# SU ÖRNEKLERİNDE POLİSİKLİK AROMATİK HİDROKARBONLARIN (PAH) TAYİNİNDE ÖRNEK HAZIRLAMA VE KROMATOGRAFİK YÖNTEMLERİN OPTİMİZASYONUNA İNOVATİF YAKLAŞIMLAR

**Selman KANDER**

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# SU ÖRNEKLERİNDE POLİSİKLİK AROMATİK HİDROKARBONLARIN (PAH) TAYİNİNDE ÖRNEK HAZIRLAMA VE KROMATOGRAFİK YÖNTEMLERİN OPTİMİZASYONUNA İNOVATİF YAKLAŞIMLAR

Selman KANDER
0000-0003-2098-9445

Prof. Dr. Belgin İZGİ
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA – 2023
**Her Hakkı Saklıdır**

# ÖZET

Doktora Tezi

SU ÖRNEKLERİNDE POLİSİKLİK AROMATİK HİDROKARBONLARIN (PAH) TAYİNİNDE ÖRNEK HAZIRLAMA VE KROMATOGRAFİK YÖNTEMLERİN OPTİMİZASYONUNA İNOVATİF YAKLAŞIMLAR

**Selman KANDER**

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. Belgin İZGİ

Bu çalışmada Amerika Çevre Koruma Ajansı'nın (EPA) öncelikli kirletici olarak belirlediği on beş poliaromatik hidrokarbon (Asenaften, Antrasen, Benzo[a]antrasen, Benzo[b]floranten, Benzo[k]floranten, Benzo[g,h,i]perilen, Benzo[a]piren, Krisen, Dibenzo[a,h]antrasen, Floranten, Floren, İndeno[1,2,3-cd]piren, Naftalin, Fenantren ve Piren) için yüksek hassasiyete sahip bir analiz yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde on beş poliaromatik hidrokarbonun (PAH) piklerinin ayrımları gerçekleştirilmiş ve literatürden tespit edilen toplam üç yüz on iki adet dalga boyu çiftinin analizleri yapılarak optimum uyarılma ve emisyon dalga boyları bulunmuştur. Oluşturulan bu analiz yöntemiyle PAH'lar için 2 ile 90 ng/L arasında değişen değerlerde gözlenebilme sınırları (LOD) elde edilmiştir. PAH analizlerinin ön işlemi olan katı faz ekstraksiyon (SPE) kısmında da basınç, sıcaklık, çözücü ve kartuş değerlerine yönelik analizler gerçekleştirilmiştir. SPE metodunun, azot gazı basıncı 12 psi, buharlaştırma sıcaklığı 35 $^{0}$C, elüsyon çözücüsü diklorometan ve kartuşu HyperSep C18 optimum koşulları olarak belirlenmiştir. Altı PAH parametresi (Floranten, Benzo[b]floranten, Benzo[k]floranten, Benzo[g,h,i]perilen, Benzo[a]piren, Indeno[1,2,3-cd]piren) için uluslararası yeterlilik testine katılım sağlanmış tüm parametrelerde ikinin altında alınan z skorlar ile hazırlanan yöntemin geçerliliği kanıtlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** PAH, UHPLC, Floresans, SPE, Optimizasyon
**2023, x + 93 sayfa.**

## ABSTRACT

PhD Thesis

INNOVATIVE APPROACHES TO SAMPLE PREPARATION AND OPTIMIZATION OF CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAH) IN WATER SAMPLES

**Selman KANDER**

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

**Supervisor:** Prof. Dr. Belgin İZGİ

In this study, it is aimed to develop a highly sensitivity analysis method for fifteen polyaromatic hydrocarbons (Acenaphthene, Anthracene, Benzo[a]anthracene, Benzo[b]fluoranthene, Benzo[k] fluoranthene, Benzo[g,h,i]perylene, Benzo[a]pyrene, Chrysene, Dibenzo[a,h]anthracene, Fluoranthene, Fluorene, Indeno[1,2,3-cd]pyrene, Naphthalene, Phenanthrene and Pyrene) which are determined as priority pollutants by the American Environmental Protection Agency (EPA). In ultra-high pressure liquid chromatography, the separation of the peaks of fifteen polyaromatic hydrocarbons (PAH) was performed and the optimum excitation and emission wavelengths were found by analyzing three hundred and twelve wavelength pairs determined by the literature. With this analysis method, the limits of detection (LOD) for PAHs ranging from 2 to 90 ng/L were obtained. In the solid phase extraction (SPE) part, which is the pre-processing of the PAH analysis, analyses were performed for pressure, temperature, solvent, and cartridge values. Nitrogen gas pressure of 12 psi, evaporation temperature of 35 $^{0}$C, elution solvent dichloromethane and cartridge HyperSep C18 were determined as optimum conditions of the SPE method. For six PAH parameters(Fluoranthene, Benzo[b]fluoranthene, Benzo[k]fluoranthene, Benzo[g,h,i]perylene, Benzo[a]pyrene, Indeno[1,2,3-cd]pyrene), participation in the international proficiency test was ensured, and the validity of the method prepared with z scores below two in all parameters was proven.



**Key words:** PAH, UHPLC, Fluorescence, SPE, Optimization
**2023, x + 93 pages.**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca, destek ve yardımlarıyla hep yanımda olan ve bana yol gösteren danışman hocam sayın Prof. Dr. Belgin İZGİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanması süresince çalışmalarımı izleyerek fikir ve tecrübeleri ile çalışmamı yönlendiren değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Elif TÜMAY ÖZER ve sayın Prof. Dr. Gizem EKER ŞANLI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuar çalışmalarımdaki desteklerinden ve anlayışlarından dolayı BUSKİ Genel Müdürlüğüne ve değerli yöneticilerime teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın ortaya çıkmasında maddi ve manevi katkıda bulunan eşim Esma Nur KANDER'e ve aileme teşekkürlerimi sunarım.

Selman KANDER
16/03/2023

# İÇİNDEKİLER

**Sayfa**

ÖZET ..... i
ABSTRACT ..... ii
TEŞEKKÜR ..... iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ ..... vi
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... viii
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... x
1. GİRİŞ ..... 1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI ..... 3
2.1. Poliaromatik Hidrokaronlar ..... 3
2.2. PAH'ların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri ..... 4
2.3. PAH'ların Kaynakları ..... 6
2.4. PAH'ların Hava, Su ve Topraktaki Döngüsü ..... 10
2.5. PAH'ların İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri ..... 11
2.6. PAH'ların Karsinojenik Potansiyelleri ..... 13
2.7. PAH'ların Analiz Yöntemleri ..... 14
2.8. Ekstraksiyon ..... 15
2.8.1. Sıvı sıvı ekstraksiyon ..... 16
2.8.2. Katı faz ekstraksiyon ..... 16
2.9. SPE'nin Sınıflandırılması ..... 18
2.9.1 Çalkalama (batch) tekniği ..... 18
2.9.2. Süzme tekniği ..... 18
2.9.3. Kolon tekniği ..... 18
2.10. Kromatografi ..... 21
2.10.1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ..... 22
2.10.2. Ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (UHPLC) ..... 22
2.11. HPLC Bileşenleri ..... 25
2.11.1 Mobil faz şişeleri ..... 25
2.11.2. Degasser (Gaz giderici) ..... 25
2.11.3. Pompa ..... 25
2.11.4. Enjektör ..... 26
2.11.5. Kolon ..... 26
2.11.6. Dedektör ..... 28
2.12. HPLC'de Kullanılan Başlıca Dedektörler ..... 28
2.12.1. Ultraviyole/görünür bölge (UV) ..... 28
2.12.2. Fotodiyot dizi (PDA) dedektörü ..... 28
2.12.3. Kırılma indisi (RI) dedektörü ..... 29
2.12.4. Elektron yakalama dedektörü (ECD) ..... 29
2.12.5. Floresan (FL) dedektörü ..... 29
2.13. HPLC'de Metot Optimizasyon ..... 30
2.13.1. Mobil faz parametreleri ..... 31
2.13.2. HPLC çalışma parametreleri ..... 33
2.13.3. Kolon parametreleri ..... 33
2.13.4. Dedektör ayarı ve numune miktarı ..... 34
2.14. Tez Çalışmasına Yönelik Kaynak Araştırması ..... 35
3. MATERYAL ve YÖNTEM ..... 37
3.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler ..... 37

3.1.1. UHPLC cihazı ..... 37
3.1.2. Katı faz ekstraksiyon cihazı (SPE) ..... 38
3.1.3. Evaporatör cihazı ..... 38
3.1.4. Azot jeneratörü ..... 39
3.1.5. Ultra saf su cihazı ..... 39
3.1.6. Vortex karıştırıcı ..... 39
3.2. Kullanılan Kimyasal ve Çözeltiler ..... 39
3.2.1. Kimyasallar ..... 39
3.2.2. Stok çözeltiler ..... 40
3.3. Yöntem ..... 40
3.3.1. Kromatografik koşullar ..... 40
3.3.2. Dalga boyu optimizasyon çalışmaları ..... 41
3.3.3. Piklerin ayrım çalışması ..... 44
3.3.4. SPE optimizasyon çalışmalar ..... 45
3.3.5. Sonuçların standart metotlarla karşılaştırılması ..... 46
4. BULGULAR ve TARTIŞMA ..... 47
4.1.UHPLC Dalga Boyu Optimizayonu ..... 47
4.1.1. Naftalin ..... 51
4.1.2. Asenaften ..... 52
4.1.3. Floren ..... 54
4.1.4. Fenantren ..... 56
4.1.5. Antrasen ..... 57
4.1.6. Floranten ..... 58
4.1.7. Piren ..... 60
4.1.8. Benzo[a]antrasen ..... 62
4.1.9. Krisen ..... 63
4.1.10. Benzo[b]floranten ..... 64
4.1.11. Benzo[k]floranten ..... 66
4.1.12. Benzo[a]piren ..... 67
4.1.13. Dibenz[a,h]antrasen ..... 69
4.1.14. Benzo[g,h,i]perilen ..... 70
4.1.15. İndeno[1,2,3-c,d]piren ..... 72
4.2. SPE Optimizasyonu ..... 74
4.2.1. Kartuş karşılaştırılması ..... 74
4.2.2. Çözücü karşılaştırması ..... 75
4.2.3. Çözücü buharlaştırmada kullanılan sıcaklığın karşılaştırılması ..... 77
4.2.4. Çözücü buharlaştırmada kullanılan azot gazı basıncının karşılaştırılması ..... 78
4.3. Sonuçların Uluslararası Standart Metotlar ile Karşılaştırılması ..... 79
5.SONUÇ ..... 82
KAYNAKLAR ..... 83
ÖZGEÇMİŞ ..... 93

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

| Simgeler | Açıklama |
|---|---|
| Å | Ångström |
| Bar | Basınç Birimi |
| $R^2$ | Belirleme Katsayısı |
| psi | Bir İnçkarelik Alana Uygulanan Kuvvetin Libre Cinsinden Değeri |
| > | Büyüktür |
| dk | Dakika |
| °C | Derece |
| fg | Femtogram |
| g | Gram |
| kg | Kilogram |
| < | Küçüktür |
| L | Litre |
| $m^2$ | Metrekare |
| µg | Mikrogram |
| µL | Mikrolitre |
| µm | Mikrometre |
| mg | Miligram |
| ml | Mililitre |
| mm | Milimetre |
| ppb | Milyarda Bir Kısmı |
| ng | Nanogram |
| nm | Nanometre |
| pg | Pikogram |
| sa | Saat |
| cm | Santimetre |
| $cm^3$ | Santimetreküp |
| t | Ton |
| % | Yüzde |

| Kısaltmalar | Açıklama |
|---|---|
| FID | Alev İyonlaştırma Dedektörü |
| LOQ | Alt Tayin Sınırı |
| ABD | Amerika Birleşik Devleri |
| Ant | Antrasen |
| Act | Asenaften |
| Acn | Asenaftilen |
| ACN | Asetonitril |
| RSD | Bağıl Standart Sapma |
| BaA | Benzo[a]antrasen |
| BaP | Benzo[a]piren |
| BbF | Benzo[b]floranten |
| BghiP | Benzo[g,h,i]perilen |
| BbK | Benzo[k]floranten |

| | |
|---|---|
| EPA | Çevre Koruma Ajansı |
| DNA | Deoksiribo Nükleik Asit |
| DahA | Dibenzo[a,h]antresen |
| DCM | Diklorometan |
| DVB | Divinilbenzen |
| WHO | Dünya Sağlık Örgütü |
| Ex | Uyarılma |
| ECD | Elektron Yakalama Dedektörü |
| Em | Emisyon |
| Phe | Fenantren |
| Fln | Floren |
| Flt | Florenten |
| Flu | Floresans Birimi |
| FL | Floresan Dedektörü |
| PDA | Foto Diyot Dizisi |
| LOD | Gözlenebilme Sınırı |
| HLB | Hidrofilik Lipofilik Dengeli |
| IcdP | İndeno[1,2,3-cd]piren |
| C 18 | Karbon 18 |
| SPE | Katı Faz Ekstraksiyon |
| RI | Kırılma İndisi |
| IR | Kızılötesi |
| Chr | Krisen |
| MS | Kütle Spektorometresi |
| LPG | Likit Petrol Gazı |
| Nap | Naftalin |
| NMR | Nükleer Manyetik Rezonans |
| Pyr | Piren |
| PAH | Poliaromatik Hidrokarbon |
| PVC | Polivinil Klorür |
| Crm | Sertifikalı Referans Malzeme |
| LC | Sıvı Kromatografisi |
| LLE | Sıvı Sıvı Ekstraksiyon |
| CN | Siyano |
| SD | Standart Sapma |
| SDVB | Stiren Divinil Benzen |
| T.E. | Tespit Edilemedi |
| TEF | Toksik Eşdeğerlik Faktörü |
| IPCS | Uluslararası Kimyasal Güvenlik Programı |
| UHPLC | Ultra Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi |
| UV | Ultraviyole |
| ISO | Uluslararası Standardizasyon Örgütü |
| HPLC | Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi |
| Z | Zeta |

## ŞEKİLLER DİZİNİ


| | | Sayfa |
|---|---|---|
| Şekil 2.1. | Öncelikli kirleticiler listesindeki 16 PAH'ın molekül yapısı..... | 4 |
| Şekil 2.2. | PAH'ların nomenklatürü..... | 6 |
| Şekil 2.3. | SPE Basamakları..... | 17 |
| Şekil 2.4. | HPLC ve UHPLC analiz süresi farkını gösteren kromatogramlar.... | 24 |
| Şekil 2.5. | PAH'ların iki tip C 18 kolonda ayrım kromatogramı……..... | 27 |
| Şekil 2.6. | Mobil faz değişiminin alıkonma zamanına ve pik yapısına etkisi.... | 32 |
| Şekil 2.7. | Tuz miktarının alıkonma zamanına ve pik yapısına etkisi……..... | 32 |
| Şekil 2.8. | Kolon uzunluğunun piklerin ayrımına etkisi… ……...… | 33 |
| Şekil 2.9. | Partikül boyutunun piklerin ayrımına etkisi……..... | 34 |
| Şekil 2.10. | Enjeksiyon hacimin pik boylarına etkisi……... | 34 |
| Şekil 3.1. | UHPLC cihazı……..... | 37 |
| Şekil 3.2. | SPE cihazı…….. | 38 |
| Şekil 3.3. | Evaporatör cihazı…….. | 39 |
| Şekil 3.4. | Dalga boyu analizlerinde kullanılan örnek HPLC metodu……... | 41 |
| Şekil 3.5. | PAH piklerinin ayrımını gösteren örnek kromatogram……..... | 44 |
| Şekil 4.1. | Naftalin için optimum dalga boyu analiz kromatogramları……. | 51 |
| Şekil 4.2. | Naftaline ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı……. | 52 |
| Şekil 4.3. | Naftaline ait LOD doğrulaması kromatogramı……. | 52 |
| Şekil 4.4. | Asenaften için optimum dalga boyu analiz kromatogramları……... | 53 |
| Şekil 4.5. | Asenaften ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı…… | 53 |
| Şekil 4.6. | Asenaftene ait LOD doğrulaması kromatogramı…….. | 54 |
| Şekil 4.7. | Floren için optimum dalga boyu analiz kromatogramları……. | 54 |
| Şekil 4.8. | Florene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı…… | 55 |
| Şekil 4.9. | Florene ait LOD doğrulaması kromatogramı…… | 55 |
| Şekil 4.10. | Fenantren için optimum dalga boyu analiz kromatogramları……... | 56 |
| Şekil 4.11. | Fenantrene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı ……. | 56 |
| Şekil 4.12. | Fenantrene ait LOD doğrulaması kromatogramı……... | 57 |
| Şekil 4.13. | Antrasen için optimum dalga boyu analiz kromatogramları……. | 57 |
| Şekil 4.14. | Antrasene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı …….. | 58 |
| Şekil 4.15. | Antrasene ait LOD doğrulaması kromatogramı……..... | 58 |
| Şekil 4.16. | Floranten için optimum dalga boyu analiz kromatogramları…… | 59 |
| Şekil 4.17. | Florantene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı……... | 59 |
| Şekil 4.18. | Florantene ait LOD doğrulaması kromatogramı……... | 60 |
| Şekil 4.19. | Piren için optimum dalga boyu analiz kromatogramları……... | 60 |
| Şekil 4.20. | Pirene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı…….. | 61 |
| Şekil 4.21. | Pirene ait LOD doğrulaması kromatogramı…….. | 61 |
| Şekil 4.22. | Benzo[a]antrasen için optimum dalga boyu analiz kromatogramları | 62 |
| Şekil 4.23. | Benzo[a]antrasene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı…….. | 62 |
| Şekil 4.24. | Benzo[a]antrasene ait LOD doğrulaması kromatogramı…….. | 63 |
| Şekil 4.25. | Krisen için optimum dalga boyu analiz kromatogramları…… | 63 |
| Şekil 4.26. | Krisene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı……..... | 64 |
| Şekil 4.27. | Krisene ait LOD doğrulaması kromatogramı…… | 64 |
| Şekil 4.28. | Benzo[b]floranten için optimum dalga boyu analiz kromatogramları | 65 |
| Şekil 4.29. | Benzo[b]florantene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı……. | 65 |
| Şekil 4.30. | Benzo[b]florantene ait LOD doğrulaması kromatogramı……. | 66 |
| Şekil 4.31. | Benzo[k]floranten için optimum dalga boyu analiz kromatogramları | 66 |

Şekil 4.32. Benzo[k]florantene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı……. 67
Şekil 4.33. Benzo[k]florantene ait LOD doğrulaması kromatogramı……. 67
Şekil 4.34. Benzo[a]piren için optimum dalga boyu analiz kromatogramları… 68
Şekil 4.35. Benzo[a]pirene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı…….. 68
Şekil 4.36. Benzo[a]pirene ait LOD doğrulaması kromatogramı…… 69
Şekil 4.37. Dibenz[a,h]antrasen için optimum dalga boyu analiz kromatogramları 69
Şekil 4.38. Dibenz[a,h]antrasene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı…….. 70
Şekil 4.39. Dibenz[a,h]antrasene ait LOD doğrulaması kromatogramı…….. 70
Şekil 4.40. Benzo[g,h,i]perilen için optimum dalga boyu analiz kromatogramları 71
Şekil 4.41. Benzo[g,h,i)perilene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı……... 71
Şekil 4.42. Benzo[g,h,i)perilene ait LOD doğrulaması kromatogramı…….. 72
Şekil 4.43. İndeno[1,2,3-cd]piren için optimum dalga boyu analiz kromatogramları 72
Şekil 4.44. İndeno[1,2,3-cd]piren e ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı…. 73
Şekil 4.45. İndeno[1,2,3-cd]piren e ait LOD doğrulaması kromatogramı…….. 73

# ÇİZELGELER DİZİNİ

**Sayfa**


| | | |
|---|---|---|
| Çizelge 2.1. | PAH'lara ait fiziksel ve kimyasal özellikler……..... | 5 |
| Çizelge 2.2. | PAH'ların emisyon kaynakları ve yıllık miktarları…… | 7 |
| Çizelge 2.3. | Atmosfer ve sudaki önemli PAH kaynakları ve miktarları…… | 9 |
| Çizelge 2.4. | PAH'ların kansorejen özelliklerine göre sınıflandırılması……... | 12 |
| Çizelge 2.5. | PAH'ların hesaplanan TEF değerleri……..... | 13 |
| Çizelge 2.6. | SPE adsorbanları…… | 19 |
| Çizelge 2.7. | Önemli SPE adsorbanları ve analiz uygulamaları……. | 20 |
| Çizelge 2.8. | UHPLC'nin avantajları…….. | 24 |
| Çizelge 2.9. | HPLC detektörlerinin bazı performans özellikleri……. | 30 |
| Çizelge 3.1. | Literatürde tespit edilen ex/em dalgaboyları……. | 42 |
| Çizelge 3.2. | PAH'ların ayrımında kullanılan UHPLC metodu……. | 44 |
| Çizelge 4.1. | Dalga boyu optimizasyon analiz sonuçları…… | 47 |
| Çizelge 4.2. | Regresyon denklemi, $R^2$, LOD, LOQ ve lineer aralık…….. | 50 |
| Çizelge 4.3. | Literatürde tespit edilen LOD değerleri…… | 50 |
| Çizelge 4.4. | Çeşitli SPE kartuşları ile yapılan analizlerin sonuçları…….. | 74 |
| Çizelge 4.5. | SPE çözücü karşılaştırması analiz sonuçları…….. | 75 |
| Çizelge 4.6. | Çözücülerin kaynama noktaları ve buharlaşma süreleri ……... | 76 |
| Çizelge 4.7. | Buharlaştırma işlemi sıcaklık karşılaştırması analiz sonuçları…... | 77 |
| Çizelge 4.8. | Buharlaştırma işlemi basınç karşılaştırması analiz sonuçları……. | 78 |
| Çizelge 4.9. | Metotların % geri kazanım değerlerinin karşılaştırılması…….. | 79 |
| Çizelge 4.10. | Metotların %RSD değerlerinin karşılaştırılması…… | 80 |
| Çizelge 4.11. | Yeterlilik testi sonuçları…… | 81 |

# 1. GİRİŞ

Poliaromatik hidrokarbonlar (PAH'lar), yarı uçucu organik bileşikler sınıfında olup karbon içeren bileşiklerin eksik yanması ile ortaya çıkmaktadırlar. Doğada yüzden fazla çeşit PAH bulunmaktadır. Atmosfere salınan PAH'lar kuru ve ıslak çökelme yoluyla topraklara, su kütlelerine ve bitkilere ulaşırlar. Besin zinciri ve diğer yollardan insan vücuduna girebilirler (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1995). Atmosferde sıkça karşılaşılan birçok PAH türünün mutajenik ve kanserojen etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Lodovici vd., 2003). Bu nedenle sürekli bu toksik etkiye maruz kalmak doğum anomalileri, canlılarda davranış değişiklikleri gibi önemli sağlık sorunlarına neden olabilir. Son zamanlarda endokrin sisteminin bozulmasına da neden olduğu tespit edilen PAH'lara ilgi artmaktadır (Park vd., 2001).

İnsan metabolizması vücuda alınan PAH'ları uzaklaştırmak için onları okside eder ve suda çözünebilir hale getirir. Bu oksidatif metabolizma sayesinde yüksek verimli diol-epoksit türevleri oluşur. Oluşan bu diol-epoksit türevleri Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) ile kimyasal tepkime verir. DNA ile kimyasal bağ yapan PAH'lar kansere sebep olur. Bilinen en önemli kanserojen Benzo[a]piren olmasından dolayı kanser araştırmalarında model PAH olarak kabul edilmiştir. Aynı DNA mutasyonuna sigara içen insanlarda da bu bileşiklerin neden olduğu görülmüştür (Alver vd., 2012).

PAH'lar hidrofobiktir ve suda çok düşük çözünürlüğe sahiptir. Bununla birlikte, oldukça lipofiliktirler. PAH'lar yapılarındaki benzen halkası sayısına göre hafif ve ağır olarak tanımlanmaktadırlar. Dört ve daha düşük benzenden oluşan PAH'lar hafif, dörtten fazla benzen halkası bulunduran PAH'lar ise ağır PAH olarak adlandırılmaktadırlar (Danyi vd., 2009). PAH'ların hafif olanlarının buhar basınçları daha yüksek ve sudaki çözünürlükleri daha fazladır. PAH'ların sudaki çözünürlükleri molekül kütleleri ile ters orantılıdır. Bununla birlikte, molekül kütlesine bağlı olarak toksisitesi ve kanserojenliği artmaktadır (Wenzl vd., 2006; Ferrarese vd., 2008). Pratikte çok halkalı ağır PAH'lar hakkında pek çok bilgi sağlanabilmektedir. Fakat hafif, buhar fazındaki PAH bileşikleri için bu geçerli değildir. Bu hafif bileşikler zayıf kanserojenik ve mutajenik özelliklere sahiptirler ve şehirlerde daha fazla bulunurlar. Ayrıca diğer kirleticilerle reaksiyona girerek daha toksik türevlerine dönüşmektedirler (Karakaş vd., 2004).

PAH’lar belirtilen bu özellikler açısından potansiyel tehlikeli kimyasallar olarak sınıflandırılmışlardır. Bazı PAH türlerinin karsinojenik ve mutajenik etkileri ispatlanmıştır. Günümüzde insan sağlığına etkileri halen araştırılmaya devam edilen PAH’ların tespiti ve analiz yöntemlerinin geliştirilmesi çevre ve insan sağlığı açısından büyük önem arz etmektedir (Kander, 2014). Çevre, biyolojik ve gıda matrikslerinde PAH'ların veya türevlerinin belirlenmesi için çeşitli analitik yöntemler kullanılmıştır. En sık olarak kullanılan kromatografik yöntemler GC (Gaz Kromatografi) ve HPLC'dir (Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi). GC ile birleştirilmiş kütle spektrometresi de tercih edilmektedir. Çünkü ek yapısal bilgilerle birlikte hem alıkonma süresi hem de kütle spektrumu ile analit bileşiklerinin güçlü bir şekilde tanımlanmasını sağlamaktadır. HPLC, GC'ye kıyasla, termal olarak kararsız ve uçuculuk özelliği düşük bileşiklerin kolay analiz edilebildiği bir yöntem olduğu için PAH'ların analizine daha uygundur (Kumar vd., 2014; Adeniji vd., 2017, Bölüm 19, s. 412).

PAH'lar floresans ışıma yapabilme kabiliyetleri oldukça yüksek bileşiklerdir. En yüksek ışıma seviyesi optimum Ex (uyarılma) / Em (emisyon) dalga boylarında meydana gelmektedir. Pah’lara ait pik boylarını arttırmak ve daha hassas analiz metodu elde etmek için Ex/Em dalga boylarının tespit edilmesi gereklidir (Jing vd., 2017). Bu çalışmada EPA’nın öncelikli kirleticiler listesinde bulunan on beş PAH’ın literatürde bulunan Ex/Em değerleri derlenmiş olup, tespit edilen Ex/Em değerleri ile analizler gerçekleştirilmiştir. Yapılan üç yüz on iki analiz neticesinde her bir PAH için en yüksek pik boyunun elde edildiği dalga boyu optimum dalga boyu değeri olarak kabul edilmiştir. Pik alanlarının artması ile hassasiyet yükselmiş, daha düşük LOD (gözlenebilme sınırı) ve LOQ (alt tayin sınırı) değerleri elde edilmiştir. PAH’lar suda oldukça düşük düzeyde çözündükleri için analiz öncesi mutlaka bir ön deriştirme işleminine gerek duyulmaktadır. Bu çalışma sırasında ön işlem olarak katı faz ekstraksiyon (SPE) tercih edilmiştir. SPE’de basınç, sıcaklık, çözücü ve kartuş başlıklarında yapılan analizler ile optimum koşullar tespit edilmeye çalışılmıştır. Hazırlanan metot ile gerçekleştirilen analizlerin sonuçları uluslararası standart metotların performans parametleri ile karşılaştırılmıştır.

# 2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

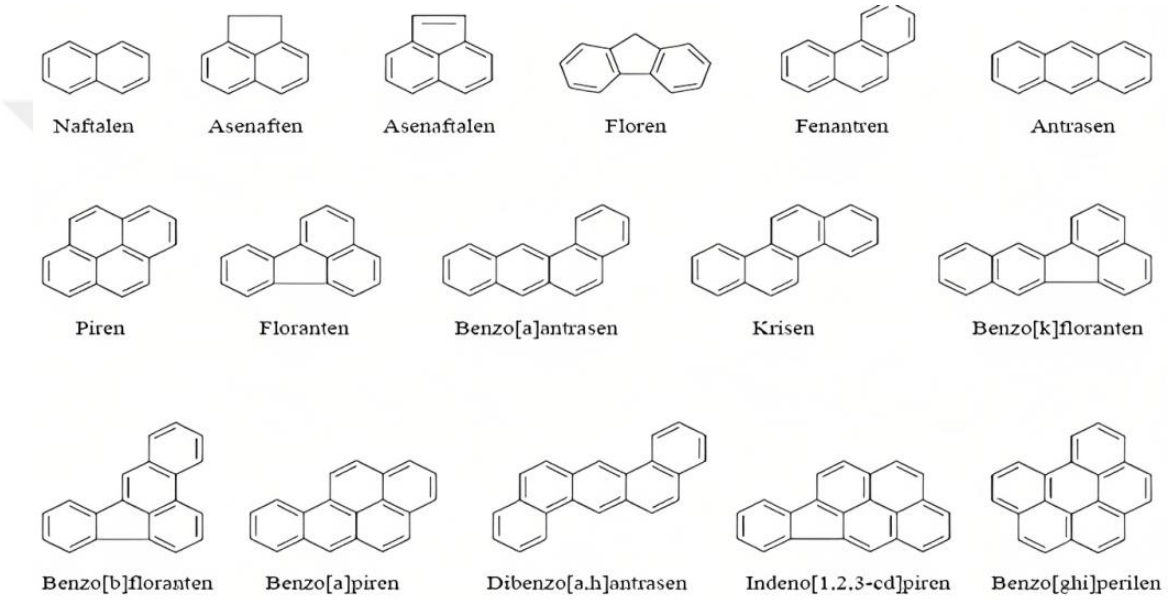
## 2.1. Poliaromatik Hidrokaronlar

PAH'lar ilk olarak 1775 yılında Percival Pott tarafından mesleki maruziyet ve kanser arasındaki ilişkiyi incelerken tespit edilmiştir. Londra'da baca temizleyenlerin cilt kanserine yakalanmalarının sebebi olarak kurum isinde bulunan benzo[a]pirenin sebep olduğu tespit edilmiştir. 1875 yılında Alman katran endüstrisindeki işçilerde cilt kanseri görülmüştür. Çevredeki yaygınlıkları ve yüksek sağlık riskleri nedeniyle PAH'lar üzerine araştırmalar günümüze kadar devam etmiştir (Yalaki, 2005; ATSDR, 1995). PAH'lar, doğrusal, küme veya açısal düzenlemelerde bağlanmış, iki veya daha fazla benzen halkasına sahip sadece hidrojen ve karbon elementlerinden oluşan bileşiklerdir (Crimmins ve Baker, 2006; Hussain ve Shaikh, 2016). PAH'lar uçucu organik bileşikler grubuna dahil olup, kalıcı toksiteye sahip atmosferik kirleticilerdir (Kamens vd., 1986). PAH'lar atmosferik uzun mesafeli taşınımlarla farklı çevresel ortamlara taşınabilmesi, kanserojenik ve toksik etkileri nedeniyle oluşabilecek sağlık riskleri dikkate alındığında çevreye zararlı olarak değerlendirilmektedirler (De Nicola vd., 2017; International Agency for Research on Cancer, 2010).

PAH'lar organik maddelerin eksik yanması sonucu oluşan büyük ve karmaşık bir organik kirletici grubudur (Lundstedt, 2003). PAH'lar, oksijen açısından fakir koşullar altında doymuş hidrokarbonlardan sentezlenir. PAH'ların ortaya çıkışı iki reaksiyon ile açıklanmaktadır. Bunlar pirosentez ve pirolizdir. PAH'lardan pirosentez ile düşük hidrokarbonlar elde edilmektedir. Beş yüz santigrat dereceyi aşan sıcaklıkta, serbest radikaller açığa çıkar bunun nedeni karbon-hidrojen ve karbon-karbon bağların kırılmasıdır. Bu radikaller, asetilen ile birleşerek termal ayrışmaya karşı daha dirençli ve daha yoğun aromatik yapılar oluşturur (Ravindra vd., 2008). PAH'ların yapısından pirosentez ile sırasıyla aromatikler>sikloolefinler>olefinler>parafinler meydana gelmektedir (Manahan, 1994).

PAH'lar, toksik, genotoksik, mutajenik ve/veya kanserojenik özellikleri, her yerde bulunmaları ve kalıcı olmalarından dolayı çevresel ve halk sağlığı üzerine kritik etkileri olan bir grup organik kirleticidir (Ghosal vd., 2016). PAH'ların on altı tanesi EPA

tarafından öncelikli kirleticiler olarak listelemiştir. Bu önceliklendirme, kirleticilerin insan sağlığı üzerindeki potansiyel risklerine ve çevredeki dağılımlarına dayanmaktadır. EPA tarafından öncelikli kirletici olarak belirlenen on altı PAH şunlardır; Naftalin (Nap), Asenaftalin (Acn), Asenaften (Act), Piren (Pyr), Floren (Fln), Fenantren (Phe), Antrasen (Ant), Floranten (Flt), Benzo[g,h,i]perilen (BghiP), Benz[a]antrasen (BaA), Krisen (Chr), Benzo[b]floranten (BbF), Benzo[k]floranten (BkF), Benzo[a]piren (BaP), İndeno[1,2,3-cd]piren (IcdP), Dibenzo[a,h]antrasen (DahA) (Environmental Protection Agency, 1999). Şekil 2.1'de on altı öncelikli PAH'ın molekül şekilleri verilmektedir.




**Şekil 2.1.** Öncelikli kirleticiler listesindeki 16 PAH'ın molekül yapısı

## 2.2. PAH'ların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

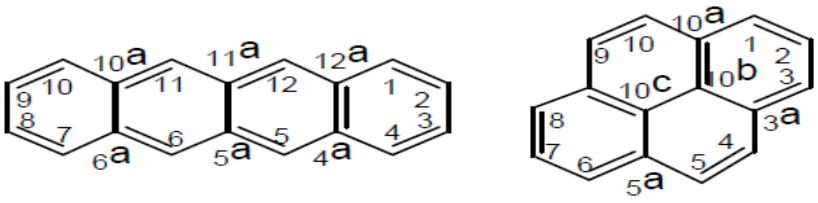
PAH'ların çoğu yüksek erime ve kaynama noktalarına sahiptirler. Tümü oda sıcaklığında katı formda bulunmaktadır (Esen, 2006). Görünümleri renksiz ya da beyaz, sarı ve yeşil renge doğru değişmekte olup, zayıf hoş kokuya sahiptirler. İki ila yedi adet benzen halkasından oluşan PAH'lar hidrofobik bileşiklerdir. Hidrofobik olmaları nedeniyle sudaki derişimleri oldukça düşüktür. PAH'ların yüksek elektrokimyasal kararlılığı ve sudaki düşük çözünürlükleri nedeniyle çevresel kalıcılıkları oldukça fazladır (Çıtak, 2006). Naftalin haricindeki PAH'lar düşük uçucu özellik göstermekte olup dayanıklıkları halka sayısındaki artışla doğru orantılıdır. Nitrasyon, sülfidasyon ve foto-oksidasyon gibi kimyasal reaksiyonlar, PAH bileşenlerinin yapısını farklı toksik

bileşiklere dönüştürebilir. Örneğin, belirli koşullar altında bazı PAH bileşikleri, nitrik asit varlığında nitro-PAH bileşiklerine dönüşebilmektedir (Gaga, 2004; Crimmins ve Baker, 2006). Aerobik sedimentte yarı ömürleri üç haftadan üç yüz haftaya kadar değişmektedir. Bu nedenle PAH'lar dayanıklı organik kirleticiler sınıfında gösterilmektedirler (Gaga, 2004). EPA'nın öncelikli kirleticiler listesindeki on beş PAH'a ait fiziksel ve kimyasal özellikler Çizelge 2.1'de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** PAH'lara ait fiziksel ve kimyasal özellikler (Arı, 2008)

| Bileşik | Formül | Molekül Kütlesi g/mol | Erime Noktası $^0$C | Kaynama Noktası $^0$C | Yoğunluk g/cm$^3$ | Çözünürlük 25$^0$C µg/L |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Nap | $C_{10}H_8$ | 128,2 | 80,3 | 218 | 1,14 | 31,6x10$^3$ |
| Acn | $C_{12}H_8$ | 152,2 | 92-93 | 265-275 | - | 3,93x10$^3$ |
| Act | $C_{12}H_{10}$ | 154,2 | 95 | 279 | 1,024 | 3,93x10$^3$ |
| Fln | $C_{13}H_{10}$ | 166,2 | 115-116 | 295 | 1,203 | 1,98x10$^3$ |
| Phe | $C_{14}H_{10}$ | 178,2 | 216,4 | 342 | 1,283 | 73 |
| Ant | $C_{14}H_{10}$ | 178,2 | 100,5 | 340 | 0,98 | 1,29x10$^3$ |
| Flt | $C_{16}H_{10}$ | 202,3 | 108,8 | 375 | 1,252 | 260 |
| Pyr | $C_{16}H_{10}$ | 202,3 | 150,4 | 393 | 1,271 | 135 |
| BaA | $C_{18}H_{12}$ | 228,3 | 253,8 | 448 | 1,274 | 2 |
| Chr | $C_{18}H_{12}$ | 228,3 | 160,7 | 400 | 1,226 | 14 |
| BbF | $C_{20}H_{12}$ | 252,3 | 168,3 | 481 | - | 1,2 (20$^0$C) |
| BkF | $C_{20}H_{12}$ | 252,3 | 215,7 | 480 | - | 0,76 |
| BaP | $C_{20}H_{12}$ | 252,3 | 178,1 | 496 | 1,351 | 3,8 |
| DahA | $C_{22}H_{12}$ | 276,3 | 278,3 | 545 | 1,329 | 0,26 |
| BghiP | $C_{22}H_{14}$ | 278,4 | 262 | - | 1,282 | 0,5 |
| IcdP | $C_{22}H_{12}$ | 276,3 | 163,6 | 536 | - | 62 |

Polisiklik halka sistemleri, üst halkanın en dıştaki karbonundan (bir sonraki halkayla paylaşılan karbona bitişik karbon) başlayarak saat yönünde numaralandırılır. Bir önceki karbonun numarasına harf eklenerek (a,b, vb.) isimlendirilmeye devam edilir. Formülün ortasında iç bölgede kalan ortak karbonlara isimlendirme yapılırken en son numara verilen karbonun numarasına b, c vb. harfler eklenerek devam edilir. Halkalar arasındaki ortak karbonlar (bağ karbonları) numaralandırılmaz. Şekil 2.2'de PAH'ların isimlendirilmesine örnekler verilmiştir (Bilgin, 1995).



**Şekil 2.2.** PAH'ların nomenklatürü

### 2.3. PAH'ların Kaynakları

PAH'ların oluşumları hareketli ve sabit olmak üzere iki kaynaktan beslenmektedir. Alüminyum, demir, çelik ve kok üretimi, asfalt üretimi ve kullanımı, petrol prosesi, ısı ve güç üretimi, evsel ısınma, çöplerin yakılması, sedimentlerden yayılan doğal petrol ürünleri, kirlenmiş şehir havası, volkanik patlamalar, orman ve tarımsal yangınlar sabit kaynakları oluşturmaktadır (Esen, 2006; Ma vd., 2001; Schneider vd., 2001). Kış mevsiminde evsel ısıtma ve yakıt tüketiminin fazlalaşması, PAH derişimlerinin artışına katkıda bulunur (Callen vd., 2014). Kış aylarındaki konsantrasyonun, yaz aylarındaki konsantrasyondan yaklaşık beş ila on kat daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Grimmer vd., 1981; ATSDR, 1995). Bununla birlikte gelişmekte olan ülkelerde yemek pişirmek için kullanılan tezek, odun ve bitki artıklarının da önemli ölçüde emisyona sebebiyet verdiği tespit edilmiştir. WHO'nun (Dünya Sağlık Örgütü) hazırladığı raporda Hindistan, Çin, Afrika, Güneydoğu Asya ülkeleri ile Güney Amerika'da nüfusun %50-75'inin günlük pişirme işlemlerinde katı yakıt kullandığı aktarılmıştır (European Communities, 2002).

Garaj, mutfak ve bina çatılarındaki havada PAH miktarları karşılaştırıldığında en yüksek PAH seviyelerinin garaj>mutfak>çatı olduğu bildirilmiştir. Tespit edilen PAH'ların ise Phe ve Nap olduğu Nap oranının ise daha yüksek olduğu ileri sürülmüştür (Martins vd., 2013). PAH'lar ham petrol, katran ruhu, çatı örtüsü olarak kullanılan

katranlarda, boya ve plastik yapımında, çok az miktarda ilaçlarda, ve zirai tarım ilaçların üretiminde kullanılmaktadır. Kişisel maruziyet için sigara dumanı önemli bir kaynaktır. Yakın zamanda yapılan bir çalışma, ABD'de (Amerika Birleşik Devleri) satılan otuz sigara markasının PAH düzeylerini belirlenmiştir. Tespit edilen on dört PAH'ın deney hayvanlarında ya yeterli ya da sınırlı kanserojenik etkisine dair kanıt vardır. Kişisel kullanım ile temas edilen toplam PAH seviyeleri sigara başına 1-1,6 µg arasında değişmektedir. İç mekan havasında duman maruziyeti de bir PAH kaynağıdır; duman maruziyetindeki BaP seviyelerinin sigara başına 52-95 ng arasında değiştiği rapor edilmiştir. Bu kişisel içilen sigara dumanından üç katından fazladır (Vardar vd., 2004; IARC, 2010). Otomobil, kamyon, motorsiklet, uçak, tren vb. olmak üzere tüm ulaşım araçları PAH'ların kaynağını oluşturmaktadır. Hareketli kaynaklardan kaynaklı PAH emisyonları motor tipine, emisyon kontrol sistemine, yüke, yakıta, yaşa ve sürüş moduna göre değişmektedir. Ulaşım sebepli PAH kirliliği geniş bir alanda, yer seviyesinde ve yerleşim bölgelerinde yoğunlaştığından kontrolü oldukça zordur (World Health Organization, 2002). PAH'lara ait emisyon kaynakları ve miktarları WHO'nun Uluslararası Kimyasal Güvenlik Programı (IPCS) tarafından çevresel sağlık kriterleri çizelgesinde gözden geçirilmiştir. IPCS monogramındaki bazı emisyonlar çizelge 2.2'de verilmiştir (World Health Organization, 1998).

**Çizelge 2.2.** PAH'ların emisyon kaynakları ve yıllık miktarları

| Emisyon Kaynağı | Tipik Emisyonlar/ Profilleri |
|---|---|
| Fosil yakıt kullanan elektrik santrali | Nap: Phe ve türevleri PAH'ların %69-92<br>Nap: PAH'ların %31-25<br>BaP: 0,02 mg/kg yanmış kömür<br>BaP: 0,1 t/yıl (Almanya)<br>PAH: 0,1 t/yıl (Norveç)<br>PAH: 11 t/yıl (Kanada) |
| Katı atık yakma | BaP: 0,001 t/yıl (Almanya)<br>PAH: 50 t/yıl (ABD)<br>PAH: 2,4 t/yıl (Kanada) |
| Demir çelik üretimi | PAH: 34 t/yıl (Norveç)<br>PAH: 19 t/yıl (Kanada) |
| Dökümhane | PAH: 1,3 t/yıl (Hollanda) |
| Sinterleme | PAH: 1,3 t/yıl (Hollanda) |

Orman yangınları ve volkanik patlamalar PAH'ların doğal kaynaklarıdır. Harrison ve arkadaşları (1996) bazı PAH'ların kaynak işaretleyici olduklarını ileri sürmüşlerdir;

1. BghiP ve Phe motorlu araç emisyonları için işaretleyicidir.
2. Chr ve BkF kömür yakımı için işaretleyicidir.
3. Pyr, Flt ve Phe katı atık yakılmasına dair işaretleyicilerdir.
4. Phe, Flt ve Pyr ulaşım araçlarından kaynaklanan uçucu PAH'ların kış aylarında kullanılan tuzlar üzerinde adsorplanması ile işaretleyici olmaktadır.

Literatürde Acn, Flt, Pyr, DahA, BkF, IcdP'nin trafikten kaynaklanan iz PAH'lar olduğu tespit edilmiştir. Benzin ve dizel yanmasının varlığını BghiP göstermektedir. Act'nin, tanklardan, yanmamış fosil yakıtların buharlaştırılması ve/veya rafine edilmesi yoluyla ortaya çıktığı bilinmektedir (Fang vd., 2003; Pekey vd., 2007). Hem Act hem Ant, petrokimya tesislerinde üretilen siyah karbon bileşiklerinin iz PAH'ları olarak bilinmektedir. BbF, Phe ve DahA gibi PAH bileşikleri yağların yanma proseslerinden açığa çıkmaktadır. Ayrıca DahA LPG (Likit Petrol Gazı) yanma proseslerinden de oluşmaktadır (Pekey vd., 2007).

Sebze ve meyveler, PAH ile kirlenmiş toprakta büyümeleri ve atmosferik birikme yoluyla kontamine olabilirler. Dünyanın en popüler iki içeceği olan çay ve kahve de ham bitkiler üzerinde atmosferik birikme, endüstriyel kurutma/kavurma işlemleri ve hazırlama aşamasındaki ısıtma adımları yoluyla PAH kirliliğine maruz kalmaktadırlar. On sekiz marka çay ve on üç marka kahvede Chr, BaP, BaAn, BbF varlığını araştırılmış siyah çayda 25–115 μg/kg ve hazır kahvede 2,2–5,1 μg/kg tespit edilmiştir. Alman Çevre Ajansı'nın raporuna göre, oyuncaklar, banyo ayakkabıları, bisiklet sapları, birçok spor malzemesi vb. ürünlerin kullanımında PAH'lar bulunmaktadır. Kauçuktan ve polivinil klorürden (PVC) yapılan ürünlerde istenilen yumuşaklık ve esneklik PAH'ları uzatan katran yağları, dolgu yağları ve endüstriyel kurumlar kullanılarak elde edilir. PVC banyo terliklerinde on altı PAH'ın toplam miktarı 546 mg/kg tespit edilmiştir. Flr ve Phe seviyeleri sırasıyla 170 ve 120 mg/kg ile en yüksek seviyedeydir. Gazete mürekkebinde sırasıyla 52, 553, 778 ve 283 μg/kg seviyelerine kadar BaP, Pyr, Phe ve Nap tespit edilmiştir. Toksik etkileri olmasına rağmen PAH'lar, günlük olarak kullanılabilir ürünlerde bulunmaları nedeniyle yaşam için kaçınılmazdırlar (Patel vd., 2020).

Yapılan çeşitli izleme çalışmaları incelendiğinde, kentsel havadaki PAH konsantrasyonlarının kırsal havaya göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Şehir havasındaki PAH konsantrasyonu, kırsal alandakinden yaklaşık üç ila beş kat daha yüksektir. Çizelge 2.3'te atmosfer ve sudaki PAH kirliliği kaynakları ve miktarları verilmiştir (Köseler, 2008).

**Çizelge 2.3.** Atmosfer ve sudaki önemli PAH kaynakları ve miktarları

| Ekosistem ve Kaynakları | Yıllık Girdi (metrik ton) |
|---|---|
| *Atmosfer* | |
| *Toplam PAH* | |
| Orman yangınları | 19513 |
| Tarım alanı yangını | 13009 |
| Atık yakma | 4769 |
| Kapalı yanma | 3902 |
| Isınma ve güç | 2168 |
| *Benzo[a]piren* | |
| *Isınma ve güç* | |
| Dünya genelinde | 2604 |
| ABD | 475 |
| *Kok üretimi* | |
| Dünya genelinde | 1045 |
| ABD | 198 |
| *Atık yakma ve açık yanma* | |
| Dünya genelinde | 1350 |
| ABD | 588 |
| *Motorlu taşıtlar* | |
| Dünya genelinde | 45 |
| ABD | 22 |
| *Su* | |
| *Toplam PAH* | |
| Petrol dökülmesi | 170000 |
| Atmosferik birikim | 50000 |
| Atıksular | 4400 |
| Yüzeysel süzüntü suları | 2940 |
| Biyosentez | 2700 |
| Toplam Benzo[a]piren | 700 |

## 2.4. PAH'ların Hava, Su ve Topraktaki Döngüsü

Emisyon sonucu atmosfere ulaşan PAH'lar uzun ve kısa mesafe taşınımlarla kaynaklarından daha uzak yerlere ulaşabilirler. Atmosferden kuru ve yaş çökelme mekanizmaları ile toprakta, suda ve bitkilerde birikme yaparlar. Yüzey sularında, PAH'lar buharlaşma, fotodegradasyon, oksidasyon, biyolojik bozunma, partiküllere adsorpsiyon ve suda yaşayan organizmaların absorpsiyonu gibi olaylarla giderilirler. Sedimentlerde biriken PAH'lar yine biyolojik bozunma ve suda yaşayan organizmalar tarafından absorpsiyon yoluyla giderilirler. PAH'lar topraktada benzer şekilde buharlaşma, fotodegradasyon, oksidasyon, biyolojik bozunma ve bitkilerde birikme olaylarıyla giderilirler. Bunlara ek olarak topraktaki PAH'lar yeraltı sularına sızarak akiferler yoluyla çeşitli mesafelere taşınabilir (Arı, 2008).

PAH'ların kimyasal, fotokimyasal ve biyolojik parçalanmaları sonucunda ketonlar, kinonlar, dikarboksillik asit anhidritler, fenoller, karboksilik asitler ve kumarinler gibi bileşikler son ürün olarak ortaya çıkmaktadır (Kılıç, 2012). Karbonil bileşikleri yüksek kararlılıklarından dolayı hidroksil veya karboksil bileşiklerine oranla çevre örneklerinde daha yaygın olarak bulunmaktadırlar (Lundstedt, 2003). PAH'ların karbonil türevleri genellikle oksi-PAH'lar olarak da adlandırılırlar ve birçoğu toksik ve mutajenik özellik göstermektedirler (Pilar vd., 1992, Brooks vd., 1998). PAH'ların bir diğer bozunma ürünü ise nitro-PAH'lardır ve özellikle atmosferde gaz fazında ve partiküllerde yaygın olarak bulunurlar. Nitro-PAH'lar taşıt egzozlarıyla doğrudan atmosfere taşınabildikleri gibi PAH'lardan fotokimyasal reaksiyonlar sonucunda da oluşurlar. Özellikle PAH'ların gündüzleri hidroksil radikalleri, geceleri ise nitrat radikalleri ile reaksiyonları sonucunda meydana gelirler. 9-nitroantrasen ve 2-nitrofloranten atmosferde bulunan en yaygın ve en yüksek derişme sahip nitro-PAH'lardır. Nitro-PAH'lar yüksek kanserojen ve mutajenik etkiye sahiptirler (Çabuk, 2009).

Tüm PAH kaynaklarından sucul ortama giren toplam PAH ve BaP miktarı, atmosfere girenden önemli ölçüde daha azdır. PAH'lar dünyadaki mevcut tüm tatlı su ve tuzlu su ortamlarına eşit olarak dağılmış olsaydı, konsantrasyonları belirlenemeyecek kadar düşük seviyede olurdu. PAH'lara ait yükün çoğu PAH'ların ortaya çıkış kaynağının yakınında bulunurlar. Konsantrasyonları kaynaktan uzaklaştıkça logaritmik olarak

azaldığından PAH'lar sucul ortamda eşit dağılamamaktadır. Bu sebeple PAH'ların sucul ortama girişi koylar, deniz ve yüzeysel sular ile sınırlıdır. PAH'lar, suda yaşayan organizmaların vücudunda kolayca birikerek canlı bünyesinde sucul ortamdan daha yüksek derişimlere ulaşırlar. Sucul ortamda PAH'lar miktar olarak, en çok sedimentlerde daha sonra su canlılarında ve en düşük su kütlesinde bulunurlar. Birçok çalışma suda yaşayan organizmaların dokularında PAH'ların özellikle de BaP'ın bulunduğunu ortaya koymuştur (Kurnaz ve Büyükgüngör, 2007).

### 2.5. PAH'ların İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

PAH'lar vücuttaki çeşitli organlara, özellikle deri, akciğerler ve mesaneye zarar verebilir. Hayvanlar üzerinde yapılan bilimsel çalışmalar, mutajenik ve kanserojenik özelliklerinin yanı sıra çeşitli toksik etkilerini de ortaya çıkarmıştır. PAH'ların hayvanlara solunum yoluyla, besinlerle ya da uzun süreli derilerine temas ettirildiğinde vücutlarında tümör oluştuğu belirlenmiştir (Castellano vd., 2003).

İnsanlar birçok sebeple PAH'lara maruz kalabilmektedirler. Endüstriyel faaliyetlerin ve evsel ısınmanın yoğun olduğu bölgelerdeki ortam havasının solunması, sigara kullanımı, taşıt egzozlarının solunması, kızartılan ve ızgarada pişirilen etlerin yenmesi, yoğun taşıt trafiğinin olan bölgelerde yetiştirilen meyve ve sebzelerin tüketilmesi, kurum, zift ve katran gibi petrol ve kömür kaynaklı ürünlerin cilde temas etmesi başlıca maruz kalma yollarıdır. Maruz kalınan PAH'larla insan vücudundaki oluşan tümörlerin ilişkisinin olduğu bilinmektedir (Boffetta vd., 1997; Boström vd., 2002; Armstrong vd., 2004). Çizelge 2.4'te PAH'ların EPA, WHO ve Ulusalarası Kanser Ajansına göre sınıflandırılması verilmiştir. Çizelgede 2.4'te belirtilen Ulusalarası Kanser Ajansına göre PAH'ların hayvanlarda kanserojen olduklarına dair yeterli kanıt olmayanlar (I), limitli kanıt olanlar (L), yeterli kanıt bulunanlar (S) ile gösterilmiştir. 3 numara ile gösterilen PAH'lar kanserojen sınıflandırılmayan, 2A ve 2B grubu PAH'lar ise muhtemel ve şüpheli kanserojen etkiye sahip PAH'lar olarak tanımlanmaktadır. WHO'ya göre (+/-) ile gösterilen PAH'lar kanserojenlik açısından şüpheli (-) ile gösterilenler negatif, (+) gösterilenler ile pozitiftir. EPA'ya göre kanserojen PAH'lar (✓) işareti ile gösterilmiştir (Çabuk, 2009).

**Çizelge 2.4.** PAH'ların kansorejen özelliklerine göre sınıflandırılması

| Bileşik | Halka sayısı | EPA | Hayvanlar | İnsanlar | WHO |
|---|---|---|---|---|---|
| Naftalin | 2 | ✓ | S | 2B | (+/-) |
| Asenaftalin | 3 | ✓ | | | |
| Asenaften | 3 | ✓ | | | (+/-) |
| Floren | 3 | ✓ | I | 3 | (-) |
| Antrasen | 3 | ✓ | I | 3 | (-) |
| Fenantren | 3 | ✓ | I | 3 | (+/-) |
| Floranten | 4 | ✓ | I | 3 | (+) |
| Piren | 4 | ✓ | I | 3 | (+/-) |
| Krisen | 4 | ✓ | L | 3 | (+) |
| Benzo[a]antrasen | 4 | ✓ | S | 2A | (+) |
| Benzo[b]florenten | 5 | ✓ | S | 2B | (+) |
| Benzo[k]florenten | 5 | ✓ | S | 2B | (+) |
| Benzo[a]piren | 5 | ✓ | S | 2A | (+) |
| Benzo[g,h,i]perilen | 6 | ✓ | I | 3 | (-) |
| Dibenzo[a,h]antrasen | 5 | ✓ | S | 2A | (+) |
| İndeno[1,2,3-cd]piren | 6 | ✓ | S | 2B | (+) |

PAH'lar tümör başlatma, geliştirme ve ilerletme özelliklerine sahip bileşiklerdir. Hamile farelerin yüksek seviyede BaP'a maruziyeti sonucu doğuma dair zorluklar görülmüş, fare yavrularında doğum anomolileri, düşük kiloda doğum gibi problemler tespit edilmiştir. BaP'a maruz kalan hayvanlarda kısa süre sonrasında iç organlarında tespit edilebilir düzeyde BaP konsantrasyonu görülmüştür. Karaciğer en yüksek BaP derişimin görüldüğü organdır. Adipoz doku PAH'lar için önemli bir depolama alanıdır, ancak hızlı metabolizmaları nedeniyle depolanma özellikleri görülmemiştir (Güler, 2020). Diğer PAH'ların çoğu için daha az bilgi bulunmasına rağmen, BaP toksikolojik olarak iyi karakterize edilmiş ve solunum sağlığı tehlikeleri genellikle BaP'a göre hesaplanarak bulunmuştur (Lodovici vd., 2003).

## 2.6. PAH'ların Karsinojenik Potansiyelleri

PAH'lar kanserojenik olarak yüksek bir potansiyele sahip olan bileşik grubudur. Gruba dahil her PAH farklı potansiyele sahiptir. Laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar ve kanser testlerinden elde edilen sonuçlar esas alınarak PAH'lar için toksik eşdeğerlik faktörü (TEF) değerleri hesaplanmıştır. Hesaplama yapılırken benzo[a]pirenin TEF değeri bir kabul edilmiş ve diğer PAH'ların TEF değerleri benzo[a]pirene kıyaslama yapılarak hesaplanmıştır. PAH'lar için farklı bilim insanları ve EPA tarafından hesaplanan TEF değerleri Çizelge 2.5'te verilmiştir.

**Çizelge 2.5**. PAH'ların hesaplanan TEF değerleri

| | **Nisbet ve Lagoy (1992)** | **Larsen ve Larsen (1998)** | **EPA (1993)** |
|---|---|---|---|
| Nap | 0,001 | - | - |
| Ace | 0,001 | - | - |
| Fln | 0,001 | 0,0005 | - |
| Phe | 0,001 | 0,0005 | - |
| Ant | 0,01 | 0,0005 | - |
| Pyr | 0,001 | 0,001 | - |
| Flt | 0,001 | 0,005 | - |
| BaA | 0,1 | 0,005 | - |
| Chr | 0,01 | 0,03 | 0,1 |
| BbF | 0,1 | 0,1 | 0,001 |
| BkF | 0,1 | 0,05 | 0,1 |
| BaP | 1 | 1 | 1 |
| DahA | 5 | 1,1 | 1 |
| IcdP | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| BghiP | 0,01 | 0,02 | - |

Genellikle PAH'ların kanserojenik potansiyelleri, ölçülen PAH derişimlerinin TEF değerleri ile çarpılmasıyla hesaplanmakta olup Benzo(a)piren ekivalent (BaPE) konsantrasyonlar olarak ifade edilmektedir. TEF değerleri özellikle atmosferdeki PAH'ların kanserojen potansiyellerinin hesaplanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Atmosferdeki PAH'ların toplam kanserojen potansiyeline en büyük katkıyı yüksek TEF değerinden dolayı BaP yapmaktadır. Düşük TEF değerlerinden dolayı, BbF ve IcdP gibi atmosferde yüksek konsantrasyonlarda bulunan PAH'ların, toplam kanserojen potansiyeline katkıları düşüktür. Atmosferde çok düşük konsantrasyonlarda bulunmasına rağmen DahA'nin, yüksek TEF değerine sahip olmasından dolayı toplam kanserojen potansiyele katkısı yüksektir (Çabuk, 2009).

## 2.7. PAH'ların Analiz Yöntemleri

PAH'lar bugün hemen hemen her yerde bulunmaktadırlar. Bu nedenle, bu kirleticileri tanımlamak için uygun analitik yöntemler kullanılmalı ve bunları ortamdan uzaklaştırmak için adımlar atılmalıdır (Quiroz vd., 2005). Çevre, gıda ve biyolojik örneklerde bulunan PAH'ların miktarları gaz kromatografi (GC), yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) ve misel elektrokinetik kromatografi gibi yüksek hassasiyete sahip analitik cihazlarla tayin edilebilmektedir. PAH'ların GC ile tespitinde detektör olarak alev iyonlaşmalı dedektör (FID) ya da kütle spektrometresi (MS) kullanılmaktadır. HPLC ile analizlerinde ise genelde ultraviyole (UV), foto diyot dizisi (PDA), floresans dedektörü (FL) ve MS detektörler kullanılmaktadır (Aygün ve Özcimder, 1996).

Gaz kromatografisi, yüksek ayırma gücüne, geniş konsantrasyon aralığında analiz, yüksek hassasiyet ve doğru sonuçlar elde etme gibi avantajlara sahip geliştirilen ilk kromatografik ayırma tekniklerinden biridir ve halen geniş bir kullanım alanı mevcuttur (Poster vd., 2006). GC teknolojisi 1960'ların başında PAH'ların analizi için kullanılmış olup hızla gelişen teknoloji sayesinde bu bileşikler için standart analiz tekniği olarak kabul edilmiştir (Lee, 2001). HPLC tekniği GC'ye alternatif olarak, gaz faza geçmesi için yüksek sıcaklık gerektiren ve yüksek sıcaklıkla degradasyona uğrayan PAH'ların analizleri için kullanılmaktadır ( De Boer ve Law, 2003). Sıvı kromatografide PAH'ları analiz etmek için en çok kullanılan dedektörler UV ve FL dedektörlerdir. PAH'ların absorpsiyon yapabilme özellikleri çok geniş dalga boyu aralığında olduğundan, programlanabilir dalga boylarına sahip UV dedektörleri bu bileşiklerin analizi için daha uygundur (Çabuk, 2009). Fakat literatürdeki çalışmalar, FL dedektörlerinin PAH'ların belirlenmesindeki hassasiyet ve seçiciliğinin UV dedektörlerinden çok daha yüksek olduğunu göstermiştir (Chen vd., 1996; Villar vd., 2004, Moreno vd., 2007).

Kromatografik analizde, analiz edilecek numunedeki analitler genellikle doğrudan cihaza yüklenemeyecek kadar küçüktür ve ön saflaştırma, zenginleştirme veya yoğunlaştırma gibi ön işleme tabi tutulmaları gerekmektedir. Analitik performansı iyileştirmek için yapılan ön hazırlık yöntemleri arasında SPE, sıvı sıvı ekstraksiyon

(LLE), iyon değiştirme ve birlikte çöktürme gibi yöntemler yaygın şekilde kullanılmaktadırlar (Yılmaz, 2017).

PAH'lar özellikle sularda eser miktarda bulunduğundan, numune alma ve numune çalışmasında kullanılacak tüm cam eşyalarda olası hidrokarbon kontaminasyonunu engellemek için kullanımdan önce sterilize edilmesi gerekmektedir. PAH'lar hem güneşten gelen UV ışığı ile hem de mikroorganizmalar tarafından bozunabilirler. Bu nedenle hedef bileşiklerin doğru bir şekilde analizde PAH'ların kaybını önlemek için bazı önlemler alınmalıdır. Güneşten gelen UV ışığının bir sonucu olarak analit kaybını önlemek için amber renkli numune şişelerinin kullanılması veya şeffaf şişeler kullanılacaksa alüminyum folyo ile kaplanması tavsiye edilmektedir. Analitlerin mikrobiyal bozunmasının önlenmesi de için, toplama noktasında asitlenmesi ve analiz süresine kadar düşük bir sıcaklıkta saklanmasıyla sağlanabilir (Nollet, 2007).

### 2.8. Ekstraksiyon

Son yıllarda hızlı, doğru, kesin ve hassas analiz metotlarının geliştirilmesi önemli bir konu haline gelmiştir. Biyolojik, çevre ve farmasötik numunelerin analitlerinin son nokta tespiti için yüksek verimli analitik cihazlar geliştirilmesine rağmen, karmaşık matrikslerden analitlerini ekstrakte etmek, izole etmek ve konsantre hale getirmek için genellikle numune ön işlemi gerekli olmaktadır. Çünkü çoğu analitik cihaz, matriksi doğrudan işleyememektedir (Sarafraz-Yazdi ve Amiri, 2010).

Mikrokirleticiler asitler, bazlar, tuzlar, proteinler ve analitlere benzer özelliklere sahip diğer organik bileşikleri de içerebilirler. Ek olarak, bu karmaşık matrikslerdeki analitler genellikle düşük konsantrasyonlarda var olmaktadırlar. Bu nedenle, numune hazırlığı yapılırken, analitin iyi bir verimle geri kazanılması, numune kaybının minimumda tutulması, kromatografi ve elektroforez sistemlerde problem oluşmaması, prosedürün rahat ve hızlı bir şekilde gerçekleştirilmesi ve analiz maliyetinin minimumda tutulması gerekmektedir. Numune hazırlamadaki son eğilimler arasında minyatürleştirme, otomasyon, yüksek verimli performans, analitik cihazlarla çevrimiçi eşleştirme gibi son derece az solvent tüketimi olan veya hiç solvent tüketimi olmayan düşük maliyetli çalışmalar bulunmaktadır (Kataoka, 2010).

### 2.8.1. Sıvı sıvı ekstraksiyon

LLE karmaşık matriks kompozisyonlu sulu numunelerde en yaygın kullanılan en eski tekniklerinden biridir. Teknik, aynı numunenin bir çözücünün taze kısımlarıyla veya artan polariteye sahip bir dizi çözücüyle ardışık olarak işlenmesine dayanır. Son basamakta hedef analit veya bir grup analit ile zenginleştirilmiş çeşitli ekstrakt fraksiyonları elde edilir. Bununla birlikte, çok aşamalı analitik prosedürler oldukça zaman alıcı ve yoğun emek gerektirir. Bunun sonucunda analiz sorumlusunun toksik inhalasyonlara maruz kalmasına neden olur. Ayrıca aynı numune üzerinde gerçekleştirilen işlemlerin sayısının artmasıyla analit kaybı veya numune kontaminasyonu riski de artar. LLE tekniği otomasyona kolay kolay uyum sağlamamaktadır. Bu nedenle, alternatif pro-ekolojik, otomatikleştirilmiş, solvent içermeyen ekstraksiyon teknikleri veya minimum miktarda solvent kullanan teknikler güvenli ve toksik olmayan ekstraktantlar (iyonik sıvılar, süperkritik sıvılar, yüzey aktif madde çözeltiler, supramoleküler çözücüler) son yıllarda analitik kimyada en popüler araştırma konularından biri haline gelmiştir (Akçelik, 2021).

### 2.8.2. Katı faz ekstraksiyonu (SPE)

Katı faz ekstraksiyon (SPE) 1970'lerin ortalarında LLE'ye alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu tekniğin esası, farklı adsorban maddelerin küçük, tek kullanımlık ekstraksiyon kolonlarına doldurularak pratik bir şekilde numunenin hazırlanmasıdır. SPE günümüzde etkili bir numune hazırlama yöntemi olarak laboratuvarlarda hali hazırda kullanılmaktadır. SPE metodu, klasik LLE ile kıyaslandığında daha hızlı, az kimyasal kullanılan ve maliyet açısından daha uygun bir tekniktir. Bununla birlikte SPE ile daha temiz ekstrakt ve daha yüksek geri kazanımlar elde edilebilmektedir (Yavuz ve Aksoy, 2006). SPE yönteminin esası sıvı numunenin hedef analitini tutan bir adsorban madde içeren kartuş, kolon veya diskin içinden geçirilmesidir. Numunenin tamamı adsorban içerisinden geçirildikten sonra kartuşta ya da kolonda tutunan analit uygun bir çözücü ile sıyrılır ve analizi gerçekleştirilir (Altundağ, 2007).

SPE tekniği dört basamaktan oluşmaktadır;

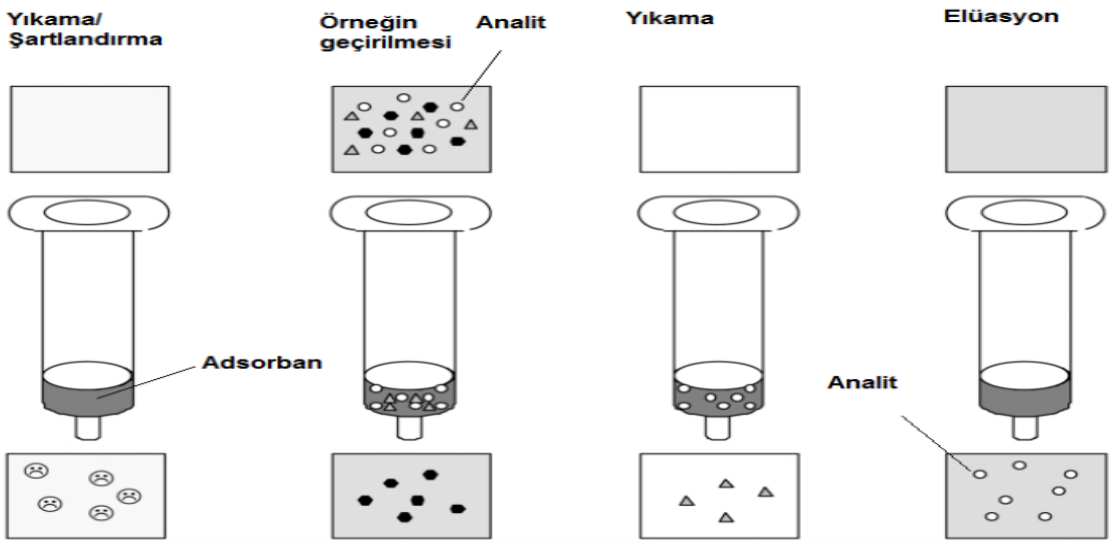
1) Şartlandırma: Bu aşamada şartlandırma yapılmadan önce adsorbent, kolonda başlangıçta bulunabilecek safsızlıkları uzaklaştırmak ve hava boşluklarını doldurmak için uygun bir çözücü ile yıkama işlemine tabi tutulmaktadır. Daha sonra şartlandırma

yapılmaktadır. Bu işlemde, kolon ya da kartuştan uygun çözücüler geçirilerek adsorbent aktif hale getirilir. Böylece matriksteki analitler ile etkileşim için gerekli ortam sağlanır. Apolar adsorbentler, polar çözücüler ile polar adsorbentler ise apolar çözücülerle şartlandırılmaktadır (Yavuz ve Aksoy, 2006).

2) Yükleme: Bu aşamada ise numune katı fazdan geçirilerek, analitin katı faz üzerine adsorpsiyonu sağlanır. Numune, yer çekimi kuvvetiyle ya da peristaltik pompa ile kartuştan geçirilebilmektedir. Bazı durumlarda, katı faza adsorbe olan analit ile birlikte istenmeyen matriks bileşenleri de tutunabilir (Çakır, 2015). Yükleme çözeltisinin kartuştan geçiş hızı, analitlerin adsorbente tutunmasını sağlayacak ancak analiz süresinin uzamasına sebep olmayacak şekilde ayarlanmalıdır.

3) Yıkama: Analitin kolona yerleşmesini ve matriks bileşenlerinden ayrılmasını sağlamak için yapılan işlemdir. Burada dikkat edilmesi gereken en önemli nokta kullanılan çözücü, analiti etkilememeli ve matriks bileşenlerini önemli ölçüde kolondan uzaklaştırılmalıdır (Şahinbaş, 2011).

4) Geri Alma: Katı faz üzerine adsorplanan analitin, uygun bir elüent ile kartuştan sıyrılıp daha küçük hacme alınmasıdır. Analitin miktarına göre yüksek kazanım verimi elde etmek için elüentin hacmi ve akış hızı da ayarlanmalıdır. Şekilde 2.3'te SPE basamakları verilmiştir.




**Şekil 2.3.** SPE Basamakları (Camel, 2003)

### 2.9. SPE'nin Sınıflandırılması

SPE metodu numuneye ve amaca bağlı olarak üç farklı şekilde sınıflandırılabilir;

a) Çalkalama (batch) yöntemi

b) Süzme (membran) yöntemi

c) Kolon yöntemi (Mihaljevcic vd., 2004).

#### 2.9.1 Çalkalama (batch) tekniği

Analizi yapılacak analitin içinde bulunduğu örneğe adsorban madde eklenerek, sorpsiyon dengesine ulaşana kadar belirli bir süre, hızlı bir şekilde birlikte çalkalama yöntemidir. Çalkalama işlemi mekanik olarak ya da ultrasonik sistemler ile de yapılabilir. Tutunmaya ait denge sağlandıktan sonra adsorban örnekten süzme veya dekantasyon yöntemleri ile ayrımı sağlanır. Adsorban madde üzerinde tutulan hedef analit az miktarda organik ya da inorganik çözücü ile geri alınarak analiz gerçekleştirilir (Karatepe, 2006).

#### 2.9.2. Süzme tekniği

Yüksek tutunma hızına ve büyük dağılma katsayısına sahip elementlerde uygulanabilen bu metotta analite ait numune tutucu özelliği olan bir diskten süzülür ve daha sonra diskte tutunmuş olan elementler uygun bir elüent ile sıyrılarak analiz gerçekleştirilir (Soylak vd., 2010).

#### 2.9.3. Kolon Tekniği

SPE tekniğinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin esasında 10-15 cm uzunluğunda, 0.5-1 cm çapında üzerinde huni şeklinde musluk bulunan mini kolonlar kullanılır. Bu kolonlara 0.1-0.8 g adsorban doldurularak analitlerin tutulması beklenir. Kolondan numune geçirilmeden önce, uygun miktarda numune matriksine benzer özellikte bir çözücünün geçirilerek kolon şartlandırılması gerekmektedir. Adsorban üzerinde tutunmuş girişim yapabilecek ya da kirlilik oluşturacak maddeler mevcutsa yalnız bu kirlilikleri çözecek bir çözücü kullanılarak, yıkama yapılır ve ortamdan uzaklaştırılması sağlanır. Katı faz üzerinde tutunan analit, kolondan uygun bir çözücünün geçirilmesi ile sıyrılır böylece numune hacminden daha küçük bir hacime deriştirildikten sonra analiz edilir (Kaya, 2014). SPE prosedürlerinde, adsorban seçimi,

analitlerin daha yüksek zenginleştirme verimliliği elde etmek için önemli bir faktördür (Zhou vd., 2006). Çizelge 2.6.'da SPE adsorban çeşitleri verilmiştir.

**Çizelge 2.6.** SPE adsorbanları

| Kolon dolgu maddeler | Formül |
|---|---|
| Karboksilik Asit | -COOH |
| Silika Jel | SiOH |
| Aromatik Sülfonik Asit | $-C_6H_5SO_3H$ |
| Alümina | $Al_2O_3$ |
| Kuarternet Amin | $N^+(CH_3)_3$ |
| Florisil | $MgSiO_3$ |
| Diol | -COHCOH |
| Oktadesil ($C_{18}$) | $-(CH2)_{17}CH_3$ |
| Amino | -NH2 |
| Oktil ($C_8$) | $-(CH2)_7CH_3$ |
| Siklohekzil | $-C_6H_{11}$ |
| Etil | $-CH_2CH_3$ |
| Fenil | $-C_6H_5$ |
| Siyano | -CN |

SPE metodundaki adsorban maddelerin geliştirilmesi ile oldukça geniş bir polarite aralığındaki maddelerin ayrımı kolaylıkla yapılabilmektedir. Yeni adsorbanlar arasında bulunan C 18 (Karbon 18) silika ve türevlerinde, silika yüzeyindeki modifiye olmamış silanol grupları artırılmıştır. Bunun sayesinde numune ile oluşabilecek ikincil etkileşimlerin azaltılması ve hedef analite dair seçiciliğin arttırılması sağlanmıştır. Su numunelerine ait analizlerde karşılaşılan polaritenin neden olduğu ekstraksiyon problemleri ise karbon temelli ve stiren divinil benzen (SDVB) gibi yeni adsorbanlar kullanılarak azaltılması hedeflenmiştir. Yeni adsorbanlarla ilgili en önemli sorun, şartlandırma gerekliliği ve şartlandırma çözeltisiyle tam olarak yıkamanın gerçekleşmemesidir. Yeni teknoloji polimerik tutucuların şartlandırılması gerekmemektedir. Bu adsorbanlar ile aynı tip kolon yardımıyla asidik, bazik, nötral, lipofilik ve hidrofilik özellikteki birçok maddenin ekstraksiyonu yapılabilmektedir. Çizelge 2.7'de Önemli SPE adsorbanlarının kullanıldığı analiz uygulamaları verilmiştir.

**Çizelge 2.7.** Önemli SPE adsorbanları ve analiz uygulamaları (Yavuz ve Aksoy, 2006)

| Dolgu maddesi | Uygulama |
|---|---|
| Oktadesil ($C_{18}$) | **Polar olmayan bileşiklerin ters faz ekstraksiyonu**: asetaminofen, aminler, analjezikler, antiaritmikler, antikonvülzanlar, antiepileptikler, antibiyotikler, aromatikler, barbitüratlar, benzodiazepinler, kafein, karbonhidratlar, karboksilik asit, karotenoidler, kolesterol esterleri, esansiyel yağlar, yağ asitleri, gıda koruyucular, fungisitler, hidrokarbonlar, hipnotikler, lidokain, yağlar, suda eriyen vitaminler, fenoller, fitalat esterleri, pestisitler, PAH'lar, sedatifler, steroidler, sülfonamidler, yüzey gerilim düşürücüler, tetrasiklinler, teofilin, trisiklik antidepresanlar, trigliseridler |
| Oktil ($C_8$) | **Orta derece polarbileşiklerin ters faz ekstraksiyonu:** PAH'lar, pestisitler ve oktadesil tarafında güçlü tutulan bileşikler |
| Fenil ($-C_6H_5$) | **Polar olmayan bileşiklerin ters faz ekstraksiyonu:** az tutulan hidrofobik bileşkler. |
| Siyano | **Polar bileşiklerin normal faz ekstraksiyonu:** Aminler, benzil alkol, suda eriyen vitaminler, PAH'lar, pestisitler, fenoller, şeker alkolleri |
| Silika Jel | **Polar bileşiklerin adsorbsiyonu:** Aflotoksinler, amfetaminler, antibiyotikler, antioksidanlar, aromatikler, vitaminler, barbitüratlar, flavinoidler, herbisitler, insektisitler ve diğer pestisitler |
| Amino ($-NH_2$) | **Zayıf anyon değişim ekstraksiyonu:** Karbonhidratlar, gıda koruyucuları, nükleotidler, peptidler, sakkaridler, steroidler, şekerler, vitaminler |
| Aromatik sülfonik asit ($-C_6H_5SO_3H$) | **Güçlü katyon değişim ekstraksiyonu:** Amino asitler, katekolaminler, hormonlar, nükleik asit bazları, nükleosidler, pürinler, vitaminler |

## 2.10. Kromatografi

Yunanca chroma (renk) ve graphein (yazma) kelimelerinin birleşiminden oluşan kromatografi, ilk olarak 1903 yılında Rus botanikçi Michael Tsvet tarafından renkli bitki pigmentlerini ayırmak amacıyla kullanılmıştır (Milli Eğitim Bakanlığı, 2013). Kuhn ve Lederer 1931 yılında, Tswett'e ait tekniği karotenlerin ve ksantofillerin preparatif ölçüde ayrılması için başarı ile kullanmışlardır. İngiliz biyokimyacılar Archer John Porter Martin ve Richard Laurence Millington Synge tarafından 1952'de gaz kromatografisinin (GC) icadı ve uçucu yağ asitleri karışımlarının analizlerinde başarılı uygulamaları, sıvı kromatografisinin (LC) gelişimi için teorik temeli ve teşviki sağlamıştır (Baltacı ve Gündoğdu, 2012; Dong, 2019). 1960 yılının sonlarında sıvı kromatografisi, yüksek basınçlı pompalar gerektiren küçük partiküllü kolonların kullanımıyla yüksek performansa dönüşmüştür. Yüksek basınçlı sıvı kromatografilerin (HPLC) ilk nesli 1960 yılında, Avrupa'da Joseph Huber ve Amerika Birleşik Devletleri'nde Csaba Horváth ve Jack Kirkland isimli araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir. Sıralı dedektörlerin ve güvenilir enjektörlerin ticari gelişimi, HPLC'nin uygulamalarını çok hızlı bir şekilde büyümesine yol açmış, hassas ve nicel bir teknik haline gelmesine sebep olmuştur. 1980'lerde, HPLC çok yönlülük ve hassasiyet özellikleri, onu ilaç ve birçok farklı endüstride vazgeçilmez hale getirmiştir. HPLC sistemleri ve aksesuarlarının dünya çapındaki yıllık satışları 2016 yılında yaklaşık dört milyar ABD dolarıdır (Dong, 2019).

Günümüzde kromatografi, bir çözeltinin içeriğindeki analitlerin (kalitatif) ve bu analitlerin miktarlarının belirlenmesi (kantitatif) sürecini uygulayan en yaygın kullanılan enstrümantal analitik yöntemlerden biri haline gelmiştir. Bu yöntem sayesinde birbirinden ayrılmaları oldukça zor olan maddeleri saf olarak ayırmak mümkün hale gelmiştir. Hareketli fazın sabit faz üzerinden geçirilerek, dağılım ve adsorpsiyon gibi mekanizmalarla numune içindeki bileşenleri taşıyan ve ayrıştıran bir işlemdir. Tüm kromatografik yöntemler, bir numunedeki maddelerin sabit ve hareketli fazların etkileşimi yoluyla ayrılmasına dayanır. Bu ayrımın nedeni, maddelerin hareketli veya sabit faza farklı ilgilerinin olmasıdır (MEB, 2013).

Hareketli faz: Numunenin sabit fazdan (kolon) geçmesini sağlayan, farklı fizikokimyasal özelliklere sahip çözgen karışımlarıdır. Hangi mobil fazın kullanılacağını seçerken, analiz edilecek numune bileşenlerinin özellikleri, kullanılan sabit faz ve dedektörün özellikleri gibi parametreler dikkate alınmalıdır.

Sabit faz: Mobil faz ile taşınan numuneye ait analitlerin etkileşime girerek ayrıştıkları ve belli bir zaman ölçüsünde alıkoyuldukları fazdır. Sabit faz, kullanılacak kromatografi tekniğine göre çeşit, ölçü, tasarım ve içerik materyali olarak farklılık göstermekte olup kolon olarak adlandırılmışlardır (Eser ve Dinçel, 2018).

### 2.10.1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)

Temelde bir HPLC sistemi; bilgisayar, enjektör, pompa, dedektör ve kolon ekipmanlarından oluşmaktadır. Analiz sırasında numune şırınga vasıtasıyla sisteme dahil edilir. Numune mobil faz yardımıyla sabit faz boyunca ilerler. Sabit faz içerisinde bileşenlerine ayrılır. Dedektör bu ayrılan bileşenlere ait sinyalleri kaydeder. Dedektörün kaydedip bilgisayara ilettiği bu sinyallerin tümüne kromatogram adı verilir (Çelebi, 2010). HPLC, çok bileşenli karmaşık karışımların analizini yapabilen bir ayırma tekniğidir. <%0,1–0,5 bağıl standart sapma (RSD) kesinliğine ve çok yönlülüğe sahip çok az analitik teknik bulunmaktadır. HPLC, gelişmiş otomatik örnekleyiciler ve veri sistemleri kullanılarak gözetimsiz analizleri gerçekleştirip, raporlama imkânı sunmaktadır. Bir dizi son derece hassas ve spesifik dedektörü sayesinde tespit sınırları ng, pg ve hatta fg seviyelerine kadar inebilmektedir. Hazırlayıcı bir teknik olarak, birçok kararsız bileşenin miligramdan kilograma kadar niceliksel olarak geri kazanımını sağlar. En önemlisi, HPLC mevcut tüm bileşiklerin analizlerinin %60-80'ine uygun iken GC için bu oran yaklaşık %15'tir (Dong, 2019).

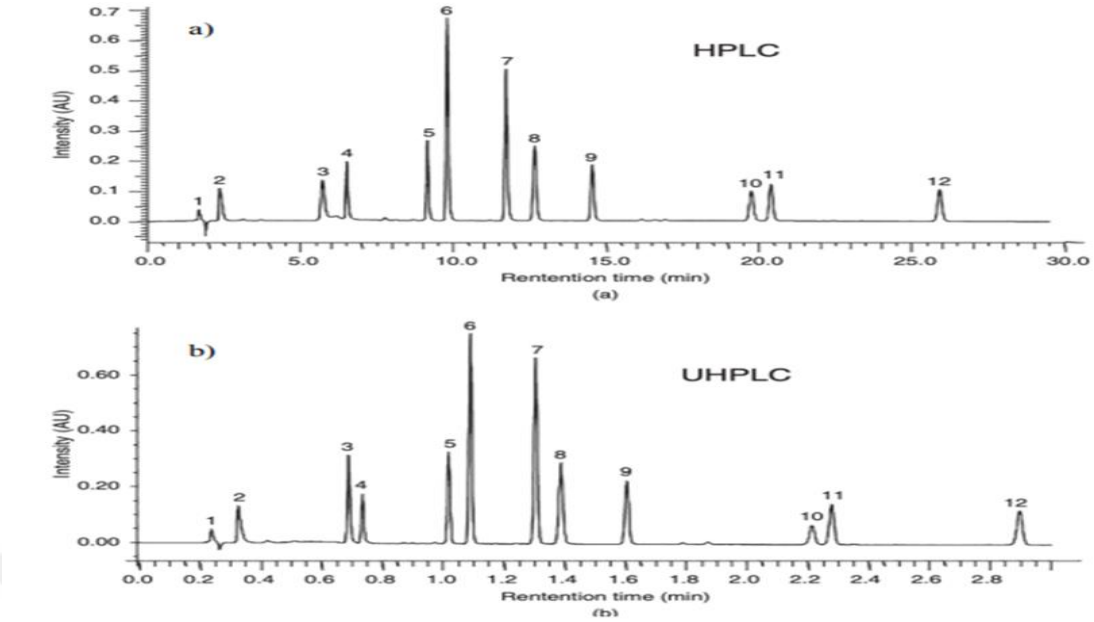
### 2.10.2. Ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (UHPLC)

HPLC uzun süredir laboratuvarlarda en yaygın kullanılan yöntemlerden biri olmuştur ancak yeni dedektör tasarımları, veri işleme ve kolon teknolojisindeki gelişmeler, ultra performanslı sıvı kromatografisinin (UHPLC) geliştirilmesini sağlamıştır. UHPLC hız, yüksek ayırım gücü ve hassasiyet gibi avantajları nedeniyle son zamanlarda geniş bir uygulama alanı bulmuştur (Wu ve Thompson, 2006). UHPLC sisteminin temel prensibi

HPLC ile aynıdır, sadece ekipman ve donanım farklıdır. Küçük partiküllü kolonları nedeniyle yüksek basınç gerekir ve pompa buna göre tasarlanmıştır. UHPLC, yüksek hız, kısa analiz süreleri ve azaltılmış mobil faz tüketimi açısından geleneksel HPLC'ye göre avantajlara sahiptir. Partikül teknolojisindeki ilerlemelerle, kolonlarda kullanılan 2 µm'nin altındaki partikül boyutu, ayırma verimliliğini iyileştirmiş ve analiz sürelerini önemli ölçüde azaltmıştır. Yönteme dair hassasiyet kullanılan dedektörlere göre 3-5 kat daha fazla olabilmektedir (Dong ve Zhang, 2014).

Mevcut HPLC sistemleri tarafından desteklenen basınç limitleri 350-400 bar'dır (5000-6000 psi). HPLC sistemleri, küçük partikül boyutlu kolonların kullanımıyla oluşan yüksek basınçları kaldıramaz, bu nedenle kolon uzunluğu veya hareketli faz akış hızları sınırlandırılmalıdır. Yüksek basınç sınırına (1030 bar = 15000 psi) sahip bir UHPLC sistemi artık küçük partikül içeren kolonlar ile çalışılabilir. UHPLC'nin kullanımı, yeni yöntemlerin optimizasyonu ve doğrulanması için gereken süreyi önemli ölçüde düşürmüştür. Kullanılan mobil fazdaki organik solvent tüketimi de düşük akış hızları ve kısa analiz süreleri nedeniyle önemli ölçüde düşmüştür (Taleuzzaman vd., 2015).

UHPLC yüksek ticari kar, yüksek hassasiyet, çözünürlük, hız ve örnek verimi göz önüne alındığında artık geleneksel HPLC'nin yerini almaya başladığı gözlemlenmektedir (Gerber vd., 2004). Geleneksel HPLC ile karşılaştırıldığında, UHPLC daha fazla numuneyi daha kısa sürede analiz ederek, daha hızlı yöntem geliştirme ve 3 ila 10 kat verimlilik artışı sağlamaktadır. Metot optimizasyonu için kolon ve mobil faz taramasının hızlı bir şekilde yapılması ve kısa kolonlar sayesinde analizlerin daha kısa sürede yapılabilir olması UHPLC'nin klasik HPLC'ye dair üstün yanlarıdır. Ayrıca kısa ve küçük iç çaplı kolonların kullanılmasıyla kullanılan numune hacimleri de azalmıştır (Swartz, 2005). Bu üstünlük Şekil 2.4'te ortaya konmuştur. A ve B kromatogramları sırasıyla, standart C 18 HPLC kolonunun (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) ve bir UHPLC kolonunun (50 mm x 2,1 mm x 1,7 µm) ayrımlarını gösterir. UHPLC ayrımı yaklaşık dokuz kat daha hızlı olmasına rağmen, ayrımlar oldukça benzer görünmektedir (Dong ve Zhang, 2014).




**Şekil 2.4.** HPLC ve UHPLC analiz süresi farkını gösteren kromatogramlar

UHPLC'de hem analiz süresi hem de pik alanı için hassasiyet performansı, klasik HPLC'ye kıyasla 2-3 kat artar. HPLC numune örnekleyicisi, >5 µL enjeksiyon hacimleri için %0,2-0,5 RSD ile kesinlik seviyelerine sahiptir. Bu hassas performans, 1 µL'ye kadar olan enjeksiyon hacimleri için bile UHPLC'de %0,1–0,2 RSD seviyesindedir. Çizelge 2.8'de UHPLC'nin avantajları verilmiştir.

**Çizelge 2.8.** UHPLC'nin avantajları (Dong, 2019)

| UHPLC Avantajları | Açıklamalar |
|---|---|
| İyi çözünürlük ile hızlı ayrım | Benzer çözünürlüğü koruyarak, HPLC'ye kıyasla verimi 3-5 kat arttırır. |
| Yüksek çözünürlük ile kompleks bileşiklerin ayrımı | HPLC'ye kıyasla çözünürlüğü 3 kata kadar arttırır. |
| Hızlı metot geliştirme | Kısa kolonlar ile mobil faz belirlenmesi ve metot optimizasyonuna sağlar. |
| Çözücü kazanımı | Daha kısa analiz süresi ve küçük partiküllü kolonların kullanımı nedeniyle HPLC'ye göre 5-15 kat daha az çözücü kullanılır. |
| Yüksek hassasiyet | Enjekte edilen numune miktarlarını 3-10 kat azalır. Uzun yola sahip UV akış hücrelerinin (25-60 mm) kullanılması, konsantrasyon hassasiyetini 6 kata kadar arttırabilir. |
| Yüksek kesinlik | Alıkonma süresinin 2-3 kat azalması ile pik alanın kesinliğini arttırır (>1 µL enjeksiyon hacimlerinde elde edilebilen <%0,1 bağıl standart sapma) |

## 2.11. HPLC Bileşenleri

HPLC cihazları genellikle altı bölümden oluşmaktadır. Hareketli faz (çözücü) şişeleri, gaz-baloncuk giderici, pompalar, enjektör, kolon, dedektör bu parçalardan bazıları çalışılacak örnek ve cihaz modeline göre değişiklik gösterebilmektedir.

### 2.11.1 Mobil faz şişeleri

HPLC cihazında bir ya da birden fazla mobil fazların konulduğu cam veya paslanmaz çelik kaplar bulunmaktadır. Analizde sulu tamponlardan hidrokarbonlara kadar farklı polaritede çözücüler kullanılabildiği için bu kapların kalitesi önemlidir.

### 2.11.2. Degasser (Gaz giderici)

Mobil faz içerisinde bulunan eriyik gazların giderilmesi için kullanılan bir sistemdir. Tüm çözücülerin gazının çözücüden uzaklaştırılması gereklidir. Mobil fazda gaz kabarcıklarının bulunması pompa ve kolonda sorunlara neden olabilmektedir. Örneğin; kolonda kabarcık oluşması pik genişlemesine veya alıkonma zamanın kaymasına yol açabilmektedir. Mobil fazlarda gazın giderilmesi çeşitli şekillerde gerçekleştirilebilir; çözücülerin ısıtılması, vakum altında karıştırma, ultra sonikasyon veya solvent şişesine helyum gazı verilmesidir. Ancak gelişen teknoloji ile beraber HPLC cihazında degasser standart olarak bulunan bir modül haline gelmiştir (Eser ve Dinçel, 2018).

### 2.11.3. Pompa

HPLC, kolon girişi ve çıkışı arasında sağlanması gereken yüksek basınç nedeni ile diğer sıvı kromatografisi cihazlarından farklılık gösterir. Bu basınç farkı, kolon girişine bir pompa vasıtasıyla uygulanan basınç ile sağlanmaktadır. Mobil faz pompa sistemi belki de HPLC cihazının en önemli parçasıdır. Pompaya ait performans, analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğine, nicel değere, tayin sınırına vb. değerlere büyük ölçüde etki etmektedir (Hanai, 1999).

HPLC cihazında analiz sırasında iki farklı akış seçeneği kullanılmaktadır. Bunlar; fazların yüzde oranlarına göre ayarlanan izokratik ve gradyan (basamaklı) akıştır. İzokratik akış, tek pompa kullanılarak oransal olarak fazların analiz başından sonuna dek değişmediği akış türüdür. Gradyan ise iki ya da daha fazla pompa kullanıldığı

polariteleri farklı mobil fazların analiz başından sonuna kadar oransal olarak farklılık gösterdiği akış türüdür (Ranade, 2010).

Gradyan analizinin avantajları şunlardır:

• Kompleks ve karmaşık numuneler için daha uygundur.

• Erken ve geç elüsyon pikleri daha iyi çözünürlüğe sahiptir.

• Pikler, tüm çalışma boyunca benzer pik genişliklerine sahiptir.

• Daha yüksek pik kapasitesi elde edilir.

Dezavantajları aşağıdaki gibidir:

• Dörtlü pompa ihtiyacından dolayı daha karmaşık HPLC yapısı.

• Optimizasyon gradyan yöntemlerinde daha zor ve zaman alıcıdır.

• Laboratuvarlar arası gradyan yöntemlerin transferi daha zordur.

• Kolon dengelemesi nedeniyle daha uzun çalışma süreleri gerekmektedir (Dong, 2019).

### 2.11.4. Enjektör

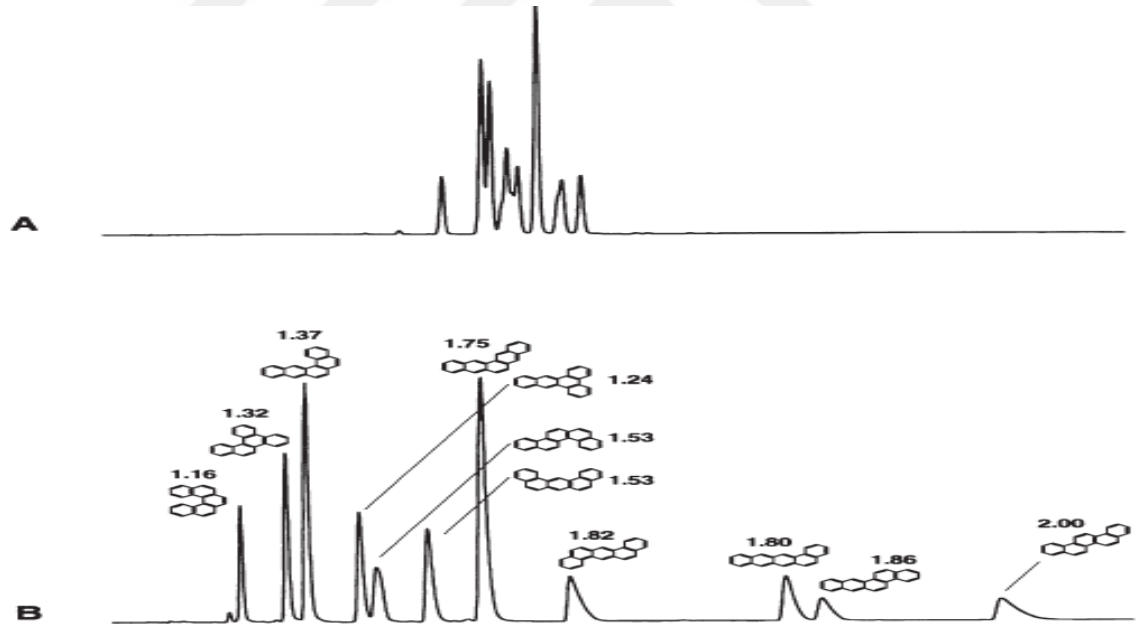
HPLC'de analizlerin kesinliğini etkileyen en önemli faktörlerden biri, örneğin kolona enjeksiyonunun tekrarlanabilirliğidir. İdeal enjektör, örneği kolonun giriş kısmına mobil faz akışına zarar vermeden iletebilmelidir. Bu septum enjektörü kullanımı ile gerçekleştirilebilir fakat yüksek basınç altında sızıntı sorunu bu enjektörün kullanımını sınırlamaktadır. Valf ve şırınga enjektör olmak üzere iki çeşit enjeksiyon sistemi vardır. Oto enjeksiyon yeni nesil HPLC sistemlerinde mevcuttur.

### 2.11.5. Kolon

Bileşeni fazla numunelerde analitlerin ayırımı sabit faz sayesinde gerçekleşmektedir. Bir kolonun ayırma verimliliği ve performansını, kolonun iç yüzeyini kaplayan dolgunun fiziksel ve kimyasal özellikleri belirler. Farklı tip dolgu malzemeleri mevcuttur bunları seçerken mobil fazların, HPLC yönteminin ayrıca analiz edilen numunenin fiziksel ve kimyasal özelliklerine dikkat edilmelidir. Tercih edilecek kolonun analizde kullanılacak akış hızı ve bu hız sonucu ortaya çıkacak basınca karşı dayanıklı olması gerekmektedir (Hanai, 1999).

HPLC’de bazen düşük basınçlı uygulamalar (<600 psi) için kalın cidarlı cam boru kullanılmasına rağmen, kromatografi kolonlarının çoğu 4–10 mm iç çapları ve 10–30 cm uzunlukları olan paslanmaz çelikten yapılmaktadır. Kolonlar genellikle 5 ila 10 µm aralığında değişen partikül boyutlarındaki silika dolgu maddeleri ile doldurulmuştur. Son zamanlarda üretilen yüksek performanslı mikro kolonların iç çapları 1 mm'den 4,6 mm'ye ve uzunlukları 3 cm'den 7,5 cm'ye kadar geniş bir aralıktadır. 3 µm veya 5 µm partiküllerle doldurulmuş bu kolonlar, hız ve düşük mobil faz kullanımı avantajları sunar (Ranade, 2010; Thammana, 2016).

Her analizde olduğu gibi PAH analizlerinde de kolon seçimi önem arz etmektedir. Seçimin önemine dair yapılan bir çalışmada monomerik ve polimerik C 18 kolonları kullanılmıştır. 11 farklı PAH’ın ayrılmasına yönelik bu çalışmada polimerik C 18 kolonu tüm PAH’ların ayrımını sağlamıştır. Fakat aynı mobil faz ve akışta monomerik kolonda düşük ayrım gerçekleşmiştir. Şekil 2.5’te monomerik ve polimerik C 18 kolonlarındaki PAH’ların ayrımına dair kromatogramları verilmiştir.




**Şekil 2.5.** PAH’ların iki tip C 18 kolonda ayrım kromatogramı (Neilson, 1998)

Analizin kaliteli olarak gerçekleştirilebilmesi için kolonun bulunduğu ortamın sabit bir sıcaklıkta olması gerekmektedir. Bu sebeple kolon fırını HPLC cihazlarında büyük önem taşımaktadır. Hava sirkülasyonlu ve blok ısıtıcılı olmak üzere iki türü vardır (Eser ve Dinçel, 2018).

### 2.11.6. Dedektör

Bir LC sistemine çok çeşitli dedektör türleri entegre edilebilir. Dedektör tipleri hassasiyet, seçicilik ve doğrusal aralık açısından farklılık gösterir. Duyarlılık, bir bileşiğin tespit edilebilecek en düşük konsantrasyonunu tanımlar. Seçicilik, bir dedektörün belirli bir bileşik için ne kadar spesifik olabileceğini belirler. Doğrusal aralık, dedektörün doğrusal bir yanıt sinyali verdiği bir bileşiğin konsantrasyon aralığını tanımlamaktadır (Agilent Technologies, 2016).

HPLC cihazlarında kullanılan başlıca dedektörler şunlardır;
-Ultraviyole/görünür bölge (UV)
-Fotodiyot dizi (PDA)
-Floresans (FL)
-Kırılma indisi (RI)
-Elektrokimyasal (ECD)
-Kütle spektrometresi (MS)
-Evaporatif ışık saçılımı (ELS)
-Nükleer manyetik rezonans (NMR)
-İnfrared spektrometresi (IR)
Bu dedektörlerden bazıları detaylı şekilde aşağıda açıklanmıştır (Novakova ve Vlckova, 2009; Dong ve Zhang, 2014).

## 2.12. HPLC'de Kullanılan Başlıca Dedektörler

### 2.12.1. Ultraviyole/görünür bölge (UV)

Organik bileşiklerin ışığı 190-800 nm aralığında absorbe edenlerinin analizlerinde Ultraviyole/görünür bölge dedektör kullanılır. Bu dedektör, UV veya görünür aralıktaki farklı dalga boylarında tarama yaparak farmasötik, çevre, gıda ve petrokimya analizlerinde avantaj sağlamaktadır (Hussain ve Shaikh, 2016).

### 2.12.2. Fotodiyot dizi (PDA) dedektörü

PDA dedektörleri, 190-800 nm aralığında iki ve üç boyutta aynı anda doğru bileşik tanımlama ve gelişmiş optik algılama sağlar. Bu dedektör ilaç analizlerinde yoğun olarak kullanılmaktadır (Malejko vd., 2016).

### 2.12.3. Kırılma indisi (RI) dedektörü

UV absorbansı olmayan ya da sınırlı olan bileşikler için kullanılan dedektördür. RI dedektörleri ile alkoller, şekerler, yağ asitleri, eksipiyanlar, ham maddeler ve farmasötikler analiz edilebilmektedir. Molekül kütlesi düşük polimerlerin karakterizasyonuna ek olarak, UHPLC'de de kullanılmaktadır. Bu dedektörün dezavantajı düşük hassasiyetidir.

### 2.12.4. Elektrokimyasal (ECD) dedektör

Amperometrik, kulometrik ve voltametrik olarak üç farklı çalışma prensibi olan elektroaktif bileşiklerin analizinde kullanılan dedektör çeşididir. Yapısında elmas, gümüş ve altın gibi çalışma elektrotları bulunması sebebiyle maliyeti yüksek bir detektördür. Ayrıca sınırlı sayıda madde ile çalışılabilmesi gibi nedenlerden dolayı daha az tercih edilmektedir (Hussain ve Shaikh, 2016).

### 2.12.5. Floresan (FL) dedektörü

Floresan dedektörler, floresans özelliğe sahip maddelerin yüksek hassasiyet ve seçicilik ile ölçülmesine olanak sağlar. Hassasiyet, UV algılamaya göre 1000 kata kadar daha fazla olabilir. PAH'lar, ilaçlar ve bazı vitaminler ile floresans veya fosforesans gibi kemilüminesans özelliklere sahip bileşiklerin analizi için kullanılmaktadır (Stragierowicz vd., 2017; Ranade, 2010).

Işık kaynağı genellikle, UV dedektörlerinde kullanılan döteryum lambası veya bir ksenon flaş lambası gibi geniş spektrumlu bir UV lambasıdır. Uyarma dalga boyu bir filtre veya monokromatör tarafından seçilir ve numuneyi akış hücresinden geçerken aydınlatır. Bir bileşik floresan yaydığında, istenen emisyon dalga boyu bir filtre veya monokromatör ile izole edilir ve bir fotodedektöre yönlendirilir, burada izlenir ve veri işleme için elektronik bir sinyale dönüştürülür. Floresan her yöne yayıldığından, yayılan ışığın gelen ışığa dik açılarda izlenmesi yaygındır. Bu optiği basitleştirir ve arka plan gürültüsünü azaltır. Floresans süreci %100 verimli değildir, bu nedenle enerji kaybolur. Bu, emisyon dalga boyunun her zaman uyarma dalga boyundan daha düşük enerjide (daha yüksek dalga boyu) olması gerektiği anlamına gelir. Diğer algılama teknikleri ile karşılaştırıldığında, floresan genellikle daha az sorun çıkarak bir tekniktir. Floresan

dedektörünün en büyük dezavantajı, tüm bileşiklerin floresans yapabilme kabiliyetine sahip olmamasıdır (Snyder, 2010). Çizelge 2.9'da HPLC'de kullanılan detektörler özellikleriyle beraber verilmiştir.

**Çizelge 2.9.** HPLC detektörlerinin bazı performans özellikleri (Güler, 2020)

| Detektör | Ticari Detektörler | Kütle LOD | Doğrusal Aralık (10x) |
|---|---|---|---|
| Uv-PDA | Var | 10 pg | 3-4 |
| FL | Var | 10 fg | 5 |
| ECD | Var | 100 pg | 4-5 |
| RI | Var | 1 ng | 3 |
| İletkenlik | Var | 100 pg-1ng | 5 |
| MS | Var | < 1pg | 5 |
| IR | Var | 1 µg | 3 |
| ELS | Var | 1 µg | 5 |

## 2.13. HPLC'de Metot Optimizasyon

Literatürden uyarlanmış veya tamamen yeni uygulanan her yöntem, iyileştirme amacıyla çeşitli modifikasyonlara tabi tutulur. Bu iyileştirme sürecinin kapsamı, çok sınırlı değişikliklerden tam bir optimizasyon sürecine kadar değişebilir. Süreç zaman alıcı ve pahalı olabileceğinden ve yalnızca küçük iyileştirmeler sağlayabileceğinden, tam bir optimizasyon ihtiyacı her zaman kritik bir şekilde değerlendirilmelidir. Öte yandan, iyileştirme süreci, yöntem analizin amacı için tamamen yeterli hale gelene kadar devam etmelidir.

Kromatografik ayırmanın optimizasyonu, bir yöntemi geliştirmenin önemli bir parçasıdır, ancak yöntemin diğer bölümleri, iyileştirme amacıyla değişikliklere tabi tutulabilir. Enjeksiyon hacmi, detektör ayarları ve kromatografik çalışmanın uzunluğuna dair iyileştirme çalışmaları da yapılabilir. İyileştirme süreci, deneme yanılma yoluyla veya çok değişkenli istatistiksel tekniklerle gerçekleştirilebilmektedir.

Optimizasyon süreci, bir kalibrasyon tipi seçimine genişletilebilir. Bir kantitatif yöntem için standartlarla basit kalibrasyonların yanı sıra çeşitli prosedürler kullanılabilir. Bunlar arasında harici, dahili normalleştirme, matriks uyumlu, standart ekleme ve sinyal-oran kalibrasyonlarıdır (Moldoveanu ve David, 2022).

Yeni analitik yöntemlere genellikle aşağıdaki nedenler sebebiyle ihtiyaç duyulur:

• Standart analiz yönteminin olmaması

• Mevcut yöntemlerin güvenilir, doğru, hassas, sağlam veya mevzuata uygun olmaması

• Yeni analiz cihazının veya tekniğinin daha yüksek performansa sahip olması (UHPLC ve LC-MS/MS gibi)

HPLC'de yöntem geliştirmek için beş adımlı bir strateji tanımlanmıştır:

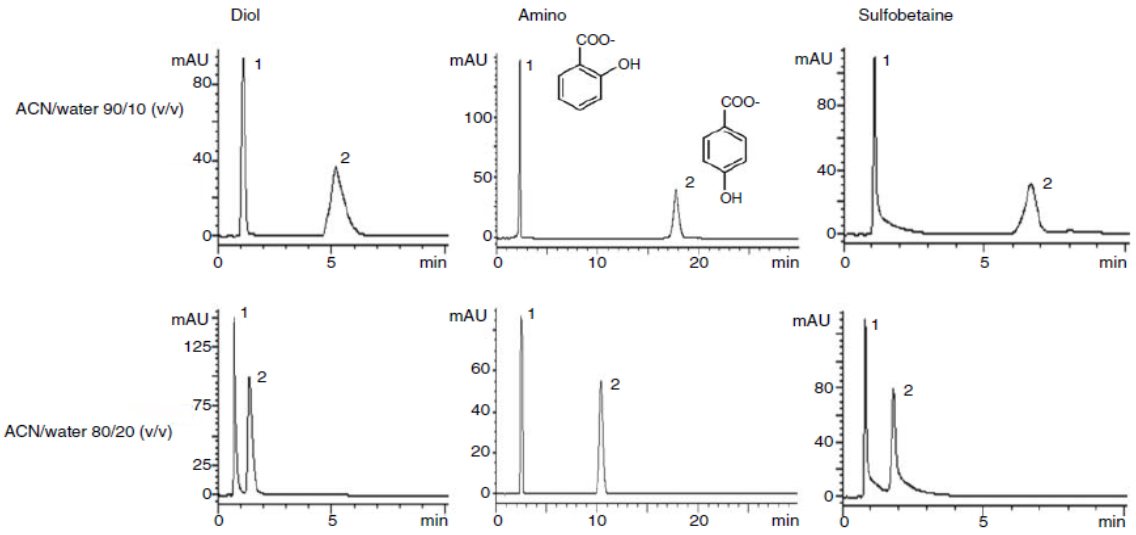
1. Yöntemin ve ayırma hedeflerinin tanımlanması
2. Numune ve analit bilgilerinin toplanması
3. İlk yöntem geliştirme: keşif çalışmaları ve ilk kromatogramların alınması
4. Yöntemin ince ayarı ve optimizasyonu
5. Yöntemin ön yeterliliği

HPLC yöntemi geliştirme sırasında, öncelikli olarak dedektör, kolon ve mobil fazların seçiminin yapılması gerekmektedir. Sonrasında optimize edilebilecek parametreler aşağıdaki gibidir:

- Mobil faz parametreleri: Organik solvent yüzdesi, tampon tipi ve konsantrasyonu, pH, solvent tipi (örn. asetonitril veya metanol), tuz eklenmesi
- HPLC çalışma parametreleri: Akış hızı, sıcaklık, gradyan aralığı ve oranları
- Kolon parametreleri: Bağlı faz tipi, uzunluk, kolon çapı ve partikül boyutu
- Diğerleri: Detektör dalga boyu, enjeksiyon hacmi ve seyreltilmesi

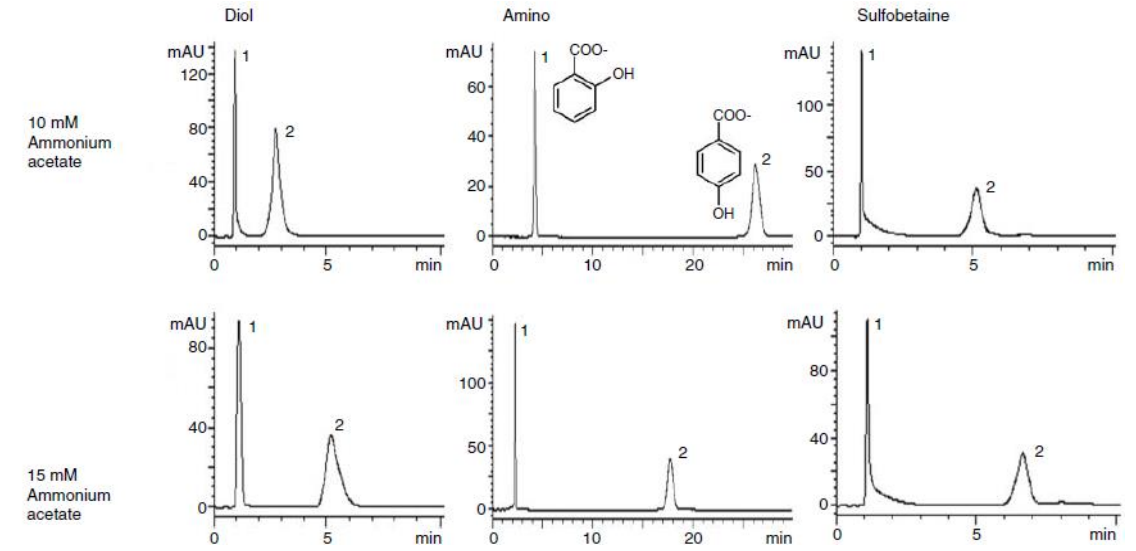
### 2.13.1. Mobil faz parametreleri

HPLC'de mobil faz, sabit faz için ayırmanın tutulmasını ve seçiciliğini kontrol eder ve yöntem geliştirme sırasında ayarlanabilir olmalıdır. Mobil fazların polarite farklarının güçlü olması tutunmayı artırır ve tipik olarak izokratik ayırmalarda çözünürlüğü artırır (Dong, 2019). Şekil 2.6'da mobil faz oranlarının analize etkisini gösteren kromatogramlar verilmiştir. Üç sabit faz tipinde (diol, amino ve sülfobetain) 1-hidroksibenzoik asit ve 4-hidroksibenzoik asit için yapılan araştırmada su yüzdesinin değişmesiyle alıkonma zamanlarının ve pik yapılarının değişimleri gözlemlenmiştir.




**Şekil 2.6.** Mobil faz değişiminin alıkonma zamanına ve pik yapısına etkisi

Yüklü analitler ile sabit faz arasındaki elektrostatik etkileşimleri kontrol etmek için mobil faza tipik tuzlar eklenmektedir. Bu ekleme işlemi ile kuyruklanma yapan analitlerin pik şeklinde bir iyileşme söz konusudur. Amonyum asetat, amonyum format ve amonyum bikarbonat gibi tuzlar kullanılmaktadır. Şekil 2.7'de tuz miktarının analize etkisini gösteren kromatogramlar verilmiştir. Üç sabit faz tipinde (diol, amino ve sülfobetain) 1-hidroksibenzoik asit ve 4-hidroksibenzoik asit için yapılan araştırmada faz içerisindeki amonyum asetat tuzunun miktarsal artışının analize etkisi verilmiştir.




**Şekil 2.7.** Tuz miktarının alıkonma zamanına ve pik yapısına etkisi (Kromidas, 2021)

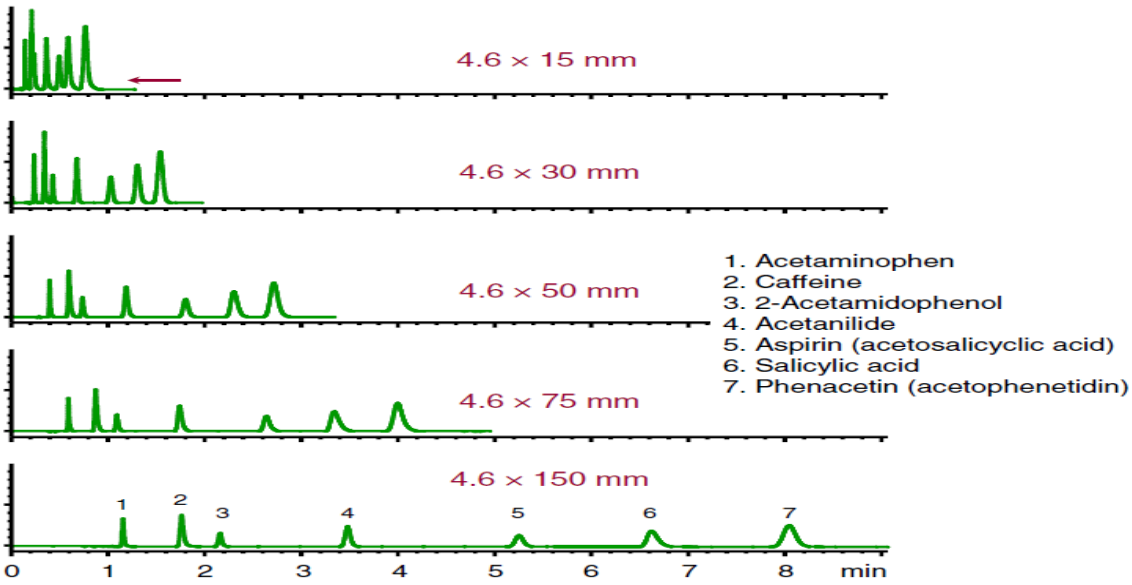
### 2.13.2. HPLC çalışma parametreleri

Akış hızı, bir izokratik analizde analitin tutulmasını veya seçiciliğini etkilemez, ancak gradyan elüsyon içinde hem ortalama tutulmayı hem de seçiciliği etkileyen önemli bir faktör olabilir. Artan kolon sıcaklıkları, ters fazlı kromatografide tutulmayı ve çözücü viskozitesini azaltır ve seçicilik üzerinde önemli etkileri olabilir.

Ana bileşen etrafındaki analitlerin çözünürlüğünü artırmak için daha dar bir gradyan aralığı yararlıdır. Gradyan süresindeki bir artış genellikle karmaşık numunelerin genel çözünürlüğünü artırır.

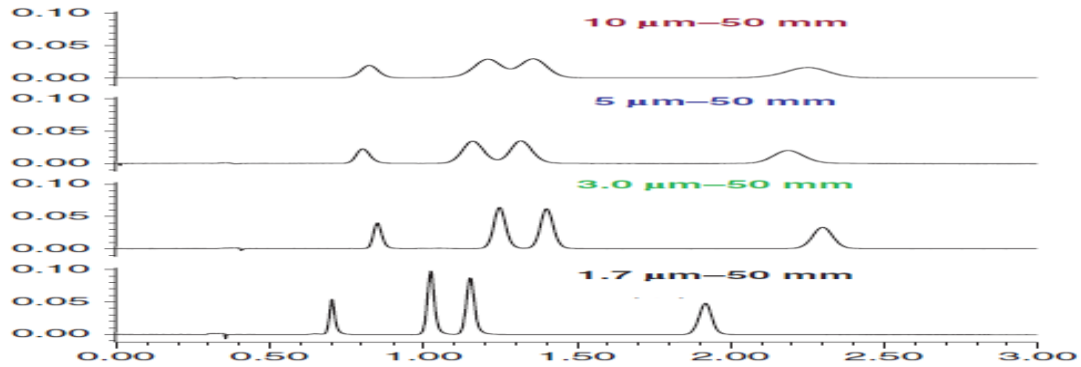
### 2.13.3. Kolon parametreleri

Kolon uzunluğu, çapı ve partikül boyutları verimliliği, hızı veya hassasiyeti artırmak için optimize edilebilir. Hızlı kolon ve hareketli faz taraması için kısa UHPLC kolonları kullanmak ve ardından seçilen bağlı fazı kullanarak daha uzun kolonlarla (çözünürlüğü maksimize etmek için) optimizasyon yapmak daha uygun olacaktır. Şekilde 2.8'de tüm özellikleri aynı sadece uzunlukları farklı beş tip kolonda Asetaminofen, Kafein, 2-Asetamidfenol, Asetanilid, Aspirin (asetosalisiklik asit), Salisilik asit, Fenasetin (asetofenetidin) maddelerinin kolon uzunluğuna bağlı değişen ayrımlarına dair kromatogram verilmiştir.




**Şekil 2.8.** Kolon uzunluğunun piklerin ayrımına etkisi

Partikül boyutu, boyut dağılımı ve mekanik gücü, kolonun veriminin ve de iç basıncın en önemli belirleyicisidir. Şekil 2.9'da boyları aynı partikül boyutları farklı dört kolonun dört maddeyi ayrıma kapasitesini göstermektedir.

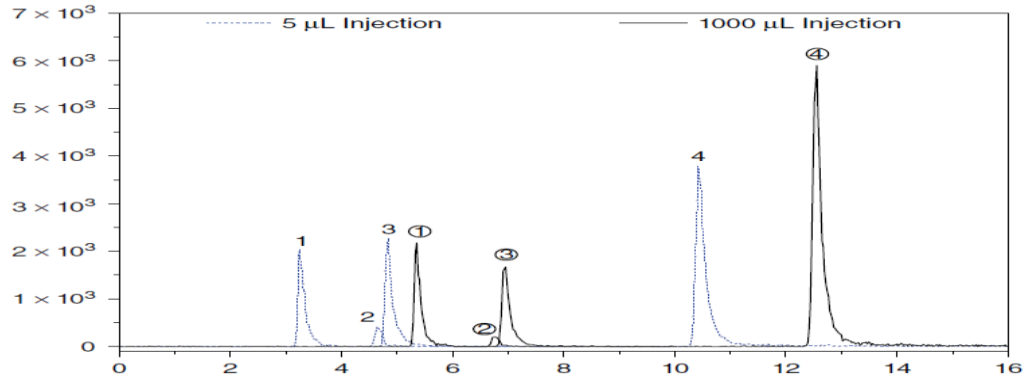



**Şekil 2.9.** Partikül boyutunun piklerin ayrımına etkisi

### 2.13.4. Dedektör ayarı ve numune miktarı

Son olarak, dedektör ayarı (algılama dalga boyu, yanıt süresi ve örnekleme oranı) ve numune yükleme parametreleri optimize edilir. UV algılama duyarlılığı optimizasyonu sırasında amaç, sinyal/gürültü oranını maksimize ederken, yöntem doğrusallığını ve iyi pik şekillerini korumaktır. Bu iyileştirme genellikle numune konsantrasyonunu ve/veya enjeksiyon hacmini artırarak elde edilir (Dong, 2019).

Şekil 2.10'da 5 µL ve 1000 µL enjeksiyon hacmi kullanılarak dört adet antineoplastik ilaçların ayrımına dair kromatogram gösterilmektedir. Tutulma sürelerindeki farklılıklar, uygulanan numune spirallerinin farklı hacimleriyle açıklanabilir. Yaklaşık iki dakikalık zaman farkı, 1000 µL numune spiralinin yıkanmasından kaynaklı gecikmedir.




**Şekil 2.10.** Enjeksiyon hacimin pik boylarına etkisi (Kromidas, 2017)

## 2.14. Tez Çalışmasına Yönelik Kaynak Araştırması

Sargenti ve Mcnair (1998) katı faz ekstraksiyon ve süperkritik akışkan ekstraksiyonun içme suyu matriksinde PAH analizlerindeki özelliklerini karşılaştırmışlardır. C 18, siyano ve fenil kartuşlarında DCM ve ACN çözücülerinin elüsyon basamağında geri kazanım değerleri incelenmiştir. EPA'nın öncelikli kirleticiler listesinde olan on altı PAH için C18 kartuşta elde edilen yüzde geri kazanım ortalaması DCM ile %68,81, ACN ile %56,25'tir. Siyano kartuşta elde edilen yüzde geri kazanım ortalaması DCM ile %61,87, ACN ile %39,12'dir. Fenil kartuşta elde edilen yüzde geri kazanım ortalaması DCM ile %74,94, ACN ile %46,94 olarak verilmiştir.

Marce ve Borrull (2000) EPA'nın öncelikli kirleticiler listesinde olan on altı PAH'ın katı faz ekstraksiyonunu farklı başlıklarda karşılaştırmışlardır. 2-propanolün geri kazanıma etkisini C18 ve SDVB kartuşlarında incelemişlerdir. 2-propanol eklenmeden kartuşların yüzde geri kazanımları C 18 için %72,8, SDVB için % 63,4 olarak verilmiştir. Numuneye %10 oranında 2-propanol eklenmesiyle C 18'ten elde edilen ortalama geri kazanım %82,4, SDVB kartuştan ise %77,6 olmuştur. Numuneye eklenen 2-propanol %15 olduğunda elde edilen geri kazanımlar C 18 kartuşta %91,7, SDVB kartuşta %77,3 olarak verilmiştir. Yüzey aktif madde olan Brij-35'in farklı derişimlerde numuneye eklenmesinin geri kazanıma etkileri araştırılmıştır. 0,5, 1,1, 3,0 ve 6,0 x $10^{-4}$ molar eklenmiş numunelerin yüzde geri kazanım ortalamaları karşılaştırılmıştır. Brij-35 yüzey aktif maddesi eklenmemiş numunede yapılan analizler sonucu ortalama yüzde geri kazanım %24,4'tür. 0,5x$10^{-4}$ molar eklenmiş numunenin ortalama yüzde geri kazanımı %30,7'dir. 1,1x$10^{-4}$ molar eklenmiş numunenin ortalama yüzde geri kazanımı %47,1'dir. 3,0x$10^{-4}$ molar eklenmiş numunenin ortalama yüzde geri kazanımı %70,2 ve 6,0x$10^{-4}$ molar eklenmiş numunenin ortalama yüzde geri kazanımı %51,8 olarak verilmiştir.

Bruzzoniti vd. (2010), EPA'nın öncelikli kirleticiler listesinde olan PAH'ların içme suyunda SPE ön işlemi kullanılarak HPLC analizine yönelik çalışma yürütmüşlerdir. SPE ön işleminde numuneye %1 oranında metanol eklenmiş, metanollü ve metanolsüz numunelerin yüzde geri kazanım oranları karşılaştırılmıştır. Nap, Acn, Fln, Phe ve Ant parametrelerinin metanolsüz numunede diğer, on PAH'ın metanol eklenmiş numunede

daha yüksek geri kazanım oranlarına sahip olduğu görülmüştür. Numune hacmi 1000 mL ve son konsantrasyon hacmi 1 mL olan örnek ile 500 mL numune ve 0,5 mL son konsantrasyon hacmi olan örneğin karşılaştırılmasında Act, Fln, BkF ve BaP'ta yarı yarıya azaltılmış numune ve son konsantrasyon hacmine sahip örnekte daha yüksek geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Diğer on bir PAH'ın geri kazanım değerlerinin numune hacmi1000 mL ve son konsantrasyon hacmi 1 mL örnekte daha yüksek olduğu belirtilmiştir.

Sibiya vd. (2012), Nap, Act, Phe, Pyr ve Chr PAH'ları için katı faz ekstraksiyonda kartuştan geçirilen numune miktarının geri kazanıma etkisini incelemiştir. 100, 150 ve 200 mL'lik numune hacimleri kartuştan geçirilerek ortalama geri kazanım değerleri grafik ile karşılaştırılmıştır. Altı PAH içinde en yüksek geri kazanım değeri 200 mL'lik numune hacminde elde edilmiştir. Numune hacminin artmasıyla geri kazanımın da arttığı belirtilmiştir.

Limam ve Driss (2013) tarafından sulu matrikslerde SPE ön işlemi kullanarak yapılan PAH analizlerinde Nap, Acn, Act, Pyr, Chr, DahA ve IcdP için C18 kartuşta alınan verimler sırasıyla %88,08, %87,95, %82,68, %48,58, %26,38, %9,37 ve %12,44'tür. Asetonitril (ACN) ile numune şişesinin yıkanıp elüsyona katılmasıyla elde edilmiş yeni geri kazanım yüzdeleri %88,40, %88,48, %84,10, %53,96, %40,11, %20,60 ve %34,85 olarak verilmiştir. Yine aynı çalışmada numuneye %0,5 metanol eklenerek elde edilmiş geri kazanım yüzdeleri %95,67, %101,48, %97,19, %79,13, %71,83, %50,72 ve %61,17'dir. Daha sonra %10 metanol eklenerek tekrarlanan çalışmada ise geri kazanım değerleri sırasıyla %26,04, %53,41, %50,51, %84,60, %80,40, %62,04 ve %67,48 olarak verilmiştir.

Huang vd. (2013), tarafından toprakta bulunan PAH'ların analizi için HPLC'de PDA ve FL dedektörlerin dedeksiyon limitleri incelemiştir. EPA'nın öncelikli on beş PAH'ı için yapılan analizler sonucunda FL dedektör en düşük Nap parametresinde 15 kat, en yüksek BaP parametresinde 820 kat daha hassas analiz yaptığı belirtilmiştir. On beş parametrenin dedeksiyon limitlerinin ortalamaları alındığında FL dedektörün PDA detektörden 225 kat daha hassas analiz yaptığı görülmüştür.

# 3. MATERYAL ve YÖNTEM

## 3.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

### 3.1.1. UHPLC cihazı

Bu çalışmada Perkin Elmer marka Flexar UHPLC cihazı kullanılmıştır. Cihaz pompa, kolon fırını, dedektörler, otomatik örnekleyici ve degasser sistemi olmak üzere toplam beş bölümden oluşmaktadır. Dörtlü pompa sistemi 18000 psi'a kadar basınç oluşturabilmektedir. Otomatik örnekleyici 1 µL'ye kadar enjeksiyon yapabilmektedir. Otomatik örnekleyici içerisinde buluna peltier fırın sayesinde numunlerin 4 °C ile 40 °C arasında sıcaklığı değiştirilebilmektedir. Kolon fırını 5 °C ile 90 °C arasında ısıtma ve soğutma özelliğine sahiptir. Yapısında bulunan FL ve PDA dedektörleri ile ayrı ayrı veya bütünleşik olarak analiz yapılabilmektedir. Analiz prosesinin takibini ve kontrolünü sağlayan Chromera isimli program ile kromatogramlar anlık olarak görüntülenebilmektedir. Farklı analizlere ait kromatogramlar üst üste çakıştırılarak sonuçlar arası karşılaştırma yapılabilmesine olanak sağlamaktadır. Cihaza ait görsel Şekil 3.1'de verilmiştir.



**Şekil 3.1.** UHPLC cihazı

### 3.1.2. Katı faz ekstraksiyon cihazı (SPE)

Dionex marka AutoTrace 280 model SPE cihazı kullanılmıştır. Cihaz aynı anda altı numune çalışabilir kapasitede olup, bilgisayar desteğinde sunduğu program sayesinde tüm ekstraksiyon koşullarında değişiklik yapılabilmesine imkân sağlamaktadır. Çözücü hatları ile numune hatlarının farklı olması çapraz kontaminasyonu engellemektedir. Cihazın gaz girişi bulunmakta olup bu sayede kartuşlar azot gazı ile kurutulabilmektedir. Cihazın on iki yollu valf sisteminin olması aynı anda altı numune çalışabilmesini sağlamaktadır. Elüsyon basamağında kartuşa uygulanan pozitif basınç sayesinde vakum pompasına gerek kalmadan çalışmaktadır. Çalışmada kullanılan SPE cihazı Şekil 3.2'de verilmektedir.



**Şekil 3.2.** SPE cihazı

### 3.1.3. Evaporatör cihazı

SPE sonrası yapılan çözücü uçurma işleminde Biotage marka TurboVap LV model evaporatör kullanılmıştır. Şekil 3.3'te görüleceği üzere 45 $^{0}$C'lik açıyla konumlandırılmış hava kanalları azot gazının direkt numune ile temasını keserek analit kaybını önlemektedir. Cihazda bulunan su banyosunda sıcaklık ve azot gazı için de basınç ayarı yapılabilmektedir. Uçurma işleminin gerçekleştirildiği cihaz Şekilde 3.3'te verilmiştir.




**Şekil 3.3.**Evaporatör cihazı

### 3.1.4. Azot jeneratörü

Cland Brezza marka Nigen LC MS 40-1 model azot jeneratöründen elde edilen saf azot gazı edilmiştir. Elde edilen azot gazı ile SPE kartuşları kurutulmuş ve buharlaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.1.5. Ultra saf su cihazı

Spike çözeltiler Merck Milli-Q IQ 7000 Ultrapure cihazında temin edilen ultra saf su ile hazırlanmıştır.

### 3.1.6. Vortex karıştırıcı

Tam kuruma yapılan uçurma işleminden sonrası çözücü değişimi için eklenen ACN'in SPE vialine daha iyi teması için Velp marka ZX3 model vortex karıştırıcı kullanılmıştır.

## 3.2. Kullanılan Kimyasal ve Çözeltiler

### 3.2.1. Kimyasallar

Dr. Ehrenstorfer GmbH PAH-Mix 9 (10 µg/mL)
Dr. Ehrenstorfer GmbH tekli PAH standartları
Merck acetonitrile gradient grade for liquid chromatography
Merck methanol gradient grade for liquid chromatography

Merck water for liquid chromatography

Merck dicholoromethane for liquid chromatography

Dionex C 18 PAH SPE kartuş 1 g 6 mL

Supelco Supelclean ENVI-18 SPE kartuş 1 g 6 mL

Supelco Supelclean LC-18 SPE kartuş 1 g 6 mL

Oasis HLB (Hidrofilik Lipofilik Dengeli) SPE kartuş 1 g 6 mL

Isolute C 18 SPE kartuş 1 g 6 mL

Thermo Scientific HyperSep C 18 SPE kartuş 1 g 6 mL

Attract DVB (Divinilbenzen) SPE kartuş 1 g 6 mL

Thermo Scientific HyperSep CN (Siyano) SPE kartuş 1 g 6 mL

Thermo Scientific HyperSep Phenyl SPE kartuş 1 g 6 mL

Brownlee Analytical PAH Kolon (150 mm x 3,2 mm x 5,0 µm, por boyutu: 110 Å)

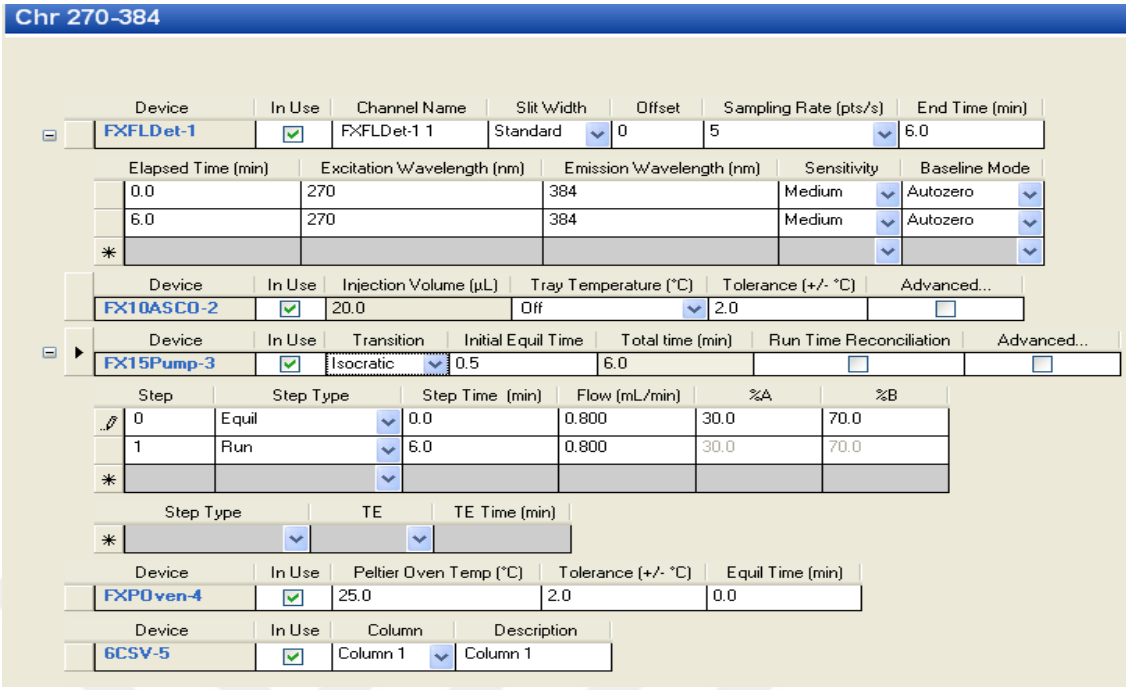
### 3.2.2. Stok çözeltiler

10 µg/mL Dr. Ehrenstorfer GmbH PAH-Mix 9 standart çözeltisinden 100 mL, 100 ppb (milyarda bir kısmı) ana stok ve bu ana stok çözeltiden 100 mL 0,1, 1, 2, 5, 7 ve 10 ppb'lik ara stok çözeltileri hazırlanmıştır.

## 3.3. Yöntem

### 3.3.1. Kromatografik koşullar

UHPLC'de yapılan tüm analizlerde Brownlee Analytical PAH (150 x 3.2 mm, 5 µm partikül boyutu) kolonu kullanılmıştır. Analizler sırasında kolon fırını 25 $^{o}$C'ye ayarlanmıştır. İzokratik akış (30/70 v/v, mobil faz A ve mobil faz B) kullanılmış olup mobil faz A su ve mobil faz B ise asetonitrildir. Dalga boyu optimizasyonu için yapılan tüm analizler 0.8 mL/dk'lık akış hızında ve 20 µL enjeksiyon hacminde çalışılmıştır. Süper düşük, düşük, orta, yüksek ve süper yüksek olarak beş kademeli dedektör hassasiyetine sahip dedektörde dalga boyu çalışmaları için "orta" seviye dedektör hassasiyeti ile gerçekleştirilmiştir. Yüksek derişimde analiz yapıldığında pik boylarında kesilme olmaması için orta seviye tercih edilmiştir. Metot tamamlandıktan sonra yapılan LOD ve LOQ çalışmaları için "süper yüksek" seviye tercih edilmiştir. Buradaki amaç cihazın tam performansını görebilmektir. Dalga boyu analizlerinde kullanılan örnek HPLC metodu Şekil 3.4'te verilmiştir.




**Şekil 3.4.** Dalga boyu analizlerinde kullanılan örnek HPLC metodu

### 3.3.2. Dalga boyu optimizasyon çalışmaları

Poliaromatik hidrokarbonların pik boylarını ve alanlarını geliştirmek için en uygun uyarılma (ex) ve emisyon (em) dalga boylarını tespit etmek gerekmektedir. Literatürde HPLC'de FL dedektörde yapılmış analizler taranarak kromatografik koşulları tespit edilmiştir. Tüm deneysel çalışmalarda pik ayrımları ve alıkonma zamanlarının bulunmasında sertifikalı referans malzemeler kullanıldığından, ex/em çiftlerinin tespitinde matriks farkı göz ardı edilmiştir. Bu sayede hemen hemen her matrikse ait ex/em çiftleri tespit edilmiş, çakışan dalga boyu çiftleri elenerek analiz listeleri oluşturulmuştur. Bu bağlamda üç yüz on iki adet farklı dalga boyu çiftleri tespit edilmiş ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Her PAH'ın analizlerinde elde edilen tüm kromatogramları üst üste çakıştırılarak en yüksek pik boyuna ulaştığı dalga boyu değerleri belirlenmiştir. Tespit edilen ex ve em değerlerine göre kalibrasyon grafiği oluşturulmuş ve tekrarlanabilirlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen standart sapmalara göre LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. Analizleri gerçekleştirilen dalga boyu çiftleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Literatürde tespit edilen ex/em dalga boyları (Jing vd., 2014; Jing vd., 2017; Bruzzoniti vd., 2010; Williamson vd., 2002; Delhomme vd., 2007; Kayali-Sayadi vd., 1996; Silva vd., 2017; Berset vd., 1999; Pagliuca vd., 2003; Okuda vd., 2006; Pensado vd., 2004; Zhang vd., 2010; Ishizaki vd., 2010; Ishizaki vd., 2011 Fernandez vd., 2015; Yang vd., 2008; Veiga vd., 2014; Denis vd., 2012; Huang vd., 2013; Windal vd., 2008; Sikalos vd., 2002; Janska vd., 2006; Varian, 2009; Wegrzyn vd., 2006; Williams vd., 1994; Gerstel, 2002; Waters, 2019; Dionex, 1994; Wang ve Campiglia, 2008; International Organization for Standardization, 2002)

| **Nap** | **Act** | **Fln** | **Phe** | **Ant** | **Flt** | **Pyr** | **BaA** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 215/330 | 220/325 | 263/310 | 247/364 | 247/401 | 280/460 | 236/389 | 275/389 |
| 219/330 | 224/320 | 265/310 | 250/365 | 248/405 | 280/450 | 237/385 | 281/391 |
| 220/330 | 220/320 | 275/315 | 250/366 | 250/402 | 281/453 | 238/398 | 277/393 |
| 217/338 | 276/330 | 270/323 | 247/357 | 250/406 | 232/445 | 270/390 | 284/390 |
| 221/337 | 275/330 | 279/306 | 250/368 | 250/380 | 237/460 | 240/386 | 270/390 |
| 222/329 | 280/324 | 280/324 | 246/370 | 252/402 | 270/450 | 332/378 | 270/410 |
| 224/330 | 280/330 | 275/330 | 244/370 | 252/400 | 270/440 | 254/390 | 270/384 |
| 224/320 | 225/315 | 276/330 | 252/365 | 250/408 | 270/470 | 240/400 | 270/385 |
| 267/330 | 227/315 | 234/320 | 240/360 | 251/378 | 284/467 | 246/375 | 268/398 |
| 275/330 | 235/332 | 280/330 | 252/370 | 248/375 | 237/440 | 334/371 | 267/385 |
| 277/330 | 290/337 | 225/315 | 252/372 | 250/375 | 285/465 | 252/400 | 287/386 |
| 270/323 | 270/323 | 250/341 | 246/375 | 254/402 | 280/420 | 248/375 | 260/390 |
| 277/337 | 292/322 | 227/315 | 248/375 | 250/420 | 288/450 | 276/391 | 290/395 |
| 276/323 | 234/320 | 224/320 | 250/380 | 255/380 | 238/418 | 238/418 | 254/390 |
| 280/330 | 275/350 | 220/325 | 254/375 | 238/418 | 290/447 | 250/420 | 290/404 |
| 278/322 | 280/355 | 290/337 | 275/350 | 240/430 | 337/440 | 237/440 | 265/380 |
| 280/324 | 275/315 | 275/350 | 280/355 | 244/370 | 260/420 | 270/440 | 260/420 |
| 275/350 | 265/360 | 265/360 | 240/400 | 252/372 | 250/420 | - | 240/400 |
| 280/355 | 250/341 | 280/355 | 252/400 | 250/368 | 365/462 | - | 277/376 |
| 248/375 | 248/375 | 240/368 | 294/347 | 260/420 | 240/400 | - | 238/398 |
| - | - | 248/375 | 297/367 | - | 252/402 | - | - |
| - | - | | - | - | 252/400 | - | - |
| - | - | - | - | - | 248/375 | - | - |
| - | - | - | - | - | - | - | - |
| - | - | - | - | - | - | - | - |

**Çizelge 3.1.** Literatürde tespit edilen ex/em dalga boyları (devam)

| Chr | BbF | BkF | BaP | DahA | BghiP | IcdP |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 260/381 | 256/446 | 295/410 | 260/408 | 290/398 | 290/415 | 248/484 |
| 264/381 | 258/442 | 290/412 | 288/406 | 285/396 | 290/410 | 290/499 |
| 265/380 | 254/451 | 290/410 | 281/407 | 294/398 | 290/418 | 290/500 |
| 260/370 | 249/443 | 296/426 | 290/410 | 285/404 | 292/415 | 250/470 |
| 267/385 | 280/438 | 243/412 | 280/410 | 290/418 | 290/420 | 293/498 |
| 260/390 | 255/420 | 302/431 | 295/405 | 290/420 | 294/425 | 300/500 |
| 270/384 | 266/425 | 294/425 | 295/410 | 290/415 | 295/410 | 302/500 |
| 270/385 | 290/430 | 303/432 | 266/415 | 289/422 | 285/416 | 274/507 |
| 270/367 | 260/420 | 290/430 | 290/430 | 290/410 | 289/422 | 293/493 |
| 269/361 | 294/425 | 300/440 | 266/425 | 298/398 | 295/425 | 302/510 |
| 254/390 | 298/436 | 288/406 | 297/405 | 295/405 | 295/405 | 300/470 |
| 270/390 | 300/440 | 307/413 | 260/420 | 296/404 | 290/430 | 305/480 |
| 268/398 | 300/445 | 255/420 | 298/407 | 295/410 | 296/406 | 300/466 |
| 277/376 | 302/452 | 266/415 | 250/400 | 295/425 | 285/404 | 300/464 |
| 270/410 | 290/410 | 260/420 | 255/420 | 300/400 | 296/404 | 300/465 |
| 260/420 | 250/400 | 266/425 | 298/404 | 268/398 | 300/415 | 268/398 |
| 277/393 | 268/398 | 250/400 | 268/398 | 300/415 | 260/420 | 296/404 |
| 240/400 | - | 256/446 | 294/425 | 290/430 | 302/419 | 300/440 |
| 238/398 | - | 260/460 | 296/406 | 260/420 | 300/440 | 250/495 |
| 290/404 | - | 268/398 | 256/446 | 300/440 | 268/398 | 245/500 |
| - | - | - | 260/460 | 234/420 | 305/420 | 250/500 |
| - | - | - | 300/440 | 300/469 | 234/420 | 246/503 |
| - | - | - |  | 300/470 | 300/465 | 251/510 |
| - | - | - | - | - | 300/470 | - |
| - | - | - | - | - | 302/500 | - |

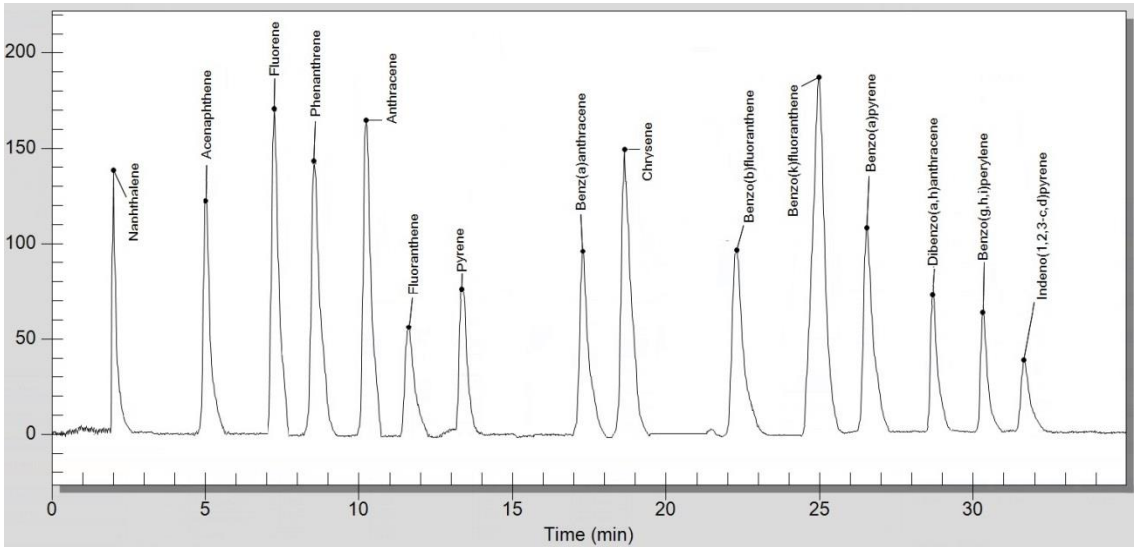
### 3.3.3. Piklerin ayrım çalışması

On beş PAH'ın piklerinin ayrımı ve rezülasyonu miktar analizleri için büyük önem taşımaktadır. Kalibrasyon eğrilerinin çizilip kantitatif analize başlamadan önce pik ayrımlarının tam olarak gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu doğrultuda tüm piklerin ayrımının sağlanması için gradyan (basamaklı) çalışma yapılmıştır. Mobil fazların polarite farklarından yararlanarak piklerin ayrımı gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.2'de akış basamakları faz oranları ile birlikte verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** PAH'ların ayrımında kullanılan UHPLC metodu

| Zaman(dk) | Su | ACN | Akış(mL/dk) |
|---|---|---|---|
| 0 | 60 | 40 | 0.8 |
| 6 | 25 | 75 | 0.7 |
| 15 | 10 | 90 | 0.8 |
| 24 | 0 | 100 | 1.0 |
| 35 | 60 | 40 | 0.8 |

Yukarıda akış ve faz oranları verilen gradyan çalışma sonucu PAH piklerinin ayrımları tam olarak sağlanmış olup kantitatif analizler bu metot kullanılarak yapılmıştır. On beş PAH'ın piklerinin ayrımına dair kromatogram Şekil 3.5'te verilmiştir.




**Şekil 3.5.** PAH piklerinin ayrımını gösteren örnek kromatogram

### 3.3.4. SPE optimizasyon çalışmaları

SPE optimizasyonları kartuş seçimi, çözücü seçimi ve SPE sonrası azot altında uçurmada kullanılan sıcaklık ve basınç başlıkları altında gerçekleştirilmiştir. Tüm analizler üç tekrarlı yapılmış elde edilen sonuçların ortalamaları ve standart sapmaları kullanılmıştır. SPE ön işlemine dair her optimizasyon aşamasında 1000 mL'lik ultra saf suya 10 ppb'lik standart eklenerek spike çözeltiler hazırlanmış ve aynı SPE metodu ile analizler gerçekleştirilmiştir. Bu analizlere ait geri kazanım değerleri ile karşılaştırmalar yapılmıştır.

SPE metodunda ilk olarak kartuş ile matriks arasındaki polarite farkının ortadan kaldırmak için şartlandırma yapılmıştır. 10'ar mL diklorometan (DCM), metanol ve ultra saf su kartuşlardan geçirilerek şartlandırma tamamlanmış böylece kartuş ile örnek aynı polariteye sahip olmuştur. 30 mL/dk akış hızı ile 1000 mL spike çözelti kartuştan geçirilerek içerisindeki PAH'ların kartuşa tutunması sağlanmıştır. DCM ile yapılacak elüsyon işlemi sonrası elüentte faz farkı oluşmaması adına kartuşlar 7 dakika boyunca azot gazı ile kurutulmuştur. Sonrasında 5 mL DCM ile kartuşlar ıslatılarak yavaş elüsyon başlatılmıştır. Daha sonra 9 mL DCM ile hızlı sıyırma yapılarak elüsyon işlemi tamamlanmıştır. Azot altında gerçekleştirilen tam kurutma işlemi sonrası viale 2 mL ACN eklenmiş, vortex cihazı yardımıyla cam çeperine tutunan PAH'lar ACN'ye alınmış ve analize hazır hale getirilmiştir.

Kartuş seçimi sırasında dört farklı C18, fenil, CN ve SDVB kartuşlarının analizleri gerçekleştirilmiştir. Kartuş dolgu maddelerin farklılıklarının geri kazanıma etkisi tespit edilmeye çalışılmıştır. Uçurma işlemi sırasında kullanılacak sıcaklık değerinin tespiti için literatürde karşılaşılan 30, 33, 35, 37 ve 40 $^{0}$C değerleri çalışma aralığı olarak belirlenmiştir. Çözücülerin karşılaştırılması sırasında kullanılan 13 mL'lik elüsyon hacimi için 14 psi üzeri denemelerde basınçtan dolayı taşma oluşmuştur. Bu yüzden en yüksek basınç olarak 14 psi, uçurma süresinin uzamaması içinde en düşük 10 psi belirlenmiştir. Bu şekilde 10, 11, 12, 13, 14 psi'lık çalışma aralığı belirlenmiştir. Çözücü seçimi içimi literatürde ve uygulama notlarında karşılaşılan çözücüler ve bunların karışımları kullanılmıştır.

### 3.3.5. Sonuçların standart metotlarla karşılaştırılması

UHPLC ve SPE kısımlarında yapılan optimizasyonlar sonrası hazırlanan inovatif metot uluslararası iki standart metot ile karşılaştırılmıştır. Standart metotlar seçilirken Türkiye Akreditasyon Kurumu'nun çevre laboratuvarları için akredite edilecek kapsam beyanı rehberi dikkate alınmıştır. Bu rehberde sularda HPLC ile yapılan PAH analizleri için tavsiye edilen EPA 550.1 ve Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO) 17993:2002 metotları seçilmiştir.

EPA 550.1 metodu ön işlem olarak katı faz ekstrasyonu (disk yöntemi), analiz yöntemi olarak olarak HPLC'yi kullanmıştır. HPLC'de on altı PAH'ın analizleri için Uv ve FL dedektörleri bütünleşik olarak kullanılmıştır. Nap, Act ve Fln analizler uv'de diğer on üç PAH FL dedeltörde analiz edilmiştir. Uv'de analizler 254 nm'de gerçekleştirilirken FL dedektörde uyarılma dalga boyu 280 nm, emisyon dalga boyu olarak 389 nm kullanılmıştır. ISO 17993 metodu ön işlem olarak sıvı sıvı ekstraksiyon, analiz yöntemi olarak HPLC'yi kullanmaktadır. HPLC'de on altı PAH'ın analizleri için FL dedektörü kullanılmıştır. On beş PAH EPA'nın öncelikli kirliteciler listesinde olup ek olarak 6-Metilkrisen'in de analizi gerçekleştirilmiştir. Metotta kullanılan uyarılma ve emisyon dalga boyları Nap, Act, Fln ve Phe için 275/350 nm, Ant, BaA ve Chr için 260/420 nm, Flt, Pyr 260/420 nm, BbF, BkF, BaP, DahA ve BghiP için 290/430 nm, IcdP için 250/500 nm olarak kullanılmıştır.

EPA 550.1'de disk yöntemi katı faz ekstraksiyonda DCM, metanol, su ile şartlandırma gerçekleştikten sonra 1 L numune diskten geçirilmektedir. Vakum sistemi ile 10 dk kurutulan diskten 12 mL DCM geçirilerek elüsyon tamamlanmaktadır. Oluşabilecek faz farkını önlemek için elüsyon sodyum sülfattan geçirilerek süzülmektedir. Azot gazı altında uçurulmaya alınan ekstrakt 1 mL hacme kadar deriştirilir. Daha sonra 3 mL ACN eklenir ve son hacim 0,5 mL oluncaya uçurmaya devam edilmektedir. ISO 17993'te 1 L numuneye 25 mL hekzan eklenerek bir saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmaktadır. Hekzan sulu kısımdan ayrıldıktan sonra sodyum sülfattan gerçirilerek kurutulmaktadır. Ekstrakt 30 $^{0}$C ve 2,9 psi basınç altında son hacim 2 mL oluncaya kadar uçurulmaktadır.

# 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

## 4.1. UHPLC Dalga Boyu Optimizayonu

Her PAH parametresi için Çizelge 3.1'de verilen dalga boyu çiftlerine ait analizler gerçekleştirilmiştir. Tüm analizler tamamlandıktan sonra optimum dalga boyu değerlerini pik boylarının en yüksek olduğu flu (Floresans Birimi) cinsinden tespit edilmiştir. "Flu" UHPLC cihazına ait analiz programının bize verdiği floresan absorbansının pik boyu cinsinden değeridir. Tüm PAH parametreleri için gerçekleştirilen dalga boyu analizleri ve onlara ait sonuçların flu cinsinden değeri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1**. Dalga boyu optimizasyon analiz sonuçları

| PAH analiz sonuçları | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nap** | **Flu** | **Act** | **Flu** | **Fln** | **Flu** | **Phe** | **Flu** | **Ant** | **Flu** |
| 215/330 | 185 | 220/325 | 518 | 263/310 | 930 | 247/364 | 191 | 247/401 | 745 |
| 219/330 | 176 | 224/320 | 400 | 265/310 | 886 | 250/365 | 180 | 248/405 | 663 |
| 220/330 | 166 | 220/320 | 385 | 275/315 | 443 | 250/366 | 178 | 250/402 | 653 |
| 217/338 | 164 | 276/330 | 210 | 270/323 | 415 | 247/357 | 176 | 250/406 | 580 |
| 221/337 | 139 | 275/330 | 205 | 279/306 | 391 | 250/368 | 173 | 250/380 | 544 |
| 222/329 | 137 | 280/324 | 198 | 280/324 | 207 | 246/370 | 172 | 252/402 | 524 |
| 224/330 | 110 | 280/330 | 185 | 275/330 | 200 | 244/370 | 168 | 252/400 | 520 |
| 224/320 | 82 | 225/315 | 183 | 276/330 | 168 | 252/365 | 166 | 250/408 | 518 |
| 267/330 | 73 | 227/315 | 162 | 234/320 | 135 | 240/360 | 155 | 251/378 | 468 |
| 275/330 | 71 | 235/332 | 155 | 280/330 | 134 | 252/370 | 149 | 248/375 | 462 |
| 277/330 | 66 | 290/337 | 155 | 225/315 | 115 | 252/372 | 139 | 250/375 | 415 |
| 270/323 | 65 | 270/323 | 142 | 250/341 | 113 | 246/375 | 138 | 254/402 | 410 |
| 277/337 | 60 | 292/322 | 140 | 227/315 | 105 | 248/375 | 138 | 250/420 | 326 |
| 276/323 | 59 | 234/320 | 128 | 224/320 | 92 | 250/380 | 110 | 255/380 | 297 |
| 280/330 | 56 | 275/350 | 109 | 220/325 | 85 | 254/375 | 110 | 238/418 | 267 |
| 278/322 | 53 | 280/355 | 95 | 290/337 | 66 | 275/350 | 50 | 240/430 | 255 |
| 280/324 | 50 | 275/315 | 63 | 275/350 | 34 | 280/355 | 47 | 244/370 | 229 |
| 275/350 | 36 | 265/360 | 40 | 265/360 | 24 | 240/400 | 37 | 252/372 | 228 |
| 280/355 | 22 | 250/341 | 34 | 280/355 | 16 | 252/400 | 37 | 250/368 | 120 |
| 248/375 | 3 | 248/375 | 4 | 240/368 | 7 | 294/347 | 17 | 260/420 | 61 |
| - | - | - | - | 248/375 | 5 | 297/367 | 14 | - | - |
| - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

**Çizelge 4.1**. Dalga boyu optimizasyon analiz sonuçları (devam)

| PAH analiz sonuçları | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Flt** | **Flu** | **Pyr** | **Flu** | **BaA** | **Flu** | **Chr** | **Flu** | **BbF** | **Flu** |
| 280/450 | 50 | 237/385 | 126 | 281/391 | 240 | 264/381 | 163 | 258/442 | 138 |
| 281/453 | 48 | 238/398 | 113 | 277/393 | 235 | 265/380 | 155 | 254/451 | 127 |
| 232/445 | 44 | 270/390 | 109 | 284/390 | 211 | 260/370 | 148 | 249/443 | 125 |
| 237/460 | 43 | 240/386 | 108 | 270/390 | 199 | 267/385 | 130 | 280/438 | 111 |
| 270/450 | 43 | 332/378 | 97 | 270/410 | 194 | 260/390 | 118 | 255/420 | 106 |
| 270/440 | 41 | 254/390 | 89 | 270/384 | 173 | 270/384 | 104 | 266/425 | 106 |
| 270/470 | 41 | 240/400 | 88 | 270/385 | 170 | 270/385 | 101 | 290/430 | 102 |
| 284/467 | 38 | 246/375 | 62 | 268/398 | 155 | 270/367 | 100 | 260/420 | 99 |
| 237/440 | 36 | 334/371 | 61 | 267/385 | 154 | 269/361 | 95 | 294/425 | 87 |
| 285/465 | 35 | 252/400 | 59 | 287/386 | 152 | 254/390 | 87 | 298/436 | 81 |
| 280/420 | 25 | 248/375 | 58 | 260/390 | 120 | 270/390 | 77 | 300/440 | 76 |
| 288/450 | 25 | 276/391 | 57 | 290/395 | 108 | 268/398 | 64 | 300/445 | 75 |
| 238/418 | 18 | 238/418 | 47 | 254/390 | 105 | 277/376 | 40 | 302/452 | 62 |
| 290/447 | 18 | 250/420 | 23 | 290/404 | 101 | 270/410 | 35 | 290/410 | 61 |
| 337/440 | 15 | 237/440 | 12 | 265/380 | 77 | 260/420 | 27 | 250/400 | 44 |
| 260/420 | 14 | 270/440 | 10 | 260/420 | 75 | 277/393 | 26 | 268/398 | 34 |
| 250/420 | 13 | - | - | 240/400 | 46 | 240/400 | 16 | - | - |
| 365/462 | 8 | - | - | 277/376 | 43 | 238/398 | 15 | - | - |
| 240/400 | 4 | - | - | 238/398 | 42 | 290/404 | 10 | - | - |
| 252/402 | 4 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 252/400 | 3 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 248/375 | T.E. | - | - | - | - | - | - | - | - |
| **BkF** | **Flu** | **BaP** | **Flu** | **DahA** | **Flu** | **BghiP** | **Flu** | **IcdP** | **Flu** |
| 295/410 | 617 | 260/408 | 317 | 290/398 | 137 | 290/415 | 76 | 248/484 | 16 |
| 290/412 | 566 | 288/406 | 312 | 285/396 | 136 | 290/410 | 74 | 290/499 | 13 |
| 290/410 | 560 | 281/407 | 311 | 294/398 | 124 | 290/418 | 73 | 290/500 | 13 |
| 296/426 | 541 | 290/410 | 294 | 285/404 | 109 | 292/415 | 73 | 250/470 | 12 |
| 243/412 | 528 | 280/410 | 289 | 290/418 | 106 | 290/420 | 72 | 293/498 | 12 |
| 302/431 | 527 | 295/405 | 228 | 290/420 | 106 | 294/425 | 64 | 300/500 | 12 |
| 294/425 | 526 | 295/410 | 222 | 290/415 | 105 | 295/410 | 64 | 302/500 | 12 |
| 303/432 | 508 | 266/415 | 207 | 289/422 | 102 | 285/416 | 61 | 274/507 | 12 |
| 290/430 | 501 | 290/430 | 207 | 290/410 | 95 | 289/422 | 59 | 293/493 | 11 |
| 300/440 | 486 | 266/425 | 189 | 298/398 | 92 | 295/425 | 59 | 302/510 | 11 |
| 288/406 | 471 | 297/405 | 187 | 295/405 | 88 | 295/405 | 54 | 300/470 | 10 |
| 307/413 | 441 | 260/420 | 180 | 296/404 | 87 | 290/430 | 52 | 305/480 | 10 |
| 255/420 | 304 | 298/407 | 171 | 295/410 | 82 | 296/406 | 50 | 300/466 | 8 |
| 266/415 | 292 | 250/400 | 170 | 295/425 | 74 | 285/404 | 49 | 300/464 | 7 |
| 260/420 | 275 | 255/420 | 168 | 300/400 | 74 | 296/404 | 45 | 300/465 | 7 |
| 266/425 | 260 | 298/404 | 166 | 268/398 | 59 | 300/415 | 38 | 268/398 | T.E. |
| 250/400 | 219 | 268/398 | 160 | 300/415 | 59 | 260/420 | 34 | 296/404 | T.E. |
| 256/446 | 207 | 294/425 | 160 | 290/430 | 58 | 302/419 | 31 | 300/440 | T.E. |
| 260/460 | 122 | 296/406 | 122 | 260/420 | 24 | 300/440 | 23 | 250/495 | T.E. |
| 268/398 | 120 | 256/446 | 70 | 300/440 | 22 | 268/398 | 21 | 245/500 | T.E. |
| - | - | 260/460 | 53 | 234/420 | 9 | 305/420 | 21 | 250/500 | T.E. |
| - | - | 300/440 | 48 | 300/469 | 5 | 234/420 | 12 | 246/503 | T.E. |
| - | - | - | - | 300/470 | 4 | 300/465 | 8 | 251/510 | T.E. |
| - | - | - | - | - | - | 300/470 | 5 | - | - |
| - | - | - | - | - | - | 302/500 | 1 | - | - |

Dalga boyu çalışmalarında dokuz dalga boyu çiftinde pik tespit edilmemiştir. Bu dalga boyu çiftleri Flt ve IcdP'ye aittir. BaA ve BaP flu sonuçları açısından dengeli bir dağılım sağlarken, en yüksek flu değeri Fln'de gözlemlenmiştir. Tüm dalga boyu çiftleri incelendiğinde en düşük flu değerlerinin IcdP'ye ait olduğu görülmüştür. Çok yakın ex/em dalga boyu çiftlerinde farklı floresans özellikler gösterildiği tespit edilmiştir. Fln'nin 275/330 nm ve 276/330 nm dalga boylarında yapılan analizlerinin sonuçları incelendiğinde, uyarılma dalga boyu değerindeki 1 nm'lik bir değişikliğin 32 flu birimlik bir farka neden olduğu görülmüştür. BaA'nın 270/384 nm ve 270/385 nm dalga boylarında yapılan analiz sonuçlarında, emisyon değerindeki 1 nm'lik bir değişikliğin 3 flu birimlik bir farka neden olduğu görülmüştür. BkF, Ant ve BaP'nin tespit edilen tüm dalga boyu çiftlerinde iyi floresans özellik gösteren PAH'lar olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca düz zincirli yapıda olan PAH'lar, dallanmış yapıdaki PAH'lardan daha iyi floresans özellik göstermiştir.

Tespit edilen optimum dalga boyu çiftleri kullanılarak kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır. Kalibrasyon için altı nokta seçilmiş olup, bu noktalar 0,1, 1, 3, 5, 7 ve 10 μg $L^{-1}$ olacak şekilde ayarlanmıştır. Kalibrasyon eğri çiziminin tamamlanmasından sonra 2 μg $L^{-1}$ spike çözeltiler hazırlanarak tüm analitik proses takip edilerek analizler gerçekleştirilmiş ve bu analizler sonucunda elde edilen standart sapmadan LOD ve LOQ değerleri elde edilmiştir. LOD değeri standart sapmanın üç katı, LOQ değeri standart sapmanın on katı olarak hesaplanmıştır. Hesap yöntemi ile elde edilen LOD değerlerinin doğrulaması da yapılmıştır. Boş bir numuneye, önceden tespit edilen LOD derişim seviyesinde analit eklenmiştir. Boş numune ve analit eklenmiş numune ara kesinlik koşullarında tüm ölçüm prosedürü izlenerek analiz edilmiştir. Analit eklenmiş numunelere cihazın verdiği yanıtın ortalaması, boş numunelere cihazın verdiği en yüksek yanıttan büyük ise hesaplanan/önceden tespit edilen LOD değerinin doğruluğu bu şekilde kanıtlanmıştır. Ayrıca her LOD değeri için gerçekleştirilen analiz sonucu bu seviyeye ait pikler gözlemlenlenerek doğrulama sağlanmıştır. PAH'ların optimum ex/em dalga boyu çiftleri, optimum pik yükseklikleri, kalibrasyon eğrisi denklemleri, lineer aralıkları, $R^2$ (belirleme katsayısı) değerleri, LOD ve LOQ konsantrasyonları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Regresyon denklemi, $R^2$, LOD, LOQ ve lineer aralık

| | Ex/Em | Flu | $R^2$ | Regresyon Denklemi | Doğrusal Aralık (µg $L^{-1}$) | LOD (µg $L^{-1}$) | LOQ (µg $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nap | 215/330 | 185 | 0,99986 | y=13,28x+28,16 | 0,1-10 | 0,003 | 0,010 |
| Act | 222/329 | 593 | 0,99980 | y=16,34x+45,11 | 0,1-10 | 0,002 | 0,007 |
| Fln | 263/310 | 930 | 0,99992 | y=5,32x+17,07 | 0,1-10 | 0,002 | 0,007 |
| Phe | 247/364 | 191 | 0,99973 | y=12,5x+29,10 | 0,1-10 | 0,009 | 0,030 |
| Ant | 247/401 | 617 | 0,99994 | y=31,45x+124,4 | 0,1-10 | 0,005 | 0,007 |
| Flt | 280/460 | 51 | 0,99987 | y=7,1x+14,30 | 0,1-10 | 0,009 | 0,030 |
| Pyr | 236/389 | 135 | 0,99989 | y=3,112x+6,98 | 0,1-10 | 0,015 | 0,050 |
| BaA | 275/389 | 241 | 0,99991 | y=7,45x+14,20 | 0,1-10 | 0,015 | 0,050 |
| Chr | 260/381 | 167 | 0,99995 | y=11,35x+28,15 | 0,1-10 | 0,015 | 0,050 |
| BbF | 256/446 | 139 | 0,99988 | y=17,10x+37,11 | 0,1-10 | 0,015 | 0,050 |
| BkF | 295/410 | 617 | 0,99992 | y=5,31+10,55 | 0,1-10 | 0,006 | 0,020 |
| BaP | 260/408 | 317 | 0,99989 | y=3,35x+6,55 | 0,1-10 | 0,009 | 0,030 |
| DahA | 290/398 | 137 | 0,99994 | y=6,06x+8,35 | 0,1-10 | 0,020 | 0,007 |
| BghiP | 290/415 | 76 | 0,99901 | y=12,2x+10,56 | 0,1-10 | 0,025 | 0,083 |
| IcdP | 248/484 | 16 | 0,99980 | y=7,28x+14,30 | 0,1-10 | 0,090 | 0,297 |

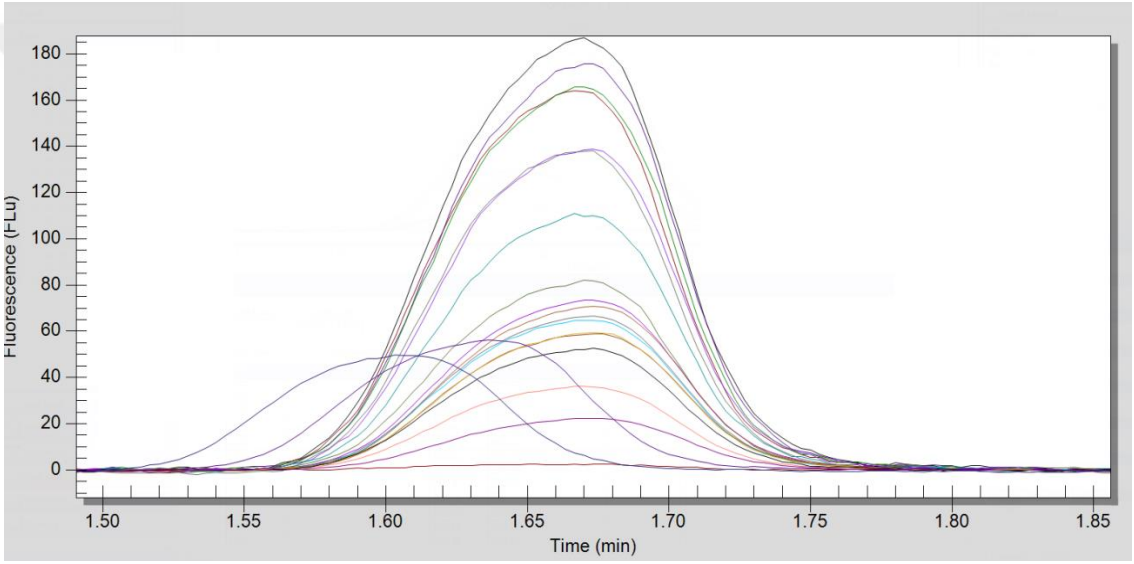
**Çizelge 4.3.** Literatürde tespit edilen LOD değerleri (Kumar vd., 2014, Bruzzoniti vd., 2010, Yusty vd., 2005, Waters, 2019, Sikalos vd., 2002, Perkin Elmer, 2015, Ishizaki vd., 2010)

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nap | 0,12 | 0,072 | - | 0,14 | 4,10 | 5 | 1,75 |
| Act | 0,31 | 0,060 | 0,10 | 0,01 | 0,60 | 1 | 0,84 |
| Fln | 0,12 | 0,061 | 0,92 | 0,03 | 1,05 | 3 | 1,16 |
| Phe | 0,03 | 0,060 | 29,4 | 0,02 | 0,45 | 11 | 1,18 |
| Ant | 0,02 | 0,010 | 0,77 | 0,01 | 0,01 | 68 | 0,86 |
| Flt | 0,01 | 0,150 | 0,65 | 0,02 | 0,25 | - | 1,47 |
| Pyr | 0,04 | 0,079 | 0,41 | 0,02 | 0,20 | 2 | 1,12 |
| BaA | 0,03 | 0,094 | 0,12 | 0,02 | 0,08 | 1 | 0,9 |
| Chr | 0,02 | 0,077 | 2,48 | 0,04 | 0,10 | 3 | 0,86 |
| BbF | 0,02 | 0,017 | 0,71 | 0,09 | 0,50 | 19 | 0,84 |
| BkF | 0,04 | 0,010 | 0,14 | 0,01 | 0,13 | 13 | 0,21 |
| BaP | 0,02 | 0,010 | 0,41 | 0,03 | 0,10 | 5 | 0,35 |
| DahA | 0,07 | 0,055 | 0,10 | 0,02 | 0,26 | 2 | 0,31 |
| BghiP | 0,03 | 0,170 | - | 0,03 | 0,70 | 8 | 0,33 |
| IcdP | 0,14 | 0,043 | 0,10 | 0,49 | 0,94 | - | 3,08 |

Çizelge 4.2’de bulunan inovatif metota ait LOD değerleri ile çizelge 4.3’te literatürde tespit edilen LOD değerleri ppb cinsinden olup inovatif metot karşılaştırıldığında IcdP parametresi hariç tamamında literatürden daha düşük olduğu görülmüştür. LOD verileri SPE ön işlemine tabi tutulmadan yani ön derişim yapılmadan hesaplanıp doğrulanmıştır. SPE ön işlemi ile birlikte çok daha düşük değerler elde edilebilecektir.

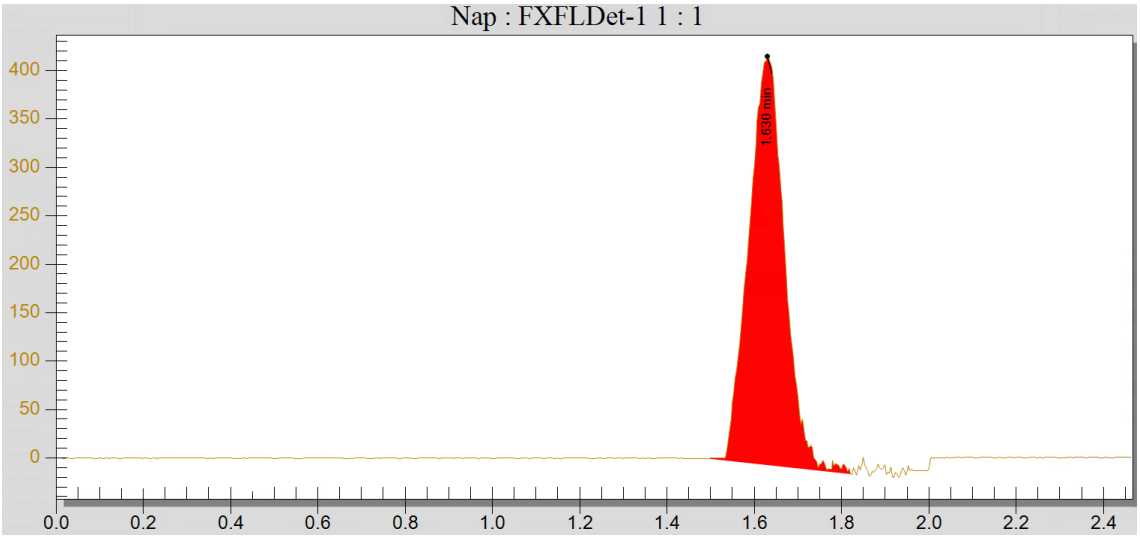
### 4.1.1. Naftalin

Naftalin için toplam yirrmi farklı dalga boyunda çalışma yapılmış olup 215-330 nm'de en yüksek pik boyu elde edilmiştir. Şekil 4.1’de Naftalin için optimum dalga boyu analiz kromatogramları verilmiştir.

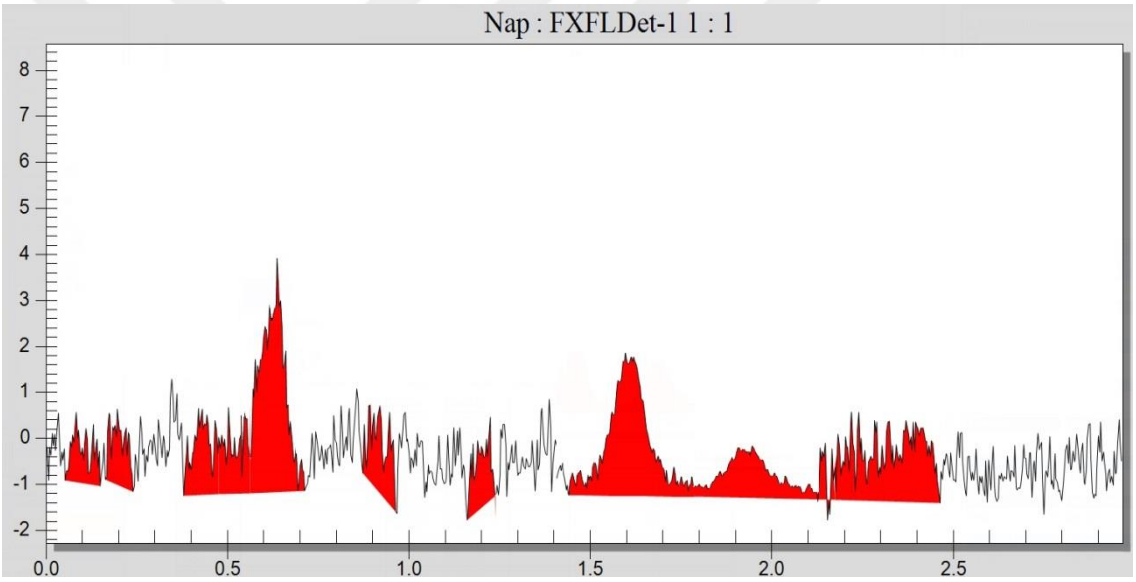



**Şekil 4.1.** Naftalin için optimum dalga boyu analiz kromatogramları

2 ppb'lik standart hazırlanarak analiz yapılmış ve bu analiz sonucu elde edilen standart sapmadan yararlanarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. 215-330 nm'de analizi gerçekleştirilmiş olup 0.003 ppb LOD değeri tespit edilmiştir. Naftaline ait 2 ppb’lik crm (Sertifikalı Referans Malzeme) analizi kromatogramı Şekil 4.2’de, LOD doğrulaması kromatogramı Şekil 4.3’te verilmiştir.



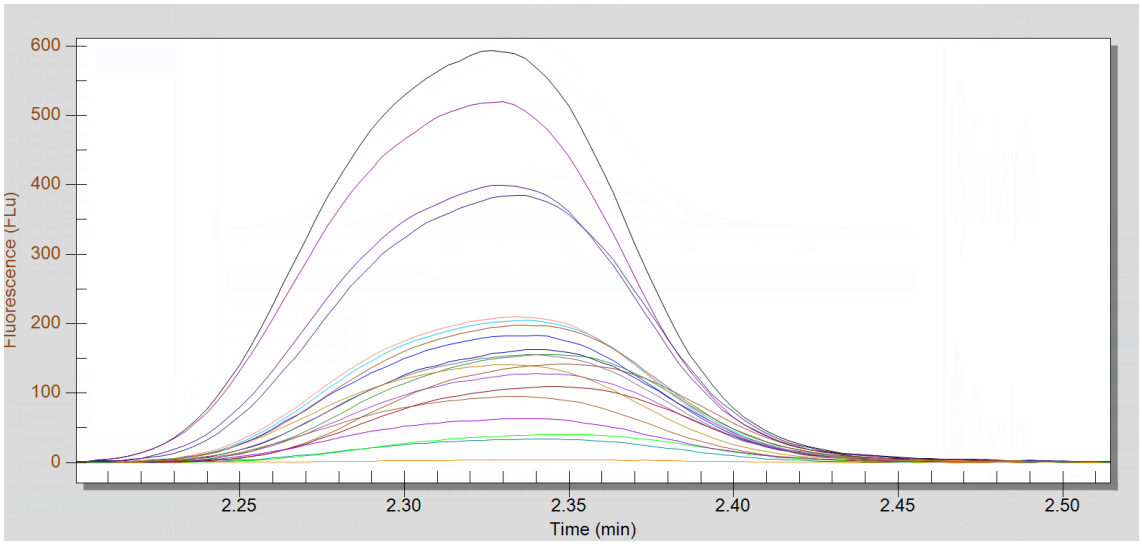

**Şekil 4.2.** Naftaline ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı




**Şekil 4.3.** Naftaline ait LOD doğrulaması kromatogramı

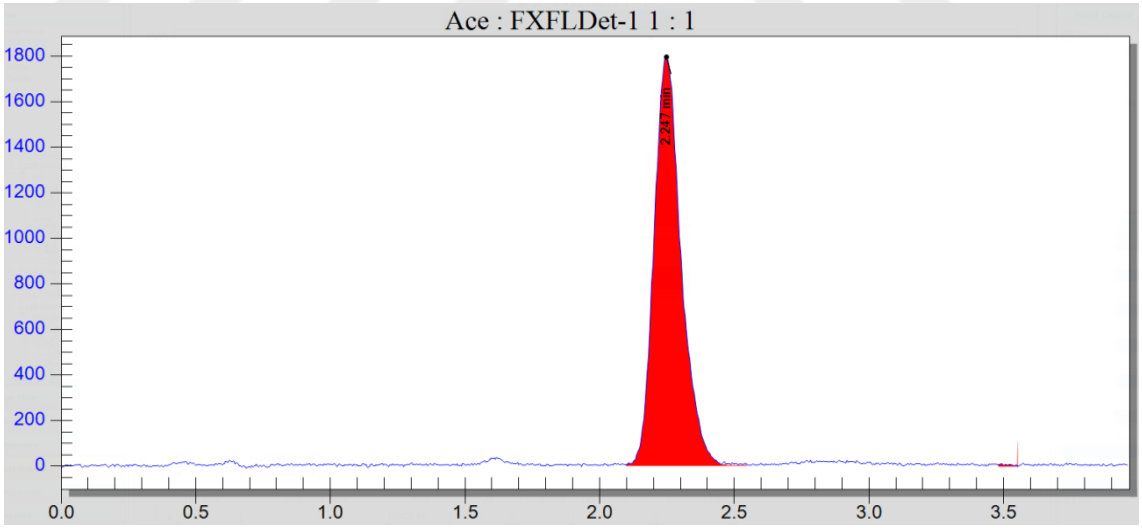
### 4.1.2. Asenaften

Asenaften için toplam yirmi farklı dalga boyunda çalışma yapılmış olup 222-329 nm'de en yüksek pik boyu elde edilmiştir. Şekil 4.4'te asenaften için optimum dalga boyu analiz kromatogramları verilmiştir.

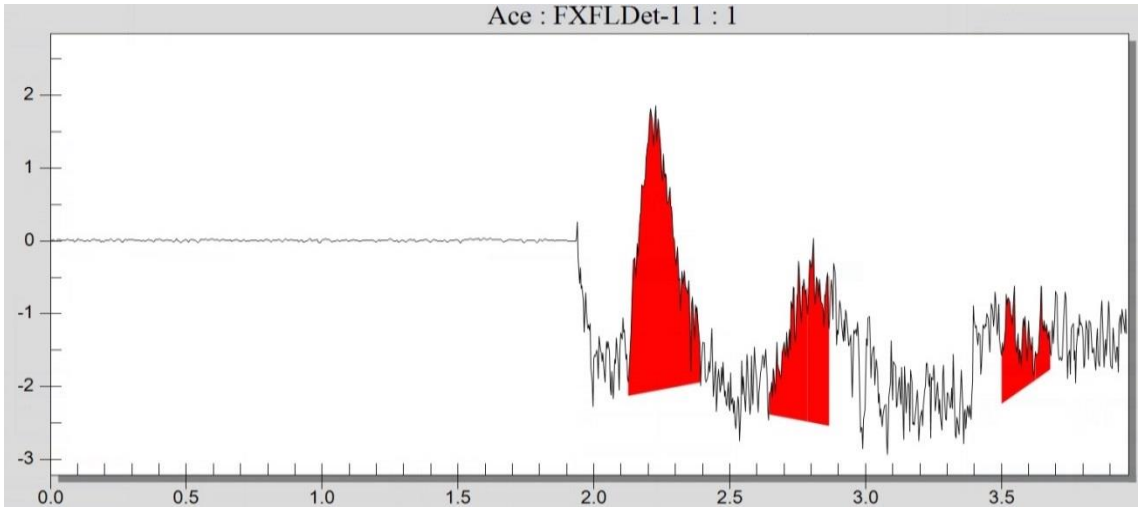



**Şekil 4.4.** Asenaften için optimum dalga boyu analiz kromatogramları

2 ppb'lik standart hazırlanarak analiz yapılmış ve bu analiz sonucu elde edilen standart sapmadan yararlanarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. 222-329 nm'de analizi gerçekleştirilmiş olup 0.002 ppb LOD değeri tespit edilmiştir. Asenaftene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı Şekil 4.5'te, LOD doğrulaması kromatogramı Şekil 4.6'da verilmiştir.



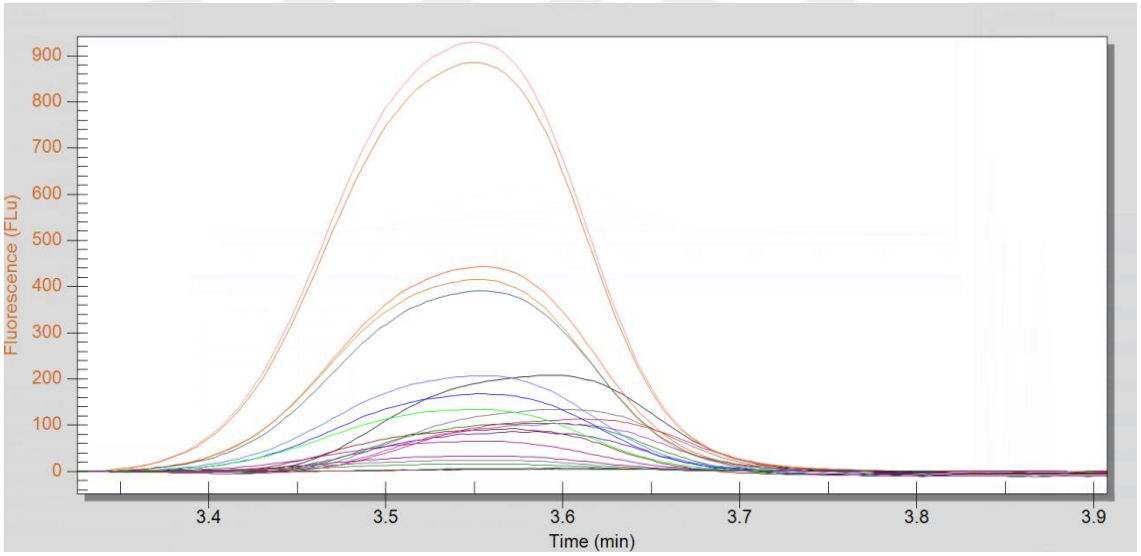

**Şekil 4.5.** Asenaften ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı




**Şekil 4.6.** Asenaftene ait LOD doğrulaması kromatogramı

### 4.1.3. Floren

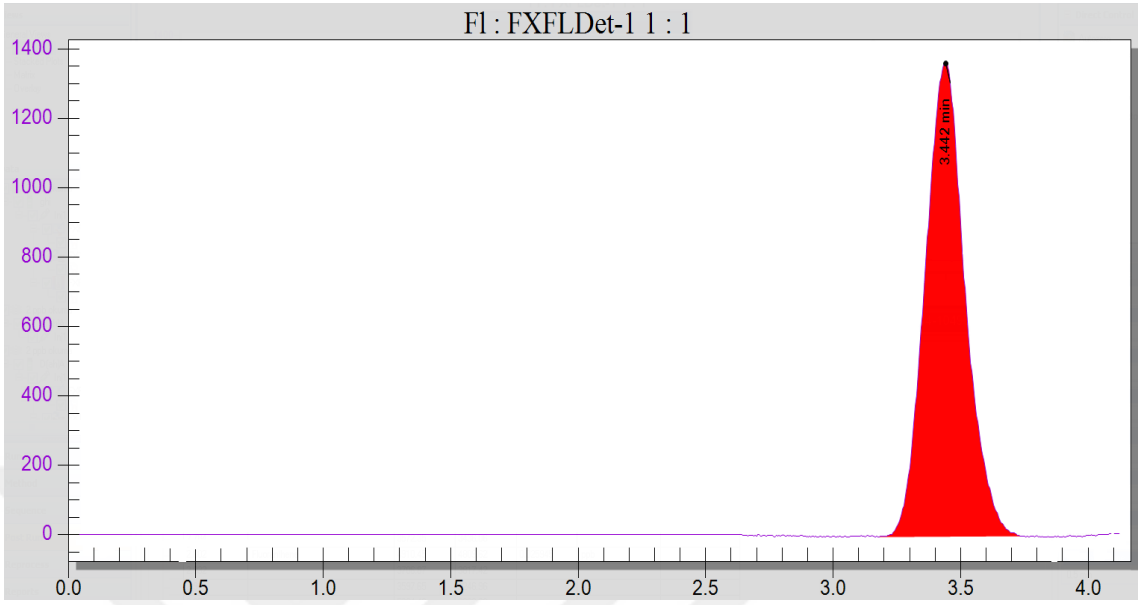
Floren için toplam yirmibir farklı dalga boyunda çalışma yapılmış olup 263-310 nm'de en yüksek pik boyu elde edilmiştir. Şekil 4.7'de floren için optimum dalga boyu analiz kromatogramları verilmiştir.



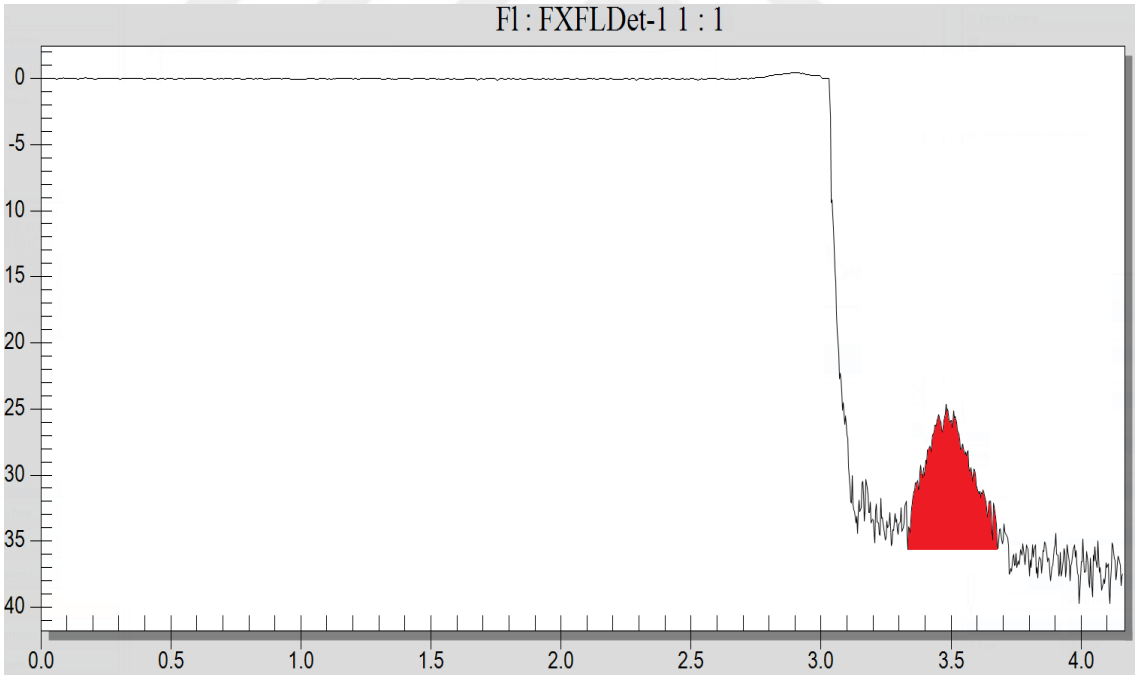

**Şekil 4.7.** Floren için optimum dalga boyu analiz kromatogramları

2 ppb'lik standart hazırlanarak analiz yapılmış ve bu analiz sonucu elde edilen standart sapmadan yararlanarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. 263-310 nm'de analizi gerçekleştirilmiş olup 0.002 ppb LOD değeri tespit edilmiştir. Florene ait 2 ppb'lik crm

analizi kromatogramı Şekil 4.8'de, LOD doğrulaması kromatogramı Şekil 4.9'da verilmiştir.



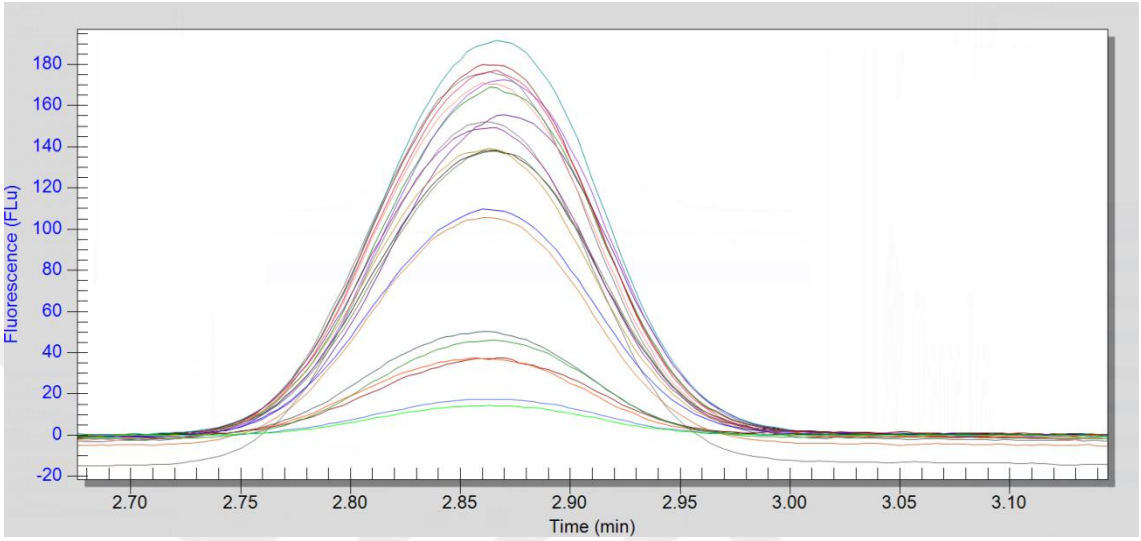

**Şekil 4.8.** Florene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı




**Şekil 4.9.** Florene ait LOD doğrulaması kromatogramı

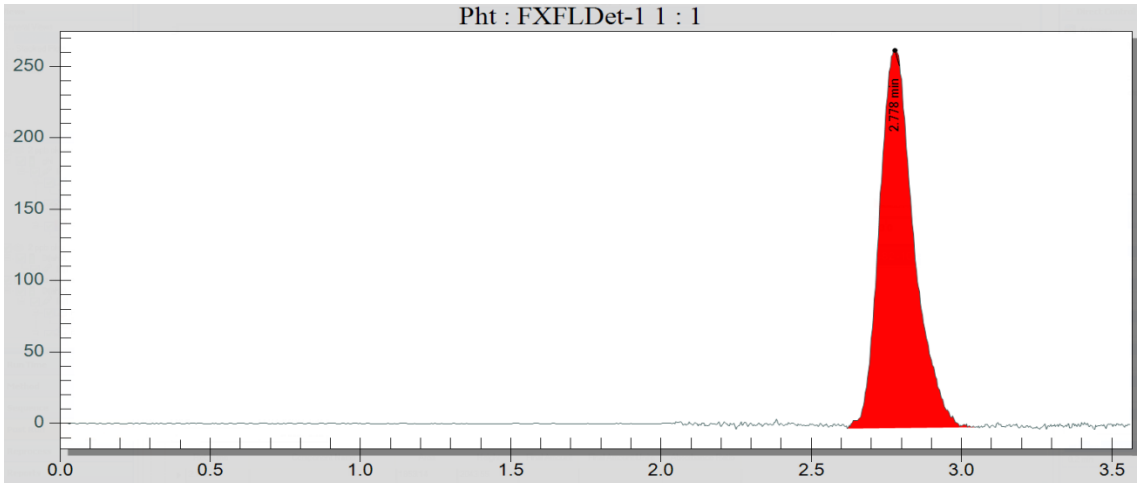
### 4.1.4. Fenantren

Fenantren için toplam yirmi bir farklı dalga boyunda çalışma yapılmış olup 247-364 nm'de en yüksek pik boyu elde edilmiştir. Şekil 4.10'da fenantren için optimum dalga boyu analiz kromatogramları verilmiştir.

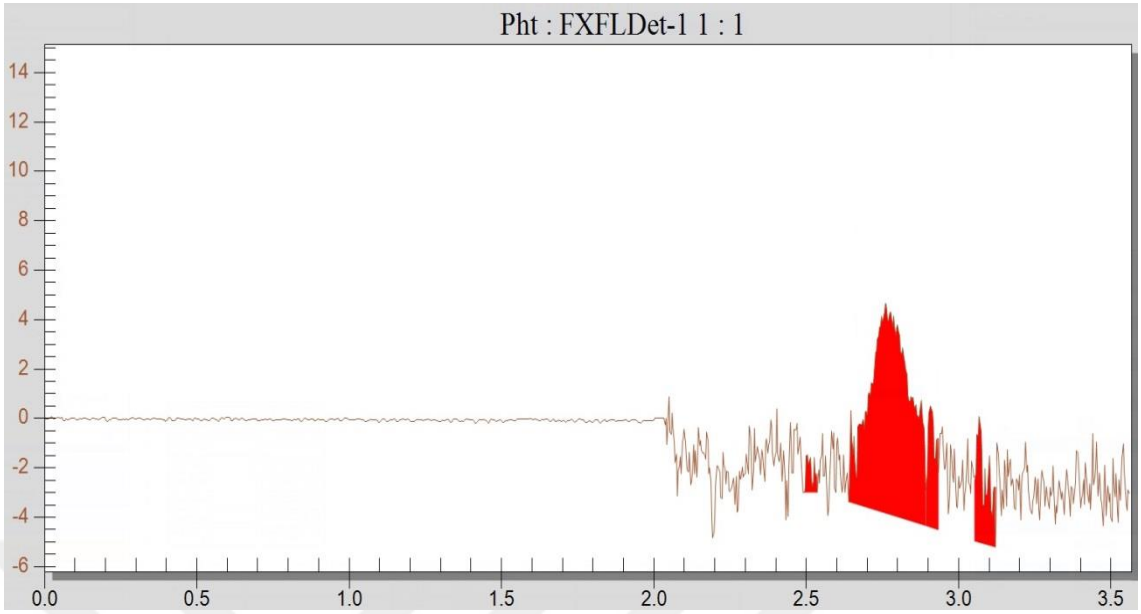



**Şekil 4.10.** Fenantren için optimum dalga boyu analiz kromatogramları

2 ppb'lik standart hazırlanarak analiz yapılmış ve bu analiz sonucu elde edilen standart sapmadan yararlanarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. 247-364 nm'de analizi gerçekleştirilmiş olup 0.009 ppb LOD değeri tespit edilmiştir. Fenantrene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı Şekil 4.11'de, LOD doğrulaması kromatogramı Şekil 4.12'de verilmiştir.



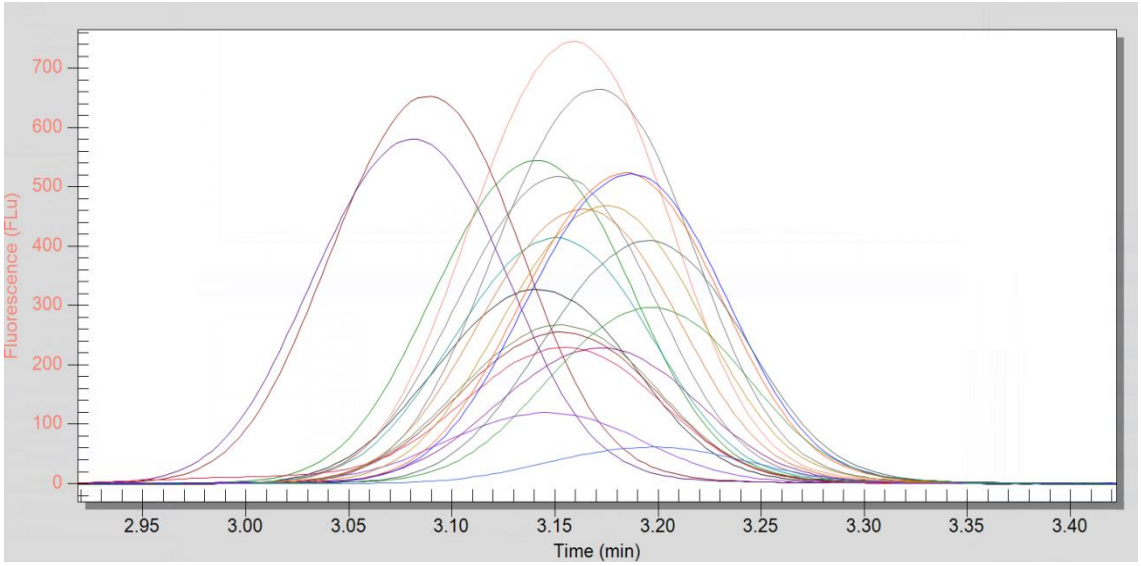

**Şekil 4.11.** Fenantren ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı




**Şekil 4.12.** Fenantrene ait LOD doğrulaması kromatogramı

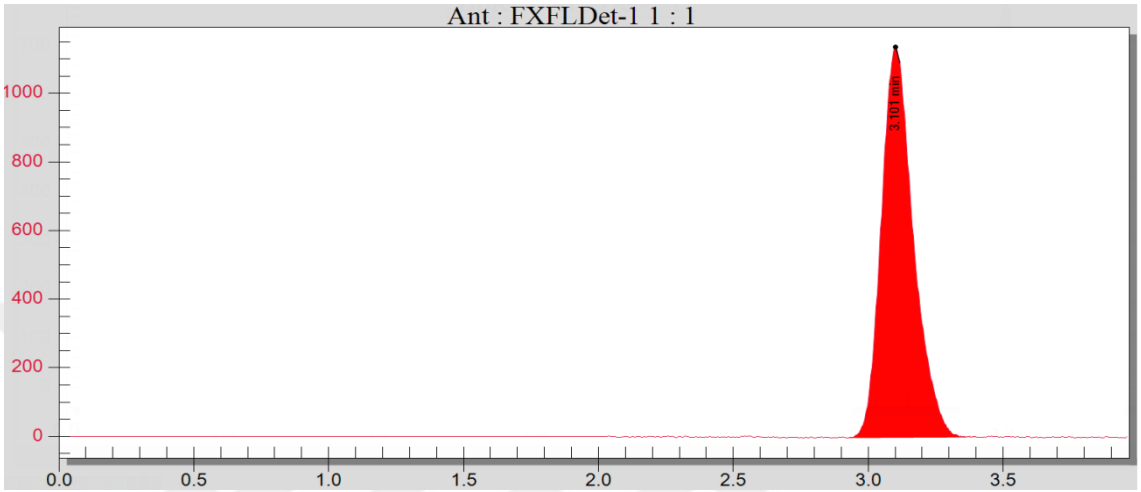
### 4.1.5. Antrasen

Antrasen için toplam yirmi farklı dalga boyunda çalışma yapılmış olup 247-401 nm'de en yüksek pik boyu elde edilmiştir. Şekil 4.13'te antrasen için optimum dalga boyu analiz kromatogramları verilmiştir.

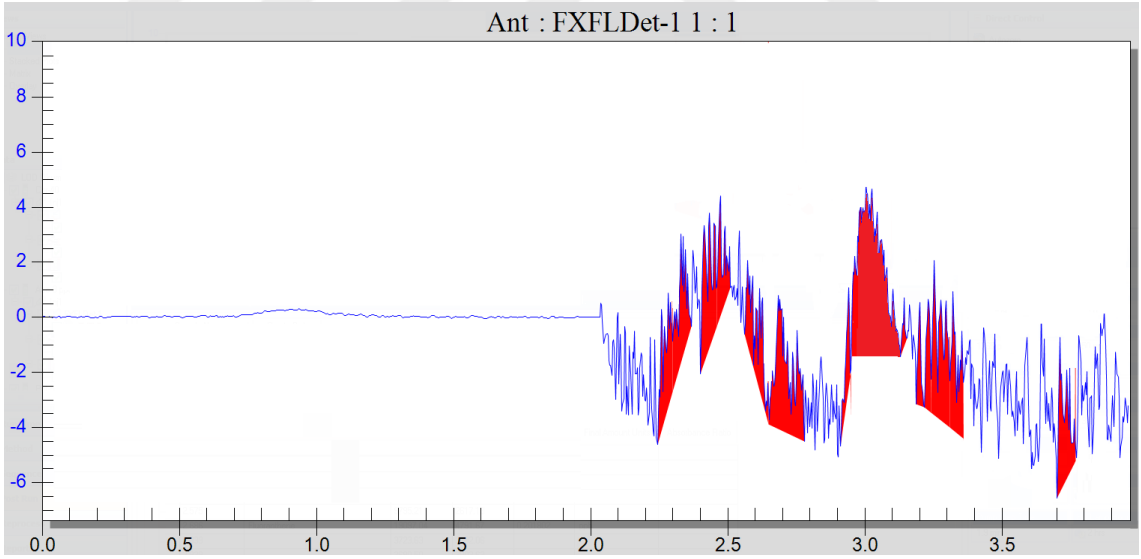



**Şekil 4.13.** Antrasen için optimum dalga boyu analiz kromatogramları

2 ppb'lik standart hazırlanarak analiz yapılmış ve bu analiz sonucu elde edilen standart sapmadan yararlanarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. 247-401 nm'de analizi gerçekleştirilmiş olup 0.005 ppb LOD değeri tespit edilmiştir. Antrasene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı Şekil 4.14'te, LOD doğrulaması kromatogramı Şekil 4.15'te verilmiştir.



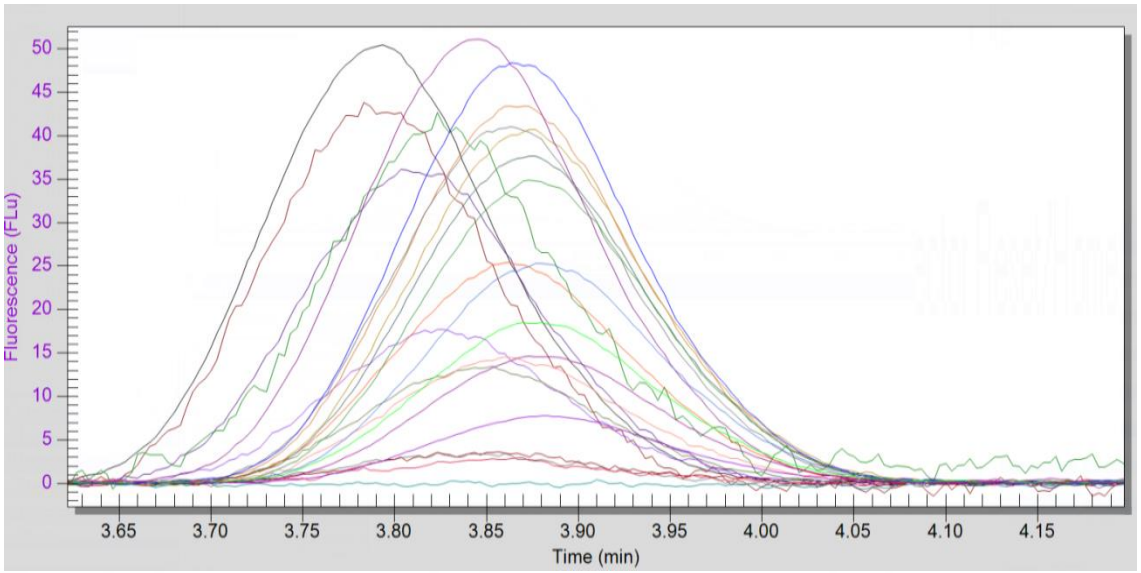

**Şekil 4.14.** Antrasene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı




**Şekil 4.15.** Antrasene ait LOD doğrulaması kromatogramı

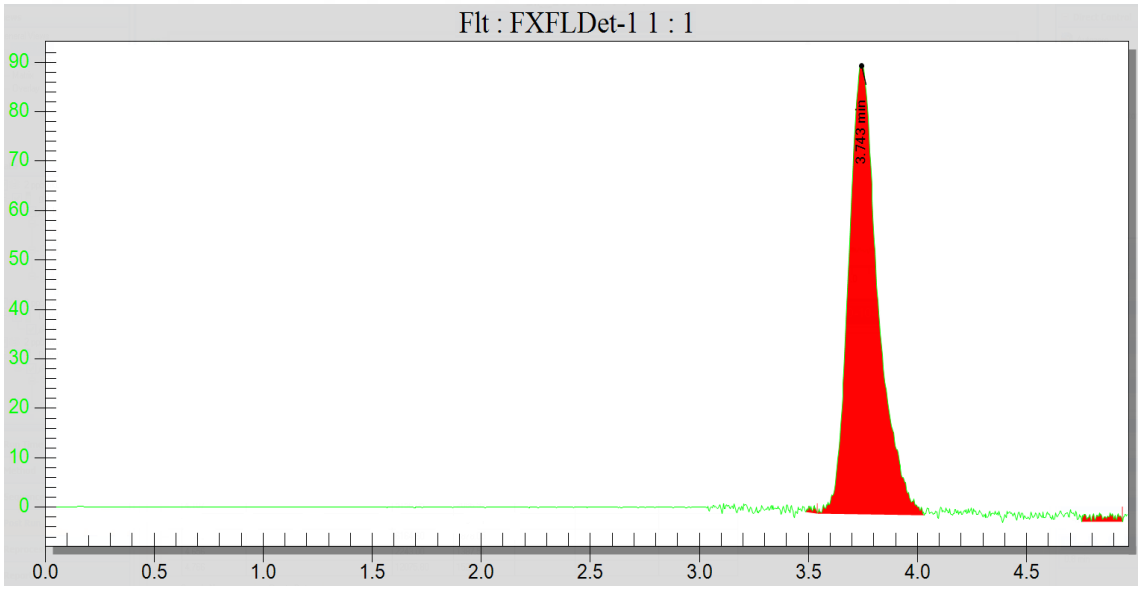
### 4.1.6. Floranten

Floranten için toplam yirmi üç farklı dalga boyunda çalışma yapılmış olup 280-460 nm'de en yüksek pik boyu elde edilmiştir. Şekil 4.16'da floranten için optimum dalga boyu analiz kromatogramları verilmiştir.

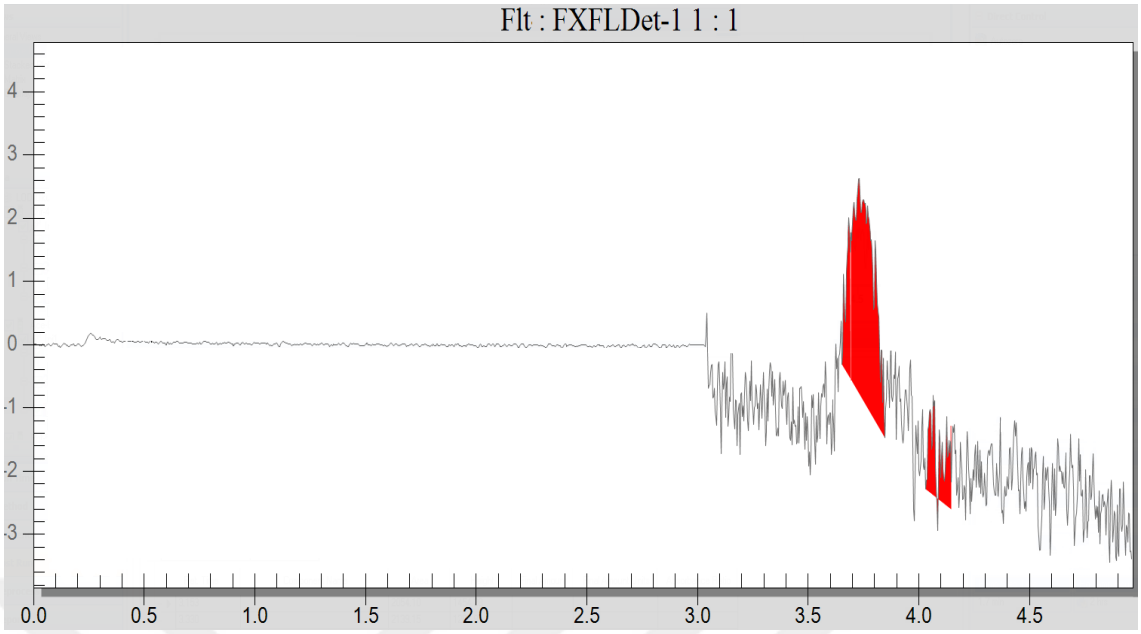



**Şekil 4.16.** Floranten için optimum dalga boyu analiz kromatogramları

2 ppb'lik standart hazırlanarak analiz yapılmış ve bu analiz sonucu elde edilen standart sapmadan yararlanarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. 247-364 nm'de analizi gerçekleştirilmiş olup 0.009 ppb LOD değeri tespit edilmiştir. Florantene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı Şekil 4.17'de, LOD doğrulaması kromatogramı Şekil 4.18'de verilmiştir.



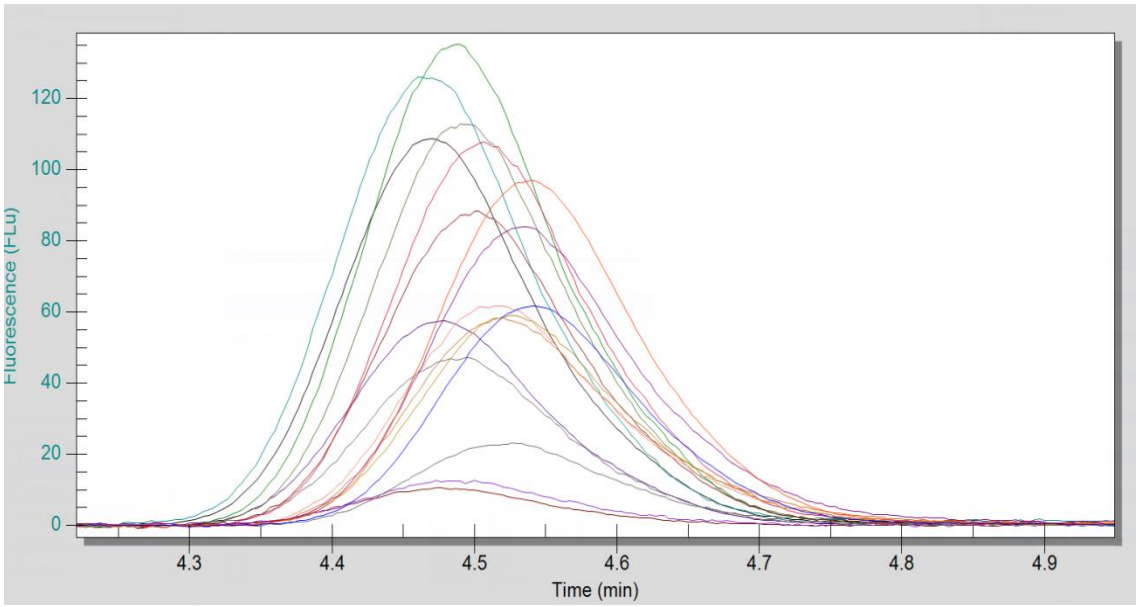

**Şekil 4.17.** Florenten ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı




**Şekil 4.18.** Florentene ait LOD doğrulaması kromatogramı

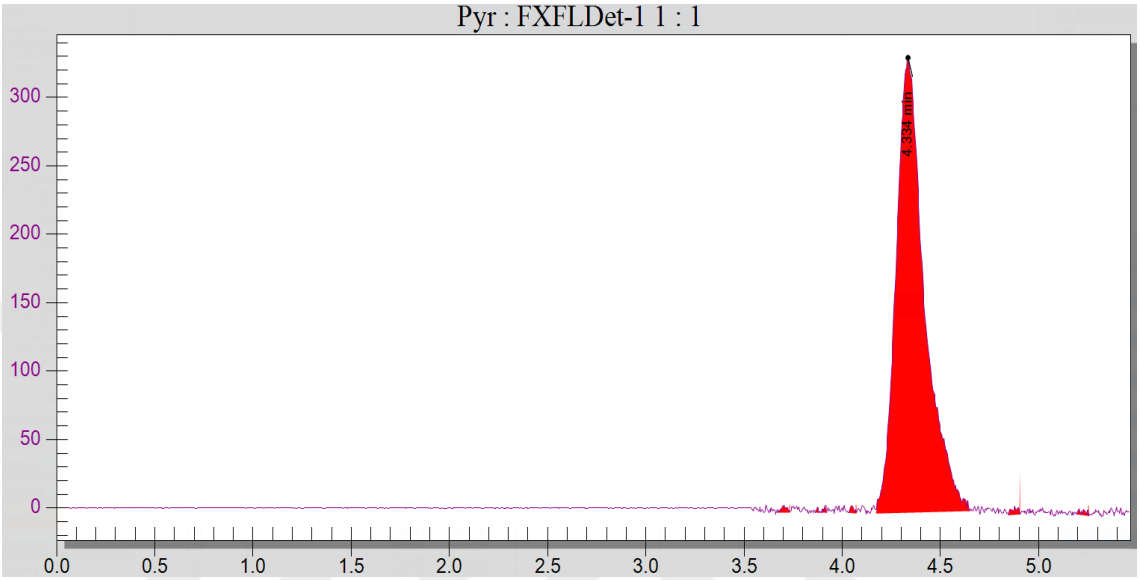
### 4.1.7. Piren

Piren için toplam on yedi farklı dalga boyunda çalışma yapılmış olup 236-389 nm'de en yüksek pik boyu elde edilmiştir. Şekil 4.19'da piren için optimum dalga boyu analiz kromatogramları verilmiştir.

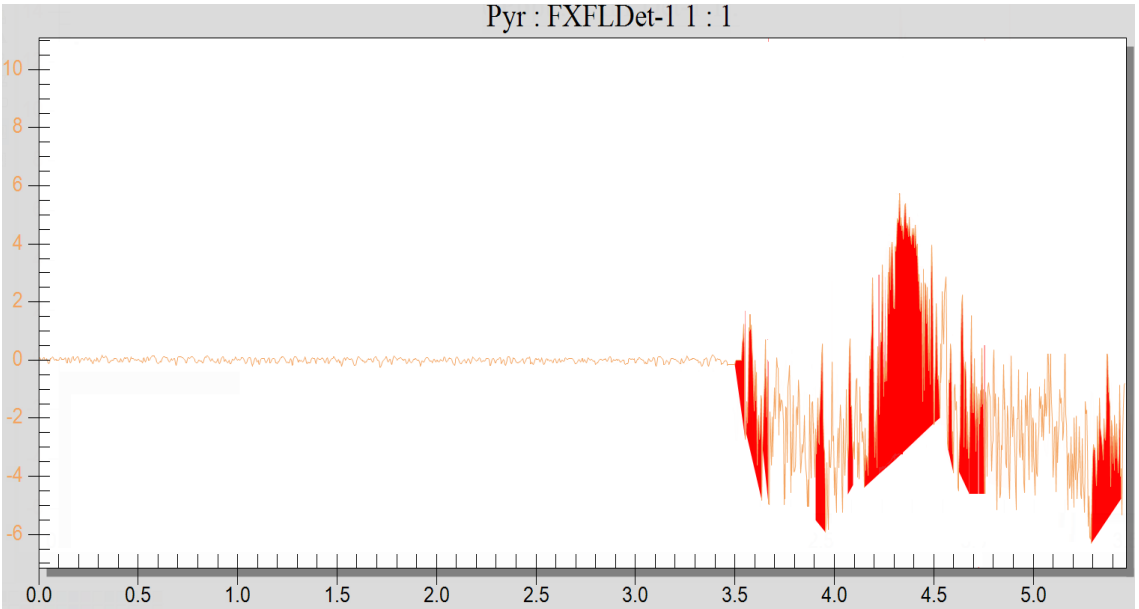



**Şekil 4.19.** Piren için optimum dalga boyu analiz kromatogramları

2 ppb'lik standart hazırlanarak analiz yapılmış ve bu analiz sonucu elde edilen standart sapmadan yararlanarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. 239-389 nm'de analizi gerçekleştirilmiş olup 0.015 ppb LOD değeri tespit edilmiştir. Pirene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı Şekil 4.20'de, LOD doğrulaması kromatogramı Şekil 4.21'de verilmiştir.



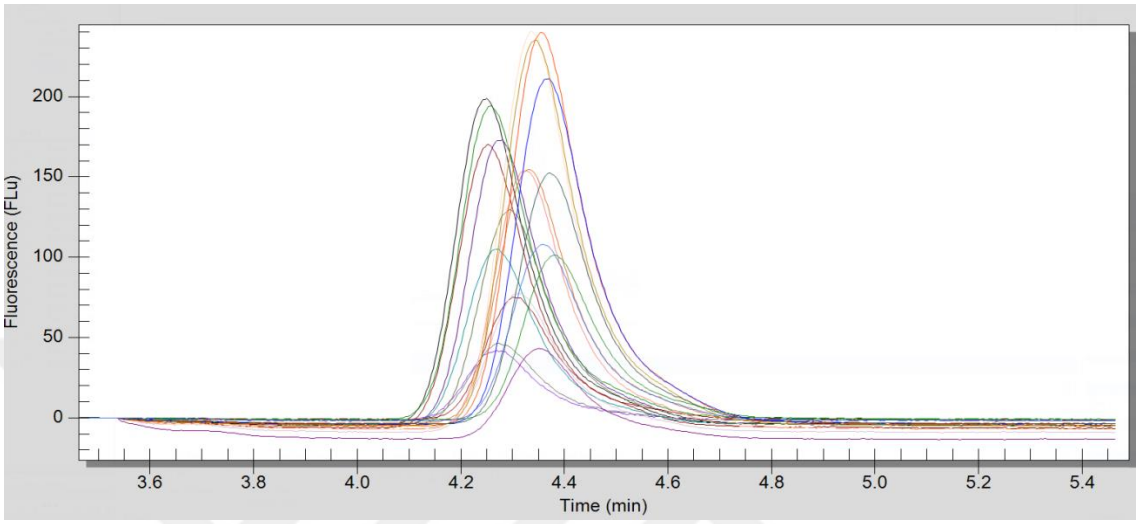

**Şekil 4.20.** Pirene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı




**Şekil 4.21.** Pirene ait LOD doğrulaması kromatogramı

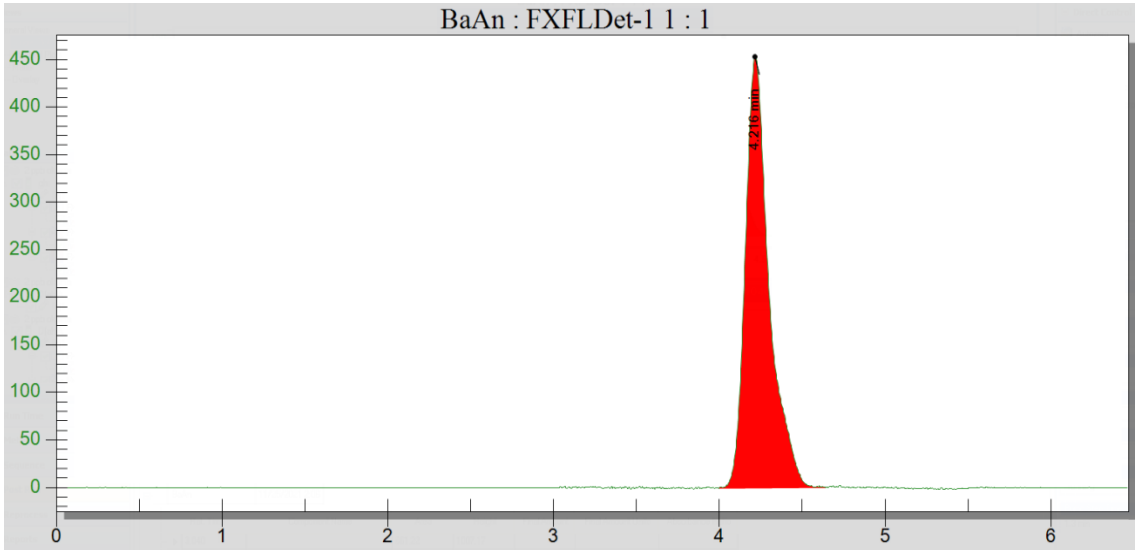
### 4.1.8. Benzo[a]antrasen

Benzo[a]antrasen için toplam yirmi farklı dalga boyunda çalışma yapılmış olup 275-389 nm'de en yüksek pik boyu elde edilmiştir. Şekil 4.22'de Benzo[a]antrasen için optimum dalga boyu analiz kromatogramları verilmiştir.

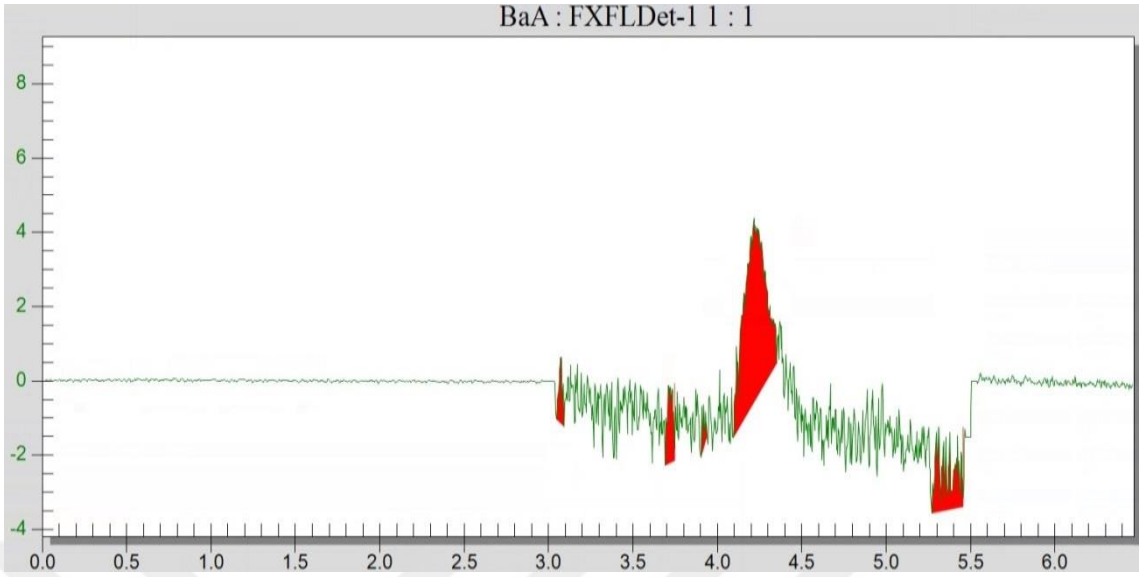



**Şekil 4.22.** Benzo[a]antrasen için optimum dalga boyu analiz kromatogramları

2 ppb'lik standart hazırlanarak analiz yapılmış ve bu analiz sonucu elde edilen standart sapmadan yararlanarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. 275-389 nm'de analizi gerçekleştirilmiş olup 0.015 ppb LOD değeri tespit edilmiştir. Benzo[a]antrasene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı Şekil 4.23'te, LOD doğrulaması kromatogramı Şekil 4.24'te verilmiştir.



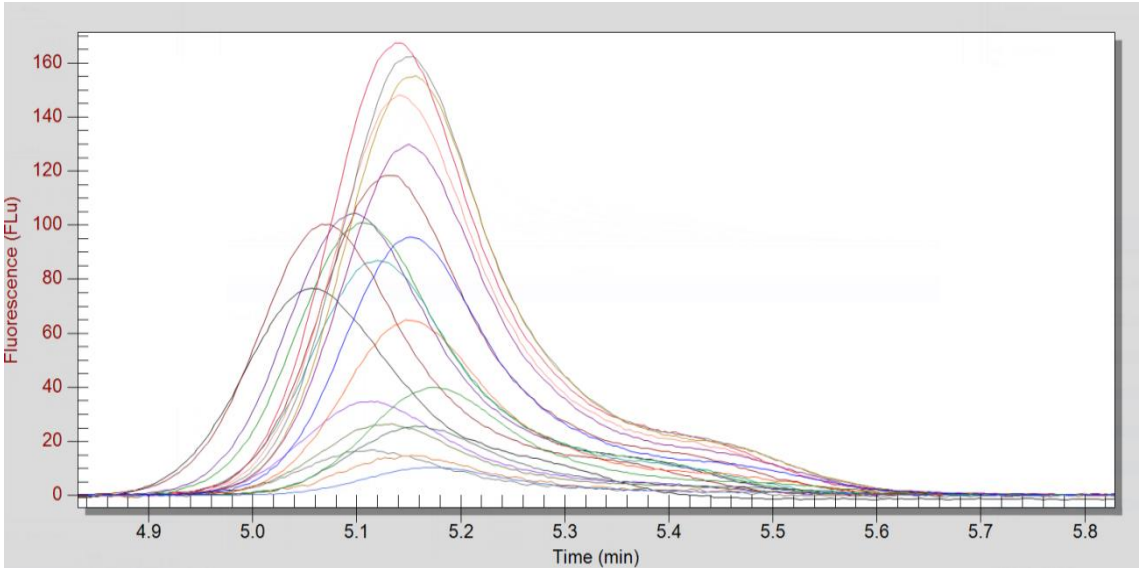

**Şekil 4.23.** Benzo[a]antrasene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı




**Şekil 4.24.** Benzo[a]antrasene ait LOD doğrulaması kromatogramı

### 4.1.9. Krisen

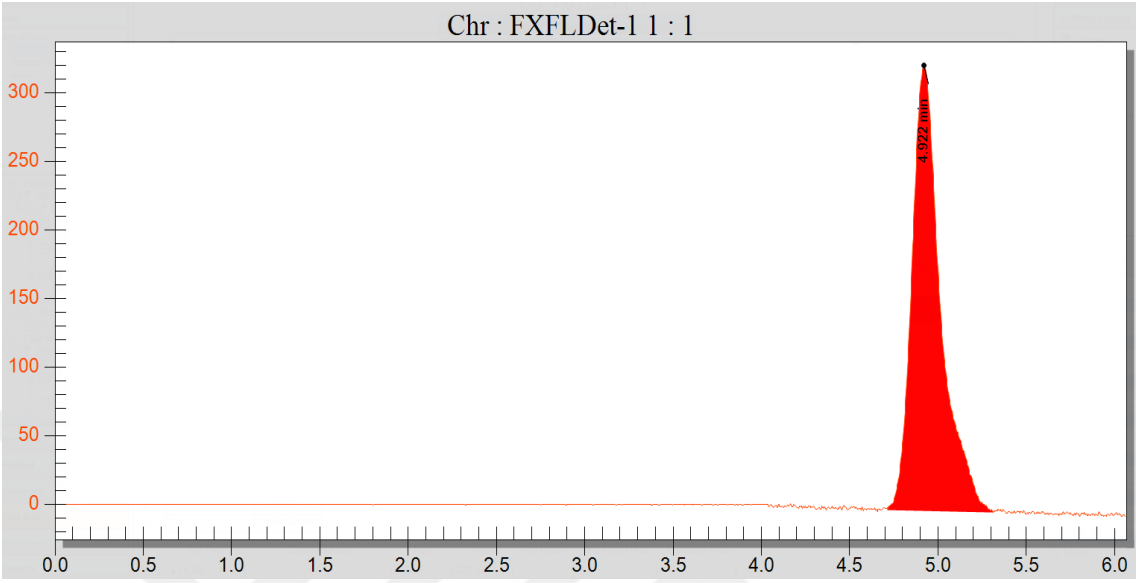
Krisen için toplam yirmi farklı dalga boyunda çalışma yapılmış olup 260-381 nm'de en yüksek pik boyu elde edilmiştir. Şekil 4.25'te Krisen için optimum dalga boyu analiz kromatogramları verilmiştir.



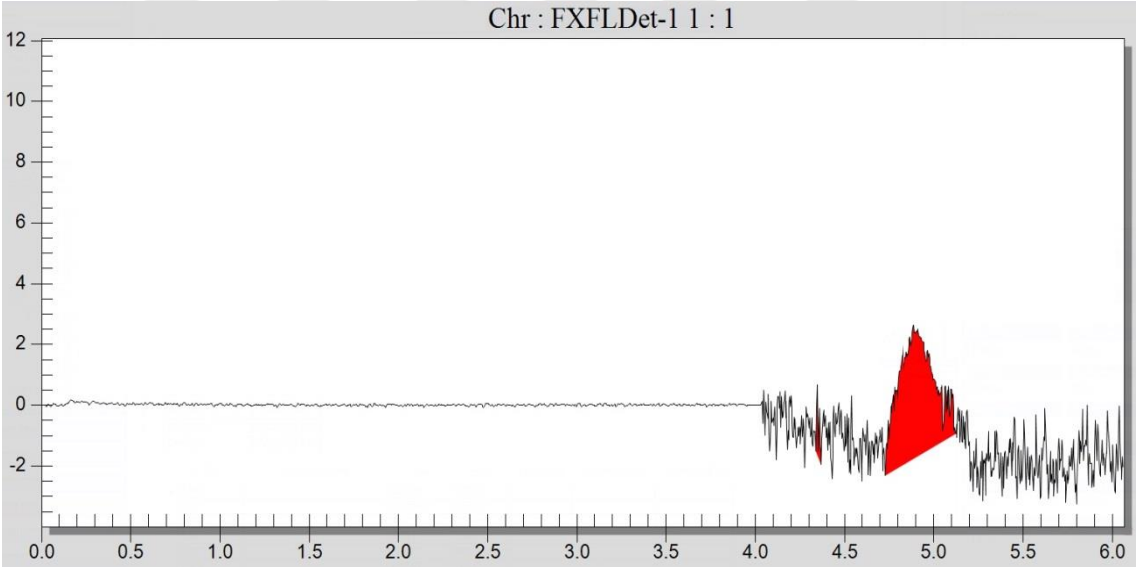

**Şekil 4.25.** Krisen için optimum dalga boyu analiz kromatogramları

2 ppb'lik standart hazırlanarak analiz yapılmış ve bu analiz sonucu elde edilen standart sapmadan yararlanarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. 260-381 nm'de analizi

gerçekleştirilmiş olup 0.015 ppb LOD değeri tespit edilmiştir. Krisene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı Şekil 4.26'da, LOD doğrulaması kromatogramı Şekil 4.27'de verilmiştir.



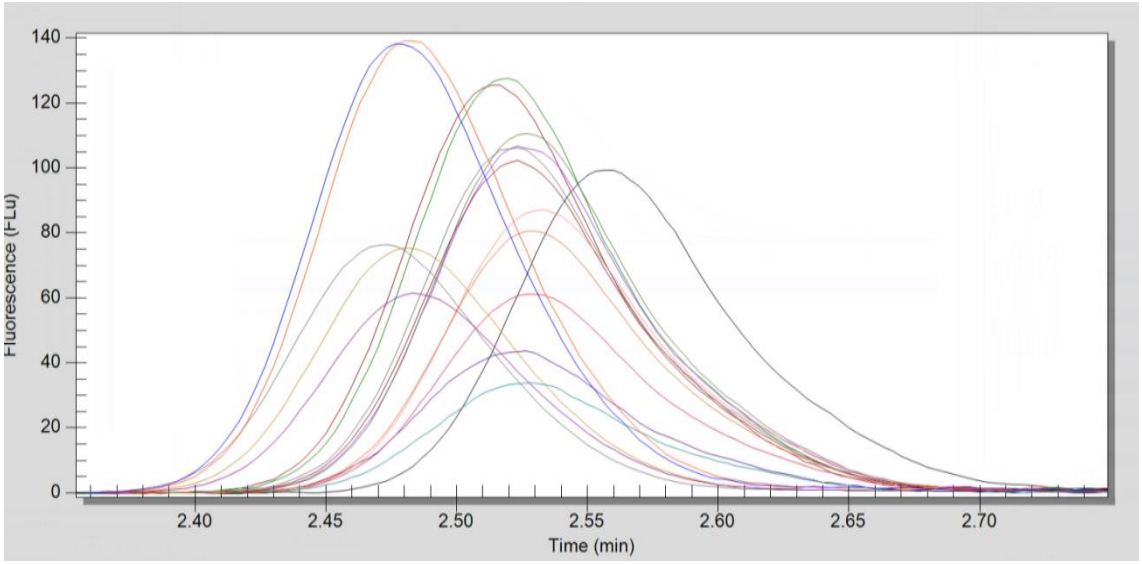

**Şekil 4.26**. Krisen'e ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı




**Şekil 4.27.** Krisen'e ait LOD doğrulaması kromatogramı

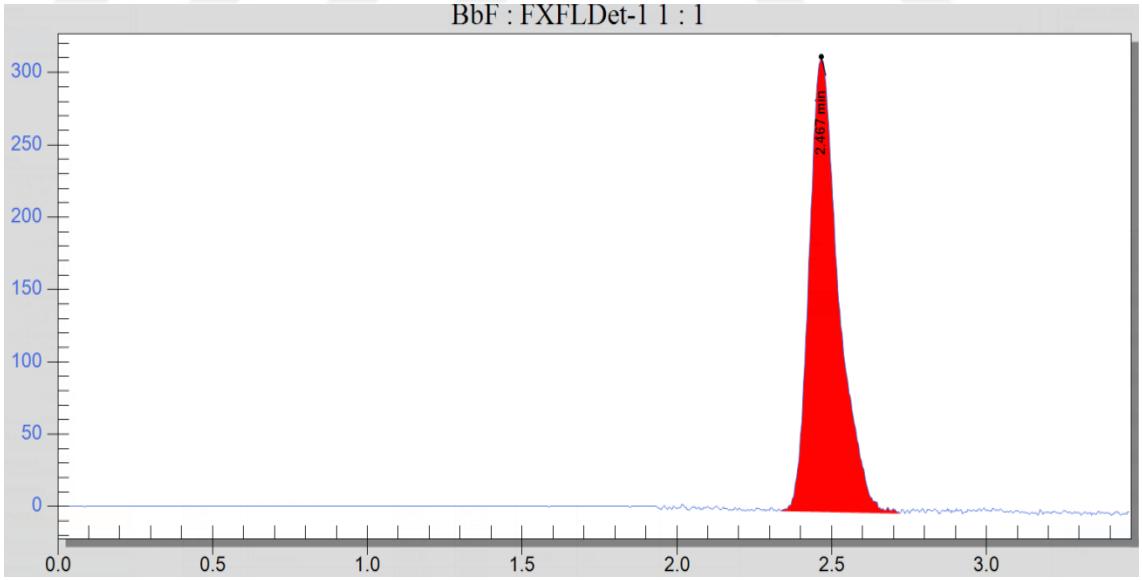
### 4.1.10. Benzo[b]floranten

Benzo[b]floranten için toplam on yedi farklı dalga boyunda çalışma yapılmış olup 256-446 nm'de en yüksek pik boyu elde edilmiştir. Şekil 4.28'de Benzo[b]floranten için optimum dalga boyu analiz kromatogramları verilmiştir.

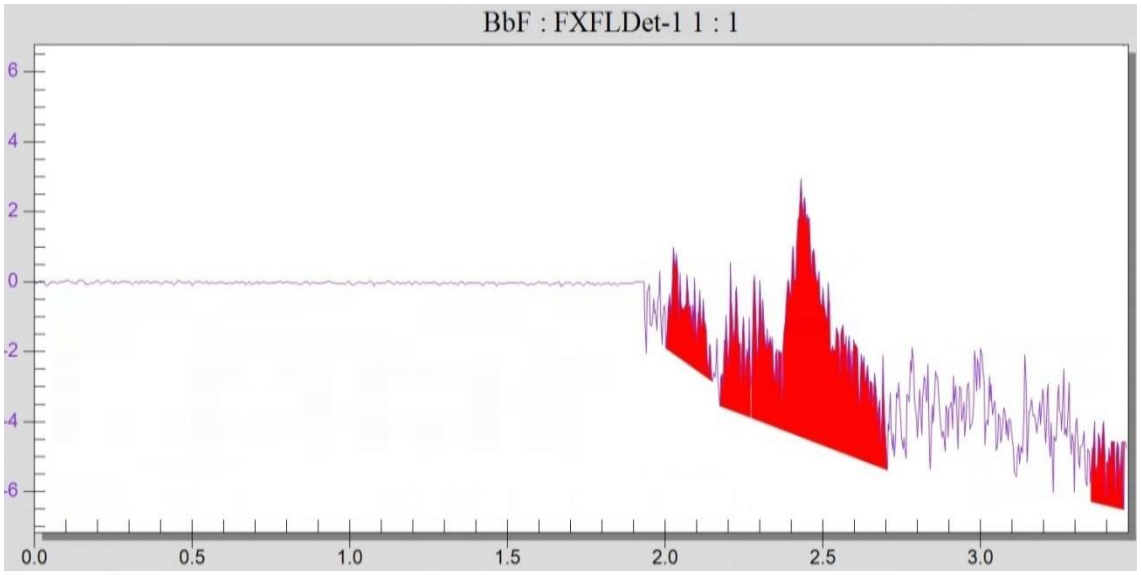



**Şekil 4.28.** Benzo[b]floranten için optimum dalga boyu analiz kromatogramları

2 ppb'lik standart hazırlanarak analiz yapılmış ve bu analiz sonucu elde edilen standart sapmadan yararlanarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. 256-446 nm'de analizi gerçekleştirilmiş olup 0.015 ppb LOD değeri tespit edilmiştir. Benzo[b]florantene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı Şekil 4.29'da, LOD doğrulaması kromatogramı Şekil 4.30'da verilmiştir.



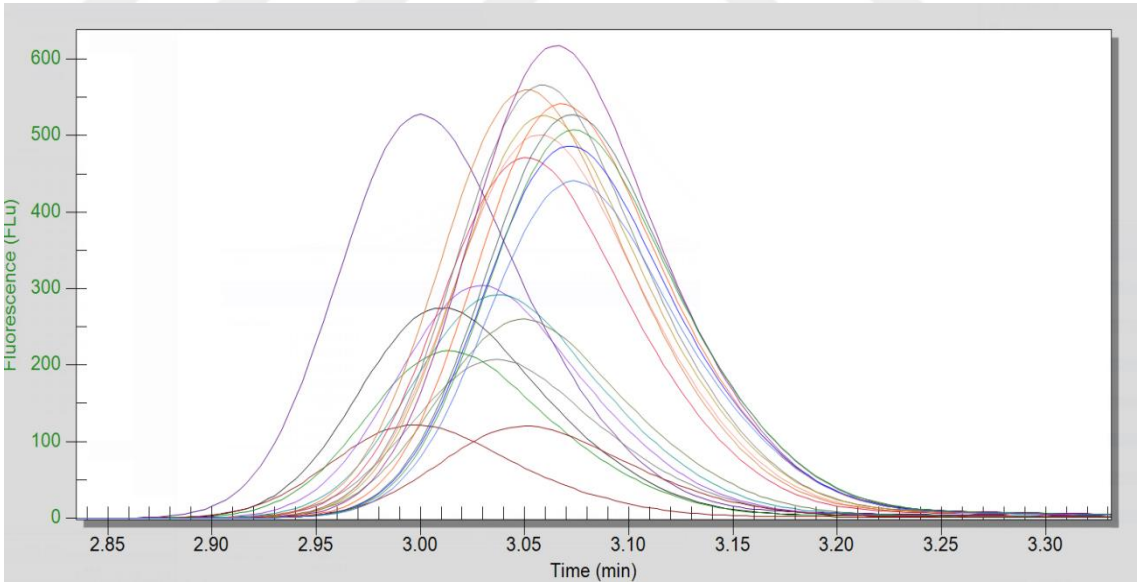

**Şekil 4.29**. Benzo[b]florantene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı




**Şekil 4.30.** Benzo[b]florantene ait LOD doğrulaması kromatogramı

### 4.1.11. Benzo[k]floranten

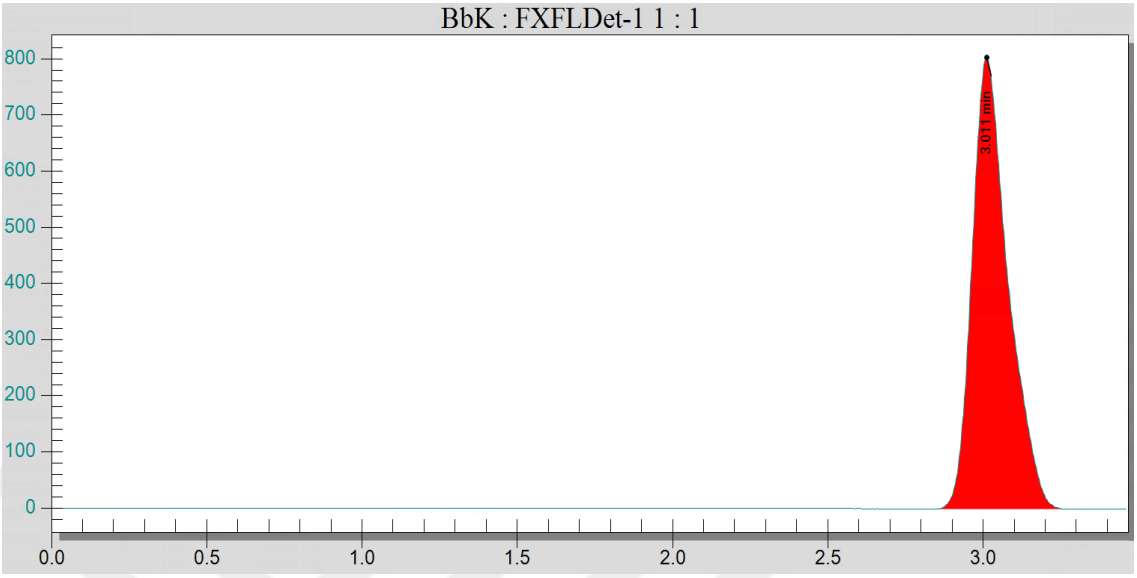
Benzo(k)floranten için toplam yirmi farklı dalga boyunda çalışma yapılmış olup 295-410 nm'de en yüksek pik boyu elde edilmiştir. Şekil 4.31'de Benzo[k]floranten için optimum dalga boyu analiz kromatogramları verilmiştir.



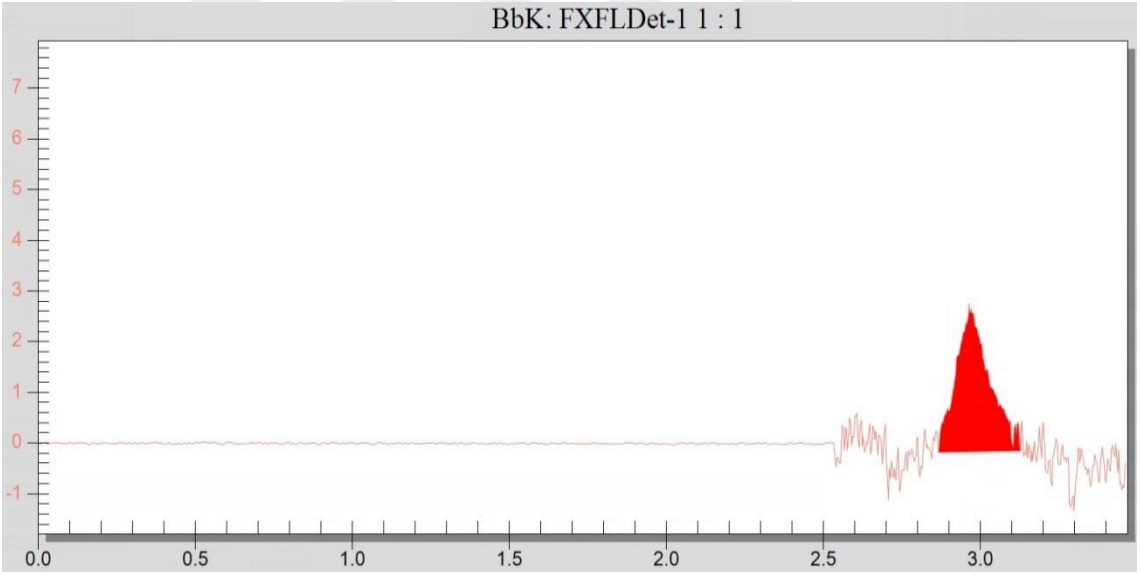

**Şekil 4.31.** Benzo[k]floranten için optimum dalga boyu analiz kromatogramları

2 ppb'lik standart hazırlanarak analiz yapılmış ve bu analiz sonucu elde edilen standart sapmadan yararlanarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. 295-410 nm'de analizi gerçekleştirilmiş olup 0.006 ppb LOD değeri tespit edilmiştir. Benzo[k]florantene ait 2

ppb'lik crm analizi kromatogramı Şekil 4.32'de, LOD doğrulaması kromatogramı Şekil 4.33'te verilmiştir.



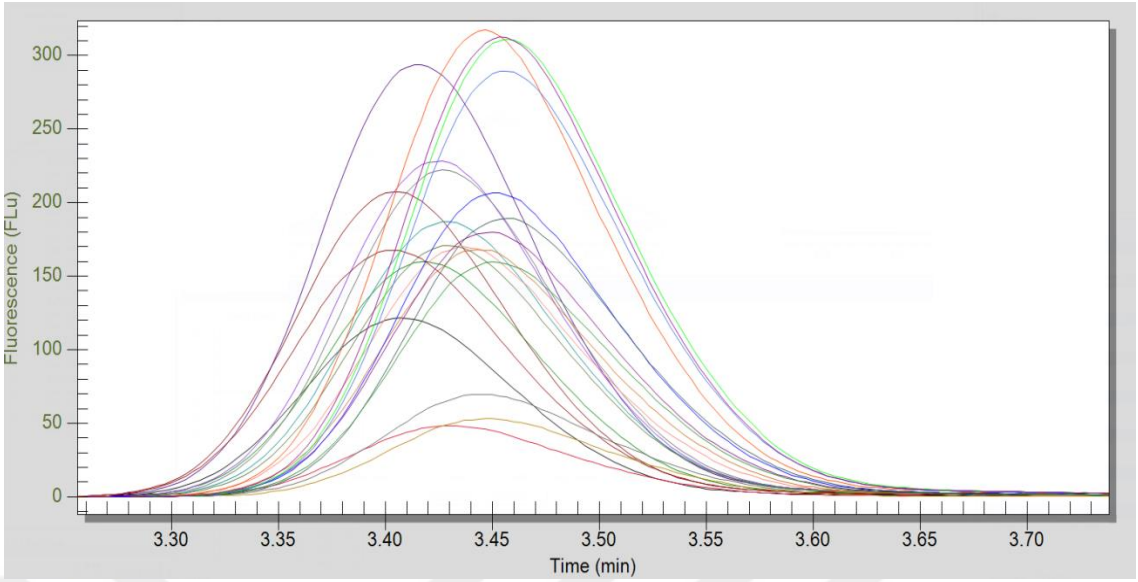

**Şekil 4.32**. Benzo[k]florantene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı




**Şekil 4.33.** Benzo[k]florantene ait LOD doğrulaması kromatogramı

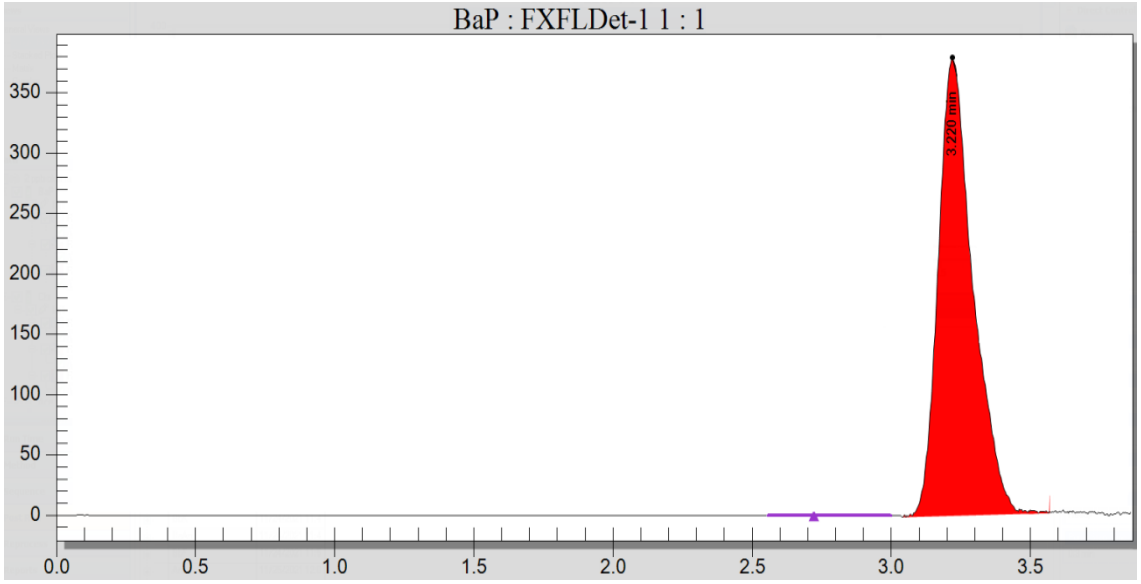
### 4.1.12. Benzo[a]piren

Benzo[a]piren için toplam yirmi iki farklı dalga boyunda çalışma yapılmış olup 260-408 nm'de en yüksek pik boyu elde edilmiştir. Şekil 4.34'te Benzo[a]piren için optimum dalga boyu analiz kromatogramları verilmiştir.

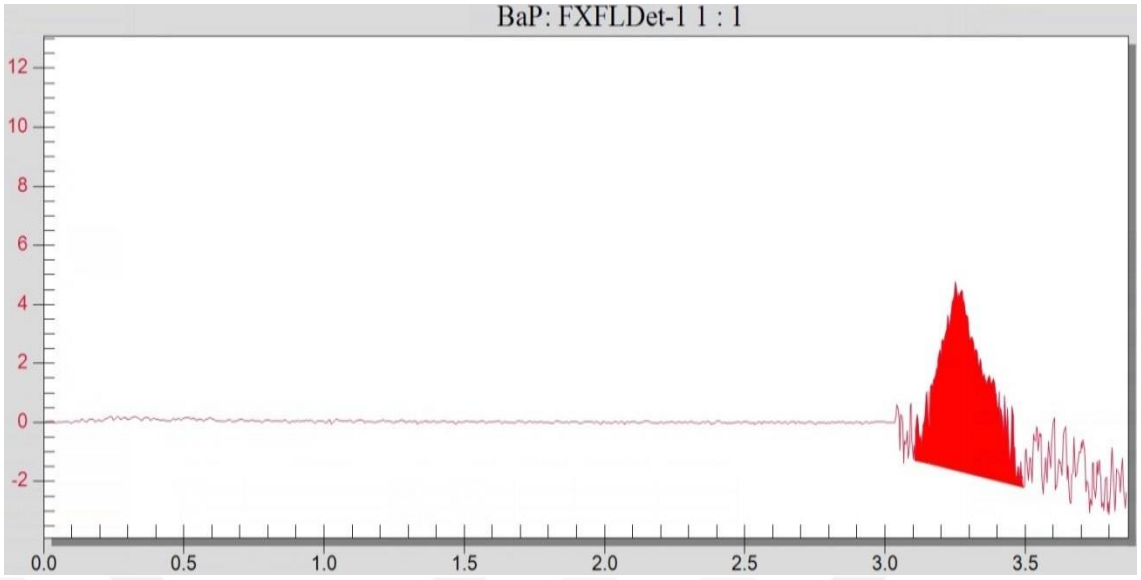



**Şekil 4.34.** Benzo[a]piren için optimum dalga boyu analiz kromatogramları

2 ppb'lik standart hazırlanarak analiz yapılmış ve bu analiz sonucu elde edilen standart sapmadan yararlanarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. 260-408 nm'de analizi gerçekleştirilmiş olup 0.009 ppb LOD değeri tespit edilmiştir. Benzo[a]pirene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı Şekil 4.35'te, LOD doğrulaması kromatogramı Şekil 4.36'de verilmiştir.



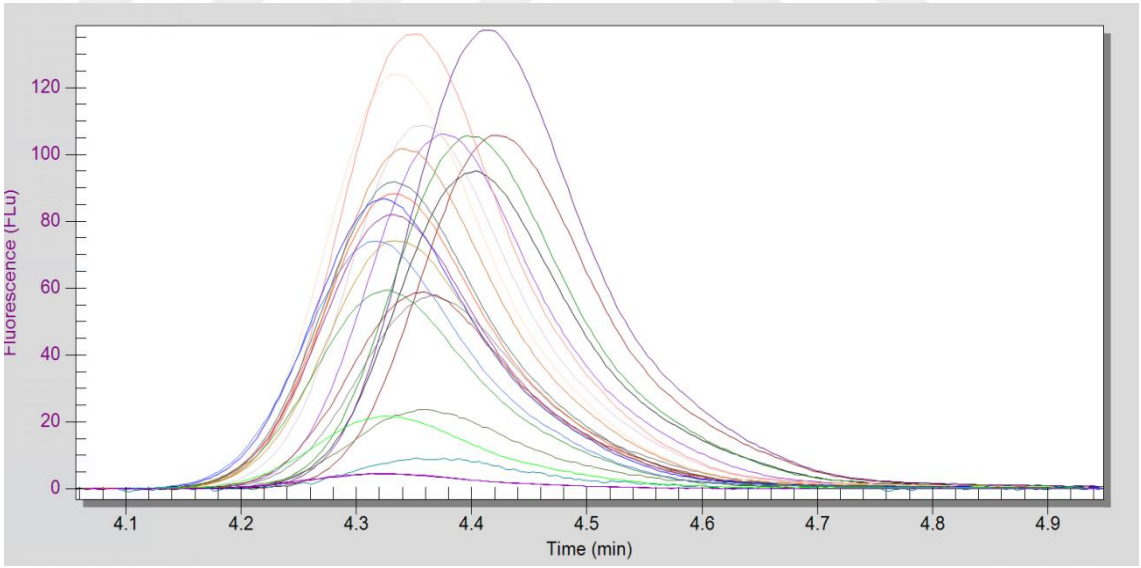

**Şekil 4.35.** Benzo[a]pirene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı




**Şekil 4.36.** Benzo[a]pirene ait LOD doğrulaması kromatogramı

### 4.1.13. Dibenz[a,h]antrasen

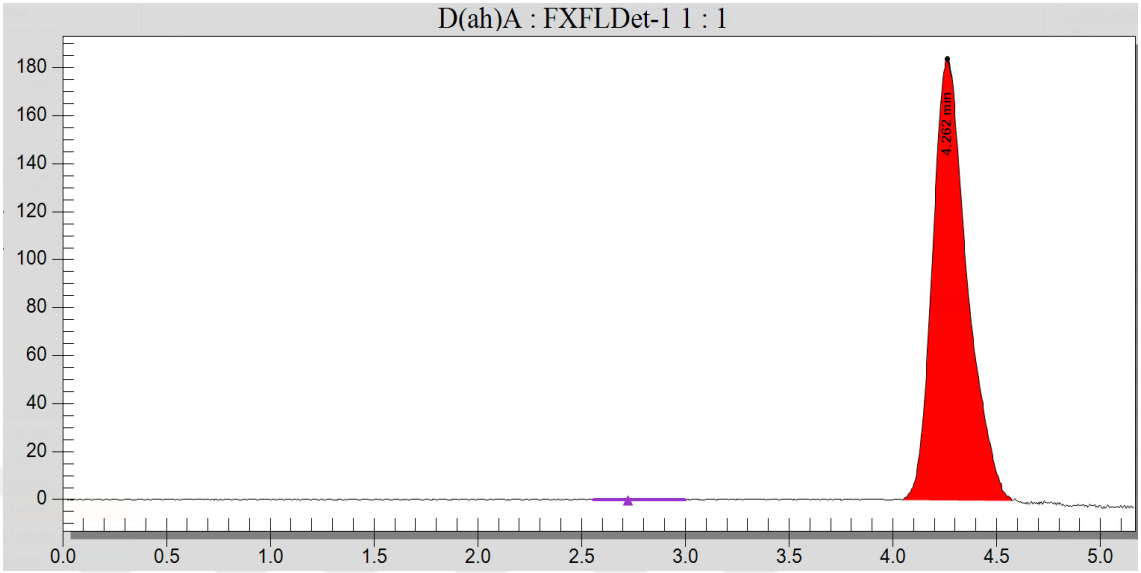
Dibenz[a,h]antrasen için toplam yirmi üç farklı dalga boyunda çalışma yapılmış olup 290-398 nm'de en yüksek pik boyu elde edilmiştir. Şekil 4.37'te Dibenz[a,h]antrasen için optimum dalga boyu analiz kromatogramları verilmiştir.



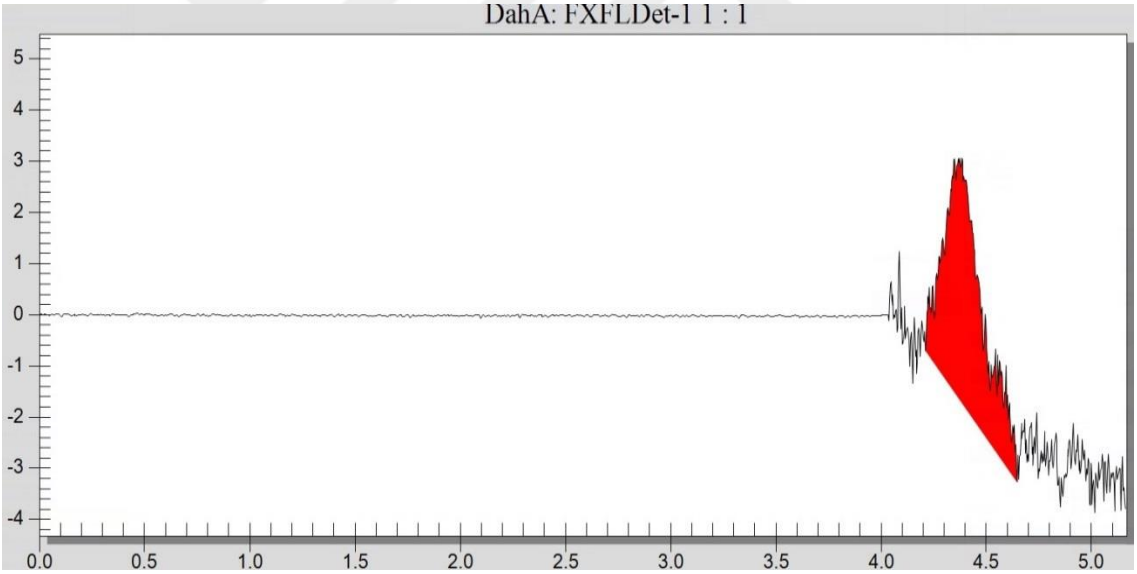

**Şekil 4.37.** Dibenz[a,h]antrasen için optimum dalga boyu analiz kromatogramları

2 ppb'lik standart hazırlanarak analiz yapılmış ve bu analiz sonucu elde edilen standart sapmadan yararlanarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. 290-398 nm'de analizi gerçekleştirilmiş olup 0.020 ppb LOD değeri tespit edilmiştir. Dibenz[a,h]antrasene ait

2 ppb'lik crm analizi kromatogramı Şekil 4.38'de, LOD doğrulaması kromatogramı Şekil 4.39'da verilmiştir.



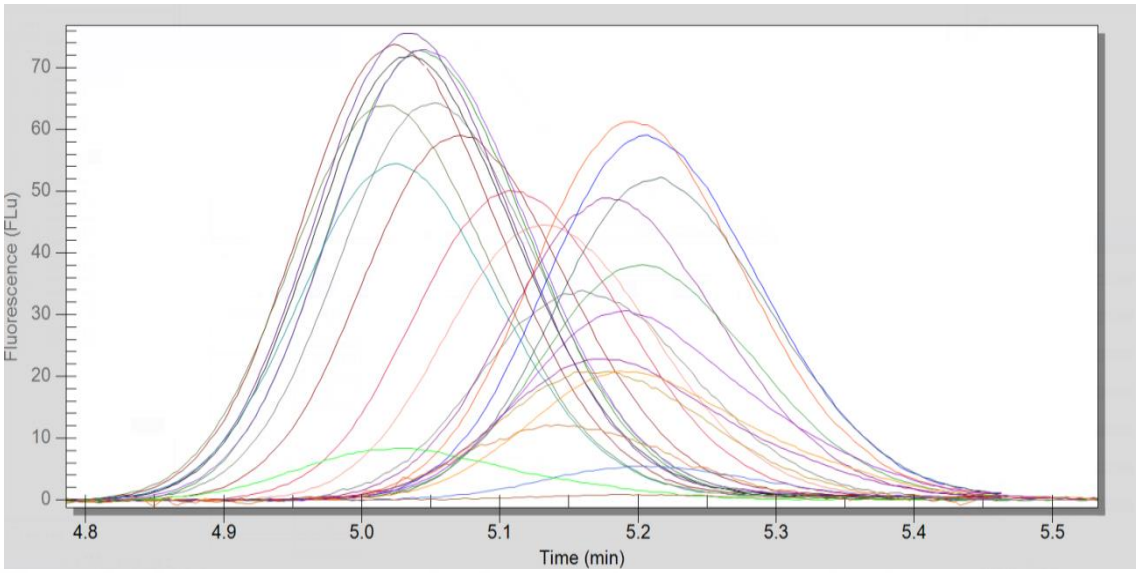

**Şekil 4.38**. Dibenz[a,h]antrasene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı




**Şekil 4.39.** Dibenz[a,h]antrasene ait LOD doğrulaması kromatogramı

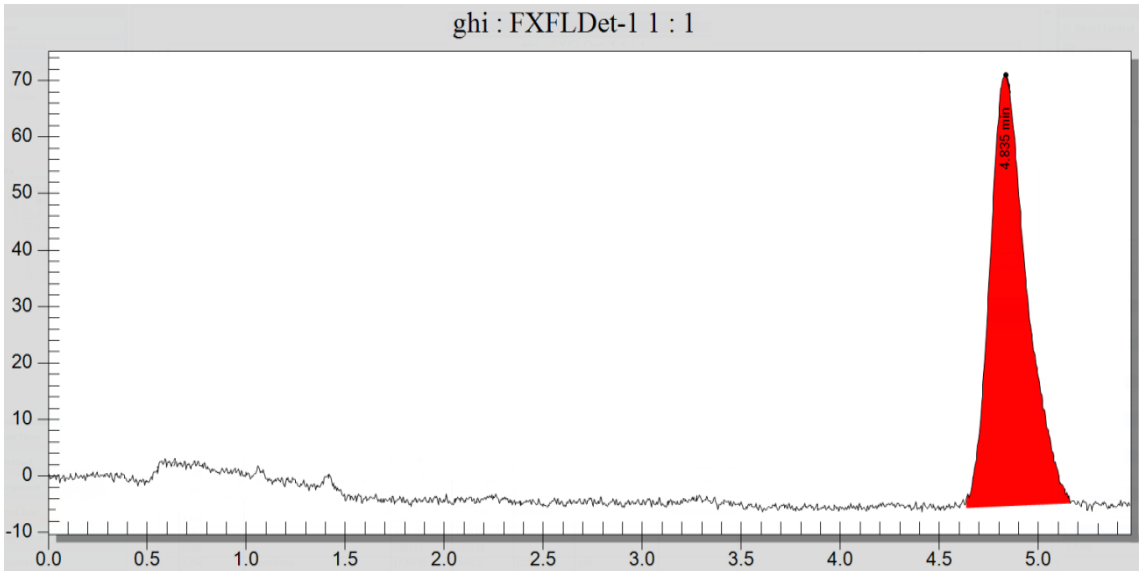
### 4.1.14. Benzo[g,h,i]perilen

Benzo[g,h,i]perilen için toplam yirmi beş farklı dalga boyunda çalışma yapılmış olup 290-415 nm'de en yüksek pik boyu elde edilmiştir. Şekil 4.40'ta Benzo[g,h,i]perilen için optimum dalga boyu analiz kromatogramları verilmiştir.

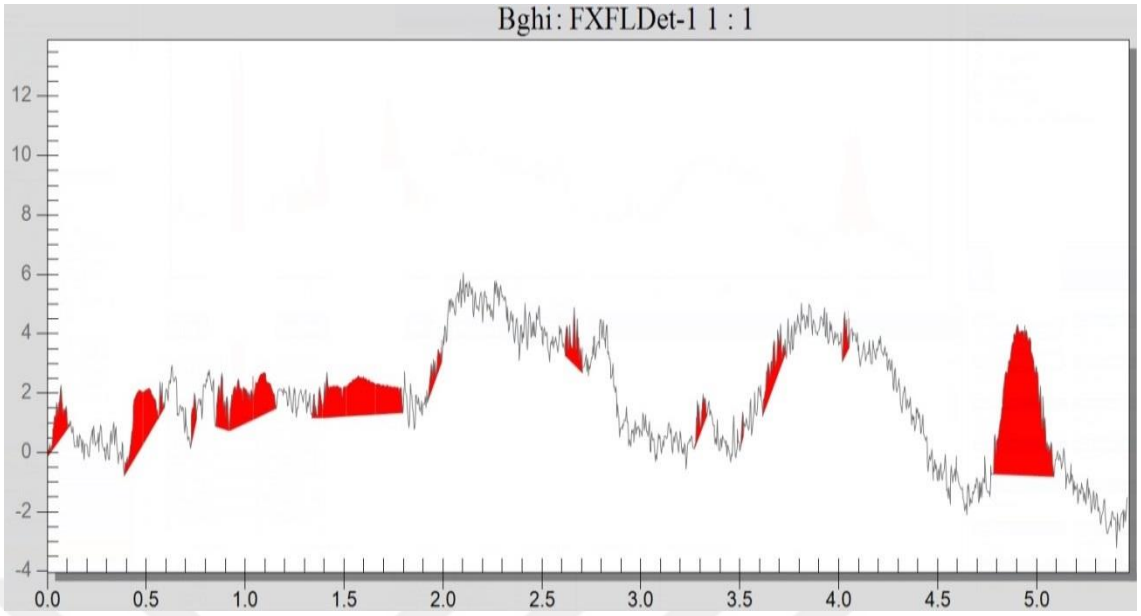



**Şekil 4.40**. Benzo[g,h,i]perilen için optimum dalga boyu analiz kromatogramları

2 ppb'lik standart hazırlanarak analiz yapılmış ve bu analiz sonucu elde edilen standart sapmadan yararlanarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. 290-415 nm'de analizi gerçekleştirilmiş olup 0.025 ppb LOD değeri tespit edilmiştir. Benzo[g,h,i]perilene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı Şekil 4.41'de, LOD doğrulaması kromatogramı Şekil 4.42'de verilmiştir.



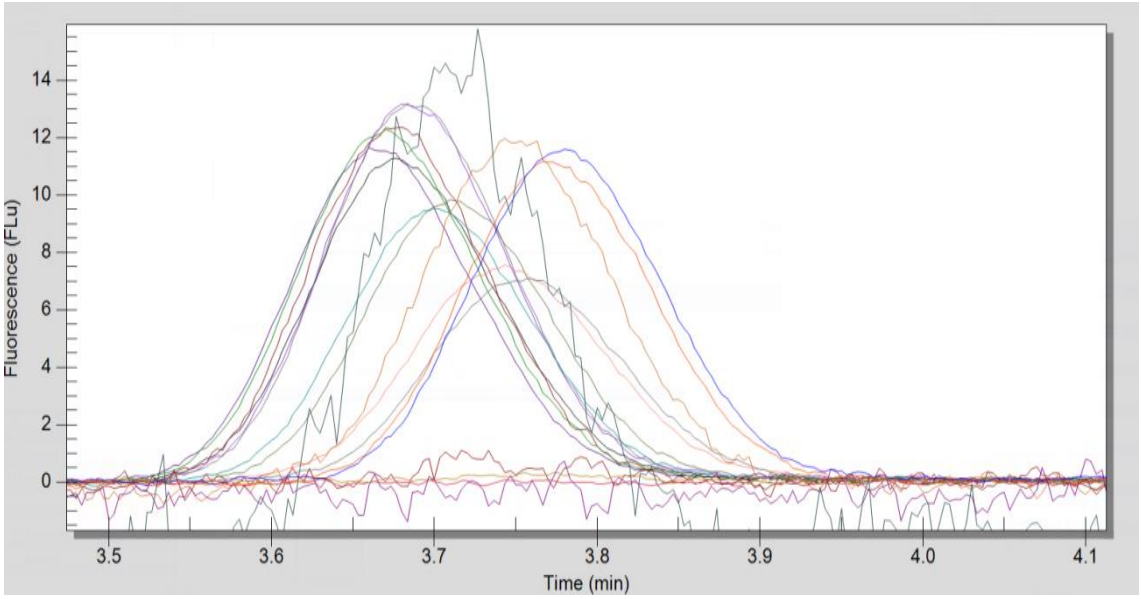

**Şekil 4.41**. Benzo[g,h,i)perilene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı




**Şekil 4.42.** Benzo[g,h,i]perilene ait LOD doğrulaması kromatogramı

### 4.1.15. İndeno[1,2,3-cd]piren

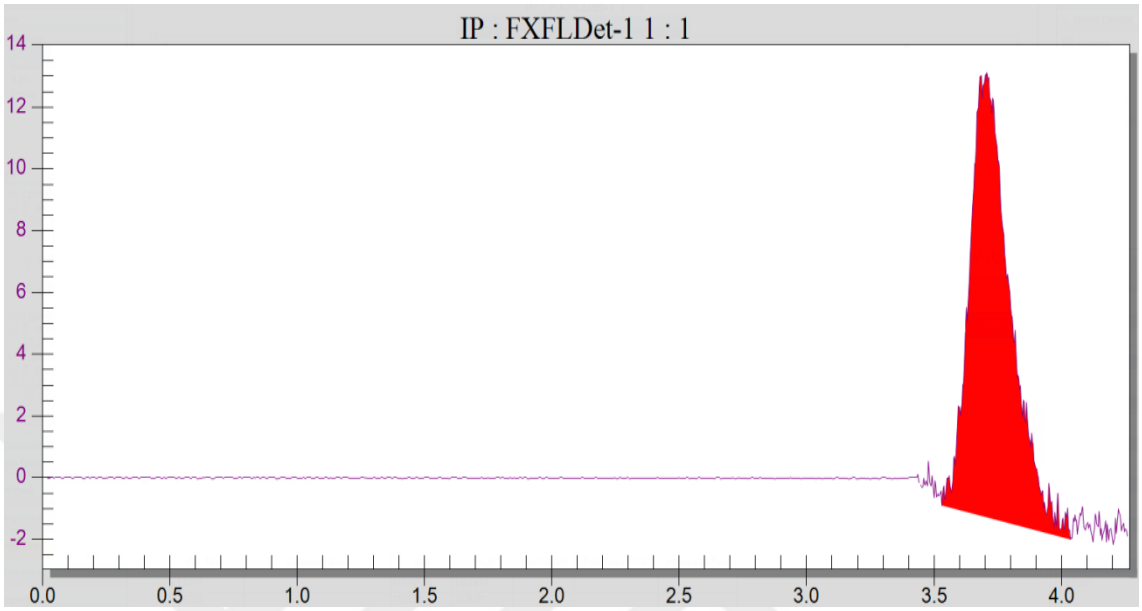
İndeno[1,2,3-cd]piren için toplam yirm üç farklı dalga boyunda çalışma yapılmış olup 248-484 nm'de en yüksek pik boyu elde edilmiştir. Şekil 4.43. İndeno[1,2,3c,d]piren için optimum dalga boyu analiz kromatogramları verilmiştir.



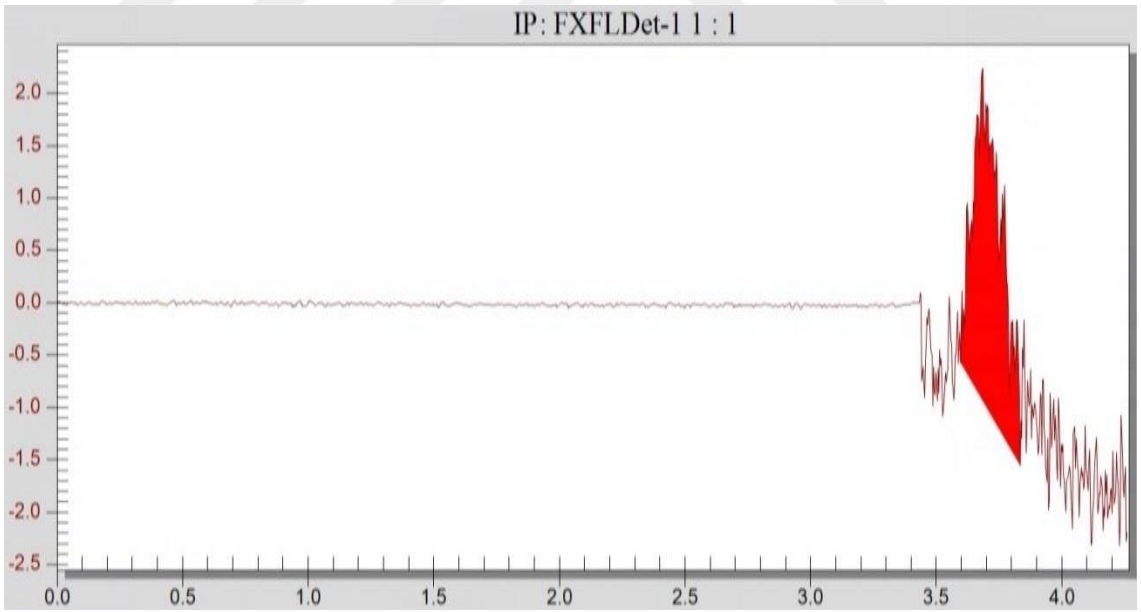

**Şekil 4.43.** İndeno[1,2,3-cd]piren için optimum dalga boyu analiz kromatogramları

2 ppb'lik standart hazırlanarak analiz yapılmış ve bu analiz sonucu elde edilen standart sapmadan yararlanarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. 248-484 nm'de analizi

gerçekleştirilmiş olup 0.090 ppb LOD değeri tespit edilmiştir. İndeno[1,2,3-cd]pirene ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı Şekil 4.44'te, LOD doğrulaması kromatogramı Şekil 4.45'te verilmiştir.




**Şekil 4.44**. İndeno[1,2,3-cd]piren e ait 2 ppb'lik crm analizi kromatogramı




**Şekil 4.45.** İndeno[1,2,3-cd]piren e ait LOD doğrulaması kromatogramı

### 4.2. SPE Optimizasyonu

Katı faz ekstraksiyon ön işlemine dair optimizasyonlar kartuş, çözücü, sıcaklık ve azot basıncı başlıkları altında gerçekleştirilmiştir. C 18, HLB, SDVB, fenil ve siyano kartuşlarına ait analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. Elüsyon basamağında çözücü karşılaştırılması siklohekzan, hekzan, kloroform, metanol, asetonitril, diklorometan ve belirli oranda karıştırılmış çözücüler arasında gerçekleştirilmiştir. SPE sonrası en önemli basamak olan tam kurutmanın yapıldığı azot altında uçurma işleminde farklı sıcaklık ve basınç değerlerinde geri kazanım oranları karşılaştırılarak optimum değerler tespit edilmiştir.

#### 4.2.1. Kartuş karşılaştırılması

PAH'ların katı faz ekstraksiyonda kullanılacak olan kartuş seçimi için C 18, HLB, SDVB, fenil ve siyano kartuşlarının analiz yapılmıştır. Ortalama yüzde geri kazanım değerlerine bakıldığında %80 geri kazanım yüzdesi ile en uygun kartuşun Thermo markasına ait HyperSep C 18 kartuş olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 4.4'te SPE kartuş karşılaştırması analiz sonuçları verilmiştir.

**Çizelge 4.4.** Çeşitli SPE kartuşları ile yapılan analizlerin sonuçları

| | **Supelco ENV-18** | **Supelco LC-18** | **Oasis HLB** | **Isolute C18** | **HyperSep C18** | **SDVB** | **HyperSep CN** | **HyperSep Phenyl** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nap | 60 | 33 | 70 | 41 | 89 | 89 | 33 | 72 |
| Act | 56 | 30 | 74 | 82 | 88 | 87 | 81 | 71 |
| Fln | 69 | 31 | 69 | 67 | 87 | 85 | 97 | 77 |
| Phe | 76 | 43 | 67 | 70 | 84 | 88 | 90 | 80 |
| Ant | 71 | 35 | 69 | 67 | 81 | 81 | 85 | 75 |
| Flt | 78 | 49 | 63 | 65 | 85 | 70 | 70 | 90 |
| Pyr | 79 | 48 | 61 | 64 | 83 | 70 | 71 | 90 |
| BaA | 72 | 49 | 59 | 51 | 82 | 52 | 48 | 63 |
| Chr | 84 | 58 | 48 | 53 | 77 | 53 | 44 | 61 |
| BbF | 89 | 96 | 45 | 48 | 75 | 45 | 45 | 62 |
| BkF | 80 | 90 | 39 | 43 | 74 | 50 | 45 | 58 |
| BaP | 99 | 91 | 48 | 45 | 78 | 44 | 47 | 59 |
| DahA | 81 | 83 | 40 | 44 | 75 | 39 | 53 | 57 |
| BghiP | 89 | 58 | 40 | 40 | 73 | 37 | 50 | 52 |
| IcdP | 68 | 31 | 27 | 33 | 70 | 40 | 44 | 49 |
| **Geri Kaz.** | **77** | **55** | **55** | **54** | **80** | **62** | **60** | **68** |

Supelco ENV-18 ve Supelco LC-18 aynı marka ve içeriğe sahip C 18 kartuşlar olup yüzde geri kazanım verimlerinin aynı olması beklenmiştir. İçerik incelemelerine bakıldığında temel farkın karbon yüzdesinde kaynaklı olduğu düşülmüştür. Supelco ENV-18 % 17, Supelco LC-18 ise % 11,5 karbon yüzdesine sahiptir. Karbon yüzdesinin yüksek olması tutunma oranını arttırmış bu sayede geri kazanım arasında fark ortaya çıkmıştır. En yüksek yüzde geri kazanım oranına sahip iki kartuş olan Supelco ENV-18 ve HyperSep C18'in içerikleri incelendiğinde karbon yüzdelerinin aynı olduğu (%17) burada farkı oluşturan unsurların partikül boyutu ve yüzey alanı oldukları tespit edilmiştir. Supelco ENV-18 45µm partikül boyutu ve 475 $m^2/g$ yüzey alanına sahipken, HyperSep C18 50µm partikül boyutu ve 500 $m^2/g$ yüzey alanına sahiptir. Partikül boyutunun ve yüzey alanın büyüklüğü maddenin kartuşla temasını arttırmış bundan dolayı geri kazanım oranlarında fark oluşmuştur.

### 4.2.2. Çözücü karşılaştırması

PAH'ların katı faz ekstraksiyonda elüsyon basamağında kullanılacak olan çözücü seçimi için siklohekzan, hekzan, kloroform, metanol, asetonitril, DCM çözücülerinin analizleri gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.5'te SPE çözücü karşılaştırması analiz sonuçları verilmiştir.

**Çizelge 4.5.** SPE çözücü karşılaştırması analiz sonuçları

| | **Siklohekzan** | **DCM** | **Hekzan** | **Kloroform** | **ACN** | **Metanol** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Nap | 37 | 88 | 82 | 55 | 71 | 103 |
| Act | 51 | 88 | 101 | 61 | 71 | 101 |
| Fln | 53 | 87 | 99 | 59 | 68 | 102 |
| Phe | 61 | 85 | 102 | 57 | 62 | 82 |
| Ant | 66 | 80 | 89 | 52 | 55 | 80 |
| Flt | 71 | 84 | 111 | 51 | 59 | 67 |
| Pyr | 68 | 86 | 106 | 56 | 45 | 62 |
| BaA | 71 | 81 | 101 | 58 | 46 | 61 |
| Chr | 70 | 76 | 88 | 59 | 54 | 60 |
| BbF | 84 | 75 | 89 | 60 | 50 | 63 |
| BkF | 81 | 74 | 95 | 57 | 55 | 59 |
| BaP | 65 | 77 | 87 | 61 | 57 | 57 |
| DahA | 69 | 79 | 91 | 58 | 61 | 52 |
| BghiP | 81 | 73 | 88 | 54 | 53 | 51 |
| IcdP | 63 | 71 | 87 | 51 | 56 | 49 |
| **% Geri Kaz.** | **66** | **80** | **94** | **57** | **58** | **70** |

**Çizelge 4.5.** SPE çözücü karşılaştırması analiz sonuçları (devam)

| | 1:1 DCM + Siklohekzan | 1:1 DCM + Hekzan | 1:2 DCM +Hekzan | 1:1:1 DCM + Hekzan + Siklohekzan |
|---|---|---|---|---|
| Nap | 25 | 65 | 66 | 87 |
| Act | 38 | 59 | 78 | 94 |
| Fln | 35 | 74 | 80 | 94 |
| Phe | 44 | 81 | 91 | 96 |
| Ant | 38 | 90 | 90 | 96 |
| Flt | 56 | 98 | 99 | 95 |
| Pyr | 52 | 101 | 97 | 98 |
| BaA | 59 | 90 | 92 | 94 |
| Chr | 58 | 89 | 87 | 95 |
| BbF | 62 | 93 | 81 | 96 |
| BkF | 64 | 85 | 78 | 91 |
| BaP | 66 | 84 | 73 | 92 |
| DahA | 60 | 91 | 72 | 89 |
| BghiP | 73 | 99 | 74 | 93 |
| IcdP | 61 | 83 | 70 | 85 |
| **% Geri Kaz.** | **53** | **85** | **82** | **93** |

Ortalama yüzde geri kazanım değerlerine bakıldığında %94 geri kazanım yüzdesi en uygun çözücünün hekzan olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca DCM, hekzan ve siklohekzan karışımınında yüksek bir geri kazanım yüzdesine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Hekzan ve karışım çözücülerle daha yüksek verim elde edilse dahi bu çözücülerin kaynama noktaları yüksektir. Bundan dolayı bu çözücülerin uçurma süreleri de fazladır bu da analiz sürelerini uzamasına neden olmaktadır. 13 mL elüsyon hacmi baz alınarak yapılan uçurma çalışmasında en kısa süre 45 dakika ile diklorometana aittir. Uçurması süresinin yükseliği özellikle molekül kütlesi düşük PAH'lar için geri kazanımda sorun yaratabilmektedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde PAH'lar için en uygun çözücünün dikolorometan olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 4.5'te SPE çözücülerinin kaynama noktaları ve buharlaşma süreleri verilmiştir.

**Çizelge 4.6.** Çözücülerin kaynama noktaları ve buharlaşma süreleri

| | Kaynama noktası | Uçurma Süresi |
|---|---|---|
| Hekzan | 69 $^0$C | 2 sa 5 dk |
| Siklohekzan | 80,8 $^0$C | 2 sa 35 dk |
| Diklorometan | 39,6 $^0$C | 45 dk |
| Kloroform | 61,2 $^0$C | 1 sa 10 dk |
| Asetonitril | 82 $^0$C | 2 sa 50 dk |
| Metanol | 64,7 $^0$C | 1 sa 35 dk |

### 4.2.3. Azot altında uçurma sıcaklık karşılaştırması

SPE sonrası çözücü değişimi (solvent exchange) basamağından önce azot altında tam kurutma yapılmaktadır. Sıcak su banyolu evaporatörde gerçekleştirilen buharlaştırma işleminde elüent alttan ısıtılırken üstten 45 derecelik açıyla azot gazı yardımıyla soğutulmaktadır. Buharlaşan çözücü soğuk azot gazı ile viale geri dönmektedir. Oluşan bu gaz girdapı sayesinde çözücünün içerisindeki PAH'lar cam vial çeperine tutunarak analit kaybı azaltılmış olur. Geri kazanımı etkileyen bu ısıtma işlemi için beş farklı sıcaklıkta çalışma gerçekleştirilmiş yüzde geri kazanım değerleri karşılaştırılarak en uygun sıcaklığın 35 $^0$C olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 4.7'de çözücü buharlaştırmada kullanılan sıcaklıkların yüzde geri kazanım değerleri verilmiştir.

**Çizelge 4.7.** Buharlaştırma işlemi sıcaklık karşılaştırması analiz sonuçları

| | **30 $^0$C** | **33 $^0$C** | **35 $^0$C** | **37 $^0$C** | **40 $^0$C** |
|---|---|---|---|---|---|
| Nap | 66 | 75 | 87 | 79 | 69 |
| Act | 68 | 79 | 85 | 77 | 71 |
| Fln | 69 | 75 | 86 | 73 | 71 |
| Phe | 70 | 75 | 82 | 73 | 70 |
| Ant | 71 | 78 | 81 | 75 | 71 |
| Flt | 74 | 80 | 86 | 81 | 75 |
| Pyr | 70 | 81 | 83 | 79 | 73 |
| BaA | 75 | 82 | 84 | 80 | 77 |
| Chr | 71 | 77 | 78 | 77 | 73 |
| BbF | 70 | 75 | 75 | 75 | 70 |
| BkF | 73 | 76 | 77 | 76 | 71 |
| BaP | 67 | 75 | 78 | 74 | 67 |
| DahA | 64 | 73 | 75 | 73 | 66 |
| BghiP | 60 | 72 | 73 | 72 | 60 |
| IcdP | 55 | 69 | 72 | 68 | 58 |
| **% Geri Kaz.** | **68** | **76** | **80** | **75** | **69** |

### 4.2.4. Çözücü buharlaştırmada kullanılan azot gazı basıncının karşılaştırılması

SPE sonrası azot altında tam kurutma yapılması için beş farklı azot basıncında çalışmalar gerçekleştirilmiş olup en uygun basınç değerinin 12 psi olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 4.8'de azot altında uçurma basınç karşılaştırması analiz sonuçları verilmiştir.

**Çizelge 4.8.** Buharlaştırma işlemi basınç karşılaştırması analiz sonuçları

| | **10 psi** | **11 psi** | **12 psi** | **13 psi** | **14 psi** |
|---|---|---|---|---|---|
| Nap | 67 | 69 | 79 | 77 | 75 |
| Act | 69 | 71 | 81 | 80 | 77 |
| Fln | 63 | 71 | 83 | 84 | 77 |
| Phe | 70 | 69 | 80 | 82 | 79 |
| Ant | 69 | 72 | 82 | 80 | 81 |
| Flt | 68 | 71 | 83 | 80 | 80 |
| Pyr | 72 | 77 | 83 | 81 | 79 |
| BaA | 75 | 75 | 87 | 80 | 81 |
| Chr | 71 | 73 | 81 | 83 | 82 |
| BbF | 73 | 75 | 77 | 75 | 77 |
| BkF | 73 | 75 | 79 | 81 | 80 |
| BaP | 77 | 75 | 78 | 80 | 80 |
| DahA | 75 | 79 | 75 | 73 | 75 |
| BghiP | 77 | 80 | 74 | 70 | 73 |
| IcdP | 71 | 75 | 75 | 73 | 73 |
| **% Geri Kaz.** | **71** | **74** | **80** | **79** | **78** |

Azot basıncı analit kaybını etkileyen bir parametredir. Yüksek basınçta vialde taşırma yapacağında geri kazanım yüzdesinin düşmesine neden olabilmektedir. Düşük basınç gaz fazındaki analitlerin viale dönüp tutunmasına yeterli olmayıp yüzde geri kazanım değerlerini azaltırken analiz süresininde uzamasına neden olabilmektedir.

### 4.3. Sonuçların Uluslararası Standart Metotlar ile Karşılaştırılması

HPLC ve SPE tekniklerinde geliştirilen metot uluslararası standartlar ile yüzde geri kazanım ve yüzde bağıl standart sapma (%RSD) parametreleri bazında karşılaştırılarak değerlendirme yapılmıştır. Çizelge 4.9'da inovatif metot ile EPA 550.1 ve ISO 17993 standart metotlarının hazırlanan inovatif metot yüzde geri kazanım karşılaştırmaları verilmiştir.

**Çizelge 4.9.** Metotların % geri kazanım değerlerinin karşılaştırılması

| | **EPA 550.1** | **ISO 17993** | **İnovatif Metot** |
|---|---|---|---|
| Nap | 72,8 | 88,1 | 90,2 |
| Act | 67,1 | 82,1 | 90,0 |
| Fln | 72,5 | 85,0 | 96,6 |
| Phe | 59,5 | 108 | 94,1 |
| Ant | 63,3 | 89,5 | 97,6 |
| Flt | 80,7 | 96,8 | 98,9 |
| Pyr | 80,7 | 94,7 | 97,6 |
| BaA | 78,1 | 96,1 | 98,1 |
| Chr | 73,1 | 92,5 | 95,5 |
| BbF | 65,9 | 91,3 | 94,7 |
| BkF | 74,9 | 90,6 | 93,3 |
| BaP | 70,0 | 85,1 | 95,2 |
| DahA | 64,7 | 82,3 | 92,6 |
| BghiP | 67,3 | 84,0 | 92,2 |
| IcdP | 74,0 | 87,7 | 90,1 |

Her iki standart metoda ait performans parametreleri incelenmiş analizi yapılan spike çözelti miktarlarına eşdeğer miktarda çözeltiler ile karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir. İki standart metot için yapılan analizlerin yüzde geri kazanım ortalamaları alınarak tek değer ile karşılaştırma yapılmıştır. On beş PAH'ın ortalama geri kazanım değeri %94,4 olarak elde edilmiştir. Bu yüzde EPA 550.1 için 70,9, ISO 17993 %90,2'dir. Tüm PAH parametrelerinde iki standart metottan daha yüksek yüzde geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

Her iki standart metoda ait performans parametreleri incelenmiş analizi yapılan spike çözelti miktarlarına eşdeğer miktarda çözeltiler ile karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir. İki standart metot için yapılan analizlerin standart sapmalarının ortalaması alınarak tek değer ile karşılaştırma yapılmıştır. Çizelge 4.10'da inovatif metot ile EPA 550.1 ve ISO 17993 standartlarının tekrarlanabilirlik %RSD karşılaştırmaları verilmiştir.

**Çizelge 4.10.** Metotların % RSD değerlerinin karşılaştırılması

| | **EPA 550.1** | **ISO 17993** | **İnovatif Metot** |
|---|---|---|---|
| Nap | 10,7 | 14,0 | 4,6 |
| Act | 7,6 | 9,2 | 4,2 |
| Fln | 7,1 | 10,1 | 3,2 |
| Phe | 4,3 | 9,0 | 2,5 |
| Ant | 9,1 | 7,0 | 4,4 |
| Flt | 6,7 | 4,7 | 4,1 |
| Pyr | 13,3 | 8,7 | 5,1 |
| BaA | 6,5 | 9,5 | 4,7 |
| Chr | 10,2 | 9,3 | 4,6 |
| BbF | 5,6 | 8,9 | 4,0 |
| BkF | 10,8 | 10,6 | 3,9 |
| BaP | 7,5 | 9,4 | 4,0 |
| DahA | 7,5 | 7,9 | 5,7 |
| BghiP | 8,0 | 11,0 | 5,9 |
| IcdP | 10,2 | 10,2 | 7,7 |

On beş PAH'ın ortalama %RSD değeri 4,6 olarak elde edilmiştir. Bu değer EPA 550.1'de 8,3, ISO 17993'te 9,3'tür. ISO metodunda LLE yönteminin kullanılması tekrarlanabilirlikten kaynaklı standart sapmayı arttırmıştır. Tüm PAH parametrelerinde iki standart metottan daha düşük % RSD değerlerine erişilmiştir.

Geliştirilen analiz metodu doğruluğunu kontrol edebilmek adına içme suyu matriksinde Flt, BaP, BbF, BkF, IcdIP ve BghiP parametrelerinde uluslararası yeterlilik testine katılım sağlanmıştır. Yeterlilik testi Aquacheck adıyla LGC firması tarafından organize edilmiştir. Sonuçların kabul edilebilirliği z-skorlarının mutlak değerleri ile şu şekilde değerlendirilir; $|z| \leq 2$ kabul edilebilir sonuç, $2<|z|<3$ şüpheli sonuç, $|z| \geq 3$ kabul edilemez sonuçtur. Laboratuvarlar arası karşılaştırma/yeterlilik testlerine katılım yoluyla gerçeklik çalışması yapıldığında, "z" skoru ile raporlanan karşılaştırma sonucunda

laboratuvarın -2<=z=>2 arasında bir skor alması, o laboratuvara ait gerikazanım/sapmanın kabul edilebilir olduğunu göstermektedir. Çizelge 4.11'de verilen z-skor değerleri 0,05 ile 1,60 arasında olup geliştirilen yöntemin doğrulaması bu şekilde sağlanmıştır.

**Çizelge 4.11.** Yeterlilik testi sonuçları

| Analit | Sonuç | Birim | Z Skor | Atanmış Değer | Katılımcı Lab. Sayısı | SD |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Flt | 20,7 | ng/L | 0,05 | 20,6 | 39 | 3,370 |
| BbF | 8,60 | ng/L | 0,52 | 7,55 | 49 | 1,232 |
| BkF | 8,21 | ng/L | 0,14 | 7,93 | 49 | 1,633 |
| BaP | 3,81 | ng/L | 0,18 | 3,72 | 49 | 0,786 |
| BghiP | 20,80 | ng/L | 1,60 | 17,60 | 48 | 3,076 |
| IcdP | 11,24 | ng/L | 0,79 | 9,67 | 49 | 1,816 |

## 5. SONUÇ

Bu çalışma ile PAH'ların analizinde çok kullanılan yöntemlerden olan HPLC ve SPE metotlarında optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. HPLC kısmında tüm PAH'ların floresan dedektörde maksimum absorbans verdiği dalga boyu çifleri tespit edilmiştir. Tespit edilen dalga boyları (Nap 215/330 nm, Act 222/329 nm, Fln 263/310 nm, Phe 247/364 nm, Ant 247/401 nm, Fl 2840/460 nm, Pyr 236/389 nm, BaA 275/389 nm, Chr 260/381 nm, BbF 256/446 nm, BkF 295/410 nm, BaP 260/408 nm, DahA 290/398 nm, BghiP 290/415 nm ve IcdP 248/484 nm) ile analiz hassasiyeti arttırılmıştır. Özellikle su gibi yasal limitlerin çok düşük olduğu matrikslerde analiz kabiliyeti yükseltilmiştir. Sertifikalı referans malzeme ile yapılan çalışmalarda ng/L seviyesinde analizler gerçekleştirilmiştir. Ön işlem ile yapılacak deriştirme sonrası metot pg/L seviyesinde analiz sonucu elde edilebilir hale getirilmiştir.

SPE kısmında geri kazanım verimini en çok etkileyen basamaklarda optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kartuş, çözücü, evaporasyon işlemindeki sıcaklık ve basınç başlıklarında optimum şartlar sağlanmıştır. Kartuş için en yüksek geri kazanım HyperSep C 18'de elde edilmiştir. Çözücü için hekzan ile daha yüksek geri kazanım verimi elde edilmesine rağmen buharlaşma süresinin daha az olmasından dolayı dikolormetan tercih edilmiştir. Çözücü buharlaştırma işlemindeki sıcaklık için 35 $^{0}$C ve azot gazının basıncı için 12 psi optimum koşullar olarak belirlenmiştir. Hazırlanan analitik metodu takip edilerek yapılan PAH analizlerinde %94,4 geri kazanım ortalaması elde edilmiştir.

İnovatif metot, EPA 550.1 ve ISO 17993 gibi uluslararası standart metotlar ile karşılaştırıldığında geri kazanım yüzdesi ve tekrarlanabilirlik %RSD'si gibi performans parametrelerinde çok daha etkin olduğu gözlemlenmiştir. Oluşturulmuş metodun sadece deneysel olmayıp laboratuvar pratiğinde de etkinliği ve doğruluğu girilen uluslararası yeterlilik testi ile de kanıtlanmıştır. İçme suyu analize yönelik altı PAH (Flt, BaP, BbF, BkF, IcdIP ve BghiP) parametresinde yeterlilik testinden ikinin altında alınan z skorlar ile metodun geçerliliği sağlanmıştır.

## KAYNAKLAR


Adeniji, A. O., Okoh, O. O., & Okoh, A. I. (2017). Recent Insights in Petroleum Science and Engineering. M. Zoveidavianpoor (Eds.), *Analytical Methods for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and their Global Trend of Distribution in Water and Sediment: A Review* (s. 412). IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.71163

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (1995, August). *Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons*. https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.pdf

Agilent Technologies. (2016). *The LC Handbook Guide to LC Columns and Method Development.* USA

Akçelik, E. (2021). *Çevresel Su Örneklerinde Tefluthrin İnsektisitinin Manyetik Katı-Faz Ekstraksiyon Ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İle Belirlenmesi* (Tez No. 710235) [Yüksek lisans tezi, Bülent Ecevit Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.

Altundağ, H. (2007). *Katı Faz Ekstraksiyon Tekniği İle Talyum Türlendirme Çalışması* (Tez No. 216251) [Doktora tezi, Sakarya Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.

Alver, E., Demirci, A., & Özcimder, M. (2012). Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar ve Sağlığa Etkileri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3(1), 45-52. https://dergipark.org.tr/tr/pub/makufebed/issue/19422/206555

Arı, A. (2008). *Eskişehir Atmosferindeki Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların (PAH'ların) Derişimlerinin ve Kaynaklarının Belirlenmesi* (Tez No. 220854). [Yüksek lisans tezi, Anadolu Üniversitesi). Ulusal Tez Merkezi.

Armstrong, B., Hutchinson, E., Unwin, J., & Fletcher, T. (2004). Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A review and meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*, *112*(9), 970–978. https://doi.org/10.1289/ehp.6895

Aygün, Ş. F., & Özcimder, M. (1996). A comparison of normal(-CN) and reversed (C-18) phase chromatographic behaviour of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Turkish Journal of Chemistry*, *20*(4), 269–275.

Baltacı, C., & Gündoğdu, A. (2012). Enstrümental Gıda Analizleri. (s. 76-77) Gümüşhane Üniversitesi.

Berset, J. D., Ejem, M., Holzer, R., & Lischer, P. (1999). Comparison of different drying, extraction and detection techniques for the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in background contaminated soil samples. *Analytica Chimica Acta*, *383*(3), 263–275. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00817-4

Bilgin, A. A. (1995). *Organik Kimya Nomenklatürü*, Şafak Matbaası.

Boffetta, P., Jourenkova, N., & Gustavsson, P. (1997). Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes and Control*, *8*(3), 444–472. https://doi.org/10.1023/A:1018465507029

Boström, C. E., Gerde, P., Hanberg, A., Jernström, B., Johansson, C., Kyrklund, T., Rannug, A., Törnqvist, M., Victorin, K., & Westerholm, R. (2002). Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environmental Health Perspectives*, *110*(SUPPL. 3), 451–488. https://doi.org/10.1289/ehp.110-1241197

Brooks, L. R., Hughes, T. J., Claxton, L. D., Austern, B., Brenner, R., & Kremer, F. (1998). Bioassay-directed fractionation and chemical identification of mutagens in bioremediated soils. *Environmental Health Perspectives*, 106(6), 1435–1440. https://doi.org/10.1289/ehp.98106s61435

Bruzzoniti, M. C., Fungi, M., & Sarzanini, C. (2010). Determination of EPA's priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking waters by solid phase extraction-HPLC. *Analytical Methods*, 2(6), 739–745. https://doi.org/10.1039/b9ay00203k

Callen, M. S., Iturmendi, A., & López, J. M. (2014). Source apportionment of atmospheric PM2.5-bound polycyclic aromatic hydrocarbons by a PMF receptor model. Assessment of potential risk for human health. *Environmental Pollution*, 195, 167–177. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.08.025

Camel, V. (2003). Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 58(7), 1177–1233. https://doi.org/10.1016/S0584-8547(03)00072-7

Castellano, V. A., López Cancio, J., Santana Alemán, P., & Santana Rodríguez, J. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air particles in the city of Las Palmas de Gran Canaria. *Environment International*, 29(4), 475–480. https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00003-5

Chen, B. H., Wang, C. Y., & Chiu, C. P. (1996). Evaluation of Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Meat Products by Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 2244–2251. https://doi.org/10.1021/jf9508211

Crimmins, B. S., & Baker, J. E. (2006). Improved GC/MS methods for measuring hourly PAH and nitro-PAH concentrations in urban particulate matter. *Atmospheric Environment*, 40(35), 6764–6779. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2006.05.078

Çabuk, H. (2009). *Zonguldak Atmosferindeki Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Dağılımları, Mevsimsel Değişimleri ve Kaynakları* (Tez No. 237803) [Doktora tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.

Çakır, B. (2015). *Dikobalt Nikel Borat İnorganik Tuzu Kullanılarak Bazı Metallerin Önderiştirilmesi* (Tez No. 395552) [Yüksek lisans tezi, Balıkesir Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.

Çelebi, B. (2010). *Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İçin İmmobilize Enzim Reaktörlerinin Geliştirilmesi ve Kinetik Karakterizasyonu*. (Tez No. 270295) [Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.

Çıtak, D. (2006). Zeytinyağı ve Pirina Yağındaki BaP Kirliliğinin HPLC ile Tespiti (Tez No. 180583) [Yüksek lisans tezi, Pamukkale Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.

Danyi, S., Brose, F., Brasseur, C., Schneider, Y. J., Larondelle, Y., Pussemier, L., Robbens, J., De Saeger, S., Maghuin-Rogister, G., & Scippo, M. L. (2009). Analysis of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons in food supplements using high performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet, diode array or fluorescence detector. *Analytica Chimica Acta*, 633(2), 293–299. https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.049

De Boer, J., & Law, R. J. (2003). Developments in the use of chromatographic techniques in marine laboratories for the determination of halogenated contaminants and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Chromatography*

*A*, *1000*(1–2), 223–251. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00309-1

De Nicola, F., Concha Graña, E., López Mahía, P., Muniategui Lorenzo, S., Prada Rodríguez, D., Retuerto, R., Carballeira, A., Aboal, J. R., & Fernández, J. Á. (2017). Evergreen or deciduous trees for capturing PAHs from ambient air? A case study. *Environmental Pollution*, 221, 276–284. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.074

Delhomme, O., Rieb, E., & Millet, M. (2007). Solid-Phase Extraction and LC with Fluorescence Detection for Analysis of PAHs in Rainwater. Chromatographia, 65, 163–171. https://doi.org/10.1365/s10337-006-0144-z

Denis, E. H., Toney, J. L., Tarozo, R., Scott Anderson, R., Roach, L. D., & Huang, Y. (2012). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in lake sediments record historic fire events: Validation using HPLC-fluorescence detection. *Organic Geochemistry*, 45, 7–17. https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2012.01.005

Dionex. (1994). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Determination by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography* [Application Note]. http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/AN-95-Polycyclic-Aromatic-Hydrocarbon-Determination-LPN0570.pdf

Dong, M. W. (2019). *HPLC and UHPLC For Practicing Scientist, Second Edition*. Wiley.

Dong, M. W., & Zhang, K. (2014). Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 63, 21–30. https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.06.019

Environmental Protection Agency. (1990). Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Drinking Water by Liquid-Solid Extraction and HPLC with Coupled Ultraviolet and Fluorescence Detection (EPA 550.1). https://www.o2si.com/docs/epa-method-550.1.pdf

Environmental Protection Agency. (1993). *Provisional Guidance for Quantitative Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. https://epa-prgs.ornl.gov/chemicals/help/documents/600R93089.pdf

Environmental Protection Agency. (1999, January)**.** *Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Ambient Air Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) in Compendium of Methods for the Determination of Toxic Organic Compounds in Ambient Air - Compendium Method TO-13A*. https://www.epa.gov/sites/default/files/2019-11/documents/to-13arr.pdf

Esen, F. (2006). *Bursa Atmosferi'ndeki Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların (PAH'ların) Gaz/Partikül Konsantrasyon Dağılımları ve Kuru Çökelme Miktarları* (Tez No. 202293) [Doktora tezi, Uludağ Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.

Eser, B., & Dinçel, S. A. (2018). Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları. *Journal of Health Services and Education*, 2(2), 51–57. https://doi.org/10.26567/johse.2018250150

European Communities. (2002, July). *Ambient Air Pollution by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. https://ec.europa.eu/environment/archives/air/pdf/pp_pah.pdf

Fang, M. Der, Lee, C. L., & Yu, C. S. (2003). Distribution and source recognition of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of Hsin-ta Harbour and adjacent coastal areas, Taiwan. *Marine Pollution Bulletin*, 46(8), 941–953. https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00099-7

Fernandez, M., Clavijo, S., Forteza, R., & Cerdà, V. (2015). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons using lab on valve dispersive liquid-liquid

microextraction coupled to high performance chromatography. *Talanta*, 138, 190–195. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.02.007

Ferrarese, E., Andreottola, G., & Oprea, I. A. (2008). Remediation of PAH-contaminated sediments by chemical oxidation. *Journal of Hazardous Materials*, *152*(1), 128–139. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.06.080

Gaga, E. O. (2004). *Investigation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Deposition in Ankara* (Tez No. 153406) [Doktora tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.

Gerber, F., Krummen, M., Potgeter, H., Roth, A., Siffrin, C., & Spoendlin, C. (2004). Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3 μm particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice *Journal of Chromatography A*, 1036(2), 127-133. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.02.056

Gerstel. (2002). *Automated Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) in Combination with HPLC - Fluorescence Detection for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water* [Application Note]. https://www.gerstelus.com/wp-content/uploads/2017/07/2002-01_twister_lc-pahs-in-water.pdf

Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T. K., & Ahn, Y. (2016). Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Frontiers in Microbiology*, *7*(AUG). https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01369

Grimmer, G., Naujack, K. W., & Schneider, D. (1981). Comparison of the profiles of polycyclic aromatic hydrocarbons in different areas of a city by glass-capillary-gas-chromatography in the nanogram-ranget. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 10(3–4), 265–276. https://doi.org/10.1080/03067318108071550

Güler, N. (2020). *Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların (PAH) Ekstraksiyonu ve Hplc ile Tayinleri*. (Tez No. 612228) [Yüksek lisans tezi, Manisa Celal Bayar Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.

Hanai, T. (1999). HPLC A Practical Guide. Royal Society of Chemistry.

Harrison, R. M., Smith, D. I. T., & Luhana, L. (1996). Source apportionment of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons collected from an urban location in Birmingham, U.K. *Environmental Science and Technology*, 30(3), 825–832. https://doi.org/10.1021/es950252d

Huang, Y., Wei, J., Song, J., Chen, M., & Luo, Y. (2013). Determination of low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by high performance liquid chromatography with tandem fluorescence and diode-array detectors. *Chemosphere*, *92*(8), 1010–1016. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.035

Hussain, S., & Shaikh, T. (2016). Ultra High Performance Liquid Chromatography (Uplc): A New Trend In Analysis. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 5(3), 387-934.

International Agency for Research on Cancer. (2010, October). Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono92.pdf

International Organization for Standardization. (2002). Water quality Determination of 15 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in water by HPLC with fluorescence

detection after liquid-liquid extraction (ISO Standard No. 17993:2002). https://www.iso.org/standard/31666.html

Ishizaki, A., Saito, K., Hanioka, N., Narimatsu, S., & Kataoka, H. (2010). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1217(35), 5555–5563. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.06.068

Ishizaki, A., Sito, K., & Kataoka, H. (2011). Analysis of contaminant polycyclic aromatic hydrocarbons in tea products and crude drugs. *Analytical Methods*, *3*(2), 299–305. https://doi.org/10.1039/c0ay00423e

Janska, M., Tomaniová, M., Hajšlová, J., & Kocourek, V. (2006). Optimization of the procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives in fish tissue: Estimation of measurements uncertainty. *Food Additives and Contaminants*, 23(3), 309–325. https://doi.org/10.1080/02652030500401207

Jing, C., Zhenyu, D., & Qun, X. (2017). Sensitive and rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in tap water. Thermoscientific - Appl note, 70923.

Jing, C., Zhenyu, D., Qun, X., Lina, L., & Rohrer, J. (2014). Sensitive and rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in tap water. *Thermoscientific - Application note*, 1085, 1–8.

Kamens, R. M., Fulcher, J. N., & Zhishi, G. (1986). Effects of temperature on wood soot pah decay in atmospheres with sunlight and low NOx. *Atmospheric Environment (1967)*, 20(8), 1579–1587. https://doi.org/10.1016/0004-6981(86)90247-7

Kander, S. (2014). *İçme Sularında Poliaromatik Hidrokarbonların Katı Faz Ekstraksiyon İle Kromatografik Analizlerine Analitik Yaklaşımlar* (Tez No. 373734) [Yüksek Lisans Tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.

Karakaş, D., Telli, K.bF., Tolun, L., Tüfekçi, V., Morkoç, E., Tüfekçi, H., Karakoç, F., Okay, O., & Yakan, H. (2004). *İzmit Körfezi'ne Giren Kanserojenik Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH): Kaynak ve Seviye Tespiti*. TÜBİTAK-MAM. https://open.metu.edu.tr/handle/11511/95471

Karatepe, A. (2006). *Chromosorb-105 Dolgulu Kolonda Ve Membran Filtrede Bazı Eser Elementlerin Katı Faz Özetlemesi* (Tez No. 177689) [Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.

Kataoka, H. (2010). Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(1), 339–364. https://doi.org/10.1007/s00216-009-3076-2

Kaya, E., M. (2014). *Mikroekstraksiyon Yöntemi İle Yapılan İlaç Analizleri* [*Bitirme Ödevi*, Erciyes Üniversitesi]. https://pharmacy.erciyes.edu.tr.

Kayali-Sayadi, M. N., Rubio-Barroso, S., Beceiro-Roldan, C., & Polo-Diez, L. M. (1996). Rapid determination of PAHs in drinking water samples using solid-phase extraction and HPLC with programmed fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 19(19), 3135–3146. https://doi.org/10.1080/10826079608015813

Kılıç S. M. (2012). *Endüstriyel Kaynaklı Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Biyoindikatör Karayosunları İle Araştırılması (Tez No. 330729)* [Yüksek lisans tezi, Bülent Ecevit Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.

Köseler, M. Didem. (2008). *Büyükçekmece Gölü'nde Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH) Konsantrasyonunun Belirlenmesi* (Tez No. 246795) [Yüksek lisans tezi,

İstanbul Teknik Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.
Kromidas, S. (Ed.). (2017). *The HPLC Expert II*. Wiley-VCH.
Kromidas, S. (Ed.). (2021). *Optimization in HPLC Concepts and Strategies*. Wiley.
Kumar, B., Verma, V. K., Gaur, R., Kumar, S., Sharma, C. S., & Akolkar, A. B. (2014). Validation of HPLC method for determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) in waste water and sediments. *Pelagia Research Library Advances in Applied Science Research*, 5(1), 201–209.
Kurnaz, Ü. S., & Büyükgüngör, H. (2007). Kızılırmak Deltası kıyı şeridinde su ve midye örneklerinde PAH kirliliğinin araştırılması. *itüdergisi/e,* 17(2), 15-22
Larsen, J. C., & Larsen, P. B. (1998). Chemical Carcinogens in air Pollution and Health. *Food and chemical toxicology*, 34, 1021-1031.
Lee, H. K. (2001). Chapter 2 Modern techniques for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Handbook of Analytical Separations*, 3, 39–74. https://doi.org/10.1016/S1567-7192(01)80005-X
Limam I., & Driss, M. R. (2013). Off-line solid-phase extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous matrices. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 10, 973–982. https://doi.org/10.1007/s13762-013-0229-9
Lodovici, M., Venturini, M., Marini, E., Grechi, D. & Dolara, P. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons air levels in Florence, Italy, and their correlation with other air pollutants. *Chemosphere*, *50*(3), 377–382. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00404-6
Lundstedt, S. (2003). *Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remedial processes* (ISBN 91-7305-452-6) [Doctoral dissertation, Umeå University]. Digitala Vetenskapliga Arkivet.
Ma, M., Feng, Z., Guan, C., Ma, Y., Xu, H., & Li, H. (2001). DDT, PAH and PCB in sediments from the intertidal zone of the Bohai Sea and the Yellow Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 42(2), 132–136. https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00118
Malejko, J., Nalewajko-Sieliwoniuk, E., Szabuńko, J., & Nazaruk, J. (2016). Ultra-high Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array and Chemiluminescence Detection for the Determination of Polyphenolic Antioxidants in Erigeron acris L. Extracts. *Phytochemical Analysis*, 27(5), 277–283. https://doi.org/10.1002/pca.2626
Manahan, S. E. (1994). *Environmental Chemistry, 6th Ed*. Lewis.
Marce, R. M., & Borrull, F. (2000). Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds. *Journal of Chromatography A*, 885(1-2), 273–290. https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)00428-3
Martins, G. V., Martins, S., Martins, A. O., Basto, M. C. P., & Silva, G. V. (2013). Determination of gaseous polycyclic aromatic hydrocarbons by a simple direct method using thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185, 6447–6457. https://doi.org/10.1007/s10661-012-3036-8
Mihaljevcic, M., Sisr, L., Ettler, V., Šebec, O., & Pruša, J. (2004). Oxidation of As-bearing gold ore - A comparison of batch and column experiments. *Journal of Geochemical Exploration*, *81*(1–3), 59–70. https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2003.08.002

Milli Eğitim Bakanlığı. (2013). *Kimya Teknolojisi Kromatografik Analizler*. http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Kromatografik%20Analizler.pdf

Moldoveanu, S., & David, V. (2022). *Essentıals in modern HPLC separations*. Elsevier.

Moreno, E., Reza, J., & Trejo, A. (2007). Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using water under subcritical conditions. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 27(4), 239–260. https://doi.org/10.1080/10406630701462916

Neilson, A. H. (Ed.). (1998). *PAHs and Related Compounds.* Springer.

Nisbet, I. C. T., & Lagoy, P. K., (1992). Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 16(3), 290-330.

Nollet, L. M. L. (Ed.). (2007). *Handbook of water analysis.* CRC Press.

Novakova, L., & Vlckova, H. (2009). A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta*, 656(1–2), 8–35. https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.004

Okuda, T., Naoi, D., Tenmoku, M., Tanaka, S., He, K., Ma, Y., Yang, F., Lei, Y., Jia, Y., & Zhang, D. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the aerosol in Beijing, China, measured by aminopropylsilane chemically-bonded stationary-phase column chromatography and HPLC/fluorescence detection. *Chemosphere*, 65(3), 427–435. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.01.064

Pagliuca, G., Gazzotti, T., Zironi, E., Serrazanetti, G. P., Mollica, D., & Rosmini, R. (2003). Determination of high molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in a typical Italian smoked cheese by HPLC-FL. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 5111–5115. https://doi.org/10.1021/jf034305j

Patel, A. B., Shaikh, S., Jain, K. R., Desai, C., & Madamwar, D. (2020) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches. *Front Microbiol*, 11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.562813

Park, J. S., Wade, T. L., & Sweet, S. (2001). Atmospheric distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and deposition to Galveston Bay, Texas, USA. *Atmospheric Environment*, 35(19), 3241–3249. https://doi.org/10.1016/S1352-2310(01)00080-2

Pekey, B., Karakaş, D., & Ayberk, S. (2007). Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons to Izmit Bay, Turkey. *Chemosphere*, 67(3), 537–547. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.09.054

Pensado, L., Blanco, E., Casais, M. C., Mejuto, M. C., Martinez, E., Carro, A. M., & Cela, R. (2004). Strategic sample composition in the screening of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, 1056(1-2), 121–130. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.04.066

Perkin Elmer. (2015). *PAHs in Surface Water by PDA and Fluorescence Detection* [Application Note]. https://resources.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/app_pahs-in-surface-water-012102_01.pdf

Pilar, F., Josep, M. B., Joan, A., Magda, G., & Anna, M. S. (1992). Bioassay-Directed Chemical Analysis of Genotoxic Components in Coastal Sediments. *Environmental Science and Technology*, 26(4), 817–829. https://doi.org/10.1021/es00028a024

Poster, D. L., Schantz, M. M., Sander, L. C., & Wise, S. A. (2006). Analysis of

polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: A critical review of gas chromatographic (GC) methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(4), 859–881. https://doi.org/10.1007/s00216-006-0771-0

Quiroz, R., Popp, P., Urrutia, R., Bauer, C., Araneda, A., Treutler, H. C., & Barra, R. (2005). PAH fluxes in the Laja Lake of south central Chile Andes over the last 50 years: Evidence from a dated sediment core. *Science of the Total Environment*, 349(1–3), 150–160. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.01.005

Ranade, V. (2010). Practical High-Performance Liquid Chromatography. Swiss Federal Laboratories for Materials Testing and Research.

Ravindra, K., Sokhi, R., & Van Grieken, R. (2008). Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment*, 42(13), 2895–2921. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.12.010

Sarafraz-Yazdi, A., & Amiri, A. (2010). Liquid-phase microextraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 29(1), 1–14. https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.10.003

Sargenti, R. S., & Mcnair, M. H. (1998). Comparison of Solid-Phase Extraction and Supercritical Fluid Extraction for Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Drinking Water. *Journal of Microcolumn Separations*, 10(1), 125-131. https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-667X(1998)10:1%3C125::AID-MCS16%3E3.0.CO;2-2

Schneider, A. R., Stapleton, H. M., Cornwell, J., & Baker, J. E. (2001). Recent declines in PAH, PCB, and toxaphene levels in the Northern Great Lakes as determined from high resolution sediment cores. *Environmental Science and Technology*, 35(19), 3809–3815. https://doi.org/10.1021/es002044d

Sibiya, P., Potgieter, M., Cukrowska, E., Jönsson, J. A., & Chimuka, L. (2012). Development and Application of Solid Phase Extraction Method for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Samples in Johannesburg Area, South Africa. *South African Journal of Chemistry*, 65, 206-213.

Sikalos, T. I., Paleologos, E. K., & Karayannis, M. I. (2002). Monitoring of time variation and effect of some meteorological parameters in polynuclear aromatic hydrocarbons in Ioannina, Greece with the aid of HPLC-fluorescence analysis. *Talanta*, 58(3), 497–510. https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00287-4

Silva, S. A., Sampaio, G. R., & Torres, E. A. F. S. (2017). Optimization and validation of a method using UHPLC-fluorescence for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cold-pressed vegetable oils. *Food Chemistry*, 221, 809–814. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.098

Snyder, R. L., Kirkland. J. J., & Dolan W. J. (2010). *Introductıon to Modern Liquid Chromatography* Third Edition. Wiley.

Soylak, M., Unsal, Y. E., Kizil, N., & Aydin, A. (2010). Utilization of membrane filtration for preconcentration and determination of Cu(II) and Pb(II) in food, water and geological samples by atomic absorption spectrometry. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 517–521. https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.11.005

Stragierowicz, J., Daragó, A., Brzeźnicki, S., & Kilanowicz, A. (2017). Optimization of Ultra-Performance liquid chromatography (UPLC) with fluorescence detector (FLD) method for the quantitative determination of selected neurotransmitters in rat brain. *Medycyna Pracy*, 68(5), 583–591. https://doi.org/10.13075/mp.5893.00622

Swartz, M. E. (2005). UPLC : An Introduction and Review. *Journal of Liquid Cromatography & Related Technologies*, 28(7-8), 1253-1263.

https://doi.org/10.1081/JLC-200053046
Şahinbaş, H. D. (2011). *Katı Faz Ekstraksiyonu ile Bazı Metal İyonlarının Zenginleştirilmesi* (Tez No. 317991) [Yüksek lisans tezi, Erciyes Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.
Taleuzzaman, M., Ali, S., Gilani, S. J., Imam, S. S., & Hafeez, A. (2015). Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)–A review. *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry*, 2(6), 1056.
Thammana, M. (2016). A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Res. Rev. J. Pharm. Anal, 5(2), 22–28.
Vardar, N., Tasdemir, Y., Odabasi, M., & Noll, K. E. (2004). Characterization of atmospheric concentrations and partitioning of PAHs in the Chicago atmosphere. *Science of the Total Environment*, 327(1–3), 163–174. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.05.002
Varian. (2009). *HPLC Detector Options for the Determination of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons* [Application Note]. https://www.agilent.com/library/applications/lc07.pdf
Veiga, L. L. A., Amorim, H., Moraes, J., Silva, M. C., Raices, R. S. L., & Quiterio, S. L. (2014). Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted guaraná (Paullinia cupana) by high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector. *Food Chemistry*, 152, 612–618. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.154
Villar, P., Callejón, M., Alonso, E., Jiménez, J. C., & Guiraúm, A. (2004). Optimization and validation of a new method of analysis for polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge by liquid chromatography after microwave assisted extraction. *Analytica Chimica Acta*, 524(1-2 SPEC. ISS.), 295–304. https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.03.099
Wang, H., & Campiglia, A. D. (2008). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water samples by solid-phase nanoextraction and high-performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 80(21), 8202–8209. https://doi.org/10.1021/ac8014824
Waters. (2019). *Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Drinking Water by Liquid-Solid Extraction and High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection* [Application Note]. https://www.waters.com/content/dam/waters/en/app-notes/2008/720002731/720002731-es.pdf
Wegrzyn, E., Grześkiewicz, S., Popławska, W., & Głód, B. K. (2006). Modified analytical method for polycyclic aromatic hydrocarbons, using SEC for sample preparation and RP-HPLC with fluorecent detection. Application to different food samples. *ACTA Chromatographica*, 17, 233–249.
Wenzl, T., Simon, R., Anklam, E., & Kleiner, J. (2006). Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. *Trends in Analytical Chemistry*, 25(7), 716–725. https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.05.010
Williams, R., Meares, J., Brooks, L., Watts, R., & Lemieux, P. (1994). Priority pollutant PAH analysis of incinerator emission particles using HPLC and optimized fluorescence detection. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 54(4), 299–314. https://doi.org/10.1080/03067319408034096
Williamson, K. S., Petty, J. D., Huckins, J. N., Lebo, J. A., & Kaiser, E. M. (2002).

HPLC-PFD determination of priority pollutant PAHs in water, sediment, and semipermeable membrane devices. *Chemosphere*, 49(7), 703–715. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00394-6

Windal, I., Boxus, L., & Hanot, V. (2008). Validation of the analysis of the 15+1 European-priority polycyclic aromatic hydrocarbons by donnor–acceptor complex chromatography and high-performance liquid chromatography–ultraviolet/fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1212(1–2), 16–22. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.104

World Health Organization. (1998). *Selected Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. https://wedocs.unep.org/handle/20.500.11822/29533

World Health Organization. (2002). *World Health Report 2002: Reducing Risks, Promoting Life.* https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42510/WHR_2002.pdf

Wu, N., & Thompson, R. (2006). Fast and efficient separations using reversed phase liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 29(7–8), 949–988. https://doi.org/10.1080/10826070600574903

Yalaki, S. (2005). *Adana Merkez ve Kırsal Alanlarda Trafiksel Kaynaklı Organik Hava Kirleticileri ve Atmosferik Poliaromatik Hidrokarbonlar* (Tez No. 198093) [Yüksek lisans tezi, Çukuova Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.

Yang, Y., Dong, X., Jin, M., & Ren, Q. (2008). Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in natural tocopherols by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Chemistry*, 110(1), 226–232. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.062

Yavuz, O., & Aksoy, A. (2006). Örnek Hazırlamada Katı Faz Ekstraksiyonu Metodu. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, 20(3), 259-269

Yılmaz, F. (2017). *Kuru Çökelme ve Sıralı Yağmur Örneklerinde Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların ve Organoklorlu Pestisitlerin Araştırılması* (Tez No. 479180) [Yüksek lisans tezi, Abant İzzet Baysal Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.

Yusty, M. A. L., Gonzalez, J. L., Lozano, J. S. (2005). Resolution of 13 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Constant-wavelength Synchronous Spectrofluorometry. *Analytical Sciences*, 21, 1203-1206. https://doi.org/10.2116/analsci.21.1203

Zhang, H., Xue, M., & Dai, Z. (2010). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic products by HPLC-fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(5), 469–474. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.12.016