/kg, bu örnek için) ayarlanması için, B[a]P' nin eğilim faktörüne uygulanabilen, benzo[a]piren denge konsantrasyonu

$B[a]P_{\text{denge konsantrasyonu}} = 0.1 \times 2 \text{ mg/kg} = 0.2 \text{ mg/kg}$ olarak hesaplanır [4].

Piştirme işlemi besinlerin tadını, kokusunu, rengini ve yapısını değiştirir. Değişik piştirme yöntemleriyle besinlerde meydana gelen değişiklikler farklılık gösterir. Özellikle et gibi yüksek protein içeren besinleri piştirme teknikleri karsinojenlerin oluşumu açısından büyük önem taşır. Bir başka deyişle eti piştirme yöntemi kanser olma riskini etkiler. Ette bulunan zararlı organizmaların etkisiz hale getirilebilmesi için yeterli piştirme önemlidir. Ancak yağda kızartma, ızgara ve mangal gibi etin yüksek ısıya maruz kalmasına neden olan bazı piştirme yöntemleri nedeniyle kanserojenik etki gösteren heterosiklik amin molekülleri meydana gelir. Bu maddeler DNA' ya zarar vererek kanser oluşumuna neden olurlar. Kısık ateşte kapalı kapta piştirme, buharda piştirme, haşlama ve fırınlama gibi piştirme teknikleri, kanser yapıcı kimyasalların oluşmasını minimize eder. Mangal ateşinde pişen et, ızgarada yandığında polisiklik aromatik hidrokarbonlar meydana gelebilir. Yiyecekteki yağın uzaklaştırılması ve etin yakılmamasıyla polisiklik aromatik hidrokarbonların teşekkülü en aza indirilebilir. Odun ateşi dumanında tütsülenmiş balık yiyen Japonlardaki mide kanseri oranı, bu alışkanlığa sahip olmayan insanlara göre çok daha yüksektir. Uzmanlar; yanmış, doğrudan mangal ateşinde pişirilmiş gıdalardan sakınarak, yemekleri güveç şeklindeki kaplarda kendi suyuyla, kısık ateşte pişirmenin en iyi usul olduğu hususunda birleşmektedir. Ayrıca etin üzerine yapışıp yanan yağlar da, benzer şekilde kansere sebep olur. Görüldüğü gibi lezzete fazla düşkünlüğün bir faturası var. Izgara etin güzel kokusu, aslında kanser yapıcı maddelerle doludur. Bu yüzden ızgarayı, etleri yanlardan ve üstten ısıtacak (döner gibi) veya ateşle doğrudan teması olmayacak şekilde alüminyum folyolara sararak, yağsız tavada ve orta sıcaklıkta yapmak gerekir [5].

Mangal yapılırken uygulanan yanlış piştirme yöntemleri, akciğer ve sindirim sistemi kanserlerine neden olabiliyor.

- ✓ Sağlıklı mangal için kömür közüyle et arasında en az 15 santimetrelilik bir mesafe bırakılması gerekir.

- ✓ Mangal yapılırken uygulanan yanlış pişirme yöntemleri, kanser yapıcı maddelerin oluşmasına neden oluyor. Bu maddelerden biri olan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH' lar) ızgara, dumanlama ve kızartma işlemleri sırasında uygulanan yüksek ısıl işlemlerde gıdalarda oluşuyor, mangalda pişirilen etlerde ise yüksek düzeye çıkıyor.
- ✓ Etin, odun ateşinin alevine doğrudan tutulması durumunda yüksek düzeyde, kor üzerinde pişirildiğinde ise daha düşük düzeyde PAH oluşuyor.
- ✓ Yiyeceklerin pişirilmesi sırasında erimiş yağların ısı kaynağı üzerine damlaması sonucu meydana gelen parçalanma ile de PAH oluşumu artıyor ve etin üzerine birikiyor. Hamburger, biftek, balık ve tavuk etlerinin yüksek ısıda mangal ateşinde pişirilmesi sonucunda PAH içerikleri önemli ölçüde artıyor.
- ✓ Mangaldaki kömür ve kömür tozları, pişirilen besinlerin üzerine sinerek karsinojen etki yapıyor; başta mide kanseri olmak üzere yemek borusu ve kalın bağırsak kanserlerine neden olabiliyor. Öte yandan sıcak havalarda bozulma riski yüksek besinlerden et ve ürünlerinin uygun koşullarda hazırlanmaması ve pişirilmemesi, uzun süre bekletilmesi sonucunda da besin zehirlenmesi meydana gelebiliyor.
- ✓ Mangalda pişirilmek için tavuk eti gibi beyaz etlerin tercih edilmeli, eğer kırmızı et pişirilmek istenirse yağsız olması ve içine kuyruk yağı konulmaması gerekiyor.
- ✓ Yakıt olarak alevsiz yanan ladin ağacı veya çam kozalakları, tezek gibi kaynaklar kullanılmamalı, saf odun kömürü tercih edilmeli.
- ✓ Etlere pişirilmeden önce terbiye işleminin uygulanması (sıvıyağ, sirke, limon suyu, süt, yoğurt, tuz vb. oluşan soslar) tercih edilmeli, bu işlemde çay şekeri kullanılmamalı.
- ✓ Çiğ veya pişmiş et ve et ürünleri açıkta veya oda sıcaklığında bırakılmamalı, tüketilene kadar buzdolabı ısısında (0-4 °C) muhafaza edilmeli.
- ✓ Çiğ besinler ile pişmiş yiyecekler birbirine temas etmeyecek şekilde üzerileri kapalı olarak muhafaza edilmeli.

Kimi insanlar ekmeğin kızarmış (yarı yanık) veya yanmış kısımlarını sever, bazıları da ızgara veya mangalda pişmiş etin lezzetine bayılır. Benzer şekilde bazı şekerli gıdalar da yüksek sıcaklıklarda 'karamelizasyon' denen birtakım değişiklikler geçirerek daha lezzetli hâle gelebilir. Son 20 yıl içinde gıdaların pişmesi esnasında meydana gelen değişiklikler üzerine çeşitli araştırmalar yapılmış; karbon, hidrojen, oksijen ve azottan yapılmış 'organik gıdalar' olarak bilinen protein, yağ ve karbonhidratların ısındıkça ne gibi maddelere dönüştüğü hususunda birçok bilimsel çalışma yapılmıştır. Bugün geldiğimiz noktada yanık gıdaların kanser meydana getirme potansiyeline sahip (karsinojen) çeşitli maddeler ihtiva edebildiği anlaşılmıştır. Yanık yiyecekler sebebiyle kanser gelişme riski, yenilen yiyeceğin miktarına ve karsinojen maddelerin yanık gıdada hangi nispette bulunduğuna bağlıdır. Araştırmalara göre,

gıdanın muamele edildiği sıcaklık ve muamele süresiyle yiyecekteki karsinojen madde arasında paralellik vardır.

Sigara içenlerde dumanın geçtiği yollar olması sebebiyle gırtlak ve akciğer kanseri fazla görünürken, yanık gıdaların yol açtığı kanserler ise daha çok sindirim organlarında görülür. Zîrâ sindirim organları gıdalardaki karsinojen maddeyle daha fazla temas etmektedir. Yanık gıda tüketimi ağız, boğaz, mide, ince bağırsak ve hususiyle kalın bağırsak kanseri riskini yükseltmektedir. Yanık yiyeceklerde bulunan karsinojen madde gruplarından biri polisiklik aromatik hidrokarbonlardır. Yiyeceğin yanmasıyla ortaya çıkan dumanda polisiklik aromatik hidrokarbonlar bulunabilir. Yiyeceği muhafaza etmek veya gıdaya lezzet katmak için bu duman kullanılırsa, polisiklik aromatik hidrokarbonların bir kısmı yiyeceğe geçebilir. Yiyecekteki yağın uzaklaştırılması ve etin yakılmamasıyla polisiklik aromatik hidrokarbonların teşekkülü en aza indirilebilir.

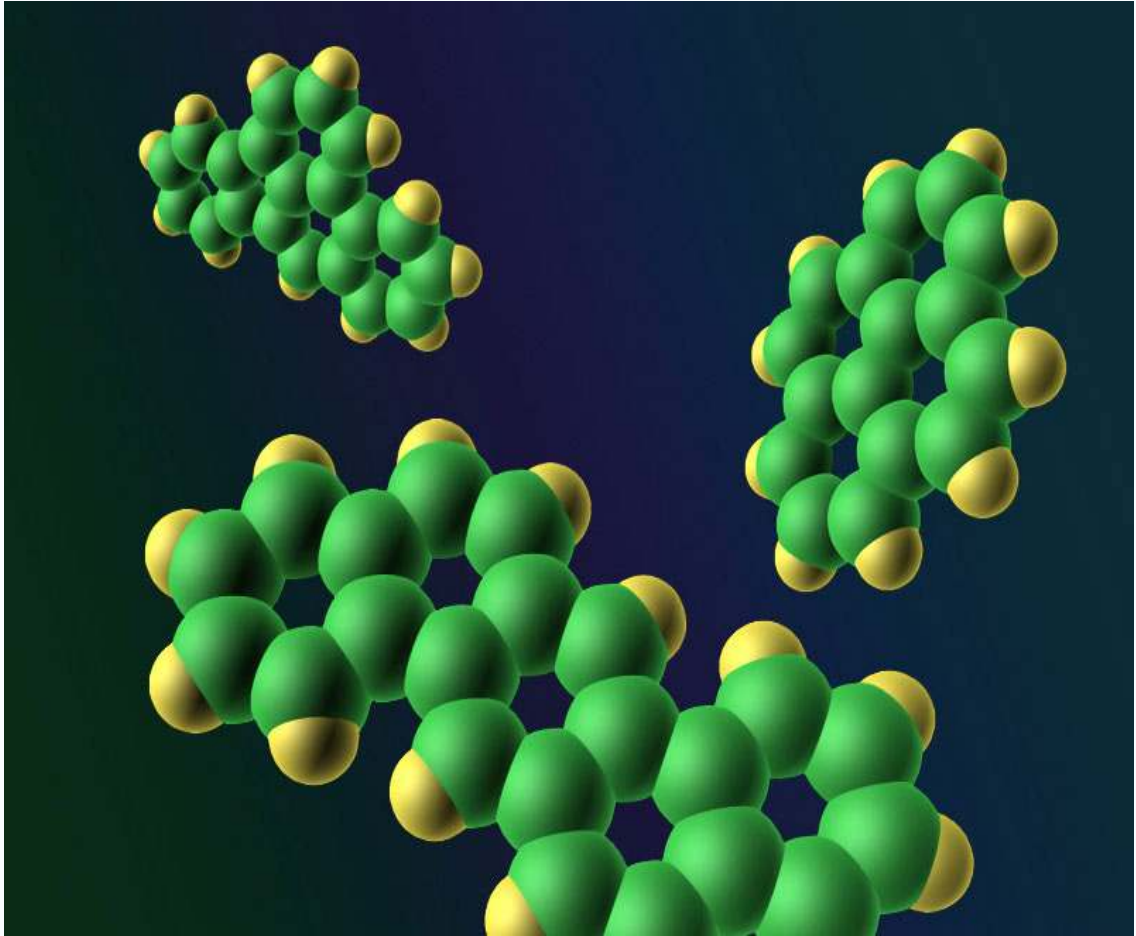
Günümüzde kanser gelişiminin kimyasal bileşiklerle önlenmesi (kemoterapi) kanser kontrol yöntemi olarak giderek artan biçimde önem kazanmaktadır. Kanser gelişimini önleyen kimyasal bileşikler, ilaç halinde ya da diyet içerisinde tabii orijin bileşikler halinde bulunurlar. Çevre ve endüstride çok sayıda bileşik insanlarda genotoksik etkileri indüklemektedir. İnsan vücudu bu toksik etkileri çeşitli enzim sistemleri aracılığıyla detoksifiye ederek önlemeye çalışmaktadır. Ancak bu tip kimyasallara maruziyetin artması durumunda karsinojenik ve mutajenik sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Karsinojen ve mutajenlere maruziyet sonucunda hücrede DNA içeren farklı oluşumlar ortaya çıktığı için bu oluşumları kullanarak mutajenik ve karsinojenik bileşiklerin genotoksitesini belirlemek mümkündür. DNA’ da hasar olarak tanımlanan genotoksik etki kanser başlatıcı bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle geliştirilen çeşitli yöntemler ile DNA’ daki hasarın saptanması ileride oluşacak kanser olaylarında riskin belirlenmesinde yardımcı olabilmektedir. Antimutajen ve antikarsinojenlerin günlük yaşamda yaygın kullanımının kanser ve genetik hastalıkları önlemek için etkili olabileceği öne sürülmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, yeşil sebze ve taze meyve içeren bileşiklerin tüketiminin insanları kansere karşı koruduğunu göstermektedir. İnsanlar, günlük yaşamlarında çok sayıda kimyasal karsinojen ve mutajenlere maruz kalabilmektedirler. Bunlar arasında antineoplastik ilaçlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), aromatik aminler, nitrozaminler, metaller, radyasyon bulunur. İnsan vücudu bu tip kimyasal bileşiklere karşı çok çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmesine rağmen bu kimyasal bileşiklere karşı giderek artan maruziyet nedeniyle, mutajenik ve/veya karsinojenik özelliklerini baskılayabilecek nitelikte diğer bileşiklerin belirlenmesine ve kullanılmasına gerek vardır [6].

Yiyeceklerin içerisinde yaklaşık 100 polisiklik aromatik hidrokarbon belirlenmiştir. Bu bileşiklerin büyük çoğunluğunun mutajenik ve/veya karsinojenik olması nedeniyle önemi

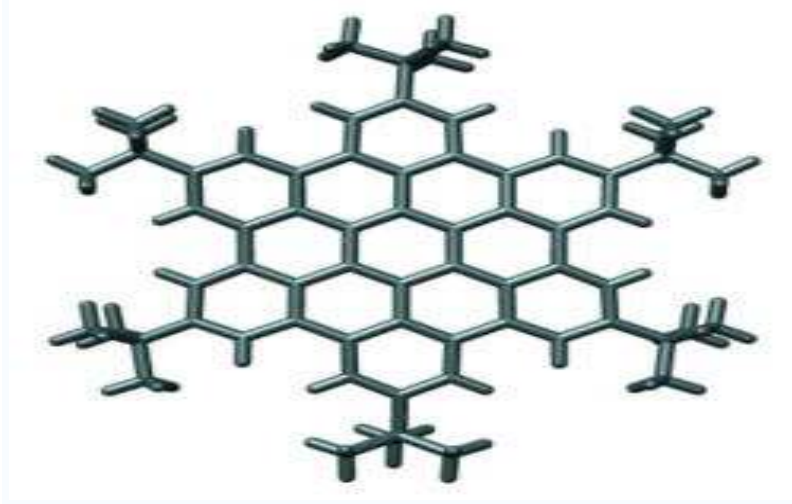
büyüktür. Yiyeceklerdeki PAH kontaminasyonunun pirolizis ve petrol ile katran ürünleri ile temas olmak üzere iki kaynağı bulunmaktadır.

Yağ damlamasıyla, açık alevler üzerinde et ve balık ürünlerinin kızartılması pirolizasyona ve diyet kökenli PAH oluşumuna neden olmaktadır. Gıdanın direkt alevle teması durumunda PAH miktarı daha da yükselmektedir.

PAH bileşikleri, endüstriyel üretim yapılan bölgelerdeki kirli hava bileşenlerinin bitkisel ürünler üzerindeki birikimi sonucunda tahıl, sebze ve meyvelerde bulunabilmektedir. Ayrıca insanların yaşadıkları alanlardan uzak topraklarda dahi bitkilerin çürümeleri sonucunda bazı PAH bileşiklerinin oluştuğu belirlenmiştir. Üzerinde en çok çalışılan ve hayvan denemelerinde kanserojen özellik gösterdiği saptanmış olan PAH bileşiği benzo[*a*]piren ile bazı amino asitlerin pirolitik ürünleri bu sınıfa girmekte, bu bileşikler ızgara et, balık, mantar gibi çeşitli gıdalarda ng/g düzeyinde bulunabilmektedirler. Yapılan çok sayıda çalışmada bu maddelerin mutajenik özelliklerinin güçlü, ancak kanserojen etkilerinin ise zayıf olduğu bildirilmektedir.



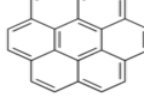
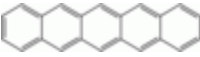
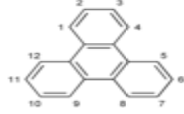
Şekil 2.1. Polisiklik aromatik hidrokarbonların tipik bir gösterimi [7].



Şekil 2.2. Hegza-peri-hegzabenzo[bc,ef,hi,kl,no,qr]coronen' den türetilen hegza-t-bütülin kristal yapısı [7].

Aromatik halkaların birbirlerine kaynaşması sonucu oluşan PAH' lar hetero atom veya sübstütient grubu bulundurmayan atmosferde biriken yaygın organik kirleticilerdir. Bu bileşiklerden bazılarının karsinojen olduğu bilinmekle beraber birçoğu ciddi sağlık problemleri oluşturmaktadır. Tütsü, sigara, yağ, dizel, kömür, odun, katran gibi karbon içeren yakıtların tam olarak yanmamasının sonucu oluşan öncelikli formlardır. Steroidlerin aromatik hidrokarbonlara dönüşümü gibi doğal ürün moleküllerinin kimyasal dönüşümü ile ham yağlarda PAH' lara dönüşürler. Kömür yanması, motor yakıtlarının yanması ve orman yangınları sonucu oluşan PAH' lar birbirinden farklıdır.

Tablo 2.5. Bazı PAH bileşikleri [8].

Bileşik adı	Bileşiğin geometrisi	Bileşik adı	Bileşiğin geometrisi
Antrasen		Benzo[a]piren	
Krisen		Koronen	
Koranolen		Naftasen	
Naftalen		Pentasen	
fenantren		Piren	
Trifenilen		Ovalen	

Petrol ve petrol türevleri olan PAH' lar, kullanım sırasındaki hatalar ve ihmaller sonucunda, petrol dökülmesi ve fosil yakıtlarının tamamen yanmadan çevreye bulaşan 3. sınıfa dahildirler. Sucul ve karasal ekosistemlerde uzun süre kalabilen çevresel bileşikler sınıfındadırlar. Dünyada, çoğu antropojenik kaynaklardan olmak üzere yılda 1.7-8.8 milyon metre küp petrol üretildiği ve bunun büyük bir kısmının zararlı bir şekilde tekrar çevreye döndüğü bilinmektedir [9]. Çevreye dökülen PAH kirliliğinin etkisi kısa veya uzun süreli olabilir. Uzun süreli etki henüz tam bilinmemekte ama kısa süreli etki oldukça iyi aydınlatılmıştır ve bu etki havasız bırakma ve zehirlenme şeklindedir. Havasız bırakma ışığın geçişini azaltma, çözünmüş oksijeni azaltma, deniz kuşlarına zarar verme şeklinde zarar verir [10-11].

Çeşitli kaynaklardan doğaya verilen ve sonunda deniz ve okyanuslara ulaşan PAH' ların bir kısmı çeşitli olaylar sonucunda zamanla gözden kaybolurlar. Bu kirlenmenin bittiğini göstermez. Hidrofobik özelliklere sahip olan PAH' lar suda çözünmeyip sadece dağılırlar ve süspanse olmuş partikülleriyle suyu sararlar [12]. Su ortamlarında çökmelerinin bir sonucu olarak göl, nehir ve okyanuslarda büyük PAH sedimentleri oluşur. Deniz sedimentlerindeki PAH konsantrasyonu 100-100.000 ng/g olabilmektedir [13]. Sahil ekosistemlerinde yağların

varlığının anlaşılmasının büyük bir önemi vardır. Bu ekosistemlerdeki PAH seviyeleri insan sağlığını bozar ve denizde kurulu olan organizmaların denge profilini bozar.

Deniz yüzeyine düşen PAH' ların % 25' i bir gün içerisinde buharlaşırlar. Kalan büyük bir kısmı emülsiyon haline dönüşür ve küçük tanecikler halinde suya karışırlar. Taneciklerin ağır metal içermeleri ise dibe çökerek yeni problemlerin doğmasına zemin hazırlamaktadırlar. Petrolün bir kısmı emülsiyon haline gelmeden fotolitik olarak, bir kısımda mikroorganizmalar tarafından parçalanır. Denizlerdeki mikroorganizmalar güçlü PAH parçalayıcılarıdır.

PAH' lar fotooksidasyon ve kimyasal oksidasyon yollarıyla parçalanırlar. Ancak biyolojik transformasyon PAH' ların doğadan temizlenmesinde hakim duruma gelmiştir. PAH' ların doğal mikroorganizmalar tarafından biyolojik olarak parçalanmaları, çevrenin petrol ve diğer kirliliklerinden temizlenmesinde birincil mekanizmadır [9]. Hem prokaryotik hemde ökaryotik parçalanma mekanizmaları, PAH halkalarına enzimatik tutunmanın başlaması için biomoleküler oksijenin varlığına ihtiyaç duyar [14]. Bununla birlikte, birçok bakteri küçük molekül ağırlıklı PAH' ları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanırlar [15,16]. PAH' ların bakteriyel parçalanmaları biyokimyasal ve genetik olarak gerçekleşmektedir [17-19]. Bu yollar için ekstra kromozomal gen lokasyonları mevcuttur. Bu güne kadar naftalen [20] fenantren [21] ve anthrasen [15] gibi çeşitli PAH' ların bakteriler tarafından parçalanmaları çalışılmıştır. Naftalenin bir plazmitte mevcut olan genlerin kodladığı enzimler tarafından parçalandığı bulunmuştur [20]. PAH' ların parçalanması gibi bazı metabolik fonksiyonlar plazmidlerde kodlanan genler tarafından gerçekleştirilir [19-23].

Organik maddelerin pirolizi veya tam yanmanın olmaması sonucu oluşan PAH' lar iyi bilinen insan karsinojenleridir. Araştırmalar bu bileşiklerin karsinojenik potansiyellerinin yanı sıra immünotoksik etkilerinin de olduğu ortaya koymaktadır. İmmünotoksik potansiyelleri hayvansal çalışmalarla ortaya konulmakla beraber insanlardaki etkileri hakkında oldukça sınırlı bilgi vardır. PAH' lar tümör başlatıcı, geliştirici ve ilerletici özellikleri olan güçlü karsinojenlerdir. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda bu maddelerin immün sistemi üzerinde baskılayıcı olduklarını ortaya çıkarmıştır. Karsinojenik potansiyellerinin yüksek oluşu da bu immünotoksik etkilerine bağlanmaktadır. PAH' lar hem hücrel hemde humoral immüniteyi inhibe etmektedir. Özellikle benzo[a]piren (BaP), 3-metilkolantren (3-MC) ve 7,12-dimetilbenzo[a]antrasen (DMBA)' in invivo olarak hayvan modellerinde ve periferik kan hücreleri ile yapılan invitro testlerde çok yüksek derecede immünotoksik olduğu saptanmıştır [24]. Özellikle hücrel immün fonksiyonlar PAH' lar tarafından modülasyona hassastır ve çeşitli araştırmalar PAH' ların mitojenlere T hücre yanıtlarını, gecikmiş tip yüksek duyarlı reaksiyonlarını, NK ve sitotoksik T hücreleri aktivitelerini, tümör ve patojenlere konakçı direncini baskıladığını doğrulamaktadır [25].

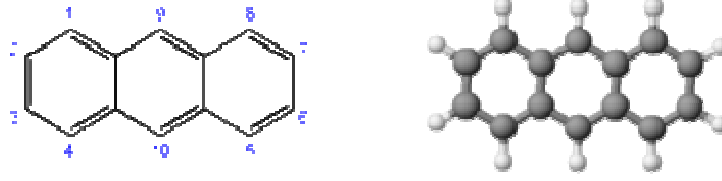
Epidemiyolojik veriler, endüstrileşmiş ülkelerde tüm kanser ölümlerinin % 4' ünün nedeninin mesleki maruz kalınan kimyasal karsinojenler olduğunu göstermektedir. Bu karsinojenler içinde PAH' lar etkiledikleri işçi sayısı ve etkinlik yönünden ilk sırayı alırlar. PAH' lardan 11 tanesi Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu (IARC) sınıflandırmasında karsinojenik olarak tanımlanmaktadır [26].

Mesleki olarak PAH' lara başlıca; kok kömürü, grafit elektrot, katran ve ürünleri, karbon siyahı ve bitümenin elde edilmesi ve kullanılması esnasında maruz kalınmaktadır. Diğer mesleki maruz gruplar ise baca temizleyicileri, araba tamir atölyelerinde çalışanlar ve trafik polisleridir. NIOSH (The National Institute for Occupational Safety and Health), Amerika Birleşik Devletlerinde sadece yol yapımı (asfaltlama), çatı kaplama ve biriket yapımında kullanılan bitüme 2 milyon civarında işçinin maruz kaldığını tahmin etmektedir [27].

PAH bileşikler, endüstriyel üretim yapılan bölgelerdeki kirli hava bileşenlerinin bitkisel ürünler üzerindeki birikimleri sonucunda tahıl, meyve ve sebzelerde bulunabilmektedir. Diğer taraftan et ve et ürünlerinin kavurma, dumanlama ve ızgaralama uygulamaları gibi işleme prosesleri de gıda ürününde özellikle direkt alevle temasta PAH oluşumunu önemli ölçüde arttırmaktadır.

Akciğer kanserinin birincil nedeni sigara içiciliğidir. Sigara dumanının karsinojenik etkisi, karsinojenlerin DNA' ya ulaşması, DNA' da hatalı kodlama ve mutasyon oluşmasına bağlıdır. Sigara; karsinojenler, kokarsinojenler (kendileri karsinojen olmayan ancak diğer maddelere karsinojen özellik kazandıran) olmak üzere binlerce madde içerir. Sigara dumanındaki majör bileşenlerin başında polisiklik aromatik hidrokarbonlar gelmektedir, bu sırayı aromatik aminler, nitrozaminler, piridin alkaloidler ve radyoaktif bileşenler izlemektedir.

2.1.4. PAH Bileşiklerinden Antrasen ve Özellikleri



Şekil 2. 3. Antrasenin molekül geometrisi.

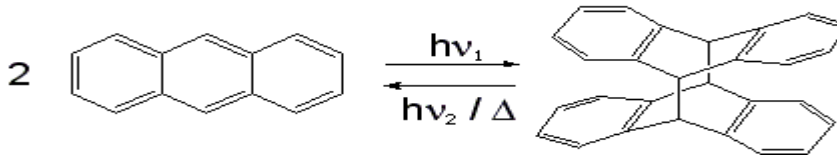
Tablo 2.6. Antrasenin genel özellikleri

Genel özellikleri	
Molekül formülü	C ₁₄ H ₁₀
Molekül ağırlığı	178.23 gr/mol
Faz	Katı
Yoğunluk	19.85 °C’ de 1.25 g/cm ³ , katı 220 °C’ de 0.969 g/cm ³ , sıvı
Erime noktası	218 °C, 491 K, 424 °F
Kaynama noktası	340 °C, 613 K, 644 °F
Diğer çözücülerde çözünürlükleri	Su: Çözünmez Metanol: 0.0908 g/L Hegzan: 1.64 g/L
Görünüşü	Açık kahverengi
Avrupa risk sınıflandırması	Tahriş edici Çevre için tehlikeli

Üç benzen halkasının yanyana kaynaşmasından meydana gelen polisiklik aromatik hidrokarbon olan antrasen kömür katranından sentezlenir. Antrasen alizarin kırmızısının suni olarak üretilmesinde kullanılır. Ayrıca keresteleri korumada, böcek ilacı ve kaplama maddesi olarak da kullanılmaktadır. Antrasen renksizdir fakat ultraviyole ışığı altında (400-500 nm’ de) mavidir. Elbs reaksiyonu adı verilen diarilketonlara sübstitüe olan o-metil veya o-metilen’ in siklodehidrasyonu ile antrasen laboratuarda elde edilir.

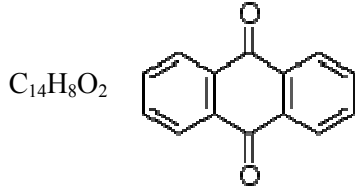
2.1.4.1. Antrasenin Reaksiyonları

Antrasenin UV ışığının saçılmasıyla fotodimeriz olabilme yeteneği vardır.



[4+4] sikloeklemeden oluşan iki kovalent bağla birleşirler. Dimer termal olarak veya 300 nm’ nin altındaki UV saçılmasıyla tekrar antrasene dönüşür. Antrasenin geri dönüşümlü bağlanma ve fotokromik özellikleri poli ve monosübstitüe antrasen türevlerinin kullanılmasında birçok

potansiyel uygulamaların temelidir. Reaksiyon oksijene karşı duyarlıdır. Antrasenin diğer reaksiyonlarının çoğunda, yüksek reaktivliğe sahip olduğundan merkez halka amaçlanmıştır. Antrasenin merkez halkasının 9 ve 10 nolu karbonlarında elektrofilik süstitüsyon meydana gelir, oksidasyonu sonucu antrekinon ($C_{14}H_8O_2$) oluşur.



Organik bir yarı iletken olan antrasenin emisyon spektrum pikleri 400-440 nm aralığındadır [28].

2.1.4.2. Antrasenin Toksisitesi

1. Antrasenin deriyle teması tahrişe neden olur, solunması durumunda ise mutajenik etki gösterir.
2. Göz ile teması halinde ciddi tahribatlara ve gözlerin kanlanmasına sebep olur.
3. Solunum yolunda tahribata yol açıp akciğer bronşuklarında zedelenmeye yol açar.
4. Genetik değişimlere yol açarak mutasyona sebebiyet vermektedir.
5. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar sonunda kansere yol açtığı rapor edilmiştir.
6. Alerjiye neden olup derideki kahverengi pigmentlerin küçülmesine, deride sivilcelerin çıkmasına ve beraberinde deri kanserine neden olmaktadır.
7. Antrasen genellikle bünyesinde akridin, kirlетici olarak barındırır ve bu bileşende antrasen gibi deri ve göz alerjisine, derinin tahriş olması neden olur.
8. Antrasene maruz kalma durumlarında eğer direkt güneş ışığından sakınılmazsa deride ciddi şekilde lekeler meydana gelir, yani güneş sinerjistik etki göstermektedir.
9. Ekolojik olarak hayvanların (balık, kuş gibi) çoğunda ölümlere, bitkilerde ise düşük oranda yeşerme veya bitki ölümlerine neden olur.

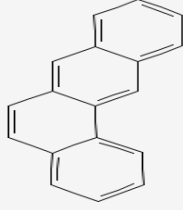
Antrasenin sudaki çözünürlüğü dikkate alınmayacak kadar küçük olup (litredeki çözünürlüğü 1 mg veya daha düşük miktardadır) sudaki yarılanma ömrü 20-200 gün arasındadır. Antrasen etlerden, içeceklerden veya hava atmosferinden organizmaya geçer ve çeşitli doku ya da organlarda birikir, çünkü biyolojik olarak birikme özelliğine sahiptir. Suda yaşayan canlılarda yapılan birçok araştırmada ve özellikle balıklarda tespit edilen antrasen miktarı sudaki miktarından çok daha fazla bulunmuştur.

2.1.5. Benzo[a]antrasen ve Özellikleri

Tablo 2.7. Benzo[a]antrasenin genel özellikleri.

Genel özellikleri	
Molekül formülü	C ₁₈ H ₁₂
Molekül ağırlığı	228.28788 g/mol
Faz	Katı
Yoğunluk	1.274 g/cm ³
Erime noktası	162 °C
Süblimleşme noktası	435 °C
Buhar basıncı (20 °C' de)	292 Pa

Benzo[a]antrasen organik maddelerin tam yanmaması sonucu oluşan polisiklik aromatik



hidrokarbondur. Benzo[a]antrasen molekülünde aromatik halkanın düzeni ile karsinojen özellikler ile ciddi bir korelasyon vardır. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve metabolitlerinin bir kısmı makromoleküler hücreler ile, DNA içeren hücreler,

etkileşip reaksiyona girdiği bilinir ve bu reaksiyonlarda da bu bileşenlerin toksikliği ve karsinojenliği hakkında bilgi verir. Oksitlenmiş benzo[a]antrasen enzimler ile karışık oksidasyon reaksiyonları verebilir ve bu durum benzo[a]antrasenin sudaki çözünürlüğünü artırır. Bu çözünmenin artması ile idrar salgısı miktarı artar. Bu oksidasyon olayının minör bir bileşeni olan diol epoksitler DNA ile direkt ve hızlı bir şekilde reaksiyona girerler ve yüksek karsinojenik etki gösterirler

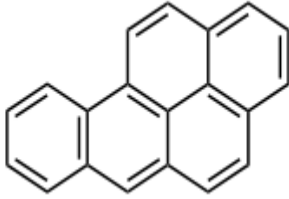
Benzo[a]antrasen ve benzer polisiklik aromatik hidrokarbonların toksik etkisi öncelikle dokulara yönelik olup hücrelerin çoğalmasını kontrol altına almakla başlar. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar, polisiklik aromatik hidrokarbonlara maruz kalma hamatopietik sistemi hasara uğratarak, agranülositoz kadar hızlı ilerleyen anemiye sebep olabilir. Ayrıca lenf sistemi üzerinde ciddi tahribatlara yol açabilir. Oral ve parenteral olarak maruz kalmalarda birçok etki görülmüştür. Benzo[a]antrasene maruz kalmakla ilgili öncelikli kaygı onun potansiyel bir karsinojen olduğudur. İnsanlarda karsinojen etkinin direkt kanıtı olmamakla beraber benzo[a]antrasen, bilinen diğer polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi kömür katranı, is, mikrodalga pişirme ve sigara tütününün bir bileşenidir. Hayvanlarda ise bu bileşenin karsinojenik etkisinin yeteri kadar kanıtı mevcuttur. Farelerin oral olarak benzo[a]antrasene

maruz kalmasının sonucunda çeşitli yaşamsal sistemlerinde birçok hasar meydana gelmiştir ve bu etkilerin sonunda karsinojen olduğu, insanlar için ise muhtemel karsinojen olduğu ilgili sağlık kuruluşları tarafından rapor edilmiştir [29].

2.1.6. Benzo[a]piren ve Özellikleri

Tablo 2.8. Benzo[a]pirenin genel özellikleri.

Özellikleri	
Molekül formülü	C ₂₀ H ₁₂
Mol kütlesi	252.31 g/mol
Yoğunluk	1.24 g/cm ³
Erime noktası	179 °C
Kaynama noktası	495 °C



Benzo[a]piren, C₂₀H₁₂, beş halkalı bir polisiklik aromatik hidrokarbon olup çok yüksek karsinojenik ve mutajenik etkiye sahiptir. Katı olan kristal yapısı sarı renklidir. 300-600°C sıcaklık aralığında tam yanmanın olmadığı durumda oluşan bir üründür. 19. yüzyılda İngiltere’de endüstri çalışanlarında görülen cilt kanseri vakalarının araştırılması sonucunda tespit edilmiştir. 20. yüzyılda ise canlılarda yapılan laboratuvar araştırmalarında kötü huylu ur ve tümör oluşturduğu bulgularına varılmıştır.

2.1.6.1. Benzo[a]piren Kaynakları

1. Izgarada pişirilen gıdalarda
2. Otomobil eksoz dumanında (özellikle dizel motorlu taşıtlarda)
3. Sigara tütünlerinde
4. Kömür katranı öncelikli benzo[a]piren kaynaklarıdır.

2.1.6.2. Benzo[a]pirenin Toksisitesi

Kanser ile benzo[a]piren arasındaki ilişki son 30 yılda çok geniş bir araştırma alanı olmuştur. Özellikle insanlarda spesifik benzo[a]piren kaynakları ve kanser arasında bağ kurmak, risk miktarını tespit etmek zordur. Yapılan bir araştırmada sigara içen kişilerde vitamin

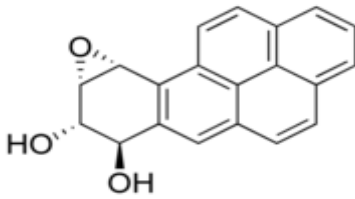
A ve anfizem arasında bir ilişkinin olduğu tespit edilmiştir [30]. Farelerde yapılan bu çalışmada vitamin A miktarını düşürdüğü tespit edilmiştir.

1996’ da yapılan başka bir çalışmada sigara tütünü ile akciğer kanseri arasında ciddi ve açık kanıtların olduğu rapor edilmiştir [31]. Sigara tütününde bulunan benzo[*a*]piren akciğer hücrelerinde genetik hasarlara ve dişi tümörünün akciğer DNA’ sında tahribatlara yol açtığı bilinmektedir.

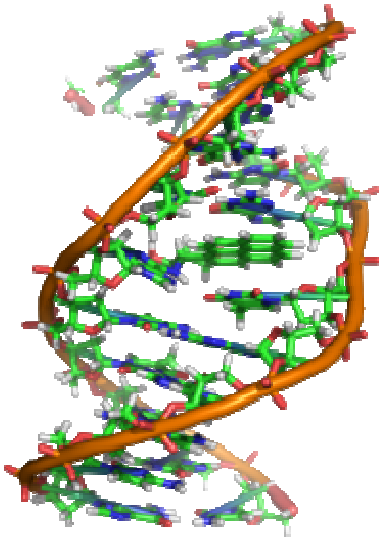
2001 Ulusal Kanser Enstitüsünün yaptığı bir çalışmada ızgarada pişirilen özellikle biftek, derisi olan tavuk ve hamburger gibi gıdalarda benzo[*a*]piren miktarının yüksek olduğu bulunmuştur. Japon bilim adamları pişmiş etlerin mutajenler ve DNA’ nın yapısını bozabilecek kimyasallar içerdiğini tespit etmişler. Gıda toksinlerinden korunmak için normal ihtiyaçlardan dolayı stikrom P450 gibi detoksifikasyon enzimlerinin aktiviteleri sindirim sisteminde artar. Böylece birçok durumda benzo[*a*]pirenin az miktarları kana geçmeden önce sindirim enzimleri tarafından metabolize edilir fakat akciğerler bu şekilde korunma şansına sahip değiller.

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada stikrom P450 1A1 (CYP1A1) ve stikrom P450 1B1(CYP1B1) koruyucu ve benzo[*a*]pirenin toksisitesini önlemek için gereklidir. Çeşitli fare türlerinde CYP1A1 ve CYP1B1 uzaklaştırması ile ilgili yapılan deneysel çalışmalarda; CYP1A1’ in memelileri düşük dozlardaki benzo[*a*]pirenden koruduğu ve yüksek dozlardaki benzo[*a*]pirenin biyolojik olarak birikmesini önlediği görülmüştür. Toksik olan benzo[*a*]piren CYP1B1 ile uzaklaştırılmaması durumunda benzo[*a*]piren-7,8-dihidrodiol-9,10-epoksit formunu alıp DNA’ ya direkt saldırı yapacak hale gelir [32].

2.1.6.3. Benzo[*a*]pirenin DNA ile Etkileşimi



Şekil 2.4. Benzo[*a*]pirenin diol-epoksit kimyasal yapısı [33].



Şekil 2. 5. Mutajen olan benzo[*a*]pirenin DNA ile etkileşimi [33].

Diol-epoksit formu alan benzo[*a*]piren nükleofilik guanin nükleo bazına N2 pozisyonunda kovalent olarak bağlanır. X-ray kristalografik ve NMR yapı çalışmaları bu bağlanmanın çift sarmallı DNA' nın yapısını bozduğunu göstermiştir. DNA' nın eşlenmesini bozan ve mutasyonlara neden olan bu durum kanser oluşumu olarak açıklanır. Bu etkinin mekanizması aflatoksinin mekanizması ile benzerdir ve guaninin N7 pozisyonuna bağlanırlar [34, 35]. Benzo[*a*]piren diol epoksit spesifik olarak koruyucu p53 genini hedef alır. Tümör yok edici özelliğinden ve hücre yenilemesini düzenleyen bu gen bir transkripsiyon etki genidir. p53 geni içinde timinin guaninle yer değiştirmesi benzo[*a*]piren diol-epoksiti bazı hücrelerin tümörü durdurma yeteneğini inaktive ederek kansere neden olur [36].

Benzo[*a*]piren üç enzimatik reaksiyonun sonunda karsinojen etki gösteren diol-epoksit formuna geçer.

1. İlk aşamada benz[*a*]piren-(+)-benzo[*a*]piren-7,8-dihidrodiol içeren çeşitli ürünleri sitokrom P4501A1 ile oksitlenir [37].
2. İlk aşamada oluşan bu ürünler (-)-benzo[*a*]piren-7,8-dihidrodiol halkasının açılması ile epoksit hidrolaz ile metabolize edilir.
3. Benzo[*a*]piren-7,8-dihidrodiol-9,10-epoksit ürünün sitokrom P4501A1 bir başka reaksiyonundan sonra nihai karsinojen form alan benzo[*a*]piren, DNA' ya kovalent bağlar ile bağlanır.

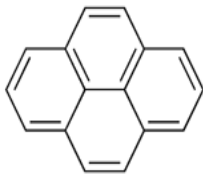
Benzo[*a*]piren sitozol' da AHR (aril hidrokarbon reseptör) ile sitokrom P4501A1 (CYP1A1) bağlanmasına neden olur. Bağlanma üzerinde alıcıya dönüştüğü yerde çekirdek, ARNT (aril hidrokarbon çekirdeksel yer değiştirici reseptör)' ye dimerize olur ve daha sonra DNA' daki bazı genler ksenobiotik cevap elementleriyle bağlanırlar. Bu basamaklar CYP1A1

proteini üretiminin artmasıyla bazı genlerin transkripsiyonunu artırır [38]. Bazı polikloronatbifenil ve dioksinler ile CYP1A1' in indüklenme basamakları benzerdir. Son zamanlarda benzo[a]pirenin insanlarda aktif yer değiştirici olduğu saptanmıştır [40]. Farelerin benzo[a]pirene maruz kalmasıyla oluşan mide tümörü için EPA tarafından $7.3 \text{ (mg/kg/gün)}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır [40]. Soluma ile alınan benzo[a]piren risk miktarı $6.1 \text{ (mg/kg/gün)}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır [41].

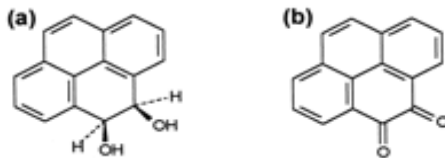
2.1.7. Piren ve Özellikleri

Tablo 2.9. Pirenin genel özellikleri.

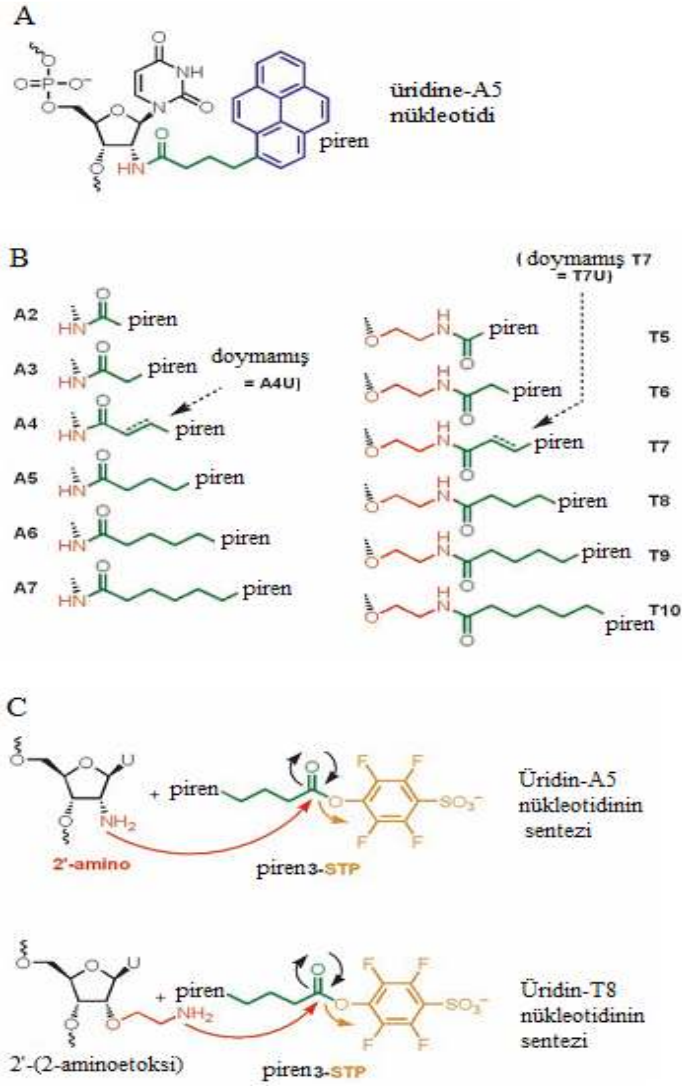
Genel Özellikler	
Molekül Formülü	$C_{16}H_{10}$
Molekül kütlesi	202.25 g/mol
Görünümü	Reksiz katı (birçok örnekte sarı renkli safsızlık olarak eser düzeyde bulunur)
Yoğunluk	1.271 g/ml
Erime noktası	145-148 °C (418-421 K)
Kaynama noktası	404 °C (677 K)
Sudaki çözünürlüğü	0.135 mg/l
Temel riski	Tahriş edici
Faz davranışları	Katı, sıvı, gaz olabilir



Piren, dört benzen halkasının kaynaşmasından meydana gelen bir polisiklik aromatik hidrokarbon olup düz bir aromatik yapıya sahiptir. Piren benzen halkalarının kaynaşması şekli itibariyle polisiklik aromatik hidrokarbonlar içinde en küçük yüzeye sahiptir. Organik maddelerin tam yanmaması sonucu oluşan bu bileşik, benzer bileşikler gibi kömür katranından izole edilebilir. Birçok rezonans yapıya sahip olan piren bu grubun bir diğer dört benzen halkalı üyesi olan florenten ile izomerdir [42].



Şekil 2.6. Enzimatik reaksiyonlar sonucu dokularda piren diol-epoksit formu **(a)** *cis*-4,5-dihidro-4,5-dihidroksipiren (**PYRdHD**); **(b)** piren-4,5-dion (**PYRQ**) [43].



Şekil 2. 7. Laboratuar ortamında piren ile RNA etkileşmesi basamakları [44].

Laboratuar koşullarında pirenin RNA ile direk etkileştirilmesi sonucu bazlar ile kovalent bağ oluşturmaktadır.

Şekil A' da işaretlenmiş pirendeki üridin nükleotit ile birleşir.

Şekil B' de piren türevi gösterilmiştir. Piren ile nükleotitlerin yarı zincir eşleşmeleri gösterilmiştir. Bu eşleşmenin her biri 2-amino grubu ile amin bağları ile olur. Bu türevler riboz halkası ve piren arasındaki 2. ve 10. hidrojeniz atomlar arasındadır.

Şekil C' de 4-sülfo-2,3,5,6-tetraflorofenil (STP) esterleri verilmiştir [44].

Piren boyaların, pestisitlerin (böcek öldürücü), farmasotöklerin, plastiklerin yapımında ticari olarak kullanılır ve floresans spektroskopisi için moleküler prob olarak çok büyük bir öneme sahiptir. Yüksek bir kuantum verimine sahip olup etanolde (273 K' de) yarılanma ömrü 410 salisedir. Pirenin floresans emisyon piki solventlerin polaritesine karşı çok duyarlıdır, bu

yüzden çevresel solvent tayininde prob olarak kullanılır. Piren dimerik bir yapı benimser ve moleküler dizilimi sandiviç çifti biçimindedir. C_{2h} simetrisine sahip bu molekül çözücülerde dimerik bir yapı sergiler [45-48].

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda piren ile beslenen farelerde bir böbrek hastalığı olan nöropatinin geliştiği rapor edilmiştir. Ayrıca fare böbreğinin ağırlığında bir azalma ve karaciğer ağırlığında bir artmanın olduğu görülmüştür. Aynı zamanda kanda küçük değişimler gözlenmiştir [49, 50].

Yüksek dozlarda solunan dizel motorlu taşıtların egsoz gazları akciğer tümörünü meydana getirmekle beraber insanlarda olası kanser nedeni olarak riskli bir bileşendir. Nitropiren dizel motor egsoz gazlarından oluşan ve vücutta direct DNA ile etkileşen yüksek metabolizma aktivitesine sahiptir. DNA' nın normal işleme basamaklarında çeşitli hatalara neden olarak replikasyon hatalarına veya mutasyona sebep olabilmektedir. Ortamdaki pirenin varlığında nitropirenin metabolitik etkisi artmaktadır. Eğer piren deriye temas ederse ve güneşten korunulmazsa pirenin tahriş edici etkisi daha da artar, deride ciddi bir biçimde lekelenmeler görülür [51].

2.2. Literatürde PAH' lar ile İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar

Christoper ve arkadaşları iki deniztarağı türü olan, Mya arenaria ve Protothaca steminea canlılarını küçük bir cam akvaryum içinde 1-hidroksi piren ve pirene maruz bırakmışlar. Deniztaraklarını 1-hidroksi piren ve pirene maruz bırakıldıktan 10 gün sonra bu canlıların dokuları ve deniz suyu HPLC, floresans spectroscopy, HPLC-ESI-MS, GC-MS ve ¹H NMR spektrometrileri kullanılarak analiz edilip pirenin metabolizması araştırılmıştır. Bu çalışmada piren metabolitleri her iki deniztarağı türünde üretildi. Bu metabolitlerin tanımlanması ve izolesi amacıyla HPLC, floresans spectroscopy, HPLC-ESI-MS, GC-MS ve ¹H NMR spektrometrileri kullanılmıştır. Piren-1-sülfat suda çözünebilen metabolit olarak tanımlandı. Deniztaraklarından piren veya 1-hidroksi piren maruz kaldığında hidroksi piren her iki canlıda minör metabolit formunda tanımlandı, piren ve 1-hidroksi piren maruz kaldıklarında pyrenediol hidrojen sülfat minör metabolit olarak tanımlandı [52].

Janoszka ve arkadaşları, ev ortamında pişirdikleri gıdalarda alevle direkt etkileşen etlerde meydana gelen PAH' ları analitik prosedürleri kullanarak tayin etmişler. Polonyada henüz o güne kadar analiz edilmeyen gıdalarda özellikle et örnekleri matrikslerinde PAH fraksiyonlarının seçici izolasyonu silikajel üzerine yapılıp kolon kromatografi ile katı faz ekstraksiyonunu C18 ile yapmışlar. Bu önemli bileşenlerin tanımlanması ve nicel olarak

hesaplanması PLC-MS ve GC-MS ile başarılmıştır. Izgara türü pişirmelerde beş tane PAH bileşeni tayin edilip nicel olarak hesaplanmıştır. Bu bileşenler:

Floranten, benzo[*a*]antrasen, benzo[*k*]floranten, benzo[*a*]piren, benzo[*g,h,i*]perilen' dir. Bu türlerin tayini amacıyla mobil faz olarak asetonitril, diklorometan, toluen, n-hegzan, ve metanol kullanılmıştır. Et örneklerinde tayin edilen PAH miktarları 2.43-16.10 ng/g olarak bulunmuştur [53].

Aygün ve Kabadayı bu çalışmalarında, ızgarada pişen et örneklerinde benzo[*a*]pirenin (BaP) nicel tayini için geliştirdikleri HPLC prosedürünü Türk yemekleri örneklerine uygulamışlar. Izgarada pişen gıda örnekleri öncelikle bazık ortamla etkileştiriliyor sonra hegzan fazı içine ekstrakte ediliyor ve saflaştırılmış XAD-2 polimerik reçinesi üzerine adsorplandıktan sonra n-hekzan / diklorometan (9: 1) (v/v) karışımı ile elue ediliyor. BaP' nın tayini ve nicel hesabı HPLC- floresans dedektörü ile 254 – 355 nm' de yapılıyor. HPLC izokrotik madde ve mobil faz % 75 ACN- % 25 su, 1 ml/dk akış hızı koşullarında elde ettikleri piklerin alanları standart çözeltiler ile karşılaştırılarak gıdalardaki BaP tayin edilmiştir.

Tayin edilen BaP miktarı;

Izgarada: $43,80 \pm 1,80 \mu\text{g/kg}$

Köfte : $37,60 \pm 3,84 \mu\text{g/kg}$ [54].

Gimeno ve arkadaşları, 10 tane polisiklik aromatik hidrokarbonun tayini için iki metod geliştirmişler. Bu iki yöntemde HPLC temeli üzerine kuruludur, fakat bir yöntemde foleresans dedektör kullanılırken diğer yöntemde APCI-MS kullanılmıştır. Geliştirilen bu iki metod deniz suyu ve sediment örneklerine uygulamıştır. Su örnekleri analizi için katı faz ekstraksiyonu ile on-line ikili ayırma sistemi kullanmışlar. Katı faz ekstraksiyonunda sorbent olarak sitiren divinilbenzen kopolimerini kullanmışlar. Su örnekleri önderiştirilmeden önce % 20' lik asetonitril ilave edilmiş ve birçok bileşende % 70' den daha yüksek oranlarda verimin olduğu görülmüştür. Floresans dedektörü ile geliştirilen metodda on bileşenin tamamı tayin edilmiş ama bunlardan sadece altı tanesinin konsantrasyonu $0.02 \mu\text{g/l}$ ' den daha yüksek olarak hesaplanabilmiştir. Sediment örneklerini analiz etmek için bu örnekler diklorometan ile eksrakte edildi ve standart ekleme yöntemi uygulandı. Alınan deniz suyu ve sediment örneklerinde benzo[*b*]floranten, benzo[*k*]floranten, benzo[*a*]piren, benzo[*ghi*] ve indeno[*1,2,3-cd*]piren bileşenleri nicel olarak hesaplandı. % 20' lik asetonitril ilave edilen ve 25 ml' lik örneklerin on-line katı faz ekstraksiyonu ile önderiştirilmesi sonucu her iki yöntemin limit tayin aralıkları şöyle bulunmuştur:

Floresans metodda, bileşenler bağlı olarak $0.004\text{-}0.3 \mu\text{g/l}$ olarak bulunurken sadece yedi bileşenin tayin edilebildiği APCI-MS metodunda ise sınır değerleri aralığı $0.006\text{-}0.7 \mu\text{g/l}$ olarak bulunmuştur [55].

Ferrari ve arkadaşları, HPLC-MS ve HPLC-FD tekniklerini kullanarak sığır cinsi hayvan idrarlarında 1-hidroksi piren tayin edip nicel olarak hesaplamışlar. Sığırların sidik örneklerinde 1-hidroksi piren nicel olarak tayini için bir analitik metod geliştirmişler. Bu metod katı faz ekstraksiyonu ile zenginleştirme yapılarak, eluent olarak dikolorometan kullanılan enzimatik bir hidroliz sistemi temeli üzerine kuruludur. HPLC-MS ve HPLC-FD ile analiz yapılmadan önce silikajel üzerine saflaştırma işlemi yapılmıştır. Sidik örneklerindeki 1-hidroksi piren pg düzeyindeki düşük miktarının duyarlı bir şekilde açıklayabilmek amacıyla HPLC elektrosprey iyonlaştırma ile negatif modda SIM çalışmışlar. Bu metod, şehirsel ve kırsal bölgelerde yaşayan sığırlardan alınan sidik örneklerine 1-hidroksi piren tayini amacıyla başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Sidik konsantrasyonları şehirsel bölgelerde kapalı alanlarda yaşayan sığır türlerinde oldukça önemli bir seviyede bulunmuştur. Bu değer ortalama olarak 8.6 µg/l olarak bulunmuştur [56].

Ikenaka ve arkadaşları, suda yaşayan kabuklu (*Daphnia magna*) ile pirenin metabolizmasını incelemişler. Suda yaşayan kabuklu *Daphnia magna* ekotoksikolojik çalışmalar için önemli bir türdür ve çevresel risk tayini için sıkça kullanılan bir test organizmasıdır. ksenobiotik mekanizmalı olmasına rağmen bu tür organizma ile detaylı çalışmalar yapılmamıştır. Bu çalışmada piren model madde olarak kullanıldı ve *Daphnia magna* da ksenobiotik metabolizmanın mekanizması araştırıldı. 24 saatlik pirene maruz bırakılmanın sonunda *Daphnia magna*'nın pireni metabolize edebildiği ve suda çözünen metabolitleri biotransform edebildiği görüldü. Diğer taraftan pirenin mekanizması stikrom (cytochrome) P450 (CYP) inhibitörü olarak dikkate değer bir belirteç olduğu görülmüştür. Bu araştırmalar gösterdi ki, *Daphnia magna* ile pirenin biotransformasyonunda CYP' nin katılması ile oksidasyon gerçekleşir. *Daphnia magna* ile piren mekanizmasının formu β-glucosidase, β-glucuronidase, sülfat ile de-konjugasyonu yardımıyla LC-ESI/MS/MS cihazıyla tanımlanmıştır. Deneysel çalışmalar sonunda toplam piren metabolizlerinin % 52' sinin 1-hidroksi sülfat içine biotransfer olduğu ve % 73' den daha fazla bir kısmının ise oksidize piren formuna biotransfer olduğu görülmüştür. Sonuçlar göstermiştir ki, CYP ve birçok konjugasyon enziminin biotransfere katıldığı, ksenobiotiklerin eliminasyonu ve metabolizması için *Daphnia magna* önemli bir role sahiptir [57].

Iglesias ve arkadaşları hava örneklerinde BaP analizi için yöntem tayin etmişler. Çalışmalarında soxhlet, ultrasonic ve mikrodalga yardımcı (MAE) ekstraksiyonunu iki referans maddesine uygulamışlar. Bu standart referans maddeler; "kent tozları" 1649a ve "kent partikül maddeleri" 1648' dir. Her yönteminde yeterli ve doyurucu sonuçlar vermesine rağmen analizlerin hızlı yapıldığı ve çok düşük miktarda solvent gerektirdiği için mikrodalga yardımcı (MAE) ekstraksiyonu tercih edilmiştir. Sonuç olarak HPLC-UV-FL ve GC-FID teknikleri

karşılaştırılmıştır. HPLC tekniği GC tekniğinden daha duyarlı sonuçlar vermiştir. Gerçek atmosferik partiküller İspanya' nın Coruna kentinin atmosferinden alınmıştır. Bu partiküller (PM₁₀, PM_{2.5}, PM₁) çeşitli yollarla gaz fazına alınarak toplanmıştır. Örneklerdeki BaP konsantrasyonları nicel olarak hesaplanmış ve benzer olarak İspanya' nın diğer kentlerinde de örnekler alınarak analiz edilip sonuçlar rapor edilmiştir [58].

Shao-Xiong ve arkadaşları cırcır böceğinde benzo[a]pirenin kinetik toksisitesini incelemişler. Böcek içine ¹⁴C işaretli benzo[a]piren enjekte edildikten sonra pirenin metabolik olarak dağılması araştırıldı. ¹⁴C işaretli benzo[a]piren cırcır böceğinde üst deri, kas, bağırsak ve sinir sisteminde hızlı bir şekilde tahribata başladı. Bu dokularda benzo[a]pirenin ortalama yarılanma süresi aralığı 8.9-17.8 saat olarak saptandı. ¹⁴C işaretli benzo[a]pirenin çok az bir kısmı cırcır böceğinin dışkısında enjeksiyondan 48 saat sonra bulundu diğer kısmı ise böceğin metabolitleri tarafından metabolize edildi. GLPC-MSD ve HPLC/ES-MS analizleri gösterdi ki; böcek dışkısında enaz iki BaP metaboliti vardır. Bu metabolitler benzo[a]piren qionin ve benzo[a]pirenin diol türevleri olarak tanımlanmıştır [59].

Kazerouni ve arkadaşları 200 çeşit gıda örneğinde benzo[a]pirenin analizini yapmışlar. Hayvansal çalışmalar göstermiştir ki benzo[a]pirenin alımı organizmanın birçok bölgesinde tümör oluşumuna veya tümör miktarının artmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada FFQ (food frequency Qestionnaire) gıdalarında, ki bu gıdalar karışık gıdalardır, her birinde BaP seviyesi ölçülmüştür. Bu karışık örneklerin bir kısmı NHANES-II (Second National Healt and Nutrition Examination Survey)' den temin edilmiştir. Analizlenen bu gıda çeşitleri, halkın geneli tarafından tüketilen gıdalardır. Et örnekleri kontrollü şartlar altında ve farklı tekniklerle Çin' in çeşitli restoranlarında pişirilmiştir. Et örnekleri dışındaki gıda örnekleri Çin' in çeşitli süpermarketlerinden temin edildi. BaP' nin nicel tayini ince tabaka kromatografi (TLC) ve HPLC teknikleriyle yapıldı ve her iki yöntemde de yüksek bir korelasyon elde edildi. BaP' nin en yüksek değerleri (4 ng/g pişirilen ette) ızgara, kızartma, biftek, hamburger ve iyi pişirilen tavuk derisinde bulunmuştur. BaP miktarı et türü olmayan gıdalarda genellikle düşük bulunmuştur. Tahıl örneklerinde 0.5 ng/g seviyesinde tespit edilmiştir. Çin halkına ekmek/tahıl % 29, kızartma/ızgara % 21 oranında BaP açısından kaynaklık ettiği istatistiksel olarak hesaplanmıştır [60].

Silvia ve arkadaşları HPLC-UV ile cachaça' da PAH' ları tayin etmişler. Cachaça, şeker kamışının fermantasyonundan elde edilen alkollu bir içecektir. Bu çalışmada Brezilya' da ticari olarak satılan 25 çeşit cachaça markasında beş tane PAH' ın varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla geliştirilen yöntemde; su-dimetilformamidin 9:1 oranı ve siklohegzan ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılmıştır. Clean-up (saflaştırma) işlemi silika jel kolonu üzerine yapılmış ve HPLC-UV ile tayin yapılmıştır. PAH' ların pikleri GC-MS ile tanımlanıp teyit edilmiştir. PAH' ların değişken

seviyeleri örneklerin analizleri sonucu tayin edildi. 1.94 µg/l' den daha düşük miktarlar tayin edilemedi. Bu çalışma sonuçlarının doğrultusunda şeker kamışının damıtılarak elde edilen sıvılardaki PAH' ların şekerden bulaştığı sonucuna varılabileceği rapor edilmiştir [61].

Busetti ve arkadaşları İtalyan atık suları ile sulanmış bitkilerde, katı ve sıvı örneklerde 16 tane PAH' ı tayin etmişler. Atık sulara uygulanan katı faz ekstraksiyonu 16 PAH' ın birlikte verimleri % 70' den fazla olduğu tespit edilmiştir. Katı faz ekstraksiyonun saflaştırma basamakları lağım suyu ve atık çamuruna uygulanmış ve verim aralığı lağım suyunda % 73-92; atık çamurunda % 71-89 olarak bulunmuştur. Geliştirilen metod sulu ve katı örneklerdeki PAH' ların tayini için kullanılmıştır. Katı ve sıvı örneklerde ortalama PAH konsantrasyonları 1.12-4.62 µg/L aralığında bulunmuştur. Yöntemin güvenilirliği araştırmak amacıyla EPA referans maddeleri IRM-104 kullanılmıştır. Analiz amaçlı HPLC-DAD ve HPLC-FLD kullanılmıştır [62].

McClaine ve arkadaşları, HPLC-UV-MS ile yakıt prolizi sonucu oluşan benzo[ghi]naftol[8,1,2-bcd] perilenin tayini yapılmıştır. C₂₈H₁₄' un izomeri olan benzo[pgr]nafto[8,1,2-bcd]perilen ve fenantro[5,4,3,2-efghi]perilen çiftinin pirolizi sonucu oluşturulan ara bileşikten faydalanarak bu iki bileşen tayin edilmiştir. Benzo[ghi]nafto[8,1,2-bcd] perilenin olduğu karışım ortamında diğer PAH gruplarında tayin edilmiştir [63].

Hua ve arkadaşları, Synchronous floresans spektroskopisi (SFS) ile toprak ekstraktlarında PAH' ları tayin etmişler. SFS yöntem farklı dört PAH bileşeni içeren kirlenmiş topraklara direkt olarak uygulanmıştır. Yöntemi optimize edilmiş ve geçerliliği tespit edilmiştir. Sonuçlar SFS' nin benzo[a]piren analizi için yüksek duyarlılık ve seçicilikte kullanılabileceğini belirtmişlerdir. SFS ile HPLC yöntemi arasında PAH tayini açısından iyi bir uyumunun olduğu rapor edilmiştir [64].

Pekey ve arkadaşları İzmit körfezi atmosferinde biriken PAH' ları tayin etmişler. HPLC-UV tekniği kullanılarak 16 PAH bileşiği örneklerde tayin edilmiştir. Endüstrinin ve trafiğin yoğun olduğu bölgelerde alınan örneklerde PAH konsantrasyonları yüksek bulunmuştur. Birikme örneklerinin her iki (yaş ve kuru) çeşidinde de önemli mevsimsel farklılıklar gözlenmiştir. Mevsimlik yaş birikme örneklerinde ortalama PAH konsantrasyonları yazın 38.6 µg.m⁻².cm⁻¹ , kışın 57.2 µg.m⁻².cm⁻¹ olarak bulunmuştur [65].

Hasbi ve arkadaşlarının on-line zenginleştirme sistemli HPLC ile atmosferik partiküllerde PAH tayinini hızlı ve duyarlı şekilde yapmışlar. Bu sistemde örnek çözeltisinin 1000 g/L' sinin enjeksiyonuna izin verdiğinden örnek hazırlamada buharlaştırma basamağı elimine edilebilmiştir. PAH verimleri % 87-120 arasında bulunmuştur. LOD 0.02-0.023 ng/ml olarak bulunmuştur. HPLC pik alanları ve PAH konsantrasyonları arasında düzgün bir korelasyon tespit edilmiştir. Ayrıca metod buharlaşma basamağını içeren yöntemlerle

karşılaştırıldığında atmosferik partikül örneklerindeki PAH tayini açısından daha avantajlıdır [66].

Rezek ve arkadaşları uzun süreli kirletilmiş topraklardan PAH içeriğinin düşüşüne karaçayırın etkisini araştırmışlardır. Orijinal topraklarda bulunan major kirleticiler olan flurentene ve piren en iyi indirgenler olarak bulunmuştur. Ayrıca diğer bileşikler benzo[a]piren ve benzo[ghi]piren bile başarılı bir şekilde indirgendi. Dibenzo[a,h]antrasen ve indeno[1,2,3-cd] piren önemli indirgenme karakteri göstermeyen PAH' lardandır. Toprak tabakaları arasında önemli farklar olmasına rağmen sonuçlar arasında ciddi bir fark bulunamamıştır. Bununla birlikte düşük PAH konsantrasyonları analiz edilen toprak tabakalarının alt kısmında tespit edilmiştir [67].

Deschamps ve arkadaşları su örneklerinde özellikle düşük PAH içerikli yağmur suyu örneklerinde 15 PAH' ın analizini ekstraksiyonu izleyen HPLC-FLD kullanarak yapmışlar. Optimum örnek hacmi 10 ml ve ekstraksiyon süresi 140 dk olarak belirlenmiştir. Optimize edilen metodun tekrarlanabilir, doğrusal olduğu verimin % 87.8' den büyük olduğu bulunmuştur. Optimize edilen metod şehirden alınan altı yağmur suyu örneğine başarılı şekilde uygulanmıştır. Toplam PAH konsantrasyonları 31-105.1 ng/L aralığında bulunmuştur. Mevsimsel değişiklikler tespit edilmiş ve ortalama üç PAH' ın (fenantren, florenten, piren) en yüksek konsantrasyonlarda olduğu gözlenmiştir [68].

Moret ve arkadaşları eski demir yolu bağlantılarından açığa çıkan katran ruhu ile kirlenmiş alanlardan toplanan toprak ve yağların PAH içeriğini araştırmışlar. Kirlilik kaynağına 1m kadar uzakta bulunan bölgelerden alınan toprak örneklerinin PAH içeriği 114.7-3121.8 µg/kg olarak bulunmuştur. Tren yolu bağlantı noktasından uzaklaştıkça PAH konsantrasyonunun hızlı bir şekilde düştüğü tespit edilmiştir. Kırsal kesimde toplanan yağ örneklerinin ekstraksiyonlarında yüksek miktarda küçük molekül ağırlıklı PAH' lar tayin edilmiştir. Yağ örneklerinde benzo[a]piren ve yüksek molekül ağırlıklı PAH' lar bulunamamıştır. PAH tayini amacıyla HPLC ve spektrofotometrik tayin cihazları kullanılmıştır [69].

Boysen ve arkadaşları, spesifik yapı metodu kullanılarak insan dokularında benzo[a]piren protein ve DNA' ya etkisini araştırmışlar. Bu amaçla kullanılan metodlar HPLC-FD ve GC-MS' dir. Yeterli duyarlılık elde edilememesinden dolayı bu metodlar genellikle yüksek miktarlarda DNA (> 100 µg) veya protein (50-100 mg) kullanılır. (7R, 8S) dihidroksi(9S, 10R)epoksi-7, 8, 9, 10 , tedrohidrobenzo[a]piren (BPDE)' dan türetilen, DNA ve proteinlerle etkileşim sonucu açığa çıkan tetraoller birçok çalışmada rapor edilmiştir. Analiz edilen 705 örneğin % 39' da BPDE-DNA etkileşimi 772 örneğin % 59' da ise BPDE- protein etkileşimi tespit edilmiştir. Örneğin, BPDE-DNA etkileşimi sigara içenlerin % 45' inde sigara içmeyenlerin % 52' inde,

bireysel mesleki maruz kalanların % 39' unda ve çevresel maruz kalan insanların % 34' ünde görülmektedir [70].

Bogusz ve arkadaşları, zeytin yağı örneklerinde benzo[a]pirenin katı faz ekstraksiyonu ve düşük basınç, GC-MS ve hızlı HPLC-FD ile tayinini yapmışlar. Örneklerdeki BaP miktarı tayini izotop seyreltme metodu veya iç standart benzo[k]flurenten ile yapılmıştır. LOD değerleri GC-MS için standart kolonda 1 ng/g, LP (low pressure) kolonunda 1.6 ng/g, HPLC standart kolonunda 0.5 ng/g, HPLC dönör akseptör kolonunda 0.3 ng/g olarak bulunmuştur. Bu metodun uygulanabildiği örneklerde verim % 80' den daha fazla olarak bulunmuştur. Geliştirilen (LP-GC-MS ve HPLC on DACC) yöntemleri ile analiz süreleri sırasıyla 8 ve 5 dk. düşürmek mümkün olmuştur. Bu metod zeytinyağı örneklerindeki BaP' nin rutin tayinlerine başarılıca uygulanmıştır [71].

Baek ve arkadaşları, ADSS' nin hedef bileşiklerin tek kaynağı olduğu kontrollü atmosferde yılanmış ve sulandırılmış sigara dumanlarını uçucu organik bileşenler tayin edilmiştir. ADSS Kentucky 1R4F referans sigarası ve sekiz ticari markayı içeren çeşitli sigaralar kullanılarak 30 m³ lük çevresel test alanında oluşturulmuştur ve 24 deney yapılmıştır. Hedef analitler üç gruba ayrılmıştır. Örneğin buhar ve çevresel sigara dumanı için işaretli faz partikülleri karbonil içeren uçucu organik bileşenler ve PAH' lardır. 16 PAH bileşeni arasından benzo[a]antrasen ve BaP' dan sonra krisin bol miktarda bulunmuştur. BaP ve Ba' nın ADSS partikülleri içinde ortalama içeriği sırasıyla 12.8 ve 21.5 mg/g bulunmuştur. Bu değerler daha önce yapılan diğer çalışmalardan 1.5-3 kat daha fazla bulunmuştur. Bir referans sigarada ortalama olarak 209 ng, ticari sigarada 215 ng BaP bulunmuştur. Tayini yapılan bu bileşenler için GC-MS metodu kullanılmıştır [72].

Capotorti ve arkadaşları, kirli topraktan izole ettikleri dört PAH' ın (fenantren, antrasen, piren, benzo[a]piren) metabolizmanın *Aspergillus terreus* strain ile sıvı kültür ortamında araştırmışlar. Et suyunun fermantasyonunun solvent ekstraksiyonundan sonra ana bileşenler HPLC-MS tekniği ile tayin edildi. Bu bileşenler, tek karbon kaynağı olarak fenantren üzerinde kolay gelişebilme yeteneği olabilen, kirli topraktan ayrılan mikrobiyal consortia ile kolayca indirgenebildi. Model bileşik olarak kullanılan 9-fenantren sülfatın biyo indirgenmesi ve toksisitesi de çalışıldı [73].

Moret ve arkadaşları, konserve gıdalarındaki bitkisel yağlarda PAH' ları tayin etmişler. Bitkisel ürünlerin yağ örneklerinde % 15' den fazlasında 2 ppb benzo[a]piren tespit edilmiştir. En yüksek PAH konsantrasyonu kızartılmış mantar örneğinin yağında, 11.3 ppb BaP ve 47.1 ppb toplam büyük moleküllü PAH bulunmuştur. Konserve balıklarında analizi yapılan hiçbir örnek bu değerleri aşmamıştır. En yüksek kirlenme seviyesi konserve ton balığındaki yağ örneğinde 1.9 ppb BaP ve 11.3 ppb toplam büyük molekül ağırlıklı PAH tespit edilmiştir. Bitki

ürünlerinden elde edilen bazı yağ örneklerindeki yüksek PAH konsantrasyonları bitkilerin kirlenmesinden kaynaklandığı rapor etmişler [74].

Tfouni ve arkadaşları, Brezilya marketlerinde bulunabilen çeşitli ticari şeker kamışı örneklerinde 5 PAH analizini HPLC-FL ile yapmışlardır. Örneklerin % 57' inde PAH tespit edilebildi. Fakat 1.35 µg/kg' dan daha küçük miktar içerenler tespit edilemedi. Analiz edilen örneklerin % 51' inde benzo[*a*]anthracene bulunurken dibenzo[*a,h*]anthracene tespit edilememiştir. Ticari olarak satılan şeker kamışlarındaki PAH' ların ürünün işlenme aşamasındaki yakma prosesinde kaynaklanabileceği rapor edilmiştir. Bu örneklerin analizi amacıyla HPLC-FL tekniği kullanılmıştır [75].

3. ÖRNEKLERİN EKSTRAKSİYONU VE ANALİZ METODLARI

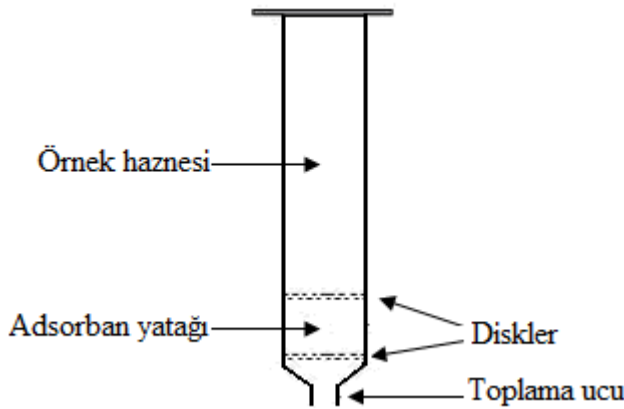
3.1. Örneklerin Ekstraksiyonu

Analizi yapılacak örneklerden analitin çözeltiye alınması için uygun çözücülerle ekstraksiyonu gereklidir. Örneğin karboksilik asitleri, aldehit ve keton yapıdaki bileşikler çözeltiye almak KOH gibi bir baz kullanılması yararlı olacaktır.

Kimyasal analizi yapılacak plazma, serum, idrar gibi biyolojik; su, toprak, hava gibi çevresel ve gıda, farmasotik ürünler gibi diğer numuneler, genellikle aranan madde dışında birçok bileşenin yer aldığı karışık bir matriks içerirler. Bu nedenle örnek hazırlama; özellikle yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC), gaz kromatografi (GC), gaz kromatografi-kütle spektrofotometresi (GC-MS), radio immün assay (RIA), atomik absorpsiyon (AA) gibi cihazlar yardımıyla yapılan analizler öncesinde uygulanması gereken çok önemli bir basamaktır [76, 77]. Örnek hazırlama başlıca iki amaç için yapılmaktadır. Bunlar sırasıyla, örneklerin istenmeyen bileşenlerden temizlenmesi (clean-up) ve önderiştirilmesidir. Temizleme işlemi ile matriksten analizin yanlış sonuçlanmasına neden olabilecek, istenen maddenin tespit edilmesini engelleyebilecek veya analiz cihazlarının kirlenmesine neden olabilecek kirliliklerin uzaklaştırılması sağlanır [76, 78]. Analiz öncesi yapılması gereken örnek hazırlama, çoğu zaman zor, pahalı ve uzun süren bir işlemdir. Yıllardan beri en sık kullanılan örnek hazırlama yöntemi olan sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi, fazla miktarda çözücü harcanması, ekstraksiyon sırasında emülsiyon faz oluşması, gerekli saflığa sahip olmayan ekstraktlar elde edilmesi, çözücülerin yeterince uzaklaştırılamaması ve duyarlı kantitatif sonuçlar elde edilememesi gibi istenmeyen durumlara da neden olabilmektedir. Bu nedenle kimyasal analiz yapan kişiler her zaman daha pratik ve basit yöntem arayışı içindedirler [76, 77, 79]. Bu konuda, özellikle kromatografik sistemlerle çalışan araştırmacı ve uygulayıcı ile yapılan bir anket çalışmasında, örnek hazırlama yönteminin seçiminde numunenin özelliği başlıca etken olmakla birlikte, kolay uygulanabilir ve ucuz olmasının da önemli rol oynadığı belirlenmiştir [80]. Kromatografik analizler öncesinde genellikle tek bir örnek hazırlama tekniği yeterli olmamakta, bu yöntemlerden birden fazlası kullanılması gerekmektedir. Klasik olarak analizden önce, sıvı-sıvı ekstraksiyonu, bunu takiben evaporasyon ve uygun çözücünün eklenerek tekrar seyreltilmesi işlemleri bir arada uygulanmaktadır. Günümüzde en etkili örnek hazırlama yöntemlerinden olan katı faz ekstraksiyon metodu (solid phase extraction=SPE), özellikle ilaç ve diğer farmasotik maddelerin analizinde en fazla kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir [78, 81, 82].

3.1.1. Katı Faz Ekstraksiyonu Metodu ve Genel Özellikleri

Katı Faz ekstraksiyon (SPE) yöntemi, temel olarak küçük, tek kullanımlık ekstraksiyon kolon veya disklerine çeşitli tutucu maddelerin doldurulması ve sıvı örneklerini istenmeyen bileşenlerden ayırma (temizleme), önderiştirme ve ileriki analiz aşamaları için örnek matriks yapısının değiştirilmesi amaçlarıyla hazırlanmış olan kolon ve disklerden geçirilmesi esasına dayanmaktadır. Sıvı örneğin kolondan geçirilmesi, yerçekimi vasıtasıyla gerçekleştirilebildiği gibi, zaman kaybının önüne geçmek amacıyla vakum manifoldları yardımıyla da yapılabilir. Son yıllarda aynı prensiple çok daha düşük miktarda örneğin uygulandığı çok sayıda kuyucuk içeren SPE plakaları da kullanılmaktadır [76, 77, 81, 83, 84]. SPE metodunda kolondan geçirilme sırasında örnek molekülleri ile tutucu madde arasında kimyasal bir etkileşim meydana gelir. Bu etkileşimden faydalanarak maddelerin ayrılma işlemi başlıca iki yolla gerçekleştirilir. Birinci yöntemde ilk aşamada, analiz edilecek bileşik tutucu maddeye bağlanarak kolon içinde tutulurken, çözelti ve istenmeyen bileşenler bu madde ile herhangi bir etkileşime girmezler. Daha sonra istenmeyen bileşenler uygun yıkama çözeltisi ile uzaklaştırılır ve analiz edilecek bileşen tutucu maddeden uygun bir çözelti yardımıyla elue edilerek alınır. Daha az tercih edilen ikinci yöntemde ise, istenmeyen bileşenlerin tutucu madde ile etkileşimi söz konusudur. Özellikle atık yağlar gibi matriksten ayrılması zor olan maddelerin analizinde kullanılan bu yöntemde, matriksteki istenmeyen bileşenler tutucu madde tarafından sıkı şekilde bağlanırlar. Asıl aranan madde ise tutucu madde ile etkileşime girmez ve uygun çözelti yardımıyla elue edilerek toplanır. Bu yöntemde, kolon içerisindeki tutucu maddenin oluşturduğu katı faz filtre işlevi görmektedir (Şekil 3.1) [76, 77, 84, 85].



Şekil 3.1. SPE kolonunun yapısı [86].

SPE kolonundaki tutucu maddenin önce şartlandırılması gerekmektedir. Şartlandırma işlemi, kolondan uygun çözelti geçirilerek tutucu maddenin aktif hale getirilmesi ve matriksteki

maddeler ile tekrarlanabilir etkileşim için gerekli ortamın sağlanabilmesi amacıyla yapılmaktadır. Polar olmayan tutucu maddeler, kolon hacminin 2-3 katı miktarda suyla karışabilen metanol, tetrahidrofuran, izopropanol gibi polar çözücüler ile; polar tutucu maddeler ise polar olmayan çözücülerle şartlandırılmaktadır [77, 84].

SPE metodunda ayrılma işleminin gerçekleşmesi için tutucu madde ve çözücüler büyük önem taşımaktadır.

3.1.2. SPE Metodunda Maddelerin Ayrılma Prensipleri

SPE metodunda maddelerin birbirinden ayrılması, analizi yapılacak maddenin molekülleri ile tutucu maddedeki etkin gruplar arasındaki moleküller arası etkileşimler sayesinde açıklanır. Analizi yapılacak madde molekülleri tutucu maddelerdeki etkin gruplara iyonik, hidrojen, dipol-dipol, dipol-indüklenmiş dipol ve indüklenmiş dipol-indüklenmiş dipol (van der Waals) bağları ile bağlanır. Bu şekilde tayini yapılacak madde, matriksteki istenmeyen bileşikler ve çözücüler birbirinden ayrılmış olur [77].

SPE metodunda kromatografik yöntemlere benzer şekilde, analiz edilecek madde, çözücü ve tutucu maddelerin özelliklerine göre çeşitli ayırma mekanizmaları rol oynar. Belli başlı ayırma mekanizmaları olarak normal faz, ters faz, iyon değişim (katyonik ve anyonik değişim) ve moleküler eleme sayılabilir [77, 84, 87].

Normal faz; polar bileşiklerin polar olmayan matrikslerden ayrılması işlemidir. Şartlandırma aşaması polar olmayan çözücüler, toplama aşaması ise daha polar çözücüler yardımıyla gerçekleştirilir. Bu yöntemde en fazla kullanılan tutucu madde silikadır. Florosil ise pestisitler için en uygun tutucu maddedir. Karbonhidratça zengin bazı aşırı polar örnekler için ise silika, alumina gibi tutucu maddelere çeşitli grupların eklenmesi ile elde edilen siyano, diol ve amino grubu tutucu maddeler tercih edilmektedir. Bu maddelerdeki polar gruplar, polar olmayan organik çözücüler (hekzan/dietileter gibi) içerisindeki orta derecede polar olan örnek moleküllerini tutarlar [77, 87]. Ters faz, tutucu madde polaritesinin örnek çözeltisinden daha düşük olduğu sistemdir.

Oktadesil (C_{18}) bu teknik için en fazla kullanılan madde olmakla birlikte, oktil (C_8), sikloheksil, bütül, fenil ve siyano da çeşitli örnekler için seçici olmaları nedeniyle tercih edilirler. Ters faz, klinik ve çevresel örneklerdeki organik kalıntıların analizinde çok yaygın şekilde kullanılan bir ayırım tekniğidir [77, 87]. İyon değişim, özellikle asit ve bazların matriksten elde edilmesi amacıyla kullanılan ve iki molekül arasındaki iyonların karşılıklı değişimi esasına dayanan bir tekniktir. SO_3^- ve $N+(CH_3)_3$ gibi etkin gruplar bağlanmış aşırı polar silika benzeri tutucu maddeler iyon değişim için uygundur. SO_3^- grubu, örnek

çözeltisinden aranan temel maddelerin ayrılması için kuvvetli katyonik değişimi (SCX=strong cation exchanger), $N+(CH_3)_3$ grubu ise asitlerin bağlanması için kuvvetli anyonik değişimi (SAX=strong anion exchanger) sağlamaktadır. İyon değişim tekniğinde pH, zıt yüklü olma, iyonik kuvvet, organik çözücünün özelliği ve örneğin kolondan geçiş hızı gibi faktörler önem taşımaktadır. Başarılı bir iyon değişiminin sağlanabilmesi için, tutucu madde ile analiz edilecek maddenin zıt yüklerde olması ve örnek çözeltisindeki zıt iyon yoğunluğunun düşük olması gerekmektedir [77, 87]. Moleküler eleme tekniğinde ise dekstran jel gibi maddeler, içerdikleri gözenekler sayesinde örnek çözeltisi içerisindeki maddelerin molekül büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlar. Örnek çözeltisi içerisindeki molekül ağırlığı 10 000' den düşük maddeler bu gözeneklere girebilirken, daha büyük maddeler direkt kolondan geçer. Böylece büyük maddeler ayrılırken, küçük molekül ağırlıklı maddeler kolonda kalmakta ve bu şekilde ayırım gerçekleşmektedir. Bu teknikte, ideal olarak maddelerin tutulması ya da diğer moleküler etkileşimlerin olmaması istenir. Moleküler eleme, genellikle bağlı olmayan radyoizotopların ve protein çözeltilerinden tuzların ayrılmasında kullanılan bir tekniktir [77]. Karışık matrislerden analizi yapılacak maddelerin istenilen düzeyde ayrılarak, ideal bir örnek hazırlama basamağının gerçekleştirilmesi için doğru ayırım tekniğinin kullanılması çok önemlidir.

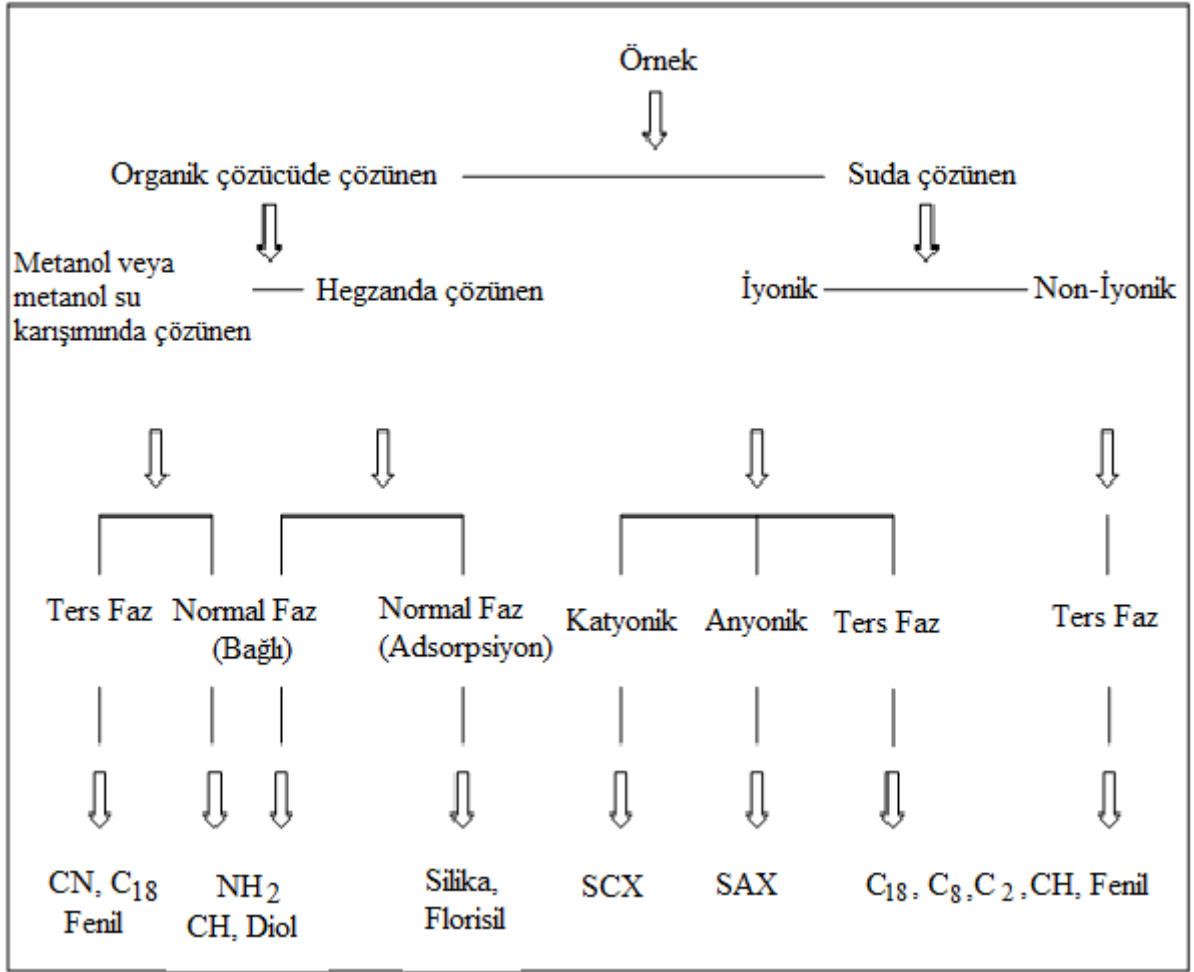
3.1.3. SPE Metodunun Avantajları

SPE metodunun diğer örnek hazırlama yöntemlerine, özellikle sıvı-sıvı ekstraksiyona kıyasla daha fazla tercih edilmesinin nedenleri şu şekilde özetlenebilir:

- a-** SPE metodu klasik sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemine göre 2-3 daha hızlı sonuç verir ve örnek hazırlama süresinin oldukça kısaltır [77, 84].
- b-** SPE, çok pratik ve bütün laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilir bir metoddur [77, 88, 89].
- c-** Bu yöntemde daha az çözücü ve ayıraç madde kullanıldığından daha ekonomik bir örnek hazırlama yapılabilir [84].
- d-** Geri kazanım oranı yüksektir ve istenilen konsantrasyonda örnekler elde edilebilir. En az düzeyde örnek transferi yapıldığından yüksek geri kazanımlar ile yüksek yoğunluk ve saflıkta örnekler elde edilebilmektedir [76, 88, 89].
- e-** Örnek, tutucu madde ve çözücüler arasında çapraz bulaşma riski düşük olduğundan yüksek doğrulukta sonuçlar alınabilir [77, 88].
- f-** Düşük miktarda örnek işlendiğinden sıvı-sıvı ekstraksiyondaki gibi emülsiyon oluşma problemi yoktur [77].
- g-** SPE metodunda en az düzeyde evaporasyona ihtiyaç duyulduğundan kararsız örnek oluşumu nadirdir [77, 88].

h- Çözücü ve örneklerin az miktarlarda kullanılmasından dolayı zararlı maddelerle temas daha azdır ve ayrıca daha az cam malzeme kullanılması nedeniyle analizi yapanlar için oldukça güvenli bir metoddur. Ayrıca çevreyi kirletme riski daha düşüktür [88, 90] .

i- Çok sayıda örneğin aynı anda ve tekrarlanabilir şekilde işlenebilmesine olanak sağlayacak şekilde çok kolay otomasyon sağlanabilir [77, 84, 90].



Şekil 3.2. Analiz edilecek örneğin özelliğine göre seçilmesi gereken SPE ayırma tekniği.

(SCX= strong cation exchanger, kuvvetli katyon değişimi yapan; SAX= strong anion exchanger, kuvvetli anyon değişimi yapan) [92].

3.2. Kromatografi ile Ayırma

Kromatografi, birden fazla bileşen içeren bir karışımın bir kolondaki hareketli bir faz (çözücü) ile sabit bir faz (dolgu maddesi) içinden geçirilmesi işlemlerini içerir. Bu teknikte ayrılacak bileşenler sabit ve hareketli fazda farklı dağılıma ve tutunma özellikleri gösterdiğinden kolonu farklı sürelerde terk ederler. Kolondaki farklı alıkonma sürelerinden faydalanılarak

kolon çıkışına bileşenlerle orantılı sinyal üreten bir dedektörün yerleştirilmesiyle hem nitel hem de nicel analiz yapan bir metod geliştirilmiştir. Bu alanda yaygın olarak HPLC sistemleri kullanılmaktadır.

3.2.1. Kromatografide Sınıflandırma

Kromatografik ayırım; bir örnek içindeki maddelerin bir hareketli ve bir sabit faz arasında dağılımlarına bağlı olarak ayırma ve ortamını farklı zamanlarda terk etmelerini esas alarak kalitatif ve kantitatif analiz yapılmasına olanak sağlayan yöntemdir. Ayırma ortamını terk eden maddeler dedektörde bir elektronik sinyal oluşmasına neden olurlar. Bu sinyaller kromatogram olarak adlandırılırlar.

Kromatografi farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır:

1. Kromatografik ortamın fiziksel şekline göre,
2. Örneğin kromatografik ortama veriliş biçimine göre,
3. Kromatografik ayırım mekanizmasına göre,
4. İki fazın polarlık durumlarına göre,
5. İki fazın fiziksel durumuna göre.

3.2.1.5. İki Fazın Fiziksel Şekline Göre Sınıflandırma

Bu sınıflandırmaya göre kromatografik yöntemler önce hareketli faza göre, gaz kromatografi ve sıvı kromatografi olarak ikiye ayrılır. Daha sonra da her biri tekrar bu kez de sabit faza göre sınıflandırılabilirler. Gaz kromatografi, gaz-sıvı ve gaz-katı olarak ikiye sıvı kromatografi ise sıvı-sıvı, sıvı-katı, iyon değiştirme ve moleküler elek olmak üzere gruplara ayırmak mümkündür. Kromatografi pratikte klasik olarak şu sınıflara ayrılır:

1. Kağıt kromatografi
2. İnce tabaka kromatografi
3. Kolon kromatografi
4. Gaz-sıvı kromatografi
5. Yüksek basınç sıvı kromatografi

3.2.2. Sıvı Kromatografi

3.2.2.1. Sıvı Kromatografinin Sınıflandırılması

Öncelikle ayırma yöntemlerinin sınıflandırılması daha yararlı olacaktır. Bu amaçla ilk akla gelen ayırma yöntemi fiziksel sınıflandırmadır.

- Filtrasyon
- Sedimentasyon
- Tanecik elektroforesiz
- Elektrostatik çöktürme
- Flotasyon
- Eleme

Denge ve hız ayırımları

Denge ayırımı;

1. Gaz-sıvı

- Destilasyon
- Gaz-sıvı kromatografi
- Köpük fraksiyonlama

2. Gaz-katı

- Adsorpsiyon
- Süblimasyon
- Moleküler elek

3. Sıvı-sıvı

- Ekstraksiyon
- Sıvı-sıvı kromatografi
- Dışarılama kromatografisi

4. Sıvı-katı

- Çöktürme
- Bölgesel eritme
- » Seçimli kristallendirme
- » İyon değişim
- » Adsorpsiyon
- » Dışarılama
- » Moleküler elek

Hız olaylarına göre ayırım;

1. Engel ayırımı

- Membran filtrasyon
- Diyaliz
- Ultrafiltrasyon
- Elektrodializ

- Elektroosmosiz
- Ters osmosiz
- Gaz difüzyon

2. Bölgesel ayırım

- Elektroforesiz
- Ultrasantrifüj
- Termal difüzyon
- Elektrotta birikme
- Kütle spektrometrik ayırım

3. Diğerleri

- Moleküler destilasyon
- Enzimatik bozunma
- Bozulma destilasyon

Bu ayırma yöntemlerine gün geçtikçe yenileri eklemektedir.

Hareketli faz türüne göre kromatografinin;

- ✓ Gaz kromatografi
- ✓ Sıvı kromatografi

olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Sıvı kromatografide hareketli faz sıvıdır. Sıvı kromatografide sabit fazın fizikokimyasal özelliklerine göre sıvı-sıvı ve sıvı-katı olmak üzere ikiye ayrılır.

Ancak pratikte bu sınıflandırma yerine aşağıdaki sınıflandırma kullanılır.

- ❖ Adsorpsiyon kromatografi (Normal ve Ters Kromatografi)
- ❖ Sıvı-sıvı partiyon kromatografi
- ❖ İyon kromatografi
- ❖ jel kromatografi

adsorpsiyon kromatografide sabit faz silika (SiO_2), alumina (Al_2O_3), zirkonia- (ZrO_2) gibi oksitler veya bunların üzerine çeşitli fonksiyonel grupların (CN, NH_2 , R, Ar) bağlanması ile elde edilmiş katı fazlardır. Sıvı hareketli faz ise n-haptan, n-hegzan, gibi apolar çözücüler veya başta su olmak üzere asetonitril, metanol, etanol gibi polar sıvılardır. Bunların belli oranlarının karışımı da hareketli faz olarak kullanılabilir. Sabit fazın polar, hareketli fazın apolar olması halinde adsorpsiyon kromatografiye **NORMAL FAZ KROMATOĞRAFI**. Sabit fazın apolar, hareketli fazın polar olduğu kromatografiye **TERS FAZ KROMATOĞRAFI** denir. Normal fazda alumina, silika, Si-CN gibi polar katılar kullanılır. Ters fazda ise polar karakter gösteren alkil gruplarının bağlandığı silika, alumina kullanılır. Normal faz ile ters faz kromatografisi arasındaki en büyük fark, ters faz kromatografide hareketli faz içinde su kullanılmasıdır. Şart

olmamakla beraber, bol ve ucuz olan suyun kullanılması kromatografiye gerçekten büyük avantajlar sağlamaktadır.

Sıvı-sıvı kromatografide sabit faz bir katı üzerine emdirilmiş olarak kullanılan sıvıdır. Ancak bu tür kromatografi son zamanlarda önemini yitirmiştir. Bunun en büyük nedeni sabit sıvı fazın, çözünürlüğü nedeniyle, hareketli faz tarafından sürüklenip götürülmesidir. Kolon performansı sürekli değişeceği için bu durum istenmez.

İyon kromatografide sabit faz genellikle bir iyon değiştiricidir. İyon değiştirici ya bir reçine ya da iyon değiştirme özelliği olan Al_2O_3 gibi amfoterik oksitler olabilir. Hareketli faz belirli iyon şiddetinde ve pH' da sulu çözeltidir. Ayırımı ve tayini yapılan maddeler anyonlar, katyonlar veya derivatizasyonla iyonik hale getirilebilen maddelerdir. Jel kromatografide maddelerin molekül büyüklüklerine ayırımları sağlanır. Moleküler elek gibi gözenekli katılar sabit faz olarak kullanılır. Hareketli faz çeşitli çözücüler veya çözeltiler olabilir. Bu yöntemi diğer kromatografik yöntemlerden ayıran en önemli fark ayırma ortamını önce büyük moleküllerin terk etmesidir.

Sıvı kromatografi türleri son zamanlarda bir hayli çoğalmıştır. Aslında yinede yeni adlar altında sunulan bu yöntemler, yukarıda verilen beş sınıf içinde düşünmek mümkündür. Ancak bütün bu yeni modern sıvı kromatografik yöntemleri **YÜKSEK BASINÇ SIVI KROMATOĞRAFİ** veya **YÜKSEK PERFORMANS SIVI KROMATOĞRAFİ** kapsamaktadır. Sıvı kromatografi son yıllarda yüksek basınç üreten pompaların üretilmesi ile oldukça iyi bir yol kat etti ve nerdeyse gaz kromatografiye rakip olacak boyutlara ulaştı ve hatta onun yerini alacağı iddia edildi ama zamanla bu iki yöntemin rakip değil birbirini tamamlayıcı nitelikte olduğu anlaşıldı.

Bir yüksek basınç pompası ile rezervuardan alınan hareketli faz filtrelerden ve basınç düzenleyiciden geçtikten sonra enjeksiyon sistemine girer. Enjeksiyon sisteminden sonra ön kolon ve analitik kolondan geçen hareketli faz dedektöre ulaşarak sistemi terk eder. Enjeksiyon bölmesinden sisteme verilen çözelti halindeki örnek analitik kolonda ayırımı yapıldıktan sonra dedektöre ulaşır. Dedektör örnek içinden art arda gelen elektronik bir sinyal oluşturur. Bu sinyal bir potansiyometrik yazıcıda veya bilgisayarda kaydedilir. Sinyallerin şekil haline dönüştürülmesi ile kromatogram adı verilen grafik meydana gelir. Apsis zaman veya yürütücü faz hacmi olabilir. Ancak bunlar doğudan doğruya dedektöre gelen madde miktarı veya derişimi ile orantılıdır. Kromatogramda görülen pik adı verilen yükseltelerin tepe noktalarının apsisdeki değerleri bunların kalitatif belirlemede kullanılır.

Yüksek basıncın kullanıldığı bir başka kromatografik yöntem **süper kritik akışkan kromatografi'** dir. Yöntemde hareketli faz olarak kullanılan amonyak, karbondioksit gibi gazlar yüksek basınç altında sıvılaşma konumuna getirilerek sabit faz üzerinden geçirilir. Visköz hale

getirilen hareketli faz sıvı özelliklerine yaklaşır, gaz ve sıvı kromatografilerin ortak özellikleri ile kromatografik ayırım gerçekleşir.

Kromatografide karşılaşılan bazı fizikokimyasal olayları kısaca açıklayalım:

3.2.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

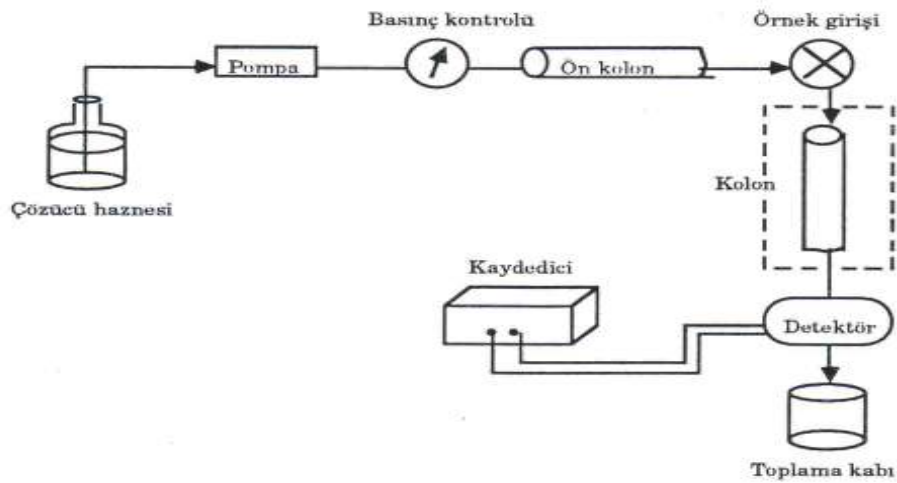
Sıvı kromatografisinde kolon veriminin dolguda kullanılan taneciklerin boyutunun küçültülmesi (normalde 100–250 μm ' den 1–15 μm ' ye) ile önemli derecede artmaktadır. Ancak tanecik çapı 3–10 μm ye kadar küçük olan dolgu maddeleri 1960' lı yılların son dönemlerinde kullanılmaya başlanmıştır. Tanecik çapının, kolon çapının küçüldüğü ve yüksek basıncın uygulandığı sıvı kromatografisine yüksek performanslı sıvı kromatografisi denir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi günümüzde en çok kullanım alanı bulan kromatografik metotlardandır [54].

Bunun nedenleri arasında:

- Duyarlılığının yüksek olması,
- Kantitatif tayinlerde kullanılabilmesi,
- Uçucu olmayan türlerin ve sıcaklıkla kolayca bozulabilen türlerin ayrılmasına uygun olması,
- Sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliği sayılabilir. Bu maddelere örnek olarak;

Amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar ve antibiyotikler sayılabilir.

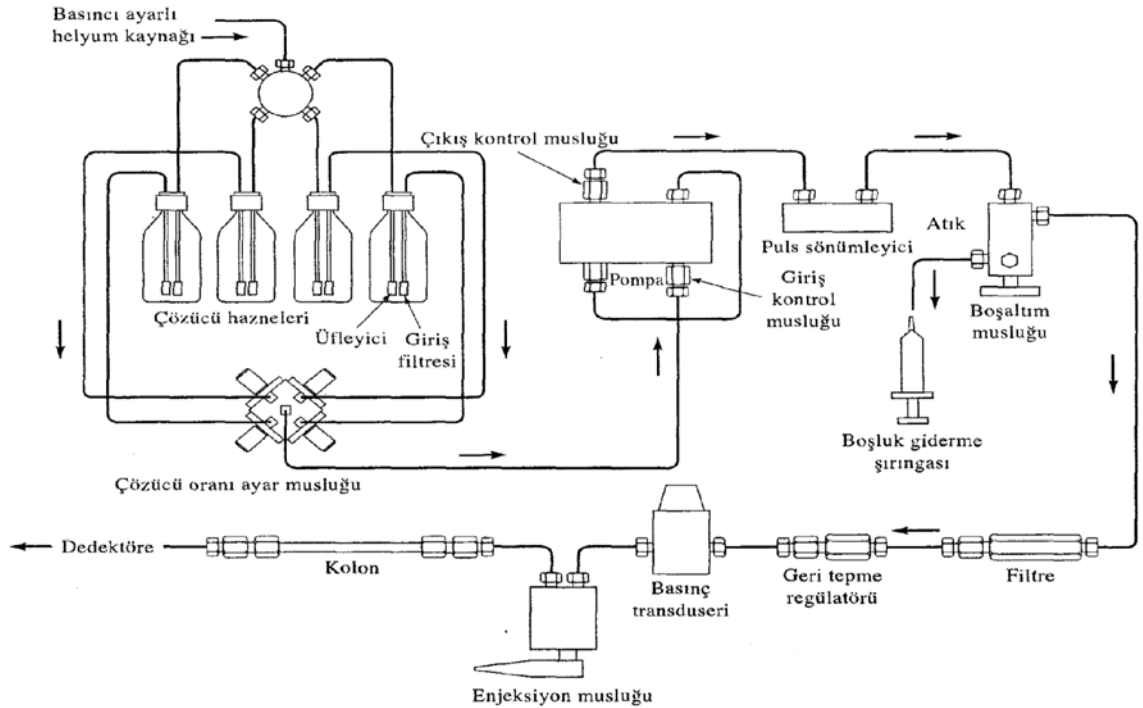
3.2.3.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı



Şekil 3.3. Bir HPLC cihazı şeması [92].

Bir HPLC cihazı her biri 200–1000 ml çözücü içerebilen camdan veya çelikten yapılmış hazne içermektedir. Bazı cihazlarda bu hazneler kolonda ve dedektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır. Bu gaz kabarcıkları bant genişlemesine ve çoğu zaman da dedektörün performansında bozucu etkilere sahip olabilir. Cihazda bulunan ön kolon çözücü içinde bulunabilecek toz ve partikül halindeki maddelerin pompaya veya enjeksiyon sistemine zarar vermemesi veya kolonu tıkamaması için toz ve partikül halindeki maddeleri tutar. Böylece çözücü kaybı en aza indirilmiş olur.

Sabit bileşimdeki tek bir çözücü kullanılarak yapılan ayırma **izokratik elüsyon** olarak adlandırılır. Genellikle ayırma etkililiği **gradient elüsyonu** ile artırılır. Bunun için polariteleri birbirinden çok farklı, iki ya da üç çözücü sistemi kullanılır. Elüsyon başladıktan sonra, belli bir programa göre bazen sürekli olarak, bazen de seri basamaklar halinde, çözücülerin oranı değiştirilir. Genellikle HPLC cihazları, çözücülerin hacimleri oranı zamanla doğrusal olarak veya üstel olarak değiştirilebilecek nitelikte, iki veya daha fazla hazneden aldığı çözücülerini bir karıştırma odasında sürekli olarak değişen hızlarda bir araya getiren sistemlerle donatılmıştır.



Şekil 3.4. Gradient elüsyon uyumlu bir HPLC cihazının şeması [93].

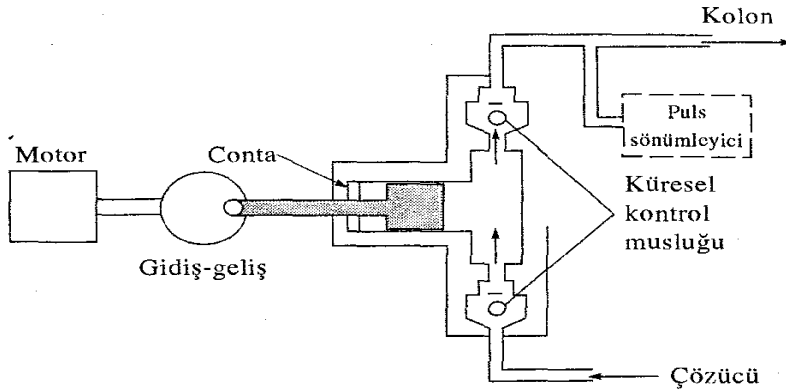
3.2.3.2.1. Pompa Sistemleri

Bir HPLC pompalama sistemi için gerekli şartlar şunlardır:

- ❖ 400 atm' ye kadar basıç üretimi
- ❖ 0,1–10 ml/ dakika aralığında akış hızları
- ❖ % 0.5 veya daha iyi bir bağıl tekrarlanabilirlikle akış kontrolü
- ❖ Korozyona dayanıklı parçalar

Sıvılar çok fazla sıkıştırılmadığından dolayı HPLC pompaları tarafından üretilen basınç bir patlama tehlikesi oluşturmaz. Böylece sistemin parçalarından herhangi birinde meydana gelecek bir çatlak, sadece çözücünün dışarı sızmasına neden olur. Ama sızıntılar bir yangın tehlikesi oluşturabilir.

a. Pistonlu Pompalar: HPLC sistemlerinin %90' ında pistonlu pompalar kullanılmıştır. Pistonlu pompalar, genellikle motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmiştir. Sırasıyla açılıp kapanan iki tane küresel kontrol musluğu, çözücünün silindir içine giriş ve çıkış akışını kontrol eder. Piston çözücü ile doğrudan temas etmektedir.



Şekil 3.5. HPLC için bir pistonlu pompa [93].

Pistonlu pompaların üstünlükleri;

- Küçük iç hacimleri (35–400µL)
- Yüksek çıkış basıncı (700 atm' ye kadar)
- Gradyent elüsyona uygun oluşları
- Kolon geri basıncından ve çözücü viskozitesinden büyük ölçüde bağımsız olan sabit akış hızlarıdır.

b. Sürgülü Pompalar: Sürgülü pompalar, bir kademeli motordan güç alan vidalı güdüm mekanizması ile kontrol edilen sızdırmaz bir sürgüsü olan, şırınga benzeri silindirik bir kaptan oluşur. Sürgülü pompalarda çıkış akımı pulssuzdur. Dezavantajları ise sınırlı çözücü kapasitesi (~ 250 ml) ve çözücü değiştirilmesi gerektiğinde karşılaşılan güçlüklerdir.

c. Pnömatik Pompalar: En basit pnömatik pompalarda, sıvı hareketli, sıkıştırılmış bir gaz ile basınçlandırılabilen bir kap içine yerleştirilmiş, bir kap içine konur. Pnömatik pompalarda çıkış basıncı düşüktür ve akış hızı çözücü viskozitesine ve kolon geri basıncına bağlıdır. Ayrıca pnömatik pompalar, gradiyent elüsyona uygun değildir ve basınçları genellikle 135 atm' den daha düşüktür.

3.2.3.2.2. Numune Enjeksiyon Sistemleri

Genellikle sıvı kromatografik ölçümlerinin kesinliğini, numunenin kolon dolgu maddesine taşınmasının tekrarlanabilirliği belirler. Aşırı numune yüklenmiş kolonlarda görülen bant genişlemesi de kesinliği etkiler. Bu yüzden kullanılan hacim oldukça küçük olmalıdır. Ayrıca, sistemin basıncı düşürülmeden numunenin sisteme girişi sağlanmalıdır.

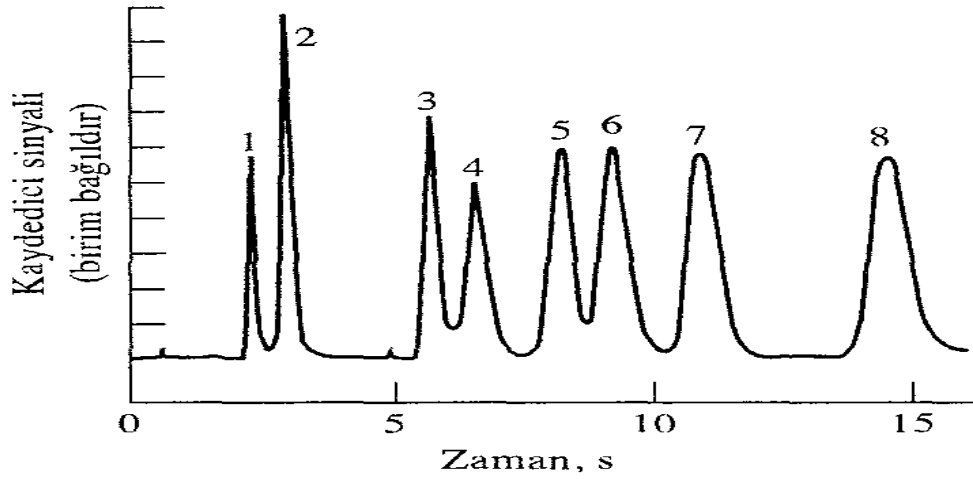
3.2.3.2.3. Yüksek performanslı Sıvı Kromatografisi Kolonları

Sıvı kromatografisi kolonları normal olarak düzgün iç çaplı paslanmaz çelik borulardan yapılır. Fakat bazen de kalın cidarlı cam borularda kullanılır.

Analitik Kolonlar (Kolon): Sıvı kromatografisi kolonlarının çoğunun boyu 10–30 cm, iç çapı 4-10 mm ve kolon dolgu maddesinin büyüklüğü 5–10 µm arasındadır. Normalde kolonlar düzgündür ve gerektiği yerlerde kolonların birbirine eklenmesiyle kolonun boyu artırılabilir.

Son yıllarda daha küçük boyutlarda yüksek hızlı ve yüksek performanslı kolonlar üretilmektedir. Bu kolonların iç çapı 1–4.6 mm, tanecik büyüklüğü 3–5 µm ve boyu 3–7.5 cm arasındadır. Bu kolonlarda çözücü sarfıyatı minimumdur.

Emniyet Kolonları (Ön kolon): Analitik kolonun ömrünü artırmak için analitik kolondan önce kısa kolon yerleştirilir. Bu kolonun görevi partikül halindeki maddeleri, çözücü içindeki yabancı maddeleri tutmak, numune içinde bulunan ve dolgun fazda tersinmez olarak bağlanan bileşenleri tutmaktır. Ayrıca hareketli fazı, durgun faz ile doyurarak analitik kolondaki çözücü kaybını en aza indirmektedir.



Şekil 3.6. Yüksek hızlı izokratik ayırma. Kolon boyutları 4 cm uzunluk, 0.4 cm iç çap, dolgu maddesi 3 μm boyutlu. Hareketli faz n-hekzanda % 4.1 etli asetat. Bileşikler: (1) p-ksilen, (2) anisol, (3) benzil asetat, (4) dioktil ftalat, (5) dipentil ftalat, (6) dibütül ftalat, (7) dipropil ftalat, (8) dietil ftalat [93].

3.2.3.2.3.1. Kolon Dolgu Maddelerinin Tipleri

Sıvı kromatografisinde iki tip kolon dolgu maddesi kullanılmaktadır. Bunlar;

- i. Film Dolgular
- ii. Gözenekli Dolgular

i. Film Dolgular: Bunlar, kürese, gözeneksiz, çapları 30–40 μm olan cam veya polimer taneciklerden oluşur. Bu taneciklerin yüzeyine silis, alumina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden oluşan ince gözenekli film kaplanmıştır

ii. Gözenekli dolgular: Çapları 3–10 μm arasındadır. Partiküller silis, alumina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden meydana gelmiştir.

3.2.3.2.4. Dedektörler

Hareketli fazdaki analit derişimine veya türüne bağılı olarak sinyal veren araçlar **dedektör** olarak adlandırılmaktadır.

Sıvı kromatografide çok kullanılan dedektörleri şöyle sıralayabiliriz:

1. Spektrofometrik Dedektörler.
2. Elektrokimyasal Dedektörler.
3. Alevde İyonlaşma Dedektörü.

4. Kırılma İndisi Dedektörü.

5. Kütle Dedektörü,

3.3. Kütle Spektrometrisi

Kütle spektrometrisi inorganik, organik moleküllerinin yapılarının aydınlatılmasında, karışımların nicel ve nitel analizinde, katı maddelerin yapılarının ve bileşimlerinin aydınlatılmasında, bir örnekteki atomların izotoplarının belirlenmesinde en çok kullanılan analitik metoddur. Bir kütle spektrometrik analizde ilk iş örneğin gaz halinde iyonlarını elde etmektir. Kütle spektrumlarının görünüşü kullanılan iyonlaştırma yöntemlerine önemli ölçüde bağlıdır [91].

3.3.1. Moleküler kütle spektrometride iyon kaynakları

Moleküler kütle spektrometride iyon kaynakları iki bölüme ayrılır:

1. Gaz fazı iyon kaynakları
2. Dispersiyon kaynakları

Tablo 3.1. Moleküler kütle spektroskopide kullanılan iyon kaynakları [93].

Temel Tip	Adı ve Kısaltılması	İyonlaştırıcı
Gaz fazı	Elektron impakt (EI)*	Enerjik elektronlar
	Kimyasal iyonlaştırmalı (CI)	Reaktif gaz iyonları
	Alan iyonlaştırma	Yüksek potansiyelli elektrot
Desorpsiyon	Alan desorpsiyonu (FD)	Yüksek-potansiyelli elektrot
	Elektrosprey iyonlaştırma (ESI)	Yüksek elektrik alanı
	Matriks yardımcı desorpsiyon/iyonlaştırma (MALDI)	Lazer demeti
	Plazma desorpsiyonu (PD)	²⁵² Cf'nin fisyon ürünleri
	Hızlı atom bombardımanı (FAB)	Enerjik atom demeti
	İkincil iyon kütle spektrometri (SIMS)	Enerjik iyon demeti
	Termospray iyonlaştırma (TS)	Yüksek sıcaklık

- ❖ Gaz fazı kaynaklarında örnek önce buharlaştırılır sonra iyonlaştırılır.
- ❖ Gaz fazı kaynakları kaynama noktaları 500 °C' den küçük olan termal olarak kararlı maddelere uygulanır.
- ❖ Desorpsiyon yönteminde ise katı ve sıvı haldeki madde doğrudan gaz iyonu haline dönüştürülür.
- ❖ Desorpsiyon kaynaklı kütle spektrometreleri uçucu olmayan ve termal olarak kararsız maddelere uygulanabilir.

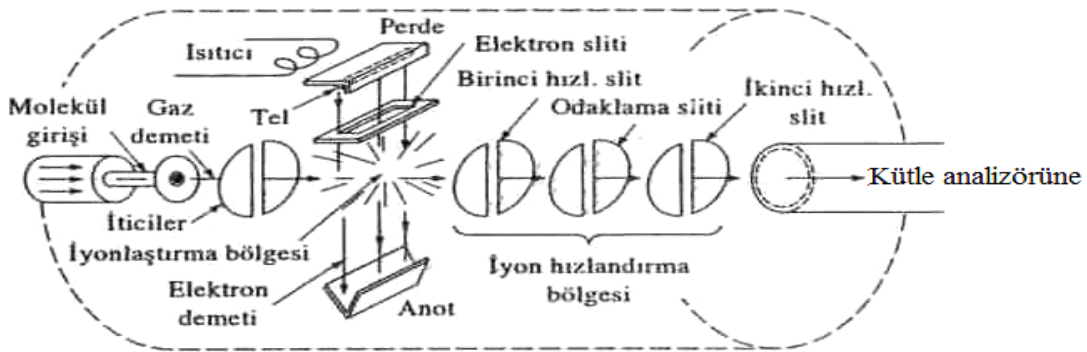
3.3.1.1. Gaz Fazı İyonlaştırma Kaynakları

3.3.1.1.1. Elektron İmpakt Kaynağı

Bu yöntemde, örnek yeterince buharlaşabilecek bir sıcaklığa getirilir ve enerjik elektronlarla bombardıman edilerek iyonlaştırılır.

Bu yöntemde;

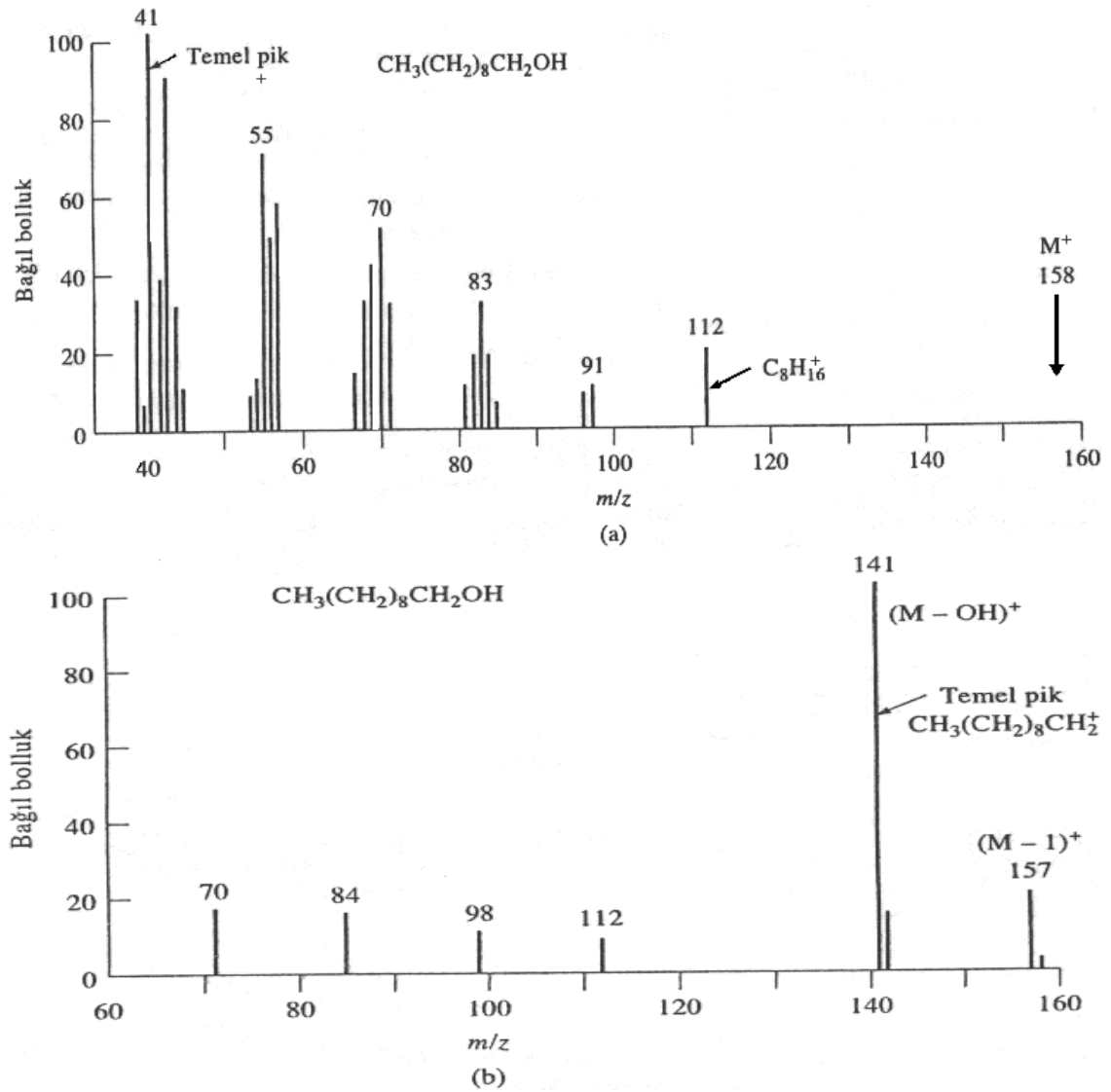
- ✓ Bazı moleküllerde parçalanma yüzünden moleküler iyon oluşmayabilir. Bu yüzden de analitin tanınması için birinci derecede önemli olan mol kütlesi tespit edilemez.
- ✓ Elektron impakt spektrumlarında temel pik genellikle parçalanma ürünlerinin arasından çıkar ve bu moleküler iyon piki değildir.
- ✓ Elektron impakt kaynakları yüksek iyon akımı üretmek için uygundur ve bu nedenle duyarlılıkları iyidir.
- ✓ Bu yöntemde parçalanmalar çok sayıda olur ve çok sayıda pik görülür, bu durum analiz edilen maddenin şüpheli kısımlarının tanımlanmasında yardımcı olur.



Şekil 3.7. Elektron-impakt kaynağının yapısı [93].

Elektron impakt kaynaklarının kullanımının dezavantajı, örneğin buharlaştırılmasıdır. Bazı örneklerde iyonlaşmadan önce termal bozulma olayı gözlenir. Bazı durumlarda ise

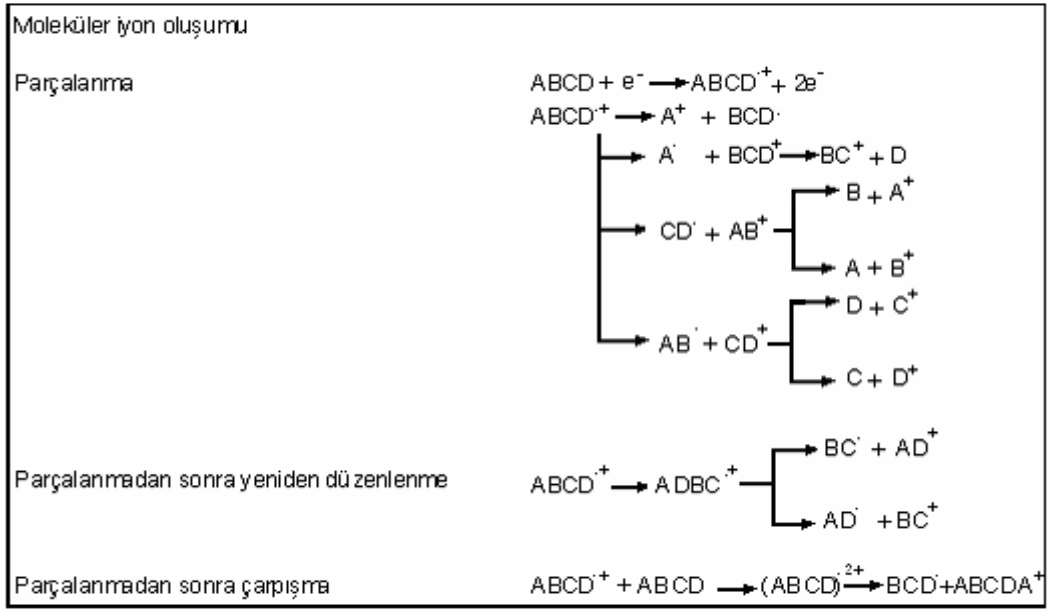
piklerden bazıları moleküler iyon pikinden daha büyük olur. Bu pikler, aynı kimyasal formüle sahip olmasına karşılık farklı izotop bileşimlerinden dolayı ortaya çıkar. Ayrıca iyon/molekül çarpışmaları moleküler iyonun kütlesinden daha büyük kütlede piklerin meydana gelmesine sebep olabilir. İyon kaynakları sert kaynaklar ve yumuşak kaynaklar olarak sınıflanır. Sert kaynaklar yeterli enerjiyi analit moleküllerine aktaran ve molekülleri yüksek enerjili uyarılmış hallerine çıkaran kaynaklardır. Bu moleküllerin durulması bağların kopması şeklinde olur ve kütle/yük oranı moleküler iyonunkinden daha küçük iyonlar ortaya çıkar. Yumuşak kaynaklar analitin daha az parçalanmasına sebep olur. Bunun sonucunda elde edilen kütle spektrumlarında moleküler pik çoğu zaman görülür ve bunun yanında birkaç başka pik bulunur. Şekil 3.8' de görülen spektrum, kütle spektrumlarının genel sunuluş tarzını göstermektedir.



Şekil 3.8. Dekanol'ün (a) sert bir kaynakla ve (b) yumuşak bir kaynakla alınmış kütle spektrumları [93].

Sert ve yumuşak iyon kaynaklarının her ikisinde analizlerde kullanılır. Sert kaynaklarla elde edilmiş bir spektrumda gözlenen çok sayıda pik fonksiyonlu grupların tiplerini belirlemede ve analitlerle ilgili yapısal bilgi, dolayısıyla yapı aydınlatmada kullanılır. Yumuşak kaynaklarla alınan spektrumlar ise analiz edilen molekül veya moleküllerin doğru olarak tayin edilmesinde yararlıdır.

Tablo 3.2. Bir elektron impakt kaynağındaki bazı tipik reaksiyonlar [93].



3.3.1.1.2. Kimyasal İyonlaştırma Kaynakları

Kimyasal iyonlaştırmada numunenin gaz haline gelmiş atomları, elektron bombardımanı ile iyonlaştırılmış başka bir reaktif gazın iyonları ile çarpıştırılır. Bu amaçla genelde pozitif iyonlar kullanılmaktadır. Fakat zaman zaman elektronegativitesi yüksek atomlar varsa, negatif iyonlar da kimyasal iyonlaşmada kullanılmaktadır. En sık kullanılan reaktif gaz metandır. Propan, izobütan ve amonyak gibi reaktifler de kimyasal iyonlaştırmada kullanılır.

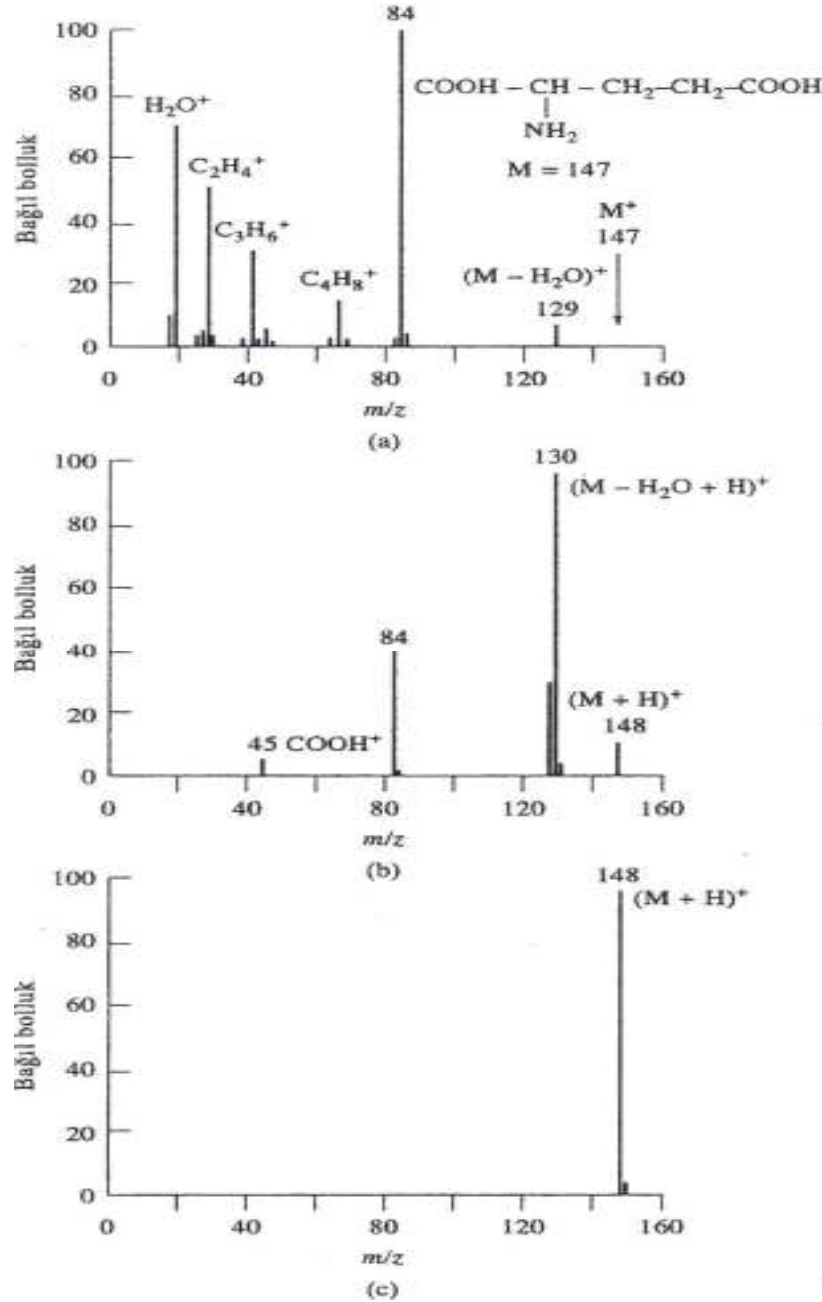
3.3.1.1.3. Alan İyonlaştırma Kaynakları

Alan iyonlaştırma kaynaklarında iyonlar, yüksek elektronların etkisiyle (10^8 V/cm) meydana gelir. Alan iyonlaştırmanın duyarlılığı elektron impakt tekniğine göre 10 kat daha kötüdür.

3.3.1.2. Desorpsiyon Kaynakları

3.3.1.2.1. Alan Desorpsiyon Kaynakları

Elektrotlardan anot olarak kullanılan yüzeyine örnek adsorbe ettirilir ve daha sonra elektrik alanın etkisi ile örnek desorbe edilir. Elektrot yüzeyinden böylece sıyrılmış olan numune iyonlaşmış halde elde edilir. Bu yöntemde molekül iyonu çok az parçalanır.



Şekil 3.9. Glutamik asidin, **a.** Elektron impakt, **b.** Alan iyonlaştırma, **c.** Alan desorpsiyon yöntemi ile elde edilen spektrumları [93].

3.3.1.2.2. Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyonu/İyonlaştırma

Bu yöntemle karışma, ışın desorplayıcı matriksten (nikotinik asit, benzoik asit türevleri, 3-nitrobenzoil alkol) katılır. Daha sonra bu çözelti, bir metalik probun (numune tutucu) yüzeyinde buharlaştırılır. Katı karışım, lazer ışınına maruz bırakılır ve analitin süblimleşerek iyonlaşması sağlanır.

3.3.1.2.3. Elektrosprey İyonlaştırma

Elektrosprey iyonlaştırma atmosfer basıncında ve oda sıcaklığında gerçekleşir. Örnek çözelti, iğne şeklindeki bir kapiler ile bir dakikada birkaç mikrolitre pompalanır. İğneye etrafındaki elektrottan birkaç kilovolt potansiyel uygulanır. Oluşan çok küçük elektrik yüklü damlacıklar, daha sonra bir çözücü giderme kapilerinden geçer. Burada çözücü buharlaşır (elektrik yükleri örnek moleküllerine tutturulur). İyonlar gaz fazına desorbe olur.

3.3.1.2.4. Hızlı Atom Bombardıman Kaynakları

Hızlı atom bombardıman kaynakları yüksek mol kütleli polar türleri iyonlaştırmada daha çok kullanılır. Hızlı atom bombardıman kaynağı ile bir matrikste (gliserin çözeltisinde), iyonlaştırılmış haldeki örnekler enerjik ksenon veya argon atomları ile bombardıman edilerek iyonlaştırılır.

Kütle spektrometrelerinin karakteristik özelliği sinyal işleme ve gösterge kısımları hariç cihazın diğer bütün bileşenlerinde bulunan vakum sistemidir. Vakum sistemi yüklü parçacıklar ve elektronların atmosfer bileşenleri ile etkileşmesini önlemektir.

3.3.2. Kütle Ayırıcıları

Kütle spektrometresinde iyonlaşma bölgesinde elde edilen iyonlar, elektrikle yüklü plakalara doğru çekilerek hızlandırılır ve kütle ayırıcısına gönderilir. Kütle ayırıcısında kütle/yük (m/z) oranlarına göre hızlıca ayrılır. İyonların çoğu tek yüklü olduğundan, oran basitçe iyonun kütesine eşittir. Çeşitli tipte kütle spektrometreler kullanılmaktadır.

Kullanılan kütle ayırıcıları;

1. Manyetik
2. Elektrostatik
3. Uçuş zamanlı

4. Dört kutuplu ve

5. İyon siklotron rezonanslı olmak üzere 5 türüdür.

En çok kullanılan kütle ayırıcısı manyetik ayırıcıdır. Vakum altında tutulan spektrometrenin içinde ayırıcıya giren pozitif yüklü hızlandırılmış iyonlar kütleleri ne olursa olsun yaklaşık aynı kinetik enerjiye sahiptirler. Manyetik alan içerisine giren bu iyonlar bu alan içinde doğrusal olan yollarından saptırılır ve dairesel bir yol izlemeye başlarlar. İyonların izledikleri bu yola ait dairenin yarıçapı r , iyonun kütle/yük oranına, (m/e) , bağlıdır. İyonların m/e oranıyla manyetik alan şiddeti (B) ve iyonun manyetik alana göndermeden önce uygulanan hızlandırıcı elektriksel potansiyel değeri (E) arasında,

$$\frac{m}{e} = \frac{B^2}{2E} \cdot r^2$$

gibi bir bağıntı vardır. Spektrometrenin dedektörüne ulaşan dairesel yolun yarıçapı değiştirilmediğinden, bu yolu izleyerek dedektöre farklı (m/e) değerine sahip iyonların ulaşması, sabit bir manyetik alan şiddetinde, hızlandırıcı gerilim değerini (E), değiştirmekle sağlanır. Aynı amaca, sabit bir E değerini kullanıp; B değerini değiştirerek de ulaşılır. Tek odaklamalı olan spektrometrelerde böylece çeşitli (m/e) değerlerine sahip iyonlar kaydedilerek örneğin spektrumları elde edilir ve

$$r_e = \frac{2E}{V}$$

eşitliği ile belirlenir. Çift odaklamalı bu tür spektrometrede, istenilen kinetik enerjili iyonlar manyetik ayırıcıya gönderilir ve kütle spektrumunda pikler böylece daha büyük bir ayırıcılıkla elde edilmiş olur. Daha basit bir kütle ayırıcısı uçuş zamanlı ayırıcıdır. Kinetik enerjileri eşit iyonlar, farklı kütlelerde iseler, farklı hızlara sahiptirler. Farklı hız ve eşit kinetik enerjili vakum altında tutulan bir uçuş tüpünün diğer tarafında bulunan dedektöre farklı zamanlarda ulaşırlar. Uçuş zamanı değerleri ölçülerek farklı (m/e) değerlerine sahip olan iyonlar kaydedilir. iyonların (m/e) değerleri ile uçuş zamanları arasındaki ilişki

$$\frac{m}{e} = \frac{2E}{d} \cdot t^2$$

eşitliği ile verilir.

Burada E , iyonları hızlandıran gerilim değeri, d ise uçuş tüpünün uzunluğudur.

Dört kutuplu ayırıcıda ise hızlandırıcıdan çıkarak bu ayırıcıya gelen iyonlar, bu dört silindirin ortasındaki boşluktan karşıdaki dedektöre doğru karmaşık bir yol izleyerek ilerlemeye çalışırlar. Bu ayırıcının kullanılması ile ekonomik ve hızlı bir biçimde ölçüm yapılır.

İyon siklotron rezonans ayırıcısı adını alan ve dikdörtgen prizması şeklindeki bir başka tür ayırıcıda, iyonların hızlandırıcıdan çıkarak ilerledikleri yola dik yönde bir manyetik alan ile hem iyonların ilerleme yönüne hem de uygulanan manyetik alana dik yönde bir alternatif elektriksel alan birlikte uygulanır. İyonlar bu ayırıcının içinde dönerek ilerlerler ve iyonların bu kabın çeperlerine çarpması, kaba ayrıca sabit bir gerilim uygulayarak önlenir.

Bir kütle ayırıcısının ayırıcılığı, R,

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

formülü ile hesaplanır.

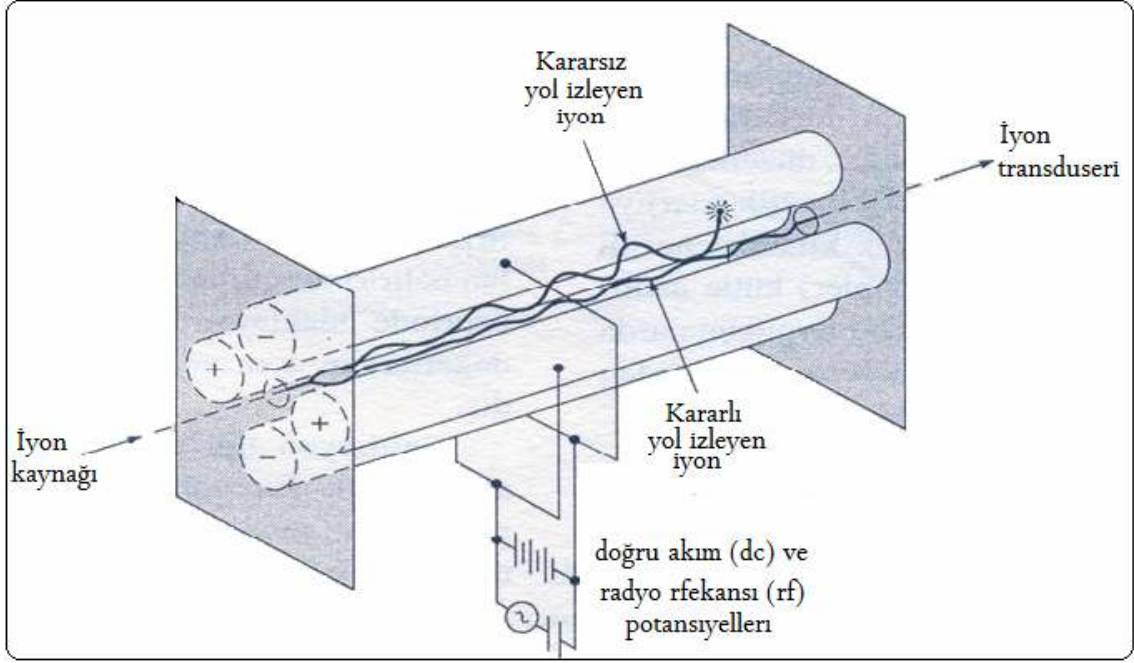
Ayırıcılığı 3000 olan bir ayırıcı, kütlesi 3000 ile 3001 olan iki iyonu pik yüksekliklerinin en çok yüzde 10' u kadar birçok çakışma ile birbirinden ayırıyor demektir.

Tek odaklamalı manyetik ayırıcısı olan aletlerle 2000-5000 değerleri arasında bir ayırıcılık elde edilir. Ayırıcılık, çift odaklamalı, yani elektrostatik ve manyetik ayırıcıları ardarda kullanan spektrometreler ile 20000-50000 değerlerine yükseltilebilir. Uçuş zamanlı kütle ayırıcısı ile elde edilen ayırıcılık değeri 500, dört kutuplu ayırıcı ile elde edilebilen ise 1500 civarındadır. Birçok organik molekülün tanımlanabilmesi için 500-1500 arasındaki ayırıcılık yeterlidir. İyon siklotron rezonans ayırıcısı ile özellikle pulslu uygulamalarda elde edilen ayırıcılık değeri ise çok büyük olup, 100000-1000000 değerine ulaşabilir.

Hem moleküler hem de atomik kütle spektrometrelerinde iyonları algılamak üzere kullanılan dedektörlerin en basiti “ faraday kabıdır”. Bu dedektörlerde bir iletken kap, spektrometrenin öteki kısımlarına göre negatif bir potansiyelde tutulur ve böylece bu kaba doğru çekilen pozitif yüklü iyonlar elektrik akımı oluştururlar. Kütle spektrometresinde kullanılan daha iyi bir dedektör türü “elektron çoğaltıcısı” adını alır. Bu düzeneğe detektöre çarpan pozitif yüklü iyonlar yüzeyden birkaç elektron fırlatılır ve bu elektronlar anotta tutularak elektrik akımına dönüştürülürler. “ sintilasyon sayıcısı” adını alan bir başka dedektörde ise iyonlar lüminesans özelliğine sahip bir ekrana çarpar ve foton yayılmasına neden olurlar.

Oldukça sık kullanılan ve iyonları öteki dedektörlerdeki gibi teker teker değil, iyonların tümünü birden algılayan bir başka dedektör türü de “fotoğraf plakası” dır. Plakaya çarpan iyonlar kararmaya neden olur. Fotoğraf plakaları ile uzun poz süreleri kullanılarak duyarlılık artırılabilir ancak, plakaların banyo edilmesi zaman alıcı bir işlemdir. Fotoğraf plakaları daha

çok nitel analizde kullanılır, çünkü bu plaklarda oluşan kararlı miktarını nicel anlamda ölçmek her zaman hata getiren bir işlemdir.



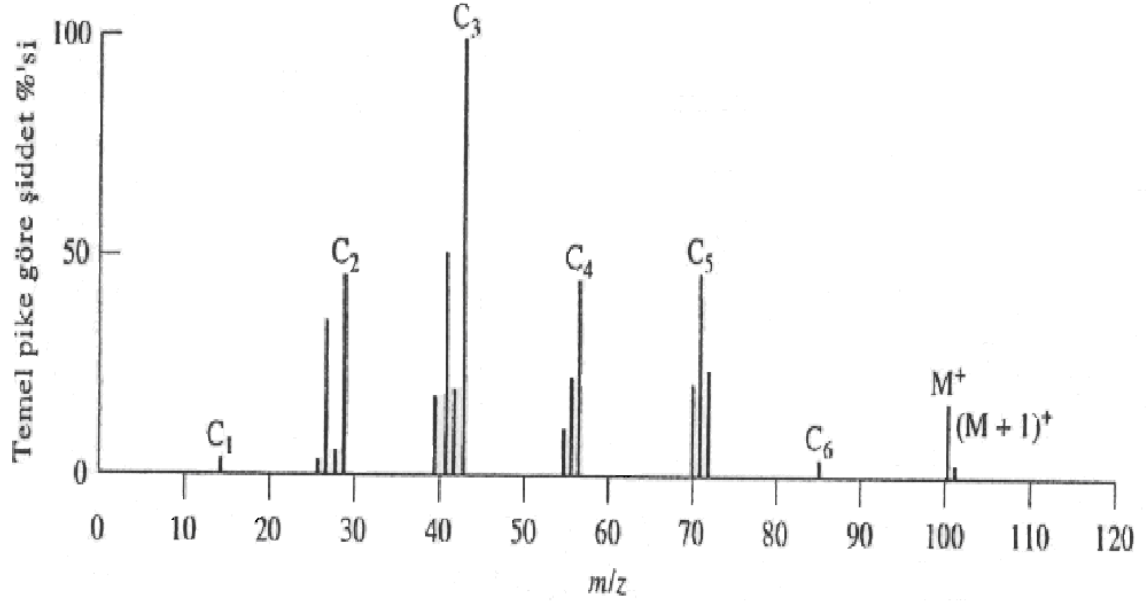
Şekil 3.10. Dört kutuplu (Kuadropol) bir kütle ayırıcısı.

İyon siklotron rezonans uyarıcısı adını alan ve dikdörtgen prizması şeklindeki bir başka tür ayırıcıda, iyonların hızlandırıcıdan çıkarak ilerledikleri yola dik yönde bir manyetik alan ile hem iyonların ilerleme yönüne hem de manyetik alana dik yönde bir alternatif elektriksel alan birlikte uygulanır. İyonlar bu ayırıcının içinde dönerek ilerlerler ve iyonların bu kabın çeperlerine çarpması kaba ayrıca sabit bir gerilim uygulanarak önlenir.

3.3.3. Kütle Spektrumlarının Karşılaştırılması ile Bileşiğin Tespit Edilmesi

Kütle spektrumlarında parçalanma şekline maddenin yapısı hakkında bilgi elde edebiliriz. Saf maddelerin parçalanma şekli üzerine yapılan sistematik çalışmalar, parçalanma mekanizmaları üzerine mantıksal değerlendirmeler, spektrum yorumlanmasına yarayan bir dizi genel kuralın ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bir spektrumda tüm piklerin sayılması her zaman mümkün olmamaktadır, hatta bu istenen bir durum da değildir. Bunun yerine parçalanmanın karakteristik şekilleri aranır. Örneğin, Şekil 3.11’deki spektrum, kütle farklılıkları 14 olan pik toplulukları şeklinde tanımlanabilir. Bu çeşit bir dizilim, düz zincirli alkanlar için çok tipiktir. Düz zincirli alkanlarda birbirine yakın karbon-karbon bağlarının

kopmasıyla, kütlesi 14 birim olan CH_2 gruplarının yapıdan ayrılması sonucu bu spektrumlar ortaya çıkar. Genel olarak en kararlı hidrokarbon parçaları üç veya dört karbonlu parçalardır, bunlara karşılık gelen pikler en büyük piklerdir.



Şekil 3.11. n-Heptanal'in elektron impakt spektrumu. Pikler C₆, C₅,C₁'e kadar, CH_2 eksilmeleriyle meydana gelen iyonların pikleridir [93].

55, 56 Alkanlardaki parçalanma sonucu CH_2 grupları çıktığından dolayı pik grupları arasında 14 kütle birimlik fark çok karakteristik olarak şekildeki örnekte de görülmektedir.

Alkenlerde özellikle poliolefinik bileşiklerin moleküler piki belirgin olarak görülür. Halkalı olmayan alkenlerde spektrum çözülürken çift bağın yerini saptamak zordur. Çünkü parçalanma sırasında çift bağın yeri sürekli olarak molekül içinde yer değiştirir. Halkasız alkenlerde parçalanma grupları arasında alkanlardaki gibi 14 kütle birimlik (CH_2) fark görülür.

Arenlerde (aromatik halkalılar), aromatik halka moleküler iyonun kararlılığını artırdığından spektrumda miktarı yüksek olarak görülür. En fazla iyonun m/e 91'de görülmesi alkillenmiş benzenin olduğunu gösterir. En kolay en büyük süstituent ayrılır. m/e 91'deki pik benzilik katyondan daha çok tropilyum iyonundan ileri gelir (C_7H_7^+). Bu yapı kararlı olduğu için 91'deki pik çok şiddetlidir. m/e 65'de görülen pik ise tropilyum iyonundan nötr asetilen molekülünün ayrılmasıdır. Mono alkil benzenlerde ise α - yerinden kopma ve hidrojenin yer değiştirmesi sonucu karakteristik bir grup pik m/e 77 (C_6H_5^+), 78 (C_6H_6^+) ve 79 (C_6H_7^+) görülür.

Karboksilli asitlerde ise en karakteristik pik m/e 60 iyonunun pikidir. Uzun zincirli asitlerde iki seri pik topluluğu ortaya çıkar; zincirdeki her C-C bağının kopması sonucu yük,

oksijenli kısımda kalır (m/e 45, 59, 73, 87, 101, 115...) veya alkil grubunda kalır (m/e 29, 43, 57, 71, 85, 99, 113, 127). Böylece alkil grupları (m/e 27, 28; 41, 42;; 69, 70; 83, 84; 97, 98;....) bir seri pik daha verir. Fakat her grupta en büyük pik $C_nH_{2n-1}O_2$ 'ininkidir.

Aromatik esterlerde en fazla iyon (temel pik) OR ve COOR gruplarının ayrılması sonucu olur. Metil esterlerinde bu pikler M-31 ve M-59' da bulunur. Aromatik asitlerin metil esterleri oldukça büyük moleküler iyon verir. Aynı koşullar altında analizi yapılan bileşikler daima aynı şekilde parçalanır. Örneğin, genel olarak en kararlı hidrokarbon parçaları 3 veya 4 karbonlu parçalardır.

Bunlara karşı gelen pikler en şiddetli piklerdir. Alkollerin ise genelde moleküler iyon pikleri çok zayıftır veya hiç gözlenmez. Ancak alkoller çoğunlukla su kaybettiklerinde $(M-18)^+$ 'de şiddetli bir pik verirler. Primer alkollerde oksijenin yanındaki C-C bağının kopması sonucu CH_2OH^+ 'ya ait şiddetli bir pik gözlenir.

Ayrıca referans bileşiklerin kütle spektrumları varsa, bilinmeyen maddenin kütle spektrumunu, referans maddelerin kütle spektrumları ile karşılaştırılması ile madde tanınabilir. Farklı bileşiklerin aynı spektrumu verme olasılığı, spektral pik sayısı arttıkça belirgin şekilde azalır.

Kütle spektrum piklerinin yüksekliği ise;

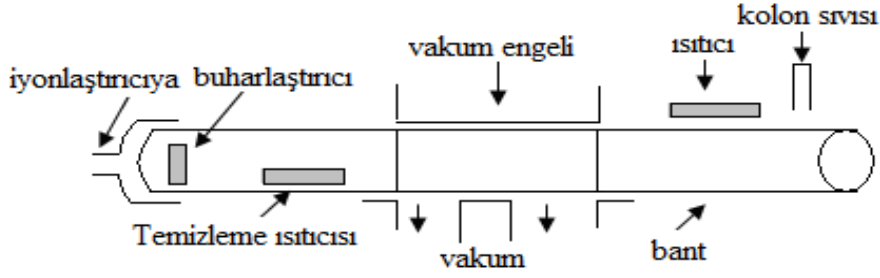
- Elektron ışınının enerjisi,
- Örneğin ışına göre yeri,
- Örneğin basıncı ve sıcaklığı,
- Kütle spektrometrenin genel şekli gibi değişkenlere bağlıdır.

Genellikle kaynama noktası yüksek, sıcaklığa dayanıksız maddelerin ayırımında kullanılan sıvı kromatografda da kütle spektrometresinin dedektör olarak kullanılması ayrı bir önem taşır. Kütle spektrometresinin dedektör olarak sıvı kromatografa bağlanmasını sağlayan bir ara fazın kullanımında iki önemli sorun aşılacak zorundadır:

1. Sıvı kromatografide hareketli faz bir sıvıdır ve akış hızı bir hayli yüksektir. (gaz kromatografide kılcal kolon kullanımı bu sorunu önemli ölçüde azaltmaktadır).
2. Sıvı kromatografide genellikle kolay buharlaşmayan ve ısıya karşı dayanıksız maddelerin ayırımı yapılır. Dolayısı ile bunların gaz halinde kütle spektrometresinin iyonlaştırma bölgesine aktarımı sorunlar yaratır.

Yukarıdaki nedenlerle sıvı kromatografi kolonundan gelen sıvının kütle spektrometresine aktarılması sağlayan ara faz sistemi ayrı bir önem taşır. Çeşitli ara faz sistemleri kullanılmaktadır:

- Doğrudan sıvı enjeksiyonu
- Sürekli akışlı hızlı atom bombardımanı sistemi (FAB)
- Hareketli bant sistemi
- Termosprey
- Elektrospray
- Atmosferik basınçta kimyasal iyonlaştırma sistemi (APCI)



Şekil 3.12. LC/MS hareketli bant ara faz sistemi [92].

Tablo 3.3' te bazı LC/MS ara faz sistemlerinin karakteristikleri gösterilmiştir. Tabloda sistemler arası önemli farklar görülmektedir. Akış hızı, iyonlaştırıcı türü, tayin edilebilen minimum kütle ve minimum tayin sınırı tabloda verilmiştir.

Doğrudan sıvının enjekte edilebildiği sistemlerde kimyasal iyonlaştırıcı kullanılırken diğerlerinde farklı sistemlerin kullanılması gerekmektedir. Diğer taraftan hareketli bant sisteminde ancak kaynama noktası 170 °C olan maddelere uygulanabilmektedir. Ayrıca hareketli faz sistemi kompleks bir teknik sisteme sahiptir ve kullanılması zordur.

Tablo 3.3. Bazı LC/MS Ara Faz Sistemlerinin Karakteristikleri [92].

Özellik	Doğrudan enjeksiyon	Hareketli bant	Termosprey	APCI	Sürekli FAB
Hız (ml/dk)	0.01-0.05, 0.2-2.0	1-2	1-2	1-2	0.005-0.01
İyonlaştırıcı	CI	EI/CI/FAB	TSP/CI	APCI	FAB
Kütle aralığı (minimum)	130	50	120	150	-
Tayin sınırı (ng)	1-10	10-20	5-10	1-10	10-50

En çok kullanılan ara faz sistemi termospreydir. Ancak her madde için uygun değildir. Kimyasal iyonlaştırıcı (CI) kullanıldığı için fragmentasyon az olur ve madde yapısı hakkında yeterli bilgi sağlanamaz. Sonuç olarak şunu söyleyebiliriz: henüz sorunları çözülmüş bir LC/MS bağlantısı yapılabilmiş değildir.

3.3.4. Moleküler Kütle Spektrometrinin Uygulamaları

Moleküler kütle spektrometrinin uygulamaları çok geniş ve kapsamlıdır. Tablo 3.4’ te, kütle spektrometrinin bu geniş kullanım alanına fikir vermek üzere, bu uygulamalardan bazıları listelenmiştir. uygulamalardan en çok rastlananlar ile bazı önemli olanları verilmiştir.

Tablo 3.4. Moleküler Kütle Spektrometrinin Uygulamaları [93].

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none">1. Organik ve biyokimyasal moleküllerin yapılarının aydınlatılması.2. Peptitlerin, proteinlerin ve oligonükleotidlerin mol kütlelerinin tayin edilmesi.3. İnce tabaka ve kağıt kromatografide ayrılan bileşiklerin tanınması.4. Poliipeptit ve protein numunelerinde amino asit dizilişinin tayini.5. Kromatografi ve kapiler elektroforez ile ayrılan türlerin belirlenmesi ve teşhisi.6. Zararlı ilaçların ve bu zararlı ilaçların metabolitlerinin kan, idrar ve tükürükte belirlenmesi.7. Ameliyat sırasında hastanın nefesindeki gazların izlenmesi.8. Yarış atları ve olimpiik atletlerde doping kontrolü.9. Arkeolojik numunelerin yaşlarının belirlenmesi.10. Aerosol oluşturan partiküllerin analizi.11. Yiyeceklerde pestisit kalıntılarının tayini.12. Su kaynaklarında uçucu organik maddelerin izlenmesi. |
|---|

Kromatografi çok gelişme gösteren analitik yöntemlerdendir. Onlarca yönteme yenileri eklenmektedir. Her yöntemin diğerine bazı üstünlükleri vardır. Bu nedenle kromatografik yöntemlerin genel bir karşılaştırmasını yapmak zorundadır. Tablo 3.5.’ te gaz ve sıvı kromatografi yöntemlerinin genel bir karşılaştırması yapılmıştır.

Tablo 3.5. Gaz ve Sıvı Kromatografilerinin Karşılaştırılması [92].

Faktör	Gaz Kromatografisi	Sıvı Kromatografisi
Prencip	Örnek sıvıya dayanıklı, buharlaşabilir.	Örnek uygun bir sıvıda
Örnek türü	Gazlar, sıvılar, katılar molekül ağırlık<500	Sıvı ve katılar, iyonlar
Hareketli faz	H ₂ , He, N ₂ ile sınırlı	Tüm organik ve inorg. Sıvılar
Sabit faz	Sınırlı sayıda	Bağlı faz şeklinde çok sayıda
En düşük tayin Sınırı	10 ⁹ -10 ¹² g	10 ⁶ -10 ⁹ g
Analiz süresi	Dakika	Dakikalardan saatlere
Teorik tepki sayısı	2 000-100 000	500-10 000
Prepara. Amaç için	Uygun değil	Uygun
Sıcaklık progr.	Yapılabilir	Güç ve yapılamaz
Gradyent yürütme	Yapılamaz	Yapılabilir
Fiyat, \$	400-8 000	2 000-25 000

Ancak bir karşılaştırma yapmak gerektiğinde ilk akla gelen gaz ve sıvı kromatografileri karşılaştırmak olur. Gaz kromatografisi duyarlılığı, pratikliği, güvenilirliği, en düşük tayin sınırının pikograma kadar inebilmesi ile kromatografik yöntemler arasında uzun zaman ilk sıradaki yerini korumuştur.

Bunun en büyük göstergesi gaz kromatografisi ile yapılan yüz binlerce araştırmadır. Ancak Tswett' in 1905 yılında ilk kez katı-sıvı şeklinde uyguladığı kolon kromatografisi 1950' li yıllardan sonra büyük gelişme kaydederek gaz kromatografisi ile boy ölçüşebilir hale gelmiştir.

Sıvı kromatografideki büyük gelişme her şeyden önce çok küçük tanecik çaplı dolgu maddelerinin (sabit faz) hazırlanabilmesi ve bu taneciklerin üzerinden sıvı fazın yürütülmesini sağlayacak yüksek basınç pompalarının teknik olarak yapılabilmesinden kaynaklanmaktadır. Uygun dedektörlerin de geliştirilmesi, çeşitli sabit fazların kullanılabilir olması, sıvı kromatografiyi, özellikle yüksek basınç sıvı kromatografiyi (HPLC), gaz kromatografisi ile yarışabilir hale getirdi. O kadar ki zaman zaman HPLC' nin daha avantajlı olduğu iddia edildi. Ancak genellikle gaz ve sıvı kromatografilerinin birbirlerinin rakibi değil, birbirlerinin tamamlayıcısı olduğu kabul edilmektedir [92].

4. MATERİYAL ve METOT

4.1. Kullanılan Cihazlar ve Cam Malzemeler

Çalışmada Agilent 1200 HPLC ve 6110 quadropol MS dedektörü birlikte kullanılmıştır. Kullanılan diğer yardımcı malzemeler şunlardır,

1. Manyetik karıştırıcı (VELP Multiposition heating magnetik stirrer)
2. Soğuk santrifüj cihazı (Hettich)
3. Döner evaporatör
4. Etüv (Quapac-Ec)
5. Elektronik terazi (Gec-Avery)
6. Santrifüj (Hettich EBA III)
7. Ultrasonik su banyosu
8. Değişik büyüklükte pipet, beher, balon joje, mezür... gibi cam malzemeler.

4.2. Kullanılan Standart Çözeltiler ve Reaktiflerin Hazırlanması

Standart çözeltiler: Çalışılan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (antrasen, piren, benzo[a]antrasen ve benzo[a]piren)' ın Fluka Standart Maddelerinden, Model standart stok çözeltiler hazırlandı. Birinci adımda bu bileşenlerin asetonitril içinde 1000 ppm' lik stok çözeltileri hazırlandı. Diğer düşük konsantrasyondaki standart çözeltiler ise bu stok çözeltiden seyreltilerek hazırlandı.

Carrez 1: 15 gr $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ (potasyumhegzasiyanoferrat) 100 ml saf suda çözüldü.

Carrez 2: 30 gr $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (çinkosülfat) 100 ml saf suda çözüldü.

Mobil faz: Asetonitril/su karışımı (75:25) kullanıldı.

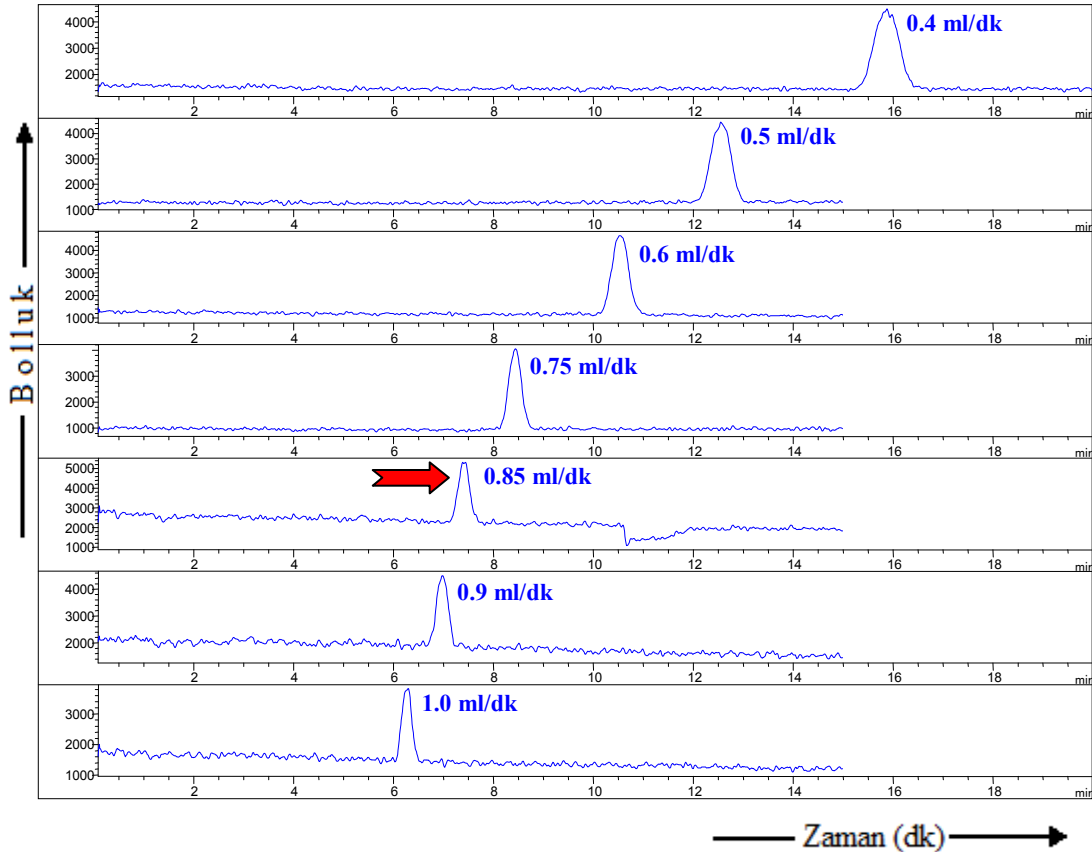
0.2 mM CH_3COOH ' ın hazırlanması: % 100' lük 1.05 kg/L olan CH_3COOH ' ten 0.57 ml alınıp 100 ml' ye tamamlanarak 0.1 M CH_3COOH hazırlandı. 0.1 M CH_3COOH ' ten ise 0.2 ml alınarak 100 ml' ye tamamlanarak 0.2 mM CH_3COOH hazırlandı.

0.4 M $HClO_4$ ' ün hazırlanması: %72' lik 1.68 kg/L olan $HClO_4$ ' ten 3.42 ml alınıp 100 ml' ye tamamlandı.

4.3. PAH' ların Tayininde HPLC-MS' in Koşullarının Optimizasyon Çalışmaları

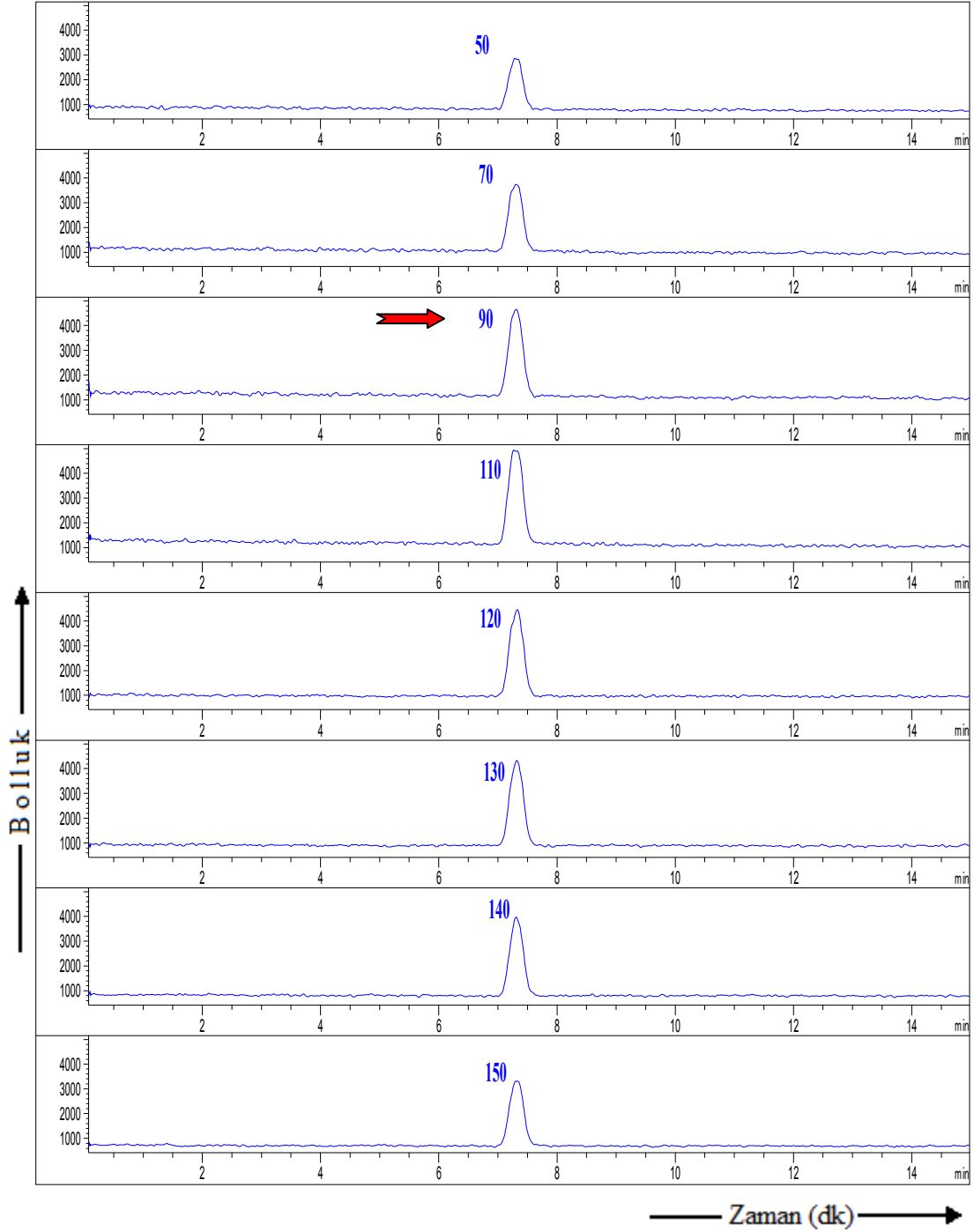
4.3.1. Antrasen için Optimum Koşullarının Tayini

Hazırlanan antrasen standart çözeltileriyle optimum koşullar tespit edildi. Öncelikle cihazın optimum mobil faz akış hızı tespit edildi. Bu amaçla 0.4 ml/dk – 1 ml/dk akış aralığında yapılan deneysel çalışmalarda elde edilen kromatogramların pik simetrisi ve kütle spektrumlarının maksimum değerlerinden faydalanarak en iyi mobil faz akış hızı Şekil 4.1' de de görüldüğü gibi 0.85 ml/dk olduğu gözlemlendi. Bundan sonraki bütün deneysel çalışmalarda bu akış hızı miktarı kullanıldı. Mobil fazın akış hızı değişiminin pikin çıkış süresini yani bileşenlerin kolonu terk etme süreleri üzerinde ciddi bir şekilde etkili olduğu görüldü.



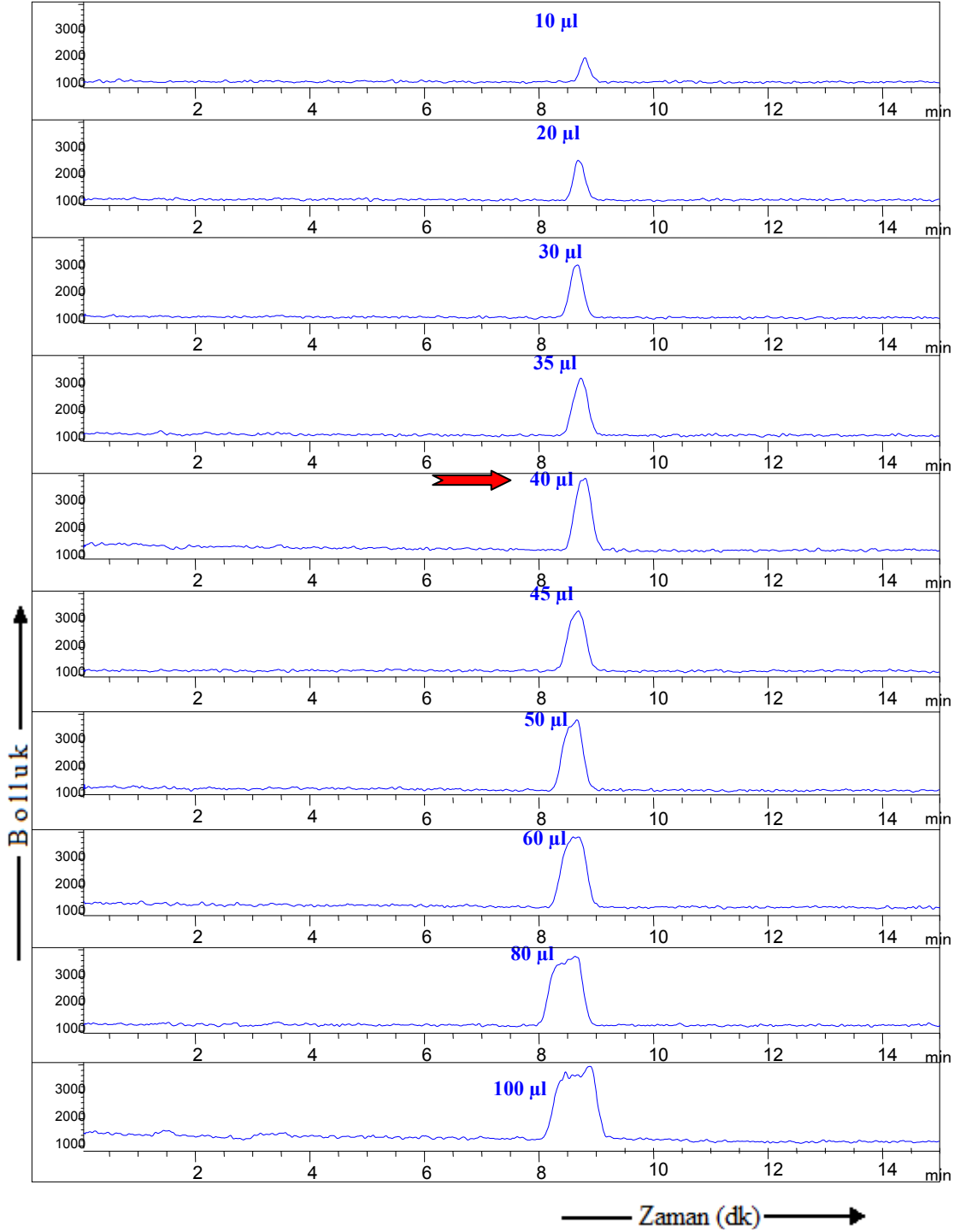
Şekil 4.1. Antrasenin optimum akış hızı tayini.

En iyi Fragmenter voltajını belirlemek için yapılan çalışmalarda, 50–150 fragmenter (parçalayıcı voltaj) aralığında kromatogramlar alındı. Pik simetrisi dikkate alındığında, Şekil 4.2’ de görüldüğü gibi en uygun fragmenterlerin 90 olduğuna karar verildi. Bundan sonraki bütün deneysel çalışmalarda bu fragmenter voltajı kullanıldı.



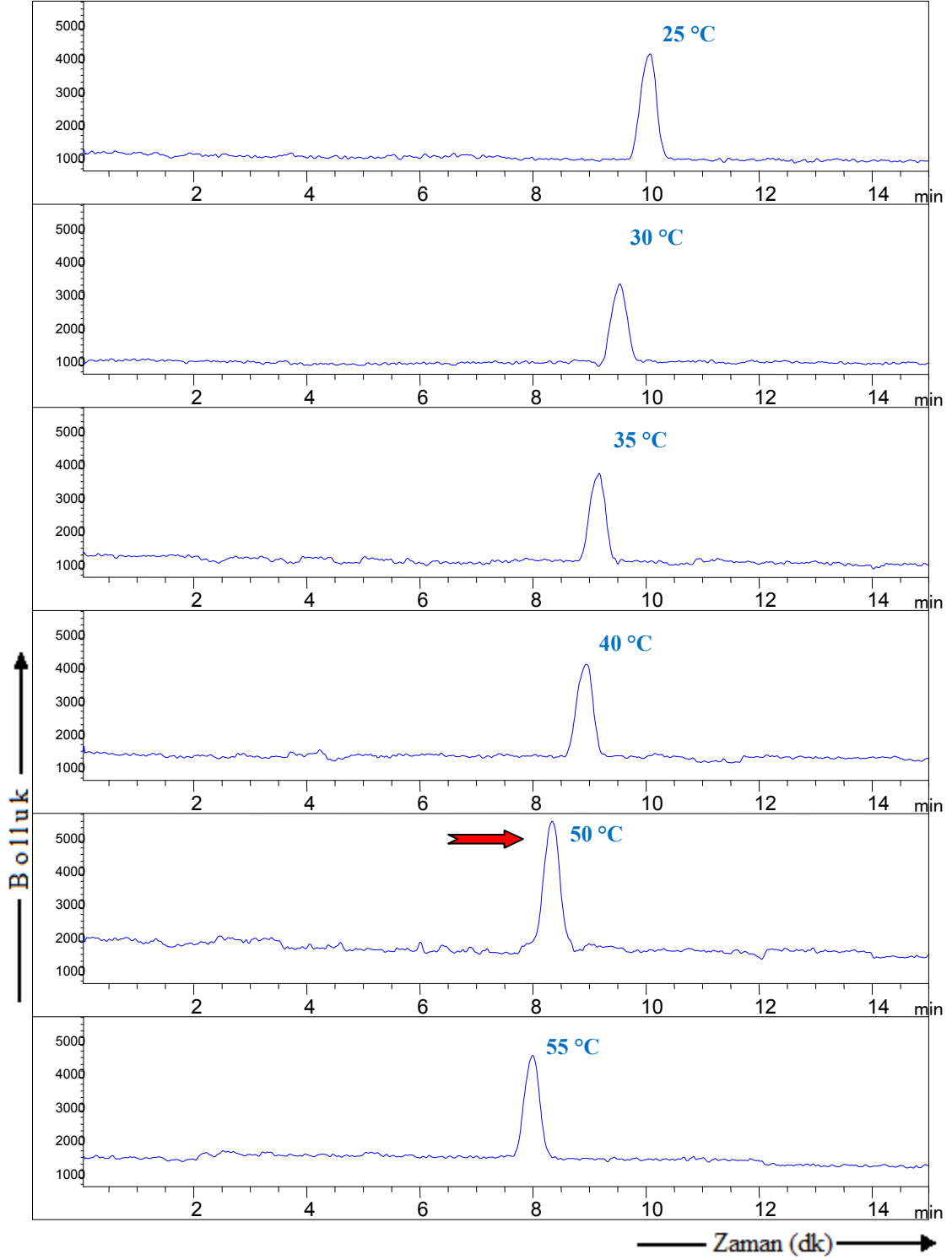
Şekil 4.2. Antrasenin optimum fragmenter tayini.

En iyi enjeksiyon hacmini belirlemek için yapılan çalışmalarda, 10–100 μ l aralığında örnek hacimleri enjekte edildi. Enjeksiyon edilen örnek miktarına karşılık pik şiddetleri ve MS spektrumlarının maksimum değerleri artmasına karşın pik simetrisi ciddi şekilde bozulduğu için pik simetrisinin en iyi olduğu 40 μ l enjeksiyon hacmi optimum olarak kabul edildi (Şekil 4.3).



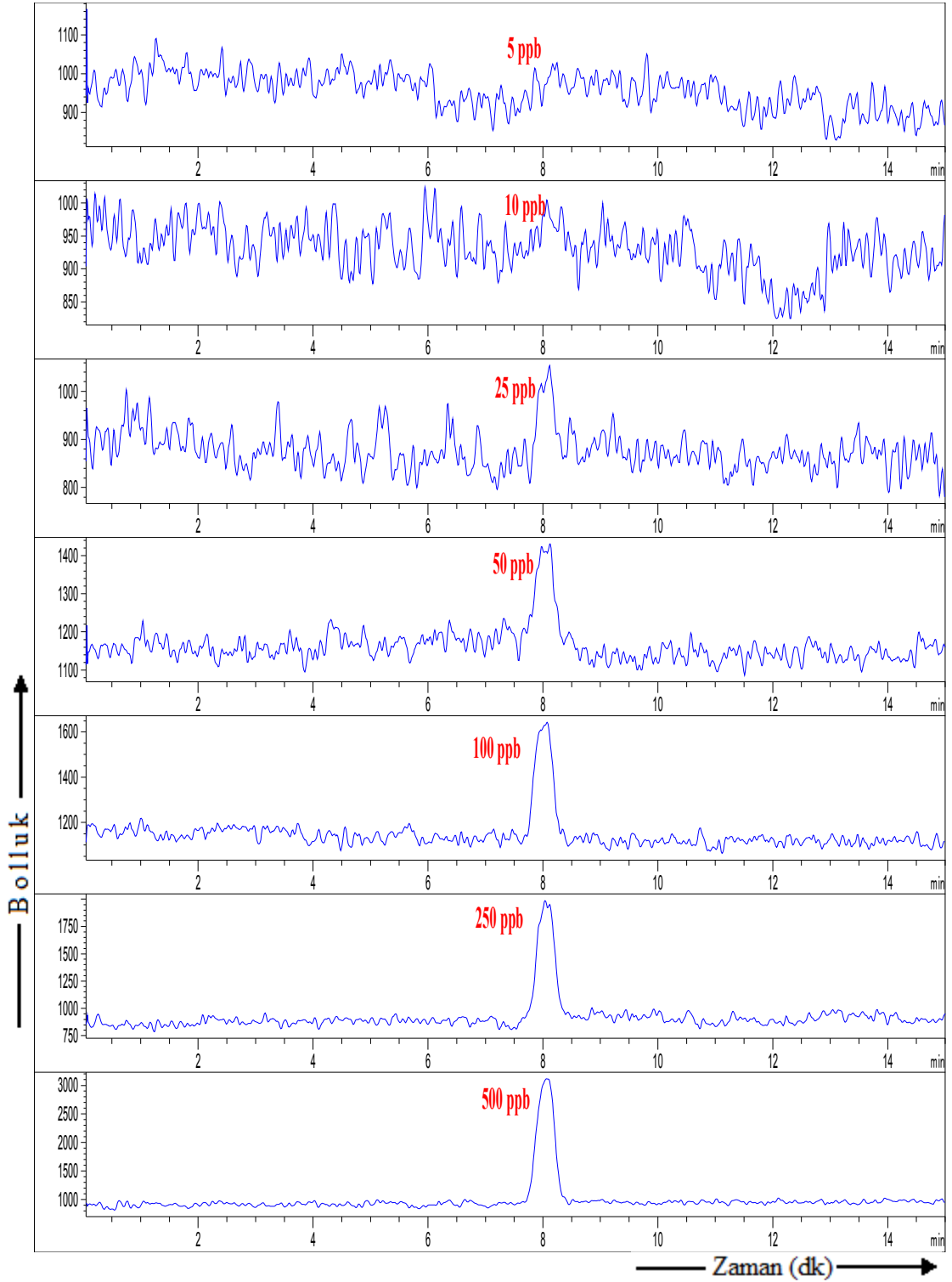
Şekil 4.3. Antrasenin optimum enjeksiyon hacmi tayini.

En uygun kolon sıcaklığının tayini için, 25- 55 °C aralığında çalışılması sonucu piklerin çıkış zamanları ve MS maksimum değerlerinin değişimi elde edildi (Şekil 4.4). Bu değişimler göz önüne alınarak pik simetrisi en iyi olan 50 °C’ deki pik optimum seçildi.



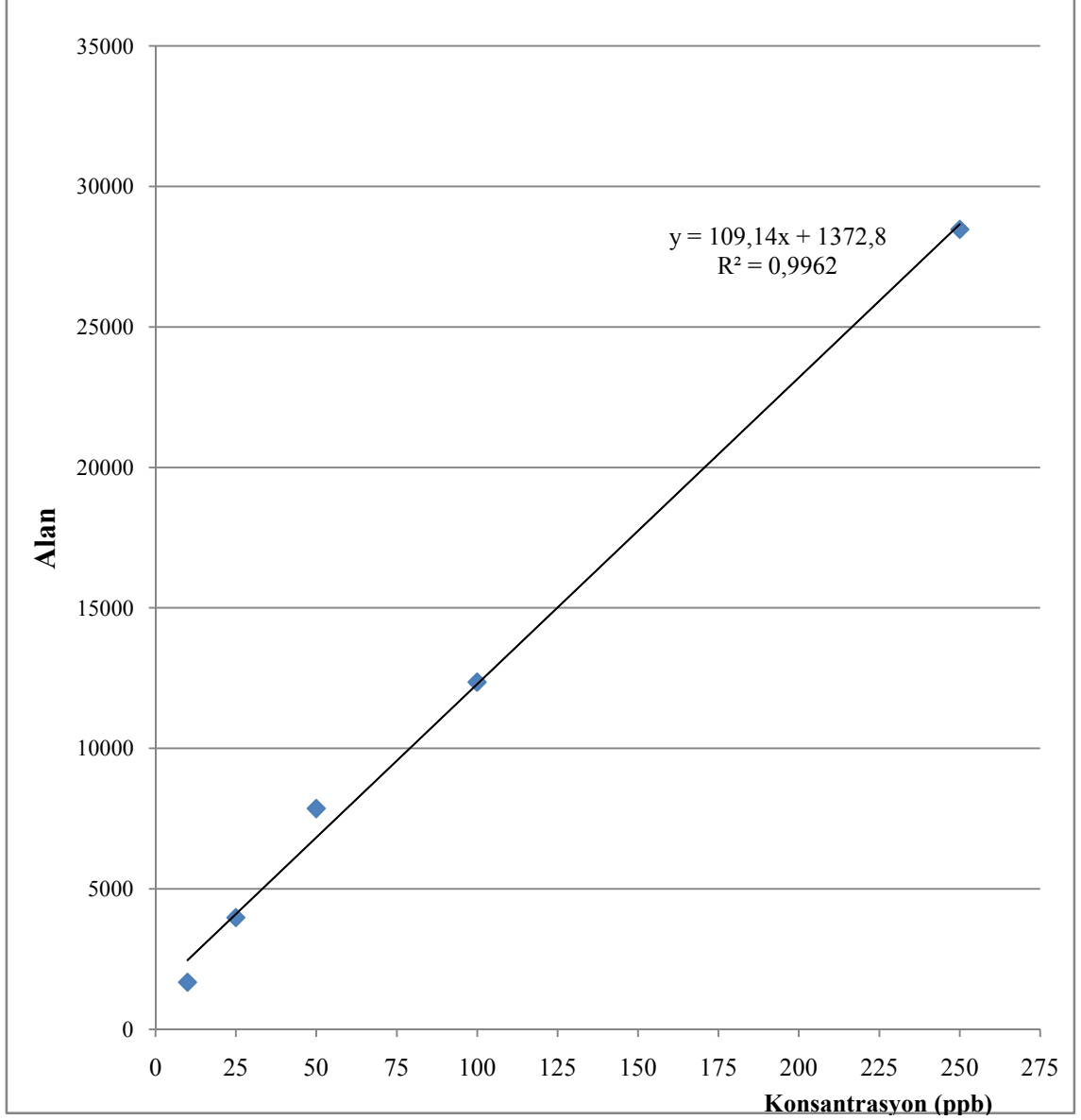
Şekil 4.4. Antrasenin optimum kolon sıcaklığı tayini.

Nicel analizde kullanılmak üzere çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan antrasen çözeltileri için optimum şartlarda elde edilen kromatogramlar Şekil 4.5’ te verilmiştir. Bu kromatogramlardan da anlaşıldığı gibi standart maddenin konsantrasyonunun artması ile zemindeki gürültülerin bastırıldığını ve piklerin daha sade olduğu görülmektedir.



Şekil 4.5. 5–10–25–50–100–250 ve 500 ppb antrasenin kromatogramları.

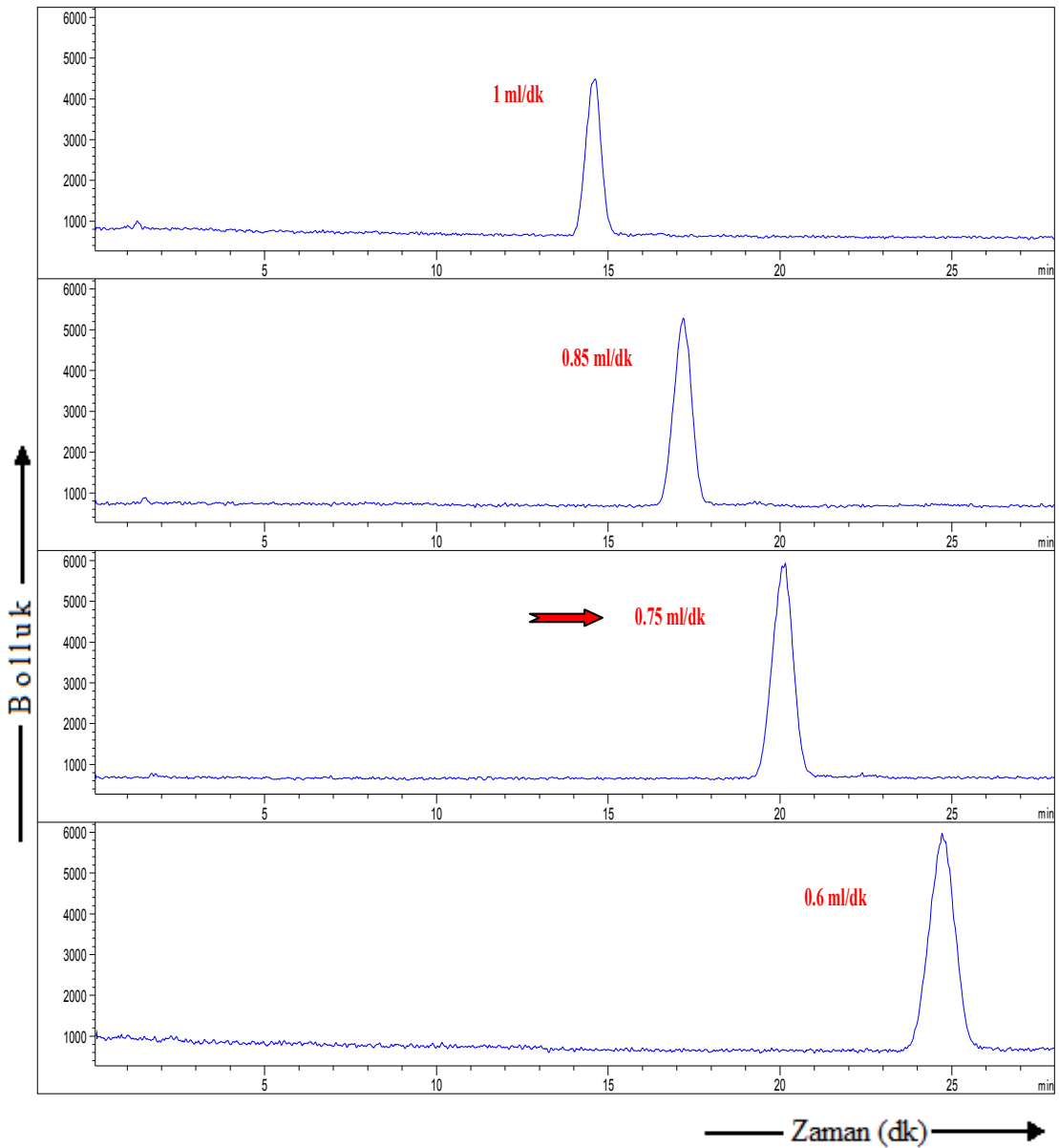
Antrasen için 10-250 ppb konsantrasyon aralığında çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.6’da görülmektedir. Analiz edilen örneklerdeki antrasen miktarı, kromatogramlarının alanları bu grafikten yararlanılarak konsantrasyona dönüştürüldü.



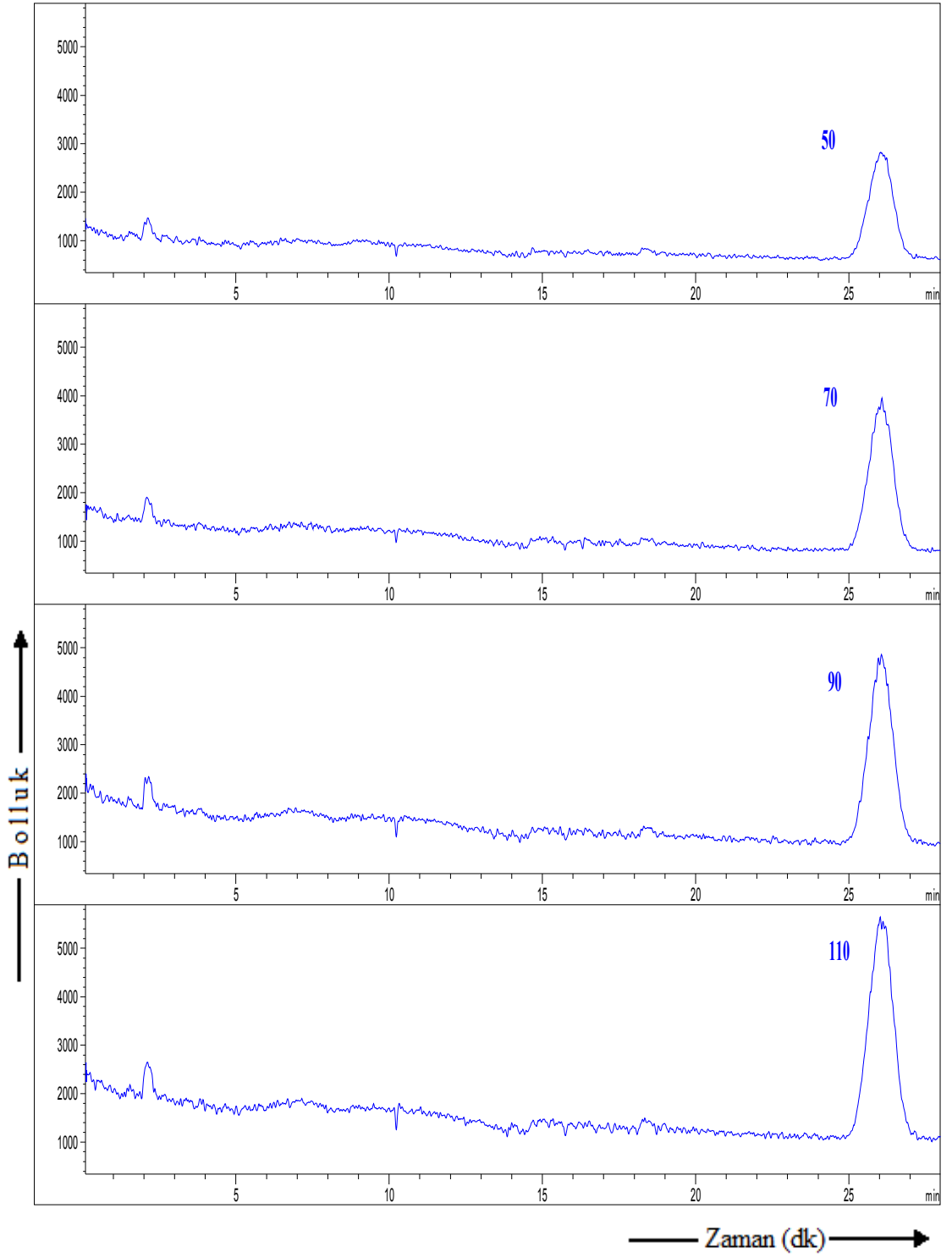
Şekil 4.6. Antrasenin kalibrasyon eğrisi.

4.3.2. Benzo[a]antrasen için Optimum Koşullarının Tayini

Benzo[a]antrasen standart çözeltileriyle (500 ppb) yapılan optimizasyon çalışmasında aşağıdaki optimum şartlar elde edildi. Bu amaçla yapılan bütün deneysel çalışmalarda elde edilen kromatogramların pik simetrisi ve pik spektrumlarının maksimum değerleri göz önünde bulundurularak en uygun şartlar tayin edildi. Bu parametreler aşağıda Şekil 4.7-4.11’ de verilmiştir. Optimum akış hızı 0.75 ml/dk olarak seçildi (Şekil 4.7). En iyi fragmenterin tayini amacıyla yapılan çalışmada Şekil 4.8 ve 4.9’ daki kromatogramlardan da görüldüğü gibi 130 fragmenter (volt) olarak seçildi. En uygun enjeksiyon hacmi ise 80 µl olarak bulundu (Şekil 4.10)

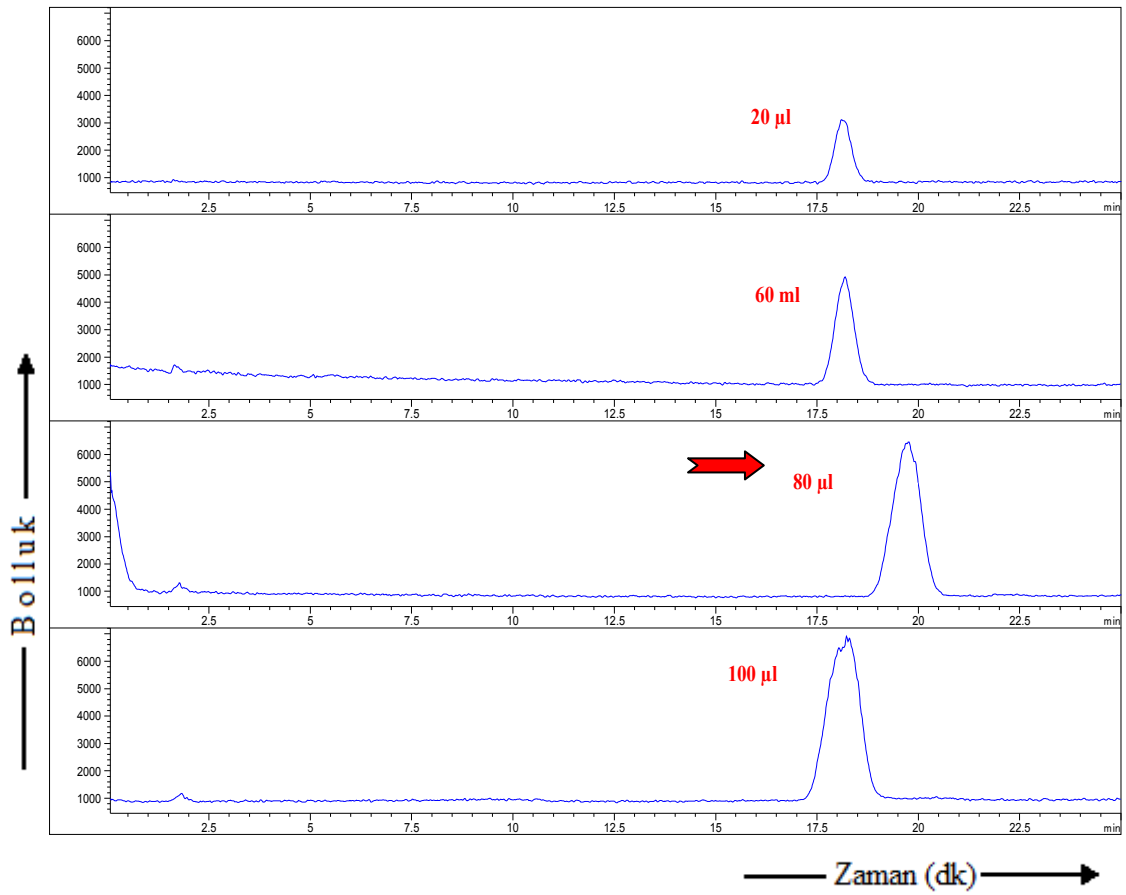
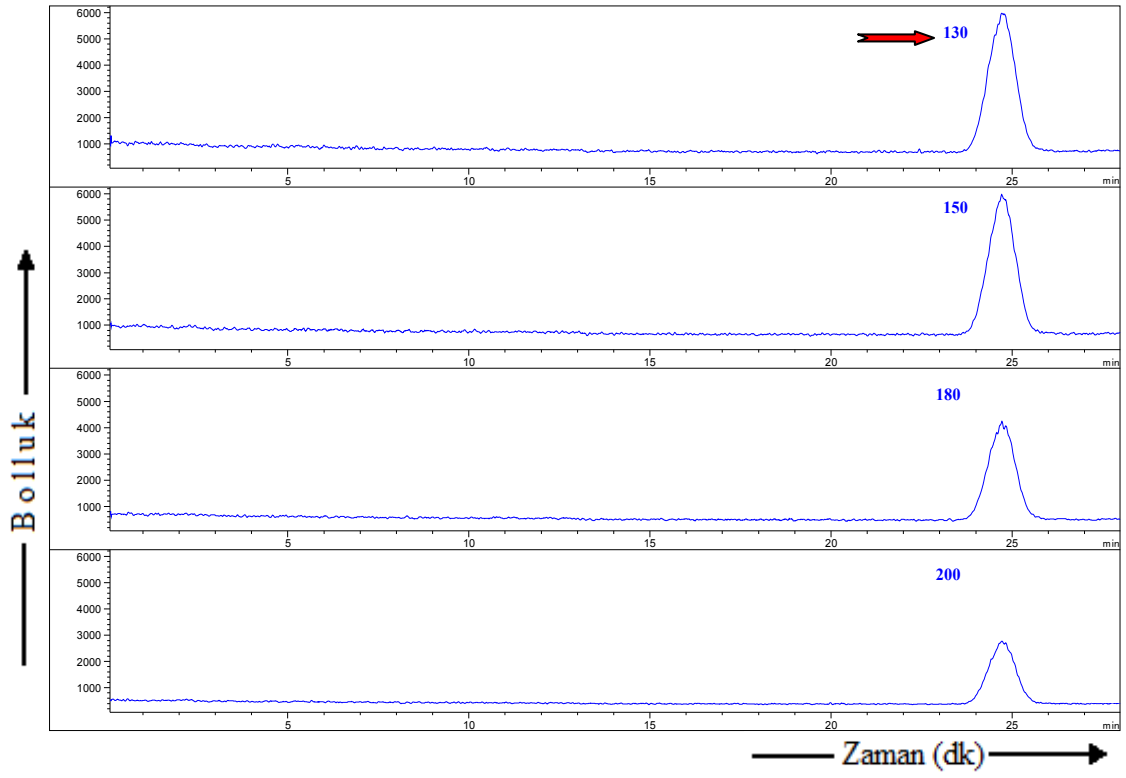


Şekil 4.7. Benzo[a]antrasenin optimum akış hızı kromatogramları.

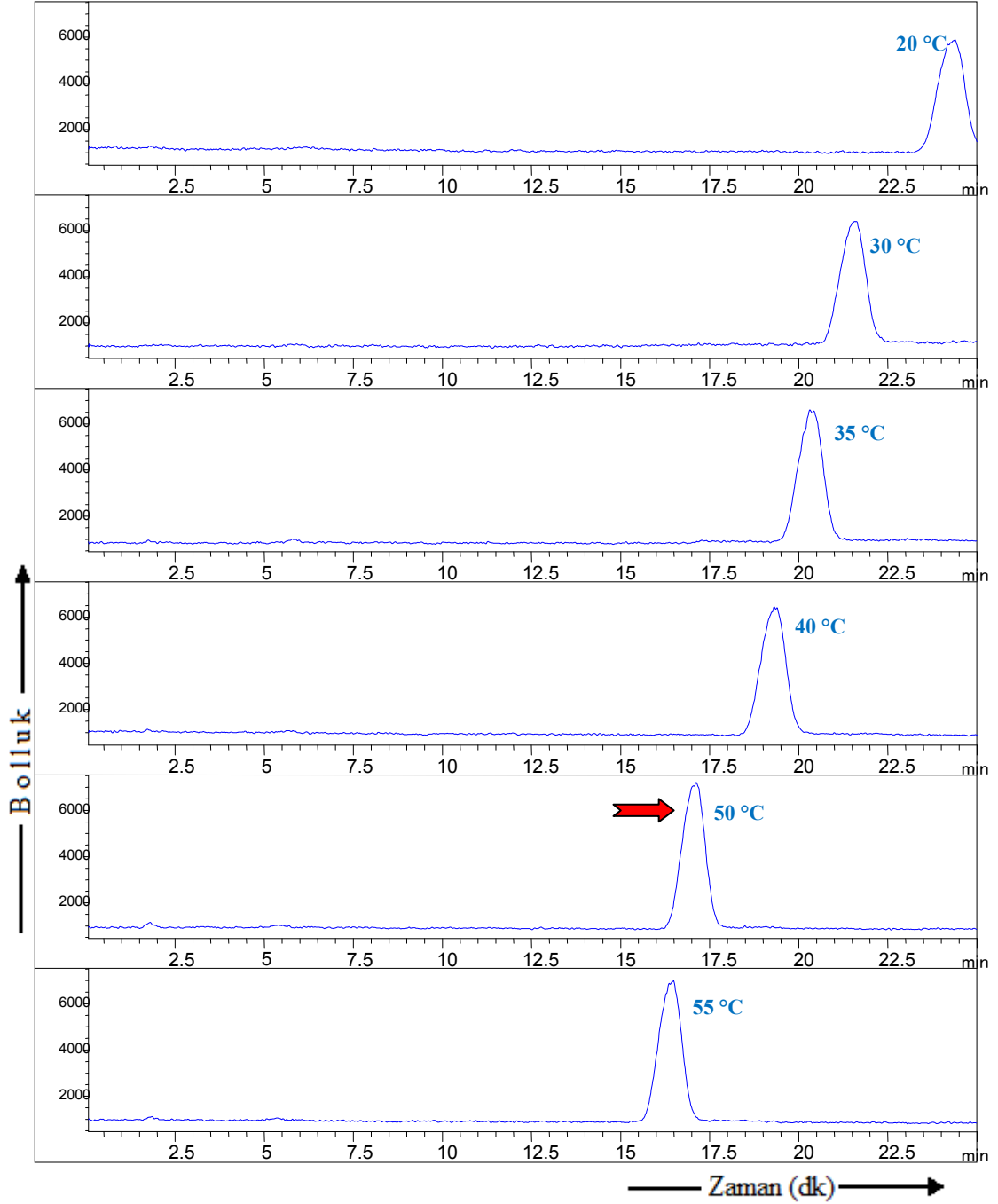


Şekil 4.8. Benzo[*a*]antrasenin 50–70–90–110 fragmenterdeki kromatogramları.

Şekil 4.8 ve 4.9’ daki kromatogramlarda görüldüğü gibi; 50-200 fragmenter aralığında yapılan optimizasyon çalışmasında pik simetrisinin iyi olduğu ve MS spektrumunun maksimum değerinin en yüksek olduğu 130 değeri benzoantrasenin optimum fragmenteri olarak seçildi.

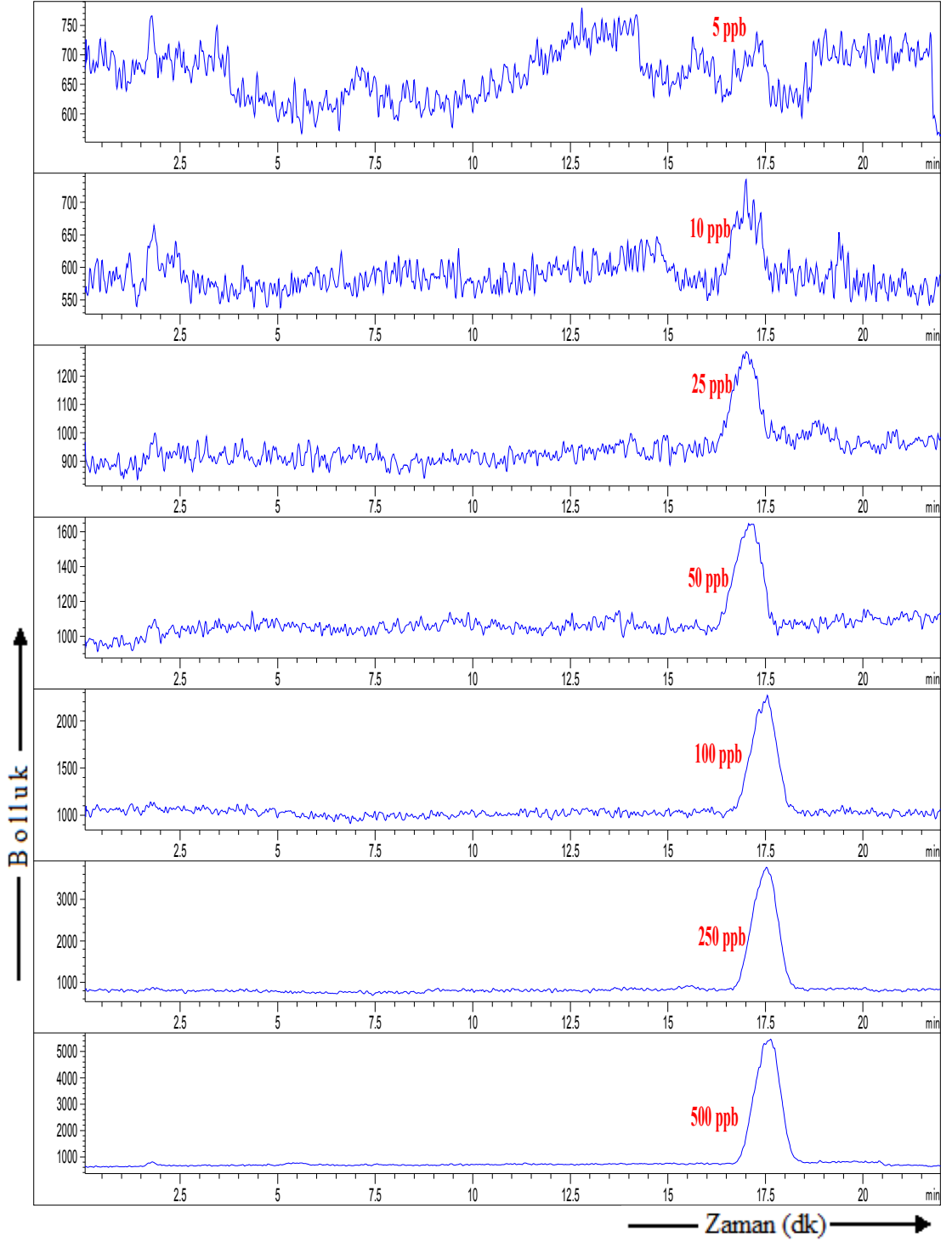


500 ppb' lik Benzo[*a*]antrasenin standart çözelti ile 20-55 °C sıcaklık aralığında yapılan deneysel çalışmada pik simetrisi ve MS spektrumunun maksimum değerleri göz önünde bulundurularak en uygun kolon sıcaklığı Şekil 4.11' de de görüldüğü gibi 50 °C olarak seçildi.

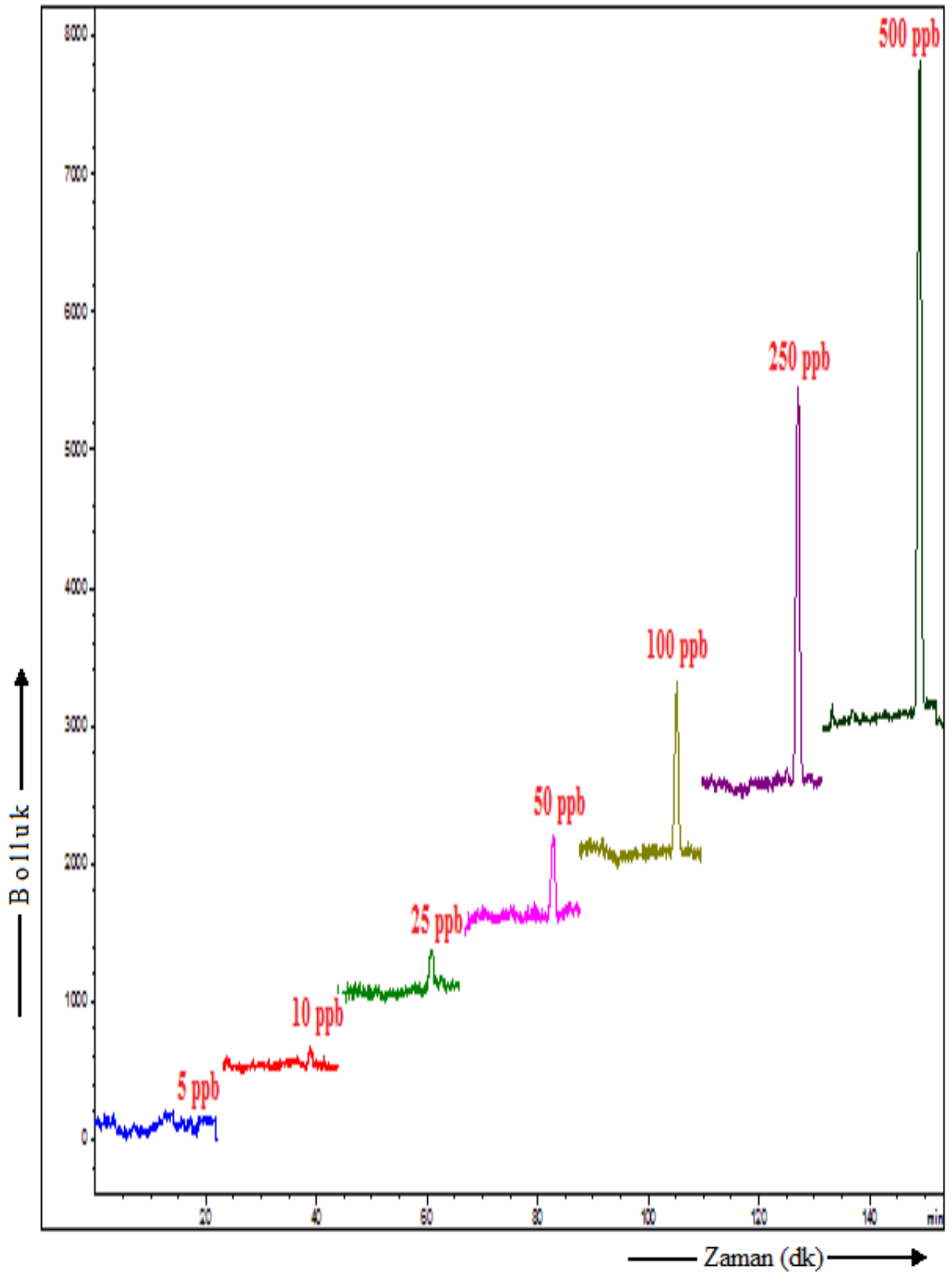


Şekil 4.11. Benzo[*a*]antrasenin kolon sıcaklığı tayini.

5–10–25–50–100–250 ve 500 ppb’ lik benzo[*a*]antrasenin çözeltiler ile yapılan çalışmada kalibrasyon grafiği elde edildi. Kromatogramlardan da (Şekil 4.12 ve 4.13) görüldüğü gibi herhangi bir matrisdeki benzo[*a*]antrasenin konsantrasyonu artıkça piklerin daha net ve keskin olduğu gözlemlendi.



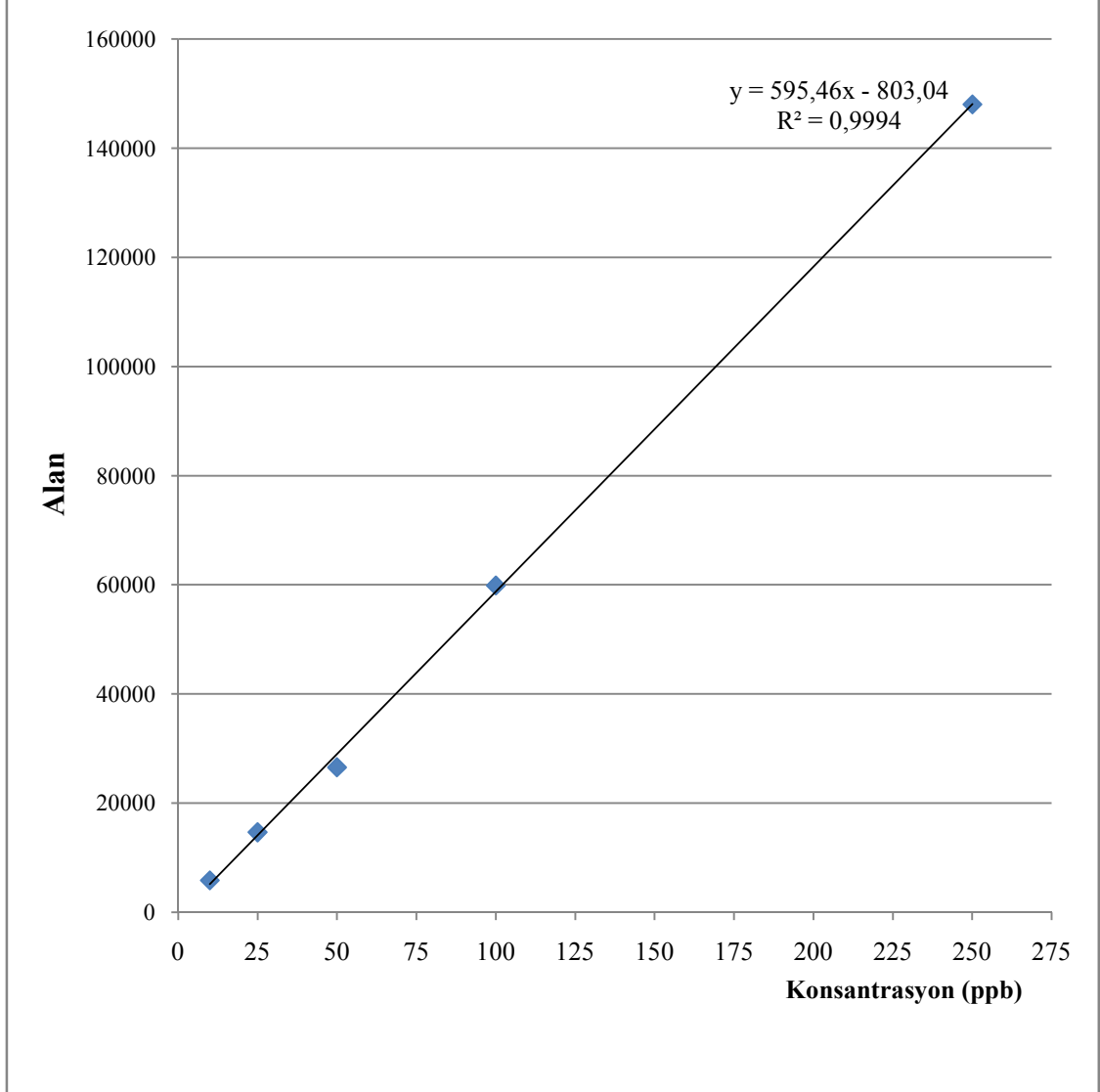
Şekil 4.12. 5-10-25-50-100-250 ve 500 ppb benzo[*a*]antrasenin kromatogramları.



Şekil 4.13. 5-10-25-50-100-250 ve 500 ppb benzo[a]antrasenin kromatogramlarının sinyal olarak gösterimi.

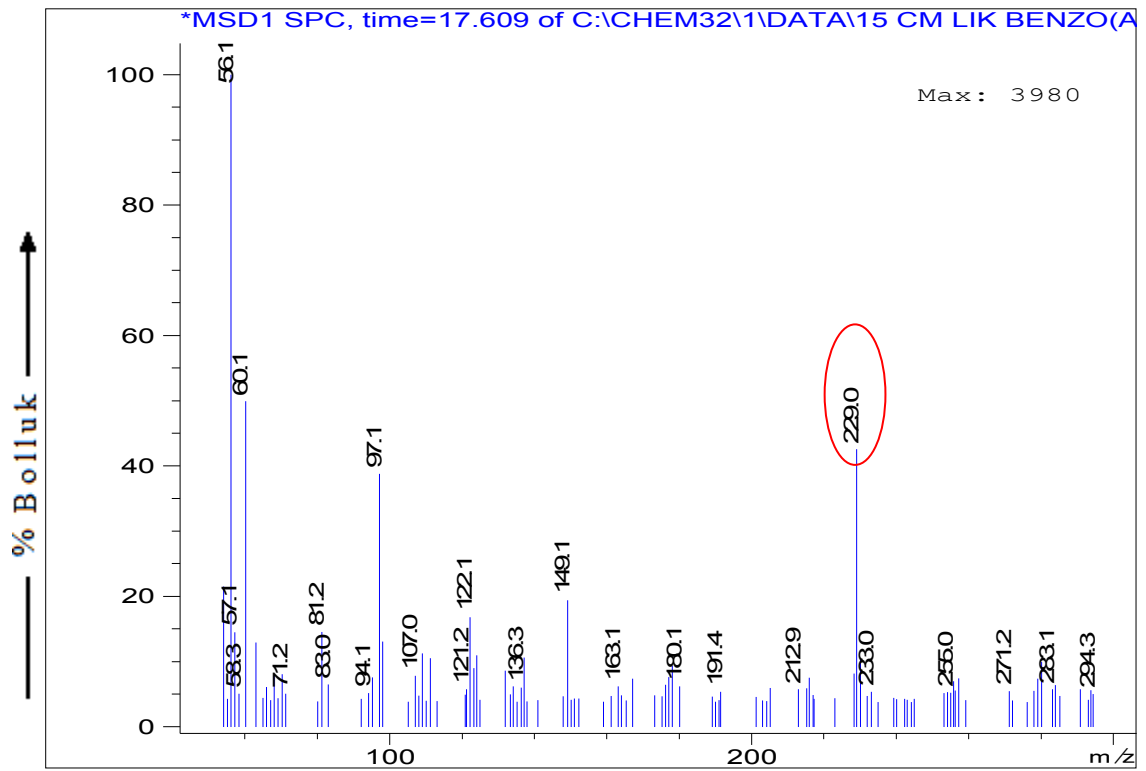
Farklı konsantrasyonlardaki benzo[a]antrasenin kromatogramlarının sinyal olarak gösteriminde de gözlenebilen en küçük konsantrasyonun 10 ppb olduğu görülmektedir.

Benzo[a]antrasen için 10-250 ppb konsantrasyon aralığında çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.14’ te görülmektedir. Analiz edilen örneklerdeki Benzo[a]antrasen miktarı, kromatogramlarının alanları bu grafikten yararlanılarak konsantrasyona dönüştürüldü.

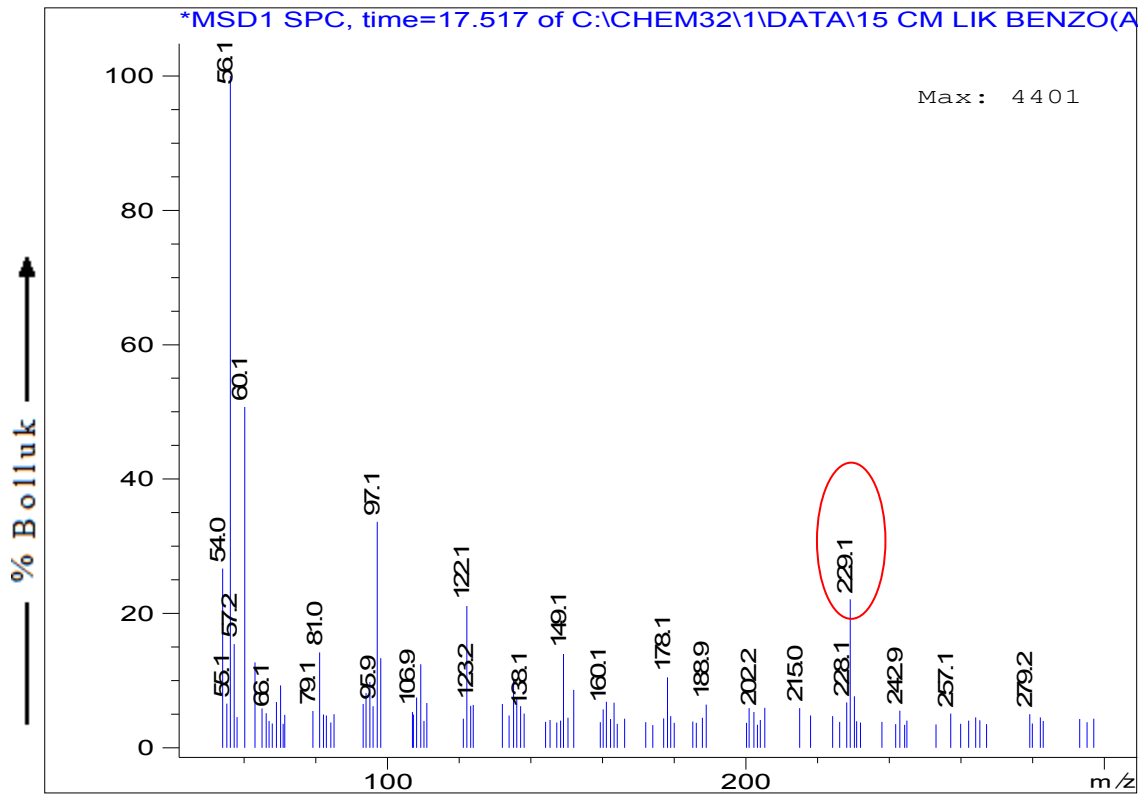


Şekil 4.14. Benzo[a]antrasenin kalibrasyon eğrisi.

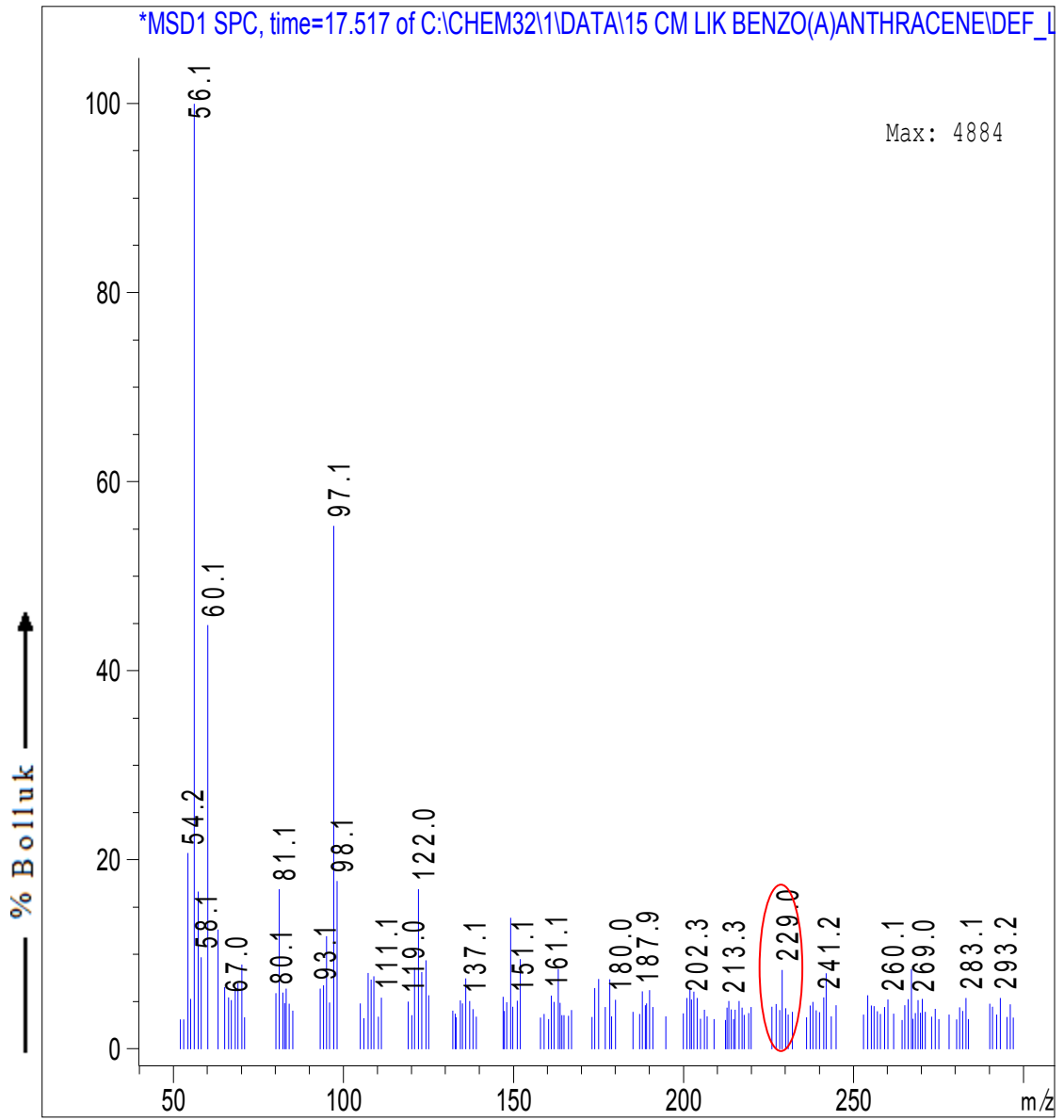
Farklı konsantrasyonlardaki Benzo[a]antrasenin SCAN-MS spektrumları Şekil 4.15-4.17’ de verilmiştir. Bu spektrumları karşılaştırıldığında iyon piki şiddetinin konsantrasyonla doğrusal değiştiği gözlenmektedir.



Şekil 4.15. 500 ppb benzo[*a*]antrasenin MS spektrumu.



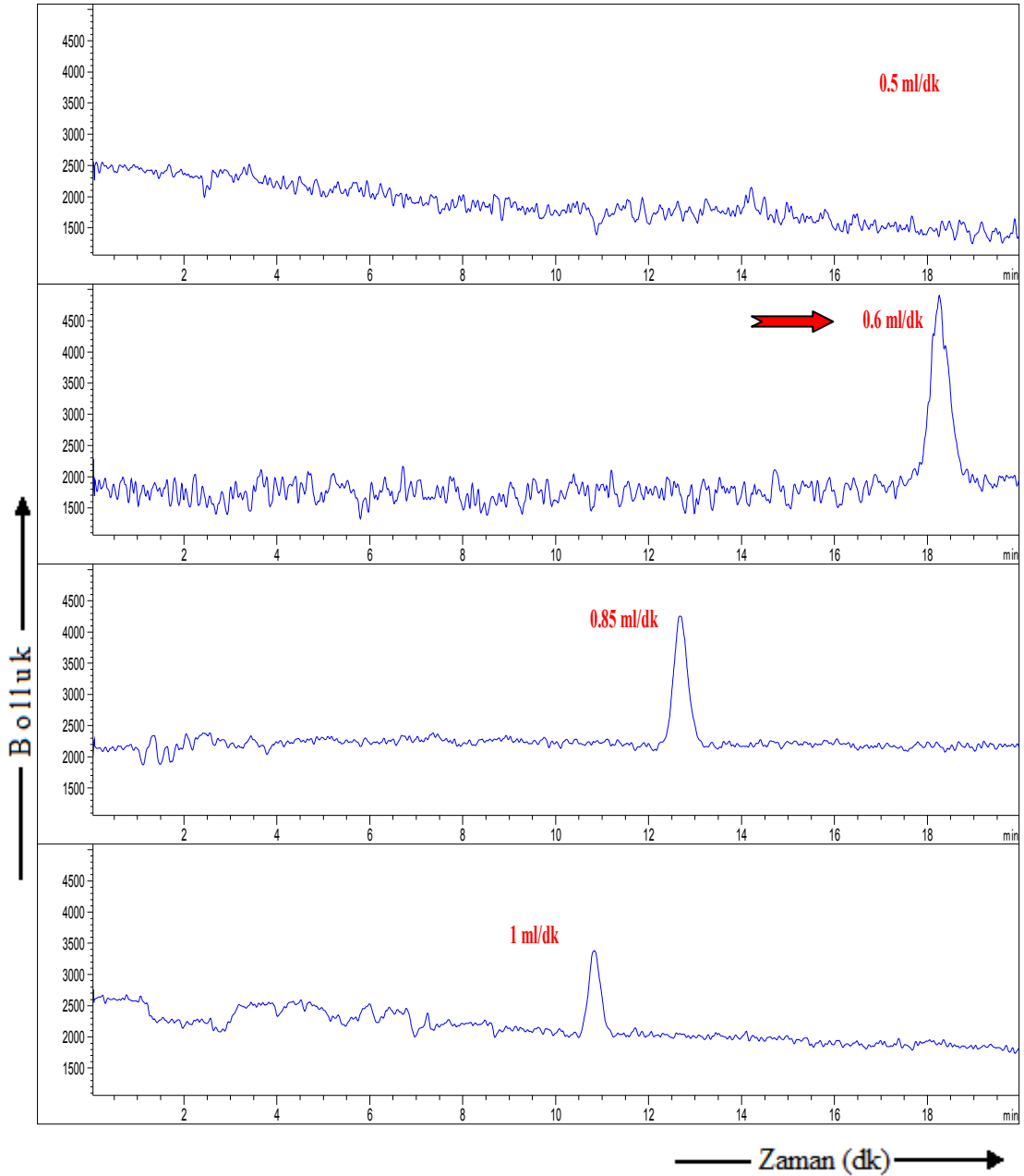
Şekil 4.16. 250 ppb benzo[*a*]antrasenin MS spektrumu.



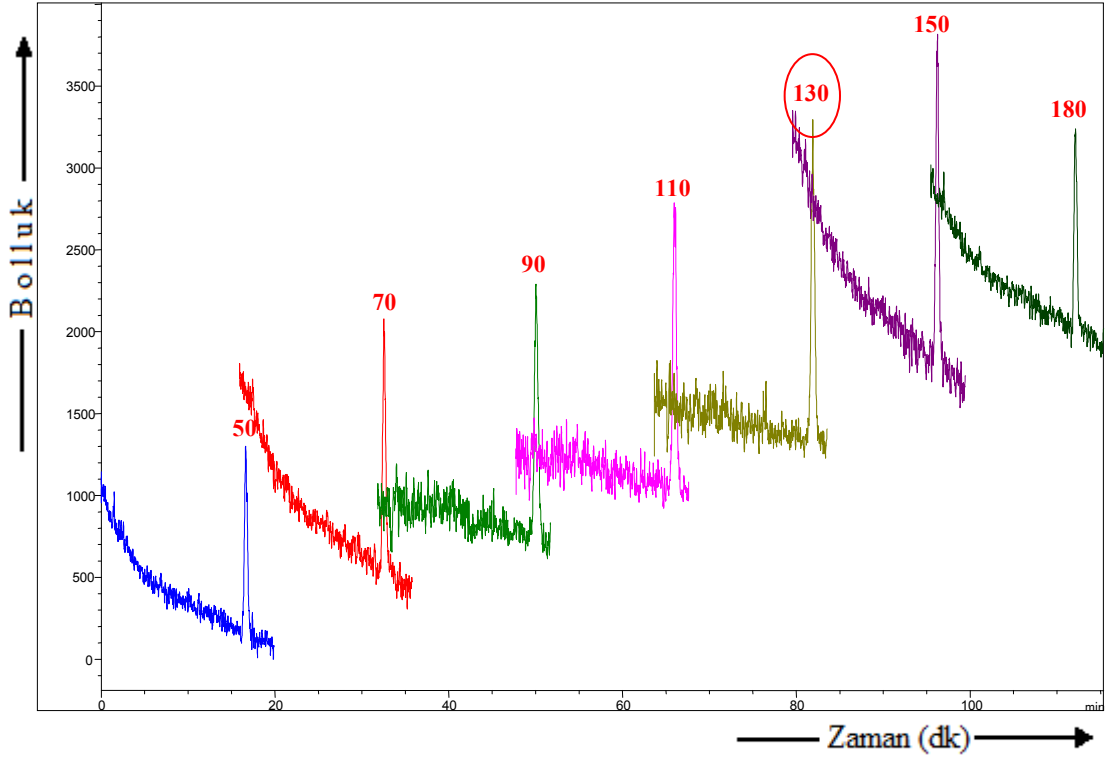
Şekil 4.17. 100 ppb benzo[a]antrasenin MS spektrumu.

4.3.3. Piren için Optimum Koşulların Tayini

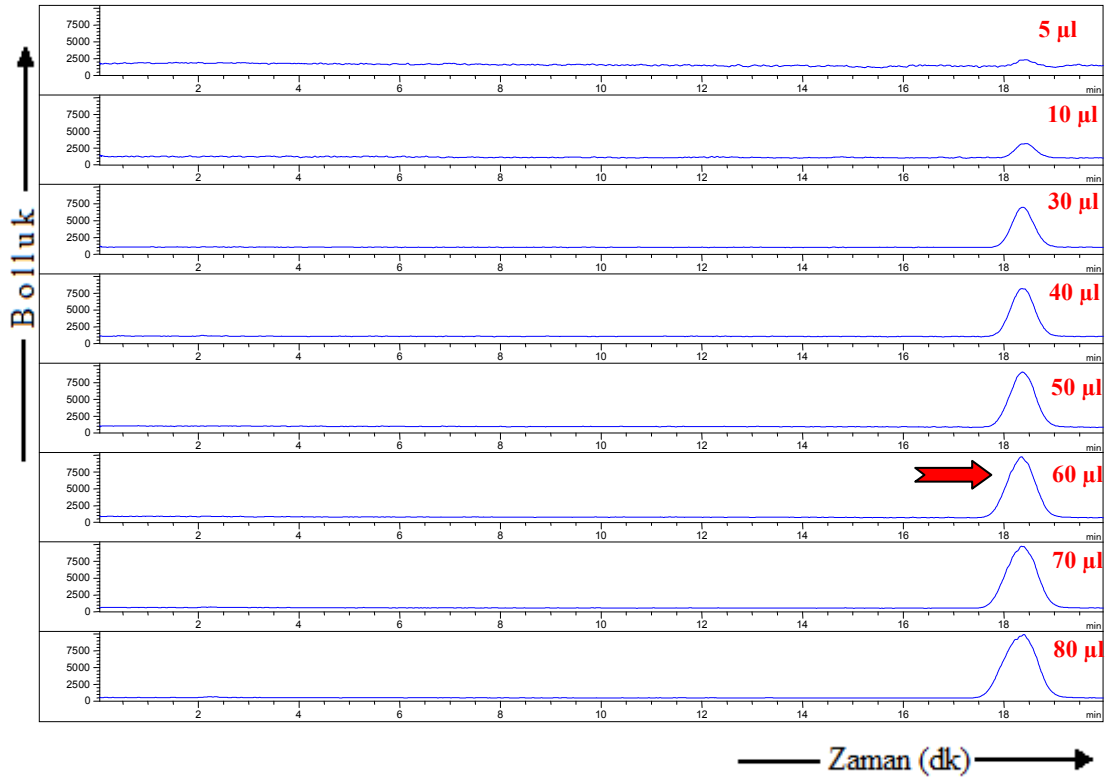
Hazırlanan piren standart çözeltileri ile yapılan deneysel çalışmada cihazın parametreleri optimize edildi. Bu amaçla mobil faz akış hızı, parçalayıcı voltaj (fragmenter), kolon sıcaklığı ve enjeksiyon hacmi parametreleri elde edilen kromatogramlardan faydalanılarak tayin edildi. Optimum akış hızı Şekil 4.18’ de de görüldüğü gibi 60 ml/dk olduğu görülmektedir. 50-180 fragmenter aralığında yapılan optimum fragmenter çalışmasında en uygun fragmenterin 130 olduğu görüldü ve bu kromatogramlar sinyal olarak Şekil 4.19’ da verilmiştir. Şekil 4.20’ de görüldüğü gibi en iyi enjeksiyon hacminin 60 µl olduğu bulundu.



Şekil 4.18. Piren için optimum akış hızı kromatogramları.

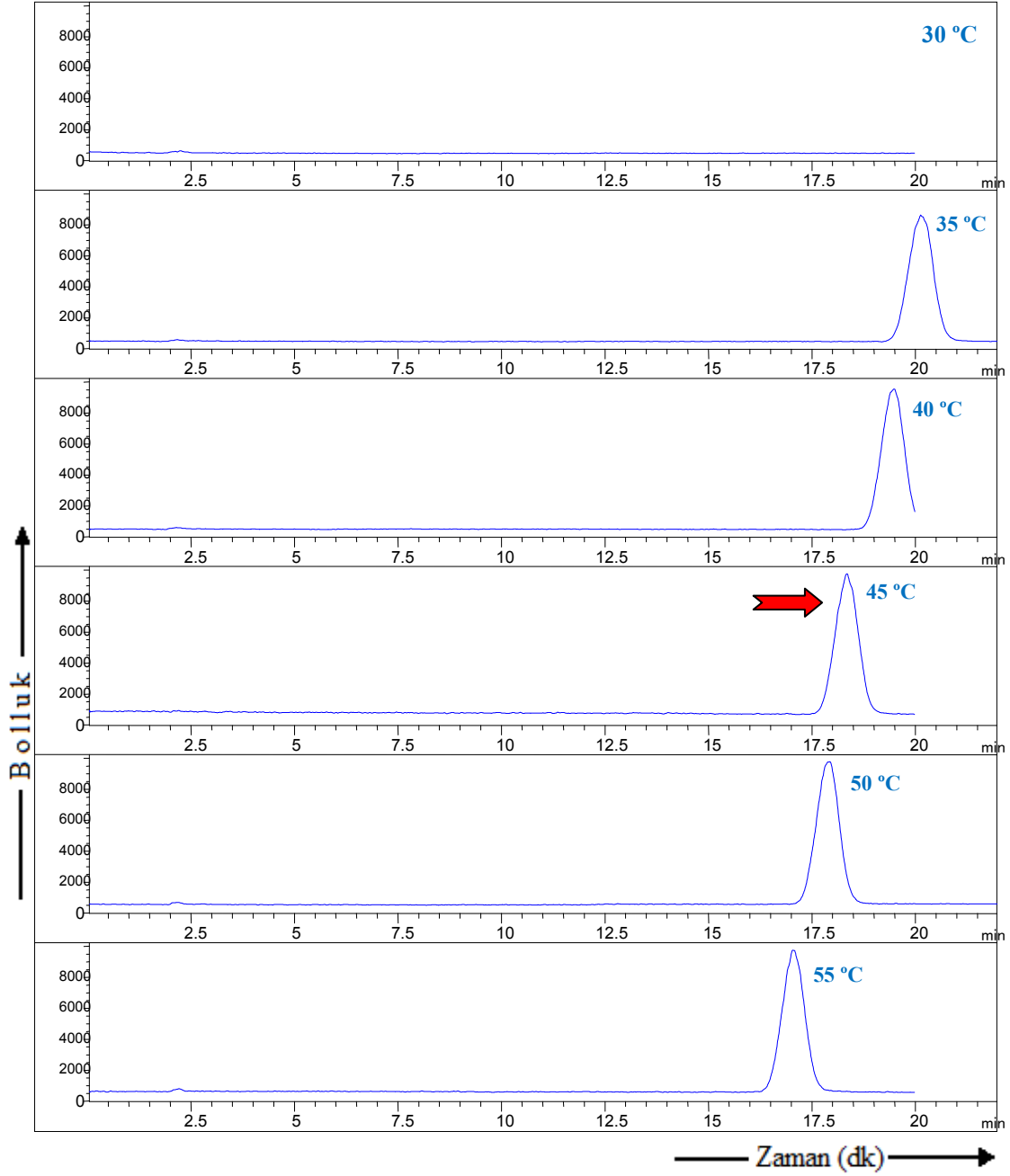


Şekil 4.19. Piren için en iyi fragmenterin sinyal olarak gösterimi.



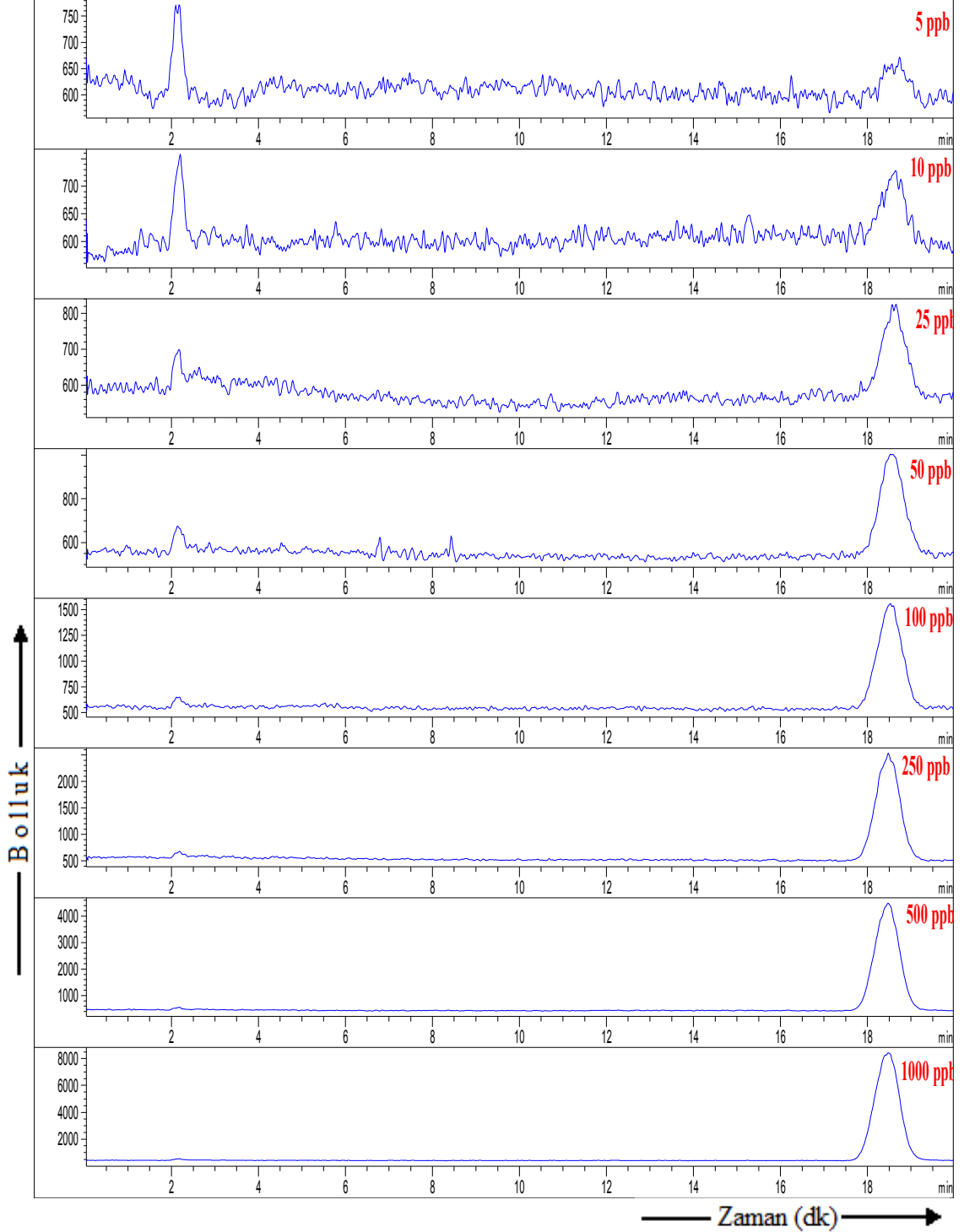
Şekil 4.20. Piren için optimum enjeksiyon hacmi .

Kolon sıcaklıklarının değiştirilmesi ile yapılan optimizasyon çalışmasında piren için en uygun kolon sıcaklığı 45 °C olarak tespit edildi (Şekil 4.21). Bu sıcaklıktaki piklerin simetriteri güzel ve MS spektrumlarının maksimum değeri yüksek olduğu için kolon sıcaklığı olarak 45 °C seçildi.



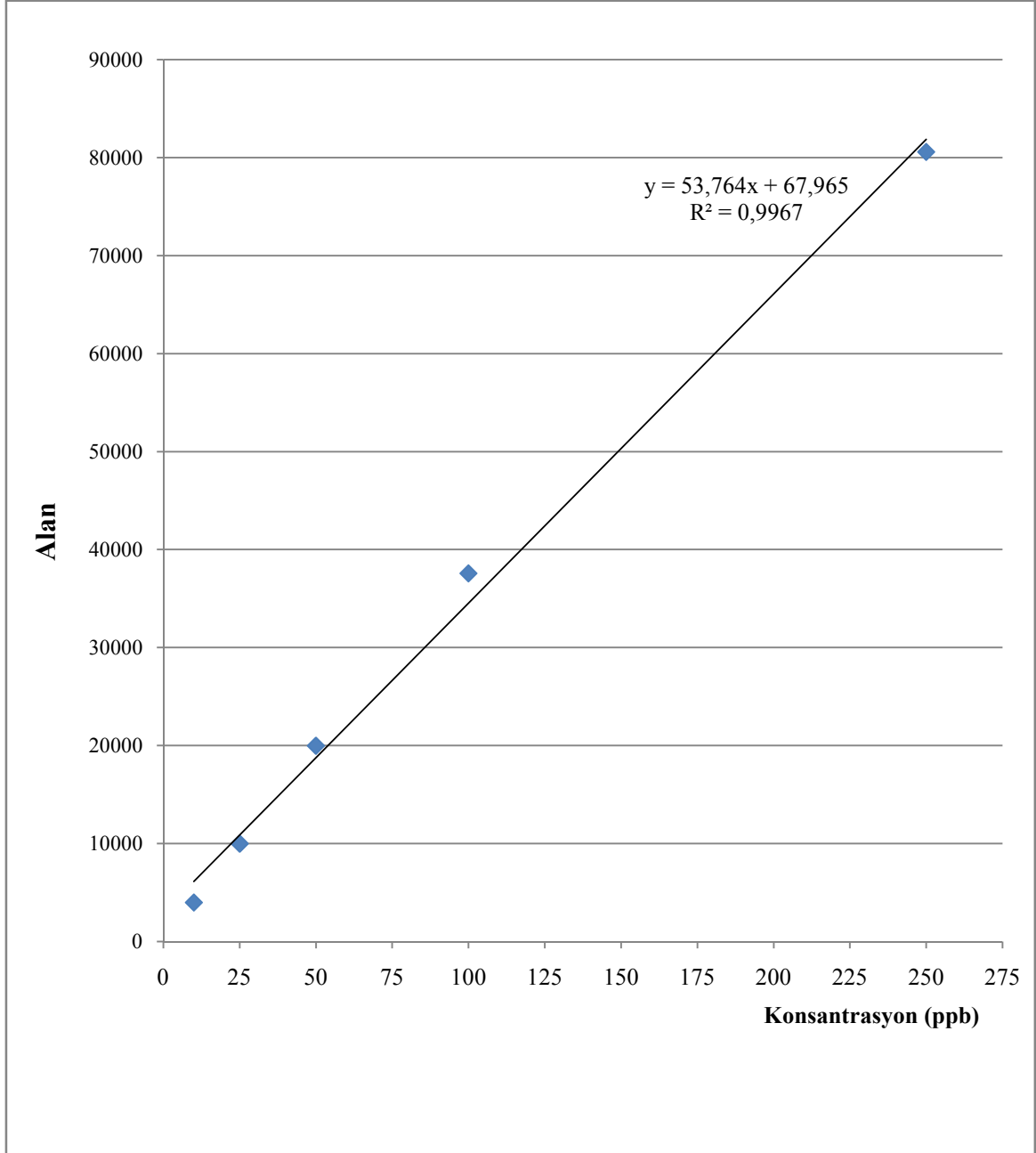
Şekil 4.21. Piren için optimum kolon sıcaklığı tayini.

Farklı derişimlerdeki piren standart çözeltileri ile yapılan çalışma grafiğinin tayini çalışmasında (Şekil 4.22), optimum şartlar altında herhangi bir matrikste direkt tayin edilebilecek madde miktarı 5 ppb olarak tespit edildi.



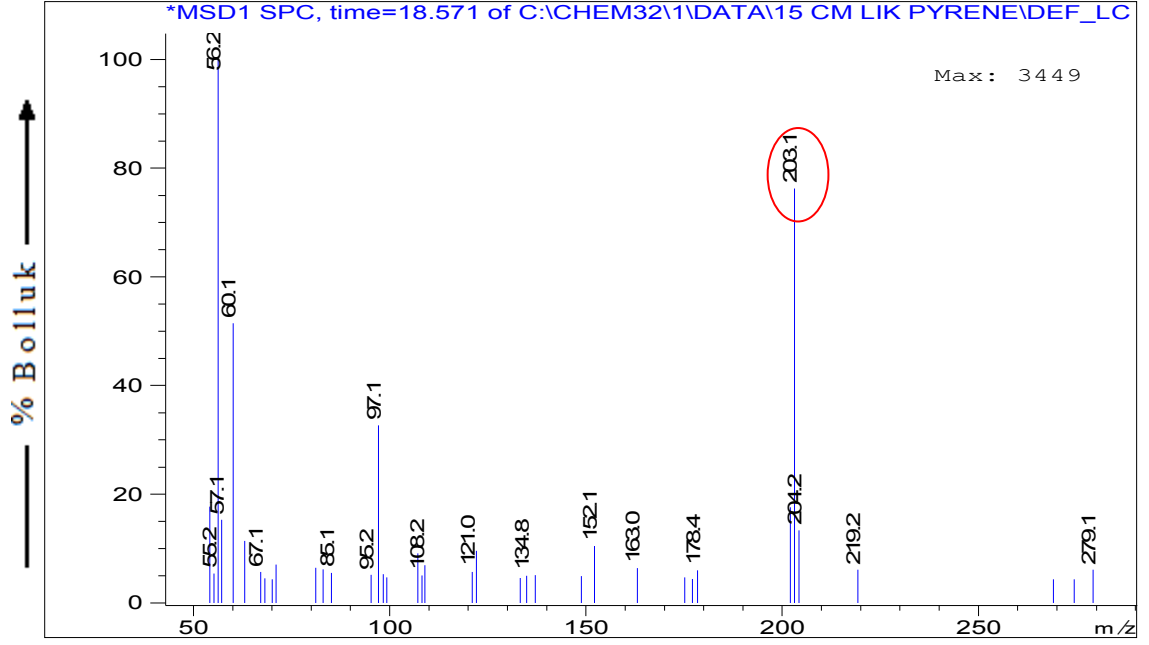
Şekil 4.22. 5-10-25-50-100-250-500 ve 1000 ppb piren standartlarının optimum koşullarda kromatogramlarının görünümü.

Piren için 10-250 ppb konsantrasyon aralığında çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.23’ te görülmektedir. Analiz edilen örneklerdeki piren miktarı, kromatogramlarının alanları bu grafikten yararlanılarak konsantrasyona dönüştürüldü. Farklı konsantrasyonlardaki piren standartları ile çizilen kalibrasyon eğrisinin korelasyon değerinin oldukça iyi olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.23. Pirenin kalibrasyon eğrisi.

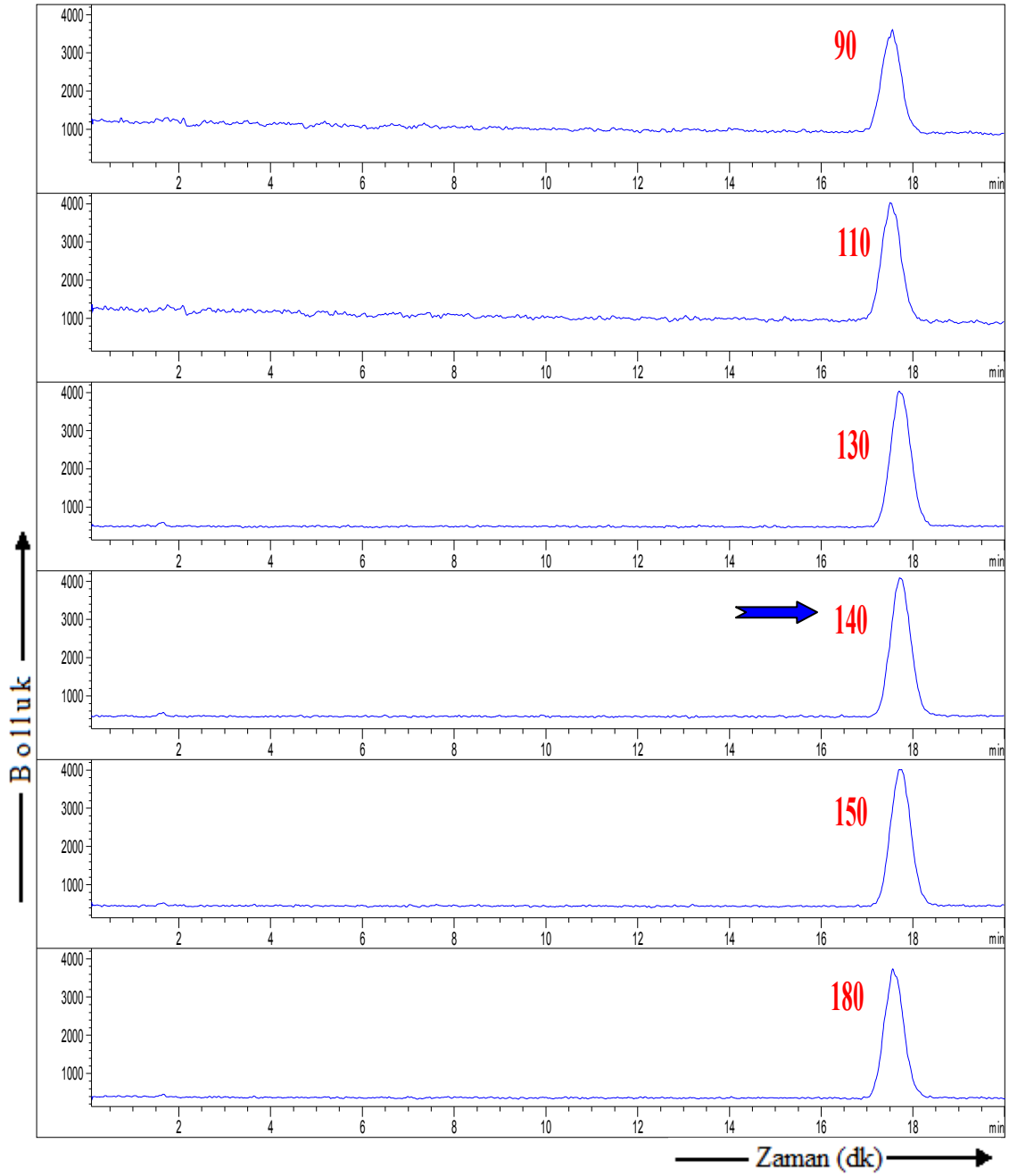
Şekil 4.24' te 1 ppm' lik piren çözeltisi için elde edilen MS spektrumu verilmiştir. Bu MS spektrumunda görüldüğü gibi; pirenin moleküler olarak pik verdiği ve $m/z=56$ temel pikin yanında oldukça iyi bir oranı vardır.



Şekil 4.24. 1 ppm piren standartının MS spektrumu.

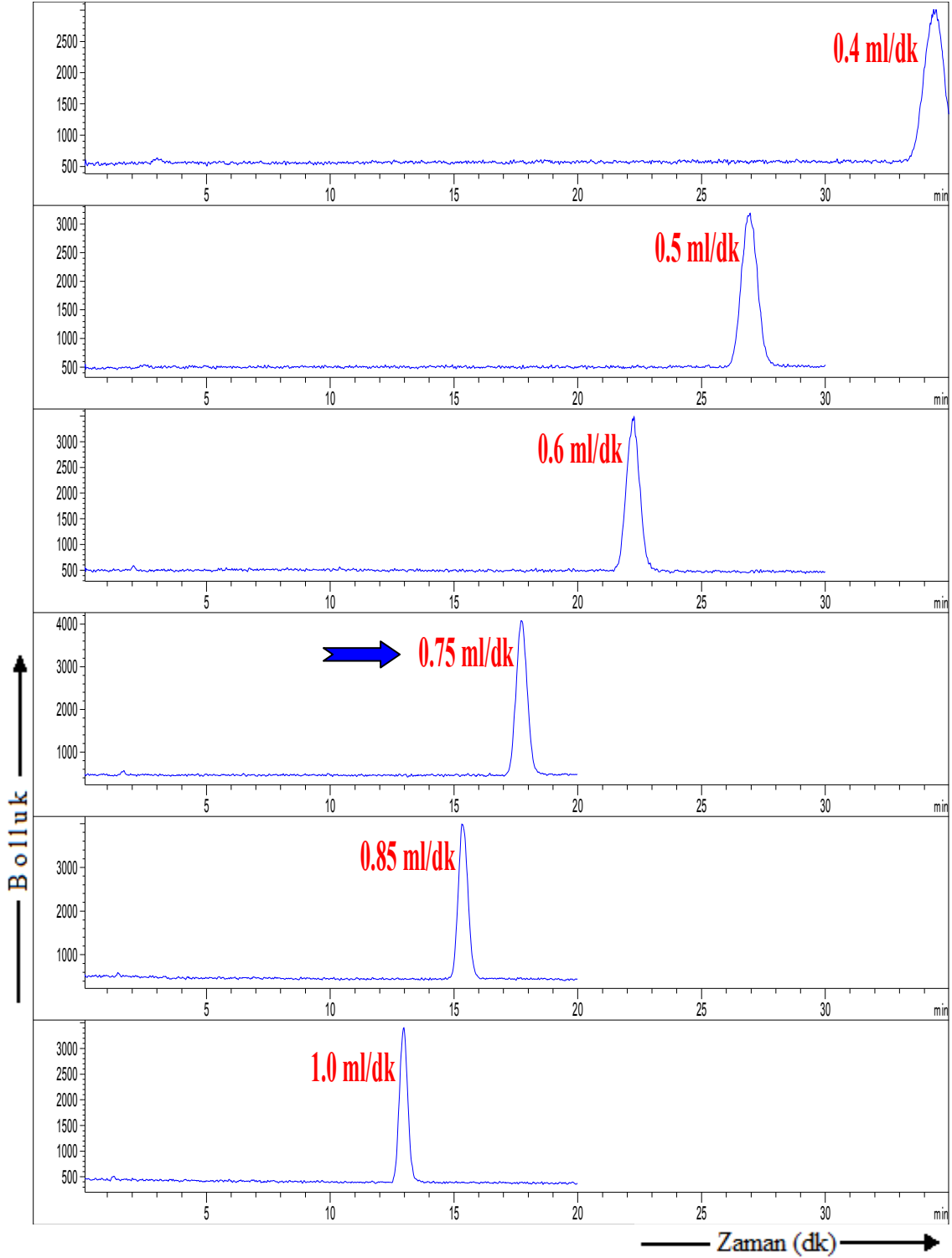
4.3.4. Benzo[a]piren Optimum Koşullarının Tayini

Benzo[a]pirenin standart çözeltileri ile yapılan optimizasyon çalışması sonucu elde edilen optimum fragmenter, mobil faz akış hızı, enjeksiyon hacmi ve kolon sıcaklığı değerleri Şekil 4.25-4.27’ de verilmiştir. En iyi fragmenter tayini için yapılan optimizasyon çalışmasında pik simetrileri ve MS spektrumunu maksimum değerleri göz önünde bulundurulduğunda en uygun fragmenter 140 seçildi (Şekil 4.25).



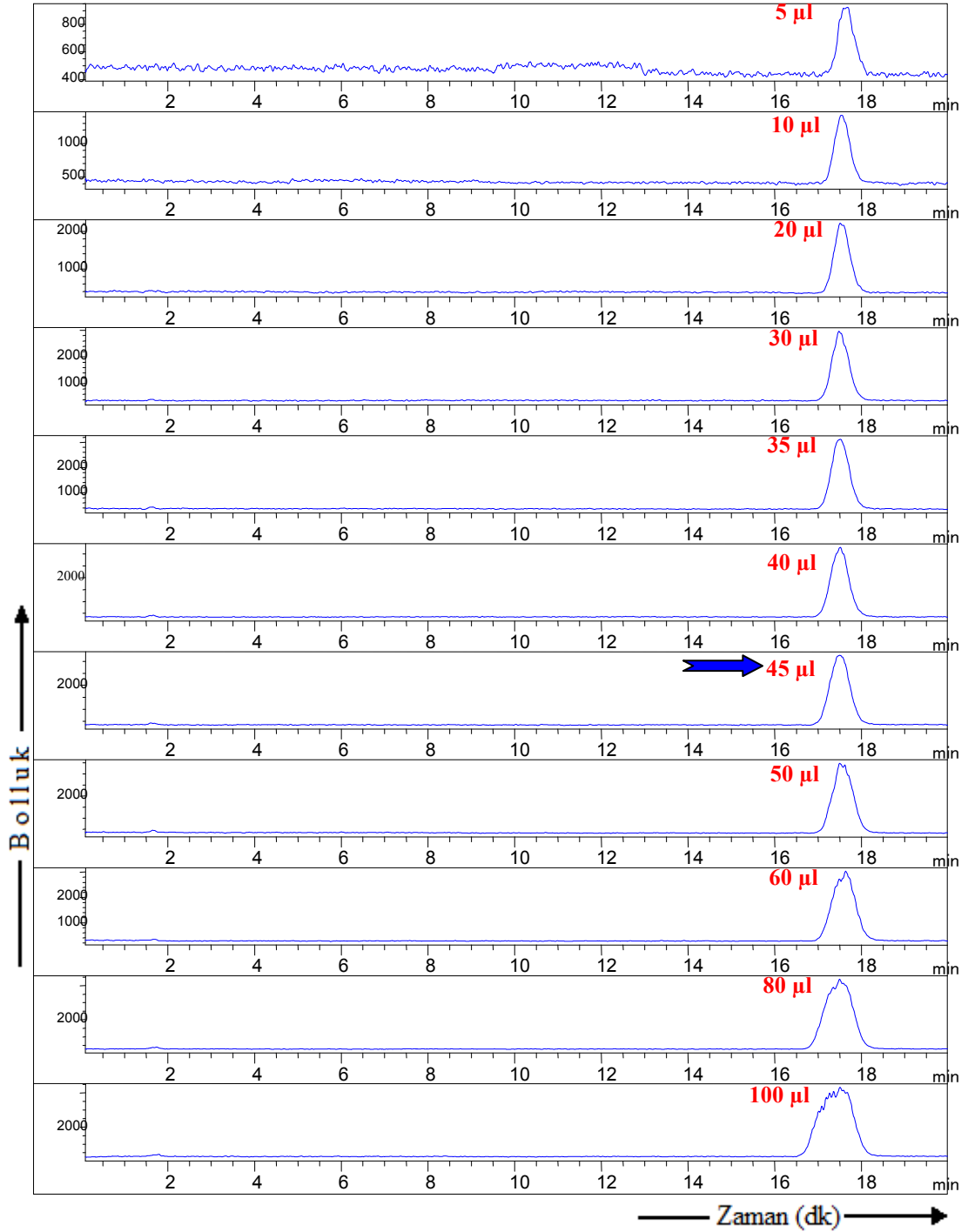
Şekil 4.25. Benzo[a]piren için optimum fragmenter tayini.

En uygun mobil faz akış hızının tayini için, 0.4 ml/dk -1 ml/dk aralığında yapılan mobil faz akış miktarı çalışmasında 0.75 ml/dk mobil faz akışının optimum olduğu gözlemlendi. Bu akış oranında pikin çıkış süresi azaldı ve pikin keskinliği arttı. 0.75 ml/dk mobil faz akışıyla elde edilen pik ideal olduğu için bundan sonraki çalışmalarda bu akış miktarı kullanıldı.



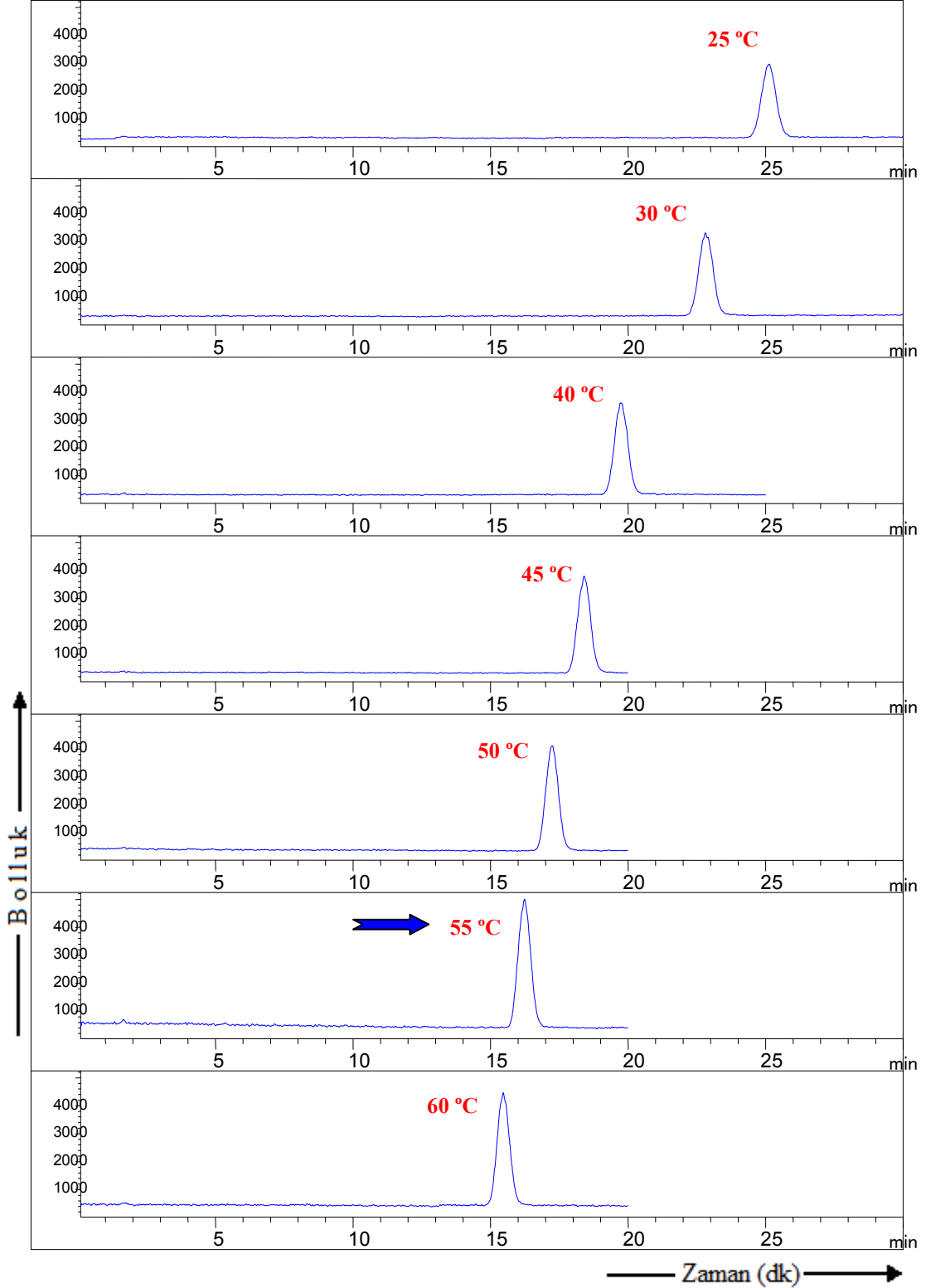
Şekil 4.26. Benzo[a]piren için optimum akış hızı tayini.

En uygun enjeksiyon hacminin tespiti için 5-100 µl aralığında yapılan çalışmada en uygun enjeksiyon hacmi 45 µl seçildi. Daha yüksek miktardaki enjeksiyon hacimlerinde pik simetrisinin bozulduğu ve pik genişliğinin arttığı görülmüştür. Şekil 4.27’ de de görüldüğü gibi 45 µl’ lik enjeksiyondan sonraki kromatogramlarda ciddi bir bozulma gözlemlendi.



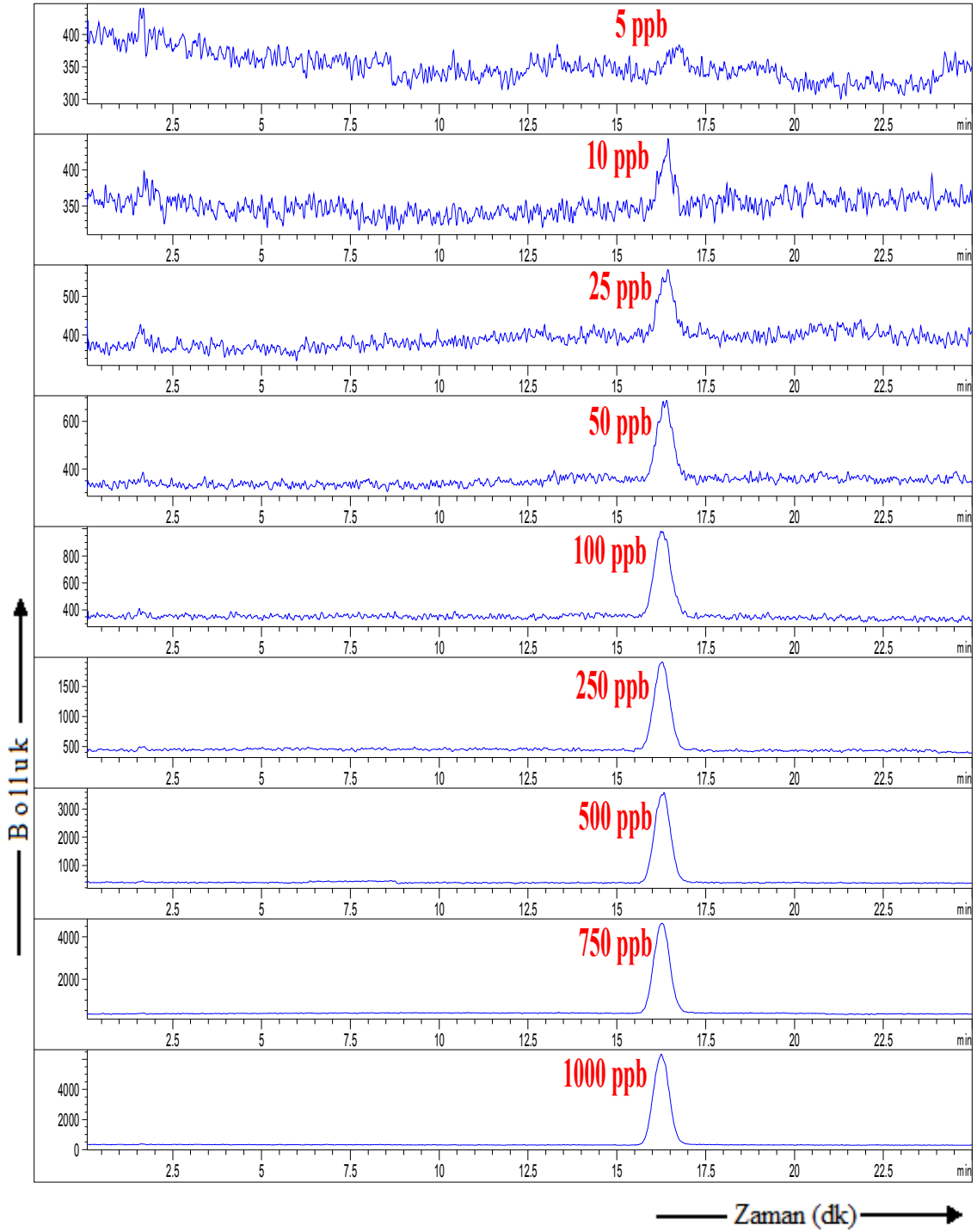
Şekil 4.27. Benzo[a]piren için optimum enjeksiyon hacmi tayini.

Benzo[a]piren için en uygun kolon sıcaklığını tayin etmek için 25 °C- 60 °C aralığında yapılan çalışmada Şekil 4.28’ de de görüldüğü gibi pikin simetrisi güzel ve bolluğun en yüksek olduğu 55 °C seçildi.



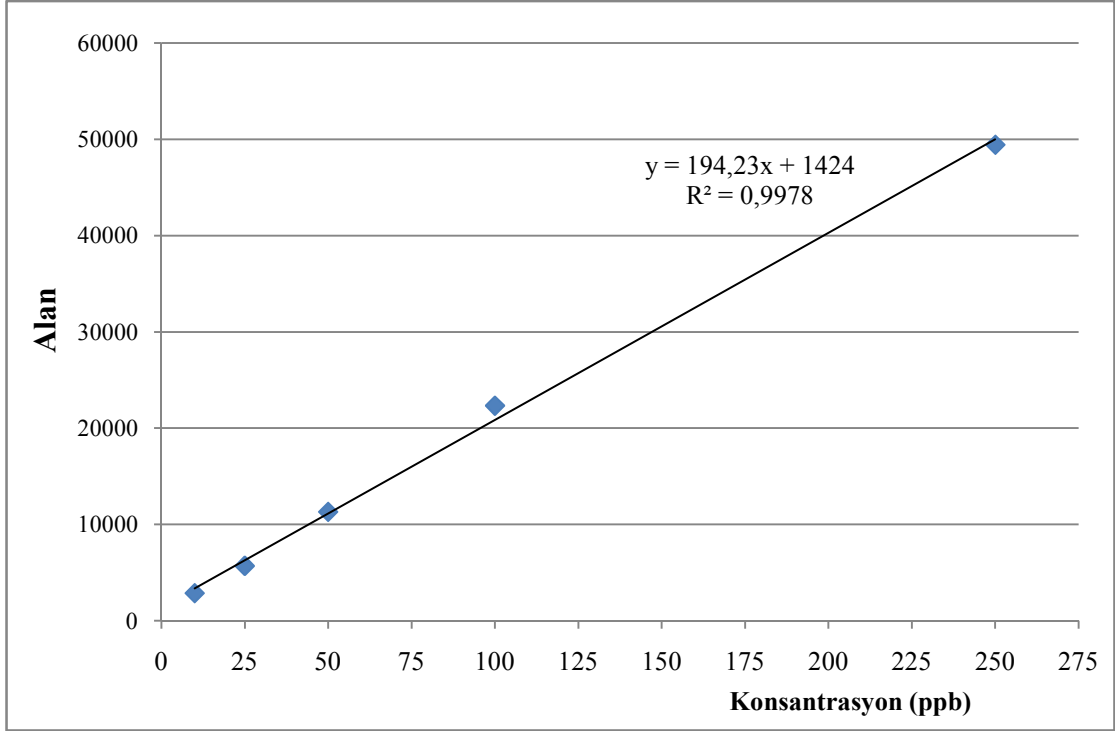
Şekil 4.28. Benzo[a]piren için optimum kolon sıcaklığı tayini.

Benzo[a]pirenin 5–10–25–50–100–250–500–750–1000 ppb’ lik standart çözeltiler ile yapılan çalışmada küçük konsantrasyonlardan büyük konsantrasyonlara doğru gidildikçe pik simetrilerinin daha güzel olduğu ve zeminden gelen gürültülerin bastırıldığı gözlenmektedir. Bu veriler ışığında çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.29’ da verilmiş olup deneysel çalışmaların sonuçları bu grafiğe göre değerlendirilmiştir.



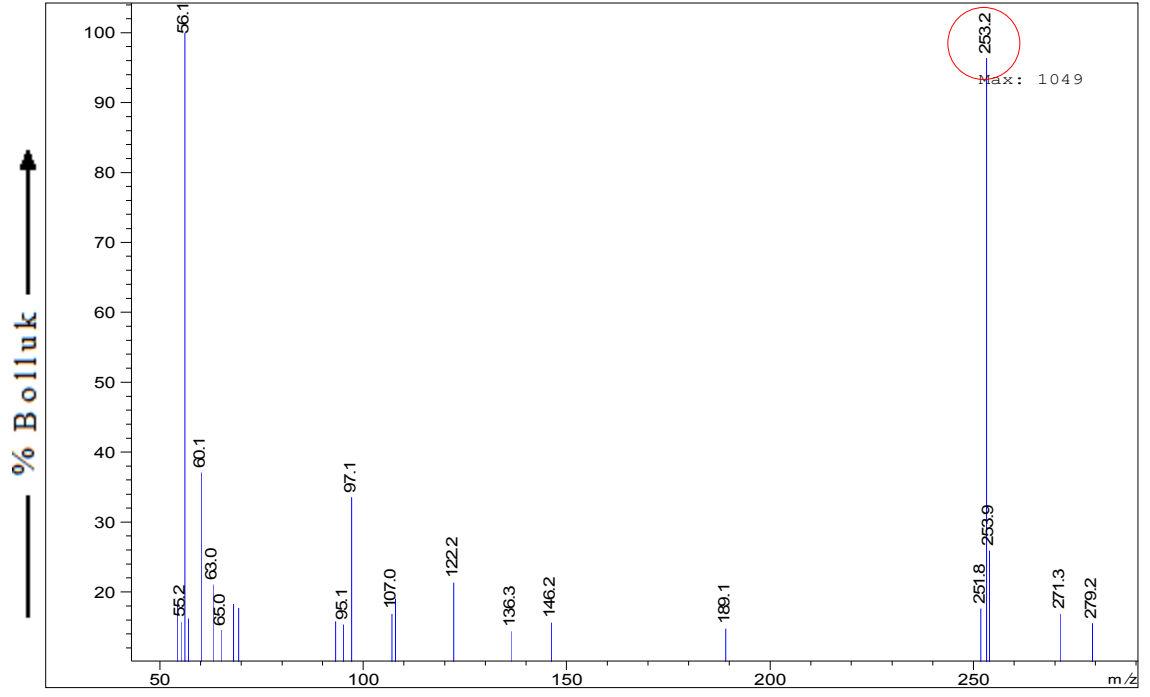
Şekil 4.29. Benzo[a]pirenin farklı konsantrasyonlardaki kromatogramları

Benzo[a]piren için 10-250 ppb konsantrasyon aralığında çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.30' da görülmektedir. Analiz edilen örneklerdeki piren miktarı, kromatogramlarının alanları bu grafikten yararlanılarak konsantrasyona dönüştürüldü.

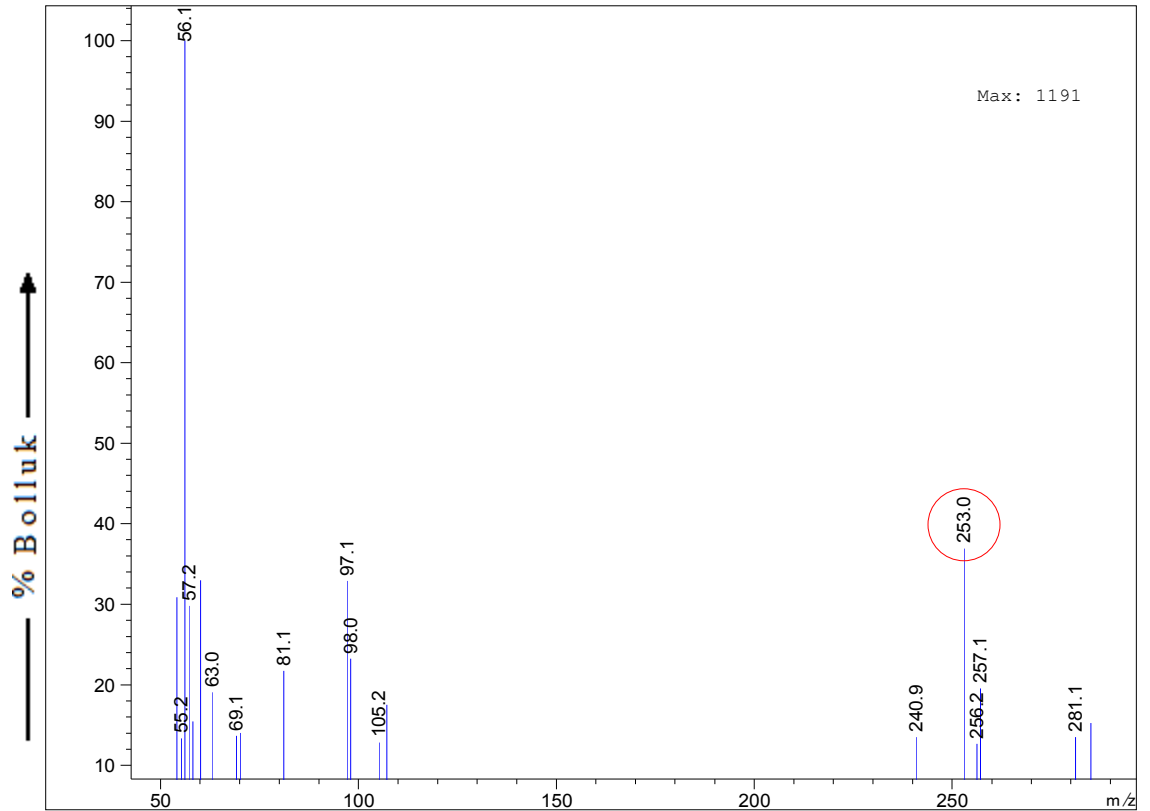


Şekil 4.30. Benzo[a]pirenin kalibrasyon eğrisi.

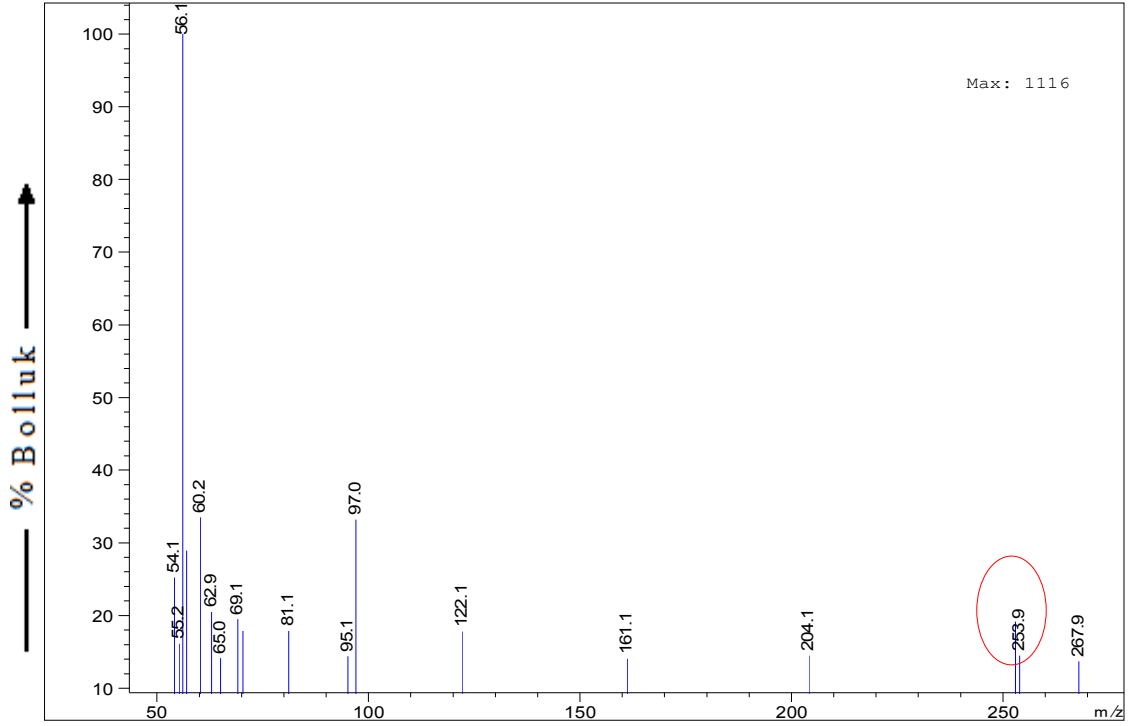
Benzo[a]pirenin farklı konsantrasyonlarının optimum koşullardaki MS spektrumlarındaki bağıl bolluk değerleri konsantrasyonları ile orantılı olarak değiştiği Şekil 4.31–4.33' te görülmektedir. Benzopirendeki kararlı halkalı yapıyı bozmak oldukça zor olduğundan MS spektrumları verilen benzo[a]pirenin halkalı yapısını koruyarak moleküler olarak pik vermiştir.



Şekil 4.31. 500 ppb benzo[a]piren nin MS spekturumu.



Şekil 4.32. 250 ppb benzo[a]pirenin MS spekturumu.



Şekil 4.33. 100 ppb benzo[a]pirenin MS spekturumu.

4.4. Ölçümlerle İlgili Elde Edilen Optimum Şartlar

PAH' ların analizi için optimize edilen HPLC ve MS parametreleri aşağıda Tablolar halinde verilmiştir (Tablo 4.1 ve 4.2).

Tablo 4.1. PAH' ların optimum tayin koşulları.

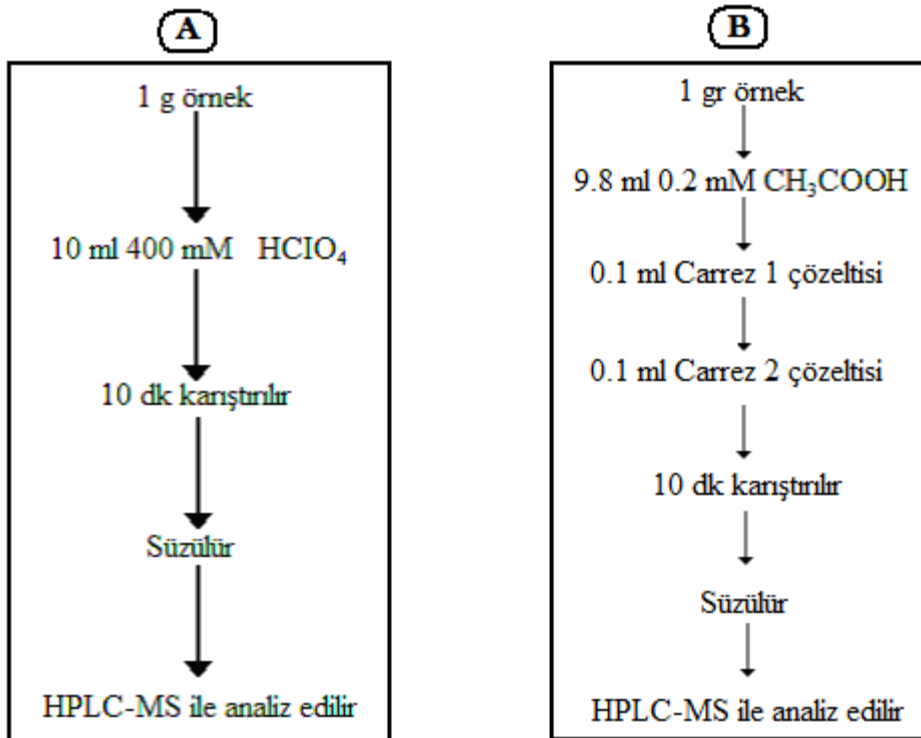
PAH	Akış hızı (ml/dk)	Fragmenter (parçalayıcı voltaj)	Enj. hacmi (µl)	Kolon Sıcaklığı (°C)	Kolon özellikleri
Antrasen	0.85	90	40	50	4.6x150 mm, 5 µm ZORBAX Eclipse XDB-C18
Benzo[a]antrasen	0.75	130	80	50	4.6x150 mm, 5 µm Inertsil ODS-3
Piren	0.60	130	60	45	4.6x150 mm, 5 µm Inertsil ODS-3
Benzo[a]piren	0.75	140	45	55	4.6x150 mm, 5 µm ZORBAX Eclipse XDB-C18

Tablo 4.2. MS parametreleri.

Kurutucu gaz akışı (L/dk)	6.0	
Nebulizer basıncı (psi)	60	
Kurutucu gaz sıcaklığı (°C)	300	
Buharlaştırıcı sıcaklığı (°C)	500	
	Pozitif Mod	Negatif Mod
Kapiler akım (V)	4000	4000
Kıvılcım voltajı (μA)	6.0	15

4.5. Örneklerin Analize Hazırlanması

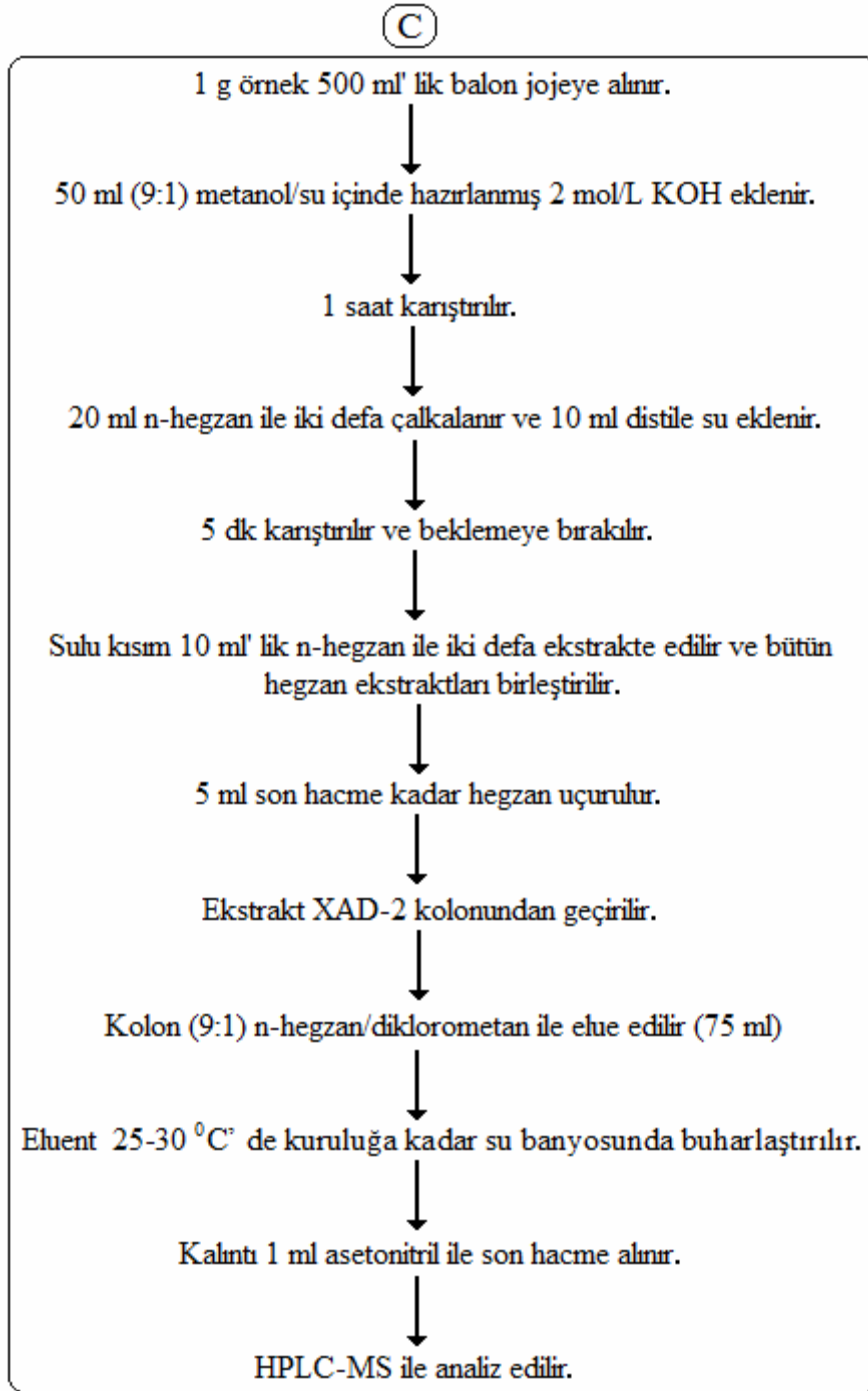
En iyi çözme metodunun tayini için, ızgara ve diğer örneklerdeki çalışılan bileşiklerin çözeltiye alınması dört farklı ekstraksiyon işlemi uygulanarak çalışıldı. Uygulanan işlem basamakları Şekil 4.34-4.36' te verilmiştir.



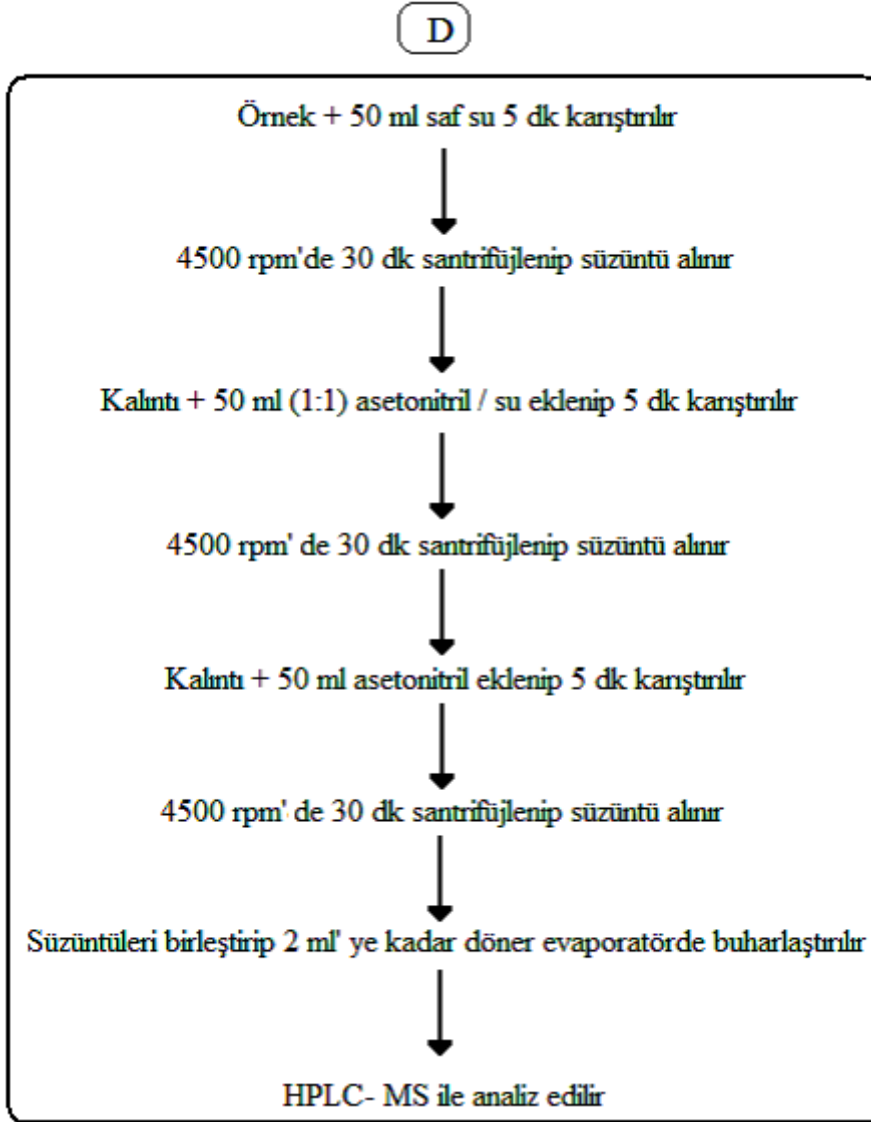
Şekil 4.34. Örneklerin analize hazırlanması basamakları: A) Perklorik asit ile B) Asetik asit ile.

Polisiklik aromatik hidrokarbonları HPLC-MS ile analiz etmek için bu bileşiklerin matriksten ayrılması gerekmektedir. Bu çalışmada, ekstraksiyon işleminden sonra elde edilen

çözeltide hem analitleri matriksten ayırmak hem de önderiştirmek için XAD-2 adsorbantı kullanıldı.



Şekil 4.35. Örneklerin katı faz ekstraksiyonu yöntemiyle hazırlanması basamakları.



Şekil 4.36. Örneklerin soğuk santrifüj yöntemi ile analize hazırlanma basamakları.

4.6. Örneklerin Temini ve Ekstraksiyonu

Kırmızı ve beyaz etten hazırlanmış ızgara örnekleri iki farklı şekilde analize hazırlandı. Bunlardan 1.sinde restoranlarda tüketime sunulan ızgaralar alındı. 2. Örnek temininde ise tavuk ve kırmızı et örnekleri yenilemeyecek kadar (siyahlaşmış) kömürde pişirildi. Bu şekilde hazırlanan örnekler normal pişirilen ve normalden daha fazla pişirilen örnekler olmak adlandırıldı. Normalden fazla pişirilen örneklerin ızgarası için hem kömür hem de tüp alevi kullanıldı. Bu örneklere C ve D ekstraksiyon metodları uygulandı.

4.7. Bulgular

4.7.1. Akış Hızı ile İlgili Bulunan Sonuçlar

Şekil 4.1, 4.7, 4.18 ve 4.26' dan görüldüğü gibi en iyi akış hızının antrasen için 0.85 ml/dk, benzoantrasen için 0.75 ml/dk, benzo[a]piren için 0.75 ml/dk ve piren için 0.6 ml/dk olarak deneysel çalışmada tespit edilirken pik simetrilerinin yanında MS spektrumlarının maksimum değerleri de dikkate alındı.

4.7.2. Fragmenter ile İlgili Bulunan Sonuçlar

Şekil 4.2, 4.8, 4.19 ve 4.25' den görüldüğü gibi, Antrasen için 90, benzo[a]antrasen için 130, benzo[a]piren için 140 ve piren için 130 fragmenter (volt) olarak tespit edildi. Optimum parçalayıcı voltajına karar verirken pik simetrisi düzgün ve kütle spektrumlarının maksimum olduğu voltajlar seçildi.

4.7.3. Enjeksiyon Hacmi ile İlgili Bulunan Sonuçlar

Şekil 4.3, 4.10, 4.20 ve 4.27'de görüldüğü gibi optimum enjeksiyon hacmi, antrasen için 40 µl, benzo[a]antrasen için 80 µl, benzo[a]piren için 45 µl ve piren için 60 µl olduğu yapılan deneysel çalışmada tespit edilirken, pik simetrisi ile birlikte MS spektrumlarının maksimum değerleri de dikkate alındı. Enjeksiyon edilen örnek miktarına karşılık pik şiddetleri ve MS spektrumlarının maksimum değerleri artmasına karşın pik simetrisi ciddi şekilde bozulduğu için pik simetrisinin en iyi olduğu enjeksiyon hacmi optimum olarak kabul edildi.

4.7.4. Kolon Sıcaklığı ile İlgili Bulunan Sonuçlar

Şekil 4.4, 4.11, 4.21 ve 4.28'de görüldüğü gibi optimum kolon sıcaklığı, antrasen için 50 °C, benzo[a]antrasen için 50 °C, benzo[a]piren için 55 °C ve piren için 45 °C olduğu yapılan çalışmada ayrı ayrı tespit edilirken pik simetrisi ve MS spektrumlarının maksimum değerlerine göre karar verildi. Kolon sıcaklığının 25- 55 °C aralığında çalışılması sonucu piklerin çıkış zamanları ve MS maksimum değerleri değiştiği gözlemlendi. Bu değişimler göz önüne alınarak simetrisi en iyi olan pik optimum seçildi.

4.8. Çalışılan Örneklerde bulunan PAH Konsantrasyonları

Şekil 4.34, 4.35 ve 4.36’ da verilen ekstraksiyon işlemiyle çalışılan örnekler ekstrakte edildi. Böylece elde edilen örnek çözeltilerine yukarıda anlatılan optimum parametreler uygulanarak örnekler için kromatogram ve spektrumlar elde edildi (Şekil 4.6, 4.14, 4.23 ve 4.30’ da verilen kalibrasyon grafiklerinin yardımıyla bulunan PAH konsantrasyonları Tablo 4.3 ve 4.4’ te verildi.

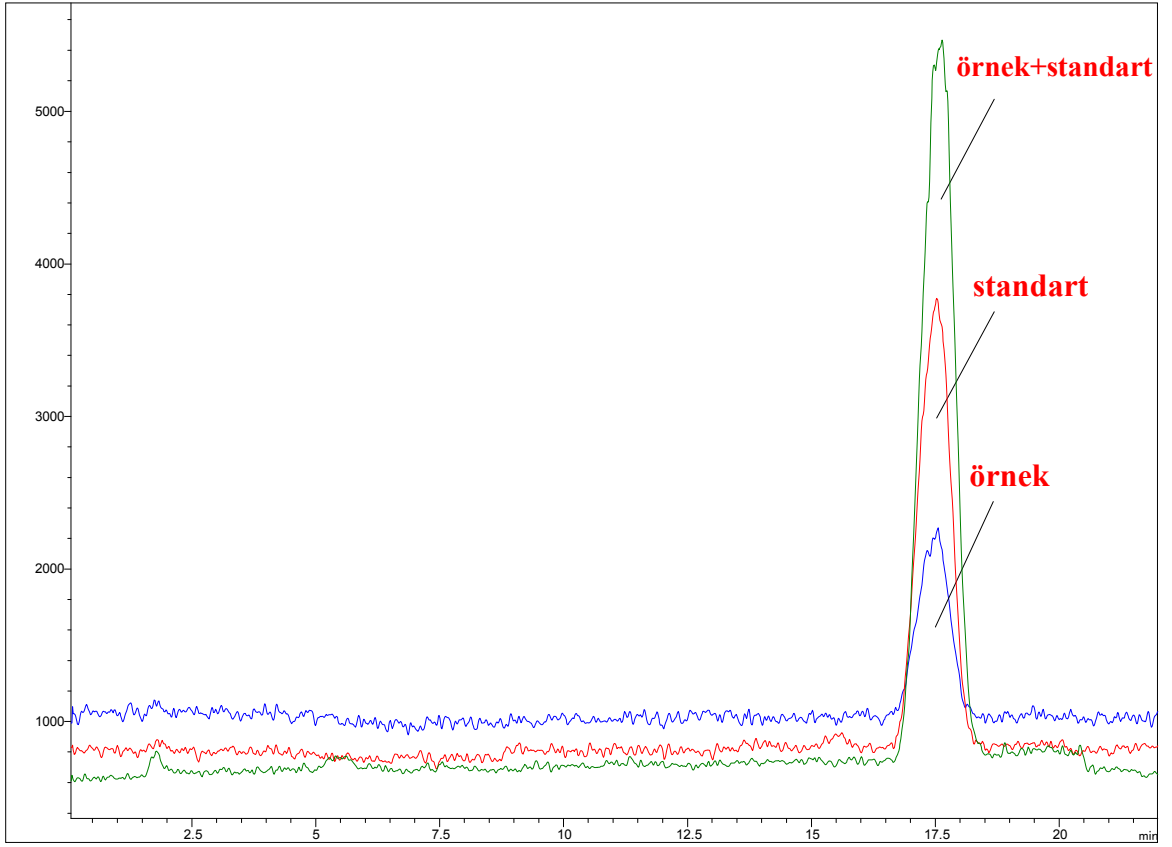
Örnek, standart ve standart ilave edilmiş örneğin kromatogramlarının alanları alınarak örnekteki antrasen, benzo[a]antrasen, benzo[a]piren ve piren miktarları hesaplandı. Bunlardan, benzoantrasen için standart ilave edilmiş ve standartların kromatogramları Şekil 4.38, 4.39 ve 4.40’ ta verilmiştir.

Izgara örneğinde benzo[a]antrasen tayini için üst üste karşılaştırılan örnek, standart ve standart ilave edilmiş örneğin kromatogramlarının alanlarından faydalanarak örnekteki benzo[a]antrasen miktarı hesaplandı. Analizlenen bütün örneklerdeki PAH’ lar aynı yöntemle hesaplandı. Sonuçların doğrularını tespit etmek için verim tayini yapıldı. Bulunan değerlerden metodun güvenilir olduğu görülmektedir. Bütün örnekler için aynı işlemler yapılarak elde edilen değerler Tablo 4.3’ te verilmiştir.

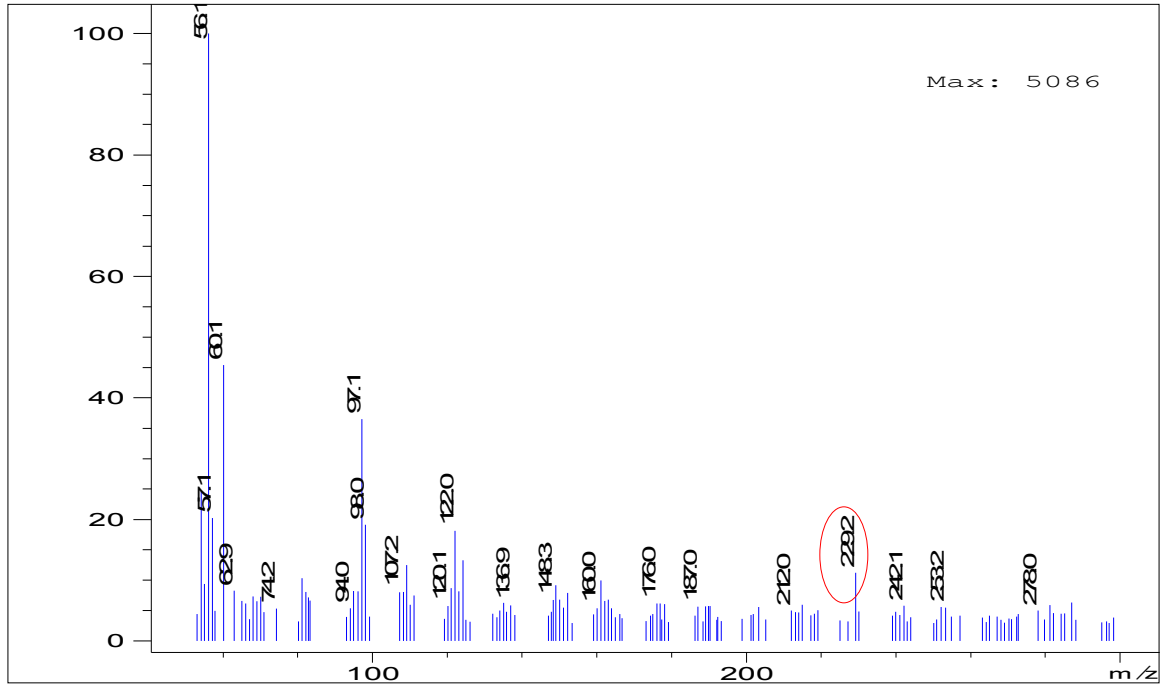
Elde edilen optimum şartlar çözelti haline getirilen ızgara ve diğer örneklerle uygulanarak antrasen, benzo[a]antrasen, benzo[a]piren ve piren miktarları tayin edildi. Bu amaçla en az üçer örnek analiz edilip ortalamaları bulundu (Tablo 4.3).

Kırmızı et ızgarasında benzo[a]antrasen (229 g/mol) miktarı hesaplanırken her kromatogramın ayrı ayrı MS spektrumları (Şekil 4.37-4.40) alınmıştır ve MS değerleri kromatogramlarıyla orantılı bir şekilde değişim gösterdiği gözlenmiştir.

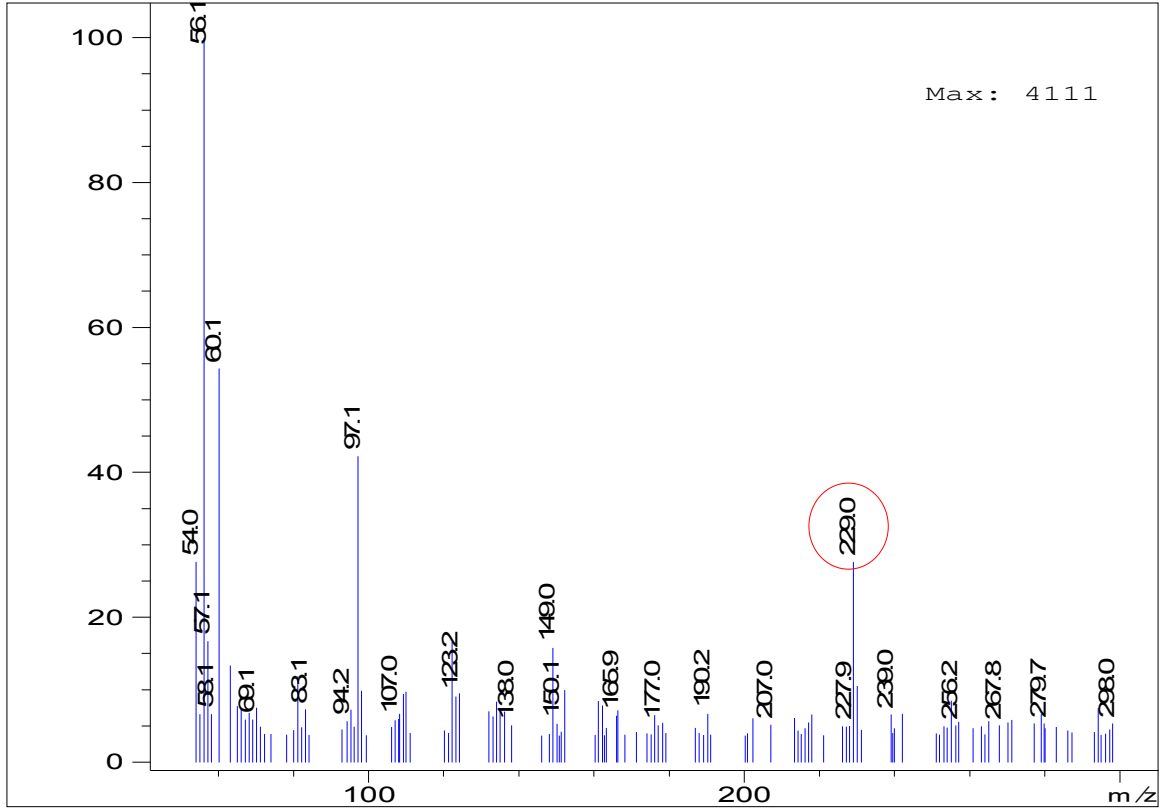
Tablo 4.3 ve 4.4’ te görülen veriler şu şekilde özetlenebilir. Antrasen, benzo[a]antrasen, benzo[a]piren ve piren için normal şartlarda kömürde hazırlanmış kırmızı et ızgarasında bulunan konsantrasyonlar sırasıyla 3.8, 2.7, 6.3 ve 4.2 ppb iken yine kömürde yenilemeyecek kadar aşırı pişirilmiş örneklerde sırasıyla 114, 52, 84 ve 12 ppb olduğu görülmektedir. Yine aynı Tablolardan, aynı bileşikler için normal şartlarda kömürde hazırlanmış beyaz et ızgarasında bulunan konsantrasyonlar sırasıyla tayin sınırının altında, 2.2, 4.8 ve 2.3 ppb iken, yine kömürde yenilemeyecek kadar aşırı pişirilmiş örneklerde sırasıyla 147, 83, 72, ve 58 ppb olduğu görülmektedir.



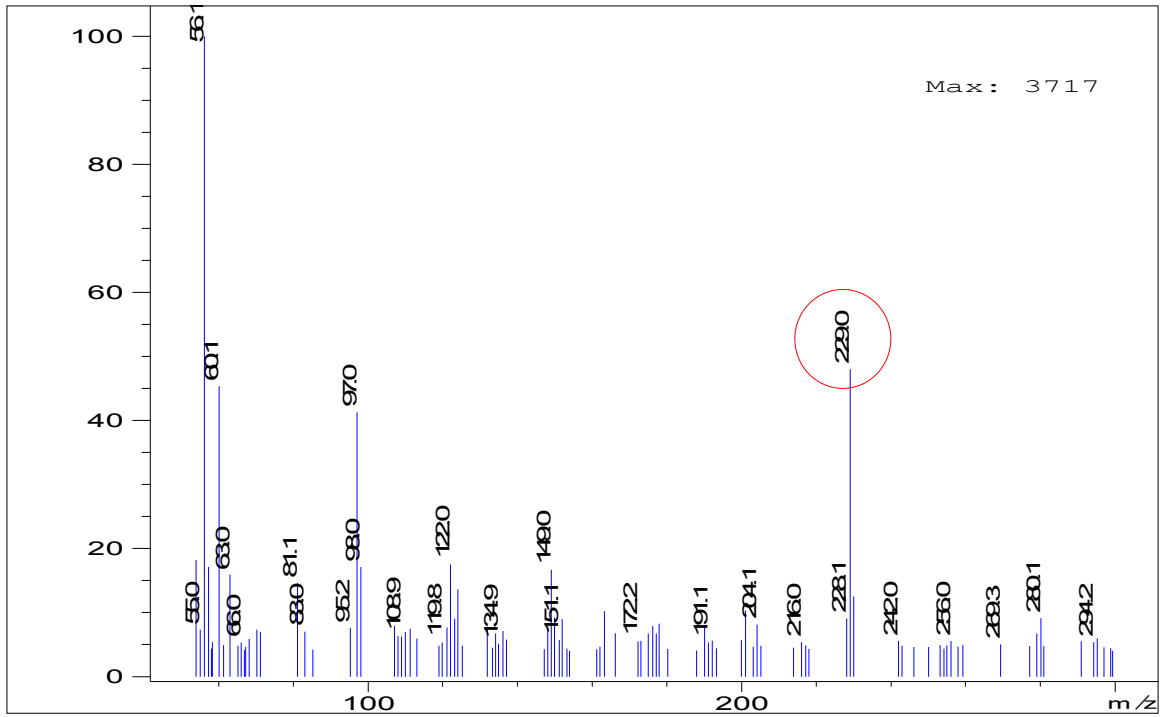
Şekil 4.37. Kırmızı et ızgarasında benzo[*a*]antrasen tayini için; örnek, standart ve standart ilave edilmiş örneğin kromatogramları.



Şekil 4.38. Kırmızı et ızgarasında benzo[*a*]antrasen tayini için; örneğin MS spektrumu.



Şekil 4.39. Kırmızı et ızgarasında benzo[*a*]antrasen tayini için; örnek+standartın MS spektrumu.



Şekil 4.40. Kırmızı et ızgarasında benzo[*a*]antrasen tayini için; standart ilave edilmiş örneğin MS spektrumu.

Tablo 4.3. Normal pişirilen gıdalardaki PAH miktarları (µg/kg), n=3.

Örnek	C Yöntemi			
	Antrasen	BaA	BaP	Piren
Kömürde kırmızı et ızgarası (Adana kebabı)	3.8±0.8	2.7±0.5	6.3±1.3	4.2±0.7
Beyaz et ızgarası (Tavuk şiş)	TA	2.2±0.4	4.8±0.8	2.3±0.5
Çifte kavrulmuş bisküvi	TA	TA	TA	TA
Türk kahvesi	TA	2.1±0.4	2.3±0.4	3.4±0.7
Neskafe	2.6±0.5	2.0±0.3	2.3±0.3	3.2±0.7

TA: Tayin sınırının altında

Tablo 4.4. Yenilemeyecek kadar ızgarada pişirilen (kömürleşmiş) gıdalardaki PAH miktarları (µg/kg) , n=3.

Örnek	C Yöntemi				D Yöntemi			
	Antrasen	BaA	BaP	Piren	Antrasen	BaA	BaP	Piren
Tüp alevde kırmızı et ızgarası	53±5	74±9	96±12	135±18	50±7	75±11	108±17	166±25
Kömürde kırmızı et ızgarası	114±22	52±7	84±13	12±2	108±16	60±9	91±14	15±3
Tüp alevde tavuk ızgarası	80±12	108±16	138±20	53±8	83±13	115±17	140±21	51±8
Kömürde tavuk ızgarası	147±28	83±12	72±10	58±9	156±21	100±17	77±12	56±8

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Proteince yüksek gıdaların yüksek sıcaklıkta hazırlanması aşamasında, gerek yağların pirolizi sonucu, gerekse tüpgaz ve kömür gibi pişirilme kaynaklarına bağlı olarak polisiklik aromatik hidrokarbonların oluştuğu belirtilmiştir. Bu bileşiklerin toksik hatta çoğunun kanserojen özelliklere sahip olmaları nedeniyle, çok düşük konsantrasyonlarda bile olsa duyarlı ve doğru bir şekilde tayinleri büyük bir öneme sahiptir. EPA ve IARC tarafından karsinojen, kanserojen ve mutajen olarak sınıflandırılan bu organik maddelerin gıdalardaki tayini GC-MS ve HPLC-MS gibi duyarlılığı ve tekrarlanabilirliği iyi olan cihazlar ile mümkündür. Bu çalışmada, HPLC-MS sistemiyle; antrasen, benzo[*a*]antrasen, benzo[*a*]piren ve piren için optimum koşullar tayin edildi. Optimizasyon çalışmasında asetonitrilde çözülen bu bileşenlerin standart çözeltileri ile optimum koşullar belirlendi. Antresen için 0.85 ml/dk mobil faz akışı, 40 µl enjeksiyon hacmi, 50 °C kolon sıcaklığı ve 90 fragmenter; Benzo[*a*]antrasen için 0.75 ml/dk mobil faz akışı, 80 µl enjeksiyon hacmi, 50 °C kolon sıcaklığı ve 130 faragmenter, Piren için 0.60 ml/dk mobil faz akış hızı, 60 µl enjeksiyon hacmi, 45 °C kolon sıcaklığı ve 130 fragmenter, ve Benzo[*a*]piren için 0.75 ml/dk mobil faz akışı, 45 µl enjeksiyon hacmi, 55 °C kolon sıcaklığı ve 140 faragmenter değerleri optimum değerler olarak belirlendi. Optimize edilen bu parametreler, ızgara ve diğer örneklerdeki bileşenleri tayin etmek için uygulandı.

Bu çalışmada, et ve tavuk gibi restoranlarda tüketime sunulan normal şartlarda hazırlanmış örneklerin antrasen, benzo[*a*]antrasen, piren ve benzo[*a*]piren derişimleri bulunmuştur. Pişirme kaynağı olarak odun kömürünün kullanıldığı normal şartlarda hazırlanmış örneklerde çalışılan PAH miktarları düşük bulundu. Farklı bir matriks yapısında olan çifte kavrulmuş bisküvide ise tayin sınırının altında bulundu. Yine kırmızı etten yapılan adana kebabında bulunan 4 bileşiğin derişimlerinin, beyaz etten hazırlanan tavuk şiş kebabından az da olsa yüksek olduğu gözlemlendi. Yine neskafe örneğinde de çalışılan 4 bileşik te tayin sınırları içerisinde olduğu görüldü. Bütün bunlarla beraber elde edilen konsantrasyonların 10 ppb den küçük olması herhangi bir risk faktörünün sözkonusu olmadığı sonucuna varıldı. Izgara türü gıda örneklerinde yapılan çalışmalar sınırlı olmakla beraber, literatürde yapılan benzer çalışmalarda 30-40 ppb gibi daha büyük derişimler rapor edildiği gibi, daha küçük sonuçlar da bulunmuştur (53-54, 60). Aygün ve Kabadayı kömürde ızgara edilmiş et örneklerinde yaptıkları çalışmada kuzu eti için 43.8 ve sığır eti için 31.33 ppb benzopiren konsantrasyonlarını rapor etmişlerdir. Kazeroni ve arkadaşları [60] ise gıda örneklerinde benzopiren tayini için yaptıkları çalışmada bisküvide 0.13, sığır etinden yapılmış ızgarada 4.15 ve tavuketinden yapılmış ızgarada ise 0.4 ppm benzopiren bulmuşlardır. Bu tezde bulunan benzopiren derişimleri ise sığır eti için 6.3 ppb, tavuk eti için 4.8 ppb bulunurken, çifte kavrulmuş bisküvide çalışılan dört

bileşenin konsantrasyonları tayin sınırının altında olduğu görülmüştür. Janoska ve arkadaşları [53] domuz etinden hazırlanmış ızgarada benzoantrasen ve benzopiren tayinlerini yapmışlardır. Bu araştırmacılar kemiksiz domuz etinde ve boyun etinde sırasıyla 2.76 ppb ve 10.78 ppb benzoantrasen 0.71 ppb ve 2.25 ppb benzopiren bulmuşlardır. Yine aynı çalışmada tavuk göğsünden yapılmış ızgarada 6.64 ppb benzoantrasen ve 0.15 ppb benzopiren gözlenmiştir. Bu derişim farklarının ızgara yapımında kullanılan kömür veya alev cinsinin yanı sıra ızgara yüksek sıcaklıkta kalma süresine de bağlı olduğu belirtilmiştir. Bu ve benzeri soruların cevabını bulmak için Kok kömürü ve açık tüp gaz alevinde yenilemeyecek kadar kızartılarak (çoğu siyahlaşmış) elde edilen tavuk ve kırmızı et örneklerinde bulunan derişimlerin çok yüksek miktarlarda olduğu bulundu. Özellikle p53 geninde mutasyona sebep olan ve ümmün (savunma) sistemini baskılayarak kanser oluşumuna yol açan benzo[a]pirenin miktarı derisiyle pişirilen tavuk ve et örneklerinde, kok kömürü ve tüpgazda pişirilmeleri ile oldukça yüksek bulundu. Bu gıdaların açık alevle temasları arttıkça oluşan PAH' ların miktarlarının da paralel olarak arttığı gözlemlendi. Diğer taraftan literatürde örneklerin aleve uzaklıkları da bünyelerinde oluşan PAH' ların miktarlarını etkilediği belirtilmiştir (53). Tablo 4.3. ve 4.4.' te verilen sonuçlardan yola çıkarak yüksek miktarlardaki PAH oluşumları örneğin pişirme kaynağına da bağlı olduğu açık bir şekilde görülmektedir.

Bu sonuçlar ışığında gıdaların ızgarada pişirilmesi aşamasında pişirme kaynağı olarak odun kömürü kullanılmasının ve aşırı pişirmeden kaçınılmasının bu bileşiklerin oluşumlarının düşük düzeyde kalmasına neden olduğu sonucuna varıldı. Yine tüp gazın kullanılmaması ve pişirme süresinin kısa tutulması da önerilen tedbirler arasında sayılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] <http://cfpub.epa.gov/ncea/iris/index.cfm>
- [2] [www.epa.gov/iriswebp/\(2000\)](http://www.epa.gov/iriswebp/(2000)).
- [3] Materna B.L. ve arkadaşları, 1992, Occupational exposures in California wildland firefighting, Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 53, 69-76.
- [4] US Environmental Protection Agency, 1993, Provisional Guidance for Quantitative Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, EPA/600/R-93/089.
- [5] www.realage.com.tr, www.sizinti.com.tr
- [6] Gürbüz, N., 2006, Antimutajenler ve Antikarsinojenler Kanseri Gelişiminin Kimyasal Bileşiklerle Önlenmesi, Türkiye Klinikleri J. Med. Sci, 26:312-318.
- [7] Mullen ve arkadaşları, 2000, Synthesis and structural characterization of hexa-tert-butyl-hexa-peri-hexabenzocoronene, its radical cation salt and its tricarbonylchromium complex Chem. Eur. J., 1834-1839.
- [8] Luch, A., 2005, The Carcinogenic Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. London: Imperial College Press.
- [9] Oil in the Sea-inputs, Fates and Effects. National Academy of Sciences, National Academy Press, Washington, D.C., 1985.
- [10] Baker J.M., 1976, Marine Ecology and Oil Pollution, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- [11] Wolfe D.E., 1977, Fates and Effects of Petroleum Hydrocarbons in Marine Organism and Ecosystems. Pergamon Press, Inc., Elmsford, New York.
- [12] Means J.C. ve arkadaşları, 1980, Sorption properties of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils, Environ. Sci. Technol., 14: 1524-1528.
- [13] Shiaris M.P. ve Jambard-Sweet D., 1986, Polycyclic aromatic hydrocarbons in surficial sediments of Boston Harbour. Massachusetts, U.S.A. Mar. Pollut. Bull., 17: 469-472.
- [14] Gibson D.T., 1968, Microbial degradation of aromatic compounds. Science, 161, 1093-1097.
- [15] Cerniglia, C.E., 1981, Aromatic hydrocarbons: Metabolism by bacteria, fungi, and algae. In: Hodgson, E. Bend. J.R. and Philpot, R.M. (ed.). Reviews in Biochemical Toxicology. Elsevier/North Holland Publishing Co., New York.
- [16] Feriello, D.A. ve arkadaşları, 1976, XYL nonconjugative xylenedegrative plasmid in pseudomonas Pxy. J. Bacterial., 127:1217-1224.
- [17] Van der Oost R. ve arkadaşları, 1991, Bioaccumulation of organic micropollutants in different aquatic organisms: sublethal toxic effects on fish. In: Mayes MA, Baron MG (eds)

Aquatic Toxicology and Risk Assessment ASTM Stp 1124, vol 14, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp 166-180.

[18] Kanemitsu ve arkadaşları, 1980, Plasmid-borne biodegradation of toluene and ethylbenzene in a pseudomonad, J. Ferment. Technol., 58:175-181.

[19] Yano ve arkadaşları, 1980, Pkj1 a naturally occurring conjugative plasmid coding for toluene degradation and resistance to streptomycin and sulfonate, J. Bacteriol., 145:552-560.

[20] Davies ve arkadaşları, 1964, Oxidation metabolism of naphthalene by soil pseudomonad: The ring-fission mechanism, J. Biochem., 91: 251-261.

[21] Jerina ve arkadaşları, 1976, Dihydrodlois from anthracene and phenanthrene, J. Am. Chem. Soc., 98: 5988-5996.

[22] Williams ve arkadaşları, 1974, Metabolism of benzoate and the methylbenzoate by Pseudomonas putida (arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid, J. Bacteriol., 127: 1217-1224.

[23] Leahy, J.G. ve Covell, R.R, 1990, Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol. Rev., 54: 305-315.

[24] Davila ve arkadaşları; Toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to the human immune system: Models and mechanisms, TEN, 4: 5-9, 1997.

[25] White ve arkadaşları, 1994, Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon immunotoxicity. In Immunotoxicology and Immunopharmacology, JH Dean, MI Luster, AE Munson, I Kimber, eds. Raven Press, New York, pp 123-142.

[26] International Agency For Research On Cancer, 1983, Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, Chemical Environmental and Experimental Data. Monographs, 32, Lyon, France.

[27] Ladou J, 1990, Occupational Medicine, pp. 349, Appleton & Lange, New Jersey.

[28] <http://en.wikipedia.org/wiki/Anthracene#Reactions>

[29] <http://www.epa.gov/R5Super/ecology/html/toxprofiles.htm#pahs>

[30] Benzopyrene and Vitamin A deficiency, 2005, Researcher links cigarettes, vitamin A and emphysema. Retrieved on March 5.

[31] Denissenko M.F. ve arkadaşları, 1996, Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53, Science, 274(5286):430-2.

[32] Daniel W., 2007, Nebert in research seminars.

[33] Pradhan, P. ve arkadaşları, 2001, Solution structure of a trans-opened (10S)-dA adduct of (+)-(7S,8R,9S,10R)-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene in a fully complementary DNA duplex: evidence for a major syn conformation, Biochemistry, 40: 5870-5881.

- [34] Volk D.E. ve arkadaşları, 2003, Solution structure of a cis-opened (10R)-N6-deoxyadenosine adduct of (9S,10R)-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene in a DNA duplex, *Biochemistry*, 18;42(6):1410-20.
- [35] Eaton D.L., Gallagher E.P., 1994, Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 34:135-72.
- [36] Pfeifer G.P. ve arkadaşları, 2002, Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers, *Oncogene*, 21(48):7435-51.
- [37] Shou M. ve arkadaşları, 1996, Stereoselective epoxidation and hydration at the K-region of polycyclic aromatic hydrocarbons by cDNA-expressed cytochromes P450 1A1, 1A2, and epoxide hydrolase, *Biochemistry*, 35(49):15807-13.
- [38] Whitlock J.P., 1999, Jr. Induction of cytochrome P4501A1, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 39:103-25.
- [39] Vilius Stribinskis ve Kenneth S. Ramos, 2006, Activation of Human Long Interspersed Nuclear Element 1 Retrotransposition by Benzo[a]pyrene, an Ubiquitous Environmental Carcinogen, *Cancer. Res.*, 66: (5).
- [40] U.S. Environmental Protection Agency (EPA), 1992, Characterization of Municipal Solid Waste in the United States: Office of Solid Waste and Emergency Response. EPA/530-R-92-019. p. ES-5.
- [41] USEPA, 1992b, Framework for Ecological Risk Assessment. Washington, D.C. Risk Assessment Forum. EPA/630/R-92/001.
- [42] ["http://en.wikipedia.org/wiki/Pyrene"](http://en.wikipedia.org/wiki/Pyrene)
- [43] Kazunga C. ve Aitken M.D., 2000, Products from the Incomplete Metabolism of Pyrene by Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 1917-1922, Vol. 66, No. 5.
- [44] Smalley M.K. ve Silverman S.K., 2006, Fluorescence of covalently attached pyrene as a general RNA folding probe, *Nucleic Acids Research*, Vol.34.
- [45] Birks, J.B., 1969, *Photophysics of Aromatic Molecules*, London: Wiley.
- [46] Valeur, B., 2002, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, New York: Wiley-VCH.
- [47] Birks, J.B., 1975, *Eximers*. London: Reports on Progress in Physics.
- [48] Fetzer, J.C., 2000, *The Chemistry and Analysis of the Large Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, New York: Wiley.
- [49] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 1990, Public Health Statement, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Atlanta, GA: U.S., Department of Health and Human Services.

- [50] Faust, Rosmarie A., 1993, Oak Ridge National Laboratory, Chemical Hazard Evaluation Group, Toxicity Summary for Pyrene, Oak Ridge.
- [51] Paul C and Frederick A Beland, 1994, The Effects of Copollutants on the Metabolism and DNA Binding of Carcinogens Howard.
- [52] Simpson C.D. ve arkadaşları, 2002, Metabolism of pyrene by two clam species, *Mya arenaria* and *Protothaca staminea*, *Chemosphere*, 49, 315-322.
- [53] Janoszka B. ve arkadaşları, 2004, Organic compounds formed in thermally treated high-protein food part I: Polycyclic aromatic hydrocarbons, *Acta Chromatographica*, 14, 115-128.
- [54] Aygün S.F. ve arkadaşları, 2005, Determination of benzo[a]pyrene in charcoal grilled meat samples by HPLC with fluorescence detection, *Intern. Journ. Food Scien. Nutrition*, 56(8), 581-585.
- [55] Gimeno R.A. ve arkadaşları, 2002, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic sulfur heterocycles by high-performance liquid chromatography with fluorescence and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry detection in sea water and sediment samples, *Jour. Chromatography A*, 958, 141-148.
- [56] Ferrari St. ve arkadaşları, 2002, Quantitative determination of 1- hydroxypyrene in bovine urine samples using high-performance liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometric detection, *Chemosphere*, 472, 173-182.
- [57] Ikenaka Y. ve arkadaşları, 2006, Metabolism of pyrene aquatic crustacean, *Daphnia magna*, *Aquatic Toxicology*, 80, 158-165.
- [58] Iglesias M.P. ve arkadaşları, 2004, Assessment of methodologies for airborne BaP analysis, *Scien. Total Environ.*, 334-335,.
- [59] He S.X. ve arkadaşları, 1998, Benzo[a]pyrene toxicokinetics in the cricket following injection the haemolymph, *Environ. Toxic. Pharmacology*, 6, 81-89.
- [60] Kazerouni N. ve arkadaşları, 2001, Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study, *Food and Chemical Toxicology*, 39, 423-436.
- [61] Tfouni S.A.V. ve arkadaşları, 2007, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaça by HPLC with fluorescence detection, *Food Chemistry* 101, 334-338.
- [62] Buseti F ve arkadaşları, 2006, Determination of sixteen polycyclic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant, *Journal of Chromatography A*, 1102, 104-115.
- [63] McClaine. J.W. ve arkadaşları, 2006, First identification of benzo[ghi]naphthol[8,1,2-bcd]perylene as a product of fuel pyrolysis, using high-performance liquid chromatography with diode-array ultraviolet-visible absorbance detection and mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1127, 137-146.

- [64] Hua G. ve arkadaşları, 2007, Rapid quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPCD) soil extracts by synchronous fluorescence spectroscopy (SFS)), *Environmental Pollution*, 148, 176-181.
- [65] Pekey B. ve arkadaşları, 2007, Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons to Izmit Bay, Turkey, *Chemosphere* 67, 537-547.
- [66] Hashi Y. ve arkadaşları, 2007, Rapid and sensitive determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulates using fast high-performance liquid chromatography with on-line enrichment system, *Talanta*, 74, 986-991.
- [67] Rezek J. ve arkadaşları, 2007, The effect of ryegrass (*Lolium perenne*) on decrease of PAH content in long term contaminated soil, *Chemosphere*, 70, 1603-1608.
- [68] Deschamps M. B. ve arkadaşları, 2007, An experimental design approach to optimise the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from rainfall water using stir bar sorptive extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection, *Journal of Chromatography A*, 1167, 143-153.
- [69] Moret S. ve arkadaşları, 2007, Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) content of soil and olives collected in areas contaminated with creosote released from old railway ties, *Science of the Total Environment*, 386, 1-8.
- [70] Boysen G. ve arkadaşları, 2003, Analysis of DNA and protein adducts of benzo[a]pyrene in human tissues using structure-specific methods, *Mutation Research*, 543, 17-30.
- [71] Bogusz M. J. ve arkadaşları, 2004, Rapid determination of benzo[a]pyrene in oliveoil samples with solid-phase extraction and low-pressure, wide-bore gas chromatography-mass spectrometry and fast liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography A*, 1026, 1-7.
- [72] Baek S. O. ve arkadaşları, 2004, Characterization of trace organic compounds associated with aged and diluted sidestream tobacco smoke in a controlled atmosphere volatile organic compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons, *Atmospheric Environment*, 38, 6583-6599.
- [73] Capotorti G. ve arkadaşları, 2005, Formation of sulfate conjugates metabolites in the degradation of phenanthrene, anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene by the ascomycete, polycyclic aromatic compounds, 25, 197-213.
- [74] Moret S. ve arkadaşları, 2005, Polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils from canned foods, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 107, 488-496.
- [75] Tfouni S.A.V. ve arkadaşları, 2007, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cane sugar, *Food Control* 18, 948-952.
- [76] http://www.forumsci.co.il/HPLC/spe_abic.pdf/
- [77] Zief M., 2005, Solid Phase Extraction for Sample Preparation. Phillipsburg: JT Baker.

- [78] Stevenson D., 2000, Immuno-affinity solid-phase extraction, *Journal of Chromatography B*, 745: 39–48.
- [79] Rosenfeld J.M., 1999, Solid-phase analytical derivatization: Enhancement of sensitivity and selectivity of analysis. *Journal of Chromatography A*, 843: 19–27.
- [80] Majors R.E., 2002, Trends in sample preparation. *LCGC North America*, 20: 1098-1113.
- [81] Hennion M.C., 1999, Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 856: 3–54.
- [82] Liljegren G., 2005, Development and Investigations of Novel Sample Preparation Techniques, Electrochemical Extraction and Evaluation of Miniaturized Analytical Devices Cuopled to Mass Spectrometry. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 54. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis.
- [83] EPA. EPA Method 3535A Solid Phase Extraction (SPE).
<http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/3535a.pdf>
- [84] Macherey-Nagel, 2004, Sample Preparation, Solid Phase Extraction. In: Macherey-Nagel Catalogue, 184-241.
- [85] Haginaka J., 2005, Selectivity of affinity media in solid-phase extraction of analytes. *Trends in Analytical Chemistry*, 24-5, 407-15.
- [86] Christie W.W. Solid-Phase Extraction Columns In The Analysis Of Lipids.
http://www.lipidlibrary.co.uk/topics/spe_alm/
- [87] Cobert Associates Catalogue. Solid Phase Extraction (SPE) Guide.
<http://www.cobertassoc.com/xpertekspe.jpg/>
- [88] Beney P.J. ve arkadaşları, 1996, Review, Evaluation, and Application of Solid Phase Extraction Methods, *Hotlines*, 35: 1-5.
http://www.uhl.uiowa.edu/newsroom/hotline/1996/1996_12/solidphase.html/
- [89] Majors R.E., 2001, New designs and formats in solid-phase extraction sample preparation, *LCGC North America*, 19: 678-687.
- [90] LeBlanc G., 2001, A review of EPA sample preparation techniques for organic compound analysis of liquid and solid samples, *LCGC North America*, 19: 1120-1130.
- [91] Prof. Dr. Atilla YILDIZ, Prof. Dr. Ömer Genç, Prof. Dr. Sema Bektaş, 1997, Enstrümental Analiz Yöntemleri, Hacettepe Yayınları, 417-422.
- [92] Özçimder M. ve arkadaşları, 2004, Gaz ve Sıvı Kromatografileri, Kırıkkale.
- [93] Skoog, D.A., Holler, F.I., Nieman, T.A., 1998, Enstrümental Analiz İlkeleri, I. Baskı, 498-531, 725-739.

ÖZGEÇMİŞ

07.02.1976’ da Malatya Merkez Söğüt Köyünde doğdu. İlköğrenimini Söğüt Köyü İlkokulunda, ortaöğrenimini Atatürk ortaokulunda ve lise öğrenimini Malatya Hacı Ahmet Akıncı lisesinde tamamladı. 1998 yılında İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliğini kazandı ve 2003 yılında mezun oldu. 2004 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya alanında başladığı Yüksek Lisansını “Ultra Eser Düzeydeki Ağır Metallerin Amberlite-XAD ile Önderiştirilmesi ve Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresiyle Tayini” isimli tezi ile tamamladı. 2005 yılında aynı enstitüde doktora eğitimine başladı ve “Yüksek Sıcaklıkta Hazırlanmış Gıdalarda Organik Kanserojen Maddelerin HPLC-MS ile Tayini” konulu doktora tez çalışması ile doktorasını sürdürmektedir.